



УДК 616-006+616.4+615.33

ПОШУК ТА ІДЕНТИФІКАЦІЯ МОЛЕКУЛЯРНИХ МІШЕНЕЙ ДІЇ АНГУЦИКЛІНОВОГО АНТИБІОТИКА ЛАНДОМІЦИНУ Е У ЗЛОЯКІСНИХ КЛІТИНАХ ЛЮДИНИ

Р. Р. Панчук¹, Л. В. Легка^{1,2}, Б. П. Мацелюх³, І. Й. Кріль⁴, Р. С. Стойка^{1,2}

¹Інститут біології клітини НАН України, вул. Драгоманова, 14–16, Львів 79005, Україна
e-mail: rpanchuk@ukr.net

²Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна

³Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. М. Заболотного НАНУ
вул. Заболотного, 154, Київ МСП03680, Україна

⁴Львівський національний медичний університет ім. Данила Галицького
вул. Пекарська, 69, Львів 79010, Україна

Проведені нами дослідження клітинних і молекулярних механізмів дії нового перспективного ангуциклінового антибіотику ландоміцину Е показали, що ця сполука використовує інші механізми індукції апоптозу пухлинних клітин порівняно зі структурно подібним відомим протипухлинним препаратом доксорубіцином. Зокрема, ландоміцин Е зупиняє клітини у фазі G1 клітинного циклу і ця дія опосередковується активними сполуками кисню. Така G1-специфічність дії ландоміцину Е може мати важливе значення у хіміотерапії, оскільки злоякісні стовбурові клітини, які вважаються головною причиною рецидивів онкозахворювання, в основному, перебувають у G0/G1 фазі і тому є нечутливими до більшості протипухлинних препаратів. У даній роботі за допомогою вестерн-блот аналізу ми ідентифікували потенційну внутрішньоклітинну білкову мішень ландоміцину Е – ефекторний апоптичний ензим каспазу-7. У літературі не описано випадків безпосередньої активації каспази-7 протипухлинними препаратами. Тому цей унікальний механізм дає ландоміцину Е змогу ефективно вбивати злоякісні клітини навіть за відсутності інших ключових ензимів реалізації програми апоптозу, таких як каспаза-3. Отже, враховуючи достатньо високий антинеопластичний потенціал та унікальний механізм дії ландоміцину Е, цей антибіотик можна рекомендувати як протипухлинний засіб другої лінії під час лікування онкологічних хворих.

Ключові слова: протипухлинні препарати, резистентність пухлин до ліків, ландоміцин, апоптоз, клітинний цикл.

ВСТУП

За прогнозами фахівців Всесвітньої організації охорони здоров'я онкологічні захворювання незабаром стануть основною причиною смертності у світі. Зокрема, у 2010 році у світі було зафіксовано понад 6 млн нових випадків захворювань

на рак, із них 165 тис. в Україні. Медики прогнозують, що до 2020 р. ця недуга щороку вражатиме до 200 тис. українців.

На сьогоднішній день традиційна медицина має обмежений вибір можливостей лікування онкологічних захворювань. Хірургічне втручання, радіотерапія і хімотерапія досі залишаються найбільш дієвими методами лікування онкохворих, незважаючи на негативні побічні ефекти, низьку вибірковість дії та швидкий (0,5–1,0 рік) розвиток резистентності пухлинних клітин до хімотерапевтичних чинників.

Тому актуальним завданням сучасної фармакології та медицини є пошук і впровадження в клініку протипухлинних препаратів адресної дії, які би вибірково знищували тільки пухлинні клітини, оминаючи клітини здорових тканин організму [20]. Деякі з таких препаратів вже пройшли успішне випробування на добровольцях і використовуються у клініці. Це, зокрема, герцептин (моноклональні антитіла до рецептора епідермального фактора росту клітин раку молочної залози), який успішно застосовують під час лікування деяких типів раку молочної залози, олапаріб (інгібітор репараційного ензиму PARP-1), який є ефективним при лікуванні раку простати і яєчника, та ін. [21].

Ангуцикліни – це найбільша група ароматичних полікетидних антибіотиків, що налічує понад 120 представників. Унікальною особливістю структури цих сполук є специфічний фенілглікозидний елемент, який може забезпечувати більше розмаїття їхньої біологічної дії порівняно зі спорідненими антибіотиками родини тетрациклінів і антрациклінів [13; 16; 17]. Найбільш виражений протипухлинний потенціал серед ангуциклінів виявлено у антибіотиків родини ландоміцинів, що була вперше описана на початку 1990-х років [5; 17].

Ландоміцин Е – новітній представник ангуциклінів, отриманий у 1996 р. в лабораторії проф. Б. П. Мацелюха (Інститут мікробіології та вірусології НАН України ім. Д. К. Заболотного, Київ). Він продукується штамом *Streptomyces globisporus* 1912 при рості на соєвому середовищі [1]. Антинеопластичний ефект цього антибіотика вперше показано *in vivo* на моделі карциноми Герена у щурів [3] і на лінійях злоякісних клітин тварин і людини [2; 9]. Нами встановлено, що цей антибіотик здатний долати резистентність пухлинних клітин до хімотерапії [8]. Крім того, ми продемонстрували важливу роль активних сполук кисню в цитотоксичному ефекті ЛЕ (див. [8]). Однак молекулярні механізми дії цієї сполуки до кінця не були з'ясовані.

Завданням цього дослідження було визначити вплив ландоміцину Е на клітинний цикл злоякісних клітин, ідентифікувати потенційні молекулярні мішені цього антибіотика й дослідити унікальні сигнальні шляхи індукції апоптозу, за допомогою яких ландоміцин Е здатний долати набуту резистентність злоякісних клітин до хімотерапії.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Ландоміцин Е (99% чистоти за даними тонкошарової хроматографії) був отриманий у лабораторії проф. Б.П. Мацелюха (Інститут мікробіології та вірусології імені Д. К. Заболотного НАН України, Київ, Україна). Доксорубіцин („Ebeve”, Австрія) був придбаний в аптеці.

Клітини лінії Jurkat Т-лейкозу людини і клітини лінії HeLa карциноми шийки матки людини були отримані з колекції клітинних культур Інституту експериментальної патології, онкології та радіобіології імені Р. Є. Кавецького НАН України (Київ). Клітини вирощували в середовищі Ігла, модифікованому Дульбекко (DMEM „Sigma”, США) за присутності декомплементованої сироватки крові ембріонів великої рогатої худоби („Sangva”, Львів) і 50 мкг/мл гентаміцину („Sigma”, США) в інкубаторі

із 5% вмістом CO_2 при 37°C . Клітини пересівали через кожні три дні розведенням клітинної суспензії у співвідношенні 1:5.

Для експериментів клітини висівали у 24-лункові пластикові планшети (Costar) і 50 мл пластикові культуральні флакони (Greiner Bio-one, Німеччина). N-ацетилцистеїн (NAC, Sigma, США) розчиняли у забуференому фізіологічному розчині (ЗФР) і додавали до культивованих клітин за 30 хв до внесення туди протипухлинних препаратів (кінцева концентрація NAC становила 1 мМ).

