

УДК 616-006.831-085.2/.3:578.826:576.533

И.В. Уласов¹, Н.В. Каверина², А.Ю. Барышников²

ИНГИБИТОР КЛЕТОЧНОГО БЕЛКА P53

ПОЗИТИВНО РЕГУЛИРУЕТ ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ

ОНКОЛИТИЧЕСКОГО ВЕКТОРА В КЛЕТКАХ ГЛИОБЛАСТОМЫ

¹Центр опухолей головного мозга, Шведский медицинский центр, Сиэтл, США²ФГБНУ «Российский онкологический научный центр 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. +1-206-991-2053e-mail: ulasov75@yahoo.com

Статья поступила 03.10.2014, принята к печати 24.11.2014.

Резюме

Резистентность мультиформных глиобластом требует создания новых подходов для терапии опухолей головного мозга. Белок P53 – один из главных клеточных онкогенов, чья экспрессия увеличена в 50% клеток глиобластом. Эффект ингибитора P53 был изучен в присутствии онколитического аденовируса, и темодала, демонстрирующих противоопухолевый эффект на глиобластомных моделях. В клетках U87 глиобластомы человека мы обнаружили аддитивный эффект между ингибированием P53, активностью аденовирусного вектора и противоопухолевой активностью алкилирующего химиопрепарата темодал, выражающийся в увеличенной опухолевой токсичности. Оказалось, что ингибирование P53 химическим реагентом PFTa вызывает активацию аутофагии, одного из вариантов клеточной смерти. Таким образом, данная терапевтическая комбинация может представлять один из возможных способов увеличения противоопухолевого эффекта онколитического вируса.

Ключевые слова: аденовирус, P53, аутофагия, пролиферация.I.V. Ulasov^{1,2}, N.V. Kaverina² and A.Yu. Baryshnikov²

SUPPRESSION OF CELLULAR P53

PROMOTES CYTOTOXICITY OF ONCOLYTIC VECTOR

AT THE MODELS OF HUMAN GLIOBLASTOMA

¹The Center for Advanced Brain Tumor Treatment, Swedish Medial Center, Seattle, USA²FSBSI «N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center», Moscow, Russia

Abstract

Glioblastoma multiforme resistance requires a new approach for glioma therapy. Protein p53 is one of the main cellular oncogene, overexpressed in 50% of brain tumor cases. Impact of p53 attenuation was evaluated in the presence of oncolytic adenovirus and temodar, which exhibit anti-glioma effect using *in vitro* glioma models. Using U87 human glioma cells we observed an additive effect between alkylated chemotherapeutic agent temodar and oncolytic adenovirus which results into p53 inhibition. It occurs that attenuation of p53 using PFTa inhibitor, significantly prolongs cell death type II- autophagy and, therefore improves effect mediated by autophagy induced agents. In conclusion, combination of PFTa and temodar might represent a powerful therapeutic combination which sensibilises glioma cells to the infection with oncolytic vector.

Key words: adenovirus, p53, autophagy, proliferation.

Введение

Глиобластома является самой распространенной формой опухолей ЦНС [1; 2; 4]. В последние годы произошел существенный прогресс в понимании механизма резистентности глиом к текущей терапии. Так, недавние исследования, проведенные группой Galvin-Burgess, показали, что глиобластомы представляют собой гетерогенную популяцию клеток, имеющих различный фенотип [6]. Одной из таких фенотипических характеристик является активация генетических программ, регулирующих клеточные сигнальные пути, такие как ангиогенез и клеточное деление. Клеточный белок P53 относится к группе белков, регулирующих клеточный гомеостаз [7].

Химиотерапия – один из видов противоопухолевой терапии, применяемой в лечении глиобластом. Несмотря на широкое применение, отсутствие селективности по отношению к опухолевым клеткам снижает эффективность терапевтических

интервенций и влияет на выживаемость пациентов. Похожая проблема ассоциирована с препаратом направленного действия против клеточного белка P53. Оказалось, что, несмотря на сниженную способность химических ингибиторов белка P53 проникать через гипоталамо-гипофизарный барьер, продолжительный курс химиотерапии с использованием P53-ингибитора повышал противоопухолевый эффект.

