

Аналіз механізмів, які визначають чутливість клітин раку щитоподібної залози до паклітакселю

В.В. Пушкарьов,
О.І. Ковзун,
В.М. Пушкарьов,
В.М. Гончарук,
М.Д. Тронько

ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України»

Резюме. Вивчено дію протипухлинного препарату паклітакселю на клітини найбільш стійких до цієї сполуки ліній раку щитоподібної залози КТС-3 і АРО. Показано, що в присутності паклітакселю активація апоптозних процесів у пухлинних клітинах КТС-3 спостерігається через 18 год. від початку інкубації. Можливою причиною стійкості клітин КТС-3 до паклітакселю є запізнена, порівняно з клітинами чутливіших ліній, активація апоптозних процесів, а тригерним механізмом такої активізації можуть бути зниження активності антиапоптозного каскаду cRaf/ERK, активація транскрипційного фактора ATF-2 і зупинка клітинного циклу. Більша стійкість клітин лінії АРО порівняно з клітинами лінії КТС-2 може бути зумовлена мутацією гена *TP53*, у результаті якої утворюється недостатня кількість інгібітора p21^{WAF1} і не відбувається зупинка клітинного циклу.

Ключові слова: паклітаксель, анапластичний рак, щитоподібна залоза, апоптоз, клітини КТС-3, клітини АРО, клітинний цикл.

Більшість ліній анапластичного раку щитоподібної залози (АТС) характеризуються високою чутливістю до паклітакселю – високоефективного препарату, що успішно використовується для лікування багатьох форм раку [1]. Показано, що паклітаксель у межах концентрацій 0,1-50 нМ ініціює в пухлинних клітинах щитоподібної залози апоптозні процеси, які призводять до їх загибелі [2]. Проте деякі клітинні лінії є стійкішими до дії препарату.

Дослідження механізмів дії паклітакселю на стійкі клітини має велике значення для розробки способів пригнічення механізмів, які беруть

участь у набутті резистентності клітин до цього протипухлинного препарату.

Метою роботи було порівняльне вивчення дії паклітакселю на клітини більш стійких до препарату ліній анапластичного раку щитоподібної залози – КТС-3 та АРО.

Матеріали та методи

Клітини КТС-2 та КТС-3 були одержані з Медичного університету Кавасакі (Окіяма, Японія), клітини АРО – з Університету Цинциннаті (Огайо, США). Клітини культивували у середовищі RPMI-1640, що містило 5% бичачої сироватки, 1% пеніциліну/стрептоміцину, в атмосфері з 5% CO₂ при 37 °С протягом 2 днів, промивали 2 рази PBS-буфером (80 мМ ортофосфату натрію однозаміщеного, 20 мМ ортофосфату натрію дво-

* адреса для листування (Correspondence): ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В.П. Комісаренка НАМН України», вул. Вишгородська, 69, м. Київ, 04114, Україна; e-mail: zdovado@ukr.net

заміщеного, 100 мМ хлориду натрію, рН 7,4) і замінювали середовище. Через 24 год. вносили розчинений у диметилсульфоксиді (ДМСО) таксол фірми «Wako Chemicals» (Японія) і збирали клітини через визначені проміжки часу. У контрольні проби вносили в такій же кількості ДМСО. По закінченні інкубації клітини двічі промивали холодним (2 °С) буфером PBS, що містив пірофосфат та ортованадат натрію, збирали в 1 мл буфера PBS і осаджували протягом 3 хв при 400 g і 2 °С. Одержання клітинних білків та Вестерн блотинг проводили за методикою, описаною раніше [2]. Поліклональні антитіла до полі-АДФ-рибозополімерази (ПАРП), каспази-9, фосфоформ білків Bcl-2, cRaf-1, ATF-2, pRb, мічені пероксидазою хрому вторинні антитіла отримані від фірми «Cell Signaling Technology» (США). Комплекси білків з антитілами візуалізували за допомогою реагенту ECL («Amersham Life Science», Велика Британія). Визначення виживаності клітин анапластичного раку проводили, культивуючи клітини в 96-лункових планшетах із плоским дном у середовищі RPMI-1640, що містило 5% FBS та антибіотики. Суспензію клітин (100 мкл, 1000 клітин) вносили в лунки та інкубували протягом 24 год. Паклітаксель, розчинений у ДМСО, додавали в об'ємі 10 мкл в концентраціях, що зростали, по 6 лунок на кожну концентрацію. У контрольні проби додавали ДМСО в такій же кількості. Після інкубації в лунки додавали по 11 мкл розчину з набору для підрахунку клітин (ССК-8, «Dojin», Японія), ін-

