

## ХЛОРОКВИН НЕ ОТМЕНЯЕТ ГИБЕЛЬ ТРАНСФОРМАНТОВ *E1A+cHa-Ras*, ИНДУЦИРОВАННУЮ ИНГИБИТОРОМ КИНАЗЫ mTOR

© Т. В. Быкова,\* С. Г. Зубова, Е. Ю. Кочеткова, Т. В. Поспелова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

\* электронный адрес: bykova\_tatiana@mail.ru

Исследовали зависимость жизнеспособности трансформированных эмбриональных фибробластов крысы *E1A+cHa-Ras*, индуцированных к старению бутиратом натрия, от модуляции аутофагии, вызванной ингибитором киназы TORC1, TORC2 веществом pp242. Ингибитор pp242 резко снижает функциональную активность митохондрий в клетках *E1A+cHa-Ras*, что служит причиной их гибели путем митофагии, а присутствие хлороквина, блокирующего слияние лизосом с аутофагосомами, не отменяет его действие. Индуцированные к старению клетки *E1A+cHa-Ras* более устойчивы к действию pp242, чем контрольные, но в присутствии pp242 и хлороквина их жизнеспособность снижается. Таким образом, полученные нами данные позволяют рассматривать комбинацию ингибитора pp242 и хлороквина как эффективный способ индукции гибели интактных и индуцированных к старению *Ras*-трансформированных клеток.

Ключевые слова: аутофагия, клеточное старение, бутират натрия, pp242, хлороквин.

Принятые сокращения: HDAC1 — ингибитор гистоновых деацетилаз, NaBut — бутират натрия.

Аутофагия — это процесс деградации, в ходе которого неправильно упакованные и долгоживущие белки, а также поврежденные органеллы утилизируются для поддержания клеточного гомеостаза и получения энергии. Аутофагия активируется различными факторами стресса, в частности голоданием, нехваткой ростовых факторов, гипоксией, повреждениями ДНК и органелл или патогенными бактериями и вирусами (Abounit et al., 2012; Vessoni et al., 2013). Процесс аутофагии состоит из стадий формирования будущей везикулы, ее созревания, слияния с лизосомой с последующей деградацией и утилизацией содержимого (Abounit et al., 2012). Маркером образования изолирующей мембраны является преобразование цитоплазматического белка LC3I в мембрано-связанную липидированную форму LC3II, которая располагается как на внешней, так и на внутренней стороне везикулы. Как клетка распознает материал, предназначенный для деградации, пока изучено не до конца, но известно, что она может распознавать отдельные убиквитинилированные белки, и важную роль в этом процессе играет белок p62/SQSTM1, который переносит убиквитинилированные белки через мембрану аутофагосомы для последующей деградации (Mathew et al., 2009). Для злокачественных клеток аутофагия играет двоякую роль. С одной стороны, она способствует удалению поврежденных белков и органелл, а возможно, и дефектного материала хромосом (Janku et al., 2011; Vessoni et al., 2013). С другой стороны, если процесс формирования аутофагосом не ограничен и выходит из-под контроля, он может приводить к аутофагической гибели. Известно, что аутофагия может способствовать выживанию опухолей, поддерживая жизнеспособность клеток, расположенных в местах, бедных

сосудами, в районах опухолей, стрессированных гипоксией (Wei et al., 2012). *Ras*-индуцированным клеткам особенно необходим базовый уровень аутофагии как механизм для поддержания гомеостаза и жизнеспособности (Guo et al., 2011). В то же время есть данные о том, что аутофагия может способствовать подавлению *Ras*-индуцированной трансформации и гибели клеток (Marino et al., 2014). Важно отметить, что дефекты аутофагии обнаружены во многих типах опухолей (White et al., 2011). Таким образом, вопрос о том, является ли аутофагическая активность причиной клеточной гибели или попыткой предотвратить ее, остается открытым.

Аутофагию регулируют многие сигнальные пути, в частности PI3K/Akt, который ингибирует аутофагию, активируя комплекс mTORC1, являющийся негативным регулятором аутофагии (Massacesi et al., 2016). Между активностью mTORC1 и уровнем аутофагии существует обратная зависимость (Janku et al., 2011). С другой стороны, известно, что активация mTORC1, сопровождающая ускоренное старение, не отменяет активацию процесса аутофагии, которую в этом случае следует отнести к категории mTOR-независимой аутофагии (Narita et al., 2009; Janku et al., 2011). В свою очередь киназа AMP при низком уровне АТФ ингибирует mTORC1 через активацию туберозно-склерозного комплекса-2 для активации процессов рециклирования в ходе аутофагии и восстановления уровня АТФ (Hardie, 2015). Несмотря на то что однозначного мнения по поводу значения аутофагии для опухолевых клеток нет, многие исследования свидетельствуют в пользу того, что аутофагия является ме-

ханизмом их выживания (White et al., 2011; Wei et al., 2012).

Показано, что аутофагия может защищать клетки, в том числе злокачественные, от различных стимулов, вызывающих клеточную смерть. Например, подавление аутофагии увеличивает чувствительность к множеству химиотерапевтических агентов (White et al., 2011). Более того, имеются свидетельства того, что аутофагия непосредственно ингибирует апоптотический процесс (Maggiò et al., 2014). Поскольку аутофагия необходима клетке, в том числе опухолевой, для поддержания гомеостаза и жизнедеятельности, ее подавление может служить причиной клеточной смерти. В то же время неконтролируемая аутофагия также может быть причиной гибели клеток. В связи с этим интересны возможности модуляции активности аутофагии для элиминации опухолевых клеток. Так, препарат хлороквин, который ранее применяли для терапии малярии (Manic et al., 2014), блокирует аутофагию на стадии слияния аутофагосом с лизосомами. Это в конечном итоге может влиять на жизнеспособность клеток или вызывать их гибель, если их жизнеспособность зависит от аутофагии. Свидетельства необходимости аутофагии для *Ki-Ras*-индуцированной злокачественной трансформации (Kim et al., 2011) позволяют полагать, что аутофагия может быть перспективной мишенью для воздействия на злокачественные клетки и что модулирование ее активности может помочь в селективной элиминации *Ras*-трансформированных клеток, для которых характерна высокая злокачественность.

