

УДК 616-006.66:577.29

АКТИВНОСТЬ МИКРОСОМАЛЬНЫХ РЕДУКТАЗ В КЛЕТКАХ РАКА ЯИЧНИКОВ, ИНТАКТНЫХ И ДЕФИЦИТНЫХ ПО КАСПАЗЕ-2

¹Федорова М.В., ²Шестакова М.А., ³Проскурнина Е.В.

¹ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора»,
Москва, e-mail: theklazontag@yandex.ru;

²ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет
имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Москва, e-mail: chrysolite7@gmail.com;

³ФГБНУ «Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова»,
Москва, e-mail: proskurnina@gmail.com

Рак яичников занимает лидирующую позицию среди причин смерти от гинекологических заболеваний. Гомеостаз активных форм кислорода и апоптоз являются ключевыми и патогенетически связанными звеньями канцерогенеза. Каспаза-2 обладает уникальным свойством запускать митохондриальный путь апоптоза в клетках. На мембранах митохондрий и эндоплазматического ретикулума располагаются цепи микросомального окисления цитохрома b5 и цитохрома P450. Проведено исследование активности NADH-зависимой цитохром b5-редуктазы (CYB5R) и NADPH-зависимой цитохром P450-редуктазы (CYPOR) в клеточной культуре рака яичников (Caov-4) в трех группах: интактные клетки (Wild Type), нокаутные клетки по гену каспазы-2 методом CRISPR/Cas9 и клетки, экспрессирующие малую шпилечную РНК, снижающую синтез каспазы-2, при помощи оригинальной методики люцигенин-активированной хемилуминесценции со стимулами NADH и NADPH. Стационарные уровни стимулированной хемилуминесценции A_{NADH} и A_{NADPH} отражают активность NADH-зависимой цитохром b5-редуктазы и NADPH-зависимой цитохром P450-редуктазы соответственно. Показано, что отсутствие или снижение экспрессии гена каспазы-2 в клетках приводит к снижению активности цитохром b5-редуктазы в исследованных клетках рака яичника, что имеет практическое значение для изучения терапии и патогенеза злокачественных новообразований яичников.

Ключевые слова: рак яичников, каспаза-2, NADH-зависимая цитохром b5-редуктаза, NADPH-зависимая цитохром P450-редуктаза, активные формы кислорода, хемилуминесценция

ACTIVITY OF MICROSOMAL REDUCTASES IN INTACT AND CASPASE-2 DEFICIENT OVARIAN CANCER CELLS

¹Fedorova M.V., ²Shetakova M.A., ³Proskurnina E.V.

¹Central Research Institute of Epidemiology of the Federal Service for Surveillance
on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Moscow, e-mail: theklazontag@yandex.ru;

²Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, e-mail: chrysolite7@gmail.com;

³Research Centre for Medical Genetics, Moscow, e-mail: proskurnina@gmail.com

Ovarian cancer occupies a leading position among the causes of death from gynecological diseases. Homeostasis of reactive oxygen species and apoptosis are key and pathogenetically related links in carcinogenesis. Caspase-2 has the unique ability to trigger the mitochondrial pathway of apoptosis. On the membranes of mitochondria and the endoplasmic reticulum, there are chains of microsomal oxidation of cytochrome b5 and cytochrome P450. We have studied the activity of NADH-dependent cytochrome b5 reductase (CYB5R) and NADPH-dependent cytochrome P450 reductase (CYPOR) in ovarian cancer culture (Caov-4) in three groups: intact (Wild Type, WT), caspase gene knockout -2 by the CRISPR/Cas9 method and expressing small hairpin RNA that reduces caspase-2 synthesis using an original technique of lucigenin-enhanced chemiluminescence with NADH and NADPH stimuli. Stationary levels of stimulated chemiluminescence A_{NADH} and A_{NADPH} reflect the activity of NADH-dependent cytochrome b5 reductase and NADPH-dependent cytochrome P450 reductase, respectively. The absence or decrease in the expression of the caspase-2 gene leads to a decrease in the activity of cytochrome b5 reductase in ovarian cancer cells, which is of practical importance for studying the therapy and pathogenesis of ovarian cancer.

