

Н.П. Аментьева, С.С. Шушанов

RHAMM (рецептор гиалуронан опосредованной подвижности)-таргет пептиды индуцируют апоптоз клеток рака предстательной железы

НИИ канцерогенеза РОНЦ им.Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Исследован эффект RHAMM (рецептор гиалуронан опосредованной подвижности)-таргет пептидов на жизнеспособность, апоптоз и некроз клеток рака предстательной железы (PC3m-LN4). RHAMM-таргет пептиды подавляли на 90 % жизнеспособность клеток PC3m-LN4 при концентрации 10 мкг/мл (2×10^{-7} М) в течение 48 час, стимулировали апоптоз и ингибировали некроз опухолевых клеток. RHAMM-таргет пептиды не оказывали влияния на фибробласты (неопухолевые клетки и RHAMM^{-/-}). Выявлено также, что RHAMM-таргет пептиды увеличивали активность каспаз-3/7 в опухолевых клетках.

Ключевые слова: RHAMM (рецептор гиалуронан-опосредованной подвижности), RHAMM-таргет пептиды, апоптоз, некроз, рак

Несмотря на многочисленные достижения в лечении онкологических заболеваний, рак предстательной железы (РПЖ) остается второй ведущей причиной смерти у мужчин в мире. Следовательно, по-прежнему, необходимы более эффективные терапевтические подходы для улучшения лечения этого заболевания.

Известно, что большое значение в прогрессии рака имеет микроокружение опухолевой клетки, а именно, внеклеточный матрикс [2,20]. Полисахариды и белки внеклеточного матрикса играют важную роль в перерождении нормальной клетки в раковую и в дальнейшей прогрессии ракового заболевания [1,3]. Во многих опухолях гиалуроновая кислота (ГК) составляет основную часть внеклеточного матрикса [13,16] и вовлечена в процессы миграции клеток, деления, ангиогенеза, воспаления, заживления ран и опухолевого роста [9,10]. Функция ГК зависит от молекулярной массы этого полисахарида. Высокомолекулярная ГК отвечает за структурные функции, в то время как низкомолекулярная ГК, связываясь с гиалуроновыми рецепторами (RHAMM, CD44), передает сигналы через клеточные пути, которые контролируют пролиферацию, дифференцировку, адгезию, подвижность и инвазивность опухолевых клеток [4,14,18,19].

ГК является физиологическим лигандом RHAMM рецептора (также известным как CD168

или HMMR, рецептор гиалуронан опосредованной подвижности). На модельных системах опухолей было показано, что RHAMM рецептор содержит центр связывания ГК, тубулина и особые области, необходимые для проявления его онкогенных свойств [7]. Установлено, что повышенный синтез ГК наблюдается при таких заболеваниях как артрит, диабет и рак [14]. ГК играет важную роль в прогрессировании и прогнозе рака простаты через RHAMM-опосредованные сигнальные пути. В ряде работ показано, что в тканях и метастазах опухолей предстательной железы наблюдаются повышенные уровни ГК и RHAMM рецептора, которые совместно с HYAL-1 гиалуронидазой способствуют росту опухоли и связаны с плохим прогнозом [11,13]. Поэтому ГК и RHAMM рецептор являются перспективными мишенями для разработки лекарственных препаратов с целью лечения онкологических заболеваний, и, в частности, РПЖ.

В ряде работ показано, что RHAMM является иммуногенным антигеном при острой и хронической лейкемии, раке молочной железы и участвует в совместном сигнальном пути с а рецептором андрогенов в раке простаты [5,9,19]. RHAMM рецептор используется для иммунотерапии; например, вакцинация с помощью RHAMM-R3 пептида применялась при острой миелоидной лейкемии, миелодиспластическом синдроме и множественной миеломе [15]. Кроме того, блокирование центра связывания ГК на RHAMM рецепторе и модуляция его функции могут препятствовать развитию опухоли. Так, было показано, что 4-метилумбеллиферон (пищевая добавка и ингибитор ГК) является мощным апоптотическим реагентом с сильными антиинвазивными и антиангиогенными свойствами, направленными против клеток рака простаты [6]. Поэтому одним из перспективных методов лечения рака предстательной железы является разработка новых эффективных ингибиторов ГК, селективно блокирующих RHAMM рецептор и его сигнальные пути. Ранее RHAMM-таргет пептиды, специфично взаимодействующие с RHAMM рецептором, были идентифицированы и охарактеризованы [7,8]. Установлено, что RHAMM-таргет пептиды конкурируют за центр связывания с ГК, селективно связываются с ре-

комбинантным белком RHAMM, легко проникают внутрь опухолевых клеток и стабильны в сыворотке крови [8]. Однако, влияние RHAMM-таргет пептидов на опухолевые клетки рака предстательной железы исследовано не было.