Клеточное старение — это состояние клетки, при котором стабильно блокируется клеточный цикл, но остается активным метаболизм (Kuilman et al., 2010). Индукция клеточного старения является одним из механизмов противоопухолевого действия химиотерапевтических препаратов. В результате их применения опухолевые клетки стареют и прекращают деление (Campisi, 2001). Поскольку стареющие клетки секретируют цитокины и ферменты, разрушающие окружающую ткань, это может способствовать развитию различных патологий, ассоциированных с возрастом (Campisi, 1998). Кроме того, секреторный фенотип стареющих клеток может способствовать трансформации окружающих клеток (Campisi, 2005). Поэтому элиминирование стареющих опухолевых клеток является одной из приоритетных задач онкологии.

Активацию программы старения могут вызывать хромосомные аберрации, ретиноиды, радиация и другие стресс-факторы, а также ингибиторы гистоновых деацетилаз (HDAC1), в частности бутират натрия (NaBut) (Robles et al., 1998; Toussaint et al., 2000). Старение, индуцированное NaBut, характеризуется высокой активностью киназы mTORC1 и превалированием анаболических процессов, а также активацией процесса аутофагии, необходимой для поддержания клеточного гомеостаза. В этих условиях подавление аутофагии, как мы полагаем, может усиливать чувствительность стареющих опухолевых клеток к терапии.

Как уже говорилось выше, одним из ключевых регуляторов аутофагии является киназа mTOR в составе комплекса mTORC1 (Narita et al., 2009). Ингибирование активности mTORC1 приводит к активации аутофагии. Ранее нами было показано, что ингибитор комплекса mTORC1 pp242 снижает активность mTORC1 в трансформированных эмбриональных фибробластах крысы *E1A+cHa-Ras* (клетках ERas), приводя к быстрому и резкому падению фосфорилирования прямой мишени комплекса

mTORC1 — белка инициатора элонгации транскрипции p4E-BP1. В то же время pp242 приводит к активации аутофагии, т. е. к перевариванию поврежденных митохондрий в аутолизосомах. В дальнейшем этот процесс переходит в фазу неконтролируемой аутофагии и завершается апоптозом (Gordeev et al., 2015). Известно, что NaBut, являясь HDAC1, активирует старение трансформантов ERas, при этом происходит повышение активности mTORC1 с последующим фосфорилированием его мишеней 4E-BP1 и рибосомального белка S6 (Гордеев и др., 2015).

В связи с этим целью работы было изучение взаимосвязи аутофагии с жизнеспособностью контрольных и стареющих трансформантов ERas. В задачи работы входил подбор оптимального сочетания ингибиторов и активаторов аутофагии для элиминации устойчивых к апоптозу стареющих опухолевых клеток.

## Материал и методика

**Клеточные линии.** Использовали стабильную линию эмбриональных фибробластов крысы, трансформированных путем введения пары комплементирующих онкогенов: раннего района *E1A* аденовируса 5-го типа человека и *c-Ha-Ras* человека с мутациями в 12-м и 61-м положениях (клетки ERas). Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной телячьей сыворотки, при 5 % CO<sub>2</sub> и 37 °C. Старение клеток индуцировали NaBut, который относится к HDAC1, в концентрации 4 мМ в течение 5 сут. В качестве ингибитора комплекса mTORC1 использовали pp242 в концентрации 1500 нМ, для ингибирования фазы слияния аутофагосом с лизосомами в процессе аутофагии использовали хлороквин в концентрации 25 мкМ.

Изменения морфологии клеток при действии NaBut, хлороквина и pp242 анализировали по методу Май-Грюнвальда. Клетки высевали на стекла и культивировали в присутствии исследуемых препаратов в течение необходимого времени, затем стекла промывали PBS и окрашивали эозин-метиленовым синим по Май-Грюнвальду в течение 1 мин при комнатной температуре. Окрашенные стекла промывали проточной водой и заключали в канадский бальзам.

**Электрофорез в полиакриламидном геле.** Активность киназного комплекса mTORC1, контролирующего аутофагию, оценивали по накоплению фосфорилированных форм прямой мишени mTORC1 — фактора трансляции p4E-BP1 путем электрофореза в полиакриламидном геле. Клетки лизировали в буфере RIPA, содержащем 1 % Igepal, 0.5 % деоксихолата натрия, 0.1 % SDS, 50 мМ Трис-HCl, pH 8.0, 150 мМ NaCl, 2 мМ EDTA, 60 мМ NaF, 50-кратный коктейль протеазных ингибиторов, а также 1 мМ ванадата натрия и 1 мМ PMSF. Содержание белка в пробах определяли по методу Брэдфорд. Белки разделяли в 12%-ном SDS-полиакриламидном геле с последующим полусухим переносом на мембрану PVDF, предварительно активированную в метилоловом спирте. Забивку мембраны проводили 10%-ным обезжиренным молоком в течение 1 ч, затем мембрану ополаскивали дистиллированной водой и инкубировали с первичными антителами к p4E-BP1 (Cell Signaling Technology, США) и  $\alpha$ -тубулину (Sigma, США) в растворе 5%-ного BSA в буфере TBS-T в течение 10–12 ч при 4 °C, после чего инкубировали со вторичными антителами (goat-anti-rabbit и rabbit-anti-mouse), конъюгированными

ми с пероксидазой хрена. Визуализацию сигнала проводили методом ECL.

Иммунофлуоресценция и конфокальная микроскопия. Клетки высевали на стекла и культивировали в присутствии исследуемых препаратов, затем промывали PBS и фиксировали 3%-ным формальдегидом в течение 20 мин при комнатной температуре. Пермеабиллизацию клеточных мембран проводили 0.2%-ным Тритоном X-100 в течение 20 мин, после чего препараты блокировали в растворе 3%-ного BSA в буфере TBS-T в течение 1.5 ч и инкубировали с антителами к p62/SQSTM1 (BD-Transduction Laboratorys, США), к LC3 (MBL, США), цитохрому *c* (Cell Signaling Technology, США) и mTOR (Cell Signaling Technology, США) в растворе 3%-ного BSA в TBS-T в течение ночи при 4 °C. После отмывания препараты инкубировали в течение 1 ч со вторичными антителами goat-anti-rabbit и goat-anti-mouse, несущими флуоресцентные метки Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 568 соответственно (Invitrogen, США), в присутствии DAPI для визуализации ядер. Анализ изображений проводили с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL (Германия).

