

DOI: 10.7868/S0041377118100089

**ДИСБАЛАНС КОЛИЧЕСТВЕННОГО СООТНОШЕНИЯ НУКЛЕОТИДОВ
ПРИ ОВЕРЭКСПРЕССИИ УБИКВИТИНЛИГАЗЫ MDM2 В КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ
КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ ЧЕЛОВЕКА**

© O. Ю. Шувалов,* A. B. Петухов, O. A. Федорова, A. A. Дакс, H. A. Барлев

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

* электронный адрес: oleg8988@mail.ru

Убиквитинлигаза MDM2 является основным негативным регулятором онкосупрессора p53 и поэтому часто оверэкспрессируется различными опухолями, включая карциному молочной железы. Помимо этого, MDM2 может играть ключевую роль в различных биологических процессах независимо от p53. При этом крайне мало известно о роли MDM2 в онкоассоциированном метаболизме. Ранее показано, что MDM2 ингибирует активность дигидрофолат редуктазы — одного из основных ферментов фолатного цикла, тесно связанного биохимически с процессом биосинтеза нуклеотидов. В настоящем исследовании мы оценили влияние оверэкспрессии MDM2 на количество и интенсивность биосинтеза нуклеотидов в клеточной модели карциномы молочной железы человека. Мы показали, что оверэкспрессия MDM2 приводит к дисбалансу количественного соотношения нуклеотидов за счет повышения количества ТМФ и УМФ. При этом из литературных данных известно, что нарушение количественного соотношения нуклеотидов приводит к многочисленным мутациям и, следовательно, способствует геномной нестабильности. Таким образом, возможно, инициируемый MDM2 дисбаланс нуклеотидного состава может способствовать усилению злокачественности опухоли и ее прогрессии.

Ключевые слова: убиквитинлигаза, MDM2, фолатный цикл, биосинтез нуклеотидов, карцинома молочной железы

Принятые сокращения: АМФ — аденоzin-монофосфат, ГМФ — гуанозин-монофосфат, ЦМФ — цитозин-монофосфат, ТМФ — тимидин-монофосфат, УМФ — урацил-монофосфат, DHFR — дигидрофолатредуктаза (dihydrofolate reductase), MDM2 — убиквитинлигаза (mouse double minute).

Активно пролиферирующие злокачественные клетки нуждаются в постоянном биосинтезе нуклеотидов для репликации ДНК и синтеза РНК. В связи с этим интенсификация одноуглеродного метаболизма и биосинтеза нуклеотидов является общей характеристикой для неоплазий различного генезиса (Locasale, 2013).

Белок MDM2 является важнейшей убиквитинлигazой онкосупрессора p53, вызывая его деградацию в 26S протеасомном комплексе (Шувалов и др., 2015). При этом ген, кодирующий MDM2, часто амплифицирован в различных неоплазиях. Это приводит к сверхэкспрессии MDM2 и является общим механизмом инактивации p53 (Дакс и др., 2013).

Помимо этого, на сегодняшний день известно, что MDM2 может играть ключевую роль в различных биологических процессах независимо от p53. Данная убиквитинлигаза вовлечена в регуляцию клеточного цикла, reparации ДНК, клеточной адгезии и т. д., влияя на стабильность таких белков, как теломераза (hTERT), ретинобластома (RB), E2F1, Е-кадхерин, транскрипционных факторов Snail и Slug и т. д. (Manfredi et al., 2010; Fähraeu, Olivares-Illana, 2014; Shuvalov et al., 2018). При этом крайне мало известно о роли MDM2 в онкоассоциированном метаболизме.

Из имеющихся литературных данных известно, что MDM2 убиквитинилирует один из ключевых ферментов цикла фолатов и одноуглеродного метаболизма — дигидрофолат редуктазу (DHFR), что приводит к снижению каталитической активности данного фермента без его деградации (Maguire et al., 2008). Фолатный цикл обеспечивает в клетках обмен С1-групп, необходимых в первую очередь для биосинтеза нуклеотидов и S-аденозилметионина (Shuvalov et al., 2017).

