

На правах рукописи



БАГАМАНШИНА АНАСТАСИЯ ВИКТОРОВНА

**ЦИТОТОКСИЧЕСКАЯ И ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ
АКТИВНОСТЬ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНАЛОГОВ
ЛАКТАПИНА**

03.01.03 – молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2020

Работа выполнена в Институте химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН

Научный руководитель:

Коваль Ольга Александровна, к.б.н.

Официальные оппоненты:

Миронова Надежда Львовна, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, в.н.с.

Нетесов Сергей Викторович, д.б.н., профессор, чл.-корр. РАН, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», зав. лаб.

Трифонов Владимир Александрович, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, в.н.с., зав. лаб.

Защита состоится « 14 » февраля 2020 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан « ___ » _____ 2020 г.

Учёный секретарь диссертационного совета
к.х.н., доцент

Коваль В. В.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. В настоящее время онкологические заболевания являются одной из наиболее серьезных проблем здравоохранения, которая требует разработки новых препаратов и методов лечения. Среди противоопухолевых лекарств нового поколения многообещающими являются средства на основе рекомбинантных белков и пептидов, в том числе, способных селективно индуцировать гибель раковых клеток с минимальными токсическими эффектами по отношению к здоровым клеткам организма. Подобная селективность может быть основана на избирательной индукции в раковых клетках процессов гибели: апоптоза, аутофагии или некроптоза. Кроме того, новые потенциальные лекарства могут быть молекулами-партнерами уже существующих и широко применяемых препаратов, что позволит усиливать их действие в синергетическом режиме.

Ранее в ЛБТ ИХБФМ СО РАН из молока человека был выделен и охарактеризован белок лактаптин – протеолитический фрагмент к-казеина человека, который вызывал гибель раковых клеток человека в культуре. На основе последовательности лактаптина был сконструирован его рекомбинантный аналог RL2 для экспрессии в клетках-продуцентах *E. coli* (Semenov et al., 2010). Для аналога лактаптина RL2 было показано, что гибель опухолевых клеток происходит по механизму апоптоза с активацией эффекторных каспаз -3 и -7 и сопровождается увеличением экспрессии гена опухолевой супрессии TP53 (Фомин и др., 2010). В качестве клеточных мишеней, с которыми взаимодействует RL2, были выявлены белки цитоскелета – α , β -тубулин и α -актинин-1. Стоит отметить, что существующий процесс наработки аналога лактаптина RL2 в системе *E. coli* и его дальнейшая очистка для получения лекарственной формы приводят к значительному снижению удельной активности препарата по сравнению с оригинальным лактаптином из молока человека. Тем не менее, ограниченность ресурса природного лактаптина не позволяет в настоящее время надеяться на его получение в количествах, необходимых для доклинических исследований, поэтому, создание новых рекомбинантных аналогов лактаптина с повышенной цитотоксической активностью, оставалась актуальной задачей.

Для поиска препаратов-партнеров, усиливающих цитотоксическое действие RL2, и для конструирования новых аналогов существовала необходимость более полно исследовать механизм гибели клеток под действием аналога лактаптина, а также оценить его противоопухолевый потенциал *in vivo*.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы являлось детальное исследование механизма клеточной гибели под действием аналога лактаптина RL2, продуцируемого в бактериальных клетках, изучение его специфической противоопухолевой активности и исследование новых аналогов лактаптина, продуцируемых в клетках эукариот.

В ходе исследования **решались следующие задачи:**

1. Исследование активации каскадов Bcl-2, p53 и NF- κ B при гибели опухолевых клеток под действием аналога лактаптоина RL2.
2. Исследование индукции аутофагии под действием аналога лактаптоина RL2.
3. Исследование цитотоксической активности аналога лактаптоина RL2 в комбинации с модуляторами аутофагии в отношении опухолевых клеток человека.
4. Анализ противоопухолевой активности аналога лактаптоина RL2 в монорежиме и в комбинации с химиопрепаратами на опухолевых моделях животных и человека.
5. Исследование цитотоксической активности аналога лактаптоина EL1, продуцируемого в эукариотических клетках.

Научная новизна полученных результатов и практическая значимость.

В результате систематического исследования гибели опухолевых клеток под действием аналога лактаптоина RL2 впервые показано, что помимо апоптоза, RL2 на ранних этапах инкубации индуцирует аутофагию в клетках аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и MCF-7, способствующую выживанию. Впервые предложен молекулярный механизм переключения RL2-индуцируемых процессов апоптоза и аутофагии, ведущих к гибели клетки. Показано, что RL2 обладает противоопухолевым потенциалом в отношении гепатомы мыши ГА1 при различной локализации опухоли и аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 в солидной форме. Впервые показано, что комбинированная терапия мышей-опухоленосителей RL2 с циклофосфамидом и хлорокином более эффективна по сравнению с монорежимом. Показано, что аналог лактаптоина EL1, продуцируемый в эукариотических клетках, обладает более выраженным цитотоксическим эффектом по сравнению с RL2 в отношении опухолевых клеток различного гистологического происхождения.

Полученная информация является важной для создания новых противоопухолевых лекарственных средств на основе лактаптоина.

Положения, выносимые на защиту:

1. Аналог лактаптоина RL2 индуцирует гибель опухолевых клеток в культуре, что сопровождается активацией аутофагии с изменением соответствующих молекулярных маркеров. Аутофагия, индуцируемая в опухолевых клетках аналогом лактаптоина RL2, направлена на выживание опухолевой клетки.
2. Применение модуляторов аутофагии – ингибиторов хлорокина и Ku55933, а также индуктора рапамицина, усиливает цитотоксическое действие аналога лактаптоина RL2 в синергетическом режиме *in vitro*.
3. Аналог лактаптоина RL2 подавляет рост модельных опухолей различной локализации (подкожной, внутрибрюшинной, внутримышечной) *in vivo*.
4. Аналог лактаптоина RL2 обладает потенциалом препарата-партнера для комбинированной терапии злокачественных опухолей *in vivo*.

5. Рекомбинантный аналог лактаптина EL1 в составе культуральной среды клеток-продуцентов обладает цитотоксической активностью, превышающей активность аналога лактаптина RL2 на два порядка.

Публикации и апробация работы. По результатам диссертационной работы опубликовано 4 статьи в международных рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus, получен патент РФ. Материалы диссертации были представлены на 3-х российских конференциях, и 5-ти международных конференциях: «FEBS Advance Course 360 degree Lysosome» (Измир, Турция, 2014), конференции «FEBS EMBO 2014 Conference» (Париж, Франция, 2014), школе «18th International Summer School on Immunology» (Рабац, Хорватия, 2015), российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015), форуме «Биомедицина-2016» (Новосибирск, 2016), школе «Advanced lecture course on oncometabolism from conceptual knowledge to clinical applications» (Фигейра-да-Фоз, Португалия, 2017), симпозиуме «The 11th International Conference BGRS/SB (SbPCD-2018)» (Новосибирск, 2018), мультиконференции «Биотехнология - медицине будущего» (Новосибирск, 2019).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и обсуждения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 136 страницах, включает 42 рисунка и 10 таблиц. Список литературы содержит 235 источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Цитотоксическая активность аналога лактаптина RL2 *in vitro*

Ранее было показано, что аналог лактаптина RL2 вызывает гибель онкотрансформированных клеток A549, Hep-2 и MCF-7 с признаками апоптоза, но не влияет на здоровые клетки человека MSC. В данной работе показано, что онкотрансформированные клетки человека AsPc1, SW786, Hs578T, MDA-MB-231, MCF-7 и мыши GA1, MX82 проявляли чувствительность к RL2. В основных экспериментах по изучению механизма действия RL2 и его противоопухолевой активности использовали культуры клеток MDA-MB-231, MCF-7 и GA1, поскольку они проявили наибольшую чувствительность к RL2.

