

Роль ингибирования аутофагии в изменении цитотоксичности темозоломида на клеточных линиях меланомы

О.О. Рябая^{1,2}, А.Н. Иншаков¹, А.А. Мальшева¹, И.С. Абрамов^{1,3},
Н.В. Шолина¹, Д.А. Хоченков¹, Е.В. Степанова¹

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России;
Россия, 115478 Москва, Каширское шоссе, 24;

²ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Минздрава России;
Россия, 117997 Москва, ул. Островитянова, 1;

³ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН»; Россия, 119991 Москва, ул. Вавилова, 32

Контакты: Оксана Олеговна Рябая oxa2601@yandex.ru

Введение. Несмотря на современные успехи в терапии метастатической меланомы кожи, эта нозология остается крайне резистентной к существующим препаратам. Современные данные свидетельствуют о том, что опухоли могут преодолевать гибель посредством аутофагии – процесса, при котором опухолевые клетки переваривают свои собственные белки и клеточные компоненты при недостатке энергии и дефиците питательных веществ.

Цель работы – исследование влияния ингибиторов аутофагии, таких как хлорокин (CQ) и LY-294.002 (LY) на цитотоксичность темозоломида (TMZ) в клеточных линиях меланомы человека.

Материалы и методы. Работа проведена на клеточных линиях меланомы Mel Z, Mel IL и Mel MTP, полученных от пациентов, проходивших лечение в РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Оценку антипролиферативной активности TMZ в комбинации с ингибиторами аутофагии исследовали с помощью МТТ-теста и метода колониеобразования. Мы оценили изменение клеточного цикла, активацию апоптоза и изменение экспрессии основных маркеров аутофагии при комбинированной терапии.

Результаты. CQ и LY усиливали цитотоксичность TMZ и снижали число жизнеспособных колоний во всех изученных линиях, при этом оба ингибитора увеличивали накопление популяции клеток в стадии G0/G1 в линиях Mel Z, Mel IL, но не в Mel MTP. Показано также, что CQ и LY синергично активировали апоптоз во всех исследованных линиях. Анализ экспрессии матричной РНК ключевых генов аутофагии свидетельствовал о вовлечении данного процесса в цитотоксичность.

Заключение. Инактивация аутофагии на разных этапах данного процесса позволяет преодолевать резистентность к TMZ и может быть рассмотрена как перспективная мишень для терапии меланомы.

Ключевые слова: меланома, аутофагия, апоптоз, химиорезистентность, темозоломид, хлорокин, LY-294.002

DOI: 10.17650/2313-805X-2017-4-3-75-82

The role of autophagy inhibition in the enhanced cytotoxicity of temozolomide on melanoma cell lines

O.O. Ryabaya^{1,2}, A.N. Inshakov¹, A.A. Malysheva¹, I.S. Abramov^{1,3}, N.V. Sholina¹, D.A. Khochenkov¹, E.V. Stepanova¹

¹N.N. Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Ministry of Health of Russia;
24 Kashirskoye Shosse, Moscow 115478, Russia;

²N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Health of Russia; 1 Ostrovityanova St., Moscow 117997, Russia;

³V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences; 32 Vavilova St., Moscow 119991, Russia

Background. Despite advantages in treatment of metastatic melanoma it remains resistant to current therapy. Recent evidence indicates that tumor cells could overcome death through autophagy, a process that degrades cellular proteins and organelles to maintain cellular biosynthesis during nutrient deprivation or lack of energy.

Objective: to investigate the involvement of autophagy inhibitors chloroquine (CQ) and LY-294.002 (LY) in temozolomide (TMZ) cytotoxicity in human melanoma cell lines.

Materials and methods. The study was performed on patient-derived melanoma cell lines Mel Z, Mel IL and Mel MTP. The anti-proliferative activity of combined TMZ and autophagy inhibitors treatment was determined by MTT assay and colony-forming assay. Cell cycle analysis, apoptosis activation and expression analysis of key autophagy markers under combined treatment was evaluated.

Results. CQ and LY enhanced the cytotoxicity of TMZ and reduced colony formation in 3 melanoma cell lines, moreover both inhibitors increased cell population in G0/G1 phase of cell cycle in Mel Z, Mel IL cell lines, but not in Mel MTP. CQ and LY synergistically activated apoptosis in all cell lines. The matrix RNA expression analysis of key autophagy genes showed autophagy involvement in enhanced cytotoxicity.

Conclusions. Thus, autophagy inhibition on different stages of this process could overcome resistance to TMZ and be applicable as potent target in metastatic melanoma treatment.

Key words: melanoma, autophagy, apoptosis, chemoresistance, temozolomide, chloroquine, LY-294.002

Введение

Метастатическая меланома — один из наиболее агрессивных типов опухолей с плохим прогнозом течения болезни, что связано с ее высоким метастатическим потенциалом, поздней диагностикой и резистентностью к химиотерапии на поздних стадиях [1, 2].

Стандартные режимы химиотерапии включают дакарбазин, темозоломид (TMZ), цисплатин и таксаны (паклитаксел, докситаксел), которые используют по отдельности или в комбинации без значительного улучшения выживаемости больных — только 10–20 % пациентов отвечают на терапию, а медиана выживаемости составляет всего 6–8 мес [3, 4]. Таким образом, поиск новых лекарственных препаратов и вариантов их комбинаций на сегодняшний день является одним из актуальных вопросов химиотерапии злокачественных опухолей.

TMZ — липофильная молекула алкилирующего агента — производного тетразина [5]. Цитотоксичность TMZ обусловлена образованием O⁶-метилгуанина в ДНК, который замещается тиминном во время репликации, вызывая ошибки в репарации, и последующим повреждением ДНК [6]. При лечении TMZ арест клеточного цикла происходит в фазе G₂–M, но при этом лишь небольшое число клеток подвергается апоптозу [7, 8]. Несмотря на невысокую частоту ответных реакций, достоинством TMZ является легкость введения, хорошая переносимость и способность проникать через гематоэнцефалический барьер, что обеспечивает умеренную противоопухолевую активность в отношении метастазов в головной мозг [9].