Таким образом, ведется поиск новых терапевтических путей, повышающих эффективность химиотерапии и снижающих побочный токсический эффект по отношению к здоровым клеткам.

Комбинирование химиотерапии с терапией онколитическими векторами является одним из методов, который нашел свое экспериментальное подтверждение в противоопухолевой терапии. В настоящее время в мире созданы несколько прототипов генно-инженерных вакцин на основе ОН-ВИР, имеющих ограниченную репликацию в нормальных клетках, но способных вызывать клеточ-

ную смерть клеток-мишеней [8; 9]. Так, одной из таких конструкций является вектор CRAd-S-pK7, который эффективно инфицировал клетки глиобластомы и вызывал токсичность, ассоциированную с развитием как апоптоза, так и аутофагии. Высокая продукция вирусных частиц инфицированной клеткой способствовала терапевтическому эффекту на неопластических клетках.

Целью настоящей работы являлось изучение терапевтического эффекта между онколитическим вирусом, темодалом и ингибированием P53.

Материалы и методы

Клетки и клеточные линии

Эмбриональные клетки почки эмбриона человека HEK293, человеческие клетки глиобластомы N10 и U87, и клетки аденокарциномы человека A549 были получены из японской (Токуо, Япония) и американской коллекции клеточных линий (ATCC, Manassas, VA).

Клетки были выращены в Дульбеко модифицированной среде Игла (DMEM; Life Technologies), содержащей 10 % ТЭС (фетальной бычьей сыворотки); GIBCO-Life Technologies, США), 2 mM L-глутамина, 100 IU/мл пенициллина, 50 IU/мл стрептомицина (Invitrogen, США). Клетки культивировали при температуре +37 °C в присутствии 5% CO₂.

Реагенты

Темодал (Temozolomide), ингибитор клеточного P53 (PFTalpha), 2 %-ный водный раствор АО и PI, 1 мг/мл были получены из компании Sigma-Aldrich (США).

В качестве растворителя для темодара и ингибитора P53 использовали ДМСО с целью получения 100µM раствора темодала [10] и 20mM раствора PFTa (1000× раствор, [11]).

Вирусные вектора

Постоянно реплицирующийся компетентный аденовектор CRAd-S-pK7 был получен путем гомологической рекомбинации с SpeI-обработанной плазмидой, кодирующей полноразмерный геном аденовируса, содержащего 7 аминокислотных остатков полилизина, вклонированных в С-терминальный конец гена полноразмерного белка фибера типа 2 аденовирусов, с E1-pSurvivin шаттл плазмидой. Вирусная конструкция была получена путем трансфекции клеток HEK293 плазмидой. CRAd-S-pK7-вирус был наработан в клетках A549 и тестирован с использованием Adeno Titer X kit (Clontech, Mountain View, Ca, USA).

Тест для определения пролиферации клеток (MTT-тест)

Опухолевые клетки культивировали при температуре +37 °C в присутствии 5 % CO₂ в среде DMEM, содержащей 2 mM L-глутамина и 10 % ТЭС («Atlanta Bio», Atlanta, США). Клетки, достигшие логарифмической фазы роста, пассировали в плоскостонные 96-луночные микропланшеты («Costar», США) по 5 000 – 6 000 клеток на лунку и инкубировали в указанных выше условиях в течение 24 ч перед добавлением тестируемого вещества.

Для определения цитотоксичности клеточные линии были инфицированы CRAd-S-pK7-вектором в разной множественности инфекции. Через 72 ч после инфекции 200 микролитров MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

было добавлено к каждой лунке для дальнейшей инкубации. Спустя 4 ч после инкубации при 5 % CO₂ при +37 °C, к каждой лунке добавили 0,1 мл ДМСО для ингибирования метаболической реакции и разрушения формазана активно делящимися клетками.

