

Hamlet and Bamlet

Hamlet ve Bamlet

İzzet Ülker¹, Gamze Akbulut²

ÖZET

HAMLET (Human Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells) insan sütünden elde edilen laktoalbumin ile oleik asidin kompleks oluşturarak kanser hücrelerinin ölmesini sağlayan bileşiktir. BAMLET (Bovine Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells) ise büyükbaş hayvanların sütünden elde edilen laktoalbumin ile oleik asidin bileşik oluşturması ile kanser hücrelerine sebep olan bileşiktir. Her iki bileşik de in vitro koşullarda oluşabildiği gibi, mide de oluşabilmektedir. Tümör hücreleri apoptoz, nekroz, otofajik gibi çeşitli yollarla hücre ölümlerine uğrayabilir. Her iki bileşiğin de kanser hücreleri üzerine etkileri apoptoza benzetilmektedir. Literatürde her iki bileşikle yapılmış hayvan ve insan çalışmaları olmakla birlikte henüz araştırma aşamasında olan bir tedavi yöntemidir.

Anahtar Noktalar: Hamlet, Bamlet, Apoptoz

ABSTRACT

HAMLET (Human Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells) is a compound that allows the cancer cell to die by forming a complex of oleic acid with lactoalbumin derived from human milk. BAMLET (Bovine Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells) is a compound that causes the cancer cell to form oleic acid with lactoalbumin, which is obtained from the milk of bovine animals. Both compounds can form in the stomach as well as in vitro conditions. Tumor cells may undergo cell death in a variety of ways, including apoptosis, necrosis, and autophagic. The effects of both compounds on cancer cells are similar to apoptosis. Despite the fact that both animal and human studies are conducted with both compounds in the literature, they are a treatment method which is still in research stage.

Keywords: Hamlet, Bamlet, Apoptosis

Geliş Tarihi: 09/08/2018

Kabul Tarihi: 24/10/2018

Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü

İletişim: Araş. Gör. İzzet Ülker

Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Fakültesi, Beslenme ve Diyetetik Bölümü Beşevler/ANKARA

Tel: 0544 219 87 38

E-posta: izzetulker@gmail.com

Giriş

HAMLET (Human Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells), tümör hücrelerini yok etmek için alfa laktoalbumin ile oleik asitten meydana getirilmiş bir komplekstir. Bu kompleks tümör hücreleri için öldürücü etki gösterirken sağlıklı hücrelere herhangi bir zararı yoktur [1]. HAMLET'in keşfedilmesi tesadüfen olmuştur ve literatürde tanımlaması ilk kez 1995 yılında yapılmıştır [2]. İnsan sütünde bulunan bir yapının tümör hücrelerini öldürdüğü ve sağlıklı hücrelerin bu yapıya karşı dayanıklı olduğu keşfedilmiştir. Daha sonra bu yapının oleik asitle kompleks yapmış alfa laktoalbumin olduğu keşfedilmiştir [1]. Yapılan in vivo ve klinik çalışmalarda antitümoral etkisinin kanıtlandığı bildirilmektedir [3]. HAMLET'e benzer şekilde büyükbaş hayvanların sütünde bulunan alfa laktoalbuminin oleik asitle kompleks oluşturmuş ve adı BAMLET (Bovine Alpha-lactalbumin Made Lethal to Tumor cells) olarak bildirilen bileşikte kanser hücresi öldürücüsü olarak tanımlanmaktadır [4]. Bu derleme yazıda HAMLET ve BAMLET'in moleküler yapısı, etki mekanizması ve konu ile ilgili yapılan güncel çalışmalara yer verilmiştir.