1.1. Анализ гибели клеток линии MDA-MB-231 под действием RL2

Для анализа индукции апоптоза клетки MDA-MB-231 инкубировали с RL2, после чего клетки анализировали методом проточной цитометрии. Показано, что в обработанных клетках ранняя апоптотическая популяция составляла в среднем 26.4% и 20.1%. (Рис. 1), а поздняя апоптотическая/вторично некротическая популяция составляла 4.6% и 27.5% для 16 ч и 24 ч инкубации соответственно. По-видимому, со временем ранние апоптотические клетки переходят в популяцию поздних апоптотических, а более длительная инкубация индуцирует апоптоз и в более резистентных клетках. Таким образом, показано, что в клетках

MDA-MB-231 RL2 вызывает гибель с признаками апоптоза.

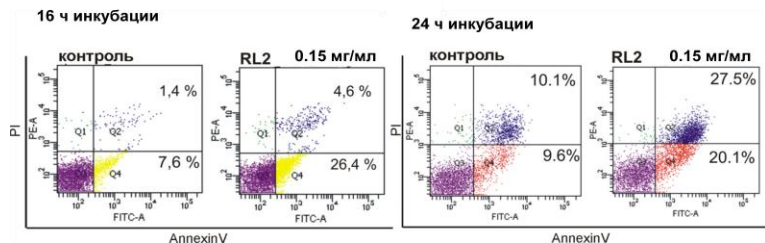


Рис. 1. Анализ апоптоза в клетках MDA-MB-231, обработанных RL2. Клетки инкубировали с RL2 (0.15 мг/мл) в течение 16 ч и 24 ч и анализировали методом проточной цитометрии с использованием окрашивания Annexin V/PI. Q1 – некротическая популяция, Q2 – ранняя апоптотическая популяция, Q3 – живые клетки, Q4 – поздняя апоптотическая/вторично некротическая популяция. Характерный пример анализа.

1.2. Анализ RL2-зависимой активации эффекторных каспаз в клетках линии MDA-MB-231

Расщепление каспазами специфических субстратов сигнализирует об апоптозе. В работе использовали флуоресцентный субстрат (FAM-DEVD-FMK), ковалентно связывающийся с активированными каспазами -3 и -7. Обнаружено, что в клетках MDA-MB-231, обработанных RL2, увеличена популяция клеток с флуоресцентным сигналом на 35% (Рис. 2, популяция P2) по сравнению с контролем, что свидетельствует об активации каспаз. Таким образом, показано, что в клетках MDA-MB-231 RL2 стимулирует активацию эффекторных каспаз -3 и -7, что характерно для гибели клеток по пути апоптоза.

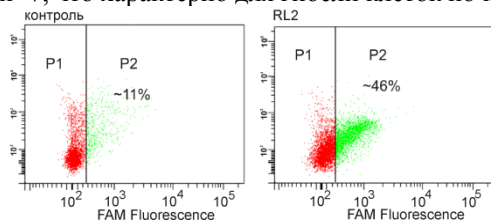


Рис. 2. Влияние RL2 на активацию каспазы-3 и -7 в клетках MDA-MB-231. Клетки инкубировали с RL2 (0.2 мг/мл) в течение 24 ч и анализировали проточной цитометрией. Характерный пример анализа. P2: FAM-положительные клетки.

1.3. Анализ изменения экспрессии генов апоптотического каскада в клетках линии MDA-MB-231 при инкубации с RL2

Индукция апоптоза в клетках сопровождается изменением экспрессии значительного числа генов, в том числе генных каскадов Bcl-2 и p53, а также трансляцией с последующим процессингом соответствующих им белков.

Можно видеть, что обработка клеток аналогом лактапина ведет к достоверному повышению уровня экспрессии гена антиапоптотического белка Bcl-2 на начальных этапах инкубации, после чего уровень экспрессии Bcl-2 снижается относительно контрольных клеток (Рис. 3 А). Методом Вестерн блота показано, что уровень белка Bcl-2 возрастает на ранних стадиях инкубации с

RL2, а далее происходит снижение Bcl-2 (Рис. 3 Б, В), что хорошо подтверждает результаты ПЦР (Рис. 3 А). Уровень экспрессии гена *BAX* незначительно снижается лишь на поздней стадии инкубации. Уровень проапоптотического белка *BAX* повышается на поздних стадиях инкубации. Можно заключить, что постепенное снижение антиапоптотического Bcl-2 сопровождается увеличением проапоптотического *BAX*, и, наиболее вероятно, стимулируется митохондриальный путь апоптоза.

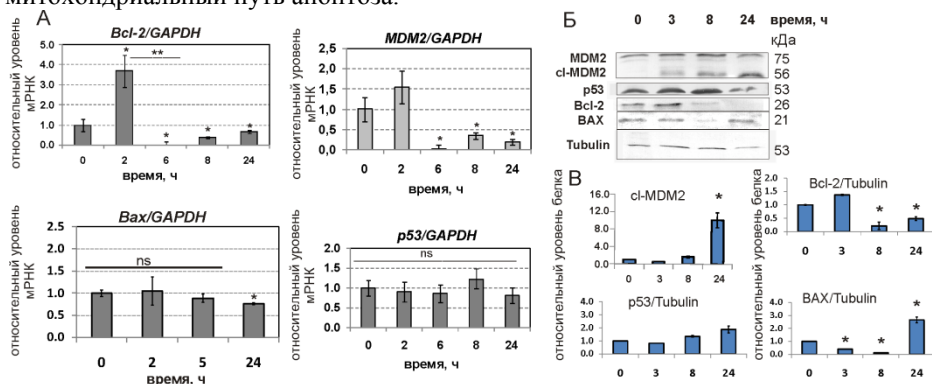


Рис. 3. Относительный уровень мРНК *MDM2*, *p53*, *Bcl-2* и *Bax* и их белковых продуктов в культуре клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, инкубированных с RL2. Клетки инкубировали с RL2 (0.2 мг/мл) в течение 0 – 24 ч. **А.** Уровень транскриптов анализировали методом ОТ-ПЦР со специфическими праймерами. Уровень мРНК *GAPDH* использовали в качестве внутреннего стандарта. Соотношение мРНК целевого гена/*GAPDH* в контрольных клетках принимали за единицу. Данные представлены как среднее значение соотношения целевого гена/*GAPDH*±SD. Различия при $p \leq 0.05$ (*) и $p < 0.005$ (**) считали достоверными, ns - отличия между группами не достоверные. **Б.** Характерный пример анализа клеточных белков методом Вестерн блота. **В.** Денситометрический анализ данных Вестерн блотов с использованием программного пакета Gel-Pro Analyzer 3.1. Данные представлены как относительное среднее значение ± SD. * - $p < 0.05$.

