

Neutroner ger unik inblick i programmerad celldöd

Med hjälp av neutronreflektometri ger forskare vid Kemiska institutionen, Umeå universitet, ny förståelse på atomnivå för hur Bax, ett protein som hjälper till att avlägsna skadade celler i kroppen, fungerar. Resultatet av studien, som gjorts i samarbete med forskningsanläggningarna ESS i Lund och ISIS i Storbritannien, har publicerats i tidskriften *Science Advances*. Här beskriver forskarna **Gerhard Gröbner** och **Hanna P. Wacklin-Knecht** den senaste kunskapen på området.

Programmerad celldöd – också kallad apoptos – är en grundläggande process i vår kropp som innebär ett kontrollerat avlägsnande av skadade, skadliga eller överflödiga celler. Processen är ytterst viktig för korrekt reglering av embryonal utveckling och för upprätthållandet av cellhomeostas under hela livet. Men det viktigaste kännetecknet för cancer är dess förmåga att undvika den naturliga celldöden; ett beteende som inte bara bidrar till cancers tillväxt utan också till dess resistens mot medicinsk behandling¹. Många patienter dör fortfarande eftersom det inte finns effektiv behandling mot deras cancer², särskilt de elakartade, oftast relapsade cancerformerna med hög resistensbenägenhet. Detta gäller också för avancerad prostatacancer som oftast är obotlig i slutfasen och som är i fokus hos våra samarbetspartner inom onkologi vid Umeå universitetet.

Molekylär insikt i en viktig underliggande mekanism kom från uppträcket av en gen i B-cells CLL/lymfom-2 (Bcl-

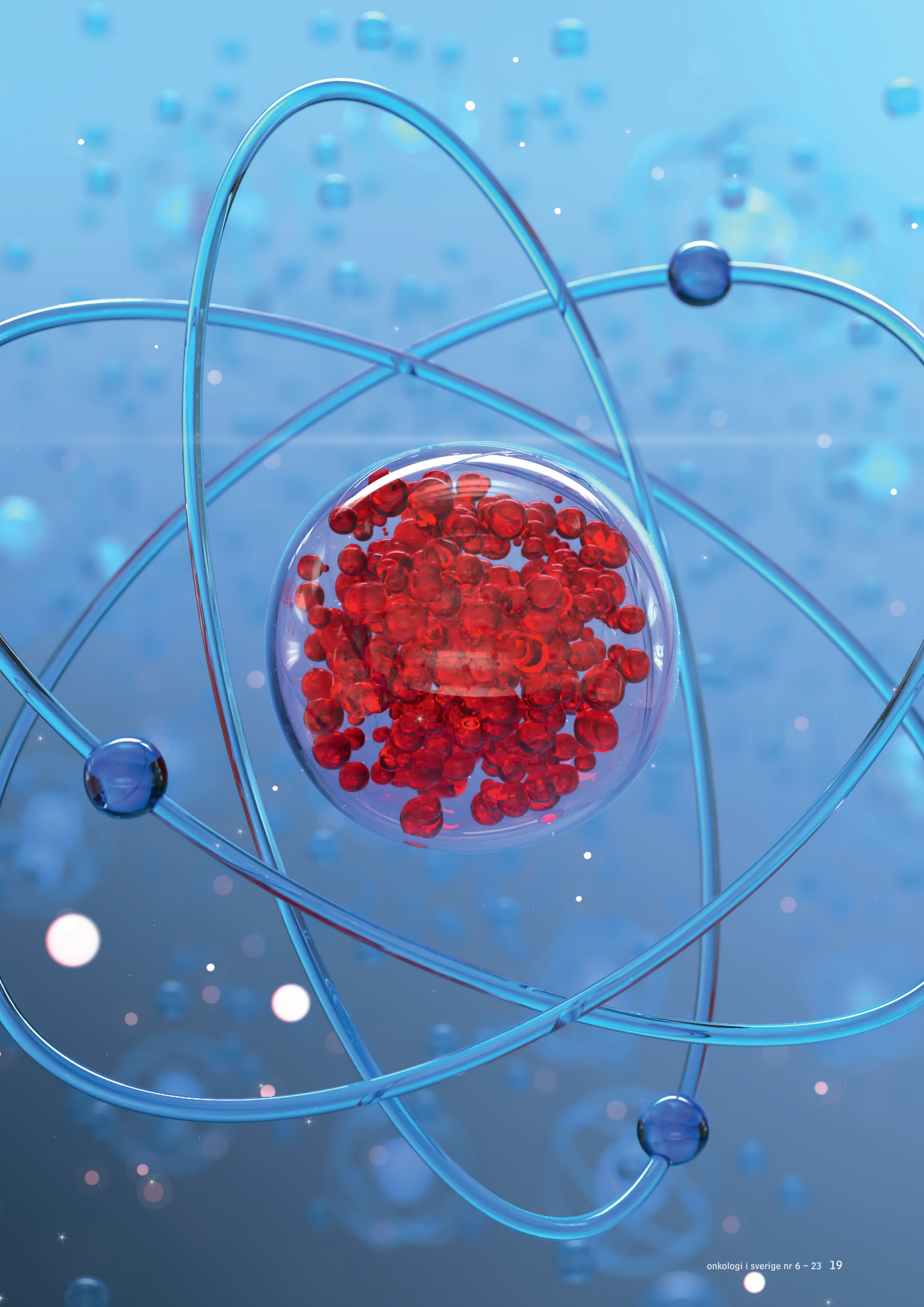
2) som visade förlängd cancercellsöverlevnad istället för ökad proliferation². Motsvarande protein var det anti-apoptotiska (pro-survival) Bcl-2-proteinet som gav namnet till den så kallade Bcl-2 proteinfamiljen med många medlemmar med olika funktioner, där vissa är cellskyddande medan andra är celldödande³. Där ingår som nyckelspelare det cellskyddande Bcl-2-proteinet själv och det celldödande proteinet Bax. Denna proteinfamilj reglerar den intracellulära programmerade celldöden i våra mitokondrier (intrinsisk apoptos) som i normal vävnad avlägsnar skadade, infekterade eller överflödiga celler. Där borde också cancerceller ingå, men de undkommer oftast denna process. Forskning har visat ett starkt samband mellan tumörutveckling och behandlingsresistens kopplat till Bcl-2-familjen. Det cellskyddande Bcl-2-proteinet är inblandat i cirka 50 procent av alla tumörer⁴ och överproduktion av Bcl-2 är en av de viktigaste skyddsmekanismerna som cancerceller använder mot naturliga döds-

