

**ПРОТЕИНФОСФАТАЗА МКР-1 УЧАСТВУЕТ В ДЕРЕПРЕССИИ ГЕНА *c-fos*
ПРИ ДЕЙСТВИИ СТРЕСС-ФАКТОРОВ НА ФИБРОБЛАСТЫ,
ТРАНСФОРМИРОВАННЫЕ ОНКОГЕНАМИ *E1A* И *cHa-ras***

© А. Н. Кукушкин,^{1, 2, *} С. Б. Светличкова,^{1, 2} В. А. Поступов^{1, 2}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
² Кафедра цитологии и гистологии С.-Петербургского государственного университета;
* электронный адрес: kan@mail.cytspb.rssi.ru

В фибробластах, трансформированных онкогенами *E1A* и *cHa-ras* (линия клеток E1A+ras), экспрессия гена раннего ответа *c-fos* репрессирована и не активируется после добавления сыворотки к голодющим клеткам. Ранее нами показано, что такие стресс-факторы, как анизомицин, способны активировать транскрипцию гена *c-fos* в трансформантах E1A+ras, причем большую роль в активации играет MEK/ERK-сигнальный путь. В настоящей работе мы исследовали роль МКР-1-зависимой регуляции гена *c-fos* через дефосфорилирование ERK-киназ. Показано, что транскрипция гена *MKP-1* активируется анизомицином в трансформантах E1A+ras максимум на 1 ч, далее происходит снижение уровня транскрипции. Использование ингибиторов MAP-киназ показало, что транскрипция гена *MKP-1* зависит от киназных каскадов MEK/ERK и JNK, но не p38. Трансфекция в клетки интерферирующей siPHK *MKP-1* усиливает индуцированную анизомицином транскрипцию гена *c-fos*. Таким образом, протеинфосфатаза МКР-1 осуществляет негативную регуляцию транскрипции гена *c-fos*, дефосфорилируя ERK-киназы, которые являются ключевым сигнальным звеном при действии стрессового агента анизомицина в трансформированных клетках E1A+ras.

Ключевые слова: гены *MKP-1* и *c-fos*, анизомицин, трансформированные фибробlastы, онкогены *E1A* и *cHa-ras*.

Принятые сокращения: АМ — анизомицин, АФК — активные формы кислорода, КИ — киназные ингибиторы, DCF — диацетат дихлордигидрофлуоресцеина, DMSO — диметилсульфоксид, ECL — усиленная хемолюминесценция, FCS — эмбриональная сыворотка теленка, HDAC — гистондеацетилазы, HDACI — ингибиторы гистондеацетилаз, MAP-киназы — митогенактивируемые протеинкиназы, MEK — киназа ERK-киназы, МКР — фосфатазы MAP-киназ, PCR — полимеразная цепная реакция, PMSF — фенилметилсульфонилфторид, RT — обратная транскрипция.

В фибробластах грызунов химические стрессорные агенты (анизомицин, арсенит натрия и др.) через каскады MAP-киназ индуцируют транскрипционную активацию генов раннего ответа, таких как *c-fos* и *c-jun* (Hazzalin et al., 1998; Torocsik, Szeberenyi, 2000; Li et al., 2003; Кукушкин и др., 2005). Ранее нами было показано, что в фибробластах, трансформированных онкогенами *E1A* и *cHa-ras*, активация транскрипцииprotoонкогена *c-fos* при действии анизомицина в основном зависит от MEK/ERK-киназ (Kukushkin et al., 2008). Активация MAP-киназ после фосфорилирования по специфическим остаткам треонина и тирозина имеет обратимый характер, так как они дефосфорилируются протеинфосфатазами МКР с двойной специфичностью. МКР дефосфорилируют киназы ERK, SAPK/JNK и p38 (Sun et al., 1993; Duff et al., 1995; Franklin, Kraft, 1997; Wu, Bennett, 2005; Lawan et al., 2013), а также другие фосфорилированные белки, например гистон H3 по серину-10 (Kinney et al., 2009). Сами по себе гены *MKP* быстро индуцируются различными ростовыми факторами (сыворотки, EGF, NGF) и стрессовыми воздействиями, например ультрафиолетом (Liu et al., 1995; Misra-Press et al., 1995), поэтому их также

можно отнести к генам задержанного раннего ответа (Keyse, Emslie, 1992; Sun et al., 1993; Lawan et al., 2013). Транскрипция гена *MKP-1* зависит от активации тирозиновых киназ и протеинкиназы C (Metzler et al., 1998; Valledor et al., 1999), а также активации MAP-киназы p38 (Palm-Leis et al., 2004). Показано, что генерация в клетках супероксидного анион-радикала или обработка H_2O_2 может индуцировать транскрипционную активацию гена *MKP-1* (Baas, Berk, 1995; Metzler et al., 1998), обусловленную индукцией JNK/AP1-регуляторного пути (Xu et al., 2004). В свою очередь при экспрессии белка МКР-1, как было сказано выше, происходит инактивация MAP-киназ, в частности ERK1/2, и наблюдается последующее ингибирование транскрипционной активности гена раннего ответа *c-fos*, индуцированной ростовыми факторами (Brondello et al., 1995).