Инкубация с RL2 вела к снижению экспрессии гена *MDM2*, способствующего деградации белка опухолевого супрессора p53. Уровень белка MDM2 в клетках, обработанных RL2, не менялся, но было обнаружено появление формы меньшего молекулярного веса – расщепленной MDM2 (ci-MDM2). Экспрессия гена *p53* в клетках, обработанных RL2, оставалась постоянной. Количество белка p53 в клетках увеличивалось к 24 ч инкубации. Мы предполагаем, что RL2 не участвует в активации транскрипции *p53* в клетках MDA-MB-231, но за счет уменьшения функционально активной MDM2 убиквитинлигазы сохраняется пул функционально активного белка p53, что стимулирует апоптоз в обработанных клетках.

Таким образом, показана негативная регуляция убиквитинлигазы MDM2 и антиапоптотического белка Bcl-2 в клетках MDA-MB-231, обработанных RL2. Тот факт, что на ранних стадиях инкубации происходила позитивная регуляция

Bcl-2, нехарактерная для апоптоза, позволила предположить вовлеченность и других путей в RL2-зависимую гибель опухолевых клеток.

1.4. Анализ изменения уровня экспрессии генов каскада NF- κ B в клетках линии MDA-MB-231 и клетках здорового эндометрия KE под действием RL2 *in vitro*

Клеточный ответ каскада NF- κ B является одним из ключевых ответов иммунной системы. NF- κ B является транскрипционным фактором, к генам-мишеням которого относятся *A20*, *IkBa* и *CXCL1*, при этом *A20* и *IkBa* осуществляют негативную регуляцию NF- κ B, связываясь с его промотором.

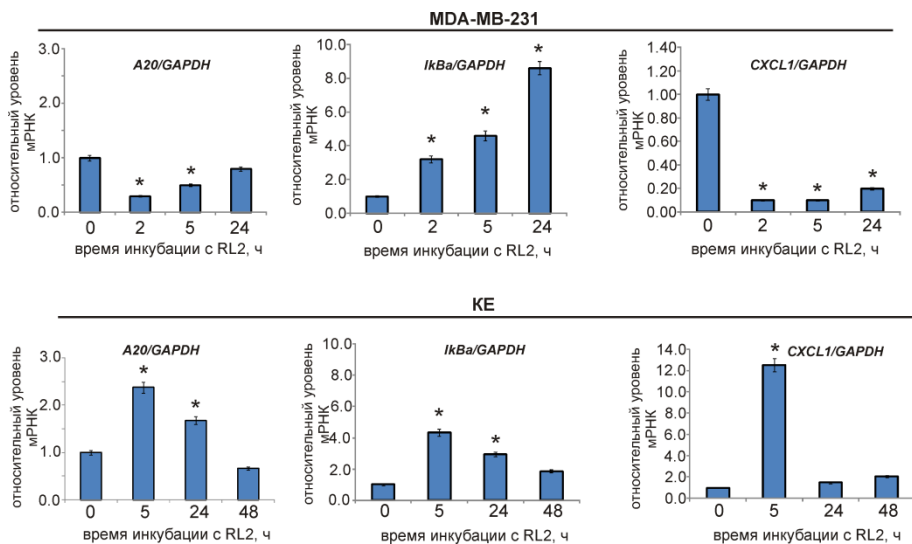


Рис. 4. Относительный уровень мРНК *A20*, *IkBa* и *CXCL1* в культурах клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231 и нетрансформированного эндометрия человека KE, инкубированных с RL2. Клетки инкубировали с RL2 (0.35 мг/мл) в течение 0 - 48 часов. Уровень мРНК *GAPDH* использовали в качестве внутреннего стандарта. Соотношение мРНК целевого гена/*GAPDH* в контрольных клетках принимали за единицу. Данные представлены как среднее значение соотношения целевого гена/*GAPDH*±SD. * - $p < 0.05$.

Влияние рекомбинантного аналога лактапина RL2 на экспрессию генов каскада NF- κ B исследовали в клетках MDA-MB-231 и клетках нетрансформированного эндометрия человека KE. Показано, что инкубация с RL2 клеток KE вела к повышению относительного уровня мРНК генов *A20*, *IkBa* и *CXCL1*, с последующим снижением до уровня контроля, указывая на кратковременную активацию NF- κ B с последующей инактивацией (Рис. 4).

В клетках MDA-MB-231 инкубация с RL2 вела к несогласованной регуляции исследованных генов: активации *IkBa* и негативной регуляции *A20* и *CXCL1*, что позволяет предположить, что в этих клетках RL2 также активирует каскад NF-

kB, но активация не сопровождается последующей инактивацией, более того не происходит увеличения экспрессии антиапоптотического *A20*. Мы полагаем, что несогласованная RL2-индуцированная активация NF-kB, наблюдаемая в клетках MDA-MB-231, способствует гибели этих клеток.

2. Анализ аутофагии в опухолевых клетках человека, инкубированных с рекомбинантным аналогом лактапина RL2

2.1. Анализ признаков аутофагии в ультраструктуре клеток MDA-MB-231, инкубированных с рекомбинантным аналогом лактапина RL2

Аутофагию можно детектировать в клетках методом электронной микроскопии, наблюдая специфические структуры – аутофаголизосомы.

В препаратах клеток, обработанных RL2, наблюдали как хорошо оформленные аутофаголизосомы, так и аутофагосомы на стадии формирования в виде фагофора в клетках, обработанных RL2 (Рис. 5 А, Б, В).

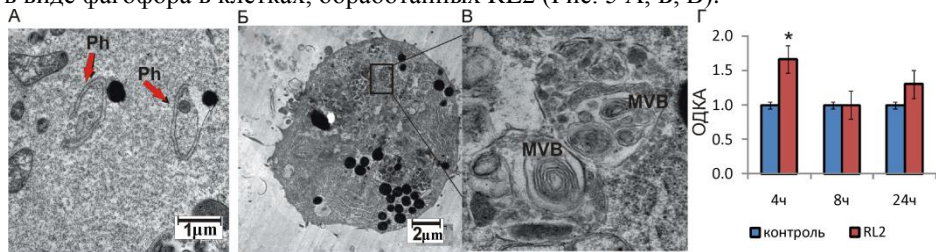


Рис. 5. Анализ ультраструктуры клеток MDA-MB-231, обработанных RL2. Клетки инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл) в течение 4 – 24 ч и анализировали методом трансмиссионной электронной микроскопии. **А.** Формирование фагофора в клетках, инкубированных с RL2 в течение 4 ч. Ph – фагофор. **Б.** Клетка с многочисленными аутофаголизосомами. **В.** Фрагмент клетки с миелоноподобными структурами и фрагментом цитоплазмы. MVB – мультивезикулярные тельца. **Г.** Относительная доля клеток с признаками аутофагии (ОДКА). ОДКА в контрольных необработанных клетках принимали за единицу. Данные представлены как относительное среднее значение \pm SD. * - $p < 0.05$. Электронно-микроскопический анализ проведен в группе микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН Юнусовой А.Ю.

Анализ относительного количества аутофагосом и аутофаголизосом в клетках MDA-MB-231 выявил увеличение доли этих структур в образцах, инкубированных с RL2 в течение 4 ч (Рис. 5 Г), что подтверждает индукцию аутофагии в этих клетках.

2.2. Анализ RL2-зависимого изменения основных молекулярных маркеров аутофагии в обработанных клетках линий MCF-7 и MDA-MB-231

Процессинг белка LC3I до LC3II является основным молекулярным изменением, ассоциированным с аутофагией. Появление липидированной формы LC3-II, которую наблюдали в клетках, обработанных RL2, свидетельствует об индукции аутофагии (Рис. 6).