Более того, показано, что MDM2 модулирует восприимчивость раковых клеток к метотрексату — ингибитору одноуглеродного метаболизма (Maguire et al., 2008). Таким образом, литературные данные косвенно свидетельствуют о потенциальном влиянии MDM2 на фолатный цикл и одноуглеродный метаболизм, а следовательно, и на биосинтез нуклеотидов, которое, однако, на уровне метаболитов показано не было.

Целью настоящего исследования стала оценка влияния оверэкспрессии MDM2 на количество и интенсивность биосинтеза нуклеотидов в клеточной модели карциномы молочной железы человека.

Материал и методика

Клеточные линии и условия культивирования. В настоящем исследовании использовали клеточную линию карциномы молочной железы человека MDA-MB-231, стабильно экспрессирующую MDM2, а также контрольную клеточную линию, трансдюцированную соответствующим лентивирусным вектором. Оверэкспрессию MDM2 верифицировали иммуноблотингом.

Введение меченого предшественника нуклеотидов. За 1 сут до анализа клетки пассивировали в трех повторностях на каждый образец в количестве $1.2 \cdot 10^6$. В день эксперимента клетки инкубировали в течение 1 ч в бессывороточной и безглюкозной среде DMEM, после чего инкубировали их в безглюкозной среде с добавлением C13-меченой глюкозы (4 г/л, 6×C13, Cambridge, США) в течение 2 и 8 ч.

Метabolомный анализ. После инкубации с меченой глюкозой клетки несколько раз промывали фосфатно-солевым буфером, после чего метаболиты экстрагировали 1 мл смеси метанол/ацетонитрил/вода в объемном соотношении 5 : 3 : 2. После центрифугирования осадок растворяли в 1 мл метанола с последующим добавлением 0.6 мл хлороформа и 0.2 мл воды. После очередного центрифугирования объединяли органическую и водную фазы и упаривали с использованием вакуумного испарителя. Оставшиеся образцы перемешивали, центрифугировали и 20 мкл супернатанта использовали для вы-

сокопроизводительной жидкостной хроматографии в системе Ultimate 3000 (Thermo). Разделение метаболитов проводили с использованием колонки Reprosil C18 (2.0×150 мм, 2.5 мкм, Dr Maisch, Германия) при 30°C со скоростью потока 0.2 мл/мин.

Жидкостную хроматографию проводили в сочетании с масс-спектрометром Q Exactive (Thermo). Идентификацию метаболитов проводили с использованием программного обеспечения Maven (Department of Chemistry and Integrative Genomics, США) путем конвертации .raw файлов в формат .mzXML, применяя MassMatrix (Cleveland, США).

Результаты представлены в виде средних и стандартных отклонений. Статистическую обработку проводили в программном обеспечении Excel с использованием парного *t*-критерия.

Результаты

Для оценки влияния убиквитинлигазы на количество и интенсивность биосинтеза нуклеотидов использовали клеточную линию карциномы молочной железы человека MDA-MB-231, стабильно экспрессирующую MDM2, а также контрольную клеточную линию, трансдюцированную соответствующим лентивирусным вектором.

Эти клеточные линии инкубировали в среде с 6×C13-меченой глюкозой в течение 2 и 8 ч соответственно, после чего проводили таргетный метabolомный

