

Rekombináns és őssejtekben termeltetett TRAIL apoptotikus hatása rhabdomyosarcoma sejtekre

Doktori értekezés

Barti-Juhász Helga

Semmelweis Egyetem
Patológiai Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Peták István, tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Csóka Mónika, egyetemi docens, Ph.D.
Dr. Szondy Zsuzsa, egyetemi tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Fekete György, egy. tanár, az MTA doktora

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Kulka Janina, egy. tanár, Ph.D.
Dr. Orosz Zsolt, főorvos, Ph.D., Habil.

Budapest
2012

TARTALOMJEGYZÉK

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	4
2. BEVEZETÉS	6
2. 1. A Rhabdomyosarcomak és molekulárisan célzott terápiás lehetőségeik	6
2. 1. 1. A rhabdomyosarcomák rövid jellemzése	6
2. 1. 2. RMS sejtvonalak és egér modellek a gyógyszercélpontok felderítéséhez	7
2. 2. A TRAIL daganatellenes hatásának mechanizmusa	8
2. 2. 1. Bevezetés	8
2. 2. 2. TRAIL és receptorai	8
2. 2. 3. TRAIL és receptorai fiziológias és patológias funkciói	10
2. 2. 4. TRAIL és TRAIL-R-agonista ellenanyagok a klinikumban	12
2. 2. 5. TRAIL szignál	13
2. 2. 5. 1. A TRAIL-receptor komplex	13
2. 2. 5. 2. Az apoptózist indukáló szignálkomplex (DISC)	15
2. 2. 5. 3. Az apoptózis I-es és II-es típusú jelútja	17
2. 2. 5. 4. Nem-apoptotikus TRAIL szignálok	19
2. 2. 5. 5. Szolúbilis és membránkötött TRAIL	20
2. 2. 6. A TRAIL jelpálya érzékenyítése proteaszómagátlással	21
2. 3. A mesenchymalis őssejtek (MSC) daganatellenes hatásai	25
2. 3. 1 Bevezető	25
2. 3. 2. A mesenchymalis őssejtek alapjellemezői	25
2. 3. 3. Az MSC sejtek célzott vándorlása, „homingja”	28
2. 3. 4. Mesenchymális őssejtek hatása a daganatok növekedésre, progressziójára	29
2. 3. 5. Klinikai felhasználás szempontjai és a géntranszfer módjai MSC-be	30
2. 3. 6. Mesenchymális őssejtek, mint vektor sejtek, daganatölő gének hordozói lehetnek	32
3. CÉLKITŰZÉSEK	35

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK	36
4. 1. Vegyszerek	36
4. 2. Felhasznált vektorok	36
4. 3. hGHss-Furin-ILZ-TRAIL génkonstrukció készítése	39
4. 4. Sejtenyésztés és a kezelések menete	45
4. 5. Citocentrifugával készült sejtkenetek festése hematoxin-eosinnal	46
4. 6. MSC izolálás	46
4. 7. MSC sejtek differenciálódási potenciáljának vizsgálata	47
4. 8. MSC sejtek tranziens transzfekciója nukleofektor technológiával	48
4. 9. BM-MSC és RD daganatsejtek együtt-tenyésztése	48
4. 10. AD-MSC és HeLa sejtek együtt-tenyésztése	49
4. 11. Apoptotikus DNS-fragmentáció vizsgálata áramlásos citometriával	49
4. 12. Viabilitás vizsgálat áramlásos citometriával	50
4. 13. Immunfenotipizálás	50
4. 14. Western-blot analízis	51
4. 15. Denzitometrázás	51
4. 16. ELISA	52
4. 17. Matematikai és statisztikai analízisek	52
5. EREDMÉNYEK	53
5. 1. Szinergikus apoptózis-indukció rhabdomyosarcoma sejteken a TRAIL és bortezumib kombinált alkalmazásával	53
5. 1. 1. A TRAIL-kezelést túlélő RD rhabdomyosarcoma sejtekben megnő az endogén Bcl-2 fehérje szintje, amit proteaszóma gátlással meg lehetett akadályozni	53
5. 1. 2. A Bcl-2 fehérje overexpressziója TRAIL rezisztenssé teszi az RD sejteket, de ez a rezisztencia is kivédhető proteaszómagátlókkal	55
5. 1. 3. A bortezumib és a TRAIL kombinációja kaszpáz-függő apoptózis indukcióval kerüli meg a Bcl-2 gátló hatását	60
5. 1. 4. A TRAIL-rezisztens Rh41 alveoláris rhabdomyosarcoma sejtvonal is érzékenyíthető proteaszóma gátlással a TRAIL-indukált apoptózissal.	60

5. 2. TRAIL szekvenciákat tartalmazó vektor konstrukciók készítése és funkcionális összehasonlítása MSC sejtekben	62
5. 2. 1. A TRAIL vektorok létrehozása	62
5. 2. 2. Csontvelői mesenchymális őssejtek nukleofektálhatósága	65
5. 2. 3. A TRAIL vektorokkal nukleofektált MSC sejtek funkcionális jellemzése	66
5. 3. A teljes TRAIL-t kifejező csontvelői és zsírszöveti eredetű mesenchymalis őssejtek (MSC) daganatellenes hatásúak <i>in vitro</i>	69
5. 3. 1. TRAIL-termelő csontvelői eredetű mesenchymalis őssejtek (BM-MSC-TRAIL) gátolják az RD rhabdomyosarcoma sejtek számának növekedését	69
5. 3. 2. Zsírszövet-eredetű, retrovirálisan TRAIL transzdukált mesenchymalis őssejtek (AD-MSC-TRAIL) sejtelhalást indukálnak HeLa carcinoma sejtekben	71
6. MEGBESZÉLÉS	76
7. KÖVETKEZTETÉSEK	87
8. ÖSSZEFOGLALÁS	89
9. SUMMARY	90
10. IRODALOMJEGYZÉK	91
11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE	123
12. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	125

1. RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AD-MSC-	adipose tissue derived mesenchymal stem cell
BAX-	BCL2-associated X protein
BAK-	BCL2-antagonist/killer 1
BID-	BH3 interacting domain death agonist
BCL2-	B cell lymphoma protein 2
BM-MSC-	bone marrow mesenchymal stromal cell
Bzb-	bortezomib/PS-341/Velcade
c-FLIP-	cellular FLICE inhibitory protein
c-MYC-	celluláris myelocytomatosis onkogén
CRD-	cysteine rich domain
DA-PCR-	dual-asymmetrical PCR
DcR-	decoy receptor
DD-	death domain
DED-	death effector domain
DISC-	death-initiation signaling complex
DR-	death receptor
EDTA-	ethylenediaminetetraaceticacid-d12
EtBr-	ethidium bromide
FA-PCR-	full-length product amplification PCR
FACS -	fluorescence activated cell sorter
FADD-	Fas-associating death domain-containing protein
FAS/CD95-	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6
GFP-	green fluorescent protein
FADD-	Fas-associating death domain-containing protein
IKK-	I κ B- kinase
ILZ-	izoleucin zipper

IRES-	internal ribosomal entry site
JNK-	C-jun-N-terminalis kináz
LLnL-	N-Acetyl-L-leucinyl-L-leucinyl-L-norleucinal
MAPK-	mitogen activated protein kinase
MSC-	mesenchymal stroma / stem cell
NF-κB-	nuclear factor kappa B
OE-PCR-	overlap-extension PCR
PBS-	phosphate buffered saline
PCR-	polimeráz láncreakció
PI-	propidium iodide
PLAD-	pre-ligand assembly domain
RIP1-	receptor-interacting protein-1
RMS-	rhabdomyosarcoma
TNF-	tumor necrosis factor
TRAIL-	TNF related apoptosis inducing ligand
TRAIL-R-	TRAIL receptor
TRAF-	TNF receptor associated factor
Ucb-MSC-	Umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cell
z-VAD.fmk -	benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp(OMe)-fluoromethylketone
XIAP-	X-linked inhibitor of apoptosis protein

2. BEVEZETÉS

2.1. Rhabdomyosarcomák és molekulárisan célzott terápiás lehetőségeik.

2.1.1. A rhabdomyosarcomák rövid jellemzése

A rhabdomyosarcoma (RMS) vázizomra jellemző fehérjéket kifejező daganat, a lágyrész-sarcomák (soft tissue sarcoma, STS) egyik típusa. Felnőttekben igen ritkán fordul elő, gyermek- és ifjúkorban viszont a leggyakoribb lágyrészdaganat, az esetek mintegy harmadát-felét teszi ki (Slater and Shipley, 2007), az összes gyermekkori daganat 5-8 %-át. Gyakorisága a 20 év alatti korosztályban évenként 4,3 új eset /1 millió ember. Morfológia, klinikai lefolyás és molekuláris jellemzők szerint két fő típusba sorolhatók (Parham, 2001). Az embrionális RMS (ERMS) orsó alakú sejtekből áll, gyakran fej-nyaki területen, reproduktív és kiválasztó szervrendszerhez kötötten jelentkezik, ez a leggyakoribb típus, az esetek közel 60%-át teszi ki. Eredetét a vázizom megújulásáért felelős ún. szatelit sejtekhez (myocita progenitorok) kapcsolják (Hettmer and Wagers, 2010). Összehasonlító (komparatív) genomiai hibridizációval a közelmúltban mutatták ki, hogy az ERMS minták között jelentős számban (60%) fordul elő a 8 kromoszóma duplikációja, és ezen belül is a FGFR1 receptor amplifikációja (Williamson et al., 2010). A másik típus az alveoláris RMS (ARMS), amely gyakran apró kerek (limfoid leukémiára emlékeztető) sejtekből áll és elsősorban a törzs, a kéz és a láb izomzatában alakul ki. Jellegzetes kromoszómális átrendeződések találhatók bennük. Az esetek 70%-ban t(2,13) (q35;q14) transzlokáció eredményeként PAX3-FOXO1A fúziós gén keletkezik, ritkábban, az esetek 10%-ban a FOXO1A partnere a kromoszómális átrendeződésben a 1. kromoszómán lévő PAX7 transzkripció faktor génje.

Az általunk használt sejtvonalak közül az RD az egyik első izolált rhabdomyosarcoma sejtvonal (McAllister et al., 1969) embrionális típusba tartozik és ismert p53 mutációt hordoz. Az Rh-41 viszont ARMS sejtvonal, mely p53 deléciós mutáns és rezisztens a FAS és a TRAIL indukált apoptózisra is (Petak et al., 2000; Taylor et al., 2000).

2.1.2. RMS sejtvonalak és egér modellek a gyógyszer-célpontok felderítéséhez

A rhabdomyosarcomak kialakulását többféle egér modellben is vizsgálják. Ezek a modellek azon túl, hogy megvilágíthatják az RMS kialakulásának mechanizmusát segíthetnek új farmakológiai célmolekulák azonosításában is a humán terápia javítása érdekében (Keller and Capecchi, 2005). Az egyik ilyen modellben, amelyben a PAX3-FOXO1A fúziós transzgen mellett a p53 gén dominánsan negatív inaktivációját is alkalmazták, azonosítottak 7 db potenciális gyógyszer-célpontot (ú.n. „drugable” fehérjekinázokat), köztük egy Aurora és két Polo-like kinázt (Nishijo et al., 2009). Ezek a spontán daganatokat növesztő egér modellek közvetlen gyógyszer-tesztelési felhasználásra egyelőre nem alkalmasak. Költséges fenntartásuk mellett nem megoldott a daganatok növekedésének kvantitatív értékelése sem (Nishijo et al., 2009).

Preklinikai gyógyszer-tesztelési modellként néhány humán eredetű RMS sejtvonal egér xenograft modellje szolgál (Houghton et al., 2007). Ezeknek a sejtvonalaknak *in vitro* molekuláris vizsgálatával sikerült kimutatnia Peták István témavezetőnek és munkatársainak, hogy az általuk vizsgált mind a 7 RMS sejtvonalban kifejeződik a TRAIL-nek a DR5 (TRAIL-R2) receptora és egy részük (4 db) érzékeny a TRAIL-indukált apoptózisra (Petak et al., 2000). Ehhez kapcsolódóan a későbbiekben további eredmények születtek az RMS sejtvonalak TRAIL érzékenyítésével kapcsolatban (Izeradjene et al., 2004a; Izeradjene et al., 2004b; Petak et al., 2003). Peták és mtsai azt is kimutatták, hogy az RMS sejtvonalak TRAIL érzékenysége jól korrelál a kaszpáz 8 proteáz kifejeződési szintjével (Petak et al., 2000).

Ebből kindulva Kang és mtsai egy anti-DR5 antitest (drozitumab, vagy más néven apomab) hatását vizsgálták 11 RMS sejtvonalon *in vitro*, melyek mindegyikén kimutatták a DR5 expressziót, (a DR4 viszont csak szórványosan fejeződött ki rajtuk), és hasonlóan az előzőekhez erős korrelációt találtak a kaszpáz-8 expresszió és az anti-DR5 kezelésre való érzékenység között. Egér xenograft kísérletekben igazolták a drozitumab tumor ellenes hatását egy TRAIL érzékeny RMS sejtvonal esetén (Kang et al., 2011).

2. 2. A TRAIL daganatellenes hatásának mechanizmusa

2.2.1. Bevezetés

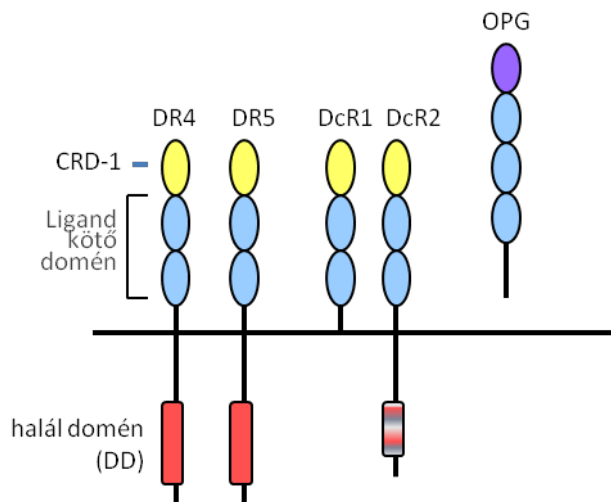
A TRAIL a TNF-családba tartozó fehérje, amely receptoraihoz kötődve közvetlenül aktiválja az ún. iniciátor kaspázokat és ezzel elindítja az apoptózis folyamatát. A TRAIL lehetséges klinikai alkalmazását a daganatellenes terápiában nagy várakozás kísérte, mert míg a normál szövetek rezisztensek voltak az apoptotizáló hatására, addig a daganatos sejtvonalak fele érzékenynek mutatkozott. A TRAIL monoterápiás kipróbálása nem hozott átütő eredményeket, de TRAIL-receptor agonista ellenanyagokkal helyettesítve, illetve kombinációban hagyományos daganatellenes szerekkel már előrehaladott klinikai fázisban próbálják kiterjeszteni az alkalmazási lehetőségeket. A TRAIL-receptorok által aktivált jelutak szabályozásának kutatása még intenzíven folyik. A jelút részletes felderítésétől olyan molekuláris markerek azonosítását remélhetjük, melyek segítségével a TRAIL hatását segítő kombinációs szerek határozhatók meg, illetve kiválasztható a kezelésre reagáló betegcsoport. Ehhez kapcsolódik a disszertációm első fele, amelyben proteaszómagátlással érzékenyítünk rhabdomyosarcoma sejteket TRAIL-re. A TRAIL daganatokhoz juttatásának módjára is sokféle próbálkozás zajlik. A rekombináns fehérje szisztémás (i.v.) adásán túl adenovirális és sejt-mediált célbajuttatási módszerek is kidolgozás alatt állnak. Ez utóbbihoz kapcsolódik disszertációm második fele, ahol mesenchymalis őssejtekben kifejeződő TRAIL hatásait vizsgáltam.

2.2.2. TRAIL és receptorai

A TRAIL-t (TNF-related apoptosis inducing ligand) a Fas-liganddal való homológia alapján két biotechnológiai cég kutatói egymással versengve azonosították és klónozták (Pitti et al., 1996; Wiley et al., 1995) Az egyik csoport TRAIL-nek a másik pedig APO-2 ligandnak nevezte el. A TRAIL egy II-es típusú transzmembrán fehérje, melyet egy (egyelőre nem azonosított) sejtfelszíni cisztein proteáz hasít le szolúbilis formára (Mariani and Krammer, 1998). Ennek a szolúbilis ligandnak (114-281 aminosav), a többi halál-ligandhoz hasonlóan, az aktív formája trimerizált, amit egy cink atom stabilizál a 230-as pozícióban található ciszteinekhez kapcsolódva (Bodmer et al., 2000; Trabzuni et al., 2000). A TRAIL expresszióját sok szövetben kimutatták a teljes szövetből nyert RNS-ből Southern blott technikával (lép, timusz, perifériás vér,

prosztata, ovárium, vékony- és vastagbél, tüdő) néhányban viszont nem volt detektálható (agy, máj) (Wiley et al., 1995). Funkcionális kifejeződését T, B, NK, és myeloid sejteken mutatták ki (Hayakawa et al., 2004; Janssen et al., 2005; Kemp et al., 2004; Lamhamedi-Cherradi et al., 2003; Simons et al., 2008).

A receptorok felderítéséhez a TNFR1 haláldoménjének szekvencia részletét használták, így találtak rá majd klónozták az első TRAIL receptort a DR4 / TRAIL-R1-et (Pan et al., 1997b). Ezt követően párhuzamosan több csoport is adatbanki keresést végzett a DR4 receptor TRAIL kötő részének szekvenciájával, ennek eredményeképpen írták le a DR5 /TRAIL-R2-t és annak két alternatív mRNS-ét (TRICK-A és TRICK-B) (Chaudhary et al., 1997; Pan et al., 1997a; Schneider et al., 1997; Screaton et al., 1997; Sheridan et al., 1997; Walczak et al., 1997).



1. ábra: A TRAIL receptorainak domén szerkezete. A teljes halál-doménnel (DD) rendelkező receptorok, a DR4 és a DR5 képesek apoptotikus jelet közvetíteni. Az ún. decoy vagy csali receptorok közül a DcR1 nem rendelkezik citoplazmatikus doménnel, lipid horgony köti a membránhoz, a DcR2 pedig csak részleges haláldomént tartalmaz. A receptorokat extracelluláris részükön cisztein gazdag domének (CRD) építik fel, melyek közül a membránhoz közeli CRD2 és CRD3 felelős a ligand kötésért, az N terminális végen elhelyezkedő, egyedi szerkezetű CRD1 a ligand-független receptor kapcsolódásért felelős. Az osteoprotegerin (OPG) egy dimer szekretált receptor forma.

Ezeket túl leírtak két csalétek (decoy, DcR) receptort melyek nem közvetítenek apoptotikus jelet, a DcR-1 /TRAIL-3-at, aminek hiányzik az intracelluláris doménje, egy glikozil-foszfatidil-inozitol horgony kapcsolja a membránhoz (Degli-Esposti et al., 1997; Pan et al., 1997a; Schneider et al., 1997; Sheridan et al., 1997), és a DcR-2-t, mely hiányos trunkált haláldoménnel rendelkezik (Degli-Esposti et al., 1997; Marsters et al., 1997; Pan et al., 1998). A DcR2 komplexbe kapcsolódhat TRAIL hatására a DR5-

tel és így befolyásolja annak jeltovábbítását, tehát szigorúan véve nem is csalétek-receptor (Lalaoui et al., 2011; Merino et al., 2006). Az ötödik TRAIL receptor az oszteoprotegerin (OPG), mely egy dimerként szekretált forma, szerepe csontfejlődést szabályozó hatásán kívül nem tisztázott (Emery et al., 1998; Simonet et al., 1997).

Nagy érdeklődést keltett a TRAIL-lel kapcsolatban az a megfigyelés, hogy normális sejtek nem, viszont számos tumorsejtvonal, illetve a vírussal fertőzött limfoblasztok érzékenyek TRAIL-indukált apoptózisra (Ashkenazi et al., 1999). A TRAIL ismételt intravénás beadása primáták szöveteiben és szerveiben nem bizonyult toxikusnak. Emellett *in vitro* számos tumorsejtvonalon, köztük vastagbél-, bőr-, emlő-, vese-, tüdőrák sejtvonalakon és egér xenograft kísérletekben is apoptózist indukált a tumorsejtekben (Ashkenazi et al., 1999).

A TRAIL tumorspecifikusságába vetett hitet megingatta az a közlemény, melyben hepatociták TRAIL-érzékenységét írták le (Jo et al., 2000). A kísérletekben exogén polihisztidin címkét („tag”) tartalmazó TRAIL variánsokat használtak. Más címkéssel ellátott TRAIL variánsok esetében is jelentkeztek problémák, az LZ-TRAIL keratinocitákra (Walczak et al., 1999), a Flag-TRAIL keratino- és hepatocitákra volt toxikus (Lawrence et al., 2001; Qin et al., 2001). A vizsgálatok arra mutattak rá, hogy ezek a TRAIL-variánsok diszulfid kötéssel, oxidált formában oligomerizálódnak és nem az optimális konformációt biztosító cink koordinációval, mely alapvető fontosságú a TRAIL stabilitása és aktivitása szempontjából, illetve a címkéssel ellátott TRAIL fajták hajlamosak nem oldható aggregátumokat képezni (Lawrence et al., 2001). Optimalizált, rekombináns TRAIL-lel végzett vizsgálatok szerint nem indukál szignifikáns sejtelhalást normál sejtekben, sem normál humán hepatocitákban *in vitro*, sem csimpánzokban *in vivo* (Lawrence et al., 2001), sem keratinocitákban *in vitro* (Qin et al., 2001).

2.2.3 TRAIL és receptorai fiziológiás és patológias funkciói

Egyre több részletet ismerünk meg a TRAIL fiziológiás és patológias szerepéről, melyek árnyalják a TRAIL daganatellenes felhasználásának lehetőségeit is.

A TRAIL és receptorai szerepet játszanak az immunrendszer, a vírushatások és a tumor-immunfelület (tumor immunesurveillance) szabályozásában (Falschlehner et al., 2009). Növekszik a TRAIL kifejeződés például monocitákon és

makrofágokon IFN- β és LPS hatására, míg IFN- γ hatására monocitákon, dendritikus sejteken és NK (természetes ölü) sejteken. Az NK sejtek TRAIL expressziója meghatározó szerepet játszik a daganatnövekedés IFN- γ függő gátlásában (Smyth et al., 2001). Hasonló képességet és szerepet tulajdonítanak a monocitáknak is (Griffith et al., 1999). TRAIL hiányos egérben egy B-sejtes lymphoma sejtvonal gyorsabban növekedett, mint normál egérben és a májjáttétek gyorsabb növekedése siettette az állatok pusztulását (Sedger et al., 2002). A TRAIL és TRAIL-receptor hiányos egerek tanulmányozása alapján úgy tűnik, hogy a lymphomák általában gyorsabban nőnek a génhányos, mint a normál egérben (Zerafa et al., 2005). Ugyanakkor a sporadikus emésztőrendszeri daganatok növekedését nem befolyásolja a TRAIL-receptor hiánya (Yue et al., 2005).

A TRAIL az antigén-specifikus T-sejtes immunválaszt is szabályozza. A Th2 típusú T-sejtek nagyobb mértékben expresszálják TRAIL-t, mint a Th1 típusú sejtek, ugyanakkor kevésbé érzékenyek a TRAIL- indukált apoptózisra is (Zhang et al., 2003).

A TRAIL szerepe a vírusok elleni immunválaszban is jelentős. HIV-1 infekció során INF α és β termelődik, és ez fokozza a CD4+ T-sejtek valamint a monociták TRAIL expresszióját a sejtek membránjában. A HIV-1 kötődése a CD4+ sejtekhez fokozza ezeknek a sejteknek a DR5 expresszióját és az in vitro keletkezett apoptotikus sejtek számát is növeli. A humán in vitro kísérletek alapján egyelőre csak feltételezik, hogy a TRAIL rendszer szerepet játszik az AIDS betegségre jellemző CD4+ sejtek számának a csökkenésben (Herbeuval et al., 2005).

A különböző daganatellenes terápiákban alkalmazott szerek vagy behatások (pl. gamma besugárzás) is részben a TRAIL-TRAIL-receptor aktiválódásán keresztül fejtik ki sejtölő képességüket. Erre példa, hogy TRAIL-receptor hiányos egér sejtjei kevésbé érzékenyek a besugárzás okozta apoptózisra, mint a normál egér sejtjei (Finnberg et al., 2005).

A TRAIL további patológiás funkciójára példa, hogy szerepe lehet az emphysema kialakulásában. A gyulladásozó sejtek által termelt TRAIL feltehetőleg hozzájárul az alveoláris epithel és endothel sejtek pusztulásához (Morissette et al., 2009).

2.2.4. TRAIL és TRAIL-R-agonista ellenanyagok a klinikumban

Számos biotechnológiai cég és gyógyszergyár fejlesztett termékeket TRAIL-alapú terápiákhoz (beleértve a DR4 és DR5 receptorok elleni humanizált agonista ellenanyagokat is), melyek napjainkban a klinikai kipróbálás különböző fázisaiban tartanak (Bellail et al., 2009).

A rekombináns humán TRAIL fehérjék közül a Genentech és az Amgen közös fejlesztése az rhApo2L vagy más néven dulanermin, amely előrehaladott szolid daganatok estében túljutott a fázis I kipróbáláson. Ez a készítmény a TRAIL extracelluláris doménjét (114-281 as) tartalmazza, cinkkel stabilizált biológiailag aktív trimer konformációban (mi is ezt használtuk a kísérleteinkben, saját előállításban) Az eredmények nem utalnak a mellékhatások esetében dózistól való függésre (0,5-30 mg/kg, egy óra alatt intravénásan, 5 egymást követő napon, 21 napos ciklusokban). Hetvenegy kezelt betegből két chondrosarcomás beteg esetében tapasztaltak tartósan részleges választ, és két sarcomás betegnél a daganat gyors lízise okozott súlyos mellékhatást (Herbst et al., 2010). A monoterápiás vizsgálatok mellett számos kombinációs kezelésben van a dulanermin előrehaladottabb klinikai vizsgálatban (Shirley et al., 2011). Nem-kissejtes tüdőcarcinomák esetében fázis I-ben 58% volt a reagálók aránya ha a dulanermin kombinálták paclitaxellel, carboplatinnal és bevacizumabbal (PCB), dulanermin nélkül viszont csak 35% (Soria et al., 2010). Fázis II vizsgálatban viszont már nem javított szignifikánsan a dulanermin a PCB kezelésen, nem szelektált betegcsoporton legalább is (Soria et al., 2011). A klinikumban fázis II-ben próbálják ki a DR4 vagy DR5 agonista humanizált egér, vagy teljesen humán ellenanyagokat is. Közülük a Human Genom Sciences terméke a HGS-ETR1 (anti-DR4, mapatumumab) és HGS-ETR2 (anti-DR-5, lexatumumab), az AMG 655 (anti-DR5, Amgen) és az Apomab (anti-DR5, drozitumab, Genentech) (Ashkenazi and Herbst, 2008; Shirley et al., 2011). A rekombináns TRAIL és a monoklonális ellenanyagok terápiás felhasználásában az egyik jelentős különbség az eltérő plazma félleletidő. A TRAIL citokin esetén ez igen rövid ($t_{1/2} \sim 30$ min) összevetve az agonista monoklonális ellenanyagok ~ 10 - 20 napos feleződési idejével (Oldenhuis et al., 2008). Klinikai felhasználását nehezíti a gyors vese-clearance ennek ellenére a TRAIL/Apo2L citokin erősebb anti-tumor aktivitást mutat *in vivo*, mint a monoklonális ellenanyagok (Kelley and Ashkenazi, 2004).

<i>Molekula</i>	<i>Gyártó</i>	<i>Cél</i>	<i>Jellemzés</i>	<i>Tumor típus</i>	<i>Klinikai státusz</i>
Apo2L/TRAIL	Amgene/ Genentech	DR4/5	rh TRAIL	CRC, O, L, M	fázis I
				NHL	fázis I/b
				NSCLC	fázis II
HGS-ETR1, (mapatumumab)	Human Genome Sciences	DR4	teljes humán MAb	vegyes	fázis I/II
HGS-ETR2 (lexatumumab)	Human Genome Sciences	DR5	teljes humán MAb	szolid tumorok	fázis I/II
LBY135	Novartis	DR5	humanizált MAB	szolid tumorok	fázis I
CS-1008 (TRA-8)	Daiichi Sankyo	DR5	humanizált MAB	vegyes carcinoma	fázis I
AMG 655	Amgen	DR5	teljes humán MAb	CRC, P	fázis I/II
Apomab (drozitumab)	Genentech	DR5	teljes humán MAb	szolid tumorok	fázis I/II

1. táblázat. Human rekombináns TRAIL-lel és DR4, DR5 agonista ellenanyagokkal végzett klinikai vizsgálatok. CRC: colorectalis carcinoma, O: ovarium, L: tüdő, M: myeloma, NHL: non-Hodgkin limfóma, NSCLC: nem kis sejtű tüdőrák, P: pankreasz

Azokra a preklinikai vizsgálatokra alapozva, melyek szerint a rhabdomyosarcoma (RMS) vonalak egy része rendkívül érzékeny a TRAIL-re illetve anti-DR5 antitestekre (drozitumab) (Kang et al., 2011; Petak et al., 2000), az RMS is része annak a Fázis I/II klinikai vizsgálatnak amely 2007-ben indult és gyermekkori sarcomák drozitumab kezelésének klinikai hatását vizsgálja az NIH/NCI szervezésében (<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT00428272?term=rhabdomyosarcoma+trail&rank=1>). A TRAIL és a TRAIL-R antagónista ellenanyagok hatásos daganatellenes klinikai felhasználása érdekében meg kell ismernünk a TRAIL-R-okhoz kapcsolódó jelpályákat, az érzékenyítő vagy rezisztenciát okozó molekuláris elemeket, hogy megfelelő diagnosztikai eljárással kiválaszthatók legyenek a terápiára alkalmas betegek vagy megfelelő kombinációs terápiával lehessen a rezisztenciát legyőzni.

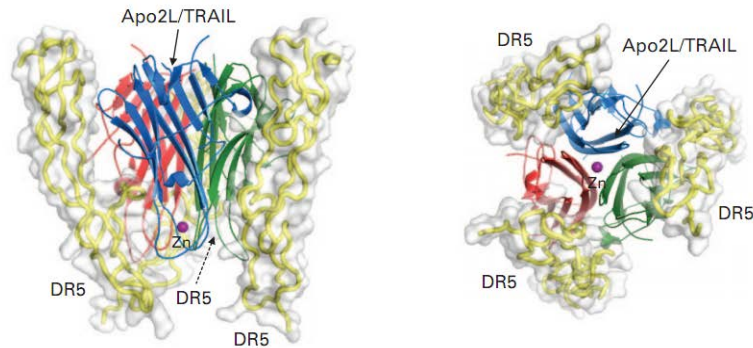
2.2.5. TRAIL szignál

2.2.5.1. A TRAIL-receptor komplex

A TRAIL által kiváltott másodlagos jelátviteli pályákról jó összefoglaló elemzések készültek a közelmúltban (Ashkenazi and Herbst, 2008; Gonzalvez and Ashkenazi, 2010; Mahalingam et al., 2009; Shirley et al., 2011; Yang et al., 2010).

A TRAIL-DR5 komplexet egy trimerizált ligand és három receptor alkotja. A DR5 extracelluláris doménje 3 cisztein gazdag doménből (cysteine-rich domain, CRD) áll, melyekben 6 cisztein 3-3 diszulfid hidat alkot. A TRAIL kötőhelyei a receptor

CRD2 és CRD3 doménjein helyezkednek el, a trimerizált ligand belesimul a monomer receptorok által képzett árokba (Hymowitz et al., 1999; Hymowitz et al., 2000).



2. ábra: A TRAIL–DR5 komplex szerkezete. A TRAIL (114-281 as.) trimer ligand (szalag-ábrázolás, kék, piros, zöld) és a DR5 receptorok extracelluláris doménjének (térkitöltéses megjelenítés) kapcsolódása röntgen-diffrakciós meghatározás alapján. Egy egyedi TRAIL ligand két DR5 receptorhoz is kapcsolódik, a trimer szerkezetet egy központi cink (Zn) atom stabilizálja (Ashkenazi et al., 2008).

A TNFR családban a ligand indukálta receptor trimerizációs modell széleskörben elfogadott jelenség. Azonban mind a Fas, mind a TNFR1 és TNFR2 receptor esetében leírtak ligand nélküli receptor trimerizációt is (Chan et al., 2000; Papoff et al., 1999). A megfigyelés alapján született egy alternatív modell, mely szerint a receptorok képesek kapcsolódni a ligandkötés hiányában is, a ligand-független oligomerizációs doménon (pre-ligand assembly domain, PLAD) keresztül. A PLAD a receptorok első CRD régiójában található és a monomerek kapcsolódását segíti elő. PLAD-függő kapcsolódást a DR4 és DR5 receptorok esetében is megfigyeltek (Clancy et al., 2005). Transzgenikus kísérletek eredményei szerint a DR4 és DR5 extracelluláris doménjei egymással és a DcR2-vel is kapcsolódhat, ami képes felbontani a DR4 és DR5 homotrimer struktúrákat, de ehhez hasonló heterotípiás ligand nélküli receptor-asszociációt endogén expressziós körülmények között még nem írtak le.

A TRAIL jelút elindulásának fontos szabályzója lehet a DR4 és DR5 receptorok poszttranszkripcionális módosítása glikoziláció vagy palmitoiláció révén. A DR4, DR5 O-glikozilációja szükséges a receptorok hatékony ligand indukált aggregációjához, ami ezt követően a DISC összeállásához és kaszpáz-8 aktivációhoz vezet. A DR5 receptor az extracelluláris doménjének specifikus helyein O-glikozilálódik. Ezek a konzervált

glikozilációs helyek megtalálhatók a DR4 receptoron is, de a Fas és TNFR1 receptorokról hiányoznak, így lehet a glikozilációnak szelektív hatása a TRAIL szignálra (Wagner et al., 2007). A daganatos sejtek TRAIL érzékenységének fontos biomarkerei lehetnek a specifikus O-glikozilációs enzimek, mint a GALNT3, GALNT14, FUT3, FUT6. A receptor palmitoiláció szintén részt vesz a halál-receptorok által indukált (extrinsic) apoptózis szabályozásában. A DR4 receptorok (de a DR5 nem) palmitoilált állapotban vannak a receptor transzmembrán- és haláldomén régiója közötti ciszteineken. A palmitoiláció farmakológiai gátlásával végzett kísérletek szerint a DR4 receptor palmitoiláció szükséges azok lipid raftokba rendeződéséhez és a ligand kötődést megelőző trimerek képzéséhez (Rossin et al., 2009). A DR5 receptor lipidáltságának hiánya részben magyarázhatja, miért szükséges a DR5-öt „erősebben” keresztkötni az apoptotikus jelpálya bekapcsolásához, mint a DR4-et: a lipid-tutaj (raft) lokalicáció hiányában a spontán receptorsűrűség alacsonyabb lehet DR5 esetében, mint DR4-nél és nehezebben alakul ki szolubilis TRAIL stimulusra az oligomerizált DISC „mező” (Scott et al., 2009), (lásd még **2.2.5.5 fejezet**).

2.2.5.2. Az apoptózist indukáló szignálkomplex (DISC)

A trimer ligandok kapcsolódásával aktivált DR4, DR5 receptorok intracelluláris haláldoménjei és a hozzájuk kapcsolódó fehérjék nagymolekulasúlyú komplexbe rendeződése eredményezi az apoptózist indukáló szignálkomplex (death initiation signal complex, DISC) létrejöttét. Az Apo2L/TRAIL-indukált DISC komponensei mára jól ismertek, a FAS DISC-jéhez hasonlóan oligomerizált receptorok, a FADD adaptor molekulák, kaspáz-8 és, vagy kaspáz-10 iniciátor kaspázok és esetenként a c-FLIP gátlófehérjék alkotják (Kischkel et al., 2000; Kischkel et al., 2001; Sprick et al., 2002; Sprick et al., 2000; Thome et al., 1997). A TRAIL-receptorok, a TNF receptorcsalád tagjaira jellemzően nem rendelkeznek enzimatis aktivitással, viszont a receptorok szignálkomplexében találunk katalitikus hatású fehérjéket, proteázokat, kinázokat, ubikvitin ligázokat. Konzervatív homológ fehérjeszerkezetek ún. homotípiás asszociáció révén biztosítják a kapcsolatot a molekulák között. A ligand bekötődés következményeként a DR4 és DR5 a FADD adaptor fehérjéhez kapcsolódik DD (death domain) interakción keresztül. A FADD rendelkezik DED (death effector domain) fehérjedoménnel is, melyek kapcsolatot teremtenek a kaspázok és az adaptor fehérjék

között. A TRAIL jelútjában a FADD-hoz DED-en keresztül a kaszpáz-8 és kaszpáz-10 és/vagy az antiapoptotikus c-FLIP molekula kapcsolódik (ld. **3. ábra**).

A c-FLIP az egyik legfontosabb haláldomént (DD) tartalmazó reguláló molekula a DISC-ben. A cFLIP splice variánsai közül hármát mutattak ki humán mintákban: két rövid variáns a c-FLIP_S és a c-FLIP_R és egy hosszú variáns a c-FLIP_L. A c-FLIP_S két tandem DED domént tartalmaz rövid C-terminális véggel és gátolja a receptor által közvetített apoptózist azáltal, hogy verseng a kaszpáz-8 és kaszpáz-10 molekulákkal a FADD-hoz kapcsolódásban. A c-FLIP_R esetleges szerepe a TRAIL jelútjában még nem ismert. A c-FLIP_L két DED domént tartalmaz az N- terminális részen és két inaktív kaszpáz-szerű domént is a C-terminálison. A kaszpáz-8 és kaszpáz-10 molekulákkal homológ szerkezetű, de az aktív centrumából hiányzik a kaszpáz működéshez szükséges katalitikus cisztein rész (Irmler et al., 1997; Thome et al., 1997). Ez a hosszú izoforma általában a kaszpáz-8-nál kisebb mennyiségben expresszálódik tumorsejtekben, a kaszpáz-8-cal együtt a DISC-hez kapcsolódik és gátolja az iniciátor kaszpázok aktivációját. A kaszpáz-8 aktiváció két lépésben zajlik, előbb dimerizálódik, majd hasítódik. Egy kaszpáz-8 molekula egy másik kaszpáz-8 közelébe kerül a DISC-ben a FADD-hoz kötődve autokatalitikusan hasítódik. A c-FLIP_S jelenlétében a prokaspáz-8 inaktív állapotban marad a DISC-ben és nem játszódik le apoptózis. A c-FLIP_L heterodimerizálódik a prokaspáz-8-cal a DISC-ben, aktiválja azt, de a hasítódása nem következik be (Micheau et al., 2002). A c-FLIP_L funkciója a DISC-ben összetett; túltermelése megvédi a sejteket az apoptózistól, túlélési utakat aktivál, mint az NF-κB- és a MAPK- szabályozta jelutak, másrészt a cFLIP-nek lehet proapoptotikus szerepe is, kaszpáz-8-c-FLIP_L heterodimerként, ami a kaszpáz-8 aktivációját segíti elő a DISC-ben (Chang et al., 2002; Micheau et al., 2002). Úgy tűnik a kettős funkció között a c-FLIP_L kaszpáz-8-hoz viszonyított relatív szintje dönt, ha magas a szintje a kaszpáz-8-hoz képest, akkor az anti-apoptotikus hatása érvényesül, a DISC-ben kompetál a kaszpáz-8 és -10 molekulákkal, ha a relatív mennyisége alacsonyabb, akkor heterodimerizálódik a kaszpáz-8-cal és -10-zel és támogatja az apoptózist.

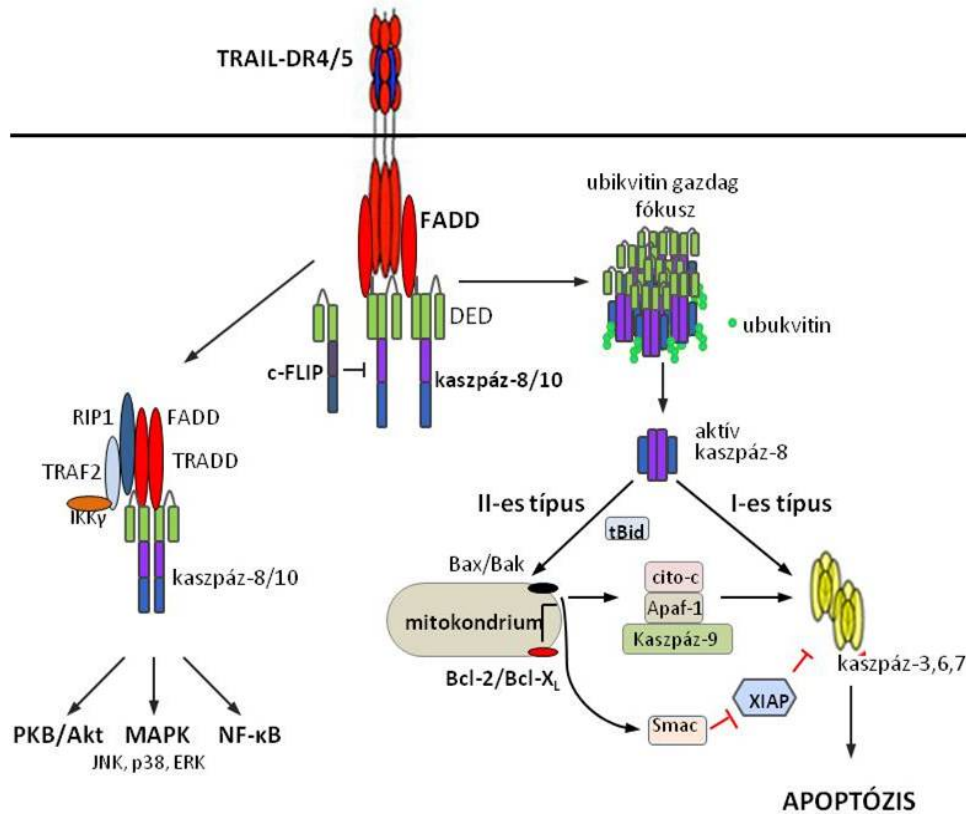
A kaszpáz-8 poliubikvitinálódása szükséges az aggregációjához és a teljes aktivációhoz. A DISC-ben a kaszpáz-8 kapcsolatba kerül a CUL3/ Rbx1 E3 proteaszóma ligáz enzimmel, ami a kaszpáz-8 C terminális részének poliubikvitinálódását katalizálja. Expressziófokozó és csendesítéses vizsgálatok

eredményei szerint a Cul3/Rbx1 E3 ligáz kaszpáz-8 ubikvitilációt és a TRAIL jelútjának aktivációját segíti (Jin et al., 2009). A poliubikvitinált kaszpáz-8 az ubikvitinkötő sequestosome/p62- fehérjével lép kapcsolatba, melynek hatására a kaszpáz-8 molekulák a DISC-et elhagyva intracelluláris ubikvitin-gazdag fókuszokban csoportosulnak. Ez az áthelyeződés növeli a kaszpáz-8 lokális koncentrációját és elősegíti a teljes aktivációját. A DISC-ben aktiválódott és szolubilizált kaszpáz-8 és -10 közvetlenül proteolitikusan aktiválhatja a kaszpáz-3-at, ami további végrehajtó kaszpázokat aktivál, kaszpáz-6-ot és -7-et, melyek működésének hatására lezajlik az apoptózis.

