

## БУТИРАТ НАТРИЯ НЕ ИНДУЦИРУЕТ ПРОГРАММУ УСКОРЕННОГО СТАРЕНИЯ В ТРАНСФОРМАНТАХ С НОКАУТОМ ПО СТРЕСС-КИНАЗАМ JNK1,2

© С. Г. Зубова, Т. В. Быкова, Ю. Г. Зубова, В. С. Романов,  
Н. Д. Аксенов, В. А. Поспелов, Т. В. Поспелова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; электронный адрес: egretta\_jlia@mail.ru

Изучали роль стресс-киназ JNK1,2 в регуляции ускоренного старения, индуцированного в трансформированных фибробластах мышцы ингибитором гистоновых деацетилаз (HDAC) — бутиратом натрия (NaB). Было обнаружено, что NaB не способен блокировать прохождение по циклу трансформантов *E1A + cHa-ras*, селективированных из эмбриональных фибробластов мышцы с нокаутом по генам стресс-киназ *jnk1,2* (клеток mERasJNK<sup>-/-</sup>). Согласно полученным данным, даже длительная (5 сут) обработка клеток NaB не приводит к блоку клеточного цикла, подавлению пролиферации, гипертрофическим изменениям размера клеток, а также к активации маркера старения SA-β-галактозидазы. Полученные результаты говорят о вовлечении в индуцированное бутиратом старение у трансформантов мышцы *E1A + cHa-ras* (клеток mERas), стресс-киназ JNK1,2. Кроме того, эти данные свидетельствуют в пользу предполагаемых опухоль-супрессорных свойств киназ JNK1,2, поскольку в их отсутствие процесс старения, препятствующий пролиферации опухолевых клеток, реализоваться не может.

Ключевые слова: онкогены *E1A* и *cHa-ras*, трансформация, киназы JNK1,2, старение, клеточный цикл, ингибитор гистоновых деацетилаз, бутират натрия.

Принятые сокращения: HDAC — гистоновые деацетилазы, MAP-киназа — митогенактивируемая протеинкиназа, NaB — бутират натрия, SA-β-Gal — ассоциированная со старением β-галактозидаза.

Известно, что введение онкогена *cHa-ras* в первичные клетки грызунов вызывает в них блок клеточного цикла и активацию программы ускоренного старения, которая рассматривается в настоящее время как программа, супрессирующая процесс неопластической трансформации (Benanti, Galloway, 2004). Введение иммортализирующих онкогенов, в частности *E1Aad5*, одновременно с геном *cHa-Ras* приводит к онкогенной трансформации первичных клеток (Davenport, Tatarowsky, 1990). Отличительной особенностью подобного рода трансформантов является неспособность блокировать прохождение клеток по циклу удалением ростовых факторов или действием ДНК-повреждающих агентов (Булавин и др., 1998; Bulavin et al., 1999; Бричкина и др., 2001). Однако, как было показано позднее, ингибитор гистоновых деацетилаз (HDAC) — бутират натрия (NaB) — способен вызывать блок G<sub>1</sub>/S клеточного цикла трансформантов *E1A + cHa-ras*, полностью подавляя пролиферацию (Абрамова и др., 2003; Зубова и др., 2005). При этом выявляется активность основного маркера ускоренного старения — SA-β-Gal (Зубова и др., 2005).

Ингибиторы HDAC относятся к агентам с плеiotропным действием, активирующим программу ускоренного старения через разные сигнальные пути (Mikhailov et al., 2004). В частности, происходит накопление активной фосфорилированной формы стресс-киназы p38α, подавление которой специфическими ингибиторами типа SB203580 отменяет включение программы старения (Kang et al., 2005). Однако мы обнаружили, что в транс-

формантах *E1A + cHa-ras*, полученных из эмбриональных фибробластов мышцы, нокаутированных по гену стресс-киназы p38α, NaB способен вызывать необратимый блок клеточного цикла и реактивацию программы старения (Зубова и др., 2007). Это позволяет предполагать возможность существования альтернативных путей негативной регуляции прохождения клеток по циклу и активации программы старения. В частности, вероятными кандидатами на роль альтернативного регулятора можно рассматривать стресс-киназы типа JNK.

Известно, что c-Jun N-терминальная киназа (JNK) активируется киназами MKK4 и MKK7 фосфорилированием по Thr и Tyr. Киназа MKK7 активируется цитокинами, а MKK4 — различными факторами стресса (Davis, 2000). Киназы JNK1,2 и онкоген *c-Jun* регулируют пролиферацию и апоптоз в клетках многих типов. Исследования с применением бессмысловых последовательностей к JNK подтверждают версию о том, что JNK функционируют по-разному в нормальных и опухолевых клетках. В частности, показано, что JNK необходимы для реализации стрессиндуцированного апоптоза в первичных клетках почки и эндотелия человека, тогда как выключение JNK в клетках A549 карциномы легкого человека ингибирует пролиферацию опухолевых клеток (Bost et al., 1999; Garay et al., 2000; Ho et al., 2000; Potapova et al., 2000). Есть данные в пользу того, что киназы JNK могут быть необходимы для трансформации клеток (Behrens et al., 2000). Считается, что активация JNK и фосфорилирование ею транскрипционного фактора c-Jun требуются для

Ras-индуцированной трансформации фибробластов и кератиноцитов (Behrens et al., 2000).

В то же время имеются данные, свидетельствующие о опухоле-супрессорных свойствах JNK (Kennedy et al., 2003). Так, показано, что у мышей с нокаутом по генам *jnk1* и *jnk2* значительно повышается частота возникновения опухолей легкого, индуцированных канцерогенами (Winn et al., 2005), а JNK-сигнальный путь подавляет Ras-стимулированную трансформацию (Kennedy et al., 2003). Эти данные согласуются с результатами, согласно которым в опухолях человека находят мутации, подавляющие активность JNK (Yoshida et al., 2001). Важно отметить, что снижение активности JNK приводит к увеличению числа и размеров опухолей у мышей *in vivo*, что позволяет рассматривать стресс-киназы JNK в качестве супрессоров развития опухолей (Kennedy et al., 2003).

