

АНТИАПОПТОТИЧЕСКИЙ ОНКОГЕН *bcl-2* ИНДУЦИРУЕТ ПРОГРАММУ СТАРЕНИЯ В ТРАНСФОРМАНТАХ E1A +c-Ha-ras ПОСЛЕ ДЕЙСТВИЯ АДРИАМИЦИНА

© А. М. Нелюдова,¹ С. Г. Зубова, Н. Д. Аксенов, В. А. Поспелов, Т. В. Поспелова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;¹
электронный адрес: annanelioudova@hotmail.com

Введение гена *bcl-2* в трансформированные онкогенами E1A и *c-Ha-ras* эмбриональные фибробласты крысы, которые обладают высокой проапоптотической чувствительностью и не останавливаются в клеточном цикле после повреждающих воздействий, приводит не только к подавлению клеточной гибели, но и к восстановлению способности реализовать блоки клеточного цикла после повреждения ДНК и в условиях сывороточного голодания. По данным проточной цитометрии, трансформанты E1A + *c-Ha-ras* + *bcl-2* способны осуществлять долговременный (не менее 5 сут) блок клеточного цикла на границе фаз G₁/S после обработки ДНК-интеркалятором адриамицином. Кривая клеточного роста показала, что число клеток остается постоянным на протяжении 1 нед культивирования Vcl-2-экспрессирующих трансформантов в среде, содержащей адриамицин. Эффективность клонирования клеток E1A + *c-Ha-ras* + *bcl-2* равна нулю уже через 16 ч после добавления адриамицина. Апоптотическая гибель, которую выявляли по олигонуклеосомной фрагментации ДНК, а также клеточная гибель по типу митотической катастрофы после обработки адриамицином практически отсутствуют у Vcl-2-экспрессирующих трансформантов по сравнению с родительской линией E1A + *c-Ha-ras*. Введение гена *bcl-2* в трансформанты E1A + *c-Ha-ras* сопровождается увеличением активности SA β-Gal (senescence associated β-galactosidase), которая считается маркером клеточного старения. Обработка адриамицином трансформантов E1A + *c-Ha-ras* + *bcl-2* приводит к еще большему росту активности SA β-Gal по сравнению с необработанными клетками. Методом коиммунопреципитации обнаружено, что присутствие Vcl-2 приводит к формированию комплексов Vcl-2 с онкопродуктами раннего района E1A, который, согласно современным представлениям, отвечает за проапоптотическую чувствительность E1A-экспрессирующих трансформантов. Полученные данные позволяют предположить, что перенос гена *bcl-2* в трансформанты E1A + *c-Ha-ras* вызывает переключение программы клеточной гибели на программу старения после действия ДНК-повреждающих агентов, что может происходить благодаря взаимодействию Vcl-2 с активатором апоптоза — вирусным онкобелком E1A.

Ключевые слова: трансформация, блок клеточного цикла, старение, *bcl-2*, E1A, *c-Ha-ras*, адриамицин.

Принятые сокращения: ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота, DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндол, SDS — додецилсульфат натрия, SA β-Gal (senescence associated β-galactosidase) — β-галактозидаза, ассоциированная со старением, TAE — Трис-ацетатный буфер.

Трансформация клеток связана с приобретением ими свойств неограниченной пролиферации и генетической нестабильности. Трансформации нормальных клеток после повреждения ДНК, окислительного стресса, активации онкогенов или инактивации опухолевых супрессоров противостоит программа остановки клеток в клеточном цикле, в ходе которой может происходить исправление полученных повреждений (Hanahan, Weinberg, 2000; Evan, Vousden, 2001). В отдельных случаях временный блок клеточного цикла становится необратимым, так как в клетке включается программа клеточного старения. В отличие от покоящегося состояния, когда блоки обратимы, старение связано с необратимым блоком клеточного цикла, который сопровождается специфическими изменениями морфологии клетки, выражающимися в расплывании на субстрате, вакуолизации и грануляции цитоплазмы. Стареющие клетки могут ак-

тивно секретировать молекулы клеточной адгезии и митогены (Blagosklonny, 2003).

Различают репликативное старение, которое связано с укорочением теломер и снижением активности теломеразы, и ускоренное (преждевременное) старение, индукторами которого являются стимулы, вызывающие в высоких дозах апоптоз. Ими могут быть онкогены, ионизирующая радиация, ДНК-интеркаляторы, микротрубочковые яды, окислительный стресс, гипоксия, ингибиторы деацетилаз гистонов, фактор роста TGF-β, ретиноиды (Blagosklonny, 2003). Преждевременное старение нельзя предотвратить восстановлением теломеразной активности и сохранением длины теломер хромосом. Первичные фибробласты от больных с атаксией-телеангиэктазией, экспрессирующие теломеразу hTERT, утрачивают способность к репликативному старению, характерному для этого синдрома, но преждевременно стареют

после действия ионизирующей радиации или окислительного стресса. При этом наблюдаются увеличение содержания фосфорилированной (активной) стресс-киназы p38 и накопление p53, p21/Waf-1 и p16/INK4a (Naka et al., 2004).

Потенциально онкогенный стимул вызывает в нормальных клетках апоптоз или ускоренное старение клеток в зависимости от их тканевой принадлежности или стадии дифференцировки. Показано, например, что повышенная экспрессия онкогенного белка Ras приводит к включению p53-зависимой программы старения (Serrano et al., 1997; Lin et al., 1998; Lin, Lowe, 2001; Ferbeyre et al., 2002; Deng et al., 2004). Для того чтобы трансформировать нормальную клетку в присутствии онкогенного цитоплазматического белка Ras, необходимо ввести его совместно с онкогеном «ядерного» типа (например, с онкопродуктами E2F, c-Myc, циклинами D, Cdc25 A и B или вирусными онкогенами E1A и E7). Другой путь трансформации возможен при введении онкогена Ras в клетки, дефектные по опухолевым супрессорам (например, p53, p16/INK4a и pRb). Обнаруженная закономерность относится только к трансформации клеток грызунов, в то время как для трансформации клеток человека необходимо присутствие конститутивно активной теломеразы hTERT. Вследствие мутаций или инактивации опухолевых супрессоров в ходе многоступенчатого канцерогенеза клетка утрачивает способность к запуску старения и апоптоза в ответ на включение онкогенов (Nahan, Weinberg, 2000; Evan, Vousden, 2001).

Не только в нормальных, но и в опухолевых клетках может запускаться процесс старения (Hwang, 2002; Roninson, 2002). Эмбриональные фибробласты крысы, трансформированные онкогенами *c-Ha-ras* и *E1Aad5* (клетки E1A + c-Ha-ras), не останавливаются в клеточном цикле, а подвергаются апоптозу после действия повреждающих агентов (Булавин и др., 1998). При введении в них гена *bcl-2* человека (клетки E1A + c-Ha-ras + *bcl-2*) апоптотическая гибель этих трансформантов подавляется и одновременно восстанавливается способность останавливаться в клеточном цикле после повреждения ДНК облучением или обработкой ДНК-интеркалятором адриамицином (Тарарова и др., 2002). В связи с тем что в состоянии блока клеточного цикла трансформанты E1A + c-Ha-ras + *bcl-2* (в отличие от исходной проапоптотически чувствительной линии) способны длительное время сохранять жизнеспособность в присутствии адриамицина, возник вопрос о том, не является ли наблюдаемый блок клеточного цикла следствием включения программы старения.

Для этого были изучены обратимость блока клеточного цикла, клеточная гибель и экспрессия маркера старения клеток SA β -Gal (senescence associated β -galactosidase) после обработки трансформантов адриамицином. Полученные результаты позволяют предположить, что состояние клеток, которое вызывает обработка адриамицином трансформантов E1A + c-Ha-ras + *bcl-2*, по ряду признаков напоминает преждевременное старение нормальных клеток.