2.2.5.3. Az apoptózis I-es és II-es típusú jelútja

Az I-es típusú sejtekben a DISC-ben elegendő mennyiségű kaszpáz-8 aktiválódik, ami közvetlenül aktiválja a végrehajtó kaszpázokat, legyőzve az antiapoptotikus XIAP hatását. Egyes sejttípusokban a DR4, DR5 által iniciált apoptózishoz szükség van az ún. belső (intrinsic) apoptotikus jelút bekapcsolódására is, mely során a mitokondrium intermembrán teréből szabadulnak ki fontos aktiváló fehérjék. Ezeket a sejtvonalakat Krammer és munkacsoportja II-es típusú sejteknek nevezte el és először a FAS/FASL rendszer kapcsán figyelték meg (Peter and Krammer, 1998; Scaffidi et al., 1998). A II-es típusú sejtekben az aktiválódó kaszpáz-8 mennyisége nem elegendő a kaszpázaktivációs kaszkád elindításához, az XIAP ellenében, ezért további jelerősítő mechanizmusra, a mitokondriális út bekapcsolására van szükség (Jost et al., 2009; Kaufmann et al., 2012).

Ennek során a kaszpáz-8 hasítja a Bid-et (BH3 jellegű Bcl-2 családba tartozó fehérje), létrehozva a tBid-et, ami ezután kapcsolódik a molekulacsalád másik proapoptotikus tagjához a Bax-hoz vagy Bak-hoz (Li et al., 1998) (ld. 3. ábra). A kapcsolódás során konformáció változás történik, ami hozzájárul a mitokondriális pórusok formálódásához (MOMP, mitochondrial outer membrane permeabilization) (Luo et al., 1998). Fontos különbség, hogy a Bcl-2 fehérje csak a II-es típusú sejtekben képes gátolni a receptor által indukált sejthalált, I-es típusúakban nem. Az I-es és II-es típusú sejtek molekuláris eltéréseire két magyarázat is született.



3. ábra: A TRAIL receptorai által aktiválódó molekuláris jelpályák. A sejt felszínén a DR4 és DR5 receptorok trimerekbe rendeződnek a PLAD doménen keresztül. A homotrimer TRAIL ligand kapcsolódásával a receptorok nagy molekulásúlyú komplexekbe rendeződnek. A receptorok intracelluláris részéhez kapcsolódik a FADD, a kaszpáz-8 és kaszpáz-10 vagy a gátló c-FLIP, létrehozva a DISC-et. A DISC a membránban lipid szigetekben helyezkedik el és a citoskeletonhoz kapcsolódik. A kaszpáz-8-at a cullin-3/Rbx1-based E3 ubikvitin ligáz komplex ubikvitinálja, az A20 enzim pedig deubikvitinálja. Az ubikvitin kötő p62 fehérje az ubikvitinált kaszpáz-8-hoz kötődik és azt intracelluláris ún. ubikvitin gazdag fókuszokba szállítja, ami szükséges a kaszpáz-8 intenzív aktivációjához (szolubilizált tetramer). Az I-es típusú sejtekben elegendő mennyiségű kaszpáz-8 aktiválódik, ami közvetlenül aktiválja a kaszpáz-3, 6 és 7 végrehajtó kaszpázokat (kaspázkaskád) olyan magas intenzitással, amelyet az XIAP fehérje már nem győz megakadályozni. A II-es típusú sejtekben a kaszpáz-8 aktivitás alacsonyabb intenzitással próbálja begyűjtani a kaszpázkaskádot, amit az XIAP fehérje még képes blokkolni. Ekkor átveheti a kaszpázkaskád begyűjtésének feladatát a mitokondriális jelpálya. A kaszpáz-8 hasított Bid (tBid) akumulálódik (a proteaszómális lebontása ellenére) a mitokondriumba transzlokálódik, ahol a Bax és Bak proapoptotikus molekulákon keresztül a mitokondrium külső membránjának permeabilizációjához vezet. A mitokondriumból kiszabaduló fehérjék egyrészt az XIAP fehérjét semlegesítik (Smac, HTRA-2), másrészt további iniciátor kaszpáz aktivitást generálnak (citokrom C az apoptozómával). A mitokondriális úton az apoptotikus szignált a Bcl-2 család proapoptotikus és antiapoptotikus tagjai szabályozzák. A II-es típusú sejtekben a mitokondriális utat gátolva Bcl-2 vagy Bcl-X_L overexpresszióval elmarad az apoptózis folyamatának lezajszódása. A TRAIL kapcsolódva a receptorához a kaszpázkaskádon kívül intracelluláris kinázkaskádot is elindíthat, mint az IKK, JNK, p38 MAPK, és PKB/Akt úvonalak. Ebben az esetben egy intracelluláris ún. II-es komplex jön létre, melynek alkotói a FADD, TRADD, kaszpáz-8, kaszpáz-10, Rip1 TRAF2 és IKK- γ . Ezek pro- és anti-apoptotikus szignálokat aktiválnak.

Az egyik szerint a II-es típusú sejtekben a c-FLIP heterotípiás kapcsolódása a kaszpáz-8-cal gátolja a a kaszpáz-3 aktiváláshoz szükséges szolúbilis, proteolitikusan teljesen aktív kaszpáz-8 megjelenését, viszont nem akadályozza a Bid hasítását.

A c-FLIP magas szintjét különböző daganattípusokban is leírták, vastagbél karcinómában, melanómában, pankreász karcinómában, Burkitt limfómában (Elnemr et al., 2001; Ryu et al., 2001).

A másik elmélet szerint az antiapoptotikus XIAP-nak van döntő szerepe, a II-es típusú sejtekben ugyanis a XIAP fehérjék gátlás alatt tartják a végrehajtó kaszpázokat és az XIAP antagonistá Smac fehérje mitokondriumból történő kiszabadulására van szükség a kaszpázkaszád belobbanásához (Jost et al., 2009). Az elméleteket összegezve egy adott sejtben c-FLIP és a kaszpáz-8 illetve a XIAP és a Smac aránya együttesen döntheti el, hogy I-es vagy II típusú lesz a TRAIL indukálta apoptózis.

2.2.5.4. Nem-apoptotikus TRAIL szignálok

A TRAIL szignál a végrehajtó kaszpázok aktivációján túl, mely apoptózis lezajlásához vezet, nem apoptotikus utakat is képes elindítani, mint az NF- κ B, protein kináz B (PKB)/ Akt, és a MAPK útvonalak (Chaudhary et al., 1997; Sheridan et al., 1997). Míg az apoptózis molekuláris mechanizmusa mára jól ismert, annak részletei hogyan képes a TRAIL befolyásolni a sejt túlélését vagy proliferációját még több ponton kérdéses. A receptor és a ligand kapcsolódásának következtében kialakuló membránkötött DISC disszociál és létrejön egy második komplex, mely már nem tartalmazza a receptort és a ligandot (ld. 3. ábra). Erről az intracelluláris II-es komplexről, melynek eddig ismert alkotói a RIP-1, TRAF2, kaszpáz-8, FADD, TRADD, IKK- γ , indulnak el a túlélési útvonalak, melyek transzkripciós faktorokon keresztül fejtik ki hatásukat (Degli-Esposti et al., 1997; Jin and El-Deiry, 2006; Varfolomeev et al., 2005).

TRAIL indukált NF- κ B aktiváció: az NF- κ B dimer formájú transzkripció faktor számos olyan gén transzkripcióját befolyásolja, amely az öröklött és szerzett immunválasz során, stresszhatásra, apoptózisban és proliferáció során aktiválódik. A TRAIL a TRAIL-R1, TRAIL-R2 és érdekes módon a DcR-2 receptorokon keresztül aktiválja az NF- κ B útvonalat (Degli-Esposti et al., 1997; MacFarlane, 2003). A DISC-ben jelenlévő RIP-1 aktiválja a NIK kinázt, ami az IKK1-ből és IKK2-ből álló IKK komplexet

foszforilálja és aktiválja (Malinin et al., 1997). Az I κ B a citoplazmában tartja az NF- κ B-t, míg az IKK komplex által foszforilálódik és fokozódik a proteolitikus lebontása a proteaszómán keresztül. A gátlás alól felszabaduló NF- κ B bejut a sejtmagba, ahol aktiválja célgénjeit. A TNF jelúttal ellentétben a TRAIL esetében a TRAF2 szerepe az NF- κ B szignálban nem teljesen tisztázott. Egyrészt a TRAF2 deléciós mutáns formája erősen gátolja a TRAIL-R1, TRAIL-R2 és a DcR-2 indukált NF- κ B aktivációt (Hu et al., 1999), másrészt a TRAF2 hiányos egér embrionális fibroblasztokban normális a TRAIL szignálja (Lin et al., 2000). A halálreceptorok működése szempontjából fontos, hogy az NF- κ B elősegíti számos anti-apoptotikus fehérje, köztük a cIAP-1/2, XIAP, cFLIP, Bcl-X_L expresszióját (Wajant, 2004). Ezek közül a cFLIP-nek központi a szerepére már utaltam a TRAIL-indukált apoptózis szabályozásában. Proteaszómagátlók alkalmazása esetén az I κ B nem degradálódik és inaktív állapotban tartja az NF- κ B-t. Ez egy lehetséges módja a TRAIL rezisztens sejtek érzékenyítésének, de nem minden esetben elégséges az NF- κ B gátlás a TRAIL-en keresztüli apoptózis lejátszódásához (Ganten et al., 2005). TRAIL rezisztens cholangiocarcinoma sejtek esetén TRAIL kezelés hatására az NF- κ B jelút aktiválódott és a tumor invázióját és áttétképzését segítette (Ishimura et al., 2006). Érdekes módon az NF- κ B csendesítése ezekben a sejtekben nem állította vissza a TRAIL érzékenységet, de teljesen megszüntette a TRAIL által kiváltott inváziót és migrációt. A TRAIL klinikai felhasználásának szempontjából tehát igen fontos lenne pontosan felderíteni a TRAIL által kiváltott NF- κ B aktiváció mechanizmusát és annak hatásait.

2.2.5.5. Szolúbilis és membránkötött TRAIL

Újabban kimutatták, hogy a DR4 és DR5 receptorok jelút aktiváló képessége között különbségek vannak. DR4 és DR5 specifikus ellenanyagok antigén-kötő fragmentumaival (Fab) végzett kísérletek szerint a DR4 receptor mind a szolúbilis, mind a membránkötött liganddal aktiválható, a DR5 receptor ezzel szemben csak a membránkötött vagy ellenanyaggal másodlagosan keresztükötött szolúbilis formával aktiválható (Wajant et al., 2001).

Emellett különbségek vannak a DR4 és DR5 receptorok és azokon keresztül a TRAIL szolúbilis, ellenanyaggal keresztükötött szolúbilis illetve membránkötött változatának aktiváló képessége között. A szolúbilis TRAIL azoknak a sejtvonalaknak

az apoptózis indukciójához elég, melyekben a DR4 és a DR5 specifikus ellenanyag is hatásos. Ezekben a sejtvonalakban az IL-6 szekréció és az NF- κ B aktiváció kiváltható keresztkötött, nem keresztkötött TRAIL-lel és mindkét receptor specifikus ellenanyagával is. Azonban a keresztkötött szolúbilis TRAIL azoknak a sejtvonalaknak az apoptózis indukciójához szükséges, melyekben csak a DR5 specifikus ellenanyag okoz sejthalált. A c-Jun N-terminal kináz (JNK) aktiváció pedig csak keresztkötött szolúbilis TRAIL vagy anti-DR5 ellenanyag használatakor figyeltek meg.

Összességében elmondható, hogy a DR4 a keresztkötött és nem-keresztkötött szolúbilis TRAIL hatására aktiválja az apoptózist és az NF- κ B jelutat ezzel szemben a DR5 receptor esetén az apoptózis, az NF- κ B és a JNK jelút aktiválódhat a keresztkötött vagy membránkötött TRAIL jelenlétében (Muhlenbeck et al., 2000).

2.2.6. A TRAIL jelpálya érzékenyítése proteaszómagátlással

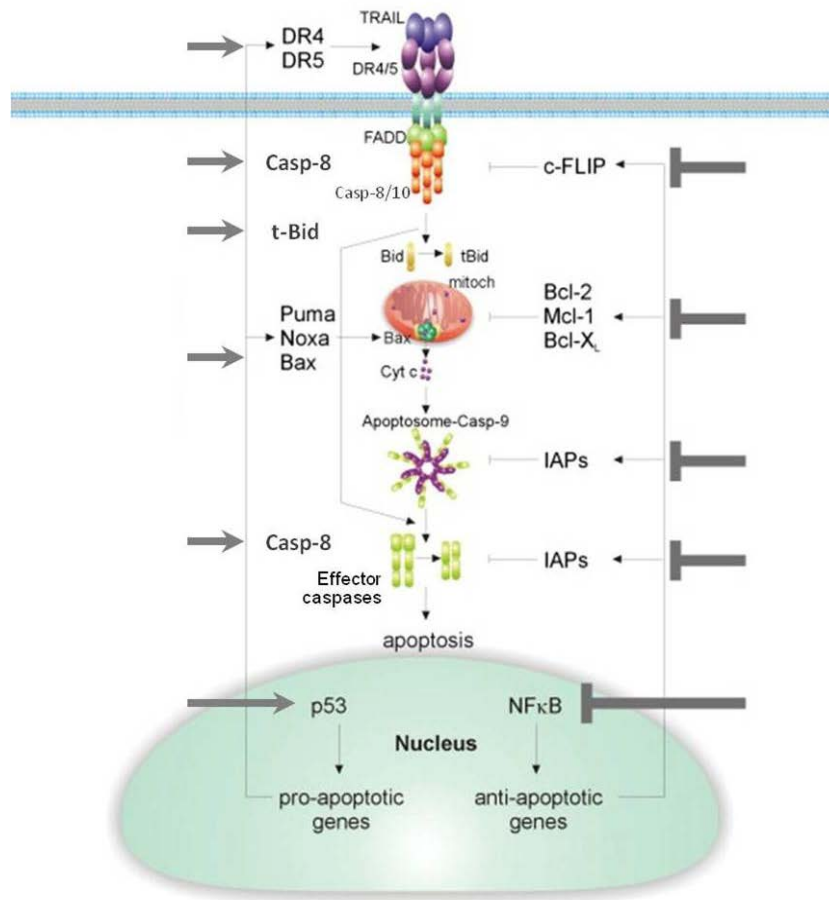
Az ubikvitin-proteaszóma rendszer alapvető és igen sokrétű szerepet tölt be a sejt biokémiai folyamataiban. A proteaszóma gátlása minden sejttípusban erős stresszt okoz (ezáltal chaperon fehérjék termelését indukálja) (Nagy et al., 2005). A daganatsejtek különösen érzékenyen reagálhatnak a proteaszómális fehérje lebontás csökkenésére. Ennek a háttérben is, a TRAIL-érzékenységhez hasonlóan, a transzformáció során kialakuló molekuláris változások állhatnak. Melanómákban például proteaszómagátlás (bortezomib) hatására jelentősen emelkedett a c-Myc fehérje mennyisége. A c-Myc domináns transzkripciós szabályozó faktora a Bcl-2 családba tartozó Noxa génnek. A Noxa, mint BH3 típusú fehérje a mitokondrium permeabilitását idézi elő olyan sejtekben, ahol az Mcl-1 az elsődleges gátlója a Bak aktivitásának (Fennell et al., 2008).

A proteaszómagátlásnak (rhabdomyo)sarcoma sejtekre kifejtett hatásáról csak nagyon szorványos adatok állnak rendelkezésre. Metasztatikus sarcomákkal végzett bortezomib kezelés fázis II vizsgálata szerint minimális specifikus hatást értek el, 25 betegből 1 reagált részlegesen (leomyosarcoma) (Maki et al., 2005). Egy preklinikai *in vitro* és *in vivo* vizsgálat szerint RMS sejtvonalakban alacsony (13-26 nM) koncentrációjú bortezomib kaspáz-mediált apoptózist és növekedésgátlást indukált (Bersani et al., 2008).

<i>Cél</i>	<i>Proteaszóma gátló</i>	<i>Tumor típus</i>	<i>Szerző</i>
Bik, Bim	PS-341	prosztata (4) és emlő (1) carcinoma	(Nikrad et al., 2005)
Bik,	PS-341, MG132	vastagbél carcinoma(2)	(Zhu et al., 2005a)
Bax	PS-341	B sejtes lymphoma (4)	(Liu et al., 2008)
smac	EPO, MG132, PS-341	vastagbél carcinoma (RKO)	(Nagy et al., 2006)
Bcl-2 Mcl-1	EPO, MG132 PS-341	T sejtes lymphoma (Jurkat)	(Nencioni et al., 2005)
Bcl-2, Bcl-xl	PS-341	anaplastikus thiroid carcinoma (3)	(Conticello et al., 2007)
Noxa	PS-341	neuroblasztoma	(Naumann et al., 2011)
DR5	MG-132	prosztata carcinoma (1)	(Yoshida et al., 2005)
DR5	MG-132	vastagbél carcinoma (HCT116)	(He et al., 2004)
DR5	PS-341	fej-nyak carcinoma (HC-4)	(Johnson et al., 2003)
DR5	PS-341	NSCLC	(Liu et al., 2007)
DR5	PS-341	NSCLC	(Voortman et al., 2007)
DR5	MG-132, EPO	glioma (4)	(Hetschko et al., 2008)
DR5	PS-341	prosztata carcinoma	(Kandasamy and Kraft, 2008)
c-FLIP	PS-341	astrocytoma	(Koschny et al., 2007)
c-FLIP	PS-341	myeloid leukemia (egér)	(Sayers et al., 2003)
c-FLIP	PS-341	Hodgkin lymphoma	(Zhao et al., 2008)
kaspáz-8	PS-341	prosztata carcinoma	(Thorpe et al., 2008)
XIAP	MG-115	(primer)	(Leverkus et al., 2003)
XIAP	MG 115, MG132	hepatocelluláris carcinoma	(Inoue et al., 2006)
XIAP	PS-341	Hodgkin lymphoma	(Kashkar et al., 2007)
NF-KB	PS-341	NSCLC	(Voortman et al., 2007)
NF-KB	PS-341	pankreász carcinoma (2)	(Khanbolooki et al., 2006)
DR5	MG-132	rhabdomyo- (1), fibro - (1), chondro- (1), synovialsarcoma (1)	(Cheong et al., 2011)
-	PS-341	Ewing's sarcoma (5)	(Lu et al., 2008)
-	MG-132	Ewing's sarcoma (8)	(Van Valen et al., 2000)

2. táblázat: Proteaszómagátlás érzékenyítő hatása a TRAIL-indukált apoptózisra. A leírt célmolekulák és a vizsgált daganatos elváltozások listája. A táblázatban szereplő vizsgálatok *in vitro* történtek, a tumor típusa a felhasznált sejtvonal eredetét jelzi (Fulda 2011, alapján).

Az első klinikumban is használatos proteaszómagátló a peptid-boronátok közé tartozó bortezomib (PS341/Velcade), melyet az FDA (Food and Drug Administration, USA) regisztrált myeloma multiplex és a köpenysejtes limfóma kemoterápiás kezelésére (Kane et al., 2003). A bortezomib előnye a korábban használt gátlószerekhez képest, hogy nagymértékben specifikus és reverzibilis, így a citotoxikus hatásai mérsékeltebbek (Richardson and Mitsiades, 2005). Számos vizsgálat támasztja alá a bortezomib tumorelles hatását elsősorban hematológiai daganatokban (Orlowski and Zeger, 2006) és bizonyos szolid tumorok kezelésében (Ludwig et al., 2005) önmagában és kemoterápiás szerekkel kombinációban.



4. ábra: Proteaszómagátlás hatása a TRAIL apoptotikus jelpályáira. A kiemelt proteinek proteaszómagátlás miatti mennyiségi változásai érzékenyítik a sejteket a TRAIL-indukált apoptózisra: a baloldalon kiemelt proteinek mennyisége növekedhet (nyíl), a jobboldalon kiemelt proteinek mennyisége csökkenhet (ütközőjel) bortezomib hatására (Mahalingam et al, 2009).

Ha a bortezomib daganatellenes hatása lassú is vagy nem kifejezett, olyan változásokat eredményezhet a sejtek molekuláris összetételében, amelyek növelni tudják más daganat ellenes szerek hatékonyságát, többek között TRAIL-ét is, kombinációban használva. A TRAIL és a bortezomib együttes daganatellenes hatása, több szinten, az apoptózis külső halálreceptor mediált útján és a belső mitokondriális úton is érvényesül ((Fulda, 2011) (ld. **4. ábra, 2. táblázat**). A bortezomib hatását a mitokondriális útra eddigi ismeretek szerint a Bim és/vagy Bik fehérjék akkumulációján (Nikrad et al., 2005; Zhu et al., 2005a), a Bax lebomlásának gátlásán (Liu et al., 2008), a Smac mitokondriumból citoszólba áramlásán (Nagy et al., 2006) és a tBid stabilitásának növelésén (Fulda, 2011) keresztül fejti ki.

A bortezomib használatakor, önmagában vagy TRAIL-el kombinációban, bizonyos anti-apoptotikus fehérjék, mint a Bcl-2, Bcl-X_L vagy az Mcl-1 hasítódnak vagy termelődésük gátlódik (Conticello et al., 2007; Nencioni et al., 2005). A proapoptotikus Noxa, melynek szintjét, ahogy már említettem, növeli a bortezomib transzkripció útján, egyes esetekben csak az apoptózis kinetikáját gyorsítja fel TRAIL használata mellett, nem az érzékeny sejtek arányát növeli (Naumann et al., 2011).

A bortezomib a DR4 és DR5 receptor számának növelésével (Hetschko et al., 2008; Kandasamy and Kraft, 2008; Liu et al., 2007; Voortman et al., 2007), a DISC kialakulásának elősegítésével (Koschny et al., 2007), a c-FLIP molekula expressziójának csökkentésével (Sayers et al., 2003; Zhao et al., 2008) és a kaszpáz-8 bomlásának gátlásával (Thorpe et al., 2008) hat az apoptózis külső útjára. Emellett a bortezomib gátolja az NF- κ B túlélési faktor aktivációját, ezen keresztül pedig a XIAP termelődését csökkenti, így is érzékenyítve a TRAIL indukált apoptózisra (Kashkar et al., 2007; Voortman et al., 2007)

A TRAIL és a proteaszómagátlás szinergizmusáról sarcoma sejtekben három vizsgálat született. Két közlemény számol be Ewing sarcoma sejtvonalakról (Lu et al., 2008; Van Valen et al., 2000) és a közelmúltban egy közlemény jelent meg más sarcoma vonalak mellett egy RMS sejtvonal felhasználásával (Cheong et al., 2011)

A proteaszómagátlás tehát vagy tucatszámú molekuláris komponens megváltoztatásán keresztül érzékenyítheti a különböző daganat-sejttípusokat TRAIL-indukált apoptózisra. A szinergia molekuláris mechanizmusa erősen függ(het) a daganattípusoktól illetve a transzformáció molekuláris hátterétől és valószínű, hogy számos esetben több összetevője is lehet.

2. 3. A mesenchymalis őssejt (MSC) daganatellenes hatásai

2.3.1. Bevezető

A mesenchymalis őssejteket vagy más néven multipotenciális strómasejteket (mesenchymal/multipotential stem/stromal cells, röviden MSC sejtek) ma már felhasználják a regeneratív orvoslásban köszönhetően annak, hogy multipotens differenciálódási képességgel rendelkeznek, viszonylag könnyen hozzáférhetőek és *in vitro* kultúrában egyszerűen szaporíthatóak (Charbord, 2010; Nombela-Arrieta et al., 2011; Tolar et al., 2010). Az a tulajdonságuk, hogy képesek a tumorba illetve annak környezetébe vándorolni, felveti annak a lehetőségét, hogy ezeket a sejteket genetikai módosításuk után tumorelles molekulák célbajuttatására használjuk (Ciavarella et al., 2011; Grisendi et al., 2011). Korábban az MSC sejtek regenerációs hasznosulását abban látták, hogy azok a sérült szövetbe vándorolnak (homing), tartósan megtelepednek és megfelelő szöveti sejté differenciálódnak. Mostanra kiderült az is, hogy a közvetlen betelepítés mellett (vagy helyett) az MSC sejtek akár távoli szövetekből is képesek egyfajta karmesterként, főleg a citokin szekréciós profiljukon keresztül irányítani, fokozni a szövetek, a szervezet saját regenerációs képességét, illetve befolyásolni a daganatok progresszióját is (Kiss et al., 2008; Lee et al., 2009; Prockop et al., 2010).

Ebben az irodalmi áttekintésben az MSC sejtek rövid jellemzése után a daganatellenes terápiában felmerülő lehetséges szerepüket elemzem az irodalom áttekintésével (a regeneratív hatást csak érintve) arra keresve a választ, hogy milyen szoros kapcsolatba (távoli humorális, közeli parakrin vagy sejt-sejt kontaktus) kell kerülnie az MSC sejteknek a daganat sejtekkel (szövettel), hogy daganatellenes hatásukat kifejtsék.

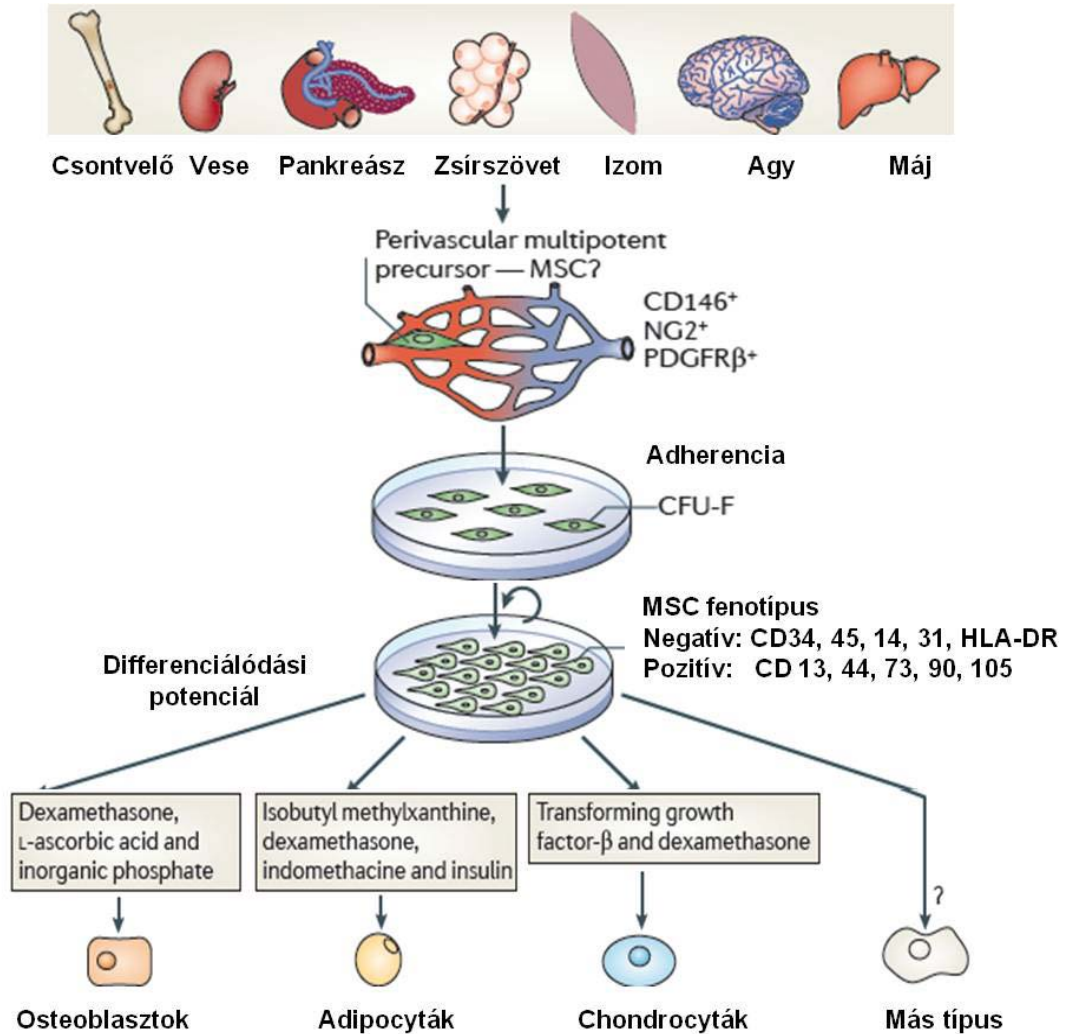
2.3.2. A mesenchymalis őssejtek alapjellemezői

A mesenchymális őssejteket Friedenstein és mtsai írták le először az 1960-as években, mint csontvelőből izolálható és *in vitro* kultúrában tenyészhető, fibroblaszt-szerű morfológiát mutató kolóniaképző sejteket (Friedenstein et al., 1966). Mára kiderült, hogy a csontvelő mellett számos magzati és felnőtt szervben előfordulnak hasonló tulajdonságú sejtek, így magzatburokban, magzatvízben és magzati szövetekben (Campagnoli et al., 2001; in 't Anker et al., 2003), izomban (da Silva Meirelles et al., 2006; Hegyi et al., 2010), szívben, zsírszövetben, perifériás vérben

(Zvaifler et al., 2000), bőrben (Toma et al., 2001) kötőszövetekben (De Bari et al., 2001). Úgy tűnik gyakorlatilag minden szerv, ami tartalmaz kötőszövetet, MSC-ket is tartalmaz. Gyakoriságukat a csontvelőben 1: 10⁵- 1: 10⁶-ra becsülik.

A mesenchymalis őssejtek nem képesek korlátlan számú önfenntartó osztódásra, az osztódások során öregszenek, a plaszticitásuk lecsökken, majd nagyjából 40 osztódás után szenescenssé válnak, leáll a szaporodásuk. Mesenchymalis őssejtek több forrásból nyerhetőek, legjobb hatékonysággal csontvelő aspirátumból izolálhatók. Zsírszövetből és köldökzsinórból friss köldökzsinór vérből 30-63%-os hatékonysággal, lényegesen kisebb hatékonysággal (19,5%) fagyasztással konzervált köldökzsinórvérből, (Kern et al., 2006; Rebelatto et al., 2008) (Bieback et al., 2004) A szöveti őssejtek között a legtöbbet vizsgált és legjobban karakterizált csoport. Általában elmondható, hogy az őssejtek azonosítása nem köthető egyetlen vagy kisszámú felszíni marker megjelenéséhez. Valójában igen nehéz meghatározni, milyen sejteket nevezünk mesenchymalis őssejteknek és hogyan tudjuk őket megkülönböztetni a belőlük származó fibroblastoktól és pericitáktól. A human MSC pozitív a következőkre: CD10, CD13, CD29 (β1-integrin), CD44, CD49e (α5-integrin), CD54 (ICAM-1), CD58, CD71, CD73 (SH3), CD90 (Thy-1), CD105 (SH2/endoglin), CD146, CD166, CD271, vimentin. Gyengén expresszálják: HLA I osztályú antigéneket, CD123-mat. Emelett negatív az alábbiakra: CD14, CD34, CD45 hematopoetikus markerek, CD31 (endotheliális markerek), CD40, CD80, CD86, human leukocytá antigén (HLA)-DR, és más HLA II osztályú antigének. A mesenchymális őssejtekkel foglalkozó munkacsoportok különböző markereket tartanak fontosnak és egymástól eltérő egyéb kritériumokat állítottak föl az izolált és tenyésztett sejtek karakterizálásához. Ezért szükség volt egységes definíció felállítására, így 2006-ban az International Society for Cellular Therapy ajánlást tett közzé mely szerint mesenchymális őssejt az, ami egyidejűleg megfelel az alábbi három kritériumnak (Dominici et al., 2006):

- Adherensek
- ≥95%-ban expresszálják MSC specifikus markereket (CD105, CD73, CD90) és hiányoznak róluk (≤ 2 % pozitív) a hematopoetikus/endotheliális markerek
- Csont-, porc- és zsírsejteké egyaránt képesek differenciálódni



5. ábra: MSC: mesenchymalis őssejtek avagy multipotenciális stromasejtek. Számos szövetből kinyert adherens sejtfrakció tartalmaz stromális progenitor sejteket, melyek fibroblaszt-szerű morfológiával rendelkező kolóniákat (CFU-F) alkotnak. Ezek a klónok huzamos ideig tenyészthetők anélkül, hogy elveszítenék multipotenciális képességüket. Klasszikusan ezeket a sejtenyészeteket nevezik MSC-nek. Ezek a sejtek megfelelő körülmények között differenciálódhatnak specifikus mesenchymalis sejttípusok irányába, illetve egyes eredmények szerint más típusú: izom, endotél, neuronális irányba (még vita tárgya, hogy ezeknek a progenitorai azonosak-e tripotenciális klasszikus MSC sejtekkel) (Nombela-Arrieta et al., 2011)

A mesenchymalis őssejtek gyakorlatban könnyen hozzáférhetőek, izolálhatóak majd szövettenyészetben könnyen fenntarthatóak. Izolálásuk ma is adherenciájukon alapszik. A kultúrából a nem adherens vértképző sejtek mosással egyszerűen eltávolíthatóak, a megmaradt sejtek fibroblaszt-szerű morfológiával rendelkező kolóniákat (CFU-F) képeznek. A morfológiailag többé-kevésbé homogénnek tűnő, exponenciálisan növekedő sejtenyészetet, ami már nem tartalmaz vértképző elemeket,

tekintjük MSC sejt kultúrájának. Az ilyen tenyészetekben mindig történik spontán differenciáció is, így egy heterogén, mesenchymalis őssejtekből és a belőlük képződött tri- bi- és unipotens elődsejtek keverékéből álló sejt kultúrát kapunk (Baksh et al., 2004).

2.3.3. Az MSC sejtek célzott vándorlása, „homingja”

Az MSC sejteknek ismert tulajdonsága, hogy képesek *in vitro* transwell migrációs esszében tumorsejtekhez, *in vivo* állat modellekben pedig primer és metasztatikus tumorba vándorolni (Khakoo et al., 2006; Kim et al., 2008; Loebinger et al., 2009; Menon et al., 2007; Nakamizo et al., 2005). Ennek körülményei még nem teljesen tisztázottak, legerőteljesebb hatásnak a daganatok mikro környezetében felszabaduló kemotaktikus anyagok csalogató hatása látszik. A daganatok számos olyan kemokint és citokint termelnek, melyek receptorai a mesenchymalis őssejtek felszínén megtalálhatók, ezek között az epidermális növekedési faktort (EGF), vaszkuláris endotheliális növekedési faktor-A (VEGF-A), stómális növekedési faktor (stromal-derived growth factor-1 α /SDF-1- α /CXCL12), IL-8, IL-6, granulocita-macrophág kolónia stimuláló faktor, Ang1, monocita kemoattraktáns protein-1 (CCL2), hemopoetikus növekedési faktor, transzformáló növekedési faktor β -1 (TGF- β) és az urokináz típusú plazminogén aktivátor (Feng and Chen, 2009; Studeny et al., 2004; Wels et al., 2008). A tumorhoz vándorlás szabályozása az MSC sejtek esetében hasonló lehet a leukociták migrációjához. Mind a P-szelektin, mind a vaszkuláris adhézis molekula-1 is meghatározza az MSC sejtek endothéliumhoz kapcsolódását (Ruster et al., 2006). A leukociták migrációjában fontos molekulákat, integrineket, szelektineket, kemokin receptorokat (CCR1, CCR4, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR4, CXCR5, CXCR6, CXCR1) az MSC-k is expresszálnak felszínükön (Ringe et al., 2007; Von Luttichau et al., 2005). A haematopoetikus sejtek migrációjában fontos CXCL12 – CXCR4 ligand-receptor páros szerepét MSC-k esetében még nem tisztázták. Wynn és kollégái (Wynn et al., 2004) megnövekedett CXCR4 expresszióról számolnak be, inkább intacellulárisan, mint sejt felszínén, mások nem tudtak CXCR4 expressziót detektálni MSC-ken (Von Luttichau et al., 2005), illetve a CXCR4 blokkolása nem volt hatással az MSC-k migrációjára. Nehezíti a specifikus migráció részletes megismerését az a megfigyelés, hogy *in vitro* kultúrában tartva az MSC sejteket, azokon csökkenhet a

kemokin receptor expresszió, a vizsgálatban 2 ill 12-16 passzázsos átesett MSC-k kemokin receptor expresszióit hasonlították össze (Honczarenko et al., 2006).

2.3.4. Mesenchymális őssejtek hatása a daganatok növekedésre, progressiójára

A terápiás céllal a szervezetbe juttatott MSC sejtek növekedésgátló és stimuláló hatással is lehetnek a már meglévő daganatokra. Általánosan használt modell szerint humán MSC sejtek keresik a kapcsolatot az egérben növő humán daganatokkal. Az MSC sejteket a tumor környékére (intra vagy peritumorálisan) vagy szisztémásan (intravénásan, i.v.) injektálják az egérbe. Egyes vizsgálatok szerint az i.v. bejuttatáskor az MSC sejtek túlnyomó többsége (>90%-a) az egér tüdő alveoláris kisereiben kitapad, illetve beszorul a sejtek nagysága miatt. A sejteknek csupán néhány százaléka kerül kemotaktikus hatásra a sérült vagy daganatos szövetbe (Lee et al., 2009). A bejuttatott és tüdőben kitapadt, megrekedt MSC sejtek parakrin módon, egy gyulladásgátló citokin termelésén (TSG-6) keresztül is képesek távoli gyulladásokat megfékezni (pl. infarktus után a szívizom károsodását csökkenteni (Prockop and Youn Oh, 2012), vagy corneában a gátolni a szövetkárosodást (Roddy et al., 2011). Az MSC sejtek szervezetbe juttatásával kapcsolatban is felmerül a kérdés, hogy az MSC sejtek daganattellenes vagy a daganattámogató hatásukat az egér modellekben vajon szintén parakrin módon fejtik ki, vagy közvetlenebb, sejt-sejt kontaktust igényel-e valamelyik hatás.

Khakoo és mtsai vizsgálatai szerint *in vivo* Kaposi szarkóma modellben az intravenásan beadott csontvelői eredetű hMSC letelepszik a tumorban ill. környezetében és közvetlen sejt-sejt interakción keresztül gátolja annak növekedését (Khakoo et al., 2006). Szintén az MSC-k közvetlen sejtkontaktust igénylő hatását írtak le B16 melanoma modell esetén a tumor növekedésének gátlásakor. A modellben az MSC sejtek daganattellenes funkciójához rés-kapcsolat (gap junction) szükséges a célsejttel (Otsu et al., 2009). Ugyanakkor szolúbilis faktor-mediált daganatgátlást figyeltek meg pankréász tumor modellben, ahol a zsírszövet eredetű MSC parakrin módon fejtette ki hatását. Az MSC sejtek és az MSC-vel kondicionált médium egyaránt csökkentette a tumorsejtek viabilitását és proliferációját. A szolúbilis faktor megfelelő hatásának eléréséhez ebben az esetben is az MSC-eket közvetlenül a daganatba kellett beadni (Cousin et al., 2009).

Másrésről a mesenchymalis őssejteknek stimuláló hatása is lehet a daganat növekedésére, amit a leírások szerint az MSC elsősorban parakrin módon fejt ki. A daganatok növekedését segítheti az MSC-k szolúbilis faktorokon keresztül kiváltott immunszupresszió hatása (Djouad et al., 2003), proliferáció serkentő (Zhu et al., 2006) vagy apoptózist gátló (Shinagawa et al., 2010; Yu et al., 2008), érzékszervi serkentő hatása (Galie et al., 2008; Muehlberg et al., 2009), valamint leírták CCL5 kemokin termelést MSC-kben, ami elősegítette emlőrák-sejtek metasztázis képzését (Karnoub et al., 2007).

Klopp és mtsai összefoglalójukban arra mutatnak rá, hogy azoknak a modelleknek többségében, ahol tumor segítő hatást írtak le magasabb az MSC - tumor sejtek aránya, mint a tumor növekedést gátló esetekben. A daganatnövekedést illetve a progressziót kimutató közleményekben gyakrabban fordul elő, hogy a szerzők zsírszövetből származó MSC sejteket alkalmaznak, mint a daganatgátlást felmutatók esetében. Az epidemiológiailag alátámasztott adatok szerint elhízással kapcsolatba hozható a daganatok progressziója és egy elmélet ennek hátterében a zsírszövetből kivándorló mesenchymalis strómasejtekre hívja fel a figyelmet (Zhang et al., 2010).

2.3.5. Klinikai felhasználás szempontjai és a géntranszfer módjai MSC-be

Őssejterápiás próbálkozások kapcsán mindig felmerül a daganat keletkezés veszélye. Felkeltette a figyelmet néhány megfigyelés, melyek szerint a hosszabb ideig szövettényészetben tartott és stressznek kitett MSC-k a transzformáció jeleit mutatták (Rubio et al., 2005). Több esetben is fény derült azonban arra, hogy az MSC transzformációra vezető kísérletekben valódi daganatsejtekkel átfertőzött MSC kultúrákból indultak ki és az eddigi klinikai gyakorlat sem igazolja az aggodalmakat (Torsvik et al., 2010).

Állatkísérletek és klinikai vizsgálatok igazolják, hogy az MSC-k allogén (a faj genetikailag eltérő másik egyede) esetenként xenogén (másik faj egyede) recipiensbe oltva sem váltanak ki immunválaszt (hipoimmunogének) (Mansilla et al., 2005). *In vitro* és *in vivo* is megfigyelhető immunszupresszív hatással rendelkeznek. Izolált majd szövettényészetben tartott MSC-k az immunválaszban fontos szerepet játszó sejtek mindegyikét, T- és B-lymphocyták, hivatásos antigén bemutató sejtek (APC) és az NK-sejtek funkcióját is gátolják *in vitro* (Kiss et al., 2008).