Ускоренное клеточное старение, согласно современным представлениям, считается одной из главных антиканцерогенных программ, так как может необратимо ограничивать пролиферацию клеток с нарушенной экспрессией онкогенов. Эта программа успешно работает в нормальных клетках и в клетках доброкачественных опухолей (Collado, Serrano, 2005). При опухолевой трансформации маркеры старения полностью исчезают, что говорит о необходимости подавления программы старения в процессе неопластической трансформации клетки (Collado et al., 2007).

Однако, как было неоднократно показано, в опухолевых клетках программа старения может быть успешно реактивирована различными агентами, в первую очередь ингибиторами HDAC (Абрамова и др., 2003; Roninson, 2003; Mikhailov et al., 2004; Campisi, 2005). При этом данные о роли стресс-киназ, в частности киназ JNK, в реализации процесса старения, по-прежнему противоречивы.

Целью настоящего исследования было изучение роли киназ JNK1,2 в регуляции программы старения после действия NaB на трансформанты mERasJNK<sup>-/-</sup>, полученные из эмбриональных фибробластов мыши с нокаутом по генам *jnk1,2* введением комплементирующих онкогенов *E1A* и *c-Ha-ras*.

## Материал и методика

Клеточные линии. Работа проведена на трансформантах *E1A + cHa-ras*, полученных из эмбриональных фибробластов мыши с нокаутом по генам киназ JNK1 и JNK2 (клетки mERasJNK<sup>-/-</sup>). Контролем служили трансформированные клетки, полученные из мышей дикого типа (клетки mERas). Клетки культивировали на среде Игла в модификации Дальбекко (DMEM) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота. Для изучения индукции клеточного старения в культуральную среду добавляли NaB до конечной концентрации 4 мМ. Процесс старения оценивали через определенные промежутки времени культивирования клеток в присутствии ингибитора.

Пролиферативную активность оценивали по кривым клеточного роста. Для этой цели высаживали по 30 000 клеток на чашки Петри диаметром 30 мм. Подсчет клеток проводили через 24, 48, 72 и 96 ч культивирования клеток в присутствии NaB и без него, используя для подсчета клеток 3 чашки на точку.

Подсчет времени удвоения клеток проводили по формуле:  $t = \log_2 2 \cdot T / \log_2(N/n)$ , где  $T$  — время, в течение которого проводился эксперимент,  $n$  — начальное число клеток,  $N$  — конечное число клеток.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла исследовали методом проточной цитометрии. Клетки снимали с чашек смесью растворов трипсина и версена в соотношении 1 : 1, затем осаждали 3 мин центрифугированием при 350 g и промывали фосфатно-солевым буфером (PBS). Клетки инкубировали в течение 30 мин в присутствии 0.01 % сапонина при комнатной температуре, после чего вновь промывали PBS и обрабатывали раствором РНКазы А (0.1 мг/мл) в присутствии иодида пропидия (40 мкг/мл) в течение 15 мин при 37 °С. Анализ проводили на цитометре типа Odam (Brucker, Франция). Этим же методом оценивали прямое светорассеяние (Howard, Shapiro, 1988) для определения размеров клеток. Концентрация сапонина составляла при этом 0.005 %.

Об обратимости блока клеточного цикла, вызванного действием NaB, судили по данным проточной цитометрии, сравнивая природу доли реплицирующихся клеток через 24 ч после удаления NaB из среды культивирования с долей пролиферирующих клеток перед его удалением.

Выявление активности SA-β-Gal проводили по описанному методу (Dimri et al., 1995). Клетки выращивали в чашках Петри на покровных стеклах, промывали PBS и фиксировали в 3%-ном формальдегиде в течение 20 мин при комнатной температуре. Фиксированные клетки промывали раствором PBS и инкубировали 18 ч при 37 °С в растворе, содержащем 1 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил β-D-галактозида (X-Gal), 40 мМ буфера, содержащего лимонную кислоту и фосфат натрия, pH 6.0, 5 мМ красной кровяной соли, 5 мМ желтой кровяной соли, 150 мМ NaCl и 2 мМ MgCl<sub>2</sub>. Об активности SA-β-Gal судили по появлению синих гранул в цитоплазме клеток.

## Результаты

Влияние NaB на пролиферацию клеток mERas и mERasJNK<sup>+</sup> оценивали по кривым клеточного роста, подсчитывая ежедневно в течение 4 сут число клеток в контроле и опыте. Обнаружено, что NaB практически полностью подавляет пролиферацию клеток mERas, тогда как подавление пролиферации клеток mERasJNK<sup>-/-</sup> происходит не полностью. Время удвоения популяции клеток mERas в контроле составляет 28.8 ч, тогда как клеток mERasJNK<sup>-/-</sup> — 26.2 ч. В присутствии NaB продолжительность удвоения числа клеток mERasJNK<sup>-/-</sup> увеличивается до 45.3 ч, в то же время для трансформантов, полученных из фибробластов дикого типа, время удвоения популяции составляет около 164.1 ч, т. е. популяция за все время исследования не успевает даже удвоиться. Таким образом, несмотря на снижение скорости пролиферации, клетки mERasJNK<sup>-/-</sup> сохраняют способность к делению в отличие от клеток дикого типа mERas, у которых она полностью подавляется (рис. 1). У трансформантов mERas число клеток в контроле через 96 ч культивирования увеличивается почти на порядок, в то время как после обработки NaB число клеток фактически не возрастает по сравнению с исходным. Число клеток mERasJNK<sup>-/-</sup> за 96 ч культивирования с NaB возрастает в 4 раза, но остается меньше, чем в контроле, в 3 раза. Таким образом, пролиферация при воздействии NaB лишь замедляется, но не прекращается (рис. 1).

