

На правах рукописи

Татарский Виктор Вячеславович

**МЕХАНИЗМЫ ГИБЕЛИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ПРИ ДЕЙСТВИИ
НОВЫХ УГЛЕВОДНЫХ ПРОИЗВОДНЫХ ИНДОЛОКАРБАЗОЛОВ**

14.01.12 - онкология

**Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Москва 2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии медицинских наук
Российском онкологическом научном центре
имени Н. Н. Блохина РАМН, Москва

Научный руководитель

доктор медицинских наук А. А. Штиль

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор Красильников М. А.

доктор биологических наук, профессор Онищенко Г. Е.

Ведущее учреждение: ГОУ ВПО Российский государственный медицинский университет им. Н. И. Пирогова.

Защита диссертации состоится _____ 2010 г. на заседании
диссертационного Ученого Совета Д.001.017.01 при
РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН по адресу:
115478, Москва, Каширское шоссе, 24.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке
РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН.

Автореферат разослан _____ 2010 г.

Ученый секретарь специализированного Ученого Совета
доктор медицинских наук
профессор

Ю.В. Шишкин

Общая характеристика работы

Актуальность проблемы

Исследование эффективности низкомолекулярных химических соединений как прототипов противоопухолевых лекарств – актуальная проблема, решение которой требует усилий биологов, химиков, фармакологов, специалистов по экспериментальной терапии и клиницистов. Несмотря на значительные достижения биоорганической и медицинской химии, развитие методов молекулярной биологии и их применение к задачам практической медицины, потребность в новых соединениях с высоким терапевтическим потенциалом остается высокой.

Поиск эффективных соединений должен включать химические классы, в которых ранее обнаруживались активные вещества. Индолокарбазолы и их производные – интенсивно исследуемый класс противоопухолевых соединений. Большое значение имеют производные, содержащие углеводные остатки, присоединенные к фармакофору. Среди таких производных впервые обнаружены соединения, удовлетворяющие требованиям предклинических тестов и преодолевшие I-II фазы клинических испытаний (NB506, эдотекарин, мидостаурин, CEP-701, энцестаурин). Следовательно, индолокарбазолы и их углеводсодержащие производные перспективны для дальнейшей оптимизации химической структуры.

Новые соединения требуют детального исследования молекулярных механизмов действия. Требуется выявление внутриклеточных мишеней и изучение взаимодействия новых веществ с этими биомолекулами. Взаимодействие с мишенью – важнейший первоначальный акт, результатом которого станут индукция гибели клеток и/или активация механизмов их выживания. Из характера взаимодействия с мишенью следует дальнейший анализ механизмов цитотоксичности. Новые производные соединений известного класса могут по-иному взаимодействовать с мишенями, чем исходное соединение (прототип); в этом – одна из причин большей или меньшей эффективности производных. Поэтому наибольшее внимание в

диссертации уделено взаимодействию новых производных индолокарбазола с внутриклеточными мишенями.

Современные представления о механизмах гибели опухолевых клеток включают многообразие процессов, существенных для реализации этого феномена. В диссертации обосновано представление о связи цитотоксичности с концентрацией химического соединения: при минимальных концентрациях происходит “насыщение” мишени, аффинность к которой у исследуемого соединения наибольшая. В этой ситуации ответ клетки будет обусловлен одними механизмами, а при увеличении концентрации токсина и его взаимодействиями с менее аффинными мишенями – другими механизмами или их совокупностью. Следовательно, выяснение механизмов гибели клеток не может ограничиваться простыми констатациями “апоптоз”, “некроз” и др. - требуется детальное исследование сложного феномена цитотоксичности в зависимости от экспериментальных условий.

Установление механизмов гибели опухолевых клеток при действии углеводсодержащих производных индолокарбазола необходимо для поиска производных, обладающих приемлемыми противоопухолевыми свойствами и меньшей общерезорбтивной токсичностью. Этот прикладной аспект диссертации базируется на фундаментальном характере исследований механизмов гибели клеток эукариот в ответ на токсический стресс. Обе стороны исследования важны для достижения прогресса в решении актуальной проблемы – установления механизмов гибели опухолевых клеток и отбора новых соединений - кандидатов для предклинических исследований.

Цель исследования

Цель работы – получение новых знаний о молекулярных механизмах гибели клеток, вызываемой углеводсодержащими производными

индолокарбазола – соединениями нового класса противоопухолевых препаратов.

Задачи:

1. Из химической библиотеки новых углеводсодержащих производных индолокарбазола выбрать наиболее активное (лидерное), т.е. вызывающее гибель опухолевых клеток в субмикромольных концентрациях.
2. Получить количественные данные о взаимодействии лидерного производного с внутриклеточными мишенями, важными для цитотоксичности: ДНК, топоизомераза I.
3. Изучить механизмы цитотоксичности нового лидерного производного индолокарбазола.

Новизна исследования

1. Впервые определены внутриклеточные мишени нового производного индолокарбазола ЛХС-1006, взаимодействие с которыми существенно для проявления цитотоксичности. Такими мишенями являются ДНК и комплекс ДНК:ЛХС-1006:топоизомераза I.
2. Впервые определены типы клеточной гибели, вызываемой новым производным индолокарбазола ЛХС-1006. Установлено, что типы гибели определяются концентрацией нового соединения и зависят от взаимодействия с конкретной внутриклеточной мишенью.
3. Впервые получены количественные данные о константах комплексообразования ЛХС-1006 с ДНК, установлен тип связывания - интеркаляция. Аффинность нового соединения к ДНК превышает таковую для ранее описанных производных индолокарбазолов.
4. Впервые установлена вакуолизация цитоплазмы и роль вакуолярной АТФазы в этом феномене – важной особенности цитотоксичности ЛХС-1006.

Научно-практическая значимость исследования

Изучение механизмов цитотоксического действия нового производного индолокарбазолов позволит обосновать эффективность этого класса соединений для лечения онкологических заболеваний.

Апробация работы

Диссертация обсуждена 16 марта 2010 г. на совместной конференции лабораторий механизмов гибели опухолевых клеток, молекулярной эндокринологии, регуляции клеточных и вирусных онкогенов, механизмов регуляции иммунитета, биохимии опухолей, канцерогенных веществ, вирусного канцерогенеза, механизмов прогрессии эпителиальных опухолей, биохимической фармакологии, медицинской химии, лаборатории химического синтеза, лаборатории электронной микроскопии отдела патологической анатомии опухолей РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН.

