

УДК 615.014.23.417
©Коллектив авторов

ВЛИЯНИЕ СОЕДИНЕНИЯ aTEL1296 НА ТЕЛОМЕРАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ И РОСТ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК

Н.А. Коваленко¹, Д.Д. Жданов^{2,3}, М.В. Бибикова⁴, В.Ю. Готовцева⁴*

¹НИЦ Первого московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва

²Учреждение Российской академии медицинских наук Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, 119121 Москва, Погодинская ул., 10; тел.: 8(495)246-33-80; эл. почта: zhdanovdd@mail.ru

³Российский университет дружбы народов, экологический факультет, Москва

⁴Государственный Научный Центр по Антибиотикам, Москва

Теломераза – рибонуклеопротеиновый комплекс, синтезирующий теломерные повторы на концах хромосом, является молекулой-мишенью для действия противоопухолевых препаратов. Исследовали влияние соединения aTEL1296, на активность теломеразы. aTEL1296 эффективно ингибирует теломеразную активность в концентрациях меньших ($IC_{50} = 0,19 \pm 0,02$ нг/мл), чем BIBR1532, самый активный из известных ингибиторов теломеразы. aTEL1296 также подавляет рост опухолевых клеток, активируя в них механизмы апоптоза (максимальный эффект выявлен для клеток LnCap $GI_{50} = 5,0 \pm 0,2$ нг/мл) и не оказывает действия на нормальные фибробласты.

Ключевые слова: теломераза, теломеры, aTEL1296, ингибитор, опухолевые клетки, апоптоз.

ВВЕДЕНИЕ. На концах хромосом всех эукариотических и некоторых прокариотических организмов расположены теломеры – ДНК-белковые комплексы, основой которых является теломерная ДНК. Теломерная ДНК человека состоит из двуцепочечных повторов 5'-(TTAGGG)_n-3' в количестве 2–30 тысяч пар оснований (т. п.о.) и заканчивается на 3'-конце т.н. 3'-выступом [1].

В нормальных соматических клетках длина теломера уменьшается на 50–200 п.о. при каждом цикле репликации, поэтому клетки способны делиться лишь ограниченное число раз (“лимит Хэйfliка”). Укорочение теломерных повторов до критических значений вызывает дестабилизацию и потерю функций теломер, слипание концов хромосом и присоединение к концам хромосом случайных фрагментов ДНК. В ответ на такие хромосомные нарушения в клетке активируется система ответа на повреждение ДНК, конечным результатом которой является активация апоптотических процессов и клеточная смерть [2, 3].

* - адресат для переписки

Теломераза – высокомолекулярный (около 1000 кДа у позвоночных) нуклеопротеиновый комплекс, синтезирующий теломерные повторы ДНК на концах хромосом. Нормальные клетки зародыша, эмбриональные и другие стволовые клетки, кроветворные клетки, активированные лимфоциты, клетки базального слоя кожи, волосяные фолликулы и клетки тонкого кишечника способны поддерживать длину теломер с помощью теломеразы [4]. Большинство (около 85-90%) раковых клеток обладают теломеразной активностью (ТА). Активная теломераза в раковых клетках не восстанавливает полную длину теломер, характерную для нормальных клеток (длина теломер в раковых клетках значительно меньше, чем в нормальных), а постоянно поддерживает их длину на уровне, достаточном для неограниченной пролиферации [5].

Поиску и исследованию биологического действия препаратов – ингибиторов ТА посвящено большое количество исследований. Некоторые из таких соединений проходят клинические испытания, но обладают множеством побочных эффектов либо недостаточно эффективны [6]. Поэтому остается актуальной проблема поиска высокоэффективного специфичного к теломеразе ингибитора.

Целью настоящей работы явилось исследование влияния на ТА и рост опухолевых клеток новых, обнаруженных нами ранее [7] соединений ITEL1296 и aITEL1296, выделенных из *Streptomyces sp.*

МЕТОДИКА.

В работе использованы реактивы трис-HCl, трис, MgCl₂, ЭДТА, ЭГТА, фенилметилсульфонилфторид, ХАПС (CHAPS), β-меркаптоэтанол, пропиций йодид (PI), твин-20 (“Sigma”, США); (NH₄)₂SO₄, глицерин (“Fluka”, Швейцария); дНТФ, TS- и CX-праймеры (“Синтол”, Россия); Taq-полимераза (“Диалат”, Россия); H₃BO₃ (“Хеликон”, Россия); РНКазы А (“Fermentas”, Латвия); SYBR Green I (“Invitrogen”, США); культуральные среды RPMI-1640, DMEM, DMEM/Low Glucose (“HyClone”, США)

Исследованные соединения. Соединения ITEL1296 и aITEL1296 получены в Государственном Научном Центре по Антибиотикам Бибиковой М.В. и её коллегами [7]. Соединения гидрофобные, в связи с чем для растворения использовали 96% этанол, что делало возможным дальнейшее растворение в воде до необходимых концентраций. Для исследования ингибирования ТА в лизатах опухолевых клеток (см. ниже) водные растворы данных веществ использовали в концентрации 5 нг/мл. Исследованию ингибирующего действия предшествовало изучение влияния ингибиторов на ПЦР (см. ниже). Поскольку у изучаемые соединения вызывали тормозное влияние на ПЦР, в методику определения ингибирования ТА в лизатах раковых клеток была введена стадия осаждения продуктов ТА и отмывки от ингибитора этанолом.