Keywords: ovarian cancer, caspase-2, NADH-dependent cytochrome b5 reductase, NADPH-dependent cytochrome P450 reductase, reactive oxygen species, chemiluminescence

Рак яичников занимает лидирующую позицию среди причин смерти от гинекологических заболеваний. Это связано с диагностированием на поздних стадиях заболевания, низким процентом пятилетней выживаемости и высоким процентом химиорезистентности [1]. Канцерогенез является сложным многокомпонентным процессом, в котором большое значение имеет нарушение гомео-

стаза активных форм кислорода (АФК) [2] и апоптоза, тесно связанных между собой в единой патогенетической цепи. Запуск апоптоза раковых клеток является целью различных схем терапии рака, например химиотерапии, лучевой терапии, иммунотерапии или таргетной терапии [3]. Резистентность опухоли к терапии зависит в том числе от способности клеток к индукции апоптоза.

Каспаза-2 обладает уникальными характеристиками, свойственными инициаторным, эффекторным и неапоптотическим каспазам. Она играет роль в запуске и усилении апоптоза, активируясь при воздействии генотоксического стресса, активации рецепторов смерти, стресса эндоплазматического ретикулума, метаболических изменений, тепловом шоке и воздействии ряда патогенов [4]. Каспаза-2 играет неапоптотическую роль в остановке клеточного цикла, стабильности генома и подавлении опухоли, действует как супрессор опухоли и участвует в химиотерапевтическом ответе [5].

Каспаза-2 обладает уникальным свойством запускать митохондриальный путь апоптоза посредством расщепления проапоптотического белка Bid и последующей пермеабиллизацией внешней мембраны митохондрий. Каспаза-2 участвует в запуске апоптоза, вызванном митохондриальным оксидативным стрессом [6] и стрессом эндоплазматического ретикулума (ЭПР-стрессом).

На внешней мембране митохондрий и мембранах эндоплазматического ретикулума располагаются цепи микросомального окисления цитохрома b5 и цитохрома P450. Не найдено работ, в которых была бы изучена возможная связь активности каспазы-2 и систем микросомального окисления, однако гипотетически такая связь может существовать на уровне кислородного метаболизма и регуляции апоптоза. Цель исследования – изучить активность микросомальных редуктаз цитохром b5-редуктазы (CYP5R) и цитохром P450-редуктазы (CYPOR) на культуре интактных и дефицитных по каспазе-2 клетках рака яичников при помощи оригинальной методики люцигенин-активированной хемилюминесценции со стимулами NADH и NADPH.

Материалы и методы исследования

Исследовали следующие культуры клеток рака яичников Caov-4 (ATCC, США): интактные (Wild Type, WT), нокаутные по гену каспазы-2 с помощью метода CRISPR/Cas9 (Cr) и экспрессирующие малую шпилечную РНК, снижающую синтез каспазы-2 (Sh). Клетки центрифугировали в течение 10 мин при 3000 g при комнатной температуре, далее осадок ресуспензировали раствором Хенкса, стабилизированном 2 мМ HEPES. Надосадочную жидкость использовали для контрольных экспериментов.

Оценку активности микросомальных редуктаз в культурах клеток проводили с помощью люцигенин-активированной хемилюминесценции на 12-канальном при-

боре Lum-1200 («ДИСофт», Россия). В пластиковую кювету вносили 800 мкл суспензии культуры клеток (количество клеток в пробе 800 000) и регистрировали базальную хемилюминесценцию в течение 3 мин при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Далее добавляли 200 мкл люцигенина (динитрат 10,10'-диметил-9,9'-биакридиния, Sigma, США, конечная концентрация 200 мкМ) и продолжали запись сигнала 3–5 мин. Далее к пробам добавляли NADH или NADPH (Sigma, США) в конечной концентрации 100 мкМ и регистрировали ответ на стимулы в течение не менее 30 мин. Общий объем пробы в кювете составил 1,000 мл. Стационарные уровни стимулированной хемилюминесценции A_{NADH} и A_{NADPH} отражают активность NADH-зависимой цитохром b5-редуктазы и NADPH-зависимой цитохром P450-редуктазы, соответственно. Эксперименты были проведены на двух образцах культур, каждую хемилюминограмму регистрировали в трех повторах.