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликованы 2 журнальных статьи и тезисы 3 международных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 105 страницах машинописи и состоит из введения, глав “Обзор литературы”, “Материалы и методы исследования”, “Результаты исследования”, заключения и выводов. Работа содержит 19 рисунков и 3 таблицы. Библиографический материал включает ссылки на 200 источников литературы.

Материалы и методы исследования

Клетки и условия культивирования

Использованы линии трансформированных клеток человека: НСТ116 (рак толстой кишки) с диким типом *p53*; НСТ116 $p53$ КО - сублиния НСТ116 с делецией обоих аллелей гена *p53* ($p53^{-/-}$) (получена в лаборатории В.Vogelstein, Johns Hopkins University, США; предоставлена Б.П.Копниным),

НСТ116WafConALacZ (получена в лаборатории П.М.Чумакова, Институт молекулярной биологии имени В.А.Энгельгардта РАН), аденокарцинома молочной железы MCF-7, сублиния плоскоклеточного рака легкого A431 с экзогенным маркером эндосом Rab4-GFP, а также линия глиомы крысы С6. Клетки культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла с добавлением 2 мМ *L*-глутамина, 5% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина при 37⁰С, 5% СО₂. Во всех экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста.

Исследование жизнеспособности клеток (МТТ-тест)

Клетки НСТ116 рассеивали в 96-луночные планшеты (5х10³ клеток в 190 мкл культуральной среды) и инкубировали 16 час. В день экспериментов приготавливали серийные разведения ЛХС-1006. Клетки инкубировали с ЛХС-1006 72 часа, вносили 20 мкл раствора МТТ (5 мг/мл) и выдерживали 2 часа до развития фиолетовой окраски. Образовавшийся формазан растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре при длине волны 570 нм, вычитая оптическую плотность при 690 нм. Для подавления активности каспаз использовали пан-каспазный ингибитор zVAD-FMK (20-40 мкМ).

Изучение связывания ЛХС-1006 с ДНК

Для изучения взаимодействия нового соединения с ДНК использовали нативную ДНК из эритроцитов кур ("Reanal", Венгрия) и синтетические олигонуклеотиды d(AT)₂₀, d(GC)₂₀ ("Литех", Москва). ДНК растворяли в буфере Хэнкса (0,137 М NaCl, 5,4 мМ KCl, 0,25 мМ Na₂HPO₄, 0,44 мМ KH₂PO₄, 1,3 мМ CaCl₂, 1 мМ MgSO₄, 4,2 мМ NaHCO₃). Измерения проводили при 37⁰С. Спектры поглощения ЛХС-1006 и его комплексов с ДНК регистрировали на спектрофотометре Jasco V-550. Спектры возбуждения и флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Photon Technology International. Флуоресценцию молекул ЛХС-1006 регистрировали в диапазоне 340< λ <650 нм при возбуждении в длине волны 320 нм. Концентрацию ЛХС-

1006, связанного с ДНК, определяли по спектрам его поглощения в ближней УФ-области ($\lambda = 320$ нм), используя уравнение (1):

$$C_2/C_0 = [A_1 - A]/[A_1 - A_2] \quad (1)$$

где A , A_1 , A_2 – абсорбция исследуемого образца на длине волны 320 нм и поглощение контрольных образцов со свободным и полностью связанным ЛХС-1006, соответственно; $C_0 = C_1 + C_2$ – сумма концентраций свободного (C_1) и связанного (C_2) ЛХС-1006 в растворе. Для определения количества связанных с ДНК молекул ЛХС-1006 флуориметрическим методом фиксированное количество ДНК в буфере титровали добавлением ЛХС-1006. Регистрировали изменения интенсивности флуоресценции (I) ЛХС-1006 в длине волны 550 нм при возбуждении $\lambda=320$ нм. Концентрацию адсорбированных на ДНК молекул ЛХС-1006 рассчитывали по возрастанию флуоресценции ЛХС-1006 в комплексе с ДНК, используя уравнение (2):

$$C_2/C_0 = (I - I_1)/(I_2 - I_1) \quad (2)$$

где I , I_1 and I_2 – интенсивности флуоресценции ЛХС-1006 в присутствии ДНК, без ДНК и при полном связывании лиганда, соответственно; $C_0 = C_1 + C_2$ – сумма концентраций свободных (C_1) и связанных (C_2) молекул ЛХС-1006. Изотермы адсорбции молекул ЛХС-1006 на ДНК строили в координатах Скэтчарда как зависимость r/C_1 от r . Параметр $r = C_2/C_{\text{ДНК}}$ соответствует количеству связанных молекул ЛХС-1006, приходящихся на одну пару нуклеотидов (п. н.).

Исследование клеточного цикла

Клетки НСТ116 рассеивали на 35-мм чашки Петри. Через 16 часов добавляли ЛХС-1006 (0,1-5 мкМ). По окончании инкубации клетки (открепившиеся и прикрепленные) собирали в пробирки, осаждали центрифугированием и лизировали в буфере (0,1% цитрата натрия, 0,3% NP-40, 50 мкг/мл РНКазы А, 50 мкг/мл пропидия иодида). Лизаты инкубировали 30 мин. при 4⁰С. Распределение фаз клеточного цикла (по плоидности ДНК) анализировали на проточном цитофлуориметре Becton Dickinson (США) в каналах PE и PerCP. Накапливали 30 000 событий для каждого образца.

Изучение действия ЛХС-1006 на активность топоизомеразы I

Реакционную смесь, содержащую 0,25 мкг ДНК плазмиды рНОТ, 1 ЕД топоизомеразы I и исследуемые концентрации ЛХС-1006 инкубировали в буфере (35 мМ Трис-НСl, рН 8,0; 72 мМ КСl, 5мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотрейтола, 5 мМ спермидина, 0,01% бычьего сывороточного альбумина) 30 мин. при 37⁰С. Реакцию останавливали внесением додецилсульфата натрия (SDS). После добавления протеиназы К реакцию смесь инкубировали 40 мин. при 37⁰С. Продукты реакции подвергали электрофорезу в 1% агарозном геле, окрашивали бромистым этидием и просматривали в УФ-свете.