Оценка жизнеспособности клеток методом МТТ. Клетки высевали на чашки Петри в количестве 30 000 на 1 чашку. Через 24 ч в культуральную среду добавляли хлороквин, или pp242, или оба препарата одновременно и культивировали согласно протоколу опыта. Часть клеток предварительно обрабатывали NaBut в течение 120 ч. Для проведения теста клетки культивировали в кондиционированной среде, содержащей 0.5 мг/мл МТТ (Sigma-Aldrich, США), в течение 1 ч при 37 °C в CO<sub>2</sub> инкубаторе. Затем среду заменяли на DMSO и инкубировали 30 мин. Оптическую плотность измеряли при длине волны 570 нм.

Исследование функциональной активности митохондрий. Клетки высевали на покровные стекла и культивировали в чашках Петри согласно протоколу опыта. После этого клетки окрашивали метиловым эфиром тетраметилродамина (TMRM; Invitrogen, США), вводя его в среду до конечной концентрации 100 нМ на 25 мин при 37 °C. Затем клетки отмывали в PBS и анализировали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SL.

## Результаты

В настоящей работе активность комплекса mTORC1 оценивали по фосфорилированию 4E-BP1 методом Вестерн-блоттинга (рис. 1, *a*). Согласно этим данным, pp242 в

дозе 1500 нМ практически полностью подавляет фосфорилирование 4E-BP1 в ERas-трансформантах уже через 2 ч, фосфорилированный p4E-BP1 не выявляется в течение последующих 48 ч. Ингибитор pp242 в концентрациях 200 и 750 нМ также подавляет фосфорилирование 4E-BP1, но уже через 1 сут его фосфорилирование восстанавливается.

В клетках ERas, индуцированных к старению NaBut в течение 5 сут, pp242 в концентрации 1500 нМ также подавляет фосфорилирование 4E-BP1 уже через 30 мин, и низкий уровень активности комплекса mTORC1 поддерживается в течение 1 сут (рис. 1, *б*). В экспериментах со стареющими ERas-клетками pp242 использовали в концентрации 1500 нМ, поскольку в этой концентрации он полностью подавляет экспрессию p4E-BP1 в контрольных ERas.

Оценку жизнеспособности интактных и индуцированных к старению клеток после обработки pp242 и хлороквином проводили при помощи МТТ-теста (рис. 2). По данным МТТ-теста можно заключить, что через 1 сут культивирования хлороквин не оказывает значимого влияния на жизнеспособность как нормальных, так и индуцированных к старению действием NaBut клеток ERas. Однако через 3 сут жизнеспособность контрольных и стареющих клеток снижается (рис. 2, *б*).

Ингибитор pp242 через 1 сут снижает жизнеспособность как контрольных, так и стареющих клеток ERas, и она не повышается в присутствии хлороквином (рис. 2, *a*, *в*). После культивирования в присутствии pp242 в течение 3 сут жизнеспособность исходных и стареющих клеток продолжала снижаться по сравнению с контролем ( $P < 0.01$ ) (рис. 2, *б*, *г*). Однако необходимо отметить, что клетки, предварительно обработанные NaBut, были более устойчивыми к действию pp242, чем исходные. В то же время стареющие клетки показали более высокую по сравнению с исходными чувствительность к подавлению аутофагии, вызванной совместным действием pp242 и хлороквином: их присутствие усиливало цитотоксический эффект ( $P < 0.01$ ).

Снижение жизнеспособности клеток сопровождается падением функциональной активности митохондрий (рис. 3, *a*). В контрольных клетках вокруг ядра наблюдается яркое свечение митохондрий, образующих митохондриальную сеть, что свидетельствует о высоком уровне их энергетической активности. В присутствии pp242 через 24 ч интенсивность флуоресцентного сигнала заметно снижается, что говорит о падении функциональной активности митохондрий. После совместного 24-часового действия pp242 и хлороквином в цитоплазме можно видеть

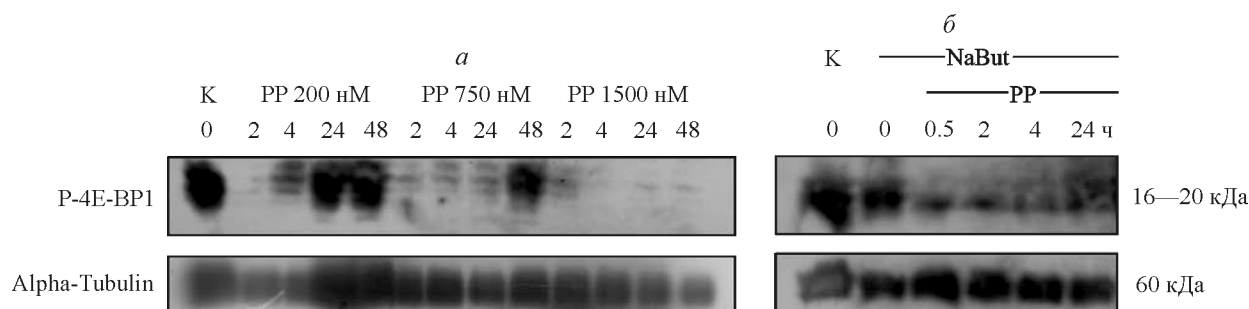


Рис. 1. Динамика фосфорилирования мишени комплекса mTORC1 белка 4E-BP1 в контрольных (*a*) и стареющих (*б*) клетках ERas после действия ингибитора pp242 в разных концентрациях и в течение разного времени.

Старение вызывали действием NaBut (4 мМ, 5 сут). К — контроль. В качестве контроля нагрузки использовали белок alpha-Tubulin.

