**Sammanfattning av mitt post doc-projekt**

Äggstockscancer behandlas idag med kirurgi i kombination med cytostatika. De flesta tumörer svarar initialt bra på denna behandling, men patienterna drabbas ofta av återkommande resistenta tumörer. Denna resistens beror på att tumörcellerna utvecklar sätt att undvika den apoptotiska, även kallad programmerade, celldöd som cytostatikan tidigare initierat. Att komma runt detta problem skulle därmed öppna vägen för nya behandlingssätt.

Apoptos involverar aktivering av en rad caspasenzymer och kan initieras av signaler både inifrån och utifrån cellen. Det senare sker via någon av de så kallade dödsreceptorerna, t.ex. TNFa receptorn, som aktiverar caspas-8, som i sin tur för signalen vidare in i cellen. I cellen finns även proteiner som motverkar apoptos, t.ex. de så kallade Inhibitor of apoptosis (IAP) proteinerna. Under min post doc så undersökte jag om man skulle kunna behandla äggstockscancer med en antagonist mot IAP. Vi testade detta genom att behandla cellinjer från äggstockstumörer med denna IAP antagonist (IAPa) i kombination med TNFa och mäta den resulterande celldöden. IAPa och TNFa hade viss effekt på några av de cellinjer vi hade i labbet. Desto intressantare var att när vi dessutom tillsatte en generell caspashämmare (zVAD), som vi egentligen bara hade med som en kontroll, så dog en av cellinjerna till nästintill 100% inom 48 timmar. Det var t.o.m. så att kombinationen av zVAD och IAPa var tillräcklig för att cellerna skulle dö, TNFa behövdes inte. Eftersom vi hämmade alla caspaser i försöket dog cellerna inte genom apoptos, utan via en annan sorts celldöd.

Vi ville ta reda på genom vilken av de kända celldödsprocesserna cellerna dog. Försök med Nec1 som specifikt hämmar nekroptos, en relativt nyligen beskriven form av dödsreceptorinitierad celldöd som även kallas programmerad nekros, visade att cellerna dog genom denna process. Det är nämligen så att caspas-8 inte bara initierar apoptos, utan även hämmar nekroptos genom att klyva två proteiner som är vitala för denna process, RIP1 och RIP3. Alltså, celldödsreceptoraktiverad apoptos kan inte ske eftersom vi inhiberar caspasaktiviteten, samtidigt som inaktivt caspas-8 tillåter att RIP1 och RIP3 kan initiera celldöd via nekroptos. Om vi tillsatte antikroppar som binder och inaktiverar TNFα tillsammans med caspas- och IAP-antagonisterna i cellodlingsmediet så förhindrades celldöden. Med andra ord startas en frisättning av TNFα från cellerna vid vår behandling, förmodligen via en aktivering av NF-κB signalering, och TNFα verkar autokrint och dödande på de behandlade cellerna. Proteininteraktionsförsök visade vidare att när vi behandlade cellerna med IAPa och zVAD så bildades den så kallade nekrosomen, ett proteinkomplex bestående av åtminstone fem proteiner: RIP1, RIP3, caspas-8 (inaktivt tack vare zVAD), FADD och P62. Tidigare studier har visat att aktivt RIP3 är nödvändigt i detta komplex för att nekroptos-kaskaden skall kunna fortskrida och våra tre följande försök visade att så var fallet även i våra cellinjer:

1. Western blot-försök visade att den cellinje som var känsligast mot kombinationen av zVAD och IAP-antagonist också var den cellinje som hade högst endogent uttryck av RIP3.

2. De cellinjer som i sitt ursprungstilstånd inte var känsliga mot behandlingen blev så när vi överuttryckte RIP3 i dem.

3. Om vi hämmade aktiviteten av RIP3 i de känsliga cellerna genom att sänka uttrycket med hjälp av shRNA specifikt mot RIP3, eller via överuttryck av dominant negativa mutanter av proteinet, så var de inte längre känsliga mot behandlingen.

Dessa cellinjer är gamla och har odlats länge i labb, i vissa fall i årtionden, och frågan är hur relevanta modeller av äggstockscancer de är idag. För att komma närmre ett test av hur denna behandling skulle kunna fungera kliniskt så genererade vi primära cellinjer från två äggstockstumörer och behandlande dem på samma sätt som i försöken beskrivna ovan. Båda dessa nya cellinjer svarade likadant som den känsliga cellinjen vi gjorde de ursprungliga försöken på.

Innan jag lämnade labbet så initierade vi även försök för att se om zVAD och IAPa fungerade på hela tumörer och inte bara på celler odlade i odlingsskålar. För att testa detta behandlade vi möss med äggstockstumörer med zVAD och IAPa. Resultaten av dessa försök är lovande, men ännu ej konklusiva. Vi såg en effekt på tumörstorlek, men vi behöver behandla fler möss för att kunna dra klara slutsatser. Vi vill även testa att dosera behandlingen annorlunda för att se om vi kan öka effekten ytterligare. Tillsammans med våra övriga resultat så stärker detta vår förhoppning om att denna behandling skall kunna fungera även på patienter med äggstockscancer, och kanske även andra cancerformer.