Материал и методика

Культивирование клеток. Работа выполнена на трансформированных онкогенами *E1Aad5* и *c-Ha-ras* эмбриональных фибробластах крысы, в которые допол-

нительно был введен антиапоптотический ген *bcl-2* человека (Поспелова и др., 1990; Тарарова и др., 2002). Клетки культивировали в среде DME с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки коров и 40 мкг/мл антибиотика гентамицина. Для экспериментов клетки рассевали на пластиковые чашки Петри. Через 1 сут клетки обрабатывали адриамицином в концентрации 0.1 мкг/мл в течение 1, 2, 3 и 7 сут.

Проточная цитометрия. Клетки снимали с чашек в фосфатно-солевом буфере, пермеабилizовывали в растворе 0.1%-ного сапонина, а затем обрабатывали РНКазой А (100 мкг/мл) и одновременно окрашивали иодидом пропидия (50 мкг/мл). Распределение клеток по фазам клеточного цикла анализировали с помощью цитофлуориметра Odam (Bruker, Франция).

Кривые роста. Клетки рассевали на чашки Петри диаметром 30 мм по $1.6 \cdot 10^4$ клеток на 1 чашку. На следующий день в чашки добавляли адриамицин (0.1 мкг/мл). Подсчет необработанных клеток и клеток, культивируемых на среде, содержащей адриамицин, проводили каждый день в течение 1 нед с использованием камеры Горяева. Анализировали по 2 чашки на каждый временной интервал. Эксперимент повторяли трижды.

Клоногенная выживаемость. Клетки рассевали на чашки и обрабатывали адриамицином. Через 16 ч, 1 и 7 сут после добавления адриамицина клетки сеяли на чашки Петри диаметром 30 мм по 100 клеток на 1 чашку. Через 1 нед выросшие клоны фиксировали смесью 30%-ного этанола и 10%-ной уксусной кислоты с одновременным окрашиванием бриллиантовым синим, подсчитывали под лупой и фотографировали. Анализировали по 3 чашки на каждый временной интервал. Эксперимент повторяли трижды.

Апоптотическую гибель клеток после обработки адриамицином выявляли по наличию олигонуклеосомной фрагментации ДНК. Из клеток выделяли экстрахромосомную ДНК стандартным способом. Для этого в течение 20 мин клетки лизировали на льду в буфере, содержащем 5 мМ Трис-НСl, 0.5 % Тритона X-100 и 100 мМ ЭДТА (рН 8.0). Клетки центрифугировали 20 мин при 12 000 об/мин. Надосадочную жидкость отбирали в отдельные пробирки, в которые добавляли NaCl до конечной концентрации 0.15 М и РНКазу А до 100 мкг/мл, а затем инкубировали 1 ч на водяной бане при 37 °С. После этого в пробы добавляли SDS до конечной концентрации 0.5 % и протеиназу К до 200 мкг/мл и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. Депротеинизацию проводили последовательно равными объемами фенола и хлороформа. ДНК осаждали 0.5 М NaCl и двойным объемом 96%-ного этанола в течение 30 мин при -20 °С, а затем промывали 70%-ным этанолом. Образцы хранили в 96%-ном этаноле при -20 °С не более 2 нед. Перед электрофорезом ДНК растворяли в дистиллированной воде и наносили на 1.5%-ный агарозный гель. Электрофорез проводили в вертикальной камере в буфере TAE, рН 8.0, при напряжении 50 В. После электрофореза гель окрашивали бромистым этидием и фотографировали в ультрафиолетовом свете.

На препаратах, окрашенных флуорохромом DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндол; Sigma, США), выявляли апоптотическую гибель клеток и клеточную гибель по типу митотической катастрофы. Для этого клетки сеяли на покровные стекла и обрабатывали адриамицином. Через 1, 2, 3 и 7 сут клетки фиксировали 4%-ным формали-

ном, окрашивали DAPI и подсчитывали апоптотические клетки и клетки с признаками митотической катастрофы. Апоптотическими считали клетки с пикнотическими ядрами маленького размера и компактным хроматином, апоптотическими тельцами и фрагментированными ядрами. Клетками, подвергшимися митотической катастрофе, считали клетки с многополюсными митозами, митозами с перестройками, многоядерные клетки и клетки с микроядрами. Препараты фотографировали видеокамерой, установленной на микроскопе Axioscope.

Определение активности SA β -Gal. Клетки сеяли на покровные стекла, обрабатывали адриамицином и фиксировали 4%-ным формалином. Затем клетки окрашивали в буфере X-Gal, pH 6.0 (Dimri et al., 1995), при 37 °C в течение ночи. Экспрессию маркера старения SA β -Gal исследовали на препаратах под световым микроскопом и фотографировали видеокамерой, установленной на микроскопе Leica.

К о и м м у н о п р е ц и п и т а ц и я. Взаимодействие белков Bcl-2 и E1A исследовали с помощью метода коиммунопреципитации. Для этого 1500 мкг белка тотального лизата икубировали при 8 °C в течение ночи с 5 мкл антител против E1A (M73, sc-25, Santa Cruz Biotechnology). Затем иммунные комплексы осаждали в течение 2 ч протеин А-сефарозой. После трех отмывок лизирующим буфером к преципитату добавляли 4-кратный буфер Лэммли для SDS-электрофореза и кипятили пробы в течение 5 мин. Белки разделяли в 12%-ном полиакриламидном геле, а затем проводили их полусухой электроперенос на мембрану PVDF (Millipore Corporation, США). Блокирование сайтов неспецифического связывания антител осуществляли в 5%-ном БСА, после чего мембрану инкубировали с моноклональными антителами мыши против Bcl-2 человека (C-2, sc-7382, Santa Cruz Biotechnology, США); в качестве вторых антител использовали иммуноглобулины кролика, полученные против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена. Для визуализации иммуноблотов использовали метод усиленной хемилюминесценции (ECL, Amersham, США).

Результаты

Для оценки влияния адриамицина на изменение численности клеточной популяции трансформантов E1A + c-Na-ras и их Bcl-2-экспрессирующих вариантов (E1A + c-Na-ras + bcl-2) строили кривые клеточного роста. В присутствии адриамицина численность популяции клеток E1A + c-Na-ras + bcl-2 увеличивается вдвое на 2-е сут, после чего остается неизменной в течение 1 нед (рис. 1, б), в то время как численность клеток исходной линии E1A + c-Na-ras неуклонно сокращается (рис. 1, а), так что на 3-и сут после добавления адриамицина клеточная популяция погибает полностью. Таким образом, адриамицин вызывает стабилизацию численности трансформантов E1A + c-Na-ras + bcl-2, которая может быть либо следствием блока клеточного цикла, либо результатом равновесия между процессами клеточной пролиферации и клеточной гибели.

Согласно данным проточной цитометрии, после обработки адриамицином трансформанты E1A + c-Na-ras + bcl-2 останавливаются в клеточном цикле на границе фаз G₁/S. Число клеток E1A + c-Na-ras + bcl-2 с содержанием ДНК, соответствующим фазе S клеточного цикла, со-

кращается вдвое через 2 сут после обработки адриамицином и остается практически на том же уровне в течение еще как минимум 5 сут (рис. 1, в). Число полиплоидных клеток E1A + c-Na-ras + bcl-2 увеличивается с 5 до 40 % через 7 сут после добавления адриамицина. Клетки исходной линии E1A + c-Na-ras под действием адриамицина также подвергаются полиплоидизации, однако их пролиферация не прекращается и сопровождается массовой апоптотической гибелью. Об этом свидетельствует появление субдиплоидного пика ДНК на гистограммах проточной цитометрии (рис. 1, в).