Для візуалізації хроматину в ядрі клітин HeLa їх промивали ЗФР, фіксували 15 хв за кімнатної температури у 4% розчині параформальдегіду у ЗФР і пермеабілізували 3 хв розчином, який містив 0,1% Triton-X100 у ЗФР. Тоді клітини інкубували протягом 5 хв у ЗФР, що містив 1 мкг/мл 4,6-діамідино-2-фенілндоли (DAPI) (Sigma). Після промивання ЗФР на предметне скло з клітинами наносили спеціальне середовище GelMount (Sigma) для тривалого збереження флуоресценції та покривне скло. Клітини досліджували за допомогою флуоресцентного мікроскопа Zeiss Axiolmager A1 (Carl Zeiss, Німеччина).

Для аналізу білків шляхом імуноблотування (Вестерн-блот аналіз) клітини промивали охолодженим ЗФР, після чого додавали лізувальний буфер: 20 мМ Tris/HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 0,5% Тритон X-100, 1% TrasyloI, 1 мМ фенілметилсульфонілфторид (PMSF, Serva, Німеччина). Концентрацію білка визначали за методом Петерсона [15]. Лізати білків аналізували електрофорезом за умов денатурації у 12% поліакриламідному гелі (ПААГ), як описано Леммлі [10]. Електрофорез проводили у Tris-гліциновому буфері pH 8,3 (25 мМ Tris, 192 мМ гліцину, 0,1% додецилсульфату натрію) у режимі 0,03 А на дві пластинки гелю протягом 3–4 годин, використовуючи камеру для електрофорезу Mini-PROTEAN II (BioRad, Швеція). Молекулярну масу білків визначали за допомогою наборів калібрувальних білків (Fermentas, Литовська Республіка). Перенесення білків із ПААГ на нітроцелюлозну мембрану здійснювали в апараті Mini Trans-Blot Cell (BioRad, Швеція) за напруги 100 В протягом 90 хв у буфері для переносу (0,192 М гліцин, 0,1% ДСН, 20% метанол, 0,025 М Tris, pH 8,3). Вільні центри зв'язування на мембрані блокували за кімнатної температури протягом 1 год 5%-ним розчином сухого знежиреного молока у ЗФР, що містив 0,05% Tween-20. Після цього мембрану інкубували за присутності специфічних кролячих моноклональних антитіл до розщепленої форми каспази-3, каспази-6, каспази-7, Bid (Cell Signaling, США), AIF (sc-5586), Bcl-2 (sc-492), Bcl-X_{LS} (sc-634) (Santa Cruz Biotech, США), каспази-9 (BD 556585) (BD Pharmingen, США), β-актину (Sigma, США), моноклональних козячих антитіл до прокаспази-3 (sc-1226) (Santa Cruz Biotech, США) і моноклональних мишачих антитіл до каспази-2, каспази-8 (BD Pharmingen, США) і каспази-10 (MBL, США) протягом 12 год при 4°C і повільному погодюванні. Антитіла розводили у розчині 2% БСА у ЗФР із 0,05 % Tween-20 у співвідношенні 1:1000, за винятком β-актину (1:400). Після інкубації мембрану промивали тричі по 5 хв у ЗФР з 0,05% Tween-20. Тоді мембрану інкубували з антитілами до кролячого, мишачого або козячого імуноглобуліну, що були кон'юговані з пероксидазою (Amersham Pharmacia Biotech, США). Антитіла розводили у блокувальному розчині у співвідношенні 1:5000. Інкубацію проводили протягом 1 год при 4°C при струшуванні. Після інкубації мембрану промивали тричі по 5 хв ЗФР з 0,05% Tween-20.

Місця зв'язування кон'югованих із пероксидазою антитіл із досліджуваними білками виявляли за допомогою хемілюмінесценції, викликаній інкубуванням нітроцелюлозної мембрани протягом 1 хв у буфері для детекції, що містив 1,25 мМ люмінолу (5-аміно-2,3-дигідро-1,4-фталазиндіон, (Sigma), 2,72 мМ кумаринову кислоту (4-гід-

роксицинамінова кислота, (Sigma) і 0,01% пероксиду водню в 0,1 М Tris-HCl (pH 8,5). Оброблені таким способом мембрани експонували протягом 1–10 хв із рентгенівською плівкою (Fujifilm, Японія). Плівку поміщали у стандартний фенідон-гідрохіноновий проявник і фіксували кислим фіксажем. Імунореактивні зони з'являлися у вигляді темних смуг на рентгенівській плівці. Нормалізацію кількості нанесення білка у зразках проводили стосовно рівня β -актину в тих же зразках.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

На першому етапі роботи ми вивчили вплив ландоміцину Е на клітинний цикл пухлинних клітин. Модельною лінією тут слугували клітини лінії Jurkat Т-лейкозу людини, що виявилися одними з найбільш чутливих до дії даного антибіотика [9]. Протипухлинний препарат доксорубіцин, що належить до близькоспорідненої групи антрациклінових антибіотиків і вже тривалий час використовується в клініці, було використано як позитивний контроль. Раніше нами було показано, що, незважаючи на близьку хімічну структуру доксорубіцину і ландоміцину Е, останній не має ДНК-тропних властивостей [2]. Саме тому було доцільно порівняти наслідки впливу цих сполук на клітинний цикл злоякісних клітин. Відомо, що доксорубіцин інгібує проліферацію клітин-мішеней у G2/M-фазі клітинного циклу [11], тоді як відомостей про особливості дії ландоміцинів на клітинний цикл не було знайдено.

На рис. 1 наведено результати проточної цитофлуориметрії Т-клітин лінії Jurkat, оброблених ландоміцином Е у різних концентраціях і доксорубіцином. Як видно з рисунка, доксорубіцин (0,5 мкМ) призводить до зупинки понад 40% клітин у фазі G2/M клітинного циклу, тоді як ландоміцин Е (0,5 мкМ) діє по-іншому, блокує ці клітини у фазі G1 (55% клітин). При зростанні діючої концентрації ландоміцину Е кількість клітин, заблокованих у стадії G1, знижується й одночасно зростає відсоток апоптичних (пре-G1) клітин.

Кількісна обробка результатів цитофлуориметрії наведена в табл. 1.

Вивчення ультраструктури хроматину й морфології клітин лінії HeLa карциноми шийки матки людини, оброблених ландоміцином Е у різних концентраціях, показали, що за дії цього антибіотика зростає кількість клітин, зупинених у стадії телофази мітозу й цитокінезу, що підтверджує наші результати проточної цитофлуориметрії (рис. 2).

Для дослідження молекулярних механізмів, задіяних у G1-інгібіторній активності ландоміцину Е, було проведено вестерн-блот аналіз із використанням специфічних антитіл до цілого ряду білків клітинного циклу – p21, p27, циклінів D1, D3, кіназ CDK6 та фосфорильованої по 15 залишку тирозину форми кінази cdc2 (pCdc2 (Tyr 15)). Як видно з рис. 3, за дії ландоміцину Е суттєво зростає внутрішньоклітинний вміст білка p27, який належить до родини інгібіторних білків циклінзалежних кіназ і перешкоджає активації циклін Е-CDK2 та циклін D-CDK4 комплексів [18]. Також нами виявлено зростання вмісту білка p21, який разом із білком p27 зупиняє ріст клітин в G1-фазі клітинного циклу. Додатковим підтвердженням цього явища є зростання рівня фосфорильованої кінази pCdc2 (Tyr 15), що має місце при зупинці клітин у G1-фазі.

