

## МЕК/ЕРК-ПУТЬ НЕОБХОДИМ ДЛЯ ПОДДЕРЖАНИЯ ЦИТОПРОТЕКТИВНОЙ АУТОФАГИИ ПОСЛЕ ОБЛУЧЕНИЯ ТРАНСФОРМАНТОВ *E1A+cHa-Ras*

© Е. Ю. Кочеткова,\* Г. И. Блинова, С. Г. Зубова, Т. В. Быкова,  
В. А. Поспелов, Т. В. Поспелова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

\* электронный адрес: [lena.linnaea@gmail.com](mailto:lena.linnaea@gmail.com)

Аутофагия — это консервативный процесс деградации белков и органелл, способствующий поддержанию жизнеспособности клеток. Аутофагия часто инициируется в ответ на стресс, действие различных ДНК-повреждающих агентов, ретиноидов, а также голодание и нехватку ростовых факторов. В настоящей работе исследовали аутофагию, возникающую в трансформантах *E1A+cHa-Ras* в ответ на рентгеновское облучение. Была проанализирована роль сигнального МЕК/ЕРК-пути в регуляции аутофагии, индуцированной облучением. Обнаружено, что ингибирование МЕК/ЕРК-пути снижает жизнеспособность клеток и приводит к изменению хода аутофагии, индуцированной действием облучения. Это выражается в нарушении последних стадий аутофагии, приводящих к аккумуляции в цитоплазме клеток адапторного белка p62/SQSTM1 в аутофагических полостях неизвестного происхождения. Таким образом, активность МЕК/ЕРК-пути необходима для активации и поддержания аутофагии, активирующейся в ответ на облучение и повышающей жизнеспособность облученных клеток.

Ключевые слова: аутофагия, МЕК/ЕРК-путь, облучение, *E1A+cHa-Ras*-трансформанты, p62/SQSTM1.

Ионизирующее облучение относится к факторам, вызывающим повреждения ДНК, в том числе двухнитевые разрывы (Featherstone, Jackson, 1999). Известно, что на облучение клетки отвечают старением или апоптозом (Mirzayans et al., 2013). Однако повреждения ДНК и мутации, вызванные облучением, могут стать источником новых свойств опухолевых клеток.

Показано, что многие злокачественные клетки устойчивы к ионизирующему облучению (Shimura, 2011). В частности, радиорезистентностью обладают *Ras*-трансформированные клетки (Grana et al., 2002). Устойчивость трансформированных клеток к облучению может быть обусловлена активностью определенных сигнальных каскадов. Показано, что PI3-киназа и МЕК/ЕРК-каскады способствуют поддержанию устойчивости *Ras*-трансформированных клеток к облучению (Toulany et al., 2016). Таким образом, ингибиторы МЕК/ЕРК и PI3-киназного путей представляют потенциальный интерес для разработки новых подходов к более эффективному уничтожению *Ras*-экспрессирующих клеток после облучения.

Для *Ras*-трансформантов процесс аутофагии является обязательным, так как он важен для поддержания жизнеспособности клеток в ходе *Ras*-трансформации (Guo et al., 2011; Mariño et al., 2011). Известно, что аутофагия помогает клеткам справляться со стрессовыми условиями. Кроме того, она может способствовать поддержанию стабильности генома (Vessoni et al., 2013). Поскольку облучение является ДНК-повреждающим и одновременно стрессовым фактором, можно предполагать,

что в ответ на облучение клетки могут развивать другой аутофагический ответ. Однако вопрос о том, будет ли аутофагия способствовать выживанию облученных *Ras*-трансформированных клеток или, наоборот, станет механизмом гибели, пока открыт.

PI3-киназный каскад является одним из регуляторов аутофагии (Yang et al., 2005). Многочисленные данные говорят о том, что МЕК/ЕРК-каскад также выполняет эту функцию (Shinojima et al., 2007; Han et al., 2011; Gu et al., 2016). На основании данных литературы можно предполагать, что активность аутофагических процессов важна для устойчивости *Ras*-трансформированных клеток к облучению (Mirzayans et al., 2013). МЕК/ЕРК-путь в трансформированных клетках, активность которого способствует поддержанию такой устойчивости, может способствовать их выживанию за счет активации аутофагии.

Цель работы — изучить жизнеспособность трансформантов *E1A+cHa-Ras* в ответ на облучение в зависимости от изменения динамики аутофагии при подавлении активности сигнального пути МЕК/ЕРК специфическим ингибитором МЕК-киназы PD0325901.

### Материал и методика

Клеточные линии. Работа выполнена на эмбриональных фибробластах крысы, трансформированных онкогенами *E1A+cHa-Ras*. Клетки культивировали в стандартной среде Игла в модификации Дальбекко с 10 % сы-

воротки крупного рогатого скота (HyClone, США). Клетки подвергали рентгеновскому облучению в дозе 3 Гр на аппарате РАП-150/300-14 (Актюбрентген, Россия). Для исследования роли MEK/ERK-пути использовали специфический ингибитор MEK-киназы PD0325901 (PD) в концентрации 1 мкМ.

Оценка жизнеспособности. Использовали МТТ-тест. Клетки сеяли на 12-луночные платы, подвергали облучению, затем добавляли ингибитор PD и далее культивировали в течение 5 сут. Конверсию МТТ в формазан оценивали через 1, 3 и 5 сут после воздействия. Среду заменяли на раствор МТТ в концентрации 0.5 мг/мл в фосфатно-солевом буферном растворе и инкубировали клетки в течение 1 ч при 37 °С. Через 1 ч раствор заменяли на DMSO и инкубировали клетки еще 30 мин. Далее DMSO с растворенным в нем формазаном вносили в лунки 96-луночной платы (по 80 мкл на 1 лунку, 3 повторности для каждой точки) и измеряли на спектрофотометре Multiscan Ex (Thermo, США) при длине волны 572 нм.

