

ВОВЛЕЧЕНИЕ МАР-КИНАЗНЫХ КАСКАДОВ В АКТИВАЦИЮ СТАРЕНИЯ, ИНДУЦИРОВАННОГО ИНГИБИТОРОМ ГИСТОНОВЫХ ДЕАЦЕТИЛАЗ БУТИРАТОМ НАТРИЯ

© Е. Ю. Кочеткова, Т. В. Быкова, С. Г. Зубова, Т. В. Постелова

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и С.-Петербургский государственный университет;
электронный адрес: lena.linnaea@gmail.com*

В работе изучали роль стресс-киназ p38 и JNK1,2 в реализации программы ускоренного старения, индуцированного ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия (NaBut), в эмбриональных фибробластах мыши, трансформированных онкогенами *E1A* и *cHa-ras*. Обнаружено, что трансформанты из клеток-нокаутов по генам киназы p38 способны реализовать программу ускоренного старения при действии NaBut, которая выражается в появлении блока клеточного цикла, подавлении пролиферации, гипертрофии клеток и появлении ассоциированной со старением β-галактозидазной активности и активации киназы mTOR. В то же время у клеток-нокаутов по генам *jnk1,2* программа NaBut-индукции старения не развивается. С использованием специфического ингибитора комплекса mTORC1 рапамицина показано, что реализация программы старения после действия NaBut на клетки-нокауты по p38 тесно коррелирует с активацией mTOR в составе комплекса mTORC1. В случае клеток-нокаутов по генам *jnk1,2* активации комплекса mTORC1 не происходит. Таким образом, использование клеток-нокаутов по стресс-киназам говорит о том, что необходимым условием для реализации программы индуцированного бутиратом старения в трансформантах *E1A+cHa-Ras* являются киназы JNK1,2, в отсутствие которых не активируется киназа mTOR в составе комплекса mTORC1 и не выявляются маркеры клеточного старения.

Ключевые слова: TOR, mTORC1, JNK, p38, бутират натрия, ускоренное клеточное старение

Принятые сокращения: NaBut — бутират натрия, SA-β-Gal — β-галактозидаза, ассоциированная со старением.

Старение клеток — это естественная эволюционно детерминированная программа, для реализации которой требуется работа определенных генов. Репликативное старение, обнаруженное в культуре фибробластов человека *in vitro*, связано с перманентным подавлением пролиферации, и его обычно связывают с укорочением теломер (Hayflick, 1965). Другой тип старения был обнаружен при введении онкогенного *ras* в клетки человека и грызунов раннего пассажа (Serrano et al., 1997). Характерными чертами этого типа клеточного старения являются блок пролиферации и развитие морфологических изменений, сходных с наблюдаемыми при репликативном старении. Этот тип старения назвали ускоренным (Serrano et al., 1997).

Программа, отвечающая на активацию онкогенов подавлением пролиферации, относится к тумор-супрессорным программам предотвращения размножения дефектных клеток. Однако при кооперации с другими онкогенами программа старения может супрессироваться (Weinberg, Hanahan, 2000). Недавно было показано, что конститутивная активация изоформ киназы p38 (p38α и p38γ) вызывает ускоренное старение в фибробластах человека, тогда как подавление киназ МЕК и p38 специфическим ингибитором SB203580 или U0126 приводит к резкому подавлению развития маркера старения — β-га-

лактозидазной (SA-β-Gal) активности в случае *ras*-индукции старения в клетках BJ человека (Kwong et al., 2009).

Показано, что старение можно индуцировать в опухолевых клетках разнообразными воздействиями: цитостатиками, ретиноидами, рентгеновским облучением, а также ингибиторами гистоновых деацетилаз (Rikiishi, 2011). В частности, ингибитор гистоновых деацетилаз бутират натрия (NaBut) способен вызвать блок клеточного цикла и старение у трансформантов *E1A+cHa-Ras*, которые не останавливаются в цикле после удаления из среды ростовых факторов или действия ДНК-повреждающих агентов (Абрамова и др., 2003; Зубова и др., 2005). К числу вероятных регуляторов процесса ускоренного старения относятся стресс-киназы JNK и p38 из суперсемейства МАР-киназ. Исследования на трансформированных клетках, полученных из эмбрионов мышей с нокаутами по генам киназ JNK и p38, показали, что действие NaBut индуцирует старение клеток-нокаутов по p38, но не трансформантов с нокаутом по генам киназ JNK (Зубова и др., 2007, 2008). Имеющиеся на сегодняшний день данные (Das et al., 2007, Wada et al., 2007) позволяют говорить о том, что функционирование киназы p38 не является необходимым и достаточным условием реализации программы старения клетки.

Старение клеток, а также и организма связано с активацией киназы mTOR (mammalian target of rapamycin) — центрального звена каскада, контролирующего основные процессы в клетке: уровень энергии, метаболизм, автофагию, трансляцию белка, старение (Blagosklonny, 2006, 2011; Guertin, Sabatini, 2007). Во многих видах опухолей регуляция активности киназы mTOR нарушена, что привело к изучению роли киназы mTOR и ее регуляторов в процессах злокачественной трансформации клеток и старения.

Данные о связи стресс-киназ и TOR-сигналинга, равно как и о роли стресс-киназ в реализации ускоренного старения малочисленны. Показано, что киназа p38 участвует в регуляции mTORC1 (mTOR complex 1) в ответ на стресс или ростовые факторы. Активируясь в ответ на генотоксический стресс, p38 участвует в регуляции mTOR-S6K1-сигналинга (Lai et al., 2010). Получены данные о роли киназы JNK в регуляции активности mTOR в составе комплекса mTORC1 (March, Winton, 2011). Тем не менее пока до конца неясно, какую роль киназы p38 и JNK играют в активации mTORC1 и реализации программы ускоренного старения.

Целью данной работы было изучение активации киназы mTOR в составе комплекса mTORC1 и реализации программы ускоренного старения при действии NaBut на эмбриональные фибробласты мыши, трансформированные онкогенами *E1A* и *cHa-ras*, в отсутствие киназ p38 или JNK.