Один из процессов, индуцируемых в клетках меланомы в ответ на химиотерапию, — аутофагия [1], основная функция которой заключается в поддержании межклеточного гомеостаза путем переваривания секвестрированных белков и органелл через лизосомальный путь деградации [10].

При метастатической меланоме аутофагия рассматривается как адаптивный механизм для преодоления неблагоприятных условий и недостатка питательных веществ [11, 12], поддерживая уровень аденозинтрифосфата, что приводит к росту опухоли и лекарственной устойчивости. В большинстве случаев опухоль имеет более высокий уровень аутофагии по сравнению с нормальными тканями, что коррелирует с повышенной выживаемостью опухолевых клеток и, как следствие, плохим исходом заболевания [12, 13]. Поскольку вызванная противоопухолевой терапией аутофагия способствует резистентности к ряду препаратов, особенно тех, которые нацелены на сигнальный путь PI3K/mTOR, ингибирование аутофагии может помочь

преодолеть химиорезистентность меланомы к стандартной терапии. В последние годы несколько клинических испытаний, сочетающих противоопухолевые препараты с ингибиторами аутофагии при разных типах злокачественных образований, показали, что ингибирование аутофагии вызывает уменьшение роста опухоли и увеличивает выживаемость пациентов [14–16].

Показано, что алкилирующие химиотерапевтические препараты, такой как TMZ, индуцируют процесс аутофагии в опухолевых клетках, например при глиоме и меланоме кожи [17, 18]. В некоторых случаях аутофагия задерживает апоптоз в опухолевых клетках при лечении противоопухолевыми препаратами и использование ингибиторов аутофагии — хлорокина (CQ) или LY-294.002 (LY) — усиливает действие химиотерапевтических препаратов, вызывающих аддитивную или синергическую цитотоксичность и апоптоз [19, 20].

Одним из ингибиторов аутофагии является CQ — производное хинолина противомаларийный препарат. Опухолевые клетки содержат лизосомы, которые реагируют с CQ, образуя ионизированную CQ-конъюгированную кислоту. При достижении критической концентрации CQ внутри лизосомы он нарушает их ферментативную функцию, действуя как слабое основание, и ингибирует клиренс аутофаголизосомы [21]. В недавних исследованиях показано, что противоопухолевая комбинация CQ с TMZ приводила к индукции апоптоза в клеточных линиях глиомы с диким типом p53 [22].

Результаты исследования терапевтического агента LY на ранних стадиях показали, что он неактивен в качестве единственного агента, однако его комбинация с гефитинибом эффективно снижает жизнеспособность клеток меланомы по сравнению с монотерапией, а также в комбинации с TMZ в экспериментах с глобальной U87 [23, 24].

Меланома кожи — гетерогенная опухоль, что связано с наличием различных генетических нарушений в зависимости от подтипов заболевания. Соответственно, опухоли с разными мутациями различно отвечают на одну и ту же терапию. Так, опухоли с мутациями в гене *BRAF*, которые встречаются в 50–70 % случаев меланомы [25], являются более резистентными к терапии и отличаются повышенным уровнем базальной аутофагии в опухоли [26, 27].

В настоящей работе мы оценивали эффективность ингибирования аутофагии при комбинированной терапии с TMZ на клеточных линиях меланомы с различным статусом гена *BRAF*. Также мы определяли эффективность комбинаций TMZ и CQ (ингибитор терминальной стадии процесса аутофагии) по сравне-

нию с комбинацией TMZ и LY (ингибитор PI3K). Наши данные показывают, что CQ и LY усиливают цитотоксичность TMZ и индуцируют арест клеточного цикла в фазе G0/G1. Хотя повышенная цитотоксичность не коррелировала с наличием онкогенных мутаций в гене *BRAF*, ингибирование аутофагии можно рассматривать как перспективный подход для повышения эффективности терапии TMZ.

Материалы и методы

Клеточные линии. Клетки метастатической меланомы Mel Z, Mel IL и Mel MTP были получены из опухолевого материала пациентов, проходивших лечение в РОНЦ им. Н.Н. Блохина [28]. Клеточные линии культивировали в RPMI-1640 (Gibco, США) с добавлением 10 % телячьей эмбриональной сыворотки (ТЭС, NuClone, США), 2 mM L-глутамин (Sigma, США), 10 ME/мл пенициллин-стрептомицин (ПанЭко, Россия) при температуре 37 °C в атмосфере с 5 % CO₂. Клетки поддерживали в логарифмической фазе роста постоянным пересевом культуры через 3–4 дня.

Оценка цитотоксичности. Клеточные линии (8 × 10⁴ кл/лунка) вносили в 96-луночный планшет. Через 24 ч заменяли среду и добавляли CQ (20 мкМ) или LY (5 мкМ), инкубировали в течение 1 ч. Затем добавляли TMZ (100 мкМ) и далее инкубировали в течение 48 ч при температуре 37 °C с 5 % CO₂. Затем вносили раствор МТТ (3-[4,5-диметилтриазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолийбромид, Sigma, США) в конечной концентрации 0,5 мг/мл. Образовавшиеся кристаллы диформаза элюировали с клеточных мембран ДМСО (200 мкл/лунка). Результат оценивали спектрофотометрически при длине волны 540 нм на анализаторе Multiscan FC (Thermo Scientific, США). Выживаемость клеток рассчитывали следующим образом:

$$(\text{OD экспериментальной группы} - \text{OD контрольной группы}) / \text{OD контрольной группы} \times 100 \%$$

