

# РОЛЬ С-КОНЦЕВОГО УЧАСТКА ОПУХОЛЕВОГО СУПРЕССОРА P14ARF В АКТИВАЦИИ НЕСЕЛЕКТИВНОЙ АУТОФАГИИ В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

## THE ROLE OF C-TERMINAL SEGMENT OF THE TUMOR SUPPRESSOR P14ARF IN THE ACTIVATION OF NONSELECTIVE AUTOPHAGY IN HUMAN CELLS

**A. Soloviev  
A. Budina  
T. Anaschenkova**

*Summary.* The article presents data on the determination of the area of the tumor suppressor protein ARF, responsible for the activation of non-selective autophagy in human cells. In experiments on osteosarcoma cells it was shown that activation of nonselective ARF-mediated autophagy occurs with the participation of C-terminal portion of p14ARF protein. The deletion of the C-terminal area disrupts ARF-mediated autophagy in tumor cells.

*Keywords:* autophagy, tumor suppressor, ARF, deletion.

**Соловьев Александр Семенович**

*Д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет»  
Aleksolo46@yandex.ru*

**Будина Анна Павловна**

*К.м.н., стажер-исследователь, «Институт Вистар»,  
Филадельфия, США*

**Анащенко Татьяна Александровна**

*К.м.н., доцент, ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет»*

*Аннотация.* В статье представлены данные по определению участка белка опухолевого супрессора ARF, ответственного за активацию неселективной аутофагии в клетках человека. В экспериментах на клетках остеосаркомы показано, что активация неселективной ARF-опосредованной аутофагии происходит с участием С-концевого участка белка p14ARF. Делеция С-концевого участка нарушает ARF-опосредованную аутофагию в опухолевых клетках.

*Ключевые слова:* аутофагия, опухолевой супрессор, ARF, делеция.

### Актуальность проблемы

**О**пухолевый супрессор ARF (от английского Alternative Reading Frame — альтернативная рамка считывания) кодируется локусом INK4a/ARF, который находится на коротком плече 9 хромосомы человека [4]. Это второй по частоте встречаемости мутантный ген в опухолях человека после гена TP53, кодирующего опухолевый супрессор p53 [13]. ARF человека содержит на своем N-конце два метионина в 1 и 42 положениях. Инициация трансляции может начинаться с любого из них в результате чего могут синтезироваться полноразмерный белок 1–173 ARF и укороченная форма 42–173 ARF. Преимущественной формой p14ARF в клетках является белок с размером 14кДа и инициацией трансляции с метионина в 42 положении — 42–173 ARF. Наиболее изученной биологической функцией ARF является его роль в стабилизации опухолевого супрессора p53. Индукция ARF стабилизирует опухолевый супрессор p53, что приводит к остановке клеточного цикла и запрограммированной гибели клетки [1, 3]. Однако несмотря на имеющееся мнение, что ARF подавляет развитие опухоли посредством стабилизации p53, накапливается все больше данных, указывающих на существование p53-независимых функций белка ARF [5,15]. Повышение его экспрессии останавливает деление клеток, приводит к апоптозу при отсутствии в них p53 [8].

Потеря функции опухолевого супрессора ARF является необходимым условием трансформации нормальных клеток в опухолевые [4]. Данные наблюдения привели к активному поиску механизмов, с помощью которых ARF подавляет развитие опухолей.

В последние годы активно изучается участие опухолевых супрессоров в регуляции аутофагии [5,9,11]. Повышенный интерес к изучению аутофагии связан с тем, что она вовлечена во многие патологические процессы, в том числе канцерогенез [6,11,14]. Показано, что эффективная работа некоторых опухолевых супрессоров зависит от их способности активировать аутофагию, которая, в свою очередь, обладает различными механизмами противоопухолевой защиты [2]. Экспериментальные исследования на опухолевых клетках свидетельствуют о влиянии опухолевого супрессора ARF на индукцию аутофагии [5,12]. Однако до настоящего времени нет ясного понимания как ARF регулирует этот процесс, каковы молекулярные механизмы ARF-опосредованной аутофагии.

### Цель исследования

Целью исследования явилось определение участка белка p14ARF, ответственного за активацию аутофагии у человека.