Оценка пролиферативной активности. Клетки высевали на чашки Петри диаметром 30 мм в начальной концентрации 30 тыс. клеток на 1 чашку. Через 24 ч клетки облучали и добавляли ингибитор PD. Клетки считали через 1, 3 и 5 сут после облучения (3 чашки на точку). Кривые пролиферативной активности строили с помощью программы Microsoft Excel.

Для оценки жизнеспособности клеток методом клоногенной выживаемости клетки высевали на чашки Петри 30 мм с начальной плотностью 30 тыс. клеток на 1 чашку. Через 5 сут после облучения и добавления PD клетки трипсинизировали и высевали на новые чашки 35 мм в свежую среду без ингибитора с плотностью 200 клеток на 1 чашку. Через 7 сут клоны промывали теплым фосфатно-солевым буфером, окрашивали кристалл-виолетом в течение 30 мин при комнатной температуре и промывали проточной водой, после чего считали клоны.

Выявление фрагментации ДНК с нуклеосомным повтором. Проводили электрофорез ДНК в агарозном геле. Клетки высевали на чашки Петри (10 мм) при плотности 500 тыс. клеток на 1 чашку, подвергали облучению, вводили PD и культивировали необходимое время. Клетки лизировали в буфере, содержащем 10 мМ Трис-НСI (рН 8.0), 0.1 М EDTA и 0.5 % SDS, в течение 30 мин при 4 °С. Затем в буфер добавляли 150 мМ NaCl и 100 мкг РНКазы А и инкубировали 1 ч при 37 °С. Затем в лизаты добавляли 200 мкг протеиназы К и 0.5 % SDS и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре. ДНК выделяли в растворе, состоящем из фенола, хлороформа и изоамилового спирта (в отношении 0.5, 0.25 и 1/24 от объема лизирующего буфера) в течение 30 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании. После центрифугирования (10 000 g) отбирали водную фазу, содержащую ДНК. ДНК осаждали с помощью 0.5 М ацетата натрия и двойного по отношению к объему пробы объема 96%-ного этанола, промывали 70%-ным этанолом и сушили при 37 °С, затем растворяли в 50 мкл дистиллированной воды. Электрофорез проводили в 2%-ном агарозном геле в буфере, содержащем 40 мМ Трис, 20 мМ ацетата, 1 мМ EDTA и 1 мкг/мл бромистого этидия, при напряжении 100—150 В. Визуализацию ДНК осуществляли с помощью трансиллюминатора Vilber Lourmat (Германия). В качестве позитивного контроля использованы *E1A+cHa-Ras*-трансформанты, которые культивировали в течение 1 сут в условиях сывороточного го-

лодания, что приводит к массовому апоптозу и фрагментации ДНК с нуклеосомным повтором (Тарарова и др., 2002).

Иммунофлуоресценция. Клетки высевали на покровные стекла и через 24 ч подвергали действию облучения и добавляли ингибитор PD. Через 1, 3 и 5 сут клетки фиксировали в 3.7%-ном формальдегиде 20 мин при комнатной температуре и промывали PBS. Пермеабиллизацию клеток осуществляли 0.2%-ным Тритоном X-100 в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем стекла промывали и проводили блокировку против неспецифического связывания 3%-ным BSA/TBS-T в течение 1.5 ч при комнатной температуре. Стекла инкубировали в течение ночи при 4 °С в том же растворе BSA, содержащем антитела к следующим белкам — LC3 (MBL, США), LAMP (Santa-Cruz Biotechnology, США) и p62/SQSTM1 (BD Transduction Laboratories, США). Через 1 сут стекла промывали и инкубировали в растворе вторых антител, конъюгированных с Alexa Flour 488 или 586 (Invitrogen, США) в том же растворе BSA в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее стекла промывали в PBS и в дистиллированной воде, после чего заключали в среду ProLong, содержащую краситель DAPI (Life Technologies, США), для визуализации ядер. Съемку и анализ препаратов производили на микроскопе Leica TSC SP5 (Германия).

Подсчет микроядер в клетках производили с помощью микроскопа Leica TSC SP5 из расчета 100 клеток на точку.

Статистическую обработку данных проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента в программе Microsoft Excel 2013. Различия считали достоверными при уровне значимости  $P < 0.05$ .

## Результаты

Для исследования роли MEK/ERK-пути в регуляции аутофагии в ответ на облучение были выбраны доза облучения 3 Гр и концентрация ингибитора MEK-киназы PD 1 мкМ. Согласно данным МТТ-теста, такие доза облучения и концентрация PD приводят к некоторому падению жизнеспособности через 1 сут, однако через 3 и 5 сут клетки восстанавливают жизнеспособность и пролиферативную активность (рис. 1, а, б). В то же время совместное действие облучения и ингибитора PD снижает жизнеспособность клеток более чем в 2 раза (рис. 1, а,  $P < 0.005$ ).

Анализ пролиферативной активности по кривым клеточного роста показывает, что облучение в дозе 3 Гр быстро снижает ее уже через 1 сут, однако через 3 сут пролиферация восстанавливается (рис. 1, б). В то же время пролиферативная активность клеток, облученных в присутствии PD, на 5-е сут ниже по сравнению с контрольными клетками и клетками, которые подвергали только одному облучению ( $P < 0.05$ ).

Полученные кривые роста подтверждаются данными по клоногенной выживаемости клеток, согласно которым через 5 сут культивирования после облучения и присутствия PD в чашках не выявлено клонов, в то время как через 5 сут после действия одного облучения половина клеток (51 %) сформировала клоны (рис. 1, в). Таким образом, совместное действие облучения и ингибитора MEK/ERK-пути оказывает более сильное антипролиферативное действие, чем одно облучение.

