

## РОЛЬ МЕК/ЕРК-ПУТИ В РЕГУЛЯЦИИ HDACI-ИНДУЦИРОВАННОГО СТАРЕНИЯ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ КРЫСЫ

© Е. Ю. Кочеткова,<sup>1, 2,\*</sup> Т. В. Быкова,<sup>1</sup> С. Г. Зубова,<sup>1</sup> Т. В. Пospelova<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, и <sup>2</sup> С.-Петербургский государственный университет;  
\* электронный адрес: lena.linnaea@gmail.com

Ключевой регулятор клеточного старения комплекс mTORC1 является мишенью многих сигнальных каскадов, в том числе Ras/Raf/MEK/ERK-сигнального каскада. В работе исследовали роль MEK/ERK-ветви этого каскада в процессе старения, индуцированного ингибитором гистоновых деацетилаз (HDACI) бутиратом натрия (NaBut), в трансформированных эмбриональных фибробластах крысы. Подавление MEK/ERK-ветви ингибитором PD0325901 не предотвращает активации комплекса mTORC1 при действии NaBut. После подавления MEK/ERK-ветви активность mTORC1 возрастила и активировался комплекс mTORC2. Активация mTOR-содержащих комплексов сопровождалась реорганизацией актинового цитоскелета с образованием актиновых стресс-фибрилл и появлением некоторых признаков клеточного старения. При этом в отличие от NaBut-индуцированного старения в клетках не накапливались белки на фоне активного mTORC1 и блока клеточного цикла, что может быть обусловлено повышением активности процессов деградации. Кроме того, индукция старения в условиях подавления MEK/ERK приводит к резкому снижению жизнеспособности клеток. Таким образом, при старении в условиях подавленной MEK/ERK-ветви MAP-киназного каскада более выражен тумор-супрессорный эффект, связанный с более сильной активацией обоих mTOR-комплексов, реорганизацией актинового цитоскелета и деградацией белков.

**Ключевые слова:** mTOR, mTORC1, NaBut, MEK/ERK, PD0325901, клеточное старение.

**Принятые сокращения:** HDACI — ингибитор деацетилаз гистонов, NaBut — бутират натрия, SA- $\beta$ -Gal — ассоциированная со старением  $\beta$ -галактозидаза.

Известно, что основной причиной превращения нормальных клеток в опухолевые является подавление тумор-супрессорных антипоплиферативных программ (Hanahan, Weinberg, 2000). К их числу в первую очередь относится программа клеточного старения, так как она, вызывая блок клеточного цикла и подавление клеточного деления, является барьером для размножения бесконтрольно пролиферирующих клеток. Поэтому одним из необходимых событий многоэтапного процесса канцерогенеза является супрессия программы старения, в результате чего клетки приобретают способность неограниченно пролиферировать. Однако недавно было обнаружено, что в опухолевых клетках старение можно вновь реактивировать, используя цитостатики, облучение, ретиноиды или ингибиторы гистоновых деацетилаз (Toussaint et al., 2000). Поэтому изучение процесса реактивации программы старения в опухолях может быть перспективным подходом для терапии рака.

Старение — это активная, консервативная, эволюционно детерминированная программа, в развитие которой вовлечены определенные гены и сигнальные каскады. Ключевым регулятором клеточного старения является киназа mTOR (mammalian target of rapamycin), которая контролирует множество процессов в клетке — аутофагию, метаболизм, организацию цитоскелета, а также является сенсором оценки уровня питательных веществ и

энергии (Sarbassov et al., 2005). Так как киназа mTOR является мишенью многих сигнальных каскадов, возникновение опухолей, как правило, связано с нарушением регуляции mTOR (Guertin, Sabatini, 2007). Роль mTOR-сигналинга в процессе клеточного старения и канцерогенеза активно изучается. Одним из сигнальных путей, регулирующих mTOR, является Ras/Raf/MEK/ERK-каскад. Через эффекторную киназу ERK1,2 этот каскад осуществляет ингибирующее фосфорилирование комплекса белков туберозного склероза TSC1,2 — негативного регулятора mTOR в составе комплекса mTORC1 (Ma et al., 2005), который, согласно многочисленным данным, является регулятором клеточного старения (Demidenko, Blagosklonny, 2008; Blagosklonny, Hall, 2009; Kolesnichenko et al., 2012; Pospelova et al., 2012). Фосфорилирование димера TSC1,2 снимает его ингибирующее действие и приводит к активации комплекса mTORC1.

Считается, что конститутивная активность сигнальных каскадов лежит в основе независимости размножения опухолевых клеток от ростовых факторов, уровня питательных веществ и от субстрата (Hanahan, Weinberg, 2011). В частности, MAP-киназные каскады могут играть существенную роль в регуляции прохождения клеточного цикла (Wilkinson, Millar, 2000). Так как старение связано с блоком клеточного цикла и подавлением пролиферации, можно предполагать, что регуляция этой программы

тесно связана с активностью MAP-киназных путей. Введение онкогенного *ras* в нормальные эмбриональные фибробласты грызунов и человека приводит к блоку клеточного цикла и активирует программу ускоренного старения (Serrano et al., 1997; Benanti, Galloway, 2004). Показано, что присутствие в клетке онкогенного *ras*, активирующего множество путей, ведущих к пролиферации, может быть причиной конститутивной активности mTOR-каскада (Carriere et al., 2011; Takashima, Faller, 2013). С другой стороны, есть данные о том, что функциональная активность MEK и ERK1,2 важна для развития старения в ответ на экспрессию онкогенного *ras* (Deschenez-Simard et al., 2013). Таким образом, Ras/Raf/MEK/ERK-каскад представляет интерес как возможный участник регуляции mTOR в клеточном старении, которое можно индуцировать в опухолевых клетках.

В связи с этим целью данного исследования было выяснение роли MEK/ERK-ветви MAP-киназного каскада в регуляции каскада mTORC1 в процессе клеточного старения, индуцированного ингибитором гистоновых деацетилаз (HDACI) бутиратом натрия (NaBut) в трансформированных клетках грызунов.

## Материал и методика

**Клеточные линии.** Работу проводили на эмбриональных фибробластах крысы, трансформированных онкогенами *E1A+cHa-Ras* (клетки ERas). Клетки культивировали на среде Игла в модификации Дальбекко (DMEM), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота. Для индукции клеточного старения использовали ингибитор гистоновых деацетилаз бутират натрия (NaBut) в концентрации 4 мМ. Для ингибирования MEK/ERK-сигнального каскада использовали ингибитор PD0325901 (PD) в концентрации 1 мКМ.

Пролиферативную активность оценивали с помощью кривых клеточного роста. Клетки высевали по 30 тыс. на чашки Петри диаметром 30 мм. Подсчет производили через 1, 3 и 5 сут культивирования в присутствии и в отсутствие ингибиторов из расчета 3 чашки на временнюю точку.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла анализировали с помощью проточной цитометрии. После культивирования клетки снимали раствором трипсина в версене, осаждали центрифугированием при 350 g в течение 3 мин и промывали фосфатно-солевым буфером (PBS). Затем клетки инкубировали в течение 30 мин в присутствии 0,01 % сапонина, промывали PBS и обрабатывали раствором РНКазы A (0,1 мг/мл) в присутствии пропидия иодида при 37 °С в течение 15 мин. Анализ проводили на цитометре Odam (Brucker, Франция). Этим же методом оценивали прямое светорассеяние для определения объема клеток (Shapiro, 1988).