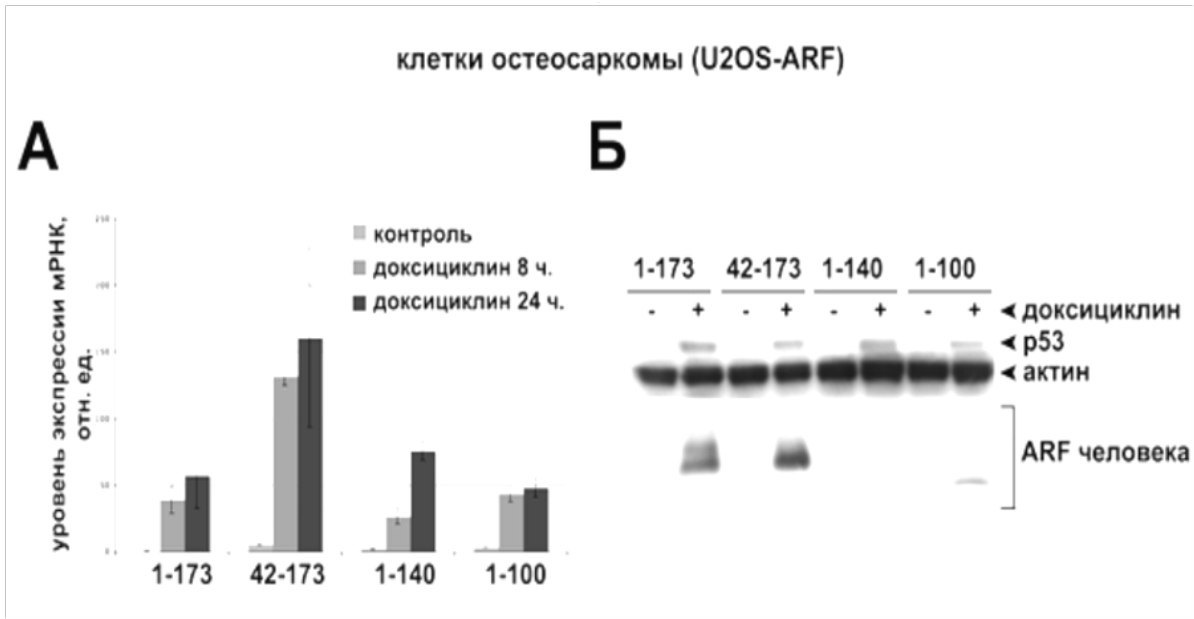


Рис. 1. Оценка индуцируемой доксициклином экспрессии p14 ARF и его мутантных форм в клетках остеосаркомы

## Материалы и методы

В работе была использована клеточная линия остеосаркомы человека U2OS-ARF и клетки аденокарциномы поджелудочной железы Саран2. На основе мРНК, выделенной из клеток Саран2, получали кДНК р14ARF полно-размерной формы ARF(1–173). Используя полученную кДНК в качестве матрицы, с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и специфических праймеров, была генерирована укороченная форма ARF, а также два С-концевых делеционных мутанта 1–140 ARF и 1–100 ARF. Все эти формы клонировали в плазмиду рGEM-I Easy (рGEM-I Easy Vector System, Promega, США). Полученные векторы трансфецировали в клетки остеосаркомы для создания четырех различных клеточных линий. Чтобы добиться регулируемой экспрессии генов для каждого варианта ARF(1–100, 1–140, 42–173, 1–173) были созданы клеточные линии остеосаркомы, содержащие тетрациклин-регулируемую систему экспрессии генов. Инкубация U2OS-ARFклеток в присутствии доксициклина приводит к повышению экспрессии гена белка ARF, что облегчает изучение этого опухолевого супрессора [12]. Экспрессию белков в клеточных лизатах определяли методом иммуноблоттинга. Уровень аутофагии оценивали иммунофлуоресцентным методом по локализации белка LC3 меченого флюорохромом GFP и деградации белка р62. Известно, что активация аутофагии приводит к деградации адаптора аутофагии белка р62, который входит в состав аутофагосомы и деградирует в процессе аутофагии. Активация аутофагии приводит к накоплению белка LC3 аутофагосомами, что также свидетельствует

об активации ARF-опосредованной аутофагии. Все это делает белки р62 и LC3 хорошими маркерами для изучения динамики процесса аутофагии [7,10].