Данные о полном подавлении пролиферации после инкубации клеток mERas в течение 120 ч с NaB, получен-

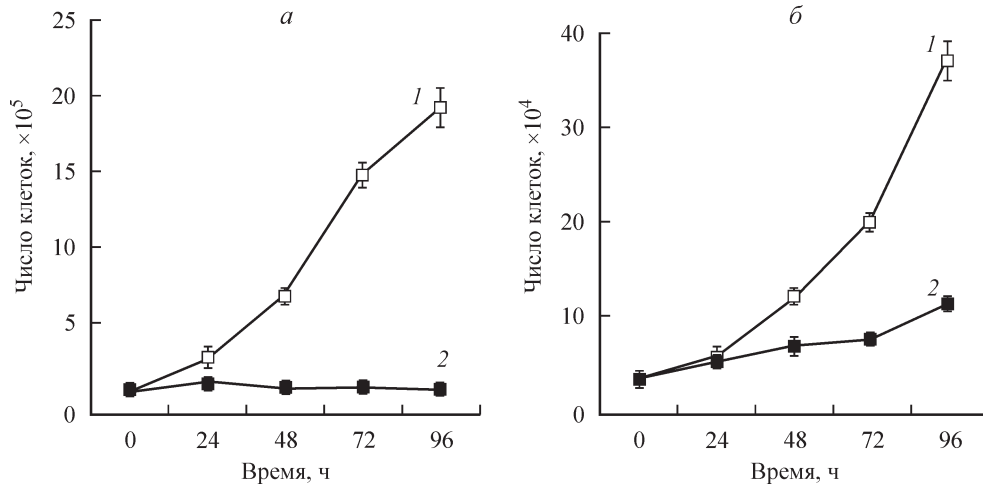


Рис. 1. Кривые роста трансформантов mERas (а) и mERasJNK<sup>-/-</sup> (б) в контроле (1) и при действии 4 мМ NaB (2).

ные с помощью кривых роста клеток, коррелируют с результатами проточной цитометрии, согласно которым в mERas-трансформантах дикого типа NaB вызывает блок клеточного цикла на стадии перехода из фазы G<sub>1</sub> в фазу S, причем доля клеток, находящихся в S-фазе, падает до 2.03 %. В клетках mERasJNK<sup>-/-</sup> блок клеточного цикла после длительной инкубации в присутствии NaB отсутствовал. Даже через 5 сут культивирования с NaB число их, находящихся в S-фазе, уменьшается лишь до 19.34 %. Таким образом, в отсутствие стресс-киназ JNK1,2 трансформанты mERas в отличие от трансформантов, полученных из фибробластов дикого типа, становятся резистентными к действию NaB (рис. 2).

Необратимость подавления пролиферации служит одним из маркеров программы ускоренного старения клеток. В связи с этим было проведено сравнение способности клеток mERas и mERasJNK<sup>+</sup> активировать пролиферацию после удаления из среды культивирования NaB. Для этой цели после культивирования в присутствии NaB в течение

120 ч (5 сут) клетки отмывали, переводили на чистую среду с сывороткой и следили за изменением доли клеток, находящихся в фазах G<sub>1</sub> и S клеточного цикла. Было обнаружено, что после прекращения действия ингибитора пролиферативная активность клеток mERas практически не возрастает, так как после удаления NaB доля клеток, переходящих из G<sub>1</sub>-фазы в фазу репликации ДНК, увеличивалась лишь на 1.12 %. После удаления NaB из среды культивирования трансформантов mERasJNK<sup>-/-</sup> существенно увеличивалась доля реплицирующихся клеток, что также свидетельствует в пользу отсутствия у них способности осуществлять ускоренное старение (рис. 2). Активность SA-β-Gal, основного маркера старения, в трансформантах mERas заметно возрастала уже через 72 ч и достигала максимума через 120 ч культивирования клеток в присутствии NaB. В клетках mERasJNK<sup>-/-</sup> такая окраска не появляется даже после действия NaB в течение 5 сут (рис. 3).

Известно, что процесс старения нормальных клеток сопровождается увеличением площади расплывания

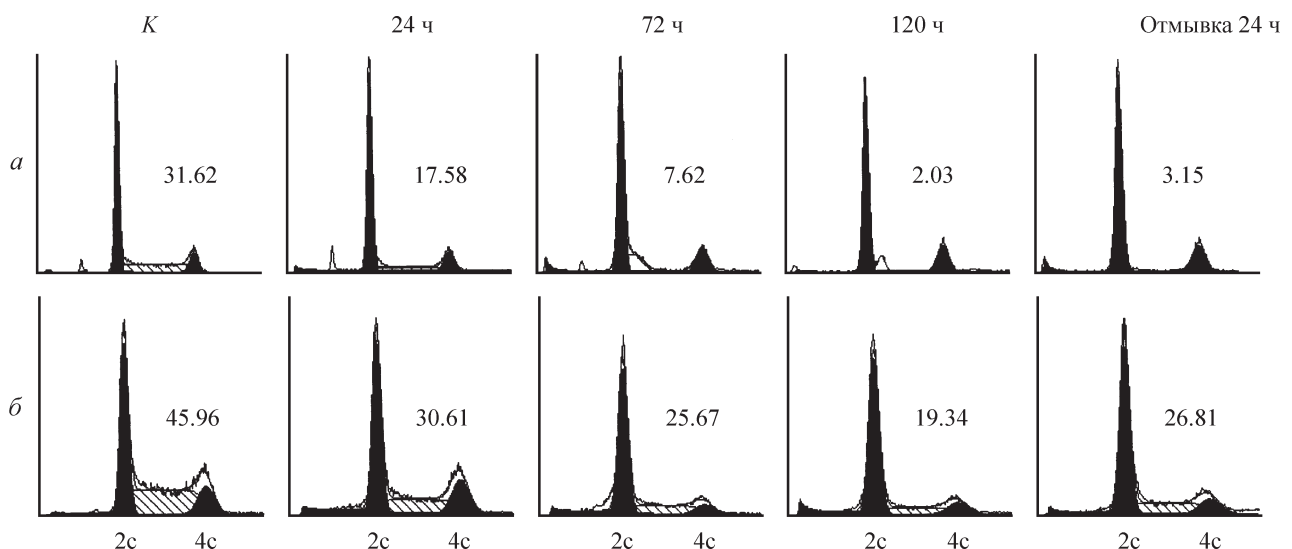


Рис. 2. Зависимость распределения трансформантов mERas (а) и mERasJNK<sup>-/-</sup> (б) по фазам клеточного цикла от времени действия 4 мМ NaB.