Важливо зазначити, що попередня обробка N-ацетилцистеїном (NAC, блокатор активних сполук кисню) клітин лінії Jurkat за 30 хв до додавання ландоміцину Е суттєво зменшувала рівень експресії білків p27, p21 та pCdc2 (Tyr 15) (див. рис. 3). Це свідчить про те, що активні сполуки кисню можуть бути залучені в механізми антипроліферативної дії ландоміцину Е і що пригнічення їхньої продукції за допо-

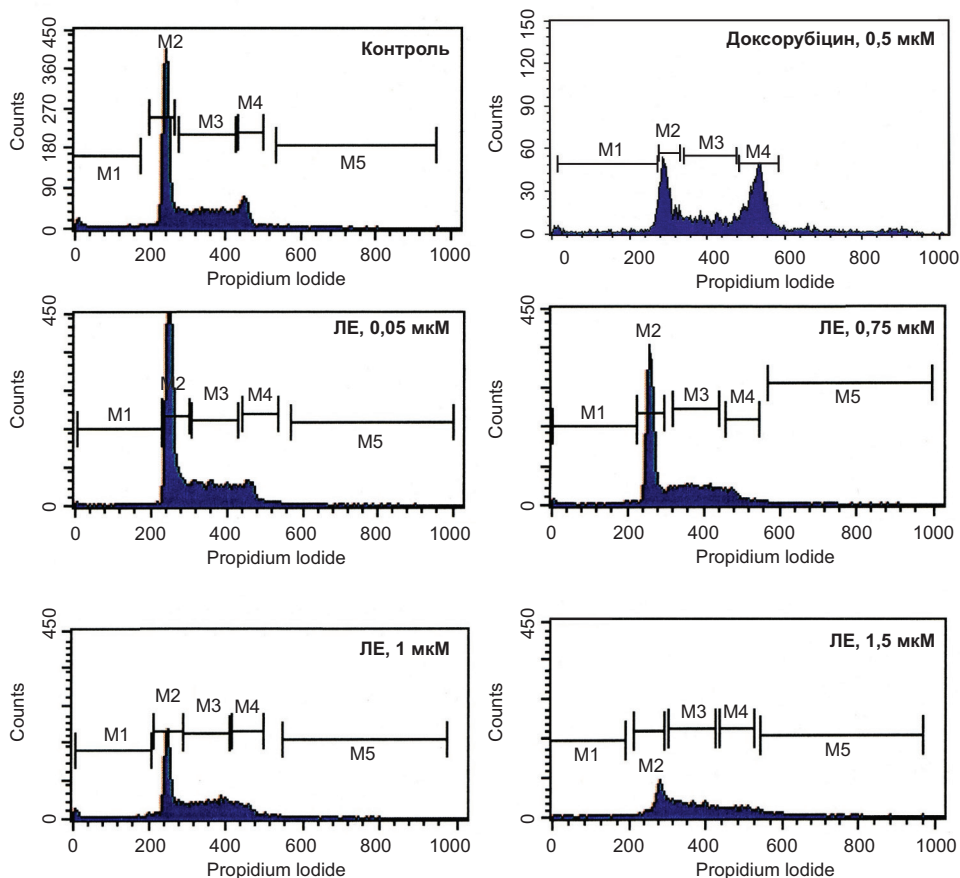


Рис. 1. Вплив ландоміцину Е на клітинний цикл лейкозних клітин. Проточна цитофлуориметрія: M1, M2, M3, M4 і M5 – різні популяції клітин: апоптичні клітини, стадії клітинного циклу G0/G1, S, G2/M, поліплоїдні клітини, відповідно

Fig. 1. Study of influence of landomycin E on cell cycle of leukemia cells. Flow cytometry – M1, M2, M3, M4-various cell populations: apoptotic cells, cell cycle stages G0/G1, S, G2/M, polyploid cells, correspondingly

могую NAC усуває G1-блок клітин, зумовлений цим антибіотиком.

На підставі отриманих результатів можна стверджувати, що ландоміцин Е, на відміну від доксорубіцину, зупиняє пухлинні клітини у G1-фазі клітинного циклу. У цьому процесі також беруть участь активні сполуки кисню і регуляторний білок p27 Kip1. G1-специфічність дії ландоміцину Е може мати важливе значення у хіміотерапії, оскільки злоякісні стовбурові клітини, які вважаються основною причиною рецидивів онкозахворювань, в основному перебувають у G0/G1 фазі клітинного циклу і тому є нечутливими до дії більшості протипухлинних препаратів [6]. Ландоміцин Е, який додатково пригнічує ріст клітин у G1-фазі клітинного циклу, може більш ефективно вбивати злоякісні стовбурові клітини, ніж інші антинеопластичні чинники, а отже, сприяти ефективнішому вилікуванню онкологічних хворих.

Наступним етапом дослідження було порівняти сигнальні шляхи індукції апоптозу, що активуються доксорубіцином і ландоміцином Е у лейкозних клітинах людини.

Таблиця 1. Результати кількісного аналізу цитофлуорометрії Т-клітинного лейкозу лінії Jurkat людини за дії ландоміцину Е і доксорубіцину

Table 1. Qualitative analysis of flow cytometry studies of T-leukemia cells of Jurkat line under action of landomycin E and doxorubicin

Варіант досліджу	Контроль	Доксорубіцин 0,5 мкМ	Ландоміцин Е, 0,5 мкМ	Ландоміцин Е, 0,75 мкМ	Ландоміцин Е, 1 мкМ	Ландоміцин Е, 1,5 мкМ
Пре-G ₁ (апоптичні клітини)	2,81	6,44	0,86	1,62	4,94	1,57
G ₀ /G ₁	45,19	24,16	62,07	49,91	38,56	25,38
S	35,41	18,25	24,58	32,09	37,81	40,70
G ₂ /M	10,77	36,91	7,95	8,68	15,05	18,44
Поліплоїдні клітини	0,97	1,34	0,52	0,95	1,89	5,60

Відомо, що протипухлинні препарати індують апоптоз двома основними шляхами, а саме за допомогою „рецепторів смерті” CD95 на поверхні клітини та ініціаторних каспаз-8, -10 (так званий рецептор-опосередкований шлях), або безпосередньо діючи на мітохондрії, що призводить до виходу з них цитохрому с в цитозоль, активації ініціаторної каспази-9 й активації ефекторних каспаз (рецептор-незалежний шлях) [6]. Окремі науковці виділяють ще один шлях індукції апоптозу за участю ендоплазматичного ретикулуму, що опосередковується каспазою-2 [19]. Раніше нами було показано, що ландоміцин Е індуює апоптоз значно швидше, ніж доксорубіцин (аналіз екстерналізації фосфатидилсерину (ранній маркер апоптозу) і гіперконденсації фрагментації ДНК) [14]. Завданням даної роботи було дослідити усі три шляхи індукції апоптозу й ідентифікувати ініціаторні проапоптичні білки, які активуються найраніше за дії ландоміцину Е і доксорубіцину. Узагальнену схему сигнальних шляхів апоптозу представлено на рис. 4. Усього нами було досліджено експресію 20-ти білків, задіяних у апоптозі.

