

ВЛИЯНИЕ ОНКОГЕНА *E1A* НА СПОСОБНОСТЬ ИНГИБИТОРА $p21^{Waf1}$ РЕГУЛИРОВАТЬ БЛОК G_1/S ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ В *E1A*-ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ ТРАНСФОРМАНТАХ

© В. С. Романов,¹ А. И. Бричкина, В. А. Поспелов, Т. В. Поспелова

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

Ингибитор циклин-киназных комплексов $p21^{Waf1}$ блокирует переход клетки из фазы G_1 клеточного цикла в фазу репликации ДНК после повреждения ДНК. Основными мишенями этого ингибитора являются комплексы CyclE /A-Cdk2, субъединица ДНК-полимеразы δ — белок PCNA (proliferating cell nuclear antigen) — и транскрипционный фактор E2F-1. Взаимодействие $p21^{Waf1}$ с этими мишенями в нормальных клетках является механизмом, блокирующим продвижение поврежденной клетки по циклу на стадии G_1 . При опухолевой трансформации механизм строгого контроля над целостностью ДНК, связанный с блоком клеточного цикла, часто нарушен. В настоящей работе исследованы молекулярные механизмы регуляции клеточного цикла после повреждения ДНК рентгеновским излучением у трансформантов *E1A* + *E1B-19kDa*, способных останавливаться на границе фаз G_1/S , и трансформантов *E1A* + *cHa-ras*, не обладающих такой способностью. Показано, что ингибитор циклинзависимых киназ $p21^{Waf1}$, несмотря на его взаимодействие с онкопродуктами *E1A* раннего района аденовируса, способен формировать комплексы с циклинами и киназами, белком PCNA и транскрипционным фактором E2F-1 в обоих типах трансформантов. После повреждения ДНК облучением взаимодействие ингибитора в составе циклин-киназных комплексов с онкопродуктами *E1A*, по-видимому, является причиной конститутивного активационного фосфорилирования киназы Cdk2 по Thr-160. Таким образом, отсутствие блока G_1/S в трансформантах *E1A* + *cHa-ras* и его реализация в трансформантах *E1A* + *E1B-19kDa* после облучения не связаны с тем, что ингибитор $p21^{Waf1}$ по-разному взаимодействует с основными регуляторами перехода клеток из фазы G_1 в фазу репликации ДНК. По-видимому, в трансформантах переход $G_1 \rightarrow S$ осуществляется через другие, пока неидентифицированные регуляторные пути.

Ключевые слова: онкогены *E1A*, *E1B-19kDa* и *cHa-ras*, G_1/S -блок клеточного цикла, ингибитор $p21^{Waf1}$, комплексы CyclE/A-Cdk2, PCNA, транскрипционный фактор E2F-1.

Принятые сокращения: БСА — бычий сывороточный альбумин, САК — Cdk activating kinase (Cdk-активирующая киназа), СВР — CREB-binding protein, Cdk — cyclin-dependent kinase (циклинзависимая киназа), Cycl — cyclin (циклин), PBS — фосфатно-солевой буферный раствор, PCNA — proliferating cell nuclear antigen.

Ингибитор циклин-киназных комплексов $p21^{Waf1}$ является одним из основных регуляторов перехода клетки из фазы G_1 клеточного цикла в фазу репликации ДНК. При повреждении ДНК, в частности рентгеновским излучением, происходят $p53$ -зависимое повышение экспрессии гена $p21^{Waf1}$ и накопление его продукта на белковом уровне. Следствием накопления $p21^{Waf1}$ является инактивация основных его мишеней — циклин-киназных комплексов CyclE/A-Cdk2 (Bartek, Lukas, 2001). Активность этих комплексов может контролироваться содержанием циклинов и киназ, формированием циклин-киназных комплексов, действием ингибиторов циклин-киназных комплексов ($p21^{Waf1}$), а также фосфорилированием Cdk в составе циклин-киназных комплексов по Thr-160 САК-киназой (активационное фосфорилирование) и(или) дефосфорилированием Cdk по Thr-14 и Tyr-15 фосфатазой Cdc25A (активационное дефосфорилирование) (Lees, 1995; Swanton, 2004).

Кроме подавления активности комплексов CyclE/A-Cdk2 белок $p21^{Waf1}$ способен регулировать клеточный цикл путем инактивации позитивных регуляторов клеточного цикла, с которыми он образует комплексы, таких как субъединица ДНК-полимеразы δ — белок PCNA — и транскрипционный фактор E2F-1, контролирующий транскрипцию генов в S-фазе (Delavaine, La Thangue, 1999; Dotto, 2000). Таким образом, ингибитор $p21^{Waf1}$ осуществляет комплексную регуляцию событий клеточного цикла, влияя на пролиферацию клетки как на уровне циклин-киназных комплексов, так и непосредственно на уровне репликации ДНК за счет взаимодействия с PCNA и регулятором генов в S-фазе транскрипционным фактором E2F-1.

Молекулярные механизмы трансформации клетки онкопродуктами *E1A* раннего района аденовируса человека связаны с инактивацией негативных регуляторов клеточного цикла, таких как опухолевые супрессоры се-

мейства ретинобластомы (pRb, p107 и p130) и коактиваторы транскрипции p300 и CBP (Bayley, Mymryk, 1994). Ранее нами и рядом других авторов (Bulavin et al., 1999; Keblusek et al., 1999; Chattopadhyay et al., 2001) было показано, что E1A способен взаимодействовать с ингибиторами циклин-зависимых киназ p21^{Waf1} и предположительно инактивировать его. Позднее мы обнаружили, что, несмотря на взаимодействие p21^{Waf1} с онкобелками E1A, трансформанты E1A + E1B-19кДа в отличие от E1A + cHa-ras после повреждения ДНК облучением способны кратковременно останавливаться на границе фаз G₁/S (Bulavin et al., 1999; Булавин и др., 2002; Бричкина и др., 2003). При этом блок G₁/S сопровождается избирательным кратковременным падением циклин E-ассоциированной киназной активности (Булавин и др., 2002).

