

## РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ КИНАЗНЫХ ПУТЕЙ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛА В ПРОЛИФЕРАЦИИ ТРАНСФОРМАНТОВ E1A + Ras

© М. В. Абрамова,<sup>1</sup> С. Б. Светликова, В. В. Гринкевич, В. А. Поспелов

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

<sup>1</sup> электронный адрес: mav@mail.cytspb.rssi.ru

Исследовали вклад различных киназных каскадов передачи сигнала в поддержание автономной пролиферации клеток, трансформированных онкогенами *E1A* и *cHa-ras*, используя специфические ингибиторы MAP-киназ ERK, JNK и p38, а также PI3K. Согласно полученным данным, только блокада каскада, запускаемого PI3K, в клетках E1A + Ras полностью подавляет рост исследуемых клеток, тогда как подавление активности любой из MAP-киназ не вызывает заметного антипролиферативного эффекта. Подавление PI3K специфическим ингибитором LY294002 вызывает накопление ингибитора циклинзависимых киназ p27<sup>Kip1</sup>, но не p21<sup>Waf1</sup>. Накопление p27<sup>Kip1</sup> в клетках E1A + Ras, обработанных LY294002, сопровождается падением активности комплексов циклин А—Cdk2 и циклин Е—Cdk2, что влечет за собой уменьшение фосфорилирования белка Rb, находящегося в комплексе с транскрипционным фактором E2F, и усиление комплексообразования между Rb и E2F. Мы показали, что связывание E2F и гипофосфорилированного Rb приводит к подавлению транскрипционной функции E2F и снижению уровня транскрипции генов-мишеней E2F, которые необходимы для перехода клеток в фазу S клеточного цикла и синтеза ДНК. Таким образом, определяющую роль в поддержании автономной пролиферации клеток E1A + Ras играет PI3K-запускаемый каскад, подавление активности которого приводит к накоплению ингибитора циклинзависимых киназ p27<sup>Kip1</sup> и как следствие — блоку клеточного цикла.

Ключевые слова: онкогены *E1A* и *ras*, каскад PI3K-Акт, ингибитор циклин-киназных комплексов p27<sup>Kip1</sup>, транскрипционный фактор E2F.

Принятые сокращения: MAP-киназы — активируемые митогенами протеинкиназы, PI3K — фосфоинозитол-3-киназа, п.н. — пары нуклеотидов.

Известно, что в клетках многих типов опухолей нарушено функционирование регулярных путей, контролирующих пролиферацию клеток, в том числе MAP-киназных каскадов и киназного каскада PI3K—Акт (Masague, 2004). Эмбриональные фибробласты крысы, трансформированные онкогенами *E1A* и *cHa-ras*, характеризуются нерегулируемой скоростью пролиферации (Поспелова и др., 1990). Известно, что онкогенный Ras активирует киназный каскад Ras—Raf—MEK—ERK, а также через другие ГТФ-связывающие белки повышает активность киназы MEK1, принимающей непосредственное участие в активации стресс-киназ JNK и p38 (Qiu et al., 1995). Кроме этого, известно, что белок Ras в ГТФ-связанном состоянии способен непосредственно активировать PI3K, взаимодействуя с ее каталитической субъединицей p110 (Rodriguez-Viciana et al., 1994). Поэтому в клетках, экспрессирующих конститутивно активный Ras, часто имеет место конститутивная активность PI3K-зависимых сигнальных путей. Известно, что гиперэкспрессия киназы Akt, которая является непосредственной мишенью для PI3K, может приводить к злокачественному перерождению клеток. Так, с достаточно высокой частотой встречается усиление активности Akt2 в опухолях поджелудочной и молочной желез (Cheng et al., 1996). Основной функцией киназного каскада

PI3K—Акт является предотвращение апоптотической гибели (Franke et al., 2003). Однако это не является единственной функцией киназы Akt в контроле клеточной пролиферации. При определенных условиях Akt может стимулировать прогрессию клеточного цикла (Ahmed et al., 1997; Brennan et al., 1997).

Ранее нами было показано, что в клетках E1A + Ras наблюдается независимая от внешних сигналов активность основных MAP-киназных каскадов ERK и p38 (Kukushkin et al., 2002). Однако пока неясно, какие именно каскады отвечают за автономную пролиферацию трансформированных клеток E1A + Ras и возможны ли торможение роста и пролиферации этих клеток при использовании специфических ингибиторов.

Основная цель настоящей работы состояла в том, чтобы определить, какие сигнальные протеинкиназные каскады отвечают за независимую от ростовых факторов пролиферацию клеток, трансформированных онкогенами *E1A* и *cHa-ras*. Для этого оценивали эффект ингибирования отдельных киназ специфическими ингибиторами на пролиферацию трансформантов, а также анализировали, какие изменения происходят с белками, регулирующими прохождение по клеточному циклу, при подавлении активности той или иной киназы. Мы показали, что определяющую роль в автономной пролифера-

ции клеток E1A + Ras играет каскад, запускаемый PI3K, а его специфическая блокада полностью подавляет рост исследуемых клеток, вызывая блок клеточного цикла на границе фаз G<sub>1</sub>/S. Мы также представили доказательства того, что эта остановка обусловлена накоплением ингибитора циклинзависимых киназ p27<sup>Kip1</sup> и подавлением активности циклин-киназных комплексов.

### Материал и методика

Клетки. В работе были использованы спонтанно иммортализованные эмбриональные фибробласты крысы (линия REF52) и клетки REF, трансформированные онкогенами E1A аденовируса 5-го типа человека и *cHa-ras* (линия E1A + Ras; Пospelova и др., 1990). Клетки обрабатывали ингибиторами киназ MEK (PD98059, 50 мкМ), p38 (SB203580, 20 мкМ), JNK (SP600125, 10 мкМ), PI3K (LY294002, 5—20 мкМ) и GSK3β (BIO, 5 мкМ) в течение 24—72 ч. Все ингибиторы — фирмы Calbiochem (США).

Распределение клеток по содержанию ДНК изучали методом проточной цитофлуориметрии (Розанов, 1988). Клетки снимали с чашек раствором Версена, пермеабилizовывали сапонином (Sigma, США) в конечной концентрации 0.01 % в течение 0.5 ч при комнатной температуре и многократно отмывали от сапониона раствором PBS (0.14 М NaCl, 2.7 мМ KCl, 6.5 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 1.5 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2). Затем добавляли РНКазу А (100 мкг/мл), иодид пропидия (10 мкг/мл) (ICN, США), инкубировали 15 мин при 37 °С и анализировали на проточном цитофлуориметре АТС300 (Brucker, Франция).

Трансфекция плазмидными ДНК и анализ люциферазной активности. Для анализа активности транскрипционного фактора E2F клетки E1A + Ras рассеивали в 12—24-луночные пласти и трансфицировали плазмидной ДНК (0.5—0.8 мкг на 1 ячейку), кодирующей люциферазу под промотором гена *e2f-1* (prE2F-luc) или под промотором, содержащим сайт для связывания транскрипционного фактора E2F (E2F-luc), с помощью липофектамина-2000 (Gibco Life Technologies, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Через 5 ч среду заменяли на свежую, добавляли ингибиторы и продолжали инкубировать в течение 16 ч. Клетки лизировали, активность люциферазы измеряли в клеточных экстрактах согласно инструкции фирмы-производителя (Promega, США).

Иммунопреципитация. Для иммунопреципитации клетки лизировали в буфере, содержащем 10 мМ Трис-НСl, pH 7.4, 150 мМ NaCl, 0.5 % NP-40, 1 % Triton X-100, а также ингибиторы протеаз (1 мМ PMSF, по 10 мкг/мл леупептина, пепстатина А и апротинина; Sigma, США) и ингибиторы фосфатаз (1 мМ ортованадата натрия, 5 мМ EGTA (Serva, Германия) и 10 мМ фторида натрия). Клеточные лизаты иммунопреципитировали соответствующими антителами при 8 °С при постоянном перемешивании в течение 2 ч или ночи. К пробам добавляли суспензию протеин А-сефарозы (Boehringer, Германия) и продолжали инкубировать еще 1 ч при 8 °С с перемешиванием. После инкубации преципитаты дважды промывали в буфере для выделения клеточных экстрактов с ингибиторами протеаз и фосфатаз. Затем иммунные комплексы, сорбированные на протеин А-сефарозы, использовали как источник киназ в реакции фосфорилирования *in vitro* или разделяли электрофоретически в полиакриламидном геле (ПААГ).

Анализ содержания белков методом иммуноблотинга. Клетки лизировали в PBS-буфере, содержащем 1 % NP40 (Sigma, США), 0.5 % дезоксихолата натрия, 0.1 % додецилсульфата натрия (SDS), ингибиторы протеаз и фосфатаз. Белки разделяли электрофоретически в 10—12%-ном ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США). Мембраны со связанными белками промывали в PBST (PBS, содержащий 0.5 % Tween 20) и инкубировали в течение 30 мин в 5%-ном обезжиренном молоке, приготовленном на PBST. После этого мембраны инкубировали 1 ч в PBST, содержащем 1 % BSA и соответствующие специфические антитела. Мембраны отмывали в PBST и инкубировали 30 мин в PBST с 5%-ным молоком, содержащим вторые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, при комнатной температуре. Белки на мембранах выявляли методом усиления хемолуминесценции согласно инструкции фирмы-производителя (NEN, США) и экспонировали с рентгеновской пленкой при комнатной температуре. Для анализа белков клеточного цикла были использованы антитела против циклинов А, D1, Е, циклинзависимых киназ Cdk2, Cdk4 и против ингибиторов клеточного цикла p21<sup>Waf1</sup> и p27<sup>Kip1</sup>, p16<sup>INK</sup>, а также E2F-1, E2F-4, Rb, Akt (Santa Cruz, США), phospho-Akt (Ser-473) (Cell Signaling, США).