Материал и методика

Клеточные линии. Работу проводили на эмбриональных фибробластах мыши, трансформированных онкогенами *E1A* и *cHa-ras*. Использовали следующие клеточные линии: трансформанты *E1A+cHa-ras* (клетки mER-Ras), полученные из мышьных эмбриональных фибробластов путем переноса в них пары комплементирующих онкогенов *E1a* и *cHa-ras* и служившие контролем, а также трансформанты с нокаутом по генам киназ JNK 1 и 2 (клетки mERasJnk^{-/-}) и трансформанты с нокаутом по гену *mapk14*, кодирующему киназу p38 (клетки mERasp38^{-/-}). Клетки культивировали на среде Игла в модификации Дальбекко (среда DMEM), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки (HyClone, США). Для индукции ускоренного старения использовали ингибитор гистоновых деацетилаз NaBut в концентрации 4 мМ. Для подавления в клетках активности mTOR-киназы использовали рапамицин (200 нМ) — ингибитор этой киназы, находящейся в составе комплекса mTORC1.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла и изменение их размера оценивали с помощью метода проточной цитометрии. Клетки снимали с чашек смесью трипсина с версеном (1 : 9), осаждали центрифугированием и промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). Затем клетки инкубировали в течение 30 мин в присутствии 0.01 % сапонина при комнатной температуре, промывали PBS и затем 15 мин инкубировали в присутствии РНКазы A (0.1 мг/мл) и иодида пропидия (40 мг/мл) при 37 °С. Распределение клеток по фазам клеточного цикла анализировали на цитометре Odam (Brucker, Франция). Изменение размера клеток оценивали с помощью метода прямого светорассеяния на образцах, окрашенных иодидом пропидия, кото-

рые использовались для анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла (Shapiro, 1988).

Пролиферативную активность клеток оценивали по кривым клеточного роста. Клетки высевали на чашки Петри (30 мм) по 30 тыс. клеток на 1 чашку. Подсчет клеток производили через 1, 3 и 5 сут после начала культивирования клеток в присутствии NaBut, рапамицина или NaBut и рапамицина одновременно. Клетки подсчитывали в камере Горяева. Использовали 3 чашки на одну временную точку. Статистическую обработку производили при помощи программы Excel.

Морфологические изменения клеток оценивали после окраски препаратов методом Романовского—Гимза. Клетки растали на стеклах в чашках Петри, культивировали в течение 5 сут в присутствии NaBut, рапамицина или NaBut и рапамицина совместно. Затем стекла промывали PBS, фиксировали и окрашивали в течение 3 мин красителем Романовского—Гимза. После этого стекла промывали проточной водой, сушили и заключали в Канадский бальзам.

Выявление активности SA-β-Gal проводили по описанному методу (Dimri et al., 1995). Клетки культивировали в чашках Петри на покровных стеклах в течение 5 сут по схеме, описанной выше, затем промывали PBS и фиксировали 3%-ным формальдегидом в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем препараты промывали раствором PBS и инкубировали при 37 °С в течение 18 ч в растворе, содержащем 1 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактозида, 40 мМ буфера, содержащего лимонную кислоту и фосфат натрия, pH 6.0, 5 мМ красной кровянной соли, 5 мМ желтой кровянной соли, 150 мМ NaCl и 2 мМ MgCl₂. Окрашенные стекла заключали в фиксатор DAKO. Об активности SA-β-Gal судили по появлению синих гранул в цитоплазме клеток.

Активацию mTORC1 выявляли методом иммунофлуоресценции по накоплению фосфорилированной формы рибосомального белка S6 — его мишени. Клетки культивировали в чашках Петри на покровных стеклах в течение 5 сут по описанной выше схеме, затем промывали PBS и фиксировали 3%-ным формальдегидом в течение 20 мин при комнатной температуре. Клетки промывали PBS и пермеабилизировали при помощи 0.2%-ного Тритона X-100 в течение 20 мин, затем блокировали в растворе 3%-ного BSA на буфере TBS-T в течение 1.5 ч, после чего инкубировали с первичными поликлональными антителами к pS6 и моноклональными к S6 (Cell Signaling, США) в разведении 1 : 100 в растворе 3%-ного BSA на буфере TBS-T в течение ночи при 4 °С. После отмыки клетки промывали и инкубировали в течение 1 ч со вторичными антителами (Goat-anti-rabbit и Goat-anti-mouse), несущими флуоресцентную метку (AlexaFluor 488 и Alexa Fluor 568 соответственно; Invitrogen, США) в присутствии DAPI для визуализации ядер. Анализ изображений проводили с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL.

Результаты

Для индукции ускоренного старения клеток использовали NaBut. Так как NaBut вызывает старение, блокируя прохождение клеток по циклу на стадии перехода фаз G₁/S (Абрамова и др., 2003), мы оценили характер распределения клеток по фазам клеточного цикла методом проточной цитометрии через 5 сут культивирования клеток в

