

Эффективность и механизм противоопухолевой активности липоплексов кардиолипиноподобного липида и гена тимидинкиназы HSV – tk в присутствии ганцикловира

А.А. Московцев ¹, А.А. Соколовская ¹, М.Я. Ибрагимова ², А.Н. Дойникова ²,
Ю.Л. Себякин ³, Р.И. Жданов ^{1,2}

¹ НИИ общей патологии и патофизиологии РАМН, Москва

² Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань

³ Московский государственный университет тонких химических технологий, Москва

Efficiency and mechanism of antitumor activity of cardiolipin-like lipid/thymidine kinase gene HSV-tk lipoplexes in the presence of gancyclovir

A.A. Moskovtsev ¹, A.A. Sokolovskaya ¹, M.Ya. Ibragimova ², A.N. Dojnikova ², U.L. Sebyakin ³, R.I. Zhdanov ^{1,2}

¹ SRI General Pathology and Pathophysiology of RAMS, Moscow

² Kazan (Volga region) Federal University, Kazan

³ Moscow State University of Fine Chemical Technology, Moscow

Система тимидинкиназы вируса простого герпеса/ганцикловир (HSV-tk/GCV) исследована в составе липоплексов на основе дикатионного кардиолипиноподобного липида КДЛ-I. Она предложена в качестве невирусной системы для использования в протоколах генотерапии онкологических заболеваний. Ранее на культурах опухолевых клеток MCF7 и HEC293 была показана эффективная трансфекция клеток этими бисамфилами. Невирусная система на основе липоплекса дикатионного КДЛ-I/HSV-tk и ганцикловира эффективно вызывает гибель опухолевых клеток с вовлечением ключевых стадий апоптоза. Деполаризация митохондриальной мембраны обнаружена также при использовании липоплексов дикатионного липида КДЛ-I в экспрессирующих тимидинкиназу клетках в ответ на ганцикловир и активацию фактора NF-kB. Предполагается раннее вовлечение митохондриального пути апоптоза также и в механизм действия «суицидальных» липоплексов дикатионного липида.

Ключевые слова: генотерапия, онкологические заболевания, апоптоз, дикатионные липиды, невирусные системы, ген тимидинкиназы вируса простого герпеса первого типа, ганцикловир.

В последние годы предпринимаются успешные попытки восстановить нормальное функциональное состояние ткани при патогенезе методами генной терапии [1–4]. Возрастающее внимание уделяется использованию в протоколах генотерапии невирусных систем трансфекции, которые, по сравнению с вирусными системами, не имеют жестких ограничений размера генетических конструкций [5–9]. В частности, при первом использовании невирусного переноса генов *in vivo* у человека с помощью липосом DC-Chol: DOPE с геном HLA B7 у всех исследуемых пациентов с меланомой была обнаружена экспрессия этого гена [10]. Недостатком всех невирусных методов переноса генов является непродолжительное время экспрессии, невысокая эффективность, ограниченная эндосомно-лизосомальной деградацией, а также отсутствие тканеспецифичности [5, 8].

The herpes simplex virus thymidine kinase/gancyclovir (HSV-tk/GCV) system is studied as cytotoxic lipoplex based on cardiolipin-like dicationic lipid CDL-I. It is proposed to be used as nonviral gene transfer system in cancer gene therapy protocols. An efficient transfection of MCF7 and HEC293 cell lines with this lipoplex was earlier demonstrated. Non-viral system based on the CDL-I/HSV-tk lipoplex and gancyclovir treatment causes efficiently death of tumor cells with an involvement of apoptosis key stages. It was proved that depolarization of mitochondrial membrane and increased level of NF-kB transcription factor take place as a response to CDL-I / HSV-tk lipoplex action followed by gancyclovir treatment. It suggests an early involvement of apoptosis mitochondrial way to an action of this certain «suicide» system, delivered using dicationic lipid.

Key words: cancer gene therapy, apoptosis, dicationic lipids, non-viral of gene transfer systems, «suicide» herpes simplex virus thymidine kinase gene system, gancyclovir, NF-kB transcription factor.