Másik sarkalatos kérdés a biztonságos klinikai felhasználást illetően, hogy a transzfektált gén hatására vagy a bevitel módjának hatására kialakul-e nem kívánt genetikai változás a gazdaszervezetben. A mesenchymalis őssejtek *in vitro* genetikai manipulációja virális és nem virális módon történhet. A primer sejtek így a mesenchymalis őssejtek is nehezen transzfektálhatók a klasszikus nem-virális módszerekkel, mint a kalcium foszfát precipitáció, mikroinjektálás, lipofekció, és az elektroporáció. Ezek a módszerek lassan osztódó sejteknél nehezen használhatóak, magas a sejtek mortalitása, így kevésbé hatékonyak, mint a virális módszerek. Vírus eredetű rekombináns vektorokat elterjedten használják primer sejteknél célzott gén transzfer esetén. Jelenleg az adenovírus, lentivírus, retrovírus rendszerek a leggyakrabban használtak. A vírus vektorok előnye a velük elérhető nagy transzfekciós hatékonyság, akár nem osztódó sejtek esetén is, hátránya, hogy időigényes a vektor előállítása, magas biztonsági előírásokat kell betartani különösen humán sejtek esetén, rekombináns lentivírus használatakor limitált a bevihető inzert mérete, és a klinikai felhasználás során immunreakció alakulhat ki (Thomas et al., 2003). A retrovírus transzfekció klinikai felhasználásának nagy veszélye a gazdaszervezetben kialakuló genetikai változás, az onkogenetikus hatás a vektor beépülése során. Rekombináns retrovírusok használatát követően leírtak a gazdaszervezetben lezajló onkogén folyamatokat (Nair, 2008). A retrovírus vektor kiválasztásánál, mint elsődleges veszélyforrást, fontos figyelembe venni a vektor beépülési helyét.

Az általunk is használt nukleofekció egy új nem-virális transzfekciós technika primer sejtek és nehezen transzfektálható sejtek számára. Az elektroporációt kombinálja a kémiai transzfekció módszerével, a plazmid DNS-t vagy oligonukleotidot (siRNA) sejtípus függő pufferoldattal és pulzusparaméterrel juttatja közvetlenül a sejtmagba. Ez a transzfekciós eljárás nem igényel sejtosztódást, így magas transzfekciós hatékonyságot biztosít primer sejtek esetén is. A technikát sikeresen alkalmazták NK- és monocytá sejt vonalak esetében (Maasho et al., 2004; Martinet et al., 2003), embrionális őssejteken, csontvelői és zsírszövet eredetű-mesenchymalis őssejteken is (Lakshmiathy et al., 2004; Zaragosi et al., 2007). A módszer hátránya a magasabb költségek (nukleofektor készülék és a specifikus kit, pufferoldattal és küvettával) és a nukleofekció során indukált sejtpusztulás.

2.3.6. Mesenchymális őssejtek, mint vektor sejtek, daganatölő gének hordozói lehetnek

Annak ellenére, hogy a génterápia alkalmazása daganatos megbetegedésekben számos előnnyel járhat, ez máig alig kiaknázott terület. A klinikai felhasználás két fő akadályba ütközik, egyrészt a megoldatlan a vektor tumorhoz juttatása, másrészt a kiváltott immunválasz szab határt az alkalmazásnak. A mesenchymalis őssejtek, az előzőekben leírtak szerint mindkét problémára megoldást kínálhatnak, így az MSC sejteket módosítva daganatellenes anyagok szállítására lehetnek alkalmasak.

<i>Szerző</i>	<i>Tumor modell</i>	<i>MSC forrása</i>	<i>Terápiás molekula</i>	<i>Bejuttatás</i>
(Studený et al., 2002)	Melanóma	BM-MSC	INF-beta	i.v.
(Studený et al., 2004)	emlő carcinoma	BM-MSC	INF-beta	i.v.
(Ren et al., 2008b)	Prosztata c., tüdő metasztázis	BM-MSC	INF-beta	i.v.
(Ren et al., 2008a)	Melanóma, tüdő metasztázis	BM-MSC	INF-alfa	i.v.
(Cavarretta et al., 2010)	Glioblasztóma	AD-MSC	CD-UPRT	i.v.
(Matuskova et al., 2010)	Glioblasztóma	AD-MSC	TK	i.t. és i.v.
(Kucerova et al., 2008)	Melanóma	AD-MSC	CD-UPRT	i.v.
(Kucerova et al., 2007)	Vastagbél carcinoma	AD-MSC	CD-UPRT	i.v.
(Zischek et al., 2009)	Pankreász carcinoma	BM-MSC	TK	i.v.
(You et al., 2009)	Gyomor carcinoma	BM-MSC	CD-UPRT	i.v.
(Gao et al., 2010)	Vese carcinoma	BM-MSC	IL-12	i.v.
(Duan et al., 2009)	Ewing sarcoma	egér BM-MSC	IL-12	i.v.
(Elzaouk et al., 2006)	Melanóma	BM-MSC	IL-12	i.v.
(Yuan et al., 2006)	Glióma	BM-MSC	IL-23	i.v.
(Nakamura et al., 2004)	Glióma	BM-MSC	IL-2	i.t.

3. táblázat: MSC, mint daganatellenes vektor sejt. Különböző transzgenikusan expresszált terápiás molekulák szállítására alkalmas MSC-k daganatellenes hatásának *in vivo* vizsgálatai. (BM-MSC: bone marrow mesenchymal stromal cell, AD-MSC: adipose tissue derived mesenchymal stem cell, CD-UPRT: Cytosine deaminase-uracil phosphoribosyl transferase, TK: tirozin kináz, i.v.: intravénás, i.t.: intratumorális)

Az MSC-k szállítósejtekként való felhasználása olyan gének alkalmazását is lehetővé teszi, melyekről expresszáldó termékek egyértelműen daganatellenes hatásúak, viszont szisztémás adásukat megakadályozza a toxicitásuk vagy rövid féléletidejük. Az alábbi táblázatban foglalom össze az elmúlt évek számos próbálkozását, melyben az MSC sejteket daganat ellenes gén expressziójára.

Számos állatmodellben, gliómában, metasztatikus melanómában, mell- és prosztata rákban az IFN β -t termelő MSC gátolta a tumorsejt növekedést, csökkentette a tumor méretét és növelte az állat túlélését (Nakamizo et al., 2005), míg a megemelt szisztémás IFN β szint nem volt hatásos. Az IL-12 szekretáló MSC-vel is szignifikáns terápiás hatást értek el és hasonlóan az előzőhöz ez is csak lokális termelés esetén teljesült (Eliopoulos et al., 2008). Az IL-2 és IL-12-t termelő MSC-k immunválszt képesek kiváltani és növelik a tumorszövetet infiltráló gyulladásoos sejtek számát.

<i>Szerző</i>	<i>Tumor típus</i>	<i>MSC forrása</i>	<i>TRAIL-típusa</i>	<i>Bejuttatás</i>
Kim SM 2008	Glióma	Ucb-MSC	szekretálódó trimer TRAIL	i.t.
Sasportas LS 2009	Glióma	BM-MSC	szekretálódó trimer TRAIL	i.t.
Menon LG 2009	Glióma	BM-MSC	szekretálódó trimer TRAIL	i.c.
Mohr A 2010	Pankreász tumor	egér BM-MSC	szekretálódó trimer TRAIL	i.v.
Yang B 2009	Glióma	BM-MSC	teljes-TRAIL	i.t.
Loebinger ML 2009	Emlő rák tüdő meta	BM-MSC	teljes-TRAIL	i.v.
Choi SA 2011	Glióma	AD-MSC	teljes-TRAIL	i.t.
Mueller LP 2011	Vastagbélrák	BM-MSC	teljes-TRAIL	s.c.

4. táblázat: TRAIL-t hordozó MSC sejtmodellek *in vivo*. Szekretálódó és teljes-TRAIL-t kifejező MSC sejteket juttattak a jelzett módon (i.v.: intravénásan, s.c.: bőr alá (peritumorálisan), i.t: intratumorálisan, i.c:intracraniálisan) humán xenotranszplantált daganattípust hordozó egerekbe.

TRAIL halálligandot expresszáló MSC-eket is használtak már tüdő-, emlő-, vastagbélrák, és glióma modellben, ahol szignifikáns *in vivo* daganatellenes hatást értek el vele. TRAIL esetében az is kérdés, hogy transzgenként vajon a teljes (full)-TRAIL daganatba juttatása hatásosabb terápia vagy az extracelluláris, lehasított rész (114-281 as) szekretálható formája. A szekretálódó TRAIL esetében az az általános eljárás, hogy az extracelluláris részt kibővítik egy trimerizációra alkalmas ILZ doménnel (Kim et al., 2008; Menon et al., 2009; Sasportas et al., 2009). Ezt a formát gyakran alkalmazzák *in*

vivo glióma modellekben. Más *in vivo* szoliddaganat- modellekben viszont inkább a teljes-TRAIL szekvenciát juttatják be a daganatokba MSC sejtekbe csomagolva (Grisendi et al., 2010b; Loebinger et al., 2009; Mohr et al., 2008; Mueller et al., 2011). Egyelőre nem született szisztematikus összehasonlító tanulmány arról, hogy a két TRAIL változat mekkora eltérést okozna, ha szállítóként MSC sejteket használnánk

Viszont már történt egy összehasonlító vizsgálat, ahol adenovírussal juttatták be a két formát glióma sejtekbe *in vitro*, majd nem fertőzött glióma sejtekkel együtt transzplantálva egérben figyelték meg a daganat növekedését. Mindkét TRAIL változat regressziót okozott, de a szolúbilis TRAIL hatásosabbnak mutatkozott (Kim et al., 2006). Egy másik kutatócsoport viszont azt találta, hogy szolúbilis, rekombináns (ILZ domén nélküli) TRAIL-re rezisztens colorectális daganatok egy csoportja apoptotikusan érzékeny az MSC-vel felkínált teljes-TRAIL-re (Mueller et al., 2011). Lehetséges, hogy glióma sejtek esetében az elegendő mennyiségben rendelkezésre álló szolúbilis TRAIL is képes megfelelően oligomerizálni és aktiválni a TRAIL receptorait. Más típusú daganat modellekben, mind rhabdomyosarcomák, viszont érdemes elvégezni ilyen összehasonlító vizsgálatokat.

3. CÉLKITŰZÉSEK

1. Rhabdomyosarcoma sejtvonalak estén a szolúbilis TRAIL[114-281] (dulanermin) hatásának javítását szeretnénk elérni a rezisztencia lehetséges mechanizmusainak feltárásával és a rezisztencia felfüggesztését eredményező kombinációs kezelések alkalmazásával.

a.) Észrevettük, hogy a TRAIL-nek ellenállóbb RD rhabdomyosarcoma sejtekben emelkedett a Bcl-2 protein kifejeződése. Azt kérdeztük, hogy vajon az RD sejtek esetében Bcl-2 termelődése valóban rezisztencia tényező-e.

b.) A proteaszóma magproteázainak gátlásával lehetséges-e a Bcl-2 közvetítette apoptózis-rezisztencia felfüggesztése rhabdomyosarcoma sejtekben?

c.) Másfajta, TRAIL-receptor közeli rezisztenciával rendelkező rhabdomyosarcoma sejtvonalak TRAIL-érzékenységét is fokozni lehet-e proteaszómagátlással?

2. TRAIL expresszáló mesenchymalis őssejtek (MSC-TRAIL) hatásának vizsgálata daganatos MSC sejtek előállítására csontvelőből és zsírszövetből.

a.) A trimerizációs doménnel rendelkező szekretálódó és a teljes TRAIL génkonstrukciók elkészítése.

b.) Nukleoporációs technika alkalmazása MSC sejtek esetén és a bevitt TRAIL gén expressziójának vizsgálata.

c.) A TRAIL- expresszió apoptotikus hatása az MSC sejtekre és a velük közös sejt kultúrában tartott daganatsejtekre (RD rhabdomyosarcoma és HeLa carcinoma).

d.) Proteaszómagátlás hatása az MSC sejtekre a maga termelte és a kívülről adott rekombináns TRAIL jelenlétében.

e.) Az MSC-TRAIL sejtek daganatellenes hatása sejt-kontaktus nélkül (transwell kísérletekben).

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4. 1. Vegyszerek

N-acetyl-L-leuciny-L-leuciny-L-norleucinal (LLnL) proteaszómagátló szert a Sigmától rendeltük a bortezomib (PS-341 vagy velcade) Millenium Inc. (Cambridge, USA) ajándéka volt. Kaszpáz proteázok gátlására z-Val-Asp-fluoromethylketone-t (z-VD.fmk; Bachem, Svájc) használtunk. A felsorolt vegyszerek mindegyikéből dimethylsulfoxide-ban (DMSO, Sigma-Aldrich) készítettük el a törzsoldatot, amelyeket -20°C-on tároltunk, majd a kezeléseknél tenyésztőmédiumban a megfelelő végkoncentrációra hígítottunk úgy, hogy a DMSO mértéke nem haladta meg a 0.1%-ot. A rekombináns TRAIL (aa.114-281) előállítását bakteriális rekombináns fehérje expressziós rendszerrel végeztük (Petak et al., 2003). Az általunk használt műanyagárak Sarstedt, Corning és Eppendorf termékek voltak.

A primereket és a génkonstrukció készítésére szánt oligonukleotidokat az Invitrogen-től rendeltük, a reakciókhoz a Platinum Pfx és Platinum Taq DNS polimeráz (Invitrogen) enzimet használtuk. A PCR termékek gélelektroforéziséhez az agarózt és az ethidium-bromide-ot a Sigmától rendeltük, BlueJuice mintafelvívő puffert (Invitrogen) és 100 bp DNS létrát (Invitrogen) használtunk. A PCR termékek tisztítása a Montage PCR kitettel (Millipore) történt. A kész PCR termékeket klónozásához Zero Blunt Topo klónozásos kitet (Invitrogen), a termeltetéshez pcDNATM3.1/V5-His TOPO[®] TA expressziós kitet (Invitrogen) használtunk. A transzformációt TOP10 E.Coli törzssel végeztük (Chemically Competent Cells; Invitrogen), a klónokat tartalmazó baktériumok szelekcijához ampicillin vagy kanamycin (Sigma) antibiotikumot használtunk.

4. 2. Felhasznált vektorok

pCR-Blunt II-TOPO vektor (Invitrogen)

A pCR-BluntII-TOPO plazmid vektor tompa végű PCR termékek klónozására alkalmas (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/zerobluntopo_man.pdf). A linearizált vektor topoizomeráz enzimekkel asszociált formában található. A vaccinia vírusból származó topoizomeráz I specifikusan köti a kettősszálú DNS-t, és egy szálon hasítja minden 5'-CCCTT felismerő motívum után. A foszfodiészter kötés hasítása során felszabaduló energia a 3' foszfátcsoport és a topoizomeráz I 274-es helyzetű

tirozinja közti kovalens kötésben konzerválódik. Ezt a kötést támadja meg a ligálás során az inszert DNS 5' hidroxil csoportja, leszorítja a topoizomerázt a vektorról, és bekötődik a helyére. A vektor tartalmazza az E.coli ccdB letális génjét a LacZ α fragmenthez fűzve. A tompa végű PCR termék beépülése megszakítja LacZ α - ccdB fúziós gén átíródását, így közvetlen pozitív szelekciót biztosít a rekombináns klónoknak. A vektor tartalmaz még kanamycin antibiotikum rezisztencia gént a vektort tartalmazó baktériumok szelekciójához valamint M13 reverse és forward szekvenáló primerhelyeket a beépült PCR termék szekvenciájának ellenőrzéséhez.

pcDNATM3.1/V5-His TOPO vektor (Invitrogen)

A pcDNATM3.1/V5-His TOPO® emlős expressziós vektorba nagy hatékonysággal lehet TA túlnyúló véggel rendelkező (Taq DNS polimerázzal amplifikált) PCR termékeket egy lépésben klónozni (http://tools.invitrogen.com/content/sfs/manuals/_pcdna3.1topota_man.pdf). A vektor az előzőhöz hasonlóan linearizált és I típusú Topoizomerázzal aktivált. A klónozendó PCR terméknek tartalmaznia kell a Kozak konszenzus szekvenciát, mert a vektor nem tartalmazza az ATG start kodont. CMV promóter biztosítja a magas szintű, konstitutív expressziót. A vektorba beépítették a V5 epitop és a polihisztidin jelölő szekvenciáit, melyek a peptidhez fűződve annak detektálását és tisztítását könnyítik meg. Esetünkben erre nincs szükség, ezért a PCR termékbe stop kodont is beépítettünk. A vektor ampicillin rezisztencia gént tartalmaz a baktériumok szelekciójához.

pORF-hTRAIL vektor

A pORF-hTRAIL (InvivoGen) egy készen kapható expressziós vektor, mely tartalmazza a humán TRAIL gén intron-mentes ORF (open reading frame) szekvenciáját, ATG kodontól stop kodonig (843 bp) (http://www.invivogen.com/PDF/pORF-hTRAIL_02C22.pdf). A vektor felhasználható újraelklónozásra (a humán TRAIL gén NcoI és NheI restrikciós endonukleáz enzimekkel hasítható ki a vektorból) és emlős sejtekben transziens transzfekcióval közvetlen génexpresszióra is. A vektorba EF-1 α / HTLV hibrid promótert építettek, mely tartalmazza az elongációs faktor-1 α (EF-1 α) promótert és a human T-sejtes leukémia vírus (HTLV) 5' nem átíródó régióját. Az ampicillin rezisztencia gén lehetővé teszi a pORF plazmidot tartalmazó baktériumok szelekcióját.

pmaxGFP vektor

A vektor része a nukleofekcióhoz felhasznált Amaxa kitnek (<http://labs.idi.harvard.edu/springer/uploads/AmaxaNucleofectormanual.pdf>). A maxGFP zöld fluoreszcencia fehérje génjét CMV promóter hajtja meg. Kanamycin rezisztencia biztosítja a szelekciós igények kielégítését.

pMSCV-Bcl-2-GFP és pMSCV-I-GFP

Murine stem cell virus (MSCV) eredetű retrovirális expressziós vektor, mellyel hatékonyan fertőzhetők emlős sejtek. Két gént szimultán kifejező (bicistronic) vektor, melybe egy belső riboszómális belépési hely (IRES) szekvenciával elválasztva szerepel a két gén (Wen et al., 2001). A vektorban található még a gazdasejt genomjába való beépülését biztosító 5' és 3' Long Terminal Repeat (LTR) szekvencia, klónozó hely (multicloning site vagy MCS) egyedi restrikciós endonukleáz hasítási helyekkel, zöld fluoreszcens protein GFP-t szekvencia és ampicillin rezisztencia gén. A sejtvonal stabil fertőzéséhez (transzfekciójához) a GFP szekvenciát tartalmazó alap vektort (pMSCV-I-GFP) és a Bcl-2 és GFP szekvenciát is tartalmazó pMSCV-Bcl-2-GFP vektort használtuk.

pMIGR-TRAIL-GFP és pMIGR-GFP

A pMIGR a pPRIG (plasmid Polylinker Retroviral IRES GFP) családba tartozó retrovírus vektor (Albagli-Curiel et al., 2007). Szintén két-génes (bicistronic), egy belső riboszómális belépési hely (IRES) választja el a klónozó helyre beépíthető szekvenciát a GFP szekvenciájától. A családra jellemző CMV promóter helyett MSCV eredetű LTR szekvenciát tartalmaz, ezért kevésbé alkalmas transziens expresszióra. Az alap vektorba a teljes humán TRAIL cDNS szekvencia került beépítésre, így a kész vektor a pMIGR-TRAIL-GFP jelölést kapta, a kontrollként használt üres vektor pedig a pMIRG-GFP.

4. 3. hGHss-Furin-ILZ-TRAIL génkonstrukció készítése

A teljes TRAIL fehérje membrán proteázok hatása következtében szolubilizálódik. Mesterségesen azonban közvetlenül tervezhető egy szekrécióna alkalmas TRAIL génkonstrukció is. Ennek a lépései következnek az alábbiakban.

A szintetikus gén tervezése

A génkonstrukció szekrécióna és homotrimerizációna biztosító hGHss-FurinCV-ILZ részét szintézissel hoztuk létre, míg a TRAIL extracelluláris részét a pORF-h TRAIL vektorból újraklónoztuk a konstrukciónkat tartalmazó vektorba (pCR-BluntII-TOPO). A konstrukción 5' végén (8-85 nukleotid pozíciónban) humán növekedési hormon szekrécióna szignál (hGHss) található, ami exogén szekrécióna szignálként biztosítja a TRAIL fehérje megfelelő endoszómális transzportját (Blam et al., 1988). Mivel a hGHss esetleg interferálhat az ILZ-TRAIL oligomerizációna ezért a szekrécióna szignál (hGHss) és az ILZ-TRAIL közén beépítünk egy furin endopeptidáz konszenzusos hasítási szekvenciát (92-118 nukleotid pozíciónban), így a Golgiban lokalizált furin proteáz lehasíthatja szekrécióna előtt a szekrécióna szignál peptidet (Hosaka et al., 1991). Az izoleucin zipper (ILZ) a TRAIL amino-terminálisához fűzve annak trimerizációna segít elő (119-214 pozíciónban) (Walczak et al., 1999; Watzl, 2006) (**6. ábra**).



AGCTAGC ATG GCTACAGGATCTCGAACGTCTCTGCTCCTGGCATTGGACTGCTCTGTCTGCCAT
GGCTTCAAGAGGGAAGTGCT GGATCC AGTGCTCGGAATCGACAGAAGCGACGGA TGAAGCA
GATCGAGGACAAGATTGAGGAAATCCTGTCCAAGATTTACCACATCGAGAACGAGATCGCTCGAAT
CAAGAAGCTCATTGGAGAGAG GAGATCTGCA

GCTAGC - Nhe I restrikcióna hasítási hely, (2-7. nt.)

ATG...GCT - humán növekedési hormon szekrécióna szignál szekvencia, (8-85. nt.)

GGATCC - Bam HI restrikcióna hasítási hely, (86-91. nt.)

AGT...CGG - furin hasítási motívum, (92-118. nt.)

ATG...AGG - izoleucin zipper szekvencia, (119-214. nt.)

AGATCT - Bgl II restrikcióna hasítási hely, (215-220. nt.)

6. ábra: A hGHss-FurinCV-ILZ (GF-ILZ) szintetikus génkonstrukcióna sémája és a tervezett konstrukcióna szekvenciája az egyes génszakaszok feltüntetésével.

Első lépésben adatbázisból kikerestük a hGH-ss, FurinCV, ILZ peptidek aminosav szekvenciáját és természetes nukleotid szekvenciáját. A szekvencián kodon

optimalizálást végeztünk 20 nukleotid cseréjével, a PCR-hez előnyösebb AT/GC arány elérése érdekében a fehérje szekvencia megtartása mellett. A megtervezett 223 bp hosszúságú szekvenciában az AT/GC arány 48% lett. Az egyes szekvenciákat restriktions enzim hasítási helyek választják el, ami az egyes „kazetták” könnyebb mozgatását teszi lehetővé klónozási lépések során, ha esetleg később más génkombinációban szeretnénk felhasználni őket.

Oligonukleotid tervezés

A génszintézisnek két technológiai korlátja van. Az egyik, hogy csak 120 nukleotidig vállalnak megrendelést a szállítók. A másik, hogy minél hosszabb az oligo, annál gyakoribbak a szintézis során ejtett hibák. A 100 nt-nál hosszabb oligók esetén a mutációval rendelkező oligók aránya az 50%-ot is elérheti (Young and Dong, 2004).

A „rövidebb szintetizált oligonukleotidokban kevesebb a mutáció” elve alapján a 223 bázis hosszú DNS szakaszt 25-29 nukleotidos egységekre bontottuk fel (**7. ábra**). Az általunk tervezett 18 darab (9 forward, 9 reverse), oligonukleotid lefedte a teljes szekvenciát úgy, hogy a szomszédos oligók 5' 3' végei egymással 10 nukleotid átfedésben voltak.

```

F1: AGCTAGCATGGCTACAGGATCTCGA
F2: ACGTCTCTGCTCCTGGCATTGGAC
F3: TGCTCTGTCTGCCATGGCTTCAAGA
F4: GGGAAAGTGTGGATCCAGTGCTCGG
F5: AATCGACAGAAGCGGCGGATGAAGC
F6: AGATCGAGGACAAGATTGAGGAAAT
F7: CCTGTCCAAGATTACCACATCGAG
F8: TCCAAGATTTACCACATCGAGAACG
F9: AGATCGCTCGAATCAAGAAGCTCAT

R1: CAGGAGCAGAGACGTTGAGACCT
R2: ATGGCAGACAGAGCAGTCCAAATGC
R3: GATCCAGCACTTCCCTCTTGAAGCC
R4: TCGCTTGTGCGATTCCGAGCACTG
R5: TCTTGTCTCGATCTGTTTCATCCG
R6: TAAATCTTGGACAGGATTTCTCAA
R7: TGATTCGAGCGATCTCGTTCTCGATGTGG (29)
R8: TGATTCGAGCGATCTCGTTCTCGAT
R9: TGCAGATCTCCTCTCCAATGAGCTTCT (29)

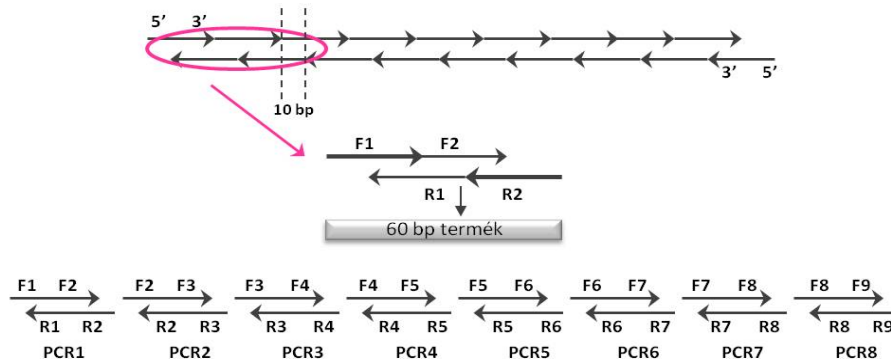
```

7. ábra: A GF-ILZ konstrukció előállításához használt szintetikus oligonukleotidok szekvenciái.

A duális-aszimmetrikus (dual-asymmetrical) PCR (DA-PCR)

A DA-PCR reakcióban maguk a tervezett oligonukleotidok funkcionálnak templátként (**8. ábra**). A DA-PCR-t összesen 8 reakcióban végeztük el, reakciónként 4-4 szomszédos oligonukleotidot egyesítettünk. A reakció kezdeti ciklusai alatt alacsony anellációs hőmérsékleten az átfedő szekvenciákat tartalmazó 25 nt hosszú oligonukleotidok páronként hibridizálnak. Abban az esetben, ha a két belső primer hibridizál az 5' végüknél, nincsen DNS szintézis, azaz PCR termék sem keletkezik. Amennyiben egy külső primer kapcsolódik össze egy belső primerrel, a két oligonukleotid megfelelő orientációban hibridizált, megvalósulhat az 5'→3' irányú DNS szintézis és keletkezik PCR termék. A reakcióban a két szélső oligonukleotidot 5x koncentrációban alkalmaztuk. A reakciót 50µl végtérfogatban raktuk össze (1µl (F1, R2 10uM, F2, R1 2uM) primer, 0,5 µl Platinum Pfx DNS polimeráz, 5µl (10x) Pfx puffer 1,5µl dNTP mix (10 mM), 1 µl MgSO₄ (50mM), , Ultra Pure H₂O) a következő ciklus paramétereit alkalmaztuk:

aktiváció: 94 °C, 1:00; ciklus (30x): [94 °C, 0:20; 55 °C, 0.15; 68 °C, 1:00]; termináció: 68 °C, 10:00.



8. ábra: A duális aszimmetrikus PRC elve és alkalmazása a génkonstrukciónk létrehozásában (Young and Dong, 2004).

Átfedéssel-növekvő (overlap-extension) PCR reakció (OE-PCR).

Az első lépésben előállított 8 darab DA-PCR reakció termékeiből egyenlő mennyiségeket (5µl) összemértünk és egyenlő mennyiségű fenol-kloroform-izoamil (25:24:1 arányú) keverékével extraháltuk, majd alkoholos kicsapással tisztítottuk meg a terméket a reakcióban maradt oligonukleotidoktól. A termékeket egy átfedéssel-növekvő PCR reakcióban egyesítettük, mely során 10 mM dNTP mixet, és Platinum Pfx

polimerázt használtunk. A reakció paraméterei: aktiváció: 94 °C, 1:00; ciklus (15x): [94 °C, 0:20; 55 °C, 0.15; 68 °C, 1:00]; termináció: 68 °C, 10:00.

Ez a reakció abban különbözik az átlagostól, hogy az elegy nem tartalmaz primereket, csupán az előzőleg megszintetizált 8 darab duplaszálú DNS szakaszt (**9. ábra**). A denaturációs fázis során szétválnak a duplaszálú DNS szakaszok, de mivel minden szomszédos 60 nt hosszú oligonuklotid 10 nt hosszú szakaszon átfed egymással, ezért a következő anellációs fázisban tudnak bázispárosodni egymással, így az OE-PCR reakció végére összeáll a 223 bp hosszú rekombináns génszakasz, a hGH-ss-FurinCV-ILZ.

A génszintézis befejező lépése: a teljes-hosszúságú terméket amplifikáló (full-length product amplification) PCR (FA-PCR).

Ez a befejező lépés a már kész szintetikus konstrukció felerősítése egy hagyományos PCR reakcióban, ahol a templát DNS az OE-PCR reakcióban szintetizált PCR termék és primerként az F1 és R9 jelölésű oligonukleotidokat használtuk fel újra. Az OE-PCR reakció termék 1 µl-éhez adtunk 5 U Platinum Pfx polimerázt, 10X Pfx puffert, 1,5 mM dNTP-eket (10 mM MgSO₄ oldatból), 10 mM Tris-HCl (pH 8.8) és 50 mM MgSO₄ nyolcadik ciklus után adtuk a reakcióhoz. (Aktiválás: 94 °C, 2:00; ciklus: [94 °C, 0:30; 55 °C, 0.30; 72 °C, 1:00]; termináció: 72 °C, 10:00)



9. ábra: Az átfedéssel-növekvő és a teljes-hosszúságú terméket amplifikáló PCR-ek elvei

Gélelektroforézis

A PCR termékek szétválasztása a méretüktől függően 0,8-2 %-os agarózos gélben, TAE pufferrel történt. A PCR minták feltöltéséhez 10X BlueJuice puffert (Invitrogen), a méretük meghatározásához 100 bp DNS létrát (Invitrogen) használtunk. A géleket utólag festettük 0,5 µg/mL-es ethidium-bromide oldatban (10 mg/mL EtBr

solution, Sigma) 15 percig, majd Eagle-Eye gél dokumentációs rendszerrel (Stratagene) fotóztuk.

hGH-SS-FurinCV-ILZ (GF-ILZ) klónozása pCR-BluntII-TOPO vektorba

Az elkészült hGH-SS-FurinCV-ILZ terméket pCR Blunt II TOPO (Invitrogen) vektorba klónoztuk a Zero Blunt Topo klónozó kittet használva. A kész vektorokkal E. coli kémiaiailag kompetens sejteket (One Shot TOP10 Chemically Competent Cells, Invitrogen) transzformáltunk. A baktériumokat S.O.C oldatban 1 órát 37 °C-os rázótermosztátban növesztettük, majd kanamycint (0,1 mg/mL) (Sigma) tartalmazó LuriaBroth (Sigma) tápagra szélesztettük. A transzformált baktériumokat egy éjszakén át 37 °C-os termosztátban növesztettük. A kinőtt, transzformált baktérium telepekből néhányat 0,1 mg/mL végkoncentrációban kanamycin tartalmazó LB tápoldatba oltottunk át, majd 37 °C-os termosztátban tovább növesztettük. Plazmid DNS izolálást S.N.A.P. Miniprep Kit-tel (Invitrogen) végeztük. Az izolált plazmid DNS mennyiségét és tisztaságát spektrofotométer segítségével állapítottuk meg.

A TRAIL sejtfelszíni doménjét kódoló szekvencia felszaporítása

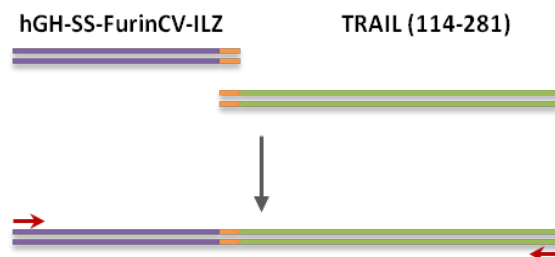
A következő lépésként a TRAIL extracelluláris (114-281 as) doménjét kódoló cDNS szakaszt amplifikáltuk a teljes humán TRAIL cDNS szekvenciáját tartalmazó pORF-hTRAIL (Invivogen) vektort használva templátként. A reakcióhoz olyan forward primert terveztünk melyeknek 5' végét kiegészítettük a hGH-SS-FurinCV-ILZ szekvencia utolsó 9 nukleotidjával (szürke háttérrel jelölve). A PCR termék mérete, így 525 bp lesz.

TRAIL-BglIII F: 5'- **AGATCTGCAGTGAGAGAAAGAGGTCCTC**

TRAIL-BglIII R: 5'- ACGAGATCTTTAGCCAACTAAAAAGGCC

A szintetikus hGH-SS-FurinCV-ILZ génkonstrukciót és a TRAIL konstrukció egyesítése

A két konstrukció átfedő részét kihasználva, egy újabb átfedéssel növekvő PCR-rel egyesítettük ezeket (**10. ábra**).



10. ábra: A hGHss-FurinCV-ILZ konstrukció és az extracelluláris TRAIL szekvencia egyesítése átfedéssel-növekvő és a teljes-hosszúságú terméket amplifikáló PCR technikával.

A kezdeti 4 alacsony anellációs hőmérsékletű ciklus után a teljes szekvencia szélső primereit adtuk a reakcióhoz, hogy az összeépült terméket erősítsük ki PCR-rel a következők szerint: aktiválás I: 94 °C, 2:00; ciklus I (4x) [94 °C, 0:20; 45 °C, 0:30; 68 °C, 0:50] 1-1 µl F1 és TRAIL R primer hozzáadása, Ciklus II (25x): [94 °C, 0:30; 55 °C 0:30; 68 °C, 0:50]; termináció: 68 °C, 1:00

Az ILZ-TRAIL és a teljes TRAIL szekvencia klónozása pcDNATM3.1/V5-His TOPO-TA expressziós vektorba

A hGH-SS-FurinCV-ILZ-TRAIL terméket az ILZ F1 és TRAIL R primereket és Taq DNS polimerázt használva (adenin túlnyúló véget épít a szekvenciához, ami a lehetővé teszi, hogy a szekvencia klónozható legyen a pcDNATM3.1/V5-His TOPO-TA vektorba) a következő paraméterekkel erősítettük ki : aktiváció: 94 °C, 2:00; ciklus (22x): [94 °C, 0:30; 55 °C, 0:30; 72 °C, 0:30]; termináció: 72 °C, 10:00.

A TRAIL teljes szekvenciáját pORF-hTRAIL vektorból amplifikáltuk szintén Taq polimerázzal a vektorhoz tervezett primerekkel: aktiváció: 94 °C, 2:00; ciklus (20x): [94 °C, 0:30; 55 °C, 0:30; 72 °C, 1:00]; termináció: 72 °C, 10:00.

pORF F: 5'- AGCTGAGATCACCGGCGAAG

PORF R: 5'- GGTGGTCCAAACTCATCAATGTATC

A termékeket pcDNATM3.1/V5-His TOPO® TA Expressziós kit (Invitrogen) használatával a vektorba klónoztuk. A kész vektorokkal E. coli kémiai kompetens sejteket (One Shot TOP10 Chemically Competent Cells, Invitrogen) transzformáltunk, az E. coli klónokat az előzőekhez hasonlóan növesztettük fel, ebben az esetben ampicillin (0,1 mg/mL) (Sigma) antibiotikumot használva. Plazmid DNS izolálást S.N.A.P. Miniprep Kit-tel (Invitrogen) végeztük. Az izolált plazmid DNS mennyiségét és tisztaságát spektrofotométer segítségével állapítottuk meg.

DNS szekvenálás, szekvencia analízis

Az általunk kiválasztott klónokat ABI Prism 310 genetikai analizátor, automata kapilláris szekvenáló készülék segítségével, univerzális M13 (Invitrogen, 10 μ M) forward és reverse (pCR-Blunt II-TOPO vektor) vagy T7 és BGH (pcDNA-TOPO) primereket használva mindkét irányból szekvenáltuk. A DNS szekvenálási reakciót a BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) alkalmazásával végeztük. A reakcióelegyet (1 μ l Big Dye terminator mix, 1 μ l Big Dye puffer, 1 μ l templát, 1 μ l M13 R vagy M13F primer, 1 μ l Ultra Pure H₂O) összemérve a következő ciklus paramétereket alkalmaztuk: aktiválás: 95 °C, 2:00, (25x): [94 °C, 0:30; 56 °C, 0:15; 68 °C, 4:00].

A termék tisztítása DyeEx 2.0 spin kittel (Qiagen) történt. A futtatás előtt a szekvenálási reakciók tisztított termékeit 20 μ l TSR (template suppression reagent) reagensben vettük fel és 95 °C-on másfél percig denaturáltuk, majd azonnal jégre helyeztük. A nyers adatok értékeléséhez a BioEdit programot használtunk.

4. 4. Sejttenyésztés és a kezelések menete

Az RD rhabdomyosarcoma sejtvonalat (Houghton et al., 1981) az ATCC-től vásároltuk, ebből retrovírus transzfekcióval RD-GFP és RD-Bcl-2 sejtvonalat hoztunk létre (Petak et al., 2003). Retrovírus expressziós vektorként pMSCV-I-GFP (GFP-t expresszál) és pMSCV-Bcl-2-GFP (humán Bcl-2-t és GFP-t expresszál), dajkasejtként 293T sejtvonalat használtunk fel, melyet 4500 mg/L glukózt tartalmazó DMEM-ben 10% FCS (Sigma) jelenlétében tenyésztettük. Az RD sejteket RPMI 1640 médium és a retrovírus felülűsző 1:1 arányú keverékében inkubáltuk, melyhez 6 μ l/mL koncentrációban polybrene-t adunk. A vírus-transzdukált sejteket GFP expresszió alapján különítettük el áramlásos citometriával és szelektáltuk. A Bcl-2 expressziót western-blot technikával igazoltuk. Az RD, RD-GFP, RD-Bcl2 és Rh41 sejtvonalat L-gutamint tartalmazó RPMI-1640 (Sigma) tápfolyadékban tenyésztettük, amelyet 10% FBS-sel (Sigma) egészítettünk ki. A HeLa sejtvonalat DMEM (Life Technologies) tápfolyadékban tenyésztettük, melyhez a következőket adtuk: 10 % FBS (HyClone), 1% glutamin (200 mmol/L) és 1% penicillin-streptomycin (Euriclone). A tenyészeteket 37 °C-os, 5% CO₂-ot tartalmazó inkubátorban neveltük.

A sejtek kezelése 24 lyukú tálcán történt, az RD, RD-GFP, RD-Bcl-2 és Rh41 sejtvonalak esetén 1×10^5 , az MSC esetén 5×10^4 sejt/lyuk sejtszámmal. A sejteket 1 mL médiumban inkubáltuk majd 24 óra elteltével médiumcserét végeztünk a kezelések előtt, hogy a le nem tapadt, elhalt sejteket eltávolítsuk. A sejtekre 900 μ l médiumot mértünk, amit a kezeléskor médiumban megfelelően hígított szerek oldataival egészítettünk ki 1 mL-re. TRAIL és LLnL ill Bzb együttes használatakor a proteaszómagátló szerrel előkezelést végeztünk, az LLnL esetén 60 percig a bortezomib esetén 30 percig. A kísérletekben, ahol kaszpá zgátlót is használtunk, 30 perces zVD.fmk kaszpá zgátló kezelés előzte meg a bortezomib kezelést.

4. 5. Citocentrifugával készült sejtkenetek festése hematoxilin-eozinnal

A kezelések végeztével a mintákból 100.000 sejtet citocentrifugával tárgylemezre vittünk fel (400 fordulat, 4 perc), majd fél perc szárítás után -20°C -os, 80%-os metanolban fixáltuk 10 percig. 10 perc hematoxilin (a kromatin festődését eredményezi) festést követően a preparátumokat csapvízzel mostuk, majd legalább 10 percre vízbe helyeztük (kékítés). Ezt követően eozinnal festettük a sejteket 2 percig (citoplazma festés). A víztelenítés fázisában a mintákat felszálló alkoholsorban és xilolban mostuk, majd a preparátumokat kanadabalzsammal fedtük le.

4. 6. MSC izolálás

A karakterizált csontvelő és zsírszövet eredetű mesenchymális őssejteket a modena-i onkológiai központban (Olaszország) preparáltuk, illetve csontvelőből izoláltuk. A heparinos, 4°C -on tárolt mintákat 1:1 arányban hígítottuk $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ mentes foszfát pufferben (phosphate-buffered saline, PBS) oldattal, majd sűrűség gradiens centrifugálással szeparáltuk, (Ficoll-Hystopaque 1,077 g/mL; Sigma), 625 g, 25 perc szoba-hőmérsékleten. A mononukleáris sejtfrakciót összegyűjtöttük és kétszer mostuk Hank's pufferelt sóoldatban (HBSS). A sejteket megszámloltuk és 800 000 sejt/cm² sűrűségben szélesztettük tenyésztő flaskákba és 10% FBS-sel (HyClone) kiegészített DMEM (1000 mg/l glukóz) vagy szérumentes Quantum 333 (PAA Laboratories) médiumban, 37°C -on, 5%-os CO₂ inkubátorban tartottuk. A felülúszót és a még le nem tapadt sejteket 24 óra elteltével leöntöttük, az adherens sejtréteget pedig alaposan megmostuk HBSS-ben. A médiumot 2-3 naponta cseréltük, ezzel a le nem tapadt sejteket folyamatosan eltávolítottuk. A megmaradt adherens sejteket 80%-os

konfluens állapotig növesztettük (kettőződési idő 4-5 nap). Passzáláskor a sejteket megszámloltuk és 5000 sejt/cm² sűrűségben tettük tenyésztő flaskába.

4. 7. MSC sejtek differenciálódási potenciáljának vizsgálata

A felnövesztett MSC sejt kultúrák csont-, zsír- és porcsejt irányú differenciálódási potenciálját a következőképpen határoztuk meg (a külön nem jelzett vegyszerek a Sigmától származtak (Grisendi et al., 2010a).

