

УДК 577.214:616-006

И.А.Савельева (6 курс, каф. БФ), Т.В.Поспелова, к.б.н. (ИНЦ РАН)

## ERK-КИНАЗНЫЙ КАСКАД ПРЕИМУЩЕСТВЕННО ВОВЛЕЧЕН В РЕГУЛЯЦИЮ СОБЫТИЙ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ КРЫСЫ ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ ОБЛУЧЕНИЯ И СЫВОРОТОЧНОГО ГОЛОДАНИЯ

В последние десятилетия число онкологических заболеваний стремительно растет, но до сих пор отсутствует адекватная лекарственная терапия, основанная на точном понимании причин трансформации нормальных клеток в опухолевые. Именно поэтому изучение молекулярных механизмов канцерогенеза представляет собой одну из горячих точек современной молекулярной биологии и медицины. Важность изучения Митоген Активируемых Протеинкиназных (МАР-киназных) каскадов состоит в том, что от их работы зависит, правильность проведения пролиферативных сигналов и продвижения клетки по клеточному циклу. Поскольку интегральные компоненты МАР-киназных каскадов кодируются протоонкогенами, определенные нарушения работы этих генов могут способствовать превращению нормальной клетки в опухолевую.

Целью данной работы является исследование МАР-киназных каскадов и регуляции событий клеточного цикла у трансформантов E1A+E1B-19кДа и E1A+c-Ha-ras после ДНК-повреждающего действия облучения (рентгеновские лучи) и стрессорных условий сывороточного голодания. В качестве объекта исследования были взяты трансформированные клеточные линии E1A+E1B-19кДа и E1A+c-Ha-Ras, полученные путем переноса онкогена E1A аденовируса 5 типа человека, в комплементации с аденовирусным онкогеном E1B19кДа или клеточным онкогеном c-Ha-ras в эмбриональные фибробласты крыс. Данные трансформанты различаются по способности реализовать блоки клеточного цикла, ответственные за репаративные процессы, после действия ДНК-повреждающих агентов и в условиях сывороточного голодания. В качестве контроля были взяты спонтанно иммортализованные эмбриональные фибробласты крысы (REF52).

Проведен анализ содержания и способности к регуляции трех основных ветвей МАР-киназного каскада - ERK1,2, JNK1,2 и p38 - после действия облучения и голодания на бессывороточной среде. Исследование проводили методом иммуноблоттинга с использованием антител, опознающих фосфорилированные и нефосфорилированные формы киназ ERK1,2, JNK1,2 и p38. Показано, что содержание неактивных форм киназ повышается при трансформации и не зависит от типа комплементирующего онкогена. Содержание фосфорилированных форм киназ, представляющих собой активные формы, изменяется при трансформации преимущественно для ERK1,2 и зависит от типа комплементирующего онкогена.

Действие рентгеновских лучей и сывороточного голодания приводит к изменению степени фосфорилирования преимущественно киназ ERK1,2, как нормальных, так и трансформированных клеток. При этом в клетках REF52 и E1A+E1B-19кДа в первые минуты голодания наблюдается отсутствие фосфорилированных форм ERK1,2, с последующим восстановлением пула фосфо-форм ERK1,2 через несколько часов. Методом проточной цитометрии показано, что способность к регуляции киназ Erk1,2 коррелирует со способностью этих клеток останавливаться в фазе G1/S после удаления ростовых факторов сывотки. Трансформанты E1A+c-Ha-ras, не способные останавливаться на границе G1/S-фаз клеточного цикла имеют одинаково высокий уровень фосфорилирования Erk1,2 на протяжении всего исследованного периода сывороточного голодания. Методом иммуноцитохимии показано, что сывороточное голодание приводит к частичному перемещению фосфорилированных форм ERK из ядра в цитоплазму эмбриональных фибробластов, тогда как в трансформантах E1A+c-Ha-ras фосфорилированные формы ERK1,2 локализованы преимущественно в ядре.

Полученные результаты свидетельствуют в пользу того, что ERK-киназный каскад является наиболее чувствительным из всех исследуемых каскадов к удалению сыворотки (в клетках, способных совершать остановку клеточного цикла – REF52 и E1A+E1B-19кДа) и действию рентгеновских лучей (во всех трех клеточных линиях). Ядерная локализация фосфо-форм ERK-киназ у трансформантов E1A+c-Ha-ras в условиях сывороточного голодания, может быть одной из причин нерегулируемой пролиферации этих трансформантов, связанной с постоянной активацией циклин-киназных комплексов.

Проведенная работа говорит о существовании перекреста компонентов MAP-киназного каскада с основными мишенями клеточного цикла, которые отвечают за реализацию блоков клеточного цикла у нормальных клеток после действия стрессорных агентов. Изучение молекулярных механизмов нарушения этого перекреста при трансформации клеток является целью дальнейших исследований.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Копнин Б.П. 2000. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров: ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. Биохимия. 65(1): 5 – 33.
2. Black E.J., Clark.W., Gillespie D.A.F. 2000. Transient deactivation of ERK signaling is sufficient for stable entry into G0 in primary avian fibroblasts. *Curr. Biol.* 10:1119-1122.
3. Bayley S.T. and Mymryk J.S. 1994. Adenovirus E1A proteins and transformation. *Int. J. of Oncology.* 5:425-444.
4. Hunter T. 1997. Oncoprotein network. *Cell.* 88:333-346.
5. Wilkinson M.G. and Millar J.B.A. 2000. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. *The FASEB J.* 14:2147-2157.