Анализ межнуклеосомной фрагментации ДНК

Клетки НСТ116 ($3,0 \times 10^5$ в 3 мл культуральной среды) рассеивали на 35-мм чашки Петри. Через 16 часов добавляли ЛХС-1006. После инкубации (24-72 часа) клетки лизировали в буфере (0,35 М NaCl; 20 мМ Трис-НСl, рН 7,4; 2 мМ MgCl₂; 1 мМ дитиотрейтола; 0,5% NP-40) и центрифугировали 10 мин. при 12 000 g. Супернатант удаляли, осадки растворяли в лизирующем буфере и добавляли к лизирующимся клеткам. Добавляли смесь забуференного фенола и хлороформа (1:1) и центрифугировали 10 мин. при 12 000 g. ДНК осаждали в присутствии 0,3 М ацетата натрия и этанола при -20⁰С, обрабатывали РНКазой А и проводили электрофорез в 1% агарозном геле.

Изучение р53-зависимой трансактивации транскрипции

Изучение р53-зависимой транскрипции проводили на сублинии НСТ116WafConALacZ, экспрессирующей ген-репортер бета-галактозидазы под контролем р53-зависимого промотора. Клетки рассеивали на 6-луночные планшеты (2×10^4 клеток/мл); 16 час. спустя добавляли ЛХС-1006 (0,25-5 мкМ). Через 24 часа клетки лизировали в буфере (1 мМ MgCl₂, 250 мМ Трис-НСl, рН 7,4; 0,02% NP-40, 0,2% о-нитрофенил-бета-D-галактопиранозид) и инкубировали 20 мин. при 37⁰С. Активность бета-галактозидазы (по оптической плотности лизатов при длине волны возбуждения 414 нм) относили к общей концентрации белка в лизатах, определяемой по

Брэдфорду. Активность бета-галактозидазы в необработанных клетках принимали за 100% (контроль).

Изучение ингибирования репликации

Клетки НСТ116 рассеивали на 96-луночные планшеты (5×10^3 клеток на лунку). Через 16 час. добавляли ЛХС-1006 (0,5-5 мкМ) и инкубировали 1 час. Добавляли 1 мкКи ^3H -тимидина, клетки инкубировали 2 часа, лизировали, ДНК переносили на фильтры и помещали во флаконы с сцинтилляционной жидкостью. Количество импульсов измеряли на счетчике Beckman. В качестве препарата сравнения использовали ингибитор синтеза ДНК афидиколин.

Изучение вакуолизации клеток

Клетки НСТ116 рассеивали на 60-мм чашки Петри (6×10^5 клеток на чашку) и оставляли для прикрепления и полного распластывания на 72 часа. Для изучения роли синтеза белка в вакуолизации использовали ингибиторы трансляции циклогексимид и актиномицин D. Для изучения влияния АТФ-азной активности использовали ингибитор F_0F_1 -АТФсинтазы олигомицин. Для изучения транспорта вакуолей от аппарата Гольджи к эндоплазматическому ретикулуму (ЭПР) использовали брефельдин А. Для ингибирования активности вакуолярной АНФазы (V-АТФазы) использовали бафиломицин А. Все ингибиторы добавляли за 1 час до внесения ЛХС-1006. Динамику образования вакуолей изучали методом фазово-контрастной микроскопии на приборе Axiovert 200M LSM 510 Meta. Фотосъемку клеток в одном поле зрения проводили каждые 5 минут. Через 60 мин. проводили дополнительную съемку 10 полей зрения.

Распределение маркеров органелл при вакуолизации клеток

Клетки линий НСТ116, С6 и А431 Rab4-GFP рассеивали на круглые покровные стекла диаметром 24 мм в 60-мм чашки Петри (6×10^5 клеток на чашку). Для визуализации митохондрий использовали флуоресцентный маркер Mitotracker Red CMX-Ros (100 нм), свечение которого зависит от трансмембранного электрического потенциала митохондрий. Для

визуализации лизосом использовали pH-чувствительный маркер LysoTracker Green DND-26 (1 мкМ). Цифровые изображения получены на лазерном конфокальном микроскопе Axiovert 200M LSM 510 Meta с использованием иммерсионного объектива 100x. Флуоресценцию Mitotracker Red возбуждали лазером (длина волны 633 нм), эмиссию регистрировали с помощью 650-710 полосно-пропускающего фильтра. Для возбуждения LysoTracker Green использовали 488 нм лазер и фильтр 500-530 нм. Для обработки изображений применяли компьютерную программу Zeiss LSM 510 Meta Software 3.2.

Анализ белков методом иммуноблоттинга

Клетки рассеивали на 60-мм чашки Петри (3×10^5 клеток на чашку) и оставляли в инкубаторе на 16 час. ЛХС-1006 добавляли в указанных концентрациях (см. главу “Результаты исследования”) на 6-48 часов, клетки открепляли от подложки и центрифугировали 5 мин. при 4000 g. Осадок лизировали на льду 30 мин. в буфере (50 мМ Трис-НСl, pH 7,4; 150 мМ NaCl; 1% NP-40; 0,25% дезоксихолата натрия, 2 мМ фенилметилсульфонил фторида). Лизаты центрифугировали 15 мин. при 10000 g. Для измерения концентрации белка в супернатантах использовали раствор Брэдфорда и серийные разведения бычьего сывороточного альбумина. Электрофорез белков проводили в 8-12% полиакриламидном геле в буфере, содержащем 375 мМ Трис-глицин, pH 8,8 и 10% SDS. После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану и выдерживали в 5% растворе обезжиренного сухого молока для блокирования неспецифического связывания. Мембраны инкубировали с антителами к процессированной каспазе 3 (1:1000) и поли(АДФ)рибозо-полимеразе (PARP) – 1:1000). В качестве внутреннего контроля использовали антитела к гамма-актину (1:1000). Мембраны отмывали и инкубировали с IgG мыши или кролика, конъюгированными с пероксидазой хрена (1:5000). Визуализацию белков проводили в растворе для хемилюминесценции.