Иммуноблоттинг. Клетки (2 × 10⁶) лизировали в буфере, содержащем 50 mM Трис-НСl, 1 mM ЭДТА, 0,5 % дезоксихолата натрия, 0,1 % SDS, 10 мкл/мл ингибирующего коктейля, 1 mM РМSE, 100 мкмоль/л ДТТ (pH 7,5) в течение 40 мин при +4 °C, центрифугировали при 13400 об/мин 15 мин при +4 °C. Концентрацию белка определяли с помощью набора Quant-IT Protein assay kit согласно протоколу производителя (Invitrogen, США) путем измерения оптической плотности на спектрофлуориметре Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Электрофорез образцов, содержащих по 40–60 мкг белка, проводили в 10 % SDS-полиакриламидном геле, белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны (Bio Rad, США) методом полусухого электропереноса в системе Trans-Blot Turbo (Bio Rad, США) при 1,3 A и 25 В в течение 7 мин. Для предотвращения неспецифической сорбции нитроцеллюлозную мембрану обрабатывали 5 % раствором сухого молока (Applichem,

Германия) в TBS-T. Мембрану инкубировали с первичными антителами LC3B (Novus Biologicals, Великобритания), p62/SQSTM1 (Cell Signaling, США) и β-актином (Sigma, США) в течение ночи при температуре +4 °C, отмывали раствором TBS-T при комнатной температуре, инкубировали 1,5 ч со вторичными антивидовыми антителами, конъюгированными пероксидазой хрена (Amersham, США). Затем добавляли хемилюминесцентный субстрат Clarity ECL (Bio Rad, США). Хемилюминесцентную реакцию регистрировали на ChemiDoc Touch (Bio Rad, США). Денситометрический анализ проводили с помощью программы Image J (NIH, США).

Определение колониеобразования. Клетки (200 тыс/лунка) высаживали в 6-луночные планшеты. К клеткам добавляли TMZ с CQ или LY и без них по описанной выше методике и инкубировали 24 ч. После этого клетки снимали, подсчитывали в камере Горяева и пересаживали на новые 6-луночные планшеты в количестве 2 тыс/лунка в триплетах и культивировали 12 дней, заменяя питательную среду каждые 3 дня. Затем колонии фиксировали в 1 % формалине, окрашивали 0,5 % раствором кристаллического фиолетового. Число колоний подсчитывали в программе Image J (NIH, США).

Цитометрическое определение апоптоза. Количество апоптотических клеток определяли окрашиванием аннексином V и йодидом пропидия (PI) с использованием набора AnnexinV-FITC (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. После инкубации с препаратами их центрифугировали, осадок ресуспендировали в 100 мкл PBS, добавляли раствор, содержащий PI и аннексин V. Клетки инкубировали при комнатной температуре в темноте в течение 15 мин, далее добавляли 350–400 мкл связывающего буфера для остановки реакции. Анализ данных (не менее 10 тыс. событий) проводили на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II с использованием программного обеспечения WinMDI.

Анализ клеточного цикла. После инкубации с препаратами клетки промывали PBS, осадок ресуспендировали в 400 мкл буфера, содержащего 50 мкг/мл PI (Becton Dickinson, США) и инкубировали в темноте при комнатной температуре в течение 15 мин. Флуоресценцию PI измеряли на проточном цитометре FACSscan (FACS Canto II, BD). Распределение клеточного цикла анализировали с использованием программного обеспечения ModFit 3.2.

Анализ экспрессии генов. Выделение РНК и полимеразная цепная реакция (ПЦР) с обратной транскрипцией в реальном времени. Через 24 ч после культивирования с химиопрепаратами клетки лизировали реагентом TRIzol (Sigma, США), как описано в литературе [29]. Для синтеза комплементарной ДНК (кДНК) брали 250 нг РНК и проводили обратную транскрипцию в конечном объеме смеси 20 мкл с использованием iScript™ Select cDNA Synthesis Kit согласно инструкции (Bio Rad, США). Реакцию проводили при температуре

42 °C в течение 70 мин. Фермент обратной транскриптазы (ревертазы) инактивировали нагреванием реакционной смеси до 85 °C в течение 5 мин. Контроль обратной транскрипции проводили при отсутствии обратной транскриптазы. В качестве матрицы для ПЦР была использована полученная кДНК. Изменение экспрессии матричной РНК (мРНК) SQSTM/p62, LC3B, Beclin 1 определяли путем нормализации образцов к референсным генам (β -актин и GAPDH). Количественную ПЦР в реальном времени проводили на CFX96 Real-Time System (Bio Rad, США) с применением коммерческой смеси iTaq® Universal SYBR® Green Supermix согласно протоколу производителя (Bio Rad, США). ПЦР-смесь содержала 5 пмоль праймеров SQSTM/p62, LC3B, Beclin 1, GAPDH и β -актин и 2 мкл (50 нг) кДНК. Были использованы следующие праймеры: GAPDH: 5'-GGGGAGCCAAAAGGGTCATCATCT-3', 5'-GACGCCTGCTTACCACCTTCTTG-3' (212 пар оснований (п.о.)); β -актин: 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3', 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTC-3' (201 п.о.); Beclin 1: 5'-GAGTTTCAAGATCCTGGACCGTGTCA-3' (282 п.о.), 5'-CTGTTGGCACTTCTGTGGACATCA-3'; LC3B: 5'-GCCGCCGCCAGATCCCT-3', 5'-GACGCTGACCATGCTGTGTCG-3' (140 п.о.); SQSTM/p62: 5'-GGCCGCCCTGTTCCCG-3', 5'-GCCGGCACTTTTTTCTCTT-3' (167 п.о.). Условия амплификации: инициация 5 мин при температуре 95 °C, затем 39 циклов: 5 с – 95 °C, 30 с – 60 °C и 30 с – 72 °C. После 39-го цикла проводили анализ кривых плавления путем детекции флуоресценции при постепенном нагревании образцов до 95 °C с шагом 0,5 °C/с. Все образцы анализировали в дупле в 96-луночных низкопрофильных планшетах или стрипах. Результаты количественной ПЦР с обратной транскрипцией представлены параметром $\Delta\Delta C_t$.