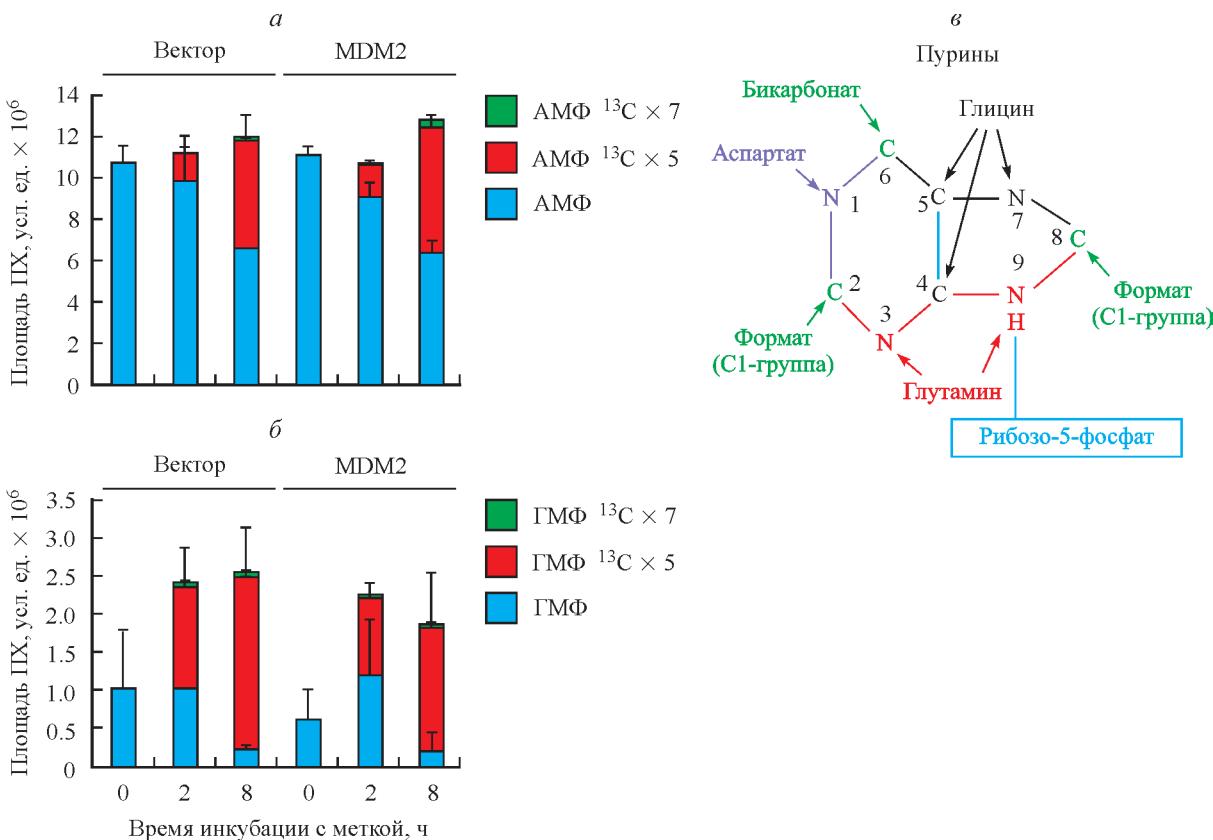


Рис. 1. Влияние оверэкспрессии MDM2 на количество и интенсивность биосинтеза пуриновых нуклеотидов АМФ (а) и ГМФ (б), оцененные по площади пиков хроматограмм (ПХ).

— источники атомов пуринового кольца. Здесь и на рис. 2: вектор — клетки, трансдюцированные вектором, MDM2 — клетки, стабильно экспрессирующие MDM2, ¹³C — включение изотопа углерода, цифровой обозначено количество изотопов ¹³C в молекуле; даны средние и стандартные отклонения.