Результаты исследования

В лаборатории химического синтеза НИИ экспериментальной диагностики и терапии опухолей РОНЦ имени Н.Н. Блохина РАМН синтезированы серии углеводсодержащих производные индолокарбазола. В Национальном институте рака США (National Cancer Institute) проведен скрининг этих производных на 60 линиях клеточных культур. В частности, ингибирование пролиферации линий CCRF-CEM, SR (лейкозы), NCI-H522 (немелкоклеточный рак легкого), SW620 (рак толстой кишки), U251 (нейрогенная опухоль), LOXIMVI, MALME-3M (меланома), IGROV1, OVCAR-3 (рак яичника), CAKI-1, RXF393 (рак почки) и T47D (рак молочной железы) отмечено в концентрациях < 10 нМ, а для UACC-62, SK-OV-3 (рак яичника), PC-3 (рак предстательной железы) и BT-549 (рак молочной железы) - в концентрациях 15-26 нМ. По результатам скрининга для исследования механизмов действия соединений исследуемого класса нами отобрано производное (12-(альфа-L-арабинопиранозил)-индоло[2,3-*a*]пирроло[3,4-*c*]карбазол-5,7-дион (условное название ЛХС-1006; предоставлено авторами синтеза – И.Л.Плихтяк и Т.Д. Миникер.

Изучение связывания ЛХС-1006 с ДНК

Поскольку соединение ЛХС-1006 показало высокую цитотоксичность на широкой панели линий опухолевых клеток человека, мы изучили внутриклеточные мишени данного соединения, важные для цитотоксичности. Мы предположили, что одной из мишеней является ДНК и комплекс ДНК с топоизомеразой I. Измерения связывания ЛХС-1006 с ДНК проводили методами спектрального анализа – поглощения света препаратом и флуоресценции при возбуждении светом. Свободный ЛХС-1006 имеет два максимума поглощения около 285 и 320 нм и слабую полосу поглощения в видимой области с максимумом около 425 нм. При адсорбции ЛХС-1006 на ДНК наблюдается гипохромный эффект и небольшое смещение максимума (320 нм) в длинноволновую сторону (рис. 1).

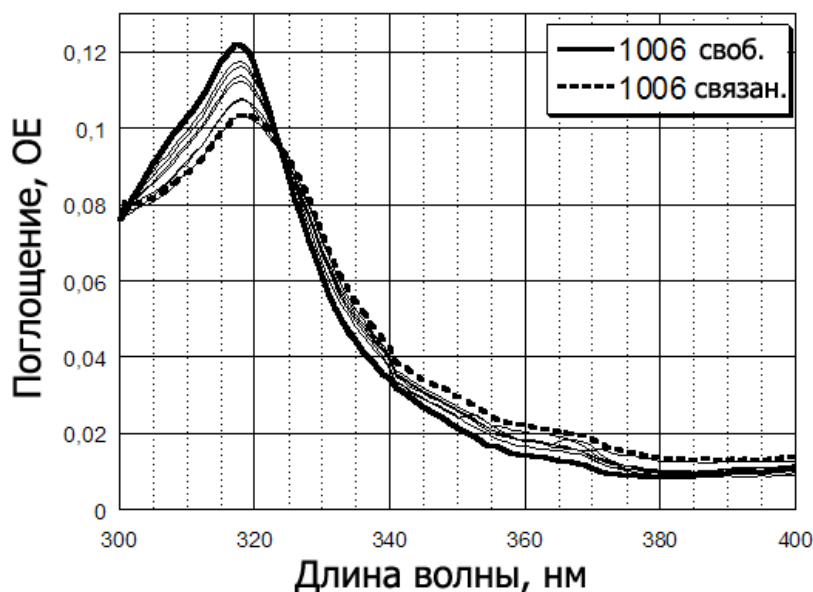


Рис. 1. Изменение спектра поглощения при связывании ЛХС-1006 с нативной ДНК.

В отсутствие ДНК молекулы ЛХС-1006 в полярном растворителе (буфере Хенкса) флуоресцируют в области $340 < \lambda < 460$ нм. В

гидрофобной среде появляется пик флуоресценции с максимумом при 550 нм. При добавлении ДНК к ЛХС-1006 возникла флуоресценция в длинноволновой области спектра $500 < \lambda < 650$ нм с максимумом около 560 нм.

На основании измерений поглощения и флуоресценции построены изотермы адсорбции ЛХС-1006 на нативной ДНК в буфере Хэнкса при 37°C . Изотермы адсорбции строили в координатах Скэтчарда как зависимость r/c_1 от r (r - концентрация связанного лиганда, отнесенная к концентрации ДНК, выраженной в молях нуклеотидов; рис.2).

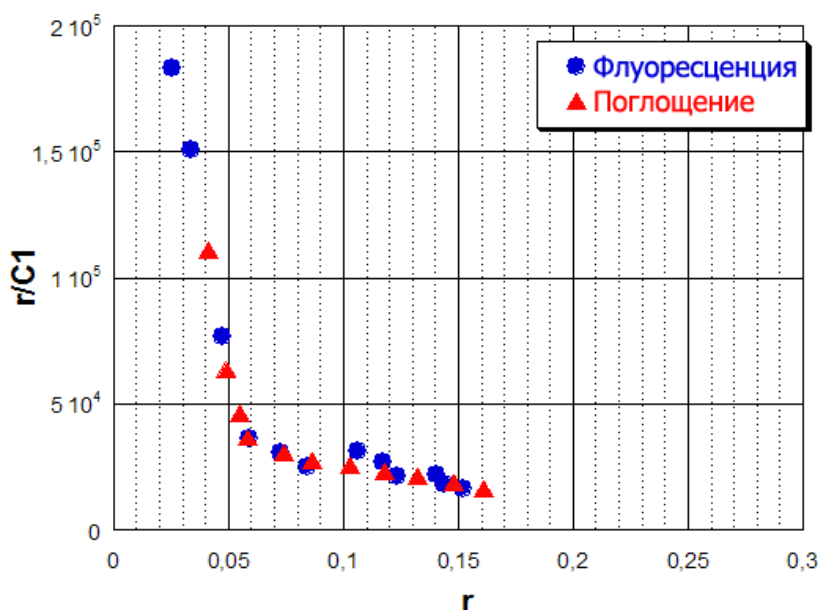


Рис. 2. Изотермы адсорбции ЛХС-1006.

r - концентрация связанного лиганда/концентрация ДНК, c_1 - концентрация свободного ЛХС-1006.

Установлено, что ЛХС-1006 образует с ДНК два типа комплексов (табл. 1) – “сильный” комплекс с высокой константой связывания ($K_1 = 3,0 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$), при образовании которого одна молекула ЛХС-1006 приходится на 4 нуклеотидные пары, и “слабый” комплекс, у которого константа связывания ($K_2 = 0,05 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$) ниже на два порядка, но плотность заполнения выше: одна молекула ЛХС-1006 приходится на 1 нуклеотид.

