

МУТАЦИИ, ПОВЫШАЮЩИЕ СЕЛЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ЦИТОКИНА TRAIL К РЕЦЕПТОРУ DR5, УСИЛИВАЮТ ЕГО ЦИТОТОКСИЧНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К ОПУХОЛЕВЫМ КЛЕТКАМ

© 2015 М.Э. Гаспарян^{1*}, М.Л. Бычков¹, А.В. Яголович^{1,2},
Д.А. Долгих^{1,2}, М.П. Кирпичников^{1,2}

¹ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва; факс: +7(495)330-6538, электронная почта: marine_gasparian@yahoo.com

² Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991 Москва

Поступила в редакцию 23.12.14
После доработки 18.02.15

TRAIL (tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) – цитокин суперсемейства фактора некроза опухолей вызывает апоптоз опухолевых клеток, связываясь с рецепторами смерти DR4 и DR5, не затрагивая нормальные клетки. Однако терапевтическое применение TRAIL ограничено, так как значительная часть опухолевых клеток к нему нечувствительна. Одной из причин этого является взаимодействие цитокина с рецепторами «ловушками» DcR1 и DcR2, которые не только не запускают апоптотический сигнал, но и ингибируют сигнал рецепторов смерти. Ранее был получен уникальный DR5 селективный мутантный вариант TRAIL DR5-B, который связывается с DR5 рецептором так же эффективно, как и исходный цитокин, однако практически не связывается с рецепторами DR4 и DcR1, а его сродство к DcR2 снижено в 400 раз. В данной работе проведен сравнительный анализ цитотоксической активности TRAIL дикого типа и DR5-B на 12 различных опухолевых клеточных линиях и двух типах нормальных клеток. В девяти из 12 линий DR5-B убивал в 1,5–5 раз больше опухолевых клеток по сравнению с TRAIL и не проявлял токсичность по отношению к нормальным клеткам. Химиопрепараты, такие как доксорубин, паклитаксел и бортезомиб, усиливали действие вариантов TRAIL, но на большинстве типов клеток эффект усиления был сильнее выражен для DR5-B. Полумаксимальные эффективные концентрации ($ЭК_{50}$) для DR5-B при совместном применении с химиопрепаратами были в 1,5–10 раз ниже по сравнению с TRAIL дикого типа. Таким образом, препарат DR5-B можно рассматривать в качестве перспективного средства, как для монотерапии, так и для комбинирования с химиотерапией, при лечении TRAIL устойчивых опухолей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: TRAIL, DR5-специфичный вариант TRAIL DR5-B, доксорубин, паклитаксел, бортезомиб, терапия рака.

Белок TRAIL был идентифицирован на основе гомологии последовательности с другими членами суперсемейства фактора некроза опухоли (ФНО) в 1995 г., и тогда же было показано, что многие нормальные ткани экспрессируют TRAIL [1]. В отличие от других членов суперсемейства ФНО, TRAIL обладает уникальной способностью выборочно индуцировать апоптоз в опухолевых клетках *in vitro* и *in vivo*, не затрагивая нормальные клетки [2, 3]. Это захватывающее открытие послужило основой для разработки ряда агонистов к рецепторам смерти TRAIL DR4 и DR5, таких как моноклональные антитела, рекомбинантный растворимый внеклеточ-

ный домен TRAIL и его рецептор-специфичные варианты [4, 5]. Эти агонисты продемонстрировали значительную противоопухолевую активность в ряде доклинических исследований, однако в клинических испытаниях их терапевтический эффект был весьма ограничен [6, 7].

Чувствительность опухолевых клеток к TRAIL-индуцированному апоптозу регулируется на нескольких уровнях: экспрессия TRAIL и его рецепторов, формирование смерть-индуцирующего сигнального комплекса (DISC, death-inducing signaling complex), активация каспазы 8 и митохондриальный путь апоптоза (регуляция белков семейства Bcl-2, Smac/DIABLO, IAPs) [8]. Одной из причин устойчивости опухолевых клеток к TRAIL является сложное взаимодей-

* Адресат для корреспонденции.

ствие цитокина с пятью рецепторами, из которых только два DR4 и DR5, получившие название «рецепторы смерти», способны передавать сигнал апоптоза. Два трансмембранных рецептора (DcR1 и DcR2) и один растворимый рецептор остеопротегерин (OPG) получили название «рецепторов ловушек» (DcR – decoy receptors), так как они не только не передают сигнал апоптоза, но и могут ингибировать TRAIL-опосредованный апоптоз. Было показано, что DcR1 предотвращает сборку индуцирующего смерть сигнального комплекса, связываясь с DR4 в липидных рафтах, тогда как DcR2 включается в состав DISC совместно с DR5, и ингибирует активацию инициаторной каспазы-8 [9].

Многие линии опухолевых клеток экспрессируют оба рецептора смерти DR4 и DR5, и каждый из этих рецепторов может инициировать апоптоз независимо друг от друга. Сродство TRAIL к рецепторам смерти и рецепторам ловушкам практически не отличается ($K_d = 0,5-0,9$ нМ) [10, 11]. Тем не менее в опухолевых клетках, экспрессирующих рецепторы DR4 и DR5, сигнал от TRAIL часто проводится преимущественно посредством одного из рецепторов смерти. Молекулярная основа такой селективности неизвестна, но эксперименты с использованием моноклональных антител к рецепторам смерти указывают на возможность независимого проведения сигнала от TRAIL через гомотримеры DR4 или DR5 [12, 13]. Результаты исследований последних лет указывают на доминирующую роль DR5 в индукции апоптоза под действием TRAIL.

Многие опухолевые клеточные линии, а также первичные опухоли полностью нечувствительны к агонистам рецепторов DR4 и DR5, несмотря на достаточную экспрессию этих рецепторов. Противоопухолевые средства, такие как доксорубин, цисплатин, паклитаксел, топотекан, этопозид, а также ингибиторы протеасом и деацетилаз гистонов повышают экспрессию рецепторов смерти и чувствительность клеток к TRAIL [14, 15]. Результаты клинических испытаний рекомбинантного препарата TRAIL дикого типа (лекарственное название Dulanermin), а также препаратов моноклональных антител к DR5 (Lexatumumab, Conatumumab, Drozitumab, Tigatuzumab и LBY-135) и к DR4 (Maratumumab), как при монотерапии, так и в комбинации с различными химиопрепаратами, не показали желаемого клинического эффекта [5]. Теоретически антитела к рецепторам смерти должны более эффективно убивать опухолевые клетки, так как они не связываются с рецепторами ловушками. Однако антитела имеют несколько недостатков по сравнению с TRAIL. Во-первых, для эффек-

тивного формирования смерть-индуцирующего сигнального комплекса они требуют присутствия сшивающих агентов или Fc-рецепторов (FcγRs) [16], а во-вторых, стоимость производства моноклональных антител намного выше по сравнению с рекомбинантными белками. С другой стороны, довольно сложно создать мутантные варианты белка TRAIL, которые бы селективно связывались только с рецепторами смерти, но не с рецепторами ловушками. Были созданы несколько DR4- или DR5-специфичных мутантных вариантов, однако их аффинность к рецепторам ловушкам DcR1, DcR2 и OPG оставалась довольно высокой [11, 17, 18].

Ранее нам удалось создать уникальный мутантный вариант цитокина TRAIL – DR5-B, который связывается с рецептором смерти DR5 так же эффективно, как и дикий тип, но практически не связывается с другими рецепторами TRAIL (DR4, DcR1, DcR2 и OPG) [11]. В данной работе мы провели сравнительный анализ цитотоксической активности препаратов TRAIL дикого типа и полученного нами рецептор-селективного варианта цитокина DR5-B на двенадцати опухолевых клеточных линиях и двух типах нормальных клеток. Кроме того, было исследовано комбинированное воздействие вариантов TRAIL с химиопрепаратами, такими как доксорубин, бортезомиб и паклитаксел. Результаты показали, что DR5-B эффективнее индуцирует гибель опухолевых клеток по сравнению с диким типом TRAIL в большинстве линий клеток. Химиотерапевтические препараты усиливали действие обоих препаратов, при этом полумаксимальные эффективные концентрации DR5-B были существенно ниже, чем у дикого типа TRAIL. Таким образом, препарат DR5-B можно рассматривать в качестве перспективного средства, как для монотерапии, так и для комбинирования с химиотерапией, при лечении опухолевых заболеваний.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные линии и реактивы. Опухолевые клеточные линии человека аденокарциномы легкого A549, Т-лимфобластной лейкемии Jurkat, гепатоклеточной карциномы HepG2, колоректальной карциномы HT29, аденокарциномы молочной железы MCF-7, моноцитарной лейкемии U937, глиобластомы U251 MG и нормальные фибробласты крайней плоти (HFF) были приобретены в НИИ цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия). Клеточные линии колоректальной карциномы HCT116, карциномы простаты Du145, аденокарциномы молоч-

ной железы SKBR-3 и MDA-MB-231, а также аденокарциному яичника SKOV3 приобретали в ATCC (Вашингтон, США). Клетки эндотелия пупочной вены человека (HUVES) были любезно предоставлены доктором М.А. Лагарьковой (НИИ Общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН). Питательные среды для эукариотических клеток (DMEM, EMEM и RPMI1640), 0,05%-ный раствор трипсин-ЭДТА, заменимые аминокислоты, таблетки фосфатно-солевого буфера и МТТ приобретались в компании «ПанЭко» (Россия). Эмбриональную бычью сыворотку приобретали у «Hyclone» (США). Конъюгированные с FITC антитела к рецепторам DR4, DR5, DcR1 и DcR2 покупали у «Abnova» (США), антитела изотипического контроля были от фирмы «Immunotech» (Франция). Бортезомиб и доксорубин приобретали у фирмы «Santa Cruz» (США), паклитаксел — «MP Biomedicals» (Германия). Все прочие реактивы покупали в фирме «Applichem» (Германия).

