

ARTYKUŁ

OTWARTE



# Jad pszczeleli i melityna hamują aktywację receptora czynnika wzrostu w raku piersi HER2-dodatnim i potrójnie ujemnym

Ciara Duffy<sup>1,2,3,4</sup>, Anabel Sorolla<sup>2,4</sup>, Edina Wang<sup>2,4</sup>, Emily Golden<sup>2,4</sup>, Eleanor Woodward<sup>2,4</sup>, Kathleen Davern<sup>4,5</sup>, Diwei Ho<sup>6</sup>, Elizabeth Johnstone<sup>4,7,8</sup>, Kevin Pflieger<sup>4,7,8,9</sup>, Andrew Redfern<sup>10</sup>, K. Swaminathan Iyer<sup>5</sup>, Boris Baer<sup>11</sup> i Pilar Blancafort<sup>1,2,4,12</sup>

Pomimo dziesięcioleci badań, mechanizmy molekularne i selektywność biomolekularnych składników jadu pszczoły miodnej (*Apis mellifera*) jako środków przeciwnowotworowych pozostają w dużej mierze nieznanymi. W niniejszym artykule wykazujemy, że jad pszczoły miodnej i jego główny składnik melityna silnie indukują śmierć komórek, szczególnie w agresywnych podtypach raka piersi potrójnie ujemnym i HER2-bogatym. Jad pszczeleli i melityna hamują aktywację EGFR i HER2, zakłócając fosforylację tych receptorów w błonie plazmatycznej komórek raka piersi. Badania mutacji ujawniają, że dodatnio naładowana sekwencja C-końcowa melittyny pośredniczy w interakcji z błoną plazmatyczną i aktywności przeciwnowotworowej. Inżynieria motywu RGD dodatkowo wzmacnia kierowanie melittyny do komórek złośliwych przy minimalnej toksyczności dla komórek normalnych. Na koniec, podanie melittyny wzmacnia działanie docetakselu w hamowaniu wzrostu guza piersi w modelu alloprzeszczepu. Nasza praca ujawnia mechanizm molekularny leżący u podstaw selektywności przeciwnowotworowej melittyny i przedstawia strategię leczenia ukierunkowane na agresywne nowotwory piersi. npj Precision Oncology (2020) 4:24; <https://doi.org/10.1038/s41698-020-00129-0>

## WSTĘP

Europejska pszczoła miodna (*Apis mellifera*) jest źródłem wielu produktów stosowanych w medycynie przez ludzi, takich jak miód, propolis i jad od tysięcy lat<sup>1</sup>. Jednak molekularne czynniki determinujące aktywność przeciwnowotworową jadu pszczelego pozostają słabo poznane, szczególnie w przypadku raka piersi, najczęstszego nowotworu u kobiet na świecie<sup>2</sup>. Zrozumienie molekularnych podstaw i swoistości jadu pszczelego przeciwko komórkom nowotworowym jest kluczowe dla opracowywania i optymalizacji nowych skutecznych terapii z naturalnego produktu, który jest szeroko dostępnym i opłacalnym w produkcji w wielu społecznościach na całym świecie.

Aktywnym składnikiem jadu pszczelego jest melityna, która stanowi połowę suchej masy jadu pszczelego<sup>3,4</sup>. Melityna to dodatkowo naładowany, amfipatyczny peptyd złożony z 26 aminokwasów<sup>5</sup>, który wiąże się z fosfolipidami dwuwarstwy błonowej, powodując śmierć komórki poprzez tworzenie toroidalnych porów transbłonowych o średnicy około 4,4 nm, które mogą umożliwić internalizację dodatkowych małych cząsteczek o działaniu cytotoksycznym<sup>4,6,7</sup>.

Zarówno jad pszczeleli, jak i melityna wykazały działanie przeciwnowotworowe w przypadku czerniaka<sup>8</sup>, czyli niedrobnokomórkowego raka płuc<sup>9</sup>, raka wątroby<sup>10</sup>, białaczki<sup>11</sup>, jajnika<sup>12</sup>, szyjki macicy<sup>13</sup> i raka trzustki<sup>14</sup>, z wyższą cytotoksycznością w komórkach nowotworowych w porównaniu do komórek nieprzekształconych<sup>8,11,14,15</sup>. Nanocząsteczki melittyny były stosowane w celu zahamowania przerzutów do wątroby poprzez immunomodulację komórek śródbłonka zatok wątrobowych<sup>16</sup>. Zgłaszano addytywne i synergistyczne działanie przeciwnowotworowe między jadem pszczoły miodnej a innymi metodami terapeutycznymi, w tym z cisplatyną w nowotworach szyjki macicy i krtani<sup>17</sup> oraz z docetakselą w komórkach raka płuc<sup>18</sup>. Podobne interakcje wykazano między melittyną a buforowanym fosforanem roztworem soli fizjologicznej poddanym działaniu osocza

w komórkach raka piersi i czerniaka MCF719. Jad pszczeleli i melityna również indukowały apoptozę w komórkach MCF720 i zmniejszały żywotność komórek i migrację w komórkach raka piersi MDA-MB-231<sup>21,22</sup>. Jad pszczoły miodnej zmniejszył przerzuty raka piersi do płuc<sup>23</sup>, zahamował wzrost guza i wydłużył przeżycie u myszy ze spontanicznymi guzami raka piersi<sup>24</sup>. Większość aktywności przeciwnowotworowej jadu pszczoły miodnej przypisuje się melittynie<sup>25</sup> poprzez hamowanie osi PI3K/Akt/mTOR w raku piersi<sup>21</sup>, MAPK w czerniaku<sup>26</sup>, JAK2/STAT3 w raku jajnika<sup>12</sup> i szlaków sygnałowych NFκB w komórkach raka płuc<sup>18</sup>. W przeciwieństwie do jadu pszczoły miodnej, jad trzmiela (*Bombus terrestris*) nie zawiera melittyny<sup>27</sup>, ale zawiera wydzielniczą fosfolipazę A<sub>2</sub>, która indukuje apoptozę poprzez hamowanie fosforylacji Akt w ludzkich komórkach przewlekłej białaczki szpikowej<sup>28</sup>.

Według naszej wiedzy, nie badano wpływu różnych jadów pszczeleli i melittyny na podtypy raka piersi w porównaniu z komórkami nieprzekształconymi. Potrójnie ujemne raki piersi (TNBC, pozbawione ekspresji receptorów estrogeny i progesteronu, a także receptora naskórkowego czynnika wzrostu 2, HER2/29) są agresywne i wiążą się z najgorszymi wynikami<sup>30–33</sup>. Około 50% TNBC nadmiernie ekspresuje receptor naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR)<sup>34</sup>, a guzy wzbogacone w HER2 nadmiernie ekspresują HER2, inny receptor kinazy tyrozynowej (RTK), który nadaje sygnalizację onkogenną, częścią zależną od szlaku PI3K/Akt<sup>34</sup>. Blokowanie sygnalizacji EGFR w TNBC za pomocą standardowych terapii wykazało ograniczoną skuteczność kliniczną we wczesnej fazie badań klinicznych z powodu braku zależności od szlaku EGFR i znaczenia szlaków pobocznych<sup>35</sup>. Chociaż terapie ukierunkowane na HER2 znacznie poprawiły medianę

<sup>1</sup> Wydział Nauk Humanistycznych, Uniwersytet Australii Zachodniej, Perth, WA 6009, Australia.

<sup>2</sup> Wydział Nauk Humanistycznych, Uniwersytet Australii Zachodniej, Perth, WA 6009, Australia. <sup>3</sup> Biologia energii roślin, Uniwersytet Australii Zachodniej, Perth, WA 6009, Australia. <sup>4</sup> Centrum Badań Medycznych, Uniwersytet Australii Zachodniej, Perth, WA

<sup>5</sup> Ośrodek badań nad przeciwciałami monoklonalnymi (MAB), Instytut Badań Medycznych Harry'ego Perkinsa, Perth, WA 6009, Australia. <sup>6</sup> Wydział Nauk Molekularnych, Uniwersytet Endokrynologii

<sup>7</sup> Molekularnej i Farmakologii, Instytut Badań Medycznych Harry'ego Perkinsa, Perth, WA 6009, Australia. <sup>8</sup> australijski

<sup>9</sup> Centre for Personalised Therapeutics Technologies, Perth, Australia. <sup>10</sup> of Western Australia, Perth, WA 6009, Australia. <sup>11</sup> Dimerix Limited; Nedlands, Perth, WA 6009, Australia. <sup>12</sup> Szkoła Medyczna, The University Research Council Australia. <sup>13</sup> Centre for Integrative Bee Research (CIBER), Department of Entomology; University of California Riverside, Riverside, CA 92521, USA. <sup>14</sup> The Greehey Children's Cancer Research Institute, The University of Texas Health Science Center in San Antonio, San Antonio, TX 78229, USA. email: pilar.blancafort@uwa.edu.au

przeżycia w przypadku przerzutów, oporność jest niemal nieunikniona w dłuższej perspektywie dla tego podtypu<sup>33,36</sup>. Oczywiście jest, że odkrycie skuteczniejszych i selektywnych strategii terapeutycznych dla tych nowotworów jest priorytetowym obszarem w onkologii klinicznej.

W niniejszym artykule doniesiono, że jad pszczoły i melittyna indukują silną i wysoce selektywną śmierć komórek w przypadku TNBC i raka piersi z nadekspresją HER2, przy nieistotnym wpływie na komórki zdrowe, poprzez zakłócanie zależnych od czynnika wzrostu oddziaływań RTK, które mają kluczowe znaczenie dla fosforylacji receptora i aktywacji sygnalizacji PI3K/Akt.

Oprócz leczenia raka piersi, przedstawiamy również ukierunkowane modyfikacje melittyny do potencjalnego zastosowania w skojarzeniu z chemioterapią w leczeniu innych agresywnych nowotworów, u których występuje nadmierna ekspresja receptorów czynników wzrostu.

## WYNIKI Jad

pszczoły miodnych i melittyna zmniejszają przeżywalność raka piersi Aby ocenić skuteczność i selektywność leczenia przeciwnowotworowego, jad europejskich pszczoł miodnych zebrany w Perth w Australii oraz peptyd melittyny oceniono w testach dawka-odpowiedź na panelu linii komórkowych reprezentatywnych dla wewnątrz trznych podtypów raka piersi oraz w komórkach nieprzekształconych (ryc. 1a). Jad pszczoły miodnej wykazał wysoką selektywność przeciwnowotworową, ze znacznie większą siłą działania w przypadku TNBC (np. SUM159 i SUM149) oraz w liniach komórkowych raka piersi wzbogaconych w HER2 (np. MDA-MB-453 i SKBR3), a następnie pnie w komórkach raka piersi luminalnego (w tym MCF7 i T-47D), przy najmniejszym wpływie na komórki normalne (pierwotne fibroblasty skóry właściwej HDFa oraz nieprzekształcone komórki gruczołu piersiowego MCF 10A i MCF-12A) (ryc. 1b, lewa strona; tabela 1; GLM, chi-kwadrat Walda = 342,  $p < 0,001$ ,  $n = 33$ ,  $df = 1$ ). Zaobserwowano istotną redukcję połowy maksymalnego stężenia hamującego (IC50) dla obu linii komórek nowotworowych TNBC SUM159 (5,58 ng/ $\mu$ l) i SKBR3 wzbogaconego w HER2 (5,77 ng/ $\mu$ l) w porównaniu z linią normalnych komórek HDFa (22,17 ng/ $\mu$ l, ryc. 1c, lewa; jednokierunkowa analiza wariancji,  $p < 0,01$ ).

Podobnie, melittyna była znacząco skuteczniejsza przeciwko rakowi piersi z HER2 i TNBC w porównaniu do komórek normalnych (Ryc. 1b, c, po prawej; Tabela 1; GLM, Wald Chi-kwadrat = 12,9,  $p < 0,001$ ,  $n = 33$ ,  $df = 1$ ), z wartościami IC50 od 0,94 do 1,49  $\mu$ M w ludzkich komórkach raka piersi z TNBC i HER2 oraz od 1,03 do 2,62  $\mu$ M w komórkach nieprzekształconych. Badania żywotności komórek jadu pszczoły miodnej i melittyny w liniach komórkowych raka piersi u myszy i normalnych potwierdziły więż kszoną selektywność wobec agresywnych linii komórkowych guza myszy, takich jak mutant p53 claudin-low T11 i mutant BRCA B.1537,38 (Ryc. uzupełniająca 1).

Jad pszczoł miodnych z różnych populacji pszczoł miodnych w Irlandii i Anglii zmniejszył żywotność komórek SUM159 i SKBR3 znacznie bardziej niż w przypadku nieprzekształconych komórek HDFa (ryc. 1d, jednokierunkowa analiza wariancji,  $p < 0,001$ ). Przetestowaliśmy również jad trzmiela *Bombus terrestris* z Anglii. Próbkki pochodzące zarówno od robotnic, jak i matek wywołały minimalną śmierć komórek raka piersi w porównaniu z jadem pszczoł miodnych, nawet przy wysokich stężeniach jadu (ryc. 1e).

Opracowaliśmy mysie przeciwciała monoklonalne rozpoznające melittynę, aby ocenić względną obfitość melittyny we wszystkich próbkach jadu pszczoł miodnych i trzmieli za pomocą testu ELISA. Zgodnie z powyższymi badaniami aktywności, względną obfitość melittyny nie różniła się istotnie we wszystkich próbkach jadu pszczoł miodnych z różnych lokalizacji (dwukierunkowa analiza wariancji,  $p > 0,999$ ). Jednak stężenia melittyny były istotnie wyższe w próbkach pszczoł miodnych w porównaniu z próbkami jadu trzmieli i kontrolą izotypu IgG (ryc. 1f, dwukierunkowa analiza wariancji,  $p < 0,001$ ).

Przeciwnowotworowe działanie melittyny zostało potwierdzone w eksperymentach blokowania *in vitro*, w których wykorzystaliśmy przeciwciała anti-melittyny do uratowania żywotności komórek w komórkach HDFa i SUM159. Komórki traktowano jadem pszczoł miodnych lub melittyną w połączeniu ze wzrastającymi stężeniami przeciwciała anti-melittyny. Żywotność komórek była istotnie wyższa, gdy melittyna była blokowana

przeciwiało przeciwko melittynie dla komórek HDFa i SUM159 wystawionych na działanie jadu pszczoł miodnych lub peptydu melittyny (ryc. 1g, test t,  $p < 0,0001$ ). Dane te sugerują, że melittyna obecna w jadzie pszczoł miodnych jest najbardziej znanym bioaktywnym związkiem przeciwnowotworowym wśród wszystkich badanych jadów. Jad pszczoł miodnych zebrany w Perth w Australii został użyty do wszystkich dalszych eksperymentów.

Jad pszczoły i melittyna indukują śmierć komórek raka piersi Aby zbadać mechanizm i kinetykę śmierci komórek, komórki TNBC poddano działaniu IC50 jadu pszczoł miodnych lub melittyny przez 18 i 24 godziny, a następnie przetworzono je za pomocą testu rozszczepionej kaspazy-3 w celu ilościowego określenia apoptotycznej śmierci komórek. Immunoblotting potwierdził indukację rozszczepionej kaspazy-3 w komórkach SUM159, przy czym sama melittyna indukowała wyższy poziom apoptozy niż jad pszczoły zarówno 18, jak i 24 godziny po leczeniu (ryc. 2a, kwantyfikacja w ryc. uzupełniająca 2).

