

УДК 57.085.23

**БЛОКАДА БИОСИНТЕЗА ХОЛЕСТЕРОЛА НА ЭТАПЕ
С4-ДЕМЕТИЛИРОВАНИЯ СЕНСИТИЗИРУЕТ
ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ К БЛОКАТОРАМ РЕЦЕПТОРА
ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА**

А.О. Горин, З.И. Абрамова

Аннотация

Блокада рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) является одним из основных методов терапии опухолей, однако эффективность этого метода остается крайне низкой. В настоящей работе мы предлагаем возможный вариант усиления чувствительности опухолевых клеток к блокаторам EGFR. Показано, что блокада экспрессии ферментов, катализирующих реакцию С4-деметилования предшественника холестерина, приводит к значительному увеличению апоптотической гибели опухолевых клеток после блокады EGFR. Этот эффект был специфичен по отношению как к месту блокады пути биосинтеза холестерина, так и к сенситизации к ингибированию EGFR. Таким образом, описанные данные позволяют рассматривать гены ферментов, катализирующих этап С4-деметилования, как мишени для улучшения эффективности блокаторов EGFR в лечении онкологических заболеваний.

Ключевые слова: биосинтез холестерина, блокаторы EGFR, культуры клеток.

Введение

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) является важным механизмом проведения сигналов, стимулирующих рост и деление опухолевых клеток [1]. Блокада данного пути – перспективный метод лечения онкологических заболеваний. Однако эффективность такой терапии лимитирована вследствие невосприимчивости клеток опухоли к блокаде EGFR. Первичная резистентность к антагонистам EGFR наблюдается в клетках с мутациями, активирующими нижестоящие эффекторы сигнального пути EGFR, например RAS и BRAF [2]. Переключение функции EGFR вследствие компенсаторного усиления активности его корецепторов, таких как ERBB2 [3], ERBB3 [4], IGF1R [5], служит примером приобретенной резистентности. Во многих случаях причина резистентности остается невыясненной. Таким образом, поиск средств усиления эффективности блокаторов EGFR является крайне важным и перспективным направлением современной онкологии.

Разные сигнальные системы клетки функционируют нелинейно. Они формируют сети из разных, многократно пересекающихся путей. В результате таких перекрестов сигнальные пути взаимодействуют и модифицируют активность друг друга. Это приводит к тому, что при блокаде одного конкретного пути за счет его буферной емкости сигнал может доходить до конечных эффекторов по другим путям. В таком случае для полного ингибирования эффекта

нужно блокировать два пути параллельно. Такое взаимодействие сигнальных путей носит название синтетической летальности [6].

Принцип синтетической летальности может быть использован для увеличения эффективности лекарственных средств. В случае невосприимчивости клеток к определенному ингибитору можно заблокировать параллельный путь, по которому сигналы могут «обходить» блокаду первичным лекарством. Такой подход может многократно потенцировать действие блокаторов без увеличения концентраций препаратов и, следовательно, без дополнительных побочных эффектов. Мы решили применить этот способ для ингибиторов EGFR.

Для поиска генов-синергистов ингибиторов EGFR мы обратились к недавно проведенному скринингу, направленному на поиск мишеней, находящихся в синтетически летальных взаимодействиях с данным рецептором [7]. В результате этого скрининга были идентифицированы гены, блокада которых приводила к сенситизации опухолевых клеток к блокаторам EGFR. Одной из многочисленных мишеней был ген *SC4MOL*, кодирующий фермент из пути биосинтеза холестерина. Блокада этого гена вызывала значительную сенситизацию клеток к эрлотинибу.

В настоящей работе мы провели анализ влияния блокады синтеза фермента *SC4MOL* на воздействие ингибиторов EGFR на линии опухолевых клеток.

