

УДК 616-006.484-02:577.15.08:615.849.14

И.В. Уласов^{1,2}, Н.В. Каверина², З.Г. Кадагидзе², А.Ю. Барышников²**ПОДАВЛЕНИЕ ЭКСПРЕССИИ КЛЕТОЧНОЙ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ ТИП 14 УСИЛИВАЕТ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЙ ЭФФЕКТ ТЕМОЗОЛОМИДА И ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМ ЧЕЛОВЕКА**¹Центр опухолей головного мозга, Шведский медицинский центр, Сиэтл, США²ФГБНУ «РОНЦ им Н.Н. Блохина», Москва**Контактная информация**

Уласов Илья Валентинович, к.б.н., ведущий сотрудник центра лечения опухолей головного мозга

адрес: 550 17th Avenue, suite 570, Seattle, Wa, 98122, USA; тел. +1-206-991-2053

e-mail: ulasov75@yahoo.com

Статья поступила 03.10.2014, принята к печати 27.04.2015.

Резюме

Цель исследования – дать клиническую и биологическую характеристику ММП14 как гену, способствующему появлению рекуррентной глиобластомы.

Проанализированы клинические данные 108 и 129 образцов, представленные базами данных Rembrandt и Oncomine. Биологическое значение ММП14 было проанализировано путем нокдауна клеток U87 и U251 с последующим анализом их клеточного деления с помощью проточной цитофлуориметрии и генетического анализа уровня экспрессии генов, отвечающих за клеточное деление.

Ингибирование ММП14 нарушало деление опухолевых клеток и приводило к накоплению их в фазе G₂ клеточного деления, что коррелирует с уровнем экспрессии специфических киназ. Последующее облучение клеток ионизирующей радиацией и лечение темозоломидом приводило к значительному нарушению клеточной пролиферации, а комбинация темозоломида с ионизирующим излучением усиливала противоопухолевый эффект.

Полученные данные свидетельствуют о значительном уровне экспрессии ММП14 в неопластических клетках глиобластом. Коррекция гена ММП14, отвечающего за резистентность к темозоломиду и ионизирующей радиации, приводит к усилению их антиопухолевого эффекта.

Ключевые слова: глиобластома человека, ММП14, темозоломид.I.V. Ulasov^{1,2}, N.V. Kaverina², Z.G. Kadagidze², A.Y. Baryshnikov²**INHIBITION OF MT1-MMP (MMP14)****IMPROVES ANT-GLIOMA EFFECT OF COMBINATION:****TEMOZOLOMIDE-IONIZING RADIATION IN THE GLIOBLASTOMA CANCER CELLS**¹The Center for Advanced Brain Tumor Treatment, Swedish Medial Center, Seattle, USA;²FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow**Abstract**

The main goal of our study is to provide clinical and biological assessment of MMP14 as gene that causes recurrent glioblastoma. We analyzed expression of MMP14 in 108 and 129 samples represented by Rembrandt

8POncomine databases. The biological significance was done is based on genetic knockdown and rescuing of MMP14 attenuated U87 and U251 glioma cells followed by cytofluorimetry and array gene expression. As expected, genetic silencing of MMP14 led to accumulation cells in the “G₂” phase of cell divisions which correlates to cell kinase’s expression. Furthermore, exposure of MMP14 to ionizing radiation and temozolomide treatments prolongs glioma cell proliferation and increase the anti-glioma effect of temozolomide-ionizing radiation therapeutic combination. Our data suggest that most of the neoplastic glioma cells express significantly MMP14. Therefore, alteration of MMP14, improves anti-tumor effect.

Keywords: glioblastoma multiforme, MMP14, Temozolomide.**Введение**

ГБМ представляет собой агрессивную опухоль головного мозга человека, которая обладает высокой резистентностью к стандартной терапии

[1; 3; 8]. Текущие терапевтические подходы, основанные на хирургической резекции, радиотерапии и химиотерапии, пролонгируют выживаемость пациентов, но не предотвращают появление рекуррентной опухоли [11]. Таким образом, понимание меха-

низма, отвечающего за образование опухоли, имеет большое клиническое значение.