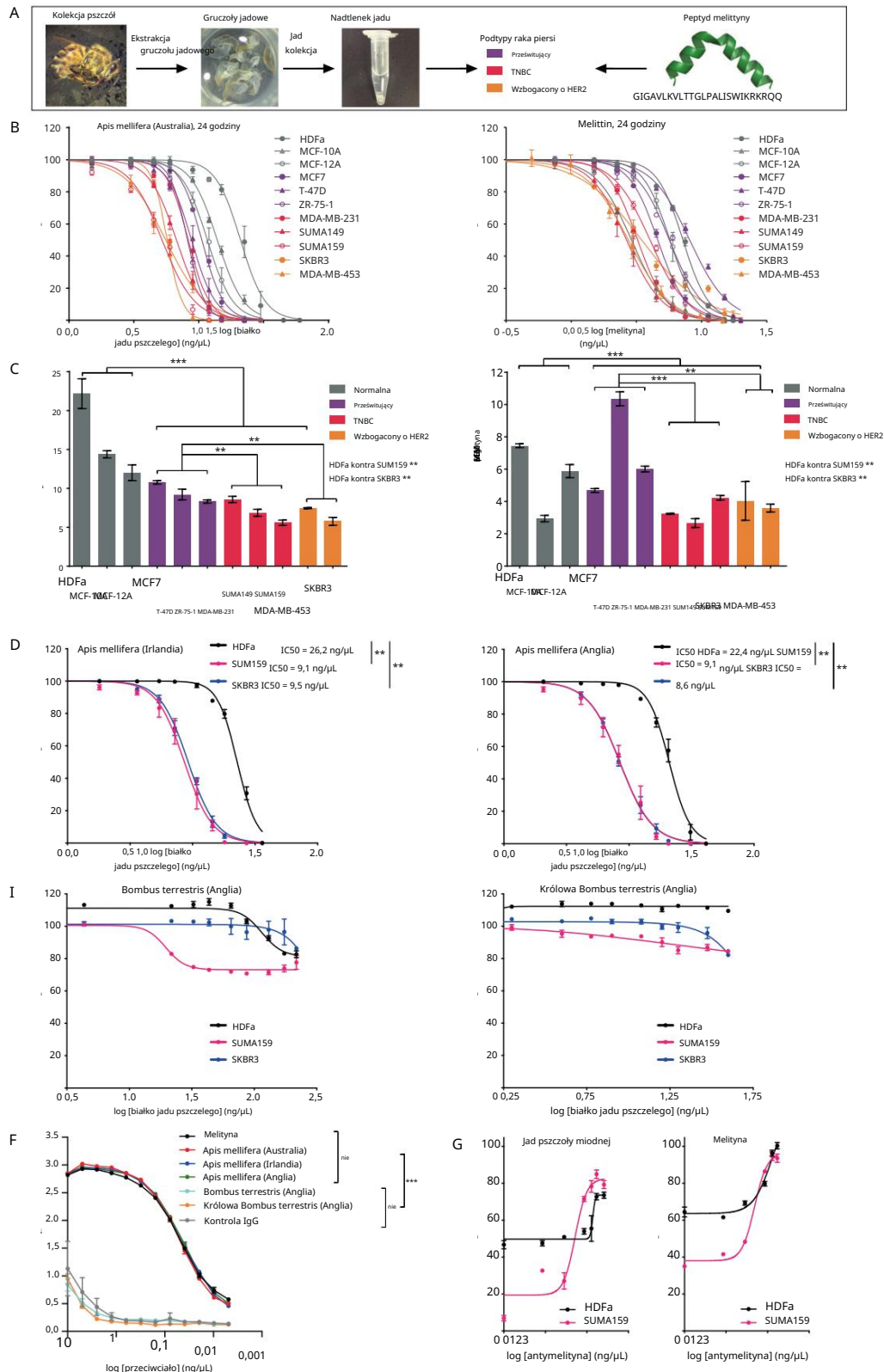
Aby określić ilościowo populacje komórek apoptotycznych, martwiczych lub martwych po leczeniu, przeprowadziliśmy test wykrywania apoptozy Annexin V-FITC. Komórki SUM159 wystawiono na działanie nośnika, jadu pszczoł miodnych lub melittyny przy użyciu stężenia IC50 i przetworzono za pomocą cytometrii przepływowej po 60-minutowym leczeniu (ryc. 2b). Znaleźliśmy znacznie więżcej późnych komórek apoptotycznych/martwiczych w przypadku próbek leczonych melittyną ( $23,6 \pm 5,7\%$ ) w porównaniu z jadem pszczoł miodnych ( $8,3 \pm 1,9\%$ ) i kontrolą nośnika ( $4,8 \pm 0,4\%$ , dwukierunkowa ANOVA,  $p < 0,001$ , średnia  $\pm$  SEM). Jednak nie było istotnych różnic w poziomach wczesnych komórek apoptotycznych lub martwiczych we wszystkich warunkach (dwukierunkowa ANOVA,  $p > 0,05$ , średnia  $\pm$  SEM). Aby scharakteryzować kinetykę obumierania komórek w krótszym czasie, mierzono żywotność komórek HDFa, SKBR3 i SUM159 poddawanych przez okres do 1 godziny działaniu jadu pszczoł miodnych lub melittyny w stężeniach IC50 (ryc. 2c).

Jad pszczoły szybko zmniejszył żywotność komórek, bez znaczącej różnicy między liniami komórek normalnych i nowotworowych w ciągu godziny (dwukierunkowa analiza wariancji,  $p = 0,97$ ). Natomiast melittyna znacząco zmniejszyła żywotność obu linii komórek raka piersi w porównaniu do komórek normalnych od 10. minuty, a SUM159 znacząco bardziej niż SKBR3 od 30. minuty (dwukierunkowa analiza wariancji,  $p < 0,0001$ ).

Mikroskopia konfokalna żywych komórek (ryc. 2d) i mikroskopia elektronowa skaningowa (ryc. 2e) w komórkach SKBR3 i SUM159 wykazały szybkie rozerwanie i obkurczenie błony plazmatycznej pod wpływem jadu pszczoł miodnych i melittyny w porównaniu do leczenia nośnikiem w ciągu 10 do 60 minut.

RGD wzmacnia ukierunkowanie melittyny na raka piersi C-końiec

melittyny tworzy dodatnio naładowaną  $\alpha$ -helisę, która została zaproponowana jako pośrednicząca w wiązaniu z ujemnie naładowaną błoną plazmatyczną, indukując późniejsze tworzenie porów i lizę komórek<sup>39-41</sup>. Poprzednie badania wykazały, że skrócenie tego dodatnio naładowanego C-końca znacząco zmniejsza wiązanie melittyny z dwuwarstwowymi fosfolipidowymi w porównaniu z dzikim typem melittyny<sup>39,42</sup>. Aby ocenić funkcjonalną rolę dodatniej sekwencji (K21RKR24) w C-końcu melittyny, zaprojektowaliśmy ujemnie naładowany peptyd melittyny (D21EDE24-melittyna). Przewidywano, że te ujemne reszty zakłócą wiązanie melittyny z błoną plazmatyczną. Odkryliśmy, że DEDE-melittyna nie wywołała mierzalnych oznak aktywności przeciwnowotworowej w żadnej z testowanych linii komórkowych (ryc. 3a, b). Co ważne, aktywność przeciwnowotworowa DEDE-melittyny została przywrócona za pomocą dodatnio naładowanej sekwencji (K21KRRK26) obecnej w dużym antygenie T wirusa Simian Virus 40 (SV40) (peptyd SV40-melittyna) posiadającym zdolność penetracji komórek<sup>43</sup> (ryc. 3b). Podobnie, wszczepienie więższej dodatnio naładowanej sekwencji TAT (transaktywator transkrypcji, pochodzący z HIV-1)<sup>43</sup> do C-końca melittyny również przywróciło aktywność DEDE-melittyny (peptyd TAT-melittyna; Ryc. uzupełniająca 3). Jednak siła działania melittyny i SV40-melittyny była więższa niż TAT-melittyny, co może wynikać z więższej kszonki rozmiaru TAT. Dane te pokazują, że reszty wymagane do aktywności melittyny obejmują



te zlokalizowane w C-końcowej  $\alpha$ -helisie, składające się z kilku kluczowych dodatnio naładowanych reszt niezbędnych do interakcji z błoną plazmatyczną.

Aby zwiększyć selektywność komórek nowotworowych, wygenerowaliśmy dwufunkcyjny peptyd melittyny, konstruując N-końcową alfa-heliką RGD

motywu peptydowego (RGD1-melittyna, pochodząca z TGF- $\beta$ 3, sekwencja HGRGDLGRLKK), który wchodzi w interakcję z integrzynami  $\alpha v \beta 6$  i  $\alpha v \beta 3$  nadmiernie ekspresjonowanymi na błonach komórek raka piersi i naczyniach krwionośnych związanych z guzem 44-46. Po zmodyfikowaniu przy użyciu bioaktywnych peptydów motywu RGD zwiększają kierowanie do komórek raka

Ryc. 1 Jad pszczele i melittyna specyficznie zmniejszają żywotność komórek guza piersi. a Proces zbierania jadu pszczelego i melittyny leczenia komórek raka piersi, z udziałem pszczoły miodnej zebranej w Australii. b Badania żywotności komórek w grupie zdrowych i zdrowych komórek człowieka linii komórek nowotworowych leczone jadem pszczoły miodnych z Australii (po lewej) lub melittinem (po prawej), z wartościami IC50 (uogólnione modele liniowe). Badania żywotności komórek normalnych ludzkich fibroblastów skórnych (HDFa) i linii komórek raka piersi (SUM159 i SKBR3) leczonych jadem d populację pszczoły miodnych w Irlandii (po lewej) i Anglii (po prawej) (jednokierunkowa analiza wariancji) oraz jad pochodzący od robotnicy (po lewej) i królowej (po prawej) z Anglii trzmiele. f Absorbancja (405 nm) wodnych roztworów melittyny i jadu pszczelego oceniana metodą ELISA z przeciwciałem przeciwko melittynie i Kontrola IgG (dwukierunkowa analiza wariancji). g Badania żywotności komórek w komórkach HDFa i SUM159 po zablokowaniu melittyny przy użyciu przeciwciała anti-melittyny z jad pszczele (po lewej) i melittyna (po prawej). Dane przedstawiono jako średnia  $\pm$  SEM (n = 3). Różnice uznano za istotne przy  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) . Zobacz także Ryc. uzupełniający 1.

Tabela 1. Połowiczne maksymalne stężenia hamujące (IC50) jadu pszczoły miodnej i melittyny.

Linia komórkowa	Podtyp	Jad pszczele IC50 (ng/ $\mu$ L)	Melittyna IC50 (ng/ $\mu$ L)	Melittyna IC50 ( $\mu$ M)
<b>Człowiek</b>				
HDFa	Normalna	22,17 $\pm$ 1,91	7,45 $\pm$ 0,12	2,62 $\pm$ 0,04
MCF-10A	Normalna	14,38 $\pm$ 0,47	2,94 $\pm$ 0,20	1,03 $\pm$ 0,07
MCF-12A	Normalna	12,00 $\pm$ 1,01	5,88 $\pm$ 0,41	2,07 $\pm$ 0,14
MCF7	Przeświet A	10,77 $\pm$ 0,22	4,68 $\pm$ 0,12	1,64 $\pm$ 0,04
T-47D	Przeświet A	9,21 $\pm$ 0,69	10,36 $\pm$ 0,43	3,64 $\pm$ 0,15
ZR-75-1	Przeświet A	8,32 $\pm$ 0,20	6,01 $\pm$ 0,18	2,11 $\pm$ 0,06
MDA-MB-231	TNBC, claudin-niski	8,58 $\pm$ 0,39	3,24 $\pm$ 0,03	1,14 $\pm$ 0,01
SUMA149	TNBC, podstawny	6,86 $\pm$ 0,45	2,67 $\pm$ 0,27	0,94 $\pm$ 0,10
SUMA159	TNBC, claudin-niski	5,58 $\pm$ 0,33	4,24 $\pm$ 0,14	1,49 $\pm$ 0,05
MDA-MB-453	Wzbogacony o HER2	7,46 $\pm$ 0,07	4,03 $\pm$ 1,20	1,42 $\pm$ 0,42
SKBR3	Wzbogacony o HER2	5,77 $\pm$ 0,51	3,59 $\pm$ 0,24	1,26 $\pm$ 0,09
<b>Myszowaty</b>				
NIH/3T3	Normalna	11,7 $\pm$ 0,81	4,51 $\pm$ 0,18	1,58 $\pm$ 0,06
BRCA B.15	Podstawowy	6,42 $\pm$ 0,44	2,36 $\pm$ 0,19	0,83 $\pm$ 0,06
p53 T11	Claudin-niski	6,24 $\pm$ 0,49	2,08 $\pm$ 0,08	0,73 $\pm$ 0,03

Dane przedstawiono jako średnią  $\pm$  SEM w ng/ $\mu$ L lub  $\mu$ M (do dwóch miejsc po przecinku). Eksperymenty przeprowadzono w biologicznych potrójnych powtórzeniach. TNBC potrójnie ujemny rak piersi nowotwór, HER2 receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2.

Wartość IC50 RGD1-melittyny nie różniła się istotnie w porównaniu do macierzystej melittyny w komórkach T11, co wskazuje, że jej potencjał był nie jest dotknięty motywem RGD (ryc. 3b, test t,  $p = 0,652$ ). stosunek IC50 HDFa/SUMA159 dla RGD1-melittyny (2,73  $\pm$  0,14) w porównaniu do melittyny (1,76  $\pm$  0,04), motyw RGD znacząco wydłużył okno terapeutyczne pomiędzy normą a Linie komórek TNBC potwierdzają zwiąkszoną selektywność komórek nowotworowych przekazany przez RGD (ryc. 3c, test t,  $p < 0,01$ , średnia  $\pm$  SEM). Indukcja apoptozy w komórkach SUM159 TNBC poddanych działaniu melittyny, Badania DEDE-melittyny i RGD1-melittyny przez 24 godziny potwierdziły działanie przeciwnowotworowe zarówno melittyny, jak i RGD1-melittyny, ale nie DEDE-melittyny (ryc. 3d).

Zgodnie z działaniem przeciwnowotworowym melittyny i RGD1-melittin, odkryliśmy, że interakcja między anty-melittiną przeciwciała i melittyna nie różniły się znacząco od z RGD1-melittinem (ryc. 3e, dwukierunkowa analiza wariancji,  $p > 0,999$ ), ale istotnie różni się od DEDE-melittyny i SV40-melittyny (dwuczynnikowa analiza wariancji,  $p < 0,05$ ), przy czym absorbancja SV40-melittyny nie istotnie różni się od kontroli IgG (dwuczynnikowa analiza wariancji,  $p > 0,1$ ). Dane te sugerują, że nasze monoklonalne przeciwciała przeciwko melittynie rozpoznaje epitop konformacyjny, który nie jest zakłócany przez inżynierię peptydu kierującego do N-końca.

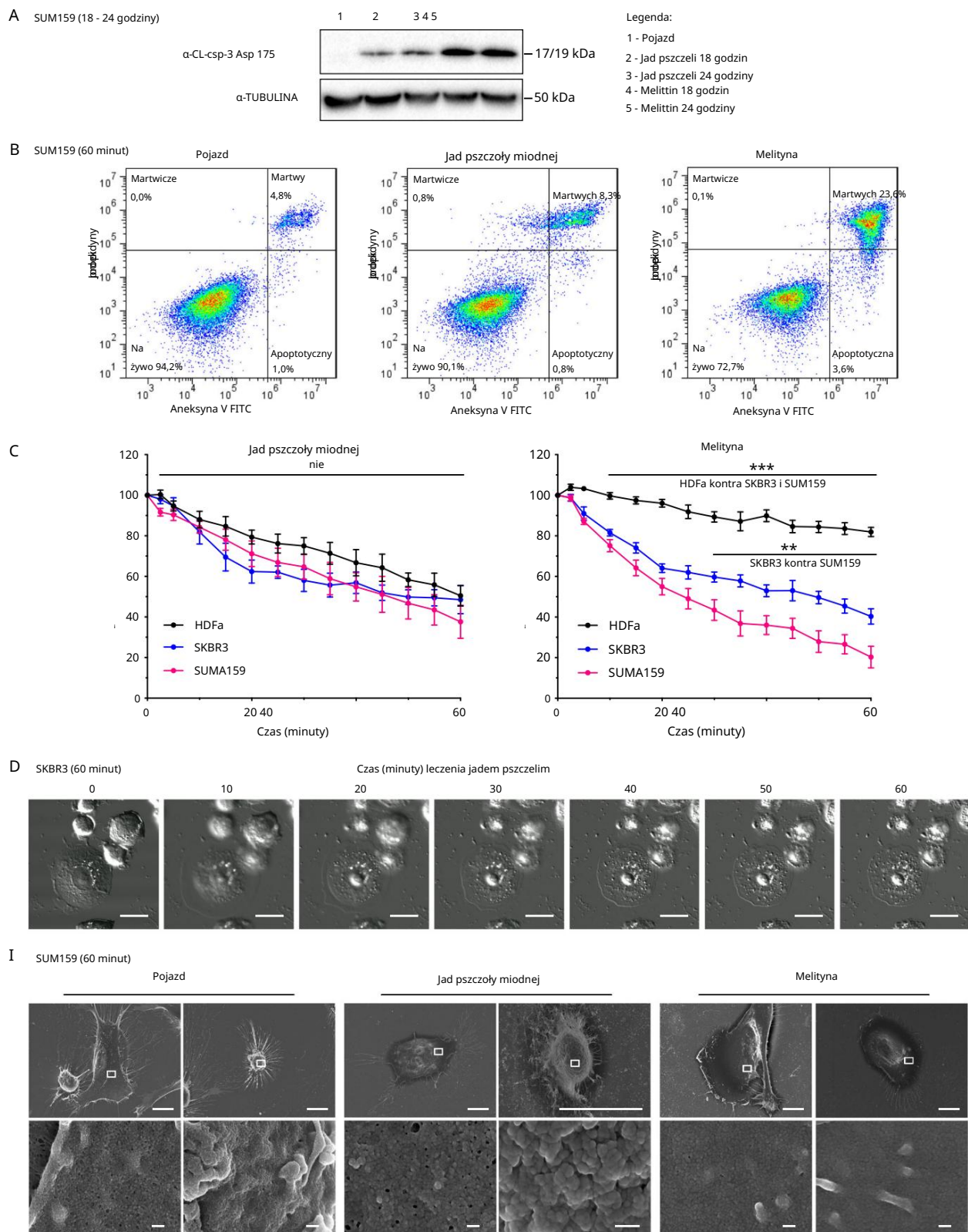
Badania modelowania wykazały, że konformacja część melittyny w modyfikowanych peptydach nie została zaburzona albo przez mutacje C-końcowe, albo przez dodanie N-końca motywu RGD (rys. 3f). Każdy peptyd zachował charakterystyczny wygięty struktura alfa-helisy potencjalnie ułatwiająca tworzenie pory4, co sugeruje, że różnice w aktywności przeciwnowotworowej pomiędzy

mutanty powstają w wyniku oddziaływań elektrostatycznych z błony, a nie ogólne zmiany w strukturze peptydu.