Изменения морфологии клеток при действии ингибиторов анализировали с помощи окрашивания по методу Романовского—Гимза. Клетки высевали на стекла и культивировали в присутствии ингибитора в течение необходимого времени, затем стекла промывали PBS и окрашивали эозин-метиленовым синим по Май-Грюнвальду в течение 4 мин при комнатной температуре. Окрашенные стекла промывали проточной водой и заключали в канадский бальзам.

Выявление ассоциированной со старением  $\beta$ -галактозидазной активности проводили по описанному методу (Dimri et al., 1995). Клетки культивировали на стеклах с ингибиторами в течение необходимого времени, затем промывали PBS и фиксировали 3%-ным раствором формальдегида в течение 20 мин при комнатной температуре. Фиксированные клетки промывали PBS и инкубировали 18 ч при 37 °С в растворе, содержащем 1 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил  $\beta$ -D-галактозида, 40 мМ буфера, содержащего лимонную кислоту и фосфат натрия, pH 6,0, 5 мМ NaCl и 2 мМ MgCl<sub>2</sub>. Об активности SA- $\beta$ -Gal судили по появлению синих гранул в цитоплазме клеток.

Для анализа накопления белка в клетках при действии ингибиторов клетки культивировали необходимое время, затем снимали при помощи раствора трипсина с версеном и отбирали 1 млн клеток для измерения. Измерение содержания белка в клетках проводили на спектрофотометре из расчета 3 измерения на 1 точку.

Активный цитоскелет визуализировали с помощью окрашивания родамин-фаллоидином. Клетки культивировали на покровных стеклах с ингибиторами необходимое время, затем фиксировали 3%-ным формальдегидом, промывали PBS и пермеабилизовали 0,1%-ным Тритоном X-100. Затем клетки промывали PBS, блокировали в 0,2 BSA на TBS-T в течение 15 мин при комнатной температуре и промывали PBS. Затем клетки инкубировали в растворе родамин-фаллоидина в течение 15 мин при 37 °С, промывали PBS и окрашивали DAPI в течение 15 мин для визуализации ядер. Изображения анализировали на микроскопе Leica TSC SL.

Для оценки накопления фосфорилированных форм 4E-BP1, кофилина, ERK1,2, АКТ, а также Ras проводили электрофорез в полиакриламидном геле. Клетки лизировали в буфере RIPA, содержащем 1 % Igepal, 0,5 % деоксихолата натрия, 0,1 % SDS, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl, 2 мМ EDTA, 60 мМ NaF, 50-кратный коктейль протеазных ингибиторов, а также ванадат натрия и PMSF. Предварительно измеряли белок в пробах по методу Бредфорд для расчета объема наносимых проб. Белки разделяли в SDS-полиакриламидном геле (12%). После разделения проводили полусухой перенос на мембрану, корректность переноса оценивали с помощью Ponceau S. Забивку мембранны проводили 10%-ным молоком на TBS-T в течение 1 ч, затем мембранны инкубировали с первичными антителами к p4E-BP1, p-кофилину, pERK1,2, pAKT/PKB и GAPDH (Cell Signalling, США) в растворе 5%-ного BSA, растворенного в буфере TBS-T, в течение 10—12 ч при 4 °С. Для выявления  $\alpha$ -тубулина мембранны инкубировали с антителами к  $\alpha$ -тубулину в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем проводили инкубацию со вторичными антителами (Goat-anti-rabbit и Rabbit-anti-mouse) — коньюгатами с пероксидазой хрина, выявляемыми методом ECL. Статистическую обработку производили при помощи программы GelPro3.

Жизнеспособность клеток оценивали по окрашиванию трипановым синим. Клетки высевали в чашки Петри и культивировали с ингибиторами необходимое время, затем снимали раствором трипсина в версене, промывали PBS и инкубировали в PBS с трипановым синим в соотношении 9 : 1 в течение 20 мин при комнатной температуре. Подсчет производили в камере Горяева из расчета 3 чашки на 1 точку.

## Результаты

Ранее было показано, что NaBut, ингибитор HDAC, индуцирует старение трансформантов ERas, характеризующееся появлением блока клеточного цикла и подавлением пролиферации, развитием гипертрофного фенотипа и увеличением объема клеток, появлением ассоциированной со старением  $\beta$ -галактозидазной активности (Зубова и др., 2005). Для того чтобы оценить вовлечение MEK/ERK-ветви в развитие программы NaBut-индуцированного старения, использовали ингибитор MEK-киназы PD.

При действии NaBut в течение 5 сут доля клеток, находящихся в S-фазе клеточного цикла, падает до 7.65 % по сравнению с 47.39 % в контроле. При этом на границе

$G_1/S$  находится около 75 % клеток, в то время как в контроле их доля составляет 33.79 % (рис. 1, *a*). Блок клеточного цикла при действии NaBut сопровождается подавлением пролиферативной активности, как это видно по кривым клеточного роста (рис. 1). При ингибионной активности MEK/ERK под действием NaBut доля клеток в S-фазе снижается до 14.44 %, что согласуется с характером кривых клеточного роста: в этом случае на 5-е сут происходит еще более сильное подавление пролиферативной активности клеток, чем при действии одного NaBut (рис. 1, *b*). Ингибирование MEK/ERK существенно сказывается и на жизнеспособности клеток: согласно результатам окрашивания трипановым синим, через 5 сут действия NaBut в присутствии PD их жизнеспособность снижается. В случае культивирования клеток с NaBut