При исследовании методом Вестерн блота белков аутофагического каскада показано снижение белков p62 и Beclin 1 в клетках, обработанных RL2, и увеличение ATG5 на ранних этапах инкубации (Рис. 6). Белок p62 является связующим звеном между субстратом, который должен подвергнуться аутофагии и внутренней мембраной растущего фагофора, поэтому снижение уровня p62, является признаком аутофагии. Белок ATG5 в комплексе с ATG12 формирует фагофор на стадиях инициации и элонгации, поэтому его увеличение также свидетельствует об активации аутофагии. Можно предположить, что снижение Beclin 1 при длительной инкубации с RL2 говорит о его расходе в иницирующем комплексе, а также, о возможном расщеплении каспазой-3, что ведет к супрессии аутофагии и гибели клетки по пути апоптоза. Полученные данные позволяют заключить, что RL2 на ранних стадиях инкубации активирует аутофагический каскад в опухолевых клетках, но далее равновесие сдвигается в пользу апоптоза.

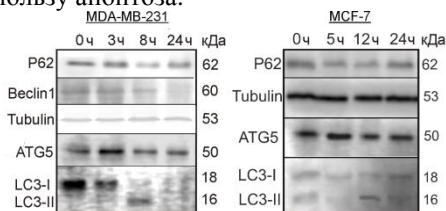


Рис.6. Анализ белков аутофагии в клетках MDA-MB-231 и MCF-7, инкубированных с RL2. Клетки инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл) в течение 0 – 24 ч. Лизаты клеток анализировали методом Вестерн блота. Характерный пример анализа.

На основании полученных данных была разработана схема, объясняющая параллельное развитие апоптоза и аутофагии в клетках, обработанных RL2 (Рис. 7).

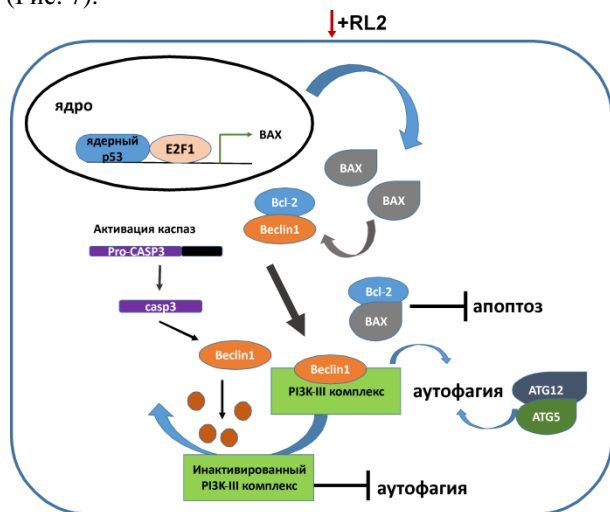


Рис. 7. Схема регуляции процессов апоптоза и аутофагии в опухолевой клетке под действием RL2.

В результате активации аутофагии Bcl-2 диссоциирует из комплекса с Beclin1 и формирует комплекс с BAX, ингибирующий апоптоз. В процессе аутофагии часть RL2 деградирует в аутофаголизосомах, а активируемый свободным RL2 процесс апоптоза ведет к супрессии аутофагии. Таким образом, можно предположить, что на ранних этапах инкубации с RL2 в клетках превалирует аутофагия. Далее наблюдаемое увеличение BAX и уменьшение Bcl-2 сдвигает равновесие в сторону апоптоза и гибели клетки.

2.3. Анализ влияния модуляторов аутофагии на гибель опухолевых клеток, обработанных RL2

Для того, чтобы определить направленность RL2-индуцируемой аутофагии использовали индуктор аутофагии рапамицин (Rap) и ингибиторы 3-метиладенин (ЗМА), Ku55933, хлорокин (CQ), действующие на разных стадиях аутофагии.

2.3.1. Влияние ингибиторов аутофагии хлорокина и Ku55933 на RL2-зависимую гибель клеток

Для анализа влияния ингибитора аутофагии хлорокина на RL2-зависимую клеточную гибель, опухолевые клетки инкубировали с препаратами в моно-режиме и в комбинации. По данным МТТ-теста были построены кривые жизнеспособности и рассчитан комбинаторный индекс. Показано, что комбинация CQ и RL2 вызывала цитотоксический эффект, превышающий эффекты моно-обработки препаратами, и соответствовала синергетическому эффекту (Рис. 8 А).

Также было показано, что при обработке клеток MDA-MB-231 комбинацией CQ и RL2 наблюдалось значительное увеличение уровня белка p62, что указывает на эффективное подавление аутофагии (Рис. 8 Б). Поскольку CQ в комбинации с RL2 усиливает гибель клеток, можно предположить, что RL2 вызывает аутофагию, способствующую выживанию раковых клеток, а ее ингибирование усиливает RL2-зависимую гибель по пути апоптоза.

Для неспецифического ингибитора аутофагии Ku также было показано, что он вызывает усиление цитотоксического эффекта RL2 по сравнению с моно-обработкой (Рис. 8 В). Полученные данные позволяют заключить, что RL2-зависимая аутофагия направлена на выживание опухолевых клеток, а ингибирование аутофагии стимулирует гибель клеток по пути апоптоза.

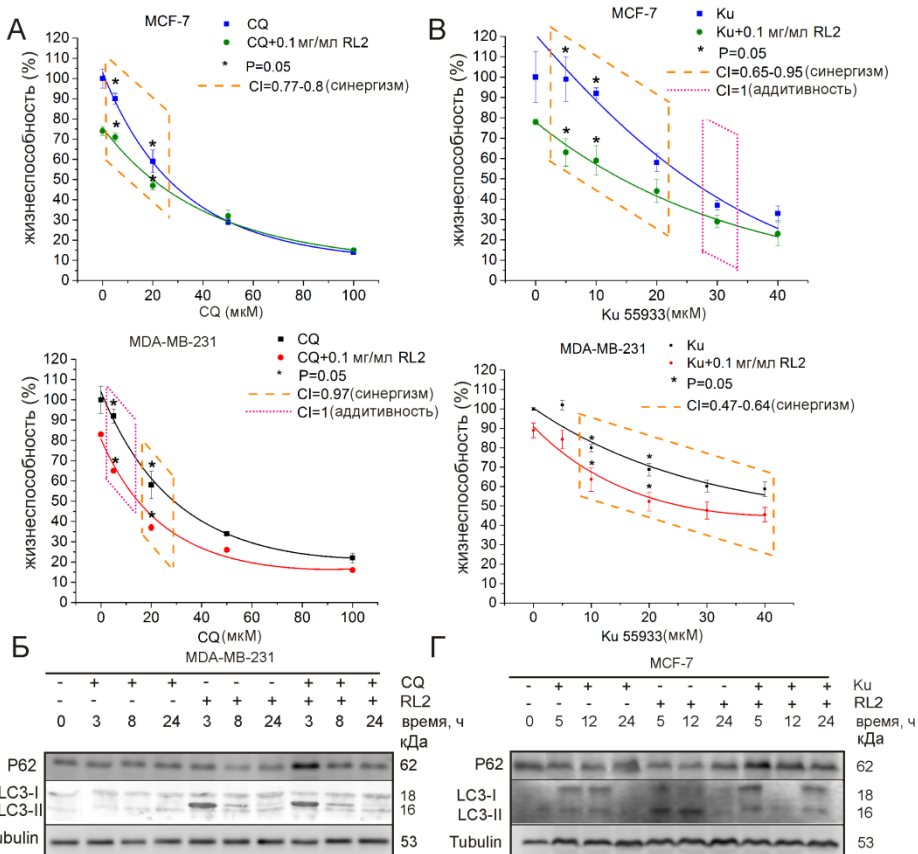
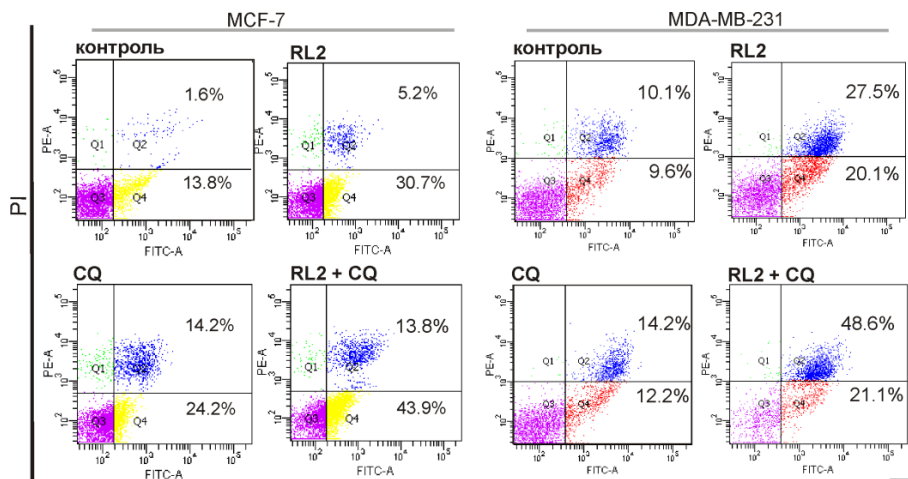