Есть данные о том, что при индукции MEK/ERK-киназного сигнального пути MAP-киназы ERK1/2 могут фосфорилировать и тем самым активировать фосфатазу МКР-1 (Wang et al., 2007), а также повышать стабильность ее молекулы (Brondello et al., 1999). Было показано, что ингибитор трансляции белков циклогексимид наряду

с ингибитором тирозиновых фосфатаз ортованадатом натрия может подавлять активность MKP-1, тем самым способствуя активации ERK-киназ (Cook et al., 1997; Lin, Hsu, 2000). Каталитический домен протеинфосфатазы MKP-1 содержит остаток цистеина (Cys-258), существенный для поддержания окислительно-восстановительного статуса фермента и его активности (Sun et al., 1993; Terphly, Carter, 2007). Пероксид водорода и другие активные формы кислорода (АФК) могут окислять остатки цистеина, что приводит к инактивации каталитического домена MKP-1 (Denu, Dixon, 1995; Van Montfort et al., 2003). Такая окисленная форма MKP-1 может быстро подвергаться протеасомной деградации (Kamata et al., 2005).

В предыдущих работах мы показали (Кукушкин и др., 2005; Kukushkin et al., 2008), что в нормальных фибробластах крысы и в фибробластах, трансформированных онкогенами *E1A* и *cHa-ras*, стрессовый агент анизомицин в низких концентрациях вызывает быструю транскрипционную активацию генов раннего ответа, таких как *c-fos*, *c-jun* и *Egr-1*. Транзиторная активация гена *c-fos* в основном обусловлена функционированием MEK/ERK-киназного пути и повышенным уровнем фосфорилирования киназ ERK1/2 (Kukushkin et al., 2008). В свою очередь транскрипция генов *MKP* может регулироваться через MAP-киназные каскады, которые в E1A+ras-трансформантах конститутивно активированы (Kukushkin et al., 2002).

Целью настоящей работы было исследование роли гена *MKP-1* в индуцированной анизомицином активации транскрипции гена *c-fos* в E1A+ras-трансформированных клетках.

Материал и методика

Клетки. Эмбриональные фибробlastы крысы (REF) или мыши (MEF), трансформированные онкогенами *E1A* и *cHa-ras* (линии клеток E1A+ras) (Поспелова и др., 1990), культивировали на среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки теленка (FCS). E1A+ras-трансформированные клетки MEF с генотипом *JNK1/2-/-* были любезно предоставлены А. И. Бричкиной (Институт цитологии РАН). Клетки с плотностью посева около 70 % от насыщающей плотности подвергали голоданию в течение 24 ч в среде DMEM, содержащей 0,5 % FCS. Голодящие клетки обрабатывали разное время (от 10 мин до 2 ч) раствором анизомицина (ICN, США) в DMSO с конечной концентрацией в среде 50 нг/мл. Кроме того, такие клетки инкубировали в течение 1 ч в среде, содержащей 10 % FCS (сывороточная стимуляция), или подвергали стрессовым воздействиям (200 мкМ пероксида водорода и 50 мкМ арсенита натрия). В некоторых опытах за 30 мин до добавления анизомицина клетки подвергали действию специфических ингибиторов протеинкиназ (Calbiochem, США), также растворенных в DMSO: 50 мкМ PD98059 — ингибитора MEK-киназ, 20 мкМ SB203580 — ингибитора p38-киназ, 20 мкМ SP600125 — ингибитора JNK-киназ. К контрольным клеткам добавляли соответствующий объем растворителя DMSO (Sigma, США), при этом обычно конечная концентрация DMSO составляла 14 мМ. В других экспериментах клетки инкубировали 6 ч в присутствии ингибиторов гистондеацетилаз (HDACI) — водных растворов 10 мМ бутират натрия (Sigma) или 2 мМ вальпроевой кислоты (ICN), а затем обрабатывали анизомицином или DMSO.

Клетки E1A+ras (трансформированные клетки REF), выросшие на чашках в низкой плотности (~50 %), переводили в среду Opti-MEM (Gibco, США) без сыворотки и временно трансфицировали двухцепочечной малой интерферирующей РНК (siРНК) для мРНК гена *MKP-1* крысы в конечной концентрации 20 нМ с помощью реагента Code Breaker по соответствующей процедуре фирмы-производителя (Promega, США). siРНК *MKP-1* длиной 19 нуклеотидов была сгенерирована нами и синтезирована компанией Синтол (Москва). Из клеток получали тотальную РНК или белковые лизаты.

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (RT-PCR). Общую клеточную РНК выделяли гуанидинтиоцианатным методом (Chomczynski, Sacchi, 1987) с последующей проверкой концентрации и целостности РНК электрофорезом в денатурирующих условиях с формальдегидом (Маниатис и др., 1984). Реакции обратной транскрипции (RT) и амплификации кДНК (PCR), а также последующий электрофорез продуктов PCR проводили, как описано ранее (Kukushkin et al., 2002). Нуклеотидные последовательности PCR-праймеров для кДНК генов *c-fos* и *GAPDH* (внутренний контроль транскрипции), условия PCR и размеры образующихся фрагментов ДНК также даны в предыдущей работе (Kukushkin et al., 2002). PCR-праймеры для кДНК генов *MKP-1* крысы и мыши были сгенерированы нами и синтезированы компанией Синтол: 5'-GTGGGTGGG-TGACTTGTCTC-3'/5'-AGCAACTGGGAGAACAGC-3' (размер PCR-фрагмента — 400 п. н., температура отжига — 56,9 °С). Реакции PCR продолжались не более 25 циклов, в ходе которых фрагменты ДНК амплифицировались линейно. Продукты PCR разделяли электрофоретически в 2%-ном агарозном геле в 40 мМ Трис-ацетатном буфере, pH 7,8. Маркерные фрагменты ДНК Gel Ruler, кратные 100 п. н., были произведены фирмой Fermentas (Литва). Все эксперименты PCR повторяли не менее двух раз. Интенсивность полос продуктов PCR оценивали количественно послеdensитометрии и выражали в виде значений относительной интенсивности (усл. ед.) для каждой электрофорограммы.

