



УЧАСТИЕ КАСПАЗ В КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ GD2-СПЕЦИФИЧНЫМИ АНТИТЕЛАМИ

© 2014 г. П. А. Вишнякова*, И. И. Доронин*, И. В. Холоденко*, **, Д. Ю. Рязанцев*,
И. М. Молотковская*, Р. В. Холоденко*., #

*ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской Академии Наук, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

**ФГБУ «Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича»
Российской академии медицинских наук, 119121, Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 8

Поступила в редакцию 23.10.2013 г.

Принята к печати 13.11.2013 г.

Изучен вклад основных каспаз в цитотоксические эффекты, вызываемые моноклональными антителами 14G2a, специфичными к опухолеассоциированному ганглиозиду GD2, в клетках мышечной лимфомы EL-4. Зарегистрирована конститутивная экспрессия генов прокаспаз в клетках EL-4. Так, инкубация клеток с антителами 14G2a не приводила к значимому увеличению синтеза прокаспаз, не усиливалась также их ферментативная активность, что было показано с использованием флуоресцентно-меченых субстратов каспаз. При одинаковом уровне клеточной гибели активность каспазы-3 и каспазы-9 в клетках, инкубированных с антителами 14G2a, в 7.5 и в 3 раза ниже, чем в клетках, обработанных стауроспорином. Общий ингибитор каспаз (Z-VAD-FMK), а также ингибитор каспазы-3, уменьшали цитотоксические эффекты, индуцированные антителами 14G2a, на 9–16% и 6–13% соответственно. В тех же условиях уровень апоптоза, индуцированного стауроспорином, падал на 55–65%. Ингибиторы инициаторных каспаз-8 и -9 не влияли на клеточную гибель, запускаемую антителами. Ингибиторный анализ показал также, что каспазы не участвуют в запуске первых этапов клеточной гибели, индуцированной антителами 14G2a, проявляющихся в уменьшении клеточного объема и в нарушении проницаемости плазматической мембраны. Таким образом, каспазы не играют ключевую роль в клеточной гибели, индуцированной антителами к GD2, их незначительная ферментативная активность не определяет механизм гибели клеток, опосредованной воздействием на опухолеассоциированный ганглиозид GD2.

Ключевые слова: GD2, опухолеассоциированные ганглиозиды, каспазы, клеточная гибель, апоптоз, моноклональные антитела.

DOI: 10.7868/S0132342314030154

ВВЕДЕНИЕ

Онкоассоциированный ганглиозид GD2 является маркером ряда онкологических заболеваний [1]. Этот сиалированный гликофинголипид гиперэкспрессируется на плазматической мембране

клеток таких опухолей, как нейробластома, глиома, меланома, мелкоклеточный рак легких, лимфома и ряде других. Современные подходы к лечению рака, основанные на применении новых вакцин [2], цитокинов [3], адресной доставки химиопрепаратов и siRNA в составе липосом [4] и наночастиц [5] к раковым клеткам, в терапии GD2-позитивных опухолей зачастую оказываются неэффективными. Ассоциированность ганглиозидов GD2 с опухолевыми клетками и ограниченная экспрессия на нетрансформированных клетках делает его привлекательной мишенью для противоопухолевой иммунотерапии с использованием GD2-специфических моноклональных антител (анти-GD2-мАт). Так, анти-GD2-мАт показали высокую эффективность при клинических испытаниях в лечении нейробластомы [6]. Основными механизмами действия анти-GD2-мАт считаются антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность и ком-

Сокращения: 7-AAD – 7-аминоактиномицин D; AVD – апоптоз-индуцированное уменьшение клеточного объема; FBS – сыворотка эмбрионов крупного рогатого скота; MTT – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид; FITC – Fluorescein Isothiocyanate, флуоресцеинизоотиоцианат; HEPES – 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этилсульфоновая кислота; PI – иодистый пропилий; siRNA – малые интерферирующие РНК; Z-VAD-FMK – общий ингибитор каспаз; Z-DEVD-FMK/AFC – ингибитор/субстрат каспазы-3; Z-IETD-FMK/AFC – ингибитор/субстрат каспазы-8; Z-LEHD-FMK/AFC – ингибитор/субстрат каспазы-9; анти-GD2-мАт – GD2-специфичные моноклональные антитела, PBS – забуференный физиологический раствор.

Автор для связи (тел.: +7 (495) 330-72-56, эл. почта: khol@mail.ru).

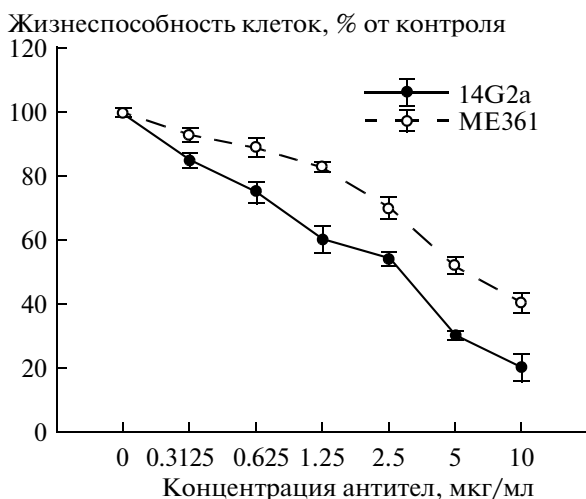


Рис. 1. Зависимость жизнеспособности клеток от концентрации анти-GD2-мАт в МТТ-тесте. Клетки EL-4 (5 тыс. кл./лунка) инкубировали с анти-GD2-мАт в течение 72 ч в 96-луночном планшете в ПС, содержащей 10% FBS. Каждая точка выполнена в трех повторях.

племент-зависимая цитотоксичность [7]. В то же время, в ряде работ была показана прямая цитотоксическая активность анти-GD2-мАт. Так, на различных GD2-позитивных опухолевых клетках, таких как нейробластома [8], мелкоклеточный рак легкого [9] и лимфома [10], показано, что анти-GD2-антитела индуцируют клеточную гибель без привлечения иммунных механизмов. Также на сингенной мышью модели перевиваемой опухоли EL-4 показаны противоопухолевые эффекты Fab-фрагментов анти-GD2-мАт [11], что говорит о возможности реализации *in vivo* гибели опухолевых клеток при непосредственном воздействии на онкоассоциированный маркер GD2, без участия системы комплемента и/или эффекторных клеток. В то же время, тип клеточной гибели, вызываемой анти-GD2-мАт, а также ее сигнальные пути, не ясны.