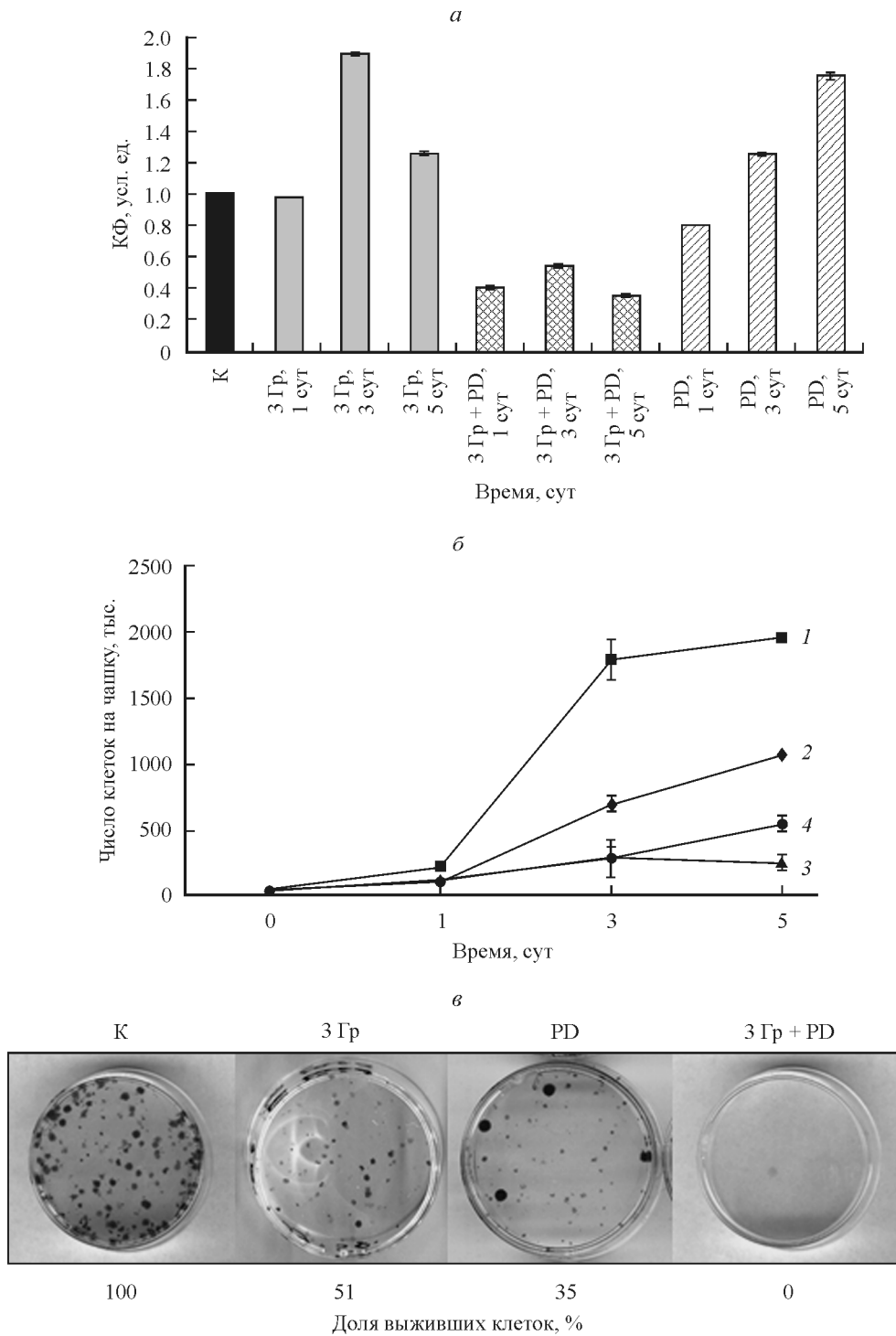


Рис 1. Жизнеспособность (а), пролиферативная активность (б) и клоногенная выживаемость трансформантов *E1A + cHa-ras* (в) в контроле (К) и после раздельного и совместного действия облучения в дозе 3 Гр и ингибитора PD0325901 (PD, 1 мкМ).

а — доля живых клеток после раздельного и совместного действия облучения (3 Гр) и PD по данным МТТ-теста; количество образованного формазана (КФ) определяли относительно контроля по поглощению при длине волны 572 нм. б — кривые роста: 1 — контроль, 2 — облучение, 3 — ингибитор PD, 4 — облучение и PD совместно. в — клоногенная выживаемость: доля выживших и сформировавших клоны клеток при действии облучения (3 Гр), PD и облучения и PD совместно (3 Гр + PD). Различия в интенсивности конверсии формазана (а), пролиферативной активности (б) и клоногенной выживаемости (в) на 5-е сут считали достоверными при  $P < 0.05$ .

Для того чтобы оценить механизм гибели клеток при действии облучения и ингибитора PD, проводили электрофорез ДНК в агарозном геле. Согласно полученным результатам, в облученных клетках через 3 сут выявляется фрагментация ДНК с нуклеосомным повтором (рис. 2, а).

Это свидетельствует в пользу апоптотической гибели трансформантов после облучения. Следует отметить, что апоптотическую гибель части популяции можно видеть и при обработке клеток только одним PD через 3 сут. Однако в тех клетках, которые подвергали только облучению