Рис. 8. Жизнеспособность клеток MDA-MB-231 и MCF-7 и изменение белков аутофагии под действием хлорокина (CQ) и Ku5933 (Ku) в моно-режиме и в комбинации с RL2. Клетки инкубировали с RL2 (0.1 мг/мл) и CQ (0 – 100 μM) (A) и Ku (0 – 40 μM) (B) в течение 48 часов. Данные жизнеспособности представлены как относительное среднее значение (%) по сравнению с контрольными клетками, обработанными PBS, ± SD. Клетки MDA-MB-231 и MCF-7 инкубировали с CQ (10 мкМ) (Б), Ku (30 мкМ) (Г) и RL2 (0.3 мг/мл) в моно-режиме и в комбинации в течение 0 – 24 ч. Представлены примеры характерных анализов образцов методом Вестерн блота.

Анализ ранней апоптотической (Annexin^{V+}/PI⁻) и поздней апоптотической/вторично некротической (Annexin^{V+}/PI⁺) популяций в клетках, обработанных RL2 и CQ, показал, что процент клеток в этих популяциях был достоверно выше, по сравнению с образцами, обработанными препаратами в отдельности (Рис. 9).



Annexin V

Рис. 9. Анализ гибели клеток MDA-MB-231 и MCF-7, инкубированных с RL2, CQ и комбинацией препаратов в течение 24 ч. Клетки инкубировали с RL2 (0.15 мг/мл), CQ (20 мкМ) и с комбинацией препаратов и анализировали методом проточной цитометрии с использованием окрашивания Annexin V/PI. Характерный пример анализа.

Таким образом, подтверждено усиление RL2-зависимой клеточной гибели по пути апоптоза при использовании ингибитора аутофагии CQ.

2.3.2. Влияние индуктора аутофагии рапамицина на RL2-зависимую гибель клеток

При обработке клеток линий MCF-7 и MDA-MB-231 комбинацией препаратов рапамицина и RL2 наблюдали увеличение цитотоксического эффекта по синергетическому типу (Рис. 10).

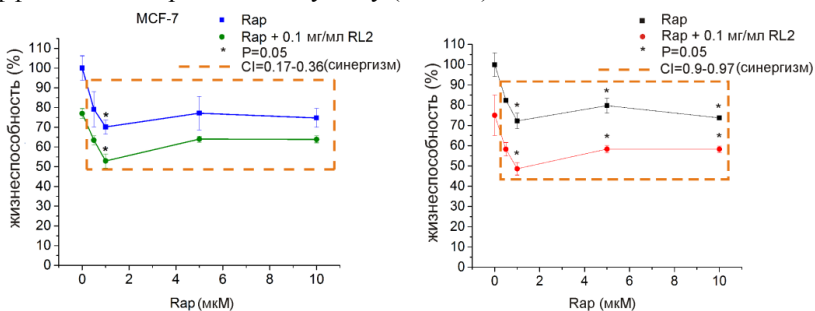


Рис. 10. Жизнеспособность клеток MCF-7 и MDA-MB-231, обработанных рапамицином (Rap) в моно-режиме и в комбинации с RL2. Клетки инкубировали с Rap (0 – 10 μМ) в моно-режиме и в комбинации с RL2 (0.1 мг/мл) в течение 48 часов. Данные жизнеспособности представлены как относительное значение (%) по сравнению с контрольными клетками, обработанными PBS. Данные представлены как среднее значение трех независимых экспериментов ± SD.

Поскольку рапамицин является индуктором аутофагии, а в комбинации с RL2 наблюдается усиление клеточной гибели, можно предположить, что такая комбинация приводит к повышенной активации аутофагии и стабильной супрессии апоптоза, и аутофагия становится причиной клеточной гибели.

2.3.3. Анализ изменения ультраструктуры клеток, обработанных рекомбинантным аналогом лактапина RL2 в комбинации с модуляторами аутофагии

Изменения ультраструктуры клеток MDA-MB-231, обработанных хлорокином и рапамицином в комбинации с RL2, были исследованы методом электронной микроскопии. В препаратах подсчитывали относительную долю клеток, содержащих структуры, характерные для аутофагии (Рис. 11). В клетках, обработанных CQ, после 8-24 ч инкубации наблюдалось значительное увеличение относительной доли аутофагосом и аутофаголизосом, как и в клетках, обработанных комбинацией препаратов. Поскольку известно, что CQ блокирует аутофагический каскад на уровне подавления слияния аутофагосом с лизосомами, наблюдаемое накопление аутофагосом закономерно, однако накопление таких аутофагосом не ведет к реализации катаболического процесса, а сдвигает равновесие в сторону клеточной гибели.

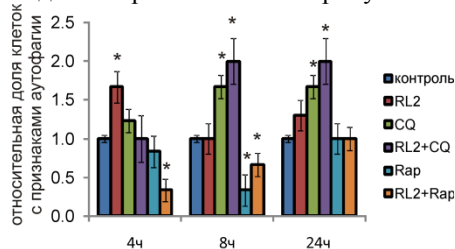


Рис. 11. Анализ ультраструктуры клеток MDA-MB-231, обработанных модуляторами аутофагии и RL2. Клетки инкубировали с RL2 (0.3 мг/мл), CQ (20 мкМ) и Rap (100 нМ) в моно-режиме и в комбинации в течение 4 – 24 ч, анализировали методом трамиссионной электронной микроскопии и подсчитывали относительную долю клеток с признаками аутофагии. Долю клеток с признаками аутофагии в контрольных необработанных клетках принимали за единицу. Данные представлены как относительное среднее значение \pm SD. * - $p < 0.05$.