Ингибирование ТА в лизатах опухолевых клеток. Определение прямого действия ингибитора на ТА проводили с помощью модифицированного метода Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP), предложенного Kim и соавт. [8, 9]. Данный метод основан на ПЦР-амплификации продуктов теломеразной реакции, полученных при удлинении ферментом специфического праймера. К опухолевым клеткам линии Jurkat (Т-клеточная лейкемия человека из коллекции культур American Type Culture Collection, США) добавляли лизирующий буфер, содержащий 10 мМ трис-HCl (pH 7,5); 1 мМ MgCl₂; 1 мМ ЭГТА; 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид; 5 мМ β-меркаптоэтанол, 0,5% ХАПС и 10% глицерин из расчёта 1 мкл лизирующего буфера на 10³ клеток. Клетки лизировали в ледяной бане в течение 30 мин, интенсивно перемешивая через равные промежутки времени. Полученный лизат клеток центрифугировали 30 мин при 4°C и 12000 g, после чего супернатант переносили в чистые пробирки и быстро замораживали в жидком азоте. Готовые лизаты хранили при -70°C. Элонгацию олигонуклеотидного субстрата-праймера и последующую амплификацию проводили в 30 мкл реакционной смеси, содержащей 67 мМ трис-HCl (pH 8,8); 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,01% твин-20; 1,5 мМ MgCl₂; 1 мМ ЭГТА;

0,25 мМ каждый дНТФ; 0,1 мкг TS-праймера (5'-AATCCGTCGAGCAGAGTT-3'); 2 мкл клеточного экстракта, разбавленного лизирующим буфером и эквивалентного 2000 клеток. В элонгационную смесь добавляли aTEL1296 в различных концентрациях в четырех повторах. Опосредованное теломеразой удлинение TS-праймера проходило при инкубации реакционной смеси при 37°C в течение 25 мин. По окончании инкубации смесь выдерживали 10 минут при 96°C для инактивации теломеразы. В реакционную смесь добавляли 75 мкл 96% этанола и оставляли на 30 мин. при -20°C для осаждения продуктов теломеразной реакции и удаления ингибитора, который хорошо растворим в спирте. Осадок, полученный центрифугированием в течение 20 мин при 4°C и 12000 g, промывали 70% этанолом дважды. К осадку продуктов теломеразной реакции добавляли 30 мкл смеси для амплификации, ПЦР-буфер: 67 мМ трис-HCl, pH = 8,8; 16,6 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,01% твин-20; 1,5 мМ MgCl₂; 0,25 мМ каждый из дНТФ; 0,1 мкг TS-праймера; 0,1 мкг CX-праймера (5'-CCCTTACCCTTACCCTTACCCTAA-3') и 2,5 Ед Taq-полимеразы. Реакционную смесь подвергали ПЦР в следующем режиме: 94°C – 2 мин; 30 циклов: 94°C – 30 сек, 50°C – 30 сек, 72°C – 40 сек; 72°C – 5 мин. Разделение продуктов амплификации осуществляли методом электрофореза в 12% неденатурирующем ПААГ и ТВЭ буфере (89 мМ трис, 89 мМ H₃BO₃, 2 мМ ЭДТА). Образцы вносили в лунки геля в объеме 10 мкл. Визуализацию разделенных продуктов проводили на УФ-трансиллюминаторе (λ =254 нм) после выдерживания геля в течение 30 мин в растворе красителя SYBR Green I по методике производителя. В качестве отрицательного контроля при анализе эффективности ингибирования использовали образец с инактивированной нагреванием теломеразой, а в качестве положительного контроля, образец с внесенным после стадии элонгации и отмытым aTEL1296. Анализ интенсивности ТА проводили при помощи программы Gel-Pro Analyzer 3.1.

Ингибирование ТА в культивируемых клетках. В 24-х луночный планшет ("Costar", США) вносили клетки линии Jurkat 5×10^4 в 1 мл среды. Через 24 часа добавляли aTEL1296 в концентрациях 5, 20 и 50 нг/мл в четырех повторах. Клетки отбирали через 3, 6, 12, 24, 48 и 72 часа после добавления ингибитора. Изучение ингибирования ТА в лизатах клеток Jurkat производилось описанным выше методом.