Задачей настоящего исследования являлась оценка способности ингибитора p21^{Waf1} взаимодействовать в E1A-трансформантах со своими мишенями — циклинами, циклинзависимыми киназами, белком PCNA и транскрипционным фактором E2F-1, инактивация которых вносит вклад в остановку клеток на границе фаз G₁/S после повреждения ДНК облучением. Кроме того, была исследована доступность Cdk2, находящейся в комплексах с циклинами A/E и ингибитором p21^{Waf1}, для активационного фосфорилирования по Thr-160 САК-киназами.

Материал и методика

Культивирование клеток. В работе использованы клеточные линии, полученные из эмбриональных фибробластов крысы (REF) путем переноса онкогенов (Попелова, 1988). Для трансформации использованы ранний район аденовируса 5-го типа человека (E1Aad5) в комплементации с онкогеном cHa-ras (мутации в положениях 12 и 61, линия E1A + cHa-ras), а также район HindIII аденовируса, кодирующий белки E1A и E1B-19кДа (линия E1A + E1B-19кДа). Для изучения действия радиации клетки подвергали рентгеновскому облучению в дозе 6 Гр.

Иммуноблотинг. Для приготовления тотальных клеточных лизатов клетки на чашках Петри лизировали в буфере RIPA, содержащем 10 мМ Трис-НСl (рН 7.4), 150 мМ NaCl, 1 % Triton X-100, 0.5 % Nonidet P-40, ингибиторы протеаз и фосфатаз (коктейль ингибиторов протеаз; Boehringer Mannheim, Германия), 50 мМ NaF, 12.5 мМ β-глициральдегида, 10 мкг/мл пепстатина и по 1 мМ дитиотреитола, ортованада натрия и фенилдиметилсульфонилфторида. Лизаты центрифугировали и измеряли концентрацию белка методом Брэдфорд (Bradford, 1976). Для разделения белков применяли метод электрофореза в модификации Лэммли (Laemmli, 1970). Электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану проводили в камере для полусухого переноса (Hoefer TE70; Amersham Biosciences, Швеция) с использованием буфера, содержащего 48 мМ Триса, 39 мМ глицина и 10 % метанола. Мембрану с иммобилизованными белками инкубировали в 5%-ном растворе БСА в течение 1 ч, а затем инкубировали в течение 12 ч с первыми антителами, разведенными в буфере PBS-Т, содержащем 1 % БСА. После инкубации с первыми антителами мембрану инкубировали в течение 1 ч в растворе вторых антител, конъюгированных с пероксидазой хрена. Вторые антитела разводили в PBS-Т, содержащем 1 % БСА. Выявление пероксидазной активности проводили методом усиленной хемилуминесценции.

Иммунопреципитация. Для иммунопреципитации использовали пробы, содержащие от 1000 до 2000 мкг белка тотальных клеточных лизатов и 4-5 мкл антител со стандартной концентрацией 200 мкг/мл. Пробы клеточных лизатов инкубировали с антителами в течение ночи при 4 °С при постоянном перемешивании на шейкере. Для осаждения белковых комплексов в пробы добавляли 25 мкл 50%-ной суспензии протеин-А сепарозы (Amersham Biosciences, Швеция), инкубировали в течение 1.5 ч при 4 °С и образовавшиеся иммунные комплексы осаждали центрифугированием. Осадок ресуспендировали в растворе RIPA с добавлением 4-кратного буфера Лэммли и кипятили в течение 3 мин. Полученные пробы использовали для электрофореза с последующим выявлением копреципитированных белков методом иммуноблотинга.

Киназную активность *in vitro*, ассоциированную с p21^{Waf1}, оценивали по уровню фосфорилирования одного из субстратов Cdk2 — гистона H1. Киназные белковые комплексы получали стандартным методом иммунопреципитации, используя p21^{Waf1}-специфические антитела. Осажденные иммунные комплексы дважды промывали лизирующим буфером RIPA, затем киназным буфером, содержащим 20 мМ HEPES, рН 7.9, 10 мМ MgCl₂ и 1 мМ MnCl₂, и инкубировали в реакционной смеси (20 мМ HEPES, рН 7.9, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ MnCl₂, 1 мМ DTT, 25 мкМ АТФ, 92.5 МБк γ-³²P, 2 мкг гистона H1 и 10 % глицирина) в течение 30 мин при 30 °С. В пробы добавляли 4-кратный буфер Лэммли и кипятили в течение 5 мин. Электрофоретическое разделение белков проводили в 12%-ном полиакриламидном геле, фиксировали и высушивали гель, затем регистрировали излучение, используя рентгеновскую пленку Konica.

Антитела. В работе использовали кроличьи поликлональные антитела против белков CyclE и CyclA (Santa Cruz Biotechnology, США), фосфорилированные по Thr-160 формы Cdk2 (pCdk2; Cell Signaling Technology, США), моноклональные мышинные антитела против белков Cdk2, E2F-1 (BD Biosciences, США), p21^{Waf1} и PCNA (Santa Cruz Biotechnology, США). В качестве вторых антител для выявления поликлональных антител использовали антитела козы, полученные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена в разведении 1 : 10 000. В качестве вторых антител для моноклональных антител использовали антитела кролика, полученные против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена в разведении 1 : 2000.