Następnie wykorzystaliśmy przeciwciała przeciwko melittynie do wykrycia subkomórkowa lokalizacja aktywnych peptydów metodą immunofluorescencji w komórkach TNBC SUM159 poddanych działaniu nośnika przez 30 min, jad pszczele, melittyna, RGD1-melittyna lub DEDE-melittyna przy IC50 stężenia (ryc. 3g). Niezależnie od tego, czy komórki były narażony na jad pszczele, melittynę lub RGD1-melittynę, melittynę zlokalizowane głównie w błonie komórkowej komórek nadmierna ekspresja EGFR, z pewnym stopniem barwienia wewnątrzkomórkowego jadu pszczelego i komórek poddanych działaniu melittyny, potencjalnie ze względu na rozerwanie błony komórkowej i tworzenie endosomu jako zgłoszono gdzie indziej<sup>25,48</sup>. Ponadto wzór barwienia RGD1-melittyna wydawała się wyraźnie ukierunkowana na osocze sama membrana, co byłoby zgodne z ulepszoną selektywność docelowego peptydu w stosunku do cząstek znajdujących się na powierzchni komórek nowotworowych. Zaobserwowaliśmy brak reaktywności przeciwciała melittin w komórkach leczonych DEDE-melittiną. Podsumowując, wyniki te ujawniają, że podczas gdy motyw RGD wzmacnia kierowanie melittyny do raka piersi błon komórkowych, pozytywny motyw C-końcowy wydaje się niezbyt dny do aktywności przeciwnowotworowa.

Jad pszczele i melittyna hamują fosforylację RTK

Następnie zbadaliśmy, czy zarówno jad pszczele, jak i melittyna zakłócić szlaki sygnałowe związane z RTK poprzez blokowanie zależnej od ligandu aktywacji EGFR i HER2 w komórkach raka piersi. Aby to ocenić, przeprowadziliśmy analizę immunoblottingową na SKBR3 (HER2+) i EGFR+) i SUM159 (EGFR+) ekstrakty komórek wystawionych na działanie EGF i leczonych IC50 jadu pszczelego lub melittyny od 2,5 do



20 min (Ryc. 4a). Zarówno jad pszczeleli, jak i melittyna obniżyły fosforylację RTK i modulowały powiązane szlaki sygnałowe PI3K-/Akt i MAPK w sposób zależny od czasu.

Leczenie jadem pszczeleli i melittyną komórek SKBR3 spowodowało znaczne zmniejszenie ekspresji p-HER2 (Tyr1248), p-EGFR (Tyr1068), p-p44/42

MAPK (Thr202/Tyr204), p-Akt (Ser473 i Thr308), p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) i p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) od 5. minuty (ryc. 4a, z lewej; ryc. uzupełniająca 4), przy niewielkim zmniejszeniu całkowitego poziomu białka HER2, EGFR i Akt dopiero po 10 minutach leczenia jadem pszczeleli, co może mieć związek z endosomalnymi

Rys. 2 Jad pszczeli i melityna indukują apoptozę i rozerwanie błony komórkowej. Western blot w celu wykrycia rozszczepionej kaspazy-3 (CL-csp-3) w komórkach SUM159 traktowanych nośnikiem (1), jadem pszczelim (2–3) i melityną (4–5) przez 18 i 24 godz. b Analiza cytometrii przepływową komórek SUM159 traktowanych IC50 jadu pszczelego (5,58 ng/μl) i IC50 melityny (4,24 ng/μl) przez 1 godz. c Badania odpowiedzi czasowej na żywotność komórek normalnych ludzkich fibroblastów skórnych (HDFa) i komórek raka piersi (SUM159 i SKBR3) traktowanych jadem pszczelim (po lewej) lub melityną (po prawej) przez 1 godzinę (dwuczynnikowa analiza wariancji). d Mikroskopia konfokalna żywych komórek SKBR3 poddanych działaniu IC50 jadu pszczeli (5,58 ng/μl) przez 1 godzinę, z dwoma reprezentatywnymi obrazami pokazanymi dla każdej grupy leczonej. Białe kontury na górnych obrazach wskazuje odpowiednie obszary każdej komórki na dolnych obrazach. Skale oznaczają 10 μm (górny rząd) i 200 nm (dolny rząd). Dane przedstawiono jako średnia ± SEM (n = 3). Różnice uznano za istotne przy p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*). Zobacz także rysunki uzupełniające 2, 10 i 16.

degradacja receptora25. W SUM159, p-EGFR (Tyr1068) był silnie regulowany w dół przez jad pszczoły miodnej i melitynę od 10 do 20 min. Leczenie SUM159 melityną spowodowało również zahamowanie p-Akt (Ser473 i Thr308) we wszystkich punktach czasowych, ale zwiększyło ekspresję p-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204), p-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) i p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) od 10 do 20 minut, podczas gdy jad pszczoły miodnej zwiększył ekspresję p-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204) i p-Akt (Ser473 i Thr308) od 10 do 20 minut (ryc. 4a, po prawej; ryc. uzupełniająca 4). Szlaki MAPK i Akt mogły być nadregulowane w komórkach SUM159 z powodu uwolnienia ujemnej pętli sprzężenia zwrotnego, która uruchamia sygnalizację ERK w celu ochrony komórek przed apoptotyczną śmiercią komórkową8,49. Przeciwnie antymelityna wskazywała na wzrastającą ilość melityny obecnej w liszaczach obu linii komórkowych w miarę upływu czasu, przy czym silniejszy sygnał dla leczenia melityną w porównaniu z jadem pszczoły miodnej w obu liniach komórkowych.

Aby scharakteryzować wpływ na szlaki sygnałowe w innym modelu TNBC, przeprowadziliśmy immunoblotting na komórkach MDA-MB-231, w których leczenie EGF fosforylowało EGFR i indukowało ekspresję EGFR (rys. uzupełniający 4). Melityna zmniejszyła fosforylację EGFR i MAPK, zmniejszając ekspresję głównych szlaków proliferacji onkogennej. W przeciwieństwie do komórek SUM159, stymulacja EGFR przez EGF nie korelowała ze wzrostem fosforylacji w p-Akt, potencjalnie z powodu odłączenia się szlaków sygnałowych EGFR i Akt. Inne receptory czynników wzrostu, takie jak VEGFR1, mogą pośredniczyć w aktywacji tych szlaków50,51. Chociaż melityna wcześniej hamowała sygnalizację JAK2/STAT3 w raku jajnika12, nie zaobserwowano żadnych efektów modulacyjnych na inhibitory szlaku JAK/STAT w komórkach SUM159 po 60-minutowym leczeniu jadem pszczelim lub melityną (Rys. uzupełniająca 5).

Biorąc pod uwagę, że komórki raka piersi wzbogacone w TNBC i HER2 są w dużym stopniu zależne od aktywacji EGFR i HER2, przeprowadziliśmy eksperymenty z transferem energii rezonansu bioluminescencji (BRET), aby określić, czy melityna zakłóca wiązanie EGF do EGFR, co prowadzi do zaobserwowanej stymulacji fosforylacji receptora czynnika wzrostu. Reporter NanoLuc został użyty jako bioluminescencyjna cząsteczka donorowa i genetycznie połączony z EGFR52,53. Eksperymenty kinetyczne i nasycenia BRET zostały użyte do monitorowania bliskości NanoLuc-EGFR z fluorescencyjnie znakowanymi cząsteczkami akceptorowymi TAMRA-EGF (kontrola pozytywna), FITC-melityna i FITC-DEDE-melityna (kontrola negatywna) w komórkach HEK293FT transfekowanych NanoLuc-EGFR. Przeniesienie energii z bioluminescencyjnego donora do fluorescencyjnego akceptora następuje na odległościach mniejszych niż 10 nm i wskazuje na interakcje między oznaczonymi cząsteczkami będącymi przedmiotem zainteresowania54. Sygnał BRET jest określany poprzez monitorowanie stosunku emisji światła z akceptora do emisji z donora.

Wybrano zakres stężeń każdego peptydu, w tym IC50 FITC-melityny, z odpowiadającymi im stężeniami molowymi FITC-DEDE-melityny. Stwierdziliśmy, że sygnał BRET wzrastał w sposób zależny od dawki dla TAMRA-EGF i FITC-DEDE-melityny, a w mniejszym stopniu dla FITC-melityny (ryc. 4b). FITC-DEDE-melityna wykazywała znacznie wyższe wskaźniki BRET niż FITC-melityna przy tych samych stężeniach, a także bardzo szybko osiągała maksymalne wskaźniki BRET przy każdej dawce. Niespecyficzny peptyd zaprojektowany przeciwko transkrypcji Engrailed 1 (EN1)

W przypadku czynnika 55 (mutant FITC-EN1) wykazano podobne wskaźniki BRET i kinetykę jak w przypadku FITC-DEDE-melityny (rys. uzupełniająca 6), co wskazuje, że konieczne są dalsze eksperymenty w celu ustalenia specyficzności oddziaływań wiążących z EGFR.

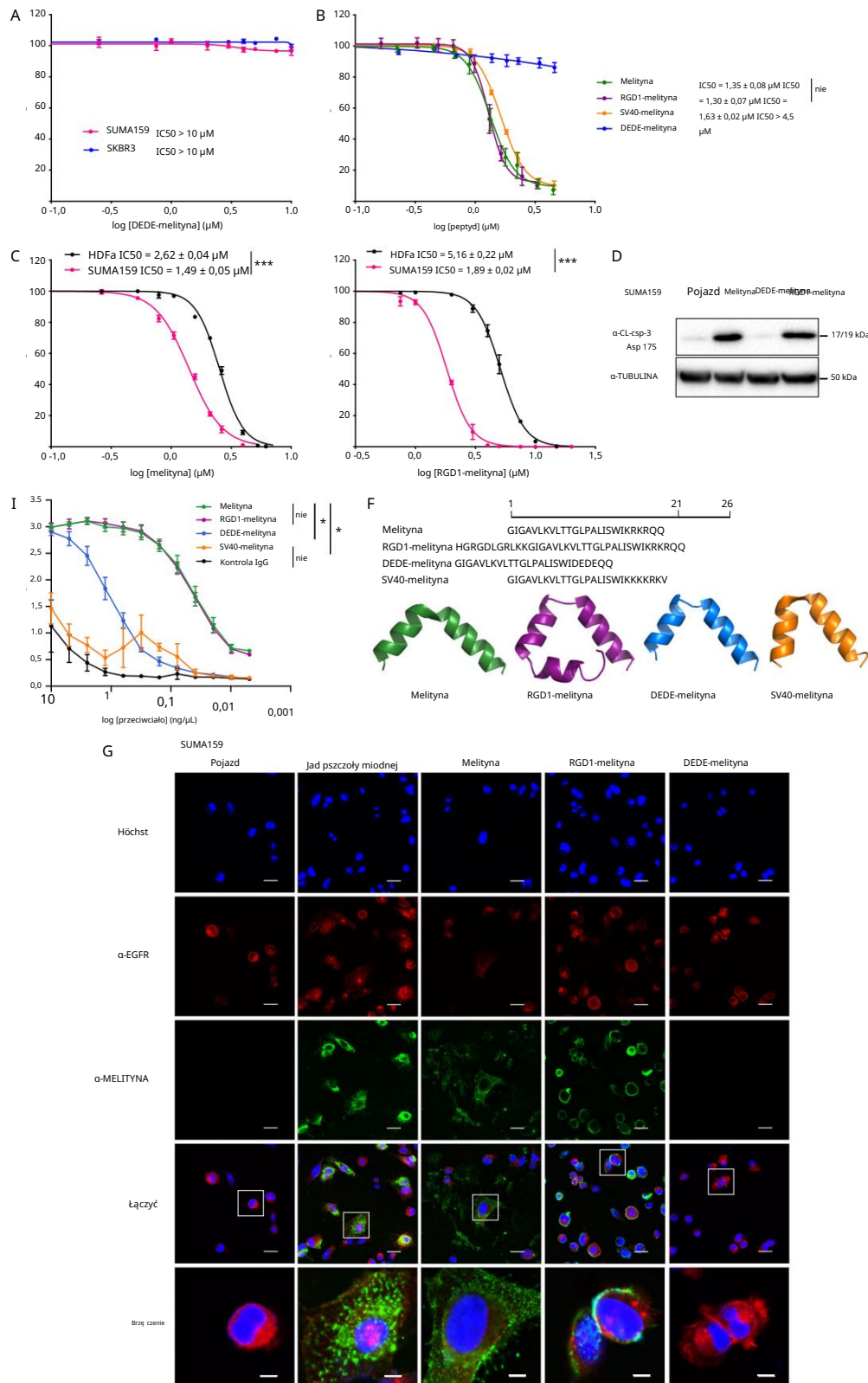
Aby określić specyficzność wiązania melityny z EGFR w miejscu wiązania EGF, przeprowadziliśmy testy BRET nasycenia, aby ocenić konkurencję EGF z każdym z peptydów wiążących się z NanoLuc-EGFR (ryc. 4c). Podczas gdy wiązanie TAMRA-EGF z NanoLuc-EGFR było nasycalne i istotnie zmniejszone w obecności 1 μM EGF (dwukierunkowa analiza wariancji, p < 0,0001), sygnały BRET melityny FITC i FITC-DEDE-melityny nie były nasycalne i nie różniły się istotnie z lub bez 1 μM EGF (dwukierunkowa analiza wariancji, p > 0,999), co sugeruje, że ani melityna, ani DEDE-melityna nie wiązały się w miejscu wiązania EGF.

Nasze dane potwierdzają pogląd, że melityna zostaje włączona do błony plazmatycznej komórek nowotworowych poprzez naładowaną sekwencję obecną w C-końcu, indukując przebudowę i rozerwanie błony plazmatycznej. Dane BRET wskazują, że melityna może być umieszczona w odległości 10 nm od RTK bez zakłócania endogennego miejsca wiązania czynnika wzrostu (ryc. 4d).

Melittin uwrażliwia TNBC na leczenie docetaksemem in vivo

Następnie przeprowadziliśmy testy potencjalnych synergii między melityną i środkami chemioterapeutycznymi w celu zwiększenia śmiertelności komórek raka piersi. Linia komórkowa myszy p53 TNBC T11 była leczona docetaksemem w połączeniu z jadem pszczoły miodnej lub melityną, a testy żywotności komórek przeprowadzono w celu określenia wskaźnika kombinacji (CI) między metodami leczenia56 (ryc. 5a). Zaobserwowaliśmy CI < 1 dla wszystkich testowanych stężeń, co wskazuje na silne interakcje synergistyczne (ryc. 5b). Synergizmy obserwowano również w przypadku cisplatin, środka stosowanego w leczeniu TNBC w klinice (ryc. uzupełniająca 7). Model ksenograftu T11 został użyty w eksperymentach in vivo, ponieważ wykazał najkorzystniejszą interakcję. Lek in vitro między melityną i docetaksemem w wielu testowanych liniach komórkowych (ryc. uzupełniająca 8) i ma nienaruszony układ odpornościowy, co umożliwiło ocenę odpowiedzi immunologicznej na melitynę.