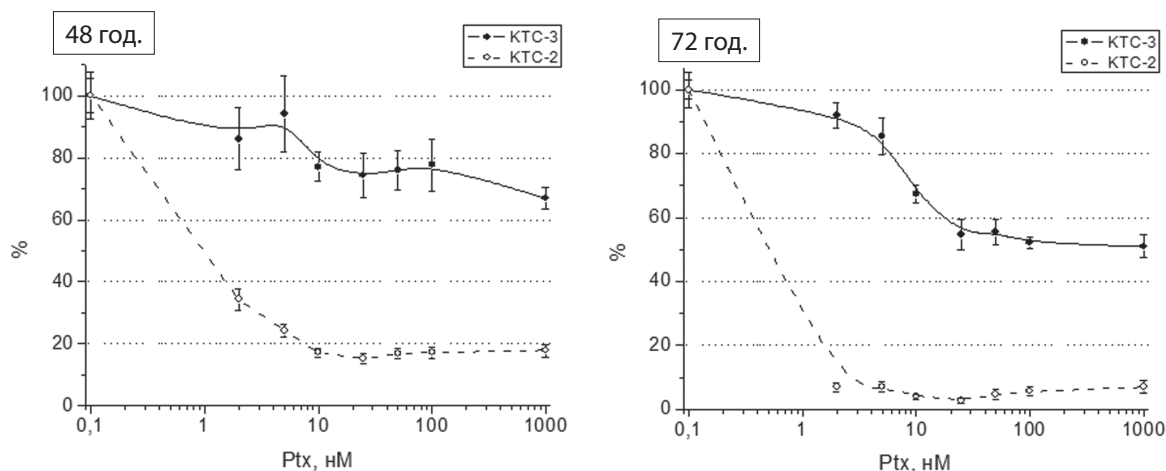
кубували протягом 1 год. при 37 °С і вимірювали оптичну густина при 450 нМ.

Результати та їх обговорення

Паклітаксель викликає залежну від концентрації сполуки загибель клітин АТС. Проте порівняння двох ліній КТС-2 та КТС-3 показало, що остання клітинна лінія є набагато стійкішою від клітин КТС-2. Через 48 год. інкубації з паклітакселем кількість клітин КТС-2, що вижили, становить менше 20%, через 72 год. їх кількість знижується до 4%. Водночас для клітин КТС-3 помічено зниження виживаності тільки на 20-35% через 48 год. інкубації з препаратом і на 50% – через 72 год. (рис. 1).

Причиною загибелі клітин анапластичного раку є індуковані паклітакселем апоптозні та некротичні процеси [2]. Аналіз біохімічних механізмів апоптозу показав, що інтенсивне розщеплення білка ПАРП, яке здійснюється ефекторними каспазами і є свідченням незворотності апоптозних процесів, починається в клітинах КТС-3 через 18 год. інкубації (рис. 2), тоді як у клітинах КТС-2 цей процес стартує, починаючи з 12 год. [2]. Активізація каспази-9, яка відбувається під впливом паклітакселю, починається з 3-ї год. інкубації клітин, а з 18-ї год. її кількість помітно збільшується. Можливим механізмом ініціації апоптозу в пухлинних клітинах є фосфорилування антиапоптозного білка Bcl-2, яке призводить до його інактивації та деградації в протеосомах [3-5]. З рис. 2 ви-

Рисунок 1. Вплив паклітакселю (Ptx) на виживаність клітин анапластичного раку ліній КТС-2 та КТС-3



За 100 % приймали виживаність клітин у пробах без паклітакселю. $M \pm SD$, $n=6$. Відмінності між кривими виживаності клітин КТС-3 та КТС-2 вірогідні, починаючи з концентрації паклітакселю 2 нМ, $p < 0,01$. Ефект паклітакселю вірогідний для клітин КТС-2 при всіх досліджених концентраціях препарату, $p < 0,01$; для КТС-3: після 48 год. для концентрацій паклітакселю, починаючи з 10 нМ ($p < 0,05$), після 72 год. інкубації – для всіх концентрацій ($p < 0,01$ - $p < 0,05$).