Клеточные линии и определение токсического действия ингибитора ТА. Исследования выполнены на клетках следующих линий, обладающих активной теломеразой: Jurkat, LnCap (карцинома предстательной железы человека) и MCF-7 (карцинома молочной железы человека) из коллекции культур Всероссийского научного центра молекулярной диагностики и лечения, Colo 320HSR (карцинома толстого кишечника) из коллекции Института биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича РАМН, и нормальных фибробластах человека полученных в Первом московском государственном медицинском университете, использованных в качестве клеток не имеющих активной теломеразы. Все клетки инкубировали в питательной среде с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС) в присутствии различных концентраций aTEL1296 в четырех повторах в течение 24–120 ч, в атмосфере с 5% содержанием CO₂ при 37°C. Для линий Jurkat, Colo320HSR и LnCap использовали полную питательную среду RPMI-1640, для клеток MCF-7 – полную среду DMEM, а для фибробластов - среду DMEM/Low Glucose. Контролем служили клетки, которые инкубировали в тех же условиях, но в отсутствие препарата. Для оценки цитотоксического действия aTEL1296 использовали МТТ-тест выживаемости клеток [10].

Определение апоптотических клеток и анализ клеточного цикла. Определение количества апоптотических клеток и анализ клеточного цикла проводили по окрашиванию ДНК пропидий йодидом (PI) через 72 часа после инкубации клеток с aTEL1296 в концентрации 5 нг/мл. Для фиксации отбирали 2×10^6 клеток, осаждали центрифугированием при 1000 g в течение 5 мин при 4°C, ресуспендировали в 1 мл холодного фосфатно-солевого буфера

НОВЫЙ ИНГИБИТОР ТЕЛОМЕРАЗЫ aTEL1296

(PBS: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 2,7 г/л, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,39 г/л, NaCl – 29,22 г/л, pH = 7,2) и фиксировали в 4 мл ледяного 96% этанола. Для окрашивания, фиксированные клетки осаждали центрифугированием (как указано выше), помещали в 1 мл ФСБ, добавляли 20 мкг РНКазы А, свободной от ДНКаз, инкубировали 30 мин при 37°C, добавляли 100 мкг PI и снова инкубировали 10 мин [11]. Для подсчета количества апоптотических клеток и клеток в различных стадиях клеточного цикла осуществляли проточно-цитофлуориметрический анализ с использованием проточного цитофлуориметра BDFACSAria (“Becton Dickinson”, США).

Статистическая обработка результатов. Статистический анализ проводили с использованием программы “BIOSTAT” (Version 3.2). Достоверность различий в исследованиях оценивали по критерию Стьюдента. Различия считали статистически достоверными при $p < 0,05$ [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Ингибирование ТА в лизатах опухолевых клеток. Продукт ТА в виде “лестницы” дискретных полос с периодичностью в 6 пар нуклеотидов, т.е. теломерных повторов TTAGGG, обнаруживается при использовании ITEL1296 и не обнаруживается при использовании aTEL1296, что говорит об ингибировании ТА (рис. 1). Все последующие исследования проводились именно с aTEL1296.

