

ШАГИЕВА ГАЛИНА СЕРГЕЕВНА

**СНИЖЕНИЕ УРОВНЯ МИТОХОНДРИАЛЬНЫХ АКТИВНЫХ ФОРМ
КИСЛОРОДА ПРИВОДИТ К ФЕНОТИПИЧЕСКОЙ НОРМАЛИЗАЦИИ
КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ШЕЙКИ МАТКИ ЧЕЛОВЕКА**

03.03.04. – клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2013

Работа выполнена на факультете биоинженерии и биоинформатики и в НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ им. М.В.Ломоносова

Научный руководитель:

кандидат биологических наук
ДУГИНА Вера Борисовна
старший научный сотрудник
НИИ физико-химической биологии
имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

Научный консультант:

доктор биологических наук,
академик РАН, профессор
СКУЛАЧЕВ Владимир Петрович
директор НИИ физико-химической биологии
имени А. Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук
ГЛУШАНКОВА Наталия Александровна
ведущий научный сотрудник
ФГБУ "Российский онкологический
научный центр им. Н. Н. Блохина" РАН

кандидат биологических наук
ГИОЕВА Фатима Константиновна
старший научный сотрудник
отдела клеточной биологии
Института белка РАН

Ведущая организация:

ФГБУН Институт биологии
развития им.Н.К. Кольцова РАН

Защита диссертации состоится «17» декабря 2013 года в 15:30 на заседании диссертационного совета Д.501.001.52. при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу 119899, Москва, Ленинские горы, д.1, стр.12, Биологический факультет МГУ, аудитория М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ им. М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан « » ноября 2013 года.

Ученый
секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



Калистратова Е.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Механизмы, благодаря которым опухолевые клетки приобретают способность к миграции, на сегодняшний день изучены недостаточно. Опухолевая трансформация клеток часто связана с изменениями в организации цитоскелета, исчезновением или уменьшением клеточной адгезии и нарушением сигнальных путей, связанных с адгезией. Разрушение адгезионных межклеточных контактов у трансформированных клеток ведет к усилению пролиферации, миграции, инвазии и метастазированию.

Активные формы кислорода (АФК) влияют на процесс трансформации клеток, опухолевые клетки часто имеют повышенное содержание АФК. Поиск и изучение веществ, влияющих на содержание АФК в клетках, является важным направлением современных исследований. Митохондриально-направленные антиоксиданты (в дальнейшем мАО) являются новым классом синтетических антиоксидантов (АО), для которых характерно быстрое и обратимое накопление в митохондриях, что повышает эффективность их действия (Скулачев, 2007).

Цель работы: исследование воздействия нового класса АО митохондриальной направленности на нормальные и опухолевые кератиноциты человека в культуральных условиях.

Задачи исследования:

- 1) Проанализировать изменения организации цитоскелетной системы и межклеточных адгезионных структур нетрансформированных и опухолевых кератиноцитов человека под действием мАО с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии;
- 2) Изучить воздействие мАО на пролиферацию нормальных и опухолевых кератиноцитов в культуре;
- 3) Провести количественную оценку изменения соотношения эпителиальных и мезенхимальных маркеров в клетках карциномы шейки матки под действием мАО с помощью иммуноблоттинга белков;
- 4) Изучить возможное влияние мАО на активацию MAP-киназных сигнальных молекул в клетках рака шейки матки.

Научная новизна и практическая значимость работы. Исследованию механизмов подвижности опухолевых клеток, их способности к инвазии и метастазированию посвящено множество научных работ. Важнейшую роль в этих процессах играет реорганизация актинового цитоскелета, межклеточных контактов, каскадов сигнальных молекул.

В настоящее время активно изучается функциональная разница изоформ актина, их роль в направленном движении клеток. Благодаря использованию уникальных специфических антител к цитоплазматическим изоформам актина впервые были исследованы изменения организации актинового цитоскелета опухолевых клеток после воздействия мАО. В данной диссертационной работе впервые были показаны различия в распределении изоформ актина в опухолевых клетках разной степени трансформации. Полученные данные указывают на различные роли цитоплазматических актинов в опухолевой прогрессии.

Актиновый цитоскелет тесно связан с межклеточными контактами. Наряду с перестройкой актинового цитоскелета после воздействия мАО группы SkQ, мы наблюдали реорганизацию адгезионных контактов и повышение количества опухолевых супрессоров – белков адгезионных контактов, E-кадгерина и α -катенина. Под действием SkQ опухолевые клетки формировали эпителиальные островки, характерные для нормальных кератиноцитов.

