

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 615.076.9-593.1

© Коллектив авторов

ЭФФЕКТ ПРИМЕНЕНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТА ГЕСПЕРАДИНА НА КУЛЬТУРАХ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ПРОСТАТЫ.

Н.Г. Ладыгина^{1,2}, Р.В. Лацис¹, Т. Ен²

¹Российский государственный медицинский университет, кафедра молекулярной биологии и медицинской биотехнологии медико-биологического факультета, Москва, РФ, тел.: 210-95-61, факс: 414 6715, эл. почта: mol-biol@cardio.ru
²Онкологический центр Фокс Чейс, Филадельфия, США, 333, Cottman Ave, R-310, Fox Chase Cancer Center, 19111, Philadelphia, Pa, USA, тел.: (215) 728 4311, факс: (215) 728 2412, эл. почта: ng_ladygina@fccc.edu

Для многих линий опухолевых клеток характерно значительное увеличение активности киназы Аугога В, контролирующей процесс клеточного деления. Синтетическое соединение гесперадин, являющийся прототипом фармакологического препарата, способен подавлять активность Аугога В. В данной работе изучали эффект гесперадина на линиях клеток рака молочной железы (MCF7) и аденокарциномы простаты – PC3. При обработке данных линий гесперадином наблюдали остановку пролиферации опухолевых клеток при наличии в них множественных митотических дефектов, вследствие снижения киназной активности Аугога В и утраты функциональной активности таких белков митотической сверточной точки (checkpoint), как hBUBR1 и CENP-E и их элиминации с кинетохоров митотических хромосом.

Ключевые слова: гесперадин, Аугога В, hBUBR1, CENP-E, опухолевые клетки.

ВВЕДЕНИЕ. Клеточные киназы Аугога А и В определяют прохождение различных этапов митотического деления [1]. Во время митоза Аугога А локализуется на центросомах и, как вполне обосновано предполагают, она играет важную роль в процессе организации веретена деления [2]. В свою очередь, Аугога В является хромосомным “белком-пассажем”, локализуясь в начале клеточного деления на кинетохорах, а затем перемещающимся в район образования клеточной перетяжки к моменту вступления в анафазу [3]. Локализация Аугога В на кинетохорах митотических хромосом наводит на мысль о контроле данным белком процесса билатерального прикрепления хромосом к микротрубочкам веретена деления (выстраивания хромосом у клеточного экватора), что обуславливает прохождение клеткой митотической точки рестрикции. Миграция этой киназы в зону образования перетяжки является критичным для процесса цитокинеза [4].

Высокий уровень экспрессии Аугога А и В наблюдается у большого числа раковых клеток [5], а гесперадин является ингибитором каталитической активности данных киназ [6]. Применение гесперадина в физиологических

ВЛИЯНИЕ ГЕСПЕРАДИНА НА КЛЕТКИ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ПРОСТАТЫ

концентрациях на клетках HeLa сопровождается подавлением функции Aurora B в большей степени, чем Aurora A, хотя *in vitro* для ингибирования функций как Aurora B так и Aurora A требуется одинаковая концентрация гесперадина [6]. Учитывая значимость данных киназ в осуществлении процесса митоза мы предположили, что их селективный ингибитор сможет избирательно подавлять рост опухолевых клеток.

МЕТОДИКА. *Культивирование клеток.* Линии клеток PC3 и MCF7, полученные в клеточном банке ATTC США (номер в каталоге CRL-1435 и HTB-22 соответственно) культивировали в среде RPMI-1640 с добавлением 10% ФБС L-глутаминна 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

Обработка культуры клеток гесперадином. Гесперадин (производное индотинона (см рис 1 в)) был любезно предоставлен центром научных исследований Vienna BIOCENTER (Испания). Препарат первоначально растворяли в DMSO (конечная концентрация 100 мМ). Для анализа роста клетки PC3 и MCF7 высевали в описанной выше среде в количестве 6×10^4 клеток на 60 мм культуральную чашку. Спустя 24 часа добавляли гесперадин непосредственно в среду до конечной концентрации 100 нМ. Клетки собирали на первый, второй и третий день инкубирования для анализа клеточного цикла. Для иммунофлуоресцентного исследования клетки инкубировали в присутствии гесперадина три дня.