Фосфорилирование белков *in vitro*. Иммунные комплексы, связанные с протеин А-сефарозой, использовали в качестве источника киназ в реакции фосфорилирования *in vitro* гистона H1. Киназную реакцию проводили в буфере, содержащем 20 мМ HEPES-KOH, pH 7.9, 1 мМ ДТТ, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ MnCl<sub>2</sub>, 25 мкМ АТР (Sigma, США) и 90 кБк[γ-<sup>32</sup>P]-АТФ (ГИИХ, Россия) при 30 °С в течение 1 ч. Реакцию останавливали добавлением буфера для проб (250 мМ трис-НСl, pH 6.7, 6 % SDS, 20 % глицерина, 8 % 2-меркаптоэтанола и 0.25 % бромфенолового синего), пробы кипятили 10 мин и наносили на 10—12%-ный ПААГ. После электрофореза гель фиксировали, высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой.

Анализ уровня транскрипции генов методом RT-PCR. Общую клеточную РНК выделяли гуанидинтиоционатным методом (Chomczynski et al., 1987). Реакцию обратной транскрипции (RT) проводили, используя 2 мкг РНК 1 мкг случайных гексапраймеров (Roche, Франция). Реакцию амплификации (PCR) проводили в присутствии всех необходимых компонентов, а также 100 нг соответствующих праймеров к кДНК одного из генов крысы. Использовали следующие праймеры: к гену *cyclinD1* — 5'-TGTTTCGTGGCCTCTAAGA TG-3'/5'-TCTGGAAAGAAAGTGCTTG-3', к гену *cyclinE* — 5'-ACCCTCCAAAGTTGCACCAG-3'/5'-CCATC-TCCCGGATAACCATG-3', к гену *c-myc* — 5'-CCCAA-ATCCTGTACCTCG-3'/5'-TCTTGGCAGCTGGATA GTC-3', к гену *cdc25A* — 5'-GACTGCCGATACCCATATG-3'/5'-CAGGACATACAGCTCAGGG-3', к гену *p21<sup>waf1</sup>* — 5'-GCCGTGATTGCGATGCGCTCA-3'/5'-ACAGCGACAAGGCCACGTGGT-3', к гену *p27<sup>Kip1</sup>* — 5'-ACTTGGAGAAGCACTGCC-3'/5'-TTCCTCATCCCTGGACAC-3' и гену *e2f1* — 5'-TGGTAGCAGTGGGC-CATTCC-3'/5'-GCCGTTTCTGCACSTTCAGC-3'. PCR в пределах линейной амплификации фрагментов ДНК продолжалась в течение 25 циклов, каждый из которых включал в себя денатурацию при 95 °С в течение 1 мин, отжиг в течение 1 мин при 56 °С (*cyclinE*, *e2f-1*), или 56.5 °С (*cyclin D1*, *c-myc* и *p27<sup>Kip1</sup>*), или 54 °С (*cdc25A*), или 65 °С (*p21<sup>waf1</sup>*), полимеризацию при 72 °С (2 мин).

Специфический продукт реакции анализировали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле на 40 мМ Трис-ацетатном буфере (pH 7.8). В качестве маркера использовали набор фрагментов ДНК, кратных 100 п. н. (Gibco BRL, США). Конститутивно экспрессирующийся ген глицеральдегид-фосфатдегидрогеназы (*gapdh*) крысы был выбран в качестве внутреннего контроля (5'-TGATGGGTGTGAACCACG-3'/5'-CCAGTGAG-CTCCCGTTCCAG-3').

Анализ фрагментации клеточной ДНК. Для выделения тотальной хромосомной ДНК клетки снимали с чашек раствором PBS и лизировали 3 ч при 50 °С в буфере, содержащем 0.25 М EDTA и 0.25 % саркозила, в присутствии протеиназы К (0.1 мкг/мкл). После последовательной депротеинизации фенолом, смесью фенола с хлороформом, а также смесью хлороформа с изоамиловым спиртом нуклеиновые кислоты осаждали двумя объемами 96%-ного этанола в присутствии 0.25 М ацетата натрия при -20 °С. Осадок растворяли в буфере TE (10 мМ Трис-НСl и 1 мМ EDTA, pH 8.0), добавляли NaCl до 150 мМ и РНКазу А до 200 мкг/мл и инкубировали 3 ч при 37 °С. После этого добавляли NaCl до 1 М и SDS до 1 %. После депротеинизации ДНК осаждали 96%-ным спиртом и растворяли в буфере TE. Количество ДНК в пробах уравнивали после определения концентрации на спектрофотометре. Проводили вертикальный электрофорез в 1.5%-ном агарозном геле.

Флуоресцентная окраска хроматина. Для анализа фрагментации ядер, возникающей при апоптогической гибели, клетки сеяли на покровные стекла, фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 10 мин. Отмытые от параформальдегида клетки обрабатывали 0.2%-ным Тритоном X-100 в течение 30 мин. Клетки промывали несколько раз PBS и инкубировали в течение 15 мин в PBS, содержащем 100 нг/мл флуорохромного красителя DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole). Препараты заключали в 5%-ный пропилгалат в глицерине и анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscope (Zeiss), оборудованного CCD-камерой.

## Результаты

Влияние ингибиторов киназ MEK/ERK, JNK, p38 и PI3K на пролиферацию трансформированных клеток E1A + Ras оценивали по изменению параметров клеточного цикла методом проточной цитометрии. Как видно на рис. 1, а, б, добавление к клеткам E1A + Ras ингибитора PI3K LY294002 приводило к уменьшению содержания клеток в фазе синтеза ДНК и накоплению клеток в фазе G<sub>1</sub> (блок G<sub>1</sub>/S). Ингибитор киназы p38 SB203580 также вызывал снижение доли клеток в S-фазе, но в меньшей степени. Подавление

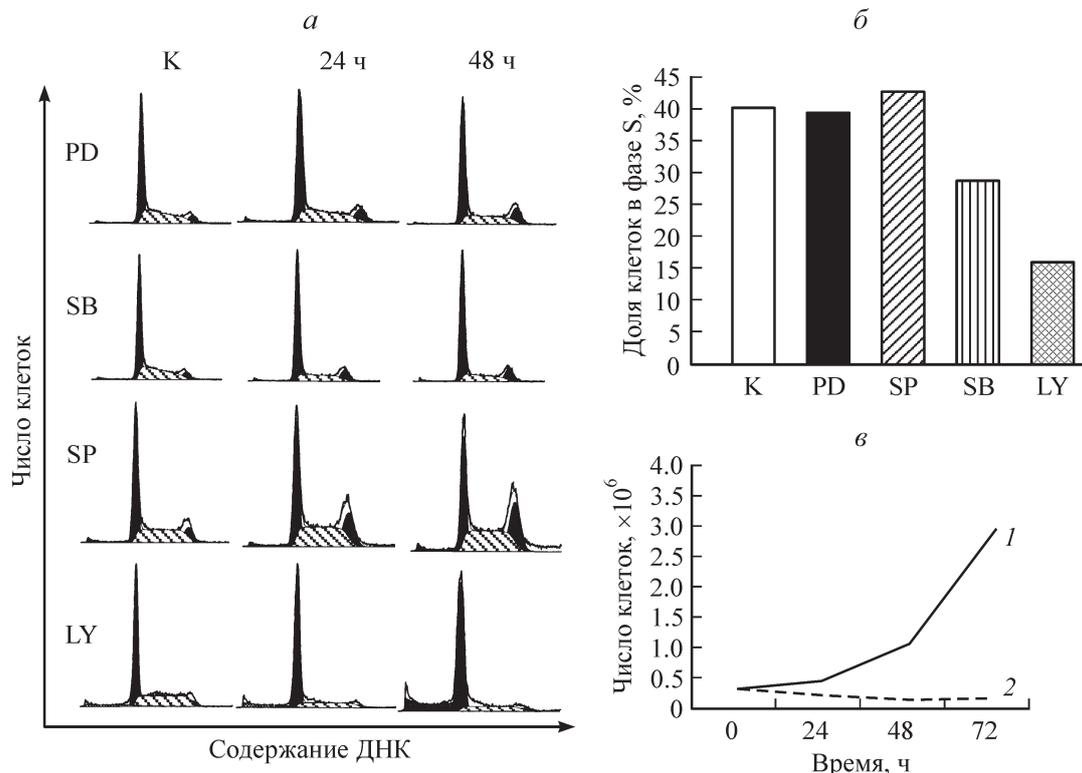


Рис. 1. Влияние ингибиторов киназ на пролиферацию клеток, трансформированных онкогенами E1A и cHa-Ras.