Среди клеточных реакций, участвующих в ингибировании опухолеобразования, одной из наиболее изучаемых и важных клеточной реакцией в настоящее время является апоптоз [11]. Система тимидинкиназы вируса простого герпеса первого типа / ганцикловир (HSV-tk/GCV) («suicide gene»), применяемая в ряде клинических протоколов генной терапии, способна запускать в клетках опухоли процессы, приводящие к их гибели, среди которых важное место занимает апоптоз [12–17]. Целью работы является оценка эффективности и исследование механизма противоопухолевого действия нового липоплекса на основе дикатионного кардиолипиноподобного липида КДЛ-I и плазмиды pUT649, кодирующей ген HSV-tk, после применения ганцикловира на линиях опухолевых клеток по сравнению с липоплексами на основе монокатионных липидов.

e-mail: zrenad@gmail.com

Материал и методы

Кардиолипиноподобный дикатионный липид КДЛ-I синтезирован, как описано ранее [18], и его строение подтверждено совокупностью данных элементного анализа, ^1H -ЯМР- и ИК-спектроскопии, а также масс-спектрометрии. Структура кардиолипиноподобного липида — КДЛ-I ($m = 3$) приведена в нашей предыдущей работе [19].

Культуры клеток. Исследования проводились *in vitro* на культурах клеток MCF-7 и HEK293. Клетки получены из Российской коллекции культур клеток позвоночных (Институт цитологии РАН). Все клетки паспортизованы, прошли контроль видовой специфичности (во всех случаях проведен кариотипический анализ) и контроль контаминации (бактерии, грибы и микопlasма не обнаружены) [17]. Клетки культивировали на среде DMEM с 10% FBS (GibcoTM Invitrogen Corporation) в атмосфере 5% CO_2 . MCF-7 и HEK293 снимали с культуральных матрасов и пересаживали в 96-луночную плашку с исходной плотностью 104 клетки на лунку в ростовую среду [7].

Трансфекция. Через 24 ч культуру клеток (96-луночная плашка, плотность 104 клетки/лунку, DMEM и 10% FBS) промывали бессывороточной средой и добавляли липоплексы в бессывороточной среде. Клетки инкубировали 6 часов при 37°C и 5% CO_2 , затем среду заменяли на полную ростовую. Для трансфекции использовали липоплексы на основе кардиолипиноподобного дикатионного липида КДЛ-I и плазмиды pUT649 с геном тимидинкиназы HSV-tk (Cayla, ZI Montaudran — BP4437, France), полученные как описано ранее [17].

В качестве контроля в исследованиях трансфекции использовали Lipofectin® Reagent (смесь катионных липидов DOTMA и DOPE, w/w 1:1, Invitrogen Corporation, U.S.A.). Для индукции гибели трансфицированных HSV-tk позитивных клеток добавляли противовирусный препарат ганцикловир. Селекцию трансфицированных клеток проводили с помощью антибиотика Zeocin (Cayla, France — InVivoGen, USA.) с постепенным увеличением его концентрации до 100 мкг/мл. Продолжительность селекции была в среднем 3,5 нед.

Регистрация экспрессии гена HSV-tk клетками методом RT-PCR. На первом этапе из клеток MCF-7 и HEK293 выделяли тотальную РНК (наборы «MBI Fermentas», Вильнюс, Литва). Экспрессия мРНК гена HSV-tk тимидинкиназы вируса простого герпеса первого типа была подтверждена с помощью RT-PCR с применением пары праймеров (sense: 5' GCTGCTTGCAATACGGTGCG-3'; antisense: 5' CGCAGATCGTCGGTATGGAGCC-3').

Получение и цифровой анализ видеоизображений флуоресцентной и конфокальной микроскопии. Статическую, цейтраферную микросъемку производили на флуоресцентном микроскопе Zeiss Axioskop 20 с помощью видеосистемы на базе цветной интегрирующей 3-х матричной (3CCD) камеры Sony, видеозахват и оцифровку — с помощью фреймграббера Matrox Meteor [7]. Конфокальную лазерную сканирующую микроскопию выполняли на инвертированном микроскопе Nikon Eclipse TE 2000, оснащенном контрастом Хоффмана и конфокальным модулем C1 с лазерами 488 и 543 нм. Для цифровой обработки изображений использовалось программное обеспечение KS100 (Zeiss), MS Office 2010, Ulead Media

Studio, Image Pro Plus (Media Cybernetics), для трехмерной реконструкции — EZ-C1 v2.30 (Nikon). Детекция деполяризации митохондриальной мембраны производилась с помощью зонда JC-1 как описано ранее [20, 21].