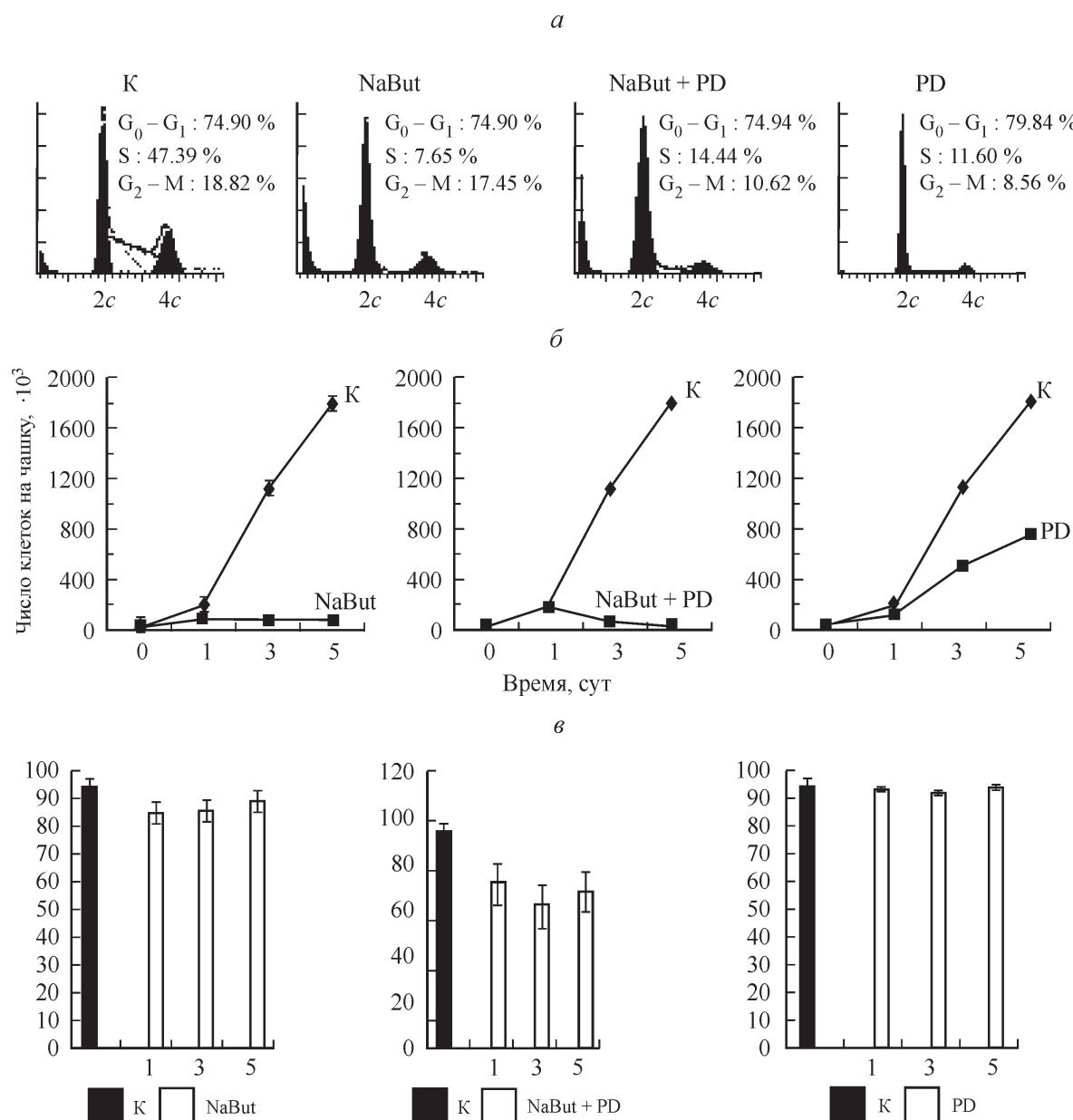


Рис. 1. Изменение распределения клеток по фазам клеточного цикла (*a*), их пролиферативной активности (*б*) и жизнеспособности (*в*) в разных условиях: в контроле (К), при индуцированном старении (NaBut), при старении в условиях ингибионной MEK/ERK-ветви сигнального каскада в течение 5 сут (NaBut + PD) и при ингибионии только MEK/ERK-ветви (PD).

*а:* по горизонтали — количество ДНК, ед. плоидности, *с*; по вертикали — число клеток. На гистограммах указана доля клеток (%) в разных фазах клеточного цикла. *в:* по горизонтали — время, сут; по вертикали — доля живых клеток, %.

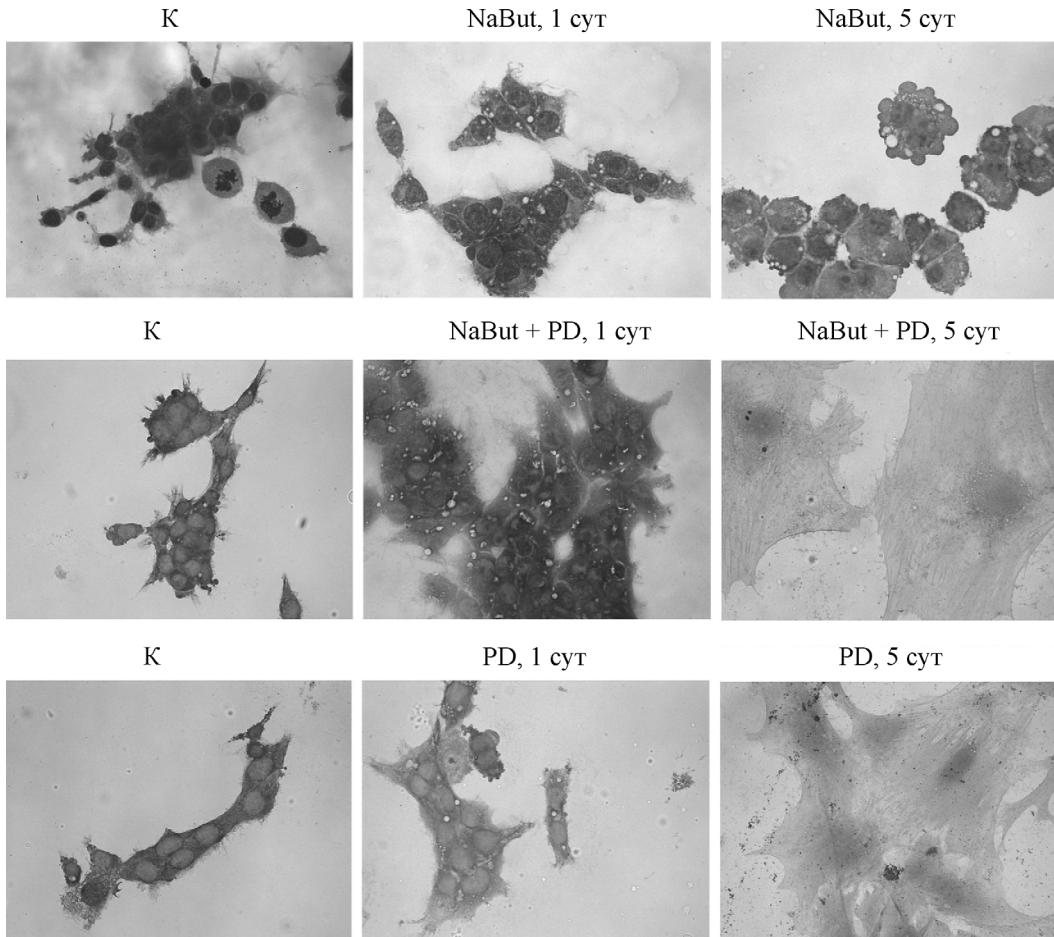


Рис. 2. Морфологические изменения клеток в контроле (К), после действия бутириата натрия (NaBut), NaBut совместно с ингибитором MEK/ERK-ветви PD (NaBut + PD) и одного PD в течение 1 и 5 сут.

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

жизнеспособность сохраняется на том же уровне, что и в контроле; ингибирование MEK/ERK также не оказывает существенного влияния на жизнеспособность клеток (рис. 1, *в*). Таким образом, NaBut в условиях подавленного MEK/ERK-каскада оказывает более значительное тумор-супрессорное действие на клетки, приводя не только к более эффективному подавлению пролиферации, но и к гибели части клеток.

При культивировании в присутствии NaBut в течение 5 сут в клетках происходили морфологические изменения, характерные для фенотипа старения: увеличение размеров, возрастание степени распластывания по субстрату, в цитоплазме появлялось множество аутофагосом. Клетки, в которых NaBut-индуцированное старение идет в условиях ингибированной MEK/ERK, на 5-е сут также увеличивались в размерах и были распластанными (рис. 2). Интересно, что процесс распластывания выявляется и в отсутствие NaBut при ингибировании MEK/ERK с помощью PD.