Оптическое поглощение было измерено при λ 540 нм. Жизнеспособность клеток определяли по исключению красителя трипанового синего (Fisher Scientific США).

Цитологический метод окрашивания клеток, имеющих фрагментацию ДНК

TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling) был произведен согласно рекомендациям фирмы-производителя Roche (США) для набора In situ cell death Detection kit.

Анализ экспрессии белков с помощью вестерн блоттинга

Клетки, выращенные в 6-луночном планшете, были затем обработаны темодалом, инфицированы онколитическим вирусом CRAd-S-pK7 (5 IU/мл), или в комбинации темодал-ОНВИР в присутствии или отсутствии ингибитора PFTa. Через 72 ч после начала эксперимента клетки были лизированы в буфере, содержащем 50mM HEPES; 0,15 M NaCl, 0,5 %-ный Nonidet P-40 и смесь протеиназных ингибиторов. Белковые фракции были исследованы в 10 %-ном ПААГ-геле и перенесены на поливинилиден дифлуорид мембрану (PVDF, BioRad, США). Мембраны были проинкубированы с первичными антителами P53 (клон DO-1), E1A (клон M58) и Актин (клон с-2), указанные антитела были получены из компании Santa Cruz Biotechnology (Техас, США).

Связанные первичные антитела были детектированы со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена Santa Cruz Biotechnology (Техас, США). Детекция белковых фракций была произведена с помощью реакции хемилюминесценции согласно инструкции (BioRad, Hercules, Калифорния, США).

Определение клеточного деления и аутофагии с помощью иммунофлуориметрии

Анализ клеточного деления был проведен с использованием АО или PI. Клетки, обработанные темодалом, инфицированные онколитическим вирусом CRAd-S-pK7 (5 IU/мл), или в комбинации темодал-ОНВИР в присутствии или отсутствии ингибитора PFTa были центрифугированы.

Затем часть клеточного осадка была дважды промыта в фосфатно-солевом буфере и зафиксирована в 70 %-ном этаноле перед окраской PI (50 mg/мл) на 4 ч. Вторая часть осадка была окрашена раствором АО.

Анализ распределения клеток по фазам клеточного деления был осуществлен с помощью проточной цитофлуориметрии. Данные были получены после анализа 10 000 клеточных событий.

Статистический анализ

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

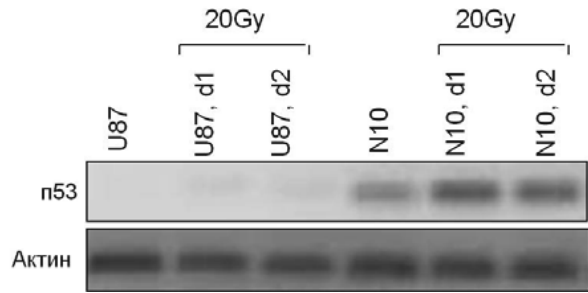


Рис. 1. Вестерн блоттинг анализ экспрессии белка P53 в клеточных лизатах U87 и N10 глиобластом человека в условиях нормального роста клеток и после облучения ионизирующим излучением.

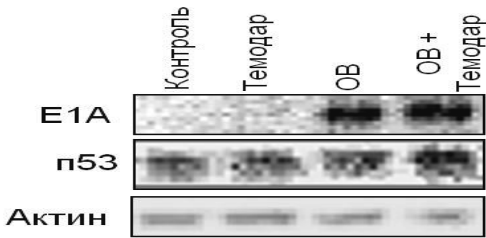


Рис. 2. Влияние индукции клеточного белка P53 на клеточную токсичность:

Б – белковые фракции клеток глиомы человека U87, инфицированных ОНВИР, обработанных темодалом, или комбинацией ОНВИР+темодал, были проанализированы с помощью вестерн-блотта с антителами к Актину, P53 и аденовирусной области E1A белка (клон M58).