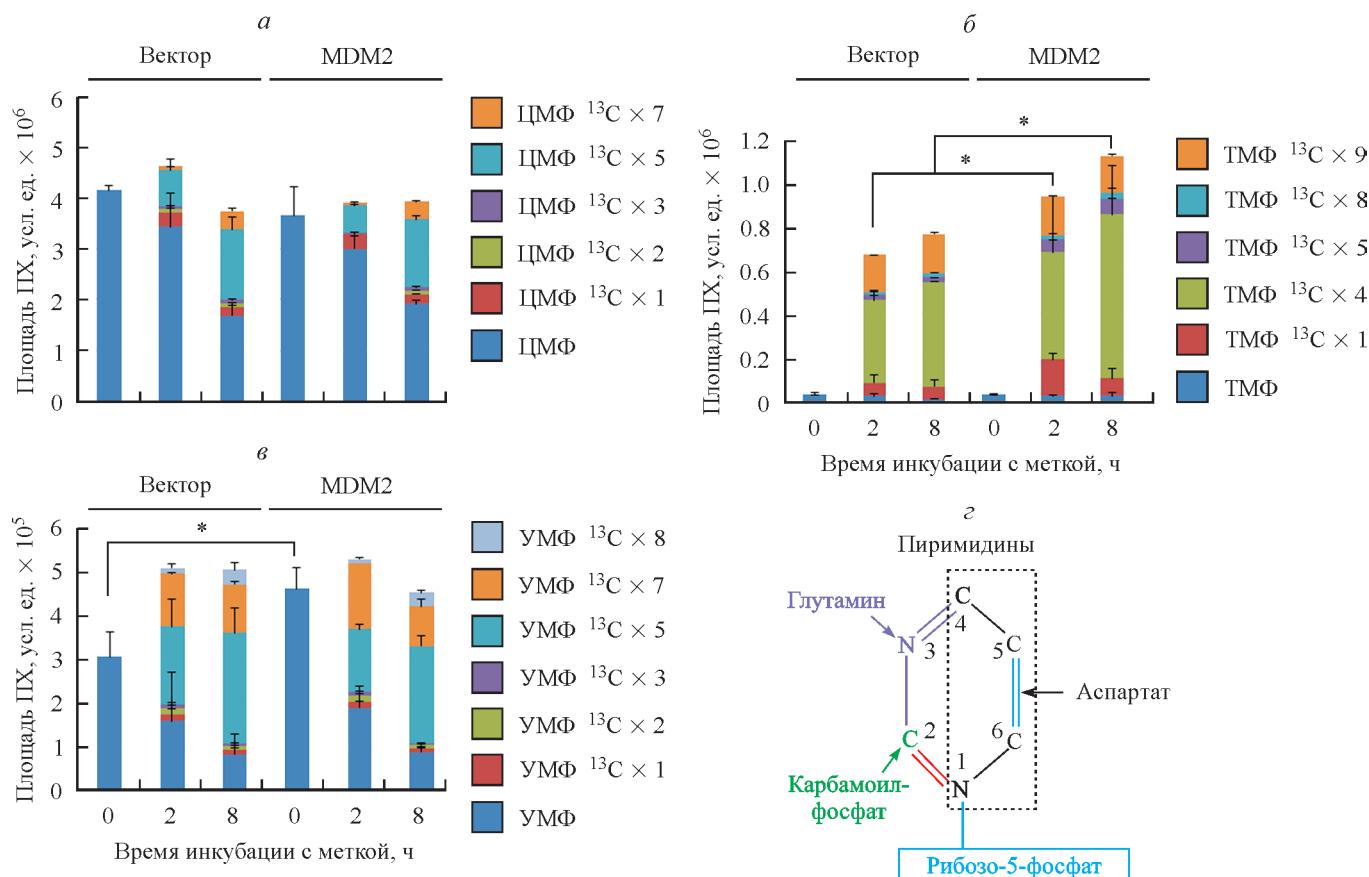


Рис. 2. Влияние оверэкспрессии MDM2 на количество и интенсивность биосинтеза пуриновых нуклеотидов ЦМФ (а), ТМФ (б) и УМФ (в), рассчитанные по площади пиков хроматограмм (ПХ).

— источники атомов пуринового кольца; звездочкой указан достоверность различий ($P < 0.05$).

анализ с использованием жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией.

Влияние оверэкспрессии MDM2 ни на количество, ни на интенсивность биосинтеза пуриновых нуклеотидов не показано (рис. 1, а, б). Кроме того, не детектировано и влияние оверэкспрессии MDM2 на количество и скорость биосинтеза пиримидинового нуклеотида ЦМФ (рис. 2, а). При этом в клетках с оверэкспрессией MDM2 отмечали повышение интенсивности биосинтеза ТМФ (метаболитов, несущих 1, 4 и 5 изотопов С13) (рис. 2, б). В то же время в клетках с оверэкспрессией MDM2 наблюдали значительное увеличение общего количества УМФ (рис. 2, в).

Обсуждение

Интенсификация одноуглеродного метаболизма и биосинтеза нуклеотидов является общей характеристикой для неопластических новообразований различного генезиса (Locasale, 2013). В связи с этим ингибиторы одноуглеродного метаболизма и биосинтеза нуклеотидов (метатрексат, 5-фторурацил и гемцитабин) занимают важное место в химиотерапии различных злокачественных новообразований (Shuvalov et al., 2017).