Однако по данным прямого светорассеяния (проточной цитометрии), клетки, культивированные в присутствии NaBut в условиях ингибированного MEK/ERK-каскада, не увеличиваются в объеме в отличие от клеток, стареющих при действии NaBut. В случае действия одного PD происходит даже некоторое уменьшение объема клеток (рис. 3). Эти данные согласуются с результатами измерения содержания белка в клетке: в присутствии Na-

But содержание белка через 5 сут превышало контрольное значение в 4—5 раз. При культивировании клеток в присутствии PD накопления белка в клетках не наблюдали.

Одной из причин распластывания опухолевых клеток по субстрату при действии PD могут быть перестройки актинового цитоскелета клеток. Окрашивание актинового цитоскелета клеток родамин-фаллоидином показало, что при действии одного PD и NaBut совместно с PD в клетках формируются мощные стресс-фибриллы, которые крепятся к мембране. В присутствии одного NaBut такой картины не наблюдается, однако стресс-фибриллы тоже формируются, но распределение их имеет менее организованный характер (рис. 4).

Показано, что развитие программы старения тесно связано с активацией комплекса mTORC1, но не mTORC2 (Zoncu et al., 2011; Kolesnichenko et al., 2012). Для оценки роли MEK/ERK в активации mTORC1, которая наблюдается в процессе NaBut-индуцированного старения, проводили анализ фосфорилирования одной из прямых мишений mTORC1, ингибитора инициации элонгации 4E-BP1. Согласно данным Вестерн-блоттинга, ингибирование MEK/ERK не препятствует активации mTORC1 при инициации старения NaBut; более того, при действии PD также наблюдается накопление фосфорилированных по Thr37/Thr46 форм 4E-BP1, превышающее не только контрольный уровень (более чем в 30—40 раз), но

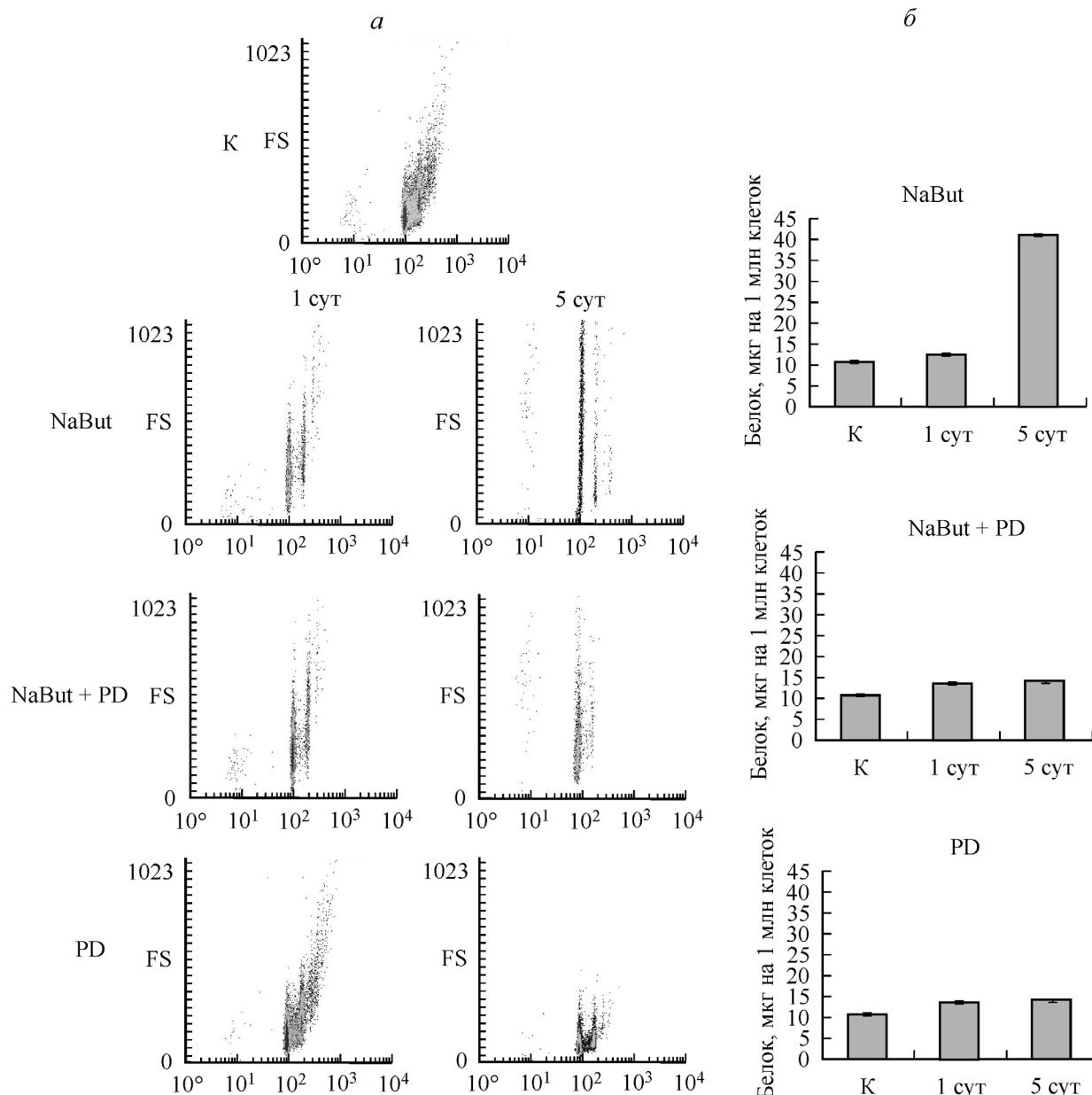


Рис. 3. Изменение объема клеток (а) и содержания белка в них (б) в контроле (К), при действии NaBut, NaBut совместно с ингибитором PD и одного PD в течение 1 и 5 сут.

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

и уровень накопления фосфоформ при действии NaBut (рис. 5, а). По всей видимости, при действии PD запускается неизвестный пока регуляторный механизм, способствующий активации mTORC1. Этот механизм может быть связан с восстановлением фосфорилирования ERK1,2 (Thr202/Tyr204) в присутствии ингибитора PD, так как, согласно данным электрофореза с антителами к p-ERK1,2, уровень содержания фосфорилированных форм киназ меняется. В первые часы культивирования с PD активные p-ERK почти не выявляются, но через 1 сут начинают выявляться вновь, хотя и не достигают уровня контроля (рис. 6). Стоит отметить, что если в контроле преобладает накопление p-ERK2 (42 кДа), то в 1-е, на 3-и и 5-е сут культивирования с PD или с NaBut в присутствии PD содержание обеих киназ остается примерно на од-

ном уровне за счет преимущественного накопления p-ERK1 (44 кДа).