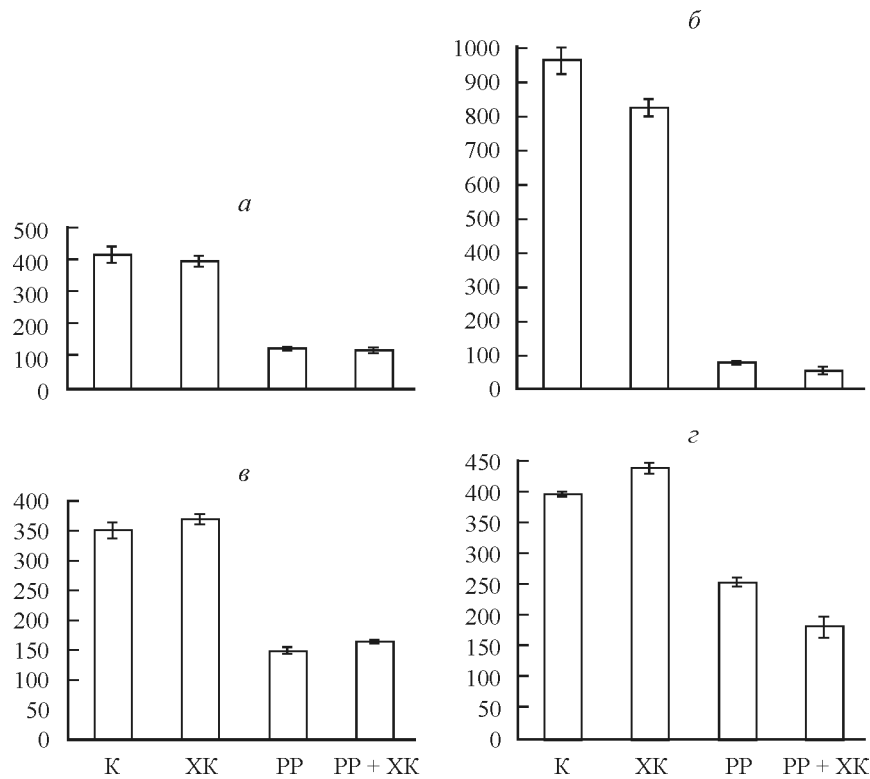


Рис. 2. Жизнеспособность контрольных (а, б) и стареющих (в, з) ERas-трансформантов при раздельном и совместном действии хлороквина (XK) и pp242 (PP) по данным МТТ-теста.

Клетки культивировали в присутствии препаратов в течение 1 (а, в) и 3 (б, з) сут. К — контроль. Старение индуцировали NaBut (4 мМ, 5 сут). По вертикали — оптическая плотность, отн. ед. Вертикальные отрезки показывают стандартное отклонение (n = 6).

единичные ярко светящиеся крупные скопления. В клетках, индуцированных к старению действием NaBut, в присутствии pp242 свечение TMRM сохраняется на уровне контроля в течение 24 ч, однако при одновременном действии pp242 и хлороквина через 24 ч свечение практически полностью исчезает.

Выход в цитоплазму цитохрома с происходит вследствие пермеабиллизации внешней мембраны митохондрий (МОМР), что приводит к активации каспаз, энергетической катастрофе и гибели клеток двумя путями: путем апоптоза, как это было показано нами ранее (Gordeev et al., 2015), или путем аутофагической программированной гибели. Высокие дозы pp242 вызывают быстрое повышение интенсивности свечения цитохрома с в интактных клетках через 3 ч, и он локализуется в виде скоплений (фокусов) внутри аутофагосом, так как LC3 колокализуется с цитохромом с, как это видно по изменению красного цвета на оранжевый (рис. 3, б). Однако через 24 ч интенсивность сигнала заметно ослабевает, но свечение выявляется по-прежнему внутри аутофагосом, что может быть следствием переваривания в них митохондрий. Однако после 24 ч совместного действия pp242 и хлороквина можно наблюдать более высокий по сравнению с действием одного pp242 уровень свечения цитохрома с, который формирует более крупные, но нерегулярные скопления, чем в контроле.

В клетках, индуцированных к старению, pp242, а также pp242 совместно с хлороквином, вызывают лишь незначительное усиление иммунофлуоресцентного сигнала цитохрома с через 24 ч, и он распределяется равномерно по цитоплазме (рис. 3, б).

Иммунофлуоресцентный анализ с антителами к маркеру аутофагии белку LC3 показал, что в исходных клетках активность LC3 возрастает уже через 3 ч после действия ингибитора mTOR pp242 и остается на высоком уровне в течение 24 ч (рис. 3, б). В индуцированных к старению клетках также наблюдается высокий уровень экспрессии LC3, что говорит о высокой активности процесса mTOR-независимой аутофагии в стареющих клетках.

Согласно результатам морфологических наблюдений, в контрольных клетках ERas после действия pp242 в течение 24 ч происходит накопление аутофагосом, а при совместном действии pp242 и хлороквина аутофагосомы морфологически не выявляются (рис. 4, а). Действие NaBut в течение 5 сут вызывает гипертрофию клеток и накопление аутофагосом, а культивирование в присутствии pp242 или pp242 совместно с хлороквином не приводит к увеличению их числа.

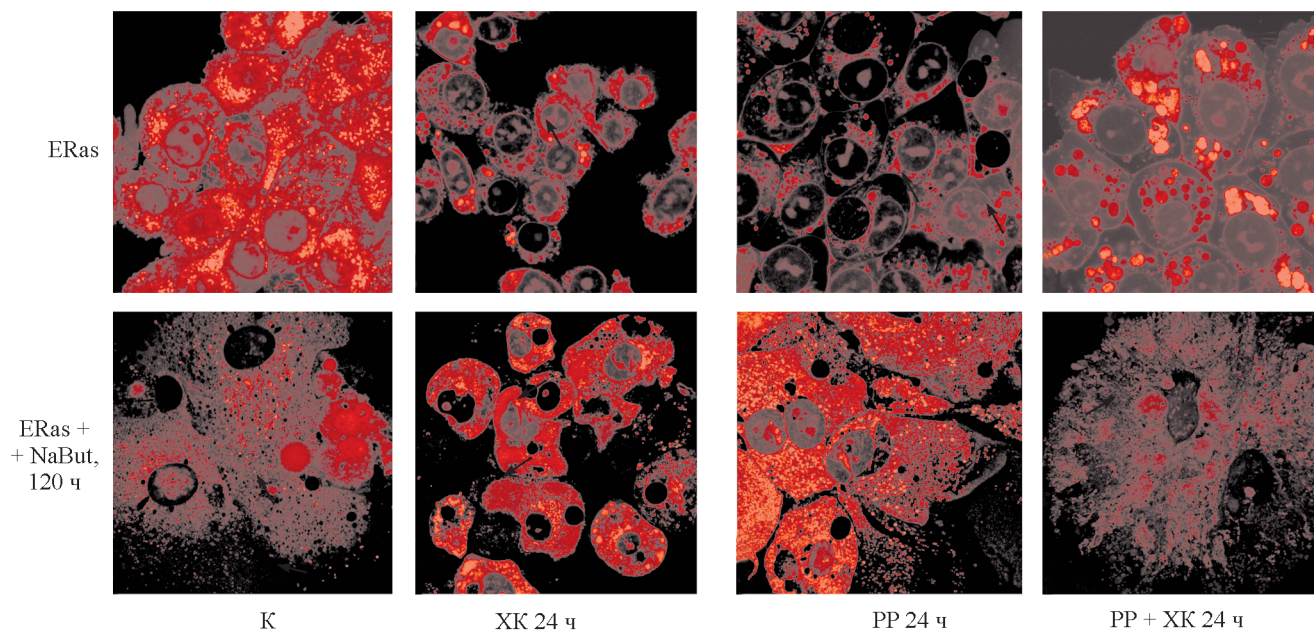
Эффективность процесса аутофагии зависит от переноса в аутофагосомы убиквитинилированных белков, связанных с p62/SQSTM1, и их последующей деградации