Каспазы – это семейство цистеиновых протеаз, которые специфически расщепляют белки после остатков аспарагиновой кислоты. Каспазы являются центральным звеном протеолитической системы, обеспечивающей запуск и проведение клеточной гибели, как правило, проходящей по механизму апоптоза, а сигнальные пути с их участием характеризуются как классические [12]. Каспазы принимают участие как в инициации гибели клетки, так и в ее реализации, выражающейся в расщеплении различных клеточных субстратов и приводящей к характерным морфологическим и биохимическим изменениям в клетке.

В настоящее время описано 14 каспаз, которые в той или иной степени участвуют в процессах

клеточной гибели [13], но ключевыми и наиболее изученными каспазами, определяющими классические механизмы апоптоза, являются каспазы-8, -9 и -3. Наиболее значимой инициаторной каспазой, приводящей к запуску рецепторопосредованного пути апоптоза, является каспаза-8. Митохондриальный путь апоптоза обычно опосредован активностью инициаторной каспазы-9. В обоих случаях ключевой эффекторной каспазой, приводящей к расщеплению клеточного субстрата, служит каспаза-3 [13]. Поскольку роль каспаз при развитии гибели клеток, обработанных антителами к ганглиозидам, не ясна, представлялось важным изучить роль инициаторных и эффекторных каспаз в клеточной гибели, индуцированной анти-GD2-мАт 14G2a, в клетках мышины лимфомы EL-4, гиперэкспрессирующей ганглиозид GD2.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы показали, что анти-GD2-мАт способны индуцировать сильные цитотоксические эффекты в клетках мышины лимфомы EL-4. Клетки данной линии являются удобной моделью для изучения прямого воздействия анти-GD2-мАт, поскольку для них характерна высокая и равномерная экспрессия ганглиозида GD2 [10].

На первом этапе работы мы выбрали оптимальное анти-GD2-мАт для проведения последующих экспериментов. Для этого были проведены сравнительные тесты цитотоксической активности анти-GD2-моноклональных антител: 14G2a и ME361. По результатам МТТ-теста получены графики зависимости жизнеспособности клеток EL-4 от концентрации антител 14G2a и ME361 (рис. 1). Как следует из рис. 1, оба антитела вызывают дозозависимое снижение жизнеспособности клеток EL-4, но антитела 14G2a имеют более выраженную цитотоксичность по сравнению с ME361. Снижение уровня жизнеспособности клеток при инкубации с максимальной использованной концентрацией (10 мкг/мл) анти-GD2-мАт 14G2a и ME361 составляет 80 и 60% соответственно.

Другим методом для сравнения цитотоксических эффектов анти-GD2-мАт был выбран PI-тест [14]. Мы исследовали временные зависимости изменения количества клеток с фрагментированной ДНК при действии антител на опухолевые клетки. Для этого клетки EL-4 инкубировали с антителами 14G2a и ME361 (5 мкг/мл) в течение 24, 48 и 72 ч. Как следует из диаграммы, представленной на рис. 2, процент гиподиплоидных клеток с течением времени возрастает. Через трое суток после инкубации клеток EL-4 с мАт 14G2a уровень их гибели составляет $67 \pm 6\%$, а для ME361 – $30 \pm 7\%$.

Таким образом, двумя методами было показано, что анти-GD2-мАт 14G2a и ME361 индуциру-

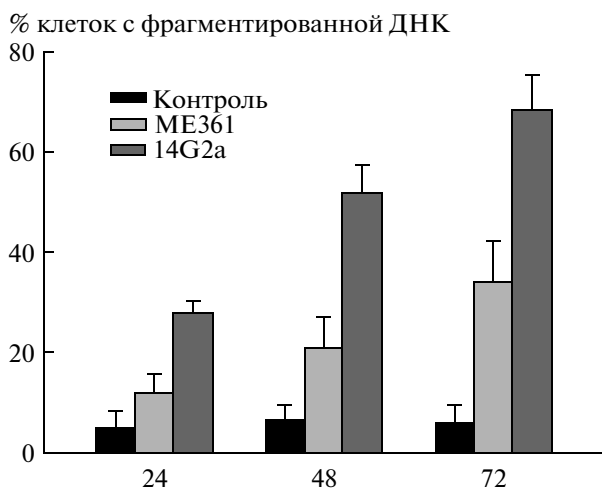


Рис. 2. Временная зависимость клеточной гибели в PI-тесте. Клетки EL-4 инкубировали с антителами 14G2a (5мкг/мл) и ME361 (5мкг/мл) в течение 24, 48 и 72 ч.

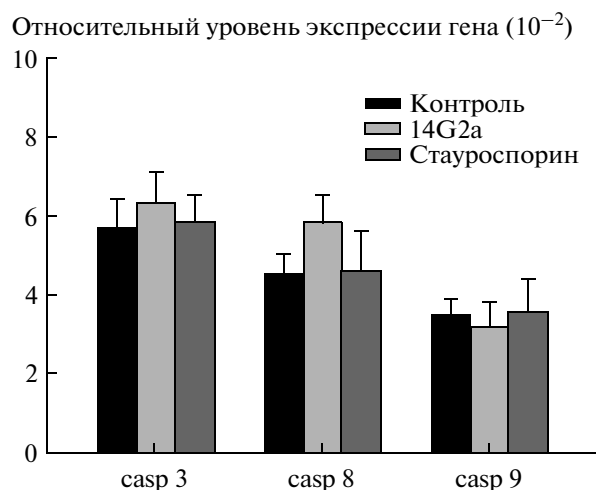


Рис. 3. Сравнение уровня экспрессии генов каспаз-3, -8, -9 в интактных клетках и в клетках, индуцированных антителами 14G2a (5мкг/мл) и стауроспорином (50 нМ) в течение 12 ч. Эффективность ПЦР – 85%.

ют клеточную гибель, но эффективность их действия различается – антитела 14G2a проявляют более высокую цитотоксическую активность и являются предпочтительными эффекторами при исследовании механизмов изучаемого процесса. Причины различий эффективности действия антител 14G2a и ME361 требуют дальнейшего исследования; возможно, они объясняются разной эффективностью связывания с ганглиозидом GD2 [15].