signaler men också mot läkemedelsbaserad cancerbehandling.

HITTA NYA LÄKEMEDEL

På grund av deras nyckelroll i intracellulär apoptos och tumörutveckling och överlevnad, är Bcl-2-familjen en primärt mål för att kartlägga de grundläggande mekanismerna bakom canceröverlevnad och för att hitta nya anti-cancermedel⁵ som via intracellulär stress kan starta celldöd genom att aktivera celldödande proteiner och mitokondrial apoptos. Detta ses som en viktig strategi mot många elakartade och svårbehandlade tumörer som skyddar sig mot celldöd genom uppreglering av de cellskyddande Bcl-2-proteinerna och/eller nedreglering av celldödande proteiner. Men för att förstå hur Bcl-2-proteinerna kan användas mot cancerbehandling behöver vi först förstå hur de fungerar.

För att förbättra behandlingen av resistent tumörer och hitta nya vägar för utveckling av en ny generation av Bcl-2-sökande läkemedel, bedriver vi molekylär



••• kunskapsutveckling på atomnivå

forskning med målsättningen att öka förståelse för hur Bcl-2 fungerar då de skyddar många cancertyper från naturlig eller behandlingstaktiverad död, samt hur det celldödande Bax-proteinet (Bcl-2-associated X) fungerar. Bax är en kritisk aktör i mitokondriellt reglerad celldöd där det aktiverar apoptos genom att perforera mitokondriens yttre membran. För att förstå hur det allra första steget i denna process fungerar, utnyttjar vi en kombination av de avancerade biofysikaliska metoderna neutronreflektometri (NR) och NMR-spektroskopi för att få en insikt i Bcl-2-proteinfamiljens funktion och mekanism på molekylär nivå.

Med dessa metoder kan man observera hur Bcl-2-proteinerna sitter på mitokondriemembranets yta, och hur de växelverkar med varandra, samt studera lipider i membranet. Neutronreflektometri blev utförd vid ISIS Neutron and Muon Source forskningsanläggning på Rutherford Appleton Laboratory i England (se figur 1) i samarbete med European Spallation Source, ESS i Lund, som för närvarande byggs i Lund och kommer att ha en rad olika instrument för forskning inom life science och medicin med hjälp av neutroner (se figur 2 för

princip). Syftet var att få molekylär information om strukturerna som bildas av Bcl-2 och Bax på mitokondriemembranets yta i det första steget av celldödsprocessen för att hitta nya sätt att blockera den skyddande funktionen av Bcl-2 och besläktade proteiner (Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w, Bfl-1...) samt att öka den celldödande effektiviteten av Bax ämnat för cancerbehandling.