Металлопротеиназы являются ключевыми молекулами, отвечающими за миграцию и инвазию опухолевых клеток [2; 3]. Среди всех возможных типов металлопротеиназ, металлопротеиназа типа 14 является важным регулятором жизнеобеспечения опухоли. Недавно опубликованные результаты показывают, что роль ММП14 в процессе формирования опухоли не ограничена только миграцией [7]. Оказалось, что ММП14 участвует в ангиогенезе клеток и активации резистентности к терапии [9; 14]. Более того, ингибирование опухолевых клеток полиММП-ингибитором, химическим агентом маримастат, продлевало жизнь больных с опухолями головного мозга после стандартного курса радиотерапии [6; 10]. Наши недавние результаты показывают, что ингибирование ММП14 нарушает пролиферацию опухолевых клеток [12]. Таким образом, впервые показана роль ММП14 в регуляции пролиферации клеток глиобластом. В настоящей работе нами продемонстрирована ведущая роль ММП14 в регуляции деления клеток, а также важное значение ингибирования ММП14 для терапии глиобластом человека в присутствии ионизирующей радиации и темозоломида.

Материалы и методы

Клеточные линии

Эмбриональные клетки почки эмбриона человека HEK293, клетки глиобластомы человека U251 и U87 были получены из американской коллекции клеточных линий (ATCC, Manassas, США). Клетки были выращены в Дульбеко модифицированной среде Игла (DMEM; Life Technologies, США), содержащей 10 %-ной фетальной бычьей сыворотки (GIBCO-Life Technologies, США), L-глутамин (2мМ), пенициллин (100 IU/мл), стрептомицин (50 мг/мл) в 5 % CO₂ при температуре +37 °C.

Химические реагенты и вирусные векторы

Темозоломид и поли-ММП ингибитор маримастат были получены из Sigma-Aldrich (St Luis, Миссури, США). В качестве растворителя для темозоломида использовали ДМСО, для маримастата – воду. Для тестов *in vitro* использовали стоковый раствор (100 мМ для темозоломида и 3,8 мМ для маримастата), из которого готовили ряд десятикратных разведений в среде DMEM или MEM. Все стоковые растворы хранили при температуре –20 °C. Для получения стабильно-трансфицированных линий клеток по методу, описанному ранее [12], был использован лентивирусный вектор (Mission shRNA lentivirus transduction particles, Sigma Chemicals, St Luis, Миссури, США), содержащий либо контрольную анти-сенс (SHC002V), либо смысловую к гену ММП14 человека (NM_004995.2, TRCN0000050854) РНК.

Количественный ПЦР

Тотальная РНК была выделена из U87 и

U251 клеток глиобластом человека, стабильно трансфицированных лентивирусом, содержащим анти-сенс РНК к РНК гена ММП14 или контрольный РНК с помощью набора Rneasy mini kit (Qiagen, США). 1X TaqMan® One-Step RT-PCR Master Mix Reagents Kit (Applied Biosystems, Foster City, Калифорния, США) использовали для получения кДНК, ее копийность анализировали с помощью ПЦР в реальном времени. Реакцию количественного ПЦР с праймерами проводили на амплификаторе Opticon 2 (BioRad, USA). Последовательности праймеров, использованные в количественном ПЦР, были опубликованы ранее [5; 13; 15]. В качестве референсного гена использовали актин [4].

Определение ассоциации гена ММП14 с генами, участвующими в делении клеток

Аттенуированные лентивирусом, содержащим либо анти-сенс РНК к ММП14, либо контрольную РНК, клетки глиобластом человека U87 и U251, выращенные в присутствии пуромицина, были использованы для выделения тотальной РНК с последующим анализом экспрессии клеточных генов, используя SABioscience cell cycle RT2 profiler PCR (Qiagen, США). Уровень экспрессии каждого из 84 генов, участвующих в регуляции клеточного деления и дифференцировки, был определен по отношению к уровню РНК актина.