По горизонтали — содержание ДНК, ед. плоидности (с); по вертикали — число клеток. На каждой гистограмме указана доля клеток (%), находящихся в фазе S. Эксперимент с 24-часовой отмывкой проводили для случая со 120-часовым действием NaB.  
К — контроль.

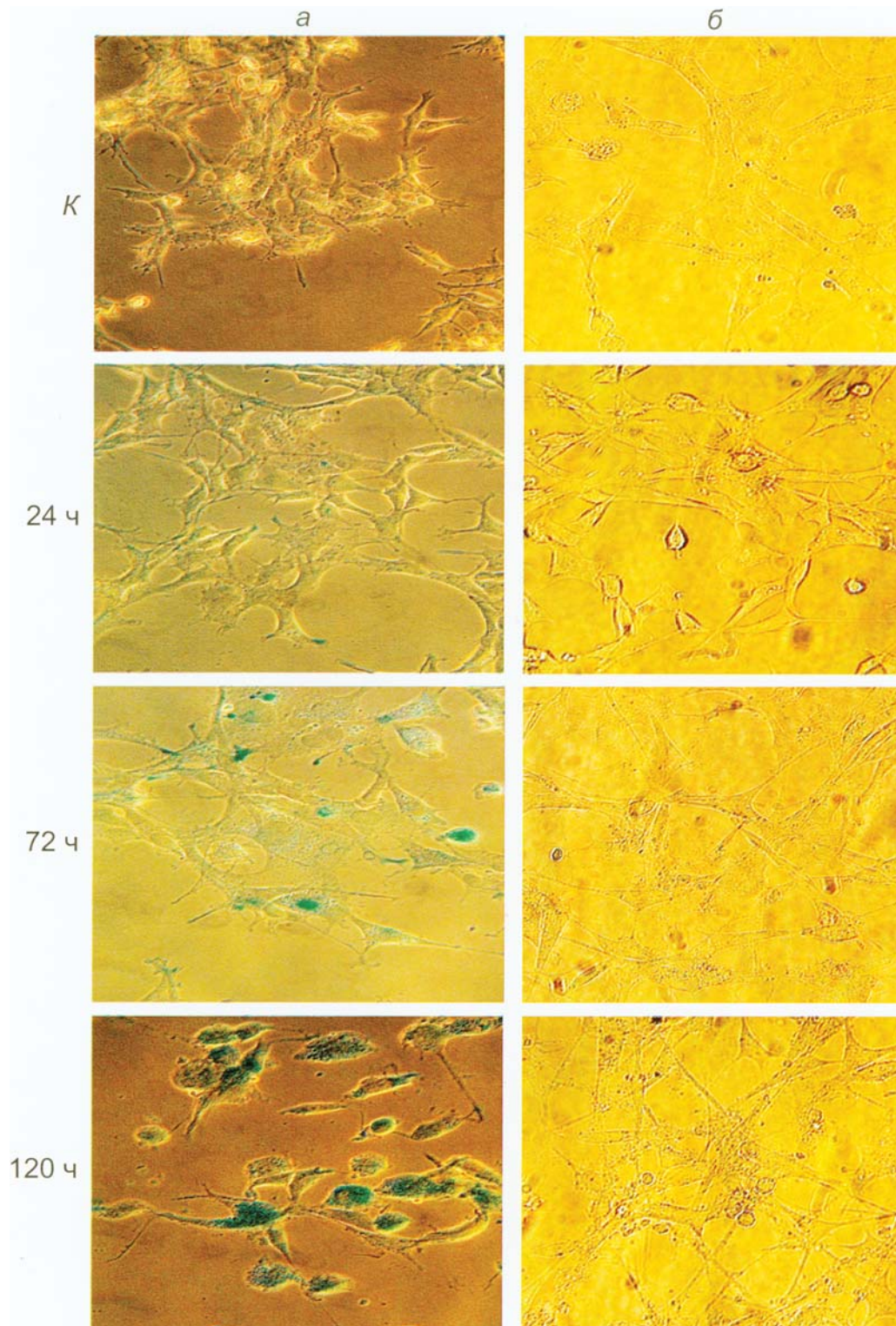


Рис. 3. Выявление ассоциированной со старением  $\beta$ -галактозиданой активности в трансформантах mERas (а) и mERasJNK<sup>-/-</sup> (б) в контроле (К) и после действия 4 мМ NaB в течение 24, 72 и 120 ч.

клеток на субстрате (Blagosklonny, 2006). Методом светорассеяния было установлено, что заметное расплывание клеток mERas после действия NaB связано с увеличением их объема, тогда как размер клеток mERasJNK<sup>-/-</sup> после длительного воздействия NaB остается на уровне контрольных значений (рис. 4).