Рис. 3. Функциональное состояние митохондрий в контрольных и стареющих ERas-трансформантах при действии 1500 нМ pp242 (PP) и 25 мМ хлороквина (XK).

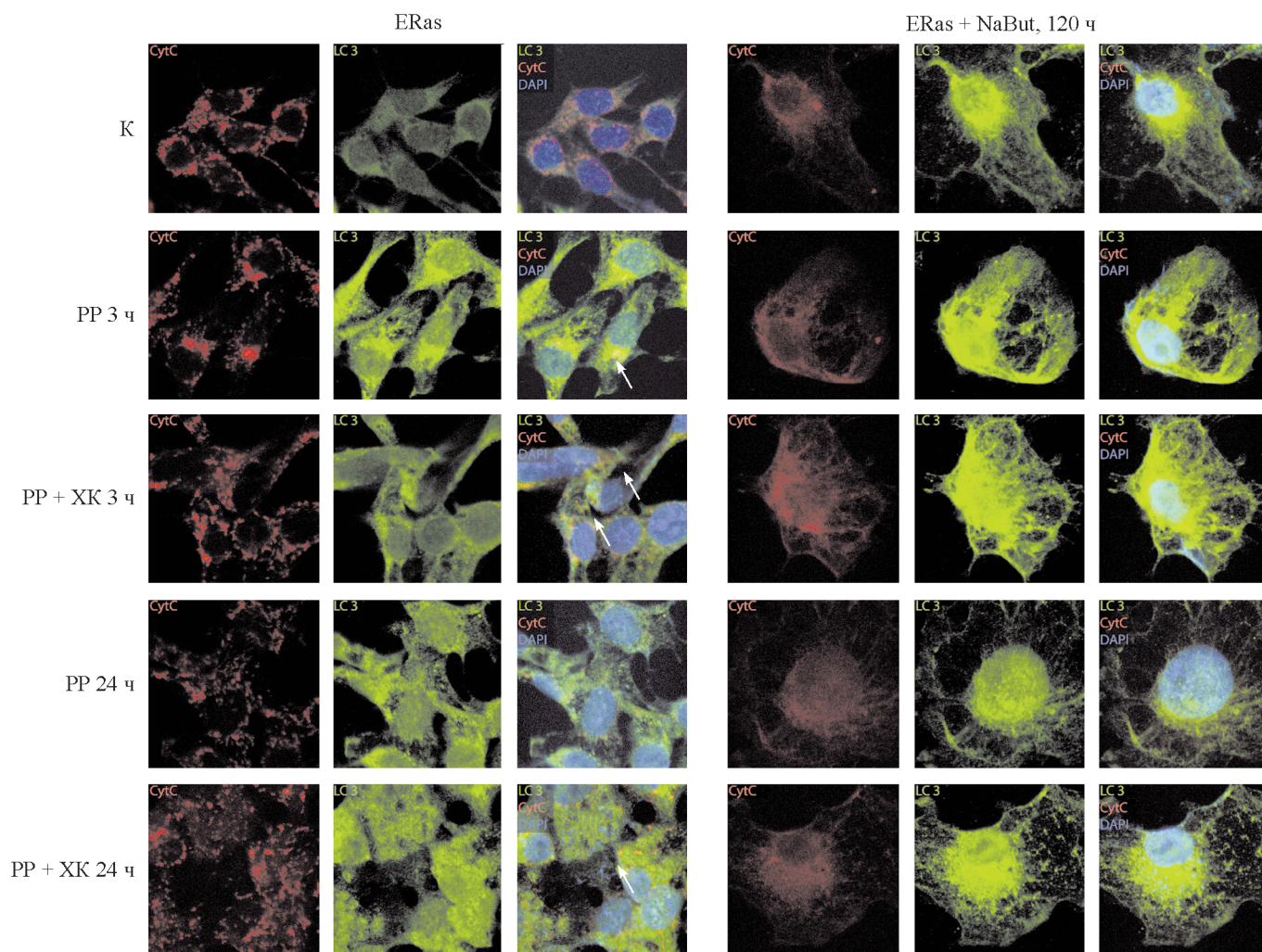
а — выявление активности (интенсивности окраски) с помощью TMRM. б — внутриклеточное распределение цитохрома с (CytC) и маркера аутофагии LC3 в контрольных клетках и в клетках, индуцированных к старению NaBut (4 мМ, 5 сут), после PP и XK по данным иммунофлуоресценции. LC3 — зеленый цвет, цитохром с — красный. Ядра визуализированы DAPI (синий цвет). Стрелки указывают на скопления цитохрома с.