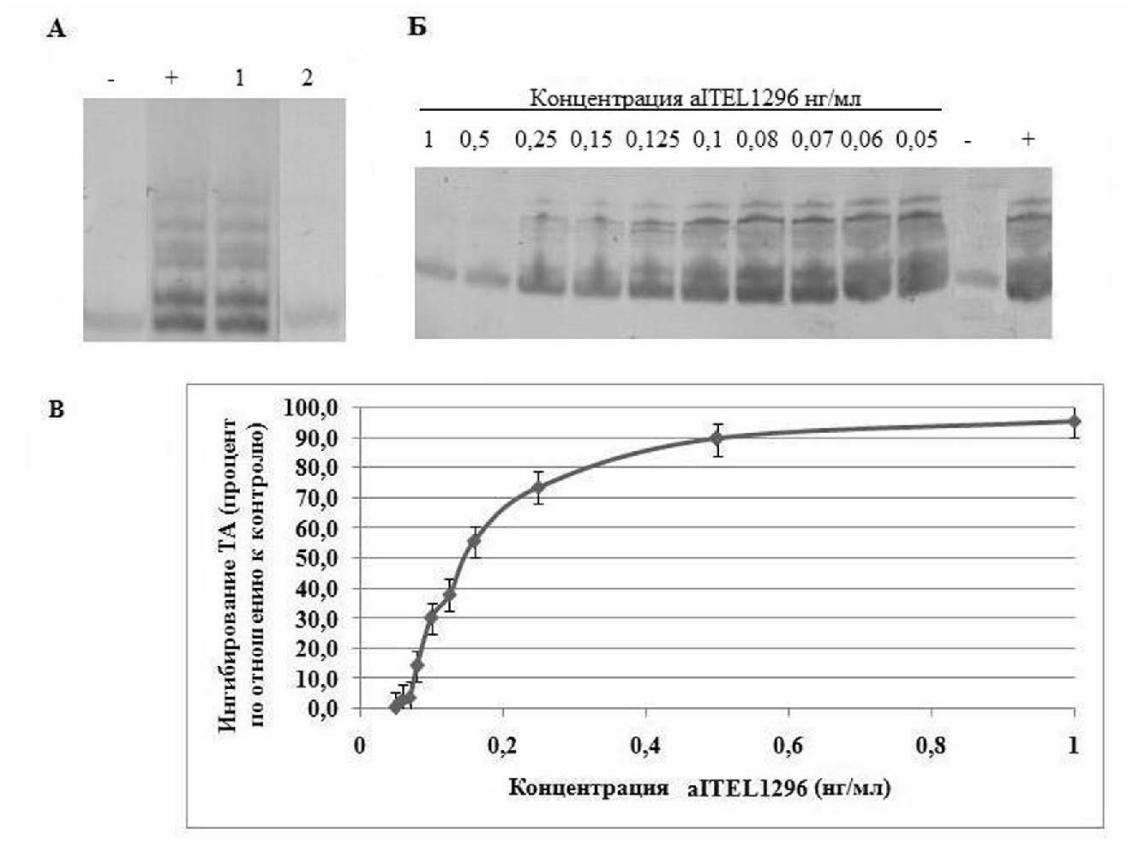


Рисунок 1

Эффективность ингибирования ТА.

А - Электрофорез продуктов ТА в опытах по ингибированию соединениями ITEL1296 и aTEL1296. "-" - отрицательный контроль, "+" - положительный контроль, 1 - ITEL1296, 2 - aTEL1296

Б - Электрофорез продуктов ТА при ингибировании различными концентрациями aTEL1296.

В - Зависимость ингибирования ТА от концентрации aTEL1296.

Для соединения aTEL1296 определено значение $IC_{50} = 0,19 \pm 0,02$ нг/мл и $IC_{90} = 0,56 \pm 0,05$ нг/мл (рис. 1). Данные результаты говорят о высокой эффективности ингибирования ТА aTEL1296, активность которого выше, чем у наиболее активного из известных ингибиторов BIBR1532 ($IC_{50} = 0,31$ нг/мл) [13, 14]

Ингибирование ТА при культивировании клеток. Исследование внутриклеточного ингибирования ТА показало дозовую зависимость от концентрации aTEL1296 (данные статистически достоверны, $p < 0,05$) и значительное снижение ТА в период 6–24 ч после добавления aTEL1296 (рис. 2). В период 24–72 ч ТА находилась на низком уровне и не зависела от концентрации aTEL1296. В период 3–6 ч ингибирования ТА не наблюдалось. Это время, вероятно, необходимо для проникновения aTEL1296 в клетки и взаимодействия с теломеразой.

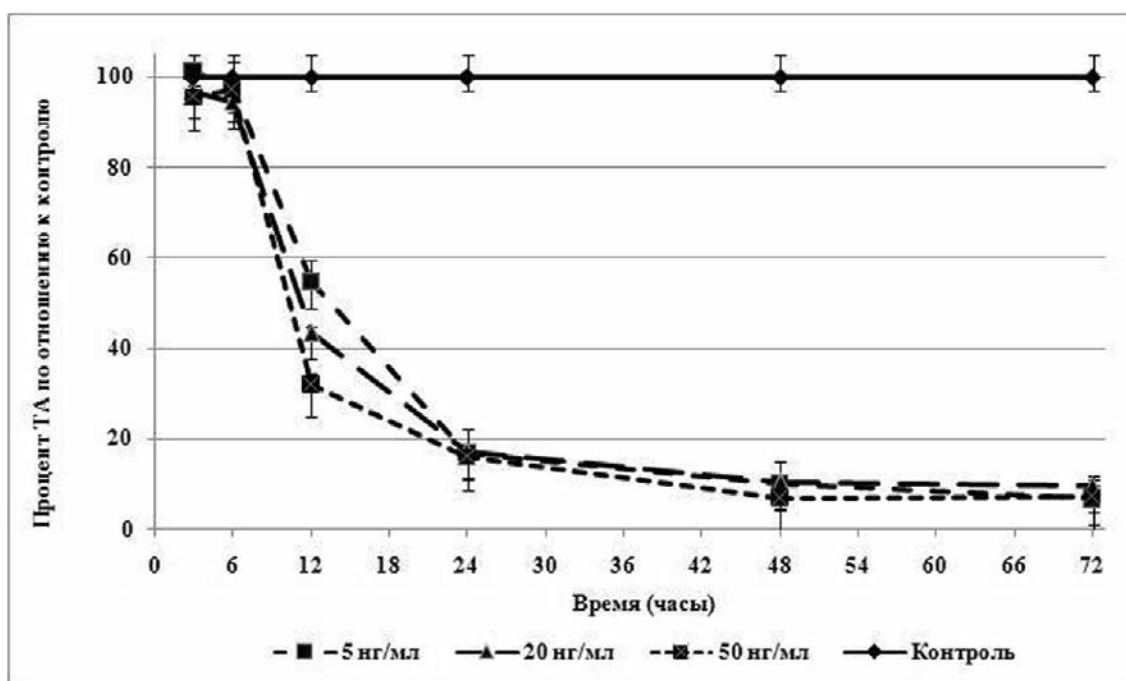


Рисунок 2.

Зависимость ингибирования ТА в лизате клеток Jurkat от времени инкубации с ингибитором и концентрации aTEL1296.