Для доказательства подавления апоптотической гибели, вызванной адриамицином, при повышенной экспрессии Bcl-2 использовали электрофоретический анализ фрагментации ДНК на разных сроках обработки клеток цитостатиком. В отличие от трансформантов исходной линии в клетках E1A + c-Na-ras + bcl-2 олигонуклеосомная фрагментация ДНК не выявляется даже через 7 сут культивирования с адриамицином (рис. 2, а). Так как адриамицин способен вызывать гибель трансформированных клеток не только путем апоптоза, но и по типу митотической катастрофы, был проведен морфологический анализ апоптозирующих клеток и клеток, подвергшихся митотической катастрофе. В клетках E1A + c-Na-ras + bcl-2 гибель по типу апоптоза и после митотической катастрофы при действии адриамицина практически отсутствуют (рис. 2, б). Многополюсные митозы отсутствовали в клетках обеих линий, обработанных адриамицином (рис. 2, б).

Долговременный блок клеточного цикла трансформированных клеток грызунов E1A + c-Na-ras + bcl-2 может быть одним из признаков ускоренного старения, которое описано для опухолевых клеток человека (Shay, Roninson, 2004). Считается, что старение представляет собой необратимый блок клеточного цикла (Blagosklonny, 2003). Необратимость блока клеточного цикла трансформантов E1A + c-Na-ras + bcl-2 количественно оценивали по способности клеток пролиферировать в клональном посеве через разные промежутки времени после обработки их адриамицином (по клоногенной выживаемости, или эффективности клонирования). Было обнаружено, что уже через 16 ч культивирования трансформантов E1A + c-Na-ras + bcl-2 с адриамицином клоны не образуются, т. е. у клеток полностью исчезает способность к пролиферации (рис. 3). Кроме того, проточная цитометрия показала, что трансформанты, обработанные адриамицином, не могут возобновить пролиферацию после отмывки адриамицина (данные не приведены). Это означает, что блок клеточного цикла, вызванный адриамицином, в трансформантах E1A + c-Na-ras + bcl-2 необратим. Эффективность клонирования клеток E1A + c-Na-ras также равна нулю уже через 16 ч после обработки адриамицином (рис. 3), что, по-видимому, связано с их гибелью (рис. 2).

Один из главных маркеров старения нормальных клеток — активность SA β -Gal — был исследован в контроле и после действия адриамицина. Экспрессию SA β -Gal изучали при pH 6.0 и 37 °C через разные промежутки времени после обработки клеток E1A + c-Na-ras + bcl-2 адриамицином (рис. 4, голубое окрашивание). В необработанных клетках родительской линии E1A + c-Na-ras экспрессия SA β -Gal очень мала, а после добавления адриамицина возрастает незначительно (рис. 4, а–в). Перенос гена *bcl-2* в трансформанты E1A + c-Na-ras приводит к повышению активности SA β -Gal (рис. 4, г).

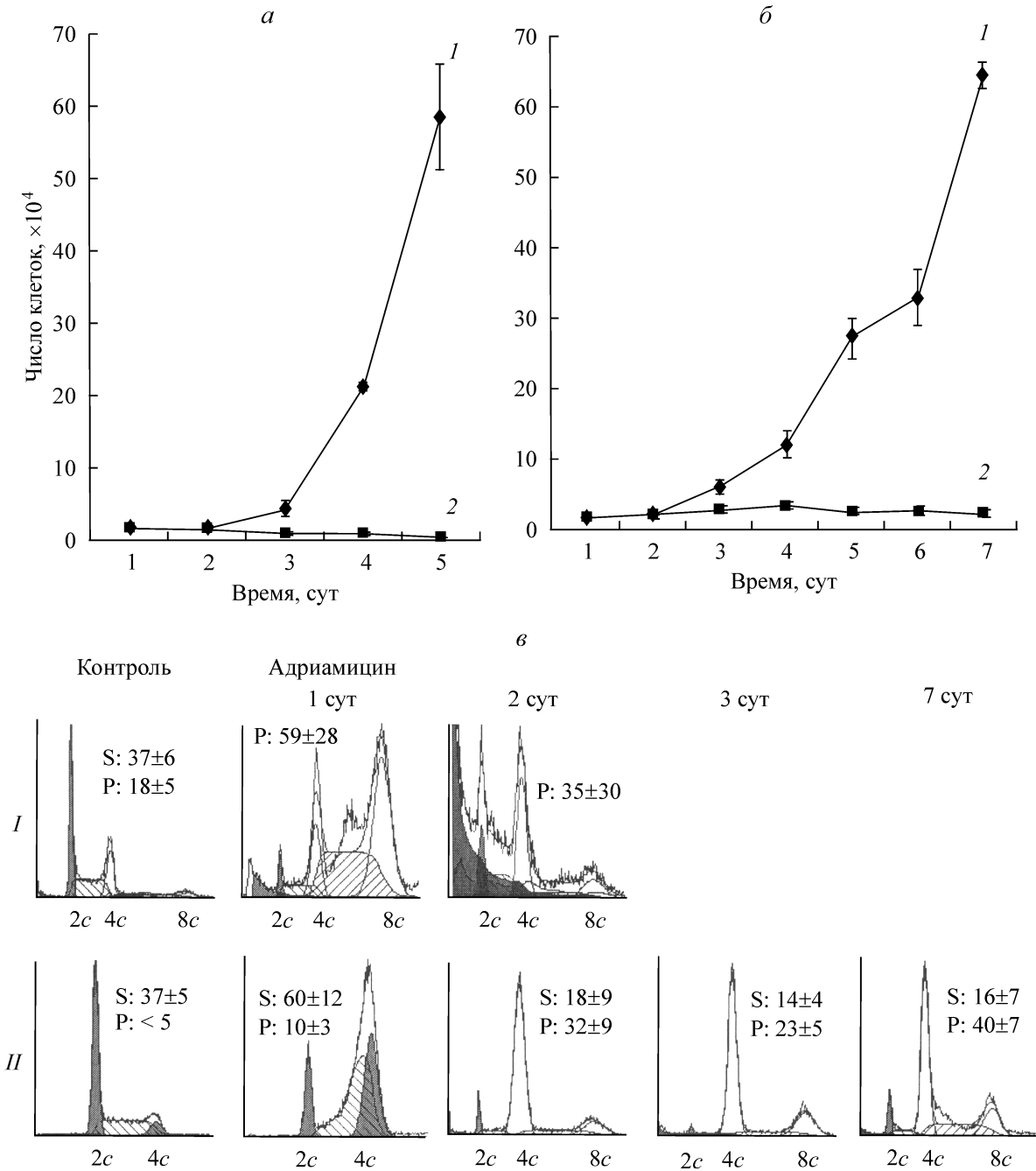


Рис. 1. Кривые роста (а, б) и распределение по фазам клеточного цикла (в) трансформантов E1A + c-Ha-ras (а и в, I) и E1A + c-Ha-ras + bcl-2 (б и в, II) в присутствии адриамицина (0.1 мкг/мл).

а, б: 1 — необработанные клетки, 2 — в присутствии адриамицина. в: по оси абсцисс — содержание ДНК, ед. пloidности c; по оси ординат — количество клеток. S — доля клеток в фазе синтеза ДНК, %; P — доля полиплоидных клеток, %. Указаны средние значения S и P и их стандартные отклонения по результатам не менее 3 экспериментов.

Fig. 1. Growth curves (a, b) and cell cycle distribution (v) of E1A + c-Ha-ras- (a and v, I) and E1A + c-Ha-ras + bcl-2- (b and v, II) in the presence of adriamycin (0.1 μg/ml).