а — гистограммы распределения трансформантов E1A + Ras по фазам клеточного цикла до (К) и после обработки специфическими ингибиторами киназ MEK (PD, 20 мкМ), p38 (SB, 20 мкМ), JNK (SP, 10 мкМ) и PI3K (LY, 10 мкМ) в течение 24 или 48 ч. б — изменение доли S-фазных клеток после обработки ингибиторами киназ трансформантов E1A + Ras в течение 24 ч. в — кривая роста трансформантов E1A + Ras, культивируемых в среде без (1) или в присутствии (2) 10 мкМ LY294002.

Fig. 1. Cell cycle response of E1A + Ras transformants to kinase inhibitor treatment.

а — cell cycle phase distribution of E1A + Ras transformants after treatment with inhibitors for kinase MEK (50 μM PD), p38 (20 μM SB), JNK (10 μM SP) and PI3K (10 μM LY) for 24 or 48 h. б — changes of S-phase cell percentage after treatment of E1A + Ras transformants with kinase inhibitors for 24 h. в — growth curve of E1A + Ras transformants untreated (1) or treated with 10 μM LY294002 (2).

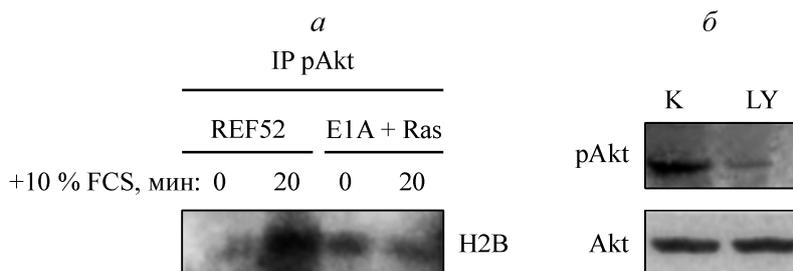


Рис. 2. Активность киназы Akt в нормальных клетках REF52 и в трансформантах E1A + Ras.

а — гистон H2B (H2B), фосфорилированный *in vitro* киназой Akt, преципитированной (IP) из контрольных лизатов клеток REF52 и трансформантов E1A + Ras, голодающих в течение 24 ч (0.1 % сыворотки FCS) или стимулированных после голодания в течение 20 мин добавлением 10 % FCS.

б — иммуноблоттинг белков из клеток E1A + Ras, не обработанных (K) и обработанных 10 мкМ LY294002 (LY) в течение 24 ч, с антителами против киназы Akt, фосфорилированной по Thr-473, а также против нефосфорилированной формы киназы.

Fig. 2. Kinase activity associated with Akt in REF52 and E1A + Ras cells.

а — histone H2B (H2B) phosphorylated *in vitro* by Akt precipitated (IP) from lysates of REF52 and E1A + Ras cells starving for 24 h, or treated with 10 % FCS for 20 min. б — immunoblotting of proteins from E1A + Ras cells untreated (K), or treated with 10 μM LY294002 (LY) for 24 h with antibodies to Akt both Thr-473 phosphorylated and non-phosphorylated form.

активности киназ ERK и JNK не оказывало заметного влияния на прохождение трансформантов по клеточному циклу или на число клеток в S-фазе. Анализ кривых роста клеток, культивируемых в среде без ингибиторов или в присутствии ингибиторов, свидетельствует о том, что только ингибирование PI3K приводит к полной остановке пролиферации трансформантов (рис. 1, в). При этом обработка клеток E1A + Ras ингибитором p38 киназы SB203580 не приводит к подавлению пролиферации трансформантов, сравнимой с действием ингибитора PI3K LY294002.

Как следствие в фибробластах E1A + Ras, экспрессирующих аденовирусный белок E1A и конститутивно активный Ras, наблюдается нерегулируемая активность основных MAP-киназных каскадов, ведущих к киназам KRK, JNK и p38 (Kukushkin et al., 2002). Кроме этого, известно, что белок Ras в GTP-связанном состоянии способен непосредственно активировать PI3K, взаимодействуя с ее каталитической субъединицей p110 (Rodriguez-Viciana et al., 1994). Как и следовало ожидать, в трансформантах E1A + Ras, экспрессирующих конститутивно активный Ras, наблюдается нерегулируемая активность киназы Akt (рис. 2, а). Она заметно выше, чем

базальная активность Akt в голодающих контрольных клетках REF, в которых, однако, Akt способна активироваться при добавлении сыворотки (рис. 2, а). Подавление активности PI3K специфичным ингибитором LY294002 приводит к снижению содержания фосфорной формы киназы Akt (рис. 2, б), что свидетельствует об участии PI3K в регуляции фосфорилирования Akt в трансформантах E1A + Ras. Таким образом, в клетках E1A + Ras, экспрессирующих аденовирусный белок E1A и постоянно активированный Ras, наблюдается нерегулируемая активность основных MAP-киназ и киназы Akt. Киназа Akt, которая является нижележащей мишенью для PI3K, может стимулировать прогрессию клеточного цикла (Ahmed et al., 1997; Brennan et al., 1997). Эти данные соответствуют результатам, полученным с применением ингибитора активности PI3K, приведенным выше, и в совокупности предполагают важную роль сигнального пути PI3K—Akt в поддержании автономной пролиферации трансформантов E1A + Ras.

Исследование апоптотической гибели трансформантов E1A + Ras при ингибировании PI3K. Длительная обработка ингибитором PI3K приводит к уменьшению числа трансформантов, что сви-

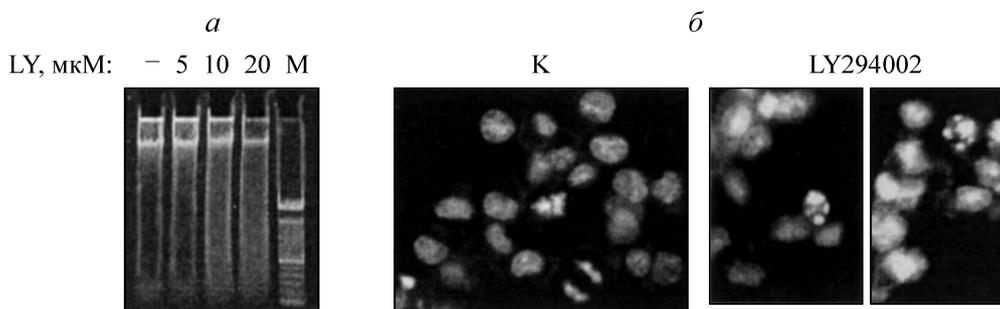


Рис. 3. Индукция апоптоза в трансформантах E1A + Ras после обработки ингибитором PI3K 10 мкМ LY294002 в течение 24 ч (LY).

а — электрофоретический анализ фрагментации ДНК из клеток E1A + Ras, обработанных 5, 10 или 20 мкМ LY294002 в агарозном геле; М — маркерные фрагменты ДНК, кратные 100 п. н. б — флуоресцентный анализ фрагментации ДНК. Клетки фиксировали и окрашивали флуорохромом DAPI.

Fig. 3. Induction of apoptotic response after treatment with 10 μM LY294002 for 24 h (LY) in transformants E1A + Ras.

а — electrophoretic analysis of oligonucleosomal DNA fragmentation in cells. б — DAPI stained fixed cells.

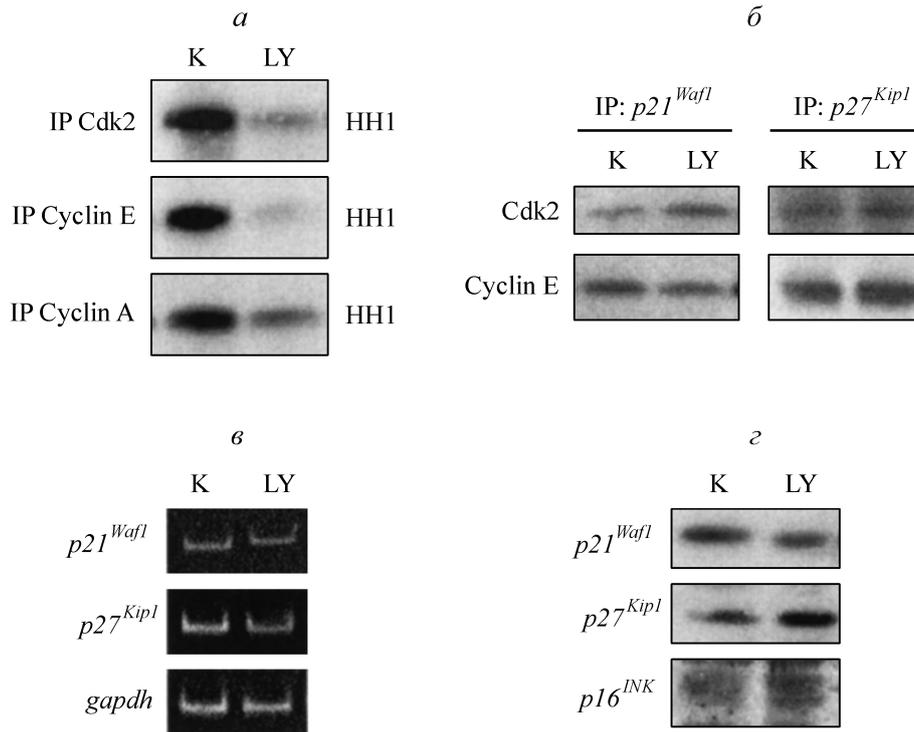


Рис. 4. Активность комплексов, содержащих циклины и циклинзависимые киназы, и их взаимодействие с циклин-киназными ингибиторами в контрольных клетках E1A + Ras (К) и в клетках, обработанных 10 мкМ LY294002 (LY) в течение 24 ч.