Результаты

В соответствии с общепринятой моделью регуляции событий клеточного цикла блок G₁/S после облучения связан с падением активности циклин-киназных комплексов, вызванным действием ингибитора циклин-киназных комплексов p21^{Waf1}. В связи с этим мы сравнили содержания белка p21^{Waf1}, а также циклинов E и A и циклинзависимой киназы Cdk2 в трансформантах, различающихся по способности реализовать блок на границе G₁/S, после облучения. На рис. 1, а представлены результаты иммуноблотинга с использованием антител против белков, регулирующих переход клеток из фазы G₁ в S (CyclE, CyclA, Cdk2 и p21^{Waf1}). Видно, что содержание киназы Cdk2 и циклинов E и A после облучения остается неизменным как в трансформантах E1A + E1B-19кДа,

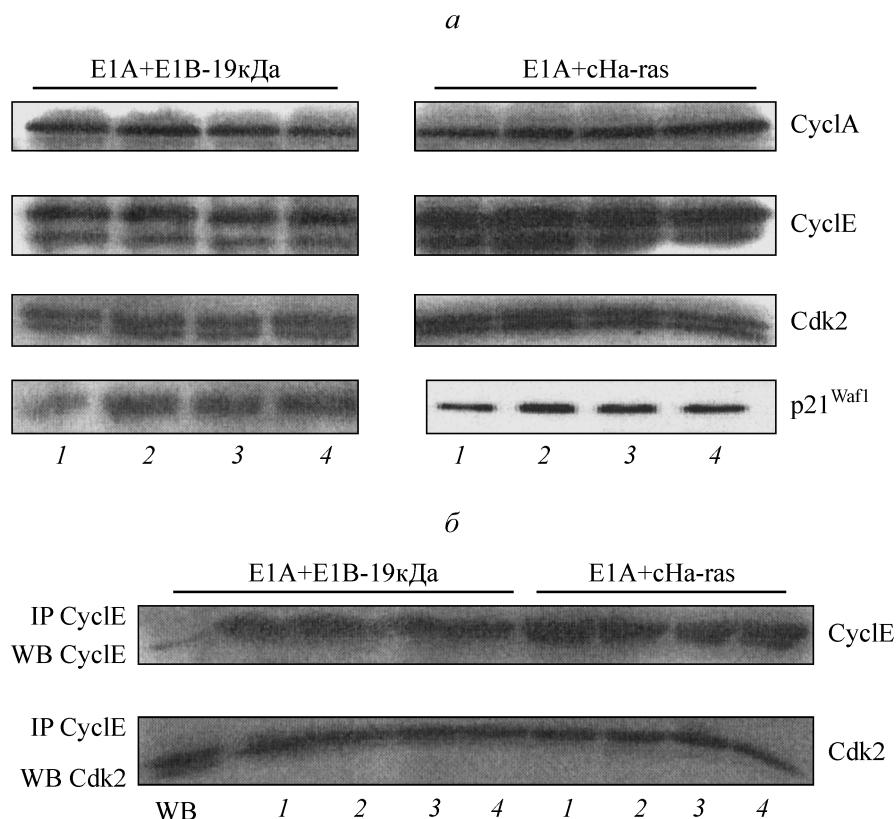


Рис. 1. Содержание белков-регуляторов клеточного цикла CyclA, CyclE, Cdk2 и p21^{Waf1} (а) и взаимодействие белков CyclE и Cdk2 (б) в клетках линий E1A + E1B-19kDa и E1A + cHa-ras после облучения.

а — иммуноблоттинг с использованием антител против CyclA, CyclE, Cdk2 и p21^{Waf1}; б — иммунопреципитация (IP) антителами против CyclE с последующим выявлением на иммуноблоте (WB) Cdk2. Дорожки: 1 — контроль; 2–4 — клетки через 4, 18 и 24 ч после облучения соответственно.

Fig. 1. Content of cell cycle regulators CyclA, CyclE, Cdk2 and p21^{Waf1} (а) and interaction of CyclE with Cdk2 (б) in E1A + E1B-19kDa and E1A + cHa-ras transformants after irradiation.

а — Western blot analysis using CyclA, CyclE, Cdk2 and p21^{Waf1} antibodies; б — immunoprecipitation (IP) with antibody against CyclE followed by measuring amounts of Cdk2 in the CyclE-Cdk2 complexes by Western blot analysis (WB). Lanes: 1 — control cells; 2–4 — cells 4, 18 and 24 h after irradiation.

так и в E1A + cHa-ras. На этом же рисунке видна одинаковая динамика накопления белка p21^{Waf1} после облучения в клетках обеих линий, различающихся между собой по способности останавливаться в клеточном цикле после облучения.

Поскольку динамика содержания белков-регуляторов перехода G₁ → S после облучения сходна в обеих трансформированных линиях, тогда как активность циклинзависимых киназ, как было показано ранее, меняется по-разному (Bulavin et al., 1999; Булавин и др., 2002), мы провели сравнительный анализ формирования комплексов циклинов А и Е с Cdk2, а также с ингибитором p21^{Waf1}. На рис. 1, б представлены результаты иммунопреципитации, показывающие взаимодействие белков CyclE с их непосредственным субстратом Cdk2. Видно, что после повреждения ДНК облучением количество циклин-киназных комплексов в трансформантах не меняется. Аналогичные результаты получены и для комплексов CyclA-Cdk2 (результаты не представлены).

Как известно, сайты взаимодействия ингибитора p21^{Waf1} с циклинами, киназами и онкопродуктами E1A картированы, показано, что все они располагаются в N-концевом районе p21^{Waf1} (Russo et al., 1996). Было высказано предположение о том, что образование комплексов p21^{Waf1} с E1A может служить причиной нарушения взаимодействия ингибитора с циклинами и киназами, не-

обходимого для ингибирующего действия p21^{Waf1} (Lees, 1995). На рис. 2, а можно видеть, что, несмотря на физическое взаимодействие ингибитора с E1A in vivo (Bulavin et al., 1999; Булавин и др., 2002), p21^{Waf1} способен формировать комплексы как с CyclE и CyclA, так и с киназой Cdk 2. Таким образом, подавление активности CyclE-Cdk2 в трансформантах E1A + E1B-19kDa и отсутствие ее подавления в трансформантах E1A + cHa-ras, по-видимому, нельзя объяснить утратой способности p21^{Waf1} в комплексе с онкобелком E1A взаимодействовать с циклинами и киназами.