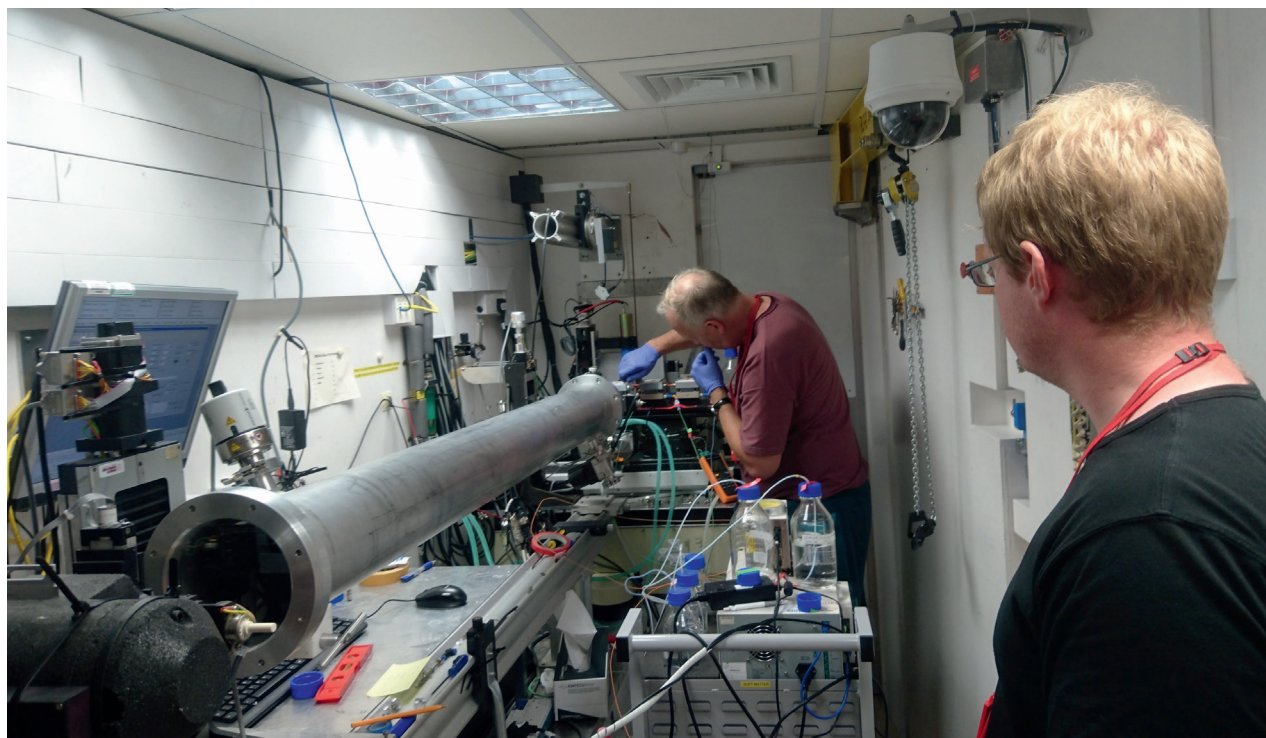
Men hur fungerar Bcl-2-proteinerna på molekylär nivå? Bcl-2-familjen reglerar den intrinsiska apoptosen som är en process inuti cellen, starkt kopplad till cellens små kraftverk, så kallade mitokondrier där till exempel ATP-produktionen sker via oxidativ fosforylering. Under apoptosen sker förstörelse av mitokondrier med en kontrollerad kedja av proteinmekanismer som i slutet är dödlig för cellen. För att detta inte ska ske i välmående celler finns därför en välbalanserad jämvikt mellan cellskyddande och celldödande Bcl-2-medlemmar som befinner sig vid mitokondriens lipidmembranyta, där de enkelt sagt neutraliserar varandra.