Определение действия ингибитора ТА на культивируемые клетки. Ингибитор теломеразной активности aTEL1296 обладает антипролиферативным действием на опухолевые клетки (рис. 3), массовая гибель которых наблюдается через 72 часа после добавления aTEL1296 и зависит от его концентрации. Следует отметить, что даже самые низкие концентрации aTEL1296 обладают мощным антипролиферативным эффектом и в пролонгированном действии он сравним с действием высоких доз. Значения GI_{50} и GI_{90} представлены в таблице 1. На нормальные фибробласты человека aTEL1296 не оказывает подавляющего действия в дозах, критичных для опухолевых клеток с активной теломеразой (рис. 4). Ингибирование роста (и, вероятно, жизнеспособности) фибробластов наблюдается только при увеличении концентрации aTEL1296 на порядок (выше 100 нг/мл) и через 24 ч.

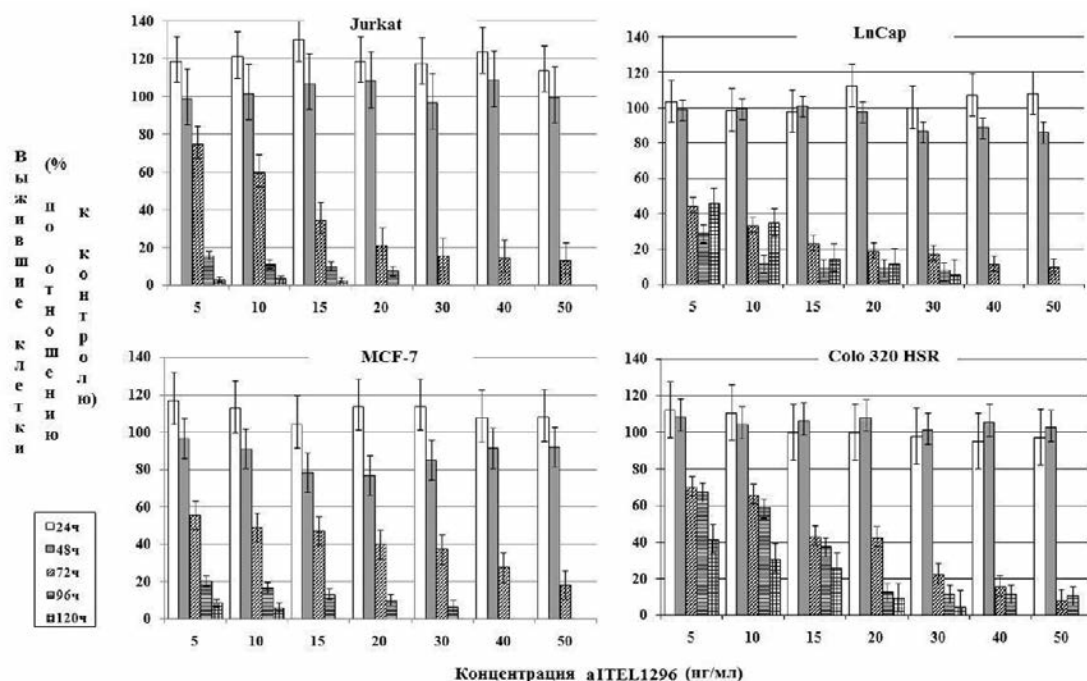


Рисунок 3.

Зависимость выживаемости опухолевых клеток от времени инкубации с ингибитором и концентрации aTEL1296.

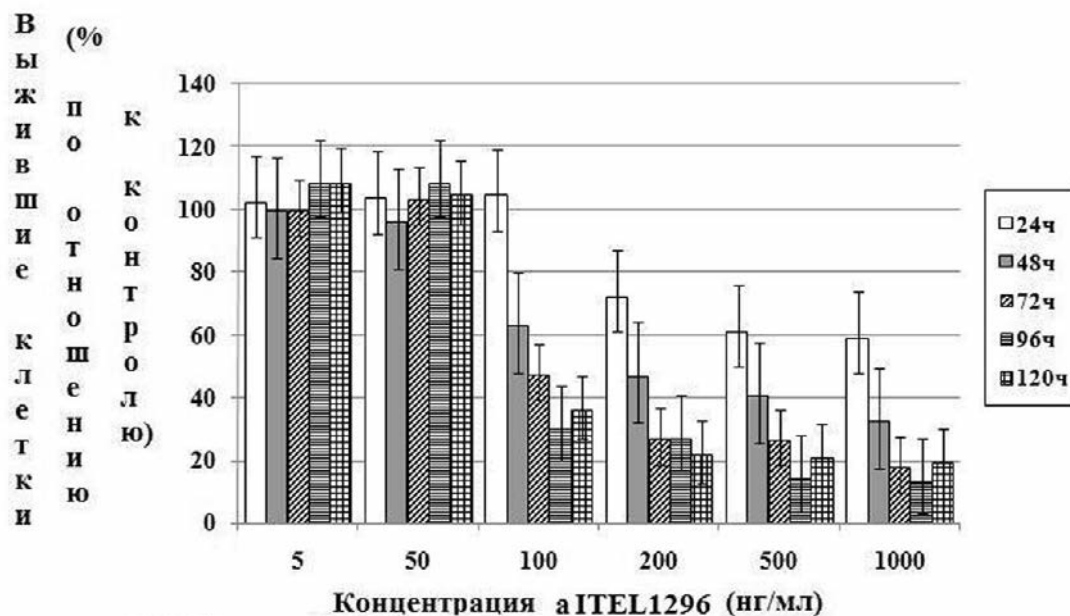


Рисунок 4.