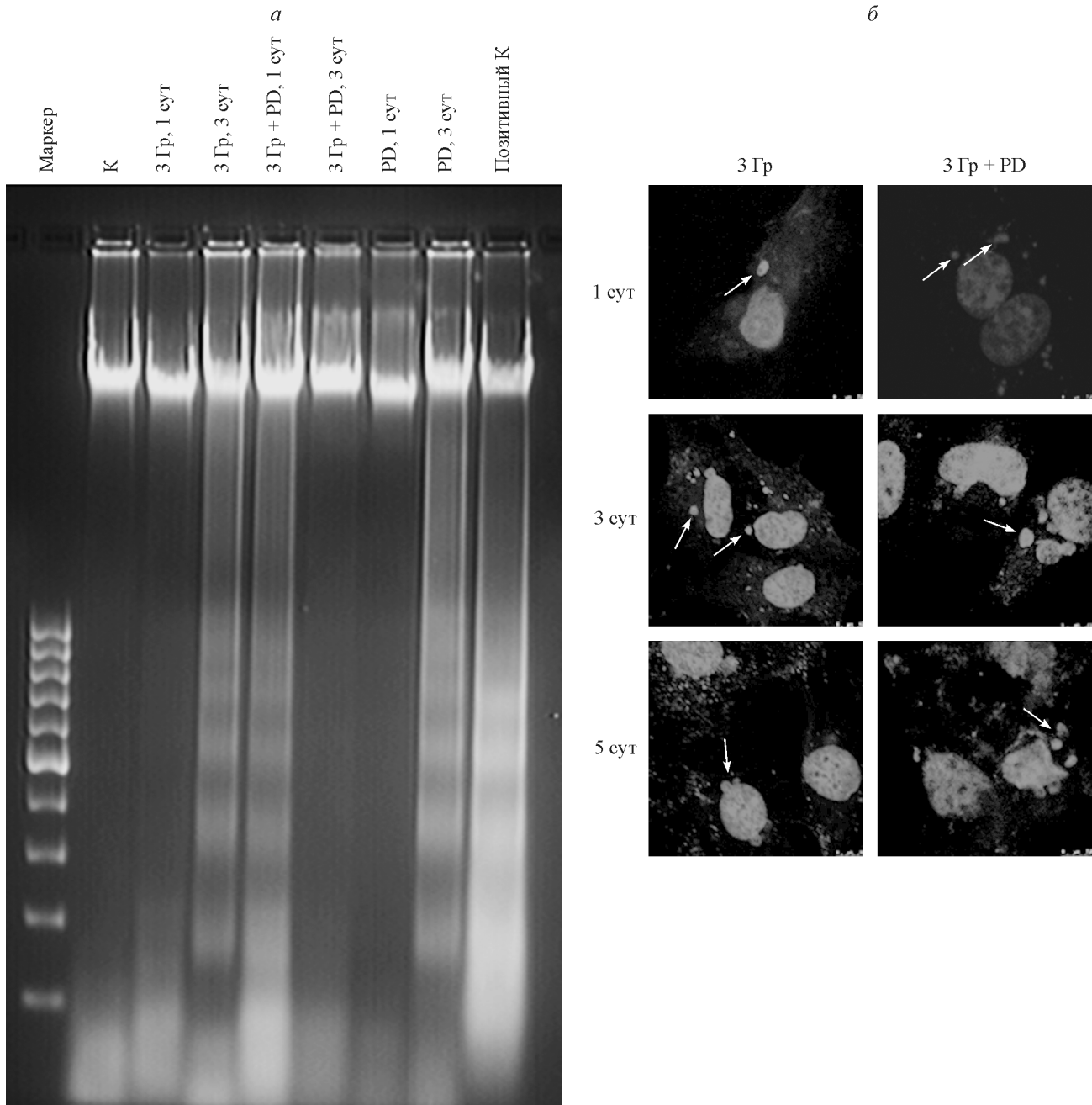


Рис. 2. Фрагментация ДНК с нуклеосомным повтором и формирование микроядер в клетках *E1A+cHa-ras* при раздельном и совместном действии облучения (3 Гр) и ингибитора PD0325901 (PD, 1 мкМ).

*a* — электрофорез ДНК клеток в 2%-ном агарозном геле через 1 и 3 сут после действия облучения (3 Гр), PD и облучения совместно с PD (3 Гр + PD); К — контроль. *б* — микроядра (показаны стрелками) в клетках через 1 и 3 сут после облучения (3 Гр) и облучения совместно с PD; ядра окрашены DAPI. Об.: 40 $\times$ .

либо только обработке MEK/ERK-ингибитором, сохраняется часть жизнеспособной популяции, способной восстанавливать пролиферацию через 5 сут после облучения или действия PD. Совместное действие облучения и PD существенно снижает жизнеспособность клеток. Также следует отметить, что в случае клеток, к которым после облучения в дозе 3 Гр был добавлен PD, нуклеосомный повтор выявляется через 1 сут, а позже (3 сут) уже не выявляется (рис. 2, *a*).

Облучение вызывает повреждения ДНК, которые приводят к запуску репарационных процессов (Maier et al., 2016). Одним из тестов для оценки грубых поврежде-

ний является формирование микроядер в облученных клетках. В облученных интерфазных клетках выявляются микроядра, в которых изолируется поврежденная, не подлежащая репарации ДНК. После облучения через 1 сут микроядра выявляются в 21 % клеток (в среднем  $1.9 \pm 0.9$  микроядра на 1 клетку). Через 3 сут микроядра выявляются в 36 % клеток, через 5 — в 21 % (рис. 2, *б*; см. таблицу). В том случае, когда облученные клетки культивировали в присутствии PD, через 1 сут микроядра выявляются у 57 % клеток, среднее число микроядер на 1 клетку возрастает до  $2.9 \pm 2.4$ . Через 3 и 5 сут доля клеток с микроядрами составляет 31 и 27 % соответственно

(в среднем  $1.7 \pm 1$  и  $1.8 \pm 1$  микроядро на 1 клетку). Таким образом, облученные клетки, которые обрабатывали PD, оказываются более чувствительными к облучению уже через 1 сут. Это совпадает с данными электрофореза ДНК, который выявил у клеток после облучения в дозе 3 Гр с последующим культивированием в присутствии PD фрагментацию ДНК с нуклеосомным повтором уже через 1 сут, в то время как после действия только облучения или PD характерная «лесенка» появляется, но позже, только через 3 сут.

Клетки могли справиться со стрессом от облучения, активировав процесс аутофагии. Чтобы оценить аутофагический процесс после облучения и при ингибировании МЕК/ERK-пути с помощью PD, методом иммунофлуоресценции были проанализированы маркеры аутофагии — белки LC3 и LAMP (Klionsky et al., 2012), их колокализация, а также белок p62/SQSTM1, переносящий убиквитинированные поврежденные белки в аутофагосомы (Johansen, Lamark, 2011; Bitto et al., 2014).