MSC sejteket széleztünk csontsejté differenciáló médiumba, amely a következőket tartalmazta: DMEM (Euroclone), 10% FBS (Hyclone), penicillin-sztreptomycin (100 IU és 100 µg/mL), L-glutamin (2 mM), dexamethasone (10 nM), L-ascorbic acid-2-phosphate (0.1 mM), beta-glycerol-phosphate (2 mM) és BMP-2 (bone morphogenic protein; 100 ng/mL; Tebu-Bio, Magenta, Olaszország). Két hét indukciós periódus leteltével a sejteket alazarin red-S (0,5% v/v kétszer desztillált vízben oldva) festékkel festettük meg.

MSC sejteket zsírsejt (adipocytá) irányba a következő összetételű médiumban differenciáltattuk: DMEM, 10% nyúlszérum (Euroclone) és 5% lószérum (Hyclone), penicillin-sztreptomycin, dexamethasone (1 mM), indomethacin (60 mM), rekombináns humán inzulin (10 mM), isobutylmethylxantine (0.5 mM). A sejteket 10 napig tartottuk a differenciáltató médiumban, majd Oil-Red-O festékkel festettük meg a mintákat.

MSC sejteket porcsejtté (kondrocitává) differenciáltatása a következő összetételű médiumban zajlott: DMEM (magas cukor tartalmú), BMP-6 (bone morphogenic protein-6, 500 ng/mL; Tebu-Bio), TGF-β (transforming growth factor-β; 10 ng/mL; Tebu-Bio), ITS+Premix 50 mg/mL (tartalma: inzulin (6.25 µg/mL), transferrin (6.25 µg/mL), selenous acid (6.25 ng/mL), BSA (1.25 mg/mL) és linoleic acid (5.35 µg/mL); BD-Bioscience), dexamethasone (100nM), L- ascorbic acide-2-phosphate (0.2 mM), sodium pyruvate (100 µg/mL) prolin (40 µg/mL), glutamin és penicillin-sztreptomycin. A sejteket (2×10^6) egy kónuszos 15 mL-es csőben tenyésztettük úgy, hogy lecentrifugáltuk őket a kónuszba és másodnaponta cseréltük a médiumot a pelletet sértetlenül hagyva. A 21 napos differenciálódási periódus után a pelletet formalinban fixáltuk, parafinba ágyasztuk, és a metszeteket végül alcian-kékben (1%) festettük.

4. 8. MSC sejtek tranziens transzfekciója nukleofektor technológiával

TRAIL konstrukciók MSC sejtekbe juttatása Amaxa-Nucleofector technológiával történt (Lonza), mely egy igen hatékony géntranszferre irányuló nem-virális módszer primer sejtek esetén, mely ötvözi a kémiai transzfekciót az elektroporációval (Gresch et al., 2004). A transzfekcióra szánt MSC sejt kultúrának a következő kritériumoknak ajánlott megfelelnie: a passzázsszáma legyen kisebb, mint 8, a konfluenciája 85% körüli legyen és az utolsó passzálás és a transzfekció között teljen el legalább 6 nap. A sejteket tripszin-EDTA-s kezelés után összegyűjtöttük, megszámláltuk és szétosztottuk az egy transzfekcióhoz szükséges 5×10^5 sejt es adagokra. A sejteket 7 perc 1300 rpm fordulatszámmal centrifugáltuk, és a felülúszó alapos eltávolítása után 100 μ l mesenchymalis őssejtekre optimalizált Human MSC Nucleofector (Amaxa) oldatban vettük fel. Ehhez adtuk hozzá a pORF-TRAIL (InVivoGen), pcDNA-TOPO-ILZ-TRAIL vagy pcDNA-TOPO-full-TRAIL vektort, 2 μ g DNS tartalmú és maximum 10 μ l térfogatú oldatban. A kontroll mintában ugyanilyen koncentrációjú pmaxGFP vektort használtunk. A transzfekciót a Nucleofector (Amaxa) készülék U-23-as programjával végeztük. A sejteket 2 mL médiumban mostuk át 6-os tálcára, 24 óra elteltével médiumot cseréltünk, mellyel eltávolítottuk az elpusztult sejteket. A transzfekció hatékonyságát a pmaxGFP kontroll vektorral transzfektált mintában fluoreszcens mikroszkóppal és áramlásos citometirával ellenőrizzük, a transzfekció után 24 órával, esetenként 8 és 168 óra elteltével is.

4. 9. BM-MSC és RD daganatsejtek együtt-tenyésztése

A kísérletekhez BM-MSC sejteket használtunk a 6-8 passzázsbán. Nukleofektáltunk őket 2 μ g pORF-TRAIL vagy pmaxGFP (kontroll) vektorral, majd ezekből 2.5×10^5 sejtet szélesztettünk mintánként 6 lyukú tálcára. Másnap az elhalt MSC sejtek leöntése és médium csere után 10^5 RD rhabdomysarcoma sejtet szélesztettünk hozzájuk és 2 mL vegyes médiumban (1:1 [RPMI-1640 + 10 % FBS]: Quantum 333) tenyésztettük együtt. A sejteket 5 nap elteltével Bürker kamrával számoltuk meg.

Áteresztő (transwell) tálcás (Transwell permeable support, poliester membrane, pore size: 0,4 μ m, Corning) együtt-tenyésztést is végeztünk. Az MSC sejteket 4 μ g pcDNA-TOPO-ILZ-TRAIL, pcDNA-TOPO-full-TRAIL vagy pmaxGFP (kontroll) vektorral nukleofektáltuk és ezekből $2,5 \times 10^5$ sejtet szélesztettünk mintánként a

transwell tálca aljára. A kosárkákba, egy másik tenyésztőtálcára áttéve, mintánként 10^5 RD rhabdomysarcoma sejtet szélesztettünk, majd másnap a sejtek letapadása és médium csere után a sejteket 1-1 mL saját médiumban egymás fölé helyeztük. 24 óra elteltével a sejteket a tálca aljáról ill a kosárka membránjának mindkét oldaláról tripszin-EDTA (0.25%) oldattal felszedtük és meghatároztuk az apoptotikus subG1 sejtek arányát.

4. 10. AD-MS-C és HeLa sejtek együtt-tenyésztése

HeLa sejteket tenyésztő tálcára szélesztettük, majd 12 óra elteltével AD-MS-C-TRAIL vagy AD-MS-C-GFP sejteket adtunk hozzá különböző tumor-effektor arányban (1:1, 1:2, és 1:5). A HeLa sejtek pusztulását PI festéssel határoztuk meg a GFP negatív sejtpopuláción áramlási citometriával. Pozitív kontrollként szolúbilis r. TRAIL (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PeprTech) kezelést alkalmaztunk.

A HeLa sejteket AD-MS-C-TRAIL vagy AD-MS-C-GFP sejtekkel tenyésztettük együtt áteresztő, szeparált tenyésztőtálcán (Transwell permeable support, poliester membrane, pore size: 0,4 μm , Corning) 1:1, 1:2, vagy 1:5 tumor/effektor arányban (T:E).

HeLa és AD-MS-C-TRAIL sejteket tenyésztettük együtt 1:1 arányban, anti-humán-TRAIL neutralizáló ellenanyaggal jelenlétében (0.8, 1.6, 3.2, és 6.4 $\mu\text{g}/\text{mL}$, PeprTech). A pusztult sejtek arányát PI festés után áramlásos citometriával határoztuk meg.

4. 11. Apoptotikus DNS-fragmentáció vizsgálata áramlásos citometriával

Az apoptózis során a DNS nukleoszomális fragmentációja figyelhető meg. Az alkoholban fixált mintákból ez a fragmentált DNS egy extrahálási eljárással eltávolítható, így az apoptotikus sejtek DNS tartalma alacsonyabb lesz, mint a normál sejteké (Darzynkiewicz et al., 1992; Gong et al., 1994). A mérést zavaró RNS-t RN-áz kezeléssel emésztettük el. A minták DNS tartalmát egy fluoreszcens DNS interkaláló festék az propídium-jodid segítségével mértük.

A kezeléseket követően, a következőképpen készítettük elő a mintákat. A sejteket tripszin-EDTA (0.25%) oldattal segítségével összegyűjtöttük, majd centrifugáltuk (200 g/ 3 perc) és a pelletet 1 mL 70 %-os -20°C -os etanolban vettük fel. A mintákat 30 percig szobahőmérsékleten, majd legalább 1 órát -20°C -on fixáltuk. A fixált mintákat ismét centrifugáltuk (200 g/ 3 perc) és 750 μl /minta alkalikus extrakciós

pufferben (200mM Na₂HPO₄/citromsav (pH=7,8) és frissen adott 100 µg/mL RNáz A (Sigma)) vettük fel a pelleteket, majd 20 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk. (Az enyhén alkalikus és hipertóniás extrakciós pufferben könnyebben szolubilizálódnak a rövidebb, főleg az apoptózis során keletkező polinukleosómális kromatin darabok. Az RNáz emésztés csökkenti az inhomogén RNS tartalom okozta ribonukleinsav festés háttér intenzitását. Végül a minták DNS tartalmát 10 µg/mL végkoncentrációban propídium-jodiddal (PI; Sigma) festettük és további 15 percig inkubáltuk. A mintákat áramlásos citométerrel vizsgáltuk (FACSCalibur, Becton Dickinson), a sejtörmeléklet az [FSC, FL2] diagramon kikapuztuk, majd a sejteket az FL2 logaritmikus skálájú diagrammon analizáltuk Celquest (BD) vagy Winlist (Verity House) szoftverrel. Fragmentált DNS-ű sejteket tekintettük azokat, amelyek DNS tartalma a kontroll, kezeletlen mintáink G1 sejtciklusban lévő sejtek PI-festési intenzitásánál alacsonyabbak voltak (sub-G1 sejtek) (Mihalik et al., 1996). A sejtciklus megoszlást a G1-S-G2/M populációk határára helyezett markerekkel határoztuk meg.

4. 12. Viabilitás vizsgálat áramlásos citometriával

Vitalitás festéshez a sejteket egysejtes szuszpenzióba gyűjtöttük fel a tenyésztő edényből és propidium jodiddal (PI; 5 µg/mL, Sigma) festettük őket 10 percig szoba hőmérsékleten. A mintákat azonnal lemértük áramlásos citoméren (FACSCalibur, BD) és a PI festéssel jelzett sejteket (a FL2 fluoreszcencia csatornában) tekintettük pusztultaknak.

Az MSC (GFP jelzett) és Hela sejtek együttes kezelése során a HeLa sejtek pusztulását PI festéssel határoztuk meg a GFP negatív sejtpopuláción áramlásos citometriával.

4. 13. Az immunfenotipizálás

AD-MSC sejtek az alábbi monoklonális antitestekkel lettek jelölve (Grisendi et al., 2010a): PerCP-anti-CD45, APC-anti-CD14, PE-anti-CD34; PE-anti-CD90, PE-anti-CD73 (BD), PE-anti-CD105 (eBioscience, San Diego, CA, USA). A transzfekció után az AD-MSC-TRAIL, AD-MSC-GFP és AD-MSC sejtek esetén PE-anti-TRAIL, PE-anti-TRAIL-R1/DR4, PE-TRAIL-R2/DR5 (Biolegend) és izotípus kontroll (Becton Dickinson) antitesteket használtak. MSC sejtekben az intracelluláris festéseket BD Cytotfix/Cytoperm kittel (Becton Dickinson) és PE-anti-TRAIL ellenanyag

használatával végeztük. A méréshez FACS Calibur áramlásos citométert használtak (BD), az analízishez CellQuest (BD) program segítségével történt.

4. 14. Western-blot analízis

RD, RDGFP és RD Bcl-2 sejtekből szövettenyésztő petricsészére (d=100mm) 1 millió sejtet raktunk ki. A sejteket 24 óra elteltével 60 percig előinkubáltuk proteaszómagátló szerrel (bortezomib / LLnL), majd 8, illetve 24 órát kezeltük TRAIL-lel. Az MSC sejtek esetén 1,5 millió pORF-TRAIL vagy kontrollként pmaxGFP vektorral nukleofektált sejtet raktunk ki, majd 24 órát növesztettük. A letapadt sejteket tripszin-EDTA (0.25%) oldattal felszedtük a flaskáról, megmostuk PBS-sel, majd 250 µl lízis pufferben vettük fel [3 mM TRIS, 150 mM NaCl, 1% TRITON-X 100, 10% glicerol, 1 mM PMSF és proteázgátló koktél (Sigma)]. A minták fehérjetartalmát Bradford-módszerrel (Protein-assay, Bio-Rad) határoztuk meg, majd 2x Laemmli pufferben (Bio-Rad) 5 percig forralással denaturáltuk. Akrilamid gélen (12%-os) 5 vagy 10 µg fehérjét futtattunk az RD sejtek esetében és 15 µg-ot a nukleofektált MSC estében, majd PVDF membránra (Immobilon-P, Millipore) helyeztük át félszárazblottoló készülékben. Az általunk használt anti-humán ellenanyagok a következők voltak: anti-Bcl-2 (Dako) anti-aktin (Sigma-Aldrich) anti-human TRAIL (MBL). Az előhíváshoz Vectastain ABC Kit-et és ECL Plus kemilumineszcens szubsztrátot (Amersham) használtunk.

4. 15. Denzitometrázás

A blotok fényintenzitását EagleEye II (Stratagene) géldokumentációs rendszerrel detektáltuk és a TIFF formátumú képeket ImageJ (NIH, Bethesda, rsb.info.nih.gov/ij/ verzió 1.37a) szofverrel értékeltük ki, azonos téglalap alakú területtel lefedve a kontroll és TRAIL kezelt minták csíkjait, valamint egy reprezentatívnak választott háttérterületet. A csíkintenzitások értékeit súlyozott normálással alakítottuk át a következők szerint: az átmenő fény intenzitását egy adott területen fényelnyelési értéké alakítottuk a háttér átmenő intenzitásból kivonva a csík átmenő intenzitását. A blotra kerülő fehérje mennyiség illetve a blotról-blotra változó háttér intenzitás szórásnövelő hatását úgy kompenzáltuk, hogy a kontroll és TRAIL kezelt minták csíkjai fényelnyelés értékeinek összegét egy közös, állandó értékre arányítottuk (súlyozott intenzitás). Ezt követően normáltuk a Bcl-2 blotok csíkjainak intenzitását a béta aktin csíkjaiéval. A

kontroll minták átlagát 1-nek választottuk és ehhez arányítottuk a csíkok normált értékeit a kontroll és TRAIL kezelt egyedi minták esetében is.

4. 16. ELISA

A nukleofektált MSC tenyészet által termelt, majd a médiumban szolúbilis formában megjelent TRAIL kimutatásához human TRAIL/TNFSF10 ELISA (DuoSet,R&D Systems) kitet használtunk. Az MSC sejteket a pcDNA-TOPO-ILZ-TRAIL, pcDNA-TOPO-full-TRAIL vektorral vagy vektor nélkül nukleofektáltuk, majd 2.5×10^5 sejtet raktunk ki 6 lyukú tenyésztő tálcára (kontroll, nem nukleoporált MSC kísérletében). A sejteket 1 napig hagytuk letapadni, majd médium csere után 4 napig tenyésztettük. Két párhuzamos mintán 24 óránként médiumot cseréltünk, centrifugáltuk a felülúszókat (1000g 10 perc) és a sejtmentes részt -80°C -on tároltuk az ELISA mérés elvégzéséig. Két párhuzamos mintán pedig csak a 4 nap elteltével szedtük le a médiumot. Az így eltett médiumokból 100-100 μl -t használtuk az ELISA teszt elvégzésekor.

4. 17. Matematikai és statisztikai analízisek

A sejtelhalás tekintetében a kombinált farmakon kezelések szinergiáját jellemző egyszerű szinergia faktor (SF) számítása a következő képlet szerint zajlott:

$$SF_{X,Y} = (XY - ko) / ((X - ko) + (Y - ko) * (100 - (X - ko)) / 100),$$

ahol a ko: az oldószerrel kezelt minta, XY: az X és Y kezelés kombinációja az egyedi kezelések koncentrációján. A függvény X-re és Y-ra szimmetrikus. Úgy gondolkodtunk, hogy additívnak tekintjük a két kezelés kombinációját, ha $SF=1$, azaz ha a kombinált érték (XY') egyenlő az egyik kezelést (X') összegezve a másik kezelés értékével (Y'), de úgy, hogy az egyik kezelésnél a „megmaradt viabilitásra” ($100 - X'$) vetítettük a másik kezelés értékét (a ' jelzés a kontrollal korrigált értékekre utal). Átalakítva: $SF = XY' / (X' + Y' - X' * Y' / 100)$.

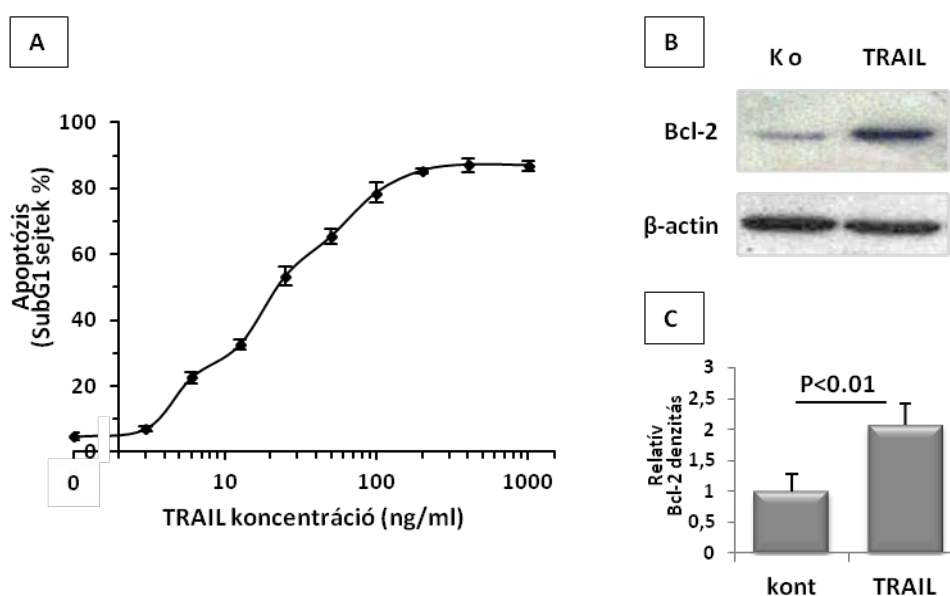
A statisztikai kiértékeléshez a Student-féle t próbát alkalmaztunk (Excel program, MS Office 2007). Párhuzamos mintavételeink miatt általában nem használtunk párosított tesztet, hanem hasonló szórás értékek mellett homocedasztikus-, míg a jelentősen eltérő szórású minták összehasonlításához nem-homocedasztikus kétszárnyú t-próbát alkalmaztunk és $p < 0.05$ értéknél tekintettük az eltéréseket szignifikánsnak.

5. EREDMÉNYEK

5. 1. Szinergikus apoptózis-indukció rhabdomyosarcoma sejtekben a TRAIL és bortezomib kombinált alkalmazásával.

5.1.1. A TRAIL-kezelést túlélő RD rhabdomyosarcoma sejtekben megnő az endogén Bcl-2 fehérje szintje, amit proteaszóma gátlással meg lehetett akadályozni

RD sejtek apoptotikus érzékenységét vizsgáltuk TRAIL hatására, 24 órás rekombináns humán TRAIL(114-281 as) kezelést követően. A TRAIL 50%-ban hatásos koncentrációja, $EC_{50} \approx 25$ ng/ml volt és az RD sejtek túlnyomó többsége (~90%) elhalt 200 ng/ml feletti TRAIL-től (**11. ábra A**).

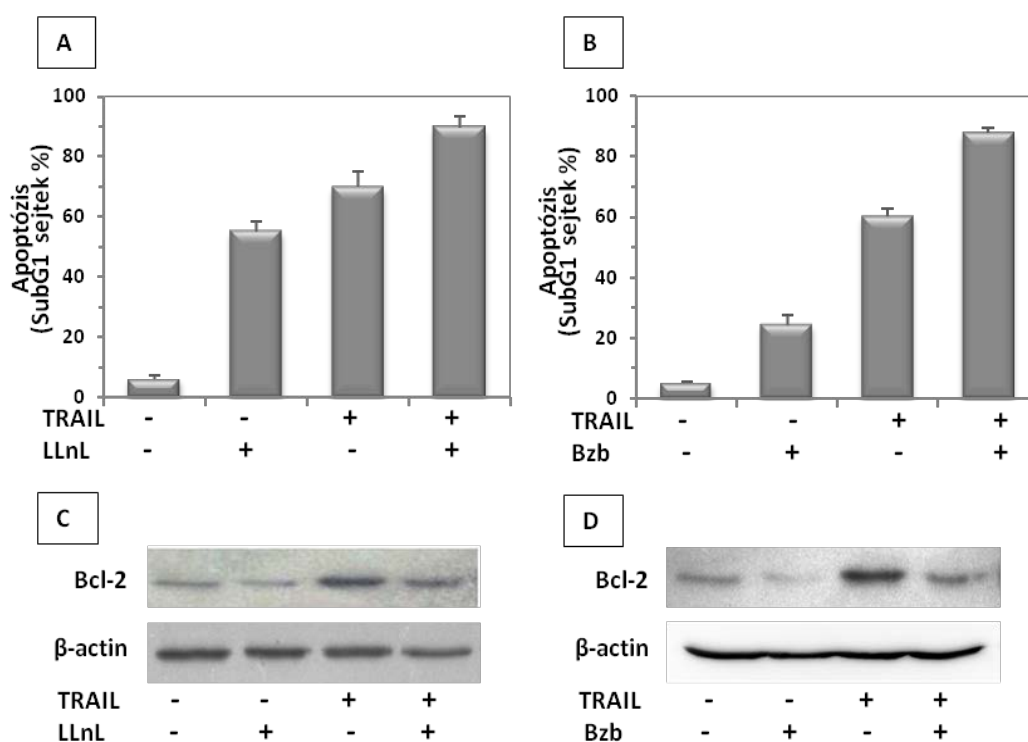


11. ábra: A TRAIL-kezelést túlélő RD sejtekben a Bcl-2 fehérje expressziós szintje megnő. Az RD sejteket r.h. TRAIL-lel kezeltük (a feltüntetett vagy 25 ng/ml koncentrációban) 24 órán keresztül. **A:** Az apoptózis mértékét a nukleoszómális DNS-fragmentáció áramlásos citometriai (FACS) vizsgálatával állapítottuk meg. Két kísérlet, $n=2-4$ minta átlaga és szórása. **B:** Bcl-2 és a β -actin fehérjék mennyiségét western blot technikával mutattuk ki. **C:** A Bcl-2 fehérjetermelés denzitometriás értékei. $n=6$ minta átlaga és szórása, szignifikancia meghatározás két szárnyú, párosított t-teszttel.

Amint azt elemeztük az irodalmi áttekintésben, a TRAIL receptorok komplex jeltovábbító tulajdonságokkal rendelkeznek, pro-és anti-apoptotikus szignálkomponenseket egyaránt aktiválnak. Ezért felmerül a kérdés, hogy a TRAIL alacsonyabb koncentrációi esetében a kevésbé hatékony sejtölés csupán az elégtelen pro-apoptotikus

jelaktivitásnak tulajdonítható (passzív rezisztencia) vagy szerepet kap benne valamelyik anti-apoptotikus jelpálya aktivitása is (aktív rezisztencia). A Bcl-2 fehérje expresszióját western-blot technikával vizsgálva az RD sejtekben észrevettük, hogy az alacsonyabb koncentrációjú (25 ng/mL) TRAIL kezelést túlélő sejtekben a Bcl-2 fehérje aránya megemelkedett (**11. ábra B**). Denzitometriás kiértékelésünk szerint a Bcl-2 aránya a béta-aktinhoz képest duplájára növekedett a 24 órát túlélő RD sejtekben (**11. ábra C**).

Számos sejtípus esetében ismert, hogy a proteaszómagátló szerek képesek érzékenyíteni a daganatsejteket a TRAIL indukálta apoptózisra (Fulda, 2011), részben a TRAIL receptorok által mediált NF- κ B aktiválódás gátlásán keresztül (Khanbolooki et al., 2006). Továbbá ismert, hogy NF- κ B szabályozza a Bcl-2 fehérjecsald tagjainak termelődését is (Turco et al., 2004). Feltételeztük, hogy amennyiben a TRAIL kezelés hatására bekövetkező Bcl-2 expressziófokozódás NF- κ B mediált, akkor a proteaszómagátlás ezt felfüggeszti.



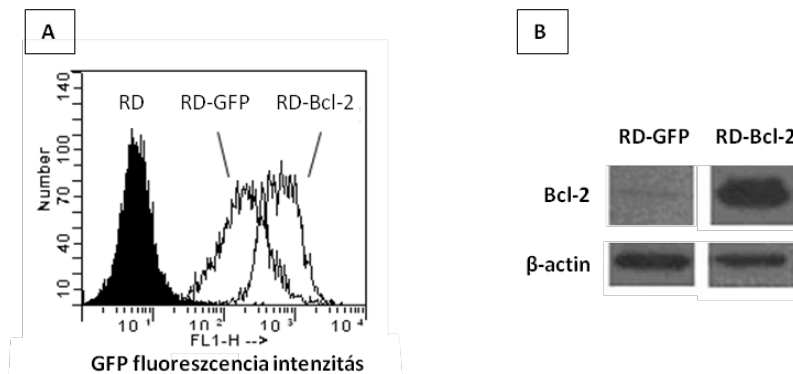
12. ábra: A TRAIL rezisztencia RD sejtekben legyőzhető proteaszómagátlók használatával. Az RD sejteket r.h. TRAIL-lel (25 ng/ml) kezeltük 24 órán keresztül kombinációban **A, C**: 20 μ M LLnL, vagy **B, D**: 1 μ M bortezomib proteaszómagátlóval. **A, B**: Az apoptotizált sejtek arányát subG1 áramlásos citometriai módszerrel állapítottuk meg. Két-két kísérlet, n=4 minta átlaga és szórása. **C, D**: A Bcl-2 és a β -actin fehérjéket western-blot technikával mutattuk ki. Repreratív ábrák három kísérlet alapján.

Az RD sejteket tehát proteaszómagátló LLnL-lel vagy bortezomibbal kezeltük, kombinációban TRAIL-lel. A bortezomibot az NF- κ B teljes gátlásához szükséges μ M-os koncentrációjában alkalmaztuk (Palombella et al., 1998). Mindkét proteaszómagátló szer magában is kisebb-nagyobb arányban apoptózist indukált az RD sejtvonalon (**12. ábra A, B**). Kombinációban TRAIL-lel, a hatásuk a sejtelhalás tekintetében additív, vagy szingergikus volt (LLnL esetében a szinergia faktor $SF_{LLnL}=1.01$, bortezomib esetében $SF_{Bzb}=1.22$) (**12. ábra A, B**). A proteaszómagátló szerek, proapoptotikus hatásuk mellett, valóban gátolták a spontán és a TRAIL-indukálta Bcl-2 kifejeződést is, mind az LLnL (**12. ábra C**), mind a bortezomib (**12. ábra D**) esetében.

Eredményeink szerint a TRAIL-indukálta Bcl-2 expresszió fokozódás túlélési előnyt jelenthet az RD rhabdomyosarcoma sejtek számára (indukált rezisztencia). Ezt a Bcl-2 túltermelődést proteaszómagátlókkal meg lehet akadályozni.

5.1.2. A Bcl-2 fehérje overexpressziója TRAIL rezisztenssé teszi az RD sejteket, de ez a rezisztencia is kivédhető proteaszómagátlókkal

A TRAIL-indukált apoptózissal szemben kialakuló rezisztencia folyamatában a Bcl-2 fehérje szerepének vizsgálatához egy olyan Bcl-2-t stabilan túltermelő sejtvonalat használtunk fel, amelybe a humán Bcl-2 transzgént retrovirálisan juttattuk be (RD-Bcl-2) (Petak et al., 2003).

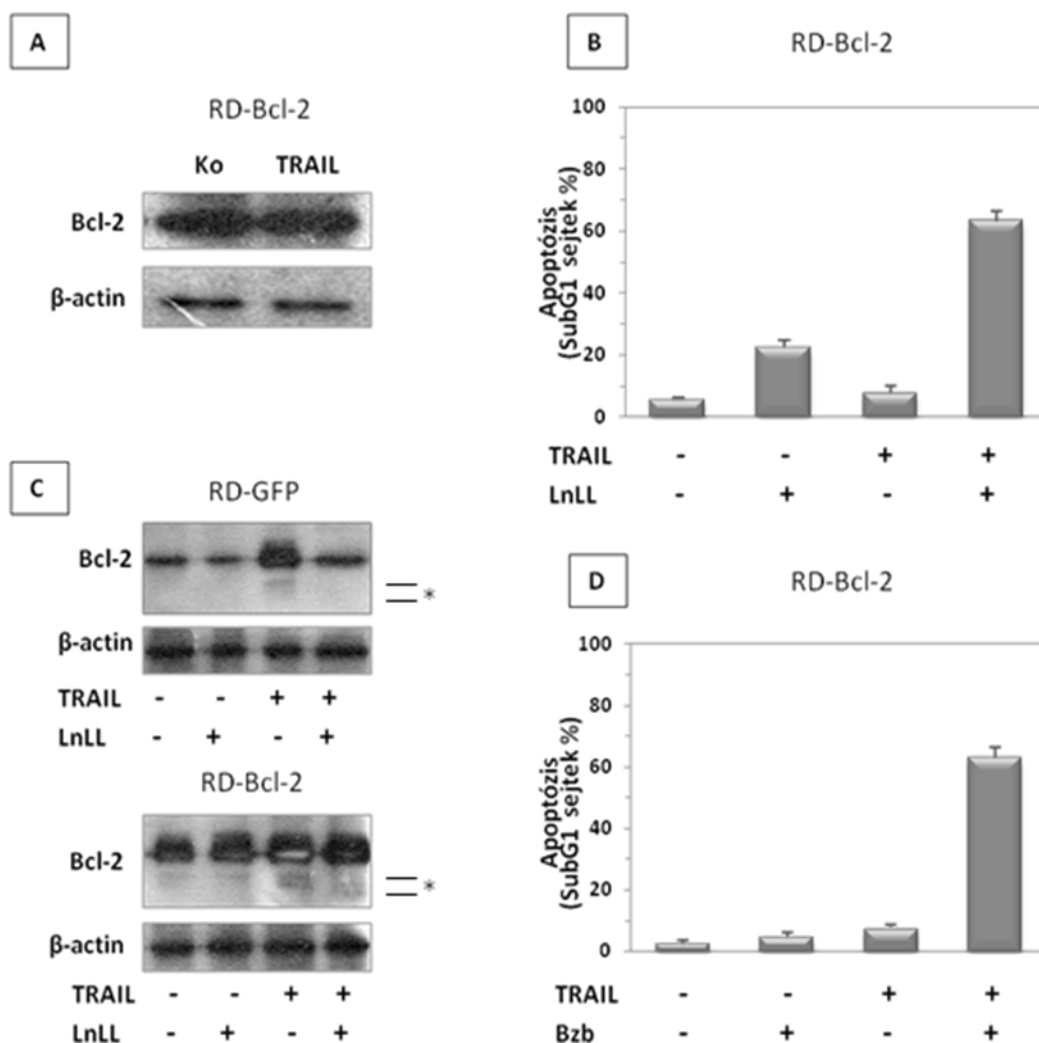


13. ábra: Bcl-2 túltermelő RD sejtvonala jellemzése. RD sejteket GFP fehérjét kódoló (pMSCV-I-GFP→RD-GFP), illetve humán Bcl-2 és GFP szekvenciáját is tartalmazó (pMSCV-Bcl-2→RD-Bcl-2) retrovírus vektorral transzfektáltuk. **A:** A GFP expresszió áramlások citometriai kimutatása. **B:** Bcl-2 és β -actin fehérjék kimutatása western-blot technikával.

A két gén termeltetésére alkalmas (bicisztronos) retrovírus vektor tartalmaz egy IRES belépési helyű GFP szekvenciát is, ezért a kontroll vektorral transzdukált sejtvonala (RD-

GFP) is kifejezi a zölden fluoreszkáló fehérjét (GFP) (**13. ábra A**). Az RD-Bcl-2 sejt vonal túltermeli a Bcl-2 fehérjét a kontroll vektort tartalmazó RD-GFP sejt vonalhoz képest (**13. ábra B**).

Az RD-Bcl-2 sejt vonalban TRAIL hatására nem változott a Bcl-2 expresszió (**14. ábra A**), és csak elenyésző arányban indukálódott apoptózis (**14. ábra B, C**). Következő vizsgálataink arra irányultak, hogy a proteaszómagátlóval történő kezelés képes-e legyőzni a stabil Bcl-2 túltermelés okozta TRAIL-rezisztenciát, hasonlóan a kiindulási sejt vonalban az indukált TRAIL-rezisztenciájához.

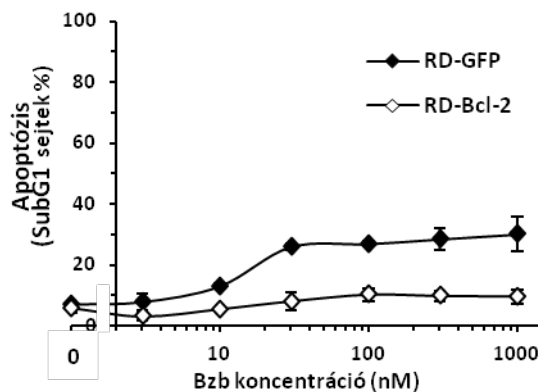


14. ábra: A Bcl-2 túltermelés okozta TRAIL rezisztencia legyőzhető RD sejtekben proteaszómagátlók használatával. Az RD-GFP és RD-Bcl-2 sejteket TRAIL-lel (25 ng/ml) kezeltük önmagában (A), és kombinációban 20 μ M LLnL gátlószerrel (B,C) vagy 1 μ M bortezomibbal (D) 24 órán keresztül. A, C: A Bcl-2 és a β -actin fehérjék mennyiségét western-blot technikával mutattuk ki. * Bcl-2 hasítási termékek. B, D: Az apoptotikus sejtek arányát subG1 módszerrel határoztuk meg. Két-két kísérlet, n=4 minta átlaga és szórása.

Mindkét proteaszómagátló, az LLnL és a bortezomib is, csak alacsony arányban váltott ki apoptózist (**14. ábra B, C**). A TRAIL és a proteaszómagátlók kombinációja azonban ismét jelentős arányú apoptózis indukált, amely a külön-külön kezelések hatásának alacsony értéke miatt magas szinergia faktor értéket adott: LLnL esetében $SF_{LLnL}=2.4$, míg bortezomib esetében $SF_{Bzb}=14.9$.

A Bcl-2 expresszióját vizsgálva western-blottal, a kontroll RD-GFP sejt vonal esetében az eredeti RD sejt vonalhoz hasonlóan, TRAIL kezelésre az életben maradt sejtekben megnőtt a Bcl-2 fehérjeszintje, amit LLnL-lel ki tudtunk védeni (**14. ábra D**). Az RD-Bcl-2 sejt vonal esetében a proteaszómagátló nem befolyásolta a transzgen fehérjeszintű kifejeződését. Ugyanakkor, ha hosszabb expozíciós idővel detektáljuk a fehérjék kimutatásához kapcsolódó kemilumineszcenciát, a teljes hosszúságú Bcl-2 csík alatt megjelentek kisebb molekulású, kis intenzitású csíkok, amelyek valószínűleg a Bcl-2 fehérje hasított formái (**14. ábra D**) (Cheng et al., 1997)

A NF- κ B teljes gátlásához szükséges bortezomib koncentráció (1-5 μ M) nem érhető el betegeken klinikai körülmények között súlyos toxikus mellékhatások nélkül (Argyriou et al., 2008; Delforge et al., 2010). Ezért először megvizsgáltuk, hogy alacsonyabb koncentrációkon alkalmazva kiválthatunk-e bortezomibbal a magasabb koncentrációhoz hasonló hatásokat. Bortezomib hígításaival kezelve RD-GFP és RD-Bcl-2 sejteket, 30 nM-os koncentrációban már az 1 μ M-os koncentrációval egyező arányú az apoptózis indukáló hatása (**15. ábra**).

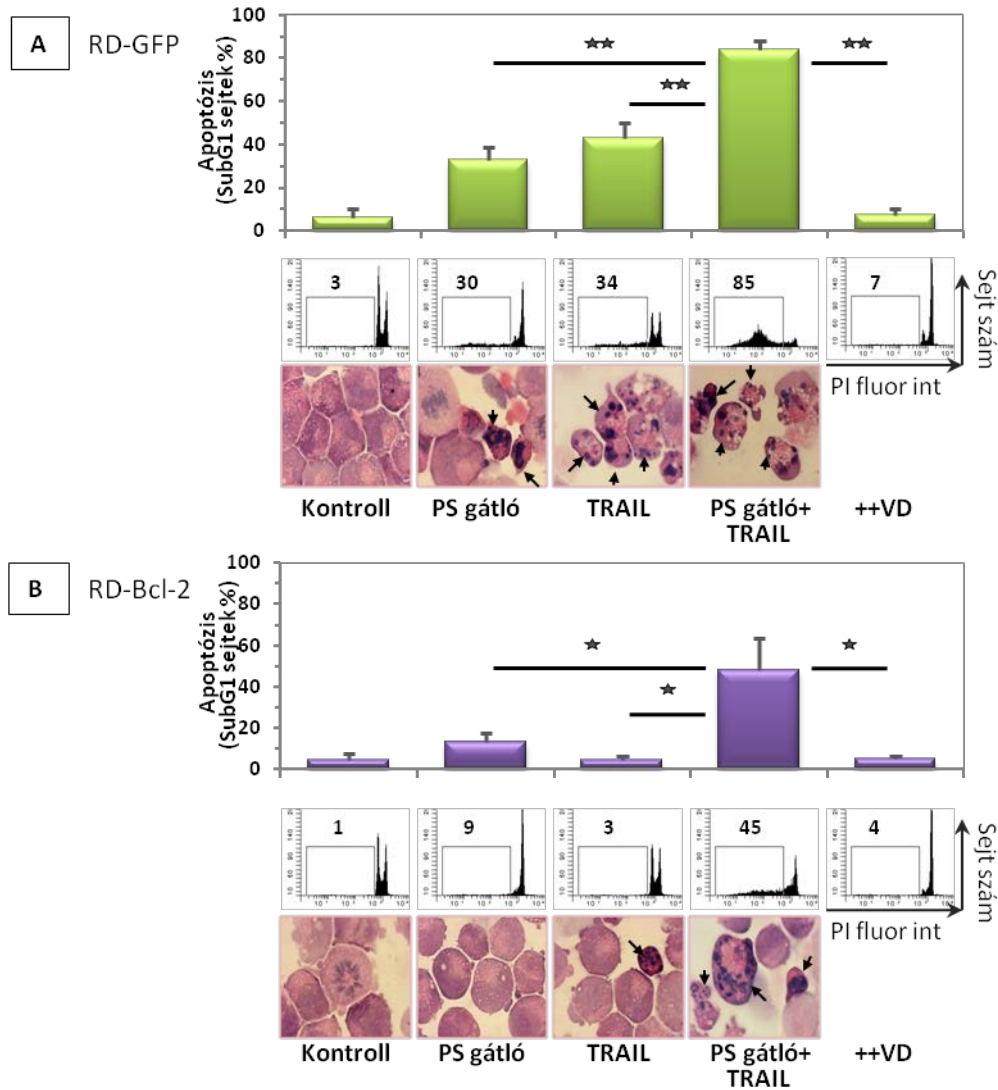


15. ábra: A bortezomib koncentráció függő apoptotikus hatása. RD sejteket kezeltünk 24 órán át a jelzett koncentrációjú bortezomibbal (Bzb) és az apoptotikus sejtek arányát subG1 módszerrel határoztuk meg. Két kísérlet, n=4 minta átlaga és szórása.

Ha az RD-GFP és RD-Bcl-2 sejtek esetében a TRAIL-kezelést kombináltuk 30 nM bortezomibbal, még mindig jelentős szinergikus hatás mutatkozott sejtelhalás

tekintetében (RD-GFP-re SFBzb=1.48±0.22 (n=5 kísérlet), RD-Bcl-2-re SFBzb=4.56±3.03 (n=4 kísérlet). Alacsonyabb koncentráción alkalmazva a bortezomibot (10 nM) már jelentősen csökkent mind a sejtelhalást indukáló hatása, mind a TRAIL-kezeléssel való szinergizáló képessége (**15. ábra** és be nem mutatott adat).

Ismert, hogy a daganat sejtvonalak többségében a proteaszóma gátlása együtt jár a sejtciklus G2 fázisban történő késleltetésével (Brignole et al., 2006), ami részben a sejtciklust szabályozó kinázokat reguláló ciklinek lebontásának késedelme miatt alakulhat ki (van Leuken et al., 2008). Bortezomibbal (30 nM) kezelve az RD-GFP és az RD-Bcl2 sejtekben is jelentős akkumuláció mutatható ki a G2/M sejtciklus fázisban áramlásos citometriai méréssel (**16. ábra A, B**). Ez is alátámasztja, hogy a 30 nM bortezomib koncentráció elegendő az RD sejtvonalak esetében a proteaszómához köthető funkciók jelentős gátlásához.



16. ábra: A TRAIL és bortezomib kombinációja kaspáz-vezérelt apoptózist indukál az RD sejtvonalakban. **A:** RD-GFP és **B:** RD-Bcl-2 sejtvonalakat kezeltünk r.h. TRAIL-lel (25 ng/mL), bortezomib proteaszómagátlóval (30 nM) és z-VD.fmk kaspázgátlóval (5 μ M) 24 órán át. **Felső oszlopdiagramok:** fragmentált DNS-sel rendelkező apoptotikus sejtek arányát (SubG1 populáció) áramlásos citometriával határoztuk meg (4-5 kísérletben n=8-10 meghatározás végeztünk, az eltérések statisztikai szignifikanciáját t-próbával határoztuk meg. * $p < 10^{-4}$, ** $p < 10^{-10}$) **Középen:** áramlásos citometriával mért reprezentatív DNS hisztogramok (a számértékek a subG1 sejtek arányát mutatják). **Alul:** r.h. TRAIL (25 ng/mL) és LLnL (20 μ M) kezelés után citocentrifugált mintákon hematoxilin-eosin festett morfológiai felvételek (nyilakkal jelöltük az apoptotikus morfológiával rendelkező sejteket)

5.1.3. A bortezomib és a TRAIL kombinációja kaszpáz-függő apoptózis indukcióval kerüli meg a Bcl-2 gátló hatását.

A Bcl-2 a mitokondrium mediált kaszpázaktiváció ismert gátlója (Kelly and Strasser, 2011). Mivel az RD sejtekben a TRAIL apoptotikus szignálját gátolja a Bcl-2 transzgenikus túltermelése, ezért feltételezhetjük, hogy az RD sejtekben szükség van a mitokondriumból kiszabadítható molekuláris komponensekre a TRAIL által indukált apoptózishoz, azaz az RD sejtek ún. II-es típusú halál-receptor jelpályával működnek. TRAIL azonban nekrotikus jelpályát is aktiválhat, elsősorban kaszpázgátolt körülmények között (Holler et al., 2000). Ezért a sejtelhalásban szinergikus proteaszómagátlók és TRAIL tekintetében, hatásuk feltérképezéséhez az első kérdésünk az volt, hogy vajon kaszpáz-függő apoptózis vagy esetleg kaszpáz-független nekroptózis indukciójával (Dunai et al., 2011) kerülnek-e meg az RD-Bcl-2 sejtek a Bcl-2 sejtelhalást gátló hatását.