Зависимость выживаемости фибробластов от времени инкубации с ингибитором и концентрации aTEL1296.

Таблица 1. Значение GI50 и GI90 для различных клеточных линий через 72 часа после добавления aTEL1296.

Клеточная линия	Значение GI ₅₀ (нг/мл)	Значение GI ₉₀ (нг/мл)
Jurkat	10,7 ± 0,5	64,4 ± 2,6
LnCap	5,0 ± 0,2	48,6 ± 1,8
MCF-7	12,9 ± 0,5	93,4 ± 4,5
Colo 320HSR	16,8 ± 0,8	57,0 ± 1,3

Влияние aTEL1296 на клеточный цикл и апоптоз в культивируемых клетках.

В клетках, инкубированных в присутствии aTEL1296 наблюдается активация процессов апоптоза через 72 ч после добавления препарата. Количество опухолевых клеток, находящихся в стадии апоптоза, вызванного применением aTEL1296, показано на рисунке 5.

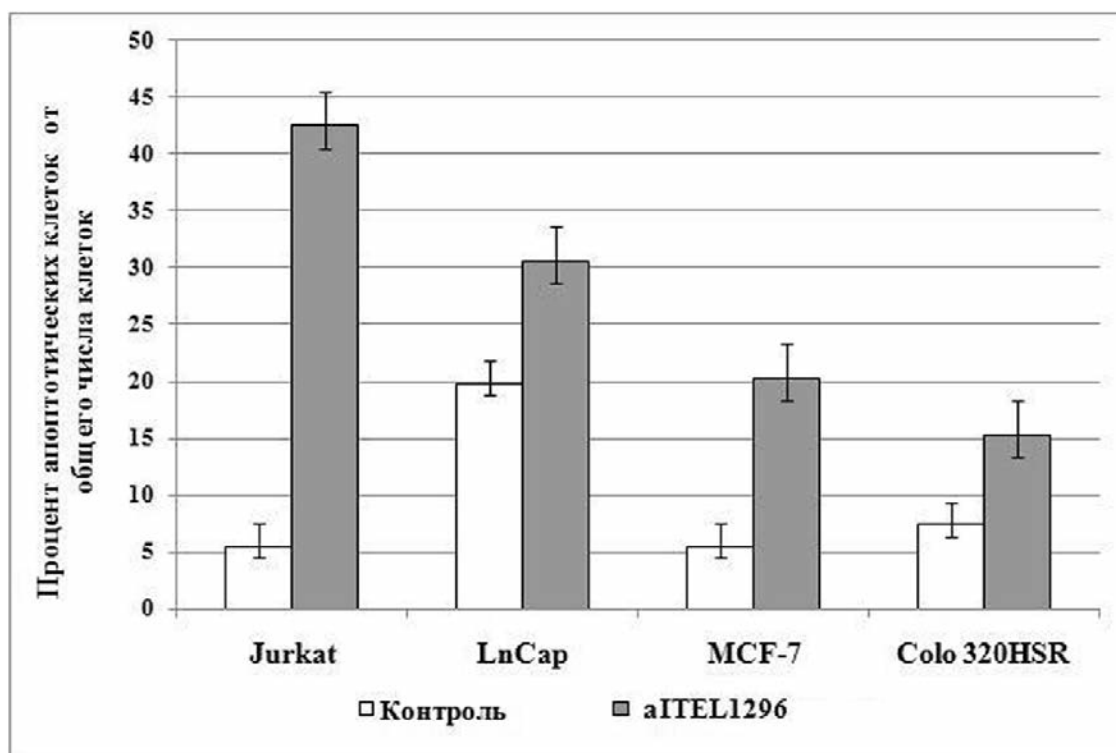


Рисунок 5.

Количество опухолевых клеток в стадии апоптоза в отсутствие и в присутствии aTEL1296 в концентрации 5 нг/мл.

В клетках Jurkat aTEL1296 влиял на клеточный цикл: в присутствии ингибитора (5 нг/мл) клетки находятся преимущественно в стадии G₀/G₁ и не вступают в стадию G₂/M (рис. 6, табл. 2). Такое изменение цикла может объясняться укорочением теломер до минимальных значений у большинства клеток в популяции. При этом клетки сохраняют жизнеспособность и активный клеточный метаболизм, что и подтверждается пребыванием клеток в стадиях G₀/G₁ и S клеточного цикла. А в клетках, теломеры которых, вероятно, укоротились до критических значений и утратили защитные функции, активируются процессы апоптоза.