Тест для определения пролиферации клеток (MTT)

Опухолевые клетки культивировали при температуре +37 °C в присутствии 5 % CO₂ в среде DMEM, содержащей 2 мМ L-глутамин и 10% фетальной бычьей сыворотки («Atlanta Bio», Atlanta, США). Клетки, достигшие логарифмической фазы роста, пересаживали в плоскодонные 96-луночные микропланшеты («Costar», США) по 5 000–6 000 клеток на лунку и преинкубировали в указанных выше условиях в течение 24 ч перед добавлением тестируемого вещества – темозоломида в количестве 10 или 100 мкМ. Через 120 ч от начала эксперимента в каждую лунку добавили 3-(4,5-диметилтиазолил-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (MTT).

Спустя 4 часа инкубации при 5% CO₂ и 37 °C, в каждую лунку добавили 100 мкл ДМСО для ингибирования метаболической реакции и растворения формазана, образованного активно делящимися клетками. Оптическое поглощение было измерено при длине волны 540 нм. Жизнеспособность клеток производили по исключению красителя трипанового синего (Fisher Scientific США). Облучение клеток в присутствии ДМСО или темозоломида осуществлялось в установке «Phillips» в суммарной дозе 2 Гр при помощи дозы 1 Гр/мин.

Биоинформатический анализ экспрессии генов

с использованием научных баз данных

Использовали базы данных Oncomine и Rembrandt, содержащие данные об экспрессии генов в тканях и клеточных линиях, выделенных от

онкологических больных с различной степенью

злокачественности.