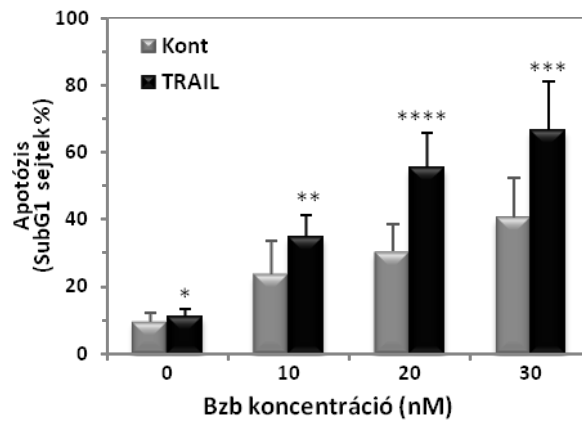
zVD.fmk általános kaszpázgátlót alkalmazva a DNS fragmentációval jellemezhető szinergikus sejtelhalás elmaradt bortezomib és TRAIL kombinációra nem csak az RD-GFP, de az RD-Bcl-2 sejtekben is (**16. ábra A, B**). A zVD.fmk viszont nem akadályozza meg a bortezomib G2/M sejtciklusgátló hatását, vagyis nem antagonistája a proteaszómagátlásnak (**16. ábra A, B**). Hematoxin-eosin festéssel vizsgálva a sejtek morfológiai változásait, a sejtek képe megerősíti, hogy a kombinációs kezelés hatására az RD-Bcl-2 sejtekben a hasonló morfológiai átalakulások zajlottak le (sejtsugorodás, DNS kondenzáció és karyorhexis - sejtmagfragmentálódás), mint az RD-GFP sejtekben TRAIL vagy bortezomib kezelésekre magukban, vagy kombinációban (**16. ábra A, B**).

Ezek alapján kijelenthetjük, hogy az RD-Bcl-2 sejtekben kaszpáz-mediált apoptózis zajlott le a kombinációs kezelés hatására.

5.1.4. A TRAIL-rezisztens Rh41 alveoláris rhabdomyosarcoma sejtvonala érzékenyíthető proteaszómagátlással a TRAIL-indukált apoptózisra.

A TRAIL rezisztens Rh41 sejtvonala hasonló fehérjeszintű expressziós profilt mutat, mint az RD sejtek a Bcl-2 géncsalád tekintetében (**33. ábra A, a Megbeszélés fejezetben**) ám jelentős eltérést, hiányt mutat a receptor-közeli (proximális), DISC-hez kapcsolódó fehérjék, köztük is a kiemelten fontos proapoptotikus iniciátor kaszpáz-8 expressziójában (**33. ábra B**) (Petak et al., 2000). Alacsony koncentrációjú bortezomib

előkezelést alkalmazva a TRAIL-érzékenység szinergikusan fokozható a Rh41 sejtekben, hasonlóan az RD és RD-Bcl2 sejtvonalakhoz (**17. ábra**). A 30 nM-os bortezomib kezelés szinergia faktora a TRAIL-lel: $SF=1.78\pm 0.33$ (n=4 kísérlet). Érdekes továbbá, hogy magasabb koncentrációban maga a bortezomib is jelentős arányú sejtelhalást képes kiváltani az Rh41 sejtvonalban.



17. ábra: A bortezomib klinikailag releváns koncentráción szinergikusan érzékenyíti az Rh41 rhabdomyosarcoma sejteket a TRAIL-indukált apoptózisra. Rh41 kezeltünk a jelzett koncentrációban bortezomibbal, majd fél óra elteltével TRAIL-t (50 ng/mL) adtunk további 24 órára. A sejtpusztulást sub-G1 módszerrel áramlásos citométeren detektáltuk. Négy kísérlet, n=8 minta átlaga és szórása. A kontroll és TRAIL kezelt minták eltérését homocedasztikus t-tesztel határoztuk meg. *: $p<0.05$; **: $p<0.01$; ***: $p<0.001$; ****: $p<0.0001$.

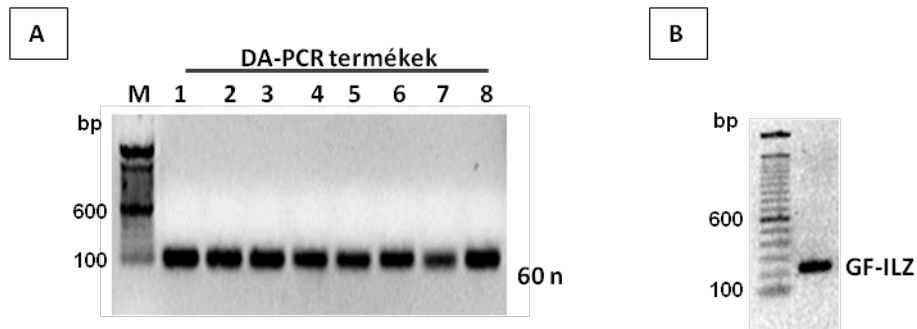
5. 2. TRAIL szekvenciákat tartalmazó vektor konstrukciók készítése és funkcionális összehasonlítása MSC sejtekben.

A TRAIL daganatellenes hatását nagyban gyengítheti, hogy i.v. bejuttatásakor nagyon rövid, fél óránál rövidebb a fél-életideje a keringésben. A szisztémás terápiás alkalmazásnál felléphetnek mellékhatások is, elsősorban az immunsejtek működésének szabályozásában. Ezeknek a problémáknak a megkerülését, feloldását jelentené, ha a daganatban (beleértve a metasztázisokat is) lokálisan zajlana le a TRAIL termelődése. Erre jelenthet egyfajta megoldást MSC sejtekkel juttatni ((homingoltatni)) daganatkörnyezetbe a TRAIL gént. Különböző vektor-konstrukciók tartalmazhatnák a TRAIL eredeti, sejtmembrán-integráns, teljes szekvenciáját, vagy akár egy mesterséges, szekretált formáját is.

5. 2. 1. TRAIL vektorok létrehozása

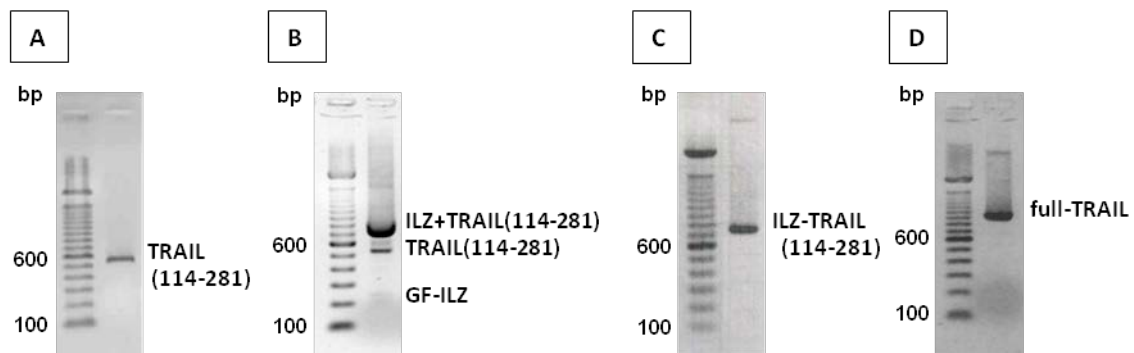
A TRAIL sejtölő hatékonyságát fokozni lehet, ha membránhoz kötötten kapcsolódik receptoraihoz (Muhlenbeck et al., 2000; Wajant et al., 2001), vagy ha a szolúbilis formája stabilabban oligomerizálódik (trimerizálódik) (Walczak et al., 1999; Watzl, 2006). A daganat-specifitást pedig a megfelelő TRAIL konstrukció MSC sejtekkel történő célba juttatásával érhetjük el (Grisendi et al., 2010b; Sasportas et al., 2009). Elkészítettünk tehát két vektor konstrukciót, amelyek a human TRAIL génből származó szekvenciákat tartalmaznak. Nukleoporáció segítségével MSC sejtekbe juttattuk és vizsgáltuk a fehérje termék megjelenését és a tranziens expresszió hatásait az MSC sejtek életképességére. Az egyik konstrukció a teljes (membránhoz kötött, vad típusú) TRAIL-t tartalmazta, míg a másik egy speciális szekretálódó, szolubilizált TRAIL-t. Ez az utóbbi konstrukció a TRAIL extracelluláris részéből (114-281 aminosavak), valamint egy génszintézis technológiával létrehozott 223 nukleotid hosszúságú szekvenciából áll, (a felépítését az Anyagok és Módszerek fejezetben részletesen leírtuk). Ennek építőelemei a humán növekedési hormon szekréciós szignálja (hGHss), egy konszenzusos furin proteáz hasítási hely, valamint egy trimerizációra hajlamos izoleucin zipper (ILZ) szekvencia. A génszintézis lépésinek megfelelően (Anyagok és Módszerek) a szintetikus oligonukleotidokkal elvégeztük a duális aszimmetrikus PCR-t (**18. ábra A**) majd az átfedéssel növekvő és a teljes

hosszúságú terméket amplifikáló PCR reakcióban előállítottuk a hGHss-FurinCV-ILZ (röviden: GF-ILZ) konstrukciót (**18. ábra B**).



18. ábra: *GF-ILZ konstrukció megalkotása duális aszimmetrikus (A) és a teljes hosszúságú terméket amplifikáló (B) PCR felhasználásával.*

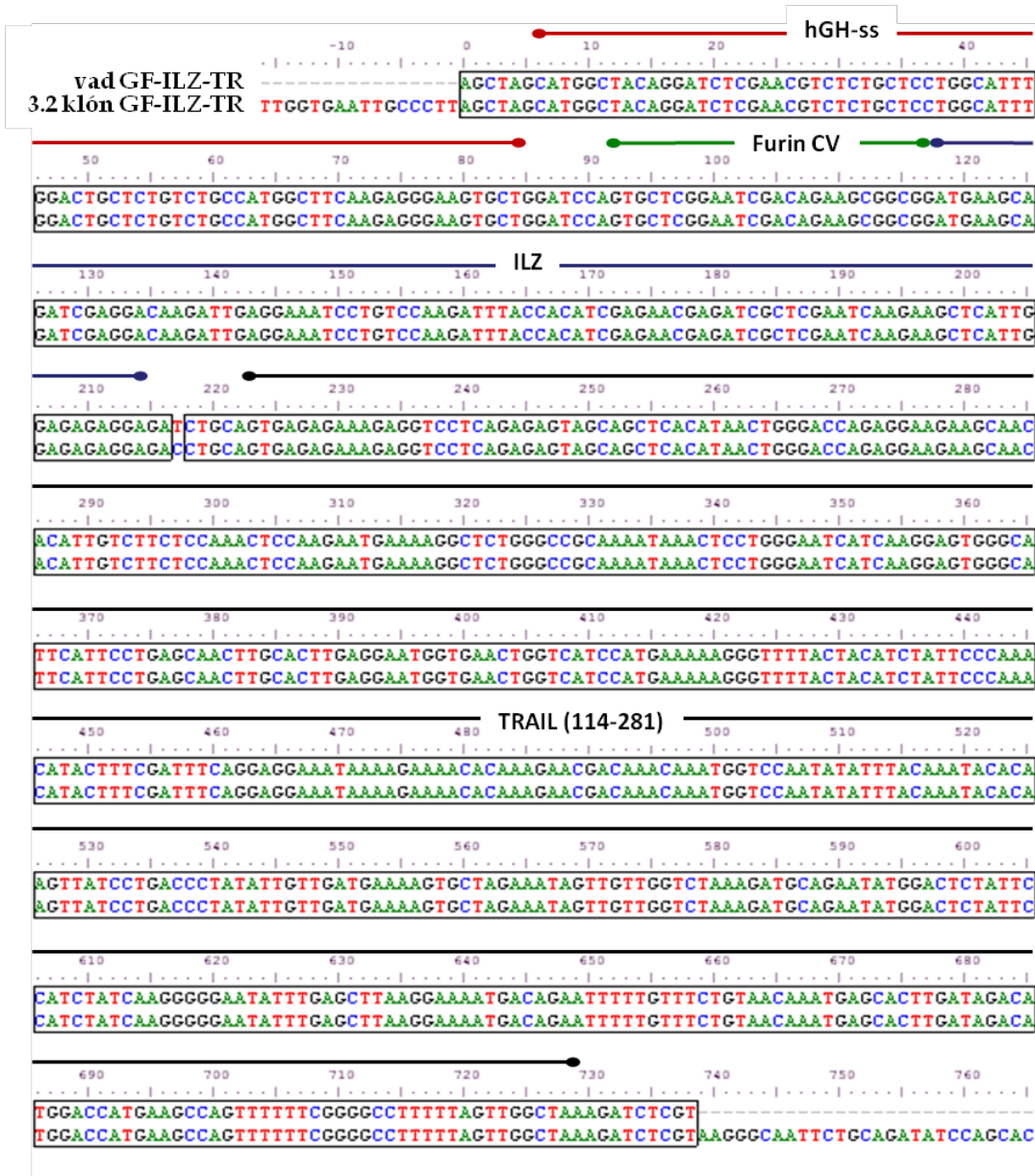
A GF-ILZ terméket pCR-Blunt II-TOPO klónozó vektorba inwertáltuk és *E. coli* TOP10 recipiens sejtekbe transzformáltuk. 24 db klónt szekvenáltunk, amik között találtunk hibátlan terméket.



19. ábra: *A vektorokban felhasznált, TRAIL-t tartalmazó konstrukciók létrehozása. A:* A TRAIL extracelluláris doménjét kódoló szekvencia (TRAIL (114-281)) PCR amplifikátuma. **B:** Az ILZ-TRAIL (114-281) előállítás a mesterséges hGHss-FurinCV-ILZ (GF-ILZ) konstrukciót egyesítve a TRAIL (114-281) szekvenciával duális aszimmetrikus PCR módszer segítségével. **C:** Az ILZ-TRAIL (114-284) konstrukció PCR amplifikátuma, **D:** A teljes hosszúságú TRAIL (full-TRAIL) PCR amplifikátuma.

A megvásárolt pORF-hTRAIL vektorból PCR amplifikáltuk az extracelluláris szekvenciát (114-281 as, 525 nukleotid) (**19. ábra A**), a mutáció mentes inwertet tartalmazó pCR-Blunt II-TOPO-GF-ILZ vektorból a GF-ILZ szekvenciát, majd a két nukleotid szekvenciát egy átfedéssel növekvő és a teljes hosszúságú terméket amplifikáló PCR reakcióban egyesítettük (739 nukleotid) (**19. ábra B, C**).

Az így létrejött ILZ-TRAIL (114-281) terméket pcDNA-TOPO expressziós vektorba inzertáltuk, TOP10 E. coli törzset transzformáltuk és 12 db klón szekvenáltunk. Az összes klónban szerepelt egy nukleotid eltérés az eredetileg megtervezett szekvenciától a GF-ILZ és a TRAIL(114-281) határán lévő Bgl II restriktációs hasítási helyen, amely Ser71Pro aminosav cserét eredményezett a létrejött termékben.



20. ábra: A kísérletekhez felhasznált ILZ-TRAIL(114-281) klón szekvenciája.

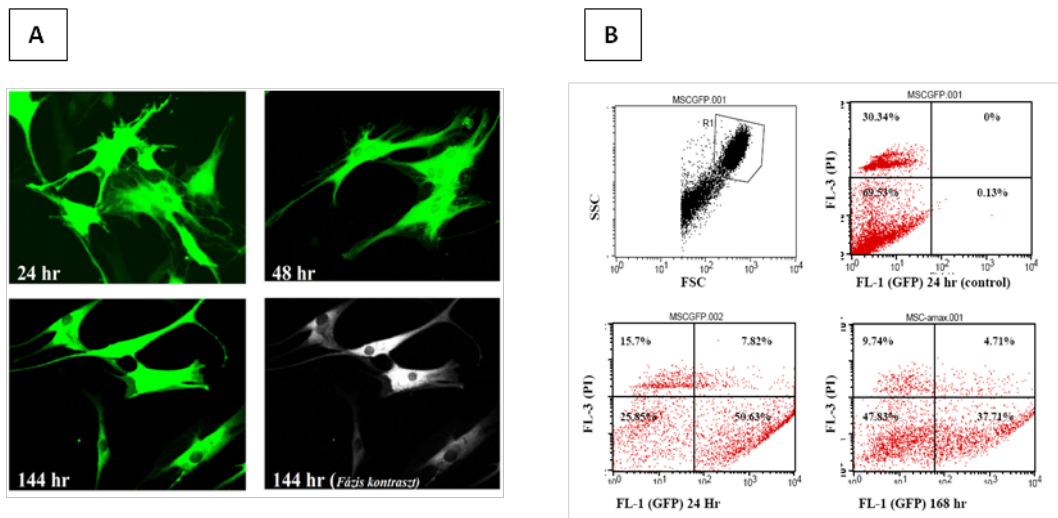
Kutatásainknak ebben a fázisában a Bgl II hasítási hely megtartása már nem volt prioritás (ez a restriktációs hely az GF-ILZ konstrukciónk egyszerű mozgását tette volna

lehetővé és kombinálását más géntermékekkel, mint pl. az IFN-gammával). Mivel az aminosavcsere semmilyen belátható káros következménnyel nem járt ezen a kapcsolódó (linker) szekvencián, ezért ezt a klónt használtuk fel a további kísérleteinkben (**20. ábra**).

A teljes TRAIL szekvenciát (full-TRAIL) a pORF-hTRAIL vektorhoz tervezett primerekkel amplifikáltuk (**19. ábra D**) és ezt is a pcDNA-TOPO vektorba klónoztuk.

5. 2. 2. Csontvelői mesenchymális őssejtek nukleofektálhatósága.

MSC tenyészetek transzfektálhatóságát vizsgáltuk nukleoporációs technikával (nukleofekció) kontrollként zöld fluoreszcencia jelző fehérjét (GFP) kódoló pmaxGFP vektorral. Az alkalmazott nukleoporációs protokoll az MSC sejtek közel ötöd részében, ($17\pm 9\%$ -ában, $n=6$ kísérlet) okoz sejtpusztuláshoz vezető károsodást (**21. ábra B**). Ugyanakkor a viabilis sejtek magas arányában ($52\pm 17\%$, $n=6$ kísérlet) már 1 nap elteltével is intenzív GFP expressziót tudunk detektálni mind konfokális mikroszkóppal (**21. ábra A**) mind áramlásos citometriával (**21. ábra B**).



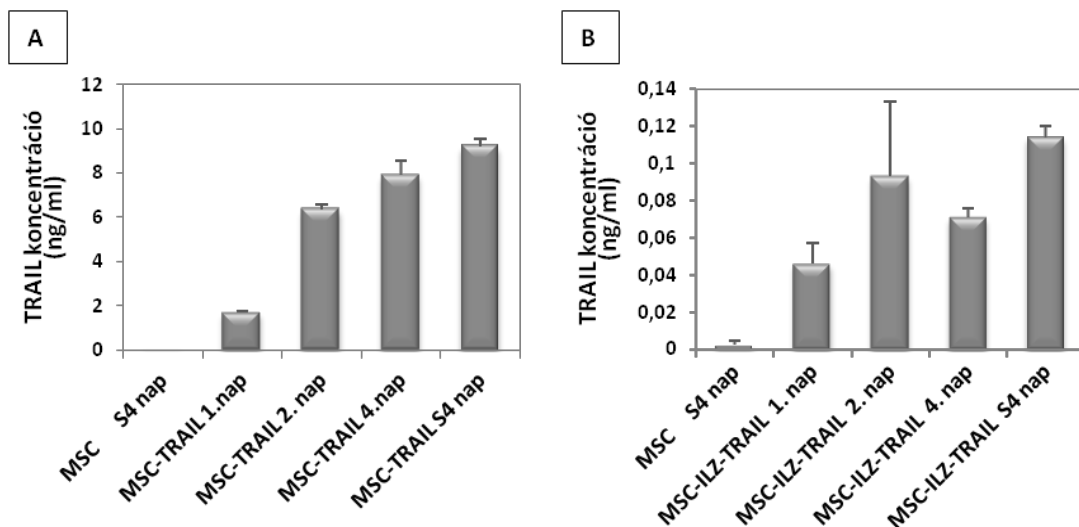
21. ábra. MSC sejtek hatékonyan nukleofektálhatók GFP-t tartalmazó vektorral. **A:** Konfokális mikroszkóppal készített reprezentatív felvételek. **B:** Áramlásos citometriával detektált GFP fluoreszcencia intenzitás kombinálva PI vitális festéssel. Inzertek: A nukleofekciótól eltelt idő, illetve a hisztogramrégiókban található sejtek %-os aránya.

A transzfekció tranziens jellege miatt 6-7 nap után a sejtek jelentős részében csökkent a GFP jelenléte. Ez minden bizonnyal a nukleofektált vektorok számának kihígulására vezethető vissza, jelezve a sejtek proliferációs képességét nukleoporáció

után is. A sejtek egy kisebb csoportja viszont megőrzi az intenzív GFP kifejeződést (**21. ábra B**).

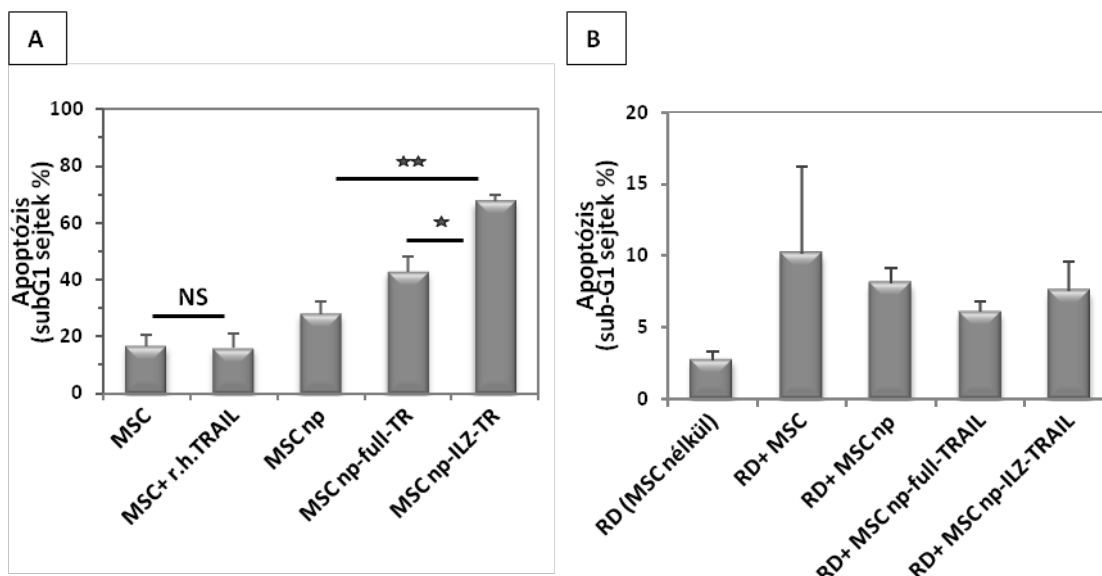
5. 2. 3. A TRAIL vektorokkal nukleofektált MSC sejtek funkcionális jellemzése

Ezt követően a teljes TRAIL szekvenciát (full-TRAIL) és az ILZ-TRAIL(114-281) konstrukciót tartalmazó pcDNA3-TOPO vektorral nukleofektáltunk csontvelői MSC sejteket és ELISA módszerrel határoztuk meg a sejtek felülúszójában a szolúbilis TRAIL koncentrációját. A nem-transzfectált MSC sejtek felülúszójában a teszt érzékenységének határán levő (2 pg/ml) mennyiségű TRAIL-t tudtunk csupán kimutatni. A teljes TRAIL szekvenciát kifejező MSC sejtek a második naptól, napi 6-8 ng/ml TRAIL-t szolúbilizáltak (**22. ábra A**). Meglepő módon a szekréción ILZ-TRAIL(114-281) konstrukciónkkal 2 nagyságrenddel kisebb TRAIL termelést (112 pg/ml S[zumma]4 nap) tudtunk csak kimutatni (**22. ábra B**).



22. ábra: Szolúbilizált TRAIL koncentráció meghatározása MSC sejtek felülúszójából. Csontvelői MSC sejteket nukleoporáltunk full-TRAIL-t (**A**) vagy ILZ-TRAIL(114-281)-et (**B**) tartalmazó pcDNA-TOPO vektorral. 1 nap letapadás után egyes mintákon naponta frissítettük a tenyésztő médiumot (1.-4.nap) másokon 4 napig nem cseréltünk (S4 nap). A felülúszókból ELISA módszerrel határoztuk meg a szolúbilis TRAIL mennyiségét. Két kísérlet, n=4 minta átlaga és szórása.

A naponta termelt TRAIL mennyisége alig marad el a 4 nap után a kultúrában talált mennyiségtől. Ez a TRAIL termelés és lebontás egyensúlyára utaló eredmény.



23. ábra: A TRAIL transzfekció apoptotikus hatása a gazda MSC (A) és a célzott RD daganatsejtekre (B). **A:** Az MSC sejteket transzfektáltuk a jelzett vektorral és 1 nap után subG1 áramlásos citometriai módszerrel detektáltuk az elhalt sejteket (három kísérlet, n=4 mintájának átlaga és szórása, *: p<0.001, **: p<1x10⁻⁵, t-test) **B:** A transz-well kísérletekben a transzwell tálcák aljára 2,5 10⁵ kontroll vagy vektorral transzfektált MSC sejtet, míg a tálcák kosárkáiba 10⁵ RD rhabdomyosarcoma sejtet széleztünk. 1 nap letapadás után egyesítettük a tálcákat és további 1 nap után az elhalt RD sejtek arányát subG1 áramlásos citometriai módszerrel detektáltuk (Két kísérlet, n=4 minta átlaga és szórása).

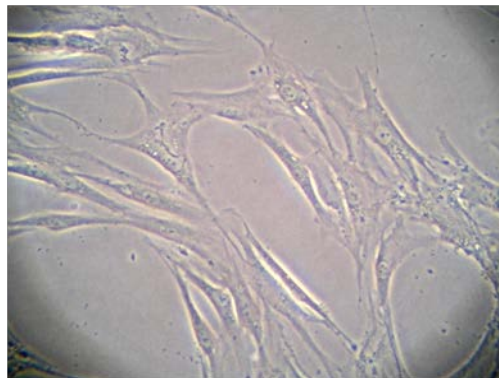
A szekréción konstrukcióval transzfektált MSC sejtjeinket nem sikerült tartósan fenntartani, a sejtek fokozatosan néhány nap alatt apoptózissal kipusztultak. Ezt alátámasztandó, az ILZ-TRAIL(114-281) konstrukcióval történő transzfekció után 1 nappal vizsgálva, a fragmentálódott DNS-sel rendelkező sejtek arányának fokozódását mutattuk ki. (**23. ábra A**). A két konstrukcióval nukleofektált MSC sejtek által szolubilizált, termelt TRAIL daganatölő hatását is összehasonlítottuk transz-well kísérletekben RD sejteket és a transzfektált MSC sejteket együtt növesztve oly módon, hogy az ölösejt-célsejt közvetlen kontaktusát elkerüljük. Az MSC sejtek magukban, illetve a rajtuk végzett nukleoporációval szignifikáns, de csak kismértékű (5% körüli) RD daganatsejt pusztulást eredményeztek. (Említésre méltó, hogy a nukleoporáció a gazda MSC sejtek egy részének pusztulásához vezet (**23. ábra A**). A nukleoporáció hatásától már nem tért el szignifikánsan sem az egyik, sem a másik TRAIL konstrukció kifejező MSC kultúra hatása az RD sejtekre (**23. ábra B**).

Összefoglalva azt állapítottuk meg, hogy az általunk tervezett ILZ-TRAIL(114-281) konstrukció nem váltotta be a hozzá fűzött reményeinket, vagyis nem sikerült a vele nukleoporációval transzfektált MSC sejteket fenntartható, hatékony (daganatölésre alkalmas koncentrációjú) TRAIL termelésére készítenünk. A teljes TRAIL konstrukciót hordozó MSC sejtek két nagyságrenddel több mobilizált szolúbilis TRAIL előállítására alkalmasak. Ráadásul a sejtfelszínen, a membránhoz kötötten maradt TRAIL további daganatellenes hatást eredményezhet. Ezért a további daganatsejt-MSC együtt-tenyésztéses (co-kultúra) vizsgálatokban a teljes TRAIL-t tartalmazó vektor alkalmazására szorítkoztunk.

5. 3. A teljes TRAIL-t kifejező csontvelői és zsírszöveti eredetű mesenchymalis stróma/ős-sejtek (MSC) hatása daganatsejtekre *in vitro*.

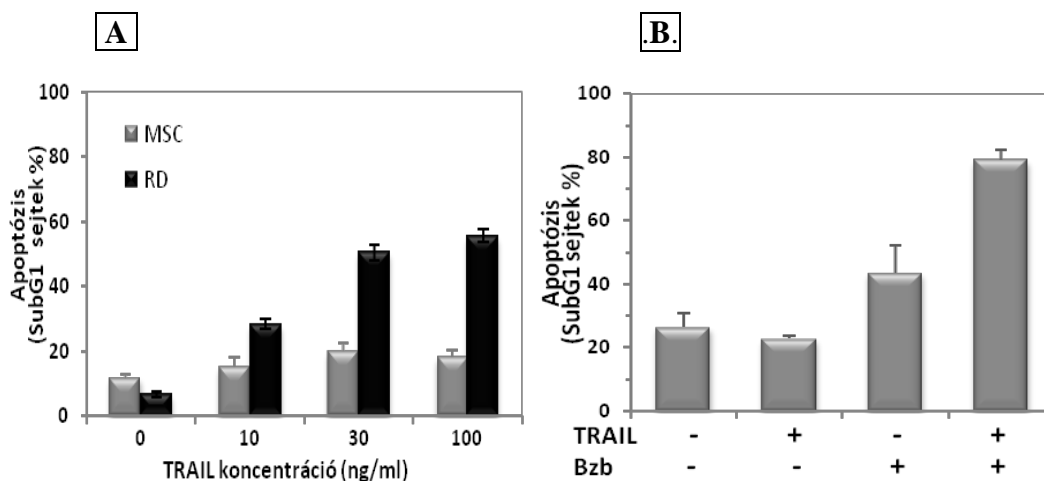
5.3.1. TRAIL-termelő csontvelői eredetű mesenchymalis őssejtek (BM-MSC-TRAIL) gátolják az RD rhabdomyosarcoma sejtek számának növekedését.

A teljes (full) TRAIL-t transzgenikusan kifejező csontvelői mesenchymalis őssejtek daganatellenes hatását két speciális, nem daganatos donorból izolált sejtvonallal vizsgáltuk. A két MSC sejttenyészet izolálását, kialakítását és immunfenotípusának jellemzését olaszországi kollaborációs partnereink végezték (Grisendi et al., 2010a). A 6. és 8. passzázs között használtunk fel ezekből az MSC tenyészetekből a mi kísérleteinkben, amelyekben a teljes-TRAIL-t tartalmazó vektorral nukleofektáltunk a sejteket. A alkalmazott MSC sejtek a 8. passzázsban is megtartották mesenchymalis morfológiájukat (**24. ábra**).



24. ábra: *Human csontvelő eredetű mesenchymalis strómasejtek (BM-MSC) a 8. passzázsban.* Fordított sugármenetű fénymikroszkópos fáziskontraszt felvétel a tenyésztő flaska aljáról.

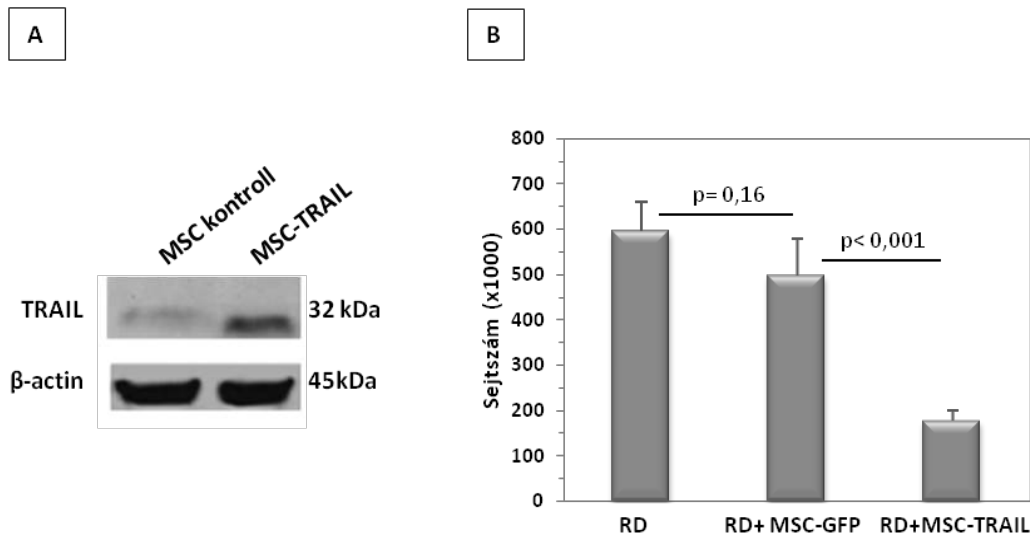
A sejt kultúrákat a 4. passzázs után jellemezték partnereink sejt felszíni fehérje expressziós mintázatuk alapján (Grisendi et al., 2010a) és 98%-ban CD45, CD34 és CD14 negatívak voltak, viszont magas arányban mutatták a bevezetőben ismertetett mesenchymalis őssejtekre is jellemző fenotípust (CD90+, CD105+, CD73+, CD146+, GD2+, CD140-, CD200-). Továbbá, rendelkeztek a mesenchymalis őssejtekre jellemző indukálható differenciálódási potenciállal (Grisendi et al., 2010a). Az így nyert MSC sejteket r.h. TRAIL(114-281) citokinnel kezelve nem tudtunk bennük apoptózist kiváltani (**25. ábra A**). Bortezomib (1 μ M) viszont érzékenyítette a TRAIL-indukálta apoptózisra az MSC sejteket hasonlóan a rhabdomyosarcoma sejtekhez (**25. ábra B**).



25. ábra: BM-MSC sejtek nem érzékenyek a szolúbilis TRAIL-indukálta apoptózisra de érzékenyíthetők proteaszómagátlással. BM-MSC sejteket kezeltünk **A:** a jelzett mennyiségű vagy **B:** 100 ng/ml koncentrációjú r.h. TRAIL(114-281) citokinnel illetve bortezomibbal (Bzb, 1 μ M) és 24 óra elteltével a sejtek apoptotikus elhalását detektáltuk sub-G1 módszerrel. Két-két kísérlet, n=2 minta átlaga és szórása.

A teljes TRAIL-t tartalmazó vektorral nukleofektált MSC sejtekben western-blot technika alkalmazásával kimutattuk a TRAIL expresszióját (**26. ábra A**). A sejt-sejt interakciót megengedő együtt-tenyésztéses vizsgálatokhoz a BM-MSC sejteket nukleofektáltunk teljes-TRAIL-lel, majd önmagukban szélesztettük ki őket, hogy 1 nap elteltével a nukleofekciótól illetve a TRAIL termelésétől sérült, pusztult sejteket kimoshassuk. Ezek után szélesztettük hozzájuk az RD rhabdomyosarcoma sejteket és 5 nap elteltével vizsgáltuk a sejtszám növekedést. A TRAIL-transzfectált MSC sejtek jelentős mértékben (84%-ban) gátolták az RD sejteket is tartalmazó tenyészetek növekedését az alkalmazott effektor-target aránynál (E:T=1:4) (**26. ábra B**). Tendenciájában a kontroll, pmaxGFP vektorral nukleofektált, MSC sejtek is eredményeztek egy kismértékű növekedésgátlást az RD sejtek számában, főleg, ha figyelembe vesszük azt is, hogy az önállóan tenyésztett kontroll MSC kultúrák az 5. nap végére $38,000 \pm 3000$ sejt/well (n=4) sejtszámmal rendelkeztek, és feltehetőleg közel ekkora számú MSC sejt lehetett az együtt-tenyésztett kultúrákban is (az MSC sejtek nagyobb mérete alapján a vizuális megfigyelés legalább is ezt a feltevést erősítette meg). A BM-MSC-TRAIL sejtek a szignifikancia határán (p=0.053) lévő mértékben kevésbé növekedtek, illetve erőteljesebben pusztultak ($26,000 \pm 9000$ sejt/well, n=4) az önálló tenyészetben, mint a kontroll MSC-GFP sejtek, jelezve, hogy a nukleofekcióval

elérhető TRAIL termelés intenzitása auto- illetve parakrín módon visszahat az MSC sejtekre is.

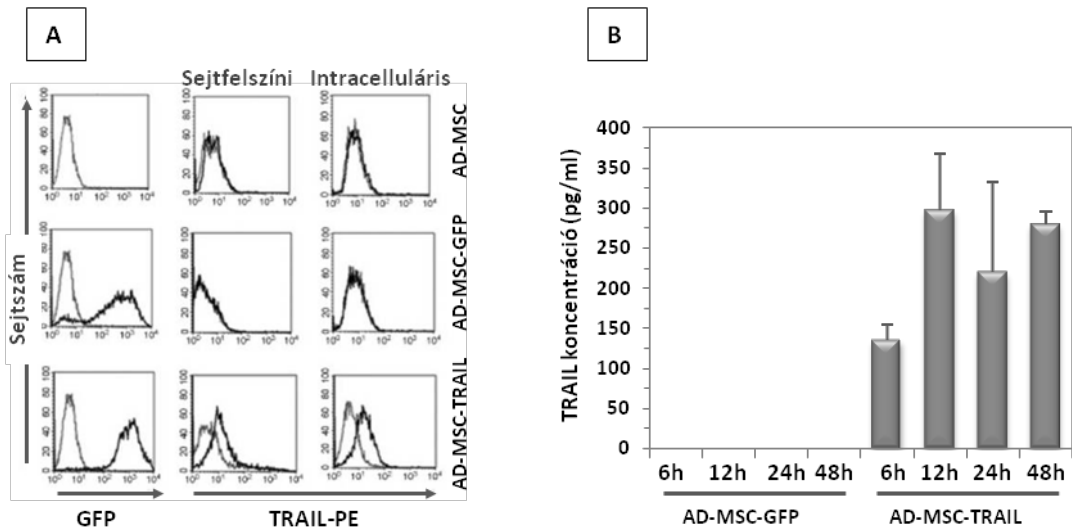


26. ábra: BM-*MSC-TRAIL* sejtek gátolják az RD rhabdomyosarcoma sejtek számának növekedését. BM-*MSC* sejteket nukleofektáltunk pORF-*TRAIL*, vagy pmax-GFP (kontroll) vektorokkal. **A:** A transzgenikus teljes *TRAIL* kifejeződését western-blot segítségével mutattuk ki. **B:** 6 lyukú tálcára $0.5 \cdot 10^5$ sejtet szélesztettünk lyukanként. Másnapi médium csere után 10^5 RD rhabdomyosarcoma sejtet szélesztettünk hozzájuk és 5 nap után megszámláltuk a sejteket Bürker kamrában. Két, nem-tumoros donortól származó BM-*MSC* sejtenyészetet használtunk két kísérletben, ($n=4$ minta átlaga és szórása). A kiértékeléshez homocedasztikus, kétszárnyú t-tesztet alkalmaztunk.

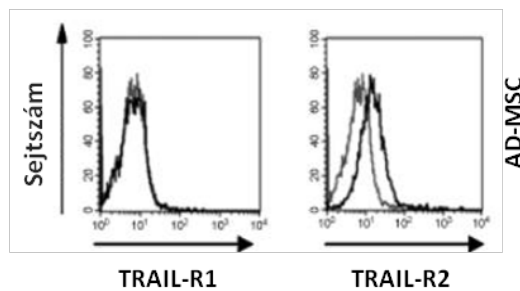
5.3.2. Zsírszövet-eredetű, retrovirálisan *TRAIL* transzfektált mesenchymalis őssejtek (*AD-*MSC-TRAIL**) sejtelhalást indukálnak HeLa carcinoma sejtekben.

Kollaborációs partnereink Olaszországban szépsészeti műtétek során nyert zsírszövetekből izoláltak adherens mesenchymalis sejteket és igazolták, hogy ezek rendelkeznek a mesenchymalis őssejtek fenotípusával (sejtfelszíni differenciálódási antigének és differenciálódási képesség) (Grisendi et al., 2010b). Ezeket az *AD-*MSC** sejteket a humán teljes *TRAIL* gént tartalmazó pMIGR retrovirus konstrukcióval (Albagli-Curiel et al., 2007) transzfektáltuk, és vizsgáltuk az így keletkezett sejtek *TRAIL* expresszióját. Immunfestéssel kimutattuk, hogy csak a *TRAIL*-t tartalmazó vírussal transzfektált sejtek fejezték ki a *TRAIL*-t, akár a sejtfelszínen, akár intracellulárisan (**27. ábra A**) Hasonlóképpen, a tenyésztő médiumban is kimutattuk a

szolúbilis TRAIL jelenlétét (**27. ábra B**). Érdekes módon az AD-MSC-TRAIL sejtek szolúbilis TRAIL termelése is eléri a maximális értéket már 12 órára (≈ 300 pg/ml) de a termelés intenzitása közel egy nagyságrenddel elmaradt a pcDNA3.1-TRAIL vektorral nukleofektált BM-MSC sejtek termelésétől (6-8 ng/ml) (**22. ábra**).



27. ábra: TRAIL termelés AD-MSC sejtekben. AD-MSC sejteket transfectáltunk TRAIL+GFP vagy GFP gént tartalmazó retrovirus vektorral. **A:** TRAIL kifejeződést detektáltuk áramlásos citométerrel sejtfelszíni vagy intracitoplazmatikus anti-TRAIL ellenanyag festéssel. **B:** A felülízüdben jelenlévő TRAIL-t detektáltuk ELISA módszerrel (médium csere nélkül) a jelzett időpontokban vett mintákban (mintaszám n=3, átlag és szórás). Reprerentatív ábrák három kísérlet alapján.

