

І. Д. Попадюк, В. М. Пушкарьов, Н. М. Костюченко,  
член-кореспондент НАН України М. Д. Тронько

## Участь MAPK в опосередкуванні дії протипухлинного препарату таксолу на клітини анапластичного раку щитовидної залози

*The role of MAPK (mitogen-activated protein kinase) in mediating the action of antitumour drug taxol on the cell line of thyroid anaplastic cancer, ARO, is studied. It is shown that taxol enhances the phosphorylation of anti-apoptotic protein Bcl-2 and activated the main executioner caspase-3. Taxol did not activate p38 MAPK but significantly inhibits the activation of ERK1/2, another MAP kinase that participates in survival mechanisms. The possible factor under control of this kinase can be a protein-inhibitor of apoptosis, XIAP. This suggestion is confirmed by experiments with the inhibitor of c-Raf-1/MEK1/ERK cascade, PD98059. In the presence of the inhibitor, the XIAP quantity essentially decreased as well as the cell viability. The possible means of augmentation of the taxol cancerostatic effect upon thyroid cancer cells are discussed.*

Таксол є високоефективним протипухлинним препаратом, який використовується для лікування таких видів раку, як рак легень, молочної залози, яєчників, простати, голови та шиї [1]. Вивчаються можливості його застосування для терапії анапластичного раку щитовидної залози, як найбільш агресивної форми раку людини [2]. Проведені дослідження свідчать, що таксол активує в пухлинних клітинах не тільки апоптозні чи некротичні процеси, але й механізми, які протидіють загибелі клітин [3]. Тому надзвичайно актуальними є дослідження, які б давали змогу вивчити механізми дії таксолу в трансформованих клітинах та визначити способи інактивації сигнальних каскадів, які беруть участь у набутті резистентності ракових клітин до цього протипухлинного препарату.

Метою проведеної роботи було вивчення механізмів індукованого таксолом апоптозу в клітинах найбільш агресивної лінії анапластичного раку щитовидної залози — ARO.

Клітини культивували у середовищі RPMI-1640, що містило 5% бичачої сироватки, 1% пеніциліну/стрептоміцину, в атмосфері з 5% CO<sub>2</sub> при 37 °C протягом 2 днів, промивали 2 рази PBS-буфером (80 мМ ортофосфат натрію однозаміщений, 20 мМ ортофосфат натрію двозаміщений, 100 мМ хлорид натрію, рН 7,4) і замінювали середовище. Через 24 год вносили розчинений у диметилсульфоксиді (ДМСО) таксол фірми “Wako Chemicals” (Японія) і збирали клітини через визначені проміжки часу. В контрольні проби вносили в такий самій кількості ДМСО. По закінченні інкубації клітини двічі промивали холодним (2 °C) буфером PBS, що містив пірофосфат та ортованадат натрію, збирали в 1 мл буфера PBS і осаджували протягом 3 хв при 1000 об/хв і 2 °C. Одержання клітинних білків та імуноблотинг проводили за методикою, що описана раніше в статті [4]. Антитіла до каспази-3 та фосфоформ білків Bcl-2, p38MAPK, ERK1/2, інгібітор MEK-1 (MAPKK), PD98 059 — від фірми “Cell Signaling Technology” (США). Комплекси білків з антитілами візуалізували за допомогою реагенту ECL (“Amersham Life Science”, Велика Британія). Статистичну обробку даних проводили за *t*-критерієм Стьюдента.

Як було показано раніше, таксол викликає дозозалежну загибель клітин анапластичного раку [5]. Причиною такої загибелі є індуковані цією сполукою апоптозні процеси. З рис. 1, 1