HAMLET'in Moleküler Yapısı

Proteinlerin katlanmamış yapısı dokular için tehdit unsurları arasında yer almaktadır. Katlanmamış yapıdaki proteinler genellikle doku yıkımı ve hastalıklarla ilişkilendirilmektedir [5]. Alfa laktoalbumin insan sütünün temel protein bileşenidir. Alfa laktoalbuminin üç boyutlu yapısı, dört alfa-heliks, bir üçlü beta-tabakası ve bir kalsiyum bağlanma bölgesi bulunmaktadır [6]. Normal süreçte laktoz sentezi için kofaktördür ve hücre ölümüne neden olmaz. Bu yapının antitümoral olması için yapı kısmi açılım göstermeli ve oleik asit bileşiği bu yapıya bağlanmalıdır. HAMLET iki aşamada oluşturulmaktadır. Önce, a-laktoalbumin, etilendiamin tetra asetik asit (EDTA) veya asit ile kalsiyum iyonunu (kırmızı)

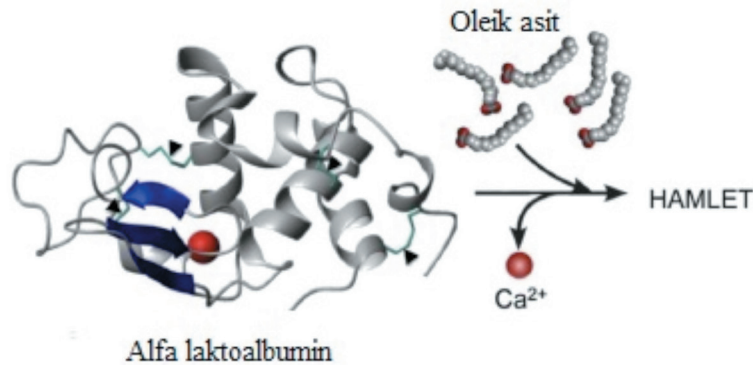
çıkararak kısmen açılır. Sonrasında, oleik asit proteine bağlanarak kompleks yapı oluşur ve buna HAMLET adı verilir [5]. Alpha-laktoalbumin, insan sütünde en fazla bulunan proteindir ve en fazla bulunan yağ asidi oleik asittir. HAMLET'in in-vivo oluşup oluşmadığı bilinmemekle birlikte, midede asidik koşulların HAMLET oluşumu için elverişli bir ortam oluşturduğu ileri sürülmektedir. Düşük pH'ın, güçlü bağlanmış kalsiyum iyonunun serbest bırakılması nedeniyle a-laktoalbuminin kısmen açılmasına neden olduğu bilinmektedir [6].

HAMLET'in Etki Mekanizmaları

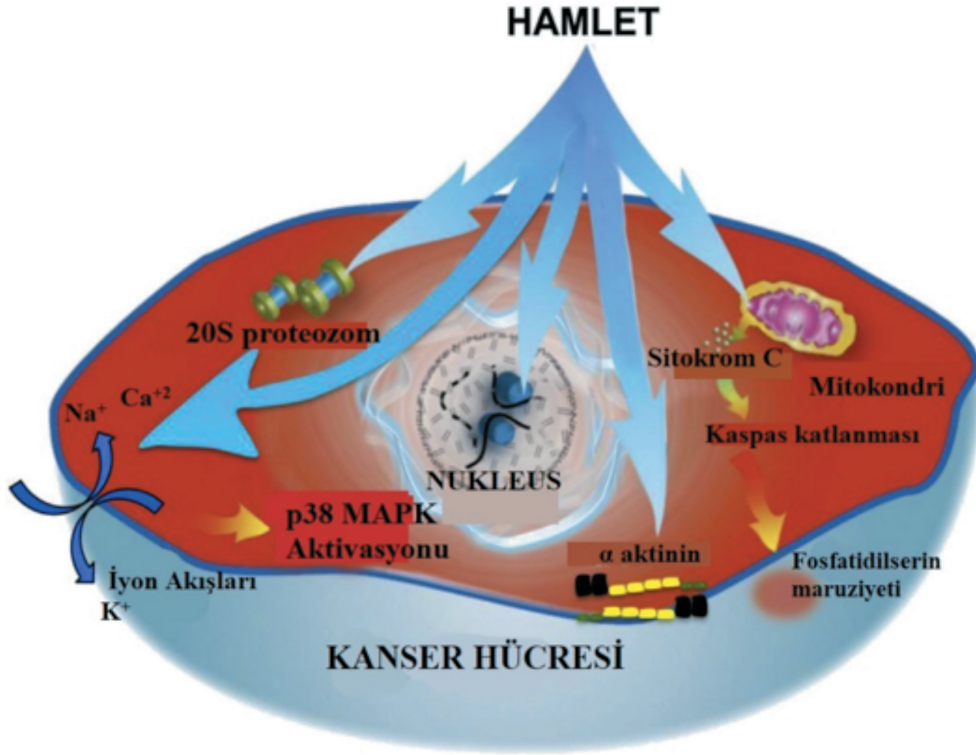
Tümör hücreleri apoptoz, nekroz, otofajik gibi çeşitli hücre ölümlerine uğrayabilir. Bununla birlikte, tümör hücreleri kendi ölümünü engellemek için, gen amplifikasyonu, delesyonlar ve mutasyonlar gibi çeşitli direnç mekanizmalarına sahiptir. İyonlaştırıcı radyasyon ve çoğu kemoterapötik ajan, genellikle kaspaz protein aktivasyonu, hücre proteinlerin bölünmesi, hücre ölümü ve fagositoza yol açan mitokondriyal sinyal yolunun aktivasyon yoluyla apoptozu aktive ederek tümör hücrelerini öldürür [8].

