

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.27:591.81
©Волкова, Немова

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ПЕРЕРАСПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНОСТЕЙ КАСПАЗ В КЛЕТКАХ K562, ИНДУЦИРОВАННЫХ К ДИФФЕРЕНЦИРОВКЕ И АПОПТОЗУ ПРОИЗВОДНЫМИ ТИАЗОФОСФОЛА

Т.О. Волкова, Н.Н. Немова*

Кафедра молекулярной биологии, биологической и органической химии
Петрозаводского государственного университета, 185910, Петрозаводск,
пр-т Ленина, 33; тел.: +(8142)-784697; факс: +(8142)-711000;
эл. почта: VolkovaTO@yandex.ru

Исследовали активность каспаз 3, 6, 9 в условиях индукции и ингибирования эритроидной дифференцировки клеток линии K562. В качестве модуляторов дифференцировки использованы широко применяемый в онкологической практике антиопухолевый агент циклофосфан (N'-бис-(β-хлорэтил)-N'-О-триметиленовый эфир диамида фосфорной кислоты) и два новосинтезированных производных тиазофосфола: 2-третбутиламино-4-тиоксо-4-хлорметил-1,3,4-тиазо-фосфол-2-ин, 2-анилино-4-тиоксо-4-хлорметил-1,3,4-тиазофосфол-2-ин. Результаты показали, что циклофосфан и третбутиламиновое производное индуцируют эритроидную дифференцировку клеток K562, сопровождающуюся активацией каспаз 3, 9 и последующим запуском апоптоза. Напротив, анилиновое производное ингибирует эритроидную и индуцирует моноцитарную дифференцировку опухолевых клеток, при этом активируются все определяемые каспазы и развивается апоптоз. В последнем варианте обработки уровень активности каспазы 3 значительно меньше по сравнению с двумя предыдущими вариантами. Обсуждается возможное функциональное перераспределение активностей между каспазами в реализации взаимосвязи различных путей дифференцировки и апоптоза клеток.

Ключевые слова: миелоидные опухолевые линии, каспазы, апоптоз, дифференцировка, производные тиазофосфола.

ВВЕДЕНИЕ. Химиотерапия, как метод высокоэффективного лечения многих опухолей у взрослых и большинства опухолей у детей, введена в клиническую практику в 1942 г. В течение 65 лет в различных странах было изготовлено и испытано несколько сот химических реагентов, оказывающих воздействие на опухоль. Особую группу среди такого рода веществ составляют соединения гетероциклического ряда (производные нуклеозидов, алкилирующие агенты, винкалкалоиды, противоопухолевые антибиотики и др.). Кроме цитостатического эффекта подобные реагенты в зависимости от условий и гистогенетического

* - адресат для переписки

происхождения опухоли способны индуцировать дифференцировку и апоптоз злокачественных клеток. Так, клетки эритролейкемических линий K562, MEL в условиях обработки 1- β -D-арабинофурано-зилцитозинном, тимидином способны экспрессировать или усиливать экспрессию маркеров эритроидной дифференцировки – гемоглобина и гликофоринов A и C [1, 2]. Другие реагенты (4-нитрохинолин-1-оксид, форбол-12-миристат-13-ацетат), напротив, ингибируют эритроидный и активируют мегакариоцитарный и/или моноцито-макрофагальный пути дифференцировки клеток K562 [3, 4]. Указанные соединения также могут выступать в роли агентов индуцирующих апоптоз опухолевых клеток, модулируя активность ключевых ферментов процесса, в частности, каспаз [5, 6]. Часто имея в составе несколько функциональных групп и радикалов, трансформируясь в различные формы метаболитов, гетероциклические соединения способны оказывать на клетку комплексное воздействие. Выступая в роли антиметаболитов, они взаимодействуют с ключевыми молекулами клетки (ДНК, РНК, белками, различными коферментами и т.д.), что в итоге приводит к регрессии опухоли. Поэтому, поиск новых соединений, обладающих высокой противоопухолевой активностью, представляет несомненный интерес.