Для определения влияния нуклеотидного состава ДНК на эффективность связывания с ЛХС-1006 исследовали поглощение индолюкарбазола при связывании с олигонуклеотидами $d(\text{GC})_{20}$ и $d(\text{AT})_{20}$. Для комплекса с $d(\text{GC})_{20}$ выявлены 2 типа мест связывания – сильные (с высокой константой связывания) и слабые – с более низкой константой. Сильный комплекс с $d(\text{GC})_{20}$ аналогичен таковому для нативной ДНК, однако имеет большее количество мест связывания – одна молекула приходится на 5 нуклеотидных пар. Слабый комплекс для GC-пар также схож со слабым комплексом, образуемым с нативной ДНК – одинаковое количество мест связывания (одна молекула на две нуклеотидных пары) и один порядок констант связывания. Для комплексов ЛХС-1006: $d(\text{AT})_{20}$ установлен только один тип связывания – слабый, аналогичный таковому для нативной ДНК. Константы и стехиометрия связывания приведены в таблице 1.

ДНК	$K, \text{ M}^{-1} \times 10^5$	N (п.н.)
нативная	$3,0 \pm 0,5$	4
	$0,05 \pm 0,02$	1
$d(\text{GC})_{20}$	$3,3 \pm 0,4$	6
	$0,09 \pm 0,03$	1
$d(\text{AT})_{20}$	$1,6 \pm 0,5$	3

Таблица 1. Константы и стехиометрия комплексов ЛХС-1006 с ДНК.

N – количество нуклеотидов на 1 молекулу ЛХС-1006.

Исследование ингибирования топоизомеразы I.

Для исследования способности ЛХС-1006 ингибировать топоизомеразу I проводили реакцию расплетания суперскрученной плазмидной ДНК ферментом. В отсутствие ЛХС-1006 фермент переводит суперскрученную ДНК (ДНКсс) в кольцевую форму (рис.3, трек Т-1). Такая конформация ДНК

замедляет миграцию в геле. КАМП – камптотецин, известный ингибитор топоизомеразы I, вызывал торможение миграции в геле (положительный контроль). ЛХС-1006 ингибирова л способность топоизомеразы I раскручивать ДНК дозозависимым образом. Концентрации, вызывавшие выраженное ингибирование активности фермента - 2,5-5 мкМ (рис.3).

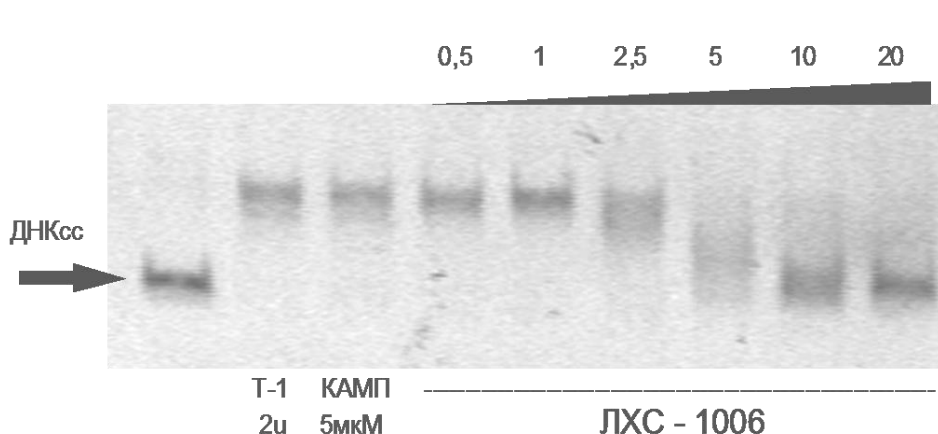
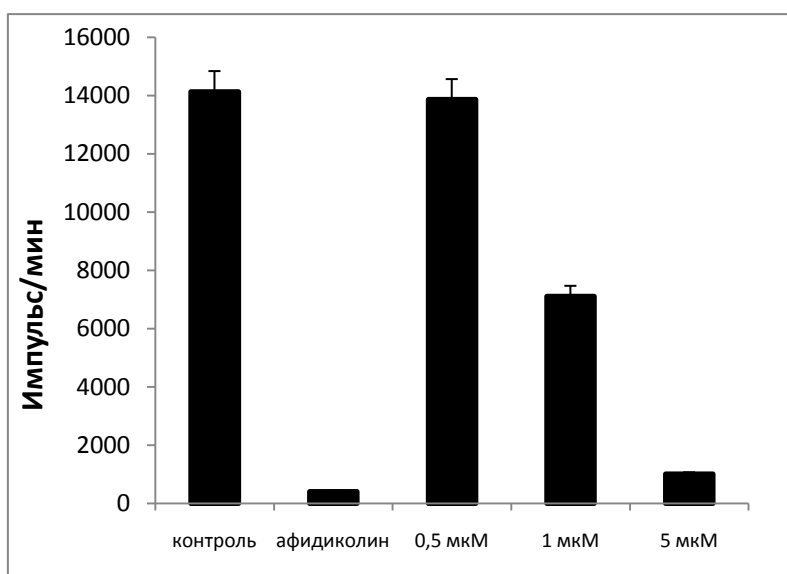


Рис. 3. Ингибирование топоизомеразы I при действии ЛХС-1006.

Анализ ингибирования репликации.

Интеркаляция производных индолокарбазола в ДНК приводит к изменению конформации двойной спирали и может вызвать ее повреждения и нарушение матричных синтезов – репликации и транскрипции. Для оценки влияния образования комплексов ДНК:ЛХС-1006 на репликацию изучено включение ³Н-тимидина в ДНК. В качестве положительного контроля



использовали ингибитор ДНК-полимераз афидиколин. На рис. 4 показано, что ЛХС-1006 эффективно ингибирует репликацию в диапазоне концентраций 1-5 мкМ.

Рис. 4. Включение ³Н-тимидина клетками НСТ116 при действии ЛХС-1006.

p53-зависимая трансактивация транскрипции

Белок p53- важнейший сенсор повреждений ДНК. Изучение активации p53 при действии ЛХС-1006 проводили на сублинии НСТ116WafConALacZ, стабильно экспрессирующей ген-репортер бета-галактозидазы под контролем p53-зависимого промотора. В качестве положительного контроля активации указанного гена-репортера выбран противоопухолевый препарат этопозид, активирующий p53 через повреждение ДНК, вызванное ингибированием топоизомеразы II. Полученные значения, нормированные на количество белка, относили к контролю, принимаемому за 100%. ЛХС-1006 вызывал 3-кратную индукцию p53-зависимой трансактивации бета-галактозидазы при максимальной концентрации 1 мкМ; активность (экспрессия) репортерного белка снижалась при > 1 мкМ ЛХС-1006, вероятно, в результате ингибирования матричного синтеза. Однако сравнение величины цитотоксичности в МТТ тесте для линии НСТ116 и сублинии НСТ116 с делецией p53, не показал разницы в цитотоксичности, что свидетельствует о вторичной роли p53 в клеточной гибели, опосредованной p53.