AVGÖR CELLENS ÖDE

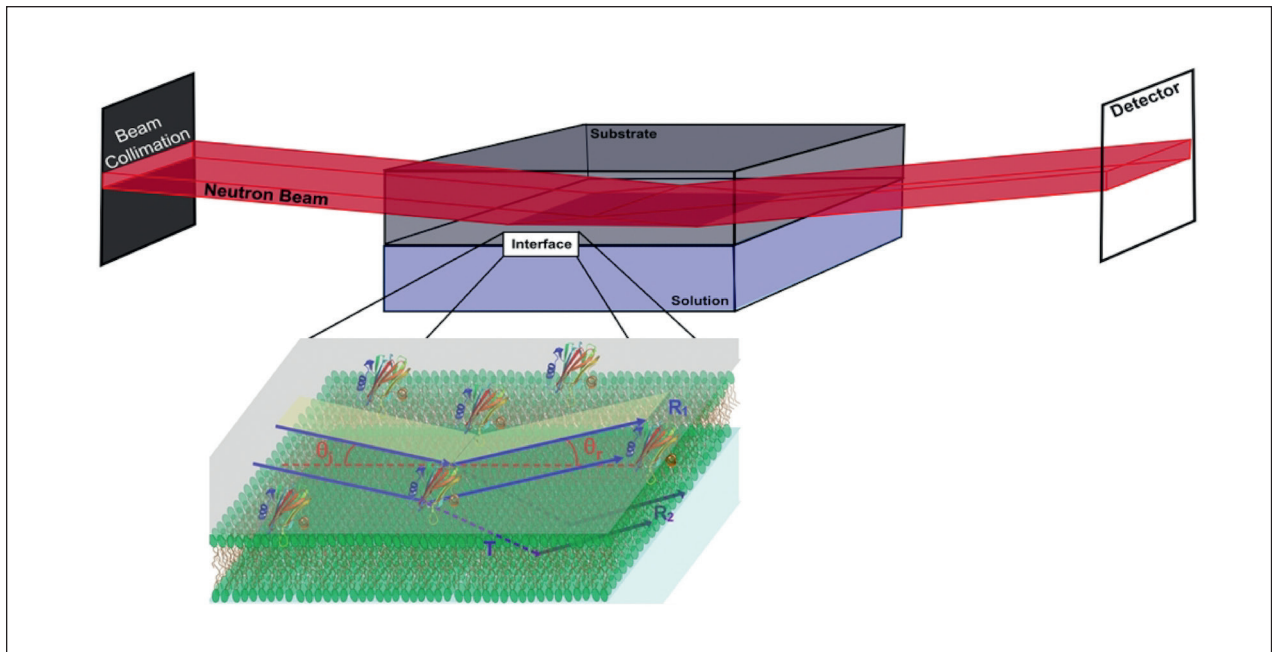
Tillsammans med Dr. Luke Clifton vid

ISIS i England och kollegor från Sverige, har vi nu undersökt hur de två nyckelproteinerna Bcl-2 och Bax beter sig när de träffas vid mitokondriernas membranyta för att avgöra cellens öde. Om det blir en dödsdom aktiveras apoptotiska proteiner som Bax i cytosolen och förflyttas i stora mängder till mitokondriens yttre membran där de neutraliserar det antiapoptotiska Bcl-2 och de övertaliga Bax-molekylerna perforerar mitokondriens hölje så att fler apoptotiska faktorer som cytokrom c släpps ut för att vidare aktivera steg i celldöden via caspaser. Slutligen fragmenteras cellen och blir städad bort via makrofager. Men för att överleva en sådan dödsdom har många tumörceller utvecklat en enkel strategi i att överuttrycka Bcl-2 för att klara Bax-attacken (som är ofta behandlingsinducerad) genom att hämma all Bax.

Ett stort problem i utvecklingen av Bcl-2-inhibitorer är fortfarande låg kunskapsnivå om hur exakt Bcl-2 utför sin cellskyddande funktion i den mitokondriella membranmiljön. Dess molekylära struktur och funktion är inte helt utredd, men skulle vara viktigt för att utveckla bättre strukturoptimerade läke-



Figur 1: Dr. J Ådén och Prof. G. Gröbner vid SURF, en avancerad neutronreflektometer vid ISIS forskningsanläggning vid Harwell i England, som används i samarbete med ESS (Lund) för att studera det cellskyddande proteinet Bcl-2 och celldödande proteinet Bax beteende i deras naturliga mitokondriala membranomgivning. Bild: Dr. Tobias Sparrman, Umeå universitet.