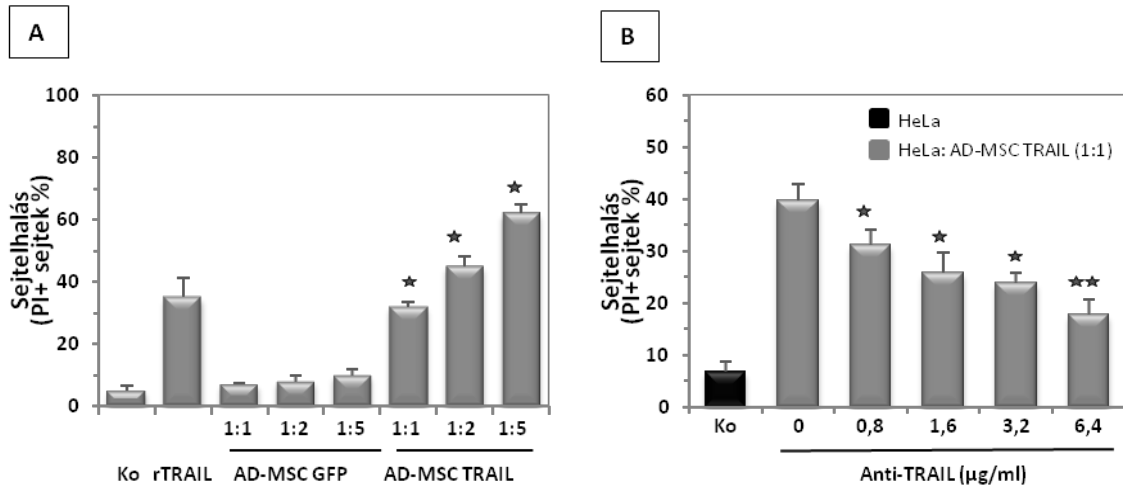


28. ábra: TRAIL-R-ok kifejeződése AD-MSC sejteken. AD-MSC sejteket EDTA segítségével szüreteltünk és a szuszpenzióban lévő sejteket festettük anti-TRAIL-R1 (DR4) és anti-TRAIL-R2 (DR5) ellenanyagokkal és detektáltuk áramlásos citométerrel. A halvány kontúrú hisztogram az izotípus kontroll. Reprerentatív ábra három kísérlet alapján.

Az AD-MSC sejtek nem fejezik ki TRAIL-R1-et (DR4) de a TRAIL-R2-t (DR5) viszont igen (**28. ábra**). Ez alátámasztja annak a lehetőségét, hogy az MSC sejtek

reagálhatnak az auto- ill. parakrin TRAIL transzgén termelésre a saját DR5 receptoraikon keresztül.

HeLa sejtekben 100 ng/mL r.h. TRAIL(114-281) jelentős, közel 40% sejtelhalást tudott indukálni (29. ábra A). AD-MSC-TRAIL sejtekkel együttes sejtkultúrába téve, a HeLa sejtekben még ennél is jelentősebb arányú daganatsejtelhalást értünk el (62%), 1:5 célsejt-effektorsejt arány esetében (29. ábra A).

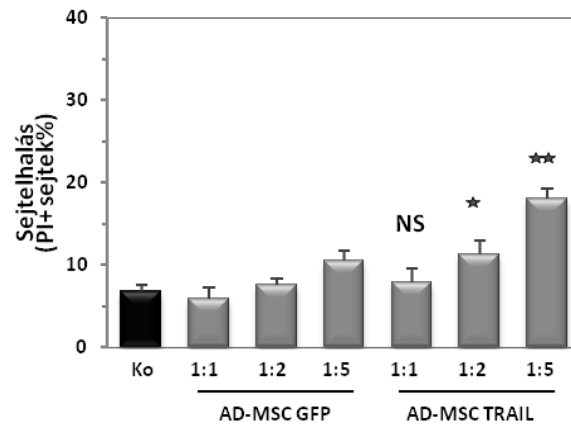


29. ábra: Seitelhalás HeLa carcinomasejtekben AD-MSC-TRAIL sejtek hatására. HeLa sejteket (3×10^4), mint célsejtet szélesztettünk 6 lyukú tálcára. Másnap AD-MSC-TRAIL vagy AD-MSC-GFP sejteket adtunk hozzájuk effektorként, a jelzett arányban (target:effektor, T:E) és 24 óra után mértük a target sejtek elhalását áramlásos citometriával PI festés után a GFP negatív sejtek tartományában. **A:** HeLa sejtelhalás különböző T:E arányoknál. r.h. TRAIL: 100 ng/mL. Két kísérlet, n=4 minta átlaga és szórása. **B:** HeLa sejtelhalás T:E=1:1 mellett, különböző koncentrációjú TRAIL neutralizáló ellenanyag jelenlétében. Három kísérlet, n=3 minta átlaga és szórása.

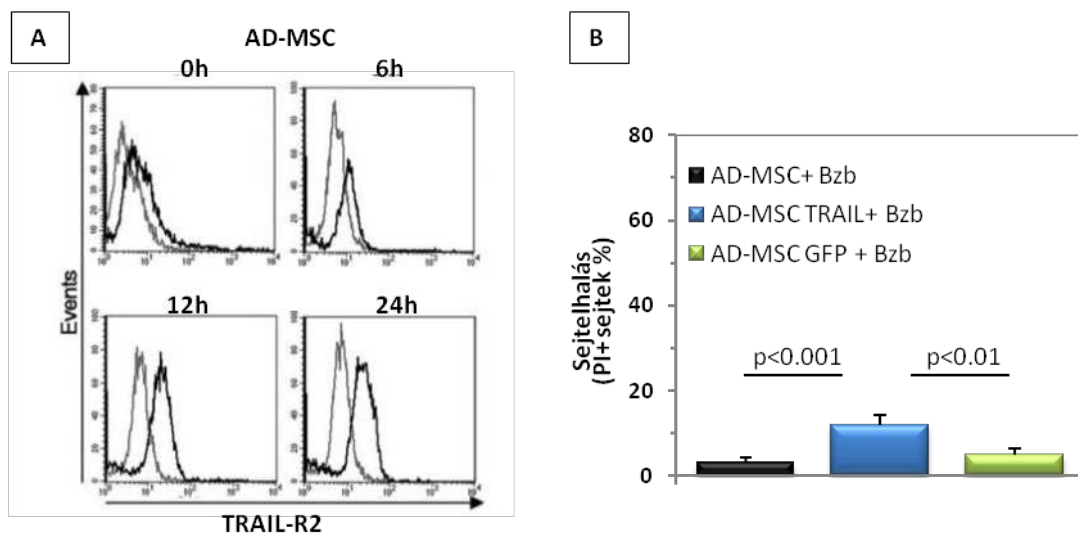
A HeLa sejtek pusztulásában a TRAIL ligand termelése direkt vagy indirekt módon biztosan részt vesz, mert TRAIL antagonistá ellenanyaggal az elhaló HeLa sejtek arányát jelentősen csökkenteni lehetett (29. ábra B).

Hasonlóan a BM-MSC-TRAIL sejtek esetéhez, a retrovírus transzdukált AD-MSC-TRAIL sejtek esetében is felmerült a kérdés, hogy a detektált relatíve alacsony (≈ 300 pg/ml) szolúbilis TRAIL, illetve valamilyen más távolra is hatni képes szolúbilis faktor képes-e transz-well kísérletekben reprodukálni a sejt-sejt kontaktus során tapasztalt nagyarányú HeLa sejtelhalást. Transz-well kísérleteink eredményei szerint (30. ábra) a magasabb effektorsejt arányoknál ha csupán alacsony mértékben is, de szignifikánsan növekedett az elhalt HeLa sejtek aránya a szolúbilis faktorok hatására, bár az elhalás mértéke még a lemagasabb célsejt-effektorsejt arányoknál (1:5) sem éri el a

direkt kontaktus során tapasztalt HeLa sejtelhalás mértékének egyharmadát (29. ábra A és 30. ábra).



30. ábra: AD-MSC sejtek által termelt szolúbilis faktorok hatása HeLa sejtek elhalására. A 29. ábrának megfelelő sejt számokkal szélesztettük AD-MSC és HeLa sejteket az alsó illetve a felső transz-well edénybe, és 24 órán át külön tenyésztettük őket, majd összeillesztettük a transz-well tálcát. További egy nap elteltével a mobilis wellbe helyezett HeLa sejtek elhalását detektáltuk vitális PI festéssel és áramlásos citométerrel. Két kísérlet, n=4 minta, átlaga és szórása. * p<0.5, ** p<0.001 a hasonló arányú AD-MSC-GFP-hez viszonyítva.



31. ábra: Proteaszóma gátlás hatása AD-MSC sejtekre. A feltüntetett különböző AD-MSC sejteket 50 nM bortezomibbal kezeltük a jelzett ideig és a **A**: TRAIL-R2 (DR5) sejtfelszíni expresszióját detektáltuk anti-DR5 immunfestéssel. Reprezentatív ábrák két kísérletből. **B**: vagy 24 óra elteltével a sejtek elhalását határoztuk meg vitális PI festéssel, áramlásos citometria segítségével. Két kísérlet, n=4 minta átlaga és szórása. A szignifikancia értékeket homocedasztiku t-tesztel határoztuk meg.

Mint azt megmutattuk rhabdomyosarcoma sejtvonalak esetében is, a TRAIL rezisztens daganatsejtek gyakran érzékenyíthetőek a sejtelhalásra bortezomibbal. A

proteaszómagátlás az AD-MSC sejtekben esetében is befolyásolhatja a rezisztenciát a transzgenikus autokrin TRAIL-re. Ezt vizsgálva AD-MSC sejteket kezeltünk 50 nM bortezomibbal, és a TRAIL-R2 (DR5) expressziójuk fokozódását tapasztaltuk (**31. ábra A**). Ez jelzi, hogy az AD-MSC sejtek is hasonlóan működnek, mint általában a daganatos sejtvonalak, azaz proteaszóma gátlás hatására fokozódik a DR5 expressziójuk (Johnson et al., 2003). A bortezomib indukálta sejtelhalást vizsgálva, az AD-MSC-TRAIL sejtvonala esetében a vitális festéssel detektált elhaló sejtek aránya szignifikánsan emelkedett (**31. ábra B**), bár relatíve kis mértékben, összehasonlítva a BM-MSC sejtekhez kívülről adott TRAIL és Bzb esetéhez (lásd **25. ábra B**).

Összefoglalva, az BM- és AD-MSC sejtek többféle eljárással is alkalmassá tehetők TRAIL hordozására és kifejezésére (nukleofekció illetve adenovírus) és a daganatellenes hatás (növekedésgátlás illetve sejtelhalás indukció) kifejtésére. A membrán proteázok hatására szolubilizálódó TRAIL valószínűleg csak kis részét tudja magyarázni ennek a daganatellenes hatásnak, annak ellenére, hogy az eltérő transzfekciós módszerek jelentős TRAIL expressziós különbségeket eredményeztek. Így feltehetőleg az MSC sejtek membránjába integrálódott TRAIL az elsősorú effektor molekula a daganatsejtek apoptózisának indukciójában.

6. MEGBESZÉLÉS

6. 1. A TRAIL indukált apoptózis elleni rezisztencia vizsgálata és a rezisztencia kialakulásának megakadályozása proteaszómagátlókkal rhabdomyosarcoma (RMS) sejtekben:

A disszertációm első felében RMS sejtek apoptózis érzékenységet vizsgáltam szolúbilis humán rekombináns TRAIL hatására. Kimutattuk, hogy 1.) az indukált és ektopikusan expresszált Bcl-2 fehérje gátolja a TRAIL apoptotikus hatását és ezt a gátlást proteaszóma-inhibitorokkal le lehet törni, 2.) proteaszómagátlással még azt a rhabdomyosarcoma sejt vonalat (Rh41) is érzékenyíteni lehet a TRAIL-indukált apoptózisra, amelyben a receptor közeli jelzőmolekulák fontos csoportja csak alacsony szinten íródik át.

6.1.1. A Bcl-2 szerepe a rhabdomyosarcoma sejtek életében

A Bcl-2 fehérje fontos szerepet játszik a normál harántcsíkt izomsejtek érés, differenciálódása során. Egér modellek szerint a Bcl-2 a myogenikus érés korai fázisában expresszálódik, még a myoblast elköteleződés előtti állapotban lévő izom ősejtekben (az összes izomsejt mindössze 1-4%-ában) majd az expressziója megszűnik a myoblast elköteleződést követően (MyoD, myogenin expresszió) (Dominov et al., 1998). A differenciálódás során a Bcl-X_L és Bcl-W gének kifejeződése biztosítja az izomsejtek túlélését (Dominov et al., 2001). Szintén egér modellek és gén-expressziós mintázat alapján azt feltételezik, hogy a rhabdomyosarcomák egy csoportja (az alveoláris RMS egy fajtája) ilyen korai, még nem elköteleződött mezodermális ősejtől eredhet (Hettmer and Wagers, 2010). Ennek is megfelelően a Bcl-2 fehérje magas szintű expressziója jellemző az RMS sejtekre. Ptch1 hiányos egerekben sporadikus rhabdomyosarcoma fejlődik ki, amelyek erősen kifejezik a Bcl-2 fehérjét (Kappler et al., 2003). Humán betegminták vizsgálata szerint mind az alveoláris, mind az embrionális RMS esetek 10%-ban jelentős (az RMS sejtek >75%-ban megjelenő) Bcl-2 kifejeződést mutattak ki immunhisztokémiai festéssel, 26%-ában átmeneti intenzitású (az RMS sejtek 25-75% megjelenő) festődést találtak (Boman et al., 1997). Egy másik tanulmányban az RMS esetek 40%-ban találtak Bcl-2 kifejeződést immunhisztokémiával, ám a betegek túlélése a kezelésekre hatására (overall survival)

nem volt kapcsolható a Bcl-2 expresszióhoz (Armistead et al., 2007). Egy hasonló vizsgálatban szintén az esetek közel 40%-ban találtak erős Bcl-2 expressziót az RMS sejtekben, de itt szignifikáns túlélési előnyt találtak a Bcl-2 hiányos esetekben (Heerema-McKenney et al., 2008). A Bcl-2 okozta apoptózis rezisztencia legyőzése tehát fontos összetevője lehet az RMS terápiás kezelésének.

Mint azt az irodalmi áttekintésben bemutattam, a TRAIL a receptorain keresztül nem csupán közvetlenül az apoptózist iniciálni képes kaspázokat aktiválja, hanem más szignálpályákat is elindíthat, köztük az NF- κ B transzkripciós faktorét, amelyet az IKK kináz az intracitoplazmatikus II-es DISC komplexen keresztül kapcsolhat be. Az NF- κ B fontos szabályozó szerepet játszik az antiapoptotikus gének átíródásában, köztük a Bcl-2 géncsaládjában is (Turco et al., 2004). A Bcl-2 gén promoterében patkánynál kimutatták az NF- κ B kötődését (Li et al., 2007), míg humán emlődagánatok esetében a RelB által indukált Bcl-2 hatást igazolták (Wang et al., 2007). Humán neuronális sejtek esetében TNF- α stimulusra mutatták ki, hogy a Bcl-2 expresszióját az NF- κ B vezérli (Tamani et al., 1999). Ez felveti annak a lehetőségét, hogy az általunk megfigyelt Bcl-2 fokozott kifejeződése a r.h. TRAIL kezelés hatására beinduló NF- κ B aktivitásnak tudható be. Ebben az esetben a proteaszóma fehérje-lebontást végző magproteázainak gátlásával megakadályozható az I κ B gátlófehérje lebontása, annak foszforiláltsága ellenére is, és ezzel megakadályozhatjuk az NF- κ B transzkripciós aktiválódását és a Bcl-2 gén fokozott kifejeződését. Ez vezethet a TRAIL és a proteaszómagátlók együttes kezelése során tapasztalt szinergikus hatáshoz. Az irodalmi áttekintésben bemutattuk (**2. táblázat**, 22. oldal) hogy, a proteaszóma gátlás tucatnyi fehérje expressziós szintjét változtathatja meg pro-apoptotikus irányba, az NF- κ B indukált Bcl-2 ebből az egyik lehetőség. Ennek akkor lehet jelentősége a TRAIL-indukált apoptózis esetében, ha az RD RMS sejtvonal II-típusú halál-receptor mediált jelpályával jellemezhető, azaz a mitokondriumból kiszabaduló molekulákra is szükség van az apoptózis lezajlásához. Ezt kívántuk megvizsgálni a retrovírus transzfekcióival létrehozott RD-Bcl-2 sejtvonallal. Ha ugyanis az RD sejtek II-es típusúak a fentiek szerint, akkor a stabilan, TRAIL stimulustól függetlenül kifejeződő Bcl-2 megakadályozhatja a TRAIL-indukált apoptózist. Azt tapasztaltuk, hogy, valóban ez történt (**14. ábra**, 56. oldal). A Bcl-2 stabil expressziója esetében a proteaszómagátlás feltehetőleg már nem fogja jelentősen befolyásolni a Bcl-2 kifejeződést (mint ahogy azt tapasztaltuk is -szintén a **14. ábrán**

bemutatva-). Ezért a stabil Bcl-2 expressziós modellben a szinergikus TRAIL és PS-gátlás együttes hatása sem magyarázható közvetlenül a Bcl-2 szint változásával, mint az indukált expresszió esetében.

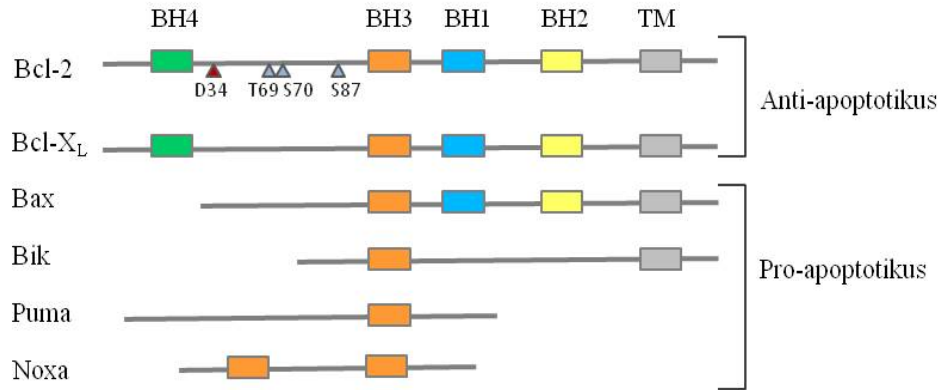
6.1.2. A halál-receptorokon keresztül indukált apoptózisra való érzékenyítés proteaszómagátlással daganatsejtekben

Vizsgálataink során két eltérő szerkezetű proteaszómagátló-szert alkalmaztunk annak érdekében, hogy az esetleges másodlagos, nem megfelelő („off target”) hatásokat kiszűrjünk az eredményeinkből. Mindkét alkalmazott PS-gátlónak van(nak) nem tervezett hatásai, az LLnL-ről ismert, hogy gátolja a μ -kalpain is (Mellgren, 1997), míg a bortezomibról, amely a myeloma multiplex terápiájában a klinikumban is használt PS-gátló, a közelmúltban mutatták ki, hogy hasonló koncentráción, mint amivel a proteaszómát, még számos más szerin-proteázt is gátol: katepszin-G, katepszin-A, kimáz, DPP-II, HtrA2/Omi (Arastu-Kapur et al., 2011). A HtrA2 a neuronális sejtek túlélésében játszik szerepet és feltételezések szerint a gátlása hozzájárulhat a bortezomib által okozott perifériás neuropátia mellékhatáshoz. A két gátlószer ismertén eltérő „off-target” profilja biztosítja, hogy a mindkét gátlószerrel reprodukált eredmények valóban a proteaszóma gátlásának tulajdoníthatók.

A Bcl-2 antiapoptotikus hatásának felfüggesztése az együttes (TRAIL+PS-gátlók) kezeléssel két, egymástól eltérő módon magyarázható: egyrészt inaktiválódhat a Bcl-2 védő szerepe a mitokondrium permeabilizálódásánál, másrészt a PS gátlás hatására megváltozhat a molekuláris profil az RD sejtekben és már nincs szükség a TRAIL-indukált apoptózishoz a mitokondriumra, azaz a sejtek II-es típusú apoptózisról I-es típusúra váltanak.

A Bcl-2 inaktiválása többféleképpen történhet. Egyrészt leírták, hogy a kaszpáz-3 proteolitikus hasítást végezhet a Bcl-2 fehérje amino-terminálisához közeli ún. rugalmas hurokban (flexible loop) lévő 34-es pozíciójú Asp aminosav mellett és ezzel az antiapoptotikus funkciójú Bcl-2-t egy 23kD molekulásúlyú proapoptotikus (Bax-szerű) fehérjévé alakítja (Cheng et al., 1997) (**32. ábra**). Hasonló jelenséget írtak le később alfa-vírusokkal fertőzött sejtvonalakban is (Grandgirard et al., 1998). A Bcl-2 fehérje több tucat másik, nem a Bcl-2 családba tartozó fehérjével képes összekapcsolódni. A közelmúltban a FKBP38-ról írták le, hogy a Bcl-2-höz kötődve

megakadályozza a Bcl-2 kaszpáz-mediált hasítódását (Choi et al., 2010). A rugalmas hurokban a kalpain proteáz is képes hasítani a Bcl-2-t a 73 pozíciójú Gln mellett, ezzel egy 15 kD fragmentet eredményezve (Gil-Parrado et al., 2002).



32. ábra: A *Bcl-2* géncsalád egyes tagjainak vázlatos fehérje-domén szerkezete. BH1-BH4: Bcl-2 homolog domén, TM: transzmembrán domén. A Bcl-2 esetében a BH4 és BH3 domén közé eső rugalmas hurokban háromszögekkel jelöltük a poszttranszlációs módosítási helyeket: foszforiláció (T69-S87) és proteolitikus hasítás (D34)

Proteaszómagátlókkal (MG-132 és lactacystin) indukálva apoptózist szintén kimutattak egy hasonló, 22 kD-os Bcl-2 fragmentet, amelynek a megjelenését kaszpáz-3 gátlóval meg lehetett akadályozni (Zhang et al., 1999). Egy tüdő carcinoma sejtvonalat bortezomibbal kezelve két eltérő, 25 kD és 23 kD, fragmentet is kimutattak, amelyek megjelenése korrelált a Bcl-2 megnövekedett foszforiláltságot jelző mobilitásváltozásával a gélfutás során valamint a G2/M sejtciklusban történő akkumulációval és az apoptózissal (Ling et al., 2002).

Mi is találtunk a blotjainkon több eltérő, az irodalomban leírtakhoz hasonló méretű Bcl-2 fragmentet (**14. ábra**, 57. oldal). A véleményünk az, hogy ezek a fragmentumok valószínűleg nem járultak hozzá számottevően az RD-Bcl-2 sejtekben a TRAIL-bortezomib kettős kezeléssel indukált apoptózishoz, mivel a fragmentek intenzitása a teljes Bcl-2 intenzitásához viszonyítva jóval alacsonyabb, mint az irodalomban bemutatott esetekben, miközben a sejtek, 50%-ában lezajlott az apoptózis ez időre.

A Bcl-2 mitokondriális apoptózist védő hatását megakadályozhatja még valamely BH3 fehérje expressziójának, vagy aktivitásának jelentős fokozódása. Ilyen lehet a Noxa melanóma sejtvonalakban (Nikiforov et al., 2007), vagy a Bik vastagbél,

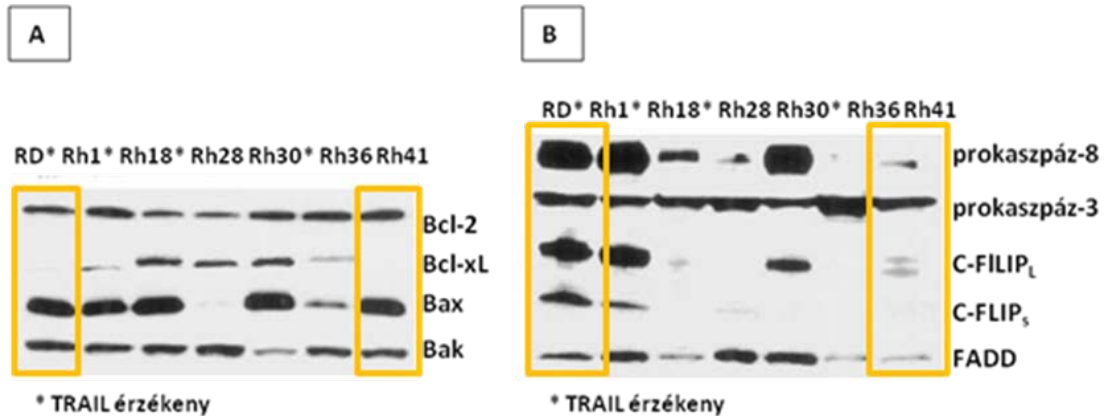
tüdő vagy ovárium sejtvonalakban (Zhu et al., 2005b), illetve a Bim prosztata sejtvonalakban (Nikrad et al., 2005). Sarcoma sejtekben hasonló jelenséget eddig nem mutattak ki. Saját vizsgálataim során azt találtam, hogy bortezomib kezelésre a Bik expressziója nem változik 24 óra elteltével. Ez tovább erősíti a feltételezésünket, hogy TRAIL+PS-gátló kettős kezelés megkerüli a mitokondriális apoptózis jelpályát.

Egy másik (még nem reprodukált) kísérletben az RD sejtek mitokondrium depolarizációját és plazmamembrán permeabilitását vizsgáltuk. Azt találtuk, hogy az RD-Bcl-2 sejtekben a mitokondrium depolarizáció gyenge az RD-GFP sejtekhez képest TRAIL+bortezomib kezelésre, ennek megfelelően feltehetőleg a mitokondriális ATP termelés viszonylag stabilan megmaradhatott az apoptotikus sejtekben, ezért csak lassan zajlott le a másodlagos nekrosis, a plazmamebrán kilyukadása. Ennek megfelelően az apoptotikus sejtek arányánál jelentősen kisebb arányú propidium jodiddal vitálisan festődő nekrotikus sejtet detektáltunk áramlásos citometriával. Ez a megfigyelésünk is a mitokondrium megkerülésének elképzelését erősíti a kettős kezelés alkalmával.

Hogyan válthat át egy sejtben a II-es típusú apoptózis I-es típusúvá? Ebben kulcsszerepet játszik az XIAP kaszpá zgátló fehérje (Jost et al., 2009). A TRAIL-indukált apoptózist képes gátlani az, ha az XIAP túltermelődik (Albeck et al., 2008; O'Connor et al., 2008). A XIAP kaszpá zgátló funkciója bénítható a mitokondriumból kiszabaduló Smac/Diablo fehérjével (Maas et al., 2010; Nagy et al., 2006), proteolitikus hasítással (kaspá z által) (Desplanques et al., 2009), kis molekulatömegű inhibitorokkal (Fakler et al., 2009; Kashkar, 2010) vagy RNS csendesítéssel (Vogler et al., 2008). Ez utóbbi esetben a Bcl-2 ektopikus kifejeződéséből adódó TRAIL rezisztenciát is sikerült felfüggeszteni. Bortezomib hatására az XIAP expresszió csökkenhet és ezzel kapcsolja át a II-es típusú sejteket I-es típusúvá (Kahana et al., 2011).

Sarcoma sejtekkel eddig kevés vizsgálat történt abban a tekintetben, hogy a TRAIL-indukált apoptózist milyen mechanizmuson keresztül szabályozza a PS-gátlás. A közelmúltban jelent meg egy közlemény, amelyben 1-1 chondro- és fibrosarcoma sejtvonal mellett egy RMS sejtvonal TRAIL-érzékenységét vizsgálták és megállapították, hogy MG132 hatására fokozódik a DR4 és DR5 expresszió az RMS sejtekben (Cheong et al., 2011). Mi is vizsgáltuk a DR5 sejt felszíni kifejeződésének változását az RD RMS sejteken, mind bortezomib mind LLnL hatására, 6 órás kezelés után másfélszeres expresszió fokozódást tapasztaltunk (nem bemutatott adat).

A halál-receptorok expressziójának növekedése feltehetőleg hozzájárul ahhoz, hogy a gyenge DISC-képző képességű sejtek is (mint pl. az Rh41, **33. ábra B.**) elegendő iniciátor kaspáz aktivitást generáljanak az apoptózis beindulásához.



33. ábra: Apoptózist szabályozó fehérjék kifejeződésének összehasonlítása RD és Rh41 RMS sejtvonalakban. **A:** A két sejtvonal a Bcl-2 családba tartozó vizsgált fehérjéket azonos intenzitással fejezi ki. **B:** A TRAIL-receptorhoz közvetlenül kapcsolódó (proximális, DISC) fehérjékből az Rh41 jelentősen kevesebbet expresszál (Petak et al, 2003).

A Bcl-2 indukált túltermelése mellett felmerülhet egy másik magyarázat is arra, hogy miért jelenik meg több Bcl-2 a TRAIL-kezelt RD sejtekben és hogyan tudja ezt csökkenteni egy PS-gátlószer az apoptózisra való érzékenység fokozásával. Ennek az elképzelésnek az a kiindulása, hogy az azonos genommal rendelkező sejtekben is jelentősen eltérhetnek az aktuális fehérjeszintek (Spencer et al., 2009).

Ez alapján az is lehetséges, hogy a teljes Bcl-2 fehérje túlélési jelből apoptózis támogató jellé válik. Ennek hátterében a Bcl-2 kettős funkciója áll: gátolja az apoptózist, ha ahhoz szükségesek a mitokondriumból kiszabaduló támogató molekulák, azaz ha II-es típusú. Ugyanakkor gátolja az autofágia folyamatát a Beclin-1-hez kötődésén keresztül. Az autofágia viszont általában túlélési folyamatként indul be és az apoptózis lezajlását is gátolja. Ezért ha a Bcl-2 szint a véletlenszerű expressziós eloszlás miatt magasabb, akkor ez a sejt érzékenyebbé válhat az I-es típusú apoptózisra. A proteaszómagátlók tehát megakadályozzák azoknak az RD sejteknek a kiválasztódását, melyek véletlenszerűen nagyobb mértékben expresszálják Bcl-2-t azzal, hogy a TRAIL apoptotikus jelét II-esről I-es típusúra alakítják át (emelett, a Bcl-2-t alacsonyabb szinten kifejező sejteknek túlélésének kedvez a PS-gátló kezelés, mert azokban erősebb

autofágiás ellenállás alakulhat ki). Ezzel az elmélettel még nem találkoztam a szakirodalom tanulmányozása során, így közvetlen kísérletes igazolásával sem.

6. 2. A TRAIL fehérje MSC sejtekkel, mint vektorokkal való eljuttatása a daganatsejtekhez

A disszertációm második felében arról számoltam be, hogy génszintézis technikával elkészítettünk egy izoleucin-zipzárral, erősített trimerizációra alkalmas, szekretálható TRAIL-t kódoló vektort. Ezzel a konstrukcióval, valamint membránhoz kötött, teljes hosszúságú TRAIL génkonstrukciókkal MSC sejteket készítettünk TRAIL termelésre és kimutattuk, hogy 1.) a membránkötött TRAIL expressziója kifejezettebb és kevésbé ártalmas az MSC sejtek számára, mint a szekretálódó TRAIL, 2.) a membránkötött TRAIL-t kifejező MSC sejtek gátolják az RD rhabdomyosarcoma és HeLa carcinoma sejtvonalak növekedését *in vitro*, jobbra sejt-sejt kapcsolatban átvitt TRAIL hatáson keresztül.

6.2.1. A TRAIL termelése és hatása a gazda MSC sejtekre

Az AD-MSC sejtekről kimutattuk, hogy a TRAIL DR5 receptorát fejezi ki számottevő mértékben, míg a DR4-et nem, vagy legalább is az a sejt felszínén nem jelenik meg (28. ábra) (expressziós kontrollként HeLa sejteket használtunk, melyek mind a két receptort kifejezik a citoplazma-membránjukon, (Grisendi et al., 2010b)). Hasonló eredményeket kaptak mások is különböző szövetből származó MSC mintákat vizsgálva. Csontvelői MSC sejtekről kimutatták, hogy a DR5 mellett DcR2-t is kifejeznek a felszínükön, illetve DcR1-et kismértékben (Menon et al., 2009). Köldökzsínór-vérből származó MSC sejtek szintén a DR5 pro-apoptotikus TRAIL receptor mellett DcR1 és DcR2 expressziót mutattak (Kim et al., 2008). Szisztematikusan Szegezdi és mtsai vizsgálták a különböző MSC sejtek (csontvelői, embrionális, és köldökzsínórból származó (wharton-kocsonya)) esetén a TRAIL receptor megjelenését és DR4 illetve DR5 expressziót is találtak (Szegezdi et al., 2009).

Az általunk vizsgált BM-MSC sejtek *in vitro* körülmények között nem érzékenyek a kívülről adott r.h. TRAIL-indukált apoptózisra 24 órás kezelésnél (**23. és 25. Ábra**). Hasonló eredményeket kaptak mások is (Luetzkendorf et al., 2010; Menon

et al., 2009; Szegezdi et al., 2009). Szegezdi és mtsai a TRAIL-rezisztencia hátterében a csalétek (decoy, DcR1 és DcR2) receptorok kifejeződésén túl alacsony kaszpáz-8 és -9 expressziót is kimutatott mindhárom említett típusú MSC-ben (Szegezdi et al., 2009). Mások viszont normál kaszpáz-8 expressziót mutattak ki köldöksínór-vérből származó MSC sejtekben (Gondi et al., 2010). Interleukin-2-vel aktivált allo- és autogén NK-sejtekről mutatták ki, hogy sejtelhalást indukálnak humán főtális májból származó MSC-sejtekben TRAIL ligand hatáson keresztül, míg felnőtt csontvelői MSC sejtekben főleg FasL hatáson keresztül (Gotherstrom et al., 2011). Elképzelhető, hogy nincs feltétlenül szükség kaszpáz 8 jelenlétére az NK sejtek hatásához, hiszen mind a TRAIL-, mind a Fas- receptorok kaszpáz-független sejtelhalási jelpályákat is aktiválhatnak (Petak et al., 2003).

Retrovirális génbevitel után a teljes TRAIL termelése sem váltott ki szignifikáns sejtelhalást AD-MSC sejtekben 2 napos megfigyelés alatt (Grisendi et al., 2010b). Ha a teljes TRAIL-t tartalmazó vektort nukleofekcióval juttattuk a BM-MSC sejtekbe, némi sejtelhalás növekedést tapasztaltunk 1 nap után (**23. ábra**), és valószínűleg ennek tudható be, hogy 5 napos növekedés vizsgálat során a szignifikancia határát súroló mértékben csökkent sejtszámot észleltünk BM-MSC-TRAIL mintáinkban a BM-MSC-GFP mintákhoz képest (lásd 67. oldalon a szövegben közölt eredményeket). A kutatócsoportok többsége nem vizsgálta, hogy a transzgenikusan kifejezett TRAIL visszahat-e autokrin vagy parakrin módon az MSC sejtek életképességére vagy növekedési kinetikájára. Csontvelői MSC sejteket lentivirális TRAIL-vektorral transzfektálva hosszú távú növekedési vizsgálatban (70 nap, >30 populáció-duplázódás) nem találtak különbséget a kontroll MSC sejtekhez képest (Luetzkendorf et al., 2010).

Az AD-MSC sejteknél a differenciálódási antigének expressziója nem változik a transzgenikus TRAIL termelés hatására (Grisendi et al., 2010b). Szintén nem változik a transzgenikus MSC sejtek differenciálódási képessége sem, legalábbis nem számottevően (Grisendi et al., 2010b). Ezeket az aspektusokat mások eddig nem vizsgálták.

A sejtelhalási és növekedést befolyásoló hatáson túl a TRAIL transzgén más tulajdonságokat is módosíthat az MSC sejtekben.

Vizsgálatainkban azt tapasztaltuk, hogy mind az AD-MSC-TRAIL, mind a BM-MSC-TRAIL mintáinkban a felülúszóban detektálható TRAIL mennyisége egy

bizonyos (viszonylag rövid, 12-24 óra) idő után nem, vagy alig növekedett (**22. és 27. ábrák**). Ebből arra következtethetünk, hogy vagy a receptorain keresztül recirkulálják, „visszaveszik” az MSC sejtek a termelt TRAIL-t vagy az is lehetséges, hogy a szolubilizáláshoz használt proteáz működése csökken idővel, amit viszont valószínűleg szintén az autokrin TRAIL a receptorain keresztül indukál az MSC sejtekben. Egyelőre nincs irodalmi adat arról, hogy pontosan melyik sejtfelszíni proteáz hasítja le és így szolubilizálja a TRAIL-t. Korai vizsgálatok idejéből ismert, hogy a TNF- α (Scheller et al., 2011) és a FasL (Schulte et al., 2007) esetében megismert metalloproteázok helyett valamilyen cisztein proteáz végzi el ezt a feladatot egy gátlószer-profil alkalmazó vizsgálat szerint (Mariani and Krammer, 1998). Az is lehetséges, hogy a TRAIL nem csak proteolitikus hasítással szolubilizálódik, hanem vedléssel (shedding), ami szorosan értelmezve azt jelenti, hogy kis membrán vezikulákon sűrűsödő receptorok (patching, majd capping) válhatnak le a sejtről (vezikuláció). MSC sejtkultúra esetében a TRAIL felülúszóba kerülésének körülményeit nem vizsgáltuk (gradiens ultracentrifugálással elkülöníthető lenne a vezikuláris és a lehasított TRAIL), és másoknál sem találtunk erre vonatkozó vizsgálatot. Elképzelhetőnek tartom, hogy a szolubilizálódás mindkét módja működik MSC sejtek esetében: a felülúszóból készített western-blott segítségével kimutatható lenne a jelenlévő TRAIL molekulásúlya. MSC sejtek esetében is leírtak már vezikulációs jelenségeket, az ú.n. exoszóma termelést (bár nem a TRAIL kapcsán) (Lai et al., 2010).

Giorgio Zauli kutatócsoportja leírta a TRAIL kemotaktikus hatását nem csak endothel és simaizom sejtekre, hanem MSC sejtekre is, kimutatva a sejtek motilitására, invazivitására tett hatását *in vitro* körülmények között (Corallini et al., 2010; Secchiero et al., 2008). Még nem ismert viszont, hogy *in vivo* körülmények között milyen szerepe lehet az MSC sejtek vándorlásában az autokrin TRAIL vagy esetleg parakrin termelt TRAIL-nek. Érdekes eredményt hozhatna egy olyan kísérlet, amelyben az *in vivo* (egérbe) beadott TRAIL-lel transzfektált MSC sejtekben csendesítenénk a TRAIL-receptorokat shRNS technológiával.

6.2.2. Az MSC sejtek transzgenikus TRAIL termelésének hatása a daganatsejtekre

Kimutattuk, hogy az MSC sejtek által termelt TRAIL a felelős a daganatsejtek apoptózisáért *in vitro*, mivel az anti-TRAIL ellenanyag kivédte az apoptotikus hatás jelentős részét (**29. ábra**). Ez fontos eredmény annak a tükrében, hogy egyes vizsgálatok szerint MSC sejtek önmagukban is daganatölő hatást tudnak kifejteni (Khakoo et al., 2006).

Olasz kollaborációs partnereink a HeLa sejtek mellett további sejtvonalak esetében vizsgálták az AD-MSC-TRAIL közvetítette daganatellenes hatást: két TRAIL érzékeny vonalon, pankreász carcinoma: BxPc3, és colon adenocarcinoma: LS174T, valamint két TRAIL-rezisztens sejtvonalon, emlő carcinoma: BT549 és neuroblastoma: IMR32 (Grisendi et al., 2010b). A szolúbilis r.h. TRAIL-re rezisztens daganatsejtekben a sejthez kötött TRAIL sem tudott javítani ezen a rezisztencián. Mások viszont kimutatták, hogy a sejthez kapcsolt TRAIL egyes szolúbilis TRAIL-re kevésbé érzékeny colorectális carcinoma sejtvonalat képes apoptózisra érzékenyíteni (Mueller et al., 2011).

A TRAIL apoptotikus hatását az ILZ trimerizációra hajlamosító domén hozzákapcsolásával is fokozni próbálták (Walczak et al., 1999). Erre az eredményre alapozva próbáltuk meg mi is olyan szekretálódó TRAIL konstrukció létrehozását, amely egyben tartalmazza ezt az ILZ trimerizációs domént is. Az előállított konstrukcióval csak alacsony mennyiségű TRAIL-t tudtunk termeltetni (**22. ábra**). Irodalmi adatok szerint ennek háttérében a nem optimális szekréciós szignál állhat (Mohr et al., 2010).

Nem tisztázott, hogy az ILZ pontosan milyen strukturális hatáson keresztül fokozza a TRAIL-indukált apoptózist, ugyanis a natív TRAIL maga is trimerizálódik (**2. ábra**). Jurg Tscopp laborjából származó eredmények szerint a csak „egyszerűen” trimerizált TRAIL, hasonlóan a trimerizált FasL-hoz általában nagyságrendekkel magasabb koncentráción indukál csak apoptózist, mint az ellenanyaggal keresztkötött (oligomerizált) TRAIL illetve FasL (Schneider et al., 1998). FasL esetében azt is kimutatták, hogy elegendő dimerizáltatni a trimereket a felfokozott apoptózis indukcióhoz (Holler et al., 2003). Vajon a szerkezet-vizsgálatok (röntgenkristallográfia) segítenek-e megérteni hogyan szabályozza a halálligandumok oligomerizációja a receptorokat és azon keresztül a DISC szerkezetét és az iniciátor

kaspázok aktiválódását? A közelmúltban született egy modell, amely hozzájárulhat a DISC működésének jobb megértéséhez (Scott et al., 2009), de az ILZ-TRAIL oligomerizációs hatását még ez az elmélet sem tudja közvetlenül magyarázni.