Поскольку взаимодействие p21^{Waf1} с E1A не влияет на способность ингибитора взаимодействовать с циклин-киназными комплексами, мы предположили, что образование комплексов p21^{Waf1}-E1A в данных трансформантах может различным образом влиять на активационное фосфорилирование Cdk2 по Thr-160, определяющее ее активность. Анализ уровня активационного фосфорилирования Cdk2 по Thr-160 в комплексах CyclE-Cdk2 и CyclA-Cdk2 не выявил изменений в содержании фосфорилированной формы Cdk2 у трансформантов E1A + E1B-19kDa и E1A + cHa-ras после облучения (рис. 3). Следует подчеркнуть, что, несмотря на взаимодействие p21^{Waf1} с циклинами и киназами, Thr-160 Cdk2 присутствовал в комплексах в фосфорилированном состоянии как в контроле, так и после облучения. При этом активность

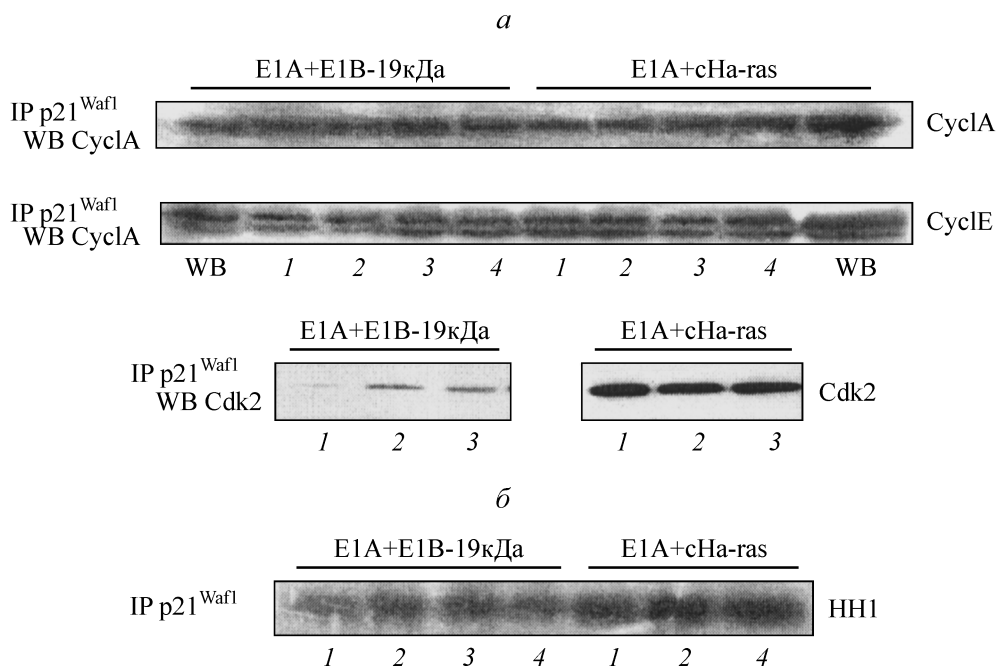


Рис. 2. Взаимодействие ингибитора циклин-киназных комплексов p21^{Waf1} с CyclE, CyclA и Cdk2 (а) и уровень киназной активности, ассоциированной с p21^{Waf1} (б), в трансформантах E1A + E1B-19кДа и E1A + cHa-ras после облучения.

Клеточные лизаты преципитировали (IP) антителами против p21^{Waf1}, затем на иммуноблоте (WB) выявляли белки CyclE, CyclA и Cdk2 (а) или преципитированные комплексы использовали в реакции фосфорилирования *in vitro* гистона H1 (HH1; б). Дорожки: 1 — контроль; 2—4 — клетки через 4, 18 и 24 ч после облучения соответственно.

Fig. 2. Interaction of p21^{Waf1} cyclin-dependent kinase inhibitor with CyclE, CyclA and Cdk2 (а) and p21^{Waf1}-associated kinase activity (б) in E1A + E1B-19kDa and E1A + cHa-ras transformants after irradiation.

а — cell lysates were immunoprecipitated (IP) with antibody against p21^{Waf1} followed by measuring amounts of CyclE, CyclA and Cdk2 in the p21^{Waf1} complexes by Western blot analysis (WB); б — p21^{Waf1}-associated kinase activities were measured using histone H1 as a substrate. Lanes: 1 — control cells; 2—4 — cells 4, 18 and 24 h after irradiation.

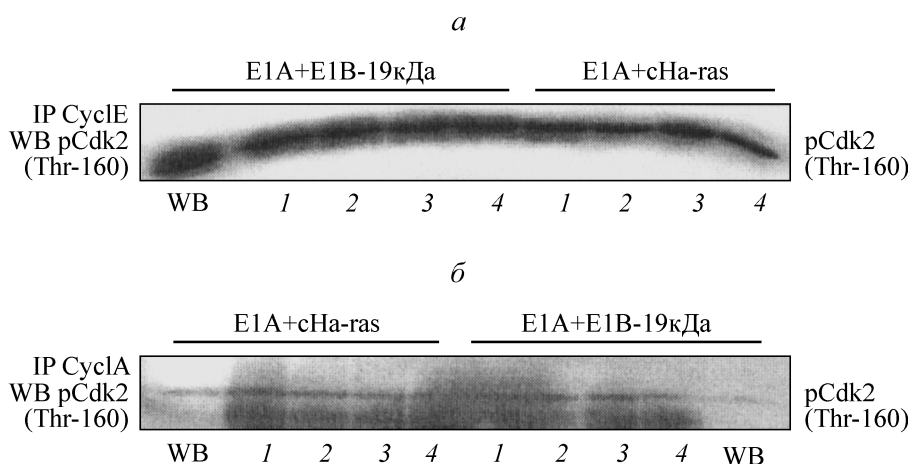


Рис. 3. Активационное фосфорилирование киназы Cdk2 по Thr-160 в трансформантах E1A + E1B-19кДа и E1A + cHa-ras после облучения в комплексах CyclE-Cdk2 (а) и в комплексах CyclA-Cdk2 (б).