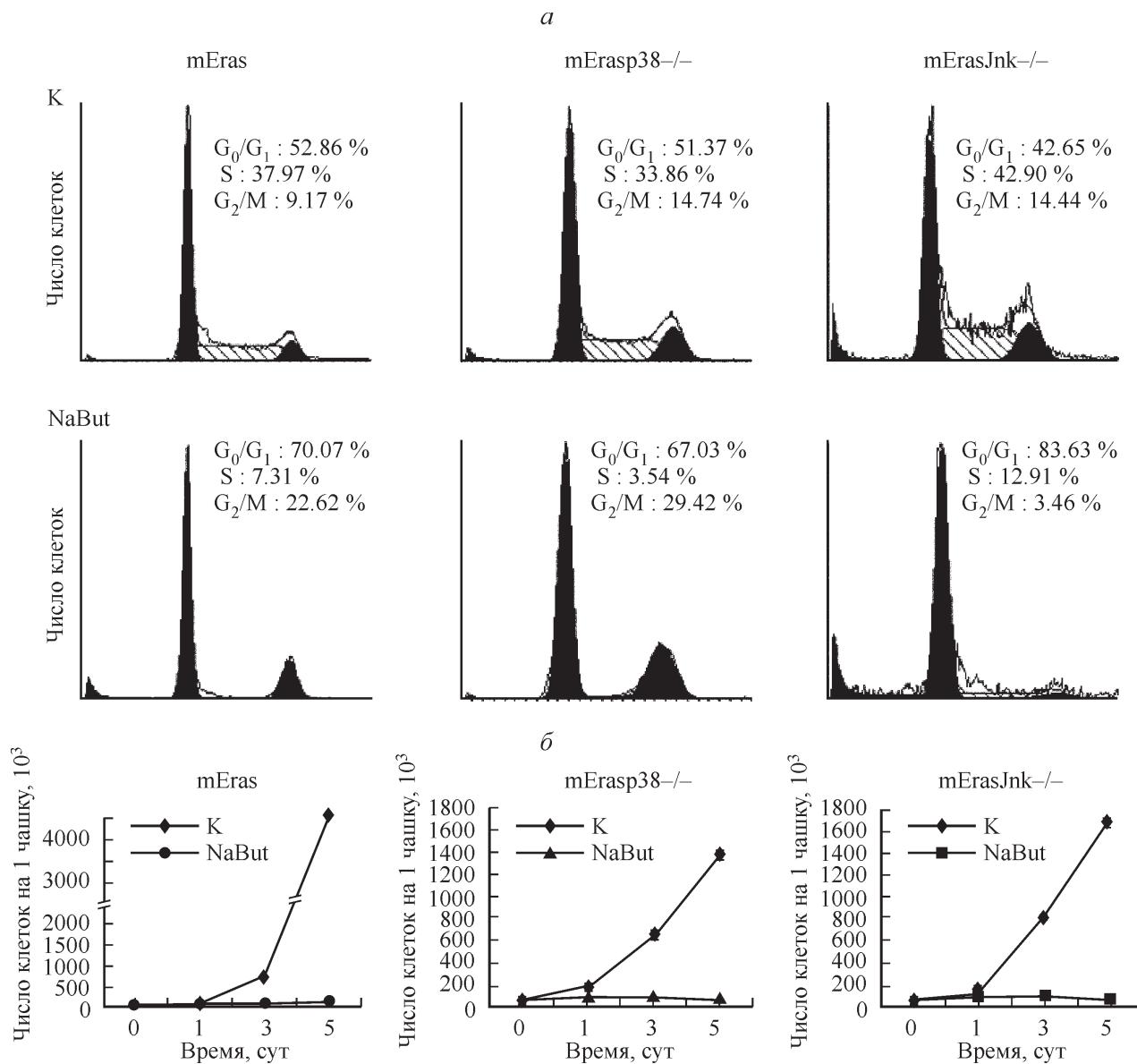


Рис. 1. Распределение клеток-трансформантов mEras, mErasp38^{-/-} и mErasJnk^{-/-} по фазам клеточного цикла в контроле (K) и на 5-е сут после действия 4 мМ бутириата натрия (NaBut, *a*) и кривые роста этих клеток (*б*).

а: по горизонтали — количество ДНК (ед. плоидности, *с*); по вертикали — число клеток; на каждой гистограмме указана доля (%) клеток в разных фазах клеточного цикла.

присутствии NaBut. Оказалось, что после действия NaBut доля клеток, находящихся в S-фазе, составила у клеток mEras 7.31 (против 37.97 % в контроле) и 3.54 % у клеток mErasp38^{-/-} (против 33.89 % в контроле). Такое же действие NaBut оказывает на клетки линии mErasJnk^{-/-} снижает долю клеток в S-фазе с 42.90 % в контроле до 12.91 %. Таким образом, NaBut вызывает накопление клеток на границе фаз G₁/S во всех 3 исследованных линиях (рис. 1, *a*). Данные проточной цитометрии хорошо согласуются с результатами пролиферативной активности клеток. По кривым клеточного роста (рис. 1, *б*) видно, что NaBut существенно подавляет пролиферацию клеток всех 3 исследованных линий.

Дифференциальное окрашивание клеток по методу Романовского—Гимза показало, что клетки линий mEras и mErasp38^{-/-} после 5-суточного культивирования в присутствии NaBut приобретают характерную для старе-

ющих клеток морфологию. У них появляется гипертрофный фенотип, вакуолизируется цитоплазма, нарушаются ядерно-цитоплазматическое отношение за счет непропорционального увеличения объема цитоплазмы, и они сильнее распластываются по поверхности. У клеток линии mErasJnk^{-/-} при действии NaBut указанных морфологических признаков старения не наблюдали (рис. 3).

Оценка размера клеток с помощью светорассеяния показала, что после 5-суточного действия NaBut объем клеток mEras и mErasp38^{-/-} (но не клеток mErasJnk^{-/-}) увеличивается (рис. 2), что связано, как показано ранее, с перестройками актинового цитоскелета (Romanov et al., 2010).

Общепринятым маркером старения является повышение активности SA- β -Gal, ассоциированной со старением, которая выявляется по появлению характерных голубых гранул, заполняющих цитоплазму клетки. Через 5 сут культивирования в присутствии NaBut повышенная

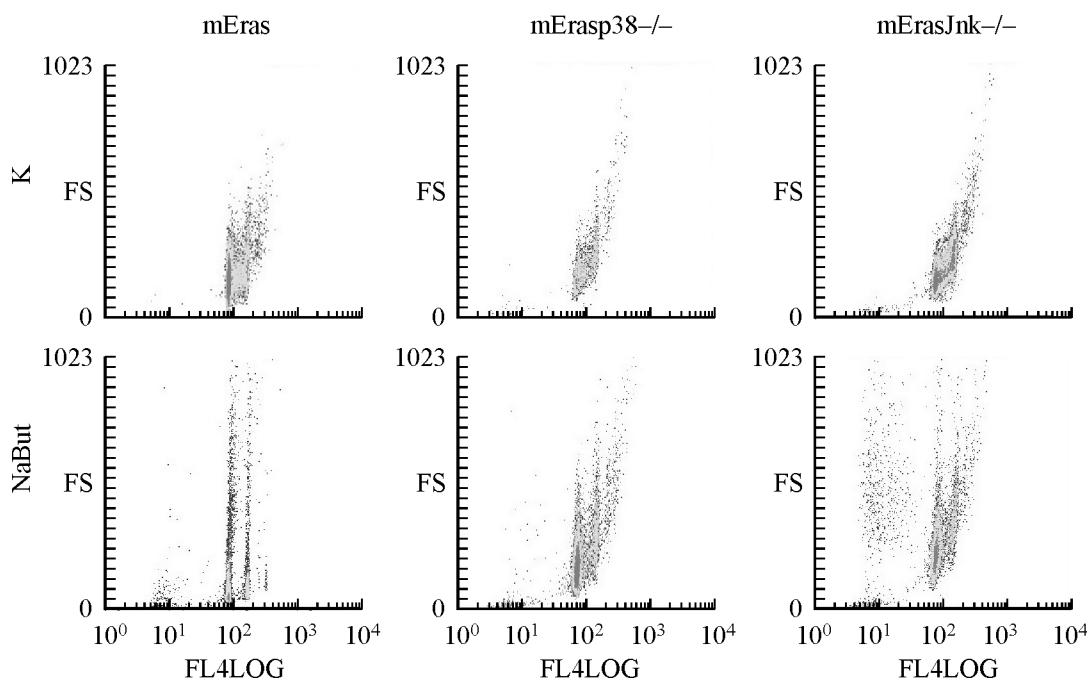


Рис. 2. Изменения размера клеток mEras, mEras38^{-/-} и mErasJnk^{-/-} в контроле (К) и при действии 4 мМ бутирате натрия (NaBut) в течение 5 сут, проведенное методом прямого рассеяния света.

По горизонтали — содержание ДНК, усл. ед.; по вертикали — величина прямого светорассеяния, усл. ед., зависящая от размера клетки.

активность SA- β -Gal обнаружена в клетках mEras и mERasp38^{-/-}, тогда как в клетках mERasJnk^{-/-} повышения активности SA- β -Gal не наблюдали, что говорит в пользу того, что в клетках-нонокутах по JNK-киназе старение не индуцируется (рис. 4).