HAMLET'in etki mekanizması apoptozla benzeilmektedir. HAMLET hücrenin yüzeyine bağlanarak tümör hücrelerine saldırı başlatır ve sonrasında hızla tümör hücrelerini kaplar. Bu mekanizma tam olarak anlaşılabilmiştir, ancak etkinin sağlanabilmesi için hem alfa laktoalbuminin açılması hem de yağ asidinin olması gereklidir. Tümör hücrelerinin ölümünün gerçekleşmesi için kaspaz proteinleri aktive olmalıdır. Kaspaz 3 ve 9'un aktive olması ile DNA hasarına neden olan kaspaz 2 proteini aktive olur. Mitokondriyal hasar ve sitokrom C salınımı meydana gelir. Buna tepki olarak kaspaz protein inhibitörleri oluşur ancak hücre ölümünü durduramaz [9].

Mitokondrinin yanı sıra, HAMLET'in tümör hücrelerindeki diğer hedefleri normalde endojen katlanmayan veya ubiquitinlenmiş proteinleri bozan proteazom-



Şekil 1. Hamlet oluşumu [7]



Şekil 2. HAMLET'in kanser hücresi üzerine etkisi [7]

lardır [10, 11]. HAMLET'e maruz kalan tümör hücrelerinde proteozomların etkinleşmesi de hücrelerin ölümüne neden olan diğer bir noktadır [5]. Hücrede HAMLET'in birikmesini önlemek için oluşturulan etki mekanizması yeterli düzeyde değildir.

HAMLET ayrıca tümör hücresi çekirdeği ile de etkileşime girer. Tümör hücreleri, HAMLET'e maruz kaldıktan yaklaşık bir saat sonra HAMLET çekirdeklerin içine ulaşır. Daha sonra H3 ve H4 histonlarına yüksek afinite ile H2a ve H2b histonlarına ise daha az afiniteyle bağlanır [12]. HAMLET, bozulmamış nükleozomları çok yüksek afinite ile bağlayarak, tümör hücrelerinin çekirdeğinde çözünmeyen kromatin komplekslerinin oluşumuna neden olur.

HAMLET ile histon deasetilaz (HDAC) inhibitörleri kombine edildiğinde histon asetilasyonunu artırdığı da bildirilmektedir. HDAC inhibitörlerinin genel kromatin yapısı üzerinde etkisi yoktur, ancak HAMLET çekirdeklerin bütülmesini sağlayarak kromatin yoğunlaşmasına neden olabilmektedir. HAMLET'in neden olduğu DNA hasarı, p53, p21(waf1) ve gadd153 gibi DNA hasar sensörü proteinlerinin ekspresyonunda bir artış ile ilişkilendirilmektedir. Bu sonuçlar, HAMLET'in sitotoksik etkilerinin, kromatin bütülmesi, DNA hasarı ve DNA parçalanması gibi etkileri olan HDAC inhibitörleri ile potansiyasyona uğradığını düşünülmektedir.