Исследование линий опухолевых клеток разной степени и этиологии трансформации позволило нам сравнить изменения морфологии и сигнальных каскадов, происходящие с клетками после воздействия мАО. Были выявлены новые закономерности, характерные для неопластически трансформированных клеток в целом, а также обнаружены различия влияния мАО на клетки разной степени трансформации.

Для реализации поставленных задач нами были использованы современные методы исследования, среди которых иммунофлуоресцентная световая и конфокальная лазерная микроскопии, проточная цитофлуориметрия,

иммуноблоттинг белков, измерение митохондриальных АФК с помощью лентивирусной конструкции с белковым сенсором перекиси водорода Нурег.

Важными научными вопросами является выяснение биологических функций окислительного стресса и его влияния на неопластическую трансформацию. Впервые были получены данные о том, что митохондриальные АФК воздействуют на сигнальный каскад EGFR/MEK/ERK в клетках рака шейки матки. Существует множество доказательств участия каскада ERK в патогенезе и прогрессии различных опухолей человека (Bodart et al., 2002), поэтому идет интенсивный поиск и тестирование новых ингибиторов этого каскада в качестве противоопухолевой терапии (Friday & Adjei, 2008; Roberts & Der, 2010; Wong, 2009). Согласно нашим данным, мАО подавляют активацию ERK1/2, тем самым блокируя этот сигнальный каскад.

Таким образом, нами была обнаружена фенотипическая нормализация клеток рака шейки матки при снижении уровня АФК с помощью мАО группы SkQ, а также изучен механизм действия SkQ на клеточный сигнальный каскад киназы ERK. Наше исследование имеет не только теоретическое, но и важное практическое значение. Полученные нами данные позволяют рассматривать мАО как потенциальные средства превентивной и поддерживающей противоопухолевой терапии.

Апробация результатов работы. Основные результаты работы были представлены и обсуждены на следующих конференциях: 1) XV Международная научная конференция «Ломоносов-2008», 8-11 апреля 2008 г., Москва, Россия; 2) XVI Евроконференция по апоптозу, 6-9 сентября 2008 г., Берн, Швейцария; 3) Всероссийская конференция «Фундаментальная онкология – Петровские чтения», апрель 2009 г., Санкт-Петербург, Россия; 4) Школа-семинар по проблемам организации внутриклеточного транспорта, цитоскелета и путей передачи сигнала, 16-17 ноября 2009 г., Санкт-Петербург, Россия; 5) IX Международный симпозиум «Биологическая подвижность», 11-15 мая 2010 г., Пущино, Россия; 6) Международная конференция «From *Homo sapiens* to *Homo sapiens liberatus*», 25-26 мая 2010 г., Москва, Россия; 7) I Всероссийская

конференция "Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет", 11–13 октября, 2011 г., Санкт-Петербург, Россия; 8) 37-ой международный конгресс Федераций европейских биохимических сообществ, 4-9 сентября 2012 г., Севилья, Испания; а также на совместном заседании отделов биоэнергетики и математических методов в биологии НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского МГУ им. М.В. Ломоносова 15.12.2011 г., на заседании кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова 15.11.2012 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 11 печатных работ, из них статей в журналах, соответствующих перечню ВАК РФ – 3, тезисов докладов и материалов конференций - 8.

Структура и объем работы. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов, обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 134 страницах машинописного текста, содержит 32 рисунка, 1 таблицу. Список литературы включает 243 источника, из которых 15 – на русском языке, 228 – на иностранном языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные линии и питательные среды для роста клеток. Были использованы следующие культуры клеток: линия HaCaT, спонтанно immortalized *in vitro* кератиноциты из гистологически нормального эпителия человека; культуры клеток рака шейки матки - C-33A (ATCC #HTB-31), SiHa (ATCC #HTB-35), Caski (ATCC #CRL-1550). Клетки культивировали на среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 5% эмбриональной сыворотки телят («HyClone», США), антибиотиков пенициллина и стрептомицина (по 100 ед/мл, «ПанЭко») и глутамина (5мМ, «ПанЭко») при 37°C в увлажненной атмосфере 5%-ного CO₂.