### Обсуждение

Программа старения клеток рассматривается в настоящее время как механизм предотвращения опухолевой трансформации нормальных клеток при внеплановой экспрессии онкогенов или действии стрессовых факторов

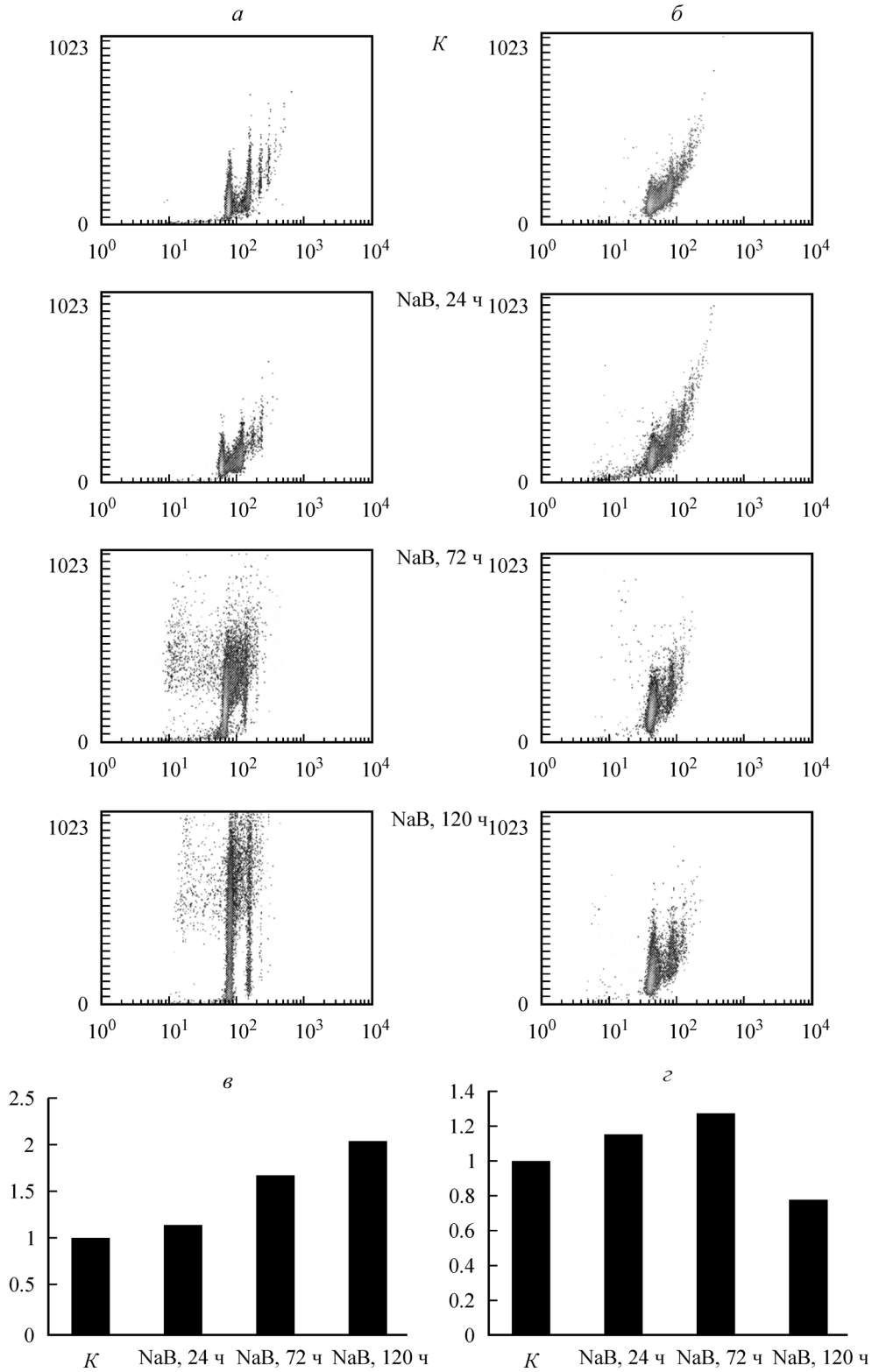


Рис. 4. Анализ изменения размера клеток mERas (а) и mERasJNK<sup>-/-</sup> (б) при действии 4 мМ NaB методом прямого рассеяния света. По горизонтали — десятичный логарифм содержания ДНК; по вертикали — прямое рассеяние света (Fs — forward light scatter). Результаты по светорассеянию (а, б) представлены в виде гистограмм (соответственно в, з): по горизонтали — время действия NaB; по вертикали — изменение светорассеяния, отн. ед. К — контроль.

(Collado, Serrano, 2005). Развитие клеточного ответа такого типа определяется высокой активностью MAP-киназного каскада и активацией опухолесупрессорных путей, что приводит к блоку прохождения по клеточному циклу метаболически активных клеток (Roninson, 2003). В используемых нами линиях трансформантов mERas и mERasJNK<sup>-/-</sup>, полученных эктопической экспрессией комплементирующих онкогенов *E1A* и *cHa-ras*, как было показано ранее, активированы все три ветви MAP-киназных каскадов — Erk, p38 и JNK (Светликова и др., 2001). Активация JNK-каскада онкогенами *E1Aad5* и *Ras* приводит к фосфорилированию белка c-jun и повышению транскрипционной активности комплексов AP-1 (Pospelova et al., 1999; Davis, 2000). Известно, что в клетках грызунов изменение активности MAP-киназных каскадов онкогеном *Ras* лежит в основе трансформации иммортализованных клеток, тогда как в первичных клетках экспрессия *Ras* приводит к включению программы ускоренного старения, которая по своей сути является опухоль-супрессорной, так как прекращает размножение клеток с повышенной экспрессией онкогенов и повышенной вероятностью неопластической трансформации (Benanti, Galloway, 2004).