Иммуноблотинг. Клеточные лизаты получали, как и ранее (Kukushkin et al., 2002), в присутствии ингибиторов протеаз (1 мМ PMSF, пепстатина А, леупептина, аprotинина в концентрации по 10 мкг/мл каждый (Sigma)) и фосфатаз (1 мМ ортованадата натрия, 5 мМ EGTA и 10 мМ фторида натрия (все от Sigma)). Концентрацию белка определяли методом Bradford (Bradford, 1976). Белки клеточных экстрактов в количестве 80 мкг разделяли электрофоретически в 10%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) в 25 мМ Трис-глициновом буфере, pH 8,3, содержащем 0,1 % SDS. Маркерами молекулярной массы служили цветные белки из набора «See Blue Plus2» (Invitrogen, США). После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Trans-Blot (Bio-Rad, США) и интересующие белки выявляли с помощью антител мыши для ERK1/2 (sc-7383, Santa Cruz, США). В качестве вторых антител использовали антитела кролика против иммуноглобулинов мыши (RAM, A9044, Sigma), конъюгированные с пероксидазой хрена. Белок на мембранных выявляли стандартным методом усиления хемолюминесценции (ECL, Sigma) или его более чувствительным вариантом (Pierce, США) в соответствии с инструкциями фирм-производителей. Иммуноблотинг с антителами повторяли 2 раза.

Флуоресцентная микроскопия. Клетки E1A+ras крысы выращивали на покровных стеклах (Men-

zel, Германия) в среде DMEM, содержащей 10 % FCS, затем их подвергали голоданию в течение 24 ч в среде DMEM, содержащей 0.5 % FCS, после чего обрабатывали 10 мин раствором анизомицина в DMSO в конечной концентрации 50 нг/мл среды или соответствующим количеством DMSO (контроль). Живые клетки на стеклах не фиксировали, среду на чашках со стеклами заменяли на раствор Хэнкса, в который добавляли раствор диацетата дихлордигидрофлуоросцеина в этаноле (DCF, Sigma, маточный раствор 5 мг/мл) до конечной концентрации 5 мкг/мл для определения АФК. Чашки со стеклами инкубировали 20 мин при 37 °C. Затем клетки на стеклах промывали 3 раза раствором PBS и 1 раз водой. Препараторы клеток просматривали на конфокальном микроскопе Axiovert 200M (Zeiss, Германия) с камерой DFC420 (Leica, США). Флуоресценцию возбуждали лазером с длиной волны 488 нм, регистрировали при 520 нм.

Результаты и обсуждение

Ранее нами было показано, что анизомицин в сублетальных концентрациях действует на эмбриональные фибробласты крысы, трансформированные онкогенами *E1A* и *cHa-ras* (линия E1A+ras), как стрессовый агент, вызывая транскрипционную активацию генов раннего ответа *c-fos*, *c-jun* и *Egr-1* (Кукушkin и др., 2005; Kukushkin et al., 2008). В E1A+ras-трансформантах ген *c-fos* репрессирован, и его базальная транскрипция находится на очень низком уровне, однако при действии анизомицина транскрипция *c-fos* быстро усиливается и достигает максимума через 1 ч, после чего наблюдается ее спад (рис. 1, *a*, верхняя панель). В предыдущей работе мы установили, что за временную активацию транскрипции *c-fos* анизомицином в основном ответствен киназный каскад MEK/ERK (Kukushkin et al., 2008). Действительно, уже через 10 мин действия анизомицина в клетках E1A+ras увеличивается содержание активированных фосфорилированных форм киназ ERK1 и ERK2 (рис. 2), оно достигает максимального уровня через 40 мин, а через 1 ч снижается. При этом содержание нефосфорилированных форм киназ ERK1/2, выступавших в качестве контроля нагрузки белка на гель при электрофорезе, не изменялось (даные не показаны). Соответствующая передача сигнала от киназ ERK1/2 на эффекторные киназы и транскрипционные факторы семейства TCF, в частности Elk-1, запускает индуцибельную транскрипцию гена *c-fos* (Kukushkin et al., 2002). Баланс дефосфорилированных (неактивных) и фосфорилированных (активных) киназ ERK1/2 может определяться активностью протеинфосфатазы MKP-1.

Так как ген *MKP-1* кодирует протеинфосфатазу MKP-1, которая важна для регуляции MAP-киназных каскадов, участвующих в активации транскрипции генов *c-fos* и *c-jun*, мы решили исследовать функционирование гена *MKP-1* на транскрипционном уровне в E1A+ras-трансформантах в присутствии стрессовых факторов. В клетках E1A+ras, голодавших в течение 1 сут в присутствии 0.5 % FCS, ген *MKP-1* транскрибируется на низком уровне (рис. 1, *b*). Стимуляция клеток 10 % FCS (1 ч) не приводила к изменению транскрипции *MKP-1*, как и транскрипции гена *c-fos* (Kukushkin et al., 2002), однако обработка клеток в течение 1 ч пероксидом водорода (200 мкМ), арсенитом натрия (50 мкМ) и анизомицином (50 нг/мл) повышала уровень его транскрипции (рис. 1, *b*). Поскольку транскрипционная активация гена *MKP-1*