*a* — гистон H1 (HH1), фосфорилированный *in vitro* в присутствии белков, копреципитирующихся с киназой Cdk2, циклином E или A (IP). *б* — иммуноблоттинг белков, копреципитирующихся с ингибиторами циклин-киназных комплексов p21<sup>Waf1</sup> или p27<sup>Kip1</sup>; белки иммунопреципитировали соответствующими антителами из клеток E1A + Ras (IP), разделяли с помощью электрофореза в ПААГ и проводили иммуноблоттинг с антителами к циклину E и киназе Cdk2. *в* — RT-PCR -анализ транскрипции генов p21<sup>Waf1</sup> или p27<sup>Kip1</sup>. *г* — иммуноблоттинг белков с антителами против ингибиторов циклин-киназных комплексов p21<sup>Waf1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> и p16<sup>INK</sup>.

Fig. 4. Kinase activity associated with cyclins and cyclin-dependent kinases, and interaction of cyclin-kinases complexes with inhibitors of cyclin-kinases in control E1A + Ras cells (K), and after treatment with 10 μM LY294002 (LY) for 24 h.

*a* — histone H1 phosphorylated *in vitro* by proteins coprecipitated with kinase Cdk2, cyclin E or A (IP). *б* — immunoblotting of proteins coprecipitated with p21<sup>Waf1</sup> or p27<sup>Kip1</sup>. Cell lysates were immunoprecipitated with antibodies to p21<sup>Waf1</sup> or p27<sup>Kip1</sup> (IP), protein complexes were separated by electrophoresis, probed with antibodies to cyclin E and Cdk2. *в* — RT-PCR analysis of p21<sup>Waf1</sup> and p27<sup>Kip1</sup> gene transcription. *г* — immunoblotting of proteins from E1A + Ras cells with antibodies to inhibitors of cyclin-kinases p21<sup>Waf1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> and p16<sup>INK</sup>.

детельствует о гибели клеток (рис. 1, *в*). Анализ распределения клеток по содержанию ДНК также показывает, что доля трансформантов E1A + Ras, содержащих субдиплоидное количество ДНК, увеличивается при действии ингибитора Р1ЗК, и это говорит о деградации ДНК и апоптотической гибели клеток (рис. 1, *а*). Для того чтобы охарактеризовать характер клеточной гибели, вызванной LY294002, мы исследовали морфологию ядер, окрашенных флуоресцирующим ДНК-связывающим агентом DAPI. После обработки трансформантов E1A + Ras ингибитором LY294002 в течение 24 ч значительная доля клеток имела конденсированные и фрагментированные ядра — признак апоптотической гибели (рис. 3, *б*). Подобных изменений морфологии ядер мы не обнаружили в контрольных клетках, не обработанных LY294002. При этом анализ ДНК из клеток E1A + Ras, обработанных LY294002 в различных концентрациях в течение 24 ч, показал, что ДНК подвергается олигонуклеосомной фрагментации (рис. 3, *а*), и это характерно для клеток, гибнущих апоптотически (Darzynkiewicz et al., 1997). Это свидетельствует о том, что ингибирование Р1ЗК в трансформантах E1A + Ras вызывает их апоптотическую гибель.

Изменение активности циклин-киназных комплексов в трансформантах E1A + Ras, обработанных ингибитором Р1ЗК. Для четкого про-

хождения по фазам клеточного цикла необходимы активация различных комплексов циклинов с циклинзависимыми киназами и фосфорилирование ими своих мишеней. Инициация и начало фазы G<sub>1</sub> контролируются комплексами киназы Cdk4 или Cdk6 с циклином D1. Для активации генов, необходимых для синтеза ДНК, в среднем и позднем периодах фазы G<sub>1</sub> требуется формирование активных комплексов киназы Cdk2 с циклином E (переход G<sub>1</sub>/S) и с циклином A в позднем периоде фазы G<sub>1</sub> и при переходе G<sub>1</sub>/S. Для того чтобы выяснить, какие белки и белковые комплексы участвуют в LY294002-индуцированной остановке пролиферации трансформантов E1A + Ras, мы анализировали активность киназы Cdk2 и циклин-киназных комплексов, содержащих циклин E или A. Видно, что обработка трансформантов E1A + Ras ингибитором Р1ЗК вызывала значительное снижение активности киназы Cdk2, а также активности, ассоциированной с циклином A и циклином E (рис. 4, *а*). При этом оказалось, что падение активности циклин-киназных комплексов сопровождается некоторым увеличением пула циклинов и циклинзависимых киназ в комплексе с ингибиторами циклин-киназной активности p21<sup>Waf1</sup> и p27<sup>Kip1</sup> (рис. 4, *б*).

Экспрессия регуляторов клеточного цикла в трансформантах E1A + Ras, обработан-

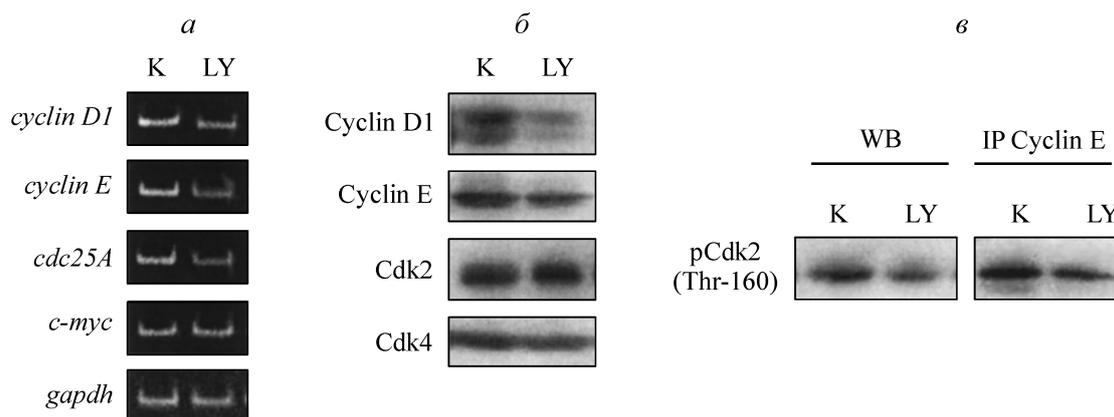


Рис. 5. Экспрессия генов, кодирующих регуляторы клеточного цикла, в контрольных клетках E1A + Ras (K) и в клетках, обработанных 10 мкМ LY294002 (LY) в течение 24 ч.

*a* — RT-PCR-анализ транскрипции генов *cyclinD1*, *cyclinE*, *cdc25* и *c-myc*. *б* — иммуноблоттинг белков с антителами против циклинов D1 и E, циклинзависимых киназ Cdk2 и Cdk4. *в* — иммуноблоттинг тотальных белков из клеток E1A + Ras (WB) и копреципитированных с циклином E (IP Cyclin E) с антителами против киназы Cdk2, фосфорилированной по Thr-160.

Fig. 5. Expression of cell cycle regulators in E1A + Ras cells untreated (K), or treated with 10  $\mu$ M LY294002 (LY) for 24 h.

*a* — RT-PCR analysis of *cyclinD1*, *cyclinE*, *cdc25* and *c-myc* gene transcription. *б* — immunoblotting of proteins with antibodies to cyclins D1, E, cyclin-dependent kinases Cdk2, Cdk4. *в* — immunoblotting of total proteins from E1A + Ras cells (WB) and precipitated with cyclin E from E1A + Ras cells lysates (IP Cyclin E) with antibodies to Cdk2 phosphorylated on Thr-160.

ных ингибитором PI3K. Активность циклинзависимых киназ в комплексе с циклинами контролируется на уровне регуляции экспрессии компонентов циклин-киназных комплексов, а также регуляторов их активности — ингибиторов циклин-киназных комплексов и модифицирующих ферментов (Sherr, Roberts, 1999).

Белки p21<sup>Waf1</sup> и p27<sup>Kip1</sup> являются универсальными ингибиторами циклин-киназных комплексов. Методом RT-PCR мы показали, что обработка клеток E1A + Ras ингибитором LY294002 вызывает уменьшение транскрипции гена p21<sup>Waf1</sup> и не оказывает влияния на транскрипцию гена p27<sup>Kip1</sup> (рис. 4, в). При этом мы обнаружили накопление белка p27<sup>Kip1</sup> после добавления ингибитора LY294002 к клеткам E1A + Ras (рис. 4, з). Такое накопление белка p27<sup>Kip1</sup> при неизменном уровне транскрипции можно объяснить снижением его деградации. Мы наблюдали так же некоторое накопление белка p16<sup>INK1</sup>, который является ингибитором комплексов циклин D—Cdk4 (рис. 4, з).