Экспрессия и очистка рекомбинантных препаратов TRAIL и DR5-B. Рекомбинантные препараты внеклеточного домена TRAIL дикого типа (114—280 а.о.) и его DR5-специфичного варианта DR5-B получали из *Escherichia coli* как было описано ранее [11]. Гибридные белки тиоредоксин-TRAIL и тиоредоксин-DR5-B были экспрессированы в штамме *E. coli* BL21(DE3), трансформированном плазмидной ДНК рЕТ-32а/TRAIL или рЕТ-32а/DR5-B. Очистку гибридных белков проводили с помощью металл-аффинной хроматографии на колонке с сорбентом Ni-Sepharose High Performance («GE Healthcare», США). Очищенный гибридный белок расщепляли рекомбинантной легкой цепью энтеропептидазы человека, полученной нами ранее [19]. Для увеличения эффективности расщепления слитных белков и уменьшения неспецифического гидролиза целевых белков в сайте расщепления энтеропептидазой Asp₄Лиз аминокислотный остаток лизина был заменен на аргинин [20]. После расщепления остаточную активность энтеропептидазы удаляли на агарозе, конъюгированной с соевым ингибитором трипсина (STI-agarose, «Sigma»). TRAIL или DR5-B отделяли от тиоредоксина на колонке с никелевой агарозой Ni-NTA («Qiagen», Германия). Растворы целевых белков диализовали против фосфатного буфера (50 мМ фосфата натрия и 150 мМ хлорида натрия, рН 7,5, стерилизовали фильтрованием и хранили при 4°).

Культивирование клеток. Клетки A549, Du145, HCT116, MDA-MB-231, U251 MG, а также нормальные фибробласты крайней плоти (HFF) культивировали в питательной среде DMEM с добавлением 10%-ной эмбриональной бычьей

сыворотки. Клетки SKBR-3 и SKOV3 культивировали в среде McCoу 5А с добавлением 10%-ной эмбриональной бычьей сыворотки. Линии Jurkat, HepG2, HT29 и U937 культивировали в среде RPMI1640 с добавлением 5%-ной эмбриональной бычьей сыворотки. Для культивации клеток HepG2 к среде RPMI1640 добавляли аминокислоты («ПанЭко», Россия). Линию карциномы молочной железы MCF-7 культивировали в среде EMEM с добавлением 10 мкг/мл рекомбинантного человеческого инсулина («Sigma», США) и 10%-ной эмбриональной бычьей сыворотки. Клетки эндотелия HUVES культивировали в среде DMEM/F12 с добавлением 15%-ной эмбриональной бычьей сыворотки, 5 нг/мл рекомбинантного основного фактора роста фибробластов (FGF-2) человека («Peprotech», США), 20 нг/мл рекомбинантного фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) человека («Peprotech», США), 1% аминокислот, 2 мМ L-глутамин, 50 ЕД/мл пенициллина и 50 нг/мл стрептомицина («ПанЭко», Россия).

Определение жизнеспособности клеток. Для определения жизнеспособности клеток использовали МТТ [3-(4, 5-диметил-2-тиазолил)-2, 5-дифенил-2Н-тетразолия бромид] тест. За день до эксперимента все адгезионные клетки адсорбировались на 96 луночный планшет из расчета 10⁴ клеток на лунку. Затем клетки отмывали и инкубировали в течение 24 ч с препаратами TRAIL отдельно или в комбинации с химиопрепаратами, предварительно разбавленными в питательной среде без сыворотки. Суспензионные клетки U937 и Jurkat центрифугировали при 900 об/мин 5 мин, суспендировали в среде без сыворотки и нанесли на планшет в расчете 5 × 10⁴ клеток на лунку. К клеткам добавляли препараты TRAIL и химиопрепараты, разбавленные в питательной среде без сыворотки. Спустя 24 ч к клеткам добавляли МТТ (конечная концентрация составляла 0,5 мг/мл) и инкубировали в течение 4 ч. Планшеты с клетками центрифугировали 5 мин при 3000 об/мин. Супернатанты удаляли и добавляли ДМСО в каждую лунку для растворения кристалов формазана. Оптическую плотность содержимого лунок измеряли с помощью планшетного спектрофотометра Bio-Rad 680 («Bio-Rad», США) при длине волны 540 нм с вычитанием фона при 655 нм.

Проточная цитофлуориметрия. Клетки снимали с флаконов с помощью 0,05%-ного раствора трипсина-ЭДТА, после чего дважды промывали холодным фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и суспендировали. Затем клетки разливали по пробиркам (35 × 10³ клеток на одну пробу). К суспензии клеток добавляли FITC-конъюгированные антитела к рецепторам TRAIL DR4,

DR5, DcR1 и DcR2 или антитела изотипического контроля и инкубировали 1 ч при 4°. После этого несвязавшиеся антитела дважды отмывали холодным ФСБ, клетки суспендировали в FACS-буфере (ФСБ с добавлением 1 мкМ иодида пропидия). Пробы анализировали на проточном цитофлуориметре FACScan («Beckton Dickinson», США). Для анализа полученных данных использовали программу WinMDI 2.9.

Статистический анализ данных. Статистическую обработку данных проводили с помощью программы Microsoft Office Excel 2013. Все эксперименты повторяли не менее трех раз. Полу-максимальные эффективные концентрации ($ЭК_{50}$) препаратов TRAIL и DR5-В были рассчитаны с помощью программы GraphPad Prism 6.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительный анализ цитотоксичности цитокина TRAIL дикого типа и его мутантного варианта DR5-В. Значительная часть опухолевых клеток нечувствительна к TRAIL, несмотря на наличие рецепторов смерти DR4 и DR5 на поверхности клеток, из-за экспрессии рецепторов ловушек и внутриклеточных защитных механизмов [21]. Для улучшения эффективности TRAIL ранее нами был получен его мутантный вариант DR5-В с шестью замененными аминокислотными остатками (Y189N, R191K, Q193R, H264R, I266L, D269H), который связывался с рецептором смерти DR5 так же эффективно, как и дикый тип, но практически не проявлял аффинность к рецептору смерти DR4, а также к рецепторам ловушкам DcR1 и DcR2 [11]. В данной работе мы сравнивали цитотоксичность TRAIL дикого типа и DR5-В на 12 линиях опухолевых клеток различного происхождения, половина которых была нечувствительна к TRAIL (гибель клеток менее 20%). На девяти из двенадцати линий (MCF-7, HT29, HCT116, HepG2, Jurkat, U937, A549, SKBR-3 и U251 MG) препарат DR5-В вызывал гибель клеток более эффективно по сравнению с TRAIL дикого типа (рис. 1, табл. 1). Например, на устойчивых к TRAIL линиях MCF-7, HT29, A549 и SKBR-3 (гибель клеток менее 16%) DR5-В убивал 54, 41, 37 и 36% клеток соответственно. Цитотоксичность препаратов TRAIL и DR5-В на трех линиях (Du145, SKOV3 и MDA-MB-231) практически не отличалась.

Анализ экспрессии рецепторов смерти и рецепторов ловушек на поверхности клеток показал, что все протестированные клеточные линии экспрессируют DR4 и DR5 в различных количествах (рис. 2). Однако прямой корреляции меж-

ду чувствительностью опухолевых клеток к TRAIL и количеством рецепторов смерти не было зафиксировано. Например, уровень экспрессии рецепторов смерти у устойчивых к TRAIL линий MCF-7, A549 и HT29 (гибель клеток менее 16%) был относительно высок по сравнению с более чувствительными линиями MDA-MB-231 и Jurkat (гибель клеток 42–45%). Во всех исследованных линиях клеток уровень экспрессии рецепторов ловушек был сравнительно невелик по сравнению с рецепторами смерти (2–11% DcR1 и 6–19% DcR2 от совокупной экспрессии рецепторов) (рис. 2). Исключение составили клетки A549 (DcR2 30%) и MDA-MB-231 (DcR1 35,5%), в которых количество рецепторов ловушек было достаточно высоко. Высокая цитотоксичность DR5-В на большинство линий опухолевых клеток, скорее всего, обусловлена наличием рецепторов ловушек DcR1 и DcR2 на поверхности клеток. Устойчивость клеток SKOV3 и Du145, как к TRAIL, так и к DR5-В, по-видимому, обусловлена низким уровнем экспрессии рецепторов смерти. DR5-В был менее эффективен чем TRAIL только на клетках MDA-MB-231, в которых содержание рецептора DR4 было почти в два раза больше чем DR5. В то же время в клетках A549 и HCT116, где соотношение DR4 и DR5 было примерно таким же, DR5-В был значительно эффективнее, чем TRAIL дикого типа.