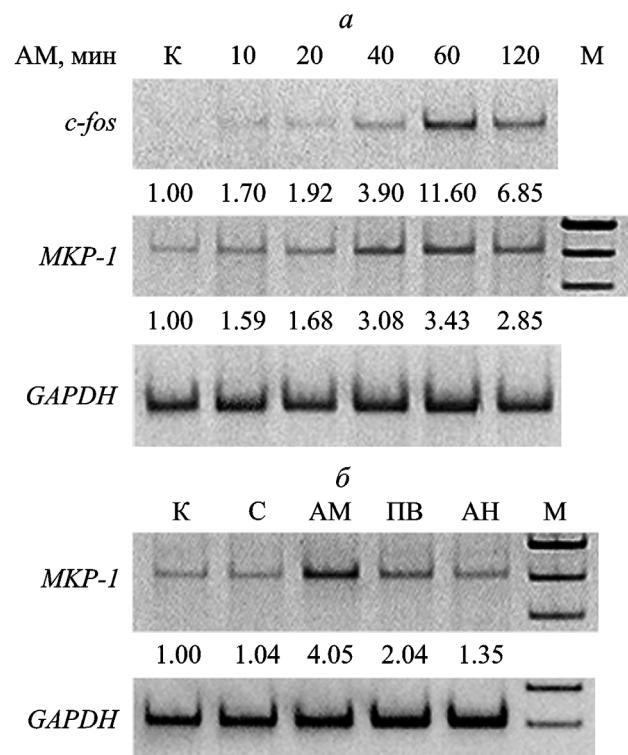


Рис. 1. Электрофоретическое разделение продуктов RT-PCR с праймерами к кДНК генов *c-fos* (размер PCR -фрагмента 356 п. н.), *MKP-1* (400 п. н.) и *GAPDH* (297 п. н.) в 2%-ном агарозном геле в 40 mM Трис-ацетатном буфере, pH 7.8.

a — К — контроль (клетки обрабатывали DMSO), AM — 50 нг/мл анизомицина в течение 10, 20, 40, 60 или 120 мин. *б* — К — контроль (DMSO), С — 10 % сыворотки, АМ — 50 нг/мл анизомицина, ПВ — 200 мкМ пероксида водорода, АН — 50 мкМ арсенита натрия (время всех обработок 1 ч). М — маркерные фрагменты ДНК, кратные 100 п. н. Под каждой дорожкой приведены относительные значения интенсивности полос (усл. ед.) анализируемых PCR-фрагментов *c-fos* или *MKP-1* для одного из экспериментов. Перед обработками фибробlastы крысы, трансформированные онкогенами *E1A* и *cHa-ras* (линия E1A + ras), подвергали голоданию при низком содержании сыворотки (0.5 % FCS) в течение 1 сут.

была наибольшей при действии низкой концентрации анизомицина (50 нг/мл) в дальнейших исследованиях мы стали использовать в качестве стрессового фактора только анизомицины. Влияние анизомицина на транскрипцию *MKP-1* становится заметным уже через 10 мин, при увеличении времени обработки клеток до 20–40 мин оно усиливается и достигает максимума через 1 ч, после чего идет на спад через 2 ч (рис. 1, *a*, средняя панель). Таким образом, характер транскрипции гена *MKP-1* при дейст-

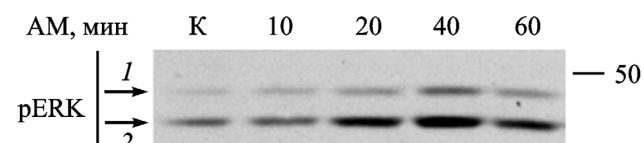


Рис. 2. Иммуноблот фосфорилированных форм (pERK) протеинкиназ ERK1/2 в клетках E1A + ras, обработанных АМ (50 нг/мл) в течение 10, 20, 40 или 60 мин.

К — контрольные необработанные клетки. Белки клеточных экстрактов разделяли электрофорезом в 10%-ном ПААГ, переносили на мембрану и выявляли исследуемые белки в присутствии антител против фосфобелков ERK1 и ERK2. Стрелки 1, 2 — положение pERK1 и pERK2 соответственно. Справа указано положение белкового маркера с мол. массой 50 кДа.