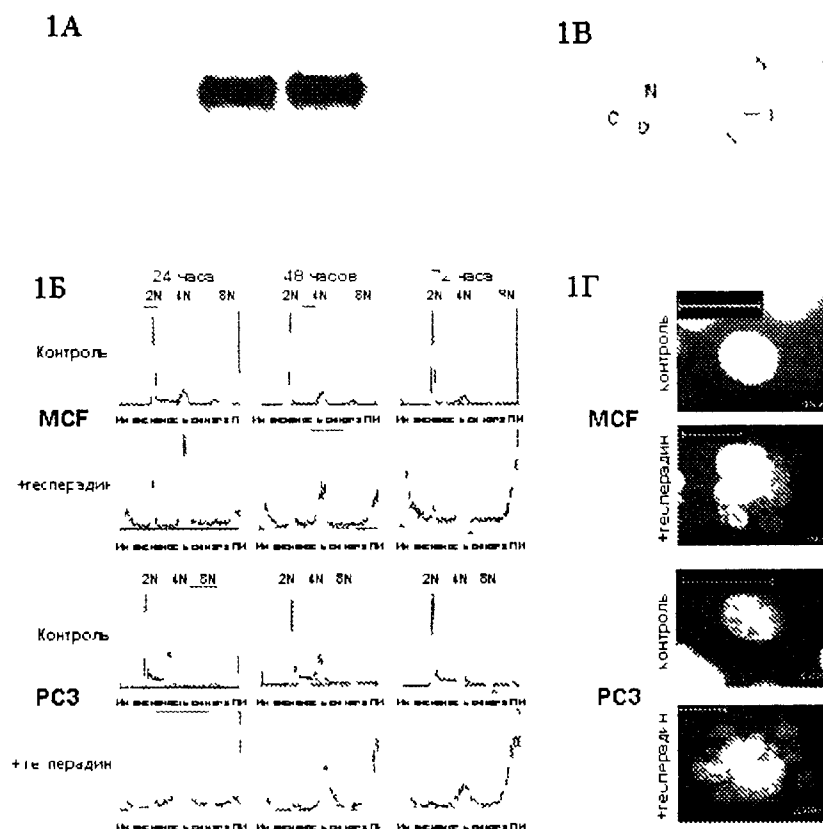


Рисунок 1

Эффект применения гесперадина на культурах клеток MCF7 и PC3. А Иммуноблоттинг с использованием Aurora B антител (линия 1 - MCF7, линия 2 - PC3). Б Данные проточной цитофлуорометрии, полученные при обработке клеток гесперадином на протяжении 24, 48 и 72 часов (верхние две панели - MCF7, нижние - PC3). В Химическая структура гесперадина. Г Конфокальные изображения MCF7 (верхняя панель) и PC3 клеток (нижняя панель) обработанных гесперадином в течение 72 часов. Здесь и далее шкала соответствует 200 мкм.

Приготовление клеточных лизатов, белковый электрофорез и вестерн-блоттинг.

Клетки лизировали в NP40 лизирующем буфере (50 mM трис-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% NP40, 1 mM PMSF, и 10 мкг/мл ингибиторы протеаз [леупептин, апротинин и пепстатин]) и центрифугировали при 16000 g и $t=4^{\circ}\text{C}$ в течение 15 минут. Белки клеточных лизатов разделяли методом электрофореза в 10% ПААГ и переносили на PVDV мембрану ("Millipore", США). Моноклональные антитела к Аугоа В ("Molecular probes", St. Louis, США) использовали в разведении 1:500 в 5% растворе сухого молока

Анализ состояния клеточного цикла. Монослой клеток отделяли от чашек путем обработки 0,25% раствором трипсина и собирали центрифугированием. Клетки фиксировали в 70%-ном этаноле при 4°C и затем ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере с добавлением иодистого пропидия до конечной концентрации 50 мкг/мл. Окрашенные клетки анализировали методом проточной цитофлуориметрии при помощи FACScan; математическую обработку данных проводили с использованием пакета Cell Quest (Becton Dickinson)