3. Исследование противоопухолевой

В задачи работы входило исследование противоопухолевой активности RL2 при различной локализации опухоли и определение эффективной схемы терапии. Поскольку гепатома мыши GA1 проявляла высокую чувствительность к RL2 *in vitro*, эта линия была выбрана для пилотных исследований противоопухолевой активности RL2.

3.1. Анализ активности препарата RL2 в отношении асцитной и солидной формы гепатомы мыши GA1 при разных способах введения препарата

Для анализа активности RL2 в отношении асцитной формы GA1 (2×10^6 кл/мышь), через день после трансплантации опухолевых клеток, мышам экспериментальной группы вводили внутривенно (в/в) RL2 (12.5 мг/кг), а контрольной группы – физ. раствор. Курс состоял из 2-х инъекций с промежутком между инъекциями 3 дня.

Показано, что средняя продолжительность жизни мышей, получавших терапию RL2, была достоверно выше, чем у животных контрольной группы (Рис. 12).

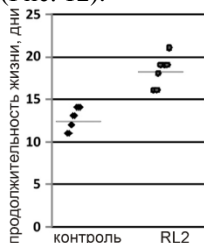


Рис. 12. Влияние RL2 на продолжительность жизни мышей линии A/Sn, с трансплантированными в/б клетками гепатомы мыши ГА1. Данные представлены как диаграмма рассеяния. Статистический анализ различия продолжительности жизни между группами проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни, при $p < 0.05$ различия считали достоверными.

Для сравнения эффективности RL2 в отношении солидной формы ГА1 при разных способах введения – внутрибрюшинном (в/б) и внутривенном (в/в), мышам линии A/Sn трансплантировали подкожно клетки ГА1 (2×10^5 кл/мышь). По достижении опухоли диаметра 3 мм мышам вводили препарат RL2 (25 мг/кг) каждый второй день курсом из 3-х инъекций.

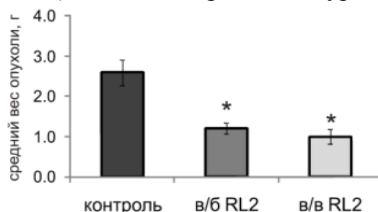


Рис. 13. Влияние RL2 на рост солидной опухоли гепатомы мыши ГА1. RL2 (25 мг/кг) вводили животным (по 8 мышей в группе) в/б или в/в. Статистический анализ различия массы опухолей между группами проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни, при $p < 0.05$ различия считали достоверными. Данные представлены как среднее значение \pm SD.

Показано, что через 20 дней после последней инъекции средний вес опухоли у мышей, получавших RL2, был в ≈ 2.5 раз меньше по сравнению с контрольной группой (Рис. 13). Достоверных отличий между группами, получавшими RL2 в/б и в/в, обнаружено не было. Таким образом, показано, что терапия RL2 эффективна в отношении асцитной и солидной формы гепатомы ГА1 как при в/в, так и при в/б введении препарата.

3.2. Определение эффективной дозы и курса терапии препаратом RL2

Для выявления эффективной дозы препарата RL2 клетки ГА1 ($1,5 \times 10^5$ кл/мышь) трансплантировали в/в мышам линии A/Sn, и начиная со следующего дня животные в группах ежедневно получали в/в инъекцию RL2 в дозе 0.4 - 150 мг/кг веса. Курс лечения состоял из 2-х инъекций. Показано, что введение животным RL2 в дозах 16 - 150 мг/кг приводит к достоверному увеличению продолжительности жизни животных (Рис. 14 А). Увеличение дозы до 150 мг/кг не ведет к достоверному увеличению продолжительности жизни по сравнению с дозой 40 мг/кг. Поэтому для экспериментального определения эффективного курса терапии RL2 была выбрана доза 40 мг/кг.

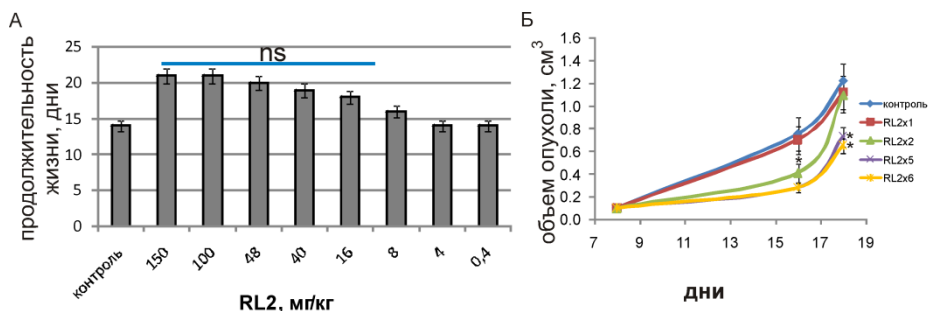


Рис. 14. Определение эффективной дозы и курса терапии препаратом RL2 при в/в введении мышам (по 7 мышей в группе). **А.** Влияние RL2 на среднюю продолжительность жизни мышей с опухолью, трансплантированной в/в, при разных дозах RL2. **Б.** Влияние продолжительности курса терапии RL2 в отношении п/к трансплантированной опухоли ГА1. Статистический анализ различия средней продолжительности жизни и объема опухолей между группами проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни, ns - различия считали недостоверными. Данные представлены как среднее значение \pm SD, * - $p < 0.05$.

Для определения эффективного курса терапии препаратом RL2 клетки ГА1 (5×10^6 кл/мышь) трансплантировали подкожно мышам линии A/Sp. Начиная с 15-ого дня после трансплантации, мыши получали ежедневную в/в инъекцию RL2 в дозе 40 мг/кг. Курс терапии в группах состоял из 1-го, 2-х, 5-ти или 6-ти введений препарата. Показано, что в процессе лечения происходит стабильное подавление роста опухоли; увеличение курса лечения с 2-х до 6-ти инъекций RL2 способствует достоверному подавлению темпа роста опухолей до 62% по сравнению с контрольной группой (Рис. 14 Б).

В результате проведенных экспериментов показано, что доза RL2 40 мг/кг является эффективной, а курс введения препарата RL2, ведущий к достоверным отличиям с контрольной группой, составляет не менее 2-х инъекций.

3.3. Анализ активности аналога лактапина RL2 в отношении аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231

Для того, чтобы исследовать противоопухолевую активность RL2 в отношении опухолей, сформированных раковыми клетками человека, использовали ксенографты рака молочной железы. Мышам линии SCID трансплантировали подкожно клетки аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231. По достижении опухолью объема в среднем 100 мм^3 животные получали в/в инъекции RL2 (40 мг/кг) или в/в инъекции физ. раствора (Рис. 15 А).

По динамике роста опухоли можно видеть, что в группе мышей, получавшей терапию RL2, объем и масса опухоли были достоверно меньше, чем в контрольной группе (Рис. 15). Торможение роста опухоли составило 43%.