Оригінальні дослідження

дно, що фосфорилювання Bcl-2 збігається в часі з розщепленням ПАРП. Водночас активується транскрипційний фактор ATF-2, який є кінцевою ланкою проапоптозних сигнальних каскадів і фосфорилюється ключовими протеїнкіназами JNK та p38MAPK [6-8]. Фосфорилювання і активність cRaf-1, яка є протеїнкіназою, що ініціює антиапоптозний сигнальний механізм [2], навпаки, зменшується (рис. 2а, б).

Відомо, що таксани в першу чергу впливають на перебіг клітинного циклу. Вивчення активності пухлинного супресора – білка ретинобластоми

pRb, який контролює вхід клітини у фазу синтезу ДНК клітинного циклу (G1/S перехід) [9], показало, що в перші 6 год. фосфорилювання pRb по 807/811 залишкам серину в клітинах КТС-3 посилюється (рис. 2а, б). Це свідчить про інактивацію супресора і вказує на певні мітогенні властивості паклітакселю, який сприяє прогресу клітинного циклу. Після 6 год. інкубації клітин з препаратом спостерігається зворотний процес – дефосфорилювання, тобто активація pRb, що свідчить про гальмування або повну зупинку клітинного циклу. Звертає на себе увагу той факт, що активація білка ретинобластоми збігається в часі з активацією ATF-2, фосфорилюванням Bcl-2 та розщепленням ПАРП.

Дослідження дії паклітакселю на клітини АТС показало, що клітини лінії АРО також стійкіші, ніж клітини лінії КТС-2 (рис. 3): різниця у стійкості може досягати майже 20% вже в перші 24 год. інкубації клітин. Можливою причиною такої резистентності є мутація гена TP53, внаслідок чого не утворюється пухлинний супресор р53, який відіграє надзвичайно важливу роль у контролюванні цілісності геному, регуляції клітинного циклу та ініціації апоптозу [10-13]. Клітини лінії КТС-2 містять ген TP53 дикого типу і здатні до синтезу активного білка р53. Фосфорилювання та активація р53 призводять до посилення експресії інгібітора циклін-залежних кіназ (CDKI) – білка p21^{WAF1}, який гальмує клітинний цикл при пошкодженні ДНК та інших стресових впливах [11-13]. Зупинка циклу за дії p21^{WAF1} ініціює репарацію

Рисунок 2а. Залежність інтенсивності розщеплення ПАРП (1), активації каспази-9 (2), фосфорилювання: антиапоптозного білка Bcl-2 (3), пухлинного супресора pRb (4), протеїнкінази cRaf-1 (5) і транскрипційного чинника ATF-2 (6) та від часу інкубації клітин КТС-3 з 25 нМ паклітакселю

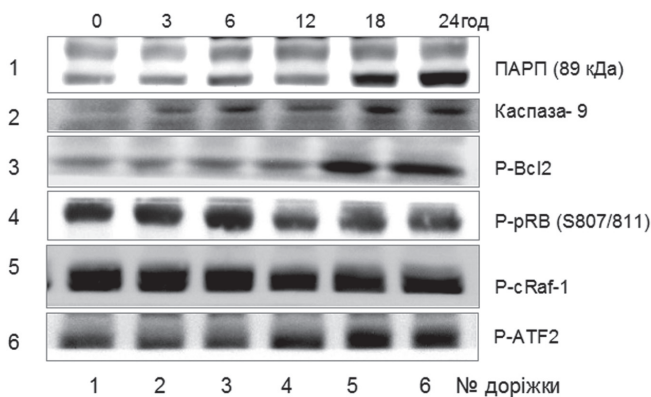


Рисунок 2б. Кількісна оцінка фосфорилювання білків cRaf-1 та pRb за результатами Вестерн-блотингу (рис. 2а).