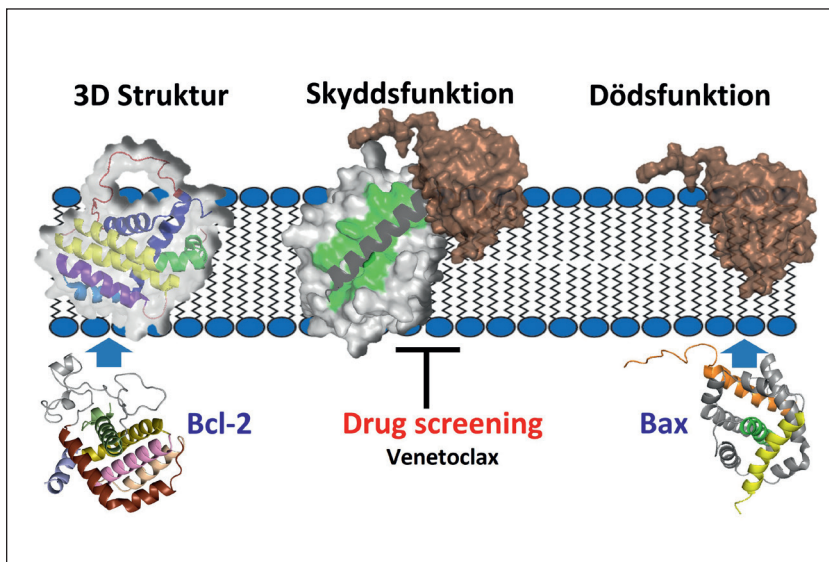


Figur 2: Neutronreflektometri på biologiska membran: Reflektions- och brytningsprocessen av en neutronstråle producerar en global profil tvärs genom hela membranet och deras lipid- och proteinkomponenter. Metoden mäter också ändringar efter tillsats av vidare proteiner, läkemedel eller membraneffektorer. Bild: stöd från Dr. L. Clifton, STFC (UK).

medelskandidater. Med neutronreflektometri (NR) och NMR (kärnmagnetresonans)-spektroskopi kunde vi studera hela Bcl-2-proteinet i en mitokondrieliknande membranmiljö för att generera en

molekylär insikt i de viktigaste strukturella och dynamiska funktionerna av Bcl-2⁶. Vi kunde kartlägga den relativa fördelningen av Bcl-2-protein i membranet och vilka delar av proteinet som

var rörliga. Resultaten visade att den huvudsakliga proteindelen som blockerar celldödande Bcl-2-medlemmar sitter innesluten och orörlig i membranet snarare än på ytan (se figur 3, vänster sida); detta i motsats till vad man tidigare trott. Men den så kallade regulativa loopen av proteinet ligger på eller nära membranytan och är mycket rörlig, som också NMR-spektroskopi tidigare indikerat. Detta proteinsegment fungerar som en molekylär omkopplare som kan ta emot signaler från cellens cytosol (till exempel fosforyleringen för att kontrollera aktiviteten). Celldödande proteiner som Bax (i brun färg i figur 3) hämmar Bcl-2 på membran nivå via sin bindande huvuddel, det så kallade BH3-motivet. Resultaten innebär ett betydande genombrott i den mekanistiska förståelsen hur Bcl-2 och Bax växelverkar med varandra i membranmiljö, trots att det länge varit känt att Bax är membranaktivt och kan delvis penetrera det yttre lipidmembranet i mitokondrierna. Att upptäcka placeringen och beteendet för Bcl-2-proteinet i dessa mitokondriella membran är ett genombrott för att förstå den molekylära cellskyddsfunktionen av Bcl-2 i normala celler samt tumörceller, vilket gör Bcl-2 till ett primärt mål för bättre cancerbehandling med fokus på aktiva substanser som släpper Bax fri



Figur 3: Vår forskningsstrategi bygger på vårt arbetskoncept: Bcl-2-protein förhindrar apoptos vid mitokondriens membran via blockering av proteinet Bax. Vår forskning har tre syften: I. Vilken struktur har Bcl-2 i sin nativa mitokondriella membranomgivning (se vänstra sidan); II. Hur blockerar cellskyddande Bcl-2 det celldödande Bax-proteinet (se mitten) så att cancerceller kan undvika (terapi-inducerad) celldöd; och hur kan framtida läkemedel lösa upp komplexen så att Bax kan utföra sin celldödande effekt (se högra sidan). Nu finns Venetoclax som dock bara fungerar för en liten grupp av Bcl-2-känsliga cancer typer (i ALL och AML leukemier). Stort fokus ligger därför på utveckling av nya läkemedelskandidater för att expandera dess tillämpning mot andra Bcl-2-känsliga cancerformer och släktingar till Bcl-2.

••• kunskapsutveckling på atomnivå

från Bcl-2/Bax complexen (se figur 3, mitten och höger).