Результаты исследования и их обсуждение

При добавлении стимулов к суспензии клеток Caov-4 WT уровень хемилюминесценции возрастал на порядок, и кинетика была близка к стационарной. Аналитический сигнал обусловлен прямым восстановлением люцигенина при помощи редуктаз с образованием супероксидного анион-радикала, к которому чувствителен люцигенин как хемилюминесцентный зонд. Таким образом, уровень хемилюминесценции отражает активность редуктаз. Для дикого типа активность цитохром b5-редуктазы была примерно в полтора-два раза выше активности цитохром P450-редуктазы (рис. 1, а). В контрольном опыте с надосадочной жидкостью сигнал хемилюминесценции был близок к нулю (рис. 1, б).

В клетках Caov-4, дефицитных по каспазе-2, уровень NADH-стимулированной хемилюминесценции был ниже, чем в клетках WT (рис. 2, а), причем этот эффект не зависел от метода редактирования генома (рис. 2, б). Уровень NADPH-зависимой хемилюминесценции был практически одинаков в клетках WT, Sh и Cr.

Таким образом, в дефицитных по каспазе-2 клетках рака яичников снижена примерно в 1,5–2 раза активность CYP5R, но не CYPOR.

Накопленные данные свидетельствуют о том, что каспаза-2 связана как с митохондриально-опосредованным апоптозом, в том числе вызванным стрессом ЭПР, так и с метаболическими процессами, в том числе с метаболизмом активных форм кислорода.

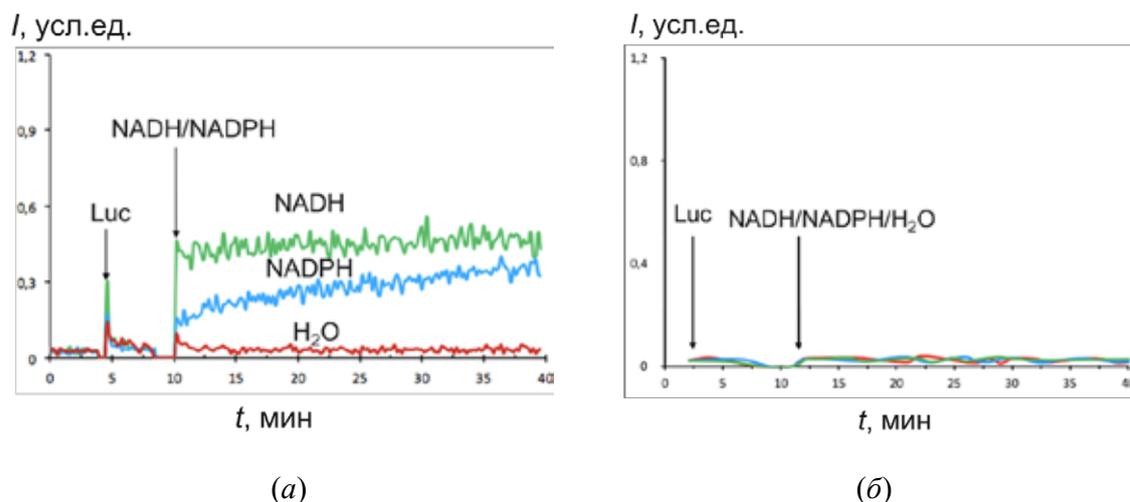


Рис. 1. Хемилуминограммы клеток дикого типа (а) и надосадочной жидкости (б) в присутствии люциферина (Luc) NADH или NADPH; в качестве контроля к клеткам добавляли 10 мкл дистиллированной воды