Облучение ведет к усилению интенсивности сигналов LC3 и LAMP (рис. 3). Однако колокализации LC3 с LAMP через 1 и 3 сут не наблюдается, она выявляется лишь через 5 сут у части клеток. В том случае, когда облученные клетки подвергали действию PD, через 1 сут наблюдается выраженная колокализация LAMP с микроядрами и с LC3. Через 3 и 5 сут колокализации LAMP с LC3 либо с ядерным материалом уже нет (рис. 3). Таким образом, микроядро в случае действия облучения и инги-

Доля клеток с микроядрами (МЯ) и среднее число МЯ на 1 клетку через 1 и 3 сут после действия облучения (3 Гр) и облучения совместно с PD0325901 (PD)

Воздействие	Доля клеток с МЯ, %	Число МЯ на 1 клетку
3 Гр, 1 сут	21	$1.9 \pm 0.9$
3 Гр, 3 сут	36	$2.3 \pm 1.5$
3 Гр, 5 сут	21	$2.0 \pm 1.2$
(3 Гр + PD), 1 сут	57	$2.9 \pm 1.4$
(3 Гр + PD), 3 сут	31	$1.7 \pm 0.9$
(3 Гр + PD), 5 сут	27	$1.9 \pm 0.9$

битора PD, по всей видимости, деградируют аутофагическим путем.

Белок p62/SQSTM1 участвует в регуляции многих процессов в клетке, в том числе аутофагии. В ходе аутофагии он контролирует погрузку убиквитинированного груза в аутофагосомы (Bitto et al., 2014). При слиянии аутофагосом с лизосомами p62/SQSTM1 деградирует вместе с грузом, поэтому его исчезновение свидетельствует о завершении аутофагического процесса (Komatsu, Ichimura, 2010; Johansen, Lamark, 2011). При облучении клеток в дозе 3 Гр через 1 сут наблюдается выраженная колокализация p62/SQSTM1 с LC3 (рис. 4). Через 3 сут p62/SQSTM1 выявляется в виде крупных кластеров, колокализующихся с LC3. Через 5 сут у части клеток

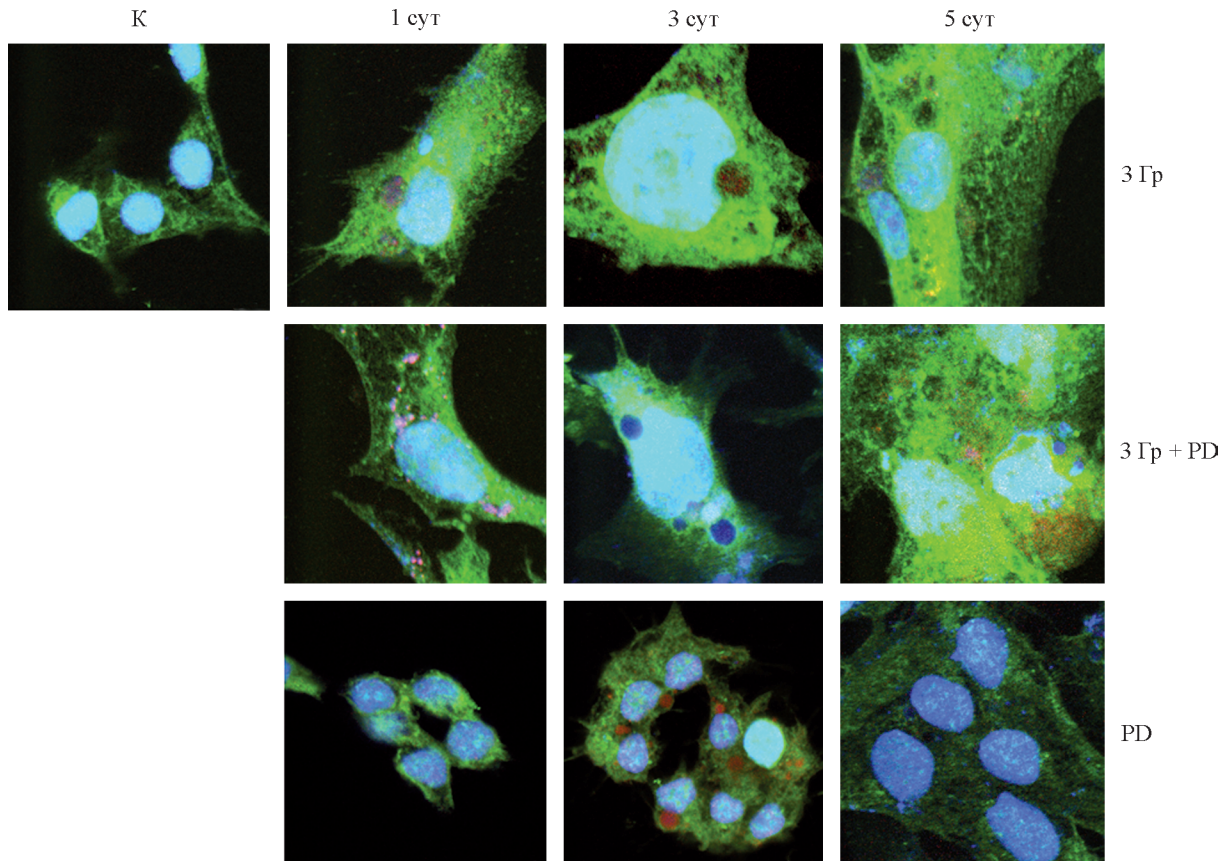


Рис. 3. Экспрессия и колокализация белков LAMP и LC3 в клетках *E1A+cHa-ras* через 1, 3 и 5 сут после раздельного и совместного действия облучения (3 Гр) и ингибитора PD0325901 (PD, 1 мкМ).

Иммунофлуоресценция с антителами к LC3 (зеленый) и LAMP (красный). Ядра окрашены DAPI (синий). Об.: 40×.

