

ВЛИЯНИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ВНУТРИКЛЕТОЧНОГО СОДЕРЖАНИЯ ПОЛИАМИНОВ НА УРОВЕНЬ БЕЛКА p53 В РАЗЛИЧНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННО ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ ЧЕЛОВЕКА

Особую роль в канцерогенезе играют дефекты генов, контролирующих повреждения ДНК и клеточную пролиферацию. Более чем в 50% случаев в опухолевых клетках повреждён ген *p53*.

Многочисленные сигнальные пути контролируют состояние клетки и в случае возникновения повреждений или сбоя вызывают активацию *p53*. Белок *p53* в активной форме является транскрипционным фактором для целого ряда мишеных генов, запускающим клеточный ответ на стресс: остановку клеточного цикла в фазе G1-S или в фазе G2-M; индукцию апоптоза; активацию генов анти-ангиогенеза; активацию генов, участвующих в репарации повреждений ДНК. Таким образом, мутации в гене *p53*, а также различные нарушения в регуляции экспрессии этого гена и/или утилизации соответствующего белка являются, по-видимому, одним из определяющих событий, приводящих к злокачественной трансформации клетки и прогрессии опухоли. Кроме того, нарушения нормального функционирования белка *p53* в опухолях отражается на их чувствительности к различным видам противоопухолевой терапии, таким как лучевая терапия и химиотерапия ДНК повреждающими агентами.

Вопрос о влиянии уровня полиаминов в клетке на количество белка *p53* пока остается дискуссионным. Кроме того, такая взаимосвязь к настоящему времени описана лишь для некоторых тканей. Такие полиамины, как органические катионы спермидин и спермин, найдены во всех эукариотических клетках. Предполагается, что полиамины влияют на уровень белка *p53*, модулируя количество белка NuR в ядре. Показано что при повышении уровня полиаминов в клетке количество белка NuR в ядре снижается. Известно, что белок NuR присоединяется к 3'-концу матричной РНК *p53*, защищая её от деградации. Механизм, по которому полиамины модулируют уровень NuR, пока до конца не ясен. Известно, что при повышенном уровне полиаминов уровень белка NuR в ядре снижается и происходит дестабилизации мРНК *p53*, в результате чего снижается уровень белка *p53*, и, наоборот, при снижении уровня полиаминов в ядре накапливается белок NuR и происходит стабилизация мРНК *p53*, что приводит к повышенному уровню белка *p53* в клетке.

Цель данной работы: определить, как сильно повышение концентрации полиаминов может повлиять на уровень белка *p53* в клетках различных злокачественно трансформированных клеточных линиях человека.

Материалы и методы. Клеточные линии MCF-7, HT-1080, GM08632, культивировались в монослое во флаконах в среде DMEM/F12 с добавлением 5% эмбриональной сыворотки, без антибиотиков, в 5% CO₂ атмосфере, при 37°C. Полиамины (спермидин) в концентрации 0.1-0.5мкг/мл, циклогексимид (общий ингибитор синтеза белка) (20мкг/мл) добавляли к культивируемым при стандартных условиях клеткам через различные промежутки времени. Для иммунофлуоресцентного анализа (ИФА) уровня экспрессии белка *p53* клетки фиксировали 4% формальдегидом, обрабатывали 0.5% раствором Triton X-100 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в течение 10 минут, затем обрабатывали 1% раствором BSA в ФСБ в течение 1 часа. После каждой обработки суспензию клеток три раза промывали ФСБ. Клетки инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными моноклональными антителами к *p53* (Clone BP53-12) в разведении 1:500, промывали трижды ФСБ и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа с FITC-мечеными вторичными антителами в разведении 1:200. После трехкратной промывки ФСБ белок *p53* в клетках визуализировали с помощью

флуоресцентного микроскопа (OPTON). Количественный анализ проводили с помощью техники проточной цитофлуометрии.

Результаты. Снижение уровня белка p53 дикого типа в культуре MCF-7 начинается через 48 часов после добавления спермидина. Значительное снижение уровня белка происходит через 72 часа после добавления. В клеточной линии HT-1080 уже через 7 часов после добавления спермидина уровень белка p53 снижается более чем в 2 раза. В клеточной линии GM08632 спермидин начинает действовать через 24 часа после добавления.

Вывод: повышение концентрации полиаминов в клетках существенно снижает уровень белка p53, причём для некоторых клеточных линий это снижение сравнимо с воздействием циклогексимида за то же время.