В следующей серии экспериментов с использованием метода ПЦР в реальном времени показано влияние выбранных анти-GD2-мАт 14G2a на уровень экспрессии генов прокаспаз-8, -9, -3 при индукции этим мАт гибели клеток линии EL-4. В качестве внутреннего контроля использован мышиный ген фермента гликолиза (глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа, GAPDH). Положительным контролем индукции клеточной гибели выбран стауроспорин – алкалоид, являющийся ингибитором протеинкиназ и запускающий каспазозависимый путь апоптоза [16]. В предварительных экспериментах (регистрация PI-методом) нами была подобрана оптимальная концентрация стауроспорина (50 нМ) таким образом, чтобы уровни клеточной гибели, индуцированной анти-GD2-мАт и стауроспорином, были сопоставимы и составляли 30–35% после 24 ч инкубации с клетками (данные не представлены). Из диаграмм, представленных на рис. 3, видно, что в контрольных клетках EL-4 присутствует конститутивная экспрессия исследуемых генов прокаспаз. При обработке клеток анти-GD2-мАт 14G2a (12-ч инкубация) происходит слабое достоверное повышение экспрессии гена каспазы-8. Достоверных изменений в экспрессии генов прокас-

паз-3 и -9 под действием антител 14G2a, а также влияния стауроспорина на индукцию генов прокаспаз в клетках EL-4 (рис. 3), как и в контрольных клетках, не наблюдалось (данные не представлены).

Для выяснения, приводит ли дополнительная индукция гена каспазы-8 при воздействии анти-GD2-мАт на клетки EL-4 к увеличению уровня прокаспазы-8, мы провели внутриклеточное окрашивание клеток антителами к этому маркеру с последующим анализом на проточном цитофлуориметре. Как следует из рис. 4, прокаспаз-8 синтезируется в интактных клетках, а индукция гибели клеток EL-4 при воздействии антител (инкубация 24 ч) не приводит к увеличению уровня экспрессии данного белка.

Таким образом, методами ПЦР и проточной цитофлуориметрии нами была показана конститутивная экспрессия генов прокаспаз-3, -8 и -9 и отсутствие увеличения уровня экспрессии белкового продукта – прокаспазы-8, что говорит о возможности быстрого проведения сигнала в случае его запуска по каспазозависимому пути. Конститутивная экспрессия прокаспаз характерна также и для ряда других опухолевых клеток [17]. Индукция клеток антителами 14G2a не вызвала изменения уровня экспрессии генов прокаспаз-3, -9, а усиление экспрессии гена прокаспазы-8 не привело к значимому увеличению уровня белкового продукта прокаспазы-8 относительно его уровня в интактных клетках EL-4.

Для прямого определения активности каспаз были использованы флуоресцентно-меченные субстраты каспазы-3 (Z-DEVD-AFC), каспазы-8 (Z-IETD-AFC) и каспазы-9 (Z-LEHD-AFC). Показано, что обработка клеток линии EL-4

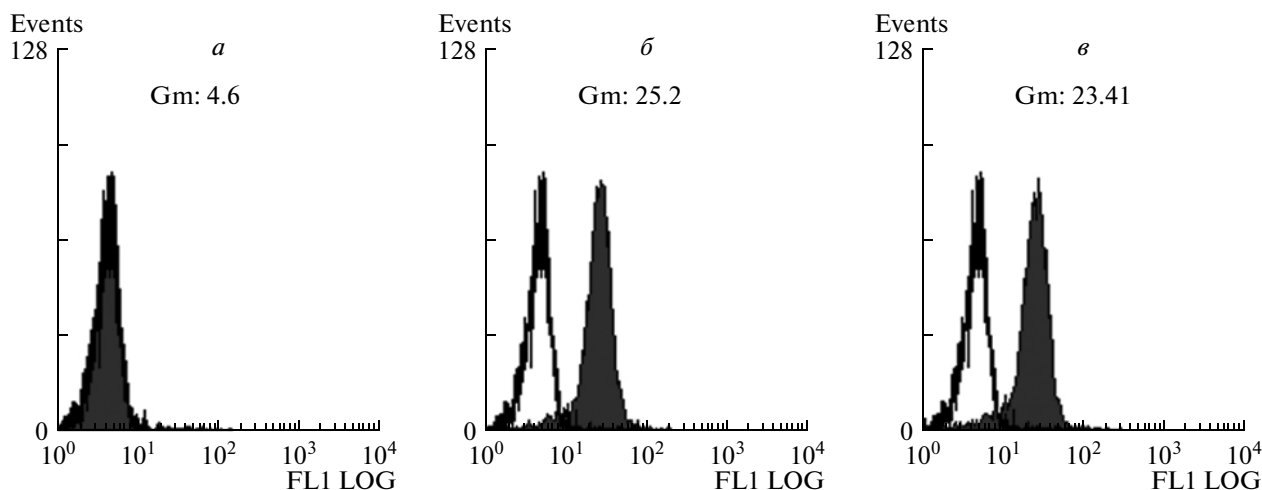


Рис. 4. Внутриклеточное окрашивание клеток EL-4 антителами к прокаспазе-8 после инкубации клеток с антителами 14G2a (5 мкг/мл) в течение 24 ч. *a* – контроль (окрашивание клеток антивидовыми FITC-мечеными антителами), *b* – интактные клетки, окрашенные антителами к прокаспазе-8, *v* – клетки, инкубированные с антителами 14G2a и окрашенные антителами к прокаспазе-8. Данные проточной цитофлуориметрии.

анти-GD2-мАт (24 ч) приводит лишь к незначительной активации тестируемых каспаз (рис. 5). В случае индукции клеток стауроспорином наблюдалось существенное усиление флуоресценции субстратов каспаз-3 и -9. Активность каспаз-3 и -9 была в 7.5 и в 3 раза соответственно ниже в клетках, инкубированных с антителами 14G2a, чем в клетках, индуцированных стауроспорином (рис. 5).

Известно, что при развитии апоптоза с участием каспазы-3 происходит активация ДНКазы, активируемой каспазами, которая вносит разрывы

ДНК между нуклеосомами, в результате чего образуются фрагменты размером 180–190 п.о. [18]. Как следует из результатов, представленных на рис. 6, после инкубации клеток линии EL-4 с антителами 14G2a в течение 24 ч на электрофореграмме появляются характерные полосы – т.н. “лесенка”, что свидетельствует о фрагментации геномной ДНК (рис. 6). Следует отметить, что в случае инкубации клеток с анти-GD2-антителами интенсивность полос, соответствующих фрагментированной ДНК, ниже, чем в образце клеток, обработанных стауроспорином (ср. полосы 3

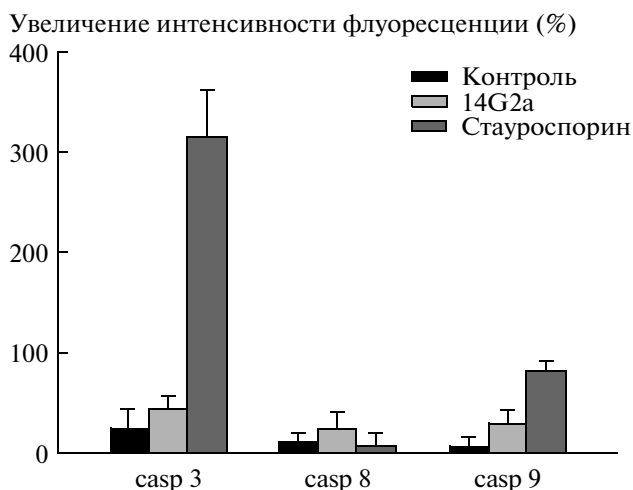


Рис. 5. Сравнение активностей каспазы-3, -8 и -9 с использованием флуоресцентно-меченых субстратов в интактных клетках и в клетках, обработанных антителами 14G2a (5 мкг/мл) и стауроспорином (50 нМ) в течение 24 ч.