Иммунофлуоресцентный анализ. Обработанные гесперадином клетки экстрагировали при использовании KB буфера (50 mM трис-HCl, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,1% BCA), содержащего 0,2% тритон X-100 в течение 5 минут при комнатной температуре (КТ), отмывали в течение 5 минут в KB буфере и затем фиксировали в растворе 3,5% параформальдегида/1xPBS, pH 6,8 в течение 10 мин при комнатной температуре. Белки hBUBR1 и CENP-E окрашивали с помощью поликлональных кроличьих антител, полученных в лаборатории проф. Т. Yen [7]; уровень Аугоа В определяли при помощи aim-1 моноклональных антител ("Molecular probes"). Микротрубочки окрашивались с помощью моноклональных антител к α -тубулину ("Sigma", США). Для окрашивания центромер использовали сыворотку больных аутоиммунной склеродермией (АСА) в разведении 1:500. Ядра клеток и хромосомы выявляли при использовании 0,1 мкг/мл 4',6'-диаминофенилиндола (ДАПИ). Клетки анализировали под микроскопом Nikon Microphot SA с использованием эпифлуоресцентной оптики. Все фотографические изображения были сделаны с использованием объектива 60x Plan Neofluor и видеокамеры TEC-1 CCD ("Dage-MTI"). Анализ изображений производился с помощью пакета программ ImagePro5+ ("Nikon", США)

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В данной работе мы изучили ответ клеток рака молочной железы – MCF7, и аденокарциномы простаты – PC3, на применение гесперадина. На первом этапе мы показали, что данные клеточные линии экспрессируют белок Аугоа В примерно на одном уровне (см рис 1, а). Для оценки фармакологического эффекта ингибитора Аугоа А и В клетки данных линий инкубировали в присутствии 100 nM гесперадина, и состояние их клеточного цикла оценивали ежедневно на протяжении трех дней. Данные проточной цитофлуориметрии в контрольных образцах (не содержащих гесперадин) показали нормальное распределение по фазам клеточного цикла. В культурах MCF7 и PC3, обработанных гесперадином, уже после 24 часов инкубации увеличивалось число клеток, находящихся в G2/M, содержащих 4N ДНК (тетраплоидные клетки) (см рис 1, б). Накопление клеток с 4N ДНК говорит о задержке их в митозе, что может быть следствием нарушения процесса выравнивания хромосом, вызванного ингибированием Аугоа В [8].

Инкубирование клеток в присутствии гесперадина на протяжении 48 и 72 часов приводило к переходу значительной части как PC3, так и MCF7 клеток в состояние 8N ДНК. Данные микроскопического анализа на данной стадии (см рис 1, с) выявили наличие в культуре гигантских клеток, превышающих размер контрольных примерно в 5 раз, с ядрами, содержащими повышенное количество конденсированного хроматина с множественными ядрышками, что свидетельствует о наличии в них полиплоидии и согласуется с данными цитофлуориметрии. Наличие полиплоидных клеток, содержащих 8N ДНК, скорее всего, обусловлено их способностью к выходу из митоза без завершения

ВЛИЯНИЕ ГЕСПЕРАДИНА НА КЛЕТКИ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ПРОСТАТЫ

физического разделения, что согласуется с исследованиями предыдущих лет показавшими, что функции Аугога В важны в процессе цитокinesis. Кроме того, в таких клетках имеются множественные дефекты структуры веретена деления, сопровождающиеся появлением множественных полюсов (см рис 2), что может объясняться нарушением функций Аугога А [2]. Таким образом, фенотип клеток, обработанных гесперадином, отражает неспособность последних образовывать правильную структуру веретена деления, вследствие угнетения функций Аугога А, а нарушение процессов выравнивания хромосом и цитокinesis - из-за потери способности Аугога В участвовать в процессе передачи сигнала митотической точки рестрикции.