Статистический анализ. Все эксперименты были выполнены в 3 повторах. Статистический анализ проводили с использованием программы Microsoft Excel, а графический интерфейс составлен с помощью программного обеспечения GraphPad Prism v.5.0. (GraphPad, США). Для достоверности различий использовали *t*-критерий Стьюдента. Значение $p \leq 0,05$ считалось статистически достоверным.

Результаты и обсуждение

Цитотоксичность комбинаций TMZ с ингибиторами аутофагии. Изучение действия TMZ в комбинации с ингибиторами аутофагии проводили на 3 клеточных линиях меланомы с разным молекулярно-генетическим статусом гена *BRAF*, который был определен нами ранее [30]: Mel Z (V600E), Mel IL (V600K), Mel MTP – дикий тип. Мы определили величину концентрации полумаксимального ингибирования (IC_{50}) TMZ у всех клеточных линий, которая составила 150 ± 10 мкМ ($p < 0,05$) для линий Mel Z, Mel MTP и 200 ± 13 мкМ ($p < 0,05$) для линии Mel IL. Для дальнейших исследований использовали TMZ в нетоксической

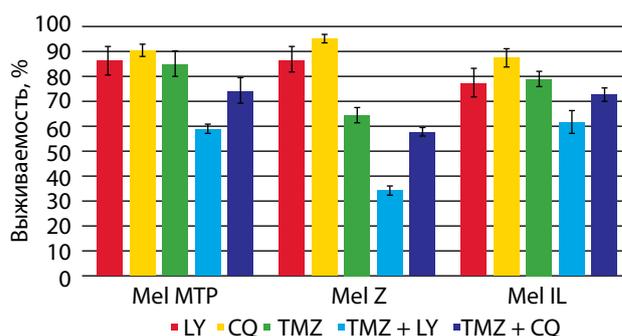


Рис. 1. Ингибирование аутофагии 20 мкМ хлорокина (CQ) или 5 мкМ LY-294.002 (LY) увеличивает цитотоксичность 100 мкМ темозоломида (TMZ) на клеточных линиях меланомы Mel Z, Mel IL и Mel MTP ($p < 0,05$)

концентрации 100 мкМ. Чтобы исключить отдельное влияние токсичности ингибиторов, в эксперимент также были взяты нетоксичные дозы CQ (20 мкМ) и LY (5 мкМ), которые значимо не влияли на клеточную пролиферацию.

Влияние ингибиторов аутофагии на цитотоксичность TMZ исследовали при предварительной инкубации клеток в течение 1 ч с 20 мкМ CQ и 5 мкМ LY, после чего добавляли 100 мкМ TMZ. Все комбинации демонстрировали усиленный антипролиферативный эффект по сравнению с монотерапией TMZ (рис. 1). Использование комбинации 20 мкМ CQ и 100 мкМ TMZ приводило к 10–15 % ингибированию роста для всех клеточных линий, комбинации 100 мкМ TMZ и 5 мкМ LY – к 30 % увеличению гибели клеток Mel Z, Mel MTP и 15 % увеличению гибели Mel IL. При этом цитотоксичность комбинаций не зависела от мутаций в гене *BRAF*.

Чтобы определить роль аутофагии в цитотоксическом эффекте TMZ, меланомные клетки культивировали в присутствии TMZ с CQ или LY и без них в течение 24 ч в ряде экспериментов на колониеобразование. Применение TMZ в монорежиме не влияло на жизнеспособность клеток Mel IL – имело место незначительное увеличение числа колоний. Комбинация TMZ + LY снижала на 10 % количество колоний относительно контроля, а TMZ + CQ – на 25 % ($p = 0,05$). Число колоний MEL Z уменьшалось на 30 % при применении TMZ, добавление LY не оказывало действия на жизнеспособность клеток. Комбинация TMZ + CQ снижала количество колоний на ~60 % по сравнению с контролем ($p < 0,05$) (рис. 2). Следует отметить, что под действием как TMZ, так и его комбинаций с CQ/LY клетки линии Mel MTP не образовывали жизнеспособных колоний (данные не представлены).

Влияние ингибиторов аутофагии на клеточный цикл клеточных линий меланомы. CQ блокирует аутофагию, повышая уровень внутрилизосомного pH и тем самым нарушая функцию лизосомальных гидролаз [31]. LY является ингибитором PI3K, участвующим в инициации процесса аутофагии [24, 32]. Мы наблюдали,

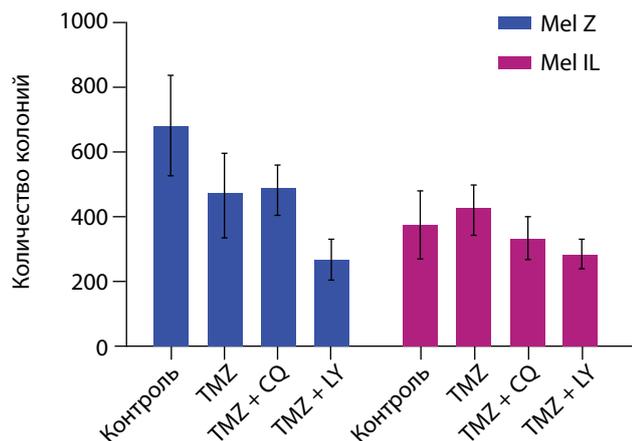


Рис. 2. Колониеобразование под действием темозоломида (TMZ) и его комбинации с хлорокином (CQ) или LY-294.002 (LY)