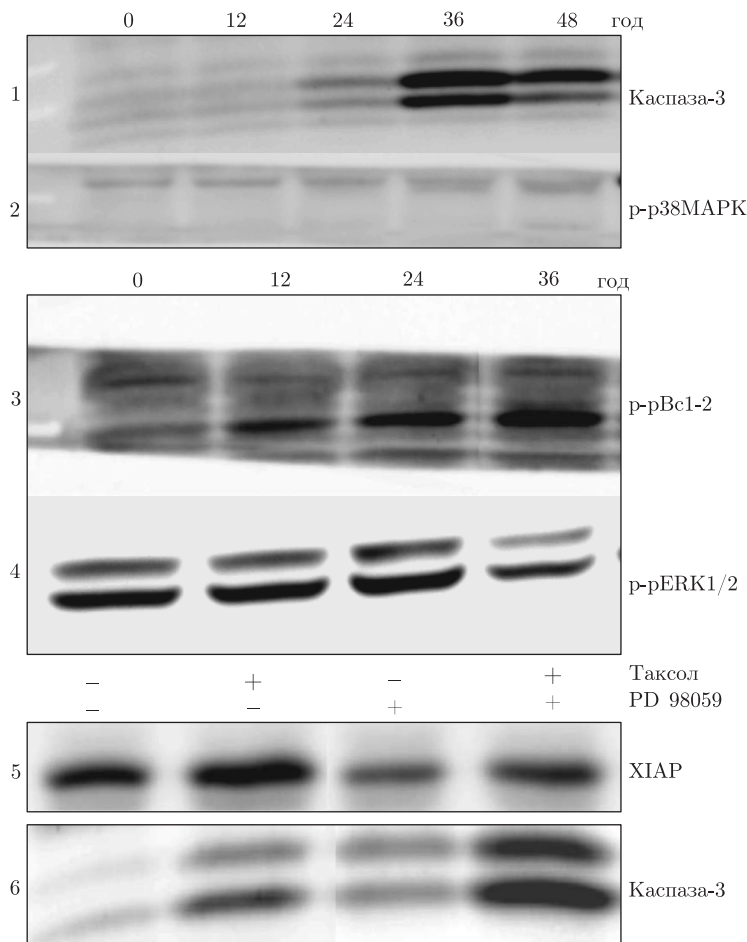


Рис. 1. Вплив таксолу на активацію каспази-3, MAP-кіназ, експресію білка-інгібітора апоптозу (XIAP) та фосфорилування антиапоптозного білка Bcl-2 у клітинах анапластичного раку ARO. 1 — активована каспаза-3; 2, 4 — фосфорилування MAPK; 3 — фосфорилування Bcl-2; 5, 6 — активація каспази-3 та експресія XIAP у присутності таксолу (25 нМ) та інгібітора MEK-1 (PD98059, 10 мкМ). (Дані типового дослідження з трьох.)

видно, що активація основної ефекторної каспази — каспази-3, стає помітною через 24 год інкубації клітин з таксолем (25 нМ), досягає максимуму через 36 год і дещо знижується до 48 год. Причиною ініційованого таксолем апоптозу певно є фосфорилування антиапоптозного білка Bcl-2 (див. рис. 1, 3), який стабілізує зовнішню мітохондріальну мембрану [6–8]. Роль такої модифікації цього білка до кінця не визначена. Припускають, що це зменшує його спорідненість до мембрани мітохондрій та проапоптозних білків [9], а також може стати причиною його деградації в протеосомах.

Наступним питанням було визначення протеїнкіназ, які могли б брати участь у опосередкуванні дії таксолу. Для цього вивчали активацію двох протеїнкіназ з сімейства MAPK (протеїнкіназ, що активуються мітогенами), які беруть участь як у про-, так і в антиапоптозних процесах [10] — p38MAPK та ERK1/2: активність p38MAPK під дією таксолу не зазнає жодних змін (див. рис. 1, 2); натомість, активність ERK1/2 знижується на 36 год (1, 4), про що свідчить зменшення кількості її фосфоформи. Активація ERK1/2 зазвичай призводить до стимуляції проліферативних, антиапоптозних процесів [11], а отже, ця протеїнкіназа мо-

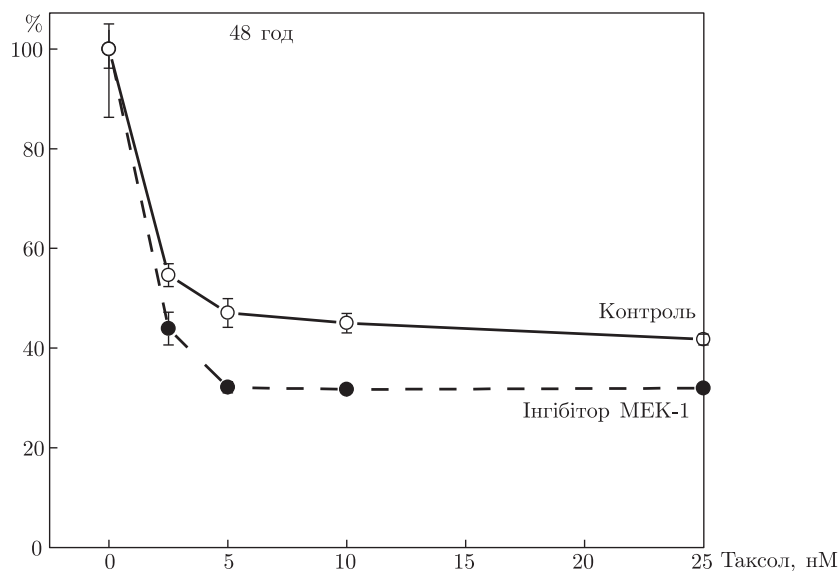


Рис. 2. Ефект таксолу та інгібітора MEK-1 на виживання клітин анапластичного раку АРО. Суцільна крива — дія таксолу, пунктирна крива — спільна дія таксолу та інгібітора MEK-1 (10 мкМ). Час інкубації — 48 год.  $M \pm m$ ;  $n = 6$ . Відміни між значеннями точок на контрольній та дослідній кривих, починаючи з концентрації таксолу 5 нМ, імовірні;  $P < 0,05$

же брати участь у протидії ефекту таксолу, в ініціації клітинних механізмів, що ведуть до виживання клітин, їх резистентності до даної сполуки. Одним з таких механізмів є посилення у відповідь на дію таксолу експресії антиапоптозного білка XIAP (див. рис. 1, 5), який пригнічує стимульований таксолем апоптоз шляхом інгібування активності каспаз [12].