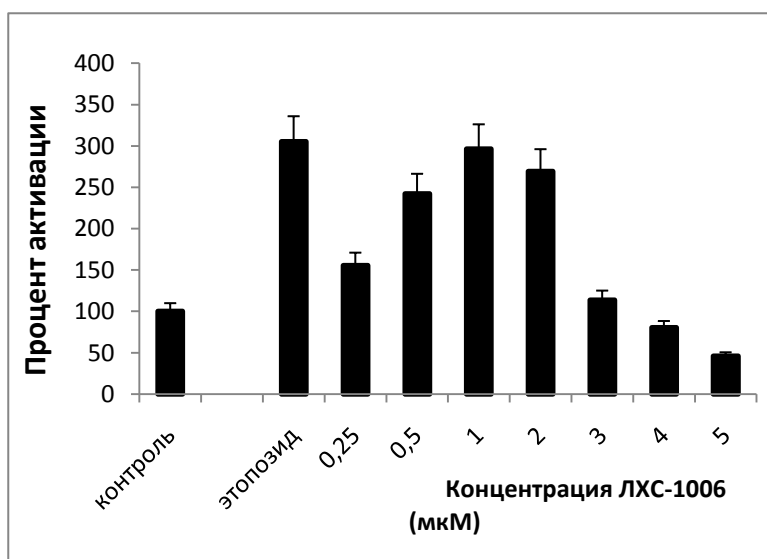


Рис. 5. Активация p53-зависимой транскрипции при действии ЛХС-1006.

Анализ клеточного цикла

Повреждение ДНК, активация p53 и ингибирование репликации могут привести к нарушениям клеточного цикла. Распределение клеток по фазам цикла изучали методом проточной цитофлуориметрии ядер, окрашенных йодидом пропидия. При инкубации клеток с ЛХС-1006 в течение 24 час.

увеличивалась доля клеток с деградацией ДНК (до 78,8%) и снижалась доля клеток в остальных фазах цикла, за исключением G2/M, где, с увеличением концентрации, наблюдали накопление клеток до максимума 45,3% при концентрации ЛХС-1006 1 мкМ (рис. 6).

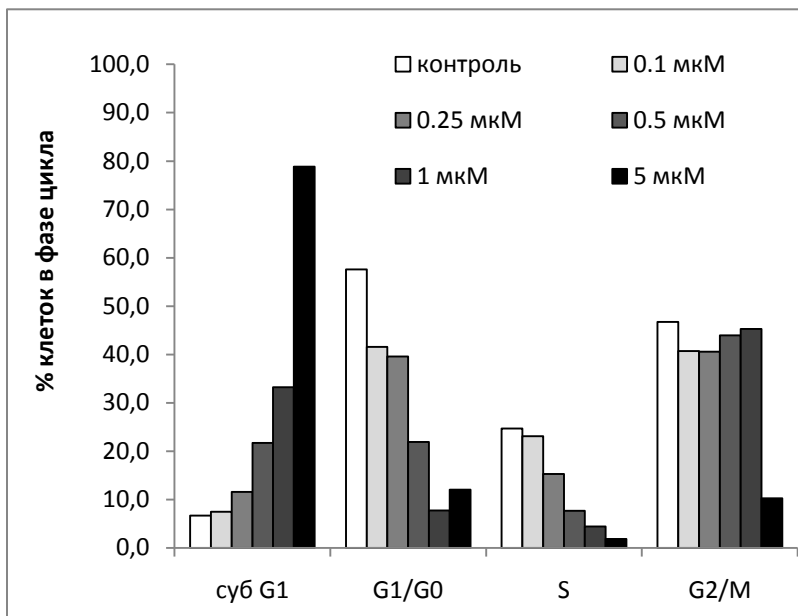


Рис. 6. Распределение фаз цикла при действии ЛХС-1006 на клетки НСТ116.

Анализ биохимических признаков апоптоза

Важнейшими молекулярными событиями при апоптозе являются активация каспазы-3 и последующая межнуклеосомная фрагментация ДНК, а также расщепление PARP. Активацию каспазы-3 и протеолитическое расщепление PARP анализировали в иммуноблоттинге. Результаты представлены на рис. 7.