что при TMZ-терапии происходит арест клеточного цикла в фазе G0/G1 в 3 исследуемых линиях. Обработка клеток TMZ и CQ увеличивала популяцию клеток в фазе G0/G1 на клеточных линиях с мутацией V600 – Mel Z (54,9 % (TMZ) против 71,4 % (TMZ + CQ)) и Mel IL (56,4 % (TMZ) против 78,8 % (TMZ + CQ)), но никаких изменений в WT Mel MTP не наблюдалось. Комбинация TMZ и LY приводила к более значительному

накоплению клеток в фазе G0/G1 по сравнению с монотерапией TMZ в клеточных линиях Mel Z (54,9 % против 74,0 %) и Mel IL (56,40 % против 85,23 %) в отличие от комбинации TMZ и CQ. TMZ с CQ или LY не влиял на клеточный цикл Mel MTP (рис. 3). Сами ингибиторы также не изменяли распределение клеток по циклу (данные не представлены). Недавно S.W. Lee и соавт. продемонстрировали, что комбинированное лечение TMZ с CQ не меняло фазу ареста G2–M, но увеличивало популяцию суб-G1 в клетках глиобластомы U87 [22].

Активация апоптоза под действием комбинации TMZ с ингибиторами аутофагии. Для изучения влияния комбинации препаратов на апоптотическую гибель клеток мы окрашивали клеточные линии с помощью аннексина V/PI и анализировали цитометрически. Уровень апоптотических клеток в случае применения монотерапии варьировал: TMZ индуцировал апоптоз в 24,0 % клеток линии Mel MTP, в 12,6 % – Mel Z и в 9,0 % – Mel IL. Комбинированное лечение с CQ повышало на 15–20 % количество апоптотических клеток Mel Z, Mel IL и Mel MTP. Предварительная обработка LY менее значимо увеличивала гибель клеток путем апоптоза в линиях Mel Z и Mel IL. Клетки линии Mel MTP были

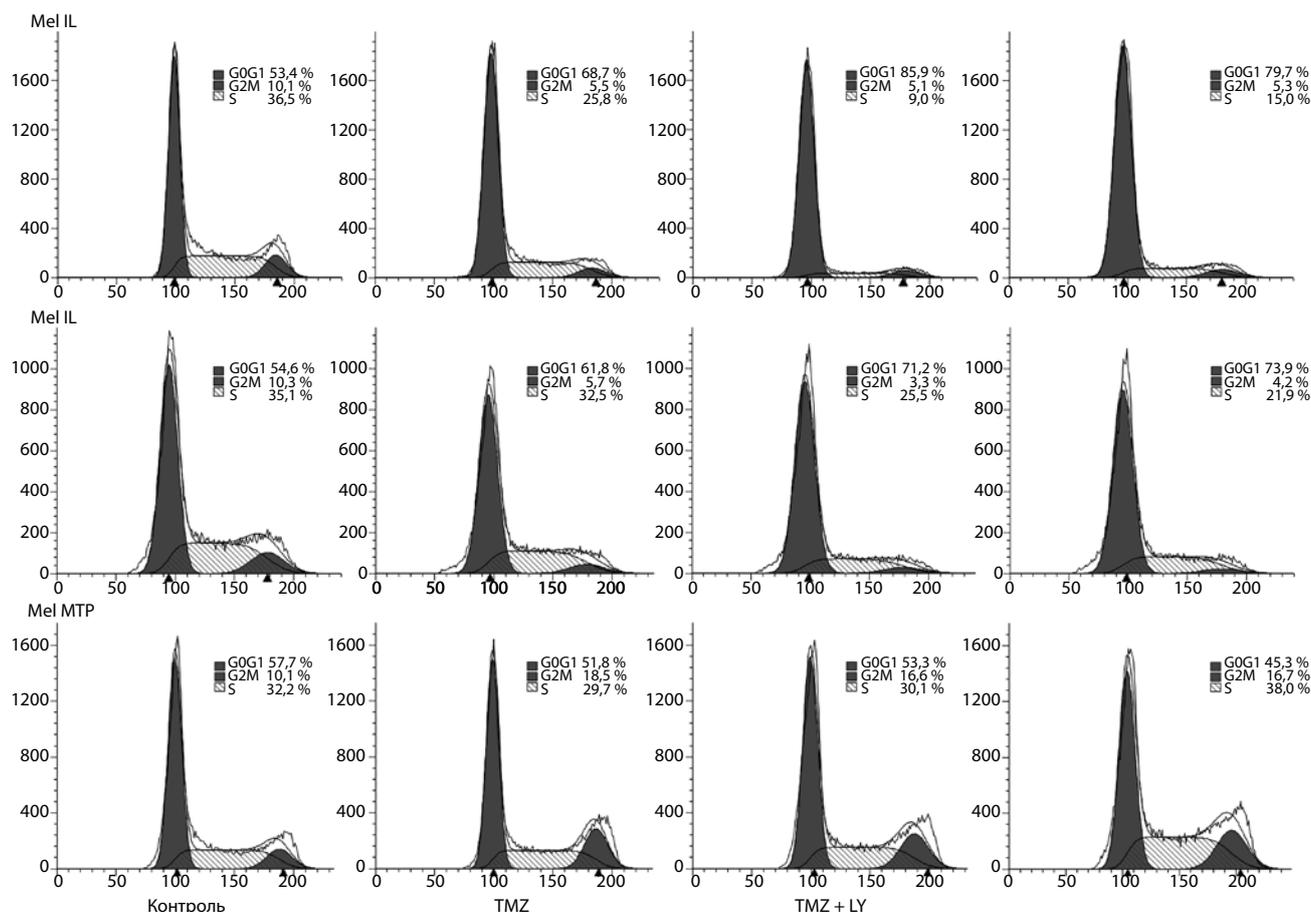


Рис. 3. Влияние 100 мкМ темозоломида (TMZ) и его комбинаций с 20 мкМ хлорокина (CQ) или 5 мкМ LY-294.002 (LY) на распределение клеток линий Mel Z, Mel IL и Mel MTP по фазам клеточного цикла (CV 5 %)