* - відмінність від контролю (1 доріжка) вірогідна, (p<0,05); + та ++ - відмінності від точки 6 год. (зниження фосфорилювання) вірогідні, p<0,05 та p<0,01 відповідно. ОГ – оптична густина в умовних одиницях

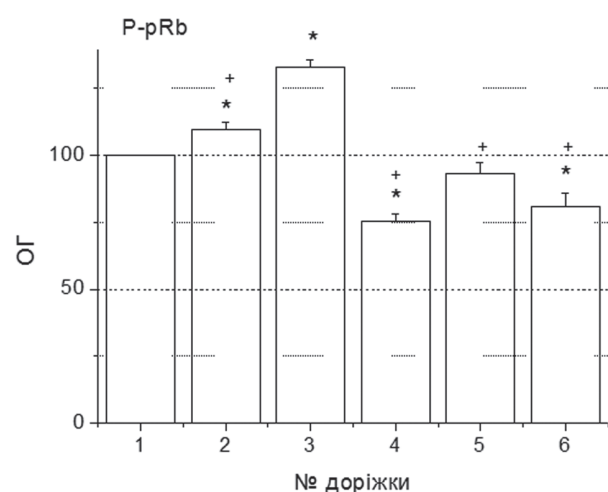
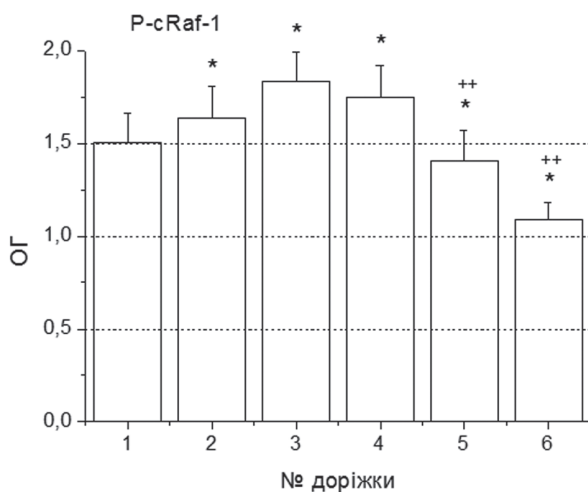
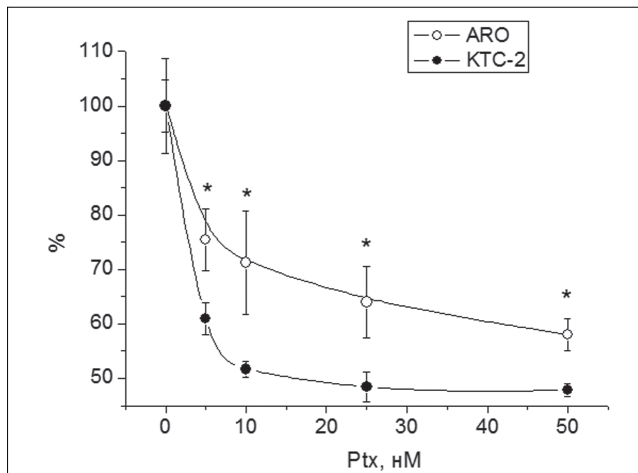


Рисунок 3. Вплив паклітакселю (Ptx) на виживаність клітин анапластичного раку ліній KTC-2 та ARO (24 год. інкубації)



За 100 % приймали виживаність клітин у пробах без паклітакселю. $M \pm SD, n=6$.

* - відмінності між кривими виживаності клітин ARO та KTC-2 вірогідні, починаючи з концентрації паклітакселю 5 нМ, $p < 0,05$. Ефект паклітакселю вірогідний щодо клітин KTC-2 та ARO за всіх досліджених концентрацій препарату, $p < 0,01 - p < 0,05$.