Вестерн-блот-анализ показал, что в случае старения, индуцированного NaBut, ингибирование MEK/ERK оказывает влияние на содержание белка Ras в клетках, при этом динамика изменения количества Ras при индукции старения и при ингибировании MEK/ERK существенно различается. Действие NaBut ведет к постепенному накоплению Ras в течение 5 сут, в то время как при добавлении ингибитора MEK-киназ количество Ras в 1-е сут снижается, а к 5-м восстанавливается до уровня, превышающего контрольный почти в 2 раза (рис. 7). Не исключено, что при ингибировании MEK-киназы Ras-белки подвергаются деградации. Так как динамика восстановления уровня Ras во времени сходна с восстановлением

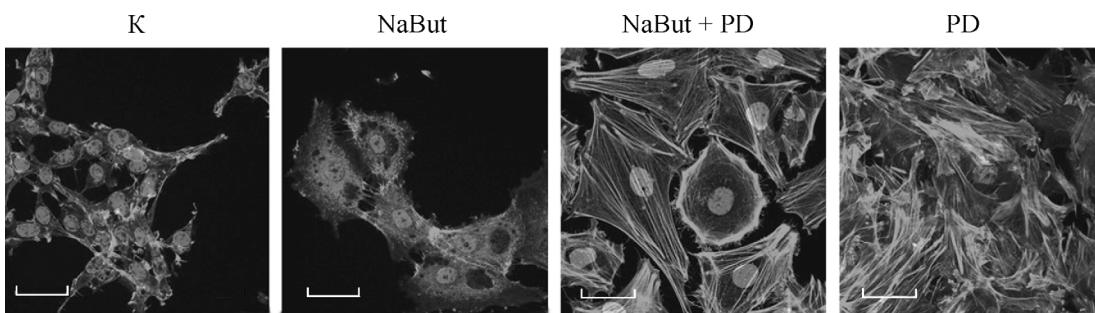


Рис. 4. Реорганизация актинового цитоскелета в клетках в процессе 5-суточного старения в контроле (К), при действии NaBut, NaBut совместно с ингибитором PD и одного PD.  
Окрашивание родамином-фаллоидином. Об. 100×.

fosфорилирования ERK1,2-киназ, это позволяет думать о том, что наблюдаемые процессы могут быть связаны.

Реорганизация актинового цитоскелета, происходящая при ингибировании MEK/ERK, позволяет предполагать, что в процесс реорганизации вовлечен комплекс mTORC2. Все функции mTORC2 в клетке пока не выяснены, однако участие комплекса mTORC2 в реорганизации актинового цитоскелета убедительно показано (Jaccinto et al., 2004). Согласно нашим данным, активация mTORC2 действительно происходит, что видно из картины накопления фосфорилированной формы AKT/PKB, которую комплекс mTORC2 фосфорилирует напрямую

по Ser473. Согласно данным по накоплению кофилина, фосфорилированного по Ser3, при действии ингибитора PD действительно наблюдается накопление фосфоформ этого белка. Важно отметить, что этот процесс более выражен в случае NaBut в присутствии PD, чем при действии одного NaBut (рис. 5, б, в). В свою очередь AKT/PKB-pSer473 участвует в активации mTORC1, так как осуществляет ингибирующее фосфорилирование димера TSC1,2 — главного негативного регулятора mTORC1, а также белка PRAS40, который негативно регулирует активность комплекса mTORC1 (Guertin, Sabatti, 2007). Таким образом, фосфорилирование AKT/PKB,

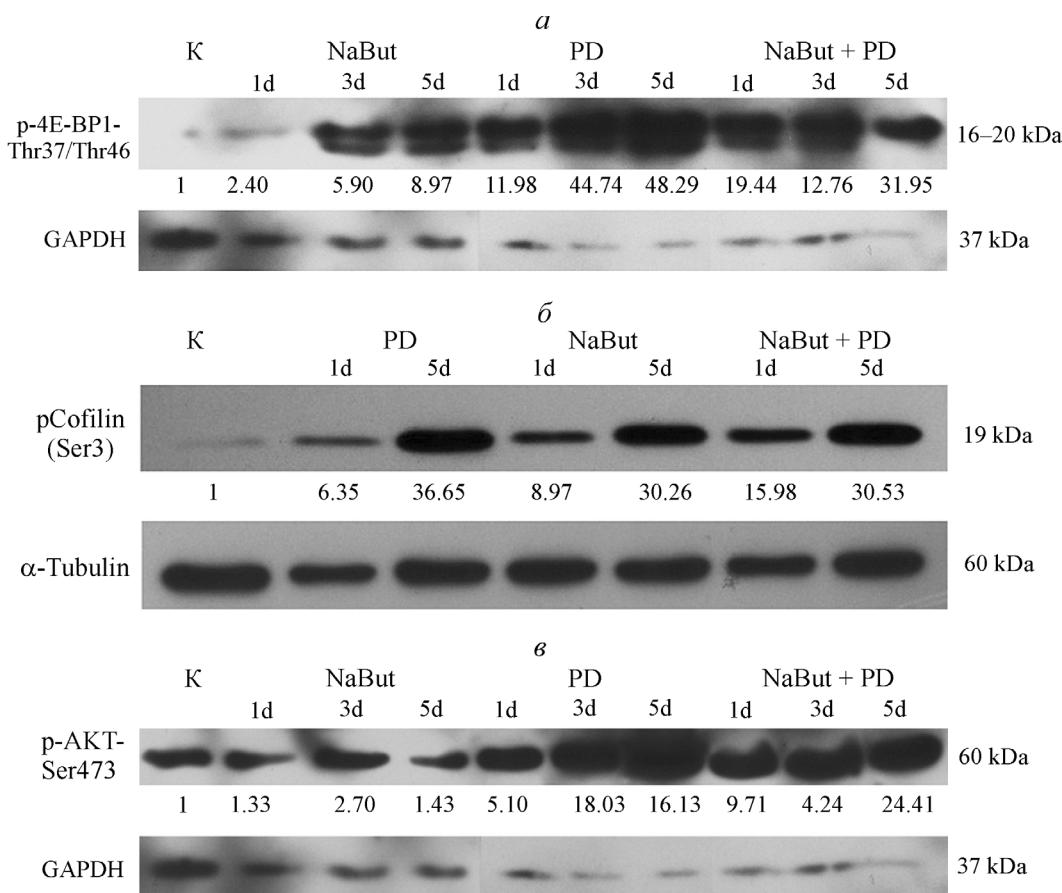


Рис. 5. Изменение фосфорилирования 4E-BP1 (а), кофилина (б) и киназы AKT (в) при действии PD, NaBut и NaBut совместно с PD в течение 5 сут.

Вестерн-блот-анализ с использованием антител к соответствующему белку, GAPDH и  $\alpha$ -тубулину. В скобках указаны сайты фосфорилирования. Здесь и на рис. 6, 7 цифры соответствуют результатам денситометрии полос Вестерн-блотинга.

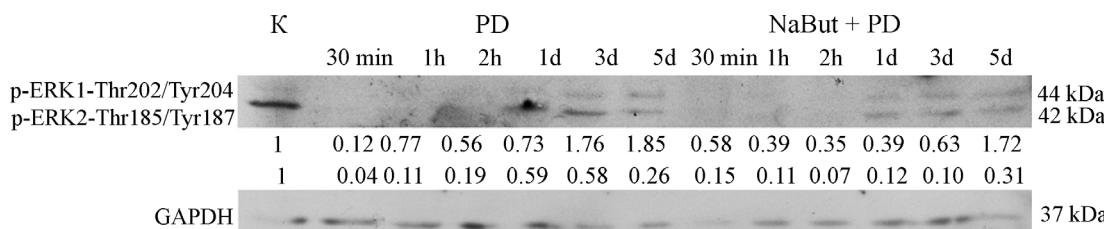


Рис. 6. Изменение фосфорилирования киназ ERK1,2 при действии ингибитора PD в течение 5 сут.  
Вестерн-блот-анализ, антитела к pERK1,2, указаны сайты фосфорилирования.