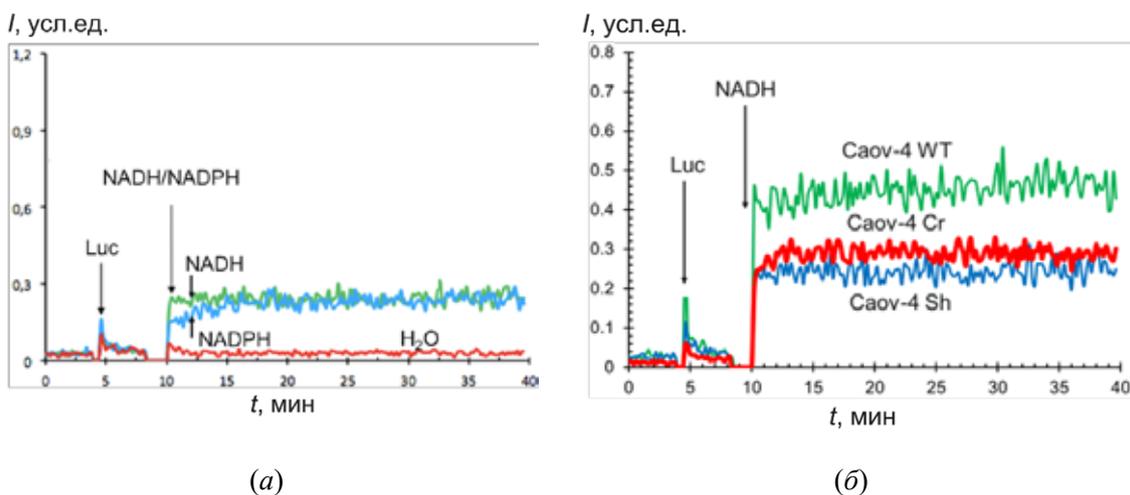


Рис. 2. Хемилуминограммы клеток Caov-4 (Sh), дефицитных по каспазе-2, в присутствии люциферина (Luc) и NADH или NADPH (а); в качестве контроля к клеткам добавляли 10 мкл дистиллированной воды. Хемилуминограммы NADH-стимулированной хемилуминесценции для клеток Caov-4 дикого типа (WT) и с дефицитом по каспазе-2 (Cr и Sh) (б)

Каспаза-2, скорее всего, через факторы транскрипции FoxO, регулирует реакцию на окислительный стресс *in vivo*. У мышей с нокаутом по каспазе-2 уровень окислительного стресса в белках был существенно выше, чем у животных дикого типа, а экспрессия генов транскрипционных противовоспалительных факторов FoxO1 и Nrf2 была снижена. Также при дефиците каспазы-2 не было усиления активности антиоксидантных ферментов глутатионпероксидазы и супероксиддисмутазы в ответ на обработку прооксидантом [7]. Таким образом, дефицит каспазы-2 приводит к усилению окисли-

тельного стресса потому, что не активируется механизм антиоксидантной защиты, что делает организм более уязвимым к экзогенным факторам и может частично объяснить более короткую продолжительность жизни мышей, дефицитных по каспазе-2 [7].

С другой стороны, АФК являются проапоптотическим фактором. Окислительный стресс приводит к накоплению белка p53 с последующей активацией каспазы-2, что, в свою очередь, инициирует апоптоз через митохондриальный путь в нейрональных стволовых клетках [8]. Ключевая роль активных форм кислорода в опосре-

дованном каспазой-2 апоптозе подтверждается тем фактом, что антиоксиданты N-ацетилцистеин и кверцитин блокировали апоптоз и последовательную активацию каспазы-2 и каспазы-3 в раковых клетках [9]. В частности, может быть задействован путь АФК -> PERK (панкреатическая киназа эндоплазматического ретикулума) -> eIF2 α (фактор инициации трансляции 2 эукариотического типа) -> каспаза-2 [10].

Стресс эндоплазматического ретикулума (накопление белков с нарушением укладки) приводит к активации проапоптотических белков BCL-2, BAX и BAK на внешней митохондриальной мембране, запуская таким образом апоптоз, и каспаза-2 участвует в этом, расщепляя BID в ответ на стресс эндоплазматического ретикулума, что приводит к потере потенциала на митохондриальной мембране; таким образом, ее ингибирование ее повышает устойчивость к апоптозу. Механизм апоптоза через BID и каспазу-2 реализуется также при окислительном стрессе. Таким образом, каспаза-2 участвует в передаче сигналов при ЭПР-индуцированном апоптозе для запуска митохондриального пути апоптоза [11].

Подведем итог: а) дефицит каспазы-2 способствует развитию окислительного стресса за счет ингибирования антиоксидантного ответа; б) окислительный стресс приводит к апоптозу, опосредованному каспазой-2; в) при стрессе эндоплазматического ретикулума каспаза-2 выступает как участник, передающий сигнал к митохондриальному апоптозу.

