

**АНТИАПОПТОТИЧЕСКИЙ ГЕН *bcl-2* ПРЕПЯТСТВУЕТ РЕАКТИВАЦИИ
ПРОГРАММЫ СТАРЕНИЯ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ИНГИБИТОРОМ
ГИСТОНОВЫХ ДЕАЦЕТИЛАЗ БУТИРАТОМ НАТРИЯ
В ФИБРОБЛАСТАХ КРЫСЫ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ
ОНКОГЕНАМИ *E1A* И *c-Ha-Ras***

© С. А. Гордеев,^{1, 2, *} Т. В. Быкова,^{1, 2} С. Г. Зубова,¹ Н. Д. Аксенов,¹ Т. В. Поспелова^{1, 2}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
и ² С.-Петербургский государственный университет;
* электронный адрес: s.a.gordeev@hotmail.com

Исследовали роль гена устойчивости к апоптозу *bcl-2* в активации программы клеточного старения, индуцированного ингибитором гистоновых деацетилаз (HDACi) бутиратом натрия (NaBut) в трансформированных фибробластах крысы. Работу проводили на клетках линии крысиных эмбриональных фибробластов, трансформированных онкогенами *E1A*, *c-Ha-Ras* и *bcl-2* (клетки ERasBcl), устойчивых к апоптозу. Контролем служила родительская линия клеток, трансформированных *E1A* и *c-Ha-Ras* (клетки ERas). Показано, что NaBut в значительно меньшей степени подавляет пролиферацию клеток ERasBcl, чем контрольных ERas, несмотря на задержку прохождения по клеточному циклу в фазе G₁ в обеих линиях. Гипертрофия, вызванная действием NaBut, выражена в меньшей степени у клеток ERasBcl, чем у клеток ERas, что обусловлено более низким уровнем активации комплекса mTORC1, контролирующего синтез белка и биогенез рибосом. Активацию mTORC1 оценивали по фосфорилированию его мишеней — рибосомного белка S6 и ингибитора фактора инициации трансляции eIF4E — белка 4E-BP1. Исследование динамики содержания одного из главных маркеров формирования аутофагосом — белка LC3 — показало, что накопление липидсвязанной формы LC3-II, маркирующей мембраны аутофагосом, при действии NaBut в *bcl-2*-экспрессирующих трансформантах имеет проходящий характер в отличие от линии ERas. Кроме того, в клетках ERasBcl не происходило активации ассоциированной со старением β-галактозидазы — маркера стареющих клеток. Совокупность полученных результатов позволяет говорить о том, что высокий уровень экспрессии *bcl-2*, блокирующего апоптотическую гибель, препятствует реализации тумор-супрессорной программы клеточного старения, индуцированной NaBut.

Ключевые слова: клеточное старение, ингибитор гистоновых деацетилаз бутират натрия, аутофагия, *bcl-2*.

Применение традиционных подходов к терапии опухолей связано с определенными трудностями в случае устойчивости опухоли к различного рода воздействиям (Gerl, Vaux, 2004). Одним из факторов, вызывающих устойчивость опухолевых клеток к цитостатикам и облучению, является гиперэкспрессия антиапоптотического гена *bcl-2*, приводящая к подавлению тумор-супрессорной программы апоптотической гибели (Adams, Cory, 2007). Перспективным подходом для подавления пролиферации подобного рода опухолей является индукция в опухолевых клетках другой тумор-супрессорной программы — клеточного старения (Campisi, 2001).

Клеточное старение, при котором необратимо индуцируется цитостатическое состояние в результате подавления пролиферации клеток без их гибели (Campisi, 1999), является перспективным способом лечения рака. Клеточное старение характеризуется определенными морфологическими и биохимическими изменениями: блоком клеточного цикла в фазе G₁ или G₂, гипертрофией

и активным белковым синтезом, экспрессией маркеров старения, в том числе β-галактозидазы (Kuilman et al., 2010). Старение является клеточной программой, блокирующей пролиферацию доброкачественных новообразований, но в ходе канцерогенеза она супрессируется (Chondrogianni et al., 2003). Однако накопленные данные говорят о том, что старение в опухолевых клетках можно вновь реактивировать. Более того, раковые клетки, резистентные к воздействию многих цитостатиков и облучения, могут оставаться чувствительными к индукции старения (Шитикова и др., 2011; Chitkova, 2014).

В ходе клеточного старения формируется блок клеточного цикла, что приводит к остановке пролиферации, накоплению белка и аутофагии (Chondrogianni et al., 2003). Показано, что киназа mTOR в составе комплекса mTORC1 контролирует не только процесс старения, но и аутофагию (Egan et al., 2011). Комплекс mTORC1 контролирует синтез белка путем прямого фосфорилирования ингибитора фактора инициации трансляции eIF4E — бел-

ка 4E-BP1 и опосредованного через киназу p70S6K рибосомального белка S6. Инициацию аутофагии mTORC1 осуществляет путем фосфорилирования киназы ULK1 по Ser757 (Roach, 2011). В свою очередь киназа ULK1 фосфорилирует белок beclin1 в составе комплекса PI(3)КC3, активация которого необходима для инициации аутофагии (Nazarko, Zhong, 2013).

Ингибитор гистоновых деацетилаз бутират натрия (NaBut) активирует программу клеточного старения в клетках многих опухолей (Rikiishi, 2011). Ранее мы показали, что NaBut активирует программу старения в эмбриональных фибробластах крысы, трансформированных онкогенами *E1A* и *cHa-Ras* (Зубова и др., 2005).

Известно, что конститутивная экспрессия онкогена *ras* инициирует одновременно и апоптогенные, и антиапоптогенные сигналы. Апоптогенные сигналы обусловлены активацией сигнального пути Ras—Raf—MAPK—E2F—p19ARF—p53 (Downward, 1998), тогда как антиапоптогенные связаны со способностью одного из эффекторов Ras — белка c-Raf — прямо фосфорилировать и инактивировать проапоптотический белок Bad (член семейства Bcl-2). Действие другой мишени онкогена *ras* — PI3K (фосфоинозитол-3-киназы) — также связано с ее антиапоптотическим действием, так как PI3K способна активировать серин-треониновую протеинкиназу PKB/Akt, которая блокирует апоптоз (Wang et al., 2014).

Введение в первичную культуру фибробластов одного онкогена *ras* недостаточно для онкогенной трансформации. Экспрессия *ras* в таких клетках приводит к постоянному блоку клеточного цикла в фазе G₁ и накоплению тумор-супрессорных белков p53 и p16/Ink4, которые негативно контролируют прохождение клетки по циклу. Находясь в Ras-индуцированном G₁-блоке клеточного цикла, такие клетки начинают экспрессировать маркеры, характерные для клеток, претерпевающих репликативное старение, а само явление получило название ускоренного старения клетки (Serrano et al., 1997).