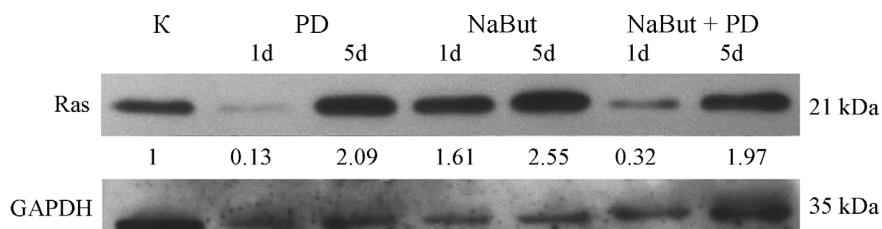


Рис. 7. Изменение количества белка Ras в клетках при действии PD, NaBut и NaBut совместно с PD в течение 5 сут.  
Вестерн-блот-анализ, антитела к Ras.

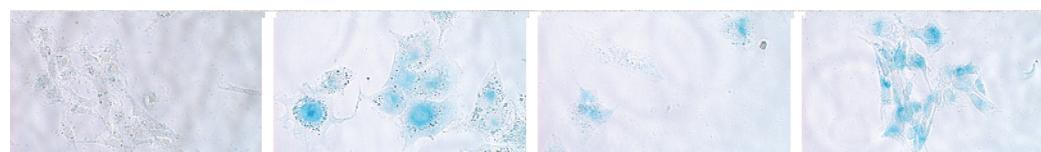


Рис. 8.  $\beta$ -Галактозидазная активность клеток при старении, индуцированном NaBut, при старении в условиях ингибированной MEK/ERK-ветви и действии ингибитора PD (NaBut + PD) и при ингибировании только MEK/ERK-ветви (PD) в течение 5 сут.  
Окрашивание водным раствором, содержащим субстрат  $\beta$ -галактозидазы, pH 6.0. Об. 63×.

которое особенно выражено при ингибировании MEK, может способствовать наблюдающейся активации mTORC1. Фосфорилирование белка кофилина комплексом mTORC2 через киназы LIMK1,2 важно для полимеризации актина, поскольку р-кофилин-Ser473 теряет свою способность деполимеризовать F-актин (Bamburg et al., 1999). Полученные данные о фосфорилировании кофилина по Ser3 соответствуют данным о реорганизации актинового цитоскелета и в совокупности с данными о фосфорилировании АКТ по Ser473 свидетельствуют о том, что при ингибировании активности MEK/ERK в процесс вовлекается комплекс mTORC2.

В случае ингибирования каскада MEK/ERK NaBut индуцирует появление таких маркеров старения, как подавление пролиферации, распластывание на субстрате, активация mTORC1 и активация SA- $\beta$ -галактозидазы (рис. 8). Однако индукция старения в условиях подавления MEK/ERK приводит к резкому снижению жизнеспособности клеток, о чем говорят результаты окрашивания клеток трипановым синим. Выявленные эффекты сопровождались активацией комплекса mTORC2. Таким образом, при действии ингибитора PD вместе с восстановлением фосфорилирования ERK1,2 начинает работать регу-

ляторный механизм, способствующий активации обоих mTOR-содержащих комплексов. При этом, несмотря на высокую активность mTORC1, индукция старения в условиях ингибированной активности MEK/ERK не сопровождается существенным увеличением содержания белка в клетке, как это происходит при действии одного NaBut. Это позволяет предполагать, что при действии PD может повышаться активность систем деградации белка (убиквитин-протеасомной, аутофагической или обеих одновременно).

## Обсуждение

Одним из основных признаков трансформированного фенотипа опухолевых клеток является их способность к автономной, независимой от разнообразных ростовых факторов пролиферации (Hanahan, Weinberg, 2011). В нормальных клетках сигнальные каскады, контролирующие процесс клеточной пролиферации, находятся под строгим контролем, в основе которого лежит баланс между активацией и инактивацией каскада после однократного действия индуктора пролиферации (Pearson et al.,

2001). Системы контроля активности регуляторных каскадов включают в себя киназы и фосфатазы, а также петли обратного ингибирования, нарушение работы которых в ходе многоэтапного процесса канцерогенеза приводит к конститутивной активности MAP-киназ и как следствие — к автономной пролиферации. Интегральными компонентами MAP-каскадов являются белки, кодируемыеprotoонкогенами, мутации которых или изменение активности могут быть причиной конститутивной активации сигнальных каскадов в отсутствие ростовых факторов или других индукторов пролиферации. Одним из таких белков является малая ГТФаза Ras, онкогенные мутации в генах которой выявляются в 30 % опухолей разного гистогенеза (Bos, 1989; Yamamoto et al., 1999; Takashima, Faller, 2013).

Клеточное старение — это тумор-супрессорная программа, в регуляцию которой вовлечены разные сигнальные каскады. Ведущую роль в регуляции клеточного старения играет mTORC1-сигналинг, как было показано в ряде исследований (Demidenko et al., 2009; Kolesnichenko et al., 2012). В фибробластах, трансформированных онкогенами *E1A+c-Ha-Ras*, старение, индуцированное с помощью NaBut (Зубова и др., 2005), связано с активацией комплекса mTORC1 (Romanov et al., 2010). В настоящей работе была поставлена цель оценить роль MEK/ERK-ветви MAP-киназного каскада, участвующего в регуляции mTORC1, в запуске процесса индуцированного бутиратом старения у трансформантов ERas.

Вопреки предположению о том, что подавление активности MEK/ERK с помощью ингибитора PD приведет к снижению активности mTORC1 и отмене программы клеточного старения, в клетках с ингибицированной активностью MEK/ERK действие NaBut приводит к активации старения. Реорганизация цитоскелета и фосфорилирование кофилина, наблюдающиеся при действии PD, свидетельствуют в пользу вовлечения в наблюдающиеся процессы комплекса mTORC2. Важно подчеркнуть, что при ингибиции MEK/ERK с помощью PD в присутствии NaBut наблюдается более сильный антитромиферативный эффект, связанный не только с подавлением пролиферации, но и с гибелю клеток, в отличие от действия одного NaBut. Отдельный интерес вызывает тот факт, что, несмотря на высокую активность комплекса mTORC1, при действии PD в клетках не происходит такого накопления белка, как в клетках, где программу старения индуцировали только NaBut. Это позволяет предполагать, что эффекты, развивающиеся в результате ингибиции MEK/ERK при действии NaBut, включают в себя и повышение активности системы деградации белка (протеасомной или аутофагической).