a



b





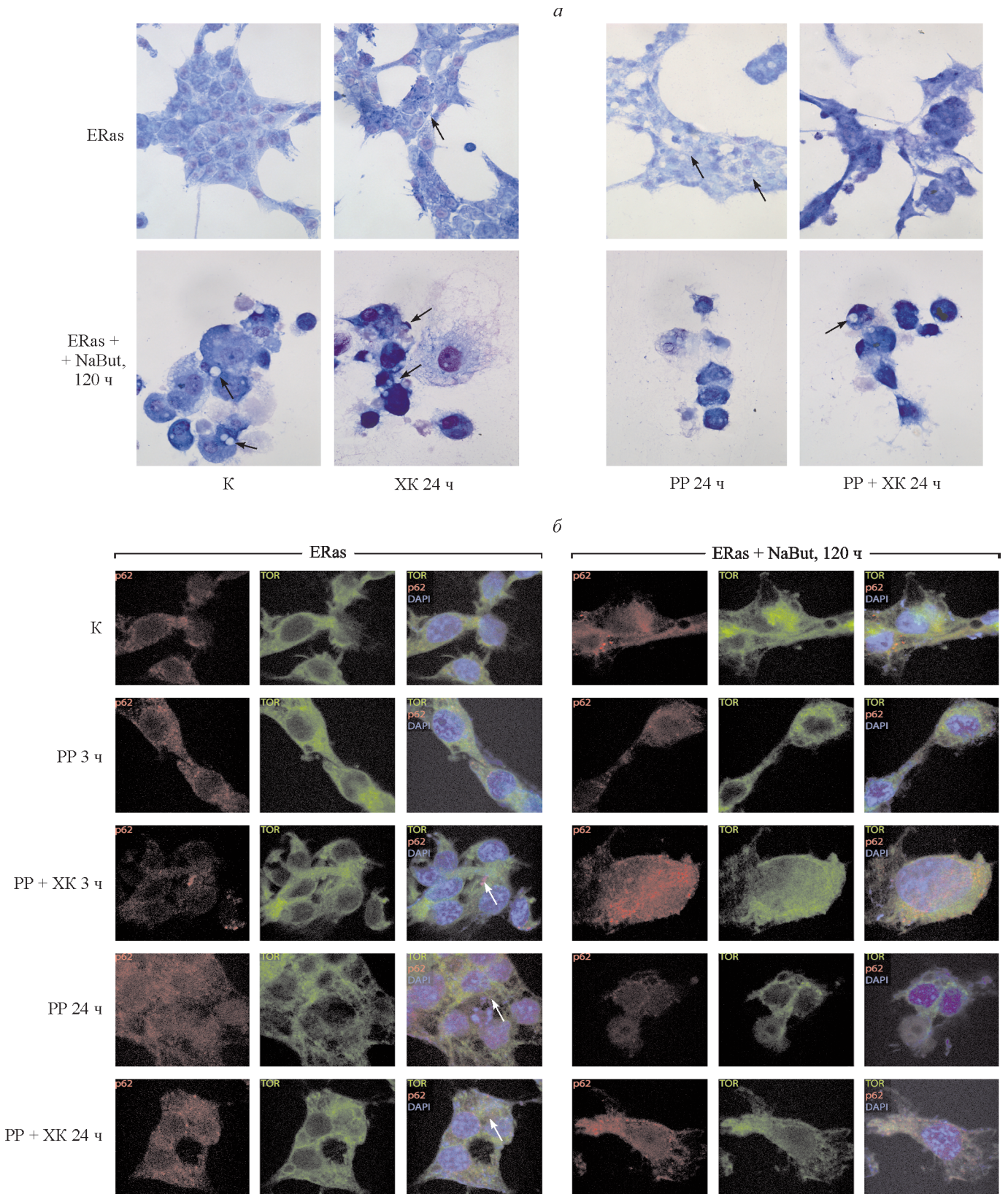


Рис. 4. Динамика накопления аутофагических вакуолей и маркера деградации белков р62/SQSTM1 в контрольных и стареющих клетках при действии рр242 (PP) и хлороквина (ХК).

*а* — морфологические изменения клеток ERas, контрольных и индуцированных к старению NaBut 4 мМ в течение 120 ч, после действия 1500 нМ PP и 25 мМ ХК. Стрелками отмечены аутофагосомы. *б* — внутриклеточное распределение белка р62/SQSTM1 и киназы mTOR в клетках контрольных и индуцированных к старению после действия 1500 нМ PP и 25 мМ ХК по данным иммунофлуоресценции. р62/SQSTM1 — красный цвет, mTOR — зеленый, ядра визуализированы DAPI (синий цвет). Стрелки указывают на скопления р62/SQSTM1.

после слияния с лизосомами. Как видно на рис. 4, б, в контрольных клетках ERas сигнал белка p62/SQSTM1 почти не выявляется, что говорит о завершенности базального процесса аутофагии. Через 3 ч действия pp242 в цитоплазме появляются небольшие яркие скопления p62/SQSTM1, а через 1 сут p62/SQSTM1 выявляется в аутофагосомах. В присутствии pp242 и хлороквина p62/SQSTM1 локализуется только в аутофагосомах на всех сроках наблюдения. В стареющих клетках можно видеть высокий уровень экспрессии p62/SQSTM1, который заметно не меняется в присутствии pp242, однако в присутствии хлороквина содержание его резко возрастает, что говорит о блоке последней стадии аутофагии, связанной с деградацией белка в аутолизосомах. В отличие от исходных клеток в клетках с активированной NaBut программой старения после действия pp242 совместно с хлороквином p62/SQSTM1 распределяется в цитоплазме, но не исчезает, а, напротив, накапливается.

Согласно данным иммунофлуоресценции с антителами к киназе mTOR (рис. 4, б), после совместного действия pp242 и хлороквина сигнал остается на одном уровне в контрольных и в стареющих клетках, что говорит о регуляции ее активности на уровне комплекса mTORC1 и его нижележащих мишеней.

### Обсуждение

NaBut индуцирует программу старения в ERas-трансформированных эмбриональных фибробластах крысы (Зубова и др., 2005). Стареющие клетки остаются метаболически активными, в них экспрессируются регуляторные белки, которые отвечают за выживание и секреторный фенотип (Loaiza, Demaria, 2016). Согласно данной литературе, стареющие клетки обладают устойчивостью к генотоксическому стрессу и апоптозу (Salminen et al., 2011).

В наших экспериментах клетки ERas, экспрессирующие фенотип старения, оказались более устойчивыми к цитотоксическому действию ингибитора pp242, чем исходные. Использование pp242 не вызвало заметного увеличения числа аутофагосом в цитоплазме. Возможно, что действие pp242 в этом случае не приводит к нарушению целостности митохондриальной мембраны и вследствие этого к митофагии, завершающейся неконтролируемым апоптозом. Это подтверждают результаты TMRM-теста, согласно которым функциональная активность митохондрий в стареющих клетках в ответ действие pp242 остается на высоком уровне.