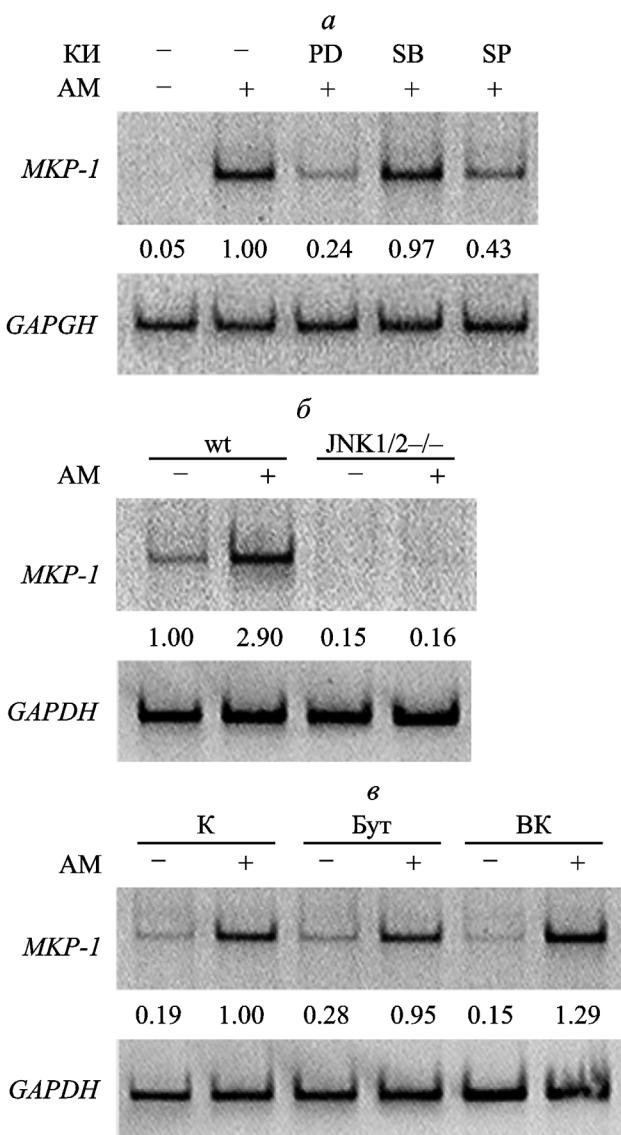


Рис. 3. Электрофоретическое разделение продуктов RT-PCR с праймерами к кДНК генов *MKP-1* и *GAPDH*.

a — клетки E1A + ras крысы голодали 1 сут в среде DMEM, содержащей 0.5 % сыворотки, затем их 1.5 ч обрабатывали DMSO (—) или специфическими киназными ингибиторами (КИ): 50 мкМ PD98059 (PD), 20 мкМ SB203580 (SB), 10 мкМ SP600125 (SP), а через 30 мин индуцировали анизомицином (+) (AM, 50 нг/мл среды, 1 ч). В качестве контроля (—) использовали DMSO — растворитель КИ и АМ. *б* — клетки двух линий MEF, трансформированных онкогенами *E1A* и *c-Ha-ras*, исходные E1A + ras (wt) и с нокаутом по генам *JNK1* и *JNK2* (*JNK1/2^{-/-}*) голодали 1 сут в среде DMEM с 0.5 % сывороткой, после чего их обрабатывали 1 ч DMSO (—) или 50 нг/мл АМ (+). *в* — голодающие клетки E1A + ras крысы инкубировали 6 ч с HDACI: 10 мМ бутиратом натрия (Бут), или 2 мМ валпроевой кислоты (ВК), или без HDACI (К, контроль), затем клетки обрабатывали 1 ч 50 нг/мл АМ (+) или DMSO (—). Под дорожками для *MKP-1* приведены относительные значения интенсивности полос (усл. ед.) анализируемых PCR-фрагментов *MKP-1* для одного из опытов.

ции анизомицина вполне позволяет относить его к генам раннего ответа.

Поскольку анизомицин активирует транскрипцию гена *MKP-1*, возникает вопрос о том, какие регуляторные пути опосредуют активацию клеток E1A+ras. Клетки культивировали в среде с низким содержанием сыворотки (24 ч, 0.5 % FCS), затем обрабатывали 1.5 ч специфическими ингибиторами MAP-киназ (ингибитором MEK-киназ — 50 мкМ PD98059, ингибитором p38-ки-

наз — 20 мкМ SB203580 и ингибитором JNK-киназ — 10 мкМ SP600125) или растворителем ингибиторов DMSO (контроль) и подвергали воздействию анизомицина в течение 1 ч при его концентрации в среде 50 нг/мл.

На рис. 3, *a* можно видеть, что индуцированная анизомицином транскрипция *MKP-1* значительно блокируется ингибитором MEK/ERK-киназного каскада PD98059, в меньшей степени — ингибитором JNK-киназ SP600125, тогда как ингибитор p38-киназ SB203580 практически не оказывает влияния на интенсивность транскрипта *MKP-1*. Таким образом, можно заключить, что MEK/ERK-киназный каскад действительно является основным для активации транскрипции гена *MKP-1* после действия анизомицина. То же относится и к гену *c-fos*. Ранее мы установили, что анизомицин индуцировал фосфорилирование и активацию киназ ERK1/2 и JNK1 в трансформированных клетках E1A+ras, что в свою очередь приводило к активации транскрипции генов раннего ответа *c-fos* и *c-jun* (Кукушкин и др., 2005).

Вклад JNK-киназного каскада в регуляцию транскрипции гена *MKP-1* был показан нами на E1A+ras-трансформированных фибробластах мыши, в которых были нокаутированы гены *JNK1* и *JNK2*. В трансформантах с нокаутами генов *JNK1/2* транскрипты *MKP-1* совсем отсутствуют как в контрольных, так и в обработанных анизомицином клетках (рис. 3, *б*). Этот факт подчеркивает важность для регуляции транскрипции гена *MKP-1* не только MEK/ERK-киназного каскада, но и JNK-киназного пути тоже.

Активность фосфатазы *MKP-1* в нестимулированных фибробlastах может снижать уровень фосфорилирования ERK-киназ (рис. 2) и соответственно транскрипцию гена *c-fos* в контрольных клетках (рис. 1, *а*). После стимулирующего действия анизомицина в течение короткого

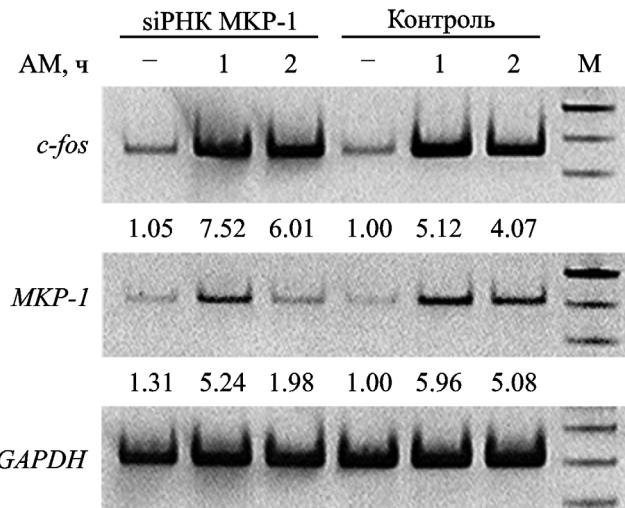


Рис. 4. Электрофоретическое разделение продуктов RT-PCR с праймерами к кДНК генов *c-fos*, *MKP-1* и *GAPDH*.