1. Материалы и методы

1.1. Клеточные линии, реагенты и антитела. Клеточные линии были получены из American Tissue Culture Collection (США). Все клеточные линии росли в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла, содержащей 10% сыворотки теленка и L-глутамин. Эрлотиниб, цетуксимаб, СРТ11 и холестерол были приобретены в фирме Sigma-Aldrich (США). Все используемые антитела также были приобретены в фирме Cell Signaling (США).

1.2. Трансфекция с помощью миРНК и анализ выживаемости клеток. Все миРНК были приобретены в фирме Qiagen (США). Трансфекция клеток проводилась при помощи 10 нМ миРНК и трансфекционного реагента HiPerfect (Qiagen, США) согласно протоколу производителя. Лекарственные препараты добавлялись через 24 ч после посадки клеток. Выживаемость клеток измерялась через 96 ч с использованием реагента CellTiter Blue (Promega, США).

1.3. Вестерн-блоттинг и анализ апоптоза. Для исследования белков с помощью вестерн-блоттинга клетки трансфецировались при помощи миРНК и засаживались в 6-луночные плашки. Через 72 ч добавлялись лекарства. Через 96 ч клетки лизировались в лизирующем буфере RIPA (Sigma, США) с добавлением ингибиторов протеаз (Thermo Scientific, США). Белки разгонялись при помощи электрофореза в градиентном (4–12%) полиакриламидном геле и переносились на PVDF мембрану. Анализ клеточной гибели проводился по методу мечения апоптотических клеток красителем аннексином V (Guava Technologies, США). Аннексин V-позитивные клетки считывались при помощи проточного цитометра через 72 ч после трансфекции и через 24 ч после добавления эрлотиниба.

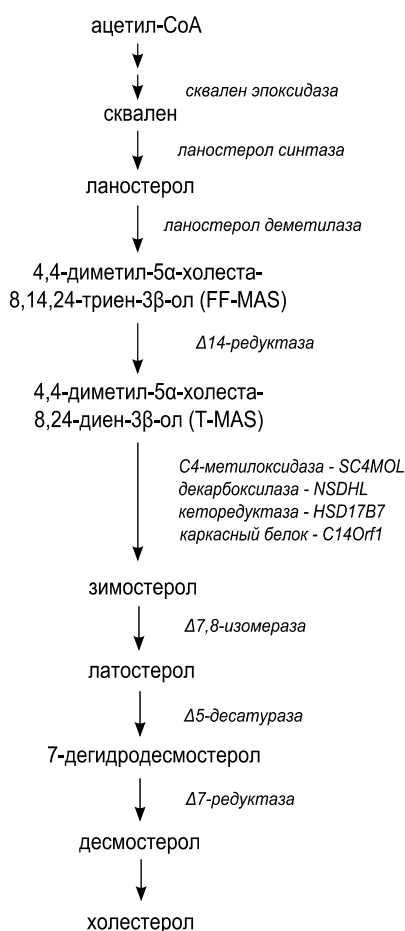


Рис. 1. Схема биосинтеза холестерина с указанием ферментов, катализирующих соответствующие реакции. Белки SC4MOL, NSDHL, HSD17B7 и C14Orf1 образуют C4-деметирующий комплекс

2. Результаты

2.1. Блокада пути биосинтеза холестерина и чувствительность клеток к блокаторам EGFR. Фермент SC4MOL работает на дистальном участке пути биосинтеза холестерина – он катализирует деметилирование предшественника холестерина Т-MAS по C4-атому (рис. 1). Эта комплексная реакция проходит в несколько этапов и в ней участвуют ферменты, образующие C4-деметирующий комплекс: C4-метилоксидаза SC4MOL, НАДФ-зависимая дегидрогеназа NSDHL, кеторедуктаза HSD17A1 и белок C14Orf1, выполняющий каркасную функцию для комплекса. Так как изначально влияние на EGFR было описано только у белка SC4MOL, то первоочередной задачей было проверить, насколько этот эффект специфичен. Мы протестировали все белки C4-деметирующего комплекса, а также 6 ферментов, работающих в пути биосинтеза стеролов как выше, так и ниже этой ступени. Значительная сенситизация клеток A431 к эрлотинибу наблюдалась только в случае блокады ферментов, входящих в C4-деметирующий комплекс (рис. 2, а). В остальных случаях чувствительность клеток