В настоящей работе изучен эффект RHAMM-таргет пептидов на выживаемость, апоптоз и некроз клеточной культуры рака предстательной железы.

Материалы и методы

Линии клеток

Использованы три линии клеток: адгезивные клетки рака предстательной железы человека (PC3m-LN4), характеризующиеся повышенной экспрессией RHAMM рецептора, нормальные фибробласты мыши и фибробласты (RHAMM^{-/-}). Клеточные линии фибробластов (RHAMM^{-/-}) были получены, как описано ранее [19]. Способ культивирования: адгезивный в среде DMEM с 10% эмбриональной бычьей сывороткой при 37°C, 5% CO₂.

Синтез пептидов

RHAMM- таргет пептиды (EEDFGEEAEEEA= пептид 1; VEGEGEEGEEY= пептид № 2) были получены, как описано ранее [7,8].

Оценка жизнеспособности клеток флуоресцентным методом (AlamarBlue)

Данный метод основан на способности митохондриальных дегидрогеназ живых клеток превращать «синий», слабо флуоресцентный резазурин в «розовый», сильно флуоресцирующий резозурин. PC3m-LN4 клетки засеивали в 96-луночные планшеты по 1000 клеток в лунке в 200 мкл ростовой среды и выращивали клетки в течение 24 час в инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и 95% влажности. Затем в лунки добавляли 10 мкг / мл (2x10⁻⁷ М) RHAMM-таргет пептидов, а в контроль - равное количество фосфатно-солевого буфера и инкубировали в течение 24 час при 37°C. На каждую дозу препарата и контроль использовали не менее трех лунок. Затем добавляли 10 мкл AlamarBlue реагента непосредственно к клеткам в ростовую среду через 0,5; 3; 24 и 48 часов.

Интенсивность флуоресценции измеряли при 570/590 нм, используя флуоресцентный планшетник. Жизнеспособность клеток при действии RHAMM-таргет пептидов оценивалась сравнением флуоресценции в экспериментальных лунках с флуоресценцией в контрольных лунках. Все измерения дублировались три раза, и данные представлены как средние от трех повторных экспериментов.

Оценка эффекта RHAMM –таргет пептидов на апоптоз и некроз раковых клеток

Клетки рака предстательной железы (PC3m-LN4), нормальные клетки (фибробласты мыши) и фибробласты (RHAMM^{-/-}) высевали на плоскодонные 96-луночные планшеты при плотности 1000 клеток в лунке и клетки выращивали в течение 24 час в инкубаторе при 37 °C , 5% CO₂ и 95% влажности. Затем в лунки добавляли RHAMM-таргет пептиды (2x10⁻⁷ М), а в контроль добавляли равное количество фосфатно-солевого буфера и инкубировали в течение 24 час при 37 °C. Для количественной оценки апоптоза и некроза клеток использовали ELISA^{PLUS} Kit (Roche Diagnostic). Индукцию апоптоза и некроза с помощью пептидов определяли измерением гистоновых компонентов моно-, олигонуклеосом (гистоны H1 , H2A , H3 и H4), являющихся индикаторами апоптоза и некроза.

Оптическую плотность измеряли при 405/490 нм. Все измерения дублировались три раза, и данные представлены как средние от трех повторных экспериментов.

Определение активности каспаз-3/7 колориметрическим методом

Клетки рака предстательной железы человека (PC3m-LN4) засеивали с плотностью 1000 клеток в лунке в 24-луночные платы и инкубировали 24 часа в ростовой среде DMEM (Multicell) с 10% эмбриональной бычьей сывороткой. Затем RHAMM-таргет пептиды (2x10⁻⁷ М) добавляли к клеткам и инкубировали в течение 24 час при 37°C. В контрольные культуры добавляли обычную ростовую среду, содержащую 10% сыворотки. Для количественного измерения активности каспаз-3/7 был использован Caspase-3 Colorimetric Assay Kit (GenScript, USA). Активация каспаз-3/7 определялась измерением расщепления колориметрического субстрата, специфичного для каспаз-3/7 (DEVD-p-нитроанилид).