M — маркерные фрагменты ДНК, кратные 100 п. н. Под дорожками для *c-fos* и *MKP-1* приведены относительные значения интенсивности полос (усл. ед.) анализируемых PCR-фрагментов для одного из экспериментов. E1A + ras-трансформированные клетки REF временно трансфицировали двухцепочечной малой интерферирующей ДНК для мРНК гена *MKP-1* крысы (siPHK MKP-1) или же клетки подвергали той же процедуре трансфекции, но без внесения siPHK (контроль). Затем контрольные и трансфицированные клетки обрабатывали 2 ч DMSO (—) или анизомицином (AM 50 нг/мл) в течение 1 или 2 ч. Из клеток выделяли тотальную РНК и проводили RT-PCR-анализ.

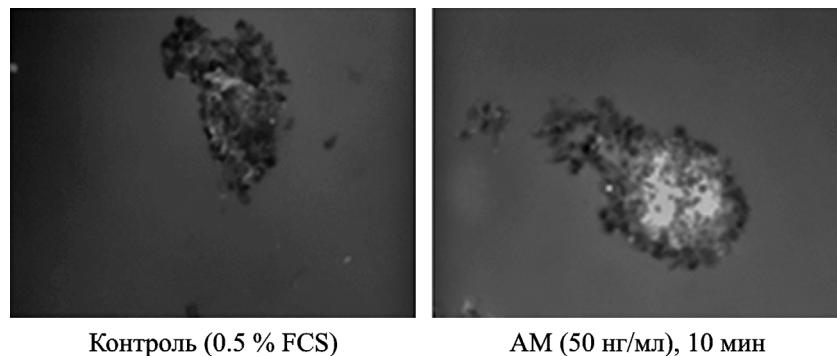


Рис. 5. Флуоресценция АФК-чувствительного красителя DCF в клетках крысы E1A + ras после 10-минутного действия 50 нг/мл АМ.

Клетки голодали 1 сут в среде DMEM, содержащей 0.5 % сыворотки. В контролльном варианте к клеткам добавляли DMSO. Конфокальная микроскопия. Об. 100×.

времени происходит накопление активных форм киназ ERK1/2 (рис. 2), а затем соответственно транскриптов *c-fos* и *MKP-1* и далее их белковых продуктов. Более того, из данных литературы известно, что киназы ERK1/2 могут непосредственно фосфорилировать и тем самым активировать и стабилизировать фосфатазу MKP-1 (Brondello et al., 1999; Wang et al., 2007). Однако накопление белка MKP-1 приводит к дефосфорилированию его субстратов, в частности киназ ERK1/2, и последующему частичному подавлению транскрипции как гена *c-fos*, так и самого гена *MKP-1* через 2 ч после действия анизомицина (рис. 1, *a*).

Транскрипционная компетентность многих генов зависит от степени компактности хроматина в их промоторных областях, которая обусловлена главным образом характером модификаций коровых гистонов, в частности ацетилированием. Интенсивность ацетилирования гистонов и других ядерных белков регулируется балансом активностей ацетилтрансфераз и деацетилаз в клетках. Применение *in vivo* ингибиторов гистондеацетилаз (HDACI), таких как бутират натрия, вызывает увеличение содержания ацетилированных форм коровых гистонов и усиление транскрипции некоторых важных генов, например *c-fos*, в клетках E1A+ras (Abramova et al., 2003). В этой связи нам представлялось интересным оценить влияние HDACI на транскрипцию гена *MKP-1* в трансформантах E1A+ras. Клетки культивировали при низком содержании сыворотки в течение 6 ч в присутствии HDACI (10 мМ бутират натрия или 2 мМ вальпроевая кислота) и затем обрабатывали анизомицином. Результаты на рис. 3, *b* показывают, что бутират натрия практически не меняет интенсивность базальной и индуцированной анизомицином транскрипции *MKP-1*, тогда как вальпроевая кислота несколько усиливает транскрипцию в присутствии анизомицина. В целом данный эксперимент позволяет отнести ген *MKP-1* к генам, транскрипция которых напрямую не определяется активностью HDAC в нормальных и E1A+ras-трансформированных фибробластах (*c-jun*, *Egr-1* и др.) (Abramova et al., 2003).

Для оценки функциональной взаимосвязи между экспрессией генов раннего ответа *c-fos* и *MKP-1* при воздействии анизомицина на E1A+ras-трансформированные клетки мы использовали двухцепочечную малую интерферирующую РНК (siPHK) для мРНК гена *MKP-1* крысы, которую временно трансфицировали в клетки E1A+ras с помощью Code Breaker Reagent (Promega). Далее клетки

обрабатывали анизомицином (1 или 2 ч) или DMSO (контроль), выделяли тотальную РНК для анализа RT-PCR. Трансфекция siPHK *MKP-1* снижает уровень транскрипции гена *MKP-1* при действии анизомицина, что особенно заметно для 2-часовой инкубации с ним (рис. 4). Интересно, что трансфекция siPHK *MKP-1* дополнительно увеличивает интенсивность транскрипции гена *c-fos*, индуцированную анизомицином в течение 1 и 2 ч, на фоне ее высокого уровня, который наблюдается в нетрансформированных контролльных клетках E1A+ras (рис. 4). Таким образом, введение siPHK *MKP-1* подавляет транскрипцию гена *MKP-1*, что соответственно снижает содержание протеинфосфатазы MKP-1. В результате большее количество молекул ERK-киназ остается в активном фосфорилированном состоянии и способно участвовать в активации транскрипции гена *c-fos* анизомицином.