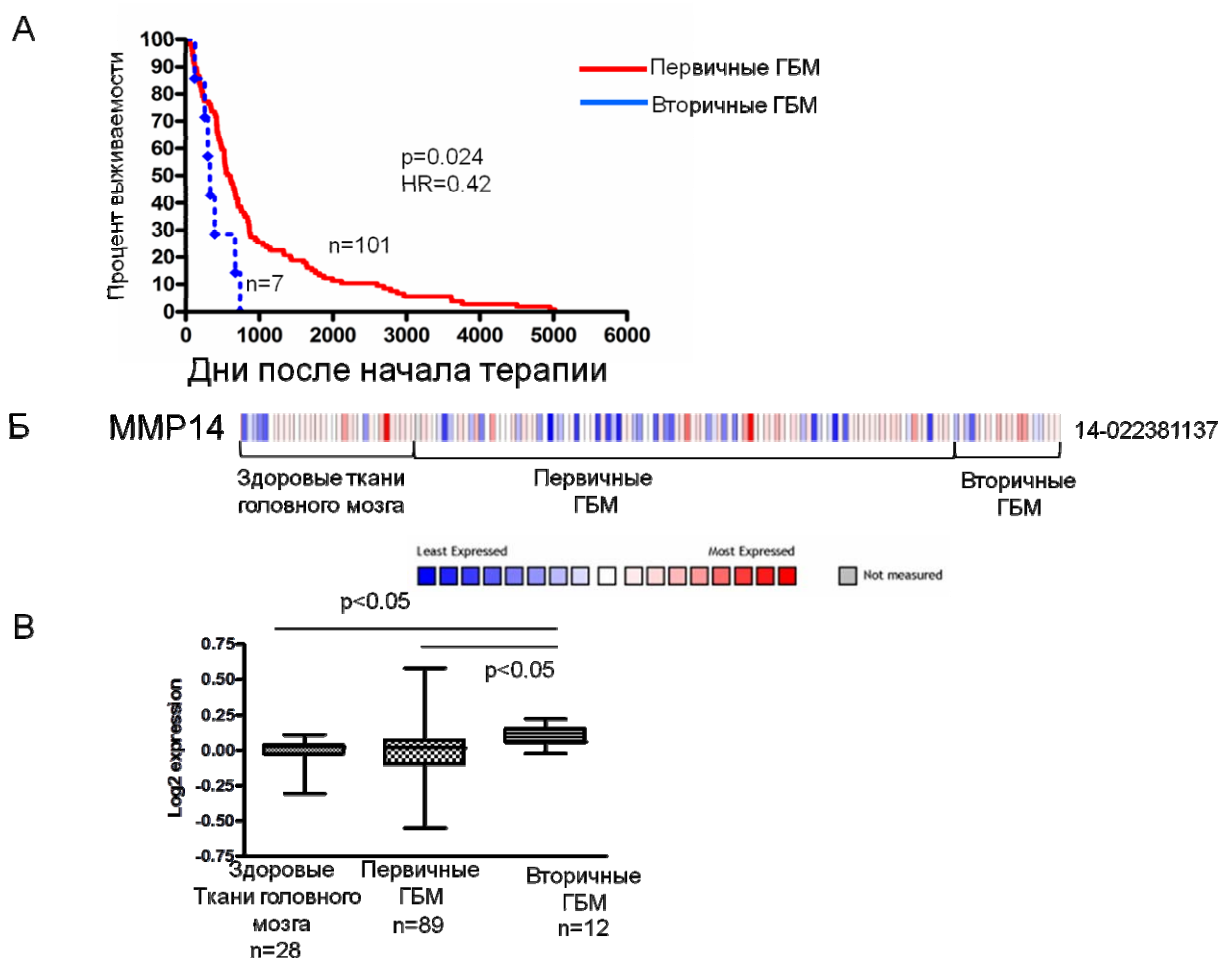


Рис. 1. Клиническое значение экспрессии ММП14 для пациентов с глиобластомами:

А. Влияние ММП14 на выживаемость;

Б. Графический анализ экспрессии гена ММП14 в клетках пациентов с первичными и вторичными глиобластомами и здоровых пациентов;

В. Уровень экспрессии гена ММП14 в клетках пациентов с глиобластомами, $*p<0,05$.

Уровень выживаемости пациентов с глиобластомами мозга в зависимости от уровня экспрессии в тканях гена ММП14, был проанализирован с помощью Каплан-Мейер кривой выживаемости и логарифмических данных, показывающих сравнительные уровни экспрессии в тканях здоровых и онкологических больных, для построения диаграмм.

Статистический анализ

Результаты представлены в виде стандартного значения \pm стандартное отклонение. Статистический анализ был выполнен с использованием теста Стьюдента (SPSS 13.0, Чикаго, Иллинойс, США). Разница меньше 0,05 означала существенное различие.

Результаты и обсуждение

Данные, представленные на рис 1, А, показывают, что уровень ММП14 существенно влияет на выживаемость пациентов с глиобластомой ГМ. Оказалось, что в тканях пациентов, имеющих более

агрессивную форму глиомы – вторичную, и высокий уровень экспрессии ММП14, уровень выживаемости сравнительно низок по отношению к выживаемости пациентов с первичной глиомой ($p=0,024$, соотношение риска (HR)=0,42). На молекулярном уровне мы определили, что пациенты со вторичными глиомами имеют более высокий уровень экспрессии ММП14 (как группа), в сравнении с таковым первичной ГБМ (рис. 1, Б). Эти данные показывают, что ММП14 вовлечен в патологический процесс, а возможное его ингибирование может иметь важное терапевтическое значение.

На следующем этапе работы мы проанализировали уровень изменчивости генов, отвечающих за клеточное деление и имеющих тесное взаимодействие с ММП14. Оказалось, что ингибирование ММП14 существенно увеличивало экспрессию генов, отвечающих за восстановление поврежденной ДНК и клеточное деление (рис. 2, А). Последующий количественный ПЦР подтвердил, что уровень ATM, ATR, CDK, а также циклин Е в ММП14-аттенуированных клетках был увеличен в среднем

в 3–52 раза по отношению к Scramble (контроль)

инфицированным клеткам (рис. 2, Б).

