

УДК 577.214: 616-006

Ф.П.Никуленков (5 курс, каф. БФ), М.В.Абрамова, к.б.н., н.с. ИНЦ РАН,
В.А.Поспелов, д.б.н., зав. лаб. ИНЦ РАН

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА ДЕАЦЕТИЛАЗ ГИСТОНОВ БУТИРАТА НАТРИЯ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ФИБРОБЛАСТОВ МЫШИ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ОНКОГЕНАМИ E1A И cHa-RAS

Перестройка хроматина играет важную роль в регуляции транскрипции генов, участвующих в клеточном росте и трансформации клеток. Один из механизмов хроматиновой перестройки основан на взаимодействии промотер-связанных транскрипционных факторов с гистоновыми деацетилазами. Такое взаимодействие приводит к временному деацетилированию нуклеосомальных гистонов и, таким образом, формированию неактивной хроматиновой структуры. Присутствие ингибиторов гистоновых деацетилаз, например, бутирата натрия (NaB), в свою очередь, вызывает активацию определенных участков хроматина. Известно, что многие ингибиторы гистоновых деацетилаз способны блокировать пролиферацию в контрольных точках G1/S и G2/M и в зависимости от типа клеток вызывать дифференцировку или апоптоз. Это обусловлено изменением характера экспрессии генов и онкогенов, вовлеченных в клеточную пролиферацию. Поэтому можно было предполагать, что NaB способен влиять на процессы регуляции клеточного цикла E1A+ras трансформантов.

В данной 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 отсутствия факторов роста, воздействия ДНК-повреждающих агентов и факторов стресса. Таким образом эмбриональные фибробласты мыши, стабильно трансформированные онкогенами E1A и cHa-ras, характеризуются нерегулируемой скоростью пролиферации.

Целью работы являлось изучение молекулярных механизмов действия NaB на пролиферацию трансформантов, экспрессирующих онкобелки E1A и cHa-ras. Для этого методом проточной цитофлуориметрии анализировалось распределение клеток по фазам клеточного цикла до и после добавления бутирата натрия. Оказалось, что NaB вызывает остановку клеток на границах фаз G1/S и G2/M, при этом рост числа клеток, находящихся в G1 и G2 фазах, пропорционален уменьшению количества клеток в S фазе клеточного цикла.

Была проанализирована активность циклин-киназных комплексов, отвечающих за переходы G1/S и G2/M. Методом фосфорилирования специфического субстрата *in vitro* показано, что обработка NaB клеток E1A+ras приводит к значительному падению киназной активности, ассоциированной с Cdk2, Cdk1, а также с циклинами E, A и B. Это, по-видимому, и обуславливает накопление трансформантов E1A+ras в фазах G1 и G2 клеточного цикла при обработке NaB. Падение киназной активности, ассоциированной с Cdk2, наблюдается и в клетках с делетированным геном p21^{Waf1}, продукт которого является ингибитором циклинзависимых киназ. Таким образом, падение активности циклинзависимых киназ не связано с действием ингибитора p21^{Waf1}, а может осуществляться либо с помощью других ингибиторов их активности, либо на уровне транскрипции.

Методом RT-PCR установлено, что в клетках E1A+ras наблюдается высокий уровень экспрессии генов, кодирующих циклины D1 и E на уровне мРНК. Добавление NaB к трансформантам приводит к подавлению экспрессии этих генов. Транскрипция гена, кодирующего фосфатазу cdc25A, которая осуществляет активирующее дефосфорилирование циклинзависимой киназы Cdk2, также значительно падает после добавления NaB к трансформантам. Был проанализирован уровень экспрессии протоонкогена c-myc, продукт которого регулирует экспрессию генов, кодирующих циклины D1, E, а также протеинфосфатазу cdc25A. Оказалось, что уровень экспрессии гена c-myc также падает после добавления NaB к клеткам E1A+ras. Таким образом, экспрессия генов, кодирующих позитивные регуляторы пролиферации (циклинов D1, E, протеинфосфатазы cdc25A и транскрипционного фактора c-Myc), подавляется NaB в трансформантах E1+ras.

Полученные нами данные позволяют говорить о том, что одним из возможных механизмов остановки клеток E1A+ras в фазах G1 и G2 под действием NaB является ингибирование транскрипции генов циклинов, cdc25A и c-myc, а не активация ингибитора циклинзависимых киназ p21^{Waf1}.