Клеточные лизаты преципитировали (IP) антителами против CyclE (а) или CyclA (б), на иммуноблоте (WB) выявляли белки pCdk2 (Thr-160). Дорожки: 1 — контроль; 2—4 — клетки через 4, 18 и 24 ч после облучения соответственно.

Fig. 3. Activating phosphorylation of Cdk2 at Thr-160 in E1A + E1B-19kDa and E1A + cHa-ras transformants after irradiation in CyclE-Cdk2 complexes (а) and in CyclA-Cdk2 complexes (б).

Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with antibody against CyclE (а) or CyclA (б) and amounts of pCdk2 (Thr-160) in the complexes with CyclA/E were measured by Western blot analysis (WB). Lanes: 1 — control cells; 2—4 — cells 4, 18 and 24 h after irradiation.

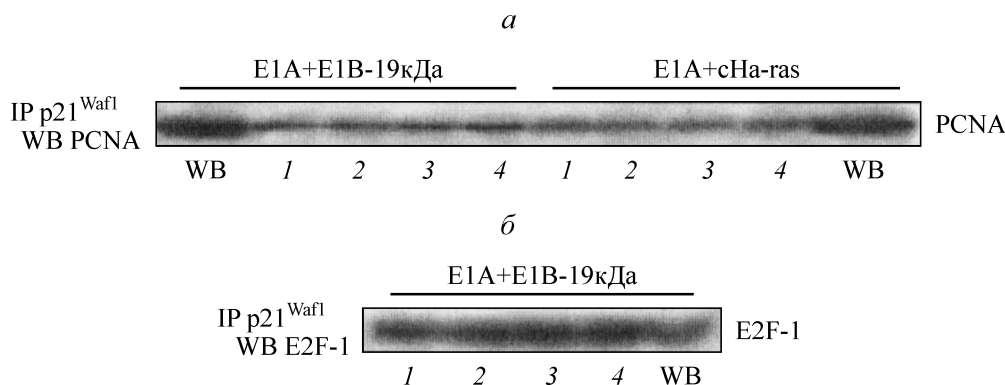


Рис. 4. Взаимодействие ингибитора циклин-киназных комплексов $p21^{Waf1}$ с белками PCNA (а) и E2F-1 (б) в трансформантах E1A + E1B-19кДа и E1A + cHa-ras после облучения.

Клеточные лизаты преципитировали (IP) антителами против белка $p21^{Waf1}$, на иммуноблоте (WB) выявляли белки PCNA или E2F-1. Дорожки: 1 — контроль; 2—4 — клетки через 4, 18 и 24 ч после облучения соответственно.

Fig. 4. Interaction of $p21^{Waf1}$ cyclin-dependent kinase inhibitor with PCNA (a) and E2F-1 (б) proteins in E1A + E1B-19kDa and E1A + cHa-ras transformants after irradiation.

Cell lysates were immunoprecipitated (IP) with antibody against $p21^{Waf1}$, and amounts of PCNA (a) and E2F-1 (б) in the complexes with $p21^{Waf1}$ were measured by Western blot analysis (WB). Lanes: 1 — control cells; 2—4 — cells in 4, 18 and 24 h after irradiation.

киназ, ассоциированных с $p21^{Waf1}$, не только не падала по сравнению с необлученными клетками, но даже увеличивалась (рис. 2, б). Наиболее вероятно, что этот факт связан с накоплением ингибитора после облучения (рис. 1, а) при полной его функциональной инактивации.

Другой путь регуляции событий клеточного цикла, осуществляющийся ингибитором циклин-киназных комплексов $p21^{Waf1}$, связан с прямым подавлением репликации ДНК за счет взаимодействия ингибитора с белком PCNA — субъединицей ДНК-полимеразы δ , участвующей в синтезе ДНК. Для многих клеточных линий показано, что взаимодействие $p21^{Waf1}$ с PCNA ведет к ингибированию репликации ДНК (Dotto, 2000). Поэтому причиной кратковременного блока G_1/S клеточного цикла в трансформантах E1A + E1B-19кДа после облучения могло бы быть взаимодействие $p21^{Waf1}$ с субъединицей полимеразы PCNA.

На рис. 4, а представлены результаты иммунопреципитации, показывающие взаимодействие $p21^{Waf1}$ с PCNA. По всей видимости, ассоциация онкопродуктов E1A с $p21^{Waf1}$ не влияет на его способность формировать комплексы с субъединицей ДНК-полимеразы (белком PCNA) как в контроле, так и после облучения в трансформантах обеих линий. При этом содержание комплексов $p21^{Waf1}$ — PCNA в клетках линии E1A + E1B-19кДа не меняется после повреждения ДНК облучением, что говорит о работе других регуляторных механизмов, осуществляющих блок G_1/S клеточного цикла в этих трансформантах.

