

СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО БЕЛКА TRAIL И ЕГО МОДИФИЦИРОВАННОЙ ФОРМЫ *IN VITRO*

Н. В. Долгих^{1,2}, Р. С. Фадеев^{1,2}, А. В. Чеканов^{1,2}, В. С. Акатов^{1,2}

¹ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

² Пуцинский государственный естественно-научный институт

Поступила в редакцию 30.06.2011 г.

Аннотация. В настоящее время цитокин TRAIL рассматривается как потенциальный кандидат для противоопухолевой терапии, благодаря его способности инициировать апоптотическую гибель опухолевых клеток, не повреждая нормальные клетки. В нашем исследовании мы сравнивали цитотоксическую активность двух растворимых рекомбинантных человеческих белков TRAIL — модифицированной формы белка m-TRAIL и белка TRAIL дикого типа. Действие m-TRAIL на опухолевые клетки показало более сильный цитотоксический эффект, чем действие белка TRAIL дикого типа. Нами было показано, что модифицированный рекомбинантный человеческий белок m-TRAIL является перспективным противоопухолевым агентом для клиники.

Ключевые слова: цитотоксичность, противоопухолевые препараты, TRAIL, клеточные линии.

Abstract. Currently cytokine TRAIL is considered to be a potential candidate for anti-cancer therapy, due to its ability to induce apoptosis in cancer cells but not in normal cells. In our experimental study we compare cytotoxic activity of two soluble recombinant human proteins TRAIL — modified m-TRAIL and wild type TRAIL. Treatment with m-TRAIL resulted in more significant toxic effect on cancer cells than treatment with wild type TRAIL. We found out that modified recombinant human protein m-TRAIL is promising agent for cancer therapy.

Keywords: cytotoxicity, anti-cancer drugs, TRAIL, cell lines.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время важной социально-значимой задачей является поиск нового противоопухолевого препарата, селективно действующего исключительно на опухолевые клетки. В этой связи большой интерес представляет применение противоопухолевого белка TRAIL. Природный белок TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) — это цитокин суперсемейства фактора некроза опухолей. В организме человека цитокин TRAIL располагается на поверхности некоторых клеток иммунной системы [1—4]. Цитокин TRAIL способен селективно инициировать апоптотическую гибель опухолевых клеток, не повреждая нормальные клетки организма [5—7]. Эта уникальная особенность TRAIL дает возможность создать на основе этого белка высокоэффективный нетоксичный противораковый препарат [1].

Природный цитокин TRAIL является мембранно-связанным белком, а для изучения биологических свойств белка TRAIL и его дальнейшего использования в клинической практике для те-

рапии онкологических заболеваний необходима разработка и получение растворимой формы рекомбинантного белка.

Такой рекомбинантный растворимый человеческий белок rhApo2L/TRAIL разработанный совместно компаниями Genentech и Amgen [6], является внеклеточным доменом природного цитокина TRAIL (114—281 аминокислотные остатки), это так называемый белок TRAIL дикого типа. В исследованиях *in vitro* показана способность белка rhApo2L/TRAIL вызывать апоптотическую гибель опухолевых клеток, не вызывая каких-либо повреждений нетрансформированных нормальных клеток. В настоящее время проводятся клинические испытания белка rhApo2L/TRAIL [1]. Однако отсутствие связи с мембранной дестабилизирует внеклеточный домен, и в действительности, rhApo2L/TRAIL легко образует димеры, связанные дисульфидной связью, которые имеют в 90 раз меньшую апоптотическую активность [8]. При хранении гомотримерная структура белка rhApo2L/TRAIL может преобразовываться в димерные или мономерные формы [9].

Для решения этой проблемы в нашей лаборатории на основе цитокина TRAIL создан рекомби-

© Долгих Н. В., Фадеев Р. С., Чеканов А. В., Акатов В. С., 2012

нантный модифицированный белок (m-TRAIL). Модификация данного белка имитирует условия связи внеклеточного домена TRAIL с мембраной, и таким образом, сохраняются стабильность трехмерной структуры и биологические функции TRAIL. Более высокая стабильность белка m-TRAIL, обеспечиваемая его модификацией, позволяет предположить, что новый белок m-TRAIL является более перспективным противоопухолевым агентом, нежели используемый в настоящее время в клинических испытаниях белок TRAIL дикого типа. Именно поэтому важно сравнить цитотоксическую активность *in vitro* белка TRAIL дикого типа и его модифицированной формы m-TRAIL.