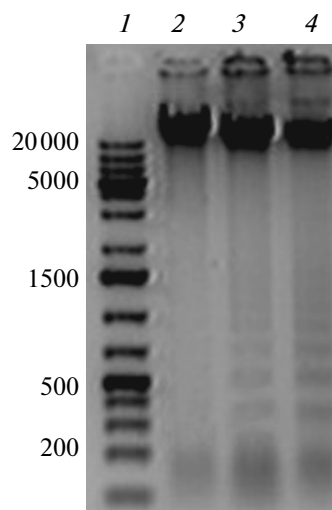


Рис. 6. Электрофорез ДНК клеток в агарозном геле. 1 – Маркеры молекулярных масс (п.о.), 2 – ДНК контрольных клеток, 3 – ДНК клеток, индуцированных антителами 14G2a (5 мкг/мл), 4 – ДНК клеток, индуцированных стауроспорином (50 нМ). Инкубация 24 ч.

и 4 на рис. 6), что коррелирует с результатами, полученными с использованием флуоресцентно-меченого субстрата каспазы-3.

В следующей серии экспериментов были использованы ингибиторы каспаз. Для исследования влияния общего ингибитора каспаз (Z-VAD-FMK), а также ингибиторов каспазы-3 (Z-DEVD-FMK), каспазы-8 (Z-IETD-FMK) и каспазы-9 (Z-LEHD-FMK) изучали долю гиподиплоидных клеток после 24 ч инкубации клеток с антителами 14G2a (5 мкг/мл) и стауроспорином (50 нМ); регистрацию проводили после окрашивания клеток в PI-тесте по общепринятому протоколу (см. “Экспериментальная часть”). Как видно из рис. 7, ингибиторы Z-VAD-FMK и Z-DEVD-FMK снижают уровень клеточной гибели, индуцированной антителами 14G2a, на 9–18 и 8–15% соответственно. Достоверного влияния ингибиторов каспаз Z-IETD-FMK и Z-LEHD-FMK на клеточную гибель, запускаемую анти-GD2-мАт, зарегистрировано не было. После инкубации клеток со стауроспорином клеточная гибель снижалась на 55–65% при ингибировании процесса Z-VAD-FMK и Z-DEVD-FMK, и на 32–40% — для Z-LEHD-FMK. Ингибитор Z-IETD-FMK не влиял на цитотоксичность, индуцированную стауроспорином.

Ингибиторный анализ показал слабую вовлеченность каспазы-3 и отсутствие влияния ингибирования каспазы-8 и -9 на клеточную гибель, запускаемую анти-GD2-мАт 14G2a. Можно заключить, что роль каспаз в процессе, индуцированном воздействием на GD2, не является ключевой и их активность значительно ниже, чем в апоптозе, индуцированном стауроспорином. Как мы полагаем, неполное ингибирование общим ингибитором каспаз и отсутствие ингибирования специфическим ингибитором каспазы-8 на индуцированную стауроспорином клеточную гибель запускается не по рецепторопосредованному типу апоптоза.

Первыми событиями, происходящими при воздействии анти-GD2-мАт, являются апоптоз-индуцированное уменьшение клеточного объема и нарушение целостности плазматической мембраны клеток EL-4. При апоптоз-индуцированном уменьшении объема (AVD) клеток происходит их сморщивание, которое характеризуется уменьшением размера клеток и увеличением их гранулированности [19]. Поэтому удобным методом детектирования AVD клеток является его цитометрическое определение в координатах прямого (FS) и бокового (SS) светорассеяния. Нами было показано, что после инкубации клеток с антителами 14G2a в течение часа процент клеток с AVD увеличивается по сравнению с контрольным образцом в 3–5 раз (см. рис. 8а, 8б).

Для определения нарушения целостности мембраны клеток было использовано окрашивание стимулированных антителами и интактных

Уровень клеточной гибели, %

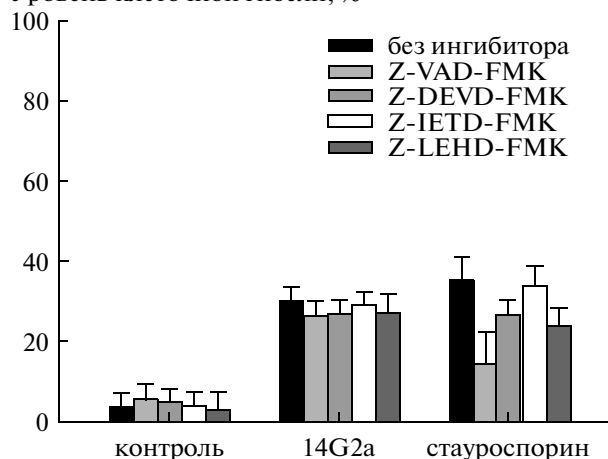


Рис. 7. Оценка уровня клеточной гибели в PI-тесте после 24-ч инкубации клеток линии EL-4 с 14G2a (5 мкг/мл) и стауроспорином (50 нМ) в присутствии ингибиторов каспаз.

клеток ДНК-красителем 7-AAD. Флуоресцентный ДНК-интеркалятор 7-AAD способен проникать в клетки с нарушенной целостностью мембраны через ее разрывы или поры, в то время как клетки с неповрежденной мембраной не окрашиваются этим красителем. После 1 ч инкубации с антителами 14G2a клетки линии EL-4 окрашивали 7-AAD; флуоресценцию регистрировали на проточном цитофлуориметре. Гистограммы, представленные на рис. 8в, 8г, демонстрируют значительное возрастание количества 7-AAD-позитивных клеток после их индукции анти-GD2-мАт, что свидетельствует об увеличении проницаемости мембран этих клеток.

Представлялось важным оценить, участвуют ли каспазы на первых этапах индуцированной антителами 14G2a клеточной гибели. Для такой оценки были использованы общий ингибитор каспаз Z-VAD-FMK и ингибитор каспазы-9 Z-DEVD-FMK, проявившие активность в клетках, индуцированных антителами 14G2a (см. выше). Как видно из таблицы, предварительная инкубация клеток с Z-VAD-FMK и Z-DEVD-FMK не изменила количества клеток с AVD, а также количества клеток с нарушенной целостностью плазматической мембраны после их инкубации с анти-GD2-мАт 14G2a. Эти результаты свидетельствуют в пользу того, что каспазы не участвуют на первых этапах клеточной гибели, запускаемой антителами 14G2a.

