

Проблема химиорезистентности PRAME-экспрессирующей клетки меланомы и способ ее преодоления с помощью бортезомиба

В.А. Мисюрин¹, Д.В. Калениченко², А.А. Рудакова¹, Ю.П. Финашутина¹, Н.А. Лыжко¹, В.В. Тихонова¹, Л.А. Кесаева¹, О.Н. Солопова¹, А.Е. Мисюрина³, А.Н. Великанов⁴, М.А. Барышникова¹, А.В. Мисюрин¹

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

²ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина»; Россия, 109472 Москва, ул. Скрябина, 23;

³ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России; Россия, 125167 Москва, Новый Зыковский проезд, 4;

⁴ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова»; Россия, 119991 Москва, Ленинские горы, 1

Контакты: Всеволод Андреевич Мисюрин vsevolod.misyurin@gmail.com

Введение. В настоящее время показано, что активность раково-тестикулярного гена PRAME, характерная только для опухолевой клетки, может контролироваться сигнальным каскадом NF-κB. Белок PRAME увеличивает жизнеспособность опухолевой клетки. Отсюда следует, что стрессовые условия могут повышать уровень экспрессии PRAME и увеличивать жизнеспособность опухолевой клетки. Мы предположили, что данный феномен определяет химиорезистентность PRAME-экспрессирующей клетки. Эту резистентность можно преодолеть ингибиторами NF-κB-пути, такими как бортезомиб.

Материалы и методы: инкубирование в течение суток клеток меланомы линии A875 с цисплатином, бортезомибом и дексаметазоном, смесью цисплатина и бортезомиба, а также со смесью цисплатина и дексаметазона. Для оценки цитотоксичности применяемых препаратов использовали МТТ-тест, уровня экспрессии гена PRAME – полимеразную цепную реакцию в реальном времени. Анализ данных проводили с помощью критерия Вилкоксона для связанных выборок.

Результаты. Установлено, что цисплатин и дексаметазон увеличивают уровень экспрессии PRAME по сравнению с клетками меланомы линии A875, не подвергнутыми действию экспериментальных веществ ($p < 0,03$). Добавление дексаметазона к цисплатину снижает цитотоксический эффект последнего. Бортезомиб обладает цитотоксическим действием, но практически не увеличивал активность гена PRAME ($p = 0,12$). В клетках, инкубированных со смесью цисплатина и бортезомиба, активность гена PRAME находилась на более низком уровне по сравнению с клетками, инкубированными с цисплатином ($p = 0,0277$).

Заключение. Результаты экспериментов показывают, что увеличение уровня экспрессии гена PRAME снижает чувствительность клеток к цитотоксическому действию цисплатина. Активность PRAME увеличивается в условиях стресса. Применение бортезомиба препятствует росту уровня экспрессии PRAME и делает опухолевую клетку более уязвимой к цитотоксическим агентам. С другой стороны, дексаметазон может увеличить резистентность PRAME-экспрессирующей клетки к цитотоксическому воздействию цисплатина.

Ключевые слова: PRAME, меланома, цисплатин, бортезомиб, дексаметазон, лекарственная резистентность

Для цитирования: Мисюрин В.А., Калениченко Д.В., Рудакова А.А. и др. Проблема химиорезистентности PRAME-экспрессирующей клетки меланомы и способ ее преодоления при помощи бортезомиба. Успехи молекулярной онкологии 2018;5(4):131–4.