Измерение оптической плотности каждой лунки производилось с использованием многорядного счетчика Wallac 1420 (Perkin Elmer) при 405 нм. Данные представляются как средние от трех повторных экспериментов.

Статистическая обработка данных

Статистическая обработка всех полученных данных была выполнена с помощью компьютерной программы GraphPad Prism, One-Way ANOVA. Различия считались достоверными при p< 0,05.

Результаты и обсуждение

RHAMM-таргет пептиды ингибируют жизнеспособность клеток PC3m-LN4.

Измеряли эффект RHAMM-таргет пептидов на жизнеспособность клеток рака предстательной железы (PC3m-LN4), для которых характерна повышенная экспрессия RHAMM рецептора (Oncogen). Чтобы понять, могут ли RHAMM-таргет пептиды ингибировать рост раковых клеток, клетки PC3m-LN4 обрабатывались пептидами при низкой концентрации 10 мкг / мл (2x10⁻⁷ М) в течение 0,5; 3; 24 и 48 час. Деление клеток анализировалось с помощью резазурина (AlamarBlue реагент), как описано в « Методиках исследования». Результаты показали, что оба пептида ингибировали жизнеспособность опухолевой клеточной культуры во времени (рис. 1). Это свидетельствует о том, что RHAMM-таргет пептиды значительно ингибируют активность митохондриальных дегидрогеназ клетки.

Инкубация с пептидами в течение 48 час подавляла жизнеспособность PC3m-LN4 клеток на ~ 90 % (рис.2).

Следует подчеркнуть, что жизнеспособность клеточных культур рака предстательной железы значительно подавлялась низкими концентрациями RHAMM-таргет пептидов (2x10⁻⁷ М), что указывает на то, что RHAMM-таргет пептиды являются перспективными кандидатами в качестве противоопухолевых препаратов.

RHAMM-таргет пептиды модулируют апоптоз и некроз раковых клеток предстательной железы.

Так как жизнеспособность клеток значительно подавлялась RHAMM-таргет пептидами, было

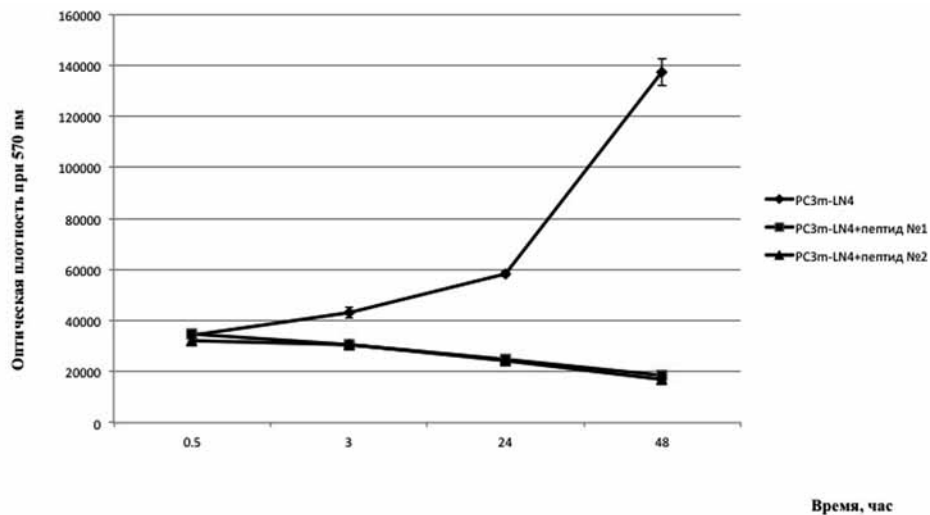


Рис. 1. Эффект RHAMM-таргет пептидов на жизнеспособность клеток рака простаты (PC3m-LN4) во времени

