

УДК 577.214:616-006

В.С.Романов (6 курс, каф. БФ), Т.В.Поспелова, к.б.н., в.н.с. (Институт Цитологии РАН)

ИЗУЧЕНИЕ РОЛИ ОНКОГЕНА *E1A* И ЕГО ДЕЛЕЦИОННЫХ МУТАНТОВ В РЕГУЛЯЦИИ СОБЫТИЙ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА

Отличительной чертой опухолевых (трансформированных) клеток является признак автономной неконтролируемой пролиферации, связанный с неспособностью трансформантов блокировать прохождение по клеточному циклу в отсутствие ростовых факторов, а также после действия ДНК-повреждающих агентов. Однако в настоящей работе показано, что могут существовать трансформанты, устойчивые к действию ДНК-повреждающих агентов, которые способны реализовать блок на границе G1/S. Этот результат был получен на трансформированных клеточных линиях, селективированных из нормальных эмбриональных фибробласты крысы (REF) путем переноса в них раннего района аденовируса пятого типа человека – онкогенов *E1A* и *E1B-19кДа*, вирусного аналога антиапоптотического гена *Bcl-2*.

Известно, что онкобелок *E1A* секвестрирует негативные регуляторы клеточного цикла и инактивирует их, что приводит к нарушению контроля над пролиферацией, однако одновременно ведет к гибели клеток путем апоптоза. Для трансформации клеток необходимо введение второго комплементирующего онкогена, в частности *E1B-19кДа*, который подавляет программу апоптоза, или онкогена *cHa-ras*, повышающего жизнеспособность клеток.

Целью работы являлся анализ способности трансформантов, экспрессирующих полноразмерный онкобелок *E1A* и делеционные варианты этого белка, реализовать блок клеточного цикла G1/S после облучения и изучение молекулярных механизмов этого процесса. Для этого из клеток REF были получены три клеточные линии: *E1A+E1B-19кДа* (полноразмерный белок *E1A*), 1101 (делеция Δ4-25 а.о., приводящая к неспособности онкопродуктов *E1A* секвестрировать белок p300/CBP) и 1102 (делеция Δ26-35 а.о., нарушающая взаимодействие *E1A* с ингибитором циклин-зависимых киназ p21/Waf1). Цитофлуориметрический анализ клеточного цикла в полученных трансформантах после действия облучения выявил различия в поведении этих трансформантов. Рентгеновское облучение приводит к кратковременному блоку клеточного цикла в клетках *E1A+E1B-19кДа*, не вызывает его в трансформантах 1101, тогда как в клетках 1102, с делецией по району взаимодействия *E1A* с циклин-киназным ингибитором, наблюдается “прочный” долговременный блок, сравнимый с таковым у нормальных REF. Сходная картина в регуляции событий клеточного цикла была выявлена в случае удаления ростовых факторов.

Методом иммуноблотинга было показано, что во всех трех линиях количество позитивных регуляторов клеточного цикла – циклинов E и A (CyclE,A) и циклин-зависимой киназы 2 (Cdk2) – не меняется через разные промежутки времени после облучения. Однако, в этих же проанализированных точках после облучения было обнаружено накопление ингибитора циклин-киназных комплексов белка p21/Waf1, имеющего ядерную локализацию во всех анализируемых линиях. Это говорит о том, что контроль над реализацией блока клеточного цикла в исследованных линиях связан не с изменением количества циклин-зависимых киназ и их циклинов, не с отсутствием способности накапливать ингибитор p21/Waf1 после повреждения ДНК, а также не с изменением внутриклеточной локализации ингибитора.

Присутствие онкопродуктов раннего района во всех трех линиях не влияло на образование комплексов киназы Cdk2 с циклинами Cys1E и Cys1A, активность которых определяет переход G1/S после облучения. Кроме того, в клеточных линиях с мутантным E1A в отличие от E1A+E1B-19кДа содержание комплексов Cdk2 с ингибитором p21/Waf1 после облучения увеличивалось, также как в нормальных эмбриональных фибробластах. Это говорит о том, что взаимодействие ингибитора с киназами не является необходимым и достаточным условием подавления циклин-киназной активности и реализации блока клеточного цикла после повреждения ДНК облучением.

Анализ другого негативного регулятора прохождения клетки по циклу белка pRb, который при трансформации должен быть инактивирован онкопродуктами E1A, показал, что в отличие от клеток 1101 и E1A+E1B-19кДа в клетках линии 1102, способной останавливаться в цикле, содержание его в нефосфорилированной форме, удерживающей основной транскрипционный фактор S-фазы E2F1, после облучения заметно накапливается. Это позволяет предполагать, что в клетках данной линии, несмотря на присутствие онкопродуктов раннего района E1A, способность контролировать клеточный цикл на уровне изменения комплексов pRb-E2F может быть сохранена.

Полученные нами данные позволяют говорить о том, что в присутствии онкогена E1A и его делеционных мутантов судьба блока G1/S после облучения зависит от тех клеточных мишеней, которые они должны изменить при трансформации. По-видимому, отсутствие блока клеточного цикла у трансформантов линии 1101 после действия повреждающих агентов связано с коактиватором транскрипции p300/CBP (CREB-binding protein), который, благодаря делеции на N-конце онкобелка E1A, по-видимому, не связывается с онкопродуктами раннего E1A района, а остается активными, участвуя в регуляции транскрипции генов, ответственных за пролиферацию. В случае трансформантов 1102, которые способны реализовать долговременный блок G1/S, как нормальные фибробласты, отсутствие участка 26-35 а.о. в белке E1A приводит к неспособности его связывать ингибитор p21/Waf1 и, таким образом, к его функциональной реактивации и реализации блока G1/S клеточного цикла после действия повреждающих агентов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 01-04-49422).

ЛИТЕРАТУРА:

1. Булавин Д.В., Тарарова Н.Д., Бричкина А.И., Аксенов Н.Д., Поспелов В.А., Поспелова Т.В. Перенос онкогенов E1A и E1A-19кДа в эмбриональные фибробласты крысы не отменяет способности клеток останавливаться в клеточном цикле после γ -облучения. Молекулярная биология. 2002; 36(1): с.58-65.
2. Dotto G.P. p21 (WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? Biochim Biophys Acta. 2000, Jul 31; 1471(1): M43-56. Review.
3. Frich S.M., Mymryk J.S. Adenovirus-5 E1A: paradox and paradigm. Nat Rev Mol Cell Biol. 2002 Jun;3(6):441-52. Review.