Использованные нами трансформанты mERasJNK<sup>-/-</sup> с нокаутом по генам стресс-киназ *jnk1,2* не способны реактивировать программу старения, которая может осуществляться в трансформированных клетках, полученных введением этих же онкогенов в эмбриональные фибробласты мыши дикого типа. Трансформанты mERasJNK<sup>-/-</sup> с нокаутом по стресс-киназам JNK после воздействия NaB не останавливаются в клеточном цикле, не прекращают пролиферацию, не увеличиваются в размерах и не экспрессируют маркер старения — SA-β-Gal-активность. В настоящее время обсуждается вопрос о том, является увеличение размеров клетки признаком старения или же механизмом его реализации. В процессе старения клеточный цикл ингибирован, несмотря на присутствие ростовых факторов. Активированные MAP-киназные пути стимулируют метаболизм, транспорт питательных веществ и нарастание клеточной массы. Таким образом, на фоне картины подавления прохождения клеток по циклу благодаря активному метаболизму идет накопление клеточной массы, в результате чего стареющие клетки увеличиваются в размерах, меняют морфологию, а также могут секретировать экстраклеточный матрикс и митогенные факторы (Roninson, 2003). Такое состояние стареющих клеток было предложено относить к категории гипертрофических изменений (Blagosklonny, 2006). Предполагается, что гипертрофический фенотип является результатом активации путей, стимулированных митогенами, в частности киназы MTOR (Blagosklonny, 2006). Таким образом, возможно, что гипертрофия может быть не только одним из маркеров, но и механизмом старения.

Известно, что после стрессорных воздействий JNK фосфорилирует опухолевый супрессор p53, ингибирует его убиквитинзависимую деградацию и, таким образом, стабилизирует p53 (Fuchs et al., 1998). Исследование молекулярных механизмов старения показало, что они могут быть связаны с активацией опухоль-супрессорного белка p53, который, будучи транскрипционным фактором, меняет регуляцию большого числа генов, наиболее важными из которых являются ингибиторы циклинзависимых киназ p21/Waf и p16/lnk4a (Чумаков, 2000). В опухолевых клетках p53 и p16/lnk4a очень часто инактивированы или же их функции сильно изменены. В связи с этим

можно было бы предполагать, что в опухолевых клетках запуск клеточного старения невозможен. Однако индукция старения была показана в опухолевых клетках человека линий HT1080 и HCT116, лишенных p16/lnk4a (Chang et al., 1999a). Кроме того, фенотип стареющих клеток появлялся после воздействия доксирубицина на клетки линии Saos-2 с нокаутом по гену *p53* (Chang et al., 1999a). В ряде случаев инактивация или нокаут гена *p53* или *p21/Waf* существенно снижала, но полностью не исключала индукцию программы старения после действия радиации или цитостатиков (Chang et al., 1999b). Таким образом, хотя белки p53 и p21/Waf являются положительными регуляторами ускоренного старения, их активность не является абсолютно необходимым условием для активации программы старения в разных клеточных типах. Однако в опухолевых клетках некоторых типов отсутствие этих негативных регуляторов приводит к неспособности клеток реактивировать программу старения.

Ранее мы показали, что p53—p21/Waf—Rb опухоль-супрессорный путь, негативно контролирующей пролиферацию, не работает в трансформантах типа *E1A + cHa-ras*, так как онкопродукты раннего района аденовируса *E1A* взаимодействуют с белками p21/Waf и Rb, инактивируя их (Bulavin et al., 1999). Позднее мы показали, что антипролиферативное действие NaB может быть связано с подавлением на уровне транскрипции активности главного регулятора фазы репликации — гена фактора транскрипции E2F1, что приводит к блоку G<sub>1</sub>/S (Abramova et al., 2006).

Наши данные позволяют предполагать, что в процесс старения может быть вовлечен ген *c-jun*. Считается, что *c-jun* необходим для трансформации клеток онкогеном *ras*, так как трансформация блокируется в случае мутаций в гене *c-jun* по сайтам фосфорилирования (Behrens et al., 2000). Более того, некоторые исследования с подавлением функций JNK, например с применением антисмысловых олигонуклеотидов, свидетельствуют о том, что подавление активности JNK может приводить в зависимости от типа клеток к блоку клеточного цикла или апоптозу. Последние исследования инактивирующих мутаций JNK или киназы MKK4, которая активирует и фосфорилирует JNK, свидетельствуют о том, что инактивация JNK-каскада коррелирует с увеличением размеров опухолей и повышенной способностью к метастазированию (Yamada et al., 2002).

Данные о том, что JNK-сигнальный путь может подавлять Ras-стимулированную трансформацию, согласуются с нашими результатами, свидетельствующими о том, что JNK может играть роль гена опухолевого супрессора, отвечая за процессы старения клеток. В то же время на первичных эмбриональных фибробластах было показано, что JNK-сигнальный путь подавляет p53-зависимое старение и JNK функционирует как негативный регулятор опухолевой супрессии (Das et al., 2007). Эти данные свидетельствуют о том, что регуляция JNK и ее функциональная значимость могут существенно различаться в нормальных и опухолевых клетках.

Считается, что в первичных клетках сигнальные пути MKK7—JNK и MKK3/5—p38 альтернативно регулируют клеточную пролиферацию, старение и онкогенную трансформацию, что делает необходимым существование в эволюции этих генетически независимых стресс-киназ (Wada et al., 2007). Эмбриональные фибробласты мыши, изолированные из MKK7 мутантных эмбрионов с нарушенной JNK и *c-jun* активацией, имеют сниженную ско-

рость пролиферации, ускоренно стареют, у них повышена чувствительность к индуцированному стрессом старению (Wada et al., 2007). Важно отметить, что ингибирование МКК3/6—p38-пути усиливает клеточную пролиферацию и значительно подавляет клеточное старение. В свою очередь ингибирование p38a-пути позволяет клеткам МКК7<sup>-/-</sup> преодолеть блок клеточного цикла и спасает эти клетки от ускоренного старения. Авторы этой работы также установили, что МКК7—JNK-путь опосредует клеточную трансформацию, в то время как p38-каскад негативно регулирует клеточную трансформацию, индуцированную онкогенами (Wada et al., 2007).