Характерным признаком клеточного старения является гипертрофный фенотип (Campisi, 2011), появление которого связывают с активной работой киназного комплекса mTORC1, одним из субстратов которого является рибосомальный белок S6, фосфорилируемый S6-киназой — мишенью действия mTORC1 (Ruvinsky et al., 2005). Иммунофлуоресценция с антителами против фосфорилированной формы рибосомального белка S6 показала, что в клетках mERasp38^{-/-}, как и в клетках mEras, через 5 сут действия NaBut происходит накопление фосфорилированной формы рибосомального белка S6, в то время как в клетках-нонокутах mERasJnk^{-/-} при действии NaBut этот белок не накапливается (рис. 5).

Роль киназного комплекса mTORC1, отвечающего за процесс трансляции, биогенез рибосом и аутофагию, в активации программы старения изучали, используя специфический ингибитор этого киназного комплекса — рапамицин (Guertin, Sabatini, 2007). Оценку вклада mTOR-киназы в становление основных маркеров старения проводили по той же схеме, которую использовали для оценки влияния NaBut на пролиферацию. При подавлении активности комплекса mTORC1 рапамицином через 1 сут после начала культивирования клеток существенного подавления пролиферации у клеток всех 3 клеточных линий нет. В результате 5-суточного действия рапамицина доля клеток, находящихся в S-фазе, у клеток mEras снижается до 11.49 % (от 37.97 % в контроле), клеток линии mERasp38^{-/-} — до 22.21 (от 33.89 % в контроле), а у клеток линии mERasJnk^{-/-} — только до 32.47 % (от 42.90 % в контроле) (рис. 6, а). Таким образом, несмотря на некоторое снижение пролиферативного потенциала под дей-

ствием рапамицина, можно сделать заключение о том, что клетки всех 3 линий устойчивы к антипролиферативному действию рапамицина: клетки замедляют пролиферацию, что видно по скорости их прохождения по циклу, но делиться не прекращают (рис. 6, б). При этом рапамицин не оказывает заметного влияния на морфологию клеток (рис. 3).

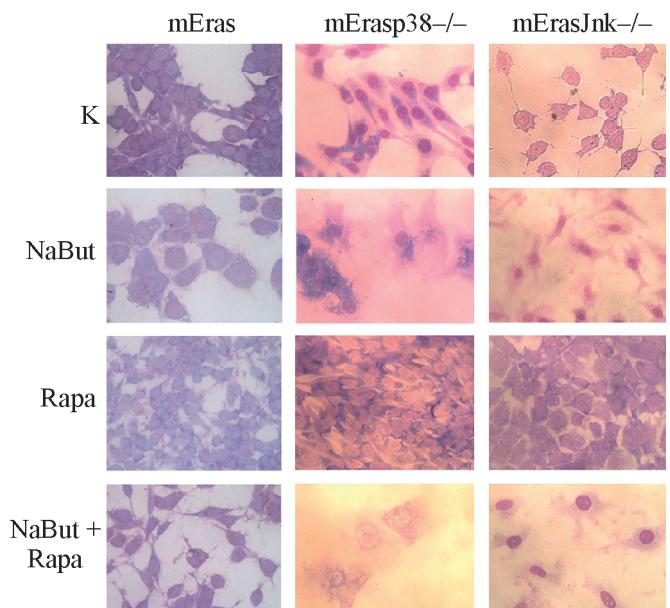


Рис. 3. Изменение морфологии клеток-трансформантов mEras, mEras38^{-/-} и mErasJnk^{-/-} в контроле, при действии NaBut (4 мМ), рапамицина (Rapa, 200 нМ) и этих агентов одновременно в течение 5 сут.

Окрашивание по методу Романовского—Гимза. Об. 40×.

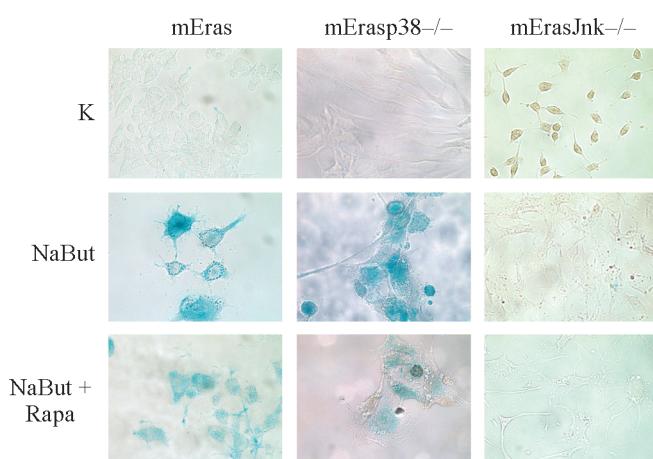


Рис. 4. Появление ассоциированной со старением β -галактозидазной активности в трансформантах mEras, mEras38^{-/-} и mErasJnk^{-/-} после 5-суточного действия 4 мМ NaBut и 4 мМ NaBut совместно с 200 нМ рапамицина.

Выявление галактозидазной активности (синий цвет) в клетках проводили в растворе, содержащим субстрат X-Gal для β -галактозидазы при рН 6.0. Об. 40×.

Для того чтобы выяснить, насколько оптимальна выбранная концентрация рапамицина для подавления активности комплекса mTORC1 и отмены формирования гипертрофного фенотипа клеток под действием ингибитора гистоновых деацетилаз, клетки всех линий культивировали вместе в присутствии NaBut и рапамицина одновременно, используя те же концентрации и ту же схему эксперимента. Было обнаружено, что, несмотря на подавление NaBut-индукционной активности mTORC1, действие рапамицина не отменяет полностью морфологических изменений, характерных для стареющих клеток. Однако

происходит уменьшение объема клеток и частично подавляется их распластывание по субстрату (рис. 3). Наиболее важным моментом является снижение в присутствии рапамицина активности SA- β -Gal в клетках mEras и mEras38^{-/-} (рис. 4). Доля клеток, позитивных по SA- β -Gal, становится меньше, как и интенсивность окраски гранул. Через 5 сут культивирования в присутствии NaBut активность SA- β -Gal проявляется у 97 % клеток mEras и у 84 % клеток mEras38^{-/-}. При одновременном действии NaBut и рапамицина доля клеток, позитивных по SA- β -Gal, достигает 71 % у mEras и 38 % у mEras38^{-/-}.

На основе этих данных можно сделать вывод о том, что реализуемая при совместном действии NaBut и рапамицина программа сходна с картиной действия одного NaBut (подавление пролиферации, большее распластывание клеток), однако подавление активности mTORC1 рапамицином частично снижает интенсивность SA- β -Gal и выраженность гипертрофии в клетках mEras и mEras38^{-/-}, что согласуется с данными по светорассеянию. В то же время клетки mErasJnk^{-/-}, в которых маркеры старения под действием NaBut не появляются, устойчивы к действию рапамицина.

Обсуждение

Клеточное старение рассматривается в настоящее время как тумор-супрессорный механизм подавления пролиферации клеток в случае экспрессии онкогенов (Raderier, Campisi, 2011). Роль MAP-киназ и TOR-сигнального пути, которые принимают участие в реализации этой программы, интенсивно исследуется, так как известно, что они дерегулируются как в процессе трансформации, так и в процессе старения клеток (Weinberg, Hanahan, 2000; Blagosklonny, 2008).