HAMLET'in tümör hücrelerinde diğer bir olası mekanizması da makrotofajiyi indüklemesi ile hücre

ölümü oluşturabilmesidir. Otofaji, uzun süre devam eden sitozolik proteinlerin ve organellerin bozulması için oluşan hücrel bir süreçtir [13]. Makrotofaji sırasında, sitoplazma ve organeller, otofagosom adı verilen, çift zarla kapatılmış vezikülleri oluşturan membran keselerinde bulunur. Otofagosomlar daha sonra lizozomlarla kaynaşır ve lizozomal enzimler içeriğini yeniden kullanım için bozarlar [14]. Makrotofaji birçok hücrede bazal seviyelerde bulunur, ancak açlık gibi hücrel strese yanıt olarak artar [15]. Ayrıca, gelişim, farklılaşma ve bağışıklık savunmasında bir rol oynar [16]. Buna ek olarak, makrotofajinin, otofajik hücre ölümü veya tip II hücre ölümü olarak adlandırılan apoptotik olmayan bir programlanmış hücre ölümü formunda yer aldığı bildirilmektedir. Bununla birlikte, makrotofajinin hücre ölümü üzerindeki rolü hala tartışmalıdır [17, 18]. HAMLET'e maruz kalan hücrenin, geniş sitoplazmik vakuolizasyonu, hasar görmüş mitokondri ve çift membranların oluşması makrotofajinin düşünülmesine sebep olur. Dolayısıyla, HAMLET'in makrotofajiyi tetiklediği ve bu yanıtın hücre ölümüne katkıda bulunabileceği düşünülmektedir [5].

Özetle, HAMLET çoklu tümör hücre bölmeleriyle etkileşime girerek, hücre morfolojisi, metabolizması, proteazom fonksiyonu, kromatin yapısı ve canlılığını etkileyerek kanser hücrelerini etkilemektedir [19]. HAMLET'e maruz kalan kanser hücrelerinde nükleer yoğunlaşma, sitoplazma kaybı ve membran yüzeyinde

çıkıntuların olduğu bildirilmektedir [7]. İlk zar etkileşimlerinden sonra HAMLET tümör hücreleri tarafından içselleştirilir, lizozomlar, mitokondri ve proteazomlar ile etkileşime uğrar. Daha sonra çekirdeğe translokasyon yapar ve tümör hücresi çekirdeğinde birikir. Organelere özgü moleküler etkileşimlere sebep olur, ayrıca proteazom inhibisyonu, kromatin modifikasyonu, transkripsiyonel inhibisyon ve kanser hücrelerinin ölümüne yol açmaktadır [20].

HAMLET'in Terapötik ve Profilaktik Etkileri α aktinin

HAMLET ile hayvan çalışmaları ve klinik çalışmalar literatürde yer almaktadır [7, 21]. HAMLET'in mesane kanseri, kolon kanseri gibi kanser türlerinde terapötik etkinliği bildirilmektedir.