Методом RT-PCR и иммуноблоттинга мы также проанализировали экспрессию позитивных регуляторов клеточного цикла, таких как *cyclinD1*, *cyclinE*, *cdc25A* и *c-myc* в клетках E1A + Ras, обработанных ингибитором PI3K. Оказалось, что в присутствии LY294002 падает транскрипция генов, кодирующих циклины D1 и E, а также фосфатазу Cdc25A (рис. 5, а). Иммуноблоттинг белков также показал, что содержание циклина D1 в клетках E1A + Ras, обработанных LY294002, значительно снижается (рис. 5, б). Уменьшение содержания циклинов D после ингибирования PI3K можно объяснить тем, что транскрипция, трансляция и посттрансляционные модификации, а также протеолиз циклинов класса D контролируется через сигнальный путь PI3K—Akt. Так, экспрессия циклинов класса D находится под негативным контролем транскрипционных факторов семейства FKHR (Schmidt et al., 2002), активность которых негативно регулируется фосфорилированием киназой Akt (Brunet et al., 1999). Было показано, что трансляция циклинов D также зависит от активности пути PI3K—Akt

(Muise-Helmericks et al., 1998), а его клеточная локализация и протеасомная деградация регулируются фосфорилированием киназой GSK3 $\beta$  (Diehl et al., 1998), которая является мишенью киназы Akt.

Мы не обнаружили изменения содержания циклинзависимой киназы Cdk2 в клетках E1A + Ras, обработанных LY294002 (рис. 5, б). Однако LY294002 вызывал заметное падение уровня фосфорилирования Cdk2 по остаткам Thr-160, которое является необходимым для активности Cdk2 (рис. 5, в). Несколько падает и содержание активной фосфорформы Cdk2 (Thr -160), находящейся в комплексе с циклином E. По-видимому, киназные каскады, запускаемые PI3K, каким-то образом способны передавать сигнал на киназы, участвующие в фосфорилировании Cdk2. Подавление активности PI3K соответственно приводит к снижению уровня фосфорилирования Cdk2 и как следствие — падению ее активности. Ранее было показано, что остановка клеточного цикла клеток кроветворного ряда, вызванная ДНК-повреждающими агентами, коррелирует с падением уровня активирующего фосфорилирования Cdk2 по остаткам Thr-160, и это является следствием изменения активности сигнального каскада, регулируемого PI3K (Earp et al., 2001).

Таким образом, наблюдаемое накопление ингибиторов циклин-киназных комплексов p27<sup>Kip1</sup> и p16<sup>INK</sup>, а также падение экспрессии позитивных регуляторов клеточного цикла и фосфорилирования циклинзависимой киназы Cdk2 по остаткам Thr-160, вызванное LY294002, возможно, являются причиной падения активности, ассоциированной с циклин-киназными комплексами, и остановки пролиферации клеток E1A + Ras.

Активность транскрипционного фактора E2F при ингибировании различных киназных каскадов в трансформантах E1A + Ras. Транскрипционный фактор E2F является ключевым регулятором перехода клеток в фазу S. Многие из генов-мишеней фактора E2F кодируют белки, участвующие в регуляции клеточного цикла, а также в репликации ДНК

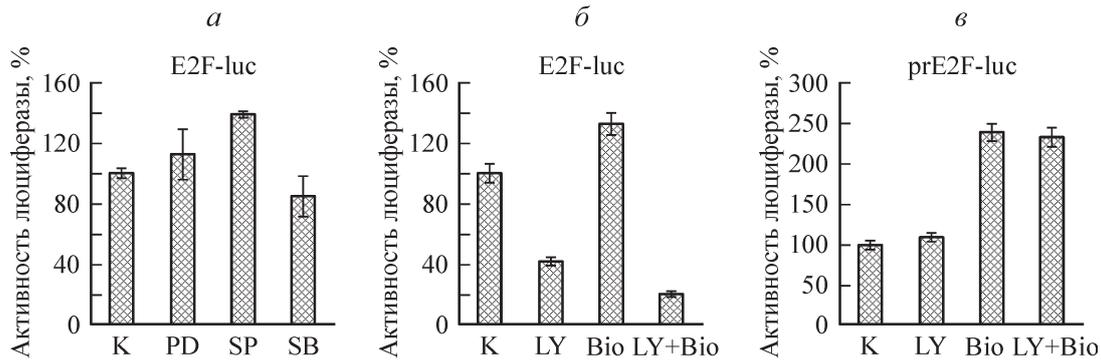


Рис. 6. Активность транскрипционного фактора E2F и активность промотора гена *e2f1* в трансформантах E1A + Ras, обработанных в течение 24 ч ингибиторами киназ MEK (PD), JNK (SP), p38 (SB), GSK3 $\beta$  (BIO) и PI3K (LY).

Клетки E1A + Ras были трансфицированы плазмидой, содержащей ген люциферазы под E2F-регулируемым промотором (E2F-luc) (a, б) или под промотором гена *e2f1* (prE2F-luc) (в), затем клетки обрабатывали ингибиторами киназ и определяли активность люциферазы в лизатах клеток через 24 ч. Значение активности люциферазы в не обработанных киназными ингибиторами клетках принято за 100 %.

Fig. 6. Activities of E2F and *e2f1*-gene promoter in E1A + Ras cells untreated (K), or treated for 24 h with kinase inhibitors MEK (PD), JNK (SP), p38 (SB), GSK3 $\beta$  (BIO) and PI3K (LY) for 24 h.

E2F-driven promoter-luciferase construct (E2F-luc) (a, б) or *e2f1*-gene promoter-luciferase construct (prE2F-luc) (в) were transfected into cycling E1A + Ras cells. The transfected cells were treated with kinase inhibitors, and then lysed for luciferase assay. Luciferase values obtained with untreated samples were set to 100 %.

(Ma et al., 2002). Мы показали, что LY294002 — ингибитор PI3K — вызывает остановку пролиферации трансформантов E1A + Ras, и это сопровождается падением активности циклин-киназных комплексов, отвечающих за переход из фазы G<sub>1</sub> в фазу S клеточного цикла. При этом мы наблюдали снижение уровня экспрессии генов — позитивных регуляторов клеточного цикла, транскрипция которых находится под контролем фактора E2F. Поэтому нас заинтересовало, как LY294002, а также ингибиторы других киназных путей могут модулировать активность транскрипционного фактора E2F в клетках, трансформированных онкогенами E1A и *cHa-ras*.

Мы обрабатывали различными ингибиторами клетки E1A + Ras со стабильно интегрированной плазмидой, имеющей ген люциферазы под промотором, содержащим область для связывания белка E2F, и определяли активность люциферазы в экстрактах клеток (рис. 6, a). Мы не обнаружили достоверного подавления E2F-регулируемой активности люциферазы при добавлении к клеткам E1A + Ras ингибиторов киназ ERK и JNK. Как можно было ожидать, активность E2F падала после обработки клеток ингибитором киназы p38, но особенно значительное падение было при действии ингибитора PI3K (рис. 6, б), который, как показано ранее, вызывал блок клеточного цикла и остановку пролиферации (рис. 1). Какие же сигнальные каскады связывают PI3K и транскрипционный фактор E2F в трансформированных клетках E1A + Ras?

PI3K имеет несколько эффектов, изменение активности каждого из которых может потенциально влиять на функционирование транскрипционного фактора E2F. Так, было показано, что каскад PI3K—Akt является основным путем передачи сигнала, необходимым и достаточным для активации E2F, индуцированной IL2 (Brennan et al., 1997). Транскрипционная активность E2F зависит от уровня фосфорилирования белков семейства Rb. Фосфорилирование Rb осуществляется комплексами, содержащими циклины D, а активность этих комплексов зависит от количества в клетке ингибитора циклин-киназных комплексов p27<sup>Kip1</sup>. Как экспрессия, так и стабильность циклинов D и p27<sup>Kip1</sup> регулируются бел-

ками, которые являются нижележащими эффекторами сигнального пути PI3K—Akt (Diehl et al., 1998; Muijs-Helmericks et al., 1998; Schmidt et al., 2002; Liang, Slingerland, 2003). Поэтому изменение активности PI3K может повлечь за собой изменение внутриклеточной концентрации белков, регулирующих фосфорилирование Rb, и как следствие — изменение активности E2F. Кроме того, стабильность и активность самого транскрипционного фактора E2F также зависят от статуса его фосфорилирования (Lin et al., 2001; Stevens, La Thaugue, 2003). В настоящее время пока нет данных о том, что компоненты пути PI3K—Akt могут непосредственно принимать участие в фосфорилировании E2F. Возможно, изменяется состояние фосфорилированности каких-то белков-посредников, что влечет за собой ингибирование трансактивирующих функций E2F. Например, известно, что  $\beta$ -катенин, деградация которого регулируется его фосфорилированием киназой GSK3 $\beta$ , способен связываться с E2F-содержащими комплексами и изменять их активность (Baek et al., 2003).