Для того, чтобы удостовериться в том, что в клетках, обработанных гесперадином, ингибируется киназная активность Аугога В, мы проверили внутриклеточный уровень фосфорилированной формы гистона H3, который является субстратом Аугога В [8]. В контроле наблюдали наличие сильного сигнала фосфорилированной формы H3, соответствующего сигналу ДАПИ. Наличие в среде гесперадина приводило к потере сигнала фосфорилированной формы H3 как в PC3 клетках так и MCF7 (см рис 3, третья колонка), что свидетельствует об угнетении киназной активности Аугога В. Также обработка клеток гесперадином препятствует ассоциации Аугога В с кинетохорами (рис 3, вторая колонка). Это позволяет предполагать, что киназная активность Аугога В необходима для ее кинетохорной локализации. Возможно также, что

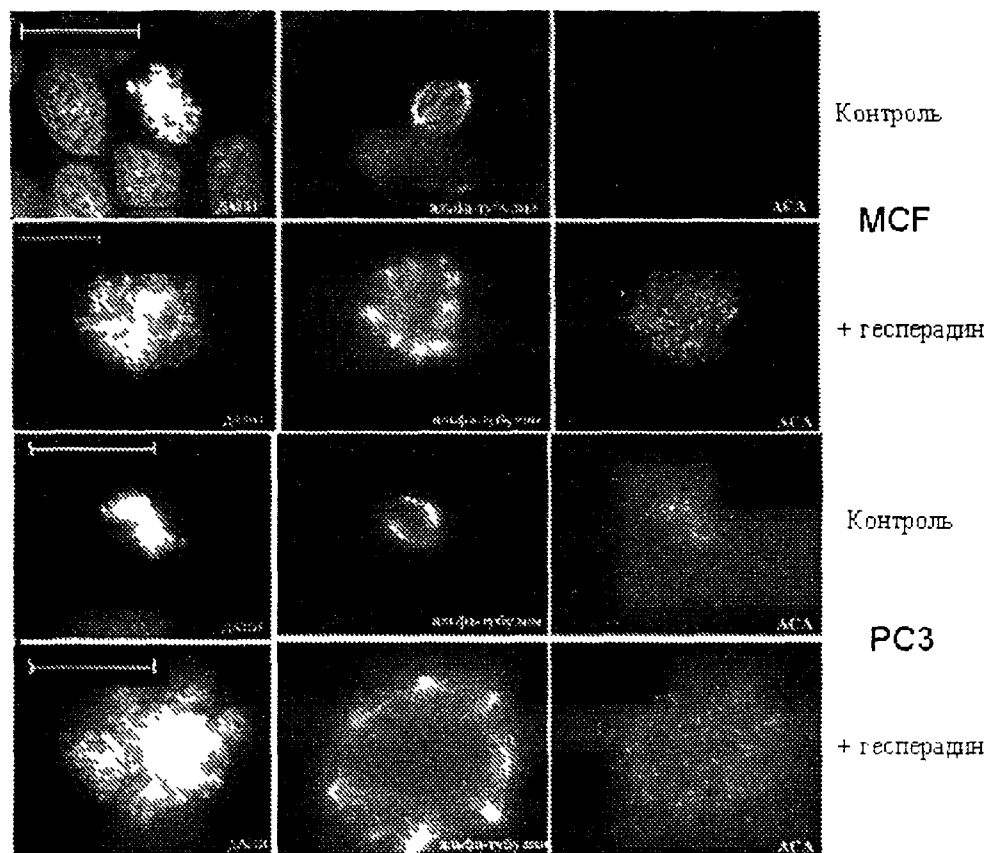


Рисунок 2

Изменение структуры веретена деления MCF7 (две верхних панели) и PC3 клеток (две нижних панели) при культивировании в присутствии гесперадина в течение 72 часов. Первая колонка - окрашивание клеток с помощью ДАПИ, вторая колонка - окрашивание клеток с помощью антител к альфа-тубулину, третья колонка - окрашивание клеток с помощью антител к прецентромерному району ДНК (ACA).

