

AKTIVACIJA CITOSOLNIH SENZORJEV DNA PO OBSEVANJU

Tanja Jesenko^{1,2}, Maša Bošnjak¹, Boštjan Markelc^{1,3}, Gregor Serša^{1,3}, Katarina Žnidar¹, Loree C. Heller⁴, Maja Čemažar^{1,5}

¹ Oddelek za eksperimentalno onkologijo, Onkološki inštitut Ljubljana, Zaloška cesta 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

² Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Vrazov trg 2, 1000 Ljubljana, Slovenija

³ Zdravstvena fakulteta, Univerza v Ljubljani, Zdravstvena pot 5, 1000 Ljubljana, Slovenija

⁴ Department of Medical Engineering, University of South Florida, Tampa, 33620 Florida, ZDA

⁵ Fakulteta za vede o zdravju, Univerza na Primorskem, Polje 42, 6310 Izola, Slovenija

Elektronski naslov: tjesenko@onko-i.si

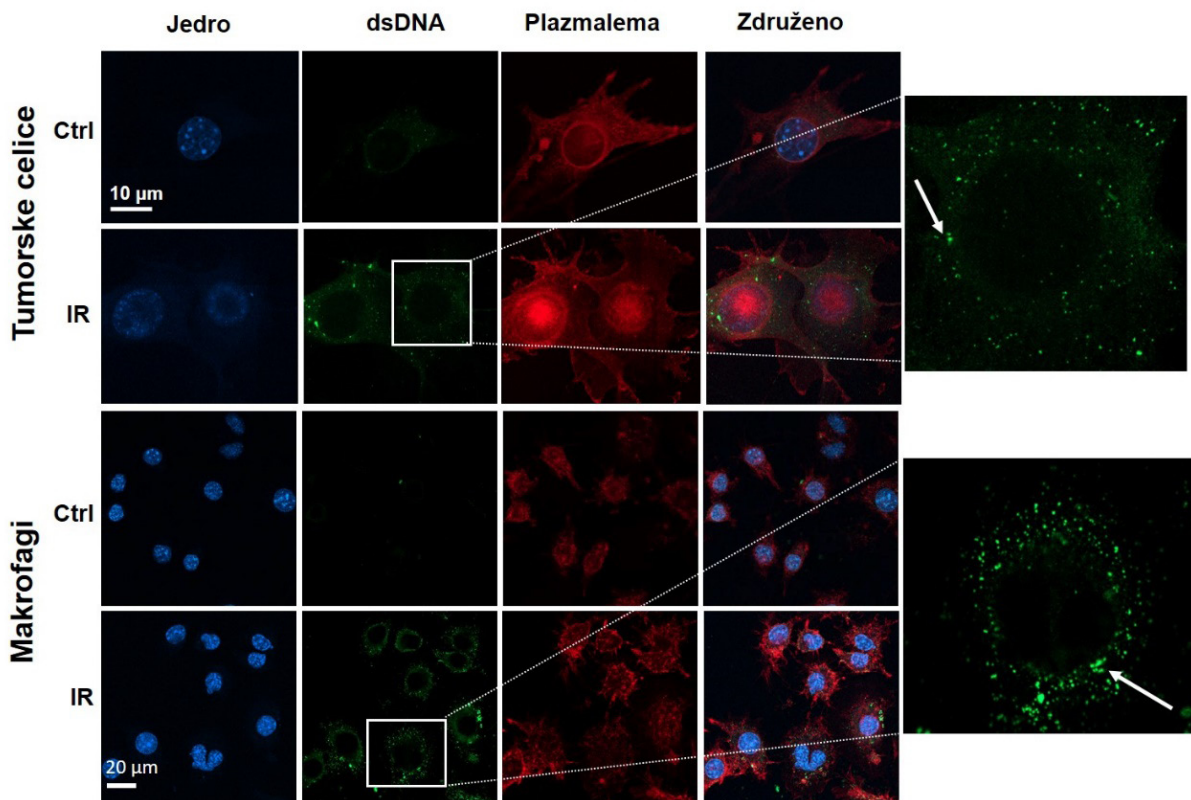
Izvleček

Obsevanje tumorjev ima poleg neposrednega citotoksičnega učinka na celice tudi posredne imunološke učinke. Eden izmed mehanizmov spodbujanja imunskega odziva z ionizirajočim sevanjem pa je aktivacija molekularnih poti zaznavanja DNA, ki v osnovi predstavlja mehanizem obrambe celic proti patogenom. V naši predklinični študiji na celičnih kulturah tumorskih celic in makrofagov smo dokazali, da obe vrsti celic v svojem citosolu nakopičijo DNA v obliki dvovertične DNA in mikrojedr. Kopičenje DNA je aktiviralo več različnih poti zaznavanja DNA, pri čemer so bili najbolj vidno aktivirani senzori DNA DDX60, DAI in P204 v tumorskih celicah ter DDX60, DAI, P204 in RIG-I v makrofagih. Povišanje izražanje senzorjev DNA je spremljalo povečano izražanje citokinov, TNF α in IFN β v tumorskih celicah in IL1 β in IFN β v makrofagih. Ti rezultati dajejo vpogled v mehanizme, ki sodelujejo pri aktivaciji imunskega odziva na ionizirajoče sevanje v tumorju.