Мы попытались идентифицировать ветвь передачи сигнала в каскаде киназ, запускаемом PI3K, ответственную за LY294002-индуцированное ингибирование активности E2F и пролиферативный блок. Киназа GSK3 $\beta$  является нижележащей в сигнальном пути PI3K—Akt, и ее активность негативно регулируется фосфорилированием Akt. Мы показали, что подавление активности GSK3 $\beta$  специфическим ингибитором BIO вызывает активацию E2F (рис. 6, б). Можно было бы предположить, что подавление активности Akt приводит к активации GSK3 $\beta$  и ингибированию E2F, поскольку специфическая инактивация GSK3 $\beta$  влечет увеличение активности E2F. Однако оказалось, что ингибирование киназы GSK3 $\beta$  специфическим ингибитором не снимает супрессирующего эффекта LY294002 на активность транскрипционного фактора E2F (рис. 6, б). Следовательно, можно предположить, что ингибирование PI3K вызывает падение активности E2F и как следствие — остановку пролиферации, не затрагивая путей, регулируемых киназой GSK3 $\beta$ .

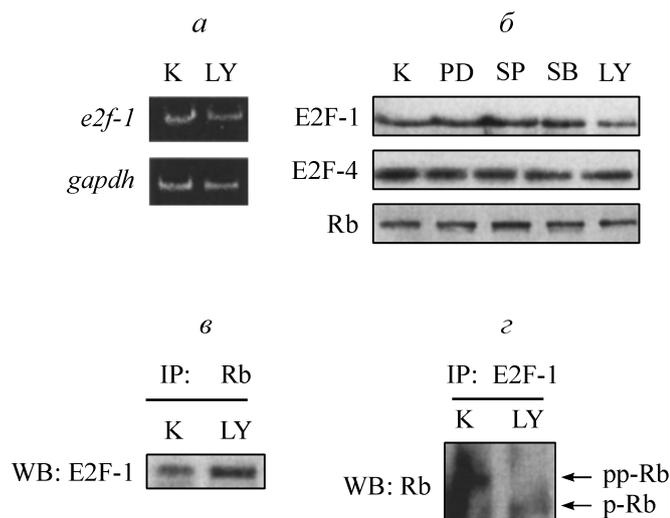


Рис. 7. Экспрессия E2F и его взаимодействие с опухолевым супрессором Rb в контрольных трансформантах E1A + Ras (K) и в обработанных 10 мкМ LY294002 (LY) в течение 24 ч.

*a* — RT-PCR-анализ транскрипции гена *e2f1*. *б* — иммуноблоттинг белков клеток E1A + Ras с антителами против E2F1, E2F4 и Rb. *в* — иммуноблоттинг белков, копреципитированных с белком Rb (IP Rb) из лизатов клеток E1A + Ras, с антителами против E2F1. *г* — иммуноблоттинг белков, копреципитированных с белком E2F1 (IP E2F1) из лизатов клеток E1A + Ras, с антителами против Rb.

Fig. 7. E2F expression and interaction with Rb in E1A + Ras cells untreated (K), or treated with 10 μM LY294002 (LY) for 24 h.

*a* — RT-PCR analysis of *e2f1*-gene transcription. *б* — immunoblotting of proteins from E1A + Ras cells with antibodies to E2F1, E2F4 and Rb. *в* — immunoblotting of proteins precipitated with Rb (IP Rb) from E1A + Ras cells lysates with antibodies to E2F1. *г* — immunoblotting of proteins precipitated with E2F1 (IP E2F1) from E1A + Ras cells lysates with antibodies to Rb.

Механизмы репрессии транскрипционного фактора E2F в клетках E1A + Ras, обработанных LY294002. Мы анализировали люциферазную активность в клетках E1A + Ras, трансфицированных вектором, кодирующим люциферазу под промотором гена *e2f1*. Оказалось, что активность промотора гена *e2f1* никак не меняется при добавлении LY294002 (рис. 6, в). При этом можно отметить, что ингибирование GSK3β значительно активировало промотор гена *e2f1*, что говорит о существовании механизмов регуляции транскрипции E2F белками, активность которых контролируется киназой GSK3β. Возможным кандидатом на эту роль выступает β-катенин, гиперэкспрессия которого приводит к снижению активности промотора *e2f1* (данные не представлены). В свою очередь ингибитор PI3K LY294002 не оказывал никакого влияния на активирующий эффект ингибитора киназы GSK3β (рис. 6, в). С помощью RT-PCR и иммуноблоттинга мы проанализировали характер экспрессии E2F. Из данных, представленных на рис. 7, а, видно, что транскрипция *e2f1* практически не меняется после добавления LY294002 к клеткам E1A + Ras. При этом LY294002 вызывает некоторое снижение количества белков семейства E2F (E2F1 и E2F4) (рис. 7, б). Однако такое незначительное уменьшение содержания в клетке транскрипционного фактора не может повлечь наблюдаемое падение его активности и экспрессии генов-мишеней.

Известно, что активность транскрипционного фактора E2F зависит от уровня фосфорилирования белков се-

мейства Rb, которые образуют комплекс с E2F. В гипофосфорилированном состоянии белок Rb связывает и инактивирует транскрипционный фактор E2F. Фосфорилирование Rb циклин-киназными комплексами приводит к подавлению ингибирующих функций Rb, что позволяет E2F активировать транскрипцию генов, необходимых для репликации ДНК (Jones, Kazlauskas, 2001). Иммуноблоттинг белков показал, что ингибирование PI3K не приводит к изменению содержания белка Rb в клетках E1A + Ras (рис. 7, б). Однако мы наблюдали усиление ассоциации Rb с транскрипционным фактором E2F (рис. 7, в). Как видно на рис. 7, г, в комплексах E2F—Rb до обработки LY294002 преобладает гиперфосфорилированная форма белка Rb. Такой Rb не способен полностью ингибировать транскрипционные функции белка E2F. Однако мы показали, что после добавления LY294002 гиперфосфорилированная форма белка Rb в комплексе Rb—E2F заменяется гипофосфорилированной, что приводит к инактивации E2F и как следствие — к реализации пролиферативного блока.

Таким образом, из полученных нами данных можно сделать вывод о том, что активность транскрипционного фактора E2F значительно падает в клетках E1A + Ras, обработанных LY294002, в результате инактивации E2F в комплексе с гипофосфорилированным Rb.

## Обсуждение

В настоящей работе проведен анализ роли киназ, принадлежащих к различным сигнальным путям, в поддержании автономной пролиферации трансформированных клеток, экспрессирующих E1A и конститутивно активный Ras. В результате постоянной экспрессии онкогенов *E1A* и *ras* в клетках E1A + Ras обнаружена нерегулируемая активность основных MAP-киназ ERK, JNK и p38 (Kukushkin et al., 2002), а также киназы Akt (рис. 2), являющейся эффектором PI3K. Мы показали, что инактивация только каскада, запускаемого PI3K, приводит к остановке пролиферации исследуемых клеток, тогда как подавление активности любой из MAP-киназ не вызывает подобного эффекта. Неспособность ингибитора киназного каскада MEK—ERK повлиять на пролиферацию клеток E1A + Ras является неожиданной, поскольку киназа ERK активируется в ответ на многие ростовые факторы. Так, было показано, что активность ERK-регулируемого сигнального пути необходима для пролиферации нормальных фибробластов (Cowley et al., 1994). Рост нетрансформированных фибробластов REF52 подавлялся при добавлении ингибитора киназы MEK PD98059 (данные не представлены). Однако нами, а также и другими авторами (Hoshino et al., 2001) была показана разная чувствительность к этому ингибитору у разных типов трансформированных клеток. Известно также, что необходимость активности ERK для пролиферации неодинакова для различных опухолевых клеток человека (Hoshino et al., 1999).

Какова причина изменения вклада различных киназных каскадов в пролиферацию трансформированных клеток? Функционально фаза G<sub>1</sub> клеточного цикла делится на два интервала, прохождение которых клеткой регулируется различными наборами сигнальных белков. Во время первого интервала наиболее важную роль играет каскад Ras—Raf—ERK, который активирует транскрипцию генов раннего и задержанного ответов, продук-

ты которых являются важными регуляторами клеточного цикла (AP-1, c-Myc, циклин D и др.). Активация киназных путей второго интервала, включающих в себя PI3K и PKC, необходима для стабилизации пролиферативных белков, синтезированных во время первого интервала, и для инактивации ингибиторов перехода G<sub>1</sub>/S (Jones, Kazlauskas, 2001). Например, белки PI3K-регулируемого сигнального каскада стабилизируют циклин D1 (Diehl et al., 1998). Фосфорилирование белка c-Myc по остатку Ser-62 MAP-киназой стабилизирует его, однако одновременно служит для инициации фосфорилирования киназой GSK3 $\beta$  по Thr-58, что вызывает убиквитин-зависимую деградацию c-Myc (Liang, Slingerland, 2003). Поэтому активность пути PI3K—Akt необходима для стабилизации c-Myc через ингибирование GSK3 $\beta$ . Деградация и клеточная локализация ингибиторов клеточного цикла p21<sup>Waf1</sup> и p27<sup>Kip1</sup> также регулируются белками пути PI3K—Akt (Liang, Slingerland, 2003). В клетках, трансформированных онкогенами E1A аденовируса и cHa-ras, экспрессия многих важных пролиферативных генов дерегулирована (Pospelova et al., 1999), по-видимому, по причине значительной реорганизации структуры хроматина в области промоторов этих генов и перераспределения кофакторов транскрипции вследствие экспрессии онкобелка E1A (Ben-Israel, Kleinberger, 2002; Kuskushkin et al., 2002). В частности, в трансформантах E1A + Ras на высоком нерегулируемом уровне транскрибируются гены *cyclinD1* и *c-myc* (Abramova et al., 2003; Абрамова и др., 2004). Соответственно в трансформантах E1A+Ras активность этих белков в основном регулируется на уровне стабилизации белка, а не на транскрипционном уровне. По-видимому, поэтому в клетках, экспрессирующих онкобелок E1A и постоянно активный Ras, определяющую роль в автономной пролиферации играет каскад PI3K—Akt, активность которого необходима для стабилизации пролиферативных белков и деградации ингибиторов клеточного цикла.