Aby zbadać skuteczność połączenia melityny i docetakselu w zmniejszaniu wzrostu TNBC, przeprowadziliśmy eksperymenty in vivo, przeszczepiając komórki T11 myszom BALB/c. Ten model alloprzeszczepu odtwarza wysoce agresywną chorobę TNBC z niskim poziomem klauzyny u myszy z nienaruszonym układem odpornościowym38,57,58. Trzy dni po wytworzeniu guzów T11 (~50 mm<sup>3</sup>), myszy przydzielono losowo do czterech grup (n = 12 myszy/grupa) i leczono śródguzowo nośnikiem, melityną (5 mg/kg), docetaksemem (7 mg/kg) lub kombinacją melityny (5 mg/kg) i docetakselu (7 mg/kg). Myszy leczono co 2 dni od dnia 3, łącznie 7 razy. Stwierdziliśmy, że w przypadku leczenia skojarzonego kontrola guza była lepsza w porównaniu z leczeniem samym lub z nośnikiem, szczególnie w 7. i 9. dniu po zaszczepieniu komórek T11, przy czym połączenie osiągnęło znaczącą redukcję objętości guza (ryc. 5c, jednokierunkowa analiza wariancji, p < 0,001). Sugeruje to, że guzy odporne na docetaksel można uczynić wrażliwymi poprzez dodanie melityny. Potwierdziliśmy te badania za pomocą obrazowania bioluminescencyjnego (BLI) w celu nieinwazyjnego



Śledzenie zmian w rozwoju guza *in vivo* w komórkach T11 oznaczonych konstruktem zawierającym lucyferazę (ryc. 5d). Tutaj również stwierdziliśmy lepszą kontrolę guza w przypadku leczenia skojarzonego docetaksem i melittyną w dniach 10, 12 i 14 w porównaniu ze wszystkimi innymi grupami.

Terapeutyczne działanie melittyny i docetakselu zostało potwierdzone w tkankach guza 14. dnia po zaszczepieniu komórek T11 za pomocą immunohistochemii i immunofluorescencji (ryc. 5e). Przeciwciało przeciwko melittynie potwierdziło wewnątrzguzową lokalizację komórek pozytywnych pod względem melittyny zarówno w melittynie ( $61,9 \pm 0,7\%$ ), jak i w

Ryc. 3 Inżynieria melittyny z motywem RGD zwiększa selektywność w przypadku raka piersi. a Badania żywotności komórek TNBC (SUM159) i komórek raka piersi wzbogaconych w HER2 (SKBR3) leczonych przez 24 godziny DEDE-melittyną. b Badania żywotności komórek T11 leczonych przez 24 godziny melittyną, RGD1-melittyną, SV40-melittyną i DEDE-melittyną (test t). c Badania żywotności komórek normalnych ludzkich fibroblastów skórnych (HDFa) i SUM159 leczonych przez 24 godziny melittyną (po lewej) i RGD1-melittyną (po prawej) (test t). d Western blot do wykrywania rozszczepionej kaspazy-3 (CL-csp-3) w lisatach z komórek SUM159 traktowanych nośnikiem, melittyną, DEDE-melittyną lub RGD1-melittyną przez 24 godziny. e Absorbancja (405 nm) wodnych roztworów melittyny, RGD1-melittyny, DEDE-melittyny i SV40-melittyny poddanych testowi ELISA z przeciwciałem anti-melittynowym (dwuczynnikowa analiza wariancji). f Sekwencja aminokwasów i górny przewidywany model 3D melittyny (zielony), RGD1-melittyny (fioletowy), DEDE-melittyny (niebieski) i SV40-melittyny (pomarańczowy). g Obrazy immunofluorescencyjne SUM159 traktowanego nośnikiem, jadem pszczelim, melittyną, RGD1-melittyną lub DEDE-melittyną przez 30 minut. Na niebiesko: jądra komórkowe, na czerwono: anty-EGFR, a na zielono: anty-melittyna. Białe kontury na połączonych obrazach wskazują odpowiednie regiony na powiększonych obrazach. Skale oznaczają 25  $\mu\text{m}$ , a 6,25  $\mu\text{m}$  dla powiększonych obrazów. Dane przedstawiono jako średnią  $\pm$  SEM (n = 3). Różnice uznano za istotne przy p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*) . Zobacz także dodatkowe rysunki 3 i 10.

grupy leczenia skojarzonego (55,8  $\pm$  1,3%), ale nie w grupie kontrolnej z nośnikiem (jednokierunkowa analiza wariancji, p < 0,01, średnia  $\pm$  SEM). Istotne zmniejszenie proliferacji komórek nowotworowych (oceniane na podstawie ekspresji Ki-67) stwierdzono w guzach leczonych połączeniem melittyny i docetakselu (5,7  $\pm$  0,8%) w porównaniu z nośnikiem (59,8  $\pm$  1,7%), w porównaniu z melittyną (31,7  $\pm$  1,3%) lub docetaksem w monoterapii (21,0  $\pm$  1,3%, jednokierunkowa analiza wariancji, p < 0,01, średnia  $\pm$  SEM). Barwienie TUNEL potwierdziło istotnie wyższą fragmentację DNA i indukcję apoptozy w grupie skojarzonej (81,0  $\pm$  3,1%) w porównaniu z grupą otrzymującą nośnik (1,0  $\pm$  0,4%, jednokierunkowa analiza wariancji, p < 0,01, średnia  $\pm$  SEM).

Ligand programowanej śmierci 1 (PD-L1) białka punktu kontrolnego układu odpornościowego zmniejsza funkcjonalność aktywowanych komórek T. W konsekwencji blokady punktów kontrolnych układu odpornościowego w połączeniu z chemioterapią zapobiegając rozpoznaniu PD-L1 przez komórki T, zapobiegając tej adaptacyjnej oporności immunologicznej w TNBC i tym samym zwiększając skuteczność terapeutyczną w porównaniu z samą chemioterapią<sup>59</sup>. W przeciwieństwie do samego docetakselu (84,3  $\pm$  0,6%), który nie wpływał na poziom PD-L1 w guzach, odkryliśmy, że melittyna znacząco zmniejszała ekspresję PD-L1 w guzach, gdy była stosowana samodzielnie (52,9  $\pm$  2,4%) lub w połączeniu z leczeniem skojarzonym (44,3  $\pm$  4,2%) w porównaniu z nośnikiem (84,9  $\pm$  1,6%, jednokierunkowa ANOVA, p < 0,01, średnia  $\pm$  SEM). Podsumowując, badania te potwierdzają tezę, że melittyna uwalnia komórki T11 na leczenie docetaksem i może pomóc w osłabieniu ekspresji białek punktów kontrolnych układu odpornościowego, co w konsekwencji poprawia przeciwnowotworową odpowiedź immunologiczną.

Następnie wykonaliśmy badanie immunohistochemiczne w leczonych guzach T11 w celu wykrycia p-HER2 (Tyr1248) i p-EGFR (Tyr1068) (Rys. uzupełniający 9). Ekspresja EGFR była umiarkowana, ale istotnie zmniejszona przez kombinację melittyny i docetakselu (75,8  $\pm$  6,4%) w porównaniu z nośnikiem (100,0  $\pm$  9,1%, jednokierunkowa analiza wariancji, p < 0,05, średnia  $\pm$  SEM). Ekspresja HER2 nie różniła się istotnie we wszystkich grupach leczonych (jednokierunkowa analiza wariancji, p = 0,1536). W przypadku p-EGFR (Tyr1068) fosforylacja została zmniejszona do istotnie niższego poziomu przez leczenie kombinacją melittyny i docetakselu (9,0  $\pm$  2,4%) w porównaniu z nośnikiem (100,0  $\pm$  8,1%, jednokierunkowa analiza wariancji, p < 0,0001, średnia  $\pm$  SEM).

Poziomy p-HER2 (Tyr1248) zostały również obniżone do istotnie niższego poziomu w leczeniu skojarzonym melittyną i docetaksem (50,3  $\pm$  7,8%) w porównaniu z nośnikiem (100,0  $\pm$  5,6%, jednokierunkowa ANOVA, p < 0,0001, średnia  $\pm$  SEM). Zmniejszenie fosforylacji EGFR i HER2 in vivo po leczeniu melittyną jest zgodne z obserwowanymi efektami melittyny w zmniejszaniu fosforylacji tych RTK w komórkach SKBR3, SUM159 i MDA-MB-231 (ryc. 4a; ryc. uzupełniająca 4).

## DYSKUSJA

Apiterapia to rozwijająca się dziedzina, która ma potencjał, aby wpłynąć na aspekty ekonomiczne badań nad rakiem na całym świecie, szczególnie w społecznościach o ograniczonych zasobach. Do tej pory jednak badania nie zbadaly w pełni mechanizmu molekularnego działania jadu pszczelego i melittyny, a ich optymalne wykorzystanie w onkologii nie zostało jeszcze kompleksowo zbadane, szczególnie w leczeniu raka piersi,

najczęściej występujący rak u kobiet na całym świecie<sup>2</sup> i guzy wzbogacone TNBC HER2 to wysoce agresywne podtypy raka piersi. TNBC wiąże się z najwyższą śmiertelnością i, pomimo częstej ekspresji EGFR, powszechnie wykazuje oporność na terapię anti-EGFR z wysoką zależnością od sygnalizacji PI3K/Akt w zakresie proliferacji, przeżycia i oporności na chemioterapię<sup>34</sup>.

Terapie anti-HER2 znacznie poprawiły długoterminowe przeżycie w przypadku nowotworów HER2-dodatnych we wczesnym stadium, ale więcej kszosć pacjentów w późnym stadium ostatecznie rozwija oporność i umiera na chorobę<sup>33,35,36</sup>. Wykazaliśmy nie tylko selektywność jadu pszczelego i melittyny w stosunku do komórek złośliwych, ale także odkryliśmy wyższą skuteczność w przypadku tych agresywnych typów raka piersi.

W niniejszym badaniu wykazaliśmy, że jad pszczeli i melittyna hamują fosforylację EGFR i HER2 wywołaną przez ligand, dynamicznie modulując dalsze szlaki sygnałowe w komórkach raka piersi. Proponujemy, że melittyna bezpośrednio lub pośrednio hamuje dimeryzację RTK. Melittyna może również przedostać się do komórki, aby bezpośrednio lub pośrednio modulować dalsze szlaki sygnałowe<sup>25,60</sup>. Poprzednie prace wykazały, że melittyna może być ukierunkowana na linie komórkowe z nadmierną ekspresją HER2 przy użyciu immunoliposomów zawierających trastuzumab<sup>61</sup>. Tutaj wykazujemy, że sama melittyna selektywnie ukierunkowuje komórki raka piersi z nadmierną ekspresją HER2 i EGFR.

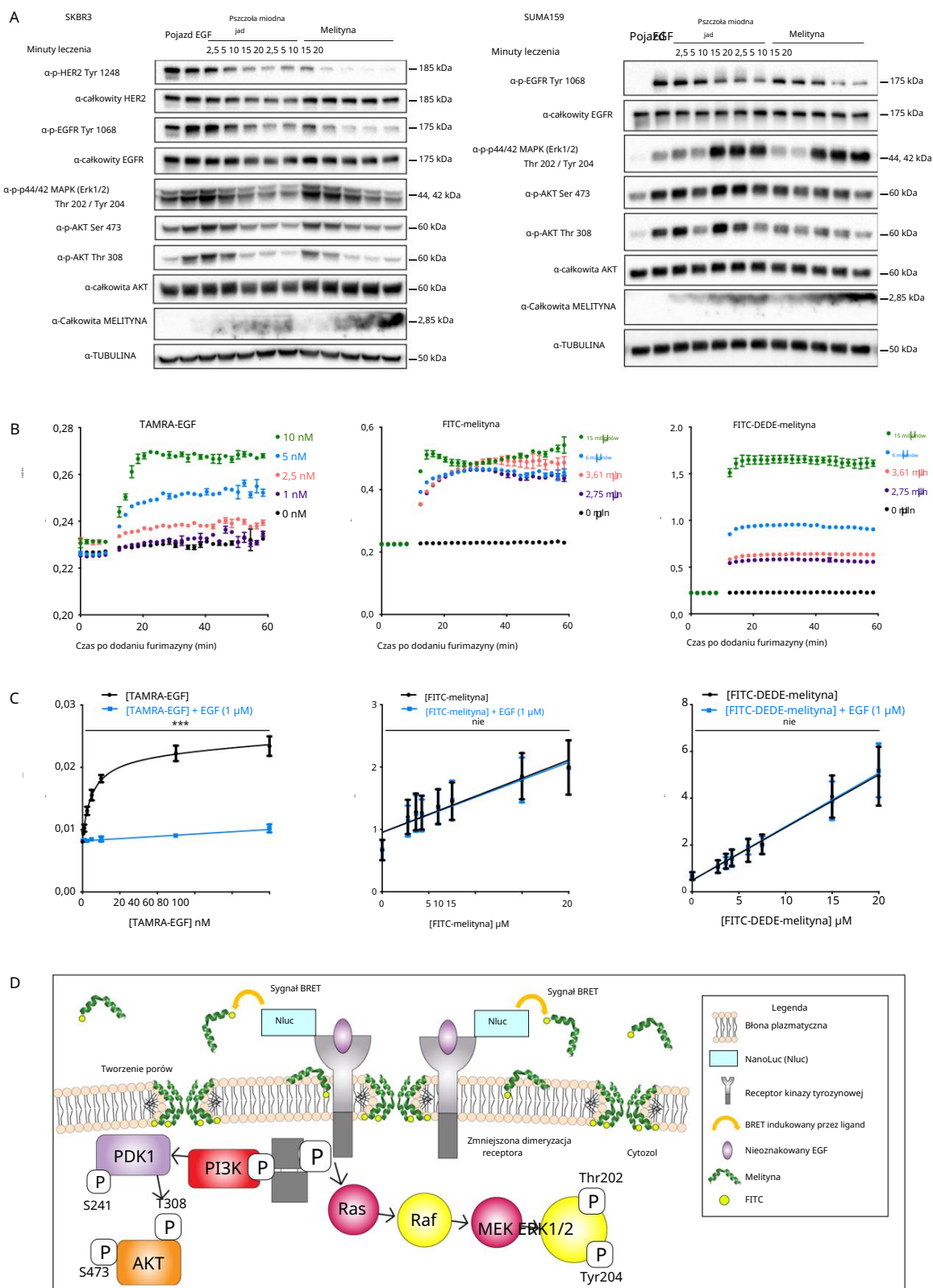
Co ciekawe, melittyna okazała się bardziej toksyczna dla komórek raka piersi w porównaniu do jadu pszczoły miodnej, co uzasadnia dalsze badania.

W naszych badaniach skupiliśmy się na liniach komórkowych SUM159 i SKBR3. SUM159 to linia komórek TNBC, która ekspresuje produkt genu EGFR i zawiera mutację missense w PI3KCA (H1047L) i w HRAS (G12D)<sup>62,63</sup>. Natomiast SUM159 to dziki typ KRAS, NRAS, BRAF, PTEN i MAP2K4 i negatywny dla aktywacji AKT1 oraz amplifikacji AKT2 i AKT363. SKBR3 to wzbogacona w HER2 linia komórek raka piersi, która nadmiernie ekspresuje produkt genu HER264 i jest dzikim typem KRAS, HRAS, NRAS, BRAF, PTEN, PI3KCA i MAP2K463,65,66 i również negatywny dla aktywacji AKT1 oraz amplifikacji AKT2 i AKT363. Biorąc pod uwagę te molekularne cechy, szlaki sygnałowe EGFR nie są konstytutywnie aktywowane w komórkach SUM159, pomimo istniejących mutacji w HRAS i PI3KCA, ponieważ nie są one wystarczające do podstawowej aktywacji tych szlaków<sup>67</sup>.

Opisujemy silną i synergistyczną odpowiedź przeciwnowotworową melittyny i docetakselu w wysoce agresywnym modelu TNBC in vivo. Podkreśla to potencjał melittyny do stosowania w terapiach skojarzonych w celu potencjalnego zwiększenia skuteczności i/lub zmniejszenia dawki środków cytotoksycznych, umożliwiając bardziej opłacalne leczenie z potencjalnie mniejszą liczbą skutków ubocznych. Melittyna zmniejszyła również poziom białka punktu kontrolnego układu odpornościowego PD-L1 zaangażowanego w unikanie odpowiedzi immunologicznej. Melittyna może zatem zmniejszyć immunosupresyjne działanie mikrośrodowiska guza, które jest powszechne w TNBC w obecności chemioterapii.