Кроме циклинов, киназ и PCNA ингибитор циклин-киназных комплексов $p21^{Waf1}$ способен подавлять активность транскрипционного фактора E2F-1, влияющего на экспрессию большого числа генов S-фазы, участвующих в репликации (Delavaïne, La Thangue, 1999). Мы предположили, что вовлечение E2F-1 в комплексы с ингибитором может уменьшать пул транскрипционно активного E2F-1 и, таким образом, приводить к остановке пролиферации в результате неспособности клеток осуществлять процесс репликации. Однако оказалось, что количество комплексов $p21^{Waf1}$ — E2F-1 в трансформантах E1A + E1B-19кДа не изменяется с течением вре-

мени после облучения (рис. 4, б), а кратковременный G_1/S -блок в этих клетках, по-видимому, не связан с избирательным секвестрированием и инактивацией транскрипционного фактора E2F-1 белком $p21^{Waf1}$.

Обсуждение

Ответом нормальной клетки на повреждающие воздействия является остановка клеточного цикла в так называемых контрольных, или сверхочных, точках. Ключевыми регуляторами, отвечающими за остановку клеточного цикла в сверхочных точках фаз G_1 и G_2 , являются ингибиторы циклинзависимых киназ (Lees, 1995). Особенностью ингибиторов, в частности белка $p21^{Waf1}$, является их способность активироваться в ответ на сигналы, подавляющие пролиферацию: контактным ингибированием, терминальной дифференцировкой и старением клетки, антипролиферативными цитокинами, повреждением ДНК (Dotto, 2000; Тимофеев и др., 2004).

Для реализации ингибирующей функции $p21^{Waf1}$ необходимо сохранение в интактном состоянии двух циклинсвязывающих сайтов: высокоаффинного (аминокислоты 17—24) и низкоаффинного (аминокислоты 152—158). Как было продемонстрировано в экспериментах *in vitro*, удаление любого из них при сохранении сайта взаимодействия с Cdk2 приводит к значительному снижению эффективности ингибирования циклин-киназных комплексов (Chen et al., 1996). Удаление из $p21^{Waf1}$ аминокислотного фрагмента 53—58, ответственного за взаимодействие с Cdk2, не препятствовало связыванию ингибитора как с циклином, так и с циклин-киназным комплексом, однако значительно снижало ингибирующую способность $p21^{Waf1}$ (Chen et al., 1996).

Молекулярные механизмы трансформации клеток аденовирусными онкогенами типа E1A связаны с инактивацией негативных регуляторов клеточного цикла, подавляющих опухолеобразование. К их числу относятся белки семейства pRb, коактиваторы транскрипции типа p300/CBP, а также ингибиторы циклинзависимых киназ ($p21^{Waf1}$ и $p27^{Kip1}$), блокирующие в нормальных клетках

прохождение по циклу после повреждения ДНК (Bailey, Mymryk, 1994; Nomura et al., 1998; Keblusek et al., 1999). Ранее нами одновременно с другими авторами (Keblusek et al., 1999) было показано, что ингибитор циклин-киназных комплексов p21^{Waf1} ассоциирован с онкобелком E1A *in vivo* в стабильно трансформированных линиях, экспрессирующих большое количество онкопродуктов E1A (Bulavin et al., 1999). Временная трансфекция онкогена E1A в клетки, обработанные доксирубицином, приводит к снижению способности ингибитора p21^{Waf1} образовывать комплексы с Cdk2, что и является причиной повышения активности комплексов CyclE-Cdk2 и преодоления блока G₁/S после действия цитостатика доксирубицина (Chattopadhyay et al., 2001). При этом, по-видимому, не происходит конкуренции между E1A и комплексами CyclE-Cdk2 за связывание p21^{Waf1}, так как сайты связывания p21^{Waf1} с циклинами и циклин-зависимыми киназами не перекрываются с E1A-связывающим сайтом p21^{Waf1} (Mal et al., 2000).

В нашей работе мы показали, что ингибитор одинаково эффективно взаимодействует с киназами Cdk2 и циклинами E и A как в трансформантах E1A + E1B-19кДа с сохраненной способностью регулировать активность комплексов CyclE-Cdk2, так и в трансформантах E1A + cHa-ras, потерявших эту способность. Эти данные говорят в пользу того, что подавление активности комплексов CyclE-Cdk2 у трансформантов E1A + E1B-19кДа после облучения не связано со снижением способности ингибитора образовывать комплексы с киназой Cdk2 в присутствии E1A, как это было показано ранее (Chattopadhyay et al., 2001). Так как p21^{Waf1} подавляет активность комплексов циклин A/E-Cd2, по крайней мере двумя механизмами — блокированием АТР-связывающего сайта киназы или за счет связывания области распознавания субстрата циклин-киназным комплексом (Тимофеев и др., 2004), — можно предположить, что в клетках различных типов или при действии разных повреждающих агентов становится доминирующим один из этих двух механизмов задержки перехода клеток из фазы G₁ в фазу S. Первый механизм реализуется с участием N-концевого фрагмента p21^{Waf1} и приводит к практически полной инактивации киназы, однако, согласно нашим данным, ингибитор p21^{Waf1}, взаимодействуя с циклин-киназными комплексами, не подавляет их активность в обеих изученных линиях E1A-экспрессирующих трансформантов. В пользу этого говорят данные о постоянной ассоциации с p21^{Waf1} высокой киназной активности, выявляемой по фосфорилированию гистона H1, в трансформантах с регулируемой (E1A + E1B-19кДа) и нерегулируемой (E1A + cHa-ras) активностью комплекса CyclE-Cdk2.