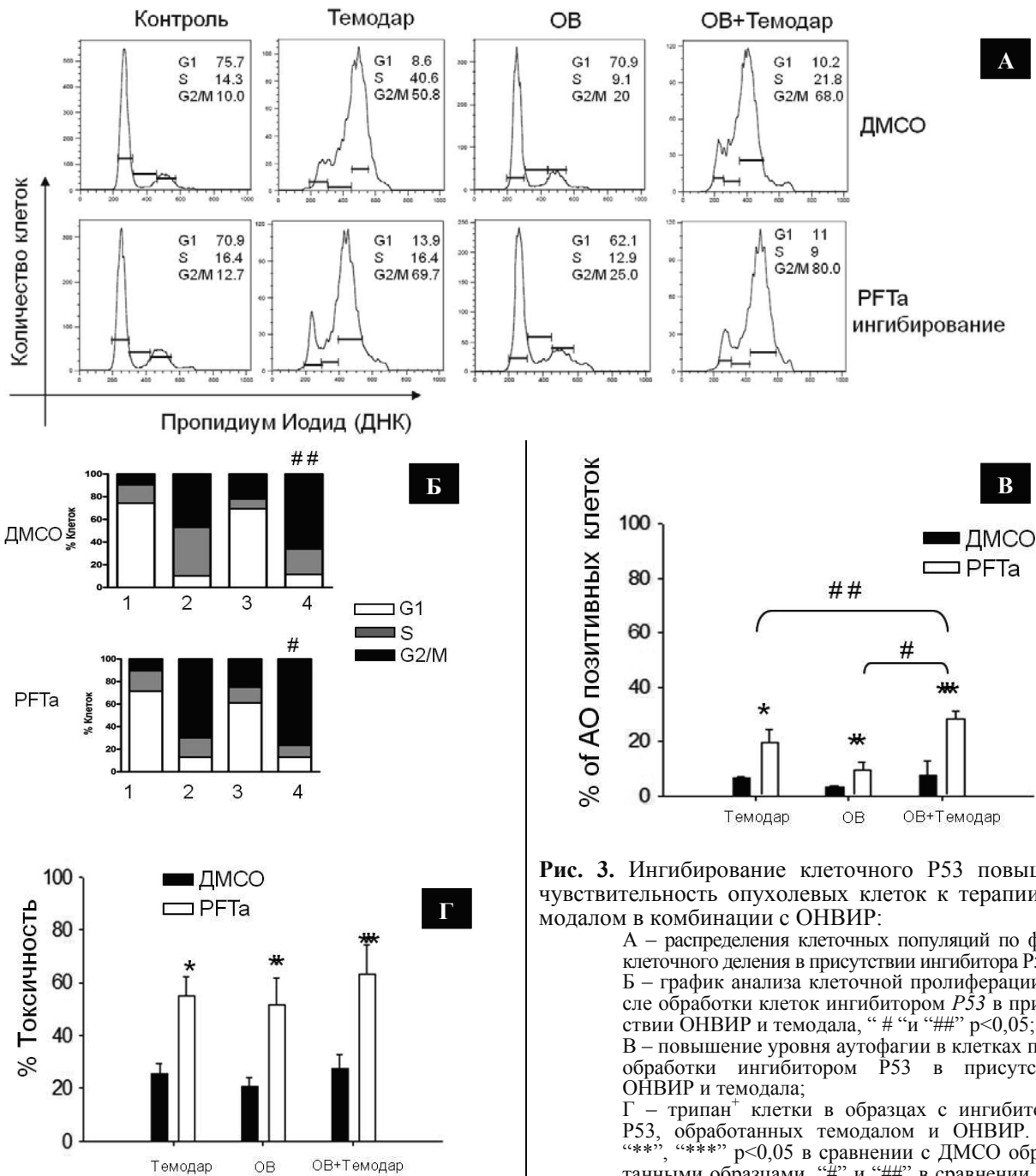


Рис. 3. Ингибирование клеточного P53 повышает чувствительность опухолевых клеток к терапии темодалом в комбинации с ОНВИР:

А – распределения клеточных популяций по фазам клеточного деления в присутствии ингибитора P53; Б – график анализа клеточной пролиферации после обработки клеток ингибитором P53 в присутствии ОНВИР и темодала, “#” и “##” $p < 0,05$; В – повышение уровня аутофагии в клетках после обработки ингибитором P53 в присутствии ОНВИР и темодала; Г – трипан⁺ клетки в образцах с ингибитором P53, обработанных темодалом и ОНВИР. “*”, “***”, “****” $p < 0,05$ в сравнении с ДМСО обработанными образцами, “#” и “##” в сравнении с темодалом и ОНВИР обработанными образцами.

Результаты и обсуждение

Функциональная характеристика клеточного P53

Эксперимент по индукции экспрессии белка P53 в модификации [3; 12] проводили в частоте 0–20 Грей [3; 12]. Клетки были собраны для анализа экспрессии белка через 24 и 48 ч после облучения ионизирующей радиацией. На рис. 1 показано, что ионизирующее излучение увеличивало экспрессию P53 только в клетках опухоли головного мозга N10, но не в клетках опухоли U87. Полученные результаты согласуются с данными литературы [3] и свидетельствуют об отсутствии в этих клетках P53 "дикого" типа. В то же самое время, ионизирующее излучение вызывало индукцию P53 в клетках N10, что свидетельствует о мутантном типе гена P53. По данным литературы, увеличение P53 в клетках глиобластом U87 не приводило к возрастанию белка P21, для которого P53 является индуцирующим регулятором клеточного деления [5].

Комбинация терапевтических подходов вызывает активацию клеточного P53

Наши предыдущие исследования показывают, что присутствие P53 снижает эффективность виротерапии с использованием CRAd-S-pK7 вектора [10]. Более того, наши недавние предварительные результаты позволяют предположить, что P53 также негативно влияет на активность темодала, нашедшего широкое применение в клинической практике при лечении глиобластом человека. Поскольку наша рабочая гипотеза позволяет предположить, что экспрессия P53 препятствует антиглионому эффекту CRAd-S-pK7-вектора и темодала, мы ингибировали экспрессию P53 в клетках глиобластомы человека U87 с помощью химического ингибитора PFTalpha.

Мы обрабатывали клетки, содержащие P53 "дикого типа", темодалом, или ОНВИР CRAd-S-pK7, или их комбинацией (темодал+ОНВИР). Через 72 ч клетки окрашивали с помощью TUNEL и определяли число CRAd-S-pK7-клеток по цитоплазматическому окрашиванию аденовирусных белков области E1A (рис. 2А; см. вклейку). Оказалось, что комбинация темодал+ОНВИР существенно увеличивала количество поврежденных клеток глиобластомы по сравнению с обработкой темодалом или ОНВИР по отдельности.

Более того, высокий уровень токсичности соответствовал высокому уровню P53 в этих клетках (рис. 2, Б).