7. KÖVETKEZTETÉSEK

1. A szolúbilis, rekombináns TRAIL[114-281] (dulanermin) RMS sejteken kifejtett hatásairól a következőket állapíthatjuk meg:
 - a.) A TRAIL-kezelt RD rhabdomyosarcoma sejtekben megnövekedett Bcl-2 fehérje mennyisége (akár szelekciós, akár indukciós módon is történt a növekedés) hozzájárul a túlélő sejtekben az apoptózis gátlásához. Ezt támasztja alá, hogy a Bcl-2 túltermelő kísérleti rendszerben lényegében az apoptózis teljes hiányát tapasztaltuk, rezisztenciát értünk el. Ebből arra következtetünk, hogy az RD sejtvonal II-es típusú sejt, vagyis a mitokondriális jelpálya aktiválódása is szükséges a TRAIL-receptorral kezdeményezett apoptózis lezajlásához.
 - b.) Sikert a Bcl-2 közvetítette apoptózis-rezisztenciát felfüggeszteni az RD rhabdomyosarcoma sejtekben a proteaszóma magproteázainak gátlásával (LLnL és bortezomib segítségével). Ennek háttérében valószínűleg nem a Bcl-2 fehérje inaktiválása áll (proteolitikus hasítása), hanem az, hogy a DISC szignálközvetítő komplex megnövekedett aktivitása miatt az RD sejtek átváltak II-típusú sejtekből I-es típusúra, azaz a TRAIL-receptor-indukált apoptózis során az iniciátor kaspázok közvetlenül aktiválják a végrehajtó kaspáz-kaskádót. Ezt támasztja alá az is, hogy a TRAIL-receptor közeli rezisztenciával (kaspáz-8 expresszió hiány) rendelkező Rh41 rhabdomyosarcoma sejtvonal TRAIL-érzékenységét is fokozni lehet proteaszómagátlással.
2. A mesenchymalis őssejtekbe (MSC) juttatott TRAIL génkonstrukciók daganatsejt-ölő tulajdonságairól a következőket állapíthatjuk meg:
 - a.) Mind a csontvelőből, mind a zsírszövetből előállított MSC sejtek gátolják a daganatsejtek növekedését *in vitro*, ha TRAIL-t expresszálnak a sejt felszínükön.
 - b.) A nukleoporáció és a retrovirális géntranszfer is alkalmas módszer a TRAIL MSC sejtekbe juttatására és funkcionális kifejezésére.

- c.) A TRAIL-t expresszáló MSC sejtek daganatsejt-ölő tulajdonságát jelentősen fokozza a célsejttel való közvetlen kontaktus, amit a célsejtek TRAIL-receptorainak oligomerizációjával ér el, vagy indirekt módon, más molekuláris mechanizmussal érzékenyítve a célsejtekben a receptor-mediált apoptózis jelpályáját.
- d.) Proteaszómagátlás hatására az MSC sejtek is érzékenyebbé válnak a TRAIL-indukált apoptózisra, akár bystander módon funkcionál a maguk termelte TRAIL vagy rekombináns formában adjuk kívülről hozzájuk. Ezért a TRAIL-t expresszáló MSC sejtek és a proteaszómagátló kezelés együttes daganatellenes hatékonyságát további kísérletekben kell még vizsgálni.

8. ÖSSZEFOGLALÓ

A rhabdomyosarcoma (RMS) a leggyakoribb gyermek és ifjúkori lágyrészdaganat, mindemellett disszeminált stádiumban a gyógyulás esélyei rosszak. Új terápiás lehetőségek kutatása szükséges a területen. Peták és mtsai mutatták ki, hogy *in vitro* körülmények között az RMS sejtvonalak jelentős hányada (7-ből 4) oligomerizált TRAIL-Flag kezelésre a teljes sejtpopulációt érintő apoptózissal válaszolt. Az ellenanyaggal oligomerizált TRAIL a teljes membránkötött TRAIL hatásához hasonló. A klinikai kipróbálás alatt álló TRAIL[114-281] (dulanermin), már kevésbé volt hatékony apoptózis-induktora az RMS sejteknek. Erősíteni kívántuk a TRAIL apoptotikus szignálját ezért megvizsgáltuk, hogy **1.)** proteaszómagátlók kombinációjával leküzdhető-e a TRAIL-rezisztencia rhabdomyosarcoma sejtekben és hogy **2.)** mesenchymális őssejtekbe (MSC) juttatott TRAIL transzgén konstrukciók közül vajon a szekretálódó, trimerizációra alkalmas izoleucin zipzárral ellátott TRAIL vagy a teljes, transzmembrán TRAIL kifejeződése hatásosabb növekedésgátlója az RMS sejteknek. Kimutattuk, hogy **1.a.)** a Bcl-2 fehérje indukált ill. ektopikus túltermelése késleltette az RMS sejtek TRAIL-indukált apoptózisát. **1.b.)** A proteaszóma magproteázainak gátlása szinergikusan fokozta a TRAIL-indukált apoptózist mind a Bcl-2-t túltermelő, mind a receptor közeli szignál komponenseket alacsony szinten kifejező RMS sejtekben. Kimutattuk továbbá, hogy **2.a.)** a membránkötött teljes TRAIL expressziója kifejezettebb és kevésbé ártalmas az MSC sejtek számára, mint az általunk konstruált szekretálódó izoleucin-zipzár konstrukcióval ellátott TRAIL és **2.b.)** a membránkötött teljes TRAIL-t kifejező MSC sejtek jelentős mértékben gátolni tudták az RD rhabdomyosarcoma és a HeLa carcinoma sejtvonalak növekedését *in vitro*, nagyjából a sejt-sejt kapcsolatban átvitt TRAIL-hatáson keresztül. Eredményeink hozzájárulhatnak a TRAIL hatékonyabb felhasználásához RMS terápiák esetében.

9. SUMMARY

Rhabdomyosarcoma (RMS) is the most frequent juvenal cancer originating from skeletal muscle, and patient survival is poor in the case of metastatic disease. New targeted therapeutics are critically needed. A decade ago Peták and his co-workers have shown that DR5 receptor of TRAIL was expressed on RMS cell lines and 4 out of 7 lines were highly sensitive for the oligomerized r.h.-TRAIL-induced caspase-mediated apoptosis. The apoptotic effect of antibody-oligomerized soluble TRAIL resembles of the membrane bound full-TRAIL. However, the soluble, non-crosslinked, recombinant TRAIL[114-281] that is in clinical phase with the name of dulanermin, was less effective apoptosis inducer in RMS cells. In order to enhance the TRAIL-induced apoptosis signal, we examined **1.)** if proteasome inhibitors were able to overcome TRAIL-resistance in RMS cells and **2.)** if secretable trimerized or membrane bound full TRAIL expressed ectopically in mesenchymal stem cells (MSC) is more appropriate for inducing apoptosis in RMS cells. Our results demonstrated that **1.a.)** Induced and ectopically expressed Bcl-2 protein delayed apoptosis in RD RMS cells exposed to TRAIL. **1b.)** Inhibitors of proteasome core proteases promoted synergistically the TRAIL-induced apoptosis both in Bcl-2 overexpressing cells (RD and RD-Bcl2) and in an RMS cell line (Rh41) with death receptor proximal signal defects. We also demonstrated that **2.a.)** Membrane bound, full TRAIL expression was more robust in MSC cells and less harmful for them than our secretable TRAIL construct. **2.b.)** MSC cells derived from bone marrow or adipose tissue and expressing ectopic membrane bound TRAIL inhibited the growth of cell number of RD RMS and HeLa carcinoma cells. This effect dominantly depended on the cell-cell contact of MSC and tumor cells. Our results will help to optimize the use of TRAIL as anticancer therapeutics in case of RMS.

10. IRODALOMJEGYZÉK

(272 db hivatkozás abc sorrendben)

- Albagli-Curiel, O., Y. Lecluse, P. Pognonec, K.E. Boulukos, and P. Martin. 2007. A new generation of pPRIG-based retroviral vectors. *BMC biotechnology*. 7:85.
- Albeck, J.G., J.M. Burke, B.B. Aldridge, M. Zhang, D.A. Lauffenburger, and P.K. Sorger. 2008. Quantitative analysis of pathways controlling extrinsic apoptosis in single cells. *Mol Cell*. 30:11-25.
- Arastu-Kapur, S., J.L. Anderl, M. Kraus, F. Parlati, K.D. Shenk, S.J. Lee, T. Muchamuel, M.K. Bennett, C. Driessen, A.J. Ball, and C.J. Kirk. 2011. Nonproteasomal targets of the proteasome inhibitors bortezomib and carfilzomib: a link to clinical adverse events. *Clin Cancer Res*. 17:2734-2743.
- Argyriou, A.A., G. Iconomou, and H.P. Kalofonos. 2008. Bortezomib-induced peripheral neuropathy in multiple myeloma: a comprehensive review of the literature. *Blood*. 112:1593-1599.
- Armistead, P.M., J. Salganick, J.S. Roh, D.M. Steinert, S. Patel, M. Munsell, A.K. El-Naggar, R.S. Benjamin, W. Zhang, and J.C. Trent. 2007. Expression of receptor tyrosine kinases and apoptotic molecules in rhabdomyosarcoma: correlation with overall survival in 105 patients. *Cancer*. 110:2293-2303.
- Ashkenazi, A., and R.S. Herbst. 2008. To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists. *The Journal of clinical investigation*. 118:1979-1990.
- Ashkenazi, A., P. Holland, and S.G. Eckhardt. 2008. Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL). *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 26:3621-3630.
- Ashkenazi, A., R.C. Pai, S. Fong, S. Leung, D.A. Lawrence, S.A. Marsters, C. Blackie, L. Chang, A.E. McMurtrey, A. Hebert, L. DeForge, I.L. Koumenis, D. Lewis, L. Harris, J. Bussiere, H. Koeppen, Z. Shahrokh, and R.H. Schwall. 1999. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *The Journal of clinical investigation*. 104:155-162.

- Baksh, D., L. Song, and R.S. Tuan. 2004. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 8:301-316.
- Bellail, A.C., L. Qi, P. Mulligan, V. Chhabra, and C. Hao. 2009. TRAIL agonists on clinical trials for cancer therapy: the promises and the challenges. *Reviews on recent clinical trials.* 4:34-41.
- Bersani, F., R. Taulli, P. Accornero, A. Morotti, S. Miretti, T. Crepaldi, and C. Ponzetto. 2008. Bortezomib-mediated proteasome inhibition as a potential strategy for the treatment of rhabdomyosarcoma. *European journal of cancer.* 44:876-884.
- Bieback, K., S. Kern, H. Kluter, and H. Eichler. 2004. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells.* 22:625-634.
- Blam, S.B., R. Mitchell, E. Tischer, J.S. Rubin, M. Silva, S. Silver, J.C. Fiddes, J.A. Abraham, and S.A. Aaronson. 1988. Addition of growth hormone secretion signal to basic fibroblast growth factor results in cell transformation and secretion of aberrant forms of the protein. *Oncogene.* 3:129-136.
- Bodmer, J.L., P. Meier, J. Tschopp, and P. Schneider. 2000. Cysteine 230 is essential for the structure and activity of the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem.* 275:20632-20637.
- Boman, F., D. Brel, L. Antunes, Z. Alhamany, J. Floquet, and L. Boccon-Gibod. 1997. Gene alterations and apoptosis in rhabdomyosarcoma. *Pediatr Pathol Lab Med.* 17:233-247.
- Brignole, C., D. Marimpietri, F. Pastorino, B. Nico, D. Di Paolo, M. Cioni, F. Piccardi, M. Cilli, A. Pezzolo, M.V. Corrias, V. Pistoia, D. Ribatti, G. Pagnan, and M. Ponzoni. 2006. Effect of bortezomib on human neuroblastoma cell growth, apoptosis, and angiogenesis. *J Natl Cancer Inst.* 98:1142-1157.
- Campagnoli, C., I.A. Roberts, S. Kumar, P.R. Bennett, I. Bellantuono, and N.M. Fisk. 2001. Identification of mesenchymal stem/progenitor cells in human first-trimester fetal blood, liver, and bone marrow. *Blood.* 98:2396-2402.

- Cavarretta, I.T., V. Altanerova, M. Matuskova, L. Kucerova, Z. Culig, and C. Altaner. 2010. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells expressing prodrug-converting enzyme inhibit human prostate tumor growth. *Mol Ther.* 18:223-231.
- Chan, F.K., H.J. Chun, L. Zheng, R.M. Siegel, K.L. Bui, and M.J. Lenardo. 2000. A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science.* 288:2351-2354.
- Chang, D.W., Z. Xing, Y. Pan, A. Algeciras-Schimmich, B.C. Barnhart, S. Yaish-Ohad, M.E. Peter, and X. Yang. 2002. c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *The EMBO journal.* 21:3704-3714.
- Charbord, P. 2010. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther.* 21:1045-1056.
- Chaudhary, P.M., M. Eby, A. Jasmin, A. Bookwalter, J. Murray, and L. Hood. 1997. Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity.* 7:821-830.
- Cheng, E.H., D.G. Kirsch, R.J. Clem, R. Ravi, M.B. Kastan, A. Bedi, K. Ueno, and J.M. Hardwick. 1997. Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science.* 278:1966-1968.
- Cheong, H.J., K.S. Lee, I.S. Woo, J.H. Won, and J.H. Byun. 2011. Up-regulation of the DR5 expression by proteasome inhibitor MG132 augments TRAIL-induced apoptosis in soft tissue sarcoma cell lines. *Cancer Res Treat.* 43:124-130.
- Choi, B.H., L. Feng, and H.S. Yoon. 2010. FKBP38 protects Bcl-2 from caspase-dependent degradation. *J Biol Chem.* 285:9770-9779.
- Ciavarella, S., M. Dominici, F. Dammacco, and F. Silvestris. 2011. Mesenchymal stem cells: a new promise in anticancer therapy. *Stem Cells Dev.* 20:1-10.
- Clancy, L., K. Mruk, K. Archer, M. Woelfel, J. Mongkolsapaya, G. Screaton, M.J. Lenardo, and F.K. Chan. 2005. Preligand assembly domain-mediated ligand-independent association between TRAIL receptor 4 (TR4) and TR2 regulates TRAIL-induced apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 102:18099-18104.
- Conticello, C., L. Adamo, R. Giuffrida, L. Vicari, A. Zeuner, A. Eramo, G. Anastasi, L. Memeo, D. Giuffrida, G. Iannolo, M. Gulisano, and R. De Maria. 2007.

- Proteasome inhibitors synergize with tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand to induce anaplastic thyroid carcinoma cell death. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 92:1938-1942.
- Corallini, F., P. Secchiero, A.P. Beltrami, D. Cesselli, E. Puppato, R. Ferrari, C.A. Beltrami, and G. Zauli. 2010. TNF-alpha modulates the migratory response of mesenchymal stem cells to TRAIL. *Cell Mol Life Sci*. 67:1307-1314.
- Cousin, B., E. Ravet, S. Poglio, F. De Toni, M. Bertuzzi, H. Lulka, I. Touil, M. Andre, J.L. Grolleau, J.M. Peron, J.P. Chavoïn, P. Bourin, L. Penicaud, L. Casteilla, L. Buscaïl, and P. Cordelier. 2009. Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo. *PLoS one*. 4:e6278.
- da Silva Meirelles, L., P.C. Chagastelles, and N.B. Nardi. 2006. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci*. 119:2204-2213.
- Darzynkiewicz, Z., S. Bruno, G. Del Bino, W. Gorczyca, M.A. Hotz, P. Lassota, and F. Traganos. 1992. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry*. 13:795-808.
- De Bari, C., F. Dell'Accio, P. Tylzanowski, and F.P. Luyten. 2001. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and rheumatism*. 44:1928-1942.
- Degli-Esposti, M.A., W.C. Dougall, P.J. Smolak, J.Y. Waugh, C.A. Smith, and R.G. Goodwin. 1997. The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity*. 7:813-820.
- Delforge, M., J. Blade, M.A. Dimopoulos, T. Facon, M. Kropff, H. Ludwig, A. Palumbo, P. Van Damme, J.F. San-Miguel, and P. Sonneveld. 2010. Treatment-related peripheral neuropathy in multiple myeloma: the challenge continues. *Lancet Oncol*. 11:1086-1095.
- Desplanques, G., N. Giuliani, R. Delsignore, V. Rizzoli, R. Bataille, and S. Barille-Nion. 2009. Impact of XIAP protein levels on the survival of myeloma cells. *Haematologica*. 94:87-93.

- Djouad, F., P. Plerce, C. Bony, P. Tropel, F. Apparailly, J. Sany, D. Noel, and C. Jorgensen. 2003. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*. 102:3837-3844.
- Dominici, M., K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, D. Prockop, and E. Horwitz. 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8:315-317.
- Dominov, J.A., J.J. Dunn, and J.B. Miller. 1998. Bcl-2 expression identifies an early stage of myogenesis and promotes clonal expansion of muscle cells. *J Cell Biol*. 142:537-544.
- Dominov, J.A., C.A. Houlihan-Kawamoto, C.J. Swap, and J.B. Miller. 2001. Pro- and anti-apoptotic members of the Bcl-2 family in skeletal muscle: a distinct role for Bcl-2 in later stages of myogenesis. *Dev Dyn*. 220:18-26.
- Duan, X., H. Guan, Y. Cao, and E.S. Kleinerman. 2009. Murine bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interleukin-12 gene delivery into Ewing sarcoma tumors. *Cancer*. 115:13-22.
- Dunai, Z., P.I. Bauer, and R. Mihalik. 2011. Necroptosis: biochemical, physiological and pathological aspects. *Pathology oncology research : POR*. 17:791-800.
- Eliopoulos, N., M. Francois, M.N. Boivin, D. Martineau, and J. Galipeau. 2008. Neo-organoid of marrow mesenchymal stromal cells secreting interleukin-12 for breast cancer therapy. *Cancer Res*. 68:4810-4818.
- Elnemr, A., T. Ohta, A. Yachie, M. Kayahara, H. Kitagawa, T. Fujimura, I. Ninomiya, S. Fushida, G.I. Nishimura, K. Shimizu, and K. Miwa. 2001. Human pancreatic cancer cells disable function of Fas receptors at several levels in Fas signal transduction pathway. *International journal of oncology*. 18:311-316.
- Elzaouk, L., K. Moelling, and J. Pavlovic. 2006. Anti-tumor activity of mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse melanoma model. *Experimental dermatology*. 15:865-874.
- Emery, J.G., P. McDonnell, M.B. Burke, K.C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, E.R. Appelbaum, C. Eichman, R. DiPrinzio, R.A. Dodds, I.E. James, M. Rosenberg, J.C. Lee, and P.R. Young. 1998. Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *The Journal of biological chemistry*. 273:14363-14367.

- Fakler, M., S. Loeder, M. Vogler, K. Schneider, I. Jeremias, K.M. Debatin, and S. Fulda. 2009. Small molecule XIAP inhibitors cooperate with TRAIL to induce apoptosis in childhood acute leukemia cells and overcome Bcl-2-mediated resistance. *Blood*. 113:1710-1722.
- Falschlehner, C., U. Schaefer, and H. Walczak. 2009. Following TRAIL's path in the immune system. *Immunology*. 127:145-154.
- Feng, B., and L. Chen. 2009. Review of mesenchymal stem cells and tumors: executioner or coconspirator? *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*. 24:717-721.
- Fennell, D.A., A. Chacko, and L. Mutti. 2008. BCL-2 family regulation by the 20S proteasome inhibitor bortezomib. *Oncogene*. 27:1189-1197.
- Finnberg, N., J.J. Gruber, P. Fei, D. Rudolph, A. Bric, S.H. Kim, T.F. Burns, H. Ajuha, R. Page, G.S. Wu, Y. Chen, W.G. McKenna, E. Bernhard, S. Lowe, T. Mak, and W.S. El-Deiry. 2005. DR5 knockout mice are compromised in radiation-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 25:2000-2013.
- Friedenstein, A.J., S. Piatetzky, II, and K.V. Petrakova. 1966. Osteogenesis in transplants of bone marrow cells. *Journal of embryology and experimental morphology*. 16:381-390.
- Fulda, S. 2011. Novel insights into the synergistic interaction of Bortezomib and TRAIL: tBid provides the link. *Oncotarget*. 2:418-421.
- Galie, M., G. Konstantinidou, D. Peroni, I. Scambi, C. Marchini, V. Lisi, M. Krampera, P. Magnani, F. Merigo, M. Montani, F. Boschi, P. Marzola, R. Orru, P. Farace, A. Sbarbati, and A. Amici. 2008. Mesenchymal stem cells share molecular signature with mesenchymal tumor cells and favor early tumor growth in syngeneic mice. *Oncogene*. 27:2542-2551.
- Ganten, T.M., R. Koschny, T.L. Haas, J. Sykora, M. Li-Weber, K. Herzer, and H. Walczak. 2005. Proteasome inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells, but not human hepatocytes, to TRAIL. *Hepatology*. 42:588-597.
- Gao, P., Q. Ding, Z. Wu, H. Jiang, and Z. Fang. 2010. Therapeutic potential of human mesenchymal stem cells producing IL-12 in a mouse xenograft model of renal cell carcinoma. *Cancer letters*. 290:157-166.

- Gil-Parrado, S., A. Fernandez-Montalvan, I. Assfalg-Machleidt, O. Popp, F. Bestvater, A. Holloschi, T.A. Knoch, E.A. Auerswald, K. Welsh, J.C. Reed, H. Fritz, P. Fuentes-Prior, E. Spiess, G.S. Salvesen, and W. Machleidt. 2002. Ionomycin-activated calpain triggers apoptosis. A probable role for Bcl-2 family members. *J Biol Chem.* 277:27217-27226.
- Gondi, C.S., V.R. Gogineni, C. Chetty, V.R. Dasari, B. Gorantla, M. Gujrati, D.H. Dinh, and J.S. Rao. 2010. Induction of apoptosis in glioma cells requires cell-to-cell contact with human umbilical cord blood stem cells. *Int J Oncol.* 36:1165-1173.
- Gong, J., F. Traganos, and Z. Darzynkiewicz. 1994. A selective procedure for DNA extraction from apoptotic cells applicable for gel electrophoresis and flow cytometry. *Anal Biochem.* 218:314-319.
- Gonzalvez, F., and A. Ashkenazi. 2010. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL. *Oncogene.* 29:4752-4765.
- Gotherstrom, C., A. Lundqvist, I.R. Duprez, R. Childs, L. Berg, and K. le Blanc. 2011. Fetal and adult multipotent mesenchymal stromal cells are killed by different pathways. *Cytotherapy.* 13:269-278.
- Grandgirard, D., E. Studer, L. Monney, T. Belser, I. Fellay, C. Borner, and M.R. Michel. 1998. Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for a caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2. *Embo J.* 17:1268-1278.
- Gresch, O., F.B. Engel, D. Nestic, T.T. Tran, H.M. England, E.S. Hickman, I. Korner, L. Gan, S. Chen, S. Castro-Obregon, R. Hammermann, J. Wolf, H. Muller-Hartmann, M. Nix, G. Siebenkotten, G. Kraus, and K. Lun. 2004. New non-viral method for gene transfer into primary cells. *Methods.* 33:151-163.
- Griffith, T.S., S.R. Wiley, M.Z. Kubin, L.M. Sedger, C.R. Maliszewski, and N.A. Fanger. 1999. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *The Journal of experimental medicine.* 189:1343-1354.
- Grisendi, G., C. Anneren, L. Cafarelli, R. Sternieri, E. Veronesi, G.L. Cervo, S. Luminari, M. Maur, A. Frassoldati, G. Palazzi, S. Otsuru, F. Bambi, P. Paolucci, C. Pierfranco, E. Horwitz, and M. Dominici. 2010a. GMP-manufactured density

- gradient media for optimized mesenchymal stromal/stem cell isolation and expansion. *Cytotherapy*. 12:466-477.
- Grisendi, G., R. Bussolari, L. Cafarelli, I. Petak, V. Rasini, E. Veronesi, G. De Santis, C. Spano, M. Tagliazzucchi, H. Barti-Juhasz, L. Scarabelli, F. Bambi, A. Frassoldati, G. Rossi, C. Casali, U. Morandi, E.M. Horwitz, P. Paolucci, P. Conte, and M. Dominici. 2010b. Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Res*. 70:3718-3729.
- Grisendi, G., R. Bussolari, E. Veronesi, S. Piccinno, J.S. Burns, G. De Santis, P. Loschi, M. Pignatti, F. Di Benedetto, R. Ballarin, C. Di Gregorio, V. Guarneri, L. Piccinini, E.M. Horwitz, P. Paolucci, P. Conte, and M. Dominici. 2011. Understanding tumor-stroma interplays for targeted therapies by armed mesenchymal stromal progenitors: the Mesenkillers. *Am J Cancer Res*. 1:787-805.
- Hayakawa, Y., V. Screpanti, H. Yagita, A. Grandien, H.G. Ljunggren, M.J. Smyth, and B.J. Chambers. 2004. NK cell TRAIL eliminates immature dendritic cells in vivo and limits dendritic cell vaccination efficacy. *J Immunol*. 172:123-129.
- He, Q., Y. Huang, and M.S. Sheikh. 2004. Proteasome inhibitor MG132 upregulates death receptor 5 and cooperates with Apo2L/TRAIL to induce apoptosis in Bax-proficient and -deficient cells. *Oncogene*. 23:2554-2558.
- Heerema-McKenney, A., L.C. Wijnaendts, J.F. Pulliam, D. Lopez-Terrada, J.K. McKenney, S. Zhu, K. Montgomery, J. Mitchell, R.J. Marinelli, A.A. Hart, M. van de Rijn, and S.C. Linn. 2008. Diffuse myogenin expression by immunohistochemistry is an independent marker of poor survival in pediatric rhabdomyosarcoma: a tissue microarray study of 71 primary tumors including correlation with molecular phenotype. *Am J Surg Pathol*. 32:1513-1522.
- Hegyí, B., B. Sagi, J. Kovacs, J. Kiss, V.S. Urban, G. Meszaros, E. Monostori, and F. Uher. 2010. Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall. *International immunology*. 22:551-559.
- Herbeuval, J.P., J.C. Grivel, A. Boasso, A.W. Hardy, C. Chougnat, M.J. Dolan, H. Yagita, J.D. Lifson, and G.M. Shearer. 2005. CD4+ T-cell death induced by

- infectious and noninfectious HIV-1: role of type 1 interferon-dependent, TRAIL/DR5-mediated apoptosis. *Blood*. 106:3524-3531.
- Herbst, R.S., S.G. Eckhardt, R. Kurzrock, S. Ebbinghaus, P.J. O'Dwyer, M.S. Gordon, W. Novotny, M.A. Goldwasser, T.M. Tohny, B.L. Lum, A. Ashkenazi, A.M. Jubb, and D.S. Mendelson. 2010. Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 28:2839-2846.
- Hetschko, H., V. Voss, V. Seifert, J.H. Prehn, and D. Kogel. 2008. Upregulation of DR5 by proteasome inhibitors potently sensitizes glioma cells to TRAIL-induced apoptosis. *The FEBS journal*. 275:1925-1936.
- Hettmer, S., and A.J. Wagers. 2010. Muscling in: Uncovering the origins of rhabdomyosarcoma. *Nat Med*. 16:171-173.
- Holler, N., A. Tardivel, M. Kovacsovic-Bankowski, S. Hertig, O. Gaide, F. Martinon, A. Tinel, D. Deperthes, S. Calderara, T. Schulthess, J. Engel, P. Schneider, and J. Tschopp. 2003. Two adjacent trimeric Fas ligands are required for Fas signaling and formation of a death-inducing signaling complex. *Mol Cell Biol*. 23:1428-1440.
- Holler, N., R. Zaru, O. Micheau, M. Thome, A. Attinger, S. Valitutti, J.L. Bodmer, P. Schneider, B. Seed, and J. Tschopp. 2000. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol*. 1:489-495.
- Honczarenko, M., Y. Le, M. Swierkowski, I. Ghiran, A.M. Glodek, and L.E. Silberstein. 2006. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*. 24:1030-1041.
- Hosaka, M., M. Nagahama, W.S. Kim, T. Watanabe, K. Hatsuzawa, J. Ikemizu, K. Murakami, and K. Nakayama. 1991. Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *The Journal of biological chemistry*. 266:12127-12130.
- Houghton, J.A., P.J. Houghton, G.M. Brodeur, and A.A. Green. 1981. Development of resistance to vincristine in a childhood rhabdomyosarcoma growing in immune-deprived mice. *Int J Cancer*. 28:409-415.

- Houghton, P.J., C.L. Morton, C. Tucker, D. Payne, E. Favours, C. Cole, R. Gorlick, E.A. Kolb, W. Zhang, R. Lock, H. Carol, M. Tajbakhsh, C.P. Reynolds, J.M. Maris, J. Courtright, S.T. Keir, H.S. Friedman, C. Stopford, J. Zeidner, J. Wu, T. Liu, C.A. Billups, J. Khan, S. Ansher, J. Zhang, and M.A. Smith. 2007. The pediatric preclinical testing program: description of models and early testing results. *Pediatr Blood Cancer*. 49:928-940.
- Hu, W.H., H. Johnson, and H.B. Shu. 1999. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors signal NF-kappaB and JNK activation and apoptosis through distinct pathways. *The Journal of biological chemistry*. 274:30603-30610.
- Hymowitz, S.G., H.W. Christinger, G. Fuh, M. Ultsch, M. O'Connell, R.F. Kelley, A. Ashkenazi, and A.M. de Vos. 1999. Triggering cell death: the crystal structure of Apo2L/TRAIL in a complex with death receptor 5. *Molecular cell*. 4:563-571.
- Hymowitz, S.G., M.P. O'Connell, M.H. Ultsch, A. Hurst, K. Totpal, A. Ashkenazi, A.M. de Vos, and R.F. Kelley. 2000. A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL. *Biochemistry*. 39:633-640.
- in 't Anker, P.S., W.A. Noort, S.A. Scherjon, C. Kleijburg-van der Keur, A.B. Kruisselbrink, R.L. van Bezooijen, W. Beekhuizen, R. Willemze, H.H. Kanhai, and W.E. Fibbe. 2003. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential. *Haematologica*. 88:845-852.
- Inoue, T., K. Shiraki, H. Fuke, Y. Yamanaka, K. Miyashita, Y. Yamaguchi, N. Yamamoto, K. Ito, K. Sugimoto, and T. Nakano. 2006. Proteasome inhibition sensitizes hepatocellular carcinoma cells to TRAIL by suppressing caspase inhibitors and AKT pathway. *Anti-cancer drugs*. 17:261-268.
- Irmeler, M., M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J.L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L.E. French, and J. Tschopp. 1997. Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature*. 388:190-195.

- Ishimura, N., H. Isomoto, S.F. Bronk, and G.J. Gores. 2006. Trail induces cell migration and invasion in apoptosis-resistant cholangiocarcinoma cells. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 290:G129-136.
- Izeradjene, K., L. Douglas, A. Delaney, and J.A. Houghton. 2004a. Influence of casein kinase II in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in human rhabdomyosarcoma cells. *Clin Cancer Res*. 10:6650-6660.
- Izeradjene, K., L. Douglas, A.B. Delaney, and J.A. Houghton. 2004b. Casein kinase I attenuates tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis by regulating the recruitment of fas-associated death domain and procaspase-8 to the death-inducing signaling complex. *Cancer Res*. 64:8036-8044.
- Janssen, E.M., N.M. Droin, E.E. Lemmens, M.J. Pinkoski, S.J. Bensinger, B.D. Ehst, T.S. Griffith, D.R. Green, and S.P. Schoenberger. 2005. CD4+ T-cell help controls CD8+ T-cell memory via TRAIL-mediated activation-induced cell death. *Nature*. 434:88-93.
- Jin, Z., and W.S. El-Deiry. 2006. Distinct signaling pathways in TRAIL- versus tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 26:8136-8148.
- Jin, Z., Y. Li, R. Pitti, D. Lawrence, V.C. Pham, J.R. Lill, and A. Ashkenazi. 2009. Cullin3-based polyubiquitination and p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling. *Cell*. 137:721-735.
- Jo, M., T.H. Kim, D.W. Seol, J.E. Esplen, K. Dorko, T.R. Billiar, and S.C. Strom. 2000. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *Nature medicine*. 6:564-567.
- Johnson, T.R., K. Stone, M. Nikrad, T. Yeh, W.X. Zong, C.B. Thompson, A. Nesterov, and A.S. Kraft. 2003. The proteasome inhibitor PS-341 overcomes TRAIL resistance in Bax and caspase 9-negative or Bcl-xL overexpressing cells. *Oncogene*. 22:4953-4963.
- Jost, P.J., S. Grabow, D. Gray, M.D. McKenzie, U. Nachbur, D.C. Huang, P. Bouillet, H.E. Thomas, C. Borner, J. Silke, A. Strasser, and T. Kaufmann. 2009. XIAP discriminates between type I and type II FAS-induced apoptosis. *Nature*. 460:1035-1039.

- Kahana, S., S. Finniss, S. Cazacu, C. Xiang, H.K. Lee, S. Brodie, R.S. Goldstein, V. Roitman, S. Slavin, T. Mikkelsen, and C. Brodie. 2011. Proteasome inhibitors sensitize glioma cells and glioma stem cells to TRAIL-induced apoptosis by PKCepsilon-dependent downregulation of AKT and XIAP expressions. *Cell Signal*. 23:1348-1357.
- Kandasamy, K., and A.S. Kraft. 2008. Proteasome inhibitor PS-341 (VELCADE) induces stabilization of the TRAIL receptor DR5 mRNA through the 3'-untranslated region. *Molecular cancer therapeutics*. 7:1091-1100.
- Kane, R.C., P.F. Bross, A.T. Farrell, and R. Pazdur. 2003. Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *The oncologist*. 8:508-513.
- Kang, Z., J.J. Chen, Y. Yu, B. Li, S.Y. Sun, B. Zhang, and L. Cao. 2011. Drozitumab, a human antibody to death receptor 5, has potent antitumor activity against rhabdomyosarcoma with the expression of caspase-8 predictive of response. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 17:3181-3192.
- Kappler, R., J. Calzada-Wack, U. Schnitzbauer, M. Koleva, A. Herwig, G. Piontek, F. Graedler, J. Adamski, U. Heinzmann, J. Schlegel, B. Hemmerlein, L. Quintanilla-Martinez, and H. Hahn. 2003. Molecular characterization of Patched-associated rhabdomyosarcoma. *J Pathol*. 200:348-356.
- Karnoub, A.E., A.B. Dash, A.P. Vo, A. Sullivan, M.W. Brooks, G.W. Bell, A.L. Richardson, K. Polyak, R. Tubo, and R.A. Weinberg. 2007. Mesenchymal stem cells within tumour stroma promote breast cancer metastasis. *Nature*. 449:557-563.
- Kashkar, H. 2010. X-linked inhibitor of apoptosis: a chemoresistance factor or a hollow promise. *Clin Cancer Res*. 16:4496-4502.
- Kashkar, H., A. Deggerich, J.M. Seeger, B. Yazdanpanah, K. Wiegmann, D. Haubert, C. Pongratz, and M. Kronke. 2007. NF-kappaB-independent down-regulation of XIAP by bortezomib sensitizes HL B cells against cytotoxic drugs. *Blood*. 109:3982-3988.
- Kaufmann, T., A. Strasser, and P.J. Jost. 2012. Fas death receptor signalling: roles of Bid and XIAP. *Cell death and differentiation*. 19:42-50.

- Keller, C., and M.R. Capecchi. 2005. New genetic tactics to model alveolar rhabdomyosarcoma in the mouse. *Cancer Res.* 65:7530-7532.
- Kelley, S.K., and A. Ashkenazi. 2004. Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. *Curr Opin Pharmacol.* 4:333-339.
- Kelly, P.N., and A. Strasser. 2011. The role of Bcl-2 and its pro-survival relatives in tumorigenesis and cancer therapy. *Cell Death Differ.* 18:1414-1424.
- Kemp, T.J., J.M. Moore, and T.S. Griffith. 2004. Human B cells express functional TRAIL/Apo-2 ligand after CpG-containing oligodeoxynucleotide stimulation. *J Immunol.* 173:892-899.
- Kern, S., H. Eichler, J. Stoeve, H. Kluter, and K. Bieback. 2006. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells.* 24:1294-1301.
- Khakoo, A.Y., S. Pati, S.A. Anderson, W. Reid, M.F. Elshal, Rovira, II, A.T. Nguyen, D. Malide, C.A. Combs, G. Hall, J. Zhang, M. Raffeld, T.B. Rogers, W. Stetler-Stevenson, J.A. Frank, M. Reitz, and T. Finkel. 2006. Human mesenchymal stem cells exert potent antitumorigenic effects in a model of Kaposi's sarcoma. *The Journal of experimental medicine.* 203:1235-1247.
- Khanbolooki, S., S.T. Nawrocki, T. Arumugam, R. Andtbacka, M.S. Pino, R. Kurzrock, C.D. Logsdon, J.L. Abbruzzese, and D.J. McConkey. 2006. Nuclear factor-kappaB maintains TRAIL resistance in human pancreatic cancer cells. *Mol Cancer Ther.* 5:2251-2260.
- Kim, C.Y., M. Jeong, H. Mushiake, B.M. Kim, W.B. Kim, J.P. Ko, M.H. Kim, M. Kim, T.H. Kim, P.D. Robbins, T.R. Billiar, and D.W. Seol. 2006. Cancer gene therapy using a novel secretable trimeric TRAIL. *Gene Ther.* 13:330-338.
- Kim, S.M., J.Y. Lim, S.I. Park, C.H. Jeong, J.H. Oh, M. Jeong, W. Oh, S.H. Park, Y.C. Sung, and S.S. Jeun. 2008. Gene therapy using TRAIL-secreting human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells against intracranial glioma. *Cancer Res.* 68:9614-9623.
- Kischkel, F.C., D.A. Lawrence, A. Chuntharapai, P. Schow, K.J. Kim, and A. Ashkenazi. 2000. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity.* 12:611-620.

- Kischkel, F.C., D.A. Lawrence, A. Tinel, H. LeBlanc, A. Virmani, P. Schow, A. Gazdar, J. Blenis, D. Arnott, and A. Ashkenazi. 2001. Death receptor recruitment of endogenous caspase-10 and apoptosis initiation in the absence of caspase-8. *The Journal of biological chemistry*. 276:46639-46646.
- Kiss, J., V.S. Urban, V. Dudics, V. Vas, and F. Uher. 2008. [Mesenchymal stem cells and the immune system--immunosuppression without drugs?]. *Orv Hetil*. 149:339-346.
- Koschny, R., H. Holland, J. Sykora, T.L. Haas, M.R. Sprick, T.M. Ganten, W. Krupp, M. Bauer, P. Ahnert, J. Meixensberger, and H. Walczak. 2007. Bortezomib sensitizes primary human astrocytoma cells of WHO grades I to IV for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 13:3403-3412.
- Kucerova, L., V. Altanerova, M. Matuskova, S. Tyciakova, and C. Altaner. 2007. Adipose tissue-derived human mesenchymal stem cells mediated prodrug cancer gene therapy. *Cancer Res*. 67:6304-6313.
- Kucerova, L., M. Matuskova, A. Pastorakova, S. Tyciakova, J. Jakubikova, R. Bohovic, V. Altanerova, and C. Altaner. 2008. Cytosine deaminase expressing human mesenchymal stem cells mediated tumour regression in melanoma bearing mice. *The journal of gene medicine*. 10:1071-1082.
- Lai, R.C., F. Arslan, M.M. Lee, N.S. Sze, A. Choo, T.S. Chen, M. Salto-Tellez, L. Timmers, C.N. Lee, R.M. El Oakley, G. Pasterkamp, D.P. de Kleijn, and S.K. Lim. 2010. Exosome secreted by MSC reduces myocardial ischemia/reperfusion injury. *Stem Cell Res*. 4:214-222.
- Lakshmiopathy, U., B. Pelacho, K. Sudo, J.L. Linehan, E. Coucouvanis, D.S. Kaufman, and C.M. Verfaillie. 2004. Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *Stem Cells*. 22:531-543.
- Lalaoui, N., A. Morle, D. Merino, G. Jacquemin, E. Iessi, A. Morizot, S. Shirley, B. Robert, E. Solary, C. Garrido, and O. Micheau. 2011. TRAIL-R4 promotes tumor growth and resistance to apoptosis in cervical carcinoma HeLa cells through AKT. *PloS one*. 6:e19679.

- Lamhamedi-Cherradi, S.E., S.J. Zheng, K.A. Maguschak, J. Peschon, and Y.H. Chen. 2003. Defective thymocyte apoptosis and accelerated autoimmune diseases in TRAIL^{-/-} mice. *Nat Immunol.* 4:255-260.
- Lawrence, D., Z. Shahrokh, S. Marsters, K. Achilles, D. Shih, B. Mounho, K. Hillan, K. Totpal, L. DeForge, P. Schow, J. Hooley, S. Sherwood, R. Pai, S. Leung, L. Khan, B. Gliniak, J. Bussiere, C.A. Smith, S.S. Strom, S. Kelley, J.A. Fox, D. Thomas, and A. Ashkenazi. 2001. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nature medicine.* 7:383-385.
- Lee, R.H., A.A. Pulin, M.J. Seo, D.J. Kota, J. Ylostalo, B.L. Larson, L. Semprun-Prieto, P. Delafontaine, and D.J. Prockop. 2009. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell.* 5:54-63.
- Leverkus, M., M.R. Sprick, T. Wachter, T. Mengling, B. Baumann, E. Serfling, E.B. Brocker, M. Goebeler, M. Neumann, and H. Walczak. 2003. Proteasome inhibition results in TRAIL sensitization of primary keratinocytes by removing the resistance-mediating block of effector caspase maturation. *Molecular and cellular biology.* 23:777-790.
- Li, H., H. Zhu, C.J. Xu, and J. Yuan. 1998. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell.* 94:491-501.
- Li, Q., W.M. Dashwood, X. Zhong, H. Nakagama, and R.H. Dashwood. 2007. Bcl-2 overexpression in PhIP-induced colon tumors: cloning of the rat Bcl-2 promoter and characterization of a pathway involving beta-catenin, c-Myc and E2F1. *Oncogene.* 26:6194-6202.
- Lin, Y., A. Devin, A. Cook, M.M. Keane, M. Kelliher, S. Lipkowitz, and Z.G. Liu. 2000. The death domain kinase RIP is essential for TRAIL (Apo2L)-induced activation of IkappaB kinase and c-Jun N-terminal kinase. *Molecular and cellular biology.* 20:6638-6645.
- Ling, Y.H., L. Liebes, B. Ng, M. Buckley, P.J. Elliott, J. Adams, J.D. Jiang, F.M. Muggia, and R. Perez-Soler. 2002. PS-341, a novel proteasome inhibitor, induces Bcl-2 phosphorylation and cleavage in association with G2-M phase arrest and apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 1:841-849.