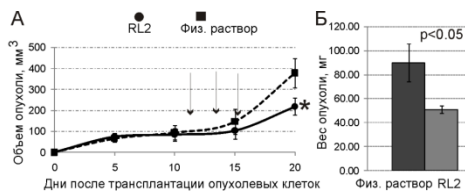


Рис. 15. Влияние RL2 (40 мг/кг, в/в) на рост опухоли MDA-MB-231. **А.** Динамика изменения объема опухоли. Стрелками отмечены дни введения RL2 (40 мг/кг, в/в) или физ. раствора. **Б.** Средний вес опухолей в финальной точке эксперимента. Статистический анализ различия размеров опухолей между группами проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни, при $p < 0.05$ различия считали достоверными (*). Данные представлены как среднее значение \pm SD.

Таким образом, препарат RL2 обладает противоопухолевой активностью в отношении опухоли молочной железы человека.

3.4. Анализ эффективности RL2 в комбинации с циклофосфамидом

Мышам линии А/Ж трансплантировали в/б клетки гепатомы мыши ГА1 (2×10^6 кл/мышь). На следующий день животные получали в/б инъекции RL2 (20 мг/кг), в/в инъекции циклофосфамида (ЦФ) (30 мг/кг) или комбинацию препаратов, а контрольные животные получали физ. раствор.

Можно видеть (Рис. 16), что наибольшая продолжительность жизни отмечена в группе животных, получавших комбинированную терапию. Продолжительность жизни животных, получавших моно-лечение RL2 или циклофосфамидом, также была достоверно выше, чем в контрольной группе.

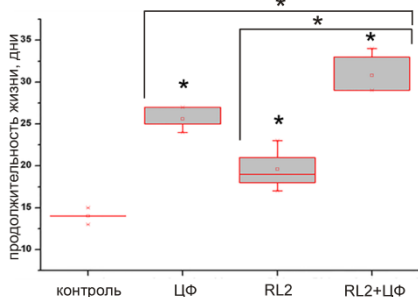


Рис. 16. Выживаемость мышей А/Ж с трансплантированными внутрибрюшинно клетками опухоли ГА1. (*) - различие между экспериментальной и контрольной группой считали достоверными $p < 0.05$. Статистический анализ различия между группами проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. Данные представлены как среднее значение \pm SD.

Таким образом, показано, что комбинация препаратов RL2 и циклофосфамида обладает большим терапевтическим противоопухолевым действием, чем каждый препарат в отдельности.

3.5. Анализ противоопухолевой активности препарата RL2 в комбинации с хлорокином в отношении опухоли RLS с фенотипом лекарственной устойчивости

Поскольку в исследованиях *in vitro* было показано повышение цитотоксической активности при комбинированной обработке опухолевых клеток хлорокином и RL2, эта комбинация была выбрана для экспериментов *in vivo*. Противоопухолевую активность исследовали на опухоли лимфосаркомы мыши RLS с фенотипом лекарственной устойчивости.

Мышам линии СВА трансплантировали внутримышечно клетки лимфосаркомы RLS (2.5×10^5 кл/мышь). Далее, животные получали в/в инъекции RL2 (12 мг/кг) каждый 2-3-й день курсом из 4-х инъекций, в/б инъекции CQ (50 мг/кг) ежедневно курсом из 10-ти инъекций и комбинацию препаратов RL2 и CQ. Контрольные животные получали физ. раствор в/в.

При анализе роста опухоли с фенотипом лекарственной устойчивости показано, что лечение RL2 не приводило к уменьшению объемов опухоли по сравнению с животными контрольной группы (Рис. 17). Торможение роста опухоли наблюдали в группах, получавших CQ и CQ с RL2. Сравнение продолжительности жизни животных показало, что только в группе животных, получавших комбинированную терапию CQ с RL2, продолжительность жизни была достоверно выше.

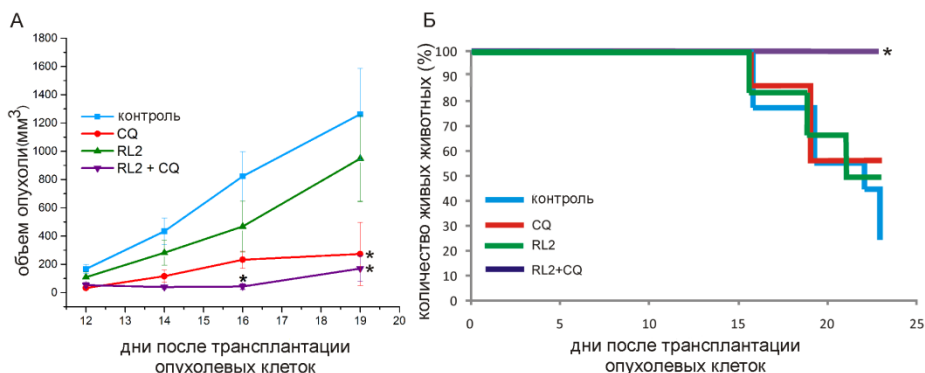


Рис. 17. Противоопухолевая активность RL2 и CQ в отношении лимфосаркомы RLS мышей. **А.** Динамика изменения объема опухоли. **Б.** Средняя продолжительность жизни экспериментальных мышей. Статистический анализ различия размеров опухолей и продолжительности жизни между группами проводили с использованием t-критерия Стьюдента, * - $p < 0.05$, различия считали достоверными. Данные представлены как среднее значение \pm SD.

Таким образом, показано, что комбинация RL2 и CQ не ведет к достоверному усилению супрессии роста опухоли, но увеличивает продолжительность жизни животных-опухоленосителей.

4. Аналоги лактапина, экспрессируемые в эукариотических клетках-продуцентах

Создание генетических конструкций, ведущих к продукции аналогов лактапина в эукариотических клетках может дать терапевтическое преимущество. Кроме того, процессинг и фолдинг белков в эукариотических клетках может изменять активность белков по сравнению с белками, продуцируемыми в прокариотических системах экспрессии.

На основе лентивирусного вектора сотрудниками ИМКБ СО РАН были созданы 2 плазмиды – рEL1 и рEL2, которые обеспечивали экспрессию секретируемых фаналогов лактаптина – EL1 и EL2, отличающихся лидерными пептидными последовательностями, при этом, после отщепления сигнального пептида, кодируемые этими плазмидами аналоги лактаптина EL1 и EL2 являются абсолютно идентичными и соответствуют первичной последовательности белка RL2.

4.1. Анализ продукции рекомбинантных аналогов лактаптина в клетках HEK293T

В образцах кондиционированной ростовой среды клеток HEK293T, трансфицированных плазмидами рEL1 и рEL2, методом Вестерн блота была подтверждена секреция аналогов лактаптина EL1 и EL2 (Рис. 18). Методом ИФА обнаружено, что концентрация рекомбинантного лактаптина EL1 в культуральной среде составляла 510 ± 25 нг/мл, а EL2 – 420 ± 17 нг/мл. Поскольку было показано, что концентрация аналога лактаптина EL1 в среде выше, далее аналог EL1 использовали для анализа цитотоксической активности *in vitro*.

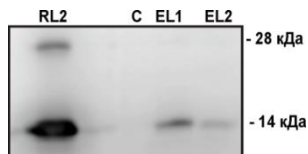


Рис. 18. Анализ рекомбинантных аналогов лактаптина в кондиционированной среде клеток HEK293T методом Вестерн блот. Аналог лактаптина RL2 был использован в качестве положительного контроля; С – кондиционированная среда клеток HEK293T, трансфицированных контрольной плазмидой рCDH-EF1-MCS-IRES-copGFP без вставки лактаптина; EL1 и EL2 – кондиционированная среда клеток, трансфицированных плазмидами рEL1 и рEL2, соответственно.