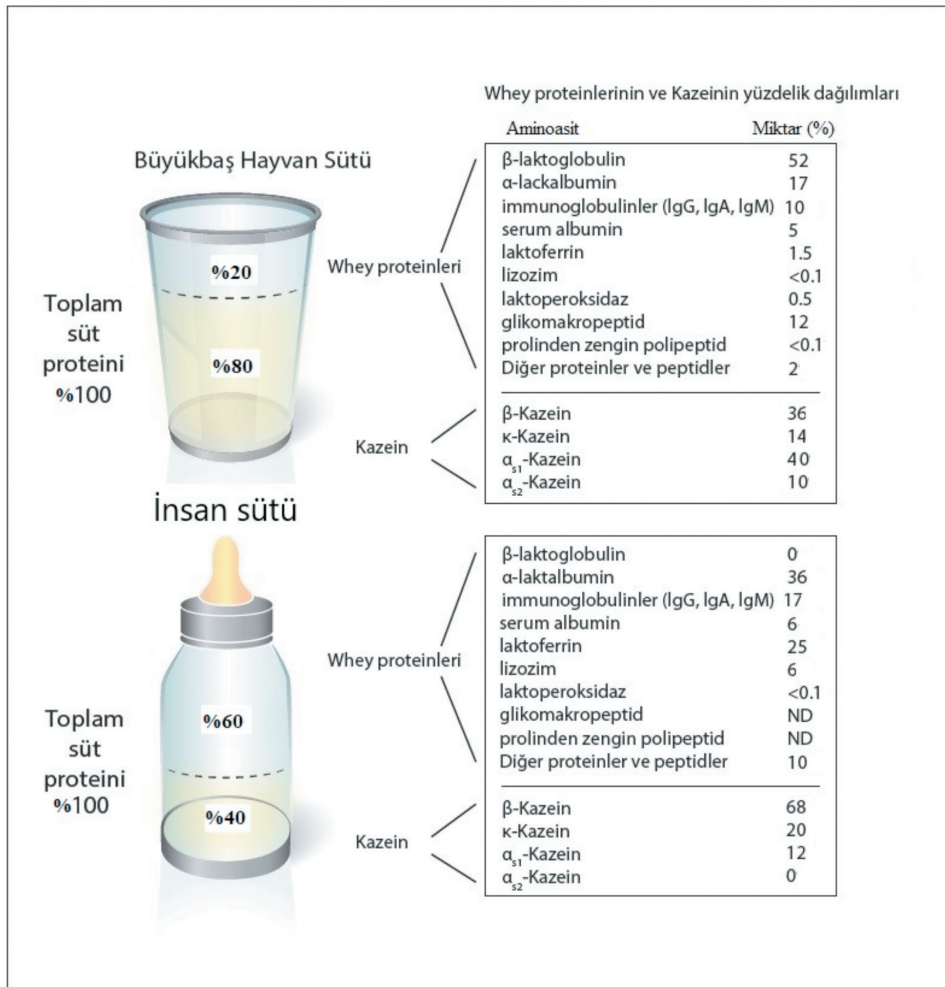
Hayvan Çalışmaları

HAMLET ile ilgili yapılan hayvan çalışmaları mesane kanseri, kolon kanseri ve glioblastomlar üzerinde yapılmıştır. Mesane kanserinde HAMLET'in bölgesel

instilasyonunun tümör gelişiminde bir azalma sağladığı bildirilmektedir [21]. Tümör gelişiminin olduğu farelerde HAMLET'in vücutta kalma süresinin tümör bulundurmayanlara göre daha uzun olduğu bildirilmektedir. Tedavinin uygulanması ile tümör hacminin küçüldüğü ve yeni tümörün gelişimini önemli ölçüde azalttığı gösterilmektedir [7].

HAMLET'in glioblastomlar üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada, lokal infüzyonları ile tümör gelişimini geciktirdiği ve sağ kalımı uzattığı bulunmuştur. HAMLET'in tümörün içine nüfuz ettiği ve tümör hücrelerinde apoptozu tetiklediği vurgulanmaktadır. Sağlıklı beyin için HAMLET toksisitesi hakkında bir kanıt bulunmamaktadır [22].

Kolon kanseri üzerine etkisinin araştırıldığı bir çalışmada ise HAMLET'in özellikle tümör dokusunda biriktiği bildirilmektedir. Buna paralel olarak, HAMLET uygulamasından sonra önemli onkoproteinlerin salgılanması ile B-catenin, Ki67 antikor, siklooksijenaj-2 inhibitörü ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) seviyelerinin azaltıldığı vurgulanmaktadır. Bu



Şekil 3. İnsan sütü ve büyükbaş hayvan sütü protein oranları[26]

tedavi, HAMLET'in profilaktik hareket ettiğini ve tümör gelişimini %60 oranında azaltabileceğini düşündürmektedir [23].