МЕТОДИКА ЭКСПЕРИМЕНТА

В работе использовали клетки эпидермоидной карциномы гортани человека (линия HEP-2), гепатоцеллюлярной карциномы человека (линия HEPG2), аденокарциномы яичника человека (линия OVCAR-3) и карциномы предстательной железы человека (линия LNCaP), полученные из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Растворимый человеческий рекомбинантный белок TRAIL дикого типа (wtTRAIL) и модифицированный белок m-TRAIL были получены в лаборатории тканевой инженерии ИТЭБ РАН.

Клетки выращивали *in vitro* при 37 °C и 5% CO₂ в газовой фазе в смеси сред DMEM:199 (1:1) (Биолот, С-Петербург) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco) и 40 мкг/мл гентамицина. Для экспериментов клетки высевали в 96 луночные планшеты (Nunc) по 5 тыс. клеток в 100 мкл ростовой среды на лунку, и либо выращивали 3 сут. до конфлюентного состояния, либо использовали через 1 сут. растущие клетки. Исследуемые белки TRAIL добавляли в лунки планшета в уменьшающейся концентрации. В качестве контроля использовали лунки с культурами клеток без добавления в них белков TRAIL. После добавления белков опытные и контрольные культуры в планшетах инкубировали в течение 24 часов. Цитотоксичность белков TRAIL оценивали по количеству живых клеток в опытных и контрольных лунках как в работе [10]. Для этого питательную среду удаляли из лунок, культуры промывали фосфатным буфером pH 7.4, добавляли 0,2% раствор кристаллического фиолетового (Sigma) в 20% этаноле и окрашивали 10 мин. Затем клетки промывали, добавляли по 100 мкл на лунку

раствор (1%) SDS, и после лизирования клеток измеряли оптическую плотность в каждой лунке при длине волны 535 нм, используя планшетный спектрофлуориметр Infinite F200 (Tecan, Австрия). Для определения фоновой оптической плотности, в пустые лунки (без клеток) добавляли 1% SDS. Цитотоксический эффект оценивали по отношению разности между оптической плотностью в опыте и фоном к разности между оптической плотностью в контроле и фоном. Оптическая плотность была пропорциональна количеству живых клеток лунке.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В нашей работе мы проводили сравнительную оценку цитотоксической активности белка wtTRAIL дикого типа и модифицированной формы белка m-TRAIL на линиях клеток, полученных из человеческих карцином различного происхождения. Для того чтобы определить, зависит ли цитотоксичность белка TRAIL от плотности культуры, исследование проводили на редких растущих культурах и на конфлюентных (не растущих) культурах.

Данные, представленные на рис. 1 свидетельствуют, что растущие клетки эпидермоидной карциномы гортани человека (линия HEP-2) являются слабо чувствительными к цитотоксическому действию белка TRAIL дикого типа (wtTRAIL) даже при высоких концентрациях белка (1,5 мкг/мл), и очень чувствительны к цитотоксическому действию модифицированного белка m-TRAIL. Концентрация белка m-TRAIL, при которой он в два раза уменьшал количество живых клеток в растущей культуре клеток HEP-2 в сравнении с контролем (IC₅₀) равнялась 20 нг/мл, в то время как величина IC₅₀ белка wtTRAIL для таких культур превышала 1,5 мкг/мл (рис. 1а).

Белок TRAIL дикого типа в плотной конфлюентной культуре клеток линии HEP-2 практически не оказывает цитотоксического действия вплоть до концентрации 1 мкг/мл. В отличие от белка дикого типа, модифицированная форма белка m-TRAIL показала значительную цитотоксическую активность в более низких концентрациях порядка 30 нг/мл (рис. 1б).

Согласно данным литературы, клетки гепатоцеллюлярных карцином человека, в частности клетки линии HEPG2, являются нечувствительными к белку TRAIL дикого типа [11, 12]. Наши данные также указывают на то, что белок wtTRAIL не оказывает токсического действия на клетки

НерG2, независимо от плотности клеточной культуры. Добавление модифицированной формы белка m-TRAIL к клеткам линии НерG2 вызывает гибель клеток как в растущей (IC_{50} — 7 нг/мл), так и в конфлюентной (IC_{50} — 14 нг/мл) культуре (рис. 2).

Из литературных данных известно, что клетки различных аденокарцином яичника человека являются резистентными к действию белка TRAIL дикого типа [13]. Результаты нашей работы показали, что клетки линии аденокарциномы яичника человека OVCAR-3 не чувствительны к действию белка TRAIL дикого типа независимо от плотности клеточной культуры (рис. 3).