Формирование аутофагосом анализировали с помощью конфокальной микроскопии, используя микроскоп Nikon E 600. Статистическую достоверность различий оценивали путем расчета t критерия Стьюдента в программе SigmaProt V.10. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты исследования

Для доказательства получения клеточных линий остеосаркомы с доксициклинзависимой экспрессией р14ARF и его концевых мутантов было проведено определение экспрессии генов путем измерения соответствующих мРНК методом количественной ПЦР в реальном времени с использованием праймеров, специфичных для этих генов. Результаты исследований показали повышение уровня экспрессии всех форм р14ARF (рис. 1-А). Определение уровня белков методом иммуноблоттинга указывало, что все мутантные гены экспрессируются в клетках U2OS-ARF и индуцируют одинаковой уровень стабилизации р53, что свидетельствует об их функциональности (рис. 1-Б.)

Убедившись, что полученные клеточные линии остеосаркомы способны экспрессировать р14ARF и его С-концевые мутанты, в последующих опытах было проведено сравнение уровня аутофагии в клетках U2OS-ARF

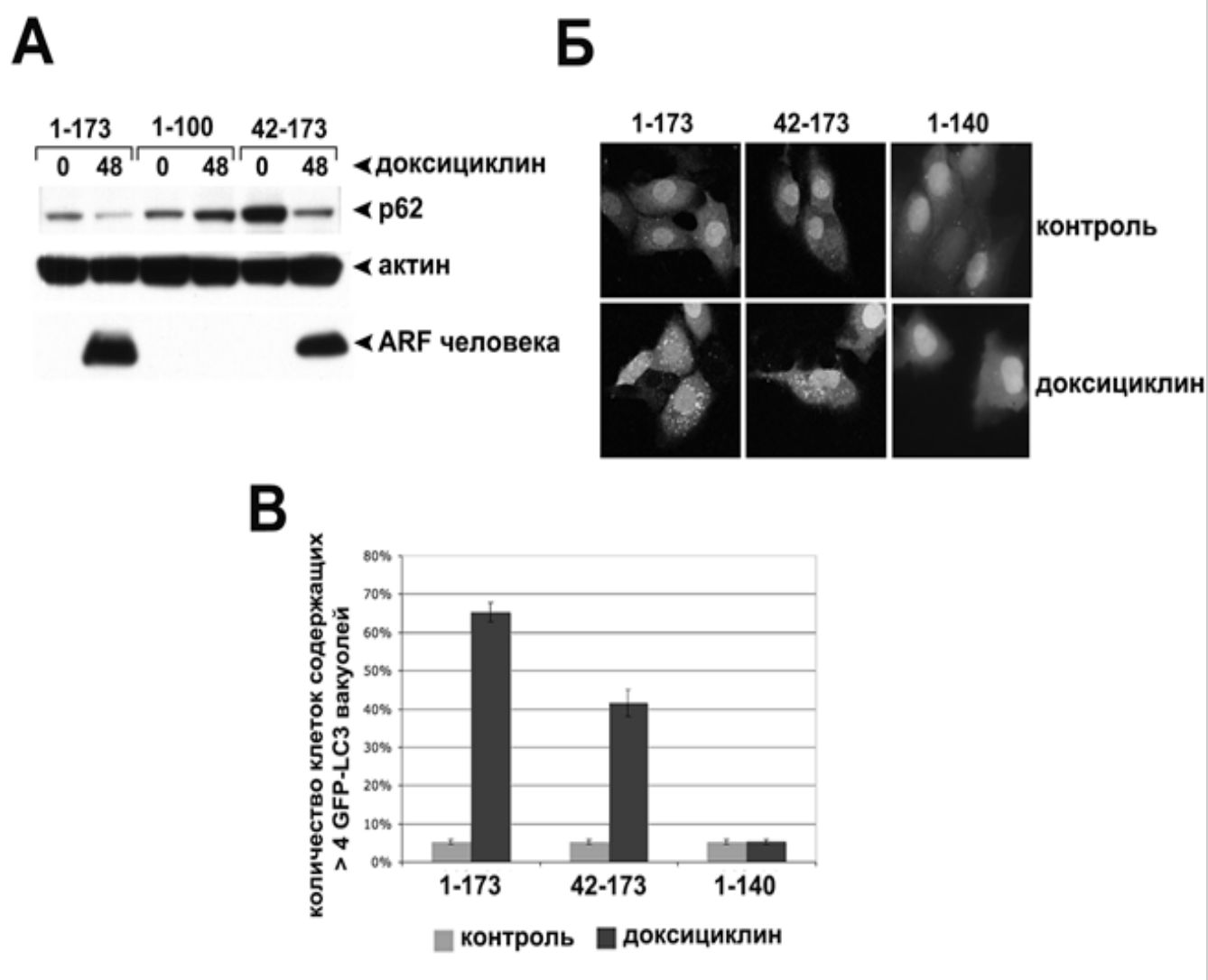


Рис. 2. Измерение аутофагии в клетках U2OS-ARF в результате индукции различных форм р14ARF доксициклином

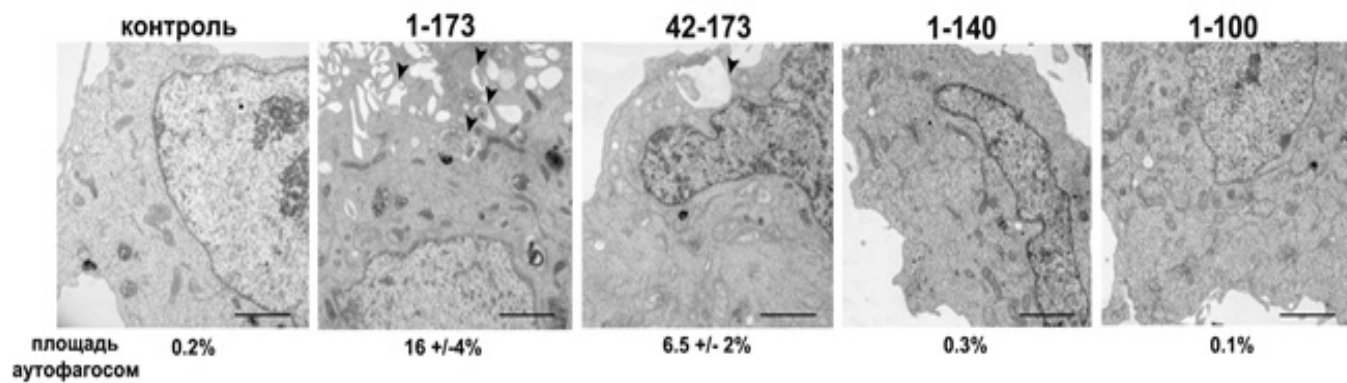