В связи с этим, в настоящем исследовании нами изучены процессы модуляции активности каспаз 3, 6, 9 в клетках K562, индуцированных к дифференцировке и апоптозу новосинтезированными производными тиазофосфола (2-третбутиламино-4-тиоксо-4-хлорметил-1,3,4-тиазо-фосфол-2-ином и 2-анилино-4-тиоксо-4-хлорметил-1,3,4-тиазофосфол-2-ином). В качестве препарата сравнения, имеющего структурное сходство с названными соединениями, был выбран часто используемый в практической онкологии циклофосфан.

МЕТОДИКА. Клетки человеческой эритролейкемической линии K562 (Институт цитологии РАН, С.-Петербург) культивировали в среде: 89% RPMI 1640 (Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов РАМН, Москва), содержащей 11% эмбриональной телячьей сыворотки (Институт эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва), 2 мМ L-глутамин, 40 мкг/мл гентамицина сульфата, 50 мкМ 2-меркаптоэтанол. Культуры засевали в 1 мл (3 мл) при плотности 10^5 (10^6) клеток/лунку, соответственно. В среду вносили индукторы в концентрациях, указанных в тексте и подписях к рисункам. Численность клеток определяли с помощью камеры Горяева, жизнеспособность оценивали по тесту с трипановым синим.

Определение активности каспаз проводили по методу, описанному ранее [6], с использованием специфических субстратов, меченных флуоресцентной меткой (7-амино-4-трифлуорометилкумарин - AFC) ("BioRad", США), детектируемой по изменению флуоресценции или оптической плотности.

Определение внутриклеточной концентрации гемоглобина проводили с помощью бензидиновой пробы [2, 7].

Фенотипирование мембранных антигенов проводили с помощью непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител (CD14), меченных флуоресцеинизотиоцианатом [8]. Антитела получены в РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН.

Определение фрагментации ДНК проводили по изменению параметров флуоресценции ДНК-тропных красителей: бромистого этидия (EtBr) ("Sigma", США) и 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) ("Serva", Германия) методом, описанным ранее [9, 6].

Производные тиазофосфола любезно предоставлены научным сотрудником Института органической и физической химии им. А.Е. Арбузова Казанского НЦ РАН, канд. хим. наук Н.А. Хайловой.

Каждый вариант исследовался в трех отдельных опытах. При построении графиков использовались усредненные величины. Достоверность различий оценивали по t-критерию Стьюдента, а также с использованием непараметрического критерия Вилкоксона-Манна-Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рисунках 1-3 представлены графики изменения активности каспаз 3, 9 и 6, соответственно, в клетках K562, обработанных химическими индукторами в течение 4 суток. Из результатов следует, что при инкубации клеток с циклофосфаном и третбутиламиновым производным тиазофосфола наблюдается значимое ($p < 0,01$) увеличение активности каспаз 3 и 9 по сравнению с необработанными клетками (рис. 1, 2). Кроме того, нами показано, что данные реагенты индуцируют в клетках синтез гемоглобина (маркер эритроидной дифференцировки): $0,132 \pm 0,003$ и $0,128 \pm 0,002$ мкг/ 10^5 клеток, соответственно (концентрация гемоглобина в необработанных клетках $0,094 \pm 0,004$ мкг/ 10^5 клеток). Индуцирование синтеза гемоглобина достоверно ($p < 0,05$). Анилиновое производное тиазофосфола активирует в клетках все определяемые нами каспазы, в том числе каспазу 6 (рис. 3). Уровень активности каспазы 3 в этом случае значительно ниже по сравнению с двумя предыдущими вариантами ($p < 0,05$) (рис. 1). Данный реагент ингибирует эритроидную (концентрация гемоглобина $0,076 \pm 0,003$ мкг/ 10^5 клеток) и запускает моноцитарную дифференцировку: количество CD14+ клеток $45,4 \pm 1,2\%$ по сравнению с контрольными пробами – $36,7 \pm 1,7\%$ ($p < 0,05$). Исследуемые соединения также индуцируют апоптоз клеток K562. Результаты определения уровней флуоресценции EtBr и DAPI при связывании с ДНК показывают достоверное усиление показателя для всех соединений, причем в вариантах с циклофосфаном флуоресценция красителей значительно ниже, чем с производными тиазофосфола (табл.). Следует отметить, что жизнеспособность опухолевых клеток в пробах не падала ниже 85-90%.