Для визначення участі ERK1/2 в механізмах виживання, клітини інкубували з інгібітором MEK-1, що входить до сигнального каскаду c-Raf-1/MEK-1/ERK1/2. MEK-1 — протеїнкіназа, активація якої передуює фосфорилюванню і активації ERK1/2. З рис. 1, 5 видно, що передінкубація клітин з інгібітором MEK-1 — PD98059 у концентрації 10 мкМ призводить до зменшення кількості антиапоптозного білка XIAP, експресія якого зростає внаслідок дії таксолу (див. рис. 1, 5). Звертає на себе увагу значне посилення активності каспази-3, що спостерігається у присутності інгібітора MEK-1, яке, в свою чергу, свідчить про посилення апоптозних процесів в клітинах анапластичного раку. Щоб впевнитися в цьому, вивчали спільний ефект таксолу та інгібітора MEK-1 на клітини анапластичного раку. З рис. 2 видно, що у присутності інгібітора загибель клітин під дією таксолу імовірно збільшується.

Таким чином, таксол ініціює в клітинах анапластичного раку щитовидної залози як апоптоз, так і механізми, що протидіють ефекту препарату. Важливим завданням, що стоїть перед дослідниками є пошук сполук, які пригнічують ці механізми. Перспективними в цьому плані є інгібітори сигнального каскаду cRaf-1/MEK-1/ERK1/2, використання яких у комбінації з таксолем дасть можливість посилити терапевтичний ефект останнього.

1. Jordan M. A., Wilson L. Microtubules as a target for anticancer drugs // Nat. Rev. Canc. — 2004. — 4. — P. 253–265.
2. Ain K. B., Egorin M. J., DeSimone P. A. Treatment of anaplastic thyroid carcinoma with paclitaxel: phase 2 trial using ninety-six-hour infusion. Collaborative Anaplastic Thyroid Cancer Health Intervention Trials (CATCHIT) Group // Thyroid. — 2000. — 10, No 7. — P. 587–594.

3. *Ling X., Bernacki R. J., Brattain M. G., Li F.* Induction of survivin expression by taxol (paclitaxel) is an early event, which is independent of taxol-mediated G2/M arrest // *J. Biol. Chem.* – 2004. – **279**, No 15. – P. 15196–15203.
4. *Пушкарьов В. М., Ковзун О. І., Тронько М. Д. та ін.* Шляхи передачі регуляторного сигналу  $K^+$  в адренокортикальних клітинах людини // *Укр. біохім. журн.* – 2005. – **77**, № 1. – С. 61–67.
5. *Тронько М. Д., Левчук Н. І., Попадюк І. Д., та ін.* Дія протипухлинного препарату таксолу на клітини анапластичного раку щитовидної залози // *Доп. НАН України.* – 2006. – № 8. – С. 204–206.
6. *Lalier L., Cartron P.-F., Juin P. et al.* Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis // *Apoptosis.* – 2007. – **12**. – P. 887–896.
7. *Escobar P. F., Rose P. G.* Docetaxel in ovarian cancer // *Expert Opin. Pharmacother.* – 2005. – **6**, No 15. – P. 2719–2726.
8. *Blagosklonny M. V.* Unwinding the loop of Bcl-2 phosphorylation // *Leukemia.* – 2001. – **15**, No 6. – P. 869–874.
9. *Shitashige M., Toi M., Yano T. et al.* Dissociation of Bax from a Bcl-2/Bax heterodimer triggered by phosphorylation of serine 70 of Bcl-2 // *J. Biochem.* – 2001. – **130**, No 6. – P. 741–748.
10. *Boldt S., Weidle U. H., Kolch W.* The role of MAPK pathways in the action of chemotherapeutic drugs // *Carcinogenesis.* – 2002. – **23**, No 11. – P. 1831–1838.
11. *Zelivianski S., Spellman M., Kellerman M. et al.* ERK inhibitor PD98059 enhances docetaxel-induced apoptosis of androgen-independent human prostate cancer cells // *Int. J. Cancer.* – 2003. – **107**. – P. 478–485.
12. *Takahashi R., Deveraux Q., Tamm I. et al.* A single BIR domain of XIAP sufficient for inhibiting caspases // *J. Biol. Chem.* – 1998. – **273**. – P. 7787–7790.

*Інститут ендокринології та обміну речовин  
ім. В. П. Комісаренка АМН України, Київ*

*Надійшло до редакції 05.07.2007*