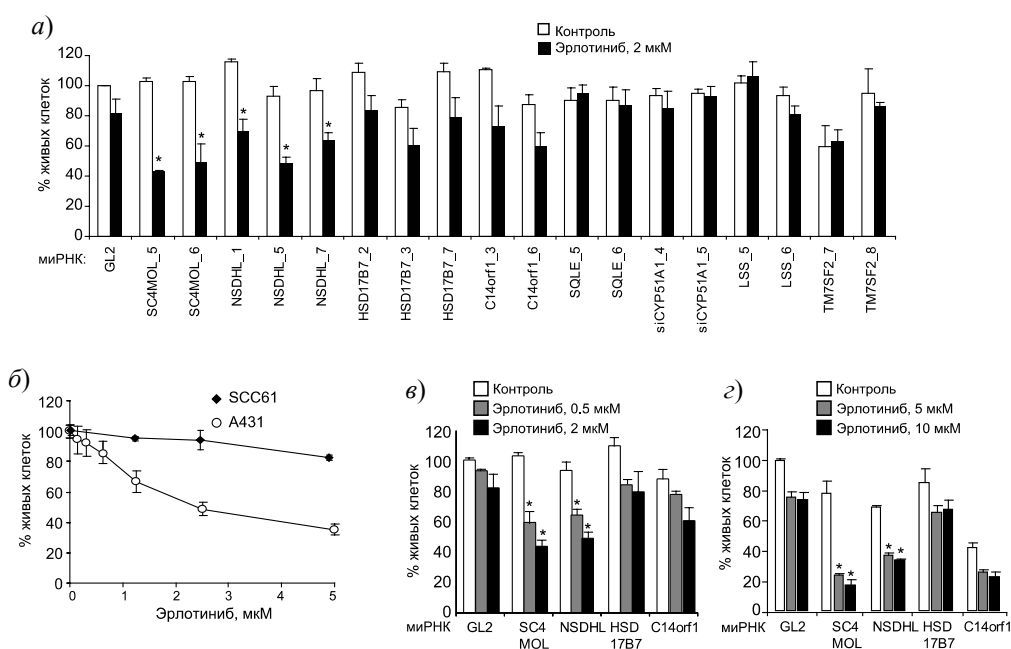


Рис. 2. Сенситизация клеток к эрлотинибу после выключения SC4MOL и NSDHL. а) Выживаемость клеток A431 после трансфекции указанными миРНК и добавления эрлотиниба. Были протестированы белки С4-деметилюющего комплекса и ферменты, работающие выше: сквален эпоксидаза (SQLE), ланостерол деметилаза (CYP51A1), ланостерол синтаза (LSS) и Δ14-редуктаза (TM7SF2). GL2 – контрольная миРНК. б) Чувствительность A431 и SCC61 клеток к эрлотинибу. в) Чувствительность A431 клеток после трансфекции указанными миРНК. з) Чувствительность SCC61 клеток после трансфекции указанными миРНК. Показаны средние значения трех экспериментов и стандартные отклонения. Звездочкой указаны результаты со статистически значимым различием ($p < 0.05$)

к данному лекарству менялась незначительно. Таким образом, сенситизация клеток является специфическим эффектом при блокировании холестерольного пути только на стадии С4-деметилюрования, и дальнейшие исследования было решено проводить только с белками, работающими на этой ступени.

Для достоверности данных следующие эксперименты мы проводили на двух разных клеточных линиях: чувствительной к эрлотинибу линии эпидермоидной карциномы A431 и изначально резистентной к эрлотинибу линии сквамозной карциномы SCC61 (рис. 2, б). Блокирование четырех интересующих нас белков при помощи миРНК-трансфекции показало, что только ферменты SC4MOL и NSDHL приводят к значительной сенситизации обеих клеточных линий к эрлотинибу (рис. 2, в, з).