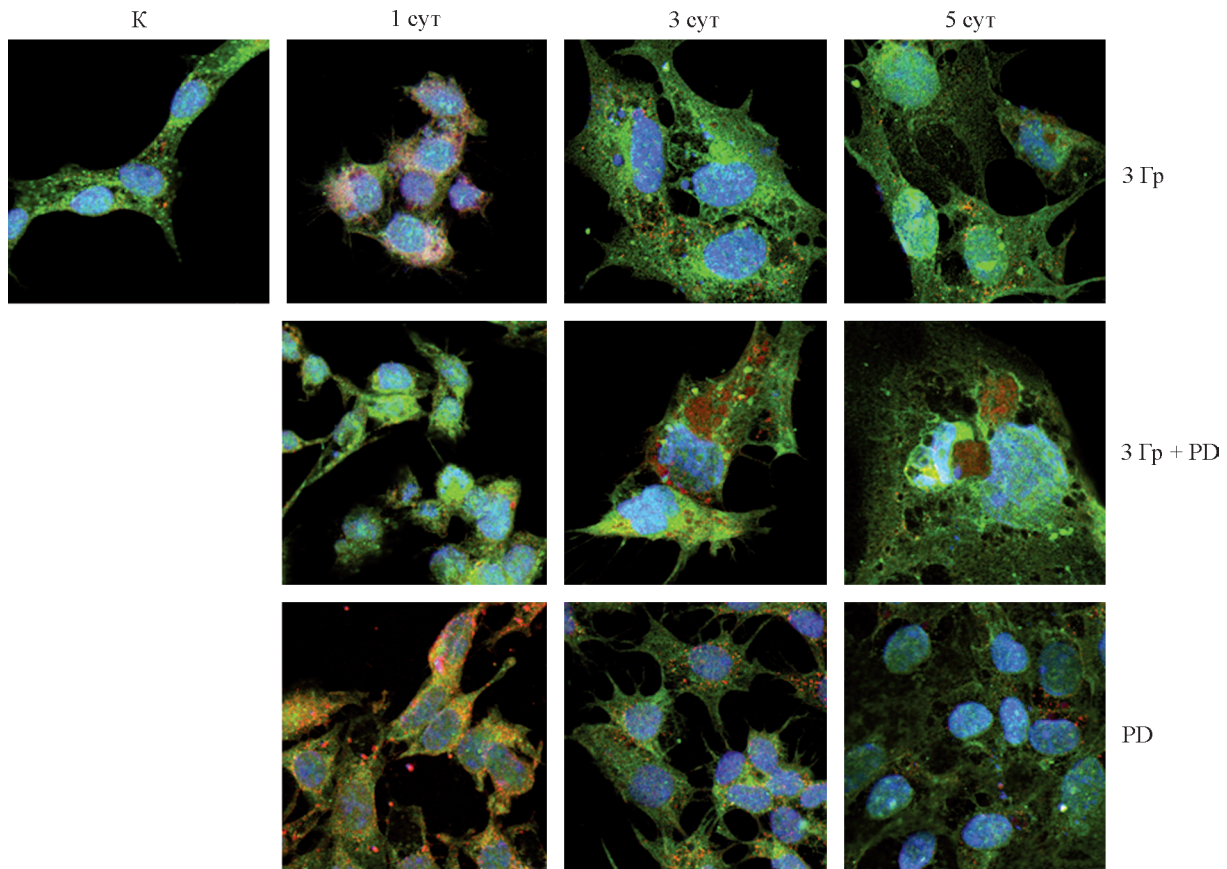


Рис. 4. Экспрессия и колокализация белков LC3 и p62/SQSTM1 в клетках *E1A+cHa-ras* через 1, 3 и 5 сут после раздельного и совместного действия облучения (3 Гр) и ингибитора PD (PD).

Иммунофлуоресценция с антителами к LC3 (зеленый) и p62/SQSTM1 (красный). Ядра окрашены DAPI (синий). Об.: 40×.

по-прежнему выявляются колокализирующиеся с LC3 кластеры, однако в других клетках p62/SQSTM1 уже не выявляется. Таким образом, аутофагия, активирующаяся при облучении, у части клеток не завершается в течение 5 сут в отличие от аутофагии, активируемой действием ингибитора PD. В случае PD также наблюдаются выраженная колокализация через 1 сут и кластеры p62/SQSTM1 через 3 сут, однако через 5 сут p62/SQSTM1 уже не выявляется.

В том случае, когда облученные клетки культивировали в присутствии ингибитора PD, колокализация p62/SQSTM1 с LC3 в 1-е сут едва выражена. Кроме того, через 3 и 5 сут не выявляются колокализованные с LC3 кластеры, которые видны после одного облучения. Белок p62/SQSTM1 выявляется в виде массивных скоплений в крупных полостях, происхождение которых пока неясно. В этих полостях p62/SQSTM1 не колокализуется с LC3, т. е. p62/SQSTM1 в данном случае накапливается, но не деградирует аутофагическим путем.

### Обсуждение

Аутофагия — это эволюционно консервативный процесс, необходимый для поддержания жизнеспособности и гомеостаза клеток. Аутофагия может быть активирована в ответ на стресс, повреждение ДНК, нехватку ростовых факторов или аминокислот и способствует выживанию клетки. Показано, что к активации аутофагии могут привести повреждения ДНК (Kang et al., 2009). Роль ауто-

фагии в ответе клеток на повреждения ДНК (DDR-ответе) пока неясна (Czarny et al., 2015). Несмотря на то что данные о роли аутофагии в DDR-ответе клеток разнятся, можно предполагать, что аутофагия играет цитопротективную (защитную) роль для клеток при повреждении ДНК.

Иммунофлуоресцентный анализ показал, что при действии облучения на *E1A+cHa-Ras*-трансформанты у части клеток аутофагия завершается через 5 сут культивирования, в то время как у части клеток аутофагический процесс имеет признаки незавершенности. У крупных распластанных клеток выявлены кластеры p62/SQSTM1 в полостях-цистернах пока неизвестного происхождения. Возможно, это клетки, которые после облучения активировали программу старения, как это было описано для опухолевых клеток разного гистогенеза (Jones et al., 2005; Quick, Gerwitz, 2006). В таком случае незавершенная аутофагия служит для поддержания гипертрофного гиперсекреторного фенотипа (Narita et al., 2009). При этом старые клетки сохраняют жизнеспособность, но пролиферация в них полностью подавляется (Rodier, Campisi, 2011).