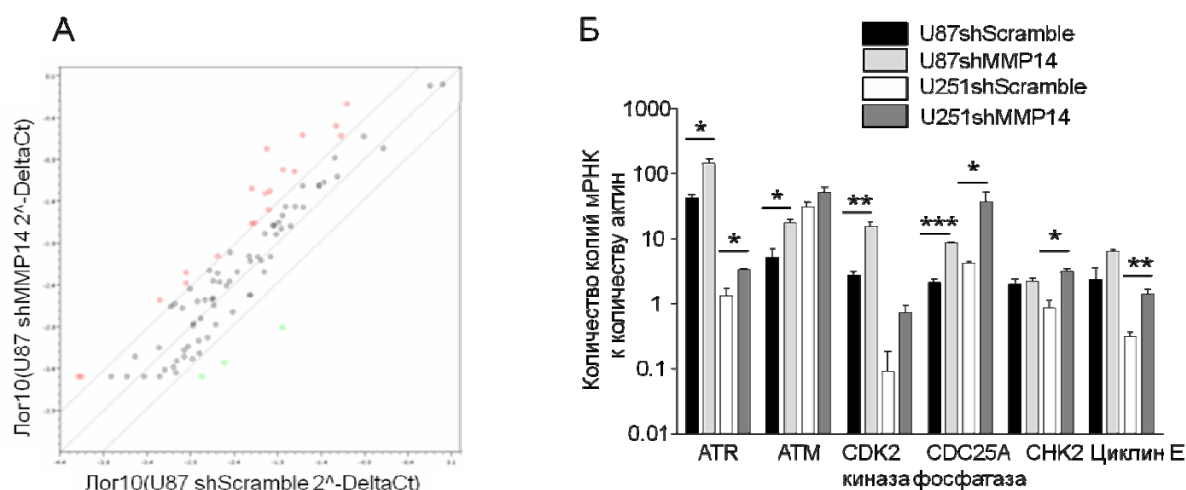


Рис. 2. Транскрипционный анализ экспрессии генов, вызванных ингибированием MMP14.

А. Результаты аттенуации генов клеток линии U87 при ингибировании MMP14;

Б. Количественный анализ экспрессии РНК генов в стабильно-аттенуированных клетках линий U87 и U251. Эксперименты повторены трижды, * $p < 0,05$.

