

УДК 577

Е.А.Затуловский (4 курс, каф. БФ), М.В.Абрамова, к.б.н.,
В.А.Поспелов, д.б.н., ИИЦ РАН

ХАРАКТЕРИСТИКА КЛОНОВ КЛЕТОК MEF ($p21^{Waf1}$ -/-), ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ОНКОГЕНАМИ E1A и cHa-ras.

Эмбриональные фибробласты мыши, трансформированные парой комплементирующих онкогенов E1A и cHa-ras (линия MERas), в отличие от исходных нормальных фибробластов, не способны реализовывать блоки клеточного цикла в ответ на воздействия различных ДНК-повреждающих агентов, стресса и голода, а гибнут апоптотически. Было показано, что ингибитор деацетилаз гистонов бутират натрия способен вызывать остановку пролиферации клеток MERas. Ряд данных свидетельствует о том, что определяющую роль в индуцированной бутиратом натрия остановке пролиферации MERas играет ингибитор циклин-зависимых киназ $p21^{Waf1}$, количество которого значительно увеличивается в обработанных бутиратом натрия трансформантах.

Для того, чтобы выяснить роль $p21^{Waf1}$ в остановке пролиферации клеток MERas, была получена линия эмбриональных фибробластов мыши, трансформированных онкогенами E1A+cHa-ras, с нокаутированным геном $p21^{Waf1}$ (линия MERas ($waf1^{-/-}$)). Анализируя кривые роста клеток с нормальным и делетированным $p21^{Waf1}$, мы показали, что бутират натрия вызывает остановку клеток MERas, лишённых ингибитора циклин-зависимых киназ $p21^{Waf1}$, так же, как и контрольных клеток MERas. Однако эффект обнаруживается позднее, чем в клетках с диким типом $p21^{Waf1}$. Таким образом, мы исключили определяющую роль белка $p21^{Waf1}$ в остановке клеточного цикла трансформантов MERas, вызванной бутиратом натрия.

Чтобы определить, какие молекулярные механизмы задействованы в остановке клеток MERas после обработки бутиратом натрия, мы анализировали ДНК-связывающую активность транскрипционного фактора E2F. Транскрипционный фактор E2F регулирует экспрессию многих генов, продукты которых необходимы для перехода из фазы G_1 в фазу S клеточного цикла, а также для синтеза ДНК. Методом задержки ДНК-белковых комплексов в геле с использованием радиоактивно меченой последовательности ДНК для связывания транскрипционного фактора E2F, мы показали, что бутират натрия вызывает ослабление ДНК-связывающей способности основного белкового комплекса, содержащего E2F, по сравнению с необработанными клетками. Более того, в обработанных бутиратом натрия клетках наблюдается появление полосы с замедленной подвижностью в геле. Это свидетельствует о том, что бутират натрия вызывает в клетках MERas формирование более высокомолекулярного белкового комплекса на промоторах, содержащих последовательность для связывания транскрипционного фактора E2F. Уменьшение ДНК-связывающей активности транскрипционного фактора E2F, индуцированное бутиратом натрия, мы обнаружили также и в клетках MERas ($waf1^{-/-}$).

Таким образом, мы исключили определяющую роль белка $p21^{Waf1}$ в остановке пролиферации клеток MERas, вызванной бутиратом натрия. Также мы показали, что одной из возможных причин блока клеточного цикла может быть наблюдаемое уменьшение ДНК-связывающей активности транскрипционного фактора E2F и, как следствие, падение его транс-активирующих функций.