На рис. 5 наведено рентгенограму, що свідчить про експресію білків, задіяних у термінальних стадіях апоптозу, індукваного ландоміцином Е. Виявлено, що активація ефекторної каспази-7 і розщеплення нею репараційного ензиму PARP-1 відбувається вже через 3 год після додавання ландоміцину Е до культурального середовища. Активація іншої ключової ефекторної каспази-3 за дії ландоміцину Е мала місце лише через 24 год і була незначною. Також не виявлено слідів розщеплення білка DFF45, який є безпосереднім білковим субстратом каспази-3. У той же час доксорубіцин викликав досить пізню активацію ефекторних каспаз-3,-7 і розщеплення ензимів PARP-1 та DFF45 через 12 год після його додавання до культурального середовища (рис. 6). Це вказує на те, що саме каспаза-7 повинна відігравати головну роль на термінальних стадіях ландоміцин Е-індукованого апоптозу.

Вивчення експресії ініціаторних апоптотичних білків за дії ландоміцину Е показало, що вони також активуються значно пізніше, ніж ефекторна каспаза-7 (рис. 7). Зокрема, ініціаторна прокаспаза-10, що бере участь у рецептор-опосередкованому апоптозі, активується лише через 9 год після дії ландоміцину Е, а прокаспаза-2 (задіяна у ендоплазматичний ретикулум-опосередкованому апоптозі) взагалі активується через 24 год. Прокаспаза-9 (мітохондріальний тип апоптозу) активується лише через 9 год після дії ландоміцину ЛЕ, а прокаспаза-8 та її субстрат-білок Від – через 12 год (рис. 7).

Для підтвердження отриманих даних було вивчено експресію ініціаторних апоптотичних білків за дії доксорубіцину (рис. 8). Встановлено, що найбільш ранньою подією у ланцюзі процесів апоптозу, індукованому доксорубіцином, є активація каспази-8 і каспази-9 через 9 год після дії цього антибіотика. Отже, ми робимо висновок, що доксорубіцин індукує пізній апоптоз, перші ознаки якого з'являються лише через 9 год, тоді як активація ефektorних каспаз-3, -7 має місце лише через 12 год.

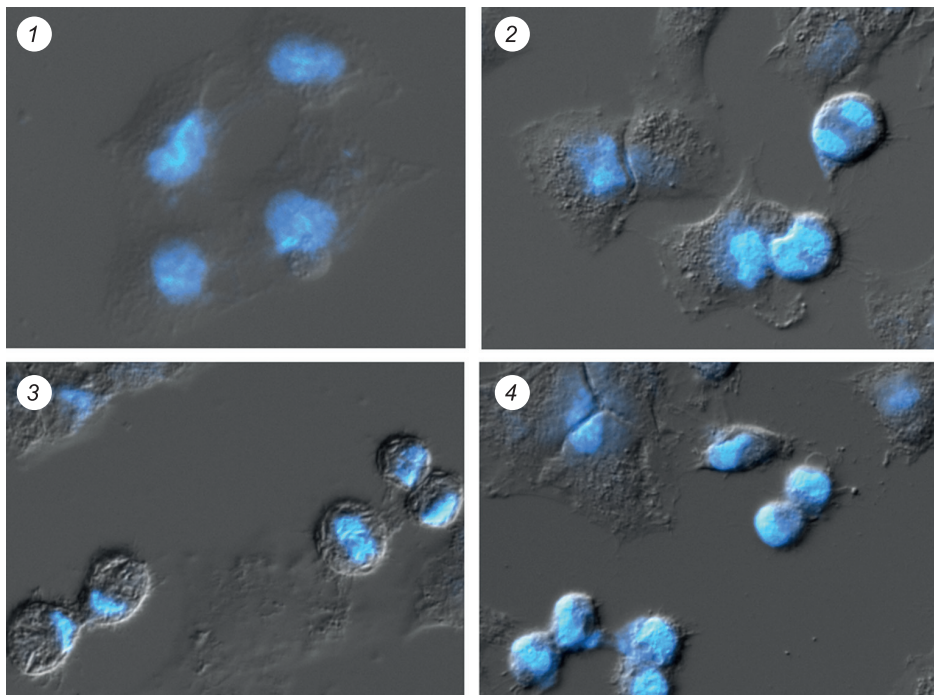


Рис. 2. Структура хроматину клітин лінії HeLa карциноми шийки матки за дії різних концентрацій ландоміцину Е (24 год, фарбування DAPI):
1 – контроль; 2 – ландоміцин Е, 0,5 мкМ; 3 – ландоміцин Е, 1 мкМ; 4 – ландоміцин Е, 2 мкМ

Fig. 2. Studies of chromatin structure of human cervix carcinoma cells of HeLa line under action of different concentrations of landomycin E (24 h, DAPI staining):

1 – control; 2 – landomycin E, 0,5 μM; 3 – landomycin E, 1 μM; 4 – landomycin E, 2 μM

Додатково було досліджено експресію антиапоптотичних білків родини Bcl-2 і проапоптотичного мітохондріального білка AIF, задіяного у каспазо-незалежному апоптозі (рис. 9). Показано, що ландоміцин Е не впливає на експресію антиапоптотичних білків, тоді як рівень AIF залишається стабільно високим, починаючи з 1 год дії цього антибіотика.

Отже, встановлено, що активація усіх відомих ініціаторних каспаз за дії ландоміцину Е відбувається значно пізніше, ніж активація ефektorної каспази-7. У літературі не описано явище подібної ранньої активації каспази-7 під час апоптозу, оскільки цей ензим завжди активується каспазами-8 чи -10, або каспазою-9, або іншою ефektorною каспазою-3. На підставі цих даних можна зробити висновок, що саме каспаза-7 є головною мішенню ландоміцину Е, що принципово відрізняє механізм дії даного антибіотика від механізму дії доксорубіцину. Ми вважаємо, що

сама активація каспази-7 є одним із можливих пояснень здатності ландоміцину Е долати набуту резистентність пухлинних клітин до хіміотерапії. Як відомо, більшість пухлинних клітин є дефектними щодо різних апоптичних білків, зокрема, каспази-8, каспази-3, білка Вах та ін. [4].