Введение *E1Aad5* способно снимать блок клеточного цикла, вызванный введением онкогена *ras*, на фоне высокого уровня ингибитора циклинзависимых киназ p16/Ink4 в фазе G₁ клеточного цикла (Serrano et al., 1997). Bcl-2 — наиболее подробно описанный член семейства про- и антиапоптотических белков. Введение в клетку гена *bcl-2* блокирует в ней возможность индукции апоптоза путем нарушения олигомеризации проапоптотических белков Bax и Bak и, как следствие, выход цитохрома *c* в цитоплазму с последующей активацией каспазного каскада (Dejean et al., 2006). Кроме апоптоза Bcl-2 способен блокировать Beclin-зависимую аутофагию, взаимодействуя с Beclin 1 через ВН3-домен (Bcl-2 Homology 3) (Marquez, Xu, 2012).

В настоящей работе исследовали возможность индукции клеточного старения при действии ингибитора гистоновых деацетилаз (HDACi) бутирата натрия (NaBut) на клетки линии эмбриональных фибробластов крысы, трансформированных сначала онкогенами *E1A* и *cHa-Ras*, а затем онкогеном *bcl-2* (клетки ERasBcl). Исследуемая линия, устойчивая к индукции апоптоза, была использована ранее для изучения закономерностей подавления апоптоза и роли гена *bcl-2* в регуляции событий клеточного цикла и ответа на повреждающие воздействия (Nelioudova et al., 2004). Поэтому мы в настоящей работе исследовали еще и роль гена *bcl-2* в HDACi-опосредованной реактивации программы клеточного старения в этих же клетках (ERasBcl). Эффективность активации программы старе-

ния оценивали, сравнивая линию ERasBcl с родительской линией ERas. Для этого исследовали такие общепринятые маркеры клеточного старения, как блок клеточного цикла, пролиферативную активность, степень гипертрофии клеток, уровень накопления белка, а также активность ассоциированной со старением β-галактозидазы (SA-β-Gal). Активность киназы mTOR в составе комплекса mTORC1 при действии NaBut оценивали по фосфорилированию ее мишеней — белков S6, 4E-BP1 и ULK-1. Динамику аутофагического процесса анализировали по переходу маркерного белка LC3 из свободной цитоплазматической формы (LC3-I) в связанную с мембраной аутофагосом (LC3-II).

Материал и методика

Клеточные линии. Использовали постоянную линию эмбриональных фибробластов крысы, трансформированных онкогенами *E1Aad5* и *cHa-ras* (ERas), и линию, полученную путем кальций-фосфатного переноса в трансформанты ERas гена *bcl-2* человека (ERasBcl) (Nelioudova et al., 2004). Исходная линия ERas была получена из эмбриональных фибробластов крысы путем введения пары комплементирующих онкогенов: раннего *E1A* района аденовируса 5-го типа человека и *c-Ha-Ras* человека с мутациями в 12-м и 61-м положениях, что позволяет ему оставаться в постоянно активном ГТФ-связанном состоянии (Brown et al., 1990). Введение этой пары онкогенов в клетки грызунов позволяет получать стабильно трансформированные клеточные линии, которые обладают, как ранее было показано, всеми признаками трансформированного фенотипа и имеют высокую онкогенную активность, согласно результатам по прививаемости бестимусным мышам (Pospelova et al., 1999).

Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Процесс активации программы старения вызывали ингибитором гистоновых деацетилаз NaBut в концентрации 4 мМ.

Для построения кривых роста клетки рассевали на чашки Петри диаметром 30 мм по $3 \cdot 10^4$ клеток на 1 чашку. Кривые строили на основании подсчета (в трех независимых повторях) числа клеток через 24, 72 и 120 ч культивирования. Среднее время удвоения популяции T_d

считали по формуле $T_d = \frac{t}{\log_2 \left(\frac{N_t}{N_0} \right)}$, где t — время прироста

популяции в логарифмической стадии роста, N_0 и N_t — число клеток соответственно исходное и через время t .

Распределение клеток по фазам клеточного цикла оценивали с помощью проточной цитометрии. Клетки снимали с чашек смесью растворов трипсина и версена (1 : 10), затем осаждали 3 мин центрифугированием при 350 g и промывали TRIS-солевым буферным раствором (TBS). Клетки инкубировали в TBS, содержащем 0.01 % сапонина, в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего вновь промывали TBS и обрабатывали раствором РНКазы А (0.1 мг/мл) в присутствии йодида пропидия (40 мкг/мл) в течение 15 мин при 37 °С. Анализ проводили на цитометре типа Odam (Bruc-ker, Франция).

Исследование активности SA-β-Gal. Клетки выращивали в чашках Петри на покровных стеклах, промывали TBS и фиксировали в 3%-ном формальдегиде в

течение 20 мин при комнатной температуре. Фиксированные клетки промывали раствором TBS и инкубировали 18 ч при 37 °С в растворе для выявления активности SA-β-Gal, содержащем 1 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-D-галактозида (X-Gal), 40 мМ буфера, содержащего лимонную кислоту и фосфат натрия, pH 6.0, по 5 мМ красной и желтой кровяной соли, 150 мМ NaCl и 2 мМ MgCl₂ (Dimri et al., 1995). Анализ и фотографирование готовых препаратов производили на микроскопе Leica в проходящем свете.

Содержание белка в 1 млн клеток определяли методом Бредфорд (Bradford, 1976).

Иммуноблотинг. Белки разделяли по методу SDS-электрофореза в ПААГ в модификации Лэммли (Laemmli, 1970), переносили на нитроцеллюлозную мембрану и выявляли с помощью антител методом ECL (Amersham). Использовали следующие антитела: α-фосфо-S6, α-фосфо-4E-BP1, α-GAPDH (Cell signaling technology, США) и α-LC3 (MBL, Япония)

Результаты

Как показывает анализ кривых клеточного роста, NaBut оказывает антипролиферативное действие на клетки обеих линий (рис. 1). Однако степень подавления пролиферации существенно различается. Через 120 ч действия NaBut число клеток линии ERasBcl в 4.6 раза ниже, чем в контроле, однако для линии ERas это различие составляет 55.5 раза. Таким образом, подавление пролиферации в присутствии NaBut в клетках ERasBcl происходит в 12 раз менее эффективно, чем в клетках родительской линии ERas.