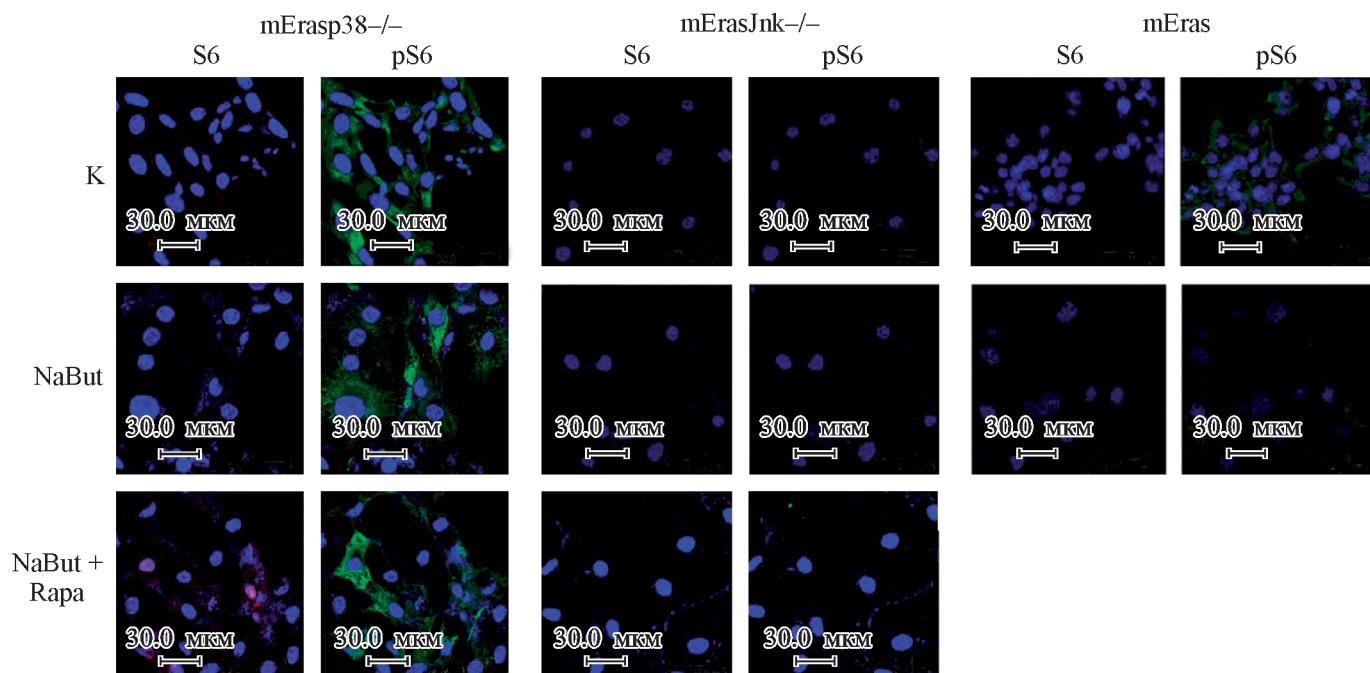


Рис. 5. Накопление фосфорилированной формы рибосомального белка S6 в клетках mEras, mEras38^{-/-} и mErasJnk^{-/-} через 5 сут действия 4 мМ NaBut и NaBut совместно с 200 нМ рапамицина.

Иммунофлуоресценция с антителами к белку S6 (красный цвет) и ее фосфорилированной форме (зеленый цвет). Ядра окрашены DAPI (синий цвет). Об. 100×.

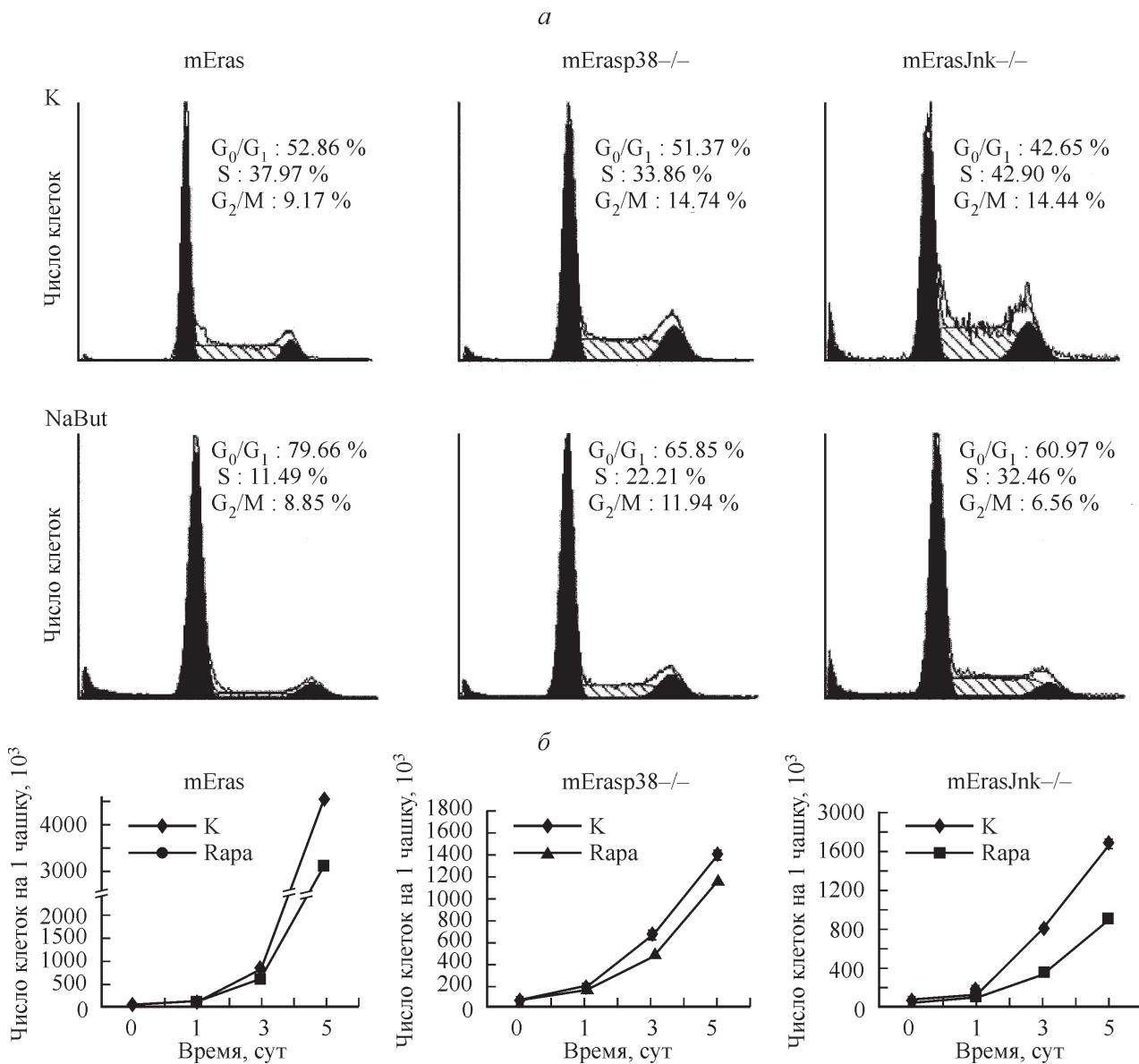


Рис. 6. Распределение трансформантов mEras, mErasp38^{-/-} и mErasJnk^{-/-} по фазам клеточного цикла в контроле (К) через 5 сут после действия рапамицина (*a*) и кривые роста этих клеток (*б*).

