

УДК 577.214: 616-006

Ф.П.Никуленков (6 курс, каф. БФ), М.В.Абрамова, к.б.н., н.с. (ИНЦ РАН),
В.А.Поспелов, д.б.н., проф. (ИНЦ РАН)

ИНГИБИТОР ГИСТОНОВЫХ ДЕАЦЕТИЛАЗ БУТИРАТ НАТРИЯ ВЛИЯЕТ НА СТАБИЛЬНОСТЬ И ЛОКАЛИЗАЦИЮ β -КАТЕНИНА В ФИБРОБЛАСТАХ МЫШИ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ОНКОГЕНАМИ E1A И cHa-Ras

Известно, что ингибиторы гистон-деацетилазной активности (ингибиторы HDAC) способны модулировать в опухолевых клетках с нерегулируемым клеточным циклом транскрипцию достаточно большой группы генов, которые являются позитивными и негативными регуляторами пролиферации, что приводит к остановке их деления, блоку клеточного цикла или апоптозу. Такой эффект происходит за счет изменения структуры хроматина при участии гистоновых ацетилтрансфераз и гистоновых деацетилаз, определяющих степень ацетилированности нуклеосомных гистонов, и, соответственно, доступность хроматина для транскрипции. Известно, что остановка пролиферации клеток происходит за счет неспособности пройти через контрольные точки G1/S и G2/M. Ранее нами было показано, что это связано с изменением в экспрессии ряда генов, регулирующих движение по клеточному циклу (циклин D1, циклин E, фосфатаза cdc25A, ингибитор циклинзависимых киназ p21^{Waf1}), а также со снижением киназной активности циклинзависимых киназ Cdk1, Cdk2. Однако полученные нами данные показали, что ингибитор HDAC, бутират натрия (NaB), может оказывать антипролиферативное действие и в клетках, не экспрессирующих p21^{Waf1}, что говорит о наличии альтернативных сигнальных путей в регуляции клеточного цикла.

Основная цель работы состояла в: 1) отыскании альтернативного сигнального пути, принимающего участие в антипролиферативном действии бутирата натрия; 2) оценке влияния бутирата натрия на стабильность и локализацию бета-катенина (БК), как центрального участника Wnt сигнального пути.

В работе использовались эмбриональные фибробласты мыши, трансформированные комплементирующими онкогенами E1A и cHa-ras. Трансформированные онкогенами клетки не способны останавливаться в клеточном цикле в ответ на действие ингибиторов пролиферации, таких как отсутствие факторов роста, воздействию ДНК-повреждающих агентов и факторов стресса. Таким образом, эмбриональные фибробласты мыши, стабильно трансформированные онкогенами E1A и cHa-ras, характеризуются нерегулируемой скоростью пролиферации.

Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10% телячьей сыворотки и 4 мМ бутирата натрия в течение 24,48 и 72 часов.

Методом проточной цитофлуориметрии мы анализировали распределение клеток по фазам клеточного цикла до и после обработки NaB. Оказалось, что NaB вызывает остановку пролиферации клеток уже через 24 часа после его введения, при этом наблюдается увеличение доли клеток, находящихся в фазе G0/G1, с одновременным уменьшением доли S фазных клеток. Экспериментальные данные свидетельствуют об образовании G1/S блока в клетках, трансформированных онкогенами E1A и cHa-ras, в ответ на обработку NaB.

Известно, что Wnt/БК сигнальный путь играет важную роль в пролиферации, клеточной адгезии и дифференцировке. Поэтому мы предположили, что изменение стабильности или локализации БК как ключевого участника Wnt сигнального пути, может вести к остановке пролиферации клеток в ответ на добавление NaB. В клетке БК

контролирует как межклеточную адгезию за счет образования комплекса с трансмембранным белком E-кадгерином и альфа-катенином, так и TCF/LEF-зависимую активацию транскрипции Wnt-регулируемых генов-мишеней, среди которых циклин D1, c-Myc и др. В отсутствие Wnt лигандов цитоплазматический БК фосфорилируется серинтреониновой киназой GSK3бета, после чего подвергается протеасомной деградации. Активация Wnt сигнального пути ведет к подавлению активности Gsk3бета и накоплению в цитоплазме нефосфорилированных форм БК, который далее может транспортироваться в ядро и активировать транскрипцию ряда генов или на плазматическую мембрану клетки.

Методом иммуноблоттинга мы показали, что уровень фосфорилированного БК уменьшается сразу после обработки трансформированных клеток NaB, при этом количество нефосфорилированного (активного) белка возрастает. Также нами было обнаружено увеличение уровня фосфорилированной (неактивной) киназы GSK3бета, параллельно с накоплением фосфорилированных (активных) форм киназы pAkt1, которая является вышестоящей киназой для GSK3бета. Эти данные показывают, что NaB может активировать Wnt/БК сигнальный путь в клетках, трансформированных онкогенами E1A и cHa-ras.

Так как связывание БК с кадгеринами и транскрипционными факторами TCF/LEF являются, по всей видимости, альтернативными событиями, секвестрируя БК, кадгеринины могут регулировать Wnt сигнальный путь. Поэтому было интересно проследить за изменением локализации БК внутри клетки после действия бутирата натрия. Для этого методом иммунофлуоресценции были получены фотографии, свидетельствующие о том, что ингибитор HDAC NaB вызывает накопление БК на плазматической мембране с одновременным его уменьшением в ядре.

Таким образом, одним из возможных способов остановки пролиферации клеток, трансформированных онкогенами E1A и cHa-ras, в ответ на действие NaB может являться активация Wnt сигнального пути и релокализация БК на плазматическую мембрану клеток.