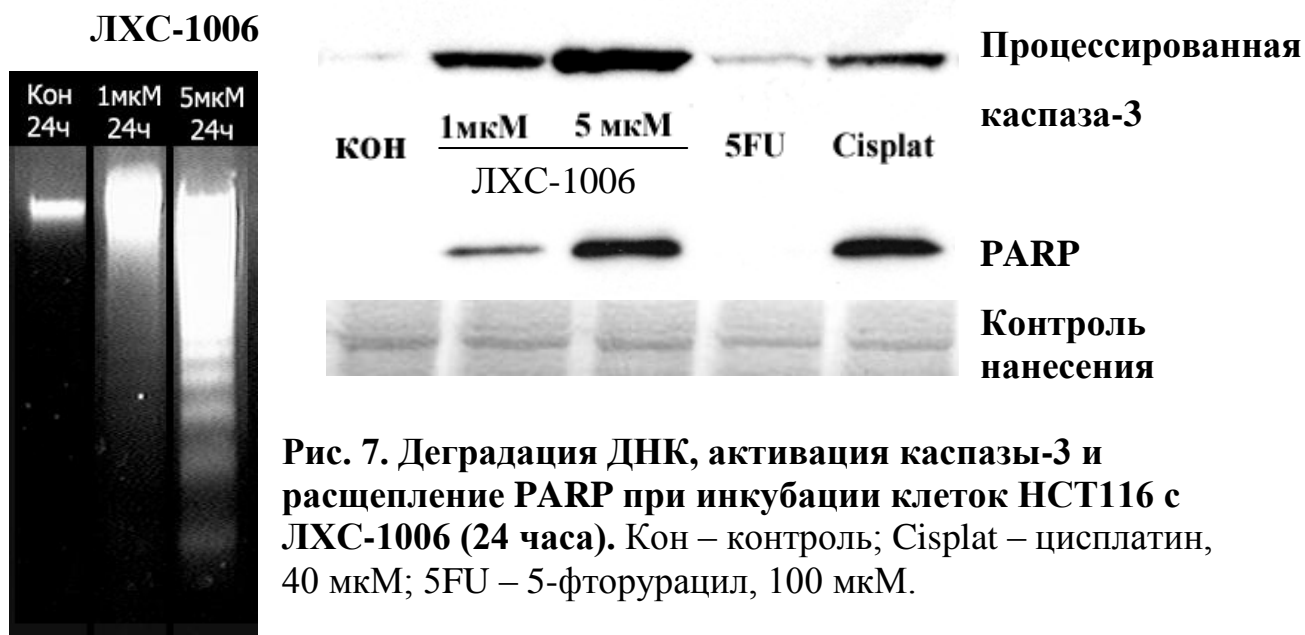


Рис. 7. Деградация ДНК, активация каспазы-3 и расщепление PARP при инкубации клеток НСТ116 с ЛХС-1006 (24 часа). Кон – контроль; Cisplat – цисплатин, 40 мкМ; 5FU – 5-фторурацил, 100 мкМ.

В диапазоне концентраций >1 мкМ наблюдалось дозозависимое увеличение маркеров апоптоза – характерной межнуклеосомной деградации ДНК, активация каспазы-3 и расщепление PARP.

Модуляция ЛХС-1006-индуцированного апоптоза z-VAD-FMK.

Делеция каспаз или гиперэкспрессия ингибиторов апоптоза в опухолевых клетках может являться причиной устойчивости опухолевых клеток к химиотерапии. Для изучения влияния ингибирования каспаз (особенно каспазы 3) на выживание клеток был использован пан-каспазный ингибитор Z-VAD-FMK (рис. 8.)

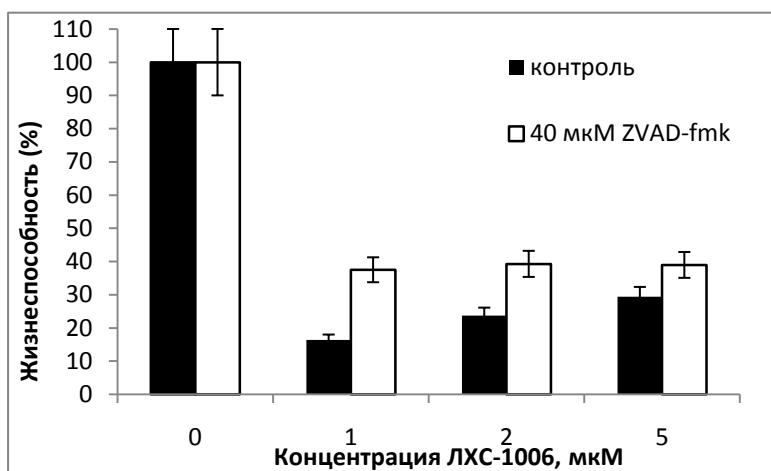


Рис. 8. Ингибирование цитотоксичности ЛХС-1006 при действии пан-каспазного ингибитора z-VAD-FMK.

Несмотря на то, что ингибирование активации каспазы-3 приводит к 50%-му увеличению жизнеспособности клеток при действии 1 мкМ ЛХС-1006, полного ингибирования цитотоксичности не происходит. Таким образом, механизмы гибели при действии ЛХС-1006 не зависят исключительно от активности каспаз.

Морфологический анализ гибели клеток при действии ЛХС-1006

Особенностью действия ЛХС-1006 является интенсивная вакуолизация клеток. Однако, такая вакуолизация не обязательно сопровождалась нарушением целостности плазматической мембраны, т.е. некрозом (как установлено по окрашиванию трипановым синим и иодидом пропидия). Вакуолизацию наблюдали уже через 5-10 минут после добавления препарата. Вакуолизация развивалась до тех пор, пока вакуоли не заполняли цитоплазму.

Для установления локализации вакуолей в компартментах, клетки, инкубированные с ЛХС-1006 1 час, были окрашены флуоресцентным брефельдином А, локализующимся в аппарате Гольджи и ЭПР, маркером ЭПР (ER-tracker), потенциал-зависимым маркером митохондрий MitoTracker RED и рН-чувствительным маркером лизосом LysoTracker Green. Окрашивание клеток этими зондами не выявило колокализацию вакуолей с митохондриями, изменений их морфологии или колокализацию вакуолей с ЭПР или аппаратом Гольджи. Однако вакуоли слабо окрашивались маркером лизосомального компартмента. Вакуоли также не колокализировались с ранними и поздними эндосомами, при наблюдении на линии А431, трансфецированной Rab4-GFP.

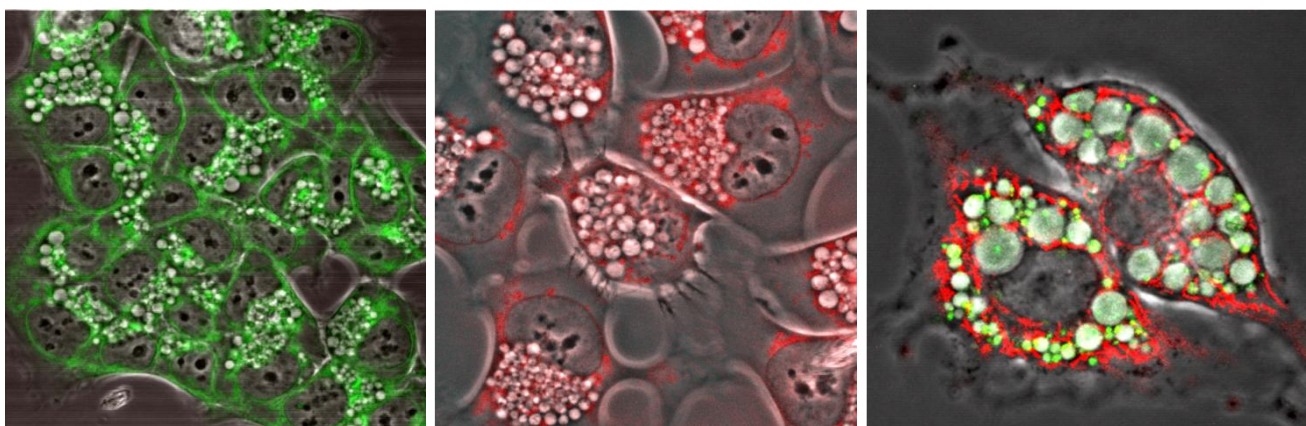


Рис. 9. НСТ-116, инкубация с ЛХС-1006 (5 мкМ, 2 часа), окрашивание: а) конъюгатом брефельдина А-BODIPY, б) ER-tracker в) LysoTracker Green и Mitotracker Red.