Цепь цитохрома P450 располагается на мембранах эндоплазматического ретикулума. NADPH-зависимая цитохром P450-редуктаза (CYPOR) восстанавливает цитохром P450, цитохром b5, гемоксигеназу, сквален-монооксигеназу, 7-дегидрохолестерол редуктазу, при этом образуются супероксидный анион-радикал и пероксид водорода. Цепь цитохрома b5 локализуется на мембранах эндоплазматического ретикулума, на внешней мембране митохондрий и мембранах комплекса Гольджи. NADH-зависимая цитохром b5-редуктаза (CYB5R) участвует в синтезе холестерина, элонгации жирных кислот, гидроксигировании ксенобиотиков и стероидных гормонов, поддерживает в восстановленном состоянии аскорбат и коэнзим Q10, защищая клетку от апоптоза [12]. Митохондриальная CYB5R локализуется на внешней мембране и в межмембранном пространстве. Она участвует, в частности, в синтезе липидов в митохондриях адипоцитов [13]. С другой стороны, CYB5R может действовать как прооксидантный фермент. Активация

CYB5R, связанной с липидными рафтами, приводит к повышенной продукции супероксидного анион-радикала, что переводит апоптоз мозжечковых гранулярных клеток в необратимую фазу [14].

В литературе не найдено работ, изучающих взаимосвязь каспазы-2 и цитохром b5-редуктазы. Возникает ряд вопросов. Во-первых, в каком именно компартменте произошло снижение активности или концентрации CYB5R – митохондриальном, компартменте ЭПР или в комплексе Гольджи. При этом митохондриальная цитохром b5-редуктаза может быть как внешне-мембранной, так и межмембранной, активность которой зависит от эффективности транслокации. Поскольку каспаза-2 тесно связана как с митохондриями, так и эндоплазматическим ретикулумом, ответ на этот вопрос следует искать специальными исследованиями, выделяя митохондрии и микросомальную фракцию из клеток, дефицитных по каспазе-2. Второй вопрос – за счет чего произошло снижение активности (или концентрации) CYB5R. Этот фермент является участником антиоксидантной защиты, и наши данные согласуются с ранее полученными результатами, свидетельствующими, что при дефиците каспазы-2 снижена активация антиоксидантных ферментов супероксиддисмутазы и глутатион-пероксидазы в ответ на окислительный стресс [15]. Каспаза-2 и CYB5R являются многофункциональными ферментами, участвующими в метаболизме активных форм кислорода, других метаболических процессах (обмен липидов и углеводов), в регуляции апоптоза. В целом они действуют в разных направлениях – активация каспазы-2 усиливает апоптоз и окислительный стресс, активация CYB5R противодействует апоптозу и окислительному стрессу. Если снижение активности каспазы-2 приводит к снижению активности CYB5R, возможно, эти ферменты связаны единой регуляцией, механизм которой предстоит выяснить.

Заключение

Отсутствие или снижение экспрессии гена каспазы-2 приводит к снижению активности цитохром b5-редуктазы в клетках рака яичника, что позволяет выдвинуть гипотезу о том, что эти ферменты связаны через пока еще невыясненные сигнальные пути. Предстоит определить, в каком пуле CYB5R и по какому механизму произошло снижение активности. Поскольку в аспекте апоптоза и окислительного стресса каспаза-2 и CYB5R действуют разнонаправленно, практическое значение заключается в том, что при разработке методов терапии

рака резистентных опухолей нужно учитывать влияние обоих ферментов.

Авторы благодарят канд. биол. наук Г.С. Копеину за предоставленные образцы клеток и ценные советы при обсуждении результатов.