В представленной работе изучен вклад каспаз, ключевых молекул апоптоза, в цитотоксические эффекты, индуцированные анти-GD2-мАт 14G2a, в клетках мышинной лимфомы EL-4. Показано, что, несмотря на функционально незначимую активацию эффекторной каспазы-3, инициаторные

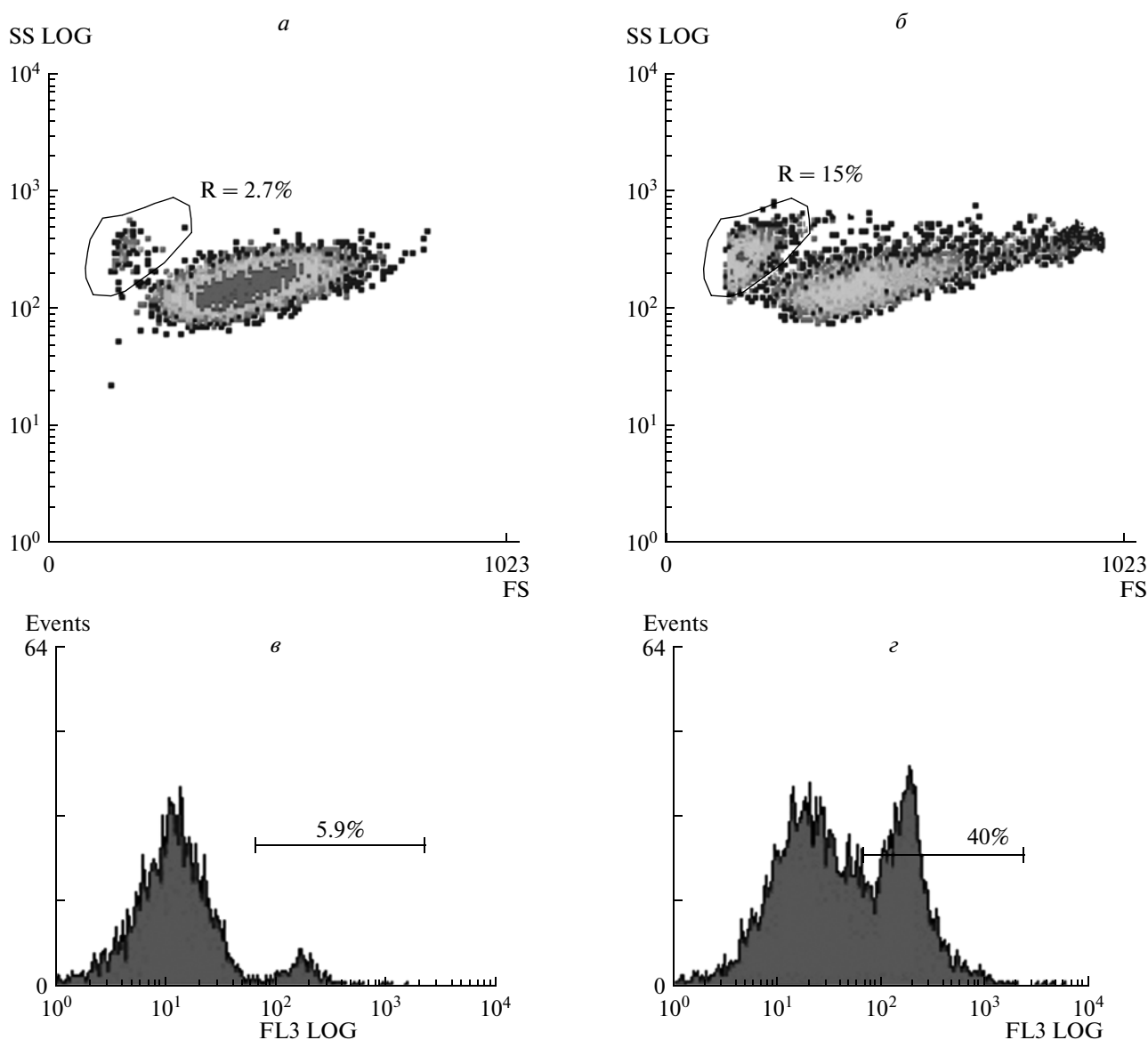


Рис. 8. а, б – Определение изменений клеточного объема в координатах прямого и бокового светорассеяния в контрольных клетках (а) и в клетках, индуцированных в течение 1 ч антителами 14G2a (5 мкг/мл) (б). R – регион, содержащий пул клеток с апоптоз-индуцированным уменьшением объема. в, з – гистограммы распределения клеток, окрашенных 7-амино-актиномицином-D (7-AAD), по интенсивности флуоресценции. в – интактные клетки, з – клетки, индуцированные в течение 1 ч антителами 14G2a (5 мкг/мл). Маркером обозначен процент 7-AAD-позитивных клеток.

каспазы (рис. 7) не участвуют в данном процессе, и первые этапы клеточной гибели являются каспазонезависимыми.

В нашей предыдущей работе [20] было показано, что эффект анти-GD2-мАт связан исключительно с воздействием на ганглиозид GD2, который является единственным акцептором, проводящим сигнал клеточной гибели. С другой стороны, экзогенные ганглиозиды, сброшенные с поверхности опухолевых клеток, могут выступать также индукторами клеточной гибели [21], и в этом процессе участвуют как исполнительные, так и инициаторные каспазы [22, 23]. Таким образом, сиг-

нальные пути, запускаемые экзогенными ганглиозидами и антителами к ганглиозидам, встроенным в клеточную мембрану, различаются. Если экзогенные ганглиозиды индуцируют рецепторопосредованный апоптоз, то в случае воздействия анти-GD2-мАт, клеточная гибель происходит, по-видимому, по одному из “неклассических” механизмов [24]. Выяснение детальных механизмов, по которым ганглиозид GD2, молекула липидной природы, локализованная на внешнем монослое плазматической мембраны клеток и не имеющая характерных признаков “классического” рецеп-

Влияние общего ингибитора каспаз и ингибитора каспазы-3 на AVD клеток линии EL-4 и целостность их плазматической мембраны после инкубации с анти-GD2-мАт 14G2a