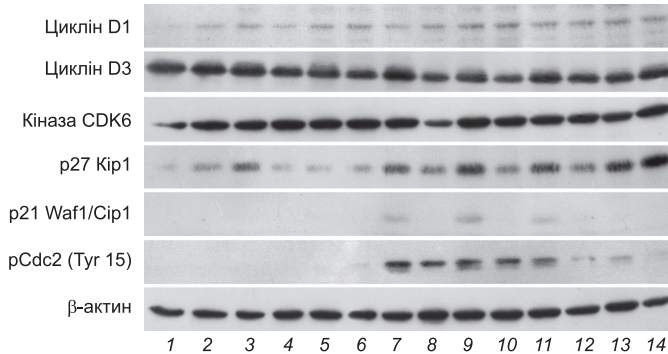


Рис. 3. Експресія регуляторних білків клітинного циклу в клітинах лінії Jurkat Т-лейкозу людини за дії ландоміцину Е (2 мкМ, 1–24 год):

1 – контроль; 2 – 1 мМ NAC; 3 – LE, 2 мкМ, 1 год; 4 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 1 год; 5 – LE 2 мкМ, 3 год; 6 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 3 год; 7 – LE, 2 мкМ, 6 год; 8 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 6 год; 9 – LE, 2 мкМ, 9 год; 10 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 9 год; 11 – LE, 2 мкМ, 12 год; 12 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 12 год; 13 – LE, 2 мкМ, 24 год; 14 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 24 год

Fig. 3. Expression of cell cycle regulatory proteins in Jurkat T-leukemia cells under action of landomycin E (2 μ M, 1–24 h):

1 – Control; 2 – 1 mM NAC; 3 – LE, 2 μ M, 1 h; 4 – 1 mM NAC, LE, 2 μ M, 1 h; 5 – LE, 2 μ M, 3 h; 6 – 1 mM NAC, LE, 2 μ M, 3 h; 7 – LE, 2 μ M, 6 h; 8 – 1 mM NAC, LE, 2 μ M, 6 h; 9 – LE, 2 μ M, 9 h; 10 – 1 mM NAC, LE, 2 μ M, 9 h; 11 – LE, 2 μ M, 12 h; 12 – 1 mM NAC, LE, 2 μ M, 12 h; 13 – LE, 2 μ M, 24 h; 14 – 1 mM NAC, LE, 2 μ M, 24 h

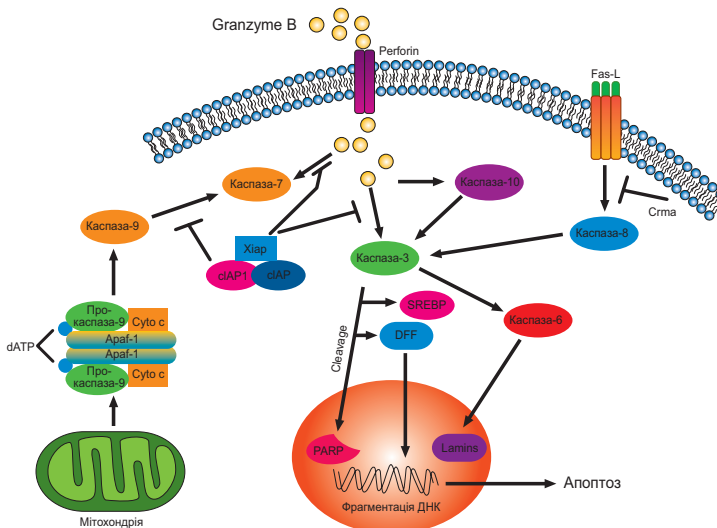


Рис. 4. Узагальнена схема апоптичних сигнальних шляхів, що індукуються протипухлинними препаратами й іншими екстремальними чинниками у злویкісних клітинах

Fig. 4. General scheme of apoptotic signaling pathways, which are induced by anticancer drugs and other extremal factors in tumor cells

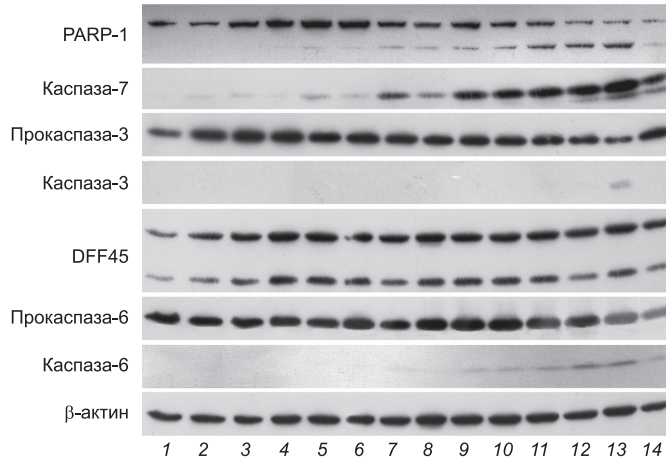


Рис. 5. Експресія ефektorних каспаз та їхніх білкових субстратів у клітинах лінії Jurkat Т-лейкозу людини за дії ландоміцину Е (2 мкМ, 1–24 год): 1 – контроль; 2 – 1 мМ NAC; 3 – LE, 2 мкМ, 1 год; 4 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 1 год; 5 – LE 2 мкМ, 3 год; 6 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 3 год; 7 – LE, 2 мкМ, 6 год; 8 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 6 год; 9 – LE, 2 мкМ, 9 год; 10 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 9 год; 11 – LE, 2 мкМ, 12 год; 12 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 12 год; 13 – LE, 2 мкМ, 24 год; 14 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 24 год

Fig. 5. Expression of effector caspases and their protein substrates in Jurkat T-leukemia cells under action of landomycin E (2 μM, 1–24 h): 1 – Control; 2 – 1 mM NAC; 3 – LE, 2 μM, 1 h; 4 – 1 mM NAC, LE, 2 μM, 1 h; 5 – LE, 2 μM, 3 h; 6 – 1 mM NAC, LE, 2 μM, 3 h; 7 – LE, 2 μM, 6 h; 8 – 1 mM NAC, LE, 2 μM, 6 h; 9 – LE, 2 μM, 9 h; 10 – 1 mM NAC, LE, 2 μM, 9 h; 11 – LE, 2 μM, 12 h; 12 – 1 mM NAC, LE, 2 μM, 12 h; 13 – LE, 2 μM, 24 h; 14 – 1 mM NAC, LE, 2 μM, 24 h

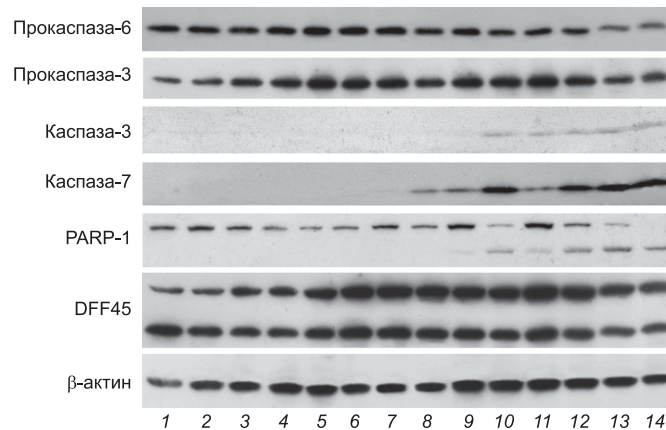


Рис. 6. Експресія ефektorних каспаз і їхніх білкових субстратів у клітинах лінії Jurkat Т-лейкозу людини за дії доксорубіцину (2 мкМ, 1–24 год): 1 – контроль; 2 – 1 мМ NAC; 3 – Dx, 2 мкМ, 1 год; 4 – 1 мМ NAC, Dx, 2 мкМ, 1 год; 5 – Dx 2 мкМ, 3 год; 6 – 1 мМ NAC, Dx, 2 мкМ, 3 год; 7 – Dx, 2 мкМ, 6 год; 8 – 1 мМ NAC, Dx, 2 мкМ, 6 год; 9 – Dx, 2 мкМ, 9 год; 10 – 1 мМ NAC, Dx, 2 мкМ, 9 год; 11 – Dx, 2 мкМ, 12 год; 12 – 1 мМ NAC, Dx, 2 мкМ, 12 год; 13 – Dx, 2 мкМ, 24 год; 14 – 1 мМ NAC, Dx, 2 мкМ, 24 год