2.2. Анализ клеточной гибели. Наши исследования показали увеличение клеточной гибели при одновременной блокаде пути синтеза холестерина и EGFR. Далее был проведен анализ клеточной гибели. Выявление белков-маркеров апоптоза показало следующие результаты: появление фрагментов расщепления каспазы 3 и существенную индукцию белка PARP (рис. 3, а). Кроме этого был проведен анализ с использованием красителя аннексина V, который выявил

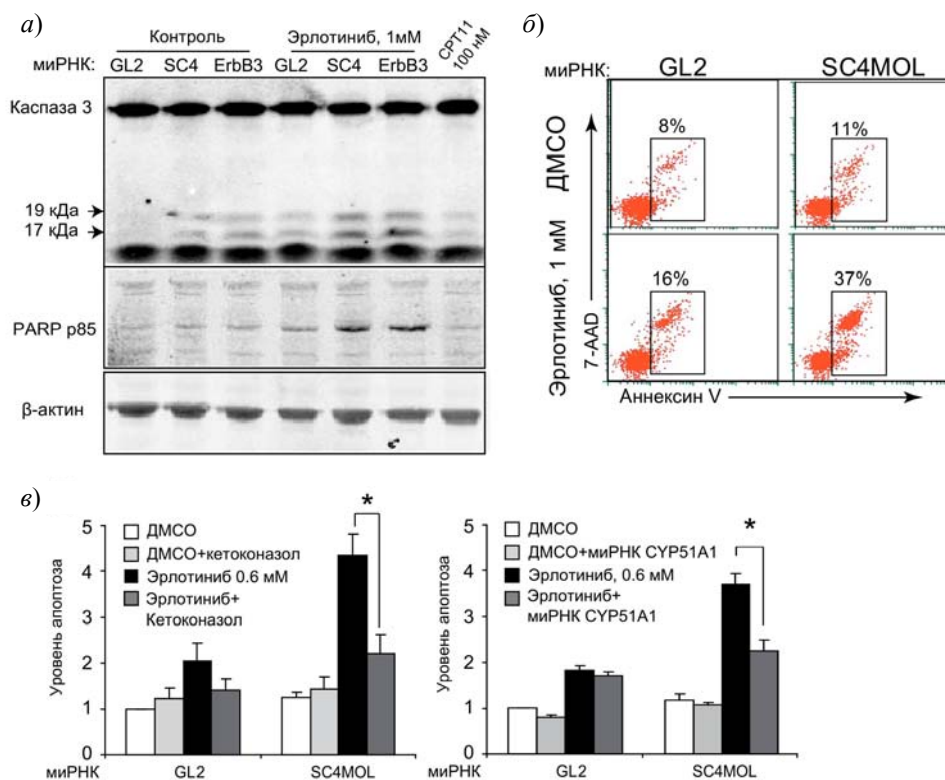


Рис. 3. Индукция апоптоза после выключения SC4MOL. *а)* Появление фрагментов расщепления каспазы 3 и индукция PARP. Клетки были трансфицированы с помощью миРНК против SC4MOL или ErbB3 (GL2 – контрольная миРНК). ДНК-повреждающий агент CPT11 был использован в качестве контроля. *б)* Анализ апоптоза клеток A431 методом окраски аннексином V. *в)* Измерение апоптоза после воздействия ингибитора ланостерол деметилазы кетоконазола (слева) или трансфекции миРНК против СУР51А1, кодирующего ланостерол деметилазу (справа). Уровень апоптоза измерялся количеством аннексин-положительных клеток, значения нормализованы на контрольные клетки. Показаны средние значения трех экспериментов и стандартные отклонения. Звездочкой указаны результаты со статистически значимым различием ($p < 0.05$)

многочратное увеличение количества аннексин-положительных клеток (рис. 3, б) в случае блокирования фермента SC4MOL и ингибирования EGFR эрлотинибом. В совокупности все эти результаты указывают на то, что гибель клеток происходит по механизму апоптоза. При этом апоптоз наблюдался только в случае блокады на этапе С4-деметиляции. Блокирование фермента Δ14-редуктазы, катализирующего предыдущую реакцию пути, при помощи селективного ингибитора кетоконазола или миРНК трансфекцией возвращало уровень апоптоза практически к исходному (рис. 3, в).