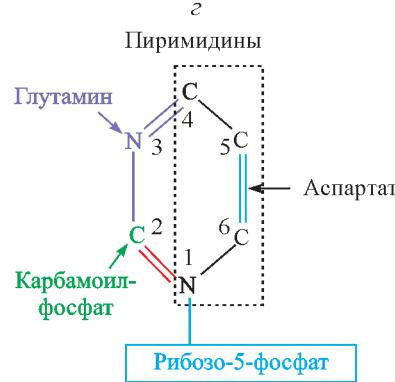
Убиквитинлигаза MDM2 часто оверэкспрессируется клетками карциномы молочной железы для инактивации онкосупрессора p53 (McCann et al., 1995). При этом показано, что MDM2 ингибирует активность DHFR — одного

из основных ферментов фолатного цикла метаболизма, тесно связанного биохимически с процессом биосинтеза нуклеотидов (Maguire et al., 2008).

В рамках настоящего исследования мы показали, что оверэкспрессия MDM2 в клеточной модели карциномы молочной железы приводит к изменению количества и интенсивности биосинтеза двух нуклеотидов пиримидинового ряда — ТМФ и УМФ. В контексте УМФ при оверэкспрессии MDM2 нами выявлено только увеличение его общего количества, и, к сожалению, не удалось проследить пути включения меченых изотопов. Возможно также, что MDM2 ингибирует процесс деградации УМФ.

В случае ТМФ нами детектировано повышение количества метаболитов, несущих 1, 4 и 5 изотопов С13. Предшественниками пиримидинов являются карбамоил-фосфат, аспартат и глутамин (рис. 2, в). Кроме того, синтез ТМФ из УМФ происходит за счет метилирования УМФ тимидилат-синтазой. Для этого используется С1-группа, переносимая с метилентетрагидрофолата, образующегося в результате цикла фолатов (Shuvalov et al., 2017). Таким образом, можно предположить, что MDM2 влияет на биосинтез ТМФ на нескольких его этапах. При этом, несмотря на то что источником двух углеродных атомов пуринового кольца является фолатный цикл (рис. 1, в), мы не выявили влияния оверэкспрессии MDM2 на количество пуриновых нуклеотидов.

Таким образом, мы показали, что оверэкспрессия MDM2 в клеточной модели рака молочной железы чело-



века приводит к дисбалансу количественного соотношения нуклеотидов. В свою очередь MDM2-опосредованное повышение количества УМФ и ТМФ может оказывать важное влияние на опухолевые клетки.

Из имеющихся литературных данных известно, что в клетках строго поддерживается количественный баланс всех нуклеотидов (Lau, 1997). Нарушение этого количественного соотношения приводит к многочисленным мутациям и, следовательно, способствует геномной нестабильности (Mathews, 2006; Pai, Kearsey, 2017). При этом хорошо известно, что геномная нестабильность является одной из основных характеристик раковых клеток, лежащих в основе их высокой пластичности и способности адаптироваться к различным стрессовым воздействиям (Negrini et al., 2010). Таким образом, возможно, инициируемый MDM2 дисбаланс нуклеотидного состава может способствовать усилению злокачественности опухоли и ее прогрессии.

Интересно отметить, что в литературе уже имеются данные о роли убиквитинлигазы MDM2 в геномной нестабильности. Показано, что MDM2 физически взаимодействует и ингибирует активность белка нибрин (NBN) — компонента комплекса MRE11—RAD50—NBN, участвующего в репарации «путем негомологичного воссоединения концов» (Bouska et al., 2008).

Полученные нами данные указывают на еще один потенциальный механизм вовлеченности MDM2 в геномную нестабильность опухолевых клеток, оверэкспрессирующих данную убиквитинлигазу, — дисбаланс количественного соотношения нуклеотидов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00816).

Список литературы

Дакс А. А., Мелино Д., Барлев Н. А. 2013. Роль различных Е3-убиквитинлигаз в регуляции активности онкосупрессора p53. Цитология. 55 (10) : 673—687. (Daks A. A., Melino D., Barlev N. A. 2013. The role of different E3-ubiquitin ligases in the regulation of the activity of the suppressor p53. Tsitologiya. 55 (10) : 673—687.)