а, б: 1 — untreated cells, 2 — in the presence of adriamycin. в: Abscissa — DNA content, units of ploidy, c; axis of ordinates — cell number. S — portion of S-phase cells, %; P — portion of polyploid cells, %. Means of S and P and their standard deviations of less than three independent experiments are represented.

Действие ДНК-повреждающего агента адриамицина усиливает экспрессию маркера старения в клетках E1A + c-Ha-ras + bcl-2, и через 7 сут культивирования в присутствии адриамицина экспрессия Sa β-Gal выявляется в большинстве клеток (рис. 4, д—з). Полученные результаты позволяют предположить, что адриамицин вызывает

старение в трансформантах E1A + c-Ha-ras с высокой экспрессией антиапоптотического гена bcl-2.

Так как введение онкогена bcl-2 в трансформанты E1A + c-Ha-ras приводит к восстановлению способности клеток останавливаться в клеточном цикле после действия повреждающих агентов, можно предположить, что

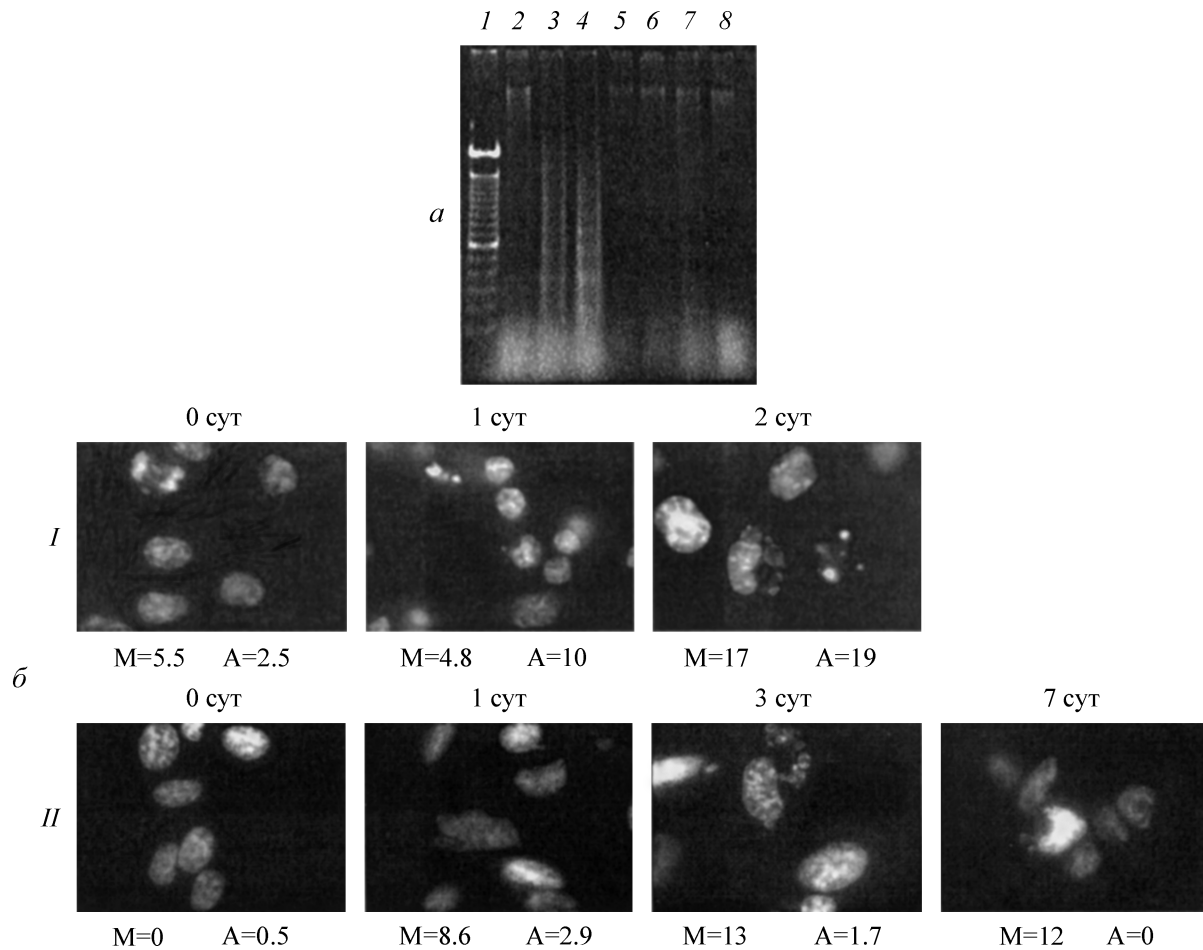


Рис. 2. Подавление клеточной гибели, вызванной адриамицином, в *Bcl-2*-экспрессирующих трансформантах *E1A* + *c-Ha-ras*. *a* — выявление олигонуклеосомной фрагментации ДНК. Дорожки: 1 — маркерная ДНК (100 п. н.); 2 — контрольные клетки *E1A* + *c-Ha-ras*; 3, 4 — они же после обработки адриамицином в течение 1 и 2 сут соответственно; 5 — контрольные клетки *E1A* + *c-Ha-ras* + *bcl-2*; 6–8 — они же после обработки адриамицином в течение 2, 3 и 7 сут соответственно. *б* — клетки *E1A* + *c-Ha-ras* (*I*) и *E1A* + *c-Ha-ras* + *bcl-2* (*II*) после окрашивания флуорохромом DAPI. М — доля клеток с нарушениями митозов, %. А — доля апоптотических клеток, %.

Fig. 2. Suppression of adriamycin-induced cell death in *Bcl-2*-expressing *E1A* + *c-Ha-ras*-transformants.

a — detection of oligonucleosomal DNA fragmentation. Lanes: 1 — 100 bp DNA ladder; 2 — control *E1A* + *c-Ha-ras*-cells; 3, 4 — the same cells treated with adriamycin for 1 and 2 days, correspondingly; 5 — control *E1A* + *c-Ha-ras* + *bcl-2*-cells; 6–8 — the same cells treated with adriamycin for 2, 3 and 7 days, correspondingly. *б* — *E1A* + *c-Ha-ras*- (*I*) and *E1A* + *c-Ha-ras* + *bcl-2*- (*II*) cells after DAPI staining. M — portions of cells with aberrant mitoses, %. A — portion of apoptotic cells, %.

Bcl-2 негативно регулирует функции онкопродуктов *E1A*. Ранний район *E1A* предотвращает остановку пролиферации и старение, вызванные онкогенным *Ras*, и кооперирует с последним в трансформации нормальных клеток (Lin et al., 1995; Serrano et al., 1997). Методом коиммунопреципитации было обнаружено физическое взаимодействие между белками *Bcl-2* и *E1A* в необработанных клетках и после добавления адриамицина, причем содержание этих комплексов со временем возрастает (рис. 5).

Обсуждение

Полученные к настоящему времени данные о длительной остановке в клеточном цикле трансформированных клеток с повышенной экспрессией *Bcl-2* могут свидетельствовать в пользу того, что обработка цитостатиком и ДНК-интеркалятором адриамицином, по-види-

мому, приводит к запуску программы старения. Показано, что цитостатики могут являться индукторами преждевременного старения в различных опухолях (Chang et al., 1999; Schmitt et al., 2002). Адриамицин вызывает необратимую остановку пролиферации и черты преждевременного старения в клеточных линиях, полученных из солидных опухолей человека, независимо от того, экспрессируют они *p53* дикого или мутантного типа (Chang et al., 1999). Кроме того, обработка адриамицином может приводить к митотической катастрофе (увеличение числа хромосом, появление микроядер) и к полиплоидизации (Chang et al., 1999).