Ključne besede: senzori DNA, ionizirajoče sevanje, imunski odziv, tumorske celice, makrofagi

Obsevanje tumorjev ima poleg neposrednega citotoksičnega učinka na celice tudi posredne imunološke učinke. Poškodbe v celicah povzročijo sprostitve signalov nevarnosti in izražanje vnetnih citokinov, kar lahko spodbudi imunski sistem in vodi v boljšo protitumorsko učinkovitost. V nekaterih primerih lahko to ob kombinaciji z zaviralci imunskih kontrolnih točk vodi tudi v izventarčni učinek na oddaljene lezije (abskopalni učinek). Imunski mehanizmi ionizirajočega sevanja niso popolnoma znani. Ena izmed signalnih poti, ki so jo prvo povezali s spodbujanjem abskopalnega učinka je signalna pot ciklični GMP-AMP sintaza–stimulator genov za interferone (cGAS–STING), ki predstavlja signalno pot odziva na prisotnost nukleinskih kislin v citosolu (1). Nukleinske kisline v citosolu naravno niso prisotne, zato njihova prisotnost običajno za celico pomeni okužbo s patogeni. Z namenom obrambe celic pred okužbo, prisotnost nukleinskih kislin v citosolu prepoznajo različni proteini, senzori DNA. Med senzorje DNA štejemo različne vrste proteinov med njimi nukleaze, helikaze, encime in različne DNA-vezavne proteine (2). Vezava nukleinskih kislin na senzore DNA sproži različne signalne poti, ki vodijo v nastajanje različnih citokinov. V naši študiji smo raziskovali aktivacijo različnih poti senzorjev DNA in citokinov v melanomskih celicah B16F10 in makrofagih RAW 264.7. Oba celična tipa se v velikem deležu nahajata v tumorskem mikrookolju in zato lahko znatno doprineseta k samemu imunskemu odzivu v tumorju. V naši študiji smo dokazali, da tumorske celice in makrofagi po obsevanju

nakopičijo DNA v svojem citosolu 24 in 48 h po obsevanju s 6 Gy. Nakopičena DNA je v obliki dvovertične DNA in v obliki mikrojedder (slika 1). Večji učinek smo opazili v primeru makrofagov.



Slika 1. Kopičenje dvovertične DNA (dsDNA) v citosolu celic po obsevanju s 6 Gy. Dvovertično DNA smo določili z imunofluorescenčnim barvanjem s protitelesi proti dsDNA. Pozitiven pikčasti signal prikazuje bela puščica.

Kopičenje DNA v citosolu je aktiviralo več različnih poti zaznavanja DNA, pri čemer so bili najbolj vidno aktivirani sensorji DNA DExD/H-Box helikaza 60 (DDX60), od DNA odvisen aktivator regulacijskih faktorjev za interferone (DAI) in proteinski aktivator interferona 204 (p204) v tumorskih celicah ter DDX60, DAI, p204 in z retinojsko kislino inducirani gen I (RIG-I) v makrofagih. Višje izražanje sensorjev DNA smo zaznali v makrofagih. Z imunofluorescenčnim barvanjem in spremljanjem translokacije v celicah smo dokazali, da se aktivira tudi pot cGAS-STING. S spremljanjem translokacij različnih transkripcijskih faktorjev smo določili tudi prenos signala iz citoplazme v jedro, kar vodi v prepisovanje genov in posledičnega nastajanja različnih citokinov. Aktivirane signalne poti zaznavanja DNA so vodile v nastajanje različnih citokinov, tumorskega nekrotizirajočega faktorja alfa ($TNF\alpha$) in interferona beta ($IFN\beta$) v tumorskih celicah in interleukina 1 beta ($IL1\beta$) in $IFN\beta$ v makrofagih. Stopnja izražanja sensorjev DNA in citokinov je naraščala z dozo obsevanja in časom po obsevanju ter je bila višja v primeru makrofagov.

Ti rezultati dajejo vpogled v mehanizme, ki sodelujejo pri stimulaciji protitumorske imunosti z ionizirajočim sevanjem. V *in vitro* pogojih smo razjasnili mehanizme in določili signalne poti, ki so vpletene v spodbujanje imunskega sistema z ionizirajočim

sevanjem. Ugotovili smo, da je nabor aktiviranih poti zaznavanja DNA odvisen od vrste celic, stopnja izražanja pa je odvisna od doze obsevanja in časa po obsevanju. Z našo *in vitro* bazično radiobiološko študijo smo tako dokazali, da imajo lahko različne vrste celic v tumorju različen nabor imunološko pomembnih sprememb kot odziv na obsevanje, ki je odvisen od kombinacije aktiviranih senzorjev DNA. Za bolj natančno razumevanje pa so v prihodnosti potrebne nadaljnje *in vivo* študije, s katerimi bi lahko še bolj natančno opredelili doprinos različnih vrst celic na celokupen imunski odziv v tumorju.

Zahvala

Vse raziskave so potekale v okviru raziskovalnega programa P3-003 in projekta Z3-8204, ki ju financira Agencija za raziskovalno dejavnost Republike Slovenije (ARRS).

Literatura

1. Vanpouille-Box C, Alard A, Aryankalayil MJ, et al. DNA exonuclease Trex1 regulates radiotherapy-induced tumour immunogenicity. *Nat Commun* 2017; 8: 15618.
2. Vanpouille-Box C, Demaria S, Formenti SC, et al. Cytosolic DNA sensing in organismal tumor control. *Cancer Cell. Cell Press* 2018; 34: 361-78.