Применение модифицированной формы противоопухолевого белка m-TRAIL на редкой растущей культуре эффективно вызывает гибель клеток линии OVCAR-3 (значение IC_{50} 20 нг/мл) (рис. 3а). Однако в плотной культуре клеток линии OVCAR-3 происходило значительное повышение их резистентности к действию белка m-TRAIL, и величина IC_{50} превышала 100 нг/мл (рис. 3б).

Клетки карциномы предстательной железы человека (линия LNCaP) высоко резистентны к цитотоксическому действию рекомбинантного белка TRAIL [14]. Данные представленные на рис. 4 показывают, что клетки линии LNCaP являются резистентными не только к дикому типу

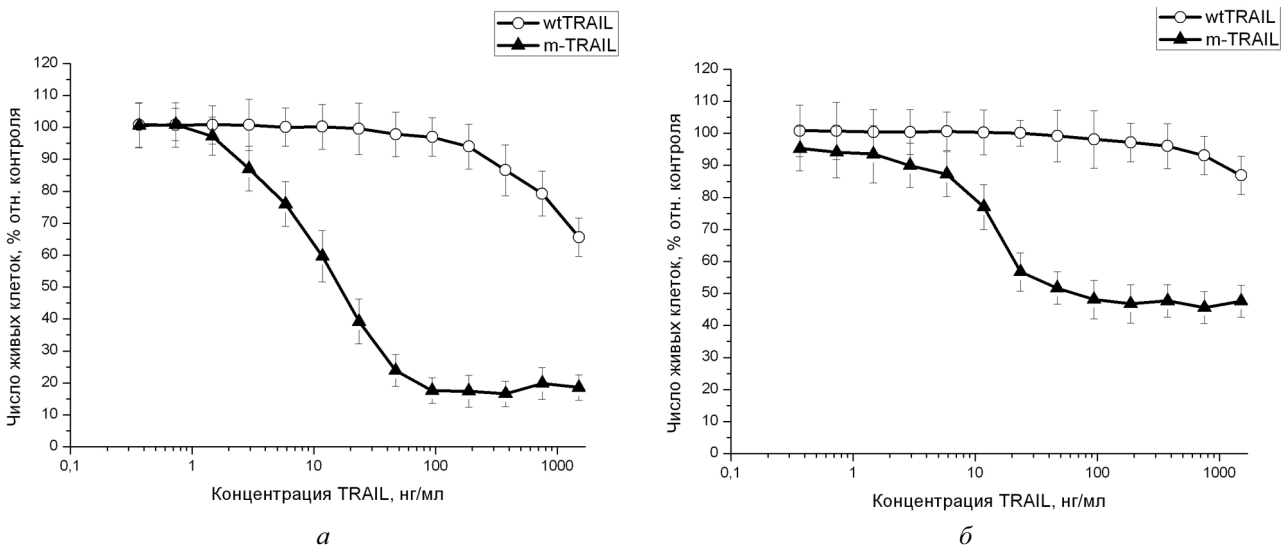


Рис. 1. Выживаемость клеток эпидермоидной карциномы гортани человека (линия Нер-2) при воздействии на них белка TRAIL дикого типа и модифицированной формы белка m-TRAIL, добавленных к растущей культуре (а), и к конфлюентной (не растущей) культуре (б)