Химиопрепараты усиливают цитотоксичность TRAIL и DR5-В в опухолевых клетках. Многочисленные исследования выявили целый ряд цитотоксичных веществ, в том числе нутрицевтиков, которые усиливают противоопухолевую активность как препарата TRAIL, так и моноклональных антител к рецепторам смерти [21–23]. В данной работе мы исследовали комбинированное воздействие DR5-В и химиотерапевтических препаратов доксорубин, паклитаксел и бортезомиб на 12 опухолевых клеточных линиях и сравнили с цитотоксической активностью TRAIL дикого типа. Доксорубин и паклитаксел являются одним из самых распространенных препаратов, которые применяются для терапии различных опухолей. Бортезомиб (лекарственное название Velcade) относительно недавно был утвержден администрацией пищевых продуктов и медикаментов (Food and drug administration) США, как первый ингибитор протеасом для лечения злокачественных опухолевых заболеваний. Выбор нами этих препаратов был обусловлен тем фактом, что они положительно регулируют экспрессию рецепторов смерти DR4 и DR5 в различных опухолевых клетках [15]. Концентрации химиопрепаратов для совместного применения с TRAIL и DR5-В подбирали для каждой клеточной линии так,

чтобы они сами вызывали гибель не более 15–30% опухолевых клеток.

Доксорубин, паклитаксел и бортезомиб усиливали как TRAIL, так и DR5-B индуцированную гибель клеток, но для большинства клеток этот эффект был более сильно выражен для DR5-B (рис. 3–5). При совместном воздействии химиопрепаратов с DR5-B гибель клеток всех линий превышала 60%, тогда как в случае TRAIL менее половины комбинаций (16 из 36) показали такой результат (табл. 1). При совместном воздействии доксорубина или паклитаксела с TRAIL ни в одной линии не наблюдалась гибель более 80% клеток, тогда как в случае с DR5-B этот барьер был преодолен в пяти линиях. Из трех протестированных химиопрепаратов бортезомиб наиболее эффективно усиливал ги-

бель клеток, вызванную действием обоих препаратов TRAIL, однако этот эффект был сильнее выражен с DR5-B. Так, DR5-B совместно с бортезомибом вызывал гибель свыше 70% клеток во всех клеточных линиях, а для линий MCF-7, HCT116, HepG2, SKOV3 и MDA-MB-231 наблюдалась гибель более 90% клеток. В то же время TRAIL дикого типа совместно с бортезомибом вызывал гибель 70% клеток только в трех линиях, а на 90% погибли только клетки линии HCT116 (табл. 1).

Полумаксимальные эффективные концентрации ($ЭК_{50}$) препарата DR5-B на девяти клеточных линиях были в ~2–10 раз ниже по сравнению с TRAIL (табл. 2). На линиях Du145 и SKOV3 оба препарата имели одинаковую $ЭК_{50}$, и только на линии MDA-MB-231 этот показатель

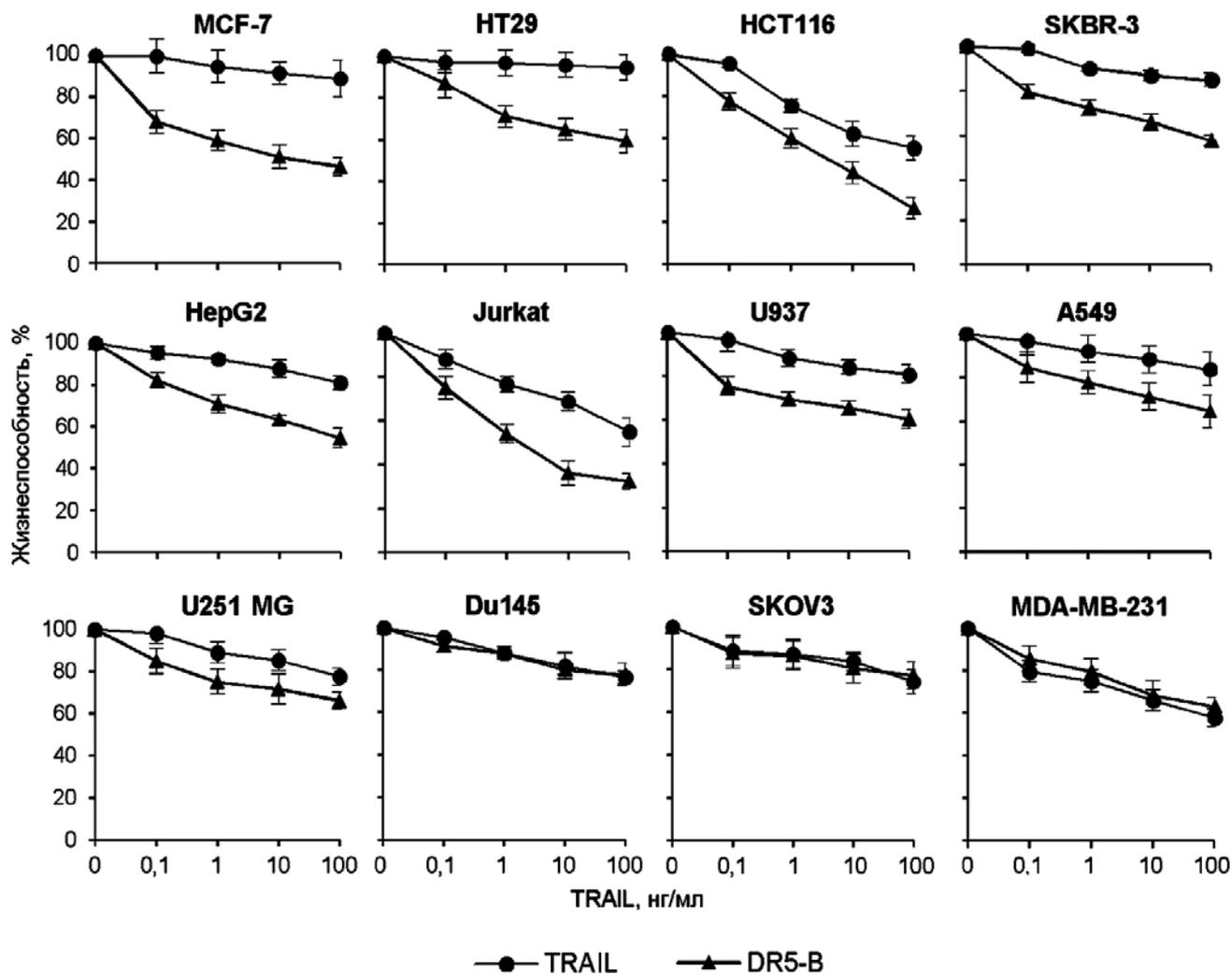


Рис. 1. Цитотоксичность TRAIL и DR5-B на различных опухолевых клетках. Клетки инкубировали с TRAIL или DR5-B в течение 24 ч и жизнеспособность определяли с помощью МТТ-теста. Значения представлены как средние \pm среднеквадратичное отклонение ($n = 3$)

у DR5-B был в 1,3 раза выше, чем у TRAIL. Все три протестированные химиопрепарата (доксорубин, паклитаксел и бортезомиб) значительно снизили значения ЭК₅₀ обеих форм TRAIL (табл. 2, 3), но DR5-B при совместном применении с химиопрепаратами оставался в ~1,5–10 раз эффективнее, чем TRAIL для большинства клеточных линий. ЭК₅₀ для DR5-B совместно с доксорубином и паклитакселем была менее 0,35 и 0,25 нг/мл соответственно для всех клеточных линий. Такие значения ЭК₅₀ для TRAIL были достигнуты лишь на четырех линиях с доксорубином и на шести линиях с паклитакселем. Эффективнее всего цитотоксичность обеих форм TRAIL усиливал бортезомиб. При совместной инкубации с бортезомибом значения ЭК₅₀ для DR5-B снижались несколько раз (>0,1 нг/мл у десяти линий), тогда как с TRAIL такая ЭК₅₀

наблюдалась лишь на линии SKOV3. Интересно, что в присутствии бортезомиба клетки линии MDA-MB-231 стали более чувствительны к DR5-B, несмотря на то, что исходно они проявили более высокую чувствительность к TRAIL дикого типа. Таким образом, полученные нами данные показали, что повышение селективности белка TRAIL к рецептору смерти DR5 увеличивает чувствительность многих типов опухолевых клеток к цитокину, а также к его комбинации с такими химиопрепаратами, как доксорубин, паклитаксел и бортезомиб.