2.3. Анализ стерольного профиля клеток. Так как наблюдаемые нами эффекты были исключительно специфичными в отношении ступени биосинтеза холестерина, было решено провести проверку стерольного состава клеток после блокирования исследуемых ферментов и того, коррелирует ли сенситизация

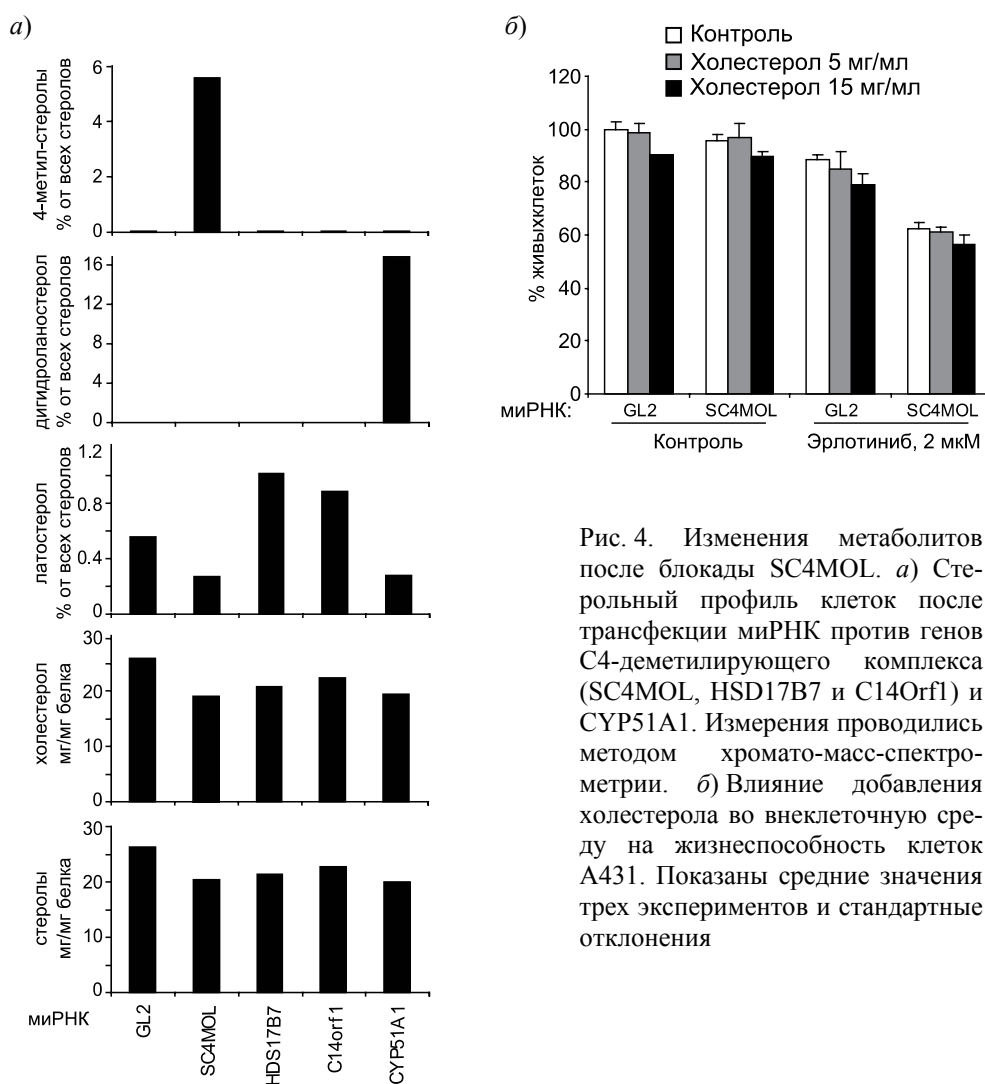


Рис. 4. Изменения метаболитов после блокады SC4MOL. а) Стерольный профиль клеток после трансфекции миРНК против генов С4-деметилирующего комплекса (SC4MOL, HSD17B7 и C14Orf1) и CYP51A1. Измерения проводились методом хромато-масс-спектрометрии. б) Влияние добавления холестерина во внеклеточную среду на жизнеспособность клеток A431. Показаны средние значения трех экспериментов и стандартные отклонения

клеток к EGFR-блокаторам с изменением стерольного состава клеток. Реакции в пути биосинтеза стеролов являются необратимыми, что в случае блокады определенного фермента приводит к накоплению только строго специфичных предшественников холестерина. Результат масс-спектрометрического анализа показал существенное увеличение содержания T-MAS в случае блокады SC4MOL и ланостерола в случае блокады $\Delta 14$ -редуктазы (рис. 4, а). Уровень нижестоящих стеролов значительно снижался после блокирования на любом этапе. Стоит отметить, что уровень холестерина, как и общее количество стеролов в клетке, снижался незначительно. Это говорит о том, что действие на рецептор опосредуется не через уменьшение количества холестерина в клетке. Тем не менее мы проверили, можно ли предотвратить сенситизацию с помощью холестерина. Как и ожидалось, добавление дополнительного холестерина в среду к клеткам с блокадой SC4MOL не привело к изменению их чувствительности к эрлотинибу (рис. 4, б).