	Клетки с уменьшенным объемом, %	7-AAD-положительные клетки, %
Контроль	3 ± 4	4 ± 4
14G2a	24 ± 6	27 ± 5
14G2a + Z-VAD-FMK	22 ± 7	25 ± 6
14G2a + Z-DEVD-FMK	25 ± 3	28 ± 6

тора, проводит сигнал клеточной гибели, станет предметом дальнейшего изучения.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. В работе использовали среду для культивирования клеток RPMI-1640, сыворотку эмбрионов крупного рогатого скота (FBS; HyClone, США); *L*-глутамин; NaHCO₃; NaN₃; DMSO; PBS, 7-актиномицин (7-AAD); IgG мыши, флуоресцентно-меченые субстраты каспаз: Z-DEVD-AFC, Z-IETD-AFC, Z-LEHD-AFC, Z-WEND-AFC, Z-YVAD-AFC; ингибиторы каспаз: Z-DEVD-FMK, Z-IETD-FMK, Z-LEHD-FMK, Z-WEND-FMK, Z-YVAD-FMK (все – Sigma, США); моноклональные антитела 14G2 к ганглиозиду GD2; антитела к прокаспазе-8 (SantaCruz, США); обратная транскриптаза вируса мышиного лейкоза Молони (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase, M-MLV), случайный гексапраймер, ОТ-буфер, тризол, вода, свободная от РНК-аз, 5хqPCRMix-HS SYBR (Евроген, Россия). Анти-GD2-мАт ME361 были получены из культуральной жидкости гибридомы HB9326 согласно описанному ранее методу [25].

Культивирование клеток мышинной лимфомы EL-4 осуществляли в полной среде (ПС), приготовленной на основе среды RPMI-1640, содержащей 10% FBS, 2 мМ *L*-глутамин, 100 мкг/мл пенициллин и 100 ед/мл стрептомицин. FBS предварительно инактивировали нагреванием в течение 30 мин при 56°C. Клетки культивировали во флаконах (75 см³; Greiner, Германия) в CO₂-инкубаторе (содержание CO₂ в атмосфере – 5%, 37°C) с пересевом каждые 48/72 ч, исходная концентрация (7.5–10) × 10⁴ кл/мл.

Оценка клеточной гибели

МТТ-тест осуществляли с использованием стандартной колориметрической процедуры [26] с рядом изменений, описанных ранее [27]. При этом клетки инкубировали с индукторами в течение 72 ч, затем центрифугировали (8 мин, 300 g), осадок суспендировали и добавляли по 30 мкл/лунка раствора МТТ (5 мг/мл в PBS). После выпадения кристаллов формазана (2–4 ч) его растворяли добав-

лением 100 мкл DMSO. Оптическое поглощение измеряли на спектрофотометре для планшетов Multiscan FC (ThermoScientific, США) при длине волны 540 нм.

Оценку клеточной гибели в PI-тесте проводили в соответствии с протоколом [14] при ряде изменений, описанных ранее [28]. После окончания инкубации с исследуемыми веществами клетки осаждали, фиксировали ледяным 70% этанолом в течение 1 ч при +4°C, дважды отмывали в PBS (300 g, 10 мин, 4°C). Затем клетки ресуспендировали в растворе для окрашивания (PBS, содержащий 10 мкг/мл йодистого пропидия и 10 мкг/мл РНКазы). Измерения проводили на проточном цитофлуориметре EPICS ELITE (Coulter, США). В каждом образце регистрировали не менее 1 × 10⁴ клеток. На гистограммах клетки с фрагментированной ДНК дифференцировали от живых клеток по более низкой интенсивности флуоресценции. Обработку результатов проводили с использованием программы WinMDI.

Внутриклеточное окрашивание клеток EL-4 антителами к прокаспазе-8 для проточной цитофлуориметрии проводили согласно методике, описанной ранее [29]. Клетки отмывали в PBS, фиксировали в 2% параформальдегиде (30 мин, 20°C) и затем центрифугировали при 350 g. Супернатант отделяли и обрабатывали 0.6% раствором сапони-на в PBS (30 мин, 20°C). Клетки отмывали в PBS с 0.1% Tween 20 (в дальнейшем такую процедуру отмывки проводили после каждой стадии). Для блокирования сайтов неспецифического связывания клетки инкубировали в PBS, содержащем 10% FBS (20 мин, 20°C). Далее клетки инкубировали с антителами к прокаспазе-8 в концентрации 10 мкг/мл (1 ч, 20°C) и окрашивали вторичными антивидовыми FITC-мечеными антителами (разведение 1 : 400, объем образца 100 мкл) в течение часа при той же температуре. После двух отмывок в PBS клетки переносили в цитометрические пробирки и проводили измерения на проточном цитофлуориметре. В каждом образце регистрировали не менее 1 × 10⁴ клеток. Обработку результатов проводили с использованием программы WinMDI.

Изменения клеточного объема детектировали с помощью метода проточной цитофлуориметрии. Интактные и подвергшиеся воздействию индукторов клетки EL-4, различающиеся по морфологии (размерам и гранулированности), дифференцировали по переднему и боковому светорассеянию. В каждом образце регистрировали не менее 1×10^4 клеток. Обработку результатов проводили с использованием программы WinMDI.

Оценку проницаемости плазматической мембраны клеток проводили с помощью флуоресцентного ДНК-красителя 7-AAD. Перед окрашиванием клетки однократно отмывали в PBS и к осадку добавляли 0.5 мл раствора 7-AAD с концентрацией 2 мкг/мл. Далее флуоресценцию клеток регистрировали цитофлуориметрически. В каждом образце регистрировали не менее 1×10^4 клеток. Обработку результатов проводили с использованием программы WinMDI.

Определение активности каспаз с использованием их флуоресцентно-меченых субстратов проводили в соответствии с методом, описанным ранее [18]. Клетки, в количестве 2×10^6 , после стимуляции однократно отмывали PBS. Затем получали клеточный лизат по методу, описанному ранее [22]. Лизат (по 20 мкл) помещали в лунки 96-луночного планшета для измерения флуоресценции (Dy-natech MicroFLUOR, США), объем в лунках доводили до 200 мкл буфером (100 мМ HEPES, 20% глицерин, 5 мМ DTT, 0.5 мМ EDTA). Планшет инкубировали 30 мин при $+37^\circ\text{C}$, затем в каждую лунку добавляли по 5 мкл 10 мМ раствора флуоресцентно-меченого субстрата каспаз. Интенсивность флуоресценции образцов измеряли на приборе Glomax (Promega, США) при $\lambda_{\text{возб}} = 400$ нм и $\lambda_{\text{исп}} = 505$ нм.