DR5-B не проявлял цитотоксичность по отношению к нормальным клеткам. Так как препарат DR5-B эффективнее вызывал гибель опухолевых клеток по сравнению с TRAIL дикого типа, мы проверили его цитотоксичность на нетрансформированных фибробластах крайней плоти

Таблица 1. Максимальная гибель опухолевых клеток, индуцированная TRAIL или DR5-B (100 нг/мл) отдельно и совместно с химиотерапевтическими препаратами

Линии клеток	Максимальная гибель, %							
	—		доксорубин		паклитаксел		бортезомиб	
	TRAIL	DR5-B	TRAIL	DR5-B	TRAIL	DR5-B	TRAIL	DR5-B
MCF-7	11 ± 4	54 ± 4	39 ± 4	69 ± 3	52 ± 5	83 ± 3	38 ± 5	97 ± 1
HT29	5 ± 3	41 ± 5	52 ± 4	87 ± 3	38 ± 5	82 ± 2	45 ± 5	82 ± 2
HCT116	45 ± 4	74 ± 6	43 ± 4	93 ± 1	57 ± 6	89 ± 5	97 ± 6	97 ± 3
SKBR-3	15 ± 3	42 ± 3	58 ± 5	76 ± 6	53 ± 6	62 ± 6	56 ± 5	79 ± 4
HepG2	19 ± 4	45 ± 4	55 ± 5	75 ± 2	74 ± 6	88 ± 1	87 ± 5	95 ± 2
Jurkat	45 ± 3	68 ± 4	64 ± 6	76 ± 5	67 ± 6	88 ± 7	56 ± 6	77 ± 7
U937	19 ± 4	40 ± 4	64 ± 5	97 ± 2	55 ± 4	70 ± 3	53 ± 4	77 ± 6
A549	16 ± 5	37 ± 5	42 ± 3	66 ± 3	44 ± 3	74 ± 2	62 ± 3	89 ± 2
U251 MG	22 ± 5	34 ± 4	58 ± 5	79 ± 5	47 ± 5	63 ± 5	58 ± 6	81 ± 4
Du145	24 ± 3	22 ± 5	76 ± 6	94 ± 4	61 ± 5	79 ± 6	61 ± 4	80 ± 5
SKOV3	26 ± 4	23 ± 3	78 ± 6	76 ± 5	68 ± 5	61 ± 6	89 ± 6	99 ± 2
MDA-MB-231	42 ± 5	37 ± 4	68 ± 5	60 ± 6	61 ± 4	67 ± 5	68 ± 5	97 ± 1
Гибели клеток, %	Количество клеточных линий							
> 60%	0	2	5	12	5	12	6	12
> 80%	0	0	0	4	0	5	3	9
> 90%	0	0	0	2	0	0	1	5

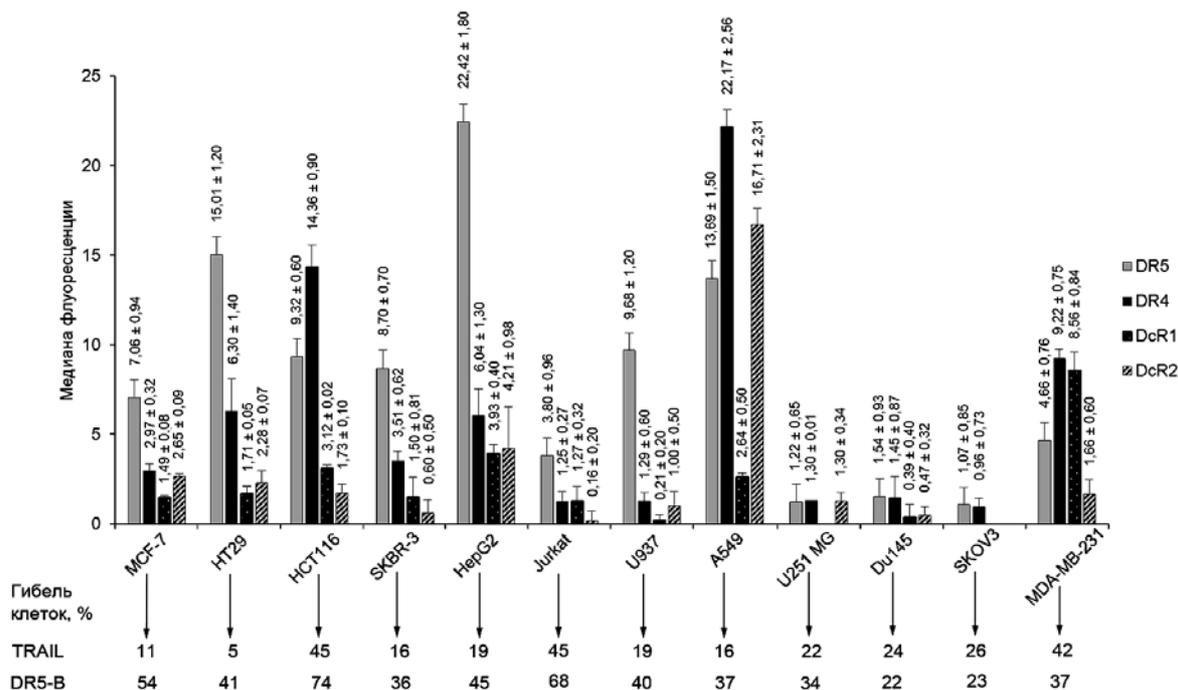


Рис. 2. Экспрессия рецепторов смерти и ловушек TRAIL на поверхности опухолевых клеток. Клетки снимали с флаконов с помощью 0,05%-ного раствора трипсина-ЭДТА, дважды промывали холодным ФСБ, суспендировали и разливали по пробиркам (35×10^3 клеток на одну пробу). К суспензии клеток добавляли FITC-конъюгированные антитела к рецепторам TRAIL DR4, DR5, DcR1 и DcR2 или антитела изотипического контроля и инкубировали 1 ч при 4°. После отмывания несвязавших антител холодным ФСБ, клетки суспендировали в FACS-буфере (ФСБ с добавлением 1 мкМ йодида пропидия) и уровень экспрессии рецепторов определяли с помощью проточной цитофлуориметрии. Значения представлены как средние \pm среднеквадратичное отклонение ($n = 3$)

человека (HFF) и эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC). На поверхности обоих типов клеток экспрессировались как рецепторы смерти DR5 и DR4, так и рецепторы-ловушки DcR1 и DcR2 (рис. 6, а). Несмотря на это, препарат DR5-B, который практически не связывается с рецепторами-ловушками, не проявил цитотоксичность к нетрансформированным клеткам даже при концентрации 10 мкг/мл, что в 100 раз превышает его концентрации максимальной цитотоксичности (100 нг/мл) (рис. 6, б, в). Таким образом, полученный нами DR5 селективный мутантный вариант TRAIL DR5-B убивает опухолевые клетки значительно эффективнее по сравнению с диким типом цитокина как в присутствии, так и в отсутствие химиопрепаратов, не проявляя цитотоксичности к нетрансформированным клеткам.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Существование двух рецепторов смерти DR4 и DR5, способных индуцировать апоптоз при связывании с TRAIL, заставляет задуматься о

том, отличаются ли эти рецепторы по функции и регуляции. Этот вопрос имеет ключевое значение для выбора DR4- или DR5-селективных цитотоксических лигандов для лечения рака. Интересно, что у мышей экспрессируется только один смерть-индуцирующий рецептор (mDR5), который на 43 и 49% гомологичен с человеческими DR4 и DR5, соответственно [21]. Можно полагать, что наличие генов двух рецепторов смерти TRAIL у человека – сравнительно недавно возникшее эволюционное событие, значение которого пока не совсем ясно. Многие опухолевые клеточные линии экспрессируют оба рецептора смерти DR4 и DR5 и каждый из этих рецепторов может инициировать апоптоз независимо друг от друга [13]. В последнее время появились данные о том, что DR5 может участвовать в TRAIL-независимом апоптозе, при индукции стресса эндоплазматического ретикулума [24, 25]. Этот факт, а также другие обстоятельства указывают на доминантную роль DR5 рецептора при передаче сигнала апоптоза, чем может быть обусловлена в основном DR5-ориентированная стратегия клинических испытаний для терапии различных типов рака в пос-