Прогрессия по клеточному циклу регулируется координированной активностью различных циклинзависимых киназ (Sherr, Roberts, 1999). Мы показали, что остановка пролиферации, вызванная LY294002, сопровождается падением активности циклин-киназных комплексов. При этом происходит накопление ингибитора циклинзависимых киназ p27<sup>Kip1</sup>. Ключевая роль p27<sup>Kip1</sup> в контроле над активностью циклинзависимых киназ и, следовательно, клеточного цикла давно установлена (Sherr, Roberts, 1999). P27<sup>Kip1</sup> опосредует остановку пролиферации в ответ на различные антимитогенные сигналы, такие как трансформирующий фактор  $\beta$ , удаление сыворотки и контактное ингибирование. Ингибитор p27<sup>Kip1</sup> связывает и выключает каталитическую активность G<sub>1</sub>-специфичного комплекса циклин E—Cdk2, которая необходима для входа клетки в фазу S. Одной из основных мишеней комплекса циклин E—Cdk2 является белок Rb. Мы показали, что накопление p27<sup>Kip1</sup>, наблюдаемое в клетках E1A + Ras, обработанных LY294002, и падение циклин-киназной активности сопровождаются уменьшением фосфорилирования белка Rb, находящегося в комплексе с E2F, и усилением комплексообразования между Rb и E2F. В результате инактивации транскрипционного фактора E2F, которая имеет место при образовании комплексов с гипофосфорилированным Rb, происходит падение транскрипционных функций E2F и транскриптов генов-мишеней E2F. Мы показали, что подавление пролиферации, вызванное блокадой киназного пути

PI3K—Akt в клетках, экспрессирующих E1A и активированный Ras, определяется увеличением содержания белка p27<sup>Kip1</sup> при неизменном уровне транскрипции. Одной из причин накопления белка p27<sup>Kip1</sup> при неизменном уровне транскрипции гена, возможно, является снижение активности комплексов циклин E—Cdk2, которые непосредственно способны фосфорилировать p27<sup>Kip1</sup>, способствуя его убиквитинированию и последующей протеасомной деградации (Sheaff et al., 1997; Sherr, Roberts, 1999). Деградация p27<sup>Kip1</sup> может также регулироваться через сигнальный путь PI3K—Akt за счет активации ключевого компонента убиквитин-лигазного комплекса SKP2, который опосредует Cdk2-циклин E-зависимое убиквитинирование и протеолиз p27<sup>Kip1</sup> (Liang, Slingerland, 2003). Поэтому блокада передачи сигнала по пути PI3K—Akt приводит к накоплению белка p27<sup>Kip1</sup>. Следовательно, накопление p27<sup>Kip1</sup>, вызванное LY294002, является результатом стабилизации p27<sup>Kip1</sup> на уровне белка.

Мы показали также, что LY294002-индуцированная остановка пролиферации клеток E1A + Ras сопровождается снижением активирующего фосфорилирования Cdk2 по остаткам Thr-160. Фосфорилирование Cdk2 осуществляется киназой САК. Связывание Cdk с ингибиторами циклинзависимых киназ p21<sup>Waf1</sup> или p27<sup>Kip1</sup> ингибирует ее фосфорилирование киназой САК (Kato et al., 1994; Aprelikova et al., 1995). Поэтому весьма вероятно роль белков семейства Cip/Kip в предотвращении доступности для киназ Thr-160 в молекуле Cdk2 в клетках E1A + Ras, обработанных LY294002, хотя нам не удалось обнаружить значительное накопление p27<sup>Kip1</sup> и p21<sup>Waf1</sup> в комплексе с циклином E и Cdk2. Было показано, что фосфорилирование Cdk4 киназой САК *in vitro* ингибируется стехиометрической ассоциацией Cdk4 с p27<sup>Kip1</sup>, чего можно избежать, повышая концентрацию Cdk4 в реакции (Kato et al., 1994).

Таким образом, мы показали регулируемый уровень фосфорилирования Cdk2 по Thr-160 при индуцированной LY294002 остановке E1A + Ras-клеток, что является возможным новым механизмом регуляции клеточной пролиферации через сигнальный путь, регулируемый PI3K.

Добавление LY294002 вызывает значительное увеличение доли клеток E1A + Ras с конденсированными и фрагментированными ядрами, что говорит о запуске программы апоптотической гибели этих клеток. Клетки, экспрессирующие аденовирусный онкобелок E1A, не могут долго делиться в культуре, поскольку достаточно быстро гибнут в результате апоптоза (Lowe, Ruley, 1993). Было показано, что белок E1A аденовируса 5-го типа человека повышает чувствительность клеток апоптозу, индуцированному различными стимулами, такими как фактор некроза опухолей  $\alpha$ , ультрафиолетовое и гамма-облучения, а также различные противоопухолевые препараты. Молекулярные механизмы, лежащие в основе E1A-зависимой чувствительности к апоптозу, остаются пока полностью не выясненными. Ранее полагали, что вызванная E1A чувствительность нормальных диплоидных фибробластов к p53-зависимому и p53-независимому апоптозу обусловлена активацией прокаспаз в результате инактивации Rb онкобелком E1A (Nahle et al., 2002). Совсем недавно появились данные о том, что E1A-зависимая чувствительность к апоптозу обусловлена, в частности, подавлением активности киназы Akt как в нормальных фибробластах, так и в линиях трансформированных клеток (Liao et al., 2004). Для подавления апоптотической гибели E1A-иммортилизованных клеток про-

водят дополнительную трансформацию комплементирующими онкогенами, такими как E1B 19 кДа аденовируса, *cHa-ras* и др. (Ruley, 1983). Онкогенный Ras, активируя антиапоптотический каскад PI3K—Akt, делает клетки E1A + Ras способными без значительных потерь пролиферировать в культуре. Блокада передачи сигнала по пути PI3K—Akt, индуцирует апоптоз в клетках E1A + Ras. В связи с этим можно отметить, что гиперэкспрессия p27<sup>Kip1</sup> ведет к апоптозу клеток в различных опухолевых линиях (Katayose et al., 1997). Таким образом, накопление p27<sup>Kip1</sup>, наблюдаемое в LY294002-обработанных клетках E1A + Ras, может отчасти играть роль в индукции апоптоза в этих опухолевых клетках.

Таким образом, в настоящей работе мы показали, что определяющую роль в поддержании автономной пролиферации клеток, трансформированных онкогенами E1A и *cHa-ras*, играет каскад PI3K—Akt, подавление передаточного сигнала по которому приводит к накоплению ингибитора циклинзависимых киназ p27<sup>Kip1</sup> и как следствие — блоку клеточного цикла и апоптотической гибели трансформантов E1A + Ras.

Авторы выражают благодарность Н. Д. Аксенову за проведение цитометрии, а также Е. И. Костылевой за предоставление гистона H2B.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 03-04-49377), гранта CRDF RB1-2511-ST-03 и программы РАН по физико-химической биологии «Эмбриональные стволовые клетки».

### Список литературы

- Абрамова М. В., Светликова С. Б., Аксенов Н. Д., Поспелова Т. В., Поспелов В. А. 2003. Ингибитор деацетилаз гистонов останавливает пролиферацию клеток, трансформированных онкогенами E1A и *cHa-ras*. Цитология. 45(11) : 1100—1108.
- Поспелова Т. В., Медведев А. В., Светликова С. Б., Поспелов В. А. 1990. Характеристика трансформированного фенотипа и экспрессии САТ-плазмид в клетках эмбриональных фибробластов крысы, трансформированных онкогенами E1A + Ras. Цитология. 32(2) : 148—155.
- Розанов Ю. М. 1988. Проточная цитометрия. В кн. : Методы культивирования клеток. Л. : Наука. 221—231.
- Абрамова М. В., Кукushkin A. N., Svetlikova S. B., Pospelova T. V., Pospelov V. A. 2003. Selective repression of *c-fos* gene transcription in rat embryo fibroblasts transformed by oncogenes E1A and *cHa-ras*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 306 : 483—487.
- Ahmed N. N., Grimes H. L., Bellacosa A., Chan T. O., Tsichlis P. N. 1997. Transduction of interleukin-2 antiapoptotic and proliferative signals via Akt protein kinase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 94 : 3627—3632.
- Aprelikova O., Xiong Y., Liu E. T. 1995. Both p16 and p21 families of cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitors block the phosphorylation of cyclin-dependent kinases by the CDK-activating kinase. J. Biol. Chem. 270 : 18 195—18 197.
- Baek S. H., Kioussi C., Briata P., Wang D., Nguyen H. D., Ohgi K. A., Glass C. K., Wynshaw-Boris A., Rose D. W., Rosenfeld M. G. 2003. Regulated subset of G<sub>1</sub> growth-control genes in response to depression by the Wnt pathway. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100 : 3245—3250.
- Ben-Israel H., Kleinberger T. 2002. Adenovirus and cell cycle control. Frontiers in Bioscience. 7 : 1369—1395.
- Brennan P., Babbage J. W., Burgering B. M., Groner B., Reif K., Cantrell D. A. 1997. Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F. Immunity. 7 : 679—689.