Рис. 3. Анализ уровня аутофагии в клетках U2OS-ARF после индукции ARF доксициклином. Цифрами указаны средние значения площади аутофагосом по трем повторам и стандартные ошибки среднего

с доксициклинзависимой экспрессией 1–173 ARF и укороченной формы 42–173 ARF с уровнем аутофагии, наблюдаемым после активации делеционных мутантных форм. Была проанализирована динамика изменений маркера p62 в клетках U2OS-ARF, инкубированных с доксициклином в течение 48 часов методом иммуноблоттинга. Выявлено, что индукция 1–173 и 42–173 ARF приводит к деградации белка p62, которой не наблюдалось при активации 1–100 ARF (рис. 2-А).

При оценке аутофагии иммунофлюорисцентным анализом по локализации белка LC3 слитого с флюорохромом GFP установлено, что экспрессия 1–173 и 42–173 ARF в клетках остеосаркомы увеличивало образование ярких, зеленых гранул вследствие вовлечения белка LC3-GFP в состав аутофагосом, что подтверждает ARF-опосредованный характер аутофагии. В то же время клетки с активированным 1–100 или 1–140 ARF сохраняли диффузную зеленую окраску (рис. 2-Б). Подсчет GFP-LC3-позитивных клеток показал, что 1–173 и 42–173

ARF способны эффективно стимулировать аутофагию, в отличие от мутантной формы 1–140 ARF, которая оказалась дефектной по данному процессу (рис. 2-В).