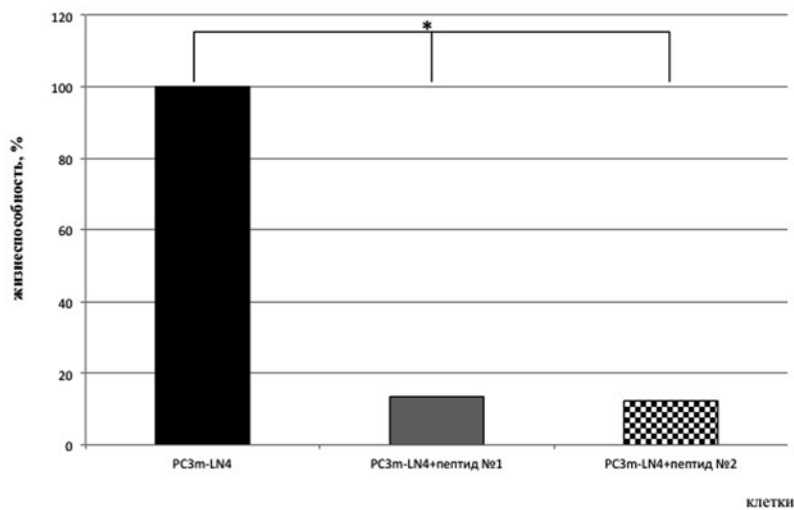


Рис. 2. Ингибирующий эффект RHAMM-таргет пептидов на жизнеспособность PC3m-LN4 клеток через 48 час.

важно классифицировать, какой тип гибели наблюдался в клетках PC3m-LN4. Необработанные пептидами клетки показали небольшой уровень апоптоза, поскольку каждая экспоненциально растущая клеточная культура содержит некоторое количество мертвых клеток (в норме приблизительно 3 %) вследствие спонтанной дифференциации и взросления клеточной линии. В то же время обработка клеток пептидами показала, что RHAMM-таргет пептиды (2×10^{-7} M) увеличивали уровень апоптоза в раковых клетках, примерно, в 2 раза (табл.1).

Эти результаты указывают на то, что RHAMM-таргет пептиды вовлечены в апоптозные пути, которые индуцируют потерю энергии и ингибирование работы мембранных насосов клетки.

При исследовании эффекта пептидов на некроз PC3m-LN4 клеток выявлено, что оба пептида значительно ингибировали некротическую

гибель опухолевых клеток (приблизительно, в 4 раза), табл. 1. Следует отметить, что поведение RHAMM-таргет пептидов сходно с PARP-ингибиторами, которые стимулируют апоптоз клеток, и в то же время ингибируют некроз опухолевых клеток, через ингибирование фермента PARP (poly-ADP-ribose polymerase) [17]. Как известно, ингибирование некроза является хемо-профилактической стратегией при лечении онкологических заболеваний [12].

Для подтверждения специфичности действия пептидов на опухолевые клетки, изучали влияние RHAMM-таргет пептидов на апоптоз и некроз в нормальных фибробластах и фибробластах (RHAMM^{-/-}). Результаты показали, что RHAMM-таргет пептиды не оказывали значительного эффекта на апоптоз и некроз нормальных клеток. Оба пептида также практически не оказывали влияния на апоптоз и некроз (RHAMM^{-/-}) клеток, табл.1.

Таблица 1.
Эффект RHAMM-таргет пептидов на апоптоз и некроз клеточной линии PC3m-LN4, фибробластов и (RHAMM^{-/-}) клеток.

Тип клеток	Апоптоз (оптическая плотность при 405 нм, ед.)	Некроз (оптическая плотность при 405 нм, ед.)
PC3m-LN4	2,113	2,104
PC3m-LN4+пептид №1	3,440	0,545
PC3m-LN4+пептид №2	3,661	0,655
Фибробласты	0,644	2,429
Фибробласты+пептид №1	0,644	2,211
Фибробласты+пептид №2	0,645	2,259
Фибробласты (RHAMM ^{-/-})	0,217	0,927
Фибробласты (RHAMM ^{-/-})+ пептид №1.	0,199	0,829
Фибробласты (RHAMM ^{-/-})+ пептид №2.	0,209	0,765