Brunet A., Bonni A., Zigmond M. J., Lin M. Z., Juo P., Hu L. S., Anderson M. J., Arden K. C., Blenis J., Greenberg M. E., 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. Cell. 96 : 857—868.

Cheng J. Q., Ruggeri B., Klein W. M., Sonoda G., Altomare D. A., Watson D. K., Testa J. R. 1996. Amplification of Akt2 in human pancreatic cells and inhibition of Akt2 expression and tumorigenicity by antisense RNA. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93 : 3636—3641.

Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Analyt. Biochem. 162 : 156—159.

Cowley S., Paterson H., Kemp P., Marshall C. J. 1994. Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. Cell. 77 : 841—852.

Darzynkiewicz Z., Juan G., Li X., Gorczyca W., Murakami T., Traganos F. 1997. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). Cytometry. 27 : 1—20.

Diehl J. A., Cheng M., Roussel M. F., Sherr C. J. 1998. Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization. Genes Develop. 12 : 3499—3511.

Eapen A. K., Henry M. K., Quelle D. E., Quelle F. 2001. DNA damage-induced G(1) arrest in hematopoietic cells is overridden following phosphatidylinositol 3-kinase-dependent activation of cyclin-dependent kinase 2. Mol. Cell. Biol. 21 : 6113—6121.

Franke T. F., Hornik C. P., Segev L., Shostak G. A., Sugimoto C. 2003. PI3K—Akt and apoptosis : size matters. Oncogene. 22 : 8983—8998.

Hoshino R., Chatani Y., Yamori T., Tsuruo T., Oka H., Yoshida O., Shimada Y., Ari-i S., Wada H., Fujimoto J., Kohno M. 1999. Constitutive activation of the 41-/43-kDa mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human tumors. Oncogene. 18 : 813—822.

Hoshino R., Tanimura S., Watanabe K., Kataoka T., Kohno M. 2001. Blockade of the extracellular signal-regulated kinase pathway induces marked G<sub>1</sub> cell cycle arrest and apoptosis in tumor cell in which the pathway is constitutively activated. J. Biol. Chem. 276 : 2686—2692.

Jones S. M., Kazlauskas A. 2001. Growth factor-dependent signaling and cell cycle progression. FEBS Lett. 490 : 110—116.

Katayose Y., Kim M., Rakkar A. N. S., Li Z., Cowan K. H., Seth P. 1997. Promoting apoptosis : a novel activity associated with the cyclin-dependent kinase inhibitor p27. Cancer Res. 57 : 5441—5445.

Kato J. Y., Matsuoka M., Polyak K., Massague J., Sherr C. J. 1994. Cyclic AMP-induced G<sub>1</sub> phase arrest mediated by an inhibitor (p27<sup>Kip1</sup>) of cyclin-dependent kinase 4 activation. Cell. 79 : 487—496.

Kukushkin A., Abramova M., Svetlikova S., Pospelova T., Darieva Z., Akseonov N., Pospelov V. 2002. Downregulation of *c-fos* gene transcription in cells transformed by E1A and *cHa-ras* oncogenes: a role of sustained activation of MAP/ERK kinase cascade and of inactive chromatin structure at *c-fos* promoter. Oncogene. 21 : 719—730.

Liang J., Slingerland J. M. 2003. Multiple roles of the PI3/RKB (Akt) pathway in cell cycle progression. Cell Cycle. 2 : 339—345.

Lialo Y., Hung M. C. 2004. A new role of protein phosphatase 2a in adenoviral E1A protein-mediated sensitization to anticancer drug-induced apoptosis in human breast cancer cells. Cancer Res. 64 : 5938—5942.

Lin W. C., Lin F. T., Nevins J. R. 2001. Selective induction of E2F1 in response to DNA damage, mediated by ATM-dependent phosphorylation. Genes Develop. 15 : 1833—1844.

Lowe S. W., Ruley H. E. 1993. Stabilization of the p53 tumor suppressor in induced by adenovirus 5 E1A and accompanies apoptosis. Genes Develop. 7 : 535—545.

Ma Y., Croxton R., Moorer R. L., Cress W. D., 2002. Identification of novel E2F-1-regulated genes by microarray. Arch. Biochem. Biophys. 399 : 212—224.

- Massague J. 2004. G<sub>1</sub> cell-cycle control and cancer. *Nature*. 432 : 298—306.
- Muise-Helmericks R. C., Grimes H. L., Bellacosa A., Malstrom S. E., Tsichlis P. N., Rosen N. 1998. Cyclin D expression is controlled post-transcriptionally via a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 272 : 29 864—29 872.
- Nahle Z., Polakoff J., Davuluri R. V., McCurrach M. E., Jacobson M. D., Narita M., Zhang M. Q., Lazebnik Y., Bar-Sagi D., Lowe S. W. 2002. Direct coupling of the cell cycle and cell death machinery by E2F. *Nat. Cell Biol.* 4 : 859—864.
- Pospelova T. V., Medvedev A. V., Kukushkin A. N., Svetlikova S. B., van der Eb A. J., Dorsman J. C., Pospelov V. A. 1999. E1A + cHa-ras transformed rat embryo fibroblast cells are characterized by high and constitutive DNA binding activities of AP-1 dimers with significantly altered composition. *Gene Expression*. 8 : 19—32.
- Qiu R. G., Chen J., Kirn D., McCormick F., Symons M. 1995. An essential role for Rac in Ras transformation. *Nature*. 374 : 457—459.
- Rodriguez-Viciano P., Warne P. H., Dhand R., Vanhaesebroeck B., Gout I., Fry M. J., Waterfield M. D., Downward J. 1994. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a target of Ras. *Nature*. 370 : 527—532.
- Ruley H. E. 1983. Adenovirus early region 1A enables viral and cellular transforming genes to transform primary cells in culture. *Nature*. 304 : 602—606.
- Schmidt M., Fernandez de Mattos., van der Horst A., Klomp-maker R., Kops G. J., Lam E. M., Burgering B. M., Medema R. H. 2002. Cell cycle inhibition by FoxO forkhead transcription factors involves downregulation of cyclin D. *Mol. Cell. Biol.* 22 : 7842—7852.
- Sheaff R., Groudine M., Gordon M., Roberts J., Clurman B. 1997. Cyclin E—CDK2 is a regulator of p27<sup>Kip1</sup>. *Genes Develop.* 11 : 1464—1478.
- Sherr C. J., Roberts J. M. 1999. CDK inhibitors : positive and negative regulators of G<sub>1</sub>-phase progression. *Genes Develop.* 13 : 1501—1512.
- Stevens C., La Thangue N. B. 2003. A new role for E2F-1 in checkpoint control. *Cell Cycle*. 2 : 435—437.

Поступила 24 V 2005

#### THE ROLE OF DIFFERENT KINASE PATHWAYS OF SIGNAL TRANSDUCTION IN PROLIFERATION OF E1A + Ras TRANSFORMANTS

M. V. Abramova,<sup>1</sup> S. B. Svetlikova, V. V. Grinkevich, V. A. Pospelov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;  
<sup>1</sup>e-mail: mav@mail.cytspb.rssi.ru

In this paper we have explored the role of different kinase pathways of signal transduction in proliferation control of E1A + Ras transformants, using specific inhibitors of MAP-kinases ERK, JNK, p38 and PI3-kinase. According to our data, suppression of signalling cascades driven by RI3K only arrested proliferation of E1A + Ras cells, while suppression of either MAP-kinase did not lead to noticeable antiproliferative effect. We have shown that suppression of RI3K with LY294002 gave rise to accumulation of cyclin-dependent kinase inhibitor p27<sup>Kip1</sup> but not p21<sup>Waf1</sup>. Accumulation of p27<sup>Kip1</sup> in LY294002-treated E1A + Ras cells was accompanied by a decrease in Cyclin E—Cdk2 and Cyclin A—Cdk2 activity, which caused diminution of Rb phosphorylation and strengthening of E2F—Rb binding. Binding of E2F with hypophosphorylated Rb resulted in inhibition of E2F activity and reduction of E2F-regulated gene transcription, these genes being necessary for S-phase entry and DNA synthesis. Thus, RI3K—Akt cascade plays the key role in maintenance of autonomous proliferation of cells transformed with E1A and cHa-ras oncogenes. Inhibition of PI3K leads to p27<sup>Kip1</sup> accumulation and cell cycle arrest, consequently.