С другой стороны, повышенная экспрессия антиапоптотического белка *Bcl-2* сама по себе также может являться фактором старения. Известно, что *Bcl-2* подавляет активность теломеразы, вызывая репликативное старение (Mandal, Kumar, 1997), ведет к торможению пролиферации и появлению черт клеточного старения (Rincheval et al., 2002; Crescenzi et al., 2003). Кроме того,

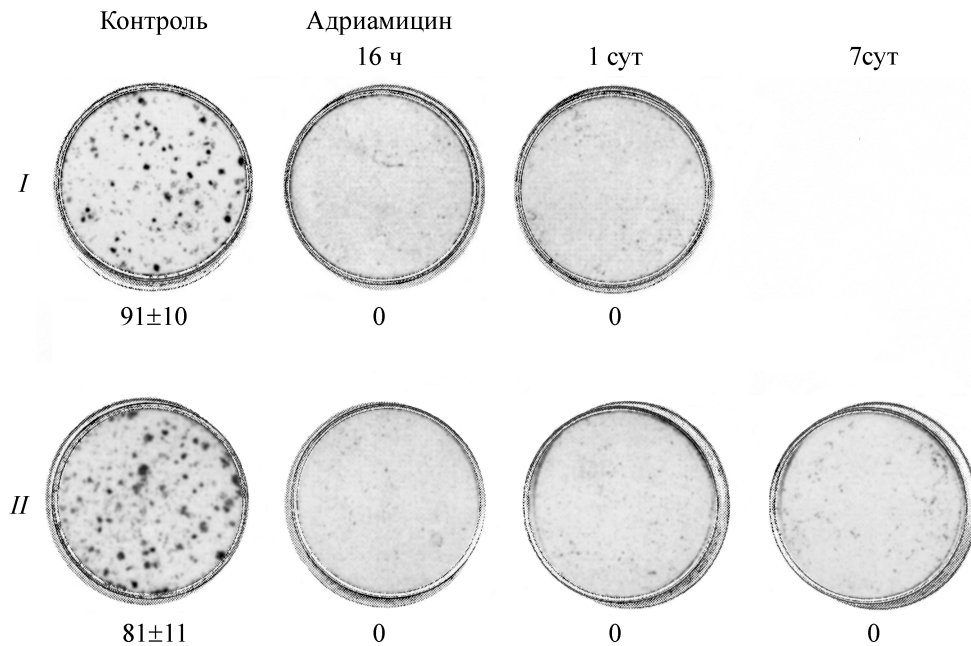


Рис. 3. Клеточные клоны трансформантов E1A + c-Ha-ras (*I*) и E1A + c-Ha-ras + bcl-2 (*II*), выросшие на чашках после обработки адриамицином.

Через указанные промежутки времени после добавления адриамина клетки сеяли на чашки Петри диаметром 30 мм по 100 клеток на 1 чашку. Через 1 нед выросшие клоны фиксировали, окрашивали бриллиантовым синим, подсчитывали под лупой и фотографировали. Указаны средние значения долей выросших клонов (%) и их стандартные отклонения по результатам не менее 3 экспериментов.

Fig. 3. Cell clones of E1A + c-Ha-ras- (*I*) and E1A + c-Ha-ras + bcl-2- (*II*) transformants grown after adriamycin treatment.

Cells were plated on 30 mm Petri dishes with a density of 100 cells per dish in the indicated time-points after adriamycin addition. After a week, the grown clones were fixed, stained with brilliant blue, counted with magnifying glass and photographed. Mean values of portions of grown clones (%) and their standard deviations of less than three independent experiments are represented.

Bcl-2 кооперирует с онкогенным H-Ras, ускоряя старение клеток с конститутивно активной теломеразой человека hTERT (Tombor et al., 2003). При старении клеток различного гистогенеза наблюдается повышение содержания Bcl-2 (Jaraskog, Gilmore, 2000; Crescenzi et al., 2003; Tombor et al., 2003). Таким образом, предположение о том, что Bcl-2 вызывает старение трансформантов E1A + c-Ha-ras в ответ на адриамицин, достаточно обоснованно.

Действительно, онкобелок Bcl-2 способен подавлять клеточную гибель трансформантов E1A + c-Ha-ras, обработанных адриамицином, но при этом клетки теряют способность к пролиферации. Сходные результаты были получены на трансформированных клетках эпителия человека, стабильно экспрессирующих Bcl-2, который защищал их от апоптоза, вызванного обработкой цитостатиком этопозидом. В этом случае Bcl-2 также не влиял на показатели клоногенной выживаемости, образование гигантских и многоядерных клеток (характерных для картины митотической катастрофы) после добавления этопозиды (Lock, Stribinskiene, 1996).

Преждевременное старение, по-видимому, наиболее вероятно в случаях, когда Bcl-2 подавляет в клетках апоптотическую программу. Циклофосамид вызывает старение клеток первичных лимфом мыши, вовлекая в этот процесс опухолевые супрессоры p53 и p16/INK4a. Подавление апоптотической программы в этих лимфомах с помощью Bcl-2 приводит к p53/p16/INK4a-зависимому блоку клеточного цикла и старению (Schmitt et al., 2002). Возможно, поэтому антиапоптотический белок Bcl-2 не повышает клоногенную выживаемость клеток

после обработки цитостатиками, а вызывает окончательный блок пролиферации, являющийся следствием включения программы старения.

Взаимодействие онкопродуктов Bcl-2 с белками раннего района E1A (рис. 5) может являться одним из механизмов, посредством которого осуществляется переключение апоптотической программы трансформантов E1A + c-Ha-ras на программу старения после введения в них Bcl-2. Индукция перехода клеток в фазу синтеза ДНК связана со способностью E1A секвестрировать покет-белки семейства ретинобластомы, вызывая образование свободного транскрипционно активного E2F (Fattaey et al., 1993). E1A взаимодействует с коактиваторами транскрипции PCAF (Chakravarti et al., 1999) и p300/CBP (Chiou, White, 1997). Кроме того, онкопродукты E1A могут инактивировать негативные регуляторы клеточного цикла p21/Waf-1 (Bulavin et al., 1999; Keblusek et al., 1999; Chattopadhyay et al., 2001) и p27/Kip (Mal et al., 1996; Nomura et al., 1998). Экспрессия онкопродуктов E1Aad5 в нормальной клетке вызывает дерегуляцию событий клеточного цикла и массовый p53-зависимый и p53-независимый апоптоз (Debbas, White, 1993; Sabbatini et al., 1995; Teodoro et al., 1995). Комплементация E1A с онкогеном c-Ha-ras приводит к полной морфологической трансформации, которая связана с подавлением E1A-индуцированной апоптотической программы (Davenport, Tatarowsky, 1990). Клеточный ген bcl-2 также способен подавлять E1A-индуцированный апоптоз (Rao et al., 1992; Chiou et al., 1994; Boulakia et al., 1996; Huang et al., 1997). Секвестрирование белком Bcl-2 онкопродуктов E1A может приводить к инактивации свойств