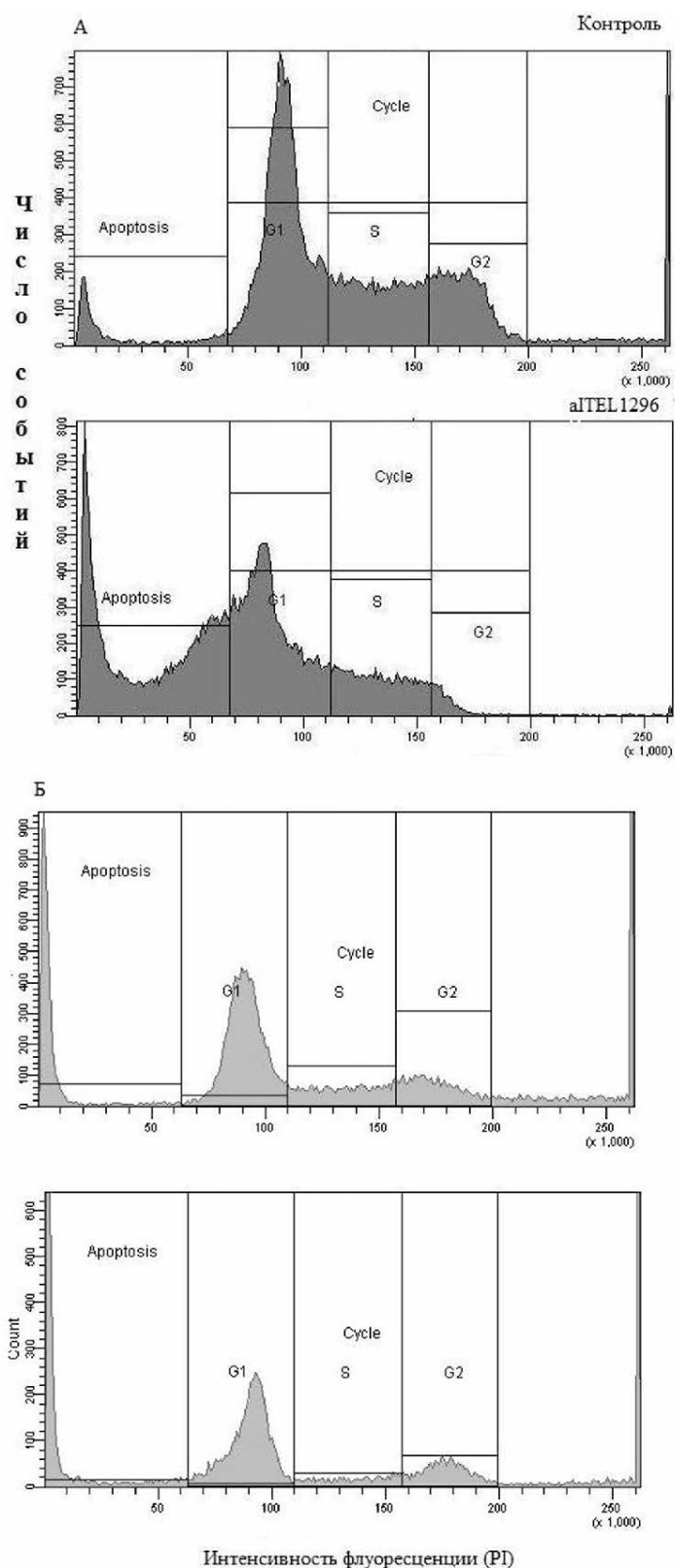


Рисунок 6.

Гистограммы определения апоптотических клеток и клеток в различных стадиях клеточного цикла в культуре клеток Jurkat (**А**) и LnCap (**Б**) через 72 часа, в присутствии aTEL1296 в концентрации 5 нг/мл.

Таблица 2. Клеточный цикл при инкубации с aTEL1296.

Стадия клеточного цикла	Процент клеток в популяции							
	Jurkat		LnCap		MCF-7		Colo 320HSR	
	Конт- роль	aTEL 1296	Конт- роль	aTEL 1296	Конт- роль	aTEL 1296	Конт- роль	aTEL 1296
G ₀ /G ₁	52,2±0,5	67,6±2,9	59,8±0,6	64,8±2,3	65,3±0,4	67,0±1,3*	57,6±0,6	57,8±1,9*
S	27,2±0,5	27,2±0,7*	20,0±0,4	12,3±0,6	21,0±0,3	18,3±0,5	26,5±0,6	17,3±1,0
G ₂ /M	20,7±0,4	5,3±0,2	20,2±0,2	22,9±0,6	13,7±0,5	14,7±0,5*	15,6±0,3	25,0±1,2

Примечание: * - не достоверно по отношению к контролю ($p > 0,05$).

Однако подобное изменение клеточного цикла не наблюдается в популяциях клеток остальных опухолевых линий, что может объясняться изначально большей длиной теломер в них, по сравнению с клетками линии Jurkat. По-видимому, клетки с более длинными теломерами в условиях ингибирования ТА в процессе деления образуют популяцию с более гетерогенными по длине теломерами. В клетках с критически короткими теломерами активируется апоптоз, а клетки с теломерами достаточной длины продолжают активно делиться. Предложенный механизм не исключает влияния aTEL1296 на какие-либо другие клеточные процессы, вызывающие изменение клеточного цикла и апоптоз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.