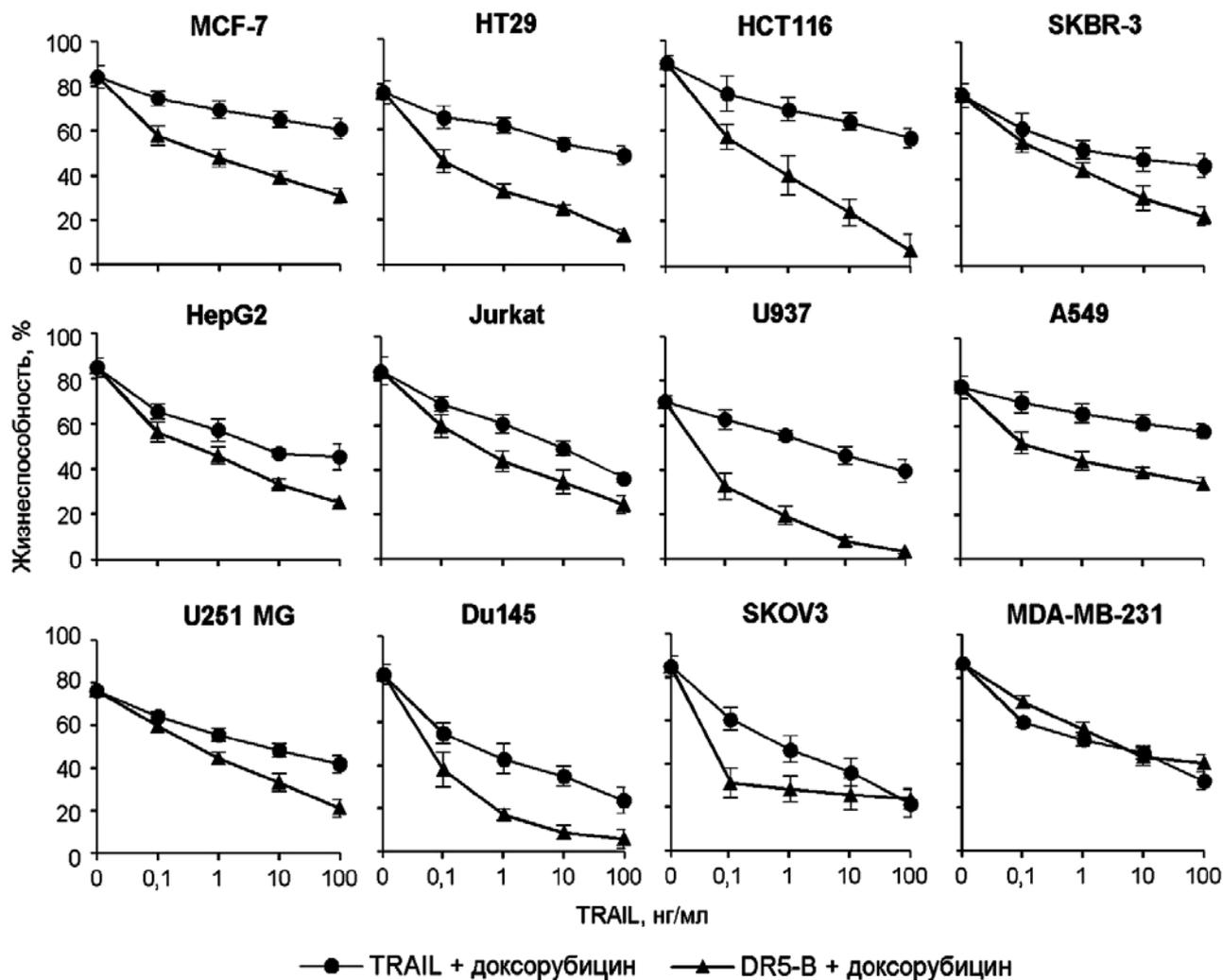


Рис. 3. Эффект доксорубина на TRAIL или DR5-B-опосредованную гибель опухолевых клеток. Клетки инкубировали 24 ч с указанными количествами TRAIL или DR5-B и доксорубицином (Jurkat – 0,1 нМ, U937 – 1 нМ, MCF-7, HT29, HCT116, SKBR-3, A549 и MDA-MB-231 – 100 нМ, Du145 и SKOV3 – 500 нМ, HepG2 – 1 мМ и U251 MG – 2 мМ) и жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. Значения представлены как средние \pm среднеквадратичное отклонение ($n = 3$)

ледние годы [26]. Более высокая эффективность DR4-опосредованного апоптоза наблюдается преимущественно при лейкемии, что может свидетельствовать о доминирующей роли DR4 в клетках иммунной системы [27]. Позже было показано, что при совместном применении TRAIL с протеасомными ингибиторами MG-132 и бортезомибом рецепторы DR4 и DR5 одинаково эффективно проводят сигнал апоптоза в клетках первичного хронического лимфолейкоза (CLL) [28]. Было также показано, что химиопрепараты не только регулируют экспрессию рецепторов смерти, но и могут переключить чувствительность клеток с одного рецептора смерти на другой [29].

В данной работе мы показали, что увеличение селективности цитокина TRAIL к рецептору смерти DR5 в разы повышает его цитотоксичность по отношению к различным опухолевым клеткам (были протестированы 12 линий клеток) и не приводит к проявлению токсичности на нетрансформированных клетках (рис. 1, 6). Повышение эффективности мутантного цитокина особенно ярко проявилось на нечувствительных к TRAIL линиях клеток MCF-7, HT29, SKBR-3, где DR5-B вызывал в 3–8 раз большую гибель клеток по сравнению с цитокином дикого типа. На шести линиях клеток (HCT116, HepG2, Jurkat, U937, A549 и U251 MG) DR5-B убивал в 1,5–2 раза больше клеток по сравнению

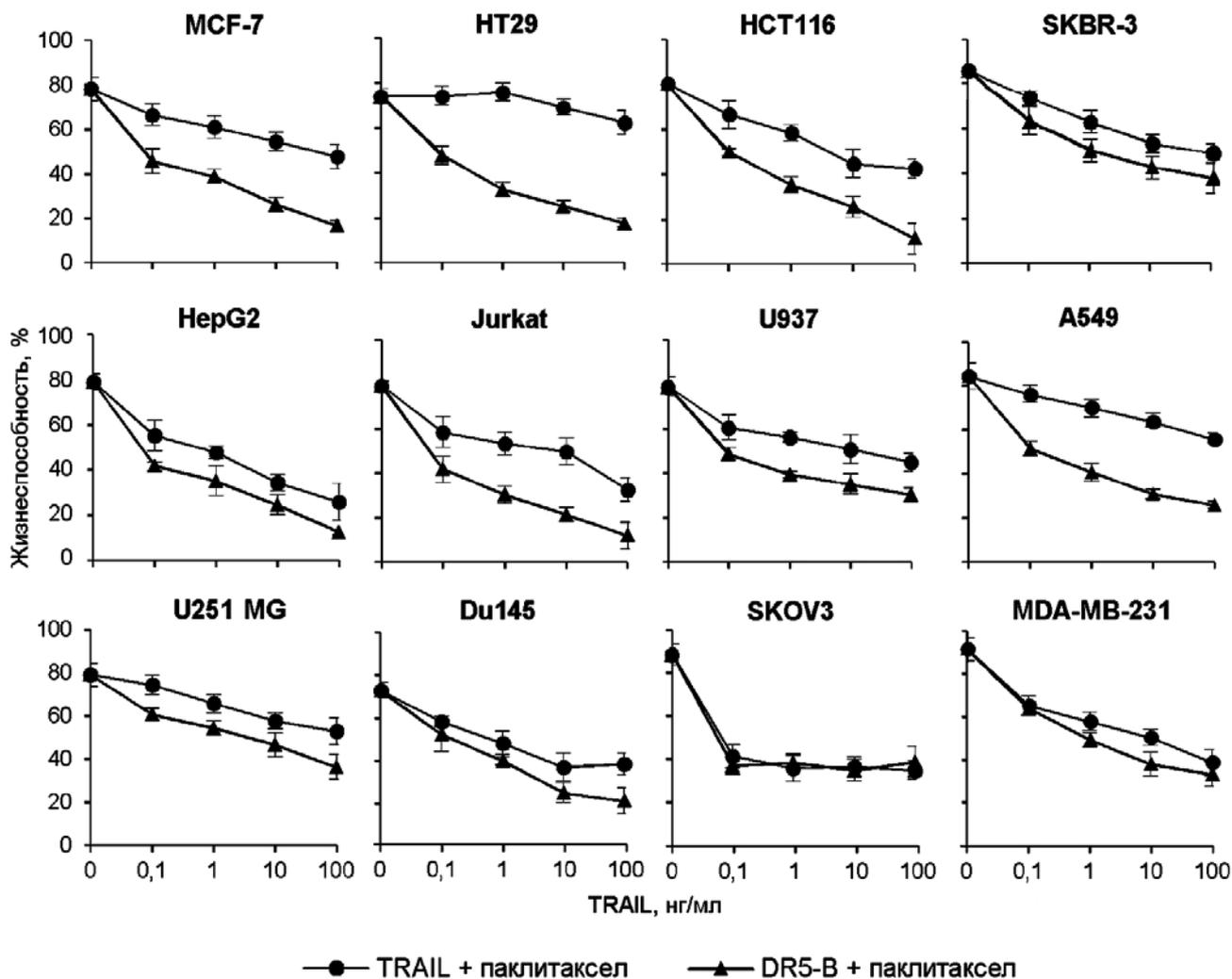


Рис. 4. Влияние паклитаксела на TRAIL или DR5-B-индуцируемую гибель клеток. Указанные опухолевые клетки инкубировали с указанными количествами вариантов TRAIL и паклитакселом (Jurkat – 0,1 нМ, U937 – 1 нМ, HCT116 – 5 нМ, HT29, SKBR-3 и SKOV3 – 10 нМ, MDA-MB-231 – 50 нМ, MCF-7 и A549 – 100 нМ, Du145 – 500 нМ, HepG2 – 1 мМ и U251 MG – 10 мМ) 24 ч, жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста. Значения представлены как средние \pm среднеквадратичное отклонение ($n = 3$)

нию с TRAIL, а полумаксимальные эффективные концентрации для DR5-B были в 1,7–10 раз меньше, чем для TRAIL (табл. 2, 3). На трех клеточных линиях (Du145, SKOV3 и MDA-MB-231) эффективность двух препаратов практически не отличалась.