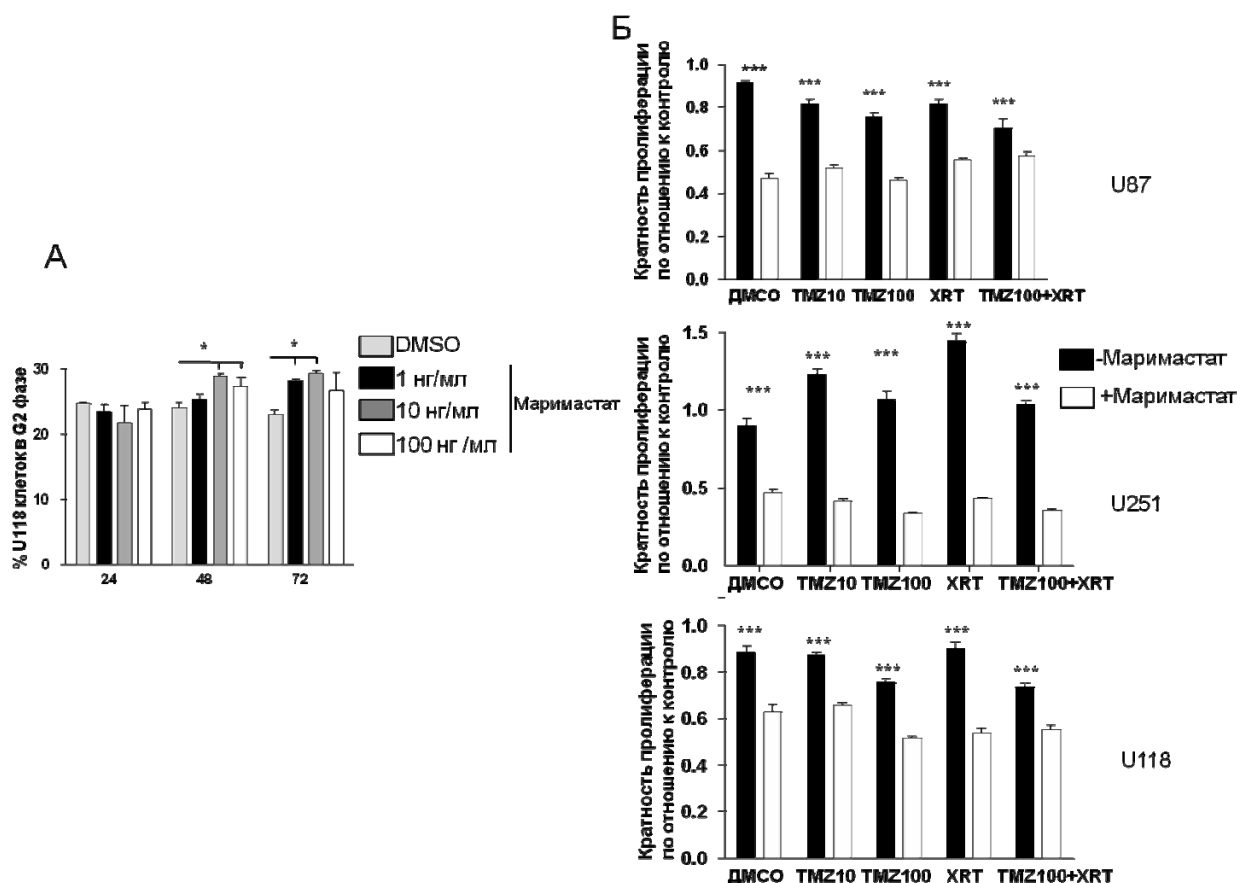


Рис. 3. Маримастат сенситизирует клетки глиобластом к комбинации темозоломида и ионизирующей радиации:

А. Маримастат нарушает клеточное деление U118 и аккумулирует клетки в G2 фазе клеточного цикла;

Б. Влияние терапии с применением маримастата на пролиферацию клеток глиобластом U87, U118 и U251 в присутствии ионизирующей радиации (2 Грей, XRT) и темодара (10 или 100 мкМ). Анализ уровня пролиферации проведен с помощью МТТ-теста. Результаты получены на основании 2 независимо проведенных экспериментов, содержащих 4 повтора на каждый вид терапии, * $p < 0,05$;