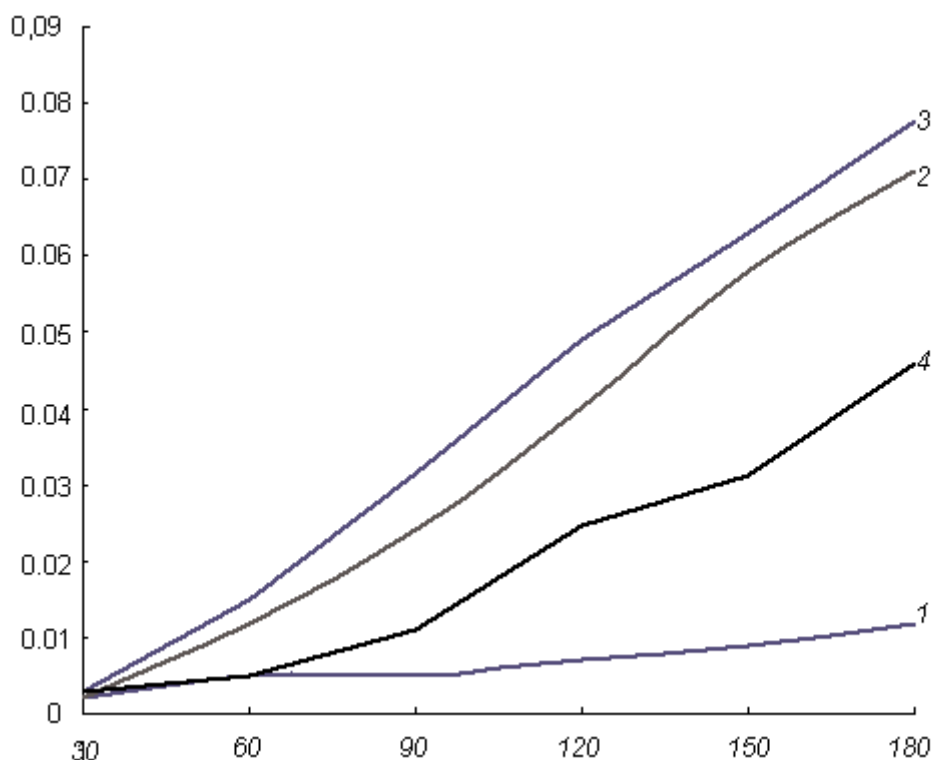


Рисунок 1.

Изменение активности каспазы 3 в клетках K562 при обработке циклофосфаном и производными тиазофосфола. Клетки K562, инкубированные в течение 4 суток: 1 – без стимуляторов; 2 – с циклофосфаном; 3 – с 2-третбутиламино-4-тиоксо-4-хлорметил-1,3,4-тиазофосфол-2-ином; 4 – с 2-анилино-4-тиоксо-4-хлорметил-1,3,4-тиазофосфол-2-ином.

Концентрация реагентов во всех случаях составляла 30 мкМ.

По оси абсцисс – время протекания ферментативной реакции, мин; по оси ординат – изменение поглощения отщепленного AFC, определенное на СФ-46 при $\lambda = 395$ нм.

Приведены усреднённые показатели из 3-5 отдельных опытов.