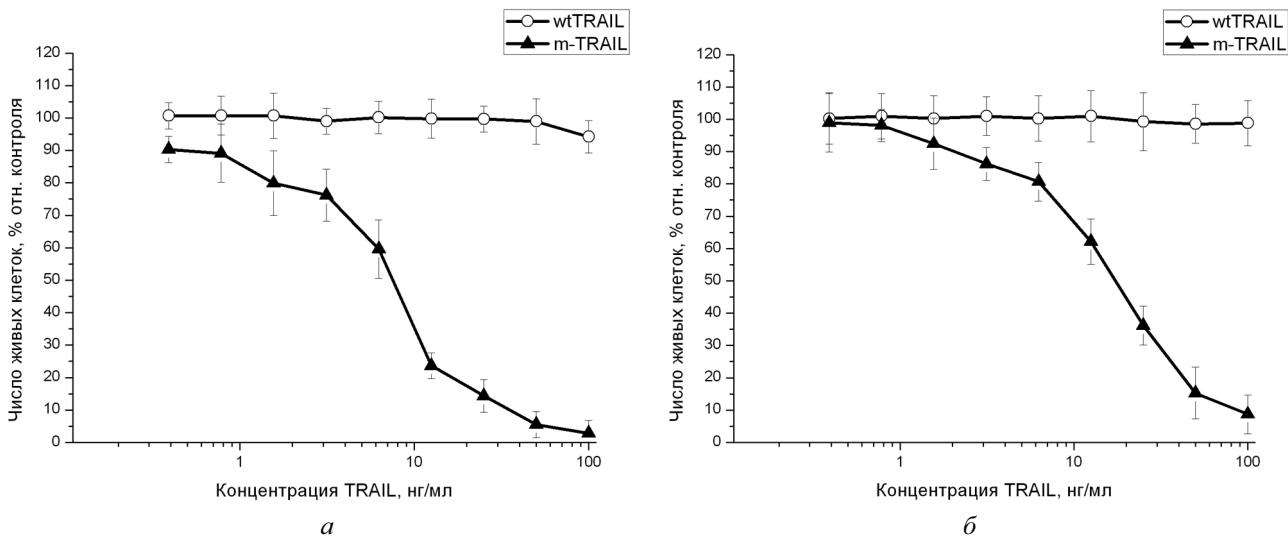


Рис. 2. Выживаемость клеток гепатоцеллюлярной карциномы (линия НерG2) при воздействии на них белка TRAIL дикого типа и модифицированной формы белка m-TRAIL, добавленных к растущей культуре (а), и к конфлюентной (не растущей) культуре (б)

белка wtTRAIL, что согласуется с данными литературы, но также не чувствительны к действию модифицированной формы белка m-TRAIL независимо от плотности культуры.

Отсутствие цитотоксического действия модифицированной формы белка m-TRAIL на редкой культуре показывает наличие конститутивной резистентности клеток линии LNCaP, в связи с чем, большой интерес представляют дальнейшие исследования по повышению чувствительности этих клеток к модифицированной форме m-TRAIL. Нами было показано, что можно добиться чувствительности таких клеток к действию модифицированной формы m-TRAIL, используя для этого мо-

дуляторы чувствительности данного белка [15]. Полученные ранее результаты указывают на то, что наиболее эффективная сенситизация раковых клеток к повреждающему действию рекомбинантного белка m-TRAIL для каждой клеточной линии достигается индивидуальным сочетанием цитокина m-TRAIL с оптимальным модулятором чувствительности этих клеток к данному белку [15].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе было показано, что уровень цитотоксической активности модифицированной формы m-TRAIL зависит от плотности клеточной культуры и происхождения клеточной линии. При