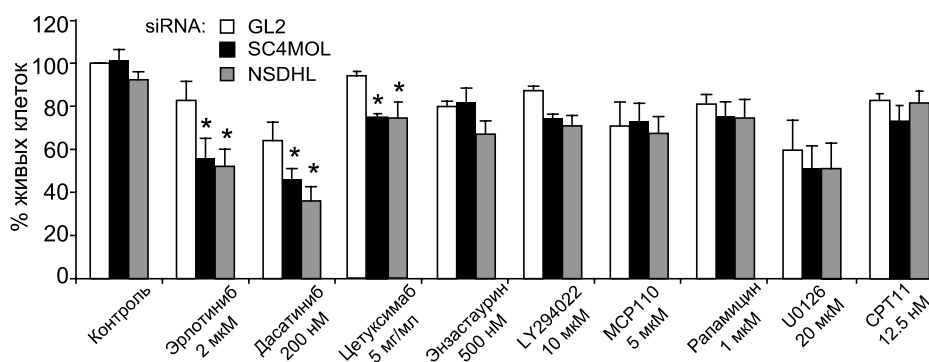


Рис. 5. Специфичность эффектов выключения генов С4-деметирующего комплекса. Клетки А431 были трансфицированы контрольной миРНК (GL2) или миРНК против SC4MOL или NSDHL. Через 72 ч к клеткам были добавлены указанные ингибиторы. Через 96 ч была измерена жизнеспособность клеток. Показаны средние значения трех экспериментов и стандартные отклонения. Звездочкой указаны результаты со статистически значимым различием ($p < 0.05$)

2.4. Специфичность эффекта сенситизации при блокировании С4-деметирирования. Так как все вышеописанные эксперименты с блокированием SC4MOL были проведены только с блокаторами EGFR, было интересно проверить, насколько этот эффект специфичен. Для этого была протестирована сенситизация клеток к блокаторам различных сигнальных путей (рис. 5). Блокада SC4MOL вызывала сенситизацию клеток ко всем ингибиторам EGFR (эрлотиниб, цетуксимаб, дасатиниб), в то время как к другим блокаторам – энзастаурин (ингибитор протеинкиназы C), LY294022 (ингибитор фосфотидилинозитол-3-киназы), MCP110 (ингибитор взаимодействия RAS/RAF), рапамицин (ингибитор mTOR), U0126 (ингибитор MEK1/2) и CPT11 (ДНК-повреждающий агент) – сенситизации не наблюдалось. Таким образом, в результате ингибирования SC4MOL клетки приобретали высокоспецифичную сенситизацию к блокаторам EGFR.