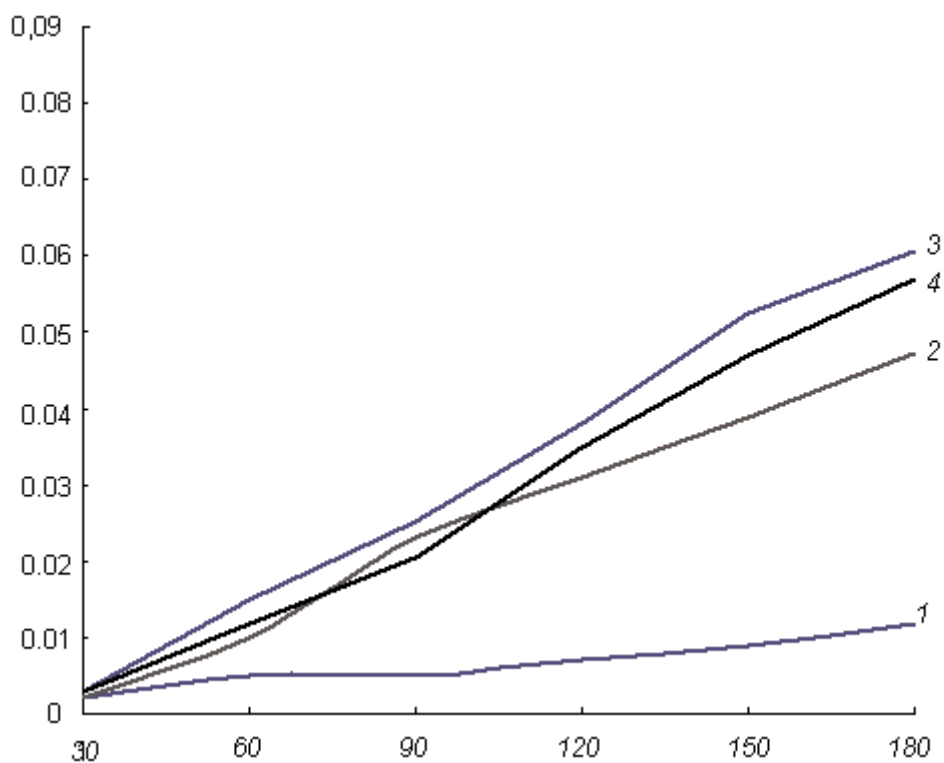


Рисунок 2.

Изменение активности каспазы 9 в клетках K562 при обработке циклофосфаном и производными тиазофосфола. Обозначение линий графика, характеризующих изменение активности каспазы, то же что и на рисунке 1.