Forskningen har haft som strategi att hitta läkemedel som binder till Bcl-2-proteinet eller dess släktingar för att släppa celldödande proteiner som Bax fria från sin inhiberande Bcl-2-komplex för att förstöra tumörceller. Men att hitta läkemedel som korrumpierar protein-protein-växelverkan och inte bara modulerar en enzymfunktion med små läkemedelmolekyler, är ganska krävande. Men på senare år hittade farmaceutisk forskning så kallade BH3 mimeriska läkemedel som blockerar Bcl-2 bindningsficka (princip, se figur 3, mitten) från att binda Bax-proteinet via sin BH3-domän. Som en första linjes läkemedel upptäcktes Venetoclax (ABT-199) som nu är tillåtet för behandling av kronisk lymfocytisk leukemi. I princip skulle Venetoclax hjälpa också mot många Bcl-2-känsliga tumörer som ensam behandlingsform, men det gör det inte.

AKTIVERAR PARALLELLA VÄGAR

Många andra Bcl-2-känsliga tumörer överlever behandlingen eftersom de kan aktivera parallella vägar för att övertrycka andra cellskyddande Bcl-2-proteiner, eller så muterar de bindningsfickan hos Bcl-2 som till exempel bidrar till att en subgrupp av leukemipatienter blir icke-responsiv till Venetoclax⁷. Därför finns nu också en typ av modifierad Venetoclax som kallas Navitoclax (ABT-263) som inte bara hämmar Bcl-2 utan också dess släktingar som Bcl-xL och Bcl-w, och befinner sig nu under klinisk prövning (AbbVie). Det finns också en hel del studier där användningen av dessa substanser i kombination med anticancer-läkemedel som utnyttjar andra signalvägar i tumörer utreds.

Den stora motspelaren av de cellskyddande Bcl-2-proteinerna är Bax och dess nära släktingar. Men hur penetrerar Bax mitokondrierna för att aktivera celldöd, en mekanism som många tumörbehandlingar vill få igång? Det finns bra molekylära strukturer av Bax i cytosolen men hur det aktiverade Bax-proteinet binder till och perforerar mitokondriens yttre membran har tidigare varit okänt. Därför använde vi i en ny studie⁸ huvudsakligen neutronreflektometri (NR) för att studera strukturen av Bax i olika mitokondria membranmiljöer. Eftersom vi

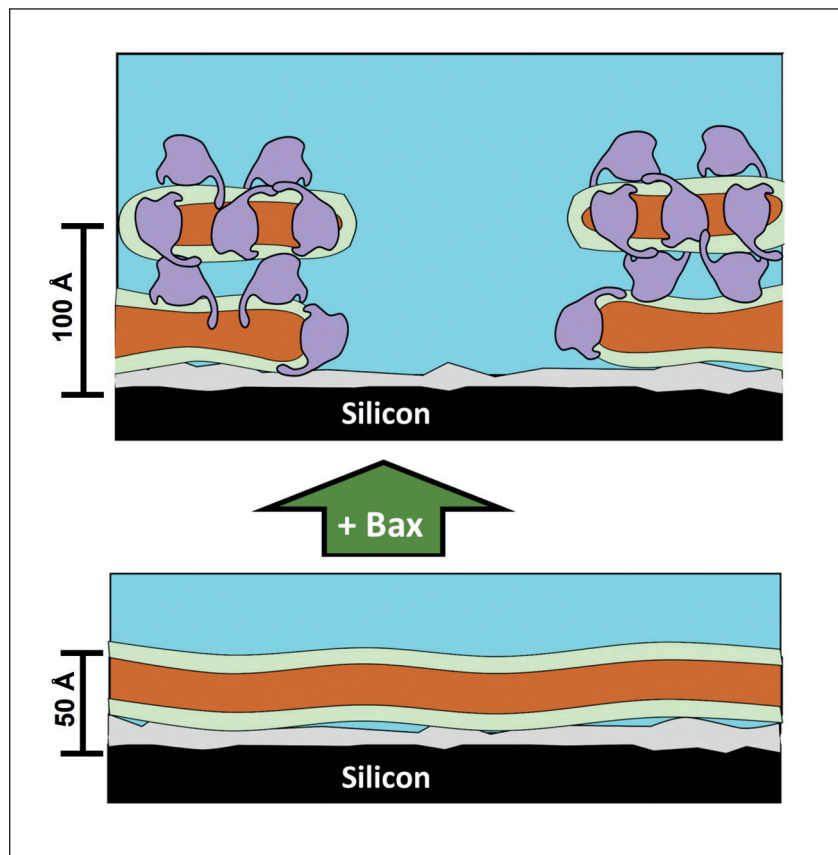
kunde göra unika tidsupplösta NR-mätningar kunde vi se hur Bax attackerar och perforerar mitokondrier under apoptosens första steg samt på vilken tidskala detta sker. Bildning av porer i membranet sker i två steg med en snabb process där Bax fastnar på membranet och en långsammare process (några timmar som är jämförbart med celldöden *in vivo*) där Bax skapar porer genom att extrahera lipider för att skapa ett hål i membranet. Lipider som på så sätt extraheras bygger lipid-Bax-komplex på membranets yta på ett sätt (se figur 4) som var okänt innan vår NR-studie. Hålens funktion är att släppa ut apoptotiska faktorer såsom cytokrom c från mitokondrien, som i cytosolen aktiverar caspaser och börjar en irreversibel signal-kaskad som slutar i cellens död.