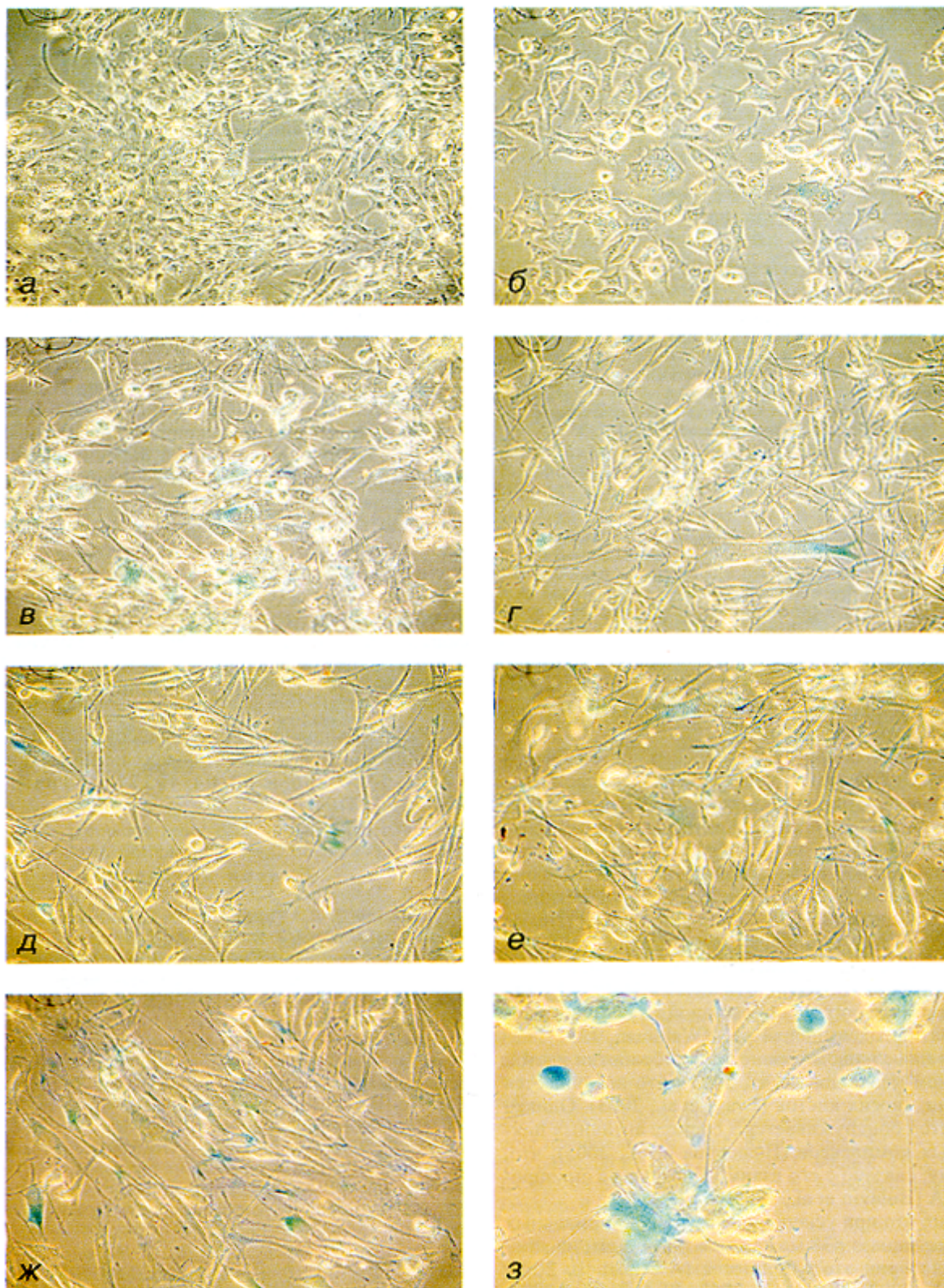


Рис. 4. Экспрессия маркера старения SA β -Gal в трансформантах E1A + c-Ha-ras и E1A + c-Ha-ras + bcl-2.

a — необработанные клетки E1A + c-Ha-ras; *б, в* — эти же клетки после обработки адриамицином в течение 1 и 2 сут соответственно; *з* — необработанные клетки E1A + c-Ha-ras + bcl-2; *д-з* — эти же клетки после обработки адриамицином в течение 1, 2, 3 и 7 сут соответственно.

Fig. 4. Expression of senescence marker SA β -Gal in E1A + c-Ha-ras- and E1A + c-Ha-ras + bcl-2-transformants.

a — untreated E1A + c-Ha-ras-cells; *б, в* — the same cells treated with adriamycin for 1 and 2 days, correspondingly; *з* — untreated E1A + c-Ha-ras + bcl-2-cells; *д-з* — the same cells treated with adriamycin for 1, 2, 3 and 7 days, correspondingly.

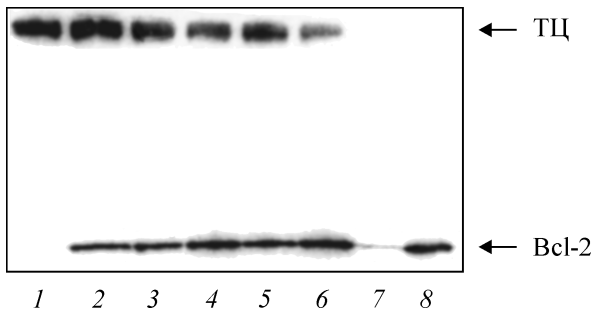


Рис. 5. Образование комплексов между онкобелками Bcl-2 и E1A в трансформантах E1A + c-Ha-ras + bcl-2.

После иммунопреципитации антителами против E1A иммунные комплексы осаждали протеин A-сепарозой и анализировали методом иммуноблоттинга. Дорожки: 1 — клетки E1A + c-Ha-ras; 2 — контрольные клетки E1A + c-Ha-ras + bcl-2; 3—6 — эти же клетки после обработки адриамицином в течение 1, 2, 3 и 7 сут соответственно; 7, 8 — тотальные лизаты клеток E1A + c-Ha-ras и E1A + c-Ha-ras + bcl-2 соответственно. ТЦ — тяжелые цепи иммуноглобулинов.

Fig. 5. Formation of complexes between Bcl-2 and E1A oncoproteins in E1A + c-Ha-ras + bcl-2-transformants.

After immunoprecipitation with anti-E1A antibodies, immune complexes were collected by protein A-sepharose and analysed by immunoblotting. Lanes: 1 — E1A + c-Ha-ras cells; 2 — untreated E1A + c-Ha-ras + bcl-2-cells; 3—6 — the same cells treated with adriamycin for 1, 2, 3 and 7 days, correspondingly; 7, 8 — whole lysates of E1A + c-Ha-ras- and E1A + c-Ha-ras + bcl-2-cells, correspondingly. ТЦ — immunoglobulin heavy chains.

E1A, связанных со стимуляцией пролиферации и индукцией апоптоза, и создавать условия для развития Ras-зависимой программы старения.

Одним из важных признаков старения клеток является необратимый блок клеточного цикла, сопровождающийся сохранением высокой метаболической активности клеток (Blagosklonny, 2003). Как известно, трансформанты E1A + c-Ha-ras + bcl-2, обработанные адриамицином, осуществляют блок клеточного цикла на фоне высокой экспрессии циклинов E и A и высокой активности комплексов циклин E-Cdk2 и циклин A-Cdk2 (Нелюдова и др., 2003; Nelyudova et al., 2004). Трансформанты E1A + c-Ha-ras содержат транскрипционно активный белок p53 дикого типа (Bulavin et al., 1999). Белок p21/Waf-1, ген которого является одной из основных антипролиферативных мишеней p53 (Waldman, 1995), накапливается на белковом уровне после обработки клеток адриамицином (Нелюдова и др., 2003), что наблюдается при старении многих клеток (Iwasa et al., 2003). Однако этот ингибитор обнаруживается в составе активных циклин-киназных комплексов (Нелюдова и др., 2003), что, по-видимому, связано с его взаимодействием с онкопродуктами E1A (Bulavin et al., 1999).