DOI: 10.17650/2313-805X-2018-5-4-131-134

Chemoresistance of PRAME-expressing melanoma cell can be resolved with help of bortezomib

V.A. Misyurin¹, D.V. Kalenichenko², A.A. Rudakova¹, Yu.P. Finashutina¹, N.A. Lyzhko¹, V.V. Tikhonova¹, L.A. Kesaeva¹, O.N. Solopova¹, A.E. Misyurina³, A.N. Velikanov⁴, M.A. Baryshnikova¹, A.V. Misyurin¹

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

²K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology; 23 Akademika Skryabina St., Moscow 109472, Russia;

³National Research Center for Hematology, Ministry of Health of Russia; 4 Novyy Zykovskiy Proezd, Moscow 125167, Russia;

⁴M.V. Lomonosov Moscow State University; 1 Leninskie Gory, Moscow 119991, Russia

Background. PRAME gene spontaneous expression is frequently observed in a cancer cell. The protein encoded by this gene increases the viability of tumour cell. NF-κB signalling pathway takes part in PRAME upregulation. It proposes, that stress conditions may increase the expression level of PRAME in the tumour cell and increase cell's viability after it. We hypothesized that this phenomenon determines chemoresistance of PRAME-expressing cell, which can be overcome by NF-κB inhibitors, such as bortezomib.

Materials and methods. We incubated A875 melanoma cells with cisplatin, bortezomib and dexamethasone, as well as with a mixture of cisplatin with bortezomib and cisplatin with dexamethasone within 24 hours. To assess the cytotoxicity of these combinations MTT-test was used. For evaluation of PRAME expression level, real-time polymerase chain reaction was used. All data were analyzed with Wilcoxon test for coupled samples.

Results. It was found that cisplatin and dexamethasone increased an expression level of PRAME compared to control ($p < 0.03$). The addition of dexamethasone to cisplatin reduced cytotoxic effect of cisplatin. Bortezomib has a cytotoxic effect, but it did not increase the activity of PRAME gene ($p = 0.12$). PRAME gene activity in cells incubated with a mixture of cisplatin and bortezomib was observed at a lower level in comparison with cells incubated with cisplatin ($p = 0.0277$).

Conclusion. The results of experiments show that an increase of PRAME expression level reduces the sensitivity of melanoma cells to the cytotoxic effect of cisplatin. PRAME activity increases under stress conditions. Using of bortezomib can inhibit the growth of PRAME expression and makes the tumour cell more vulnerable to cytotoxic agents. On the other hand, dexamethasone may increase a resistance of PRAME-expressing cell to cytotoxic effects.

Key words: PRAME, melanoma, cisplatin, bortezomib, dexamethasone, drug resistance

For citation: Misyurin V.A., Kalenichenko D.V., Rudakova A.A. et al. Chemoresistance of PRAME-expressing melanoma cell can be resolved with help of bortezomib. *Uspekhi molekulyarnoy onkologii = Advances in Molecular Oncology* 2018;5(4):131–4.

Введение

Раково-тестикулярный ген *PRAME* экспрессируется при онкологических и онкогематологических заболеваниях, но не активен в нормальной клетке. Свойства белка *PRAME* таковы, что увеличивают жизнеспособность опухолевой клетки. *PRAME* блокирует TRAIL-опосредованный апоптоз, защищает клетку от отравления солями тяжелых металлов, блокирует дифференцировку и увеличивает скорость пролиферации [1–5]. При лечении множества онкологических заболеваний гиперэкспрессия *PRAME* становится проблемой, так как она связана с прогрессией и неблагоприятным исходом [5].

Проблема *PRAME*-опосредованной лекарственной резистентности усугубляется тем, что активность *PRAME* у больных наблюдается чрезвычайно часто — примерно в каждом 2-м случае [6]. Очевидно, что для нивелирования последствий экспрессии *PRAME* нужно найти способ ее блокировки на уровне транскрипции РНК или функций зрелого белка.