За осуществление второго механизма инактивации циклин-киназных комплексов отвечает С-концевая часть p21^{Waf1} (149—160), причем в этом случае имеет место специфическое ингибирование киназной активности по отношению к основному субстрату — pRb, но не гистону H1 (Zheleva et al., 2002). Однако, по нашим данным, характер фосфорилирования pRb также существенно не меняется в трансформантах E1A + E1B-19кДа при G₁/S-блоке после облучения (результаты не представлены). Интересно, что С-концевой фрагмент p21^{Waf1} способен специфически подавлять киназную активность комплексов CyclA/E-Cdk2 и CyclD1-Cdk4 по отношению к pRb, но этого не происходит, если в качестве субстрата используется гистон H1 (Zheleva et al., 2002). Примени-

тельно к трансформантам наших линий этот факт нуждается в экспериментальной проверке, так как позволил бы более детально охарактеризовать роль взаимодействия E1A-p21^{Waf1} в регуляции фосфорилирования белков-субстратов циклинзависимых киназ.

Другой способ подавления пролиферации с участием ингибитора p21^{Waf1} связан с его непосредственным влиянием на процесс репликации. Известно, что PCNA является фактором процессивности ДНК-полимераза δ и участвует как в репликации, так и в репарации ДНК. Ингибитор p21^{Waf1} был описан как белок, взаимодействующий с PCNA и подавляющий его репликативную активность (Luo et al., 1995). Связывание p21^{Waf1} с PCNA не влияет на взаимодействие ингибитора с циклин-киназными комплексами, что показано и в нашем исследовании. Способность С-концевой части p21^{Waf1} взаимодействовать с PCNA и вызывать ингибирование синтеза ДНК независимо от его доменов связывания с циклин-киназными комплексами была продемонстрирована в экспериментах *in vitro* и *in vivo* (Waga et al., 1994; Cayrol et al., 1998). Кроме того, было обнаружено, что значительная часть клеточного пула p21^{Waf1} присутствует в комплексах с циклинами и Cdk2 будучи в PCNA-связанном состоянии (Zhang et al., 1993). Мы получили данные, которые говорят о том, что и в связанном с E1A состоянии ингибитор p21^{Waf1} способен образовывать комплексы с белком PCNA, однако присутствие онкопродуктов E1A приводит к подавлению ингибирующей активности p21^{Waf1} и в отношении процесса репликации.

Известно, что p21^{Waf1} способен участвовать в регуляции клеточного цикла путем подавления репликации генов, вовлеченных в прохождение клеток через S-фазу, благодаря инактивации транскрипционного фактора E2F-1 (Delavaine, La Thangue, 1999). На клетках U2OS было показано, что повышенная экспрессия p21^{Waf1} подавляет активность E2F-1 pRb-независимым способом. При этом p21^{Waf1} способен взаимодействовать *in vitro* с транскрипционным фактором E2F-1 N-терминальным концом (Delavaine, La Thangue, 1999). В связи со снижением доли S-фазных клеток после повреждения ДНК в трансформантах E1A + E1B-19кДа был проведен анализ накопления комплексов p21^{Waf1}-E2F-1 в этих клетках. Отсутствие повышения содержания данных комплексов после облучения не позволяет говорить о секвестрировании и прямой инактивации транскрипционного фактора E2F-1 ингибитором p21^{Waf1}.

Реализация временного блока на границе G₁/S в трансформантах E1A + E1B-19кДа после облучения может быть связана со снижением циклин E-ассоциированной киназной активности p21^{Waf1}-независимым способом. Если допустить, что в трансформантах обоих типов ингибитор не функционирует, то снижение активности циклин-киназных комплексов CyclE-Cdk2 в трансформантах E1A + E1B-19кДа может быть следствием изменения уровня активационного фосфорилирования Cdk2, уже находящейся в комплексе с циклином E. Показано, что даже в тех случаях, когда комплекс Cycl-Cdk сформирован, киназа остается неактивной до тех пор, пока она не будет фосфорилирована по Thr-160 САК-киназами (Lees, 1995; Swanton, 2004). При этом для фосфорилирования Cdk2 киназой САК необходима активация каскада Raf-MEK-ERK (Lents et al., 2002), который, таким образом, осуществляет p21^{Waf1}-независимую регуляцию фосфорилирования Cdk2 по Thr-160. Анализ содержания Cdk2, фосфорилированной по Thr-160 в комплек-

сах CyclE-Cdk2, а также CyclA-Cdk2, не выявил изменений в уровне фосфорилирования Cdk2 после облучения в трансформантах E1A + E1B-19кДа и E1A + cHa-ras.

Подводя итог, можно заключить, что взаимодействие p21^{Waf1} с E1A не влияет на взаимодействие ингибитора с такими мишенями, как циклин-киназные комплексы, PCNA и E2F-1, однако ингибирования их функции при этом не происходит. По-видимому, в трансформантах E1A + E1B-19кДа задержка клеточного цикла на границе фаз G₁/S после повреждения ДНК облучением связана с работой других, пока неизвестных механизмов, осуществляющих G₁/S-блок клеточного цикла в присутствии онкопродуктов E1A раннего района аденовируса.

Авторы благодарят Т. В. Быкову и А. А. Бардина за ценные замечания и стилистические правки при прочтении статьи.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 01-04-49422, 03-04-49377 и 04-04-49766) и гранта CRDF (RB1-2511-ST-03).

Список литературы

Бричкина А. И., Аксенов Н. Д., Поспелов В. А., Поспелова Т. В. 2003. Анализ механизмов реализации кратковременного блока G₁/S в трансформантах E1A + E1B-19кДа после облучения. Цитология. 45 (12) : 1203—1210.

Булавин Д. В., Тарарова Н. Д., Бричкина А. И., Аксенов Н. Д., Поспелов В. А., Поспелова Т. В. 2002. Перенос онкогена E1A и E1B-19 кДа в эмбриональные фибробласты крысы не отменяет способности клеток останавливаться в клеточном цикле после γ -облучения. Молекуляр. биол. 36 (1) : 58—65.

Поспелова Т. В. 1988. Трансформация нормальных клеток онкогенными последовательностями ДНК. В кн.: Методы культивирования клеток. Л.: Наука. 221—231.