Stanowi to uzupełnienie danych z poprzednich raportów, które pokazują, że melittyna może również zmniejszyć populację makrofagów związanych z guzem, podobnych do M2, sprzyjających rozwojowi nowotworu w mikrośrodowisku nowotworu w modelu raka płuc<sup>68</sup>. Stawiamy hipotezę, że w naszym modelu in vivo T11,





Sygnalizacja EGFR i HER2 może modulować ekspresję PD-L1 w komórkach nowotworowych. Zgodnie z poprzednimi badaniami immunohistochemicznymi, PD-L1 ma najwyższą ekspresję w guzach TNBC, a następnie w guzach wzbogaconych w HER269-72, a ekspresja PD-L1 wiąże się ze słabym przeżyciem69. W przypadku raka piersi typu basalioidowego

wykazano, że białko ALIX koreluje z aktywacją EGFR, upośledzając biogenezę eksosomów73. PD-L1 jest wydzielane przez eksosomy w sposób zależny od ALIX, tak że upośledzenie eksosomów wiąże się z PD-L1 na błonie komórkowej. Zmniejszenie ekspresji ALIX promuje przeżycie guza poprzez wzmocnienie EGFR

Ryc. 4 Jad pszczeni i melityna hamują fosforylację EGFR i HER2. a Kinetyka fosforylacji HER2, EGFR i dalszych szlaków MAPK i Akt po leczeniu jadem pszczelim i melityną w komórkach raka piersi SKBR3 (po lewej) i SUM159 (po prawej), oceniona metodą immunoblottingu. b Kinetyka przenoszenia energii rezonansu bioluminescencji (BRET) interakcji TAMRA-EGF, FITC-melityny i FITC-DEDE-melityny z NanoLuc-EGFR w komórkach HEK293FT. Peptydy dodano po zrównoważeniu komórek w czytniku z substratem NanoLuc furimazyną przez 5 min. c Analiza wiązania nasycenia wzrastających stężeń TAMRA-EGF, FITC-melityny i FITC-DEDE-melityny w komórkach HEK293FT transfekowanych NanoLuc-EGFR w obecności lub nieobecności nieoznakowanego EGF (1  $\mu$ M). Dane wyrażono jako surowe stosunki BRET i przedstawiono jako średnią  $\pm$  SEM (n = 3, dwukierunkowa ANOVA). d Proponowany model działania melityny zakłócającej dimeryzację i fosforylację RTK w błonie plazmatycznej. Różnice uznano za istotne przy  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) . Zobacz także dodatkowe rysunki 4–6 i 11–15.

aktywację i poprzez akumulację błony PD-L1, co prowadzi do immunosupresji<sup>73</sup>. W raku piersi z wzbogaconym HER2, interakcja między HER2 i PD-L1 jest słabo poznana<sup>74</sup>.

Jednakże w komórkach raka piersi HER2-dodatnich współhodowanych z ludzkimi mononuklearnymi komórkami krwi obwodowej oraz w modelu mysim terapia trastuzumabem przeciwko HER2 spowodowała zwiększenie ekspresji PD-L1<sup>75,76</sup>. Stąd włączenie melityny do trastuzumabu mogło zniwelować tę odpowiedź immunosupresyjną.

Selektywność melityny w przypadku nowotworów HER2 stanowi kolejny argument za połączeniem z czynnikami ukierunkowanymi na HER2, w tym przeciwciałami monoklonalnymi, trastuzumabem-emtanzyną i innymi koniugatami przeciwciał-lek, w których właściwości zakłócające błonę melityny mogłyby zwiększyć kinetykę internalizacji cytotoksycznego ładunku. Nasza praca ujawnia również nowe możliwości modyfikacji określonych obszarów melityny w celu dalszego zwiększenia skuteczności i ukierunkowanej swoistości dla komórek złośliwych. Zaprojektowane peptydy ukierunkowane, takie jak RGD1-melityna, mogłyby być dostarczane dożylnie, aby umożliwić bardziej selektywne namierzenie i wchłanianie przez komórki nowotworowe. Melityna mogłaby być również dostarczana za pomocą ukierunkowanych podejść nanocząsteczkowych, takich jak te wcześniej zgłoszone w przypadku „nanobees”<sup>77,78</sup>. Łączenie melityny z toksynami lub prolekami mogłoby być również wykorzystane, jak zgłoszono w przypadku fuzji melityny rozszczepialnych uPA79. Przed rozpoczęciem badań na ludziach konieczne będą przeprowadzenie dalszych badań mających na celu formalną ocenę toksyczności i maksymalnych tolerowanych dawek tych peptydów.

Jad pszczoł miodnych jest dostępne na całym świecie i oferuje opłacalne i łatwe do dostępną opcję leczenia w odległych lub słabo rozwiniętych regionach. Konieczne będą dalsze badania w celu oceny, czy jad niektórych genotypów pszczoł ma silniejsze lub bardziej specyficzne działanie przeciwnowotworowe, które można by wykorzystywać.

Oprócz raka piersi, guzy nadmiernie ekspresujące EGFR obejmują raka płuc, glejaka wielopostaciowego i raka jelita grubego<sup>80</sup>, a guzy, które mogą nadmiernie ekspresować HER2, obejmują raka żołądka, jajników, endometrium, pęcherza moczowego, płuc, jelita grubego oraz głowy i szyi<sup>81</sup>. Ogólnie rzecz biorąc, nasze wyniki mogą być wykorzystane do pomocy w opracowaniu nowych metod terapeutycznych dla wielu typów nowotworów związanych z częstą lekoopornością i złym rokowaniem.

## METODY

Odczynniki chemiczne i przeciwciała Wszystkie

peptydy zakupiono od China Peptides Corporation, Ltd. Znacznik fluorescencyjnego izotocyanianu fluoresceiny (FITC) sprzężony z N-końcem FITC-melityny, SV40-melityny, TAT-melityny i mutantu EN1.

CellTiter-Glo 2.0 z Luminescent Cell Viability Assay, NanoLuc-EGFR, FuGENE i furimazyna zostały uzyskane z Promega. TAMRA-EGF został uzyskany z Invitrogen (Thermo Fisher Scientific). Docetaksel (nr kat. D-1000) został uzyskany z LC Laboratories. Monoklonalne przeciwciało do  $\alpha$ -tubuliny (1:5000, nr kat. T5168), Hoechst (1:5000, nr kat. 94403) i ludzki EGF (nr kat. E9644) zostały uzyskane z Sigma-Aldrich. Mysi EGF (nr kat. 315-09) został uzyskany z Peprotech. Przeciwciała przeciwko fosfo-HER2 (Tyr1248) (immunoblotting: 1:1000, immunohistochemia: 1:100, nr kat. 2247), fosfo-EGFR (Tyr1068) (immunoblotting: 1:1000, nr kat. 2234; immunohistochemia: 1:350, nr kat. 3777, klon D7A5), fosfo-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (1:2000, nr kat. 4370), fosfo-Akt (Ser473) (1:2000, nr kat. 4060), fosfo-Akt (Thr308)

(1:1000, nr kat. 13038), fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) (1:1000, nr kat. Nr 4668), fosfo-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (1:1000, nr kat. 4511),

Całkowity AKT (1:1000, nr kat. 9272 i 4685), rozszczepiona kaspaza-3 (Asp175) (1:1000, nr kat. 9661), Ki-67 (1:400, nr kat. 9449), zestaw do pobierania próbek przeciwciał inhibitorów ścieżki Jak/Stat (1:1000, nr kat. 8343) oraz wtórne przeciwciało antymyśie IgG, powiązane z HRP (1:10 000, nr kat. 7076) i przeciwciało antykrólicze IgG, powiązane z HRP (1:10 000, nr kat. 7074) zostały wyprodukowane przez Cell Signaling Technology. Przeciwciała monoklonalne przeciwko ErbB2 (immunoblotting: 1:1000, immunohistochemia: 1:100, nr kat. ab8054, klon CB11), EGFR (immunoblotting: 1:5000, immunohistochemia: 1:100, nr kat. ab52894, klon EP38Y) i PD-L1 [PD-L1/2746] (1:100, nr kat. ab238697) zostały wyprodukowane przez Abcam. Przeciwciała wtórne kozie Alexa Fluor 488 antymyśie (1:500, nr kat. A11001) i kozie Alexa Fluor 594 antykrólicze (1:500, nr kat. A11012) zostały uzyskane od Thermo Fisher Scientific. Poliklonalne kozie przeciwciało wtórne przeciwko mysim łańcuchom  $\gamma$  IgG (ELISA: 1:1000, nr kat. AP503P) uzyskano od Millipore. Mysie monoklonalne przeciwciało IgG specyficzne dla ludzkiej IL-12 (28/00 8C1-6) użyte jako przeciwciało kontrolne do eksperymentów ELISA oraz mysie monoklonalne przeciwciało IgG specyficzne dla melityny (ELISA: 1:350, klon 3B9) zostały wytworzone w Monoclonal Antibody Facility w Harry Perkins Institute of Medical Research. Test TUNEL (In Situ Cell Death Detection Kit) uzyskano od Roche.

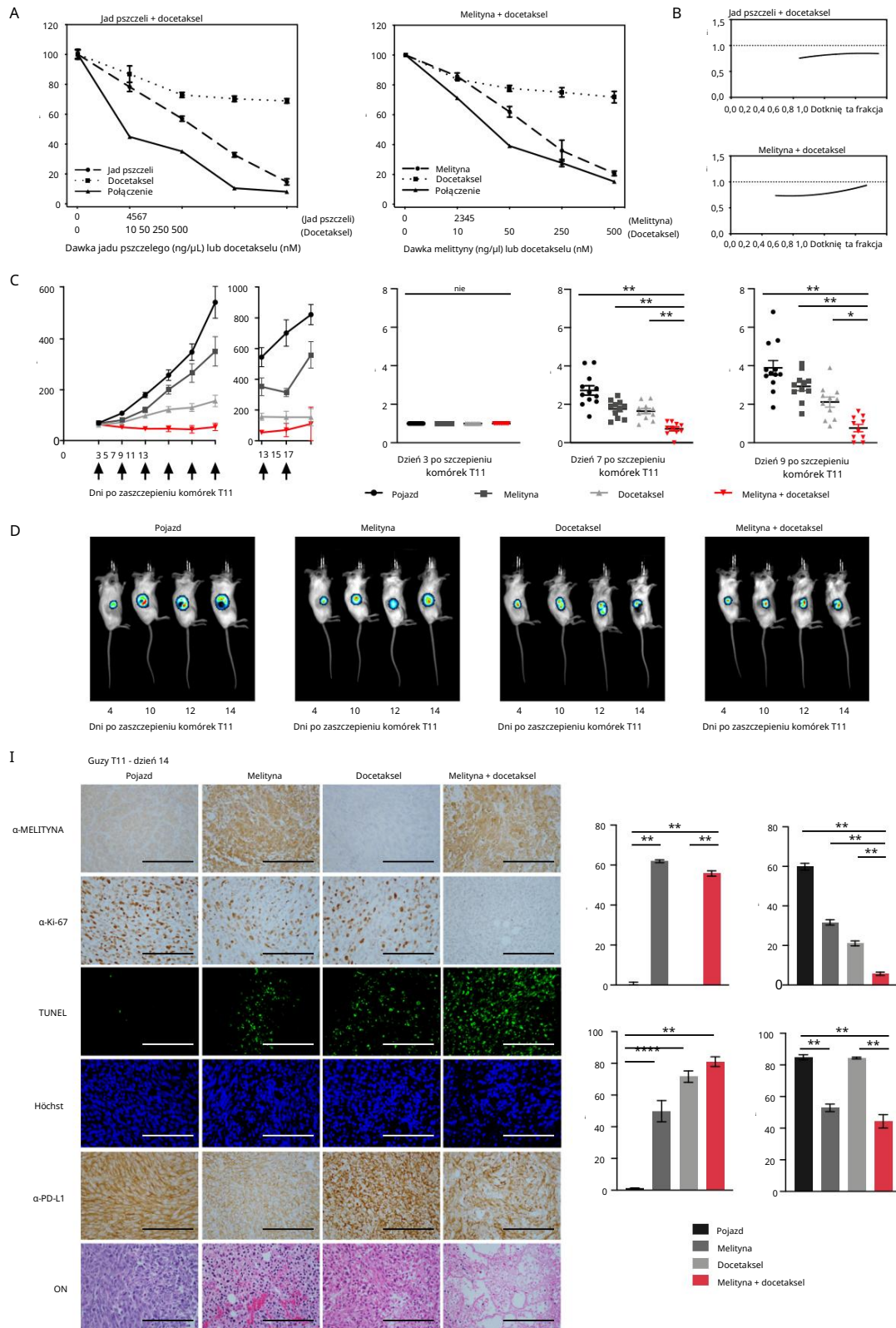
## Kolekcja jadu pszczelego

Jad pobrano od robotnic lub matek z kilku różnych populacji pszczoł Apid. Próbki jadu pobrane od europejskich pszczoł miodnych (*Apis mellifera*) i trzmieli płowooogonowych (*Bombus terrestris audax*) pochodziły z Perth (Australia), Dublina (Irlandia) i Londynu (Anglia). Pszczoła miodna jad zebrano od 30 robotnic z każdej z trzech różnych kolonii w pasieki lub gospodarstwa, jak opisano. Jad pszczoły miodnej z Australii zebrano z pasieki prowadzonej przez Centrum Integryjnych Badań nad Pszczołami (CIBER) znajdujące się na Uniwersytecie Australii Zachodniej (UWA): 31.980151, 115.817919). Jad pszczoły miodnej z Irlandii został zebrany z jednej kolonii w pasieki w Trinity College Dublin (53,343933, 6,254635), a pozostałe dwie kolonie z farm w pobliżu Glasnevin (53,383245, 6,276333) i Blanchardstown (53,384220, 6,375979). Jad pszczoły miodnej i trzmiela z Anglii został zebrany na Royal Holloway University of London (51,425626, 0,562987). Jad trzmiela został zebrany od 20 robotnic z każdej z 2 zakupionych komercyjnie kolonii, przy czym pojedyncze królowe trzmieli z każdej z tych dwóch kolonii zostały wykorzystane do zebrania jadu królowej trzmieli. Przygotowano niezależne biologiczne mieszanki główne, oddzielając jad od różnych kolonii. Łącznie zebrano jad pochodzący od 312 pszczoł.

Jad gruczołowy zebrano przez ręczną sekcję. Pszczoły schwymano w pobliżu wejścia do ula w przypadku pszczoł miodnych lub bezpośrednio z kolonii w przypadku trzmieli, znieczulono dwutlenkiem węgla i schłodzono na lodzie. Aparat żądający wycięto z każdej osoby; następnie usunęto gruczoł jadowy i umieszczono go w buforowanym fosforanem roztworze soli fizjologicznej (PBS). Gruczoły przekłuto igłą Terumo (25 G  $\times$  5/8) i odwirowano (13 000 g, 10 min, 4 °C), a następnie pnie zebrano supernatant zawierający jad w zawieszynie płynnej. Stężenie białka w każdej mieszance głównej określono ilościowo za pomocą Detergent Compatible Protein Assay (Bio-Rad), mierząc absorbancję przy 750 nm za pomocą Millennium Science BioTek PowerWave XS2 (oprogramowanie Gen 5 1.11, wersja 1.11.5). Następnie pnie każdą mieszankę główną podzielono na alikwoty i przechowywano w temperaturze 80 °C.

## Linie komórkowe i warunki hodowli

Wszystkie linie komórkowe zakupiono w American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA), z wyjątkiem komórek HEK293FT zakupionych od Invitrogen (Thermo Fisher Scientific, Victoria, Australia), SUM149 i SUM159 uzyskanych od Asterand Bioscience (Detroit, MI, USA) oraz komórek T11 i B.15 uprzejmie udostępnionych przez Charlesa Perou i Lyubę Varticovski z University of North Carolina w



Chapel Hill i National Institutes of Health, odpowiednio. T11 i B.15

są bardzo dobrze scharakteryzowanymi liniami komórkowymi<sup>37,38</sup>.

Komórki inkubowano w temperaturze 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>, a następnie uzupełniono 1% antybiotyk-środek przeciwgrzybiczy. HDFa (normalny pierwotny dorosły ludzki rak skóry) Komórki fibroblastów hodowano w DMEM z dodatkiem 10% surowicy płodowej bydlęcej

(FBS). MCF 10A i MCF-12A (ludzki nabłonek zimmortalizowany) komórki nieprzekształcone hodowano w DMEM/F-12 z suplementami (5% surowicy płodowej końskiej, 20 ng/ml czynnika wzrostu naskórka, 10 μg/μl insuliny, 100 ng/ml toksyny cholery i 500 ng/ml hydrokortyzonu). NIH/3T3 (mysi Komórki (fibroblasty zarodkowe) hodowano w DMEM z dodatkiem 10% FBS.