Возможностью для снижения уровня активности гена *PRAME* может быть блокирование внутриклеточных сигнальных путей. Так, в культуре трансформированных клеток HL60 экспрессия *PRAME* может быть опосредована провоспалительными сигнальными путями, в том числе, возможно, и NF-κB, так как промотор гена *PRAME* имеет последовательности, распознающиеся субъединицами RelA комплекса NF-κB [7]. Некоторые препараты способны блокировать инициацию передачи сигнала по NF-κB-зависимому пути. Один из таких препаратов — дексаметазон, применяемый для купирования воспаления [8]. Известно также, что белок *PRAME* является компонентом комплекса убиквитинлигазы E2 [7]. Функция *PRAME* в этом комплексе заключается в распознавании белковых субстратов, которые убиквитинируются и деградируют в протеасоме. Несмотря на то что эти субстраты пока неизвестны, можно предположить, что данное свойство позволяет опухолевой клетке активно перерабатывать поврежденные белки, что снижает ее

чувствительность к химиопрепаратам. Таким образом, использование ингибиторов протеасом может подавить *PRAME*-опосредованную деградацию белков. В результате жизнеспособность *PRAME*-экспрессирующей клетки снизится. Действительно, бортезомиб, ингибирующий функции протеасом, улучшает прогноз *PRAME*-экспрессирующих больных множественной миеломой. Терапия, не включающая бортезомиб, оказывается менее результативной при лечении таких больных [9]. Бортезомиб интересен также тем, что стабилизирует IκB, который, в свою очередь, препятствует активации NF-κB [10].

Как дексаметазон, так и бортезомиб можно сочетать с традиционными химиопрепаратами, в том числе с цисплатином. В данном исследовании мы определили чувствительность клеток меланомы линии A875 (пример опухоли, для которой типична гиперэкспрессия *PRAME*) [11] к различным сочетаниям дексаметазона (Эллара, Россия), бортезомиба (Ф-Синтез, Россия) и цисплатина (Цисплатин-РОНЦ, Россия), ожидая, что блокирование функций *PRAME* на уровне матричной РНК или белка увеличит цитотоксический эффект цисплатина.

Материалы и методы

На 1-м этапе методом МТТ-теста мы определяли концентрацию перечисленных веществ, при которой в течение суток инкубирования погибало 50 % клеток A875. Для цисплатина эта концентрация составила 20 мкг/мл, для бортезомиба — 86 мкг/мл. Дексаметазон оказался не токсичным для этих клеток. Более того, инкубирование клеток с дексаметазоном увеличивало скорость их роста примерно на 10 %.

На следующем этапе мы определили, какое влияние оказывают используемые препараты на уровень экспрессии гена *PRAME* в опухолевой линии через сутки инкубирования. Концентрация цисплатина при инкубировании составила 20 мкг/мл, бортезомиба — 10 и 0,4 мкг/мл, дексаметазона — 100 мкг/мл. Выбор концентрации обоснован использованием

Эффекты от воздействия химиопрепаратов

Effects of chemotherapy drug interactions

Тип воздействия Interaction type	Медиана уровня экспрессии <i>PRAME</i> в процентах относительно контрольного гена <i>ABL</i> Median <i>PRAME</i> expression level in percent relative to <i>ABL</i> control gene	Сравнение с контролем, <i>p</i> Comparison with control, <i>p</i>	Доля погибших клеток, % Fraction of dead cells, %
Нет (контроль) No (control)	5308		2
Цисплатин, 20 мкг/мл Cisplatin, 20 µg/ml	42 900	0,0277	50
Бортезомиб, 10 мкг/мл Bortezomib, 10 µg/ml	6990	0,1158	24
Бортезомиб, 0,4 мкг/мл Bortezomib, 0.4 µg/ml	6372	0,2864	5
Дексаметазон, 100 мкг/мл Dexamethasone, 100 µg/ml	44 941	0,0277	1
Цисплатин, 20 мкг/мл + бортезомиб, 10 мкг/мл Cisplatin, 20 µg/ml + bortezomib, 10 µg/ml	22 130	0,0277	59
Цисплатин, 20 мкг/мл + бортезомиб, 0,4 мкг/мл Cisplatin, 20 µg/ml + bortezomib, 0.4 µg/ml	21 080	0,0464	54
Цисплатин, 20 мкг/мл + дексаметазон, 100 мкг/мл Cisplatin, 20 µg/ml + dexamethasone, 100 µg/ml	84 260	0,0277	44