Выделение РНК из образцов проводили в системе тризол/хлороформ/NaAc. Стимулирован-

ные клетки в количестве не менее 2×10^6 отмывали в PBS (5 мл), после чего суспендировали в 0.5 мл тризола и инкубировали 5 мин при 20°C . Затем добавляли 0.2 мл хлороформа и после 2 мин интенсивного встряхивания вновь выдерживали 15 мин при 20°C , центрифугировали (15 мин, 12000 об/мин), отбирали супернатант, содержащий РНК, к нему добавляли 80%-ный изопропанол (0.5 мл). Затем следовали инкубация (15 мин, 20°C) и центрифугирование (10 мин, 10000 об/мин). Супернатант удаляли и к осадку добавляли 1 мл 75% этанола, после ресуспендирования центрифугировали (7500 об/мин, 5 мин). Супернатант удаляли, а осадок, содержащий РНК, высушивали 10 мин при 60°C и растворяли в 30 мкл воды, не содержащей РНКаз. Концентрацию РНК рассчитывали по OD при λ_{260} на приборе NanoVue (GE Healthcare, Швеция). Образцы хранили при -20°C .

Проведение обратной транскрипции. В пробирке, помещенной в лед, смешивали 2 мкг тотальной РНК и 2 мкл 20 мМ случайного гексапраймера. Объем доводили до 9 мкл свободной от РНКаз водой. После перемешивания смесь инкубировали 2 мин при 70°C . Затем пробирку переносили в лед, после чего добавляли 4 мкл 5-кратного буфера обратной транскрипции (ОТ-буфера), 2 мкл 10 мМ смеси dNTP, 2 мкл 20 мМ DTT, 1 мкл обратной транскриптазы M-MLV (50 ед/мкл). Смесь инкубировали в течение 30 мин при 40°C и останавливали реакцию прогреванием в течение 10 мин при 70°C . Полученную кДНК хранили при -20°C .

Полимеразная цепная реакция в реальном времени. В пробирке, свободной от РНКаз, смешивали следующие компоненты: 2 мкл кДНК-матрицы (1–5 нг), по 0.4 мкл прямого и обратного праймера (100 пмоль), 2 мкл 5xqPCRmix-HS SYBR. Объем реакционной смеси доводили до 10 мкл водой, свободной от РНКаз.

Последовательности праймеров (5'-3'):

	Прямой	Обратный
Каспаза-8	TCACGGACTTCAGACAA	GTGGGATAGGATACAGCA
Каспаза-3	TGACTGGAAAGCCGAAAC	GCAAGCCATCTCCTCATC
Каспаза-9	GGCTCAAGCCAGAGGTTT	CTTGGCAGTCAGGTCGTT

После перемешивания добавляли к смеси 20 мкл минерального масла так, чтобы поверхность смеси была полностью закрыта для предотвращения испарения. Пробирку помещали в детектирующий амплификатор DTrime ДТ-96 (ДНК-технологии, Россия). Полученные образцы проверяли с помощью электрофореза в агарозном геле (см. ниже). Данные обрабатывали с помощью программы RealTimePCR.

Выделение ДНК и проведение электрофореза в агарозном геле

Экспериментальные и контрольные клетки в количестве 2×10^6 отмывали в PBS, к осадку добавляли 0.1 мл PBS, 100 мкг протеиназы К, 10 мкг РНКазы А и 0.6 мл СТАВ-буфера (2% СТАВ, 100 мМ Tris-HCl, 20 мМ EDTA, 1.4 М NaCl, pH 8). На 30-й мин смесь помещали на водяную баню (65°C), добавляли равный объем смеси фенол–

хлороформ (1 : 1, об/об), перемешивали и центрифугировали (13000 об/мин, 5 мин). Водную фазу помещали в новую пробирку и добавляли 1/10 часть объема 3 М NaAc, 0.8 мл 100% изопропанола, аккуратно перемешивали и помещали на 30 мин на -20°C . После этого центрифугировали (14000 об/мин, 15 мин), супернатант удаляли, к осадку добавляли 0.5 мл 70% этанола, ресуспендировали осадок, содержащий ДНК, и центрифугирование повторяли при тех же условиях. Спирт удаляли, ДНК растворяли в 50 мкл бидистиллированной воды, измерение концентрации проводили на приборе NanoVue (GE Healthcare, Швеция). Агарозный гель (1.5%) готовили на ТАЕ-буфере, затем добавляли этидиумбромид до конечной концентрации 1 мкг/мл. После полимеризации геля в лунки наносили по 5 мкл исследуемых образцов, 1 мкл маркера. Электрофорез проводили при 85 В, 30 мА. Результаты визуализировали в ультрафиолетовом свете.