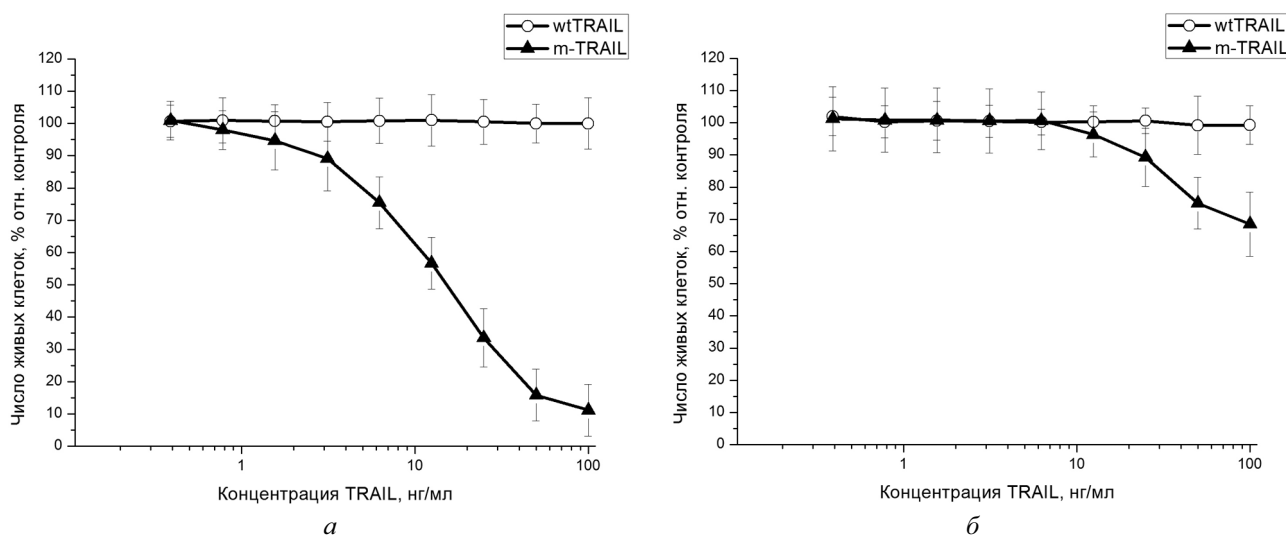


Рис. 3. Выживаемость клеток аденокарциномы яичника человека (линия OVCAR-3) при воздействии на них белка TRAIL дикого типа и модифицированной формы белка m-TRAIL, добавленных к растущей культуре (а), и к конфлюентной (не растущей) культуре (б)

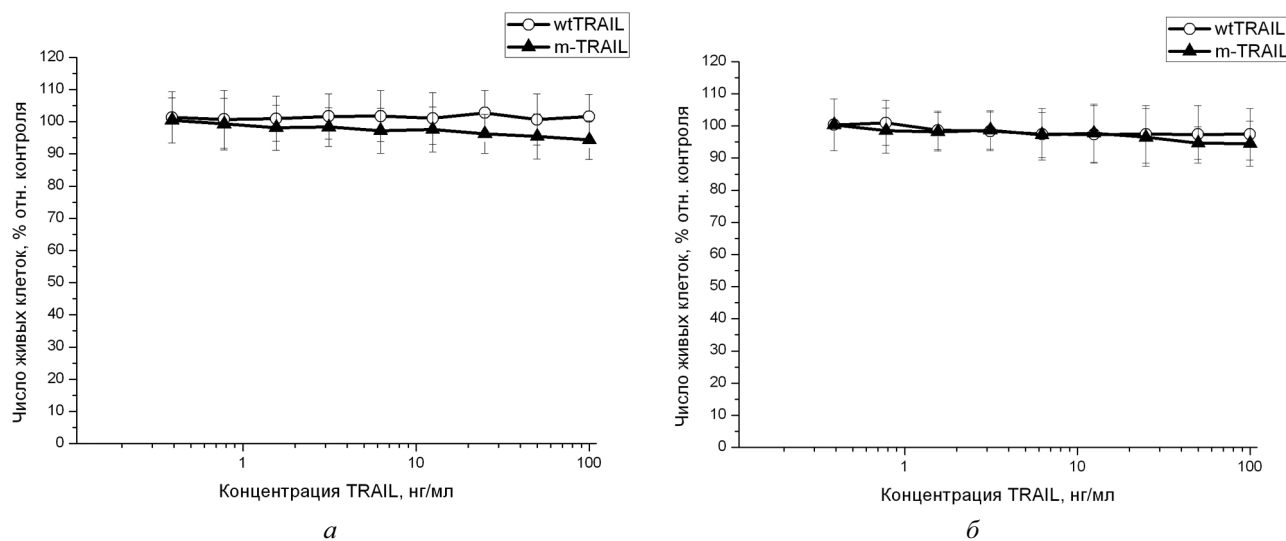


Рис. 4. Выживаемость клеток карциномы предстательной железы человека (линия LNCaP) при воздействии на них белка TRAIL дикого типа и модифицированной формы белка m-TRAIL, добавленных к растущей культуре (а), и к конфлюентной (не растущей) культуре (б)

переходе от модели клеточной культуры низкой плотности к высокой плотности происходит формирование резистентности клеток к цитотоксическому действию белка TRAIL.