Для выяснения причин такого различия антипролиферативного действия NaBut мы исследовали его способность блокировать прохождение клеток по циклу методом проточной цитометрии. Анализ данных (рис. 2) показывает, что NaBut задерживает клетки линии ERasBcl на границе фазы G₁. Через 120 ч действия NaBut доля клеток, находящихся в фазе G₁, в 1.3 раза больше, чем в контроле. Характер распределения клеток линии ERas при действии NaBut несколько иной: через 120 ч действия NaBut доля клеток, находящихся в фазе G₁, увеличивается в 2.2 раза по сравнению с контролем, тогда как доля клеток, находящихся в фазе G₂, уменьшается в 1.7 раза. Накопление клеток в фазе G₁, описанное выше, происходит за счет сокращения доли клеток, находящихся в фазе S, для обеих исследуемых клеточных линий. Для линии

ERas доля клеток в S-фазе падает с 44 до 5 %, а для ERasBcl — с 27 до 6 %.

Блок клеточного цикла — необходимое, но еще не достаточное условие процесса клеточного старения (Blagosklonny, 2003). Если, находясь в блоке, клетка продолжает синтезировать белки, это неизбежно приводит к увеличению содержания белка в клетке и, как следствие, к увеличению размеров, т. е. к гипертрофии, которая является одним из маркеров клеточного старения.

Для выяснения связи между увеличением размеров клетки и накоплением белка в случае задержки прохождения клеточного цикла были проведены эксперименты по оценке размеров клетки в протоке методом прямого светорассеяния и измерению удельного содержания белка на клетку при действии NaBut. Данные прямого светорассеяния показали, что клетки, остановившись в цикле, увеличиваются в объеме. В большей степени этот процесс выражен в клетках ERas, в меньшей степени — в ERasBcl (рис. 3).

Таким образом, увеличение объема клеток связано с накоплением в них белка. Через 72 ч действия NaBut содержание белка в клетках ERasBcl увеличивается в 2.9 ± 0.2 раза, тогда как в клетках ERas — в 6.3 ± 0.3 раза по сравнению с контролем (рис. 4).

Накопление белка в клетке и явление гипертрофии являются показателями стареющей клетки. Ключевым фактором регуляции белкового синтеза является киназа mTOR в составе киназного комплекса mTORC1, фосфорилирующая нижележащие мишени, такие как рибосомальный белок S6 (опосредованно, через киназу p70S6K1) и 4E-BP1 (ингибитор фактора инициации трансляции-IF4E), вовлеченные в процесс трансляции.

Для изучения вклада комплекса mTORC1 в процесс накопления белка в клетках при действии NaBut методом Вестерн-блоттинга оценивали активность киназы mTOR по фосфорилированию ее субстратов — рибосомального белка S6 и ингибитора 4E-BP1 (рис. 5). В клетках ERasBcl, как и в линии ERas, при действии NaBut количество фосфорилированного белка S6 и 4E-BP1 увеличивалось. Это говорит о том, что NaBut не только останавливает прохождение клеток по циклу, но и вызывает дополнительную активацию комплекса mTORC1.

Эксперименты по оценке активности SA-β-Gal показали, что активность SA-β-Gal в клетках ERas появляется уже через 72 ч действия NaBut и интенсифицируется далее (120 ч) (рис. 6). В отличие от ERas в клетках ERBcl

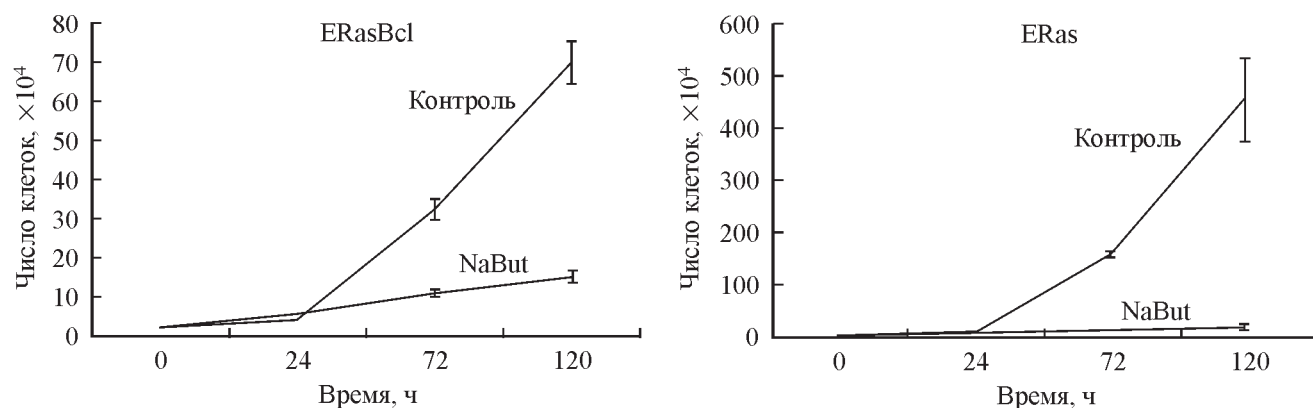


Рис. 1. Кривые роста устойчивых (ERasBcl) и чувствительных (ERas) к апоптозу трансформированных фибробластов крысы в контроле и при действии ингибитора гистоновых деацетилаз бутирата натрия (NaBut).