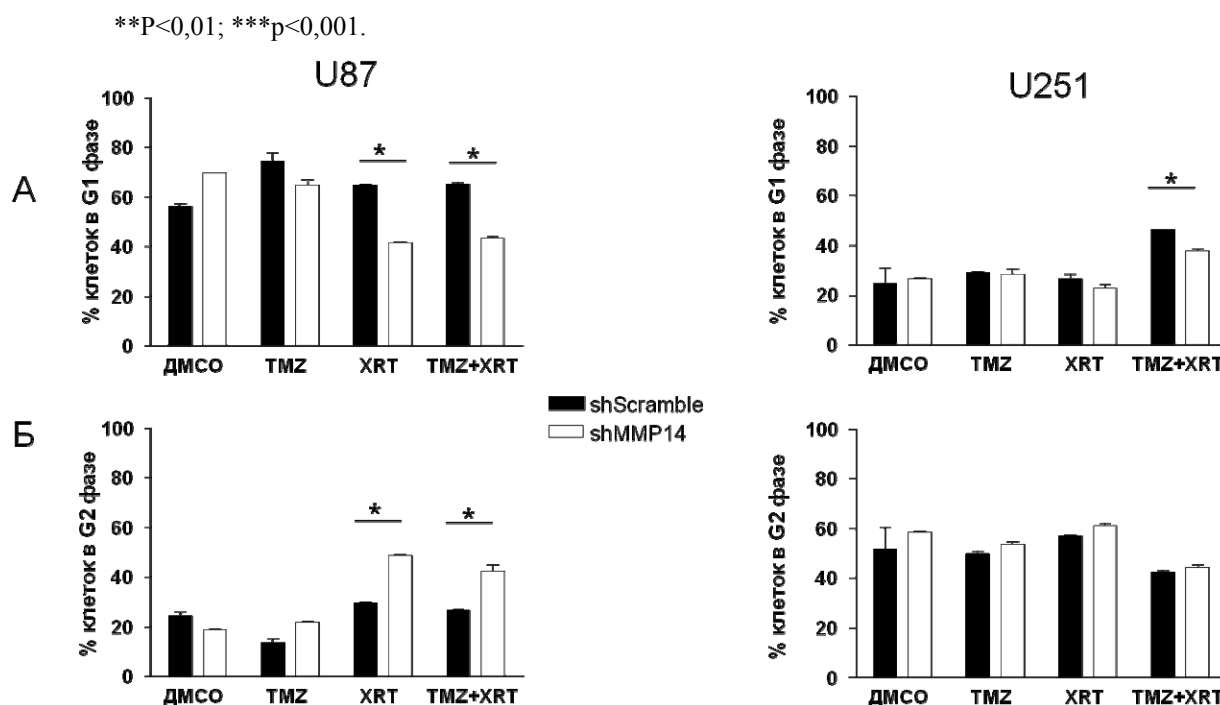


Рис. 4. Генетическое ингибирование ММП14 усиливает эффект темозоломида и ионизирующей радиации. Аккумуляция клеток U87 и U251 в фазе G₂ клеточного цикла ассоциирована с ингибированием ММП14. Темозоломид (100мкМ) и ионизирующая радиация (2 Грей, однократное облучение).

Таким образом, наши результаты свидетельствуют, что ген ММП14 регулирует экспрессию клеточных циклин-зависимых киназ и активирует механизм восстановления поврежденной ДНК.

При изучении противоопухолевой активности ММП14 нами впервые показано, что ингибирование ММП14 снижает пролиферацию клеток глиобластомы. В данной работе нами показано, что нарушение клеточного деления путем ингибирования мРНК гена ММП14 приводило к усилению эффекта темозоломида и ионизирующей радиации.

Так, однократное облучение клеток ионизирующей радиацией в присутствии ингибитора ММП14 увеличивало токсичность с 11% до 42 % в различных линиях клеток. Более того, в случае применения темозоломида в концентрациях 10 или 100 мкМ наблюдалось статистически значимое усиление его противоопухолевого эффекта ($p < 0,05$). По-видимому, усиление токсичности темозоломида и ионизирующей радиации наблюдалось вследствие сочетания их эффекта на клеточное деление, что привело к снижению накопления клеток в фазе G₁ с 60 % до 39 % (U87) и с 43 % до 35 % (U251).

Параллельно мы детектировали, что уменьшение клеток в G₁ фазе сопровождалось накоплением клеток в фазе G₂ с 23 % до 42 % (U87) и с 39 % до 42 % (U251). Нами было установлено, что в неопластических клетках наблюдалось усиление противоопухолевого эффекта темозоломида и ионизирующей радиации в случае генетического knockdown ММП14.