Ryc. 5 Melittin uwrażliwia wysoce agresywne guzy TNBC na leczenie docetaksemem in vivo. a Badania żywotności komórek T11 leczonych jadem pszczelim i melittinem w monoterapii i w skojarzeniu z docetaksemem przez 24 godziny. Przedstawiono reprezentatywne wykresy leczenia skojarzonego (n = 3). b Wykresy indeksów skojarzeń uzyskane dla różnych frakcji komórek dotkniętych chorobą w każdej kombinacji, obliczone przy użyciu oprogramowania CompuSyn. c Objętości guzów u myszy leczonych śródguzowo nośnikiem, 5 mg/kg melittinem, 7 mg/kg docetaksemem i 5 mg/kg melittinem + 7 mg/kg docetaksemem. Strzałki wskazują dni leczenia. Wskazano odpowiadające wykresy rozrzutu względną zmiany objętości guzów w dniach 3, 7 i 9 (jednokierunkowa ANOVA, n = 12). d Reprezentatywne obrazowanie bioluminescencji (BLI) guzów T11-lucyferazy u myszy w dniach 4, 10, 12 i 14 po zaszczepieniu komórek. e Reprezentatywne obrazy immunohistochemii i immunofluorescencji w biopsjach guzów od myszy pobranych w dniu 14 po zaszczepieniu T11, barwionych przeciwciałami przeciwko melittynie, przeciwciałami przeciwko Ki-67, testem TUNEL, Hoechst, przeciwciałami przeciwko PD-L1 i H&E (jednokierunkowa analiza wariancji, n = 8). Skale oznaczają 100 µm. Dane przedstawiono jako średnia ± SEM. Różnice uznano za istotne przy p < 0,05 (\*), p < 0,01 (\*\*), p < 0,001 (\*\*\*). Zobacz także dodatkowe rysunki 7–9.

HEK293FT (ludzkie komórki embrionalne nerki 293 stabilnie ekspresujące duży antygen T SV40) hodowano w DMEM z 10% FBS i suplementami (1% glutaminy i 0,4 mg/ml G418 Geneticin, Gibco). MCF7 (ludzki rak piersi luminalny A) hodowano w MEM α z 10% FBS i suplementami (po 1% pirogronianu sodu, wodorowę glanu sodu i nieistotnych aminokwasów). T-47D i ZR-75-1 (oba ludzki rak piersi luminalny A) hodowano w RPMI z 10% FBS. MDA-MB-231 (ludzki rak piersi z niską kładyną) hodowano w DMEM z 10% FBS. SUM149 (ludzki rak piersi typu basal-like) hodowano w F-12 z 10% FBS. SUM159 (ludzki rak piersi z niską kładyną) hodowano w F-12 z 5% FBS i suplementami (5 µg/ml insuliny i 1 µg/ml hydrokortyzonu). MDA-MB-453 (ludzki rak piersi z wzbogaconym HER2) hodowano w DMEM z 10% FBS. SKBR3 (ludzki rak piersi z wzbogaconym HER2) hodowano w RPMI z 10% FBS i 1% pirogronianu sodu. p53 T11 (mysi rak piersi z niską kładyną) hodowano w podłożu RPMI 1640 z 10% FBS. BRCA B.15 (mysi rak piersi typu basal-like) hodowano w podłożu RPMI 1640 z 10% FBS.

#### Badania żywotności

Żywotność komórek określono za pomocą Luminescent Cell Viability Assay zgodnie z protokołem dostawcy. Komórki umieszczono na 96-dółkowych płytkach hodowlanych i inkubowano w temperaturze 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> przez 24 godziny. W przypadku badań dawka-odpowiedź podłoże wyrzucono i zastąpiono podłożem zawierającym wskazane stężenie jadu pszczelego lub peptydu i hodowano przez 24 godziny. W przypadku żywotności komórek przez 60 minut komórki traktowano IC50 jadu pszczelego lub melittyny dla każdej linii komórkowej przez krótkie odstępy czasu przez 1 godzinę, a żywotność określano bezpośrednio po leczeniu. Aby określić żywotność, komórki inkubowano z odczynnikiem CellTiter-Glo (CTG) 2.0 przez 10 minut. Żywotność komórek określono ilościowo, mierząc luminescencję za pomocą czytnika EnVision 2102 Multilabel Reader (PerkinElmer). Eksperymenty przeprowadzono w powtórzeniach biologicznych (n = 3).

Produkcja podstawowego przeciwciała monoklonalnego przeciwko melittynie Produkcja przeciwciała została przeprowadzona zgodnie z protokołami zatwierdzonymi przez Animal Ethics Committee of the Harry Perkins Institute of Medical Research. Samice myszy *A/J* zostały uodpornione jadem pszczół miodnych zebranych w Australii. Myszy otrzymały dootrzewnowe zastrzyki 12 µg jadu w Complete Freund's Adjuvant (Difco), a następnie dawkę przypominającą Incomplete Freund's Adjuvant w 29. dniu i dawkę przypominającą wodną w PBS w stężeniu 7 µg/mysz w 49. dniu. Myszom pobrano krew w 60. dniu, a surowice zbadano metodą ELISA. Najlepiej reagujące myszy otrzymały dawkę przypominającą 7 µg jadu pszczół miodnych w PBS 4 dni przed fuzją. Komórki śledziony połączono z komórkami szpiczaka Sp2/O zgodnie ze standardowymi procedurami<sup>82</sup>.

Supernatanty zawierające przeciwciała przebadano metodą ELISA. Do dalszych badań wybrano klon hybridoma 3B9. Przeciwciała wytworzono poprzez hodowlę komórek hybridoma w bioreaktorach w medium Hybridoma Serum Free Medium (Gibco). Przeciwciała oczyszczono metodą chromatografii białkowej G-Sepharose. Oczyszczone przeciwciała dializowano w PBS (pH 7,3). Przeciwciała odtąd nazywano przeciwciałem anty-melittyny (3B9).

#### Test immunoenzymatyczny (ELISA)

Jady i peptydy umieszczono na przejrzystych 96-dółkowych płytkach o krzywej wzrostu w stężeniu 5 µg/ml w buforze węglanowym i inkubowano w temperaturze 4 °C przez 24 godziny. Płyn usunął to, a płytki przemyto trzy razy roztworem 0,05% TWEEN-20 („Tween-20”, Sigma-Aldrich) w PBS. Pierwotne przeciwciała dodano do studzienek w rozcieńczeniach 1:2, zaczynając od 10 µg/ml w rozcieńczalniku (0,1% albuminy surowicy bydłej (BSA) w PBS) i inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej. Pierwotne przeciwciała

usunął to, a płytki przemyto trzy razy w 0,05% Tween-20 w PBS. Do studzienek dodano poliklonalne kozie przeciwciała wtórne przeciwko specyficznemu dla łańcucha γ mysiej IgG (1:1000 w rozcieńczalniku) i inkubowano przez 1 h w temperaturze pokojowej. Pierwotne przeciwciała usunął to, a płytki przemyto trzy razy w 0,05% Tween-20 w PBS. Do studzienek dodano bufor do wywoływania testu ELISA, roztwór oczyszczonej wody zawierający 10% kwasu cytrynowego (pH 4,2), 2% ABTS i 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a płytki inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 15 min. Absorbancję rejestrowano przy 405 nm za pomocą czytnika płytek VICTOR Light z oprogramowaniem Wallac 1420 Manager Software (PerkinElmer). Kontrolą było mysie monoklonalne przeciwciała IgG (28/00 8C1-6), które reaguje z ludzkim IL-12, nałożone na peptyd melittyny na płytce ELISA. Eksperymenty przeprowadzono w powtórzeniach biologicznych (n = 3).

#### Eksperymenty z konkurencją przeciwciał przeciwko melittynie

Komórki HDFa i SUM159 umieszczono na 96-dółkowych płytkach hodowlanych i inkubowano w temperaturze 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> przez 24 godziny. Rosnące stężenia przeciwciała przeciwko melittynie inkubowano z stężeniami IC50 jadu pszczelego lub melittyny dla każdej linii komórkowej przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej, a następnie dodawano do komórek na 24 godziny. Żywotność komórek określono zgodnie z opisem w „Testy żywotności komórek”. Eksperymenty przeprowadzono w powtórzeniach biologicznych (n = 3).

#### Western blot

Komórki umieszczono na płytkach 6-dółkowych w gęstości 300 000 komórek/dółek i inkubowano w temperaturze 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> przez 24 godziny. Eksperymenty z hodowlą komórek przeprowadzono zgodnie z opisem, a następnie zastosowano standardowy protokół Western blot zgodnie z opisem w niniejszym dokumencie. Komórki przemyto zimnym PBS i lizowano zimnym buforem do lizy białek (2% dodecylsulfian sodu (SDS), 125 mmol/l Tris-HCl, pH 6,8). Próbkę poddano działaniu ultradźwięków przez 10 s przy natężeniu 10 mA, a stężenia białek oznaczono ilościowo za pomocą testu Detergent Compatible Protein Assay (Bio-Rad). Równe ilości białek zmieszano z buforem ładującym (Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad) uzupełnionym o środek redukujący ditiotreitól (DTT). Próbkę białka zdenaturowano przez gotowanie w temperaturze 95 °C przez 5 min, załadowano do gotowych żeli Mini-PROTEAN (Bio-Rad) i poddano elektroforezie przy 100 V, a następnie przenieśiono na membrany PVDF (Bio-Rad) za pomocą systemu Trans-Blot Turbo Transfer (Bio-Rad) na 7 min. Membrany inkubowano z TBST (20 mM Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl i 0,1% Tween-20) z 5% odtłuszczonego mleka w celu zablokowania niespecyficznego wiązania.

Membrany inkubowano przez noc w temperaturze 4 °C z pierwotnymi przeciwciałami rozcieńczonymi w 3% BSA i 0,02% azydku sodu. Sygnał wykrywano za pomocą Luminata Crescendo Western HRP Substrate (Millipore) z systemem obrazowania ChemiDoc MP Imaging System (Bio-Rad) z oprogramowaniem Image Lab Software (Bio-Rad, wersja 6). Western bloty uzyskano z tego samego eksperymentu i przetworzono równolegle. Nieprzycięte skany Western blotów przedstawiono na rysunkach uzupełniających 10–15.

#### Cytometria

przeplęwowano Apoptozę i martwicę oceniano przy użyciu zestawu Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences) zgodnie z protokołem producenta. Komórki SUM159 umieszczono na 6-dółkowych płytkach hodowlanych na 24 godziny. Następnie podłoże usunął to i zastąpiono podłożem zawierającym jad pszczeli lub melittynę (stężenia IC50) i hodowano przez 60 minut. Komórki zebrano z trypsyną i podłożem, odwirowano (1000 g, 5 min, 24 °C), przemyto zimnym PBS, odwirowano (1000 g, 5 min, 24 °C) i zawieszono ponownie w 1× buforze wiążącym. Komórki przygotowano do stężenia 1 miliona komórek/ml w 1× buforze wiążącym. Próbkę inkubowano z FITC i PI (5 µl każdego) w ciemności przez 15 minut. Obecność żywych, martwych, apoptotycznych lub martwiczych komórek

oceniono za pomocą cytometru BD Accuri C6 (BD Biosciences, San Jose, USA) z oprogramowaniem BD Accuri C6 i przeanalizowano za pomocą FlowJo™ (Ashland, USA, Windows Version 7). Eksperymenty przeprowadzono w replikacjach biologicznych (n = 3). Strategie bramkowania przedstawiono na Rys. uzupełniającym 16.

#### Mikroskopia żywych komórek

Komórki SKBR3 umieszczono w mikroplacie ze szklanym dnem (10 × 35 mm, MatTek) i inkubowano przez 24 godziny. Mikroplakę pozostawiono do osiągnięcia ciśnienia równowagi w komorze inkubacyjnej na szczycie stolika mikroskopu konfokalnego NIKON Eclipse Ti (37 °C i 5% CO<sub>2</sub>) przez 20 minut. Obiektyw 20× został użyty z wyrównaniem Kohlera, a obrazy wykonywano co minutę od 10 minut przed do 1 godziny po leczeniu IC50 jadu pszczoły miodnej zebranego w Australii. Autorzy doceniają udogodnienia oraz pomoc naukową i techniczną oferowaną przez National Imaging Facility, zdolność National Collaborative Research Infrastructure Strategy (NCRIS), a także Australian Microscopy & Microanalysis Research Facility, oba w Centre for Microscopy, Characterization and Analysis (CMCA), UWA, placówce finansowanej przez rządy uniwersytetu, stanu i Wspólnoty Narodów.

#### Mikroskopia elektronowa skaningowa

Szkiełka nakrywkowe (średnica 12 mm, Menzel, Thermo Fisher Scientific) pokryto bromowodorkiem poli-L-lizyny (Sigma-Aldrich) na 20 min, a następnie przymyto dwukrotnie oczyszczoną wodą. Komórki SUM159 umieszczono na szkiełkach w gęstości 62 500 komórek/dolek i inkubowano w temperaturze 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> przez 24 h. Komórki przymyto dwukrotnie PBS, a następnie przymyto poddano działaniu nośnika lub stężeniu IC50 jadu pszczołego i melittyny przez 1 h.

Komórki przymyto dwukrotnie PBS, następnie utrwalono 4% formaldehydem w PBS przez 25 min, a następnie przymyto ponownie trzy razy PBS. W celu przygotowania do mikroskopii próbki zanurzono w 2,5% glutaraldehydu i inkubowano w temperaturze 4 °C przez 2 h. Próbki przymyto wodą dejonizowaną i zanurzono w rosnących stężeniach etanolu (50%, 70%, 95%, 100%, a następnie 100% absolutnego „suchego” etanolu). Pomimo każdego zanurzenia próbki odwadniano w specjalistycznej kuchence mikrofalowej (PELCO, BioWave 34700 Laboratory Microwave System). Proces odwadniania ukończono za pomocą Critical Point Drying Apparatus E3000, aby zastąpić etanol w próbce nadkrytycznym CO<sub>2</sub>. Przetworzone szkiełka nakrywkowe zamontowano na oprawkach SEM (ProSciTech) z zakładkami węglowymi. Próbki pokryto platyną o grubości 3 nm, aby uczynić je przewodzącymi elektronicznie, zanim uwidoczono je pod skaningowym mikroskopem elektronowym (Zeiss 1555 VP-FESEM) w CMCA, UWA. Obrazy wykonano za pomocą detektora w soczewce przy odległości roboczej 2,6 mm, aperturze 30 μm i napięciu przyspieszającym 5 kV. Obrazy analizowano za pomocą oprogramowania do analizy obrazów FIJI (ImageJ)83.

#### Immunofluorescencja

Szkiełka nakrywkowe (średnica 12 mm, Menzel, Thermo Fisher Scientific) umieszczono w 24-dolekowych płytkach i pokryto poli-L-lizyną (Sigma-Aldrich) przez 20 min, a następnie przymyto dwukrotnie oczyszczoną wodą. Komórki SUM159 umieszczono na szkiełkach i inkubowano w temperaturze 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> przez 24 h.

Komórki traktowano przez 30 min nośnikiem lub IC50 jadu pszczołego, melittinem, RGD1-melittinem i równoważnym stężeniem molowym melittinu dla DEDE-melittinu. Komórki przymyto dwukrotnie PBS, a następnie utrwalano 4% paraformaldehydem w PBS przez 25 min, a następnie przymyto ponownie trzy razy PBS. Niespecyficzne wiązanie przeciwciał blokowano, stosując 5% normalną surowicę kozią (Thermo Fisher Scientific) w PBS przez 1 h w temperaturze pokojowej.

Do komórek dodano przeciwciała pierwotne, w tym monoklonalne przeciwciała anty-melittin (5 μg/ml) i 1:500 przeciwciała anty-EGFR [EP38Y] (Abcam). Próbki inkubowano z delikatnym kołysaniem w temperaturze 4 °C przez noc. Komórki przymyto trzy razy PBS, a następnie inkubowano z 1:500 przeciwciałem wtórnym kozim Alexa Fluor 488 anty-mysim, 1:500 przeciwciałem wtórnym kozim Alexa Fluor 594 anty-króliczym i Hoechstem (1:5000) w PBS w temperaturze pokojowej przez 1 h. Próbki przymyto trzy razy PBS i umieszczono na szkiełkach nakrywkowych za pomocą SlowFade Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific). Ślady obrazowano za pomocą konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego Nikon Ti-E. Zdjęcia wykonano przy użyciu obiektywu powietrznego 20× (NA 0,75) i sekwencyjnego wzbudzenia przy użyciu długości fal 405 nm (Hoechst 34580), 488 nm (przeciwciała wtórne Alexa Fluor 488) i 561 nm (przeciwciała wtórne Alexa Fluor 594). Zdjęcia zebrano przy użyciu oprogramowania NIS-C Elements i przetworzono przy użyciu FIJI (ImageJ) w CMCA83.