Апоптотическая активность TMZ и/или ингибиторов аутофагии на клеточных линиях меланомы. Окраска аннексином V/PI после 24-часовой инкубации с препаратами ($CV < 5\%$; $p < 0,05$)

Вид терапии	Уровень апоптоза, %		
	Mel Z	Mel IL	Mel MTP
TMZ	12,6	9,0	24,0
CQ	8,3	5,3	15,5
LY	4,5	1,5	14,5
TMZ + CQ	27,6	28,3	39,5
TMZ + LY	20,1	14,2	39,3

Примечание. TMZ – темозоломид; CQ – хлорокин; LY – LY-294.002.

чувствительны к комбинации TMZ и LY (24,0 % против 39,3 %; $p < 0,05$) (см. таблицу).

Таким образом, TMZ-индуцированная аутофагия защищает меланомные клетки от запуска апоптоза и инактивация аутофагии впоследствии увеличивает гибель клеток при использовании TMZ. Комбинированный эффект TMZ и CQ опосредуется увеличением апоптоза в клетках меланомы, однако активация апоптоза не зависит от мутаций в гене *BRAF*.

Мы изучили влияние комбинированной терапии TMZ и CQ или LY на активацию аутофагии в клеточных линиях меланомы по уровню экспрессии мРНК *Beclin 1*, *LC3B* и *p62*. TMZ является индуктором аутофагии [24], что было подтверждено увеличением уровня относительной экспрессии мРНК *Beclin 1* в клетках меланомы, а добавление ингибиторов аутофагии, напротив, уменьшало уровень *Beclin 1*. Течение процесса аутофагии в клетках можно изучать путем соотношения уровня мРНК *LC3B*/II и *p62*/*SQSTM1* [33]. Последнее связывает убиквитинированные белки и доставляет их в аутофагосомы для расщепления. При контакте с аутофагосомой *p62* связывается с *LC3B*II и сам впоследствии расщепляется в аутолизосоме, поэтому его уровень может отражать уровень аутофагии: при повышении уровня *LC3B*/II снижается содержание *p62*/*SQSTM1* в клетках [34, 35]. Мы продемонстрировали, что под действием TMZ уровень экспрессии мРНК *LC3B*/II был увеличен в клеточных линиях Mel Z и Mel IL, но не в Mel MTP, а транскрипционная активность *p62*/*SQSTM1* была снижена (рис. 4). При добавлении CQ или LY отмечали повышение уровня транскрипционной активности *p62*/*SQSTM1* одновременно со снижением экспрессии *LC3B*/II, что доказывает подавление аутофагии в клетках.

Оценивая переход *LC3*-I в *LC3*-II методом иммуноблоттинга (рис. 5), мы показали, что монотерапия TMZ приводила к накоплению *LC3B*/II в 3 исследуемых кле-

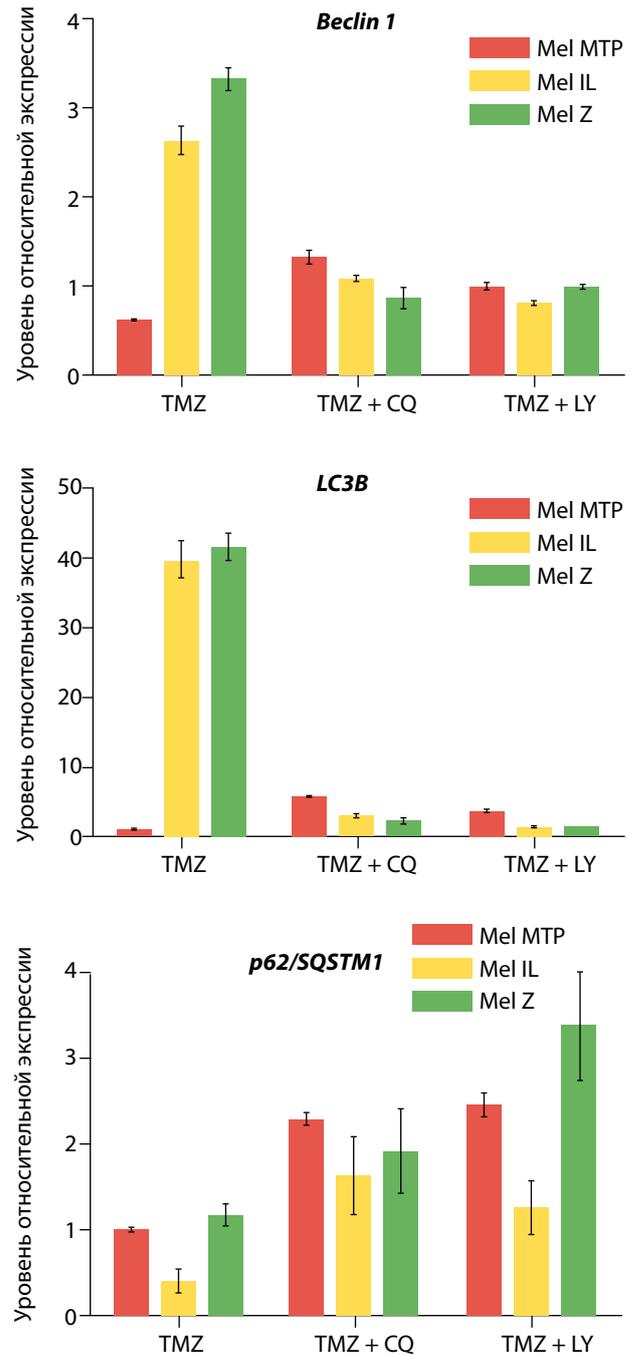


Рис. 4. Изменение экспрессии матричной РНК генов *Beclin 1*, *LC3B* и *p62/SQSTM1* после 24-часовой культивации с 100 мкМ темозоломида (TMZ) с 20 мкМ хлорокина (CQ) или 5 мкМ LY-294.002 (LY) и без них