Клинические испытания показали, что монотерапия как с препаратом TRAIL, так и с моноклональными антителами к рецепторам смерти недостаточно эффективна [7]. В последние годы идет активный поиск сенсibiliзирующих веществ, которые бы усиливали TRAIL-индуцированный апоптоз. В этой работе мы сравнивали влияние доксорубина, паклитаксела и бортезомиба на цитотоксичность препаратов

TRAIL. Все протестированные химиопрепараты усиливали как действие TRAIL, так и DR5-B. Эффективнее всего была комбинация ингибитора протеасом бортезомиба с препаратом DR5-B, при которой погибли более чем 75% клеток почти всех 12 линий, а клетки пяти линий – более чем на 90% (табл. 1). Надо отметить, что на линиях Du145, SKOV3 и MDA-MB-231, на которых эффективность двух препаратов цитокина исходно не отличалась, бортезомиб намного эффективнее усиливал действие DR5-B, чем TRAIL. Интересно, что эффективность DR5-B и TRAIL в комбинации с доксорубицином и паклитакселом на клетках MDA-MB-231 практически не отличалась (табл. 1, 3), тогда как в ком-

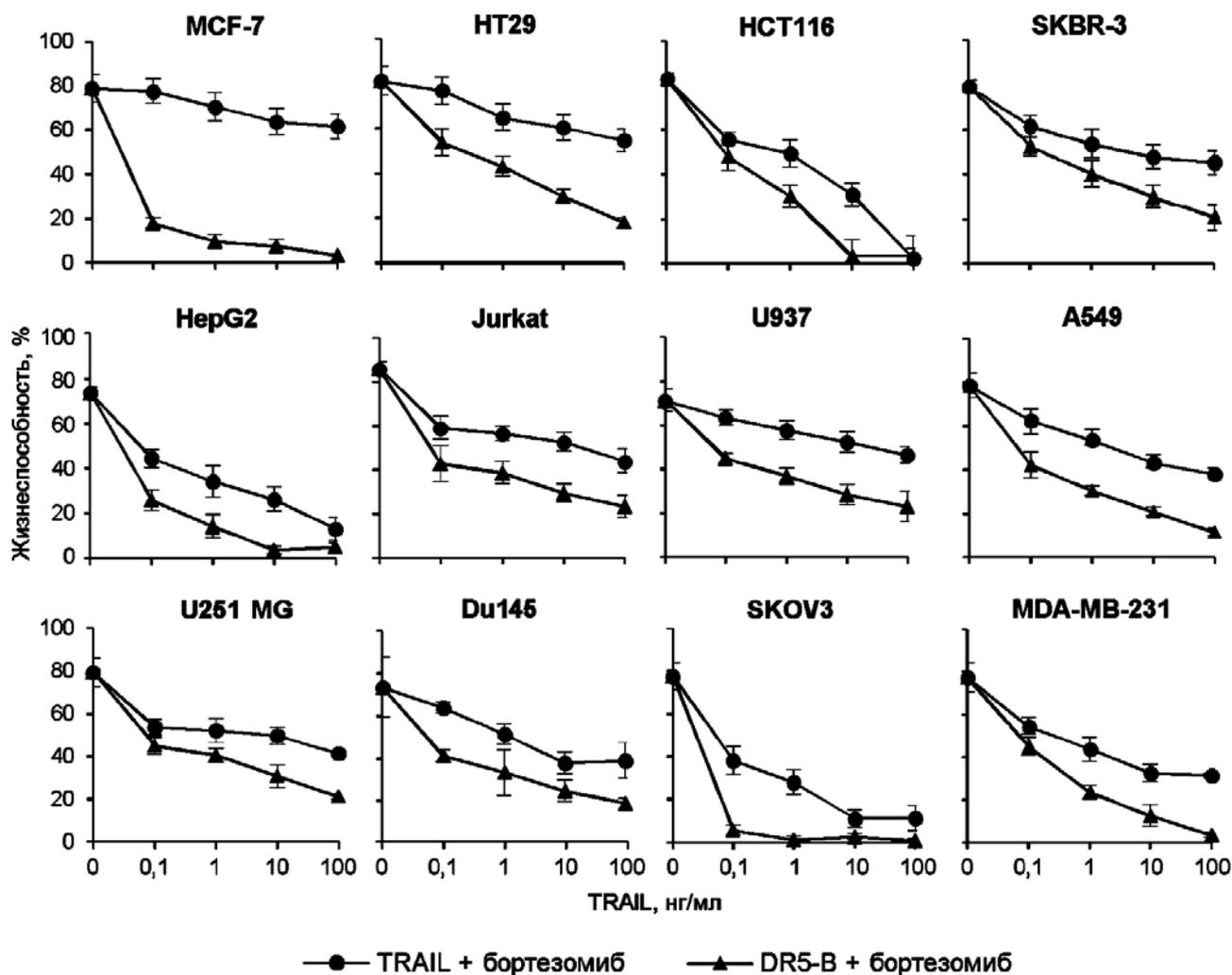


Рис. 5. Влияние бортезомиба на TRAIL или DR5-В-индуцированную гибель опухолевых клеток. Клетки инкубировали 24 ч с TRAIL или DR5-В и бортезомибом (HCT116, Jurkat, U937 – 0,1 нМ, MDA-MB-231 – 25 нМ, SKBR-3, A549 и Du145 – 50 нМ, MCF-7, HT29 и SKOV3 – 100 нМ, HepG2 и U251 MG – 500 нМ) и жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ. Значения представлены как средние \pm средноквадратичное отклонение ($n = 3$)

бинации с бортезомибом эффективность DR5-В и по максимальной гибели клеток и по ЭК₅₀ были намного выше, чем у TRAIL дикого типа. Недавно на клетках MDA-MB-231 и HCT116 было показано, что при комбинированном воздействии TRAIL и бортезомиба происходит специфическая интернализация и деградация рецептора смерти DR4, в ходе которой активируется рецептор DR5 [29].

Важно отметить, что DR5-специфичный мутантный вариант цитокина TRAIL DR5-В не только эффективнее убивал опухолевые клетки, но и демонстрировал значительно более низкие полумаксимальные эффективные концентрации (ЭК₅₀), чем TRAIL, как в присутствии, так и в отсутствие химиопрепаратов (табл. 2, 3). Так

как рекомбинантный препарат TRAIL относительно быстро выводится из организма (период полувыведения у человека составляет около часа), то более низкие ЭК₅₀ DR5-В позволяют предполагать, что фармакологическое действие этого препарата будет пролонгировано [30]. Например, ЭК₅₀ DR5-В на клеточных линиях HepG2 и U937 в 7,1 и 10,6 раз ниже по сравнению с диким типом (табл. 2). В зависимости от химиопрепарата, при совместном воздействии с препаратами TRAIL, эффективность менялась для различных клеток в различной степени, однако в целом ЭК₅₀ DR5-В оказался в 1,5–10 раз ниже по сравнению с TRAIL. Низкие значения ЭК₅₀ отчасти может объясняться тем, что DR5-В практически не связывается с рецепторами-ло-

Таблица 2. Полумаксимальные эффективные концентрации ($ЭК_{50}$) цитотоксического воздействия препаратов TRAIL и DR5-B на опухолевые клетки отдельно и совместно с бортезомибом

Линии клеток	$ЭК_{50}$, нг/мл					
	–			бортезомиб		
	TRAIL	DR5-B	TRAIL/DR5-B	TRAIL	DR5-B	TRAIL/DR5-B
MCF-7	н.в.*	0,10 ± 0,03	–	н.в.	0,06 ± 0,01	–
HT29	н.в.	0,50 ± 0,07	–	0,85 ± 0,12	0,25 ± 0,08	3,4
HCT116	0,91 ± 0,11	0,53 ± 0,14	1,7	0,96 ± 0,15	0,33 ± 0,08	2,9
SKBR-3	н.в.	0,12 ± 0,04	–	0,11 ± 0,02	0,07 ± 0,03	1,6
HepG2	3,03 ± 0,47	0,43 ± 0,04	7,1	0,35 ± 0,03	0,07 ± 0,01	5,0
Jurkat	0,95 ± 0,04	0,35 ± 0,03	2,7	0,12 ± 0,01	0,06 ± 0,01	2,0
U937	0,95 ± 0,19	0,09 ± 0,05	10,6	0,93 ± 0,10	0,09 ± 0,02	10,3
A549	2,07 ± 0,34	0,52 ± 0,04	4,0	0,25 ± 0,03	0,09 ± 0,02	2,8
U251 MG	1,53 ± 0,02	0,35 ± 0,02	4,4	0,17 ± 0,02	0,05 ± 0,01	3,4
Du145	0,85 ± 0,09	0,78 ± 0,07	1,1	0,37 ± 0,09	0,07 ± 0,01	5,3
SKOV3	0,40 ± 0,21	0,39 ± 0,03	1,0	0,09 ± 0,01	0,05 ± 0,01	1,8
MDA-MB-231	0,34 ± 0,02	0,45 ± 0,05	0,8	0,15 ± 0,03	0,08 ± 0,02	1,9

* н.в. — невозможно вычислить $ЭК_{50}$, т.к. цитотоксический эффект TRAIL дикого типа не достигает 15%.