Литература

1. Уласов И.В., Каверина Н.В., Кадагидзе З.Г., Барышников А.Ю. Антиглиома аденовирусная виротерапия: механизм, регуляция и клинические перспективы // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, №2. – С. 11–8.
2. Уласов И.В., Тусон А., Барышников А.Ю. Белок фибера аденовируса человека обеспечивает стабильность вирусных капсидов // Российский биотерапевтический журнал. – 2014. – Т. 13, № 2. – С. 51–5.
3. Badie B., Goh C.S., Klaver J., Herweijer H., Boothman D.A. Combined radiation and p53 gene therapy of malignant glioma cells // Cancer Gene Ther. – 1999. – 6. – P. 155–62.
4. Bao S., Wu Q., McLendon R.E. et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response // Nature. – 2006. – 444. – P. 756–60.
5. el-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E. et al. WAF1 a potential mediator of p53 tumor suppression // Cell. – 1993. – 75. – P. 817–25.
6. Galvin-Burgess K.E., Travis E.D., Pierson K.E., Vivian J.L. TGF-beta-superfamily signaling regulates embryonic stem cell heterogeneity: self-renewal as a dynamic and regulated equilibrium // Stem Cells. – 2013. – 31. – P. 48–58.
7. Kremenetskaya O.S., Logacheva N.P., Baryshnikov A.Yu. et al. Distinct effects of various p53 mutants on differentiation and viability of human K562 leukemia cells // Oncology Research. – 1997. – 9. – P. 155–66.
8. Ulasov I.V., Tyler M.A., Rivera A.A. et al. Evaluation of E1A double mutant oncolytic... // J Med Virol. – 2008. – 80. – P. 1595–603.
9. Ulasov I.V., Zhu Z.B., Tyler M.A. et al. Survivin-driven and fiber-modified oncolytic adenovirus exhibits potent antitumor activity in established intracranial glioma // Hum Gene Ther. – 2007. – 18. – P. 589–602.
10. Ulasov I.V., Sonabend A.M., Nandi S. et al. Combination of adenoviral virotherapy and temozolomide chemotherapy eradicates malignant glioma through autophagic and apoptotic cell death in vivo // Br J Cancer. – 2009. – 100. – P. 1154–64.
11. Xu G.W., Mymryk J.S., Cairncross J.G. Pharmaceutical-mediated inactivation of p53 sensitizes U87MG glioma cells to BCNU and temozolomide // Int J Cancer. – 2005. – 116. – P. 187–92.
12. Yamashita K., Nakashima S., You F. et al. Overexpression of immediate early gene X-1 (IEX-1) enhances gamma-radiation-induced apoptosis of human glioma cell line, U87-MG. // Neuropathology. – 2009. – 29. – P. 20–4.

Поскольку функциями клеточного белка P53 являются транскрипционная регуляция клеточного цикла и контроль за клеточной реакцией на повреждение ДНК, мы предположили, что ингибирование P53 может усилить цитотоксическую реакцию в клетках глиобластомы U87.

Ингибирование P53 повышает активность ОНВИР и темодала

Как оказалось, в соответствии с нашей гипотезой ингибирование клеточного P53 не нарушало деления клеток U87 (рис. 3, А). При этом оказалось, что ингибирование P53 усиливало эффект темодала, ОНВИР и комбинации темодал+ОНВИР, что выражалось в накоплении клеток в состоянии G₂– и М–фаз клеточного цикла (рис. 3, Б). Чтобы определить, привело ли нарушение клеточного деления ингибитором P53 к клеточной смерти, мы проанализировали клетки в реакции клеточной пролиферации. Как оказалось, ингибирование P53 также приводило к нарушению клеточной пролиферации.

По нашим данным, в среднем в 2–3 раза по отношению к клеткам, обработанным ДМСО, ингибирование P53 усиливало активность темодала (с 25,2 до 55,8 %), ОНВИР (с 18,2 до 49,4 %) и их комбинации (с 24,1 до 63,8 %, p<0,05; рис. 3, Б).

По результатам наших исследований, увеличение клеточной токсичности при применении темодала привело к активации аутофагии. Поскольку активация аутофагии может служить как защитным механизмом, так и механизмом клеточной смерти, с целью детекции аутофагосом с двойной мембраной мы окрасили клетки с помощью акридина оранжевого. Как и ожидалось, ингибирование P53 приводило к увеличению числа акридин⁺ клеток (рис. 3, В). Более того, результаты окрашивания трипановым синим показали, что ингибирование пролиферации клеток PFTa приводило к клеточной смерти (рис. 3, Г). В этом случае, увеличение аутофагии в клетках U87 также сопровождалось арестом клеточного деления и накоплением клеток в G₂/М фазе клеточного цикла.

Заключение

Таким образом, впервые показано, что ингибирование клеточного белка P53 увеличивает не только токсичность онколитического аденовируса и темодара, но терапевтический эффект их комбинации. Полученные данные подтверждают существенную роль белка P53 в регуляции клеточного ответа на внешние стимулы и воздействие химиопрепаратов в комбинации с аденовирусом.