точных линиях, а его комбинация с CQ увеличивала экспрессию белка *LC3B*/II, блокируя расщепление аутолизосом. Добавление LY к TMZ не показывало аналогичных результатов на уровень *LC3B*/II в клетках. При этом экспрессия *p62*/*SQSTM1* при комбинированной терапии TMZ и CQ повышалась только у линий Mel IL и Mel MTP.

Несмотря на то, что *p62*/*SQSTM1* вовлечен в процесс аутофагии в качестве «транспортировщи-

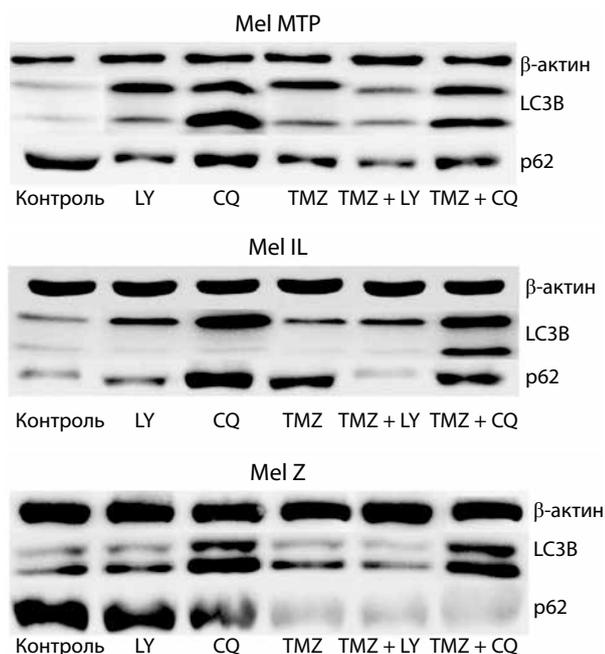


Рис. 5. Иммуноблоттинг экспрессии LC3B и p62 после комбинированной терапии темозоломида (TMZ) и хлорокина (CQ) или LY-294.002 (LY) на клеточных линиях меланомы

ка» материала для расщепления, его функции в клетке на этом не ограничиваются [36]. Повышенный уровень p62 по принципу положительной обратной связи ведет к увеличению количества активных форм кислорода в клетке, усиленной индукции фолдинга белков в ответ на ЭР-стресс и ДНК-повреждения [36].

Заключение

Таким образом, комбинированная терапия при низких концентрациях может эффективно подавлять рост клеток меланомы. Мы показали, что CQ и LY снижают TMZ-индуцированную аутофагию, тем самым усиливая ингибирующее действие на клеточные линии меланомы. TMZ в сочетании с CQ или LY синергически ингибирует рост за счет увеличения ареста клеточного цикла в фракции G0/G1 в клетках Mel Z и Mel IL, несущих мутацию *BRAF*, но не в Mel MTP. Однако взаимодействие между аутофагией и мутациями *BRAF* пока остается неясным. Наше исследование свидетельствует о том, что комбинация TMZ и исследуемых ингибиторов может увеличивать противоопухолевую активность по сравнению с монотерапией TMZ при лечении злокачественной меланомы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. Authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 14-35-00 107-П).

Financing. The study was supported by the Russian Science Foundation (grant No. 14-35-00 107-П).

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Saito R.F., Tortelli T.C. Jr, Jacomassi M.D. et al. Emerging targets for combination therapy in melanomas. *FEBS Lett* 2015;589(22):3438–48.
- Soura E., Eliades P.J., Shannon K. et al. Hereditary melanoma: update on syndromes and management: emerging melanoma cancer complexes and genetic counseling. *J Am Acad Dermatol* 2016;74(3):411–20.
- Luke J., Schwartz G. Chemotherapy in the management of advanced cutaneous malignant melanoma. *Clin in Dermat* 2013;31(3):290–7.
- Yeramian A., Sorolla A., Velasco A. et al. Inhibition of activated tyrosine kinases by Sunitinib induces growth arrest and sensitizes melanoma cells to Bortezomib by blocking Akt pathway. *Int J Cancer* 2012;130:967–78.
- Zhang J., Stevens M.F., Bradshaw T.D. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr Mol Pharmacol* 2012;5(1):102–14.
- Denny B.J., Wheelhouse R.T., Stevens M.F. et al. NMR and molecular modeling investigation of the mechanism of activation of the antitumor drug temozolomide and its interaction with DNA. *Biochemistry* 1994;33(31):9045–51.
- Hirose Y., Berger M.S., Pieper R.O. p53 effects both the duration of G2/M arrest and the fate of temozolomide-treated human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2001;61(5):1957–63.
- Kanzawa T., Germano I.M., Komata T. et al. Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 2004;1(4):448–57.
- Rangwala R., Leone R., Chang Y.C. et al. Phase I trial of hydroxychloroquine with dose-intense temozolomide in patients with advanced solid tumors and melanoma. *Autophagy* 2014;10(8):1369–79.
- Mathew R., Karantza-Wadsworth V., White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007;7(12):961–7.
- Maes H., Martin S., Verfaillie T., Agostinis P. Dynamic interplay between autophagic flux and Akt during melanoma progression in vitro. *Exp Dermatol* 2014;23(2):101–6.
- Lazova R., Camp R.L., Klump V. et al. Punctate LC3B expression is a common feature of solid tumors and associated with proliferation, metastasis, and poor outcome. *Clin Cancer Res* 2012;18(2):370–79.
- Guo J.Y., Chen H.Y., Mathew R. et al. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* 2011;25(5):460–70.
- Thorburn A., Morgan M.J. Targeting autophagy in BRAF mutant tumors. *Cancer Discov* 2015;5(4):353–4.
- National Library of Medicine US. Clinical trials investigating the use of chloroquine in cancer: NCT01575782, NCT00969306, NCT01446016, NCT01023477, NCT01469455, NCT01438177, NCT01727531, NCT00224978. Clinicaltrials.gov: Bethesda, MD, 2013.