Электронная микроскопия также выявила значительную аккумуляцию аутофагосом после увеличения экспрессии 1–173 и 42–173 ARF, в то время как индукция 1–100 и 1–140 ARF не активировала формирование аутофагосом (рис. 3).

### Заключение

На основании полученных данных можно констатировать следующее. Делеция концевой участка гена опухолевого супрессора p14ARF не исключает его экспрессию в опухолевых клетках. В то же время активация неселективной ARF-опосредованной аутофагии у человека происходит только с участием С-концевого участка белка p14ARF, являющегося имманентной составляющей этого процесса.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Михайлов В.Ф., Шулина Л.В., Васильева И.М., и др. Некоторые аспекты канцерогенеза, связанные с генетическими и эпигенетическими факторами // *Успехи современной биологии*. — 2018. — Т. 138. — № 5. — С. 427–445.
2. Рябая О.О., Егорова А.В., Степанова Е.В. Роль аутофагии в механизме гибели опухолевых клеток // *Успехи современной биологии*. — 2015. — Т. 135. — № 2. — С. 177–188.
3. Пимкина Ю.С., Доросевич А.Е. Роль опухолевого супрессора ARF в онкогенезе // *Архив патологии*. — 2009. — Т. 71. — № 1. — С. 60–63.
4. Aram Ko, Su Yeon Han, Jaewhan Song. Regulatory network of ARF in cancer development // *Molecules and Cells*. — 2018. — № 41 (5). — P. 381–389.
5. Fontana R., Vivo M. Dynamics of p14 ARF and focal adhesion kinase-mediated autophagy in cancer // *Cancers*. — 2018. — № 10. — P. 221.
6. Galluzzi L., Bravo-San Pedro JM, Kroemer G. Autophagy mediates tumor suppression via cellular senescence // *Trends in cell biology*. — 2016. — № 26 (1). — P. 1–3.
7. Hai-Ming Zhang, Shi-Peng Li, Yao Yu, et al. Bi-directional roles of IRF-1 on autophagy diminish its prognostic value as compared with Ki67 in liver transplantation for hepatocellular carcinoma // *Oncotarget*. — 2016. — № 7 (25). — P. 37979–37992.
8. Kotsinas A, Papanagnou p, Evangelou K., et al. ARF: a versatile DNA damage response ally at the crossroads of development and tumorigenesis // *Front Genet*. — 2014. — 5:236.
9. Lee E., Wei Y., Zou Z., et al. Genetic inhibition of autophagy promotes p53 loss-heterozygosity and tumorigenesis. — 2016. — № 7 (42). — P. 67919–67933.
10. Moscat J., Karin M., Diaz-Meco M.T. P62 in cancer: signaling adaptor beyond autophagy // *Cell*. — 2016. — № 167 (3). — P. 606–609.
11. Mrakovcic M, Fronlich LF. P-53 — mediated molecular control of autophagy in tumor cells // *Biomolecules*. — 2018. — № 8 (2).
12. Pimkina J., Humbey O., Zilfou J.T., et al. ARF induces autophagy by virtue of interaction with Bcl-xl // *Journal of biological chemistry*. — 2009. — № 5 (284). — P. 2803–2810.
13. Saporita A.J., Maggi L. B., Apicelli A. J., et al. Therapeutic targets in the ARF tumor suppressor pathway // *Curr Med Chem*. — 2007. — № 14 (17). — P. 1815–1827.
14. Singh SS, Vats S, Chia AY., et al. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer // *Oncogene*. — 2018. — № 37 (9). — P. 1142–1158.
15. Vivo M, Fontana R, Ranieri M, et al. P14 ARF interacts with the focal adhesion kinase and protects from anoikis // *Oncogene*. — 2017. — № 36 (34). — P. 4913–4928.

© Соловьев Александр Семенович (Aleksolo46@yandex.ru), Будина Анна Павловна, Анащенко Татьяна Александровна.

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»