Заключение

Таким образом, наши результаты показывают, что экспрессия гена ММП14 тесно связана с экспрессией генов, отвечающих за регуляцию клеточного деления. Более того, значительное ингибирование клеточного деления вследствие интерференции РНК гена ММП14 приводило к усилению эффекта темозоломида и ионизирующей радиации. Результаты использования ингибитора ММП14 мариастата, применяющегося в экспериментальном лечении глиобластом человека, позволяют говорить наличии терапевтического эффекта ингибирования ММП14, что может быть полезно в нейроонкологии.

Литература

1. Брюховецкий И.С., Брюховецкий А.С., Миценко П.В., Хотимченко Ю.С. Роль системных механизмов миграции и хоуминга стволовых клеток в развитии злокачественных опухолей центральной нервной системы и разработка новых методов противоопухолевой терапии // Российский биотерапевтический

- журнал. – 2013. – Т. 12, № 4. – С. 3–12.
2. Степанова Е.В., Зейналова К.Р. Механизмы резистентности к трантузумабу // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 3–8.
 3. Уласов И.В., Каверина Н.В., Кадагидзе З.Г., Барышников А.Ю. Антиглиомная аденовирусная виротерапия: механизм, регуляция и клинические перспективы // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 11–8.
 4. Banerjee N.S., Rivera A.A., Wang M. et al. Analyses of melanoma-targeted oncolytic adenoviruses with tyrosinase enhancer/promoter-driven E1A, E4, or both in submerged cells and organotypic cultures // Mol Cancer Ther. – 2004. – 3(4). – P. 437–49.
 5. Fernandez-Vidal A., Ysebaert L., Didier C. et al. Cell adhesion regulates CDC25A expression and proliferation in acute myeloid leukemia // Cancer Res. – 2006. – 66(14). – P. 7128–35.
 6. Groves M.D., Puduvalli V.K., Hess K.R. et al. Phase II trial of temozolomide plus the matrix metalloproteinase inhibitor, marimastat, in recurrent and progressive glioblastoma multiforme // J Clin Oncol. – 2002. – 20(5). – P. 1383–8.
 7. Hagemann C., Anacker J., Ernestus R.I., Vince G.H. A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas // World J. Clin. Oncol. – 2012. – 3(5). – P. 67–79.
 8. Kim J.H., Bae Kim Y., Han J.H. et al. Pathologic diagnosis of recurrent glioblastoma: morphologic, immunohistochemical, and molecular analysis of 20 paired cases // Am. J. Surg. Pathol. – 2012. – 36(4). – P. 620–8.
 9. Lehti K., Allen E., Birkedal-Hansen H. et al. An MT1-MMP-PDGF receptor-beta axis regulates mural cell investment of the microvasculature // Genes Dev. – 2005. – 19(8). – P. 979–91.
 10. Levin V.A., Phuphanich S., Yung W.K. et al. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of marimastat in glioblastoma multiforme patients following surgery and irradiation // J Neurooncol. – 2006. – 78(3). – P. 295–302.
 11. Li R., Li G., Deng L. et al. IL-6 augments the invasiveness of U87MG human glioblastoma multiforme cells via up-regulation of MMP-2 and fascin-1 // Oncol Rep. – 2010. – 23(6). – P. 1553–9.
 12. Ulasov I., Yi R., Guo D. et al. The emerging role of MMP14 in brain tumorigenesis and future therapeutics // Biochim Biophys Acta. – 2014. – 1846(1). – P. 113–20.
 13. Saini D., Shelke S., Mani Vannan A. et al. Transcription profile of DNA damage response genes at G(0) lymphocytes exposed to gamma radiation // Mol Cell Biochem. – 2012. – 364(1/2). – P. 271–81.
 14. Ulasov I., Thaci B., Sarvaiya P. et al. Inhibition of MMP14 potentiates the therapeutic effect of temozolomide and radiation in gliomas // Cancer Med. – 2013. – 2(4). – P. 457–67.
 15. Wang H., Wang S., Shen L. et al. Chk2 down-regulation by promoter hypermethylation in human bulk gliomas // Life Sci. – 2010. – 86(5/6). – P. 185–91.