Список литературы

1. Webb P.M., Jordan S.J. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2017. Vol. 41. P. 3–14. DOI: 10.1016/j.bpobgyn.2016.08.006.
2. Sarmiento-Salinas F.L., Perez-Gonzalez A., Acosta-Casique A., Ix-Ballote A., Diaz A., Trevino S., Rosas-Murrieta N.H., Millan-Perez-Pena L., Maycotte P. Reactive oxygen species: Role in carcinogenesis, cancer cell signaling and tumor progression. *Life Sci* 2021. Vol. 284. P. 119942. DOI: 10.1016/j.lfs.2021.119942.
3. Carneiro B.A., El-Deiry W.S. Targeting apoptosis in cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2020. Vol. 17. No. 7. P. 395–417. DOI: 10.1038/s41571-020-0341-y.
4. Aksenova V.I., Bylino O.V., Zhivotovskii B.D., Lavrik I.N. [Caspase-2: what do we know today?]. *Mol Biol (Mosk)*. 2013. Vol. 47. No. 2. P. 187. DOI:10.7868/s0026898413010023.
5. Terry M.R., Arya R., Mukhopadhyay A., Berrett K.C., Clair P.M., Witt B., Salama M.E., Bhutkar A., Oliver T.G. Caspase-2 impacts lung tumorigenesis and chemotherapy response in vivo. *Cell Death Differ.* 2015. Vol. 22. No. 5. P. 719–730. DOI: 10.1038/cdd.2014.159.
6. Lopez-Cruzan M., Sharma R., Tiwari M., Karbach S., Holstein D., Martin C.R., Lechleiter J.D., Herman B. Caspase-2 resides in the mitochondria and mediates apoptosis directly from the mitochondrial compartment. *Cell Death Discov.* 2016. Vol. 2. DOI: 10.1038/cddiscovery.2016.5.
7. Shalini S., Puccini J., Wilson C.H., Finnie J., Dorstyn L., Kumar S. Caspase-2 protects against oxidative stress in vivo. *Oncogene.* 2015. Vol. 34. No. 38. P. 4995–5002. DOI: 10.1038/nc.2014.413.
8. Tamm C., Zhivotovsky B., Ceccatelli S. Caspase-2 activation in neural stem cells undergoing oxidative stress-induced apoptosis. *Apoptosis.* 2008. Vol. 13. No. 3. P. 354–363. DOI: 10.1007/s10495-007-0172-7.
9. Kim B.M., Rode A.B., Han E.J., Hong I.S., Hong S.H. 5-Phenylselenenyl- and 5-methylselenenyl-methyl-2'-deoxyuridine induce oxidative stress, DNA damage, and caspase-2-dependent apoptosis in cancer cells. *Apoptosis.* 2012. Vol. 17. No. 2. P. 200–216. DOI: 10.1007/s10495-011-0665-2.
10. Moserova I., Truxova I., Garg A.D., Tomala J., Agostinis P., Cartron P.F., Vosahlikova S., Kovar M., Spisek R., Fucikova J. Caspase-2 and oxidative stress underlie the immunogenic potential of high hydrostatic pressure-induced cancer cell death. *Oncoimmunology.* 2017. Vol. 6. No. 1. P. e1258505. DOI: 10.1080/2162402X.2016.1258505.
11. Mishra R., Karande A.A. Endoplasmic reticulum stress-mediated activation of p38 MAPK, Caspase-2 and Caspase-8 leads to abrin-induced apoptosis. *PLoS One.* 2014. Vol. 9. No. 3. P. e92586. DOI: 10.1371/journal.pone.0092586.
12. Elahian F., Sepehrizadeh Z., Moghimi B., Mirzaei S.A. Human cytochrome b5 reductase: structure, function, and potential applications. *Crit Rev Biotechnol.* 2014. Vol. 34. No. 2. P. 134–43. DOI: 10.3109/07388551.2012.732031.
13. Neve E.P., Nordling A., Andersson T.B., Hellman U., Diczfalusy U., Johansson I., Ingelman-Sundberg M. Amidoxime reductase system containing cytochrome b5 type B (CYB5B) and MOSC2 is of importance for lipid synthesis in adipocyte mitochondria. *J Biol Chem.* 2012. Vol. 287. No. 9. P. 6307–6317. DOI: 10.1074/jbc.M111.328237.
14. Samhan-Arias A.K.; Marques-da-Silva D., Yanamala N.; Gutierrez-Merino C. Stimulation and clustering of cytochrome b5 reductase in caveolin-rich lipid microdomains is an early event in oxidative stress-mediated apoptosis of cerebellar granule neurons. *J Proteomics.* 2012. Vol. 75. No. 10. P. 2934–2949. DOI: 10.1016/j.jprot.2011.12.007.
15. Shalini S., Kumar S. Caspase-2 and the oxidative stress response. *Mol Cell Oncol.* 2015. Vol. 2. No. 4. P. e1004956. DOI: 10.1080/23723556.2015.1004956.