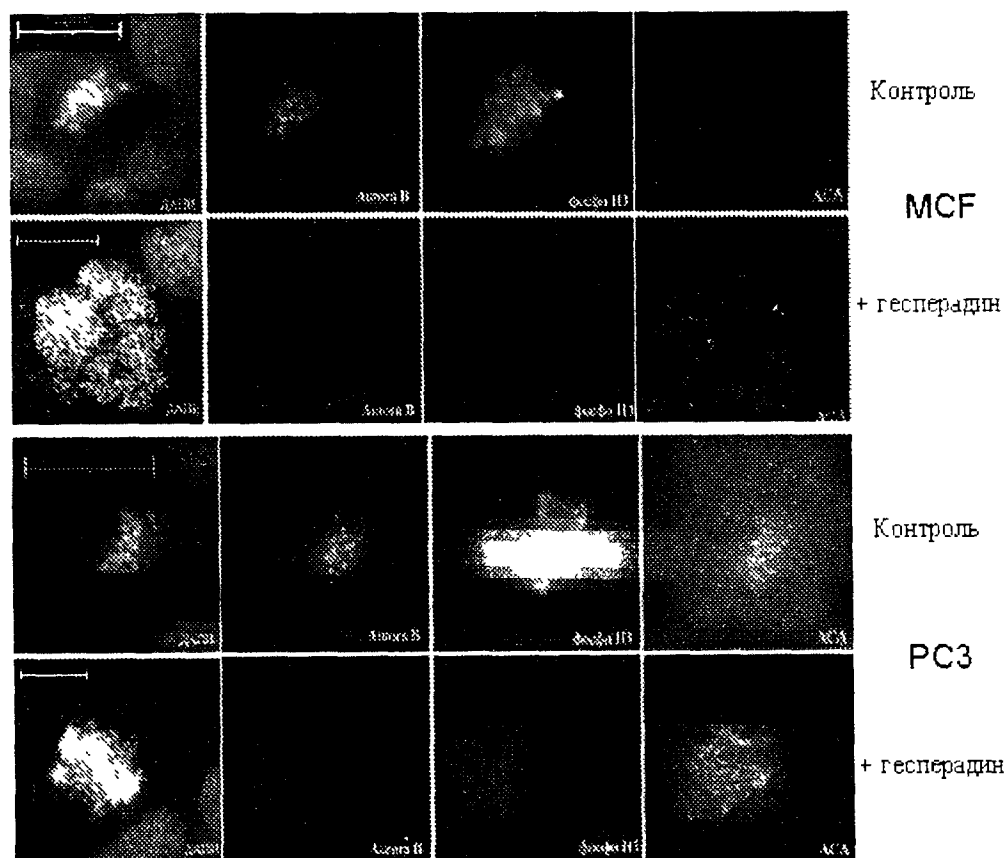


Рисунок 3

Обработка клеток MCF7 (две верхних панели) и PC3 (две нижних панели) гесперадином в течение 72 часов приводит к исчезновению сигналов Aurora B и фосфорилированной формы гистона H3 с кинетохоров. Первая колонка - окрашивание клеток с помощью ДАПИ, вторая колонка - окрашивание клеток с помощью антител к Aurora B, третья колонка - окрашивание клеток с помощью антител, распознающих фосфорилированную форму гистона H3, четвертая колонка - окрашивание клеток с помощью антител к прецентромерному району ДНК (ACA).

гесперадин ингибирует другие внутриклеточные киназы, необходимые для кинетохорной локализации Aurora B [3].

Ранее проведенные исследования с использованием различных ингибиторов Aurora B или применением мiРНК (малая интерферирующая РНК, [9]) показали, что локализация таких кинетохорных белков как CENP-E и hBUBR1 зависит от Aurora B [10]. Как было показано, образование функциональных связей между кинетохорами и нитями веретена деления зависит от активности CENP-E, что находится под контролем киназной активности белка митотической точки рестрикции hBUBR1 [7, 11]. Поэтому мы исследовали, как ингибирование Aurora B отражается на кинетохорной локализации CENP-E и hBUBR1 в PC3 и MCF7 клетках. Клетки, обработанные гесперадином в течение 72 часов, использовались для проведения иммунофлуоресцентного анализа с использованием антител к CENP-E, hBUBR1 и ACA (маркер кинетохоров) (см. рис. 4, вторая и третья колонки). В контроле у клеток PC3 и MCF7 получен сильный сигнал как CENP-E, так и hBUBR1, соответствующий ACA. В противоположность этому в клетках, обработанных гесперадином, наблюдалась потеря CENP-E и hBUBR1 с кинетохоров, в то время как сигнал ACA оставался неизменным. Полученные нами результаты показали, что локализация CENP-E и hBUBR1 у изученных опухолевых клеток является зависимой от Aurora B, что совпадает с данными, полученными на нормальных клетках [10].