цисплатина в дозе IC_{50} дальнейших экспериментов, а сниженная концентрация бортезомиба подобрана для возможности сочетать его с цисплатином и сохранить при этом достаточное количество клеток. Концентрация дексаметазона соответствовала той, которая достигается в крови при введении препарата больному. Согласно данным количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени цисплатин и дексаметазон значительно увеличивают уровень экспрессии гена *PRAME* (см. таблицу). После инкубирования с бортезомибом активность *PRAME* менялась незначимо.

На заключительном этапе эксперимента мы проверили эффекты сочетания цисплатина с бортезомибом и дексаметазоном. Инкубирование линии A875 с цисплатином и бортезомибом приводило к гибели большего количества клеток и к менее выраженному увеличению уровня экспрессии *PRAME* по сравнению с клетками, инкубированными только с цисплатином ($p = 0,0303$). С другой стороны, добавление дексаметазона и цисплатина снижало количество погибших клеток и вдвое увеличивало активность *PRAME* ($p = 0,0277$) по сравнению с результатами, полученными после инкубирования с цисплатином (см. таблицу).

Результаты

Таким образом, стрессовые условия, такие как повреждение самих опухолевых клеток с помощью цисплатина, приводят к увеличению уровня экспрессии гена *PRAME*. В результате гиперэкспрессия *PRAME* снижает чувствительность опухолевой клетки к стрессу в целом и химиопрепаратам в частности. Это позволяет *PRAME*-положительным клеткам опухоли очень быстро приобретать резистентность к химиопрепаратам не путем естественного отбора новых клонов, а увеличением уровня экспрессии *PRAME* в уже существующих. Это следует из увеличения уровня экспрессии *PRAME* на порядок, в то время как погибла только половина клеток.

Заключение

Наиболее важное следствие наших результатов — возможность не допускать увеличения уровня экспрессии гена *PRAME* с помощью бортезомиба — известного и достаточно доступного препарата. Поскольку экспрессия *PRAME* не является обязательной для нормальной соматической клетки, отрицательных для организма последствий блокирования функций белка ожидать не следует, в то время как резистентность опухолевой клетки не будет увеличиваться.

Л И Т Е Р А Т У Р А / R E F E R E N C E S

- Epping M.T., Wang L., Plumb J.A. et al. A functional genetic screen identifies retinoic acid signaling as a target of histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104(45):17777–82. DOI: 10.1073/pnas.0702518104. PMID: 17968018.
- Passeron T., Valencia J.C., Namiki T. et al. Upregulation of SOX9 inhibits the growth of human and mouse melanomas and restores their sensitivity to retinoic acid. *J Clin Invest* 2009;119(4):954–63. DOI: 10.1172/JCI34015. PMID: 19273910.
- Oehler V.G., Guthrie K.A., Cummings C.L. et al. The preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) inhibits myeloid differentiation in normal hematopoietic and leukemic progenitor cells. *Blood* 2009;114(15):3299–308. DOI: 10.1182/blood-2008-07-170282. PMID: 19625708.
- Kim H.L., Seo Y.R. Molecular and genomic approach for understanding the gene-environment interaction between Nrf2 deficiency and carcinogenic nickel-induced DNA damage. *Oncol Rep* 2012;28(6):1959–67. DOI: 10.3892/or.2012.2057. PMID: 23023193.
- Zhang W., Chi K., Zhang Y. et al. Correlation between preferentially expressed antigen of melanoma and tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand gene expression in different types of leukaemia patients. *Acta Haematol* 2013;130(4):297–304. DOI: 10.1159/000351166. PMID: 24008770.
- Yao J., Caballero O.L., Yung W.K. et al. Tumor subtype-specific cancer-testis antigens as potential biomarkers and immunotherapeutic targets for cancers. *Cancer Immunol Res* 2014;2(4):371–9. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-13-0088. PMID: 24764584.
- Wadelin F.R., Fulton J., Collins H.M. et al. PRAME is a golgi-targeted protein that associates with the Elongin BC complex and is upregulated by interferon-gamma and bacterial PAMPs. *PLoS One* 2013;8(2):e58052. DOI: 10.1371/journal.pone.0058052. PMID: 23460923.
- Bhattacharyya S., Ratajczak C.K., Vogt S.K. et al. TAK1 targeting by glucocorticoids determines JNK and IκappaB regulation in Toll-like receptor-stimulated macrophages. *Blood* 2010;115(10):1921–31. DOI: 10.1182/blood-2009-06-224782. PMID: 20065289.
- Qin Y., Lu J., Bao L. et al. Bortezomib improves progression-free survival in multiple myeloma patients overexpressing preferentially expressed antigen of melanoma. *Chin Med J (Engl)* 2014;127(9):1666–71. PMID: 24791872.
- Chen D., Frezza M., Schmitt S. et al. Bortezomib as the first proteasome inhibitor anticancer drug: current status and future perspectives. *Curr Cancer Drug Targets* 2011;11(3):239–53. PMID: 21247388.
- Ikeda H., Lethe B., Lehmann F. et al. Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity* 1997;6(2):199–208. PMID: 9047241.