Активация фактора транскрипции NF-kB (p65). Определение активации транскрипционного фактора NF-kB (p65) в ответ на действие системы HSV-tk производили с помощью методики и тест-системы NoShift Transcription Factor Assay Kit (EMD Biosciences, Inc, an affiliate of Merck KGaA, Germany) как описано ранее [22]. Технология обеспечивает быструю и чувствительную детекцию транскрипционных факторов или других белков, связывающихся с ДНК и основан на колориметрии в планшете. Активированные ДНК-связывающие белки локализуются в ядре клеток, поэтому для анализа экстрагировали белки ядра клеток с помощью NucBuster Protein Extraction Kit (EMD Millipore Bioscience).

Статистическая обработка результатов производилась с помощью программного обеспечения Statistica ver.6.0 (StatSoft Inc, U.S.A.), а также Microsoft Excel. Использовались однофакторный дисперсионный анализ и критерий Крускала-Уоллиса. Различия считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Цитотоксическое действие комплекса «КДЛ-I — pUT649/GCV». Цитотоксическое действие комплекса «КДЛ-I — pUT649/GCV» спустя 48 ч. после добавления в среду культивации ганцикловира было зарегистрировано нами с помощью МТТ-теста. Оно заключалось в существенном уменьшении количества жизнеспособных клеток как MCF7, так и HEK293. Была отмечена корреляция концентрации ганцикловира с выраженностью цитотоксического эффекта: доля выживших клеток уменьшалась с увеличением GCV от 0,1 к 1,0 и до 5 мкг/мл: для MCF7 доля 42,03; 28,45; и 24,76%, и для HEK293 — 61,10; 35,23; и 29,01%. Высокий процент клеточной гибели (до 75% для MCF7 и до 71% для HEK293) на фоне сравнительно невысокой эффективности трансфекции, возможно, обусловлен так называемым эффектом летального соседства (bystander effect), характерным для «суицидной» системы HSV-tk/GCV [13, 16].

Экспрессия мРНК тимидинкиназы вируса простого герпеса первого типа. Селекция трансфицированных pUT649 клеток с целью обогащения популяции HSV-tk -положительными клетками стала возможна благодаря тому, что продукт экспрессии представляет собой рекомбинантный белок — тимидинкиназу, конъюгированную с продуктом экспрессии Sh ble гена (375 п.о.) — небольшим белком — Sh ble protein (м.м. 13665 Да), обладающим высокой афинностью к антибиотикам флеомицинового ряда (в частности, Zeocin) и тем самым сообщаящим устойчивость трансфицированным клеткам. Экспрессия гена HSV-tk была подтверждена нами методом RT-PCR с применением пары праймеров: -sense: 5'GCTGCTTGCAATACGGTGCG3'; -antisense: 5'CGCAGATCGTCGGTATGGAGCC-3'. Для обеих культур клеток MCF7 и HEK293, трансфицированных геном HSV-tk, была зарегистрирована полоса на электрофореграмме размером 368 п.о. Это свидетельствует об экспрессии мРНК гена тимидинкиназы вируса простого герпеса первого типа (ее не было в контрольных клетках без HSV-tk/GCV).