Таблица 3. Полумаксимальные эффективные концентрации ($ЭК_{50}$) цитотоксического воздействия препаратов TRAIL и DR5-B на опухолевые клетки совместно с доксорубицином и паклитакселом

Линии клеток	$ЭК_{50}$, нг/мл					
	доксорубицин			паклитаксел		
	TRAIL	DR5-B	TRAIL/DR5-B	TRAIL	DR5-B	TRAIL/DR5-B
MCF-7	0,62 ± 0,07	0,10 ± 0,03	6,2	0,81 ± 0,11	0,10 ± 0,01	8,1
HT29	0,82 ± 0,09	0,11 ± 0,02	7,5	н.в.*	0,12 ± 0,02	–
HCT116	0,52 ± 0,04	0,31 ± 0,04	1,2	0,78 ± 0,21	0,15 ± 0,04	5,2
SKBR-3	0,12 ± 0,03	0,08 ± 0,01	1,5	0,09 ± 0,10	0,07 ± 0,02	1,3
HepG2	0,41 ± 0,02	0,09 ± 0,01	1,2	0,43 ± 0,10	0,08 ± 0,01	4,8
Jurkat	0,97 ± 0,06	0,26 ± 0,04	3,7	0,20 ± 0,08	0,08 ± 0,03	2,5
U937	0,76 ± 0,09	0,09 ± 0,01	8,4	0,10 ± 0,03	0,09 ± 0,03	1,0
A549	0,31 ± 0,02	0,07 ± 0,02	3,9	1,02 ± 0,23	0,09 ± 0,02	11,3
U251 MG	0,41 ± 0,03	0,34 ± 0,03	1,2	0,93 ± 0,09	0,24 ± 0,03	3,7
Du145	0,27 ± 0,04	0,09 ± 0,01	3,0	0,19 ± 0,04	0,07 ± 0,01	2,7
SKOV3	0,42 ± 0,09	0,07 ± 0,01	6,0	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01	1,0
MDA-MB-231	0,10 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,8	0,10 ± 0,03	0,12 ± 0,01	0,8

* н.в. — невозможно вычислить $ЭК_{50}$, т.к. цитотоксический эффект TRAIL дикого типа не достигает 15%.

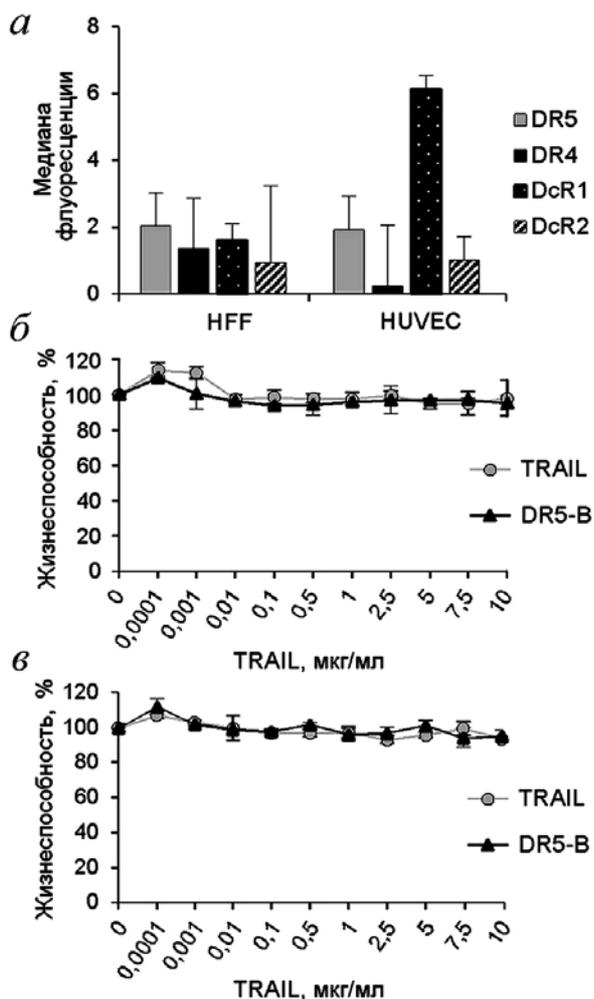


Рис. 6. DR5-B не проявляет цитотоксическую активность к нормальным клеткам человека. *а* – Анализ экспрессии мембранных рецепторов цитокина TRAIL на поверхности фибробластов крайней плоти человека (HFF) и клеток эндотелия пупочной вены человека (HUVEC). Влияние препаратов TRAIL и DR5-B на жизнеспособность HFF (*б*) и HUVEC (*в*). Клетки инкубировали с различными концентрациями препаратов TRAIL и DR5-B 24 ч и их жизнеспособность определяли с помощью МТТ-теста. Значения представлены как средние \pm среднеквадратичное отклонение ($n = 3$)

вушками DcR1 и DcR2, которые экспрессируются на поверхности у всех протестированных клеток, кроме линии SKOV3 (рис. 2). Однако

прямая корреляция между уровнем экспрессии рецепторов ловушек и чувствительностью к препаратам TRAIL не наблюдался. Например, чувствительность клеток MDA-MB-231 к TRAIL и DR5-B не отличалась, несмотря на высокий уровень экспрессии рецепторов ловушек (рис. 2). В отличие от рецепторов смерти модуляция рецепторов ловушек под воздействием химиопрепаратов практически не исследована. Возможно при совместном воздействии агонистов рецепторов смерти и химиопрепаратов модулируются все рецепторы TRAIL, в ходе которого меняется чувствительность клеток [29]. Если учесть тот факт, что в крови человека присутствует растворимый рецептор-ловушка TRAIL OPG, аффинность к которому у DR5-B снижена в 221 раз, то можно предполагать, что *in vivo* различие эффективности воздействия DR5-B и TRAIL на опухолевые клетки будет выражено еще сильнее [11]. Так, например, недавно было показано, что DR5 селективный мутантный вариант TRAIL D269H/E195R, который примерно в 88 раз хуже связывается с OPG, более эффективно убивает клеточные линии меланомы в присутствии OPG, который сильно ингибирует активность TRAIL дикого типа [31].

В настоящее время терапевтический потенциал агонистических антител к рецепторам смерти или рекомбинантного TRAIL до сих пор не реализован в клинике. Для агонистических антител одной из возможных причин неудач является то, что для их эффективного взаимодействия с рецепторами смерти и последующей кластеризации требуются сшивающие агенты (например, антитела к Fc-фрагменту иммуноглобулинов), а эффективность растворимого TRAIL снижена вследствие наличия рецепторов ловушек. Полученный нами высокоселективный к рецептору смерти DR5 мутантный вариант противоопухолевого цитокина TRAIL DR5-B не имеет этих недостатков и возможно будет более эффективен для терапии рака как при монотерапии, так и в комбинации с химиотерапевтическими препаратами.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы РАН «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wiley, S.R., Schooley, K., Smolak, P.J., Din, W.S., Huang, C.P., Nicholl, J.K., Sutherland, G.R., Smith, T.D., Rauch, C., and Smith, C.A. (1995) Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis, *Immunity*, **3**, 673–682.
2. Pitti, R.M., Marsters, S.A., Ruppert, S., Donahue, C.J., Moore, A., and Ashkenazi, A. (1996) Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family, *J. Biol. Chem.*, **271**, 12687–12690.