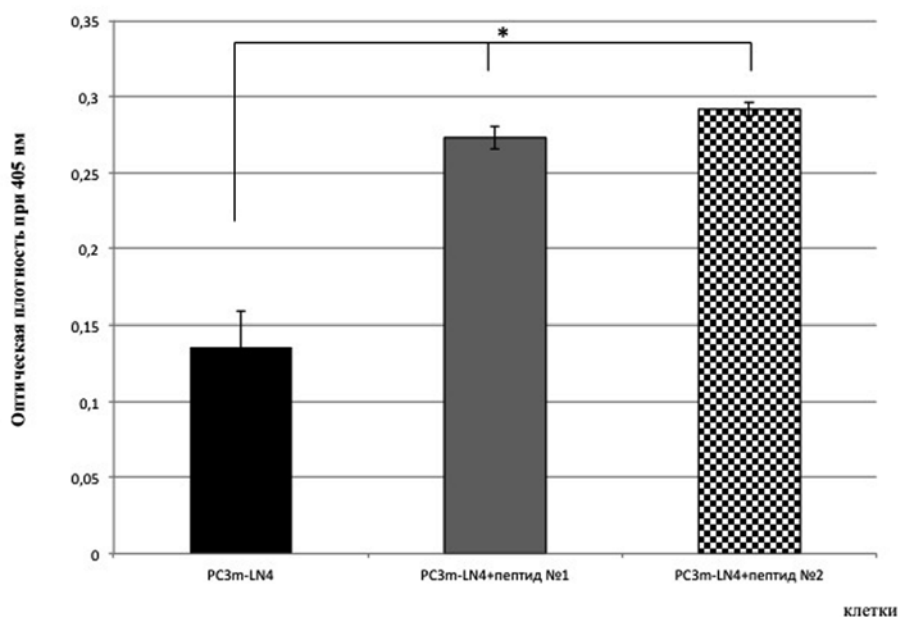


Рис. 3. Индукция активности каспаз-3/7 посредством RHAMM-таргет пептидов в клетках рака простаты (PC3m-LN4).

Эти результаты подтверждают, что эффект RHAMM-таргет пептидов является специфичным для опухолевых клеток и RHAMM-опосредованным. В целом, полученные данные показали, что низкие концентрации RHAMM-таргет пептидов (2×10^{-7} М) селективно индуцируют гибель клеток рака предстательной железы.

Влияние RHAMM-таргет пептидов на активность каспаз-3/7.

Поскольку пептиды стимулировали апоптоз раковых клеток, исследовалось влияние

RHAMM-таргет пептидов на активность каспаз-3/7 в PC3m-LN4 клетках. К клеткам добавляли RHAMM-таргет пептиды (2×10^{-7} М) и инкубировали в течение 24 час. Затем активность каспаз-3/7 измеряли методом расщепления меченого субстрата DEVD – р-нитроанилида. Результаты показали, что активность каспаз-3/7 увеличилась примерно в 2 раза в клетках, обработанных пептидами, по сравнению с контрольными необработанными клетками (рис.3).