Рисунок 4а. Вплив паклітакселю (Ptx) на експресію супресора pRb та інгібітора p21^{WAF1} у клітинах анапластичного раку ліній KTC-2 та ARO. Стрілкою позначена межа між клітинами KTC-2 та ARO

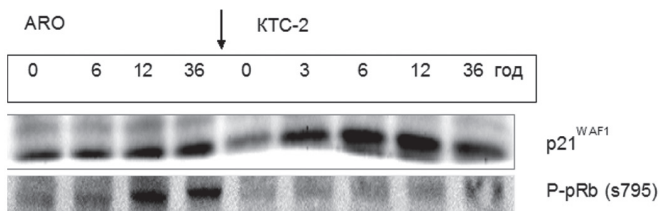
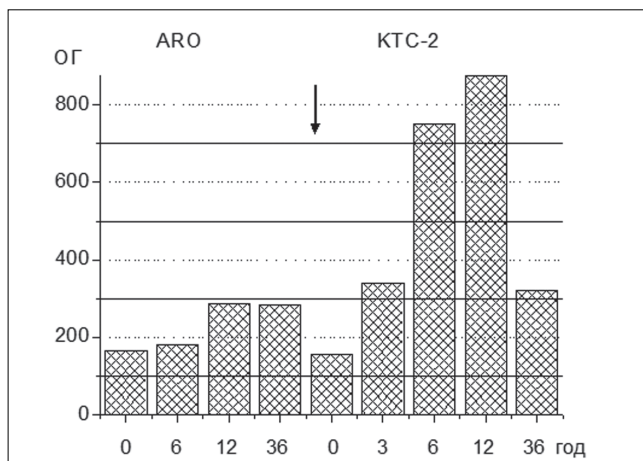


Рисунок 4б. Кількісна оцінка білка p21^{WAF1} за результатами Вестерн-блотингу (рис. 4а). ОГ – оптична густина в умовних одиницях



пошкоджень, або, при неможливості репарації, сенеценсію та апоптоз [13, 14]. З рис. 4а видно, що в клітинах ARO з мутантним геном *TP53* експресія CDK1 після 12 год. інкубації з паклітакселем дещо зростає. У клітинах KTC-2 з *wtTP53* посилення експресії значно потужніше – на 12-й год. після інкубації, кількість p21^{WAF1} в клітинах KTC-2 перевищує кількість інгібітора в клітинах ARO більш ніж у три рази (рис. 4б). Визначення активності супресора pRb при дії паклітакселю показало, що в клітинах ARO спостерігається інактивація pRb, що відкриває шлях до синтетичної фази клітинного циклу. Разом із тим у клітинах KTC-2 супресор був максимально активним, що є наслідком високої експресії p21^{WAF1} і може свідчити про зупинку циклу.

Таким чином, можливою причиною стійкості клітин KTC-3 до паклітакселю є запізніла, порівняно з клітинами більш чутливих ліній, активація апоптозних процесів, а тригерним механізмом такої активації можуть бути зниження активності антиапоптозного каскаду cRaf/ERK, активація транскрипційного фактора ATF-2 та зупинка клітинного циклу. Стійкість клітин лінії ARO порівняно з клітинами лінії KTC-2 може бути зумовлена мутацією гена *TP53*, внаслідок якої утворюється недостатня кількість інгібітора p21^{WAF1} і не відбувається гальмування клітинного циклу.

Література

- Jordan M.A., Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs // Nat. Rev. Canc. 2004, 4, 253-265.
- Pushkarev V.M., Starenki D.V., Saenko V.A. et al. Molecular mechanism of the effects of low concentrations of taxol in anaplastic thyroid cancer cells // Endocrinology. 2004, 145, N 7, 3143-3152.
- Labi V., Grespi F., Baumgartner F., Villunger A. Targeting the Bcl-2-regulated apoptosis pathway by BH3 mimetics: a breakthrough in anticancer therapy? // Cell. Death Diff. 2008, 15, 977-987.
- Skommerer J., Wlodkowic D., Deptala A. Larger than life: Mitochondria and the Bcl-2 family // Leukemia Res. 2007, 31, 277-286.
- Geng F., Tang L., Li Y. et al. Allyl isothiocyanate arrests cancer cells in mitosis, and mitotic arrest in turn leads to apoptosis via BCL-2 phosphorylation // J. Biol. Chem. 2011, 286, 32259-32267.
- Btaouri H., Morjani H., Greffe Y. et al. Role of JNK/ATF-2 pathway in inhibition of thrombospondin-1 (TSP-1) expression and apoptosis mediated by doxorubicin and camptothecin in FTC-133 cells // Biochim. Biophys. Acta. 2011, 1813, N 5, 695-703.