Наблюдающиеся эффекты могут объясняться активностью Ras, который имеет множество мишней. Нарушение регуляции этого пути может приводить к трансформации клеток, устойчивости к лекарственным препаратам или преждевременному старению (Yamamoto et al., 1999; Benanti, Galloway, 2004). Ras участвует в активации PI3-киназного каскада — одного из основных регуляторов mTORC1 (Shaw, Cantley, 2006), который, кроме того, имеет перекрест с каскадом Ras/Raf/MEK/ERK (Mendoza et al., 2011). Ras может способствовать активации стресс-киназ (Santarpia et al., 2012), участие которых в регуляции mTORC1 также показано (March, Winton, 2011; Wu et al., 2011). Эффекты, наблюдающиеся при действии PD, могут быть обусловлены ингибицией TSC1,2 киназой РКВ/АКТ. Согласно некоторым данным, TSC1,2 не

только регулирует mTORC1, но и участвует в регуляции mTORC2. В отличие от регуляции mTORC1, которая осуществляется через малую ГТФазу Rheb, комплекс mTORC2 регулируется TSC1,2 непосредственно, способствуя активации mTORC2 (Huang et al., 2008). Активированный mTORC2 фосфорилирует киназу АКТ по Ser473, которая в свою очередь вновь способствует активации mTORC1. Известно, что даже минимальная активность mTORC2 обеспечивает активацию mTORC1 (Janes, Friedman, 2010). Таким образом, активность Ras затрагивает достаточно широкий спектр процессов в клетке.

Данные Вестерн-блот-анализа об изменении количества Ras, а также о фосфорилировании ERK1,2 при ингибиции MEK/ERK показали, что через 5 сут содержание онкогенного Ras в клетке повышается, в это же время восстанавливается уровень фосфорилирования ERK1,2 по Thr202/Tyr204;Thr185/Thr187. Механизм, способствующий восстановлению фосфорилирования ERK-киназ, может вовлекать сигналинг от интегринов. Показано, что система интегринов принимает активное участие в фосфорилировании ERK1,2 (Walker, Assoian, 2005). Наблюдаемая при ингибиции MEK/ERK реорганизация цитоскелета с образованием мощных стресс-фибрилл указывает на усиление адгезии клеток при взаимодействии их с субстратом. Как показывают исследования, сигналинг от интегринов принимает участие в регуляции прохождения клетки по циклу, кроме того, некоторые из интегринов через Ras/ERK-путь могут вовлекаться в пролиферацию опухолевых клеток (Moreno-Lauseca, Streuli, 2013). Важно отметить следующую закономерность: для нормального прохождения клетки по клеточному циклу сигнал к ERK-киназам должен поступать от обеих систем — рецепторных тирозинкиназ и интегринов (Botazzi et al., 1999). При ингибиции MEK-киназ с помощью PD система интегриновых рецепторов с большой вероятностью является участником усиления адгезивности трансформантов ERas, но оказывается недостаточной для поддержания пролиферации, особенно в том случае, когда на клетки действовали PD и NaBut совместно.

В контрольных трансформантах преобладает фосфорилирование ERK2, однако при восстановлении фосфорилирования после действия ингибитора PD обе изоформы фосфорилируются примерно в равной степени. Клетки, в которых индуцировали старение при ингибиции MEK/ERK, также способны к восстановлению фосфорилирования ERK1,2 и содержания Ras. Но в отличие от клеток, обработанных только PD или только NaBut, у них резко падает жизнеспособность. Возможно, в трансформантах ERas каскад Ras/Raf/MEK/ERK способствует поддержанию жизнеспособности клеток, а его подавление приводит к падению жизнеспособности. Возможно также, что падению жизнеспособности способствует активация системы деградации белка в результате совместного действия NaBut и PD. Такую роль может играть аутофагия, которая необходима для *ras*-индуцированной трансформации (Guo et al., 2010). Так или иначе, этот процесс является исключительно важным для клеток, трансформированных с участием онкогена *ras*. Как деградация белка, так и падение жизнеспособности, наблюдающиеся при подавлении активности MEK/ERK и индукции старения в таких условиях, могут быть связаны с аутофагическими процессами.

Старение клеток сопровождается увеличением клеточного объема и накоплением белка, обусловливая

развитие гипертрофного гиперсекреторного фенотипа, являющегося одним из основных маркеров старения. При подавлении MEK/ERK MAP-киназного каскада наблюдается появление некоторых маркеров старения. С одной стороны, присутствует положительная окраска на SA- $\beta$ -Gal, с другой — полностью отсутствует увеличение размеров клеток и количества белка. Положительная окраска на SA- $\beta$ -Gal может быть следствием повышения активности лизосом, которая возрастает при повышенной утилизации белка.

Согласно полученным результатам, индукция старения NaBut в условиях ингибионной MEK/ERK способствует эффективному подавлению пролиферации клеток. Однако падение прироста числа клеток в этом случае связано не только с индукцией старения, но и с одновременным снижением жизнеспособности клеток. Таким образом, можно считать установленным факт более сильно-го тумор-супрессорного действия NaBut, ингибитора гистоновых деацетилаз, в условиях подавленной активности MEK/ERK. Это может иметь значение для разработки новых способов уничтожения Ras-экспрессирующих опухолевых клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00552), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и С.-Петербургского государственного университета (1.38.247.2014).