Показано, что при ускоренном старении нормальных клеток стресс-киназа p38 может являться одним из ключевых регуляторов этого процесса (Awad et al., 2000; Grippi et al., 2002; Haq et al., 2002; Zhu, Zhang, 2003; Finn et al., 2004; Naka et al., 2004; Wada, Penninger, 2004). Стабильная экспрессия активированной МКК6, которая является прямым активатором p38, приводит к накоплению p21/Waf-1 и может вызывать необратимый блок клеточного цикла и морфологические черты старения (распластывание, вакуолизацию цитоплазмы, экспрессию SA β -Gal, пигментов) также и у трансформированных клеток (Haq et al., 2002). Перенос Bcl-2 в трансформанты E1A + c-Ha-ras приводит к секвестрированию как

фосфорилированных (активных), так и нефосфорилированных (неактивных) форм p38 онкопродуктами Bcl-2. При этом уровень фосфорилированных форм p38 высок и практически не снижается при добавлении адриамицина в среду культивирования (Nelyudova et al., 2004). Однако было показано, что для преждевременного старения, вызванного такими агентами, как окислительный стресс, γ -облучение и обработка TGF- β , активности p38 не требуется (Haq et al., 2002). Кроме того, обнаружено, что в трансформантах E1A + c-Ha-ras ингибитор циклин-киназных комплексов p21/Waf-1 начинает взаимодействовать со стресс-киназой p38 только в присутствии Bcl-2 (Nelyudova et al., 2004). В экспериментах с IPTG-индуцибельным геном *p21/waf-1* были получены данные о том, что экспрессия ингибитора p21/Waf-1 как таковая и независимо от изменения статуса фосфорилирования pRb приводит к включению и выключению большого числа генов (Chang et al., 2000). В частности, p21/Waf-1 подавляет транскрипцию ряда генов — митотических генов, вовлеченных в биосинтез нуклеотидов, репликацию и репарацию ДНК, сегрегацию и укладку хроматина. Кроме того, p21/Waf-1 активирует транскрипцию генов, экспрессирующихся при старении, — компонентов внеклеточного матрикса, других секретлируемых белков, в том числе антиапоптотических, и митогенных молекул (Chang et al., 2000). Запуск и реализация программы старения онкопродуктами Bcl-2 в трансформантах E1A + c-Ha-ras + bcl-2 могут осуществляться через изменение функций белков E1A, p38 и p21/Waf-1, связанных с регуляцией транскрипции.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 04-04-49766 и 03-04-49377) и гранта CRDF Rb1-2511-ST-03.

Список литературы

- Булавин Д. В., Тарарова Н. Д., Аксенов Н. Д., Поспелов В. А., Поспелова Т. В. 1998. Анализ характера апоптотической гибели эмбриональных фибробластов крысы, трансформированных онкогенами E1A + c-Ha-ras, после гамма-облучения. Цитология. 40 (12): 1017—1025.
- Нелюдова А. М., Аксенов Н. Д., Поспелова Т. В. 2003. Изменение активности циклин-киназных комплексов, контролирующих переход клеток из стадии G₁ клеточного цикла в фазу репликации ДНК, после переноса гена *bcl-2* в трансформанты E1A + c-Ha-ras. Цитология. 45 (2): 149—157.
- Поспелова Т. В., Кислякова Т. В., Медведев А. В., Светликова С. Б., Поспелов В. А. 1990. Особенности трансформированного фенотипа и экспрессия индикаторных САТ-плазмид в эмбриональных фибробластах крысы, иммортализованных E1Aad5-онкогеном и трансформированных E1A + c-Ha-ras-онкогенами. Цитология. 32 (2): 148—155.
- Тарарова Н. Д., Булавин Д. В., Нелюдова А. М., Аксенов Н. Д., Поспелов В. А., Поспелова Т. В. 2002. Антиапоптотическое и антипролиферативное действие гена *bcl-2* при переносе его в трансформанты E1A + c-Ha-ras. Цитология. 44 (5): 441—449.
- Awad M. M., Enslen H., Boylan J. M., Davis R. J., Gruppiso P. A. 2000. Growth regulation via p38 mitogen-activated protein kinase in developing liver. J. Biol. Chem. 275: 38 716—38 721.
- Blagosklonny M. V. 2003. Cell senescence and hypermitogenic arrest. EMBO Rep. 4: 358—362.
- Boulakia C. A., Chen G., Ng F. W., Teodoro J. G., Branton P. E., Nicholson D. W., Poirier G. G., Shore G. C. 1996. Bcl-2 and adenovirus E1B 19 kDa protein prevent E1A-induced proces-

sing of CPP32 and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase. *Oncogene*. 12 : 529—535.

Bulavin D. V., Tararova N. D., Aksenov N. D., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 1999. Deregulation of p53/p21Cip1/Waf1 pathway contributes to polyploidy and apoptosis of E1A + c-Ha-ras transformed cells after gamma-irradiation. *Oncogene*. 18 : 5611—5619.

Chakravarti D., Ogryzko V., Kao H. Y., Nash A., Chen H., Nakatani Y., Evans R. M. 1999. A viral mechanism for inhibition of p300 and PCAF acetyltransferase activity. *Cell*. 96 : 393—403.

Chang B.-D., Broude E. V., Dokmanovic M., Zhu H., Ruth A., Zuan Y., Kandel E. S., Lausch E., Christov K., Roninson I. 1999. A senescence-like phenotype distinguishes tumor cells that undergo terminal proliferation arrest after exposure to anticancer drugs. *Cancer Res*. 59 : 3761—3767.

Chang B.-D., Watanabe K., Broude E.-V., Fang J., Poole J. C., Kalinichenko T. V., Roninson I. B. 2000. Effects of p21^{Waf1/Cip1/Sdi1} on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 97 : 4291—4296.

Chattopadhyay D., Ghosh M. K., Mal A., Harter M. L. 2001. Inactivation of p21 by E1A leads to the induction of apoptosis in DNA-damaged cells. *J. Virol*. 75 : 9844—9856.

Chiou S. K., Rao L., White E. 1994. Bcl-2 blocks p53-dependent apoptosis. *Mol. Cell. Biol*. 14 : 2556—2563.

Chiou S. K., White E. 1997. P300 binding by E1A cosegregates with p53 induction but is dispensable for apoptosis. *J. Virol*. 71 : 3515—3525.

Crescenzi E., Palumbo G., Brady H. J. M. 2003. Bcl-2 activates a program of premature senescence in human carcinoma cells. *Biochem. J*. 375 : 263—274.

Davenport E. A., Taparowsky E. J. 1990. Novel phenotype of C3H 10T1/2 fibroblasts cotransfected with the c-Ha-ras and adenovirus 5 E1A oncogenes. *Mol. Carcinog*. 3 : 83—92.

Debbas M., White E. 1993. Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Develop*. 7 : 546—554.

Deng Q., Liao R., Wu B.-L., Sun P. 2004. High intensity ras signaling induces premature senescence by activating p38 pathway in primary human fibroblasts. *J. Biol. Chem*. 279 : 1050—1059.

Dimri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E. E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O. et al. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 92 : 9363—9367.

Evan G. I., Vousden K. H. 2001. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*. 411 : 342—348.

Fattaey A. R., Harlow E., Helin K. 1993. Independent regions of adenovirus E1A are required for binding to and dissociation of E2F-protein complexes. *Mol. Cell. Biol*. 13 : 7267—7277.

Ferbeyre G., de Stanchina E., Lin A. W., Querido E., McCurach M. E., Hannon G. J., Lowe S. W. 2002. Oncogenic ras and p53 cooperate to induce cellular senescence. *Mol. Cell. Biol*. 22 : 3497—3508.

Finn G. J., Creave B. S., Egan D. A. 2004. Daphnetin induced differentiation of human renal carcinoma cells and its mediation by p38 mitogen-activated protein kinase. *Biochem. Pharmacol*. 67 : 1779—1788.

Frippiat C., Dewelle J., Remacle J., Toussaint O. 2002. Signal transduction in H₂O₂-induced senescence-like phenotype in human diploid fibroblasts. *Free Radic. Biol. Med*. 33 : 1334—1346.