İnsan Çalışmaları

HAMLET'in insanlar üzerindeki etkinliğinin araştırıldığı çalışmalar mesane kanseri ve deri papillomları ile sınırlıdır. Mesane kanseri hücrelerinin HAMLET'e cevap verip vermediğini araştırmak için, mesane kanseri olan hastalara, mesane ameliyatından sonraki beş gün, mesaneye lokal olarak HAMLET enjeksiyonu yapılmıştır. İki saat sonra idrar içinde çok miktarda tümör hücrelerinin atıldığı tespit edilmiştir. Çalışma sonucunda kanser hücrelerinin çoğunun öldüğü ve apoptoz bulgusu olduğu gösterilmiştir. Sistoskopi ile ameliyat sırasında tümör boyutunda bir azalma ve biyopsi örneklerinde apoptotik hücrelerin olduğu saptanmıştır [24].

HAMLET'in deri papillomları üzerindeki etkinliğinin araştırıldığı bir çalışmada ise ellerde ve ayaklarda şiddetli, tedaviye dirençli papillomalı hastalara 3 hafta boyunca (1 uygulama/hafta) HAMLET veya tuzlu su çözümü uygulanmıştır. HAMLET'in topikal uygulanmasının, lezyon hacmini %75 azalttığı bulunmuştur. Ayrıca HAMLET ile tedavi edilen hastaların yaklaşık %83'ünde tüm lezyonların, iki yıl sonra tamamen iyileştiği bildirilmiştir [25].

BAMLET

HAMLET'in insan sütünde bulunan alfa laktoalbuminin oleik asitle kompleks oluşturarak kanser hücresi öldürücüsü olarak nitelendirilirken, BAMLET ise büyükbaş hayvanların sütünde bulunan alfa laktoalbuminin oleik asitle kompleks oluşturmuş 'kanseri öldürücüsü' olarak tanımlanmaktadır [4]. İnsan sütü ile büyükbaş hayvan sütü karşılaştırıldığında insan sütünün whey proteini oranı %60 iken, büyükbaş hayvan sütünde bu oran %20'ye düşmektedir. Whey proteinleri içinde laktoalbumin oranları ise sırasıyla insan sütü ve büyükbaş hayvan sütü için %36 ve %17'dir [26].

Literatürde HAMLET ile BAMLET'in etkilerinin karşılaştırıldığı çalışmaya rastlanmamıştır. Süt türlerinin içerdiği protein oranlarının farklı olmasına rağmen BAMLET'inde tümör hücrelerine etkilerinin HAMLET ile benzer olduğu bildirilmektedir. BAMLET'in kanser hücrelerinde lizozomal hücre ölüm yolunu tetiklediği ve böylece alfa-laktokalbümin: oleat komplekslerinin apoptoza dirençli tümör hücrelerini öldürme kabiliyeti olduğu bildirilmektedir [27].

Sonuç ve Öneriler

HAMLET'in kanser hücreleri üzerine etkisinin araştırıldığı çalışmalara göre tıbbi tedavinin yanında HAMLET alternatif bir tedavi olarak düşünülebilir. Ya-

pılan bazı in vitro çalışmalarda kullanımın sitotoksik olduğu bildirilmesine rağmen in vivo çalışmalarda bu etkinin görülmediği bildirilmektedir. Benzer şekilde BAMLET'in de kanser hastalarında olumlu sonuçlar getirdiği bildirilmektedir. Ancak yapılan çalışma sayısının az olması, HAMLET veya BAMLET'in tek başına bir tedavi olarak nitelendirilmesi şu anda mümkün değildir. Yapılacak daha fazla çalışma ve çalışmaların özelliklerine göre ilerleyen zamanlarda uygun bir tedavi olduğu sonucuna ulaşılabilir.