3. Обсуждение

В работе описывается влияние блокады генов, кодирующих ферменты С4-деметирирования стеролов, на чувствительность опухолевых клеток к ингибиторам EGFR.

Из методов модификации стерольного биосинтеза в настоящее время в качестве терапевтического средства используются только статины, ингибирующие фермент в самом начале синтетического пути, что ведет к уменьшению продукции всех стеролов клетки, в том числе и холестерина [8]. В настоящей работе описан новый подход к воздействию на данный путь, эффект которого опосредуется не через уменьшение продукции холестерина, а через блокаду определенного этапа синтеза на дистальном его участке.

Мы описали метод воздействия на путь биосинтеза холестерина, эффект которого опосредуется не через уменьшение количества холестерина в клетке. Сенситизация к блокаторам EGFR является строго специфичной к белкам SC4MOL и NSDHL, что позволяет предположить две возможные причины этих эффектов. Во-первых, индуктором сенситизации, вероятнее всего, может

являться накопление соответствующих метаболитов (метилстеролов), которые могут оказывать воздействие как на сам рецептор, так и на его различные эффекторы и модуляторы. Во-вторых, причиной может служить нарушение белок-белковых взаимодействий между SC4MOL и любыми белками, влияющими на сигнальную активность рецептора, его интернализацию или деградацию.

В наших экспериментах мы не обнаружили никаких изменений в сенситизации после добавления к клеткам дополнительного холестерина. Более того, блокада SC4MOL не приводила к уменьшению общего количества холестерина. Вероятнее всего, 3 дня после удаления фермента являются недостаточными для того, чтобы клетка исчерпала запас холестерина. Кроме того, холестерол может восполняться при помощи импорта из среды. В этом отношении эксперименты *in vitro* не воспроизводят в полной мере картины, наблюдаемой *in vivo*. Блокада энзиматической активности SC4MOL приводит к значительному снижению уровня холестерина в плазме крови [9], воспроизводя тем самым действие статинов. Тем не менее блокада фермента во всем организме не представляется возможной, так как она приводит к серьезным нарушениям многочисленных физиологических функций [9].

Изменение стерольного профиля клеток может также влиять на состав мембран. В частности, может изменяться строение липидных плотов, которые играют ключевую роль в некатриновом пути эндоцитоза клеточных рецепторов, в том числе и EGFR [10].

Таким образом, указанные данные свидетельствуют о влиянии генов, кодирующих ферменты C4-деметилюющего комплекса биосинтеза стеролов, на сигнальную активность EGFR. И несмотря на то, что механизм этого взаимодействия остается невыясненным, результаты исследования указывают на то, что выключение данных ферментов вызывает стойкий сенситизирующий эффект к блокаторам EGFR. Это, в свою очередь, дает надежду на последующее применение этого метода в клинической практике для усиления эффективности лекарств, направленных на ингибирование рецептора эпидермального фактора роста.

Summary

A.O. Gorin, Z.I. Abramova. Blockade of C4-Demethylation Step in Cholesterol Biosynthesis Sensitizes Cancer Cells to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors.

Although blockade of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) is one of the most widely used methods in cancer therapy, its efficacy is very low. In our work we postulate a way to enhance the sensitivity of cancer cells to EGFR blockade. We show that blockade of genes encoding the enzymes catalyzing the C4-demethylation step of cholesterol biosynthesis leads to a considerable increase in apoptotic cell death upon treatment with EGFR inhibitors. This effect was specific to both sterol pathway inhibition and EGFR blockade. Altogether these data indicate that the genes encoding these enzymes can be potentially used as enhancers of EGFR blockers in treatment of oncological diseases.