Hanahan D., Weinberg R. A. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100 : 57—70.

Haq R., Brenton J. D., Takahashi M., Finan D., Rottapel R., Zanke B. 2002. Constitutive p38HOG mitogen-activated protein kinase activation induces permanent cell cycle arrest and senescence. *Cancer Res*. 62 : 5076—5082.

Huang D. C. S., Cory S., Strasser A. 1997. Bcl-2, Bcl-XL and adenovirus protein E1B 19kd are functionally equivalent in their ability to inhibit cell death. *Oncogene*. 14 : 405—414.

Hwang E. S. 2002. Replicative senescence and senescence-like state induced in cancer-derived cells. *Mech. Ageing Develop*. 123 : 1681—1694.

Iwasa H., Han J., Ishikawa F. 2003. Mitogen-activated protein kinase p38 defines the common senescence-signalling pathway. *Genes and Cells*. 8 : 131—144.

Jarskog L. F., Gilmore J. H. 2000. Developmental expression of Bcl-2 protein in human cortex. *Brain Res. Develop. Brain Res*. 119 : 225—230.

Keblusek P., Dorsman J. C., Amina F. S., Teunisse S., Teunissen H., van der Eb A. J., Zantema A. 1999. The adenoviral E1A oncoprotein interfere with the growth-inhibiting effect of the cdk-inhibitor p21^{CIP/WAF1}. *J. Gen. Virol*. 80 : 381—390.

Lin A. W., Barradas M., Stone J. C., van Aelst L., Serrano M., Lowe S. W. 1998. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Develop*. 12 : 3008—3019.

Lin A. W., Lowe S. W. 2001. Oncogenic ras activates the APF/p53 pathway to suppress epithelial cell transformation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 98 : 5025—5030.

Lin H.-J. L., Eviner V., Prendergast G. C., White E. 1995. Activated Ha-ras rescues E1A-induced apoptosis and cooperates with E1A to overcome p53-dependent growth arrest. *Mol. Cell. Biol*. 15 : 4536—4544.

Lock R. B., Stribinskiene L. 1996. Dual modes of death induced by etoposide in human epithelial tumor cells allow Bcl-2 to inhibit apoptosis without affecting clonogenic survival. *Cancer Res*. 56 : 4006—4012.

Mal A., Poon R. Y., Howe P. H., Toyoshima H., Hunter T., Harter M. L. 1996. Inactivation of p27Kip1 by the viral E1A oncoprotein in TGFβ-treated cells. *Nature*. 380 : 262—265.

Mandal M., Kumar R. 1997. Bcl-2 modulates telomerase activity. *J. Biol. Chem*. 272 : 14 183—14 187.

Naka K., Tachibana A., Ikeda K., Motoyama N. 2004. Stress-induced premature senescence in hTERT-expressing ataxia telangiectasia fibroblasts. *J. Biol. Chem*. 279 : 2030—2037.

Nelyudova A. M., Tararova N. D., Aksenov N. D., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 2004. Restoration of G₁/S arrest in E1A + c-Ha-ras-transformed cells by Bcl-2 overexpression. *Cell Cycle*. 3 : 1427—1432.

Nomura H., Sawada Y., Ohtaki S. 1998. Interaction of p27 with E1A and its effect on CDK kinase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 248 : 228—234.

Rao L., Debbas M., Sabbatini P., Hockenbery D., Korsmeyer S., White E. 1992. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 89 : 7742—7746.

Rincheval V., Renaud F., Godefroy N., Trotot P., Boulo V., Mignotte B., Vayssiere J. L. 2002. Bcl-2 can promote p53-dependent senescence versus apoptosis without affecting the G₁/S transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 298 : 282—288.

Roninson I. B. 2002. Tumor senescence as a determinant of drug response *in vivo*. *Drug. Resist. Updat*. 5 : 204—208.

Sabbatini P., Lin J., Levine A. J., White E. 1995. Essential role for p53-mediated transcription in E1A-induced apoptosis. *Genes Develop*. 9 : 2184—2192.

Schmitt C. A., Fridman J. S., Yang M., Lee S., Baranov E., Hoffman R. M., Lowe S. W. 2002. A senescence program controlled by p53 and p16/INK4a contributes to the outcome of cancer therapy. *Cell*. 109 : 335—346.

Serrano M., Lin A. W., McCurach M. E., Beach D., Lowe S. W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16/INK4a. *Cell*. 88 : 593—602.

Shay J. W., Roninson I. B. 2004. Hallmarks of senescence in carcinogenesis and cancer therapy. *Oncogene*. 23 : 2919—2933.

Teodoro J. G., Shore G. C., Branton P. E. 1995. Adenovirus E1A proteins induce apoptosis by both p53-dependent and p53-independent mechanisms. *Oncogene*. 11 : 467—474.

Tombar B., Rundell K., Oltvai Z. N. 2003. Bcl-2 promotes premature senescence induced by oncogenic Ras. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303 : 800—807.

Wada T., Penninger J. M. 2004. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene.* 23 : 2838—2849.

Waldman T., Kinzler K. W., Vogelstein B. 1995. p21 is necessary for the p53-mediated G₁ arrest in human cancer cells. *Cancer Res.* 55 : 5187—5190.

Zhu K.-Q., Zhang S.-J. 2003. Involvement of ATM/ATR-p38 MAPK cascade in MNNG induced G₁-S arrest. *World J. Gastroenterol.* 9 : 2073—2077.

Поступила 22 II 2005

ANTIAPOPTOTIC ONCOGENE *bcl-2* INDUCES A PROGRAM OF SENESCENCE
IN E1A + c-Ha-ras-TRANSFORMANTS TREATED WITH ADRIAMYCIN

A. M. Nelyudova,¹ S. G. Zubova, N. D. Aksenov, V. A. Pospelov, T. V. Pospelova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: annaneliudova@hotmail.com

Introduction of *bcl-2* gene in E1A + c-Ha-ras-transformed rat embryo fibroblasts, which are unable to be arrested after damaging influences and possess high proapoptotic sensitivity, results not only in suppression of cell death but also in re-establishment of cell cycle block following DNA damage and serum starvation. Flow cytometry showed that E1A + c-Ha-ras + *bcl-2*-transformants treated with DNA-intercalator adriamycin are capable of being arrested at G₁/S boundary for a long time (for less than 5 days). According to the growth curve data, the number of Bcl-2-overexpressing cells remains constant for a week of cultivation with adriamycin. Clonogenic efficacy of E1A + c-Ha-ras + *bcl-2*-cells is brought to no already in 16 h after adriamycin addition. Apoptotic death, revealed by oligonucleosomic fragmentation of DNA, as well as cell death, occurring due to mitotic catastrophe, after adriamycin treatment are almost absent in Bcl-2-overexpressing transformants, as compared with parental E1A + c-Ha-ras-transformants. Bcl-2 introduction in E1A + c-Ha-ras-transformants is accompanied by a rise of SA β -Gal (Senescence Associated β -Galactosidase) activity, which is commonly considered to be a marker of cell senescence. Adriamycin treatment of E1A + c-Ha-ras + *bcl-2*-transformants results in a much higher rise in SA β -Gal activity, as compared with untreated cells. Co-immunoprecipitation experiments demonstrated the introduction of Bcl-2 to result in formation of Bcl-2 complexes with early region E1A oncoproteins, which are thought to be responsible for proapoptotic susceptibility of E1A-expressing transformants. The data obtained lead to suggestion that *bcl-2* transfer to E1A + c-Ha-ras-transformants may induce a switch from the cell death program on the program of senescence after DNA damage, due, presumably, to Bcl-2 interaction with the apoptosis activator the viral oncoprotein E1A.