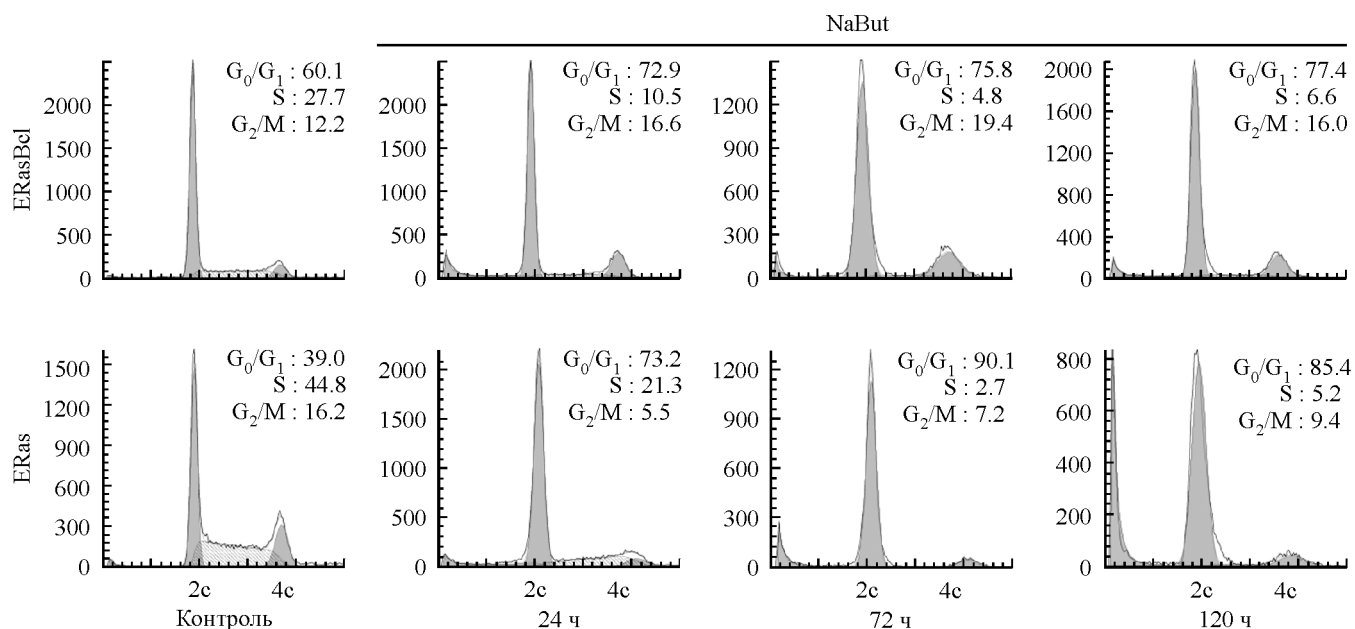


Рис. 2. Распределение клеток, устойчивых (ERasBcl) и чувствительных к апоптозу (ERas), по фазам клеточного цикла при действии NaBut.

По горизонтали — содержание ДНК, ед. плоидности c ; по вертикали — число клеток. На гистограммах указана доля клеток (%), находящихся в разных фазах клеточного цикла.

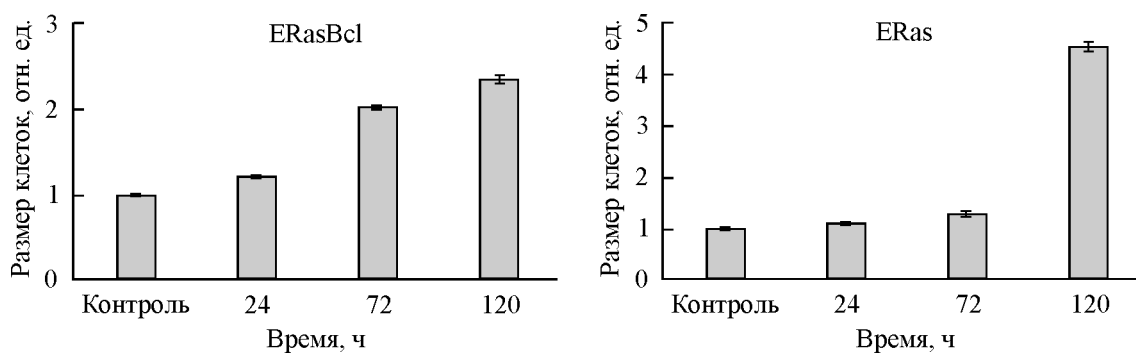


Рис. 3. Изменение размера клеток после действия NaBut в течение разного времени.

Через 120 ч клетки ERasBcl увеличиваются в 2.1 раза, а клетки ERas — в 4.5 раза по сравнению с контролем.

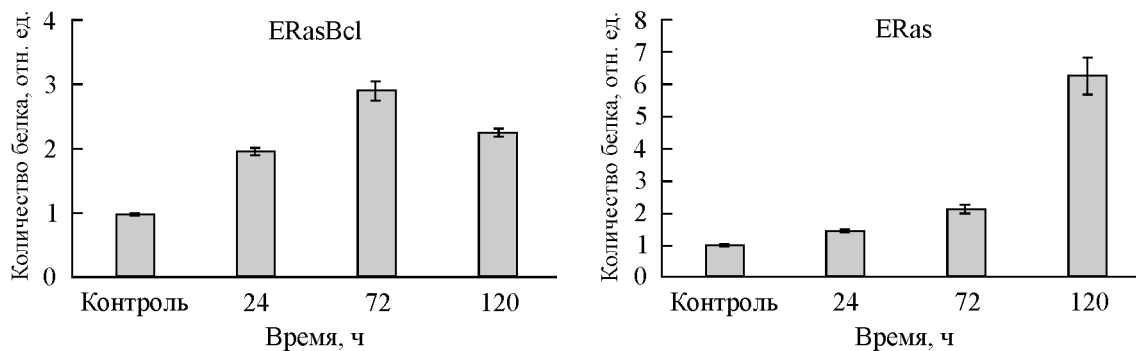


Рис. 4. Содержание белка в клетках при обработке NaBut в течение разного времени.

Содержание белка рассчитано на 1 клетку, в необработанных клетках оно принято за единицу.