#### Rezonansowy transfer energii bioluminescencji (BRET)

Interakcje receptor-ligand oceniano za pomocą BRET, stosując metodę podobną do opisanej wcześniej84,85. BRET obejmuje nieradiacyjny transfer energii (dipol-dipol) między dwoma białkami lub cząsteczkami zainteresowania znakowanymi albo lucyferazą dawcy, albo fluoroforem akceptora po utlenieniu substratu przez lucyferazę i późniejszej emisji światła54. Znaczniki FITC sprzężono z N-końcowym fragmentem melittyny (FITC-melittyna) i DEDE-melittyny (FITC-DEDE-melittyna). Komórki HEK293 stabilnie wyrażające duży antygen T SV40 (HEK293FT) wysiewano na płytki 6-dolekowe w gęstości 550 000 komórek/dolek przez 24 godziny. Komórki HEK293FT transfekowano plazmidami zawierającymi cDNA dla NanoLuc-EGFR przy użyciu FuGENE. Krótko mówiąc, cDNA plazmidu inkubowano przez 10 min w temperaturze pokojowej z mieszaną odczynnikową transfekcyjną i DMEM bez surowicy w stosunku 10 ng/μl NanoLuc-EGFR: 4 μl FuGENE: 100 μl SFM. Mieszanę dodano do komórek HEK293FT w końcowym stężeniu 10 ng/μl NanoLuc-EGFR na dołek płytki 6-dolekowej, a komórki inkubowano przez 24 h.

Komórki przymyto PBS i oddzielono trypsyną, a następnie przymyto w medium zawierającym 5% surowicy cielęcej w DMEM bez czerwieni fenolowej. Komórki umieszczono w ilości 50 000 komórek/dolek na 96-dolekowych białych płytkach pokrytych poli-L-lizyną i inkubowano przez 24 godziny. Do testów nasycenia i kinetyki BRET użyto dwóch filtrów do jednoczesnego pomiaru luminescencji krótko- i długofalowej odpowiadającej długościom fali emisji cząsteczek donora i akceptora.

W przypadku eksperymentów kinetyki asocjacji ligandów w czasie rzeczywistym, z komórek usunęto medium, a następnie przymyto inkubowano je z 50 μL/dolek substratu NanoLuc furimazy do końcowego stężenia 10 μM rozcieńczonego w zrównoważonym roztworze soli Hanka (HBSS). Następnie komórki równoważono w czynniku płytek CLARIOstar (BMG Labtech, Australia) przez 5 min, aby zarejestrować odczyty bazowe. Następnie dodano ligandy (TAMRA-EGF, FITC-melittyna i FITC-DEDE-melittyna) do zakresu prawidłowych stężeń końcowych, a rejestracje NanoBRET wykonywano co 90 s przez 60 min w temperaturze 37 °C. Do eksperymentów nasycenia z komórek usunęto podłoże, dodano szereg stężeń TAMRA-EGF, FITC-melittyny i FITC-DEDE-melittyny w obecności lub nieobecności konkurencyjnego stężenia (1 μM) nieoznakowanego EGF i inkubowano w temperaturze 37 °C przez 60 minut w ciemności.

Furimazynę dodano w stężeniu końcowym 10 μM. Rejestracje dokonano przy użyciu LUMistar Omega (BMG Labtech, Australia). Dane przedstawiono jako „surowy współczynnik BRET”, wyprowadzony ze stosunku emisji długofalowej (akceptor) do emisji krótkofalowej (dawca). Eksperymenty przeprowadzono w replikacjach biologicznych (n = 3).

#### Analiza łączonych efektów leków Jad pszczełli lub

melittyna były łączone z docetaksem i podawane w stężeniach wskazanych w niestłym stosunku do komórek T11 przez 24 godziny. Żywotność komórek oceniano przy użyciu CellTiter-Glo, jak wspomniano wcześniej. Łączny efekt jadu pszczołego lub melittyny z docetaksem oceniano metodą mediany dawka-efekt przy użyciu oprogramowania CompuSyn (ComboSyn). Ta metoda określa CI na podstawie efektu połączenia dwóch środków (gdzie CI < 1 oznacza synergizm, CI > 1 oznacza antagonizm, a CI = 1 oznacza addytywność)56. Eksperymenty przeprowadzono w powtórzeniach biologicznych (n = 3).

#### Model zwierzęcy i leczenie

Te eksperymenty na zwierzętach przeprowadzono zgodnie z protokołami zatwierdzonymi przez Animal Ethics Committee of UWA. Aby symulować zaawansowany model raka piersi z niskim poziomem klaudyni, 2,5 × 10<sup>5</sup> komórek T11 zawieszono w podłożu bez surowicy i BD Matrigel Matrix High Concentration (BD Bioscience) w stosunku 1:1 do całkowitej objętości 100 μl i wstrzyknięto to podskórnie w boki 5-tygodniowych samic BALB/cJ (Animal Resources Centre, WA, Australia) za pomocą igły 26-G. Użyte komórki T11 zostały lentiwirusowo transdukiowane za pomocą konstrukcji ZsGreen-lucyferazy i sortowane trzy razy w celu uzyskania wzbogacenia wyższego niż 99% komórek lucyferazo-pozytywnych. Melittynę zawieszono w wodzie Milli-Q + 5% dekstrozy. Docetaksel (w proszku) zawieszono w 25% TWEEN 80 (Sigma-Aldrich) i 75% mieszaniny 15,25:84,75 (v/v) roztworu absolutnego etanolu i oczyszczonej wody i przechowywano w temperaturze 20 °C. Bezpośrednio przed leczeniem docetaksel świeżo rozcieńczono w wodzie Milli-Q + 5% dekstrozy do wymaganego stężenia końcowego. Trzy dni po wytworzeniu guzów T11 (~50 mm<sup>3</sup>), myszy przydzielono losowo do 4 grup (n = 12 myszy/grupa). Leczenie wstrzykiwano śródnowotworowo w dniach 3, 5, 7, 9, 11, 13 i 15 po zaszczerpieniu komórek T11, z nośnikiem, melittyną (5 mg/kg), docetaksem (7 mg/kg) lub kombinacją melittyny (5 mg/kg) i docetakselu (7 mg/kg). Wielkość guza u zwierząt monitorowano co 2 dni, a

objętości obliczone na podstawie zmodyfikowanego wzoru elipsoidalnego (objętość = szerokość  $\times$  długość  $\times$  2). Zwierzęta zostały humanitarnie uśmiercone, gdy guzy osiągnęły 800 mm<sup>3</sup>

Analiza immunohistochemiczna guzów Tkanki guzów utrwalono w

4% paraformaldehydu, przemyto trzykrotnie w PBS i pozostawiono w 70% etanolu. Guzy zatopiono w parafinie i przygotowano 5- $\mu$ m skrawki. Do barwienia hematoksyliną/eozyną, szkiełka odparafinowano, uwodniono przy użyciu banku roztworów etanolu o malejącej zawartości, zabarwiono hematoksyliną Gilla, odwodniono przy użyciu 70% etanolu, zabarwiono eozyną, dalej odwodniono przy użyciu 100% etanolu, oczyszczono przy użyciu toluenu i umieszczono w szkiełkach nakrywkowych przy użyciu medium montażowego Acrymount IHC (StatLab).

Apoptozę komórek nowotworowych określono w wycinkach tkanek za pomocą testu TUNEL (zestaw do wykrywania śmierci komórek in situ, Roche).

Obrazowanie bioluminescencji Aby

dokładnie śledzić zmiany wzrostu guza in vivo podczas leczenia, przeprowadziliśmy analizę bioluminescencji przy użyciu systemu obrazowania Caliper IVIS Lumina II w CMAA, UWA. Analizy przeprowadzono co 2 dni po wytworzeniu guzów. Mysiom wstrzykiwano dootrzewnowo 200  $\mu$ l D-Lucyferyny (Cayman Chemical) o końcowym stężeniu 150 mg/kg rozpuszczonej w PBS przed znieczuleniem 4% izofluranem. Po znieczuleniu myszy umieszczano w ogrzanej komorze urządzenia do obrazowania bioluminescencji i obrazowano 7–12 minut po wstrzyknięciu, przy 2% izofluranie, aż intensywność sygnału bioluminescencji osiągnęła stan ustalony.

Analiza statystyczna

Wszystkie dane pochodzą z wielu eksperymentów przeprowadzonych co najmniej trzykrotnie. Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu GraphPad Prism v8 (GraphPad Software Inc.), Office Excel 365 (Microsoft) i oprogramowania SPSS Predictive Analytics Software (IBM, wersja 26). W przypadku testów żywotności komórek dane znormalizowano do średniej luminescencji stanu nośnika, który uznano za 100% żywotności, a wartości IC50 uzyskano w GraphPad Prism.

W przypadku immunohistochemii leczonych guzów T11 w celu wykrycia p-HER2 (Tyr1248) i p-EGFR (Tyr1068), nośnik znormalizowano do 100%. W stosownych przypadkach i zgodnie z zaleceniami w tekście głównym istotność statystyczną określono przy użyciu nieparzystego dwustronnego testu t-Studenta, nieparzystej jednokierunkowej analizy wariancji z testem post hoc HSD Tukeya korygującym wielokrotne porównania, dwukierunkowej analizy wariancji z powtarzanymi pomiarami, a następnie pnie testu wielokrotnych porównań Sidaka lub Tukeya lub uogólnionego modelu liniowego (GLM).

W przypadku wszystkich testów różnice uznano za istotne na poziomie  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

Podsumowanie sprawozdania

Więcej informacji na temat projektu badawczego można znaleźć w Podsumowaniu Sprawozdania z Badań Nature dostępnym pod tym artykułem.

DOSTĘPNOŚĆ DANYCH

Wszystkie dane wygenerowane lub przeanalizowane podczas tego badania są zawarte w tym opublikowanym artykule (i jego plikach z informacjami uzupełniającymi). Przeciwciała anti-melittyny opracowane w Monoclonal Antibody Facility w Harry Perkins Institute of Medical Research może zostać udostępnione po zawarciu odpowiednich umów.

Otrzymano: 9 października 2019 r.; Przyjęto: 28 lipca 2020 r.;  
Published online: 01 September 2020

## REFERENCJE

1. Son, DJ i in. Terapeutyczne zastosowanie przeciwartretycznych, przeciwbólowych i przeciwnowotworowych efektów jadu pszczelego i jego związków składowych. *Pharmacol. Ther.* 115, 246–270 (2007).
2. Fitzmaurice, C. i in. Globalna, regionalna i krajowa zapadalność na nowotwory, śmiertelność, utracone lata życia, lata przeżyte z niepełnosprawnością i lata życia skorygowane o niepełnosprawność dla 32 grup nowotworów w latach 1990–2015. *JAMA Oncol.* 3, 524 (2017).
3. Park, S.-C. i in. Badanie porów toroidalnych i oligomeryzacji przez melittynę przy użyciu transmisyjnej mikroskopii elektronowej. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343, 222–228 (2006).
4. Lyu, Y., Zhu, X., Xiang, N. i Narsimhan, G. Badanie dynamiki molekularnej tworzenia porów przez melittynę w 1,2-dioleoyl-sn-glicero-3-fosfocholine i 1,2-Di
- (9 Z- $\alpha$ -oktadecenoyl)-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) Mieszana podwójna warstwa lipidowa. *W. Łąka. Chem. Rozdzielczość* 54, 10275–10283 (2015).
5. Terwilliger, TC i Eisenberg, D. Struktura melittyny. II. Interpretacja struktury. *J. Biol. Chem.* 257, 6016–6022 (1982).
6. Lee, M.-T., Sun, T.-L., Hung, W.-C. i Huang, HW Proces indukowania porów w błonach przez melittynę. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 110, 14243–14248 (2013).
7. Sun, D., Forsman, J. & Woodward, CE Wieloletowe symulacje dynamiki molekularnej identyfikują wysoce kooperatywną aktywność melittyny w rozpoznawaniu i stabilizowaniu porów błony. *Langmuir* 31, 9388–9401 (2015).
8. Tu, WC, Wu, CC, Hsieh, HL, Chen, CY i Hsu, SL Jad pszczoły miodnej wywołuje zależną od wapnia, ale niezależną od kaspazy śmierć komórek apoptotycznych w komórkach czerniaka ludzkiego A2058. *Toxicol. Oncol.* 52, 318–329 (2008).
9. Gao, D. i in. Melittyna indukuje apoptozę niedrobnokomórkowego raka płuca poprzez hamowanie miR-183. *Oncotarget* 11, 4511–4523 (2018).
10. Sisakht, M. i in. Jad pszczoły indukuje apoptozę i hamuje ekspresję metaloproteazy macierzy-2 w komórkach ludzkiego glejaka. *Braz. J. Pharmacogn.* 27, 324–328 (2017).
11. Killion, JJ i Dunn, JD Różnicowa cytologia komórek śledziony, szpiku kostnego i białaczki u myszy przez melittynę ujawnia różnice w topografii błony. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 222–227 (1986).
12. Jo, M. i in. Działanie przeciwnowotworowe toksyny jadu pszczelego i melittyny w komórkach raka jajnika poprzez indukcję receptorów śmierci i hamowanie szlaku JAK2/STAT3. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 258, 72–81 (2012).
13. Zarrinadah, H. i in. Apoptotyczne działanie melittyny oczyszczonej z jadu irańskiej pszczoły miodnej na linię komórkową Hela ludzkiego raka szyjki macicy. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 24, 563–570 (2018).
14. Wang, X. i in. Długi niekodujący RNA NONHSAT105177 indukowany przez melittynę hamuje proliferację i migrację gruczolakoraka przewodowego trzustki. *Cell Death Dis.* 9, 940 (2018).
15. Zhu, HG, Tayeh, I., Israel, L. & Castagna, M. Różna podatność linii komórek płuc na inhibitory promocji nowotworu i induktory różnicowania. *J. Biol. Reg. Homeost. Agents* 5, 52–58 (1991).
16. Yu, X. i in. Modulacja immunologiczna komórek śródłonka zatok wątrobowych przez nanocząsteczki melittyny hamuje przerzuty do wątroby. *Nat. Commun.* 10, 574 (2019).
17. Gajski, G. i in. Połączone działanie przeciwnowotworowe jadu pszczelego i cisplatyny na ludzkie komórki raka szyjki macicy i krtani oraz ich leukoporne podlinie. *J. Toksykologiczno-aplikacyjne.* 34, 1332–1341 (2014).
18. Choi, K. i in. Hamujący wpływ jadu pszczelego na wzrost komórek rakowych poprzez zniekształcenie ekspresji receptora śmierci 3 i inaktywację NF- $\kappa$ B w komórkach NSCLC. *Toxins* 6, 2210–2228 (2014).
19. Shaw, P. i in. Synergistyczne efekty leczenia melittyną i osoczem: obiecujące podejście do terapii nowotworowej. *Cancers* 11, 1109 (2019).
20. Ip, SW i in. Rola mitochondriów w apoptozie wywołanej jadem pszczelem w komórkach ludzkiego raka piersi MCF7. *Vivo* 22, 237–245 (2008).
21. Jeong, Y.-J. i in. Melittin tłumi ruchliwość i inwazję komórek wywołaną przez EGF poprzez hamowanie szlaku sygnałowego PI3K/Akt/mTOR w komórkach raka piersi. *Food Chem. Toxicol.* 68, 218–225 (2014).
22. Jung, GB i in. Działanie przeciwnowotworowe jadu pszczelego na ludzkie komórki raka piersi MDA-MB-231 przy użyciu spektroskopii Ramana. *Biomed. Opt. Express* 9, 5703 (2018).
23. Oršolić, N., Šver, L., Verstovšek, S., Terzić, S. i Bašić, I. Hamowanie proliferacji komórek raka sutka in vitro i wzrostu guza in vivo przez jad pszczele. *Toxikon* 41, 861–870 (2003).
24. Oršolić, N., Terzić, S., Šver, L. i Bašić, I. Produkty pszczele w profilaktyce i/lub terapii przeszczepialnych nowotworów u myszy. *J. Sci. Food Agric.* 85, 363–370 (2005).
25. Kohno, M., Horibe, T., Ohara, K., Ito, S. i Kawakami, K. Peptydy lityczne błony K8L9 i melittyna dostają się do komórek nowotworowych poprzez endocytozę receptorową po narażeniu subcytotoksycznym. *Chem. Biol.* 21, 1–11 (2014).
26. Lim, H., Baek, S. i Jung, H. Jad pszczele i jego składnik peptydowy melittin hamują wzrost i migrację komórek czerniaka poprzez hamowanie szlaków PI3K/AKT/mTOR i MAPK. *Molecules* 24, 929 (2019).
27. Van Vaerenbergh, M., Debysse, G., Smaghe, G., Devreese, B. i De Graaf, D.C. Odkrywanie proteomu jadu trzmiela (*Bombus terrestris*) poprzez integrację podejścia kombinatorycznego biblioteki ligandów peptydowych z FT-ICR MS. *Toxicol.* 102, 81–88 (2015).
28. Qiu, Y. i in. Klonowanie molekularne białka jadu trzmiela *Bombus terrestris*, fosfolipazy A2 i jego działanie przeciwbiałkowe w komórce K562. *J. Asian Pac. Entomol.* 20, 699–704 (2017).
29. Prat, A. i Perou, CM Dekonstrukcja portretów molekularnych raka piersi. *Mol. Oncol.* 5, 5–23 (2011).
30. Lehmann, BD i in. Identyfikacja podtypów ludzkiego potrójnie ujemnego raka piersi i modele przedkliniczne do wyboru terapii ukierunkowanych. *J. Clin. Investig.* 121, 2750–2767 (2011).
31. Mayer, IA, Abramson, VG, Lehmann, BD i Pietenpol, JA Nowe strategie leczenia potrójnie ujemnego raka piersi – rozszyfrowanie heterogeniczności. *Clin. Cancer Res.* 20, 782–790 (2014).