Судя по данным кривых роста и клоногенной выживаемости, после облучения часть популяции не только выживает, но и восстанавливает способность к пролиферации. По всей видимости, это та часть популяции, у которой в течение 5 сут успешно завершилась аутофагия. Таким образом, аутофагия, развивающаяся при действии облучения, играет цитопротективную роль, способствуя

выживанию клеток, но при этом популяция неоднородна по чувствительности к облучению, в результате чего часть клеток гибнет апоптозом через 1—3 сут, часть клеток, возможно, претерпевает старение, а часть не только выживает, но и восстанавливает пролиферативный потенциал.

Надо отметить, что ингибитор PD также оказывает стрессорное действие на клетки, проявляющееся на 1-е сут в снижении жизнеспособности и апоптотической гибели части клеток. Тем не менее и в этом случае клетки также восстанавливают жизнеспособность. Через 1 и 3 сут в клетках наблюдаются признаки аутофагии, которая завершается через 5 сут. По всей видимости, в этом случае также активируется цитопротективная аутофагия.

В ряде исследований было показано, что сигнальный путь MEK/ERK участвует в регуляции аутофагии (Liu et al., 2015; Gu et al., 2016). Согласно данным иммунофлуоресценции с использованием антител к LC3, LAMP и p62/SQSTM1, при совместном действии облучения и ингибитора PD течение аутофагии изменяется. Несмотря на то что материал микроядер активно деградирует путем аутофагии, белок p62/SQSTM1 не деградирует, а выявляется в полостях в цитоплазме клеток, что указывает на незавершенность аутофагического процесса. Ингибирование MEK/ERK-пути, по всей видимости, усиливает чувствительность клеток к облучению именно таким образом. Это приводит к ускорению активации апоптоза и увеличению доли клеток с поврежденной ДНК (доли клеток с микроядрами).

Судя по данным иммунофлуоресценции, с одной стороны, поврежденная ДНК активно элиминируется посредством аутофагии, с другой — накапливается p62/SQSTM1, не колокализующийся с LC3, что говорит о незавершенности аутофагии. Недавно было показано, что в клетках-нокаутах по гену белка Atg3, у которых нарушено течение аутофагического процесса, p62/SQSTM1 аккумулируется и связывает лигазу RNF168 T3, необходимую для убиквитинирования гистона H2A и развития DDR-ответа (Wang et al., 2016). В нашем случае наблюдается накопление p62/SQSTM1 в клетках, которые подвергались совместному действию облучения и ингибитора PD. Это позволяет сделать предположение о том, что активный MEK/ERK-путь необходим для деградации p62/SQSTM1 в аутофагосомах в ходе аутофагии, активирующейся в ответ на облучение. Так как при этом не наблюдается клеток с колокализацией p62/SQSTM1 с LC3, которые предположительно могут претерпевать старение в ответ на облучение, можно думать, что полноценное старение, индуцированное облучением, также невозможно реализоваться при ингибировании MEK/ERK-пути. Существенную роль в этом может играть изменение характера аутофагии.

Таким образом, согласно полученным нами данным, аутофагия представляет собой перспективную мишень для повышения чувствительности трансформированных клеток к облучению. При этом MEK/ERK-путь может рассматриваться как потенциальный регулятор процесса аутофагии, развивающейся в ответ на повреждения ДНК при облучении, подавление которой усиливает клеточную гибель.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068; иммунофлуоресцентный анализ, определение количества

микроядер, ДНК-электрофорез в агарозном геле, анализ клоногенной выживаемости и МТТ-тест) и С.-Петербургского государственного университета (проект 1.38.247.2014; обеспечили условия для культивирования клеток и исследования пролиферативной активности клеток после облучения и действия ингибитора PD).

#### Список литературы

- Tararova N. D., Bulavin D. V., Neliudova A. M., Akse-  
nov N. D., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 2002. Антиапопто-  
тическое и антипролиферативное действие гена *bcl-2* при пе-  
реносе его в трансформанты *E1A+cHa-Ras*. Цитология 44 (5) :  
441—449. (Tararova N. D., Bulavin D. V., Neliudova A. M.,  
Aksenov N. D., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 2002. Antiapop-  
totic and antiproliferative effect of *bcl-2* gene transferred  
to *E1A+cHa-ras*-transformed cells. Tsitologiya. 44 (5) : 441—  
449.)
- 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 (Dordr). doi: 10.1007/s11357-014-9626-3.
- Czarny P., Pawlowska E., Bialkowska-Warzecha J., Kaarni-  
ranta K., Blasiak J. 2015. Autophagy in DNA damage response.  
Int. J. Mol. Sci. 16 : 2641—2662.
- Featherstone C., Jackson S. P. 1999. DNA double-strand bre-  
ak repair. Curr. Biol. 9 : 759—761.
- Grana T. M., Rusyn E. V., Zhou H., Sartor C. I., Cox A. D.  
2002. Ras mediates radioresistance through both phosphatidyli-  
nositol 3-kinase-dependent and Raf-dependent but mitogen-activated  
protein kinase/extracellular signal-regulated kinase kinase inde-  
pendent signaling pathways. Cancer Res. 62 : 4142—4150.
- Gu J., Hu W., Song Z. P., Chen Y. G., Zhang D. D., Wang C. Q.  
2016. Rapamycin inhibits cardiac hypertrophy by promoting autop-  
hagy via the MEK/ERK/Beclin-1 Pathway. Front Physiol. Doi:  
10.3389/fphys.2016.00104.
- Guo J. Y., Chen H., Mathew R., Fan J., Strohecker A. M., Kars-  
li-Uzunbas G., Kamphorst J. J., Chen G., Lemons J. M. S., Karant-  
za V., Collier H. A., Dipaola R. S., Gelinas C., Rabinovitz J. D.,  
White E. 2011. Activated Ras requires autophagy to maintain oxi-  
dative metabolism and tumorigenesis. Genes Develop. 25 : 460—  
470.
- Han W., Sun J., Feng L., Wang K., Li D., Pan Q., Chen Y.,  
Jin W., Wang X., Pan H., Jin H. 2011. Autophagy inhibition enhan-  
ces daunorubicin-induced apoptosis in K562 cells. PLoS ONE. 6.  
Doi: 10.1371/journal.pone.0028491.
- Johansen T., Lamark T. 2011. Selective autophagy mediated  
by autophagic adapter proteins. Autophagy. 7 : 279—296.
- Jones K. R., Elmore L. W., Jackson-Cook C., Demasters G.,  
Povirk L. F., Holt S. E., Gewirtz D. A. 2005. p53-Dependent acce-  
lerated senescence induced by ionizing radiation in breast tumour  
cells. Int. J. Radiat. Biol. 81 : 445—458.
- Kang K. B., Zhu C., Yong S. K., Gao Q., Wong M. C. 2009. En-  
hanced sensitivity of celecoxib in human glioblastoma cells: induc-  
tion of DNA damage leading to p53-dependent G<sub>1</sub> cell cycle arrest  
and autophagy. Mol. Cancer. 8 : 66. Doi: 10.1186/1476-4598-66.
- Klionsky D. J. et al. 2012. Guidelines for the use and interpre-  
tation of assays for monitoring autophagy. Autophagy. 8 :  
445—544.
- Komatsu M., Ichimura Y. 2010. Physiological significance of  
selective degradation of p62 by autophagy. FEBS Lett. 584 :  
1374—1378.
- Liu W., Zhang Z., Zhang Y., Chen X., Guo S., Lei Y., Xu Y.,  
Ji C., Bi Z., Wang K. 2015. HMGB1-mediated autophagy mo-  
dulates sensitivity of colorectal cancer cells to oxaliplatin  
via MEK/ERK signaling pathway. Cancer Biol. Ther. 16 : 511—  
517.
- Maier P., Hartmann L., Wenz F., Herskind C. 2016. Cellular  
pathways in response to ionizing radiation and their targetability  
for tumor radiosensitization. Int. J. Mol. Sci. 17. Doi: 10.3390/  
ijms17010102.