3. Ashkenazi, A., Pai, R.C., Fong, S., Leung, S., Lawrence, D.A., Marsters, S.A., Blackie, C., Chang, L., McMurtrey, A.E., Hebert, A., DeForge, L., Koumenis, I.L., Lewis, D., Harris, L., Bussiere, J., Koeppen, H., Shahrokhi, Z., and Schwall, R.H. (1999). Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand, *J. Clin. Invest.*, **104**, 155–162.
4. Wajant, H., Gerspach, J., and Pfizenmaier, K. (2013) Engineering death receptor ligands for cancer therapy, *Cancer Lett.*, **332**, 163–174.
5. Lemke, J., von Karstedt, S., Zinngrebe, J., and Walczak, H. (2014) Getting TRAIL back on track for cancer therapy, *Cell Death Differ.*, **21**, 1350–1364.
6. Wajant, H., Gerspach, J., and Pfizenmaier, K. (2005) Tumor therapeutics by design: targeting and activation of death receptors, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **16**, 55–76.
7. Dimberg, L.Y., Anderson, C.K., Camidge, R., Behbakht, K., Thorburn, A., and Ford, H.L. (2013) On the TRAIL to successful cancer therapy? Predicting and counteracting resistance against TRAIL-based therapeutics, *Oncogene*, **32**, 1341–1350.
8. Gonzalez, F., and Ashkenazi, A. (2010) New insights into apoptosis signaling by Apo2L/TRAIL, *Oncogene*, **29**, 4752–4765.
9. Merino, D., Lalaoui, N., Morizot, A., Schneider, P., Solary, E., and Micheau, O. (2006) Differential inhibition of TRAIL-mediated DR5-DISC formation by decoy receptors 1 and 2, *Mol. Cell Biol.*, **26**, 7046–7055.
10. Hymowitz, S.G., O'Connell, M.P., Ultsch, M.H., Hurst, A., Totpal, K., Ashkenazi, A., de Vos, A.M., and Kelley, R.F. (2000) A unique zinc-binding site revealed by a high-resolution X-ray structure of homotrimeric Apo2L/TRAIL, *Biochemistry*, **39**, 633–640.
11. Gasparian, M.E., Chernyak, B.V., Dolgikh, D.A., Yagolovich, A.V., Popova E.N., Sycheva, A.M., Moshkovskii, S.A., and Kirpichnikov, M.P. (2009) Generation of new TRAIL mutants DR5-A and DR5-B with improved selectivity to death receptor 5, *Apoptosis*, **14**, 778–787.
12. Georgakis, G.V., Li, Y., Humphreys, R., Andreeff, M., O'Brien, S., Younes, M., Carbone, A., Albert, V., and Younes, A. (2005) Activity of selective fully human agonistic antibodies to the TRAIL death receptors TRAIL-R1 and TRAIL-R2 in primary and cultured lymphoma cells: induction of apoptosis and enhancement of doxorubicin- and bortezomib induced cell death, *Br. J. Haematol.*, **130**, 501–510.
13. Griffith, T.S., Rauch, C.T., Smolak, P.J., Waugh, J.Y., Boiani, N., Lynch, D.H., Smith, C.A., Goodwin, R.G., and Kubin, M.Z. (1999) Functional analysis of TRAIL receptors using monoclonal antibodies, *J. Immunol.*, **162**, 2597–2605.
14. Elrod, H.A., and Sun, S.Y. (2008) Modulation of death receptors by cancer therapeutic agents, *Cancer Biol. Ther.*, **7**, 163–173.
15. Mahalingam, D., Szegezdi, E., Keane, M., de Jong, S., and Samali, A. (2009) TRAIL receptor signalling and modulation: Are we on the right TRAIL? *Cancer Treat Rev.*, **35**, 280–288.
16. Li, F., and Ravetch, J.V. (2012) Apoptotic and antitumor activity of death receptor antibodies require inhibitory Fcγ receptor engagement, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 10966–10971.
17. Kelley, R.F., Totpal, K., Lindstrom, S.H., Mathieu, M., Billeci, K., Deforge, L., Pai, R., Hymowitz, S.G., and Ashkenazi, A. (2005) Receptor-selective mutants of Apo2L/TRAIL reveal a greater contribution of DR5 than DR4 to apoptosis signaling, *J. Biol. Chem.*, **280**, 2205–2212.
18. Van der Sloot, A.M., Tur, V., Szegezdi, T.E., Mullally, M.M., Cool, R.H., Samali, A., Serrano, L., and Quax, W.J. (2006) Designed tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand variants initiating apoptosis exclusively via the DR5 receptor, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 8634–8639.
19. Gasparian, M.E., Ostapchenko, V.G., Schulga, A.A., Dolgikh, D.A., and Kirpichnikov, M.P. (2003) Expression, purification, and characterization of human enteropeptidase catalytic subunit in *Escherichia coli*, *Protein Express. Purif.*, **31**, 133–139.
20. Gasparian, M.E., Bychkov, M.L., Dolgikh, D.A., and Kirpichnikov, M.P. (2011) Strategy for improvement of enteropeptidase efficiency in tag removal processes, *Protein Expr. Purif.*, **79**, 191–196.
21. Yagita, H., Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M.J., and Okumura, K. (2004) TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy, *Cancer Sci.*, **95**, 777–783.
22. Ashkenazi, A., and Herbst, R.S. (2008) To kill a tumor cell: the potential of proapoptotic receptor agonists, *J. Clin. Invest.*, **118**, 1979–1990.
23. Prasad, S., Kim, J.H., Gupta, S.C., and Aggarwal, B.B. (2014) Targeting death receptors for TRAIL by agents designed by Mother Nature, *Trends Pharmacol. Sci.*, **35**, 520–536.
24. van Roosmalen, I.A., Quax, W.J., and Kruijff, F.A. (2014) Two death-inducing human TRAIL receptors to target in cancer: similar or distinct regulation and function? *Biochem. Pharmacol.*, **91**, 447–456.
25. Lu, M., Lawrence, D.A., Marsters, S., Acosta-Alvear, D., Kimmig, P., Mendez, A.S., Paton, A.W., Paton, J.C., Walter, P., and Ashkenazi, A. (2014) Cell death. Opposing unfolded-protein-response signals converge on death receptor 5 to control apoptosis, *Science*, **345**, 98–101.
26. Holland, P.M. (2014) Death receptor agonist therapies for cancer, which is the right TRAIL? *Cytokine Growth Factor Rev.*, **25**, 185–193.
27. MacFarlane, M., Inoue, S., Kohlhaas, S.L., Majid, A., Harper, N., Kennedy, B.D., Dyer, M.J., and Cohen, G.M. (2005) Chronic lymphocytic leukemic cells exhibit apoptotic signaling via TRAIL-R1, *Cell Death Differ.*, **12**, 773–782.
28. Kabore, A.F., Sun, J., Hu, X., McCrea, K., Johnston, J.B., and Gibson, S.B. (2006) The TRAIL apoptotic pathway mediates proteasome inhibitor induced apoptosis in primary chronic lymphocytic leukemia cells, *Apoptosis*, **11**, 1175–1193.
29. Bychkov, M.L., Gasparian, M.E., Dolgikh, D.A., and Kirpichnikov, M.P. (2014) Combination of TRAIL with bortezomib shifted apoptotic signaling from DR4 to DR5 death receptor by selective internalization and degradation of DR4, *PLoS One*, **9**, e109756.
30. Herbst, R.S., Eckhardt, S.G., Kurzrock, R., Ebbinghaus, S., O'Dwyer, P.J., Gordon, M.S., Novotny, W., Goldwasser, M.A., Tohnya, T.M., Lum, B.L., Ashkenazi, A., Jubb, A.M., and Mendelson, D.S. (2010) Phase I dose-escalation study of recombinant human Apo2L/TRAIL, a dual proapoptotic receptor agonist, in patients with advanced cancer, *J. Clin. Oncol.*, **28**, 2839–2846.
31. Bosman, M.C., Reis, C.R., Schuringa, J.J., Vellenga, E., and Quax, W.J. (2014) Decreased affinity of recombinant human tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (rhTRAIL) D269H/E195R to osteoprotegerin (OPG) overcomes TRAIL resistance mediated by the bone microenvironment, *J. Biol. Chem.*, **289**, 1071–1078.

**MUTATIONS ENHANCING SELECTIVITY
OF ANTITUMOR CYTOKINE TRAIL TO DR5
RECEPTOR INCREASES ITS CYTOTOXICITY
AGAINST TUMOR CELLS**

**M. E. Gasparian^{1*}, M. L. Bychkov¹, A. V. Yagolovich^{1,2},
D. A. Dolgikh^{1,2}, M. P. Kirpichnikov^{1,2}**

¹ *Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow 117997, Russia;
fax: +7(495)330-6538, E-mail: marine_gasparian@yahoo.com*

² *M. V. Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology,
Moscow 119991, Russia*

Received December 23, 2014

Revision received February 18, 2015

The tumor necrosis factor superfamily cytokine TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) induces apoptosis in tumor cells by binding to death receptors DR4 and DR5 without affecting normal cells. However, the therapeutic use of TRAIL is limited, because many tumor cells are resistant to it. The resistance is partially related to interaction of TRAIL with the decoy receptors DcR1 and DcR2, which do not trigger the apoptotic signal and inhibit signaling of death receptors. Previously, we designed a unique DR5-specific TRAIL mutant variant DR5-B, which binds to DR5 receptor as effectively as the original cytokine, but has practically no interaction with DR4 and DcR1 receptors, and its affinity for DcR2 is reduced 400-fold. In the present work, the cytotoxicity of TRAIL and DR5-B was analyzed on 12 different tumor cell lines and two types of normal cells. In nine tumor lines, DR5-B killed 1.5–5 times more cells than TRAIL and did not exhibit toxicity towards normal cells. Chemotherapeutic drugs such as doxorubicin, paclitaxel, and bortezomib augmented the effect of both TRAIL variants, and the enhancing effect was more pronounced for DR5-B. Half-maximal effective concentrations (EC_{50}) for DR5-B in combination with chemotherapeutic agents were 1.5–10-fold lower than for wild-type TRAIL. Thus, DR5-B is as a promising candidate for both monotherapy and combination with chemotherapy for treatment of TRAIL-resistant tumors.

Key words: TRAIL, DR5-specific variant of TRAIL, DR5-B, doxorubicin, paclitaxel, bortezomib, anticancer therapy