Между активностью mTORC1 и уровнем аутофагии существует обратная зависимость: низкий уровень активности mTORC1 определяет преобладание катаболических процессов в клетке — гликолиза, окисления жирных кислот, окислительного метаболизма и разрушения митохондрий и других органелл (Janku et al., 2011; Hardie, 2015). В случае неконтролируемого разрушения органелл в аутофагосомах процесс аутофагии может становиться необратимым, и она становится причиной гибели клеток — аутофагической гибели, которая в некоторых случаях может завершаться апоптозом (Gordeev et al., 2015). В этом случае сама аутофагия выступает как триггер апоптотической гибели.

Известно, что mTORC1 отвечает за биогенез митохондрий и ингибирует элиминацию митохондрий в процессе аутофагии (Zong et al., 2016). Падение фосфорили-

рования 4E-BP1 в клетках при действии pp242 говорит о подавлении активности mTORC1 и активации mTORC1-зависимой аутофагии, которая может быть причиной активации катаболических процессов в клетке. Почти полное отсутствие свечения в клетках цитохрома *c* через 1 сут действия pp242 может свидетельствовать об утилизации митохондрий в аутофагосомах. Это согласуется с полученными нами ранее данными и, согласно которым неконтролируемая аутофагия и митофагия в присутствии ингибитора pp242 в контрольных клетках ERas завершаются их апоптозом (Gordeev et al., 2015).

Культивирование клеток ERas в присутствии NaBut в течение 5 сут повышает активность mTORC1, о чем свидетельствует фосфорилирование его мишени 4E-BP1 (Гордеев и др., 2015), что приводит к активации анаболических процессов и повышению метаболизма. Ингибитор pp242 понижает активность mTORC1, о чем свидетельствует падение фосфорилирования 4E-BP1 в течение 1 сут, но это в отличие от контрольных клеток не сопровождается повышением экспрессии LC3, а цитохром *c* не образует локальных скоплений и остается равномерно распределенным по цитоплазме клетки. По-видимому, это говорит в пользу того, что в стареющих клетках действие pp242 не приводит к выходу цитохрома *c* из митохондрий в цитоплазму и не инициирует запуск апоптоза, вследствие чего жизнеспособность этих клеток остается на сравнительно высоком уровне.

Известно, что Ras-трансформированным клеткам, индуцированным к старению при высокой активности mTORC1, для поддержания гомеостаза и жизнеспособности необходима аутофагия (Guo et al., 2011). О взаимосвязи старения и аутофагии свидетельствуют также данные о повышении экспрессии генов аутофагии в процессе старения, а введение аутофагического гена *ulk3* индуцирует одновременно аутофагию и старение (Young et al., 2009). Кроме того, есть данные о том, что действие ингибиторов mTORC1 рапамицина и pp242 может отменять героконверсию (Leontieva et al., 2015), однако при этом существует опасность приобретения стареющими трансформированными клетками более агрессивного трансформированного фенотипа (Hurst et al., 2016).

Аутофагия может способствовать повышению жизнеспособности путем селективного снижения содержания проапоптотических белков и специфических белков, которые были убиквитинилированы (Galluzzi et al., 2015). Убиквитинилирование позволяет белкам взаимодействовать с рядом адаптеров, в том числе с белком p62/SQSTM1 (sequestosome 1), который связывается как с убиквитинилированными субстратами, так и с маркером аутофагии белком LC3 (Bitto et al., 2014). Кроме того, p62/SQSTM1 может иметь отношение к активации или, наоборот, к селективному удалению активной каспазы 8 (Jin et al., 2009). Показано, что аутофагия уменьшает избыток белка p62/SQSTM1, который в случае высокой экспрессии может стимулировать продукцию активных форм кислорода и таким образом вызывать гибель клетки (Bitto et al., 2014). Возможно, это и происходит при совместном действии pp242 и хлороквина, которое приводит к аномально высокому накоплению p62/SQSTM1.

Известно, что в опухолевых клетках аутофагия может поддерживать их жизнедеятельность по крайней мере тремя путями: 1) обеспечивать адаптацию к неблагоприятным условиям окружающей среды (недостатку питательных веществ и гипоксии); 2) обеспечивать субстратами митохондрии для их метаболизма; 3) сокращать на-



копление потенциально цитотоксических веществ, таких как свободные радикалы (Manic et al., 2014). Белок p62/SQSTM1 переносит в аутофагосомы белки, подлежащие утилизации, а также поврежденные митохондрии (Bitto et al., 2014) и сам деградирует в процессе завершения аутофагии. Его содержание повышается при одновременном присутствии pp242 и хлороквина в стареющих клетках, однако в контрольных клетках в отличие от стареющих он эвакуируется в аутофагосомы, где позднее частично разрушается. Накопление p62/SQSTM1 в цитоплазме стареющих клеток свидетельствует о незавершенной аутофагии, что и приводит к падению их жизнеспособности.

Таким образом, согласно полученным нами данным, комбинация ингибиторов pp242 и хлороквина оказывает элиминирующее действие на Ras-трансформированные клетки, однако цитотоксический эффект выражен более ярко в случае индуцированных к старению трансформантов Eras.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068; данные по иммунофлуоресценции, МТТ-тесту, морфологии и TMRM-окрашиванию) и С.-Петербургского государственного университета (проект 1.38.247.2014; данные Вестерн-блот-анализа).