a: по горизонтали — количество ДНК (ед. плоидности, *c*); по вертикали — число клеток; на каждой гистограмме указана доля (%) клеток в разных фазах клеточного цикла.

Показано, что ключевую роль в старении может играть киназа p38, а по уточненным данным, две ее изоформы — p38 α и p38 γ . Обнаружено, что ras-индукционное старение в клетках BJ человека полностью блокируется после выключения с помощью siPHK изоформ p38 α и p38 γ , и, напротив, введение конститутивно активных форм p38 α и p38 γ вызывает клеточное старение, подавляя пролиферацию клеток и вызывая повышение активности SA- β -Gal (Kwong et al., 2009). К субстратам киназы p38 относятся многие белки, участвующие в контроле за клеточным циклом старением клетки. В частности, киназа p38 может быть вовлечена в регуляцию блока клеточного цикла на стадии перехода G₁ → S и G₂ → M при действии ультрафиолетового излучения или нарушениях веретена деления (Булавин и др., 1999). Кроме того, показано, что p38 может фосфорилировать и активировать белок p53 (Булавин и др., 1999). Также p38 может выступать в роли регулятора апоптоза. Показано, что кардиомиоциты с но-

каутом по гену киназы p38 менее чувствительны к апоптогенным стимулам, чем кардиомиоциты дикого типа, а эмбриональные фибробласты мыши с нокаутом по гену киназы p38 более устойчивы к апоптозу, индуцируемому Fas-сигналом или нехваткой питательных веществ (Porras et al., 2004).

В зависимости от стимула передача сигнала с участием p38 может приводить к противоположным результатам. Так, при действии стрессовых факторов, например анизомицина, происходит длительная активация p38 и ее мишени транскрипционного фактора CREB, в результате чего блокируется клеточный цикл. При действии митогенных сигналов в процесс вовлекаются малые ГТФазы, активность p38 снижена, но стимулируются экспрессия циклина D1 и пролиферация клеток (Faust et al., 2012). На основании вовлечения киназы p38 в регуляцию многих важных процессов можно предполагать, что она играет и тумор-супрессорную роль. Тем не менее, согласно ре-

зультатам нашего исследования, в клетках-трансформантах *E1a+ChA-Ras* реализация старения возможна в нокаутах по гену киназы p38 через сигнальные каскады, которые могут быть вовлечены в регуляцию программы старения и в ее отсутствие.

Показано, что белок Ras через свой сигнальный каскад приводит к активации комплекса mTORC1 путем ингибирования негативного регулятора mTORC1 — комплекса белков туберозного склероза хамартина и туберина (комплекс TSC1—TSC2). Старение клетки характеризуется определенными признаками и маркерами — это гипертрофия и усиление распластывания клетки по субстрату (Blagosklonny, Hall, 2009), усиление β -галактозидазной активности (Dimri et al., 1995). У стареющей клетки подавление пролиферации связано с блоком клеточного цикла в сверочной точке G₁ клеточного цикла после осуществления определенных событий, связанных с изменением активности циклин-киназных комплексов, действующих в фазе G₁. Предположительно именно блок клеточного цикла является основой переключения на программу старения. Однако в настоящее время ясно, что это не столь однозначно, как предполагалось ранее. Показано, что блок в G₁/S может возникать в клетках не только в ответ на повышенную экспрессию онкогенов, но и в ответ на нехватку ростовых факторов и может длиться несколько месяцев, до тех пор пока клетки вновь не будут стимулированы ростовыми факторами. В случае блока, вызванного повышенной экспрессией онкогенов, клетка не испытывает нехватки питательных веществ и ростовых факторов. В случае активного MAP-киназного и TOR-каскада клетка активно синтезирует и накапливает белок, приобретая гипертрофный фенотип (Blagosklonny, 2011). Мы обнаружили, что в трансформантах-нокаутах по генам *jnk1,2* блок клеточного цикла и подавление пролиферации происходят так же эффективно, как и в клетках mERas дикого типа и в клетках-нокаутах по p38. Однако программа старения и маркеры старения в клетках, лишенных JNK-киназ, не реагирует в присутствии NaBut. Это говорит о том, что блок клеточного цикла не является достаточным условием включения тумор-суппрессорной программы старения.

Ингибиторы гистоновых деацетилаз относятся к числу агентов, которые за счет модификации структуры хроматина могут вызвать изменения в транскрипции генов и старение клетки (Lee, Marks, 2010). Этот процесс не требует транскрипционно-активного опухолевого супрессора p53. Ингибиторы гистоновых деацетилаз вызывают модификацию гистонов и, как следствие, изменяют характер транскрипции разных групп генов. Действие ингибиторов гистоновых деацетилаз (NaBut или H40) ведет к усилению экспрессии ингибитора циклин-киназ белка p21^{CIP/WAF1} и одновременно к снижению уровня транскрипции циклинов, что способствует подавлению циклин-киназной активности и блоку клеточного цикла на стадии G₁ (Абрамова и др., 2003).

В опухолевых клетках сигнальные каскады с участием Ras и PI3K-киназы часто конститтивно активированы, что приводит к митогеннезависимой пролиферации — одному из главных свойств опухолевых клеток. В наших трансформантах, полученных введением конститтивно активной формы Ras вместе с онкогеном *E1A* раннего района аденоовирусов, сигнальные каскады, контролирующие пролиферацию, работают, скорее всего, конститтивно, и им не нужна активация извне. Определенную информацию о состоянии каскадов можно

получить, используя специфические ингибиторы киназ, которые помогают оценить их роль в становлении определенных программ. Так, используя рапамицин, мы обнаружили, что при подавлении активности комплекса mTORC1 пролиферативная активность клеток всех 3 линий несколько снижалась по сравнению с контролем, не было блока G₁/S, не изменялись размеры клеток, не выявлялась активность SA- β -Gal. Рапамицин является специфическим ингибитором комплекса mTORC1. В нашем случае наблюдалась тесная корреляция между подавлением активности комплекса mTORC1 рапамицином и отменой накопления фосфорилированного белка S6, отсутствием блока клеточного цикла и подавлением фенотипа старения (уменьшение гипертрофии и интенсивности активности SA- β -Gal). На основе полученных данных можно предполагать существование тесной связи процессов клеточного старения и активности TOR-киназы, в частности комплекса mTORC1.