Вклад авторов

В.А. Мисюрин: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи;
 Д.В. Калениченко, А.А. Рудакова, Н.А. Лыжко, В.В. Тихонова, А.Н. Великанов, Л.А. Кесаева: получение данных для анализа;
 Ю.П. Финашутина: написание текста рукописи;
 О.Н. Солопова: анализ полученных данных;
 А.Е. Мисюрина: разработка дизайна исследования, анализ полученных данных;
 М.А. Барышникова, А.В. Мисюрин: разработка дизайна исследования, доработка финальной рукописи.

Authors' contributions

V.A. Misyurin: developing the research design, analysis of the obtained data, article writing;
 D.V. Kalenichenko, A.A. Rudakova, N.A. Lyzhko, V.V. Tikhonova, A.N. Velikanov, L.A. Kesaeva: obtaining data for analysis;
 Yu.P. Finashutina: article writing;
 O.N. Solopova: analysis of the obtained data;
 A.E. Misyurina: developing the research design, analysis of the obtained data;
 M.A. Baryshnikova, A.V. Misyurin: developing the research design, finalizing the final manuscript.

ORCID авторов/ORCID of authors

В.А. Мисюрин/V.A. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0002-0762-5631>
 Ю.П. Финашутина/Yu.P. Finashutina: <https://orcid.org/0000-0002-6154-535X>
 Н.А. Лыжко/N.A. Lyzhko: <https://orcid.org/0000-0003-3834-5816>
 В.В. Тихонова/V.V. Tikhonova: <https://orcid.org/0000-0002-8658-2819>
 Л.А. Кесаева/L.A. Kesaeva: <https://orcid.org/0000-0001-8277-8649>
 О.Н. Солопова/O.N. Solopova: <https://orcid.org/0000-0002-5465-6094>
 А.Е. Мисюрина/A.E. Misyurina: <https://orcid.org/0000-0002-9535-6688>
 А.Н. Великанов/A.N. Velikanov: <https://orcid.org/0000-0002-3819-8564>
 М.А. Барышникова/M.A. Baryshnikova: <https://orcid.org/0000-0002-6688-8423>
 А.В. Мисюрин/A.V. Misyurin: <https://orcid.org/0000-0003-1349-2879>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Исследование проведено без спонсорской поддержки.

Financing. The study was performed without external funding.

Статья поступила: 02.10.2018. **Принята к публикации:** 31.10.2018.

Article received: 02.10.2018. **Accepted for publication:** 31.10.2018.