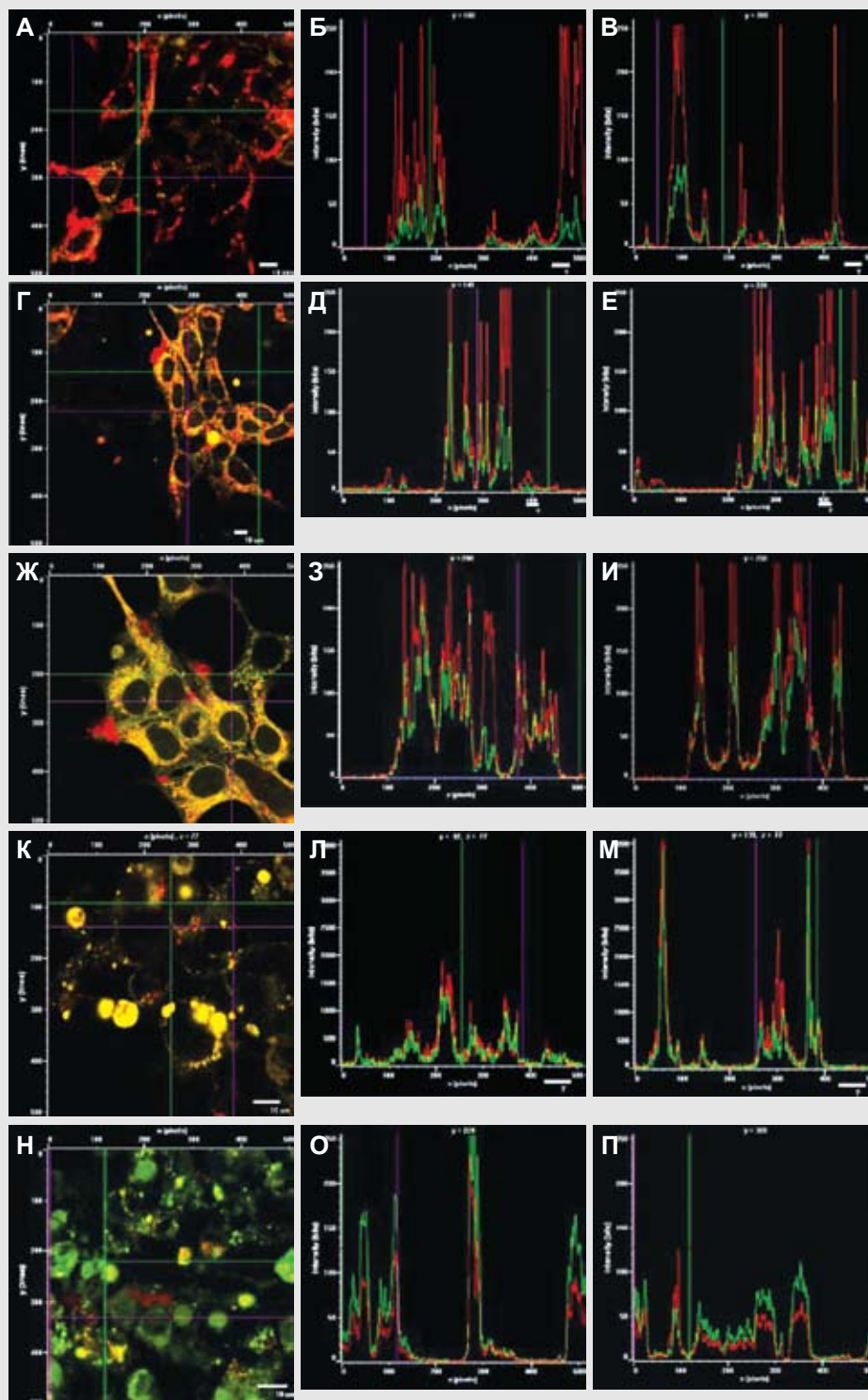


Рис. 1. HSV-tk-положительные (опыт) и HSV-tk-отрицательные клетки MCF7 через 6, 12 и 24 ч. после добавления в среду ганцикловира (GCV):
 А, Б, В – HSV-tk-отрицательные клетки (1 контроль), без GCV, 0 ч;
 Г, Д, Е) HSV-tk-отрицательные клетки (2 контроль), с GCV, 24 ч;
 Ж, З, И – HSV-tk-положительные клетки (опыт), с GCV, 6 ч;
 К, Л, М – HSV-tk-положительные клетки (опыт), с GCV, 12 ч;
 Н, О, П – HSV-tk-положительные клетки (опыт), с GCV, 24 ч.
 Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия.
 Гистограммы яркости соотношения красный/зеленый канал.
 Окраска потенциалазависимым, тропным к митохондриям красителем JC-1

Кинетика деполяризации митохондриальной мембраны при действии системы HSV-tk/GCV. Деполяризация митохондриальной мембраны свидетельствует о вовлечении митохондрий в индуцированный повреждением каскад клеточных реакций [22]. Для проверки, имеет ли она место в случае системы липоплекса дикатионного липида КДЛ-I/HSV-tk, а не только для липоплексов монокатионных липидов, использовали конфокальную лазерную сканирующую микроскопию клеток MCF7, прошедших селекцию как HSV-tk позитивных и обработанных ганцикловиром, так и контрольных, нетрансфицированных. Для детекции трансмембранного потенциала митохондриальной мембраны использовали флуоресцентный краситель JC-1, обладающий высоким сродством к митохондриям и способностью к спектральному сдвигу эмиссии с 527 нм в мономерной форме (зеленая флуоресценция) при снижении потенциала и деполяризации до 590 нм (оранжево-красная) при образовании J-агрегатов (рис. А–П). Полученные данные позволяют утверждать, что в ответ на действие системы дикатионного липида и гена HSV-tk в клетках MCF7 развивается деполяризация мито-

хондриальной мембраны, начиная с 6 часов после начала инкубации с ганцикловиром (рис. А–И). Из данных рисунка, а именно: значительного усиления зеленого окрашивания от поля К к полю Н — следует, что в ответ на действие системы HSV-tk в клетках MCF7 имеет место деполяризация митохондриальной мембраны спустя 24 ч после начала инкубации с ганцикловиром. Это говорит о вовлечении митохондриального каскада в цепь событий, являющихся реакцией клетки на действие системы HSV-tk/GCV.