Ранее мы также показали, что в фибробlastах, трансформированных онкогенами *E1A* и *c-Ha-ras*, повышен уровень АФК по сравнению с нормальными клетками (Kukushkin et al., 2008). Уровень АФК еще более возрастает при воздействии анизомицина. Использование флуоресцентного субстрата DCF, специфично взаимодействующего с АФК, в частности с супероксид-анионом, позволило с помощью конфокальной микроскопии качественно подтвердить значительное возрастание уровня АФК уже через 10 мин после обработки E1A+ras-трансформантов анизомицином (рис. 5). Аналогичные количественные результаты были получены с помощью проточной цитофлуориметрии в присутствии DCF, когда уровень АФК возрастал на 40 % при обработке анизомицином клеток E1A+ras (данные не показаны). Повышение содержания АФК может приводить к окислению остатков цистеина в каталитическом центре молекулы протеинфосфатазы MKP-1 и инактивации ее фосфатазной функции в отношении субстратов (Denu, Dixon, 1995; Van Montfort et al., 2003). Поскольку киназы ERK являются субстратами для MKP-1, анизомицин зависимое накопление АФК и инактивация свободными радикалами фосфатазы MKP-1 являются дополнительными факторами для поддержания MEK/ERK-киназного каскада в активном состоянии, что обеспечивает анизомицин-индуцирующую активацию гена *c-fos*.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 06-04-49261 и 11-04-01393), программ прези-

диума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и С.-Петербургского государственного университета (1.37.122.2011).