Mariño G., Martins I., Kroemer G. 2011. Autophagy in Ras-induced malignant transformation: fatal or vital? *Mol. Cell.* 42 : 1—3.

Mirzayans R., Andrais B., Scott A., Wang Y. W., Murray D. 2013. Ionizing radiation-induced responses in human cells with differing TP53 status. *Int. J. Mol. Sci.* 14 : 22 409—22 435.

Narita M., Young A. R. J., Narita M. 2009. Autophagy facilitates oncogene-induced senescence. *Autophagy.* 5 : 1046—1047.

Quick Q. A., Gerwitz D. A. 2006. An accelerated senescence response to radiation in wild-type p53 glioblastoma multiforme cells. *J. Neurosurg.* 105 : 111—118.

Rodier F., Campisi J. 2011. Four faces of cellular senescence. *J. Cell. Biol.* 192 : 547—556.

Shimura T. 2011. Acquired radioresistance or cancer and the AKT/GSK3 $\beta$ /cyclin D1 overexpression cycle. *J. Radiat. Res.* 52 : 539—544.

Shinojima N., Yokoyama T., Kondo Y., Kondo S. 2007. Roles of the Akt/mTOR/p70S6K and ERK1/2 signaling pathways in curcumin-induced autophagy. *Autophagy.* 3 : 635—637.

Toulany M., Iida M., Keinath S., Iyi F. S., Mueck K., Fehrenbacher B., Mansour W. Y., Schaller M., Wheeler D. L., Rode- mann H. P. 2016. Dual targeting of PI3K and MEK enhances the radiation response of *K-RAS* mutated non-small cell lung cancer. *Oncotarget.* Doi: 10.18632/oncotarget.9670.

Vessoni A. T., Filippi-Ciela E. C., Menck C. F., Lenz G. 2013. Autophagy and genomic integrity. *Cell Death Differ.* 20 : 1444—1454.

Wang Y., Zhang N., Zhang L., Li R., Fu W., Ma K., Li X., Wang L., Wang J., Zhang H., Gu W., Zhu W. G., Zhao Y. 2016. Autophagy regulates chromatin ubiquitylation in DNA damage response through elimination of SQSTM1/p62. *Mol. Cell.* Doi: 10.1016/j.molcel.2016.05.027.

Yang Y., Liang Z., Gu Z., Qin Z. 2005. Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol. Sinica.* 26 : 1421—1434.

Поступила 1 VII 2016

#### MEK/ERK-PATHWAY IS REQUIRED TO MAINTAIN CYTOPROTECTIVE AUTOPHAGY PROCESS IN IRRADIATED *E1A+cHa-Ras* TRANSFORMANTS

E. Yu. Kochetkova,\* G. I. Blinova, S. G. Zubova, T. V. Bykova,  
V. A. Pospelov, T. V. Pospelova

Institute of Cytology RAS; Saint-Petersburg, 194064;

\* e-mail: lena.linnaea@gmail.com

Autophagy is a conservative process of misfolded protein and damaged organelle degradation that serves to support cellular viability. Autophagy is often induced in response to stress, DNA damage, retinoids, starvation and growth factor withdrawal. The aim of the present work was to study autophagic response of *E1A+cHa-Ras*-transformed cells to irradiation and to analyze the role of MEK/ERK pathway in regulation of autophagy induced by irradiation. MEK/ERK suppression has been found to decrease the viability of irradiated cells. Inhibition of MEK/ERK pathway leads to the changes in the autophagy induced by irradiation connected with disturbances of final stages followed by accumulation of adaptor protein p62/SQSTM1 in autophagic cavities within cytoplasm. Thus, the data obtained allow to suggest that active MEK/ERK pathway is required to support, the cytoprotective autophagy which is induced in response to irradiation of transformed *E1A+cHa-ras* cells.

**Key words:** autophagy, MEK/ERK pathway, irradiation, *E1A+cHa-Ras* transformed cells, p62/SQSTM1.