- Liu, F.T., S.G. Agrawal, J.G. Gribben, H. Ye, M.Q. Du, A.C. Newland, and L. Jia. 2008. Bortezomib blocks Bax degradation in malignant B cells during treatment with TRAIL. *Blood*. 111:2797-2805.
- Liu, X., P. Yue, S. Chen, L. Hu, S. Lonial, F.R. Khuri, and S.Y. Sun. 2007. The proteasome inhibitor PS-341 (bortezomib) up-regulates DR5 expression leading to induction of apoptosis and enhancement of TRAIL-induced apoptosis despite up-regulation of c-FLIP and survivin expression in human NSCLC cells. *Cancer research*. 67:4981-4988.
- Loebinger, M.R., A. Eddaoudi, D. Davies, and S.M. Janes. 2009. Mesenchymal stem cell delivery of TRAIL can eliminate metastatic cancer. *Cancer Res*. 69:4134-4142.
- Lu, G., V. Punj, and P.M. Chaudhary. 2008. Proteasome inhibitor Bortezomib induces cell cycle arrest and apoptosis in cell lines derived from Ewing's sarcoma family of tumors and synergizes with TRAIL. *Cancer biology & therapy*. 7:603-608.
- Ludwig, H., D. Khayat, G. Giaccone, and T. Facon. 2005. Proteasome inhibition and its clinical prospects in the treatment of hematologic and solid malignancies. *Cancer*. 104:1794-1807.
- Luetzkendorf, J., L.P. Mueller, T. Mueller, H. Caysa, K. Nerger, and H.J. Schmoll. 2010. Growth inhibition of colorectal carcinoma by lentiviral TRAIL-transgenic human mesenchymal stem cells requires their substantial intratumoral presence. *J Cell Mol Med*. 14:2292-2304.
- Luo, X., I. Budihardjo, H. Zou, C. Slaughter, and X. Wang. 1998. Bid, a Bcl2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*. 94:481-490.
- Maas, C., I. Verbrugge, E. de Vries, G. Savich, L.W. van de Kooij, S.W. Tait, and J. Borst. 2010. Smac/DIABLO release from mitochondria and XIAP inhibition are essential to limit clonogenicity of Type I tumor cells after TRAIL receptor stimulation. *Cell Death Differ*. 17:1613-1623.
- Maasho, K., A. Marusina, N.M. Reynolds, J.E. Coligan, and F. Borrego. 2004. Efficient gene transfer into the human natural killer cell line, NKL, using the Amaxa nucleofection system. *Journal of immunological methods*. 284:133-140.

- MacFarlane, M. 2003. TRAIL-induced signalling and apoptosis. *Toxicology letters*. 139:89-97.
- Mahalingam, D., E. Szegezdi, M. Keane, S. de Jong, and A. Samali. 2009. TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer treatment reviews*. 35:280-288.
- Maki, R.G., A.S. Kraft, K. Scheu, J. Yamada, S. Wadler, C.R. Antonescu, J.J. Wright, and G.K. Schwartz. 2005. A multicenter Phase II study of bortezomib in recurrent or metastatic sarcomas. *Cancer*. 103:1431-1438.
- Malinin, N.L., M.P. Boldin, A.V. Kovalenko, and D. Wallach. 1997. MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature*. 385:540-544.
- Mansilla, E., G.H. Marin, F. Sturla, H.E. Drago, M.A. Gil, E. Salas, M.C. Gardiner, G. Piccinelli, S. Bossi, L. Petrelli, G. Iorio, C.A. Ramos, and C. Soratti. 2005. Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. *Transplant Proc*. 37:292-294.
- Mariani, S.M., and P.H. Krammer. 1998. Differential regulation of TRAIL and CD95 ligand in transformed cells of the T and B lymphocyte lineage. *Eur J Immunol*. 28:973-982.
- Marsters, S.A., J.P. Sheridan, R.M. Pitti, A. Huang, M. Skubatch, D. Baldwin, J. Yuan, A. Gurney, A.D. Goddard, P. Godowski, and A. Ashkenazi. 1997. A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Current biology : CB*. 7:1003-1006.
- Martinet, W., D.M. Schrijvers, and M.M. Kockx. 2003. Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocytic cells. *Biotechnol Lett*. 25:1025-1029.
- Matuskova, M., K. Hlubinova, A. Pastorakova, L. Hunakova, V. Altanerova, C. Altaner, and L. Kucerova. 2010. HSV-tk expressing mesenchymal stem cells exert bystander effect on human glioblastoma cells. *Cancer letters*. 290:58-67.
- McAllister, R.M., J. Melnyk, J.Z. Finkelstein, E.C. Adams, Jr., and M.B. Gardner. 1969. Cultivation in vitro of cells derived from a human rhabdomyosarcoma. *Cancer*. 24:520-526.

- Mellgren, R.L. 1997. Specificities of cell permeant peptidyl inhibitors for the proteinase activities of mu-calpain and the 20 S proteasome. *J Biol Chem.* 272:29899-29903.
- Menon, L.G., K. Kelly, H.W. Yang, S.K. Kim, P.M. Black, and R.S. Carroll. 2009. Human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells expressing S-TRAIL as a cellular delivery vehicle for human glioma therapy. *Stem Cells.* 27:2320-2330.
- Menon, L.G., S. Picinich, R. Koneru, H. Gao, S.Y. Lin, M. Koneru, P. Mayer-Kuckuk, J. Glod, and D. Banerjee. 2007. Differential gene expression associated with migration of mesenchymal stem cells to conditioned medium from tumor cells or bone marrow cells. *Stem Cells.* 25:520-528.
- Merino, D., N. Lalaoui, A. Morizot, P. Schneider, E. Solary, and O. Micheau. 2006. Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2. *Molecular and cellular biology.* 26:7046-7055.
- Micheau, O., M. Thome, P. Schneider, N. Holler, J. Tschopp, D.W. Nicholson, C. Briand, and M.G. Grutter. 2002. The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *The Journal of biological chemistry.* 277:45162-45171.
- Mihalik, R., F. Uher, E.E. Pocsik, L. Berczi, M. Benczur, and L. Kopper. 1996. Detection of Drug-induced Apoptosis by Flow Cytometry after Alkaline Extraction of Ethanol Fixed Cells. *Pathol Oncol Res.* 2:78-83.
- Mohr, A., S.M. Albarenque, L. Deedigan, R. Yu, M. Reidy, S. Fulda, and R.M. Zwacka. 2010. Targeting of XIAP combined with systemic mesenchymal stem cell-mediated delivery of sTRAIL ligand inhibits metastatic growth of pancreatic carcinoma cells. *Stem Cells.* 28:2109-2120.
- Mohr, A., M. Lyons, L. Deedigan, T. Harte, G. Shaw, L. Howard, F. Barry, T. O'Brien, and R. Zwacka. 2008. Mesenchymal stem cells expressing TRAIL lead to tumour growth inhibition in an experimental lung cancer model. *J Cell Mol Med.* 12:2628-2643.
- Morissette, M.C., J. Parent, and J. Milot. 2009. Alveolar epithelial and endothelial cell apoptosis in emphysema: what we know and what we need to know. *International journal of chronic obstructive pulmonary disease.* 4:19-31.

- Muehlberg, F.L., Y.H. Song, A. Krohn, S.P. Pinilla, L.H. Droll, X. Leng, M. Seidensticker, J. Ricke, A.M. Altman, E. Devarajan, W. Liu, R.B. Arlinghaus, and E.U. Alt. 2009. Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis. *Carcinogenesis*. 30:589-597.
- Mueller, L.P., J. Luetzkendorf, M. Widder, K. Nerger, H. Caysa, and T. Mueller. 2011. TRAIL-transduced multipotent mesenchymal stromal cells (TRAIL-MSC) overcome TRAIL resistance in selected CRC cell lines in vitro and in vivo. *Cancer gene therapy*. 18:229-239.
- Muhlenbeck, F., P. Schneider, J.L. Bodmer, R. Schwenzer, A. Hauser, G. Schubert, P. Scheurich, D. Moosmayer, J. Tschopp, and H. Wajant. 2000. The tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 have distinct cross-linking requirements for initiation of apoptosis and are non-redundant in JNK activation. *The Journal of biological chemistry*. 275:32208-32213.
- Nagy, K., I. Petak, G. Imre, G. Barna, M. Gezane-Csorba, A. Sebestyen, J.A. Houghton, R. Mihalik, and L. Kopper. 2005. Proteasome inhibitors abolish cell death downstream of caspase activation during anti-microtubule drug-induced apoptosis in leukemia cells. *Anticancer research*. 25:3321-3326.
- Nagy, K., K. Szekely-Szuts, K. Izeradjene, L. Douglas, M. Tillman, H. Barti-Juhasz, M. Dominici, C. Spano, G. Luca Cervo, P. Conte, J.A. Houghton, R. Mihalik, L. Kopper, and I. Petak. 2006. Proteasome inhibitors sensitize colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via enhanced release of Smac/DIABLO from the mitochondria. *Pathology oncology research : POR*. 12:133-142.
- Nair, V. 2008. Retrovirus-induced oncogenesis and safety of retroviral vectors. *Current opinion in molecular therapeutics*. 10:431-438.
- Nakamizo, A., F. Marini, T. Amano, A. Khan, M. Studeny, J. Gumin, J. Chen, S. Hentschel, G. Vecil, J. Dembinski, M. Andreeff, and F.F. Lang. 2005. Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells in the treatment of gliomas. *Cancer Res*. 65:3307-3318.
- Nakamura, K., Y. Ito, Y. Kawano, K. Kurozumi, M. Kobune, H. Tsuda, A. Bizen, O. Honmou, Y. Niitsu, and H. Hamada. 2004. Antitumor effect of genetically

- engineered mesenchymal stem cells in a rat glioma model. *Gene Ther.* 11:1155-1164.
- Naumann, I., R. Kappler, D. von Schweinitz, K.M. Debatin, and S. Fulda. 2011. Bortezomib primes neuroblastoma cells for TRAIL-induced apoptosis by linking the death receptor to the mitochondrial pathway. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 17:3204-3218.
- Nencioni, A., L. Wille, G. Dal Bello, D. Boy, G. Cirmena, S. Wesselborg, C. Belka, P. Brossart, F. Patrone, and A. Ballestrero. 2005. Cooperative cytotoxicity of proteasome inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in chemoresistant Bcl-2-overexpressing cells. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 11:4259-4265.
- Nikiforov, M.A., M. Riblett, W.H. Tang, V. Gratchouck, D. Zhuang, Y. Fernandez, M. Verhaegen, S. Varambally, A.M. Chinnaiyan, A.J. Jakubowiak, and M.S. Soengas. 2007. Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:19488-19493.
- Nikrad, M., T. Johnson, H. Puthalalath, L. Coultas, J. Adams, and A.S. Kraft. 2005. The proteasome inhibitor bortezomib sensitizes cells to killing by death receptor ligand TRAIL via BH3-only proteins Bik and Bim. *Mol Cancer Ther.* 4:443-449.
- Nishijo, K., Q.R. Chen, L. Zhang, A.T. McCleish, A. Rodriguez, M.J. Cho, S.I. Prajapati, J.A. Gelfond, G.B. Chisholm, J.E. Michalek, B.J. Aronow, F.G. Barr, R.L. Randall, M. Ladanyi, S.J. Qualman, B.P. Rubin, R.D. LeGallo, C. Wang, J. Khan, and C. Keller. 2009. Credentialing a preclinical mouse model of alveolar rhabdomyosarcoma. *Cancer Res.* 69:2902-2911.
- Nombela-Arrieta, C., J. Ritz, and L.E. Silberstein. 2011. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 12:126-131.
- O'Connor, C.L., S. Anguissola, H.J. Huber, H. Dussmann, J.H. Prehn, and M. Rehm. 2008. Intracellular signaling dynamics during apoptosis execution in the presence or absence of X-linked-inhibitor-of-apoptosis-protein. *Biochim Biophys Acta.* 1783:1903-1913.

- Oldenhuis, C.N., J.H. Stegehuis, A.M. Walenkamp, S. de Jong, and E.G. de Vries. 2008. Targeting TRAIL death receptors. *Curr Opin Pharmacol.* 8:433-439.
- Orlowski, R.Z., and E.L. Zeger. 2006. Targeting the proteasome as a therapeutic strategy against haematological malignancies. *Expert opinion on investigational drugs.* 15:117-130.
- Otsu, K., S. Das, S.D. Houser, S.K. Quadri, S. Bhattacharya, and J. Bhattacharya. 2009. Concentration-dependent inhibition of angiogenesis by mesenchymal stem cells. *Blood.* 113:4197-4205.
- Palombella, V.J., E.M. Conner, J.W. Fuseler, A. Destree, J.M. Davis, F.S. Laroux, R.E. Wolf, J. Huang, S. Brand, P.J. Elliott, D. Lazarus, T. McCormack, L. Parent, R. Stein, J. Adams, and M.B. Grisham. 1998. Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:15671-15676.
- Pan, G., J. Ni, Y.F. Wei, G. Yu, R. Gentz, and V.M. Dixit. 1997a. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science.* 277:815-818.
- Pan, G., J. Ni, G. Yu, Y.F. Wei, and V.M. Dixit. 1998. TRUNDD, a new member of the TRAIL receptor family that antagonizes TRAIL signalling. *FEBS letters.* 424:41-45.
- Pan, G., K. O'Rourke, A.M. Chinnaiyan, R. Gentz, R. Ebner, J. Ni, and V.M. Dixit. 1997b. The receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *Science.* 276:111-113.
- Papoff, G., P. Hausler, A. Eramo, M.G. Pagano, G. Di Leve, A. Signore, and G. Ruberti. 1999. Identification and characterization of a ligand-independent oligomerization domain in the extracellular region of the CD95 death receptor. *The Journal of biological chemistry.* 274:38241-38250.
- Parham, D.M. 2001. Pathologic classification of rhabdomyosarcomas and correlations with molecular studies. *Mod Pathol.* 14:506-514.
- Petak, I., L. Douglas, D.M. Tillman, R. Vernes, and J.A. Houghton. 2000. Pediatric rhabdomyosarcoma cell lines are resistant to Fas-induced apoptosis and highly sensitive to TRAIL-induced apoptosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 6:4119-4127.

- Petak, I., R. Vernes, K.S. Szucs, M. Anozie, K. Izeradjene, L. Douglas, D.M. Tillman, D.C. Phillips, and J.A. Houghton. 2003. A caspase-8-independent component in TRAIL/Apo-2L-induced cell death in human rhabdomyosarcoma cells. *Cell Death Differ.* 10:729-739.
- Peter, M.E., and P.H. Krammer. 1998. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. *Current opinion in immunology.* 10:545-551.
- Pitti, R.M., S.A. Marsters, S. Ruppert, C.J. Donahue, A. Moore, and A. Ashkenazi. 1996. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *The Journal of biological chemistry.* 271:12687-12690.
- Prockop, D.J., D.J. Kota, N. Bazhanov, and R.L. Reger. 2010. Evolving paradigms for repair of tissues by adult stem/progenitor cells (MSCs). *J Cell Mol Med.* 14:2190-2199.
- Prockop, D.J., and J. Youn Oh. 2012. Mesenchymal Stem/Stromal Cells (MSCs): Role as Guardians of Inflammation. *Mol Ther.* 20:14-20.
- Qin, J., V. Chaturvedi, B. Bonish, and B.J. Nickoloff. 2001. Avoiding premature apoptosis of normal epidermal cells. *Nature medicine.* 7:385-386.
- Rebelatto, C.K., A.M. Aguiar, M.P. Moretao, A.C. Senegaglia, P. Hansen, F. Barchiki, J. Oliveira, J. Martins, C. Kuligovski, F. Mansur, A. Christofis, V.F. Amaral, P.S. Brofman, S. Goldenberg, L.S. Nakao, and A. Correa. 2008. Dissimilar differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, and adipose tissue. *Experimental biology and medicine.* 233:901-913.
- Ren, C., S. Kumar, D. Chanda, J. Chen, J.D. Mountz, and S. Ponnazhagan. 2008a. Therapeutic potential of mesenchymal stem cells producing interferon-alpha in a mouse melanoma lung metastasis model. *Stem Cells.* 26:2332-2338.
- Ren, G., L. Zhang, X. Zhao, G. Xu, Y. Zhang, A.I. Roberts, R.C. Zhao, and Y. Shi. 2008b. Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell.* 2:141-150.
- Richardson, P.G., and C. Mitsiades. 2005. Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Future oncology.* 1:161-171.
- Ringe, J., S. Strassburg, K. Neumann, M. Endres, M. Notter, G.R. Burmester, C. Kaps, and M. Sittinger. 2007. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem

- cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *Journal of cellular biochemistry*. 101:135-146.
- Roddy, G.W., J.Y. Oh, R.H. Lee, T.J. Bartosh, J. Ylostalo, K. Coble, R.H. Rosa, Jr., and D.J. Prockop. 2011. Action at a distance: systemically administered adult stem/progenitor cells (MSCs) reduce inflammatory damage to the cornea without engraftment and primarily by secretion of TNF-alpha stimulated gene/protein 6. *Stem Cells*. 29:1572-1579.
- Rossin, A., M. Derouet, F. Abdel-Sater, and A.O. Hueber. 2009. Palmitoylation of the TRAIL receptor DR4 confers an efficient TRAIL-induced cell death signalling. *The Biochemical journal*. 419:185-192, 182 p following 192.
- Rubio, D., J. Garcia-Castro, M.C. Martin, R. de la Fuente, J.C. Cigudosa, A.C. Lloyd, and A. Bernad. 2005. Spontaneous human adult stem cell transformation. *Cancer Res*. 65:3035-3039.
- Ruster, B., S. Gottig, R.J. Ludwig, R. Bistrrian, S. Muller, E. Seifried, J. Gille, and R. Henschler. 2006. Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood*. 108:3938-3944.
- Ryu, B.K., M.G. Lee, S.G. Chi, Y.W. Kim, and J.H. Park. 2001. Increased expression of cFLIP(L) in colonic adenocarcinoma. *The Journal of pathology*. 194:15-19.
- Sasportas, L.S., R. Kasmieh, H. Wakimoto, S. Hingtgen, J.A. van de Water, G. Mohapatra, J.L. Figueiredo, R.L. Martuza, R. Weissleder, and K. Shah. 2009. Assessment of therapeutic efficacy and fate of engineered human mesenchymal stem cells for cancer therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106:4822-4827.
- Sayers, T.J., A.D. Brooks, C.Y. Koh, W. Ma, N. Seki, A. Raziuddin, B.R. Blazar, X. Zhang, P.J. Elliott, and W.J. Murphy. 2003. The proteasome inhibitor PS-341 sensitizes neoplastic cells to TRAIL-mediated apoptosis by reducing levels of c-FLIP. *Blood*. 102:303-310.
- Scaffidi, C., S. Fulda, A. Srinivasan, C. Friesen, F. Li, K.J. Tomaselli, K.M. Debatin, P.H. Krammer, and M.E. Peter. 1998. Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO journal*. 17:1675-1687.

- Scheller, J., A. Chalaris, C. Garbers, and S. Rose-John. 2011. ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration. *Trends Immunol.* 32:380-387.
- Schneider, P., J.L. Bodmer, M. Thome, K. Hofmann, N. Holler, and J. Tschopp. 1997. Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS letters.* 416:329-334.
- Schneider, P., N. Holler, J.L. Bodmer, M. Hahne, K. Frei, A. Fontana, and J. Tschopp. 1998. Conversion of membrane-bound Fas(CD95) ligand to its soluble form is associated with downregulation of its proapoptotic activity and loss of liver toxicity. *J Exp Med.* 187:1205-1213.
- Schulte, M., K. Reiss, M. Lettau, T. Maretzky, A. Ludwig, D. Hartmann, B. de Strooper, O. Janssen, and P. Saftig. 2007. ADAM10 regulates FasL cell surface expression and modulates FasL-induced cytotoxicity and activation-induced cell death. *Cell Death Differ.* 14:1040-1049.
- Scott, F.L., B. Stec, C. Pop, M.K. Dobaczewska, J.J. Lee, E. Monosov, H. Robinson, G.S. Salvesen, R. Schwarzenbacher, and S.J. Riedl. 2009. The Fas-FADD death domain complex structure unravels signalling by receptor clustering. *Nature.* 457:1019-1022.
- Screaton, G.R., J. Mongkolsapaya, X.N. Xu, A.E. Cowper, A.J. McMichael, and J.I. Bell. 1997. TRICK2, a new alternatively spliced receptor that transduces the cytotoxic signal from TRAIL. *Current biology : CB.* 7:693-696.
- Secchiero, P., E. Melloni, F. Corallini, A.P. Beltrami, F. Alviano, D. Milani, F. D'Aurizio, M.G. di Iasio, D. Cesselli, G.P. Bagnara, and G. Zauli. 2008. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand promotes migration of human bone marrow multipotent stromal cells. *Stem Cells.* 26:2955-2963.
- Sedger, L.M., M.B. Glaccum, J.C. Schuh, S.T. Kanaly, E. Williamson, N. Kayagaki, T. Yun, P. Smolak, T. Le, R. Goodwin, and B. Gliniak. 2002. Characterization of the in vivo function of TNF-alpha-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL/Apo2L, using TRAIL/Apo2L gene-deficient mice. *European journal of immunology.* 32:2246-2254.
- Sheridan, J.P., S.A. Marsters, R.M. Pitti, A. Gurney, M. Skubatch, D. Baldwin, L. Ramakrishnan, C.L. Gray, K. Baker, W.I. Wood, A.D. Goddard, P. Godowski,

- and A. Ashkenazi. 1997. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science*. 277:818-821.
- Shinagawa, K., Y. Kitadai, M. Tanaka, T. Sumida, M. Kodama, Y. Higashi, S. Tanaka, W. Yasui, and K. Chayama. 2010. Mesenchymal stem cells enhance growth and metastasis of colon cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 127:2323-2333.
- Shirley, S., A. Morizot, and O. Micheau. 2011. Regulating TRAIL receptor-induced cell death at the membrane : a deadly discussion. *Recent patents on anti-cancer drug discovery*. 6:311-323.
- Simonet, W.S., D.L. Lacey, C.R. Dunstan, M. Kelley, M.S. Chang, R. Luthy, H.Q. Nguyen, S. Wooden, L. Bennett, T. Boone, G. Shimamoto, M. DeRose, R. Elliott, A. Colombero, H.L. Tan, G. Trail, J. Sullivan, E. Davy, N. Bucay, L. Renshaw-Gegg, T.M. Hughes, D. Hill, W. Pattison, P. Campbell, S. Sander, G. Van, J. Tarpley, P. Derby, R. Lee, and W.J. Boyle. 1997. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*. 89:309-319.
- Simons, M.P., K.G. Leidal, W.M. Nauseef, and T.S. Griffith. 2008. TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is expressed throughout myeloid development, resulting in a broad distribution among neutrophil granules. *J Leukoc Biol*. 83:621-629.
- Slater, O., and J. Shipley. 2007. Clinical relevance of molecular genetics to paediatric sarcomas. *J Clin Pathol*. 60:1187-1194.
- Smyth, M.J., E. Cretney, K. Takeda, R.H. Wiltrot, L.M. Sedger, N. Kayagaki, H. Yagita, and K. Okumura. 2001. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *The Journal of experimental medicine*. 193:661-670.
- Soria, J.C., Z. Mark, P. Zatloukal, B. Szima, I. Albert, E. Juhasz, J.L. Pujol, J. Kozielski, N. Baker, D. Smethurst, Y.J. Hei, A. Ashkenazi, H. Stern, L. Amler, Y. Pan, and F. Blackhall. 2011. Randomized phase II study of dulanermin in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in advanced non-

- small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 29:4442-4451.
- Soria, J.C., E. Smit, D. Khayat, B. Besse, X. Yang, C.P. Hsu, D. Reese, J. Wiezorek, and F. Blackhall. 2010. Phase 1b study of dulanermin (recombinant human Apo2L/TRAIL) in combination with paclitaxel, carboplatin, and bevacizumab in patients with advanced non-squamous non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 28:1527-1533.
- Spencer, S.L., S. Gaudet, J.G. Albeck, J.M. Burke, and P.K. Sorger. 2009. Non-genetic origins of cell-to-cell variability in TRAIL-induced apoptosis. *Nature*. 459:428-432.
- Sprick, M.R., E. Rieser, H. Stahl, A. Grosse-Wilde, M.A. Weigand, and H. Walczak. 2002. Caspase-10 is recruited to and activated at the native TRAIL and CD95 death-inducing signalling complexes in a FADD-dependent manner but can not functionally substitute caspase-8. *The EMBO journal*. 21:4520-4530.
- Sprick, M.R., M.A. Weigand, E. Rieser, C.T. Rauch, P. Juo, J. Blenis, P.H. Krammer, and H. Walczak. 2000. FADD/MORT1 and caspase-8 are recruited to TRAIL receptors 1 and 2 and are essential for apoptosis mediated by TRAIL receptor 2. *Immunity*. 12:599-609.
- Studeniy, M., F.C. Marini, R.E. Champlin, C. Zompetta, I.J. Fidler, and M. Andreeff. 2002. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells as vehicles for interferon-beta delivery into tumors. *Cancer Res*. 62:3603-3608.
- Studeniy, M., F.C. Marini, J.L. Dembinski, C. Zompetta, M. Cabreira-Hansen, B.N. Bekele, R.E. Champlin, and M. Andreeff. 2004. Mesenchymal stem cells: potential precursors for tumor stroma and targeted-delivery vehicles for anticancer agents. *Journal of the National Cancer Institute*. 96:1593-1603.
- Szegezdi, E., A. O'Reilly, Y. Davy, R. Vawda, D.L. Taylor, M. Murphy, A. Samali, and H. Mehmet. 2009. Stem cells are resistant to TRAIL receptor-mediated apoptosis. *J Cell Mol Med*. 13:4409-4414.
- Tamatani, M., Y.H. Che, H. Matsuzaki, S. Ogawa, H. Okado, S. Miyake, T. Mizuno, and M. Tohyama. 1999. Tumor necrosis factor induces Bcl-2 and Bcl-x

- expression through NFkappaB activation in primary hippocampal neurons. *J Biol Chem.* 274:8531-8538.
- Taylor, A.C., L. Shu, M.K. Danks, C.A. Poquette, S. Shetty, M.J. Thayer, P.J. Houghton, and L.C. Harris. 2000. P53 mutation and MDM2 amplification frequency in pediatric rhabdomyosarcoma tumors and cell lines. *Med Pediatr Oncol.* 35:96-103.
- Thomas, C.E., A. Ehrhardt, and M.A. Kay. 2003. Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature reviews. Genetics.* 4:346-358.
- Thome, M., P. Schneider, K. Hofmann, H. Fickenscher, E. Meinel, F. Neipel, C. Mattmann, K. Burns, J.L. Bodmer, M. Schroter, C. Scaffidi, P.H. Krammer, M.E. Peter, and J. Tschopp. 1997. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors. *Nature.* 386:517-521.
- Thorpe, J.A., P.A. Christian, and S.R. Schwarze. 2008. Proteasome inhibition blocks caspase-8 degradation and sensitizes prostate cancer cells to death receptor-mediated apoptosis. *The Prostate.* 68:200-209.
- Tolar, J., K. Le Blanc, A. Keating, and B.R. Blazar. 2010. Concise review: hitting the right spot with mesenchymal stromal cells. *Stem Cells.* 28:1446-1455.
- Toma, J.G., M. Akhavan, K.J. Fernandes, F. Barnabe-Heider, A. Sadikot, D.R. Kaplan, and F.D. Miller. 2001. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. *Nature cell biology.* 3:778-784.
- Torsvik, A., G.V. Rosland, A. Svendsen, A. Molven, H. Immervoll, E. McCormack, P.E. Lonning, M. Primon, E. Sobala, J.C. Tonn, R. Goldbrunner, C. Schichor, J. Mysliwietz, T.T. Lah, H. Motaln, S. Knappskog, and R. Bjerkvig. 2010. Spontaneous malignant transformation of human mesenchymal stem cells reflects cross-contamination: putting the research field on track - letter. *Cancer Res.* 70:6393-6396.
- Trabzuni, D., K.S. Famulski, and M. Ahmad. 2000. Functional analysis of tumour necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): cysteine-230 plays a critical role in the homotrimerization and biological activity of this novel tumoricidal cytokine. *Biochem J.* 350 Pt 2:505-510.

- Turco, M.C., M.F. Romano, A. Petrella, R. Bisogni, P. Tassone, and S. Venuta. 2004. NF-kappaB/Rel-mediated regulation of apoptosis in hematologic malignancies and normal hematopoietic progenitors. *Leukemia*. 18:11-17.
- van Leuken, R., L. Clijsters, and R. Wolthuis. 2008. To cell cycle, swing the APC/C. *Biochim Biophys Acta*. 1786:49-59.
- Van Valen, F., S. Fulda, B. Truckenbrod, V. Eckervogt, J. Sonnemann, A. Hillmann, R. Rodl, C. Hoffmann, W. Winkelmann, L. Schafer, B. Dockhorn-Dworniczak, T. Wessel, J. Boos, K.M. Debatin, and H. Jurgens. 2000. Apoptotic responsiveness of the Ewing's sarcoma family of tumours to tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 88:252-259.
- Varfolomeev, E., H. Maecker, D. Sharp, D. Lawrence, M. Renz, D. Vucic, and A. Ashkenazi. 2005. Molecular determinants of kinase pathway activation by Apo2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. *The Journal of biological chemistry*. 280:40599-40608.
- Vogler, M., H. Walczak, D. Stadel, T.L. Haas, F. Genze, M. Jovanovic, J.E. Gschwend, T. Simmet, K.M. Debatin, and S. Fulda. 2008. Targeting XIAP bypasses Bcl-2-mediated resistance to TRAIL and cooperates with TRAIL to suppress pancreatic cancer growth in vitro and in vivo. *Cancer Res*. 68:7956-7965.
- Von Lutichau, I., M. Notohamiprodjo, A. Wechselberger, C. Peters, A. Henger, C. Seliger, R. Djafarzadeh, R. Huss, and P.J. Nelson. 2005. Human adult CD34-progenitor cells functionally express the chemokine receptors CCR1, CCR4, CCR7, CXCR5, and CCR10 but not CXCR4. *Stem Cells Dev*. 14:329-336.
- Voortman, J., T.P. Resende, M.A. Abou El Hassan, G. Giaccone, and F.A. Kruyt. 2007. TRAIL therapy in non-small cell lung cancer cells: sensitization to death receptor-mediated apoptosis by proteasome inhibitor bortezomib. *Molecular cancer therapeutics*. 6:2103-2112.
- Wagner, K.W., E.A. Punnoose, T. Januario, D.A. Lawrence, R.M. Pitti, K. Lancaster, D. Lee, M. von Goetz, S.F. Yee, K. Totpal, L. Huw, V. Katta, G. Cavet, S.G. Hymowitz, L. Amler, and A. Ashkenazi. 2007. Death-receptor O-glycosylation controls tumor-cell sensitivity to the proapoptotic ligand Apo2L/TRAIL. *Nature medicine*. 13:1070-1077.

- Wajant, H. 2004. TRAIL and NFkappaB signaling--a complex relationship. *Vitamins and hormones*. 67:101-132.
- Wajant, H., D. Moosmayer, T. Wuest, T. Bartke, E. Gerlach, U. Schonherr, N. Peters, P. Scheurich, and K. Pfizenmaier. 2001. Differential activation of TRAIL-R1 and -2 by soluble and membrane TRAIL allows selective surface antigen-directed activation of TRAIL-R2 by a soluble TRAIL derivative. *Oncogene*. 20:4101-4106.
- Walczak, H., M.A. Degli-Esposti, R.S. Johnson, P.J. Smolak, J.Y. Waugh, N. Boiani, M.S. Timour, M.J. Gerhart, K.A. Schooley, C.A. Smith, R.G. Goodwin, and C.T. Rauch. 1997. TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *The EMBO journal*. 16:5386-5397.
- Walczak, H., R.E. Miller, K. Ariail, B. Gliniak, T.S. Griffith, M. Kubin, W. Chin, J. Jones, A. Woodward, T. Le, C. Smith, P. Smolak, R.G. Goodwin, C.T. Rauch, J.C. Schuh, and D.H. Lynch. 1999. Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nature medicine*. 5:157-163.
- Wang, X., K. Belguise, N. Kersual, K.H. Kirsch, N.D. Mineva, F. Galtier, D. Chabos, and G.E. Sonenshein. 2007. Oestrogen signalling inhibits invasive phenotype by repressing RelB and its target BCL2. *Nat Cell Biol*. 9:470-478.
- Watzl, C. 2006. Production and use of trimeric isoleucine zipper fusion proteins to study surface receptor ligand interactions. *Curr Protoc Protein Sci*. Chapter 19:Unit 19 11.
- Wels, J., R.N. Kaplan, S. Rafii, and D. Lyden. 2008. Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes & development*. 22:559-574.
- Wen, R., D. Wang, C. McKay, K.D. Bunting, J.C. Marine, E.F. Vanin, G.P. Zambetti, S.J. Korsmeyer, J.N. Ihle, and J.L. Cleveland. 2001. Jak3 selectively regulates Bax and Bcl-2 expression to promote T-cell development. *Molecular and cellular biology*. 21:678-689.
- Wiley, S.R., K. Schooley, P.J. Smolak, W.S. Din, C.P. Huang, J.K. Nicholl, G.R. Sutherland, T.D. Smith, C. Rauch, C.A. Smith, and et al. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*. 3:673-682.

- Williamson, D., E. Missiaglia, A. de Reynies, G. Pierron, B. Thuille, G. Palenzuela, K. Thway, D. Orbach, M. Lae, P. Freneaux, K. Pritchard-Jones, O. Oberlin, J. Shipley, and O. Delattre. 2010. Fusion gene-negative alveolar rhabdomyosarcoma is clinically and molecularly indistinguishable from embryonal rhabdomyosarcoma. *J Clin Oncol.* 28:2151-2158.
- Wynn, R.F., C.A. Hart, C. Corradi-Perini, L. O'Neill, C.A. Evans, J.E. Wraith, L.J. Fairbairn, and I. Bellantuono. 2004. A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood.* 104:2643-2645.
- Yang, A., N.S. Wilson, and A. Ashkenazi. 2010. Proapoptotic DR4 and DR5 signaling in cancer cells: toward clinical translation. *Current opinion in cell biology.* 22:837-844.
- Yoshida, T., T. Shiraishi, S. Nakata, M. Horinaka, M. Wakada, Y. Mizutani, T. Miki, and T. Sakai. 2005. Proteasome inhibitor MG132 induces death receptor 5 through CCAAT/enhancer-binding protein homologous protein. *Cancer research.* 65:5662-5667.
- You, M.H., W.J. Kim, W. Shim, S.R. Lee, G. Lee, S. Choi, D.Y. Kim, Y.M. Kim, H. Kim, and S.U. Han. 2009. Cytosine deaminase-producing human mesenchymal stem cells mediate an antitumor effect in a mouse xenograft model. *J Gastroenterol Hepatol.* 24:1393-1400.
- Young, L., and Q. Dong. 2004. Two-step total gene synthesis method. *Nucleic acids research.* 32:e59.
- Yu, J.M., E.S. Jun, Y.C. Bae, and J.S. Jung. 2008. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo. *Stem Cells Dev.* 17:463-473.
- Yuan, X., J. Hu, M.L. Belladonna, K.L. Black, and J.S. Yu. 2006. Interleukin-23-expressing bone marrow-derived neural stem-like cells exhibit antitumor activity against intracranial glioma. *Cancer Res.* 66:2630-2638.
- Yue, H.H., G.E. Diehl, and A. Winoto. 2005. Loss of TRAIL-R does not affect thymic or intestinal tumor development in p53 and adenomatous polyposis coli mutant mice. *Cell death and differentiation.* 12:94-97.

- Zaragosi, L.E., N. Billon, G. Ailhaud, and C. Dani. 2007. Nucleofection is a valuable transfection method for transient and stable transgene expression in adipose tissue-derived stem cells. *Stem Cells*. 25:790-797.
- Zerafa, N., J.A. Westwood, E. Cretney, S. Mitchell, P. Waring, M. Iezzi, and M.J. Smyth. 2005. Cutting edge: TRAIL deficiency accelerates hematological malignancies. *Journal of immunology*. 175:5586-5590.
- Zhang, X.M., H. Lin, C. Chen, and B.D. Chen. 1999. Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway activates a caspase-3-like protease and induces Bcl-2 cleavage in human M-07e leukaemic cells. *Biochem J*. 340 (Pt 1):127-133.
- Zhang, X.R., L.Y. Zhang, S. Devadas, L. Li, A.D. Keegan, and Y.F. Shi. 2003. Reciprocal expression of TRAIL and CD95L in Th1 and Th2 cells: role of apoptosis in T helper subset differentiation. *Cell death and differentiation*. 10:203-210.
- Zhang, Y., C.F. Bellows, and M.G. Kolonin. 2010. Adipose tissue-derived progenitor cells and cancer. *World J Stem Cells*. 2:103-113.
- Zhao, X., W. Qiu, J. Kung, X. Peng, M. Yegappan, B. Yen-Lieberman, and E.D. Hsi. 2008. Bortezomib induces caspase-dependent apoptosis in Hodgkin lymphoma cell lines and is associated with reduced c-FLIP expression: a gene expression profiling study with implications for potential combination therapies. *Leukemia research*. 32:275-285.
- Zhu, H., W. Guo, L. Zhang, S. Wu, F. Teraishi, J.J. Davis, F. Dong, and B. Fang. 2005a. Proteasome inhibitors-mediated TRAIL resensitization and Bik accumulation. *Cancer biology & therapy*. 4:781-786.
- Zhu, H., L. Zhang, F. Dong, W. Guo, S. Wu, F. Teraishi, J.J. Davis, P.J. Chiao, and B. Fang. 2005b. Bik/NBK accumulation correlates with apoptosis-induction by bortezomib (PS-341, Velcade) and other proteasome inhibitors. *Oncogene*. 24:4993-4999.
- Zhu, W., W. Xu, R. Jiang, H. Qian, M. Chen, J. Hu, W. Cao, C. Han, and Y. Chen. 2006. Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Experimental and molecular pathology*. 80:267-274.

- Zischek, C., H. Niess, I. Ischenko, C. Conrad, R. Huss, K.W. Jauch, P.J. Nelson, and C. Bruns. 2009. Targeting tumor stroma using engineered mesenchymal stem cells reduces the growth of pancreatic carcinoma. *Annals of surgery*. 250:747-753.
- Zvaifler, N.J., L. Marinova-Mutafchieva, G. Adams, C.J. Edwards, J. Moss, J.A. Burger, and R.N. Maini. 2000. Mesenchymal precursor cells in the blood of normal individuals. *Arthritis research*. 2:477-488.

(az Irodalomjegyzék 272 db hivatkozást tartalmaz)

11. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz témájában megjelent közlemények

1. **Barti-Juhász H**, Mihalik R, Nagy K, Grisendi G, Dominici M, Petak I. Bone marrow derived mesenchymal stem/stromal cells transduced with full length human TRAIL repress the growth of rhabdomyosarcoma cells in vitro. *Haematologica*. 2011 Mar;96(3):e21-2.
2. Grisendi G, Bussolari R, Cafarelli L, Petak I, Rasini V, Veronesi E, De Santis G, Spano C, Tagliazzucchi M, **Barti-Juhász H**, Scarabelli L, Bambi F, Frassoldati A, Rossi G, Casali C, Morandi U, Horwitz EM, Paolucci P, Conte P, Dominici M. Adipose-derived mesenchymal stem cells as stable source of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand delivery for cancer therapy. *Cancer Res*. 2010 May 1;70(9):3718-29. Epub 2010 Apr 13.

Egyéb témában megjelent közlemények

1. Nagy K, Székely-Szüts K, Izeradjene K, Douglas L, Tillman M, **Barti-Juhász H**, Dominici M, Spano C, Luca Cervo G, Conte P, Houghton JA, Mihalik R, Kopper L, Peták I. Proteasome inhibitors sensitize colon carcinoma cells to TRAIL-induced apoptosis via enhanced release of Smac/DIABLO from the mitochondria. *Pathol Oncol Res*. 2006;12(3):133-42. Epub 2006 Sep 23.
2. Pintér Ferenc, Várkondi Edit, **Barti-Juhász Helga**, Árvai Kristóf, Órfi Zoltán, Peták István. Az epidermális növekedési faktor receptor jelátviteli útjai és molekuláris biológiája. The signal transduction and molecular biology of epidermal growth factor. *Orvosképzés 2009 LXXXIV éf.* 3:163-170
3. **Helga Barti-Juhász**, András Pazsitka, Istvan Petak, Rudolf Mihalik. Altered Expression of a Broad Range of Protease Genes in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells after Bortezomib Exposure *Biochemica*, 2009; 4: 24-26.

4. Balázs Jóri, **Helga Barti-Juhász**, András Pazsitka, Matan Siterman, István Peták. Expression Analysis of ABC Transporters in Lung Cancer Cell Lines Using a RealTime ready qPCR Focus Panel Biochemica, 2009; 4: 27-28.
5. **Helga Barti-Juhász**, András Pazsitka, Balázs Jóri, Kristóf Árvai, Dániel Erös, György Kéri, István Peták¹, Rudolf Mihalik. Altered Expression of a Broad Range of Protease Genes in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells after Bortezomib Treatment. Cancer res application note 2010
6. Arvai K, Nagy K, **Barti-Juhász H**, Peták I, Krenács T, Micsik T, Végső G, Perner F, Szende B. Molecular Profiling of Parathyroid Hyperplasia, Adenoma and Carcinoma. Pathol Oncol Res. 2011 Dec 24. [Epub ahead of print]

12. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretném megköszönni és kifejezni hálámat szüleimnek, akik szerető gondoskodásukkal a mai napig támogatnak.

Köszönettel tartozom Prof. Kopper Lászlónak és Prof. Matolcsy Andrásnak hogy az általuk vezetett intézetben folytathattam PhD tanulmányaimat.

Köszönöm témavezetőmnek, Dr. Peták Istvánnak hogy befogadott munkacsoportjába, TDK és PhD munkám éveit alatt támogatta tevékenységemet.

Hálás köszönet és mély tisztelet illeti Tanáromat és konzulensemét Dr. Mihálik Rudolfot az eredmények tételes átgondolásában, értelmezésében és a dolgozat megírásában nyújtott messzemenő segítségéért.

Szintén köszönet illeti Dr. Nagy Katalint, aki első kísérleteimtől nap, mint nap mellettem állt, akinek szakmai és baráti támogatását mindvégig élvezhettem.

Az értekezésben bemutatott eredmények egy része a Modénai Egyetem Onkológiai és Hematológiai Intézetében született. Köszönet Massimo Dominicinek, és munkatársainak, elsősorban Giulia Grisendinek értékes segítségükért.

Dr. Sebestyén Annának köszönöm, hogy laboratóriumában dolgozhattam és bármikor fordulhattam Hozzá segítségért.

Barátaimnak és kollégáimnak a volt Molekuláris Terápia Labor minden dolgozójának, köztük Dr. Imre Gergelynek, Dr. Jóri Baláznak, Dr. Pintér Ferencnek, Árvai Kristófnak, Kánya Melindának köszönöm a szakmai segítséget és a jó légkört.

Köszönöm Csorba Gézáne Maricának, hogy megtanított a szövettényészeti technikákra, precizitásával és kiterjedt figyelmével segítette mindennapi munkánkat.

Laczik Cecíliának köszönöm, hogy segített a PhD tanulmányaimmal kapcsolatos adminisztratív feladatok lebonyolításában.

Végül tisztelet illeti Barti Károlyt türelméért, bátorításáért és mindenekelőtt kitartó jelenléteért.