Обработка результатов и статистический анализ

Анализ цитометрических результатов проводили в программе WinMDI. Построение графиков выполняли в программе SigmaPlot, MS Excel. Представленные результаты являются либо средним значением как минимум трех независимых экспериментов, либо репрезентативными данными.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена при поддержке Федеральной целевой программы “Научные и научно-педагогические кадры инновационной России” на 2009–2013 гг., государственным контрактом № 8165, а также грантами РФФИ №№ 12-04-31511 и 13-04-02141.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ritter G., Livingston P.O. // *Semin. Cancer Biol.* 1991. V. 2. P. 401–409.
- Cheung N.K., Dyer M.A. // *Nat. Rev. Cancer.* 2013. V. 13. № 6. P. 397–411.
- Navid F., Armstrong M., Barfield R.C. // *Cancer Biol. Ther.* 2009. V. 8. №10. P. 874–882.
- Водовозова Е.Л., Назарова А.И., Феофанов А.В., Холоденко Р.В., Пазынина Г.В., Гаенко Г.П., Бовин Н.В., Молотковский Ю.Г. // *Биол. мембраны.* 2004. Т. 21. С. 53.
- Di Paolo D., Brignole C., Pastorino F., Carosio R., Zorzoli A., Rossi M., Loi M., Pagnan G., Emionite L., Cilli M., Bruno S., Chiarle R., Allen T.M., Ponzoni M., Perri P. // *Mol. Ther.* 2011. V. 19. № 6. P. 1131–1140.
- Холоденко И.В., Доронин И.И., Холоденко Р.В. // *Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии.* 2010. Т. 6. С. 79–83.
- Mujoo K., Kipps T.J., Yang H.M., Cheresch D.A., Wargalla U., Sander D.J., Reisfeld R.A. // *Cancer Res.* 1989. V. 49. № 11. P. 2857–2861.
- Kowalczyk A., Gil M., Horwacik I., Odrowaz Z., Kozbor D., Rokita H. // *Cancer Lett.* 2009. V. 281. № 2. P. 171–182.
- Yoshida S., Kawaguchi H., Sato S., Ueda R., Furukawa K. // *Japan J. Cancer Res.* 2002. V. 93. № 7. P. 816–824.
- Холоденко Р.В. // *Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии.* 2010. Т. 1. С. 13–19.
- Холоденко И.В., Доронин И.И., Вишнякова П.А., Болховитина Е.Л., Молотковская И.М., Холоденко Р.В. // *Иммунология.* 2013. Т. 34. № 4. С. 199–203.
- Kroemer G., Galluzzi L., Vandenabeele P., Vandenabeele P., Abrams J., Alnemri E.S., Baehrecke E.H., Blagosklonny M.V., El-Deiry W.S., Golstein P., Green D.R., Hengartner M., Knight R.A., Kumar S., Lipton S.A., Malorni W., Nuñez G., Peter M.E., Tschopp J., Yuan J., Piacentini M., Zhivotovskiy B., Melino G. // *Cell Death. Differ.* 2009. V. 16. № 1. P. 3–11.
- Miura M. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. doi: 10.1101/cshperspect.a008664
- Telford W.G., King L.E., Fraker P.J. // *J. Immunol. Methods.* 1994. V. 172. № 1. P. 1–16.
- Cheung N.K., Guo H., Hu J., Tassev D.V., Cheung I.Y. // *Oncoimmunology.* 2012. V. 1. № 4. P. 477–486.
- Chae H.J., Kang J.S., Byun J.O., Han K.S., Kim D.U., Oh S.M., Kim H.M., Chae S.W., Kim H.R. // *Pharmacological Res.* 2000. V. 42. № 4. P. 373–381.
- Fink D., Schlagbauer-Wadl H., Selzer E., Lucas T., Wolff K., Pehamberger H., Eichler H.G., Jansen B. // *Melanoma Res.* 2001. V. 11. № 4. P. 385–393.
- Sakahira H., Enari M., Nagata S. // *Nature.* 1998. V. 391. № 6662. P. 96–99.
- Bortner C.D., Cidlowski J.A. // *Cell Physiol. Biochem.* 2011. V. 28. № 6. P. 1079–1088.
- Vishnyakova P.A., Kholodenko I.V., Molotkovskaya I.M., Kholodenko R.V. // *Front. Immunol.* 2013; ICI conference abstract. doi: 10.3389/conf.fimmu.2013.02.00284
- Молотковская И.М., Холоденко Р.В., Зеленова Н.А., Сапожников А.М., Михалев И.И., Молотковский Ю.Г. // *Биол. мембраны.* 1999. Т. 16. № 6. С. 657–666. [Molotkovskaya I.M., Kholodenko R.V., Zelenova N.A., Sapozhnikov A.M., Mikhalev I.I., Molotkovskiy Jul.G. // *Membr. Cell Biol.* 2000. V. 13. P. 811–822.]
- Холоденко Р.В., Сапожников А.М., Михалев И.И., Молотковский Ю.Г., Молотковская И.М. // *Биол. мембраны.* 2002. Т. 19. С. 209–215.
- Холоденко Р.В., Холоденко И.В., Вискова Н.Ю., Луцан Н.И., Молотковская И.М. // *Биол. мембраны.* 2007. Т. 24. С. 142–149.
- Вишнякова П.А., Холоденко Р.В. // *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.* 2013. № 6. С. 4–6.
- Доронин И.И., Холоденко И.В., Молотковская И.М., Холоденко Р.В. // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины.* 2012. Т. 11. С. 616–622. [Doronin I.I., Kholodenko I.V., Molotkovskaya I.M., Kholodenko R.V. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2013. V. 154. P. 658–663.]

26. Denizot F., Lang R. // *J. Immunol. Methods*. 1986. V. 89. № 2. P. 271–277.
27. Кониева А.А., Холоденко И.В., Шрагина О.А., Холоденко Р.В., Бурунова В.В., Бибеева Л.В., Ярыгин К.Н., Ярыгин В.Н. // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2010. № 3. С. 147–152. [Konieva A.A., Kholodenko I.V., Shragina O.A., Kholodenko R.V., Burunova V.V., Bibaeva L.V., Yarygin K.N., Yarygin V.N. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2010 V. 150. P. 131–136.]
28. Kholodenko R., Kholodenko I., Sorokin V., Tolmazova A., Sazonova O., Buzdin A. // *Cell Res*. 2007. V. 17. № 2. P. 151–162.
29. Холоденко И.В., Буздин А.А., Холоденко Р.В., Байбикова Ю.А., Сорокин В.Ф., Ярыгин В.Н., Свердлов Е.Д. // *Биохимия*. 2006. Т. 71. № 7. С. 945–953. Kholodenko I.V., Buzdin A.A., Kholodenko R.V., Baibikova J.A., Sverdlov E.D., Sorokin V.F., Yarygin V.N. // *Biochemistry (Moscow)*. 2006. V. 71. P. 767–774.

Caspases Participarion in the Cell Death Induced by GD2-Specific Monoclonal Antibody

P. A. Vishnyakova*, I. I. Doronin*, I. V. Kholodenko*.,,
D. Yu. Ryazantsev*, I. M. Molotkovskaya*, R. V. Kholodenko#. ***

#Phone: +7 (495)330-72-56, e-mail: khol@mail.ru

*Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

**Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry of the Russian Academy of Medical Sciences,
ul. Pogodinskaya 10, Moscow, 119121 Russia

The participation of the main caspases in the cytotoxic effects induced by monoclonal antibody 14G2a specific against tumor-associated ganglioside GD2 was studied in the EL-4 cells. It has been found constitutive expression of procaspases genes in the EL-4 cells; incubation of the cells with 14G2a antibodies did not result in increasing of the procaspases expression. Weak enzymatic activity of caspases has been shown using fluorescent labeled substrates. At the same cell death level, activity of caspase-3 and caspase-9 in the cells incubated with 14G2a was about 7.5- and 3-fold lower than in cells after incubation with staurosporine. Pan caspase inhibitor Z-VAD-FMK, and caspase-3 inhibitor reduced the cytotoxic effects induced by 14G2a at 9–16 and 6–13%, respectively. At the same conditions, pan caspase inhibitor decreased staurosporine-induced apoptosis at 55–65%. Inhibitors of other caspases had no effect on the cell death triggered by the antibodies. Inhibition analysis demonstrated also that caspases did not involved in the cell volume decreasing and permeabilization of the cell plasma membrane, which were the first stages of anti-GD2-mAb-induced cell death in the EL-4 cells. Thus, despite the slight activation of caspases during the cell death induced by antibodies directed to GD2, they do not play a key role and do not determine the mechanism of cell death triggered through the tumor-associated ganglioside GD2.

Keywords: ganglioside GD2, tumor-associated gangliosides, caspases, cell death, apoptosis, monoclonal antibodies