GAV UNIKA INSIKTER

Att vi kunde studera hur Bax bildar porer i membranet genom att undersöka strukturen av Bax i olika membranmiljöer med tidsupplösta experiment gav en

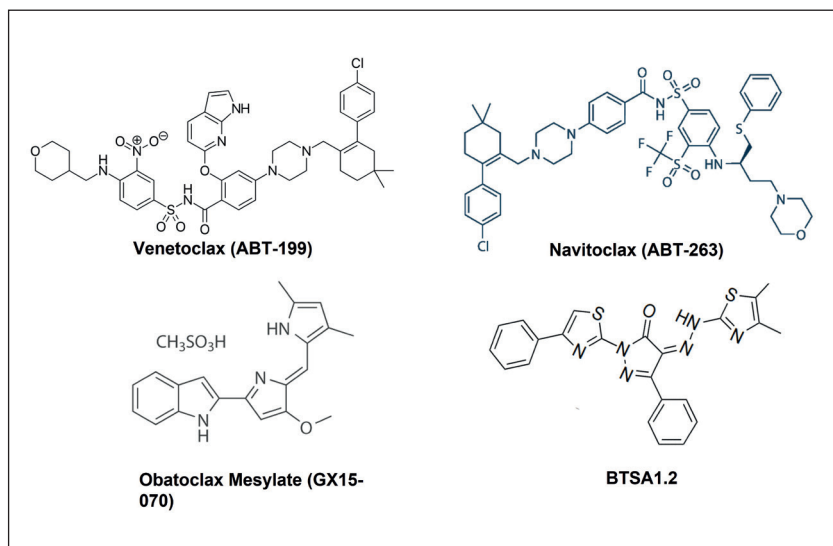
unik molekylär och mekanistisk insikt i denna kritiska process där Bax attackerar mitokondrier under celldöd. Detta arbete har relevans för att förstå både grundläggande cellprocesser samt cancerbiologi. Det visar verkligen förmågan av neutronreflektometri att ge unik information på molekylär nivå inom biomedicinsk forskning och öppnar upp nya vägar för utveckling av läkemedel som förstärker Bax förmåga att attackera mitokondrier också hos elaka tumörceller. På sistone ligger fokus i att utnyttja Bcl-2-familjen i cancerbehandlingar, nämligen att hitta nya läkemedel som är aktivatörer⁹ av Bax för att ytterligare öka dess effekt i cancerbehandling.

Men hur aktiverar man Bax att utföra celldöd via penetrering av mitokondriens yttre lipidmembran där också cellskyddande proteiner som Bcl-2 sitter och kan vara i stort övertal? Fysiologiskt säkerställs Bax homeostasis i vävnad, men felreglering av Bax kan orsaka oavsiktlig celldöd. Detta vill man utnyttja. Trots att Bax är ett intressant läkemedelsmål



Figur 4: Schematisk modell av proteinet Bax (lila) generering av porer i mitokondriernas yttre membran detekterat med hjälp av neutronreflektometri (överst). Bildningen av protein/lipid-komplex sker på samma tidskala av några timmar som i levande celler och är ett nyckelsteg för att utföra den programmerade celldöden. Bild: Dr. Luke Clifton, STFC (UK).