Оригінальні дослідження

7. Hassan M., Feyen O., Grinstein E. Fas-induced apoptosis of renal cell carcinoma is mediated by apoptosis signal-regulating kinase 1 via mitochondrial damage-dependent caspase-8 activation // *Cell. Oncol.* 2009, 31, N 6, 437-456.
8. Selimovic D., Hassan M., Haikel Y., Hengge U.R. Taxol-induced mitochondrial stress in melanoma cells is mediated by activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) and p38 pathways via uncoupling protein 2 // *Cell Signal.* 2008, 20, N 2, 311-322.
9. Hallstrom T.C., Nevins J.R. Balancing the decision of cell proliferation and cell fate // *Cell Cycle.* 2009, 8, N 4, 532-535.
10. Vousden K.H., Lane D.P. p53 in health and disease // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007, 8, 275-283.
11. Levine A.J., Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex // *Nat. Rev. Cancer.* 2009, 9, 749-758.
12. Vousden K.H., Prives C. Blinded by the light: the growing complexity of p53 // *Cell.* 2009, 137, 413-431.
13. Brady C.A., Jiang D., Mello S.S. et al. Distinct p53 transcriptional programs dictate acute DNA damage responses and tumour suppression // *Cell.* 2011, 145, 571-583.
14. Brady C.A., Attardi L.D. p53 at a glance // *J. Cell Sci.* 2010, 123, N 15, 2527-2532.

Анализ механизмов, определяющих чувствительность клеток рака щитовидной железы к паклитакселю

В.В. Пушкарев, Е.И. Ковзун, В.М. Пушкарев, В.М. Гончарук, Н.Д. Тронько

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В.П. Комиссаренко НАМН Украины»

Резюме. Изучали действие противоопухолевого препарата паклитакселя на клетки наиболее устойчивых к этому соединению линий рака щитовидной железы KTC-3 и ARO. Показано, что в присутствии паклитакселя активация апоптозных процессов в опухолевых клетках KTC-3 наблюдается через 18 ч после начала инкубации. Возможной причиной устойчивости клеток KTC-3 к паклитакселю является запоздалая, по сравнению с клетками

более чувствительных линий, активация апоптозных процессов, а триггерным механизмом такой активизации могут быть снижение активности антиапоптозного каскада cRaf/ERK, активация транскрипционного фактора ATF-2 и остановка клеточного цикла. Большая устойчивость клеток линии ARO, по сравнению с клетками линии KTC-2, может быть обусловлена мутацией гена *TP53*, в результате которой образуется недостаточное количество ингибитора p21^{WAF1} и не происходит остановка клеточного цикла.

Ключевые слова: паклитаксель, анапластический рак, щитовидная железа, апоптоз, клетки KTC-3, клетки ARO, клеточный цикл.

Analysis of the mechanisms determining the sensitivity of thyroid cancer cells to paclitaxel

V.V. Pushkarev, O.I. Kovzun, V.M. Pushkarev, V.M. Goncharuk, M.D. Tronko

State Institution «V.P. Komisarzenko Institute of Endocrinology and Metabolism, Natl. Acad. Med. Sci. of Ukraine»

Summary. The effect of anti-cancer drug paclitaxel on the cells resistant to the drug thyroid cancer lines KTC-3 and ARO has been studied. It has been shown that in the presence of paclitaxel activation of apoptotic processes in the tumor cells KTC-3 observes in 18 h after start of incubation. A possible reason for the resistance of the KTC-3 cells to paclitaxel is delayed, compared with the cells of more sensitive lines, activation of apoptotic processes, and a decrease in the activity of antiapoptotic cascade cRaf/ERK, activation of the transcription factor ATF-2 and cell cycle arrest may be a triggering mechanism of such activation. Resistance of the ARO cell line compared to the KTC-2 cell line may be due to mutation of the *TP53* gene, which causes insufficient production of p21^{WAF1} inhibitor and as a result absence of cell cycle arrest.

Keywords: paclitaxel, thyroid, anaplastic cancer, apoptosis, KTC-3 cells, ARO cells, cell cycle.

(Надійшло 1.11.2012)