4.2. Сравнение цитотоксической активности рекомбинантных аналогов лактаптина RL2 и EL1

Для анализа цитотоксической активности кондиционированной среды, содержащей аналог лактаптина EL1, были выбраны линии опухолевых клеток человека различного гистологического происхождения: аденокарцинома молочной железы MDA-MB-231, аденокарцинома простаты PC3 и глиобластомы T98G, U343, U251 и U87MG. К исследуемым клеточным культурам добавляли различное количество кондиционированной среды от клеток-производителей. В качестве контроля использовали кондиционированную среду от клеток HEK293T, трансфицированных плазмидой рCDH-EF1-MCS-IRES-copGFP. Такой контроль позволял учитывать возможный цитотоксический эффект векторной ДНК.

На основании данных МТТ-теста были построены гистограммы зависимости жизнеспособности клеток от концентрации EL1 (Рис. 19). Данные, представленные на рисунке 19, свидетельствуют о выраженной цитотоксической активности кондиционированной среды, содержащей EL1 в отношении всех исследованных опухолевых клеточных линий. Наиболее чувствительной клеточной линией была линия глиобластомы человека U251. Можно видеть, что

сравнимое снижение жизнеспособности исследуемых клеток вызывало добавление среды с нанogramмовым количеством белка EL1 и микроgramмовое количество белка RL2.

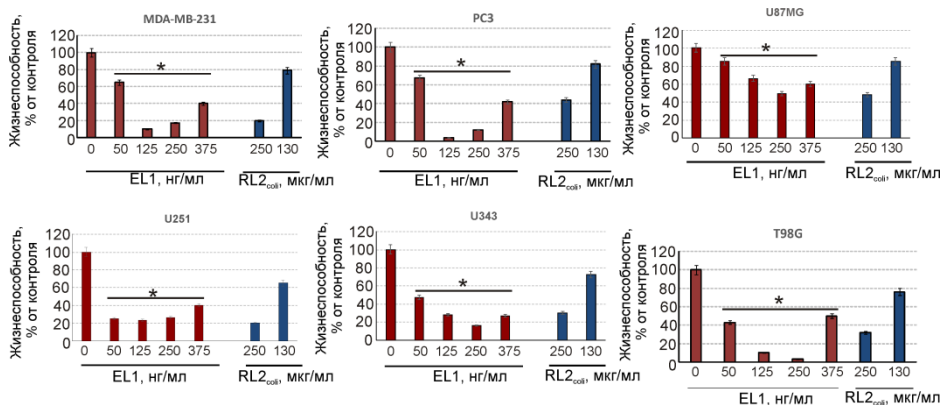


Рис. 19. Влияние рекомбинантного аналога лактапина EL1 на жизнеспособность опухолевых культур клеток человека. Клетки инкубировали с кондиционированной средой, содержащей EL1 в концентрации 50 – 375 нг/мл в течение 48 часов. Данные жизнеспособности представлены как относительное значение (%) по сравнению с контрольными клетками, обработанными культуральной средой IMDM от клеток НЕК293Т, трансфицированных контрольным вектором. В гистограммах указано среднее значение трех независимых экспериментов ± SD. * - $p < 0.05$ отличия от контроля считали достоверными.

Таким образом, секретируемый аналог лактапина EL1 обладает высокой цитотоксической активностью в отношении опухолевых клеток человека различного гистологического происхождения и может быть использован для создания более эффективных противоопухолевых препаратов.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что рекомбинантный аналог лактапина RL2, продуцируемый в клетках *E.coli*, индуцирует апоптоз клеток аденокарциномы молочной железы человека MDA-MB-231, обусловленный негативной регуляцией убиквитинлигазы MDM2, позитивной регуляцией про-апоптотического белка BAX, негативной регуляцией антиапоптотического белка Bcl-2 и несогласованной активацией генов каскада NF- κ B.
2. Рекомбинантный аналог лактапина RL2 индуцирует аутофагию в опухолевых клетках, что подтверждено образованием специфических для аутофагии ультраструктур клетки – фагофоров, аутофаголизосом и мультивезикулярных тел, а также изменением ключевых белковых маркеров аутофагии: процессингом белка LC3, негативной регуляцией белка p62 и позитивной регуляцией белка ATG5.
3. При исследовании цитотоксической активности аналога лактапина RL2 в комбинации с модуляторами аутофагии в отношении опухолевых клеток человека показано, что ингибиторы аутофагии хлорокин, Ku 55933 и индуктор аутофагии рапамицин усиливают цитотоксическое действие рекомбинантного аналога лактапина RL2 в синергетическом режиме.
4. Показано, что рекомбинантный аналог лактапина RL2 оказывает противоопухолевое действие в отношении опухолевых моделей различной локализации у мышей: подкожной, внутримышечной и внутрибрюшинной при суммарной дозе препарата RL2 40 – 240 мг/кг.
5. Показано, что индекс торможения роста опухоли (ТРО) при терапии комбинацией препаратов - рекомбинантным аналогом лактапина RL2 и химиопрепаратов – хлорокина и циклофосфида выше, чем индекс ТРО для моно-терапии этими препаратами.
6. Показано, что рекомбинантный аналог лактапина EL1, продуцируемый эукариотическими клетками, обладает цитотоксической активностью в отношении широкого спектра культур клеток опухолей человека в диапазоне концентраций 50-375 нг/мл.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ ДИССЕРТАЦИИ ОПУБЛИКОВАНЫ В РАБОТАХ:

1. Koval O.A., **Tkachenko A.V.**, Fomin A.S., Semenov D.V., Nushtaeva A.A., Kuligina E.V., Zavjalov E.L., Richter V.A. Lactaptin induces p53-independent cell death associated with features of apoptosis and autophagy and delays growth of breast cancer cells in mouse xenografts. // PLOS ONE. – 2014. – V. 9. – N. 4. – P. e93921.
2. **Ткаченко А.В.**, Троицкая О.С., Семенов Д.В., Дмитриенко Е.В., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Коваль О.А. Активация иммунной системы рекомбинантным аналогом противоопухолевого белка лактаптина. // Молекулярная биология. – 2017. – V. 51. – N. 5. – P. 787-796.
3. Коваль О.А., Волкова О.Ю., Горчаков А.А., Кулемзин С.В., **Ткаченко А.В.**, Нуштаева А.А., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Таранин А.В. Сравнительный анализ активности лактаптина, полученного в про- и эукариотических системах экспрессии. // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2017. – V. 21. – N. 7. – P. 764-769.
4. **Bagamanshina A.V.**, Troitskaya O.S., Nushtaeva A.A., Yunusova A.Yu., Starykovych M.O., Kuligina E.V., Kit Yu.Ya., Richter M., Wohlfromm F., Kahne T., Lavrik I.N., Richter V.A., Koval O.A. Cytotoxic and Antitumor Activity of Lactaptin in Combination with Autophagy Inducers and Inhibitors. // BioMed Research International. – 2019. – V. 2019. – P. ID 4087160.
5. Патент РФ № 2683221. 26.03.2019. Коваль О.А., Волкова О.Ю., Горчаков А.А., Кулемзин С.В., **Ткаченко А.В.**, Нуштаева А.А., Кулигина Е.В., Рихтер В.А., Таранин А.В. Рекомбинантный пептид EL1, обладающий цитотоксической активностью по отношению к раковым клеткам человека.