Эти данные подтверждают участие каспаз-3/7 в индукции апоптоза в опухолевых клетках РС3m-LN4. Таким образом, наши результаты показывают, что RHAMM-таргет пептиды ингибируют жизнеспособность, некроз и индуцируют апоптоз клеток рака предстательной железы. Эти данные позволяют предположить, что RHAMM-таргет пептиды являются перспективными кандидатами для терапии рака предстательной железы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Becker-Weimann S., Xiong G., Furuta S. et al. NFkB disrupts tissue polarity in 3D by preventing integration of microenvironmental signals // *Oncotarget*. - 2013. - Vol. 4. - No. 11. - P. 2010-2020.
2. Bhat R, Bissell MJ. Of plasticity and specificity: dialectics of the micro- and macro-environment and the organ phenotype // *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*. - 2014. - Vol. 3. - No. 2. - P. 147-163.
3. Brownfield D.G., Venugopalan G., Lo A. et al. Patterned collagen fibers orient branching mammary epithelium through distinct signaling modules // *Curr Biol*. - 2013. - Vol. 23. - No. 8. - P. 703-709.
4. Dicker K.T., Gurski L.A., Pradhan-Bhatt S. et al. Hyaluronan: a simple polysaccharide with diverse biological functions // *Acta Biomater*. - 2014. - Vol. 10. - No. 4. - P. 1558-1570.
5. Lin S.L., Chang D., Chiang A., and Ying S. Androgen receptor regulates CD168 expression and signaling in prostate cancer // *Carcinogenesis*. - 2008. - Vol. 29. - P. 282-290.
6. Lokeshwar V.B., Lopez L.E. et al. Antitumor activity of hyaluronic acid synthesis inhibitor 4-Methylumbelliferone in prostate cancer cells // *Cancer Res*. - 2010. - Vol. 70. - P. 2613-2623.
7. Luyt L.G., Turley E.A., Esguerra K.V. Rhamm binding peptides // *International Patent WO2011/150495*. - London Health Sciences Centre Research Inc. - 2011.
8. Mde V., Els-Heindl S., Beck-Sickinger A.G. Automated solid-phase peptide synthesis to obtain therapeutic peptides // *Beilstein J. Org. Chem*. - 2014. - Vol. 10. - P. 1197-1212.
9. Misra S, Hascall VC, Markwald RR, Ghatak S. Interactions between hyaluronan and its receptors (CD44, RHAMM) regulate the activities of inflammation and cancer // *Front Immunol*. - 2015. - Vol. 6. - P. 201-210.
10. Nagy N., Kuipers H.F., Frymoyer A.R. et al. 4-methylumbelliferone treatment and hyaluronan inhibition as a therapeutic strategy in inflammation, autoimmunity, and cancer // *Front Immunol*. - 2015. - Vol. 6. - P. 123-133.
11. Nikitovic D., Tzardi M., Berdiaki A. et al. Cancer microenvironment and inflammation: role of hyaluronan. // *Front Immunol*. - 2015. - Vol. 6. - P. 169-179.
12. Panda P.K., Mukhopadhyay S., Das D.N. Mechanism of autophagic regulation in carcinogenesis and cancer therapeutics // *Semin. Cell Dev. Biol*. - 2015. - Vol. 39. - P. 43-55.
13. Rizzardi A.E., Vogel R.I., Koopmeiners J.S. et al. Elevated hyaluronan and hyaluronan-mediated motility receptor are associated with biochemical failure in patients with intermediate-grade prostate tumors // *Cancer*. - 2014. - Vol. 120. - No.12. - P. 1800-1809.
14. Stivarou T., Patsavoudi E. Extracellular molecules involved in cancer cell invasion // *Cancers (Basel)*. - 2015. - Vol. 7. - No. 1. - P. 238-265.
15. Tabarkiewicz J, Giannopoulos K. Definition of a target for immunotherapy and results of the first Peptide vaccination study in chronic lymphocytic leukemia // *Transplant Proc*. - 2010. - Vol. 42. - No. 8. - P. 3293-3296.
16. Tammi R.H., Kultti A., Kosma V.M. et al. Hyaluronan in human tumors: pathobiological and prognostic messages from cell-associated and stromal hyaluronan // *Semin. Cancer Biol*. - 2008. - Vol. 18. - P. 288-295.
17. Tangutoori S., Baldwin P., Sridhar S. PARP inhibitors: A new era of targeted therapy // *Maturitas*. - 2015. - Vol. 81. - No.1. - P. 5-9.
18. Tolg C., Hamilton S. J., Morningstar L. et al. RHAMM promotes interphase microtubule instability and mitotic spindle integrity through MEK1/ERK1, 2 activity // *J. Biol. Chem*. - 2010. - Vol. 285. - P. 26461-26474.
19. Tolg C., Hamilton S.R., Nakrieko K.A. et al. Rhamm-/- fibroblasts are defective in CD44-mediated ERK1,2 mitogenic signaling, leading to defective skin wound repair // *J. Cell Biol*. - 2006. - Vol. 175. - P. 1017-1028.
20. Zhang P., Lo A., Huang Y. et al. Identification of genetic loci that control mammary tumor susceptibility through the host microenvironment // *Sci. Rep*. - 2015. - Vol. 5. - P. 8919.

Поступила в редакцию 10.06.2015 г.

N.P.Akentieva, S.S.Shushanov

RHAMM (receptor hyaluronan-mediated motility)-target peptides induce apoptosis in prostate cancer cells

Research Institute of Cancerogenesis,
N.N.Blokhin Russian Cancer Research Center
Moscow

In this work the effect of RHAMM (receptor hyaluronan-mediated motility)-target peptides was investigated on the viability, apoptosis and necrosis of prostate cancer cells (PC3m-LN4). It has been established that RHAMM-target peptides inhibited on 90 % cell viability of PC3m-LN4 cells at a concentration of 10 ug / ml (2×10^{-7} M) for 48 h. It has shown that RHAMM-target peptides induced apoptosis and inhibited necrosis of tumor cells. RHAMM-target peptide had no effect on fibroblasts (non-tumor cells) and fibroblasts (RHAMM-/-). The studies also revealed that RHAMM-target peptides enhanced activity of caspase-3/7 in cancer cells.

Key words: RHAMM (receptor hyaluronan-mediated motility), RHAMM-target peptides, apoptosis, necrosis, cancer