Определение активации транскрипционного фактора NF-kB (p65). В клетках MCF7 при действии системы HSV-tk/GCV спустя 24 ч после добавления ганцикловира в среду культивации было обнаружено также повышение содержания фактора транскрипции NF-kB. Это определялось по увеличению оптической плотности (табл.). Первые 4 строки являются контролями: без ганцикловира отличий нет. В его присутствии содержание фактора NF-kB возрастает в 3–4 раза как в присутствии специфических и неспецифических полинуклеотидов, конкурентно взаимодействующих с фактором.

Таблица 1. Содержание транскрипционного фактора NF-kB при действии системы HSV-tk/GCV в культуре клеток MCF7 (по сравнению с контрольным воздействием H2O2), оптическая плотность, относит. единицы

Варианты опыта	Контроль	HSV-tk
Контроль, без обработок	0,1+0,05	0,23+0,07
30 мкМ H2O2, 90 мин	1,43+0,24	1,56+0,17
30 мкМ H2O2, 90 мин, ННКП эквимольно	1,55+0,30	1,42+0,30
30 мкМ H2O2, 90 мин, СНКП эквимольно	0,62+0,11	0,53+0,18
HSV-tk/GCV, 3 часа	0,27+0,11	0,87+0,15
HSV-tk/GCV, ННКП эквимольно	0,19+0,08	0,82+0,21
HSV-tk/GCV, СНКП эквимольно	0,08+0,05	0,34+0,18

Приложение: ННКП—неспецифическая нуклеотидная конкурентная последовательность, СНКП—специфическая к NF-kB нуклеотидная конкурентная последовательность.

Таким образом, обнаруженные клеточные ответы в виде деполяризации митохондриальной мембраны и активации NF-kB позволяют предположить комплексное действие системы HSV-tk/GCV, индуцирующее каскад реакций, ведущий к клеточной гибели. Помимо классического *p53*-опосредованного пути в ответ на повреждение ДНК, имеющего место при действии HSV-tk [12–16], можно предположить подключение дополнительных стимулов, например, связанных с возможным нарушением репарации ядерной ДНК, синтеза митохондриальной ДНК (ядерно-митохондриальное взаимодействие). Каждый из этих сигналов может быть подпороговым и недостаточным для принятия клеткой решения о самоубийстве, но интегральной суммы сигналов может хватить для исполнения апоптоза [17, 18]. С этой точки зрения повреждение ядерной ДНК может являться основной (но не единственной) причиной апоптоза. Известно, что транскрипционный фактор NF-kB влияет на регуляцию апоптоза

по нескольким механизмам [22]. Предполагается, что NF-kB кооперирует с *p53*, регулируя некоторые гены, необходимые для индукции апоптоза, в частности, рецептор клеточной смерти KILLER/DR5 [22]. Этот факт свидетельствует о неспецифическом модулировании этим транскрипционным фактором апоптотического каскада, так как значительное количество промоторов содержит сайты связывания с NF-kB.

Выводы

1. Предложенная новая невирусная система на основе дикатионного липида КДЛ-I, HSVtk и ганцикловира эффективно вызывает гибель опухолевых клеток с вовлечением ключевых стадий апоптоза.

2. В случае генного переноса липоплексом на основе дикатионного липида обнаружена деполяризация митохондриальной мембраны и повышенный уровень фактора NF-kB в экспрессирующих тимидинкиназу клетках в ответ на ганцикловир.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке грантов Института экспериментальной диагностики и терапии РОНЦ им. Н.Н. Блохина, Москва и Минобрнауки РФ (КФУ № 12-26; РФФИ 12-03-97089-р_поволжье_а). Авторы благодарят академика РАМН А.А. Кубатиева