### Список литературы

- Гордеев С. А., Быкова Т. В., Zubova С. Г., Аксенов Н. Д., Поспелова Т. В. 2015. Антиапоптотический ген *bcl-2* препятствует реактивации программы старения, индуцированной ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия в фибробластах крысы, трансформированных онкогенами *E1A* и *cHa-Ras*. Цитология. 57 (2) : 135—143. (Gordeev S. A., Bykova T. V., Zubova S. G., Akse-  
nov N. D., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 2015. Antiapoptotic gene *bcl-2* prevents cellular senescence program reactivation induced by histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in *E1A* and *cHa-ras* transformed rat fibroblasts. Tsitologiya. 57 (2) : 135—143.)
- Зубова Ю. Г., Быкова Т. В., Zubova 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., Akse-  
nov N. D., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 2005. Induction of pre-  
mature senescence program by inhibitor of histone deacetylase sodium butyrate in normal and transformed rat fibroblasts. Tsitologiya. 47 (12) : 1055—1062.)
- Abounit K., Scarabelli T. M., McCauley R. B. 2012. Autophagy in mammalian cells. World J. Biol. Chem. 3 : 1—6.
- Bitto A., Lerner C. A., Nacarelli T., Crowe E., Torres C., Sell C. 2014. p62/SQSTM1 at the interface of aging, autophagy and disease. Age. 36 : 1123—1137.
- Campisi J. 1998. The role of cellular senescence in skin aging. J. Investig. Dermatol. Symp. Proc. 3 : 1—5.
- Campisi J. 2001. Cellular senescence as tumor-suppressor mechanism. Trends Cell Biol. 11 : 27—31.
- Campisi J. 2005. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. Cell. 120 : 513—522.
- Galluzzi L., Pietrocola F., Bravo-San Pedro J. M., Amaravadi R. K., Baehrecke E. H., Cecconi F., Codogno P., Debnath J., Gewirtz D. A., Karantza V., Kimmelman A., Kumar S., Levine B., Maiuri M. C., Martin S. J., Penninger J., Piacentini M., Rubinsztein D. C., Simon H. U., Simonsen A., Thorburn A. M., Velasco G., Ryan K. M., Kroemer G. 2015. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. EMBO J. 34 : 856—880.
- Gordeev S. A., Bykova T. V., Zubova S. G., Bystrova O. A., Martynova M. G., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 2015. mTOR ki-  
nase inhibitor pp242 causes mitophagy terminated by apoptotic cell death in E1A-Ras transformed cells. Oncotarget. 6 : 44 905—44 926.
- Guo J. Y., Chen H.-Y., Mathew R., Fan J., Strohecker A. M., Karsli-Uzunbas G., Kamphorst J. J., Chen G., Lemons J. M. S., Karantza V., Collier H. A., DiPaola R. S., Gelinas C., Rabinowitz J. D., White E. 2011. Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. Genes Develop. 25 : 460—470.
- Hardie D. G. 2015. Molecular pathways: is AMPK a friend or a foe in cancer? Clin. Cancer Res. 21 : 3836—3840.
- Hurst R. E., Bastian A., Bailey-Downs L., Ilnat M. A. 2016. Targeting dormant micrometastases: rationale, evidence to date and clinical implications. Ther. Adv. Med. Oncol. 8 : 126—137.
- Janku F., McConkey D. J., Hong D. S., Kurzrock R. 2011. Autophagy as a target for anticancer therapy. Nat. Rev. Clin. Oncol. Doi: 10.1038/nrclinonc.2011.71.
- Kim M. J., Woo S. J., Yoon C. H., Lee J. S., An S., Choi Y. H., Hwang S. G., Yoon G., Lee S. L. 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.
- Leontieva O. V., Demidenko Z. N., Blagosklonny M. V. 2015. Dual mTORC1/C2 inhibitors suppress cellular geronconversion (a senescence program). Oncotarget. 6 : 23 238—23 248.
- Loaiza N., Demaria M. 2016. Cellular senescence and tumor promotion: is aging the key. Biochim. biophys. acta. 1865 : 155—167.
- Manic G., Obrist F., Kroemer G., Vitale I., Galluzzi L. 2014. Chloroquine and hydroxychloroquine for cancer therapy. Mol. Cell. Oncol. Doi: 10.4161/mco29911.
- Marino G., Niso-Santano M., Baehrecke E. H., Kroemer G. 2014. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 15 : 81—94.
- Massacesi C., Di Tomaso E., Urban P., Germa C., Quadt C., Trandafir L., Aimone P., Fretault N., Dharan B., Tavorath R., Hirawat S. 2016. PI3K inhibitors as new cancer therapeutics: implications for clinical trial design. Onco Targets Ther. 9 : 203—210.
- Mathew R., Karp C. M., Beaudoin B., Vuong N., Chen G., Chen H. Y. 2009. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. Cell. 137 : 1062—1075.
- Narita M., Young A.R., Narita M. 2009. Autophagy facilitates oncogen-induced senescence. Autophagy. 7 : 1046—1047.
- Robles S. J., Adami G. R. 1998. Agents that cause DNA double strand breaks lead to 16INK4a enrichment and premature senescence of normal fibroblasts. Oncogene. 16 : 1113—1123.
- Salminen A., Ojala J., Kaarniranta K. 2011. Apoptosis and aging: increased resistance to apoptosis enhanced the aging process. Cell Mol. Life Sci. 68 : 1021—1031.
- Toussaint O., Dumont P., Dierick J. F., Pascal T., Frippliat C., Chaintiaux 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.
- Vessoni A. T., Fillippi-Chiela E. C., Menck C. F. M., Lenz G. 2013. Autophagy and genomic integrity. Cell Death Different. 20 : 1444—1454.
- Wei H., Guan J.-L. 2012. Pro-tumorigenic function of autophagy in mammary oncogenesis. Autophagy. 8 : 129—131.
- White E., Martin V., Liu J.-L., Klein S. R., Piya S., Gomez-Manzano C., Fueyo J., Jiang H. 2011. Autophagy regulation in cancer development and therapy. Amer. J. Cancer Res. 1 : 362—372.
- Young A. R., Narita M., Ferreira M., Kirschner K., Sadaie M., Darot J. F., Tavares S., Arakawa S., Shimizu S., Watt F. M., Narita M. 2009. Autophagy mediates the mitotic senescence transition. Genes Develop. 23 : 798—803.
- Zong W.-X., Rabinowitz J. D., White E. 2016. Mitochondria and cancer. Mol. Cell. 61 : 667—676.



CHLOROQUINE DOES NOT CANCEL *E1A+cHa-Ras* TRANSFORMANTS' DEATH INDUCED  
BY mTOR KINASE INHIBITOR pp242

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

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

\* e-mail: bykova\_tatiana@mail.ru

We have studied the dependence of cell viability on cell autophagy in control and senescent *E1A+cHa-Ras* transformed rat embryo fibroblasts. pp242, a TORC1/C2 kinase inhibitor, was used as a trigger of cell autophagy. Cell senescence was induced in the cells by sodium butyrate. pp242 inhibitor occurred to dramatically reduce the functional activity of mitochondria in intact cells causing their death by mitophagy and apoptosis. The presence of chloroquine that blocks lysosome and autophagosome fusion does not cancel pp242 effects. Senescent cells were more resistant to pp242 than control ones. However, their viability was significantly reduced in the presence of chloroquine and pp242. Thus, our results allow us to consider that the usage of chloroquine and pp242 combination is an effective way of cell death induction in intact and senescent *Ras*-transformants.

Key words: autophagy, cell senescence, sodium butyrate, pp242, chloroquine.

---