Fig. 6. Expression of effector caspases and their protein substrates in Jurkat T-leukemia cells under action of doxorubicin (2 μM, 1–24 h): 1 – Control; 2 – 1 mM NAC; 3 – Dx, 2 μM, 1 h; 4 – 1 mM NAC, Dx, 2 μM, 1 h; 5 – Dx, 2 μM, 3 h; 6 – 1 mM NAC, Dx, 2 μM, 3 h; 7 – Dx, 2 μM, 6 h; 8 – 1 mM NAC, Dx, 2 μM, 6 h; 9 – Dx, 2 μM, 9 h; 10 – 1 mM NAC, Dx, 2 μM, 9 h; 11 – Dx, 2 μM, 12 h; 12 – 1 mM NAC, Dx, 2 μM, 12 h; 13 – Dx, 2 μM, 24 h; 14 – 1 mM NAC, Dx, 2 μM, 24 h

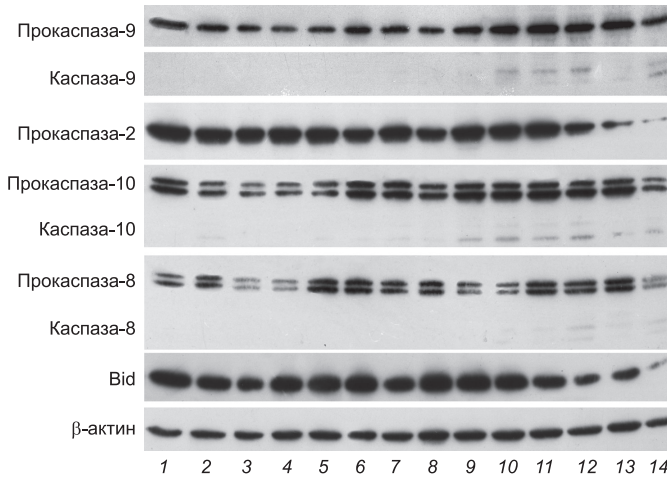


Рис. 7. Експресія ініціаторних каспаз і їхніх білкових субстратів у клітинах лінії Jurkat Т-лейкозу людини за дії ландоміцину Е (2 мкМ, 1–24 год): 1 – контроль; 2 – 1 мМ NAC; 3 – LE, 2 мкМ, 1 год; 4 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 1 год; 5 – LE 2 мкМ, 3 год; 6 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 3 год 7 – LE, 2 мкМ, 6 год; 8 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 6 год; 9 – LE, 2 мкМ, 9 год; 10 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 9 год; 11 – LE, 2 мкМ, 12 год; 12 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 12 год; 13 – LE, 2 мкМ, 24 год; 14 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 24 год

Fig. 7. Expression of initiator caspases and their protein substrates in Jurkat T-leukemia cells under action of landomycin E (2 μ M, 1–24 h): 1 – Control; 2 – 1 mM NAC; 3 – LE, 2 μ M, 1 h; 4 – 1 mM NAC, LE, 2 μ M, 1 h; 5 – LE, 2 μ M, 3 h; 6 – 1 mM NAC, LE, 2 μ M, 3 h; 7 – LE, 2 μ M, 6 h; 8 – 1 mM NAC, LE, 2 μ M, 6 h; 9 – LE, 2 μ M, 9 h; 10 – 1 mM NAC, LE, 2 μ M, 9 h; 11 – LE, 2 μ M, 12 h; 12 – 1 mM NAC, LE, 2 μ M, 12 h; 13 – LE, 2 μ M, 24 h; 14 – 1 mM NAC, LE, 2 μ M, 24 h

На рис. 10 наведено узагальнювальну схему сигнальних шляхів апоптозу, що індукуються ландоміцином Е у пухлинних клітинах.

Здатність ландоміцину Е викликати апоптоз безпосередньо за участі каспази-7 дає змогу цьому антибіотику ефективно вбивати злоякісні клітини навіть за відсутності інших ключових ензимів, таких як каспаза-3. Отже, враховуючи високий антинеопластичний потенціал і унікальний механізм дії ландоміцину Е, цей антибіотик може бути рекомендований як ефективний засіб другої лінії під час лікування онкологічних хворих. Очевидно, наведені результати досліджень *in vitro* є достатніми для допуску даної сполуки на другий етап випробування, а саме вивчення його терапевтичної дії *in vivo* на модельних пухлинах тварин.

ВИСНОВКИ

Ландоміцин Е, на відміну від доксорубіцину, викликає р27-опосередковану зупинку пухлинних клітин у G1-фазі клітинного циклу. У цьому процесі також задіяні активні форми кисню. За допомогою вестерн-блот аналізу ідентифіковано потенційну молекулярну мішень дії ландоміцину Е у пухлинних клітинах – ефекторну каспазу-7. Раніше у літературі не описано випадків, коли б ця каспаза безпосередньо активувалася протипухлинним препаратом. Такий унікальний механізм дії ландоміцину Е дає йому змогу ефективно вбивати злоякісні клітини навіть за відсутності інших ключових проапоптичних білків, наприклад, таких як каспаза-3.

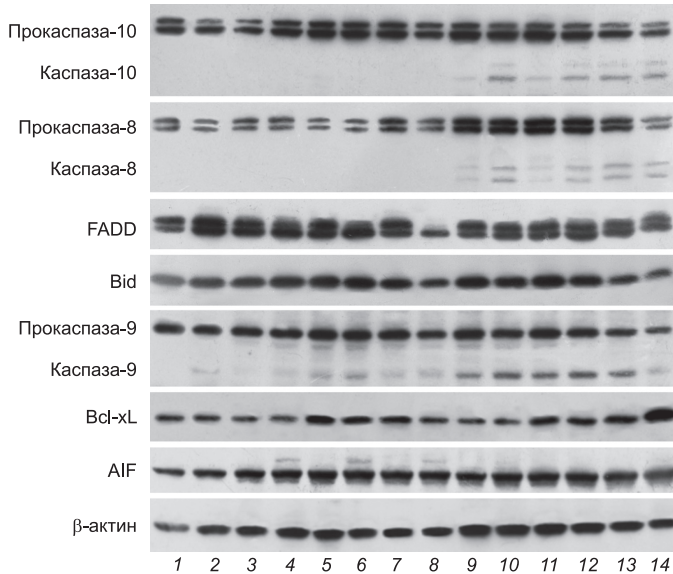


Рис. 8. Експресія ініціаторних каспаз і їхніх білкових субстратів у клітинах лінії Jurkat Т-лейкозу людини за дії доxorубіцину (2 мкМ, 1–24 год):