Мы показали, что клетки mERas и mERas после действия NaBut оказались сходными по таким маркерам старения, как гипертрофный фенотип, блок клеточного цикла, высокая β -галактозидазная активность, а также маркеры активности mTORC1. Однако у клеток mERasJnk^{—/—}, несмотря на подавление пролиферативной активности в ответ на действие NaBut, старение не индуцировалось, так как не происходило активации mTORC1. На основе этих результатов можно сделать предположение как о необходимости JNK-киназы для реализации NaBut-индукции старения, так и о существовании некой регуляторной петли от JNK к комплексу mTORC1.

Показано, что сигнальные пути p38 и JNK регулируют пролиферацию, старение и трансформацию альтернативно; согласно этим данным, сигнальный путь MKK7-JNK опосредует клеточную трансформацию (Wada et al., 2007). Тем не менее предполагается, что NaBut может влиять на онкопродукты района *E1A* и, следовательно, влиять на работу *jnk*-зависимых генов, а также осуществлять контроль за процессами апоптоза, клеточной трансформации и прохождения клеточного цикла (Heasley, Han, 2006). Таким образом, NaBut может индуцировать старение в клетках mERAS и mERasp38^{—/—}, в которых сохраняется конститтивная активность JNK-киназы, однако в клетках-нокаутах по JNK-киназе, несмотря на блок клеточного цикла и подавление пролиферации, программа старения, которую оценивали по появлению общепринятых маркеров, не развивается. Возможным объяснением может служить предположение о том, что функционирование киназ зависит от стимула, типа клетки или ткани. В случае наших трансформантов факторы, влияющие на функционирование киназ и конечный результат, связанный с реализацией программы старения, могут иметь эпигенетическую природу. Введение в клетку одного Ras ведет к старению клетки (Serrano et al., 1997); комплементация онкогенов *ras* и *E1A* обуславливает трансформацию клетки. Тем не менее трансформанты mERas и mERasp38^{—/—} в ответ на NaBut способны реализовать программу старения. Можно предполагать, что действие *E1A* каким-то образом осуществляется через JNK-киназу, как и действие NaBut.

Одним из возможных объяснений роли киназы JNK в регуляции программы старения могут быть данные, согласно которым киназа JNK участвует в регуляции mTORC1 за счет фосфорилирования белка Raptor — компонента комплекса mTORC1, стимулируя, таким образом, киназную активность комплекса (March, Winton,

2011). Необходимость киназы JNK для активации комплекса mTORC1 и развития опухоли кишечника была показана на мышах и трансформированных клетках (Fujishita et al., 2011). На мышах-нокаутах по генам JNK-киназы было показано, что киназа JNK1 играет ключевую роль в подавлении развития опухоли кишечника в связи с усиленной экспрессией p21^{waf1} (Tong et al., 2007). Кроме того, известно, что JNK способствует стабилизации опухолевого супрессора p53, который является важным регулятором процесса старения клетки, подавляя его убиквитинизацию (Fuchs et al., 1998; Itahana et al., 2001; Brady et al., 2011). На мышиных эмбриональных фибробластах, нокаутных по генам *jnk1,2*, было показано, что в отсутствие активной киназы JNK в этих клетках повышенна экспрессия белка p53 и его мишени Mdm2 и p21 (Das et al., 2007). Таким образом, можно думать, что стабилизация p53 за счет действия JNK-киназы является важным дополнительным условием для положительной регуляции процесса старения, которое в нокаутах по генам *jnk* неспособно индуцироваться под действием NaBut. Данные о роли киназы JNK в клеточной трансформации противоречивы: с одной стороны, есть исследования, показывающие, что эта киназа требуется для ras-стимулированной трансформации клеток (Cellulare et al., 2011), а с другой стороны, данные о том, что действие JNK может подавлять ras-индуцированную трансформацию (Kennedy et al., 2003).

Таким образом, для старения клетки существенным фактором является работа TOR-киназы (особенно в опухолевых клетках, в которых p53-зависимые пути индукции старения зачастую инактивированы) в составе комплекса mTORC1. Это было показано с использованием ингибитора этого комплекса рапамицина, в присутствии которого отменялись NaBut-индуцированные гипертрофия и активность SA-β-Gal. Существенную роль в этих процессах играет киназа JNK, которая в зависимости от тканевой специфиности, стимула и эпигенетических особенностей приобретает функции регулятора старения, наиболее вероятно через активацию mTORC1.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-01152), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и С.-Петербургского государственного университета (контракт 1.37.122.2011).