Мы получили данные, свидетельствующие о том, что в mERas-трансформированных клетках мыши процесс старения при действии ингибитора HDAC может идти в отсутствие функционально активной киназы p38a (Зубова и др., 2007), тогда как киназы JNK необходимы для этого процесса. Такой клеточный ответ, противоположный тому, который обнаружен при активации процесса старения в первичных фибробластах мыши при действии стресс-агентов, может быть следствием того, что стресс-киназный каскад JNK является мишенью как онкогена Ras, так и E1Aad5 при трансформации мышечных эмбриональных фибробластов парой онкогенов E1A и cHa-ras (Shields et al., 2000; Brichkina et al., 2006). В E1A-экспрессирующих трансформантах конститутивно активированы c-jun и транскрипционный комплекс AP-1 (Kukushkin et al., 2002). Однако трансформация эмбриональных фибробластов комплементирующими онкогенами возможна и в отсутствие киназ JNK1,2, как это следует из нашего исследования. По данным лаборатории Дэвиса (Davis, 2000), отличительной чертой трансформантов, полученных из фибробластов с нокаутом по JNK-киназам, является их устойчивость к апоптозу. Согласно нашим данным, повышенная устойчивость к апоптозу подобного рода трансформантов коррелирует с устойчивостью к действию ингибитора HDAC NaB. Эти данные свидетельствуют в пользу того, что JNK необходимы для реализации блока G<sub>1</sub>/S клеточного цикла при действии NaB, так как индукция старения без блока клеточного цикла невозможна. Согласно нашим недавним результатам, киназы JNK являются также мишенью действия E1A-онкопродуктов при трансформации (Brichkina et al., 2006). Так как действие ингибиторов HDAC на клетку носит плейотропный характер, NaB может модифицировать онкопродукты района E1A, что в свою очередь меняет работу JNK, влияя, таким образом, на экспрессию JNK-зависимых генов, контролирующих процессы апоптоза, трансформации и регуляции клеточного цикла (Heasley, Han, 2006). В отсутствие JNK подавление пролиферации, как и активация старения, зависящего от ее активности, становятся невозможными.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 06-04-49058 и 07-04-01537), CRDF — РФФИ (RUB1-2868-ST-07/07-04-91154), грант МКБ РАН.

#### 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 c-Ha-ras. Цитология. 45 (11) : 1100—1108.

Бричкина А. И., Тарарова Н. Д., Аксенов Н. Д., Поспелов В. А., Поспелова Т. В. 2001. Трансформанты, полученные из эмбриональных фибробластов крысы комплементацией онкогенов E1A + E1B-19kDa и E1A + cHa-ras, различаются по способности реализовывать блок G<sub>1</sub>/S в условиях сывороточного голодания. Цитология. 43 (11) : 1024—1030.

Булавин Д. В., Тарарова Н. Д., Аксенов Н. Д., Поспелов В. А., Поспелова Т. В. 1998. Анализ характера апоптической гибели эмбриональных фибробластов крысы, трансформированных онкогенами E1A + c-Ha-ras, после гамма-облучения. Цитология. 40 (12) : 1017—1025.

Зубова С. Г., Быкова Т. В., Зубова Ю. Г., Романов В. С., Аксенов Н. Д., Поспелов В. А., Поспелова Т. В. 2007. Роль киназы p38a в активации программы «ускоренного старения» в трансформированных фибробластах мыши. Цитология. 49 (2) : 115—124.

Зубова Ю. Г., Быкова Т. В., Зубова С. Г., Абрамова М. В., Аксенов Н. Д., Поспелов В. А., Поспелова Т. В. 2005. Индукция программы ускоренного старения ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия в нормальных и трансформированных фибробластах крысы. Цитология. 47 (12) : 1055—1062.

Светликова С. Б., Абрамова М. В., Кукушкин А. Н., Дариева З. А., Поспелова Т. В., Поспелов В. А. 2001. Конститутивная активность MAP-киназных каскадов в клетках REF, трансформированных онкогенами E1A и cHa-ras. Цитология. 43 (10) : 961—968.

Чумаков П. М. 2000. Функция гена p53: выбор между жизнью и смертью. Биохимия. 65 : 34—37.

Abramova M. V., Pospelova T. V., Nikulenkov F. P., Hollander C. M., Fornace A. J., Jr., Pospelov V. A. 2006. G<sub>1</sub>/S arrest induced by histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in E1a + Ras transformed cells is mediated through down-regulation of E2F activity and stabilization of beta catenin. J. Biol. Chem. 28 : 21 040—21 051.

Behrens A., Jochum W., Sibiilia M., Wagner E. F. 2000. Oncogenic transformation by ras and fos is mediated by c-Jun N-terminal phosphorylation. Oncogene. 19 : 2657—2663.

Benanti J. A., Galloway D. A. 2004. The normal response to RAS: senescence or transformation? Cell Cycle. 3 : 715—717.

Blagosklonny M. V. 2006. Cell senescence: hypertrophic arrest beyond the restriction point. J. Cell. Physiol. 209 : 592—597.

Bost F., McKay R., Bost M., Potapova O., Dean N. M., Mercola D. 1999. The Jun kinase 2 isoform is preferentially required for epidermal growth factor-induced transformation of human A549 lung carcinoma cells. Mol. Cell. Biol. 19 : 1936—1949.

Brichkina A., Angel P., Pospelova T., Herrlich P. 2006. Activation of JNK/cJun by adenoviral E1A oncoprotein. FEBS-EMBO Advanced Lecture Cours: Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Cancer. Island of Spetses, Greece.

Bulavin D. V., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 1999. Oncoprotein E1Aad5 interact with universal inhibitor of cyclin-dependent kinases p21/waf-1 and inhibit its activity in E1A + cHa-ras transformants. Mol. Biol. (Moscow). 33 (4) : 641—643.

Campisi J. 2005. Aging, tumor suppression and cancer: high wire-act! Mech. Aging Develop. 126 : 51—58.

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

Chang B. D., Xuan Y., Broude E. V., Zhu H., Schott B., Fang J., Roninson I. B. 1999b. Role of p53 and p21waf1/cip1 in senescence-like terminal proliferation arrest induced in human tumor cells by chemotherapeutic drugs. Oncogene. 18 : 4808—4818.