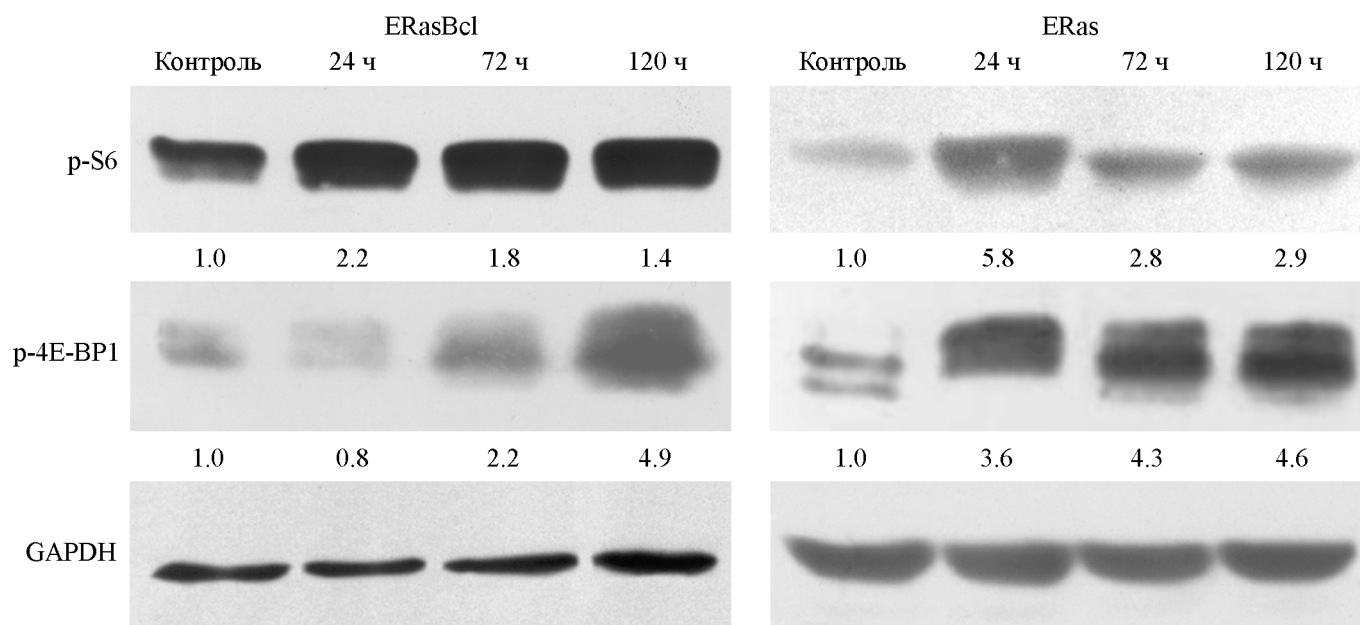


Рис. 5. Динамика фосфорилирования мишеней комплекса mTORC1 — белка S6 и 4E-BP1 при действии NaBut.

Числа под дорожками — значения отн. оптической плотности (D). Значение D в контроле принято за единицу. В качестве контроля нагрузки использовали белок GAPDH.

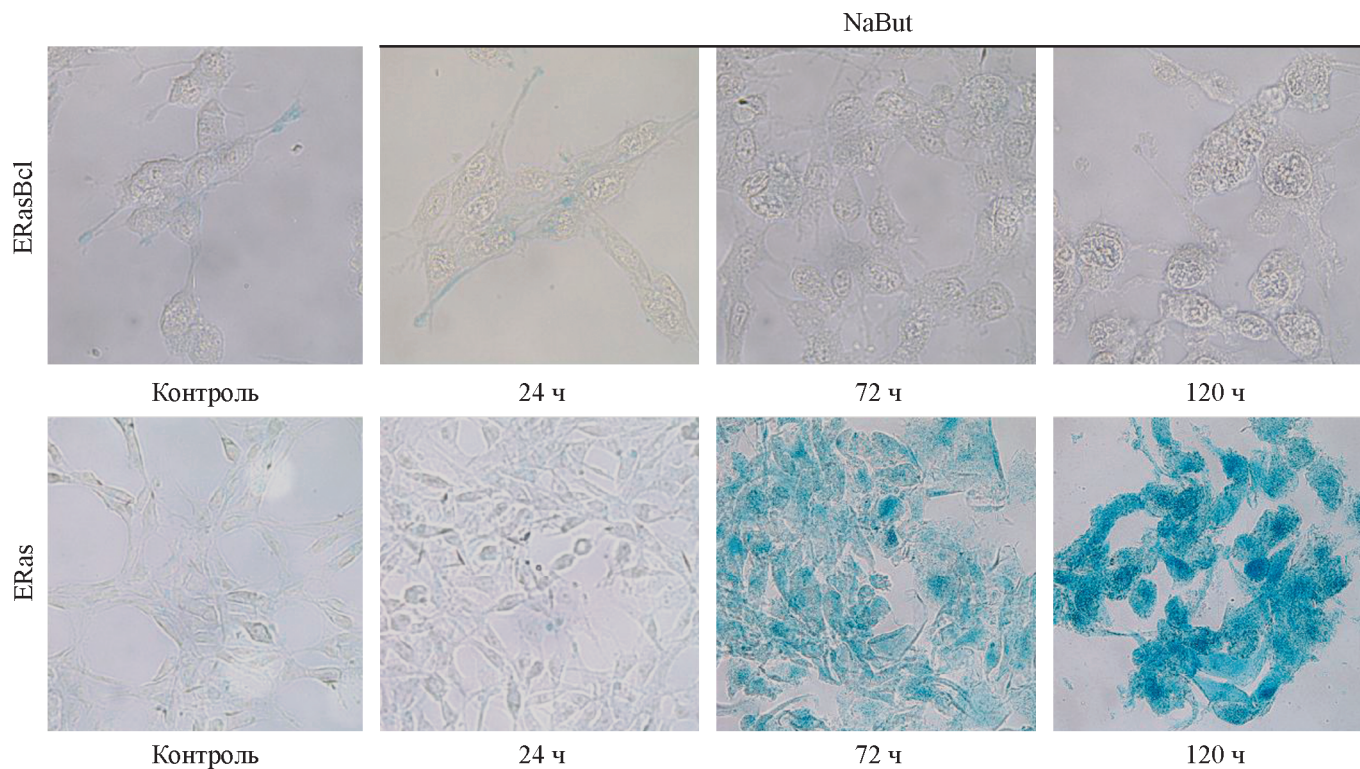


Рис. 6. Активность ассоциированной со старением β-галактозидазы (SA-β-Gal, синий цвет) в клетках линий ERas и ERasBcl в контроле и при действии NaBut.

В клетках ERasBcl активность SA-β-Gal не выявляется, а в клетках ERas проявляется через 72 ч действия NaBu.

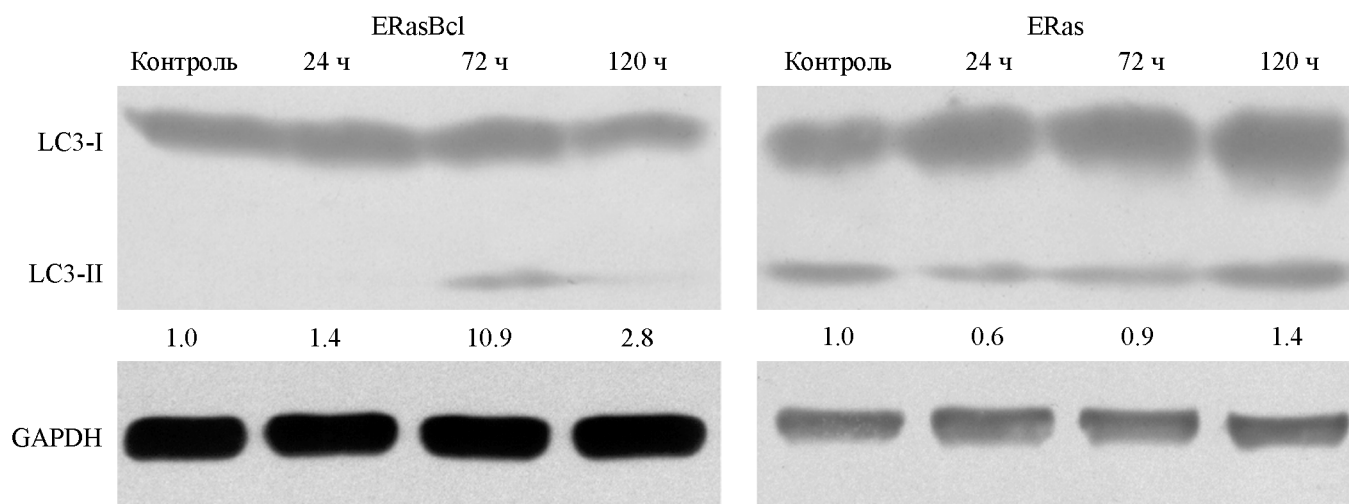


Рис. 7. Динамика перехода маркера аутофагосом — белка LC3 — из свободной цитоплазматической формы в мембранно-связанную.