за поддержку проекта и помощь в выполнении работы и профессора Д.Ю. Блохина (РОНЦ РАМН, Москва) – за помощь и обсуждение результатов. Дикатионный липид КДЛ-I синтезирован и охарактеризован в МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Москва под руководством профессора Ю.Л. Себякина.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Anderson W.F. Human gene therapy. Science 1992; 256: 808–13.
2. Lewis R. The Forever fix: Gene therapy and the boy who saved it. N.Y.: St. Martin's press; 2012.
3. Жданов Р.И., Семенова Н.В., Арчаков А.И. Реальности и надежды генной терапии. Специальный выпуск журнала «Вопросы мед. химии» под редакцией А.И. Арчакова и Р.И. Жданова, посвященный вопросам генного переноса и генотерапии. 2000; 3: 197–206.
4. Северин Е.С., Жданов Р.И., редакторы. Специальный выпуск журнала «Вопр. Биол. Мед. Фарм. Химии», посвященный проблемам генного переноса и генотерапии; 1999.
5. Жданов Р.И., Куценко Н.Г., Федченко В.И. Невирусные методы переноса генов в генной терапии. Вopr. Мед. Химии. 1997; 43 (1): 3–11.
6. Duzgunes N., Ilarduya C., Simoes S. et al. Cationic liposomes for gene delivery: novel cationic lipids and enhancement by proteins and peptides; Curr. Med. Chem. 2003; 10(14): 1213–20.
7. Zhdanov R.I., Bogdanenko E.V., Moskovtsev A.A. et al. Liposome-mediated gene delivery: dependence on lipid structure, glycolipid mediated targeting, and immunological properties. In: Duzgunes N., editor. Methods in Enzymol. Liposomes. Part C: Gene Transfer and Therapy. Elsevier; 2003; 373: 433–65.
8. Zhdanov R.I., Podobed O.V., Vlassov V.V. Cationic lipid-DNA complexes – lipoplexes-for gene transfer and therapy. Bioelectrochem. 2002; 58(1): 53–64.
9. Daniels A., Noor-Mahomed N., Singh M. et al. Cytofectin amine head group modification and degree of liposome pegylation: factors influencing gene transfer. Indian J. Pharm Sci. 2011; 73(4): 381–86.
10. Lasic D.D. Liposomes in gene delivery. Boca Raton: CRC Press; 1997.
11. Заридзе Д.Г. редактор. Канцерогенез. Москва: Медицина; 2004.
12. Tang Q., Zhang D., Wan M. et al. Experimental study of the RV-HSV-TK/GCV suicide gene therapy system in gastric cancer. Cancer Biother. Radiopharm. 2007; 22(6): 755–61.
13. Craperi D., Vicat J.M., Nissou M.F. et al. Increased bax expression is associated with cell death induced by gancyclovir in a herpes thymidine kinase gene-expressing glioma cell line. Hum. Gene Ther. 1999; 10(4): 679–88.
14. Huang Q., Pu P., Xia Z. et al. Exogenous wt-p53 enhances the antitumor effect of HSV-TK/GCV on C6 glioma cells. J Neurooncol. 2007; 82(3): 239–48.
15. Tang Y., Li J., Zhao S. et al. Killing effect of the herpes simplex virus thymidine kinase/ganciclovir enzyme/prodrug system on human nasopharyngeal carcinoma cells. J. Int. Med. Res. 2007; 35(4): 433–41.
16. Shibata M.A., Horiguchi T., Morimoto J. et al. Massive apoptotic cell death in chemically induced rat urinary bladder carcinomas following in situ HSVtk electrogene transfer. J. Gene Med. 2003; 5(3): 219–31.
17. Московцев А.А. Индукция гибели опухолевых клеток человека новой невирусной системой на основе дикатионных амфифилов, гена тимидинкиназы HVS-tk и ганцикловира [диссертация]. Москва: НИИОПП РАМН; 2007.
18. Полякова А.А., Панченкова И.А., Скрипникова М.А. и др. Мембранообразующие свойства димерных катионных амфифилов на основе L-глутаминовой кислоты. Биологические мембраны 2003; 20(2): 178–83.
19. Жданов Р.И., Московцев А.А., Блохин Д.Ю. и др. Генный перенос в опухолевые клетки с помощью новых комплексов кардиолипиноподобных дикатионных липидов и плазмидной ДНК. Клеточная Трансплантология и Тканевая Инженерия 2012; 7(3): в печати.
20. Smiley S.T., Reers M., Mottola-Hartshorn C. et al. Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. PNAS USA 1991; 88: 3671–75.
21. Соколовская А.А., Заботина Т.Н., Московцев А.А. и др. Характеристика методов детекции апоптоза и их использование в экспериментальной и клинической онкологии. Рос. Биотерап. Ж. 2003; 2 (3): 53–60.
22. Tergaonkar V., Pando M., Vafa O. et al. p53 stabilization is decreased upon NFκB activation: A role for NFκB in acquisition of resistance to chemotherapy. Cancer Cell. 2002; 1(5): 493–503.

Поступила 09.08.2012