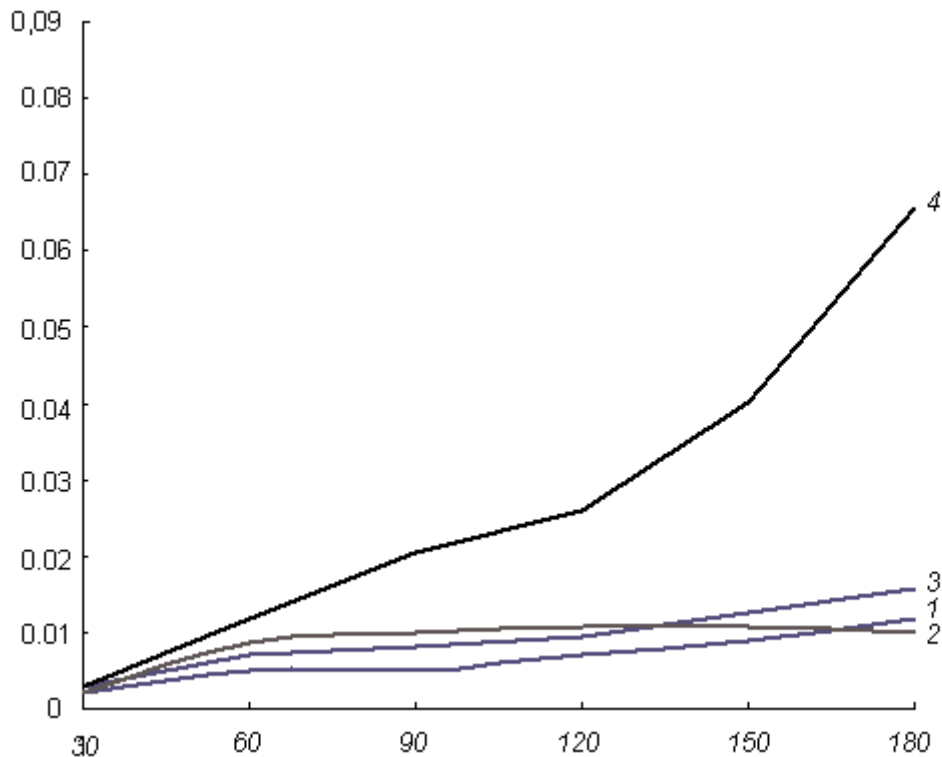


Рисунок 3.

Изменение активности каспазы 6 в клетках K562 при обработке циклофосфаном и производными тиазофосфола. Обозначение линий графика, характеризующих изменение активности каспазы, то же что и на рисунке 1.

Таблица. Интенсивность флуоресценции EtBr и DAPI нуклеоидов клеток K562, обработанных индукторами в течение 4 суток инкубации

Реагент (мкМ)	Интенсивность флуоресценции	
	ΔEtBr	ΔDAPI
Контроль	$3,7 \pm 0,3$	$25,6 \pm 0,8$
Циклофосфан (30)	$8,1 \pm 0,3^*$	$33,7 \pm 0,5^*$
2-третбутиламино-4-тиоксо-4-хлорметил-1,3,4-тиазофосфол-2-ин (30)	$15,9 \pm 0,6^{**}$	$45,2 \pm 1,2^{**}$
2-анилино-4-тиоксо-4-хлорметил-1,3,4-тиазофосфол-2-ин (30)	$13,6 \pm 0,7^{**}$	$41,1 \pm 0,9^{**}$

Примечание: * – достоверное различие по сравнению с контролем ($p < 0,05$), (** - $p < 0,01$).

Таким образом, из результатов следует, что каспаза 3 в зависимости от условий может принимать участие в апоптозе или сопровождать процессы индукции эритроидной дифференцировки клеток K562, поскольку в моноцитарную дифференцировку ее активность снижается. Не исключено, что в данном случае одной из ключевых каспаз запуска апоптоза клеток K562 является каспаза 9. Известно, что белки-предшественники каспаз активируются путем протеолиза или образования димерных/олигомерных комплексов. Так, в присутствии АТР и цитохрома *c* прокаспаса 9 взаимодействует с адаптерным белком Араф-1, превращается в каспазу 9 и инициирует каскад реакций с участием каспаз 3, 6 и 7 [10]. Активация каспазы 6 наблюдается только в моноцитарную дифференцировку клеток K562 (при обработке анилиновым производным тиазофосфола). Используемый нами ингибитор каспазы 6 (Z-VEID-FMK) приводит к частичному блоку моноцитарной дифференцировки, количество CD14+ клеток снижается в 1,5 раза. В результате можно сделать заключение, что каспаза принимает непосредственное участие в реализации этого пути дифференцировки клеток. Подобный эффект нами был обнаружен при обработке клеток форбол-12-миристан-13-ацетатом [6]. Однако роль каспазы 6 в протекании апоптоза также может быть существенной, поскольку это каспаза “второго эшелона”, и одним из путей её инициации является путь через каспазу 9.

ВЫВОДЫ.