Key words: cholesterol biosynthesis, EGFR blockers, cell cultures.

Литература

1. *Woodburn J.R.* The epidermal growth factor receptor and its inhibition in cancer therapy // *Pharmacol. Ther.* – 1999. – V. 82, No 2–3. – P. 241–250.

2. *Di Nicolantonio F., Martini M., Molinari F., Sartore-Bianchi A., Arena S., Saletti P., De Dosso S., Mazzucchelli L., Frattini M., Siena S., Bardelli A.* Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer // *J. Clin. Oncol.* – 2008. – V. 26, No 35. – P. 5705–5712.
3. *Erjala K., Sundvall M., Junttila T.T., Zhang N., Savisalo M., Mali P., Kulmala J., Pulkkinen J., Grenman R., Elenius K.* Signaling via ErbB2 and ErbB3 associates with resistance and epidermal growth factor receptor (EGFR) amplification with sensitivity to EGFR inhibitor gefitinib in head and neck squamous cell carcinoma cells // *Clin. Cancer Res.* – 2006. – V. 12, No 13. – P. 4103–4111.
4. *Turke A.B., Zejnullahu K., Wu Y.L., Song Y., Dias-Santagata D., Lifshits E., Toschi L., Rogers A., Mok T., Sequist L., Lindeman N.I., Murphy C., Akhavanfard S., Yeap B.Y., Xiao Y., Capelletti M., Iafrate A.J., Lee C., Christensen J.G., Engelman J.A., Jänne P.A.* Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC // *Cancer Cell.* – 2010. – V. 17, No 1. – P. 77–88.
5. *Guix M., Faber A.C., Wang S.E., Olivares M.G., Song Y., Qu S., Rinehart C., Seidel B., Yee D., Arteaga C.L., Engelman J.A.* Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in cancer cells is mediated by loss of IGF-binding proteins // *J. Clin. Invest.* – 2008. – V. 118, No 7. – P. 2609–2619.
6. *Krause S.A., Gray J.V.* The functional relationships underlying a synthetic genetic network // *Commun. Integr. Biol.* – 2009. – V. 2, No 1. – P. 4–6.
7. *Astsaturov I., Ratushny V., Sukhanova A., Einarson M.B., Bagnyukova T., Zhou Y., Devarajan K., Silverman J.S., Tikhmyanova N., Skobeleva N., Pecherskaya A., Nasto R.E., Sharma C., Jablonski S.A., Serebriiskii I.G., Weiner L.M., Golemis E.A.* Synthetic lethal screen of an EGFR-centered network to improve targeted therapies // *Sci. Signal.* – 2010. – V. 3, No 140. – P. ra67.
8. *Brown A.J.* Cholesterol, statins and cancer // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* – 2007. – V. 34, No 3. – P. 135–141.
9. *He M., Kratz L.E., Michel J.J., Vallejo A.N., Ferris L., Kelley R.I., Hoover J.J., Jukic D., Gibson K.M., Wolfe L.A., Ramachandran D., Zwick M.E., Vockley J.* Mutations in the human SC4MOL gene encoding a methyl sterol oxidase cause psoriasiform dermatitis, microcephaly, and developmental delay // *J. Clin. Invest.* – 2011. – V. 121, No 3. – P. 976–984.
10. *Patra S.K.* Dissecting lipid raft facilitated cell signaling pathways in cancer // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2008. – V. 1785, No 2. – P. 182–206.

Поступила в редакцию
20.03.12

Горин Андрей Олегович – аспирант кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: andrey_gorin@bk.ru

Абрамова Зинаида Ивановна – доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии Казанского (Приволжского) федерального университета.

E-mail: ziabramova@mail.ru