1 – контроль; 2 – 1 мМ NAC; 3 – Dх, 2 мкМ, 1 год; 4 – 1 мМ NAC, Dх, 2 мкМ, 1 год; 5 – Dх 2 мкМ, 3 год; 6 – 1 мМ NAC, Dх, 2 мкМ, 3 год; 7 – Dх, 2 мкМ, 6 год; 8 – 1 мМ NAC, Dх, 2 мкМ, 6 год; 9 – Dх, 2 мкМ, 9 год; 10 – 1 мМ NAC, Dх, 2 мкМ, 9 год; 11 – Dх, 2 мкМ, 12 год; 12 – 1 мМ NAC, Dх, 2 мкМ, 12 год; 13 – Dх, 2 мкМ, 24 год; 14 – 1 мМ NAC, Dх, 2 мкМ, 24 год

Fig. 8. Expression of initiator caspases and their protein substrates in Jurkat T-leukemia cells under action of doxorubicin (2 μM, 1–24 h):

1 – Control; 2 – 1 mM NAC; 3 – Dх, 2 μM, 1 h; 4 – 1 mM NAC, Dх, 2 μM, 1 h; 5 – Dх, 2 μM, 3 h; 6 – 1 mM NAC, Dх, 2 μM, 3 h; 7 – Dх, 2 μM, 6 h; 8 – 1 mM NAC, Dх, 2 μM, 6 h; 9 – Dх, 2 μM, 9 h; 10 – 1 mM NAC, Dх, 2 μM, 9 h; 11 – Dх, 2 μM, 12 h; 12 – 1 mM NAC, Dх, 2 μM, 12 h; 13 – Dх, 2 μM, 24 h; 14 – 1 mM NAC, Dх, 2 μM, 24 h

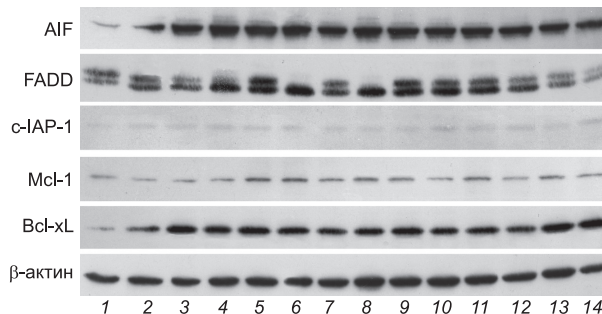


Рис. 9. Експресія антиапоптичних і проапоптичних білків мітохондрій клітин лінії Jurkat Т-лейкозу людини за дії ландоміцину Е (2 мкМ, 1–24 год):

1 – контроль; 2 – 1 мМ NAC; 3 – LE, 2 мкМ, 1 год; 4 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 1 год; 5 – LE 2 мкМ, 3 год; 6 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 3 год; 7 – LE, 2 мкМ, 6 год; 8 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 6 год; 9 – LE, 2 мкМ, 9 год; 10 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 9 год; 11 – LE, 2 мкМ, 12 год; 12 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 12 год; 13 – LE, 2 мкМ, 24 год; 14 – 1 мМ NAC, LE, 2 мкМ, 24 год

Fig. 9. Expression of antiapoptotic and proapoptotic mitochondrial proteins in Jurkat T-leukemia cells under action of landomycin E (2 μM, 1–24 h):

1 – Control; 2 – 1 mM NAC; 3 – LE, 2 μM, 1 h; 4 – 1 mM NAC, LE, 2 μM, 1 h; 5 – LE, 2 μM, 3 h; 6 – 1 mM NAC, LE, 2 μM, 3 h; 7 – LE, 2 μM, 6 h; 8 – 1 mM NAC, LE, 2 μM, 6 h; 9 – LE, 2 μM, 9 h; 10 – 1 mM NAC, LE, 2 μM, 9 h; 11 – LE, 2 μM, 12 h; 12 – 1 mM NAC, LE, 2 μM, 12 h; 13 – LE, 2 μM, 24 h; 14 – 1 mM NAC, LE, 2 μM, 24 h

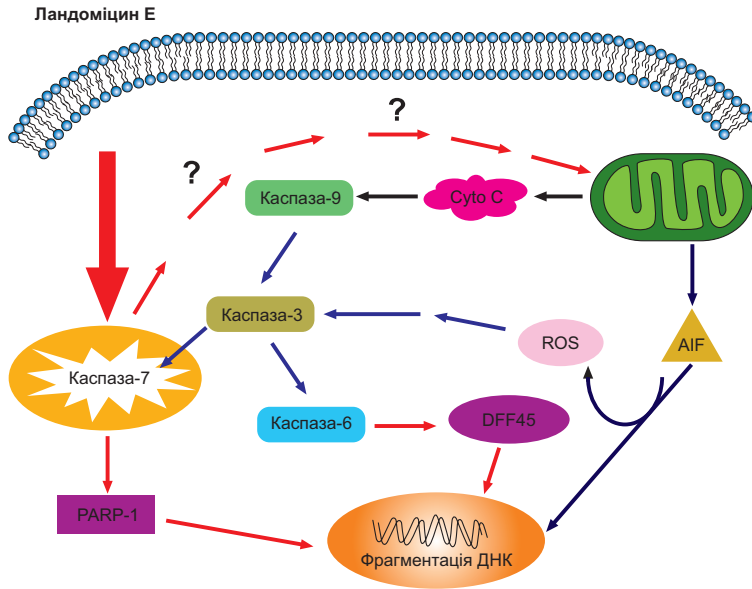


Рис. 10. Узагальнена схема сигнальних шляхів, які індукуються під час апоптозу за дії ландоміцину E у клітинах-мішенях

Fig. 10. General scheme of signaling apoptotic pathways, induced by landomycin E in target cells

ПОДЯКИ

Дана робота була частково підтримана грантами, наданим Р. Панчуку Західно-Українським Біомедичним Дослідницьким Центром (Україна–США) у 2008–2012 рр., та Державним Фондом Фундаментальних Досліджень у 2011 р. (в рамках Гранту Президента України для підтримки наукових досліджень молодих учених № Ф32-192/2011), а також Державним Агенством з питань науки, інновацій та інформатизації України у 2011–2012 рр. (українсько-австрійський науково-дослідний проект № M/577-2011).

1. Мацелюх Б.П., Лаверінчук В.Я. Одержання і характеристика мутантів *Streptomyces globisporus* 1912, дефектних по біосинтезу ландоміцину E. **Мікробіол журн**, 1999; 61: 22–27.
2. Панчук Р., Кориневська А., Остап Б. та ін. Дослідження механізмів дії ландоміцину E на клітини ссавців. **Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол**, 2004; 35: 54–59.
3. Поліщук Л.В., Ганусевич І.І., Мацелюх Б.П. Вивчення протипухлинної дії антибіотиків, що продукуються *Streptomyces globisporus* 1912, на моделі карциноми Герена щурів. **Мікробіол журн**, 1996; 58: 55–58.
4. Фільченков О.О., Стойка Р.С. **Апоптоз і рак: від теорії до практики**. Тернопіль: ТДМУ „Укрмедкнига”, 2006. – 524 с.
5. Henkel T., Rohr J., Beale J.M., Schwenen L. Landomycins, new angucycline antibiotics from *Streptomyces* sp. I. structural studies on landomycins A–D. **J. Antibiot**, 1990; 43: 492–503.
6. Kamohara Y., Haraguchi N., Mimori K. et al. The search for cancer stem cells in hepatocellular carcinoma. **Surgery**, 2008; 144(2): 119–124.
7. Kim R., Tanabe K., Uchida Y. et al. Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis. The contribution of molecular-level analysis to cancer chemotherapy. **Cancer Chemother Pharmacol**, 2002; 50(5): 343–352.