### Список литературы

- Зубова Ю. Г., Быкова Т. В., Зубова С. Г., Абрамова М. В., Аксенов Н. Д., Пospelov V. A., Пospelova T. V. 2005. Индукция программы ускоренного старения ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия в нормальных и трансформированных фибробластах крысы. Цитология 47 (12) : 1055—1062. (Zubova Yu. G., Bykova T. V., Zubova S. G., Abramova M. V., Aksakov N. D., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 2005. Induction of premature senescence program by an inhibitor of histone deacetylase sodium butyrate in normal and transformed rat fibroblasts. Tsitologiya. 47 (12) : 1055—1062.)
- Bamburg J. R., McCough A., Ono S. 1999. Putting a new twist on actin: ADF/cofilins modulate actin dynamics. Trends Cell Biol. 9 : 364—370.
- Benanti J. A., Galloway D. A. 2004. The normal response to Ras. Senescence or transformation? Cell Cycle. 3 : 715—717.
- Blagosklonny M. V., Hall M. N. 2009. Growth and aging: a common molecular mechanism. Aging. 1 : 357—362.
- Bos J. L. 1989. Ras oncogenes in human cancer: a review. Cancer Res. 49 : 4682—4689.
- Botazzi M. E., Zhu X., Bohmer R. M., Assoian R. K. 1999. Regulation of p21<sup>cip1</sup> expression by growth factors and the extracellular matrix reveals a role for transient ERK activity in G<sub>1</sub> phase. J. Cell Biol. 146 : 1255—1264.
- Carriere A., Romeo Y., Acosta-Jaques H. A., Moreau J., Bonneil E., Thibault P., Fingar D. C., Roux P. P. 2011. ERK1,2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR Complex 1 (mTORC1). J. Biol. Chem. 286 : 567—577.
- Demidenko Z. N., Blagosklonny M. V. 2008. Growth stimulation leads to cellular senescence when the cell cycle is blocked. Cell Cycle. 7 : 3355—3361.
- Demidenko Z. N., Zubova S. G., Bukreeva E. I., Pospelov V. A., Pospelova T. V., Blagosklonny M. V. 2009. Rapamycin decelerates cellular senescence. Cell Cycle. 8 : 1888—1895.
- Deschenez-Simard X., Gamont-Leclerc M.-F., Bourdeau V., Lessard F., Moiseeva O., Forest V., Igelmann S., Mallette F. A., Saba-El-Leil M. K., Meloche S., Saad F., Mes-Masson A. M., Ferreyre G. 2013. Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK path-way by promoting selective protein degradation. Genes Dev. 27 : 900—915.
- Dimri J. 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. Natl. Acad. Sci. USA. 92 : 10541—10546.
- Guertin D. A., Sabatini D. M. 2007. Defining the role of mTOR in cancer. Cancer Cell. 12 : 9—20.
- Guo G. Y., Chen H.-Y., Mathew R., Fan J., Strohecker A. M., Karsli-Uzunbas G., Kamphorst J. J., Chen G., Lemons J. M. L., Karantza V., Coller H. A., DiPaola R. S., Gelinas S., Rabino-witz J. D., White E. 2010. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. Genes Develop. 25 : 460—470.
- Hanahan D., Weinberg R. A. 2000. The hallmarks of cancer. Cell. 100 : 57—70.
- Hanahan D., Weinberg R. A. 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 144 : 646—674.
- Huang J., Dibble C. C., Matsuzaki M., Manning B. D. 2008. The TSC1—TSC2 complex is required for proper activation of mTOR Complex 2. Mol. Cell. Biol. 28 : 4104—4115.
- Jacinto E., Loewith R., Schmidt A., Lin S., Ruegg M. A., Hall A., Hall M. N. 2004. Mammalian TOR Complex 2 controls cytoskeleton and is rapamycin-insensitive. Nature Cell Biol. 6 : 1122—1128.
- Janes M. R., Fruman D. A. 2010. Targeting TOR dependence in cancer. Onco Target. 1 (1) : 69—76.
- Kolesnichenko M., Hong L., Liao R., Vogt P. K., Sun P. 2012. Attenuation of TORC1 signaling delays replicative and oncogenic Ras-induced senescence. Cell Cycle. 11 : 1—11.
- Ma L., Chen Z., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Pandolfi P. P. 2005. Phosphorylation and functional inactivation of TSC2 by ERK: implications for tuberous sclerosis and cancer pathogenesis. Cell. 121 : 179—193.
- March N. H., Winton D. J. 2011. mTOR regulation by JNK: rescuing the starving intestinal cancer cell? Gastroenterology. 140 : 1387—1391.
- Mendoza M. C., Er E. E., Blens J. 2011. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-link and compensation. Trends Biomed. Sci. 36 : 320—328.
- Moreno-Lauseca P., Streuli C. H. 2013. Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression. Matrix Biol. doi: 10.1016/j.matbio.2013.10.011.
- Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B. E., Karandikar M., Berman K., Cobb M. N. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr. Rev. 22 (2) : 153—183.
- Pospelova T. V., Leontieva O. V., Bykova T. V., Zubova S. G., Pospelov V. A., Blagosklonny M. V. 2012. Suppression of replicative senescence by rapamycin in rodent tumor cells. Cell Cycle. 11 : 1—6.
- Romanov V. S., Abramova M. V., Svetlikova S. B., Bykova T. V., Zubova S. G., Aksakov N. D., Fornace A. J., Jr., Pospelova T. V., Pospelov V. A. 2010. P21waf1 is required for cellular senescence but not for cell cycle arrest induced by the HDAC inhibitor sodium butyrate. Cell Cycle. 9 : 1—11.
- Santarpia L., Lippman S. L., El-Naggar A. K. 2012. Targeting the mitogen-activated protein kinase Ras-Raf signalling pathway in cancer therapy. Expert Opin. Ther. Targets. 16 : 103—119.
- Sarbassov D. D., Ali S. M., Sabatini D. M. 2005. Growing roles for the mTOR pathway. Curr. Opin. Cell Biol. 17 : 596—603.
- Serrano M., Lin W. A., McCurrach M. E., Beach D., Lowe S. W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16<sup>INK4a</sup>. Cell. 88 : 593—602.
- Shapiro H. M. 1988. Practical flow cytometry. New York: Alan R. Liss, Inc. 353 p.
- Shaw R. J., Cantley L. C. 2006. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumor cell growth. Nature. 441 : 424—430.
- Takashima A., Faller D. V. 2013. Targeting the Ras oncogene. Expert Opin. Ther. Targets. 17 : 507—531.

- Toussaint O., Dumont P., Dierick J. F., Pascal T., Frippiat C., Chainiaux F., Sluse F., Eliaers F., Remacle J. 2000. Stress-induced premature senescence. Essence of life, evolution, stress and aging. Ann. N. Y. Acad. Sci. 908 : 85—98.
- Walker J. L., Assoian R. K. 2005. Integrin-dependent signal transduction regulating cyclin D1 expression and G1 phase cell cycle progression. Cancer Met. Rev. 24 : 383—393.
- Wilkinson M. G., Millar J. B. A. 2000. Control of the eukaryotic cell cycle by MAP kinase signaling pathways. FASEB. 5 : 2147—2157.
- Wu X.-N., Wang X.-K., Wu S.-Q., Lu J., Zheng M., Wang Y.-H., Zhou H., Zhang H., Han J. 2011. Phosphorylation of raptor by p38 $\beta$  participates in arsenite-induced mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) activation. J. Biol. Chem. 286 : 31 501—31 511.
- Yamamoto T., Taya S., Kaibuchi K. 1999. Ras-induced transformation and signaling pathway. J. Biochem. 126 : 799—803.
- Zoncu R., Sabatini D. M., Efeyan A. 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and aging. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 12 : 21—35.

Поступила 21 III 2014

## ROLE OF MEK/ERK PATHWAY IN THE REGULATION OF HDACI-INDUCED SENESCENCE OF TRANSFORMED RAT EMBRYO FIBROBLASTS

*E. Yu. Kochetkova,<sup>1, 2,\*</sup> T. V. Bykova,<sup>1</sup> S. G. Zubova,<sup>1</sup> T. V. Pospelova<sup>1</sup>*

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and <sup>2</sup> St. Petersburg State University;  
\* e-mail: lena.linnaea@gmail.com

A key regulator of cellular senescence, mTORC1 complex, is the target of many signaling cascades including Ras/Raf/MEK/ERK-signaling cascade. In this paper we investigated the role of MEK/ERK-branch of this cascade in the process of cellular senescence induced by histone deacetylase inhibitor (HDACI) sodium butyrate (NaBut), in transformed rat embryo fibroblasts. Suppression of MEK / ERK activity by inhibitor PD0325901 does not prevent activation of mTORC1 complex induced by NaBut treatment. After the suppression of MEK/ERK, activity of mTORC1 increased as well as complex mTORC2. Activation of mTOR-containing complexes accompanied by the reorganization of the actin cytoskeleton with the formation of actin stress fibers and the appearance of some markers of cellular senescence. In contrast to NaBut-induced senescence accumulation of proteins was not observed, which may be due to increased activity of the degradation processes. Furthermore, the induction of senescence in conditions suppressed MEK/ERK leads to a drastic decrease in cell viability. Thus, NaBut-induced senescence upon suppressed activity of MEK/ERK-branch of MAP kinase cascade has a more pronounced tumor-suppressor effect associated with stronger activation of both mTOR-complexes, reorganization of the actin cytoskeleton and protein degradation.

**Key words:** HDACI — inhibitor of histone deacetylases, NaBut — sodium butyrate, SA- $\beta$ -Gal — senescence-associated  $\beta$ -galactosidase.