Kaynaklar

1. Svensson M, Hakansson A, Mossberg AK, Linse SSvanborg C. Conversion of alpha-lactalbumin to a protein inducing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000;97:(8): 4221-6.
2. Hakansson A, Zhivotovsky B, Orrenius S, Sabharwal HSvanborg C. Apoptosis induced by a human milk protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995;92:(17): 8064-8.
3. Fang B, Zhang M, Tian M, Jiang L, Guo HYRen FZ. Bovine lactoferrin binds oleic acid to form an anti-tumor complex similar to HAMLET. *Biochim Biophys Acta*, 2014;1841:(4): 535-43.
4. Rath EM, Duff AP, Hakansson AP, Vacher CS, Liu GJ, Knott RBChurch WB. Structure and Potential Cellular Targets of HAMLET-like Anti-Cancer Compounds made from Milk Components. *J Pharm Pharm Sci*, 2015;18:(4): 773-824.
5. Mok KH, Pettersson J, Orrenius SSvanborg C. HAMLET, protein folding, and tumor cell death. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007;354:(1): 1-7.
6. Permyakov EABerliner LJ. alpha-Lactalbumin: structure and function. *FEBS Lett*, 2000;473:(3): 269-74.
7. Ho JC, Nadeem ASvanborg C. HAMLET - A protein-lipid complex with broad tumoricidal activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017;482:(3): 454-458.
8. Kaufman RJ. Orchestrating the unfolded protein response in health and disease. *J Clin Invest*, 2002;110:(10): 1389-98.
9. Hallgren O, Gustafsson L, Irjala H, Selivanova G, Orrenius SSvanborg C. HAMLET triggers apoptosis but tumor cell death is independent of caspases, Bcl-2 and p53. *Apoptosis*, 2006;11:(2): 221-33.
10. Ciechanover A. Intracellular protein degradation: From a vague idea thru the lysosome and the ubiquitin-proteasome system and onto human diseases and drug targeting. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2017;30:(4): 341-355.
11. Goldberg AL. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature*, 2003;426:(6968): 895-9.

12. Durringer C, Hamiche A, Gustafsson L, Kimura H, Svanborg C. HAMLET interacts with histones and chromatin in tumor cell nuclei. *J Biol Chem*, 2003;278(43): 42131-5.
13. Yorimitsu T, Klionsky DJ. Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, 2005;12 Suppl 2: 1542-52.
14. Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct*, 2002;27(6): 421-9.
15. Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ*, 2005;12 Suppl 2: 1509-18.
16. Deretic V. Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr Opin Immunol*, 2006;18(4): 375-82.
17. Baehrecke EH. Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005;6(6): 505-10.
18. Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G. Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy*, 2005;1(2): 66-74.
19. Ho J, Sielaff H, Nadeem A, Svanborg C, Gruber G. The molecular motor F-ATP synthase is targeted by the tumoricidal protein HAMLET. *J Mol Biol*, 2015;427(10): 1866-74.
20. Gustafsson L, Aits S, Onnerfjord P, Trulsson M, Storm P, Svanborg C. Changes in proteasome structure and function caused by HAMLET in tumor cells. *PLoS One*, 2009;4(4): e5229.
21. Mossberg AK, Hou Y, Svensson M, Holmqvist B, Svanborg C. HAMLET treatment delays bladder cancer development. *J Urol*, 2010;183(4): 1590-7.
22. Fischer W, Gustafsson L, Mossberg AK, Gronli J, Mork S, Bjerkvig R, Svanborg C. Human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells (HAMLET) kills human glioblastoma cells in brain xenografts by an apoptosis-like mechanism and prolongs survival. *Cancer Res*, 2004;64(6): 2105-12.
23. Puthia M, Storm P, Nadeem A, Hsiung S, Svanborg C. Prevention and treatment of colon cancer by peroral administration of HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumour cells). *Gut*, 2014;63(1): 131-42.
24. Mossberg AK, Wullt B, Gustafsson L, Mansson W, Ljunggren E, Svanborg C. Bladder cancers respond to intravesical instillation of HAMLET (human alpha-lactalbumin made lethal to tumor cells). *Int J Cancer*, 2007;121(6): 1352-9.
25. Gustafsson L, Leijonhufvud I, Aronsson A, Mossberg AK, Svanborg C. Treatment of skin papillomas with topical alpha-lactalbumin-oleic acid. *N Engl J Med*, 2004;350(26): 2663-72.
26. Artym J, Zimecki M. Milk-derived proteins and peptides in clinical trials. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2013;67: 800-16.
27. Rammer P, Groth-Pedersen L, Kirkegaard T, Dugaard M, Rytter A, Szyniarowski P, Hoyer-Hansen M, Povlsen LK, Nylandsted J, Larsen JE, Jaattela M. BAMLET activates a lysosomal cell death program in cancer cells. *Mol Cancer Ther*, 2010;9(1): 24-32.