Числа под дорожками — значения отн. оптической плотности (D). Значение D в контроле принято за единицу. В качестве контроля нагрузки использовали белок GAPDH. В клетках ERasBcl наблюдается транзитный переход LC3 из свободной цитоплазматической формы (LC3-I) в мембранно-связанную (LC3-II) через 72 ч действия NaBut, а в клетках ERas форма LC3-II присутствует как в контроле, так и после обработки NaBut.

активность SA- β -Gal при действии NaBut не отличается от контроля.

Поскольку развитие программы клеточного старения зависит от активности mTORC1 и тесно связано с программой аутофагии (Kang et al., 2011; Rubinsztein et al., 2011; Wang et al., 2012), мы оценивали уровень аутофагии по переходу белка LC3 из свободной цитоплазматической формы (LC3-I) в мембранно-связанную (LC3-II) на внешней мембране аутофагосомы (рис. 7). Нами был обнаружен базальный уровень аутофагии в контрольных, необработанных клетках ERas по присутствию формы LC3-II (рис. 7). Данные литературы также подтверждают существование базального уровня аутофагии в Ras-трансформированных клетках (Guo et al., 2011). При действии NaBut на клетки ERas в течение 1—3 сут этот уровень снижался, а через 5 сут поднимался выше контрольных значений. В клетках ERasBcl динамика накопления LC3-II принципиально иная: в контроле и в течение 1 сут действия NaBut LC3-II не выявляется, но обнаруживается на 3-й сут и существенно падает на 5-е (рис. 7).

Обсуждение

Индуктор программы старения — NaBut — ингибитор гистоновых деацетилаз 1-го и 2-го классов, который, как уже показано, активирует программу клеточного старения во многих типах опухолевых клеток, в том числе в эмбриональных фибробластах крысы, трансформированных онкогенами *cHa-Ras* и *E1A* (Зубова и др., 2005; Rikiishi, 2011).

Одним из важных маркеров старения клеток является необратимый блок клеточного цикла, связанный с сохранением высокой метаболической активности клеток (так называемый гипермитогенный арест), при котором стимуляция митогенами не приводит к прохождению клеток по циклу (Blagosklonny, 2003). Следствием гипермитогенного блока клеточного цикла и является программа старения, если в условиях этого блока синтезируется бо-

льшее количество белка, и клетки начинают увеличиваться в размерах. Это приводит к гипертрофии, которая является одним из основных событий процесса клеточного старения (Blagosklonny, 2003).

В устойчивых к апоптозу клетках, экспрессирующих *bcl-2*, гипертрофия развивается в значительно меньшей степени, несмотря на то что блок клеточного цикла у них не менее выражен. Как мы обнаружили, доля клеток в фазе G₁ достигает 77.5 %, тогда как в случае чувствительных родительских клеток их доля составляет 85.5 %. Интересно, что при этом блок в фазе G₂ не выявляется ни в чувствительных, ни в устойчивых к апоптозу клетках, а процесс накопления клеток в фазе G₁ идет за счет снижения доли реплицирующихся клеток (рис. 2). Как показал расчет, при действии NaBut время удвоения популяции *bcl-2*-экспрессирующих трансформантов возрастает с 18 до 42 ч. Это свидетельствует в пользу существенного замедления скорости прохождения клеток по циклу. Таким образом, замедление прохождения клеток по циклу при отсутствии признаков клеточного старения определяется гиперэкспрессией *bcl-2* в исследуемых клетках.

В условиях блока клеточного цикла и активированного белок-синтетического аппарата клетка, как уже было сказано ранее, начинает накапливать белок и увеличивается в размерах. Существует несколько компенсаторных механизмов, позволяющих клетке справиться с избыточным количеством белка. Например, стареющая клетка может начать секретировать белки (так называемый секреторный фенотип) (Coppé et al., 2010) либо запускать внутриклеточные механизмы утилизации белка — активировать убиквитин-протеасомную деградацию или аутофагию (Vicencio et al., 2008). Общеизвестным маркером процесса аутофагии является переход белка LC3 из свободной цитоплазматической формы в мембранно-связанную, что происходит при формировании аутофагосомы (Tanida et al., 2008). Не исключена и активация β -галактозидазы при нефизиологических значениях pH (6.0), тогда как в норме галактозидаза активна при pH 4.0 (Dimri et al., 1995).

В ряде работ было показано, что аутофагия является необходимым компонентом клеточного старения (Kang et al., 2011; Rubinsztein et al., 2011; Wang et al., 2012). Так, при Ras-индуцированном старении активируются гены *ATG* (такие как *ULK1*, *ULK2* и *ULK3* — гомологи гена *ATG1* дрожжей у млекопитающих, участвующие в стадии инициации аутофагии), LC3 — компонента аутофагосомы, а также белки BNIP3 и BNIP3L, ответственные за миграцию митохондрий в аутофагосому (Naga et al., 2008; Young et al., 2009). С другой стороны, было показано, что для Ras-индуцированной трансформации клетке требуется включение аутофагии для поддержания трансформированного фенотипа путем регуляции процессов метаболизма и жизнеспособности опухолевых клеток (Guo et al., 2011; Kim et al., 2011; Lock et al., 2011).

Цель активации аутофагии, имеющая своим началом киназу ULK1, контролируется киназой mTOR в составе комплекса mTORC1 и киназой AMPK. Активный mTORC1 осуществляет ингибирующее фосфорилирование ULK1, тогда как активная AMPK ингибирует mTORC1 и активирует ULK1. Активированный ULK1 инициирует развитие процесса аутофагии через комплекс VPS34/Becn1 (Roach, 2011).