8. Korynevska A., Heffeter P., Matselyukh B. et al. Mechanisms underlying the anticancer activities of the angucycline landomycin E. **Biochem. Pharmacol.**, 2007; 74(12): 1713–1726.
9. Korynevska A.V., Matselyukh B.P., Stoika R.S. *In vitro* study of landomycin E antitumor activity. **Експеримент. онкологія**, 2003; 25: 98–105.
10. Laemmli U. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 1970; 227: 680–684.
11. Ling Y.H., el-Naggar A.K., Priebe W., Perez-Soler R. Cell cycle-dependent cytotoxicity, G2/M phase arrest, and disruption of p34cdc2/cyclin B1 activity induced by doxorubicin in synchronized P388 cells. **Mol. Pharmacol.**, 1996; 49(5): 832–841.
12. Luzhetskyy A., Zhu L., Gibson M. et al. Generation of novel landomycins M and O through targeted gene disruption. **Chembiochem**, 2005; 6(4): 675–678.
13. Newman D.J., Cragg G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Prod.**, 2007; 70(3): 461–477.
14. Panchuk R.R. Signaling pathways involved in apoptosis induced by novel angucycline antibiotic landomycin E in Jurkat T leukemia cells. **Biopolymers and Cell**, 2011; 27(2): 124–131.
15. Peterson G.L. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. **Anal. Biochemistry**, 1977; 83(2): 346–358.
16. Rohr J., Hertweck C. **Comprehensive Natural Products II—Chemistry and Biology**; Mander, L. and Liu, H.-W., Eds.; Elsevier: Oxford. 2010; 1: 227–303.
17. Rohr J., Thiericke R. Angucycline group antibiotics. **Nat. Prod. Rep.**, 1992; 9: 103–137.
18. Toyoshima H., Hunter T. p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-Cdk protein kinase activity, is related to p21. **Cell**, 1994; 15: 78(1): 67–74.
19. Vakifahmetoglu-Norberg H., Zhivotovsky B. The unpredictable caspase-2: what can it do? **Trends Cell Biol.**, 2010; 20(3): 150–159.
20. Warr M.R., Shore G.C. Small-molecule Bcl-2 antagonists as targeted therapy in oncology. **Curr. Oncol.**, 2008; 15(6): 256–261.
21. Zhukov N.V., Tjulandin S.A. Targeted therapy in the treatment of solid tumors: practice contradicts theory. **Biochemistry (Mosc)**, 2008; 73(5): 605–618.

SEARCH FOR AND IDENTIFICATION OF MOLECULAR TARGETS OF ANGUICYCLINE ANTIBIOTIC LANDOMYCIN E IN HUMAN TUMOR CELLS

R. R. Panchuk¹, L. V. Lehka^{1,2}, B. P. Matselyukh³, I. Y. Kril⁴, R. S. Stoika^{1,2}

¹Institute of Cell Biology of NAS of Ukraine, 14–16, Drahomanov St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: rpanchuk@ukr.net

²Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine

³Zabolotny Institute of Microbiology and Virology of NAS of Ukraine
154, Zabolotnyi St., Kyiv 03680, Ukraine

⁴Danylo Halytsky Lviv National Medical University, 69, Pekarska St., Lviv 79010, Ukraine

Study of cellular and molecular mechanisms of anticancer activity of novel perspective angucycline antibiotic landomycin E was carried out. It was revealed that this compound uses mechanisms of apoptosis induction in tumor cells that differ from such mechanisms used by structurally related drug doxorubicin which is widely applied in clinics. In particular, landomycin E blocks cells in G1 phase of cell cycle, and this action is mediated by the reactive oxygen species. Such G1-specificity of landomycin E action can be of great importance in chemotherapy, since it is known that cancer stem cells which are responsible for recurrent tumors, are staying mainly in G0/G1 phase, and, thus, are insensitive to most anticancer drugs. Application of Western-blot analysis for studying potential intracellular targets of the landomycin E action allowed identifying procaspase-7 as a targeted effector apoptotic protein. There are no other cases of direct

activation of this enzyme by the anticancer drugs described in literature till now. Thus, such a unique mechanism of anticancer activity might allow landomycin E to kill tumor cells effectively even in the absence of other key enzymes involved in apoptosis, such as caspase-3. Taking into consideration high antineoplastic potential of landomycin E and unique mechanism of its action, this antibiotic could be recommended as anticancer drug of second line defense at treatment of cancer patients.

Keywords: anticancer drugs, tumor drug resistance, landomycin E, apoptosis, cell cycle.

ПОИСК И ИДЕНТИФИКАЦИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МИШЕНЕЙ ДЕЙСТВИЯ АНГУЦИКЛИНОВОГО АНТИБИОТИКА ЛАНДОМИЦИНА E В ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Р. Р. Панчук¹, Л. В. Легкая^{1,2}, Б. П. Мацелюх³, И. Й. Криль⁴, Р. С. Стойка^{1,2}

¹Институт биологии клетки НАН Украины, ул. Драгоманова 14–16, Львов 79005, Украина
e-mail: rpanchuk@ukr.net

²Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина

³Институт микробиологии и вирусологии им. Д. К. Заболотного НАНУ
ул. Заболотного, 154, Киев МСП03680, Украина

⁴Львовский национальный медицинский университет им. Данила Галицкого
ул. Пекарская, 69, Львов 79010, Украина

Проведенные нами исследования клеточных и молекулярных механизмов действия нового перспективного ангуциклинового антибиотика ландомицина E показали, что это соединение использует другие механизмы индукции апоптоза опухолевых клеток по сравнению со структурно подобным известным противоопухолевым препаратом доксорубицином. В частности, ландоминин E останавливает клетки в фазе G1 клеточного цикла, и это действие опосредуется активными соединениями кислорода. Такая G1-специфичность действия ландомицина E может иметь важное значение в химиотерапии, поскольку злокачественные стволовые клетки, которые считаются главной причиной рецидивов онкозаболевания, в основном находятся в G0/G1 фазе и потому являются нечувствительными к большинству противоопухолевых препаратов. В данной работе с помощью Вестерн-блот анализа мы идентифицировали потенциальную внутриклеточную белковую мишень ландомицина E – эффекторный апоптотический фермент каспазу-7. В литературе не описаны случаи непосредственной активации каспазы-7 противоопухолевыми препаратами. Поэтому этот уникальный механизм позволяет ландомицину E эффективно убивать злокачественные клетки даже при отсутствии других ключевых ферментов реализации программы апоптоза, таких как каспаза-3. Следовательно, учитывая достаточно высокий антинеопластический потенциал и уникальный механизм действия ландомицина E, этот антибиотик можно рекомендовать как противоопухолевое средство второй линии в лечении онкологических больных.

Ключевые слова: противоопухолевые препараты, резистентность опухолей к лекарствам, ландоминин E, апоптоз, клеточный цикл.

Одержано: 01.02.2012