Collado M., Blasco M. A., Serrano M. 2007. Cellular senescence in cancer and aging. Cell. 130 : 223—233.

Collado M., Serrano M. 2005. The senescent side of tumor suppression. Cell Cycle. 4 : 1722—1724.

Das M., Jiang F., Sluss H. K., Zhang C., Shokat K. M., Flavell R. A., Davis R. J. 2007. Suppression of p53-dependent senes-

cence by the JNK signal transduction pathway. PNAS. 104 : 15 759—15 764.

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

Davis R. J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. Cell. 103 : 239—252.

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

Fuchs S. Y., Adler V., Pincus M. R., Ronai Z., 1998. MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 95 : 10 541—10 546.

Garay M., Gaarde W., Monia B. P., Nero P., Cioffi C. L. 2000. Inhibition of hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis by an antisense oligonucleotide targeted to JNK1 in human kidney cells. Biochem. Pharmacol. 59 : 1033—1043.

Heasley L. E., Han S.-Y. 2006. JNK regulation of oncogenesis. Mol. Cells. 21 : 167—173.

Ho F. M., Liu S. H., Liao C. S., Huang P. J., Lin-Shiau S. Y. 2000. High glucose-induced apoptosis in human endothelial cells is mediated by sequential activation of c-jun NH2-terminal kinase and caspase-3. Circulation. 101 : 2618—2624.

Kang S., Jung M., Kim C.-W., Shin D. 2005. Inactivation of p38 kinase delays the onset of senescence in rabbit articular chondrocytes. Mech. Aging Develop. 126 : 591—597.

Kennedy N. J., Sluss H. K., Jones S. N., Bar-Sagi D., Flavell R. A., Davis R. J. 2003. Suppression of Ras-stimulated transformation by the JNK signal transduction pathway. Genes Develop. 17 : 629—637.

Kukushkin A. N., Abramova M. V., Svetlikova S. B., Darieva Z. A., Pospelova T. V., Pospelov V. A. 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.

Mikhailov A., Shinohara M., Rieder C. L. 2004. Topoisomerase II and histone deacetylase inhibitors delay the G<sub>2</sub>/M transition by triggering the p38 MAPK checkpoint pathway. J. Cell Biol. 166 : 517—526.

Pospelova T. V., Medvedev A. N., 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 Exp. 8 : 19—32.

Potapova O., Gorospe M., Dougherty R. H., Dean N. M., Gaarde W. A., Holbrook N. J. 2000. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase 2 expression suppresses growth and induces apoptosis of human tumor cells in a p53-dependent manner. Mol. Cell. Biol. 20 : 1713—1722.

Pulverer B. J., Kyriakis J. M., Avruch J., Nikolakaki E., Woodgett J. R. 1991. Phosphorylation of c-jun mediated by MAP kinases. Nature. 353 : 670—674.

Roninson I. B. 2003. Tumor cell senescence in cancer treatment. Cancer Res. 63 : 2705—2715.

Shapiro H. M. 1988. Practical flow cytometry. New York: Alan R. Liss., Inc. 353 p.

Shields J. M., Pruitt K., McFall A., Shaub A., Der C. J. 2000. Understanding Ras: «in ain't over 'til it's over». Trends Cell Biol. 10 : 147—154.

Wada T., Stepniak E., Hui L., Leibbrandt A., Katada T., Nishina H., Wagner E. F., Penninger J. M. 2007. Antagonistic control of cell fates by JNK and p38-MAPK signaling. Cell Death Different. 1—5.

Winn R. A., Marek L., Han S. Y., Rodriguez K., Rodriguez N. 2005. Restoration of Wnt-7a expression reverses non-small cell lung cancer cellular transformation through frizzled-9-mediated growth inhibition and promotion of cell differentiation. J. Biol. Chem. 280 : 19 635—19 634.

Yamada S. D., Hickson J. A., Hrobowski Y., Vander Griend D. J., Benson D., Montag A., Karrison T., Huo D., Rutgers J., Adams S. 2002. Mitogen-activated protein kinase kinase 4 (MKK4) acts as a metastasis suppressor gene in human ovarian carcinoma. Cancer Res. 62 : 6717—6723.

Yoshida S., Fukino K., Harada H., Nagai H., Imoto I., Inazawa I., Takahashi H., Teramoto A., Emi M. 2001. The c-Jun NH2-terminal kinase 3 (JNK3) gene: genomic structure, chromosomal assignment, and loss of expression in brain tumors. J. Hum. Genet. 46 : 182—186.

Поступила 23 IV 2008

#### SODIUM BUTYRATE DO NOT INDUCE THE PROGRAM OF PREMATURE SENESCENCE IN TRANSFORMANTS WITH JNK1,2 KNOCKOUT

S. G. Zubova, T. V. Bykova, J. G. Zubova, V. S. Romanov, N. D. Aksenov, V. A. Pospelov, T. V. Pospelova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;  
e-mail: egretta\_julia@mail.ru

We studied the role of JNK1,2 stress-kinases in the regulation of premature senescence program, stimulated by the inhibitor of histone deacetylase, sodium butyrate (NaB). It was found, that the transformants *E1A + cHa-ras* selected from embryonic mouse fibroblasts with knockout *jnk1,2* stress-kinase genes did not block the cell cycle after sodium butyrate treatment. The data on the cell cycle distribution and cell growth curves showed that even long term (during five days) NaB influence did not suppress proliferation. We did not also reveal any cellular hypertrophy and increase in SA- $\beta$ -galactosidase activity after NaB treatment. The data presented suggest that JNK stress-kinases are involved in sodium butyrate-induced senescence in *E1A + cHa-Ras* mouse transformants, and they are indicative of that JNK1,2 have tumor suppressor properties.

Key words: oncogenes *E1A* and *cHa-ras*, transformation, JNK1,2 kinase, senescence, cell cycle, sodium butyrate.