1. Показано, что дифференцирующее действие производных тиазофосфола на клетки K562 различно: 2-третбутиламино-4-тиоксо-4-хлорметил-1,3,4-тиазофосфол-2-ин индуцирует эритроидную, 2-анилино-4-тиоксо-4-хлорметил-1,3,4-тиазофосфол-2-ин – моноцитарную дифференцировку клеток. В индукции моноцитарного пути дифференцировки участвует каспаза 6.

2. Установлено, что по сравнению с циклофосфаном производные тиазофосфола проявляют по отношению к клеткам более выраженное апоптогенное действие. В реализации апоптоза принимают участие каспазы 9 и 3.

Работа выполнена при поддержке гранта Фонда Президента Российской Федерации “Поддержка ведущих научных школ РФ” (НШ-4310.2006.4) и ФЦНТП “Ведущие научные школы”.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wiener E., Shiels A., Wickramasinghe S.N. et al. (1998) Br. J. Haematol., **103**, 259-267.
2. Волкова Т.О., Малышева И.Е. (2002) Вопр. мед. хим., **48**(6), 586-593.
3. Волкова Т.О., Малышева И.Е. (2002) Вест. мол. ученых. Серия "Науки о жизни", **4**, 58-63.
4. Watanabe T., Mitchell T., Sariban E. (1985) Mol. Pharmacol., **27**, 683-688.
5. Majumder P.K., Pandey P., Sun X. et al. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 21793-21796.
6. Волкова Т.О., Малышева И.Е., Немова Н.Н. (2005) Онтогенез, **36** (1), 18-25.
7. Andersson L.C., Nilsson K., Gahmberg C.G. (1979) Int. J. Cancer, **23**, 143-147.
8. Jackson A., Warner N. (1986) in: *Preparation, staining, and analysis by cytometry of peripheral blood leukocytes*. Manual of clinical laboratory immunology, Washington, pp. 226-235.
9. Иванов С.Д., Николаевская Л.В., Федоров Б.А., и др. (1992) Бюл. эксперим. биологии и медицины, **114**, 9, 310-312.
10. Srinivasula S.M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T., et al. (1998) Mol. Cell., **1**, 949-957.

Поступила: 03.07. 2007.

THE FUNCTIONAL REDISTRIBUTION OF ACTIVITIES OF CASPASES IN K562 CELLS, INDUCED FOR DIFFERENTIATION AND APOPTOSIS TREATED WITH THIAZOPHOSPHOL DERIVATIVES

T.O. Volkova, N.N. Nemova

Department of molecular biology, Petrozavodsk State University, prosp. Lenina, 33, Petrozavodsk, 185910 Russia; tel.: +(8142)-784697; fax: +(8142)-711000; e-mail: VolkovaTO@yandex.ru

Activity of caspases 3, 9, 6 has been investigated in erythroleukemia K562 cells under conditions of induction or inhibition of erythroid differentiation using cyclophosphane (N'-bis-(β -chloroethyl)-N'-O-trimethyl ester of diamide of phosphoric acid, antitumour agent of oncologic practice) and two new synthetic thiazophosphol derivatives - 2-*t*-butylamino-4-thioxo-4-chloromethyl-1,3,4-thiazophosphol-2-in, 2-anilino-4-thioxo-4-chloromethyl-1,3,4-thiazophosphol-2-in as modulators of differentiation. The treatment of K562 cells with cyclophosphane and the *t*-butylamine thiazophosphol derivative was accompanied by the induction of erythroid differentiation, activation of caspase 3 and caspase 9, followed by subsequent induction of apoptosis. Treatment of cancer cells with the aniline thiazophosphol derivative led to a loss of erythroid differentiation in cells and increased expression of the monocyte lineage associated surface antigen, activation of caspases 3, 9, 6, and induction of apoptosis. In the latter case the level of activity of caspase 3 was lower than in the cells treated in the presence of other compounds. Possible functional redistribution of activity of cell caspases involved in the realization of different directions of differentiation and apoptosis in K562 cells is discussed.

Key words: myeloid cancer cell lines, caspases, apoptosis, differentiation, thiazophosphol derivatives.