Таким образом, соединение aTEL1296 ингибирует ТА с высокой эффективностью ($IC_{50} = 0,19 \pm 0,02$ нг/мл; $IC_{90} = 0,56 \pm 0,05$ нг/мл), которая превышает таковую у наиболее активного из известных ингибиторов ТА – BIBR1532.

aTEL1296 ингибирует внутриклеточную ТА при его добавлении в питательную среду при культивировании клеток; что говорит о проницаемости клеточной мембраны для данного соединения.

aTEL1296 вызывает подавление пролиферации испытанных опухолевых клеток в культуре. Максимальный эффект выявлен для клеток LnCap ($GI_{50} = 5,0 \pm 0,2$ нг/мл), а минимальный – для клеток Colo 320HSR ($GI_{50} = 16,8 \pm 0,8$ нг/мл). На рост нормальных фибробластов aTEL1296 не оказывал влияния в концентрациях критичных для опухолевых клеток.

Во всех испытанных клеточных линиях aTEL1296 вызывал активацию механизма апоптоза. Максимальный уровень апоптоза наблюдали в клетках Jurkat.

Соединение aTEL1296 может служить основой для создания противоопухолевого терапевтического препарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Xin H., Liu D., Songyang Z. (2008) Genome Biol., **9**, 232.
2. Arkus N. (2005) J. Theor. Biol., **235**, 13–32.
3. Ramírez R., Carracedo J., Jiménez R., Canela A., Herrera E., Aljama P., Blasco M.A. (2003) J. Biol. Chem., **278**, 836–842.

4. Shay J.W., Van Der Haegen B.A., Ying Y., Wright W.E. (1993) *Exp. Cell Res.*, **209**, 45–52.
5. Lue N.F. (2004) *Bioessays*, **26**, 955–962.
6. Chen H., Li Y., Tollefsbol T. O. (2009) *Mol. Biotechnol.*, **41**, 194–199.
7. Zhdanov D.D., Kovalenko N.A., Abakumova O.Y., Bibikova M.V., Gotovtseva V. Y. (2010) 5th International Conference “Genomics, Proteomics, Bioinformatics and Nanobiotechnology for Medicine” Abstract Book, 70.
8. Kim N.W., Piatyszek M.A., Prowse K.R., Harley C.B., West M.D., Ho P.L., Coviello G.M., Wright W.E., Weinrich S.L., Shay J.W. (1994) *Science*, **266**, 2011–2015.
9. Глухов А.И., Зимник О.В., Гордеев С.А., Северин С.Е. (1999) *Аллергия и клиническая иммунология*, **9**, 173 – 175.
10. Mosmann T. (1983) *J. Immunol. Methods.*, **65**, 55–63.
11. Walker P.R., Kwast-Welfeld J., Gourdeau H., Leblanc J., Neugebauer W., Sikorska M. (1993) *Experimental Cell Research*, **207**, 142–151.
12. Гланц С. (1998) *Медико-биологическая статистика* (пер. с англ.), Практика, М.
13. Ward R.J., Autexier C. (2005) *Mol. Pharmacol.*, **68**, 779–786.
14. Damm K., Hemmann U., Garin-Chesa P., Huel N., Kauffmann I., Priepke H., Niestroj C., Daiber C., Enenkel B., Guilliard B., Lauritsch I., Müller E., Pascolo E., Sauter G., Pantic M., Martens U.M., Wenz C., Lingner J., Kraut N., Rettig W.J., Schnapp A. (2001) *EMBO J.*, **20**, 6958–6968.

Поступила: 08. 11. 2010.

THE INFLUENCE OF COMPOUND ITEL1296 ON TELOMERASE ACTIVITY AND THE GROWTH OF CANCER CELLS

N.A. Kovalenko¹, D.D. Zhdanov^{2,4}, M.V. Bibikova³, V.Y. Gotovtseva³

¹I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Research Center

²Institute of Biomedical Chemistry of Russian Academy of Medical Sciences, Pogodinskaya 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: (495)246-33-80; e-mail: zhdanovdd@mail.ru

³Peoples' Friendship University of Russia, Ecological Faculty

⁴National Research Center of Antibiotics

Telomerase is a ribonucleoprotein that synthesizes telomeric repeats and identified as a promising target for anticancer therapy. Here we describe a new compound aTEL1296 as a potent telomerase inhibitor. Its inhibitory activity was a bit higher ($IC_{50} = 0,19 \pm 0,02$ ng/ml) than that of BIBR1532, one of the most potent telomerase inhibitors known to date. Besides telomerase inhibition aTEL1296 activated apoptotic mechanisms and effectively suppressed proliferation of tumor cell lines ($GI_{50} = 5,0 \pm 0,2$ ng/ml for most sensitive cell line LnCap) but not normal fibroblast cell line.

Key words: telomerase, telomere, aTEL1296, inhibitor, cancer cells, apoptosis.