16. National Library of Medicine US. Clinical trials investigating the use of hydroxychloroquine in cancer: NCT01273805, NCT00933803, NCT01006369, NCT01480154, NCT00765765, NCT00728845, NCT01266057, NCT00813423, NCT01494155, NCT01023737, NCT00786682, NCT00726596, NCT01417403, NCT00809237, NCT00909831, NCT00714181, NCT00714181, NCT01206530, NCT01026844, NCT00486603, NCT01649947, NCT00977470, NCT01506973, NCT01128296, NCT00568880, NCT01144169, NCT00962845, NCT01292408, NCT01689987, NCT01550367, NCT01396200, NCT01227135, NCT01602588, NCT01510119, NCT00031824, NCT01548768, NCT00908089, NCT01687179, NCT00405275, NCT00771056, NCT01709578. Clinicaltrials.gov: Bethesda, MD, 2013.
17. Katayama M., Kawaguchi T., Berger M.S., Pieper R.O. DNA damaging agent-induced autophagy produces a cytoprotective adenosine triphosphate surge in malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 2007;14(3):548–58.
18. Ma X.H., Piao S., Wang D. et al. Measurements of tumor cell autophagy predict invasiveness, resistance to chemotherapy, and survival in melanoma. *Clin Cancer Res* 2011;17(10):3478–89.
19. Amaravadi R.K., Yu D., Lum J.J. et al., Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. *J Clin Invest* 2007;117(2):326–36.
20. Guo X.L., Li D., Hu F. et al. Targeting autophagy potentiates chemotherapy-induced apoptosis and proliferation inhibition in hepatocarcinoma cells. *Cancer Lett* 2012;320(2):171–9.
21. Carew J.S., Nawrocki S.T., Cleveland J.L. Modulating autophagy for therapeutic benefit. *Autophagy* 2007;3(5):464–7.
22. Lee S.W., Kim H.K., Lee N.H. et al. The synergistic effect of combination temozolomide and chloroquine treatment is dependent on autophagy formation and p53 status in glioma cells. *Cancer Lett* 2015;360(2):195–204.
23. Carlino M.S., Todd J.R., Gowrishankar K. et al. Differential activity of MEK and ERK inhibitors in BRAF inhibitor resistant melanoma. *Mol Oncol* 2014;8(3):544–54.
24. Yang Y.P., Hu L.F., Zheng H.F. et al. Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacol Sin* 2013;34(5):625–35.
25. Davies H., Bignell G.R., Cox C. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* 2002;417(6892):949–54.
26. Armstrong J.L., Corazzari M., Martin S. et al. Oncogenic B-RAF signaling in melanoma impairs the therapeutic advantage of autophagy inhibition. *Clin Cancer Res* 2011;17(8):2216–26.
27. Ma X.H., Piao S.F., Dey S. et al. Targeting ER stress-induced autophagy overcomes BRAF inhibitor resistance in melanoma. *J Clin Invest* 2014;124(3):1406–17.
28. Mikhaylova I.N., Kovalevsky D.A., Morozova L.F. et al. Cancer/testis genes expression in human melanoma cell lines. *Melanoma Res* 2008;18(5):303–13.
29. Miracco C., De Nisi M.C., Arcuri F. et al. Macrophage migration inhibitory factor protein and mRNA expression in cutaneous melanocytic tumours. *Int J Oncol* 2006;28(2):345–52.
30. Рябая О.О., Цыганова И.В., Сидорова Т.А. и др. Влияние активирующих мутаций V600 гена *B-RAF* на способность клеток меланомы к аутофагии. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи 2013;(3):68–72. [Ryabaya O.O., Tsyganova I.V., Sidorova T.A. et al. Effect of Activating V600 mutations of the *B-RAF* gene on the ability of melanoma cells to autophagy. Sarkomy kostey, myagkikh tkaney i opukholi kozhi = Sarkomas of Bones, Soft Tissues and Skin Tumors 2013;(3):68–72. (In Russ.)].
31. Kimura T., Takabatake Y., Takahashi A., Isaka Y. Chloroquine in cancer therapy: a double-edged sword of autophagy. *Cancer Res* 2013;73(1):3–7.
32. Diez H., Benitez M.J., Fernandez S. et al. Class I PI3-kinase or Akt inhibition do not impair axonal polarization, but slow down axonal elongation. *Biochim Biophys Acta* 2016;1863(11):2574–83.
33. Klionsky D.J., Abdelmohsen K., Abe A. et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edn). *Autophagy* 2016;12(1):1–222.
34. Mathew R., Karp C.M., Beaudoin B. et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009;137(6):1062–75.
35. Pankiv S., Clausen T.H., Lamark T. et al. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007;282(33):24131–45.
36. Amaravadi R., Kimmelman A.C., White E. Recent insights into the function of autophagy in cancer. *Genes Dev* 2016;30(17):1913–30.