Обобщая полученные результаты, можно заключить, что цитотоксическая активность модифицированного белка m-TRAIL значительно превышает активность TRAIL дикого типа, что справедливо для всех использованных клеточных линий. Неэффективность применения белка TRAIL дикого типа ставит под сомнение целесообразность его применения в клинике. Именно поэтому модифицированная форма белка m-TRAIL является более перспективным противоопухолевым агентом для клиники.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ВП «Развитие научного потенциала высшей школы» (Проект №4.3887.2011), ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009—2013 гг. (ГК № 02.740.11.0710) и ФЦП «Исследование и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России за 2007—2013 годы» (Госконтракт №16.512.11.2261) с использованием приборов Центра Коллективного Пользования ИТЭБ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ashkenazi A. Ligand-based targeting of apoptosis in cancer: the potential of recombinant human apoptosis ligand 2/Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhApo2L/TRAIL) / A. Ashkenazi, P. Holland, S.G. Eckhardt // *J Clin Oncol.* — 2008. — V. 26. — P. 3621—3630.
2. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells / N. Kayagaki [et al.] // *J Immunol.* — 1999. — V. 163. — P. 1906—1913.
3. Gonzalez F. New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL / F. Gonzalez, A. Ashkenazi // *Oncogene.* — 2010. — Vol.29. — P. 4752—4765.
4. Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells / K. Takeda [et al.] // *Nat Med.* — 2001. — V.7. — P. 94—100.
5. Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions / D. Lawrence [et al.] // *Nat Med.* — 2001. — Vol.7. — P. 383—385.
6. Johnstone R. W. The TRAIL apoptotic pathway in cancer onset, progression and therapy / R.W. Johnstone, A. J. Frew, M.J. Smyth // *Nat Rev Cancer.* — 2008. — V. 8. — P. 782—798.
7. Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand / A. Ashkenazi [et al.] // *J Clin Invest.* — 1999. — Vol. 104. — P. 155—162.
8. A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL / S. G. Hymowitz [et al.] // *Biochemistry.* — 2000. — Vol.39. — P. 633—40.
9. Trabzuni D. Functional analysis of tumour necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): cysteine-230 plays a critical role in the homotrimerization and biological activity of this novel tumoricidal cytokine / D. Trabzuni, K. S. Famulski, M. Ahmad // *Biochem J.* — 2000. — V. 350. — P. 505—510.
10. Повреждение ДНК и гибель опухолевых клеток в результате совместного действия витаминов B_{12b} и C / В. С. Акатов [и др.] // *ДАН.* — 2000. — Т. 373. — № 6. — С. 838—840.
11. Adenoviral gene transfer of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand overcomes an impaired response of hepatoma cells but causes severe apoptosis in primary human hepatocytes / S. Armeanu [et al.] // *Cancer Res.* — 2003. — V.63. — P. 2369—2372.
12. Parthenolide sensitizes hepatocellular carcinoma cells to trail by inducing the expression of death receptors through inhibition of STAT3 activation / D. Carlisi [et al.] // *J Cell Physiol.* — 2011. — V. 226. — P. 1632—1641.
13. Synergistic induction of apoptosis by the combination of trail and chemotherapy in chemoresistant ovarian cancer cells / M. Cuello [et al.] // *Gynecol Oncol.* — 2001. — Vol. 81. — P. 380—390.
14. Inhibition of Akt signaling by the lignan matairesinol sensitizes prostate cancer cells to TRAIL-induced apoptosis / E. Peuhu [et al.] // *Oncogene.* — 2010. — Vol.29. — P. 898—908.
15. Долгих Н.В. Специфичность сенситизации опухолевых клеток различного происхождения к повреждающему действию противоракового рекомбинантного белка m-TRAIL / Н. В. Долгих, Р. С. Фадеев, А. В. Чеканов // *Материалы Международного молодежного научного форума «Ломоносов-2011» [Электронный ресурс].* — М.: МАКС Пресс, 2011. — 1 электрон. опт. диск (DVD-ROM).

Долгих Надежда Владимировна — магистрант, Пушкинский государственный естественно-научный институт; тел.: (4967) 73-94-52, e-mail: n.v.dolgikh@gmail.com

Dolgikh Nadezda V. — master student of Pushchino State Natural Science Institute; tel.: (4967) 73-94-52, e-mail: n.v.dolgikh@gmail.com

Фадеев Роман Сергеевич — аспирант, Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пушкинский государственный естественно-научный институт; тел.: (4967) 73-94-52

Fadeev Roman S. — PhD student of Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino State Natural Science Institute; tel.: (4967) 73-94-52

Чеканов Алексей Владимирович — к.б.н., с.н.с., Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущинский государственный естественно-научный институт; тел.: (4967) 73-94-52

Акатов Владимир Семенович — д.ф.-м.н., профессор Пущинского государственного естественно-научного института, зав. лаб. тканевой инженерии Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН; тел.: (4967) 73-94-52

Chekanov Alexey V. — Ph.D in Biology. Senior Researcher of Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino State Natural Science Institute; tel.: (4967) 73-94-52

Akatov Vladimir S. — Doctor of Physical and Mathematical Sciences, professor of Pushchino State Natural Science Institute, the head of laboratory of tissue engineering at Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS; tel.: (4967) 73-94-52