ВЛИЯНИЕ ГЕСПЕРАДИНА НА КЛЕТКИ ОПУХОЛЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ПРОСТАТЫ

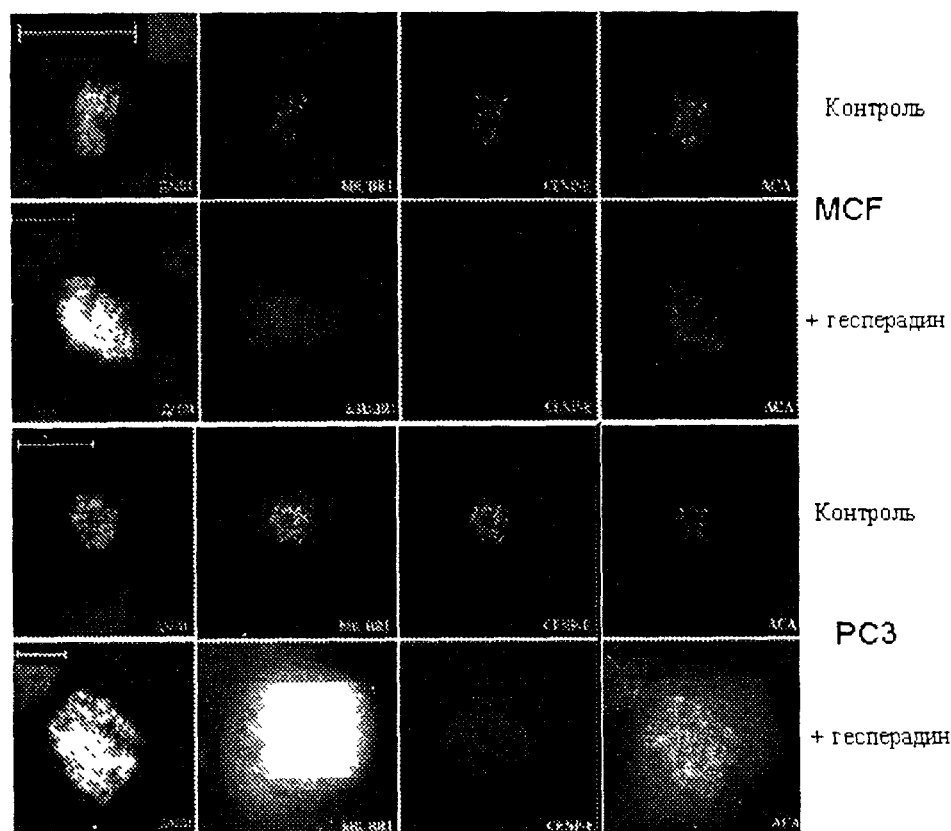


Рисунок 4

Ингибирование Aurora B в клетках MCF7 (две верхние панели) и PC3 (две нижние панели) приводит к потере белков hBUBR1 и CENP-E с кинетохоров клеток, обработанных гесперадином в течение 72 часов. Первая колонка - окрашивание клеток с помощью ДАПИ, вторая колонка - окрашивание клеток с помощью антител к белку митотической точки рестрикции hBUBR1, третья колонка - окрашивание клеток с помощью антител к кинетохор-ассоциированному белку CENP-E, четвертая колонка - окрашивание клеток с помощью антител прецентромерному району ДНК (ACA).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Как известно, киназа hBUBR1 играет ключевую роль в регуляции митотической сверочной точки (checkpoint) [7], вот почему отсутствие данного белка на кинетохорах клеток обработанных гесперадином, приводит к накоплению последних в состоянии 8N ДНК. Диссоциация hBUBR1 с кинетохоров митотических хромосом, скорее всего, снижает тормозное действие сигнала сверочной точки веретена деления [12], что приводит к потере клетками способности задерживаться в метафазе при наличии "неисправностей" в машине деления, вследствие угнетения функций Aurora B. Несмотря на наличие невыравненных у экватора хромосом клетки, обработанные гесперадином, рано или поздно выходят из митоза. Если клетка выходит из митоза при наличии невыравненных хромосом, в стандартных условиях это приведет к появлению двух анеуплоидных клеток. Однако, как нами показано выше, в клетках, обработанных гесперадином, существенно снижена или отсутствует киназная активность Aurora B, определяемая по уровню фосфорилирования гистона H3 и необходимая для завершения процесса цитокинеза, что приводит к выходу подобных клеток из митоза с невыравненными хромосомами и без завершения физического разделения (накопление 8N ДНК клеток). Интересно, что мы не наблюдали появления 16N ДНК клеток, что несколько отличает полученные результаты от данных, описанных при обработке клеток HeLa, где было показано,