Для выяснения природы вакуолизации использованы принятые в литературе ингибиторы отдельных процессов, которые могли приводить к наблюдаемому фенотипу (параптоз, ЭПР-стресс, некроз, осмотическое набухание). Клетки наблюдали 24 часа после добавления ЛХС-1006. Полученные данные приведены в таблице 2.

Таблица 2. Влияние фармакологических ингибиторов на ЛХС-1006-индуцированную вакуолизацию.

Ингибитор	Ингибируемый процесс	Действие на вакуолизацию
Брефельдин А	СОР1-зависимый транспорт, структура аппарата Гольджи	Нет изменений
Олигомицин	Активность F_0F_1 АТФазы	Нет изменений
Актиномицин D	Синтез белка	Нет изменений
Циклогексимид	Синтез белка	Нет изменений
Бафиломицин А	Активность V-АТФазы	Полное ингибирование

Обнаружено подавление вакуолизации только при использовании ингибитора V-АТФазы – бафиломицина А. Бафиломицин А, добавленный после развития вакуолизации, вызывал исчезновение вакуолей. Таким образом, для образования и поддержания вакуолей необходима активность V-АТФазы, содержащейся на мембране лизосом. Описанный механизм не совпадает с фенотипами вакуолизации цитоплазмы, обнаруженными при других видах гибели.

Таким образом, механизмы гибели клеток при действии нового углеводного производного индолокарбазола ЛХС-1006 зависят от его концентрации. При относительно невысоких концентрациях механизмы гибели связаны с образованием комплекса ЛХС-1006 с ДНК и повреждением ее структуры. При увеличении концентрации ЛХС-1006 активируются дополнительные механизмы, такие как вакуолизация и апоптоз, вызванные связыванием с ДНК, и активацией других механизмов, в частности вакуолярной АТФазы.

Выводы

1. Среди новых углеводных производных индолокарбазолов выявлены наиболее цитотоксические и выбран 12-(альфа-*L*-арабинопиранозил)-индоло[2,3-*a*]пирроло[3,4-*c*]карбазол-5,7-дион (ЛХС-1006) как лидерное производное-прототип нового класса противоопухолевых соединений.
2. Внутриклеточной мишенью, важной для противоопухолевого действия ЛХС-1006, является двухцепочечная ДНК. Количественный расчет констант связывания ЛХС-1006 с ДНК показал, что соединение образует 2 типа комплексов с высокой и низкой константой.
3. Следствиями взаимодействия ЛХС-1006 с ДНК являются нарушение конформации дуплекса, снижение активности топоизомеразы I и p53-зависимая транскрипция генов.
4. Механизмы гибели клеток при действии ЛХС-1006 включают ингибирование пролиферации, остановку клеточного цикла и активацию запрограммированной клеточной гибели по типу апоптоза. Эти механизмы проявляются в зависимости от концентраций, при которых лидерное соединение взаимодействует с конкретными внутриклеточными мишенями.
5. Отличительной особенностью гибели клеток при действии ЛХС-1006 является фенотип вакуолизации цитоплазмы, связанный с быстрым расширением лизосомального компартмента в результате активности вакуолярной АТФазы. Данный фенотип отличается от ранее описанных и не зависит от трансляции, повреждения плазматической мембраны, нарушения структуры эндоплазматического ретикулума и митохондрий.

Автор выражает благодарность И.Л.Плихтяк и Т.Д.Миникер за предоставление препарата ЛХС-1006, Б.П.Копнину и П.М.Чумакову за сублинии клеток, М.М.Мойсеновичу за возможность работы на конфокальном микроскопе.

Публикации по теме диссертации

1. Калюжный Д.Н., Татарский-мл. В. В., Бондарев Ф.С., Плихтяк И.Л., Миникер Т.Д., Мельник С.Я., Штиль А.А., Борисова О.Ф.
Взаимодействие с ДНК как фактор цитотоксичности нового гликозидного производного индолокарбазола // *Доклады РАН*. 2006. Т.411. № 6. С. 833-836.
2. Kaluzhny D.N., Tatarskiy V.V. Jr, Dezhenkova L.G., Plikhtyak I.L., Miniker T.D., Shchyolkina A.K., Strel'tsov S.A., Chilov G.G., Novikov F.N., Kubasova I.Y., Smirnova Z.S., Mel'nik S.Y., Livshits M.A., Borisova O.F., Shtil A.A. Novel antitumor L-arabinose derivative of indolocarbazole with high affinity to DNA. // *ChemMedChem*. 2009. V. 4. № 10. P. 1641-1648.
3. Tatarskiy V.V. Kaluzhny D.N., Jr., Shchyolkina A.K., Bondarev F.S., Plikhtyak I.L., Miniker T.D., Mel'nik S.Ya., Smirnova Z.S., Shtil A.A., Borisova O.F. High antitumor activity of novel glycosylated indolocarbazole is determined by strong intercalation into DNA. // *Proc. 14th Euroconference on Apoptosis 'Death or Survival: Fate in Sardinia'*, Chia, Italy, 2006, P.230.
4. Kaluzhny D.N., Borisova O.F., Shchyolkina A.K., Tatarskii V.V.Jr., Shtil A.A. Novel antitumor L-arabinose derivative of indolocarbazole with high affinity to the duplex and telomeric G-quadruplex DNA. // *Second International Meeting on Quadruplex DNA*, 2009, Louisville, KY, p. 60.
5. Татарский-мл В.В., Плихтяк И.Л., Мельник С.Я., Калюжный Д.Н., Литвина М. М., Борисова О.Ф., Смирнова З.С., Штиль А.А. Механизмы противоопухолевого действия нового производного индолокарбазолов. // *Материалы конференции «Фундаментальная онкология. 2-е Чтения им. проф. Н.Н. Петрова»*. Санкт-Петербург, 2006. *Вопросы онкологии*. 2006. Т.52. С. 38-39.