В исследуемых нами линиях клеток — как чувствительной, так и устойчивой к апоптозу (*bcl-2*-экспрессирующей) — комплекс mTORC1 активирован и, следовательно, белок-синтетический аппарат клеток также активен. Мы это видим по накоплению фосфорилированных форм мишеней mTORC1 — рибосомального белка S6 и ингибитора фактора eIF4E инициации трансляции 4E-BP-1. Таким образом, комплекс mTORC1 активирован, и аутофагия, подконтрольная mTORC1, должна быть подавлена. Однако при действии HDACi мы наблюдаем подавление аутофагии только в клетках, экспрессирующих *bcl-2*, тогда как в клетках ERas как морфологически (по формированию везикул), так и по накоплению LC3-II и SA- β -Gal наблюдается аутофагия. Это противоречие, согласно описанной выше схеме контроля аутофагии, может быть связано с особой функцией аутофагии в процессе клеточного старения (Young et al., 2009).

Контроль mTORC1 над ULK1 в процессе инициации аутофагии показан в экспериментах по культивированию клеток без аминокислот. Дефицит аминокислот приводил к подавлению активности mTORC1, синтеза белка и активации аутофагии (Chen et al., 2014). В этом случае аутофагия является эволюционно консервативным, компенсаторным механизмом, помогающим клетке в условиях стресса и дефицита аминокислот пополнить их запас за счет деградации клеточных белков.

При клеточном старении, когда происходят остановка клетки в цикле и накопление белка, аутофагия на фоне старения, возможно, направлена не на компенсацию истощенного пула аминокислот в клетке, а, наоборот, на очистку клетки от избыточного количества белков. В этом случае аутофагия должна активироваться на фоне активного комплекса mTORC1. По-видимому, в этом случае работают иные, mTOR-независимые пути активации аутофагии.

Показано, что Bcl-2 может блокировать аутофагический процесс на ранних стадиях, взаимодействуя со скэффолд-белком машины роста фагофора — белком Beclin1, который является платформой агрегации многих сигнальных и эффекторных белков, связанных с аутофагическим процессом, в частности с процессом роста фагофора. Помимо Beclin1 ключевыми белками здесь являются UVRAG, Atg14, VPS15 и VPS34 — PI3-киназа 3-го класса. Взаимо-

действие Beclin1 и Bcl-2 нарушает сборку этого комплекса, делая невозможным дальнейшее развитие аутофагии (Patingre et al., 2005; Marquez, Xu, 2012).

Bcl-2 и Beclin1 — белки, несущие домен BH3 и взаимодействующие друг с другом через этот домен. Кроме того, Bcl-2 и Beclin1 имеют сайты фосфорилирования, которое осуществляют белки MAP-киназного каскада, в частности киназы JNK 1, 2 (Wei et al., 2008). Так как в исследуемых линиях клеток присутствует конститутивно-активный Ras, активирующий MAP-киназный каскад, который опосредует ингибирующее фосфорилирование Bcl-2 и Beclin1, это должно препятствовать их взаимодействию. Следствием этого события должно быть развитие аутофагии в *bcl-2*-экспрессирующих трансформантах, инициацию которой можно видеть по иммуноблоттингу LC3 аутофагосом (рис. 7). Мы наблюдаем транзитный переход LC3-I в LC 3-II. Это явление как раз может быть связано с влиянием MAP-киназного каскада на взаимодействие Beclin1 и Bcl-2. Однако полноценная активация процесса аутофагии в *bcl-2*-экспрессирующих клетках на фоне гипертрофии отсутствует.

Таким образом, нами обнаружена новая роль Bcl-2 в процессе клеточного старения. Bcl-2 препятствует HDACi-индуцированной реактивации клеточного старения в трансформированных фибробластах грызунов, устойчивых к апоптозу (клетках ERasBcl), возможно в связи с тем, что он блокирует программу не только апоптоза, но и аутофагии. Согласно данным ряда авторов, она может быть необходима для уничтожения существующих белков в клетке, с тем чтобы затем более точно и корректно установить новую программу — в данном случае программу старения. Однако конкретные механизмы роли Bcl-2 в этом сложном процессе нуждаются в дальнейшем изучении.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы МКБ РАН, Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00552) и программы 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., Поспелов В. А., Поспелова Т. В. 2005. Индукция программы ускоренного старения ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия в нормальных и трансформированных фибробластах крысы. Цитология. 47 (12) : 1055—1062.
- (Zubova Yu. G., Bykova T. V., Zubova S. G., Abramova M. V., Aksenov 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.)
- Шутикова Ж. В., Аксенов Н. Д., Поспелов В. А., Поспелова Т. В. 2011. Индукция клеточного старения ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия в трансформантах грызунов, устойчивых к апоптозу. Цитология. 53 (3) : 277—284.
- (Chitikova Z. V., Aksenov N. D., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 2011. Sodium butyrate induces cell senescence in rodent transformed cells resistant to apoptosis. Tsitologiya. 53 (3) : 277—284.)
- Adams J. M., Cory S. 2007. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. Oncogene. 26 : 1324—1337.
- Blagoslony M. V. 2003. Cell senescence and hypermitogenic arrest. EMBO Rep. 4 : 358—362.
- Bradford M. 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.