••• kunskapsutveckling på atomnivå



Figur 5: Strukturerna av läkemedlet Venetoclax och de experimentella läkemedelskandidaterna Navitoclax och Obatoclax som fungerar som inhibitorer av den cellskyddande proteinfamiljen Bcl-2. BTSA1.2 är en läkemedelskandidat som istället aktiverar celledödande Bax för att undvika blockering via Bcl-2 och därmed avlägsnar tumörceller.

har man fokuserat ganska länge på läkemedel mot cellskyddande proteiner som Bcl-2, detta för att det har varit svårt att förstå mekanismerna bakom Bax-aktivering samt att hitta aktiveringsläkemedel. Men nyligen har det hänt mycket på denna front⁹. Genom intensiva struktur-funktionsstudier de senaste åren hittade man en Bax N-terminal bindingsite som är nödvändig för aktivering av Bax så att den attraheras från cytosolen till mitokondrier och bildar dödliga membranperforerande oligomerer. Detta aktiveringsställe i Bax är en hydrofob yta där man också lyckades att hitta och optimera läkemedelskandidater som kan fastna och aktivera Bax. Det finns många försök för att hitta små molekyler som öppnar nya möjligheter för att angripa Bax. Den direkta farmakologiska moduleringen av Bax är ett attraktivt mål och de nyligen upptäckta små molekyler som BTSA1.2 har exempelvis uppvisat potential i djurmodeller för att stoppa blockeringen av cancer via överuttryck av cellskyddande Bcl-2-proteiner⁹.

Samfattningsvis kan man säga att grundforskning som till exempel våra NR-studier är en liten pusselbit, men som bidragit med stora steg för att förstå rollen av Bcl-2-familjen och programmerad celledöd och dess ökade roll i uppkomsten av tumörer och behandlingsresistens. Baserad på en molekylär förståelse hur cellskyddande Bcl-2 och deras släktingar skyddar cancerceller och hur

Bax dödar celler via cellens mitokondrier, utvecklades nya strategier att bota cancer genom att utnyttja dessa proteiner som terapeutiska mål. Medan Venetoclax och Navitoclax redan finns godkända som Bcl-2-inhibitorer trots deras begränsningar, är mer forskning på gång för att förbättra dem och hitta nya Bcl-2 familjen-inhibitorer som Obatoclax (översikt, se figur 5). För Bax-aktivator är BTSA1.2 en het kandidat, men det sker mycket sökande fortfarande för andra små läkemedelsmolekyler som kan vara ortosteriska, allosteriska eller inducera Bax oligomerisering, detta för att hitta nya vägar att förbättra behandlingsformer. Nyligen finns också behandlingsstrategier där man kombinerar Bcl-2-inhibitorer med Bax-aktivatorer¹⁰ för att slå kraftfullt mot tumörceller och motverka deras förmåga att utveckla resistens.

REFERENSER

1. M. Garcia-Aranda, E. Perez-Ruiz, M. Redondo, Bcl-2 Inhibition to Overcome Resistance to Chemo- and Immunotherapy. *International Journal of Molecular Sciences* 19 (2018).

2. Y. Tsujimoto, L. R. Finger, J. Yunis, P. C. Nowell, C. M. Croce, Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* (New York, N.Y) 226, 1097-1099 (1984).

3. J. M. Adams, S. Cory, The BCL-2 arbiters of apoptosis and their growing role as cancer targets. *Cell death and differentiation* 25, 27-36 (2018).

4. K. W. Yip, J. C. Reed, Bcl-2 family proteins and cancer. *Oncogene* 27, 6398-6406 (2008).

5. D. Kaloni, S. T. Diepstraten, A. Strasser, G. L. Kelly, BCL-2 protein family: attractive targets for cancer therapy. *Apoptosis* 28, 20-38 (2023).

6. A. U. Mushtaq et al., Neutron reflectometry and NMR spectroscopy of full-length Bcl-2 protein reveal its membrane localization and conformation. *Commun. Biol.* 4, 507 (2021).

7. R. W. Birkinshaw et al., Structures of BCL-2 in complex with venetoclax reveal the molecular basis of resistance mutations. *Nat Commun* 10 (2019).

8. L. A. Clifton et al., Creation of distinctive Bax-lipid complexes at mitochondrial membrane surfaces drives pore formation to initiate apoptosis. *Sci Adv* 9 (2023).

9. A. Z. Spitz, E. Gavathiotis, Physiological and pharmacological modulation of BAX. *Trends in pharmacological sciences* 43, 206-220 (2022).

10. A. Lopez et al., Co-targeting of BAX and BCL-XL proteins broadly overcomes resistance to apoptosis in cancer. *Nat Commun* 13 (2022).

HANNA P. WACKLIN-KNECHT, EUROPEAN SPALLATION SOURCE ERIC, ESS OCH DEPARTMENT OF CHEMISTRY, DIVISION OF PHYSICAL CHEMISTRY, LUND UNIVERSITY



GERHARD GRÖBNER, DEPARTMENT OF CHEMISTRY, UNIVERSITY OF UMEÅ, GERHARD.GROBNER@UMU.SE