Тимофеев О. В., Поспелова Т. В., Поспелов В. А. 2004. Функции p21^{Waf1} в норме и при стрессовых воздействиях. Молекуляр. биол. 38 (3) : 371—385.

Bartek J., Lukas J. 2001. Pathways governing G₁/S transition and their response to DNA damage. FEBS Lett. 490 : 117—122.

Bayley S., Mymryk J. 1994. Adenovirus E1A proteins and transformation. Int. J. Oncol. 5 : 425—444.

Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 72 : 248—254.

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 + cHa-ras transformed cells after gamma-irradiation. Oncogene. 18 : 5611—5619.

Cayrol C., Knibiehler M., Ducommun B. 1998. p21 binding to PCNA causes G₁ and G₂ cell cycle arrest in p53-deficient cells. Oncogene. 16 : 311—320.

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.

Chen J., Saha P., Kornbluth S., Dynlacht B. D., Dutta A. 1996. Cyclin-binding motifs are essential for the function of p21CIP1. Mol. Cell. Biol. 16 : 4673—4682.

Delavaine L., La Thangue N. B. 1999. Control of E2F activity by p21Waf1/Cip1. Oncogene. 18 : 5381—5392.

Dotto G. P. 2000. P21Waf1/Cip1: more than a break to the cell cycle? Biochim. biophys. acta. 1471 : 43—56.

Keblusek P., Dorsman J. C., Teunisse A. F., Teunissen H., van der Eb A. J., Zantema A. 1999. The adenoviral E1A oncoproteins interfere with the growth-inhibiting effect of the cdk-inhibitor p21(CIP1/WAF1). J. Gen. Virol. 80 : 381—390.

Laemmli V. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.

Lees E. 1995. Cyclin dependent kinase regulation. Curr. Opin. Cell Biol. 7 : 773—780.

Lents N. H., Keenan S. M., Bellone C., Baldassare J. J. 2002. Stimulation of the Raf/MEK/ERK cascade is necessary and sufficient for activation and Thr-160 phosphorylation of a nuclear-targeted CDK2. J. Biol. Chem. 277 : 47 469—47 475.

Luo Y., Nurwitz J., Massague J. 1995. Cell-cycle inhibition by independent CDK and PCNA binding domains in p21Cip1. Nature. 375 : 159—161.

Mal A., Chattopadhyay D., Ghosh M. K., Poon R. Y., Hunter T., Harter M. L. 2000. p21 and retinoblastoma protein control the absence of DNA replication in terminally differentiated muscle cells. J. Cell Biol. 149 : 281—292.

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.

Russo A. A., Jeffrey P. D., Patten A. K., Massague J., Pavletich N. P. 1996. Crystal structure of the p27Kip1 cyclin-dependent-kinase inhibitor bound to the cyclin A—Cdk2 complex. Nature. 382 : 325—331.

Swanton C. 2004. Cell-cycle targeted therapies. Lancet Oncol. 5 : 27—36.

Waga S., Hannon G. J., Beach D., Stillman B. 1994. The p21 inhibitor of cyclin-dependent kinases controls DNA replication by interaction with PCNA. Nature. 369 : 574—578.

Zhang H., Xiong Y., Beach D. 1993. Proliferating cell nuclear antigen and p21 are components of multiple cell cycle kinase complexes. Mol. Biol. Cell. 4 : 897—906.

Zheleva D. I., McInnes C., Gavine A. L., Zhelev N. Z., Fischer P. M., Lane D. P. 2002. Highly potent p21(WAF1)-derived peptide inhibitors of CDK-mediated pRb phosphorylation: delineation and structural insight into their interactions with cyclin A. J. Pept. Res. 60 : 257—270.

Поступила 19 V 2005

E1A ONCOGENE EFFECT ON THE ABILITY OF p21^{Waf1} TO REGULATE G₁/S ARREST IN E1A-EXPRESSING TRANSFORMANTS FOLLOWING IRRADIATION

V. S. Romanov,¹ A. I. Brichkina, V. A. Pospelov, T. V. Pospelova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
¹ e-mail: vsromanov@hotmail.com

P21^{Waf1} cyclin-dependent kinase inhibitor blocks cell cycle transition from G₁ phase into DNA replication after DNA damage. The main targets of p21^{Waf1} are CyclE—Cdk2 and CyclA—Cdk2 complexes, PCNA (proliferating cell nuclear antigen), a subunit of DNA polymerase δ , and E2F-1 transcription factor. The universal

mechanism of cell cycle arrest in normal cells is determined as p21^{Waf1} interaction with positive regulators of G₁ phase. As a rule, DNA integrity control mechanisms are destroyed in the process of oncogenic transformation, which results in proliferation of genetically defective cells. The purpose of our study was to investigate molecular mechanisms of cell cycle regulation in transformants that are able (E1A + E1B-19kDa) or unable (E1A + cHa-ras) to be arrested at G₁/S checkpoint. We have shown that p21^{Waf1} is able to form complexes with cyclins and Cdks, PCNA and E2F-1 transcription factor, although it interacts with E1A oncoproteins in both transformants. The presence of E1A bound p21^{Waf1} in cyclin-kinase complexes seems to be the cause of activating phosphorylation of Cdk2 at Thr-160 in cyclin A/E—Cdk2 complexes in both control and X-ray irradiated cells. Thus, the absence of G₁/S arrest following irradiation in E1A + cHa-ras transformants and its presence in E1A + E1B-19kDa transformants is not connected with differences in interaction of p21^{Waf1} with the main regulators of G₁-to-S transition, but is realized through other not yet identified ways.

Key words: *E1A*, *E1B-19kDa* and *cHa-ras* oncogenes, G₁/S arrest of the cell cycle, p21^{Waf1} inhibitor, CyclA/E-Cdk2 complexes, PCNA, E2F-1.