Шувалов О. Ю., Федорова О. А., Петухов А. В., Дакс А. А., Васильева Е. А., Григорьева Т. А., Барлев Н. А. 2015. Негативные регуляторы онкосупрессора p53 в контексте направленной противоопухолевой терапии. Цитология. 57 (12) : 847—854. (Shuvalov O. Yu., Fedorova O. A., Petukhov A. V., Daks A. A., Vasileva E. A., Grigorieva T. A., Barlev N. A. 2015. Negative regulators of the suppressor p53 in the context of a directed antitumor therapy. Tsitologiya. 57 (12) : 847—854.)

Bouska A., Lushnikova T., Plaza S., Eischen C. M. 2008. Mdm2 promotes genetic instability and transformation independent of p53. Mol. Cell. Biol. 28 : 4862—4874.

Fahræus R., Olivares-Illana V. 2014. MDM2's social network. Oncogene. 33 : 4365.

Lau C. 1997. Nucleotide pool imbalance. In: Drug toxicity in embryonic development I. Berlin: Springer. 341—372.

Locasale J. W. 2013. Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. Nat. Rev. Cancer. 13 : 572.

Maguire M., Nield P. C., Devling T., Jenkins R. E., Park B. K., Polanski R., Boyd M. T. 2008. MDM2 regulates dihydrofolate reductase activity through monoubiquitination. Cancer Res. 68 : 3232—3242.

Manfredi J. J. 2010. The Mdm2—p53 relationship evolves: Mdm2 swings both ways as an oncogene and a tumor suppressor. Genes Develop. 24 : 1580—1589.

Mathews C. K. 2006. DNA precursor metabolism and genomic stability. FASEB J. 20 : 1300—1314.

McCann A. H., Kirley A., Carney D. N., Corbally N., Maggee H. M., Keating G., Dervan P. A. 1995. Amplification of the MDM2 gene in human breast cancer and its association with MDM2 and p53 protein status. Br. J. Cancer. 71 : 981.

Negrini S., Gorgoulis V. G., Halazonetis T. D. 2010. Genomic instability — an evolving hallmark of cancer. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11 : 220.

Pai C. C., Kearsey S. E. 2017. A critical balance: dNTPs and the maintenance of genome stability. Genes. 8 : 57.

Shuvalov O., Kizenko A., Shakirova A., Fedorova O., Petukhov A., Aksenenko N., Barlev N. 2018. Nutlin sensitizes lung carcinoma cells to interferon-alpha treatment in MDM2-dependent but p53-independent manner. Biochem. Biophys. Re. Commun. 495 : 1233—1239.

Shuvalov O., Petukhov A., Daks A., Fedorova O., Vasileva E., Barlev N. A. 2017. One-carbon metabolism and nucleotide biosynthesis as attractive targets for anticancer therapy. Oncotarget. 8 : 23 955.

Поступила 16 VII 2018

OVEREXPRESSION OF MDM2 UBIQUITINE LIGASE IN CELLULAR MODEL OF HUMAN BREAST CARCINOMA CAUSES AN IMBALANCE OF NUCLEOTIDES QUANTITATIVE RATIO

O. Yu. Shuvalov,* A. V. Petukhov, O. A. Fedorova, A. A. Daks, N. A. Barlev

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;
* e-mail: oleg8988@mail.ru

Ubiquitine ligase MDM2 is the main negative regulator of the p53 oncosuppressor and therefore it is often overexpressed in various tumors, including breast carcinoma. In addition, MDM2 can play a key role in various biological processes, regardless of p53. Very little is known about the role of MDM2 in onco-associated metabolism. It was previously shown that MDM2 inhibits the activity of DHFR — one of the main enzymes of the folate cycle, closely related biochemically with the biosynthesis of nucleotides. In this study, we evaluated the effect of overexpression of MDM2 on the quantity and intensity of nucleotide biosynthesis in the human breast carcinoma cell model. We showed that overexpression of MDM2 leads to an imbalance in the quantitative ratio of nucleotides due to an increase in the amount of TMP and UMP. It is known from the literature data that the interruption of the quantitative ratio of nucleotides leads to numerous mutations and, consequently, promotes genomic instability. Thus, it is possible that the MDM2-induced imbalance of the nucleotide quantitative ratio may contribute to the malignancy of the tumor and its progression.

Key words: ubiquitine ligase MDM2, folate cycle, biosynthesis of nucleotides, breast carcinoma