Список литературы

- Абрамова М. В., Светличкова С. Б., Аксенов Н. Д., Поступова Т. В., Поступов В. А. 2003. Ингибитор деацетилаз гистонов останавливает пролиферацию клеток, трансформированных онкогенами E1A и cHa-Ras. Цитология. 45 (11): 1100—1108.
- Булавин Д. В., Поступов В. А., Поступова Т. В., 1999. Онкопротеин E1Aad5 взаимодействует с универсальным ингибитором циклин-зависимой киназы p21^{waf1} и подавляет ее активность в трансформантах E1A+cHa-ras. Молекуляр. биол. 33(4): 641—643.
- Зубова С. Г., Быкова Т. В., Зубова Ю. Г., Романов В. С., Аксенов Н. Д., Поступов В. А., Поступова Т. В. 2007. Роль киназы p38α в активации программы «ускоренного старения» в трансформированных фибробластах мыши. Цитология. 49 (2): 115—124.
- Зубова С. Г., Быкова Т. В., Зубова Ю. Г., Романов В. С., Аксенов Н. Д., Поступов В. А., Поступова Т. В. 2008. Бутират натрия не индуцирует программу ускоренного старения в трансформантах с нокаутом по стресс-киназам Jnk 1,2. Цитология. 50 (11): 964—971.
- Зубова Ю. Г., Быкова Т. В., Зубова С. Г., Абрамова М. В., Аксенов Н. Д., Поступов В. А., Поступова Т. В. 2005. Индукция программы ускоренного старения ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия в нормальных и трансформированных фибробластах крысы. Цитология. 47 (12): 1055—1062.
- Blagosklonny M. V. 2006. Aging and immortality. Quasi-programmed senescence and its pharmacological inhibition. Cell Cycle. 5 : 2087—2102.
- Blagosklonny M. V. 2008. Prevention of cancer by inhibiting aging. Cancer Biol. Therapy. 7 : 1520—1524.
- Blagosklonny M. V. 2011. Molecular damage in cancer: an argument to mTOR-driven aging. Aging. 3 : 1130—1141.
- Blagosklonny M. V., Hall M. N. 2009. Growth and aging: a common molecular mechanisms. Aging. 1 (4) : 357—362.
- Brady C. A., Jiang D., Mello S. S., Johnson T. M., Jarvis L. A., Kozak M. M., Broz D. K., Basak S., Park E. J., McLaughlin M. E., Karnezis A. N., Attardi L. D. 2011. Distinct p53 transcription programs dictate acute DNA-damage responses and tumor suppression. Cell. 145 : 571—583.
- Campisi J. 2011. Cellular senescence: putting the paradoxes in perspective. Curr. Opin. Genet. Develop. 21 : 107—112.
- Cellulare C., Sabio G., Kennedy N. J., Das M., Barlow M., Sandy P., Jacks T., Davis R. J. 2011. Requirement of c-Jun NH2-terminal kinase for Ras-initiated tumor formation. Mol. Cell. Biol. 31 : 1565—1576.
- Das M., Jiang F., Sluss H. K., Zhang C., Shokat K. M., Flavell R. A., Davis R. J. 2007. Suppression of p53-dependent senescence by the Jnk signal transduction pathway. PNAS. 104 : 15 759—15 764.
- Dimri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley K., Medrano E. E., Liskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and aging skin *in vivo*. Cell Biol. 92 : 9363—9367.
- Faust D., Schmitt C., Oesch F., Oesch-Bartlomowicz B., Schreck I., Weiss C., Dietrich C. 2012. Differential p38-dependent signalling in response to cellular stress and mitogenic stimulation in fibroblasts. Cell Commun. Signaling. 10 : 6—19.
- 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.
- Fujishita T., Aoki M., Taketo M. M. 2011. JNK signaling promotes intestinal tumorigenesis through activation of mTOR complex 1 in *Apc*^{Δ716} mice. Gastroenterology. 140 : 1556—1563.
- Guertin D. A., Sabatini D. M. 2007. Defining the role of mTOR in cancer. Cancer Cell. 12 : 9—20.
- Hayflick L. 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Exp. Cell Res. 37 : 614—636.
- Heasley L. E., Han S.-Y. 2006. JNK regulation of oncogenesis. Mol. Cells. 21 : 167—173.
- Itahana K., Dimri G., Campisi J. 2001. Regulation of cellular senescence by p53. Eur. J. Biochem. 268 : 2784—2791.
- 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.
- Kwong J., Hong L., Liao R., Deng Q., Han J., Sun P. 2009. p38α and p38γ mediate oncogenic ras-induced senescence through differential mechanisms. J. Biol. Chem. 284 : 11 237—11 246.
- Lai K. P., Leong W. F., Fung Ling Chau J., Jia D., Zeng L., Liu H., He L., Hao A., Zhang H., Meek D., Velagapudi C., Habib S. L., Li B. 2010. S6K1 is a multifaceted regulator of Mdm2 that connects nutrient status and DNA damage response. The EMBO J. 29 : 2994—3006.
- Lee J. H., Marks P. A. 2010. Histone deacetylase inhibitors in the therapy of cancer: much to learn. Epigenomics. 2 : 723—725.
- March H. N., Winton D. J. 2011. mTOR regulation by JNK: rescuing the starving intestinal cancer cell? Gastroenterology. 140 (5) : 1387—1391.

- Porras A., Zuluaga S., Black E., Valladares A., Alvarez A. M., Ambrosino C., Benito M., Nebreda A. L. 2004. p38 α mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. Mol. Biol. Cell. 15 : 922—933.*
- Radier F., Campisi J. 2011. Four faces of cellular senescence. J. Cell Biol. 192 (4) : 547—556.*
- Rikiishi H. 2011. Autophagic and apoptotic effects of HDAC inhibitors on cancer cells. J. Biomed. Biotechnol. Volume 2011 (2011) : 830260.*
- Romanov V. S., Abramova M. V., Bykova T. V., Zubova S. G., Aksenov N. D., Fornace A. J., jr., Pospelova T. V., Pospelov V. A. 2010. p21^{Waf1} is required for cellular senescence but not for cell cycle arrest induced by the HDAC inhibitor sodium butyrate. Cell Cycle. 9 : 1—11.*
- Ruvinsky I., Sharon N., Lerer T., Cohen H., Stolovich-Rain M., Nir T., Dor Y., Zisman P., Meyuhas O. 2005. Ribosomal protein S6 phosphorylation is a determinant of cell size and glucose homeostasis. Genes Develop. 19 : 2199—2211.*
- Serrano M., Lin A. W., McCurrach M. W., Beach D., Lowe S. W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16^{INK4a}. Cell. 88 : 593—602.*
- Shapiro H. M. 1988. Practical flow cytometry. New York: Alan R. Liss., Inc. 353 p.*
- Tong C., Yin Z., Song Z., Dockendorff A., Huang C., Mariadasson J., Flavell R. A., Davis R. J., Augenlicht L. H., Yang W. 2007. c-Jun NH₂-terminal kinase 1 plays a critical role in intestinal homeostasis and tumor suppression. Amer. J. Pathol. 171 : 297—303.*
- Wada T., Stepiak E., Hiu L., Leibbrandt A., Katada T., Nishina H., Wagner E. F., Penninger J. M. 2007. Antagonistic control of cell fates by Jnk and p38-MAPK signalling. Cell Death Different. 1—5.*
- Weinberg E. A., Hanahan D. 2000. The hallmarks of cancer. Cell. 100 : 57—70.*

Поступила 10 VII 2012

INVOLVEMENT OF MAP-KINASE CASCADES INTO THE REGULATION OF SODIUM BUTYRATE INDUCED PREMATURE CELL SENESCENCE

E. Yu. Kochetkova, T. V. Bykova, S. G. Zubova, T. V. Pospelova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and St. Petersburg State University;
e-mail: lena.linnaea@gmail.com

We studied the role of p38 kinase and JNK1,2 in the activation of the complex mTORC1 and the program of senescence induced by histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate (NaBut), in mouse embryonic fibroblasts transformed by *E1A+cHa-Ras* oncogenes. It was found that transformants from knockouts for the genes *p38*, were able to implement the program of NaBut-induced senescence, according to the data of the cell cycle arrest, inhibition of proliferation, hypertrophic changes associated with the activation of mTORC1 and SA- β -galactosidase activity. According to the behavior of these markers, cell knockouts for the genes *jnk1,2* were unable to implement NaBut-induced senescence. Induction of senescence closely correlates with the activation of the complex mTORC1, as it was shown by inhibiting mTORC1 with rapamycin. We believe that JNK 1,2 kinases are required for mTORC1 activation and acquiring the markers of premature senescence, induced by NaBut in the *E1A+cHa-Ras* transformants.

Key words: TOR, mTORC1, JNK, p38, sodium butyrate, premature cell senescence.