32. Gelmon, K. i in. Celowanie w potrójnie ujemnego raka piersi: optymalizacja terapii wyniki. *Ann. Oncol.* 23, 2223–2234 (2012).
33. Gagliato, D. de M., Jardim, DLF, Marchesi, MSP i Hortobagyi, GN. Mechanizmy oporności i wrażliwości na terapię anty-HER2 w raku piersi HER2+. *Oncotarget* 7, 64431–64446 (2016).
34. Shah, SP i in. Widmo ewolucji klonalnej i mutacyjnej pierwotnych potrójnych rak piersi ujemny. *Nature* 486, 395–399 (2012).
35. Costa, R. i in. Oddziaływanie na receptor naskórkowego czynnika wzrostu w potrójnie ujemnym raku piersi: nowe odkrycia i praktyczne spostrzeżenia dotyczące rozwoju leków. *Leczenie raka. Rev.* 53, 111–119 (2017).
36. Swain, SM i in. Pertuzumab, trastuzumab i docetaksel w HER2-dodatnim przerzutowy rak piersi. *N. Engl. J. Med.* 372, 724–734 (2015).
37. Wright, MH i in. Guzy piersi Brca1 zawierają odrębną białą komórkę CD44+/CD24- i CD133+ o cechach komórek macierzystych raka. *Breast Cancer Res.* 10, R10 (2008).
38. Roberts, PJ i in. Połączone hamowanie PI3K/mTOR i MEK zapewnia szeroką aktywność przeciwnowotworową w wiernych mysich modelach raka. *Clin. Cancer Res.* 18, 5290–5303 (2012).
39. Hall, K., Lee, T.-H. & Aguilar, M.-I. Rola oddziaływań elektrostatycznych w wiązaniu błonowym melittyny. *J. Mol. Recognit.* 24, 108–118 (2011).
40. Rai, DK, Qian, S. i Heller, WT Interakcja melittyny z dwuwarstwowymi błonami lipidowymi dimirytoilofosfatydylocholino i dimirytoilofosfatydyloseryny. *Biochim. Biophys. Acta* 1858, 2788–2794 (2016).
41. Krauson, AJ i in. Konformacyjne dostrajanie potencjału i selektywności peptydu tworzącego porę. *J. Am. Chem. Soc.* 137, 16144–16152 (2015).
42. Sharma, SV Odporność na melittynę — kontrselekcja dla transformacji ras. *Onkogen* 7, 193–201 (1992).
43. Morris, MC, Deshayes, S., Heitz, F. & Divita, G. Peptydy penetrujące komórki: od mechanizmów molekularnych do terapii. *Biol. Cell* 100, 201–217 (2008).
44. Dong, X., Hudson, NE, Lu, C. i Springer, TA Strukturalne wyznaczniki swoistości podjednostki  $\beta$  integryny dla utajonego TGF- $\beta$ . *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21, 1091–1096 (2014).
45. Li, W., Liu, C., Zhao, C., Zhai, L. i Lv, S. Zmniejszenie ekspresji  $\beta$ 3 integryny przez miR-30a-5p moduluje adhezję i inwazję komórek poprzez przerwanie sieci Erk/Ets-1 w potrójnie ujemnym raku piersi. *Int. J. Oncol.* 48, 1155–1164 (2016).
46. Sorolla, A. i in. Potrójne podejście terapeutyczne w przypadku potrójnie ujemnych nowotworów piersi z wykorzystaniem nanocząsteczek docetakselu, EN1-iPeps i peptydów RGD. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 20, 102003 (2019).
47. Kretzmann, JA i in. Tłumienie nowotworu za pomocą ukierunkowanego dożylnego niewirusowego CRISPRa z wykorzystaniem polimerów dendrytycznych. *Chem. Sci.* 10, 7718–7727 (2019).
48. Kokot, G., Mally, M. i Svetina, S. Dynamika zmian błonowych wywołanych melittyną przepuszczalność. *Eur. Biophys. J.* 41, 461–474 (2012).
49. Carracedo, A. i in. Hamowanie mTORC1 prowadzi do aktywacji szlaku MAPK poprzez pętlę sprzężenia zwrotnego zależną od PI3K w raku u ludzi. *J. Clin. Investig.* 118, 3065–3074 (2008).
50. Lee, T.-H. i in. Czynniki wzrostu śródbłonna naczyniowego pośredniczy w wewnątrzwydzielniczym przeżyciu w komórkach ludzkiego raka piersi poprzez wewnętrzną ekspresję VEGFR1/FLT1. *PLoS Med.* 4, e186 (2007).
51. Weigel, MT i in. Połączenie imatinibu i winorelbiny zwiększa hamowanie wzrostu komórek w komórkach raka piersi poprzez sygnalizację PDGFR  $\beta$ . *Cancer Lett.* 273, 70–79 (2009).
52. Hall, MP i in. Zaprojektowany reporter lucyferazy z kretki gębinowej wykorzystujący nowy substrat imidazopyrazinonu. *ACS Chem. Biol.* 7, 1848–1857 (2012).
53. Machleidt, T. i in. NanoBRET — nowa platforma BRET do analizy oddziaływań białko-białko. *ACS Chem. Biol.* 10, 1797–1804 (2015).
54. Pflieger, KDG i Eidne, KA Oświetlające spostrzeżenia na temat interakcji białko-białko przy użyciu transferu energii rezonansu bioluminescencji (BRET). *Nat. Methods* 3, 165–174 (2006).
55. Beltran, AS, Graves, LM i Blancafort, P. Nowa rola Engrailed 1 jako czynnika transkrypcyjnego sprzyjającego przeżyciu w raku piersi typu basal-like i inżynieria peptydów interferencyjnych blokująca jego funkcję onkogenną. *Oncogene* 33, 4767–4777 (2014).
56. Chou, TC i Talalay, P. Ilościowa analiza zależności dawka-efekt: łączone efekty wielu leków lub inhibitorów enzymów. *Adv. Enzym. Regul.* 22, 27–55 (1984).
57. Prat, A. i in. Charakterystyka fenotypowa i molekularna podtypu raka piersi o niskim poziomie klaudyny. *Breast Cancer Res.* 12, R68 (2010).
58. Sorolla, A. i in. Uważliwanie raka piersi typu basal-like na chemioterapię przy użyciu nanocząsteczek sprzężonych z peptydem interferencyjnym. *Nanoscale* 8, 9343–9353 (2016).
59. Swoboda, A. & Nanda, R. Blokada punktów kontrolnych układu odpornościowego w raku piersi. *Rak Leczyć. Obj.* 173, 155–165 (2018).
60. Sharma, SV Odporność na melittynę : kontrselekcja w kierunku transformacji ras. *Onkogen* 7, 193–201 (1992).
61. Barrajón-Catalán, E. i in. Selektowna śmierć ludzkich komórek raka piersi przez lityczne immunoliposomy: korelacja z poziomem ekspresji HER2. *Cancer Lett.* 290, 192–203 (2010).
62. Barnabas, N. & Cohen, D. Charakterystyka fenotypowa i molekularna linii komórkowych raka piersi MCF10DCIS i SUM. *Int. J. Breast Cancer* 2013, 1–16 (2013).
63. Hollestelle, A. i in. Odmienne profile mutacji genów w liniach komórkowych raka piersi typu luminalnego i bazalnego. *Breast Cancer Res. Treat.* 121, 53–64 (2010).
64. Mota, A. i in. Charakterystyka molekularna linii komórkowych raka piersi za pomocą klinicznych markerów immunohistochemicznych. *Oncol. Lett.* 13, 4708–4712 (2017).
65. Wu, GJ i in. Amplifikacja 17q23 w raku piersi obejmują PAT1, RAD51C, Geny P56K i SIGMA1B. *Cancer Res.* 60, 5371–5375 (2000).
66. Saal, LH i in. Nawracające mutacje makroskopowe genu supresora nowotworu PTEN w raku piersi z niedoborem naprawy DSB. *Nat. Genet.* 40, 102–107 (2008).
67. Liang, SI i in. Zfosforylowane dimery EGFR nie są wystarczające do aktywacji Ras. *Komórka Rep.* 22, 2593–2600 (2018).
68. Lee, C., Bae, S.-J., Joo, H. i Bae, H. Melittyna hamuje progresję guza poprzez regulację makrofagów związanych z guzem w mysim modelu raka płuc Lewisa. *Oncotarget* 8, 54951–54965 (2017).
69. Muenst, S. i in. Ekspresja ligandu programowanej śmierci 1 (PD-L1) jest związana ze złym rokowaniem w raku piersi u ludzi. *Breast Cancer Res. Treat.* 146, 15–24 (2014).
70. Qin, T. i in. Wysoki poziom ekspresji PD-L1 był związany ze złym rokowaniem u 870 chińskich pacjentów z rakiem piersi. *Oncotarget* 6, 33972–33981 (2015).
71. Zawlik, I. i in. Punkty kontrolne układu odpornościowego w agresywnych podtypach raka piersi. *plazma* 63, 768–773 (2016).
72. Hou, Y., Nitta, H., Parwani, AV i Li, Z. PD-L1 i CD8 są powiązane z niedoborem naprawy niezgodności w potrójnie ujemnym i HER2-dodatnim raku piersi. *Hum. Pathol.* 86, 108–114 (2019).
73. Monypenny, J. i in. ALIX reguluje immunosupresję zależną od nowotworu poprzez kontrolowanie aktywności EGFR i prezentacji PD-L1. *Cell Rep.* 24, 630–641 (2018).
74. Padmanabhan, R., Kheraldine, HS, Meskin, N., Vranic, S. & Al Moustafa, A.-E. Przesłuchanie między HER2 i PD-1/PD-L1 w raku piersi: od zastosowań klinicznych do modeli matematycznych. *Cancers* 12, 636 (2020).
75. Polk, A., Svane, I.-M., Andersson, M. & Nielsen, D. Inhibitory punktów kontrolnych w raku piersi rak — aktualny stan. *Leczenie raka. Rev.* 63, 122–134 (2018).
76. Chaganty, BKR i in. Trastuzumab zwiększa ekspresję PD-L1 jako potencjalny mechanizm oporności na trastuzumab poprzez zaangażowanie komórek efektorowych układu odpornościowego i stymulację wydzielania IFN $\gamma$ . *Cancer Lett.* 430, 47–56 (2018).
77. Cheng, B., Thapa, B., KC, R. i Xu, P. Podwójnie zabezpieczona nano-melittyna do bezpiecznej i skutecznej eradycji komórek rakowych. *J. Mater. Chem. B* 3, 25–29 (2015).
78. Soman, NR i in. Nanonośniki ukierunkowane molekularnie dostarczają cytotolyczny peptyd melittin specyficznie do komórek nowotworowych u myszy, zmniejszając wzrost guza. *J. Clin. Zbadać* 119, 2830–2842 (2009).
79. Sun, D. i in. Potencjał przeciwnowotworowy i mechanizm działania nowego leku aktywowanego przez guz toksyna zespolona, DLM. *Toksyny* 7, 423–438 (2015).
80. Sigismund, S., Avanzato, D. i Lanzetti, L. Nowe funkcje EGFR w raku. *Mol. Oncol.* 12, 3–20 (2018).
81. Iqbal, N. & Iqbal, N. Receptor ludzkiego naskórkowego czynnika wzrostu 2 (HER2) w nowotworach: nadmierna ekspresja i implikacje terapeutyczne. *Mol. Biol. Int.* 2014, 1–9 (2014).
82. Goding, J. *Przeciwciała monoklonalne: zasady i praktyka.* (Academic Press, 1996).
83. Schindelin, J. i in. Fiji: platforma open-source do analizy obrazów biologicznych. *Nat. Metody* 9, 676–682 (2012).
84. Stoddart, LA i in. Zastosowanie BRET do monitorowania wiązania ligandu do GPCR. *Nat. Metody* 12, 661–663 (2015).
85. Kilpatrick, LE i in. Analiza w czasie rzeczywistym wiązania fluorescencyjnego VEGF 165 a do VEGFR2 w żywych komórkach: wpływ inhibitorów kinazy receptora tyrozynowego i los zinternalizowanych kompleksów agonista-receptor. *Biochem. Pharmacol.* 136, 62–75 (2017).

## PODZIĘKOWANIE

Niniejsza praca została wsparta następującymi grantami przyznawanymi PB: stypendium Australian Research Council (ARC) Future Fellowship FT130101767, stypendium badawcze Cancer Council of Western Australia (CCWA) i granty projektowe CCWA 1083745 i 1147435 oraz granty National Health and Medical Research Council (NHMRC) 1069308, 1147528 i 1165208. CD otrzymała wsparcie w ramach stypendium Australian Government Research Training Program (RTP) oraz stypendium CCWA PhD Top Up.

AS potwierdziła stypendium podoktorskie z National Breast Cancer Foundation (PF-15-001) i Raine Foundation Priming Grant (RPG-004-19). EJ otrzymało wsparcie z ARC Industrial Transformation Training Centre Fellowship (IC170100016). KP otrzymało wsparcie z NHMRC RD Wright Fellowship (1085842).

Prace BRET były częścią finansowane przez grant ARC LP160100857. Prace te były również wspierane przez następujące granty przyznane BB: granty ARC (LP100100438, DP130100087 i LP130100029), stypendium ARC Future Fellowship FT110100105 i grant

FT110100528 i University of California Riverside. Autorzy chcieliby podziękować za wsparcie Jane Stout (Trinity College Dublin), Markowi Brownowi (Royal Holloway, University of London), Kevinowi Li (FACS Facility w Harry Perkins Institute of Medical Research, UWA) i Paulowi Rigby'emu (CMCA).

#### WKŁAD AUTORÓW

CD przyczynił się do projektowania i wykonywania eksperymentów, analizy danych, konstrukcji rycin, a także napisał i zredagował artykuł. AS i EW przyczynili się do eksperymentów in vivo. EG przyczynił się do modelowania peptydów i ilustracji błony plazmatycznej. EW przyczynił się do eksperymentów immunofluorescencyjnych. KD przyczynił się do produkcji przeciwciał melittin. DH przyczynił się do skaningowej mikroskopii elektronowej. EJ i KP przyczynili się do przygotowania testów BRET. AR zrecenzował i zredagował artykuł. KSI przyczynił się do nadzoru i zrecenzował artykuł. BB i PB przyczynili się do konceptualizacji, nadzoru i projektowania eksperymentów oraz zredagowali artykuł.

#### KONFLIKTY INTERESÓW

KP otrzymał dofinansowanie od Promega, BMG Labtech i Dimerix jako organizacji uczestniczących w ARC Linkage Grant. Te organizacje uczestniczące nie odegrały żadnej roli w żadnym aspekcie koncepcji lub projektu badań, gromadzenia, analizy i interpretacji wyników ani pisania i edycji artykułu. KP jest głównym doradcą naukowym Dimerix, w którym ma udziały. Pozostali autorzy deklarują brak konfliktów interesów.

#### DODATKOWE INFORMACJE

Informacje uzupełniające dotyczące niniejszego artykułu są dostępne pod adresem <https://doi.org/10.1038/s41698-020-00129-0>.

Korespondencję i prośby o materiały należy kierować do PB

Informacje o przedrukach i pozwoleńiach są dostępne na stronie <http://www.nature.com/reprints>

Uwaga wydawcy: Springer Nature zachowuje neutralność w kwestii roszczeń jurysdykcyjnych zawartych w publikowanych mapach i powiązań instytucjonalnych.



Otwarty dostęp p Niniejszy artykuł jest licencjonowany na podstawie licencji Creative Commons Attribution 4.0 International License, która zezwala na używanie, udostępnianie, adaptację, dystrybucję i reprodukcję w dowolnym medium lub formie, pod warunkiem podania odpowiedniego uznania dla oryginalnych autorów i źródła, podania linku do licencji Creative Commons i wskazania, czy wprowadzono zmiany. Obrazy lub inne materiały stron trzecich w tym artykule są objęte licencją Creative Commons artykułu, chyba że wskazano inaczej w linii kredytowej do materiału. Jeśli materiał nie jest objęty licencją Creative Commons artykułu, a zamierzone użycie nie jest dozwolone przez przepisy ustawowe lub przekracza dozwolone użycie, należy uzyskać zgodę bezpośrednio od posiadacza praw autorskich. Aby wyświetlić kopię tej licencji, odwiedź stronę <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© Autor(zy) 2020