- Brown K., Buchmann A., Balmain A. 1990. Carcinogen-induced mutations in the mouse c-Ha-ras gene provide evidence of multiple pathways for tumor progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87 : 538—542.
- Campisi J. 1999. Cancer, aging and cellular senescence. *In Vivo.* 14 : 183—188.
- Campisi J. 2001. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* 11 : 27—31.
- Chen R., Zou Y., Mao D., Sun D., Gao G., Shi J., Liu X., Zhu C., Yang M., Ye W., Hao Q., Li R., Yu L. 2014. The general amino acid control pathway regulates mTOR and autophagy during serum/glutamine starvation. *J. Cell Biol.* 206 : 173—182.
- Chitikova Z. V., Gordeev S. A., Bykova T. V., Zubova S. G., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 2014. Sustained activation of DNA damage response in irradiated apoptosis-resistant cells induces reversible senescence associated with mTOR down regulation and expression of stem cell markers. *Cell Cycle.* 13 : 1424—39.
- Chondrogianni N., Stratford F. L., Trougakos I. P., Friguet B., Rivett A. J., Gonos E. S. 2003. Central role of the proteasome in senescence and survival of human fibroblasts: induction of a senescence-like phenotype upon its inhibition and resistance to stress upon its activation. *J. Biol. Chem.* 278 : 28 026—28 037.
- Coppé J. P., Desprez P. Y., Krtolica A., Campisi J. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Ann. Rev. Pathol. Mech. Disease.* 5 : 99—118.
- Dejean L. M., Martinez-Caballero S., Manon S., Kinnally K. W. 2006. Regulation of the mitochondrial apoptosis-induced channel, MAC, by BCL-2 family proteins. *Biochim. biophys. acta.* 1762 : 191—201.
- Dimiri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Pereira-Smith O. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92 : 9363—9367.
- Downward J. 1998. RASSIGNALLING and apoptosis. *Curr. Opin. Genet. Develop.* 8 : 49—54.
- Egan D., Kim J., Shaw R. J., Guan K. L. 2011. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy.* 7 : 643—644.
- Gerl R., Vaux D. L. 2004. Apoptosis in the development and treatment of cancer. *Carcinogenesis.* 26 : 263—270.
- Guo J. Y., Chen H. Y., Mathew R., Fan J., Strohecker A. M., Karsli-Uzunbas G., White E. 2011. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Develop.* 25 : 460—470.
- Hara T., Takamura A., Kishi C., Iemura S. I., Natsume T., Guan J. L., Mizushima N. 2008. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 181 : 497—510.
- Kang H. T., Lee K. B., Kim S. Y., Choi H. R., Park S. C. 2011. Autophagy impairment induces premature senescence in primary human fibroblasts. *PLoS ONE.* 6 : 23367e.
- Kim M. J., Woo S. J., Yoon C. H., Lee J. S., An S., Choi Y. H., Lee S. J. 2011. Involvement of autophagy in oncogenic K-Ras-induced malignant cell transformation. *J. Biol. Chem.* 286 : 12 924—12 932.
- Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W. J., Peeper D. S. 2010. The essence of senescence. *Genes Develop.* 24 : 2463—2479.
- Laemmli V. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227 : 680—685.
- Lock R., Roy S., Kenific C. M., Su J. S., Salas E., Ronen S. M., Debnath J. 2011. Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Mol. Biol. Cell.* 22 : 165—178.
- Marquez R. T., Xu L. 2012. Bcl-2: Beclin 1 complex: multiple mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Amer. J. Cancer Res.* 2 : 214—221.
- Nazarko V., Zhong Q. 2013. ULK1 targets Beclin-1 in autophagy. *Nature Cell Biol.* 15 : 727—728.
- Nelioudova A. M., Tararova N. D., Aksenov N. D., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 2004. Restoration of G₁/S arrest in E1A + cHa-ras-transformed cells by Bcl-2 overexpression. *Cell Cycle.* 11 : 1427—1432.
- Pattingre S., Tassa A., Qu X., Garuti R., Liang X. H., Mizushima N., Packer M., Schneider M. D., Levine B. 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 122 : 927—939.
- Pospelova T. V., Medvedev A. V., Kukushkin A. N., Svetlikova S. B., van der Eb A. J., Dorsman J. C., Pospelov V. A. 1999. E1A+cHa-ras transformed rat embryo fibroblast cells are characterized by high and constitutive DNA binding activities of AP-1 dimers with significantly altered composition. *Gene Expression.* 8 : 19—32.
- Rikiishi H. 2011. Autophagic and apoptotic effects of HDAC inhibitors on cancer cells. *BioMedRes.Int.* 2011. doi: 10.1155/2011/830260.
- Roach P. 2011. AMPK → ULK1 → autophagy. *Mol. Cell Biol.* 31 : 3082—3084.
- Rubinsztein D. C., Mariño G., Kroemer G. 2011. Autophagy and aging. *Cell.* 146 : 682—695.
- Serrano M., Lin A. W., McCurrach M. E., Beach D., Lowe S. W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell.* 88 : 593—602.
- Tanida I., Ueno T., Kominami E. 2008. LC3 and autophagy. *Methods Mol. Biol.* 445 : 77—88.
- Vicencio J. M., Galluzzi L., Tajeddine N., Ortiz C., Criollo A., Tasdemir E., Morselli E., Younes B., Maiuri M. C., Lavandro S., Kroemer G. 2008. Senescence, apoptosis or autophagy? *Gerontology.* 54 : 92—99.
- Wang G. B., Ni Y. L., Zhou X. P., Zhang W. F. 2014. The AKT/mTOR pathway mediates neuronal protective effects of erythropoietin in sepsis. *Mol. Cell Biochem.* 385 : 125—312.
- Wang Y., Wang X. D., Lapi E., Sullivan A., Jia W., He Y. W., Lu X. 2012. Autophagic activity dictates the cellular response to oncogenic Ras. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 109 : 13 325—13 330.
- Wei Y., Sinha S., Levine B. 2008. Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy.* 7 : 949—951.
- Young A. R. J., Narita M., Ferreira M., Kirschner K., Sadaie M., Darot J. F. J., Tavares S., Arakawa S., Shimizu S., Watt F. M. 2009. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Develop.* 23 : 798—803.

ANTIAPOPTOTIC GENE *bcl-2* PREVENTS CELLULAR SENEESCENCE PROGRAM
REACTIVATION INDUCED BY HISTONE DEACETYLASE INHIBITOR SODIUM BUTYRATE
IN *E1A* AND *cHa-ras* TRANSFORMED RAT FIBROBLASTSS. A. Gordeev,^{1, 2, *} T. V. Bykova,^{1, 2} S. G. Zubova,¹ N. D. Aksenov,¹ T. V. Pospelova^{1, 2}¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and ² St. Petersburg State University; * e-mail: s.a.gordeev@hotmail.com

We have investigated the role of apoptosis resistance gene *bcl-2* in the activation of cellular senescence program induced by histone deacetylase inhibitor (HDACi) sodium butyrate (NaBut) in transformed rat fibroblasts. This study was conducted in a resistant to apoptosis induction cell line of rat embryo fibroblasts transformed by oncogenes *E1A*, *cHa-ras* and *bcl-2* (ERasBcl). The parent cell line transformed with only *E1A* and *cHa-ras* (ERas) was used as a control. It has been found that NaBut reduces proliferation rate of ERasBcl cells significantly weaker than of ERas transformed cells, despite the fact that the G₁ cell cycle arrest was observed in both cell lines. After NaBut treatment, hypertrophy of the apoptosis resistant transformants ERasBcl also was reduced compared to parent cell line ERas, due to less activation of mTORC1, which is known to control the synthesis of protein and ribosome biogenesis. The degree of mTORC1 activation was assessed by its target proteins phosphorylation: the ribosomal S6 protein and 4E-BP1 — inhibitor of translation initiation factor eIF4E. Since cell senescence process may be associated with changes in autophagy regulation, we analyzed the dynamics of one of the main autophagosome formation markers — protein LC3. The accumulation of lipid-bound form LC3-II changes significantly in ERasBcl cells after NaBut treatment and has transient nature. The set of analyzed cellular senescence markers suggests that a high level of apoptosis resistance gene *bcl-2* expression prevents the realization of tumor-suppressor senescence program induced by HDACi sodium butyrate treatment.

Key words: senescence, sodium butyrate, autophagy, *bcl-2*, HDACi.