что на 4-5 день после применения препарата выявлялись клетки с 32N ДНК [6]. Неспособность клеток РС3 и MCF7 к увеличению полиплоидии в присутствие гесперадина может быть объяснена тем, что данные клетки "подвергаются аресту" в клеточном росте как только они достигают стадии 8N ДНК вследствие отсутствия активности киназ Ауорога А и В. С другой стороны, нельзя исключить, что в дальнейшем клетки в состоянии 8N ДНК вступают в апоптоз, хотя данные цитофлуорометрии не выявили значительного числа апоптозных клеток в состоянии < 2N ДНК.

Таким образом, полученные результаты могут быть использованы для понимания молекулярных механизмов ингибирования митотических киназ новым поколением фармакологических агентов, способных необратимо подавлять рост пролиферирующих опухолевых клеток.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Adams R.R., M. Carmena, and Earnshaw W.C. (2001) Trends Cell Biol., **11**(2), 49-54
2. Hirota T., Kunitoku N., Sasayama T., Marumoto T., Zhang D. (2003) Cell, **114**, 585-598
3. Adams R.R., Helatley W.S., Gouldsworthy A.M., Kandels-Lewis S.E., Carmena M., et al. (2000) Curr. Biol., **10**, 1075-1078
4. Carmena M., Earnshaw W.C. (2003) Nat. Rev. Mol. Cell Biol., **4**, 842-854
5. Bischoff J.R., Anderson A.L., Zhu Y., Mossie K., Ng L., et al. (1998) EMBO, **17**, 3052-3065
6. Hauf S., Cole R.W., LaTerra S., Zimmer C., Schnapp G. (2003) J. Cell Biol., **161**, 281-294
7. Chan G.K., Jablonski S.A., Sudakin V., Hittle J.C., Yen T.J. (1999) J. Cell Biol., **146**, 941-954
8. Adams R.R., Maiato H., Earnshaw W.C., Carmena M. (2001) J. Cell Biol., **153**, 865-880
9. Jedrusik M.A. and Schulze E. (2004) Methods Mol. Biol., **254**, 35-48
10. Ditchfield C., Johnson V.L., Tighe A., Ellston R., Haworth C. (2003) J. Cell Biol., **161**, 267-280
11. Schaar B.T., Chan G.K.T., Maddox P., Salmon E.D., Yen T. (1997) J. Cell Biol., **139**, 1373-1382
12. Chen R.H. (2002) J. Cell Biol., **158**, 487-496

Поступила 01.06.2004

EFFECT OF SMALL MOLECULE HESPERADIN ON BREAST AND PROSTATE CANCER CELL LINES.

N.G. Ladygina^{1,2}, R.V. Lacis¹, T. Yen²

¹Russian State Medical University, Ostrovityanova st, 1, Moscow, 117437 Russian

²Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave, 19111. Philadelphia, Pa, USA,
e-mail: ng_ladygina@fccc.edu.

Aurora B, which is important for cell division control, is highly expressed in large number of cancer cell lines. Hesperadin, a prototype of a pharmacological agent, is a small molecule inhibitor of catalytic activity of Aurora B. In present work we investigate effect of Hesperadin on breast – MCF7 and prostate adenocarcinoma – PC3, cancer cell lines. After Hesperadin treatment we observe stop of cell proliferation due to appearance of multiple mitotic defects caused by Aurora B activity reduction and elimination of checkpoint proteins – such as hBUBR1 and CENP-E – from kinetochores of mitotic chromosomes.

Key words: Hesperadin, Aurora B, hBUBR1, CENP-E, cancer cell lines.