Список литературы

- Kukushkin A. N., Svetlikova C. B., Pospelov V. A. 2005. Изучение активации генов раннего ответа *c-fos*, *c-jun*, *Egr-1* в клетках, трансформированных онкогенами *E1A* и *cHa-ras*, при действии анизомицина. Молекуляр. биол. 39 (1) : 80—88.
- Maniatis T., Frisch E., Сэмбрюк Дж. 1984. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 480 с.
- Поспелова Т. В., Кислякова Т. В., Медведев А. В., Светликова С. Б., Пospelov V. A. 1990. Характеристика трансформированного фенотипа и экспрессии CAT-плазмид в клетках эмбриональных фибробластов крысы, трансформированных онкогенами *E1A* + *cHa-ras*. Цитология. 32 (1) : 148—155.
- Abramova M. V., Kukushkin A. N., Svetlikova S. B., Pospelova T. V., Pospelov V. A. 2003. Selective repression of *c-fos* gene transcription in rat embryo fibroblasts transformed by oncogenes *E1A* and *cHa-ras*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 306 : 483—487.
- Baas A. S., Berk B. C. 1995. Differential activation of mitogen-activated protein kinases by H_2O_2 and O_2^- in vascular smooth muscle cells. Circ. Res. 77 : 29—36.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 : 248—254.
- Brondello J. M., McKenzie F. R., Sun H., Tonks N. K., Pouyssegur J. 1995. Constitutive MAP kinase phosphatase (MKP-1) expression blocks G₁ specific gene transcription and S-phase entry in fibroblasts. Oncogene. 10 : 1895—1904.
- Brondello J. M., Pouyssegur J., McKenzie F. R. 1999. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. Science. 286 : 2514—2517.
- Chomczynski P., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 62 : 156—159.
- Cook S. J., Beltman J., Cadwallader K. A., McMahon M., McCormick F. 1997. Regulation of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression by extracellular signal-related kinase-dependent and Ca²⁺-dependent signal pathways in Rat-1 cells. J. Biol. Chem. 272 : 13 309—13 319.
- Denu J. M., Dixon J. E. 1995. A catalytic mechanism for the dual-specific phosphatases. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 92 : 5910—5914.
- Duff J. L., Monia B. P., Berk B. C. 1995. Mitogen-activated protein (MAP) kinase is regulated by the MAP kinase phosphatase (MKP-1) in vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem. 270 : 7161—7166.
- Franklin C. C., Kraft A. S. 1997. Conditional expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase MKP-1 preferentially inhibits p38 MAPK and stress-activated protein kinase in U937 cells. J. Biol. Chem. 272 : 16 917—16 923.
- Hazzalin C. A., Le Panse R., Cano E., Mahadevan L. C. 1998. Anisomycin selectively desensitizes signalling components involved in stress kinase activation and *fos* and *jun* induction. Mol. Cell. Biol. 18 : 1844—1854.
- Kamata H., Honda S., Maeda S., Chang L., Hirata H., Karin M. 2005. Reactive oxygen species promote TNFalpha-induced death and sustained JNK activation by inhibiting MAP kinase phosphatases. Cell. 120 : 649—661.
- Keyse S. M., Emslie E. A. 1992. Oxidative stress and heat shock induce a human gene encoding a protein-tyrosine phosphatase. Nature. 359 : 644—647.
- Kinney C. M., Chandrasekharan U. M., Yang L., Shen J., Kinster M., McDermott M. S., DiCorleto P. E. 2009. Histone H3 as a novel substrate for MAP kinase phosphatase-1. Amer. J. Physiol. Cell. Physiol. 296 : 242—249.
- 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.
- Kukushkin A. N., Svetlikova S. B., Amanzholov R. A., Pospelov V. A. 2008. Anisomycin abrogates repression of protooncogene *c-fos* transcription in *E1A*+*cHa-ras*-transformed cells through activation of MEK/ERK kinase cascade. J. Cell. Biochem. 103 : 1005—1012.
- Lawan A., Shi H., Gatzke F., Bennett A. M. 2013. Diversity and specificity of the mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 functions. Cell. Mol. Life Sci. 70 : 223—237.
- Li J., Gorospe M., Barnes J., Liu Y. 2003. Tumor promoter arsenite stimulates histone H3 phosphoacetylation of proto-oncogenes *c-fos* and *c-jun* chromatin in human diploid fibroblasts. J. Biol. Chem. 278 : 13 183—13 191.
- Lin W. W., Hsu Y. W. 2000. Cycloheximide-induced cPLA(2) activation is via the MKP-1 down-regulation and ERK activation. Cell. Signal. 12 : 457—461.
- Liu Y., Gorospe M., Yang C., Holbrook N. J. 1995. Role of mitogen-activated protein kinase phosphatase during the cellular response to genotoxic stress. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase activity and AP-1-dependent gene activation. J. Biol. Chem. 270 : 8377—8380.
- Metzler B., Hu Y., Sturm G., Wick G., Xu Q. 1998. Induction of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 by arachidonic acid in vascular smooth muscle cells. J. Biol. Chem. 273 : 33 320—33 326.
- Misra-Press A., Rim C. S., Yao H., Roberson M. S., Stork P. J. S. 1995. A novel mitogen-activated protein kinase phosphatase. Structure, expression, and regulation. J. Biol. Chem. 270 : 14 587—14 596.
- Palm-Leis A., Singh U. S., Herbelin B. S., Olsovsky G. D., Baker K. M., Pan J. 2004. Mitogen-activated protein kinases and mitogen-activated protein kinase phosphatases mediate the inhibitory effects of all-trans retinoic acid on the hypertrophic growth of cardiomyocytes. J. Biol. Chem. 279 : 54 905—54 917.
- Sun H., Charles C. H., Lau L. F., Tonks N. K. 1993. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase *in vivo*. Cell. 75 : 487—493.
- Tephly L. A., Carter A. B. 2007. Differential expression and oxidation of MKP-1 modulates TNF-alpha gene expression. Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 37 : 366—374.
- Torocsik B., Szeberenyi J. 2000. Anisomycin uses multiple mechanisms to stimulate mitogen-activated protein kinases and gene expression and to inhibit neuronal differentiation in PC12 phaeochromocytoma cells. Eur. J. Neurosci. 12 : 527—532.
- Valledor A. F., Xaus J., Marquès L., Celada A. 1999. Macrophage colony-stimulating factor induces the expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 through a protein kinase C-dependent pathway. J. Immunol. 163 : 2452—2462.
- Van Montfort R. L., Congreve M., Tisi D., Carr R., Jhoti H. 2003. Oxidation state of the active-site cysteine in protein tyrosine phosphatase 1B. Nature. 423 : 773—777.
- Wang J., Zhou J. Y., Wu G. S. 2007. ERK-dependent MKP-1-mediated cisplatin resistance in human ovarian cancer cells. Cancer Res. 67 : 11 933—11 941.
- Wu J. J., Bennett A. M. 2005. Essential role for mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1 in stress-responsive MAP kinase and cell survival signaling. J. Biol. Chem. 280 : 16 461—16 466.
- Xu Q., Konta T., Nakayama K., Furusawa A., Moreno-Manzano V., Lucio-Cazana J., Ishikawa Y., Fine L. G., Yao J., Kitamura M. 2004. Cellular defense against H_2O_2 -induced apoptosis via MAP kinase-MKP-1 pathway. Free Radical Biol. Med. 36 : 985—993.

PROTEIN PHOSPHATASE MKP-1 PARTICIPATES IN *c-fos* GENE DEREPRESSION
UNDER THE ACTION OF STRESS FACTORS ON FIBROBLASTS TRANSFORMED
WITH *E1A* AND *cHa-ras* ONCOGENES

A. N. Kukushkin^{1, 2}, * *S. B. Svetlikova*^{1, 2} *V. A. Pospelov*^{1, 2}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and ² St. Petersburg State University;
* e-mail: kan@mail.cytspb.rssi.ru

Immediate-early response gene *c-fos* expression is repressed and not activated after serum stimulation of serum-starved fibroblasts transformed with *E1A* and *cHa-ras* oncogenes. We have previously shown that such stress factors as an anisomycin are able to activate *c-fos* gene transcription in *E1A* + *cHa-ras* transformants, wherein MEK/ERK signal pathway plays a major role in the activation. In the present paper, we investigated the role of MKP-1-dependent regulation of *c-fos* gene by dephosphorylation of ERK kinases. It has been shown that *MKP-1* gene transcription in *E1A* + *ras* transformants is activated by anisomycin for a maximum of 1 h, and then a reduction in the level of transcription occurs. Use of inhibitors of MAP-kinase has revealed that *MKP-1* gene transcription depends on MEK/ERK and JNK kinase cascades, but not on p38 cascade. The anisomycin-induced *c-fos* gene transcription intensified after transfection of siRNA *MKP-1* into the cells. Thus, protein phosphatase MKP-1 carries a negative regulation of *c-fos* gene transcription by dephosphorylation of ERK kinases that are a key signal component under the action of such stress reagent as anisomycin on the *E1A* + *ras*-transformed cells.

Key words: *MKP-1* and *c-fos* genes, anisomycin, transformed fibroblasts, *E1A* and *cHa-ras* oncogenes.