Реактивы и специфические агенты. В ходе работы использовались мАО SkQ1 и его аналоги (10-40нМ, «Митотехнологии», Россия); АО NAC (1мМ, N-acetyl-L-cysteine, «Sigma», США); разобщитель FCCP (carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone, 0,5μМ, «Sigma», США); эпидермальный фактор роста (ЭФР, 5–10 нМ, «Chemicon», США); высокоселективный ингибитор киназ MEK1/2, U0126 (2-10мкМ, «Cell Signalling», США).

Для иммунофлуоресцентной микроскопии и иммуноблоттинга белков использовали следующие мышинные моноклональные антитела: к β-актину (клон 4C2, IgG1), γ-актину (клон 2A3, IgG2b; Dugina et al., 2009); Е-кадгерину, N-кадгерину («BD Transduction Laboratories», США), виментину (DAKO, США); α-тубулину («Sigma», США); крысиные моноклональные антитела к Snail («Cell Signalling», США); кроличьи поликлональные антитела к ERK1/2 (p42/44), p-ERK1/2 (p-p42/44) («Cell signalling», США), рецептору к эпидермальному фактору роста, РЭФР (EGFR), ф-РЭФР (p-EGFR) («Cell Signalling», США). В качестве вторых антител для иммунофлуоресценции использовали козы флуоресцеин- и родамин-конъюгированные антитела к иммуноглобулинам IgG2a, IgG2b и IgG1 мыши («Southern Biotechnology», США), козы Alexa-488-конъюгированные антитела к иммуноглобулинам крысы («Molecular probes», США), ядра выявляли с помощью DAPI («Sigma», США). Для иммуноблоттинга белков вторыми антителами, связанными с пероксидазой хрена, служили козы антитела к иммуноглобулинам IgG мыши и кролика («Sigma», США). Содержание АФК в клетке изучалось с помощью H2DCF-DA (диацетиловый эфир 5'-6'-хлорметил-2',7'-дихлордигидро-флуоресцеина, «Invitrogen», США).

Иммунофлуоресцентная и лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Для иммунофлуоресцентного окрашивания клетки культивировали на покровных стеклах, фиксировали 15 мин 1%-ным параформальдегидом, затем подвергали их экстракции–фиксации холодным метанолом при –20° в течение 5 мин для последующей окраски антителами.

Иммунофлуоресцентное исследование проводили с помощью микроскопа Axioplan (объективы Plan-Neofluar 40x/0.75 и 100x/1.3, «Carl Zeiss», Германия),

лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM510 (аргоновый (исходящая длина волны 488 nm) и гелий-неоновый (543nm) лазеры, объектив Plan-Neofluar 63x/1.4, «Carl Zeiss», Германия). Обработка изображений производилась при помощи программ LSM5 Image Examiner и Adobe Photoshop.

Электрофорез и иммуноблоттинг белков проводили по стандартным методикам (Шагиева и др., 2012). Полученные пленки сканировали и проводили денситометрический анализ в программе ImageJ 1,37C (NIH, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) с использованием α -тубулина для нормализации.

Измерение продукции АФК методом проточной цитофлуориметрии. Для изучения содержания АФК клетки инкубировали с раствором H2DCF-DA в концентрации 1,8 мкМ в культуральной среде в течение 10 минут в темноте при 37°C. Флуоресценцию анализировали с помощью проточного цитофлуориметра Beckman Coulter Cytomics FC500. Для измерения митохондриальной продукции АФК использовали белковый сенсор перекиси HyPer, содержащий последовательность, кодирующую сигнальный пептид импорта в митохондрии («Eurogene», Россия). На основании данного сенсора была создана лентивирусная конструкция (pLCMVHyPer-mito, Е. Галимов, Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН). Для экспериментов использовали линию клеток SiHa, стабильно экспрессирующую направленный в митохондрии желтый флуоресцентный белок HyPer. Исследование интенсивности флуоресценции проводили с помощью микроскопа Axioplan (объектив Plan-Neofluar 100x/1.3) и программы ImageJ 1,37C.

Подсчет количества клеток при изучении пролиферативных характеристик клеточных культур производился на единицу площади культурального матраса на сроках инкубации от 5 часов до 5 суток при помощи микроскопа Axioplan (объектив Plan-Neofluar 20x/0.50).

Статистический анализ. Данные представлены как среднее значение $\pm$ стандартная ошибка среднего по результатам как минимум трех независимых экспериментов. Для проверки статистических гипотез был использован *t*-тест

Стьюдента, значения $p < 0,001$ (***) , $p < 0,01$ (**) и $p < 0,05$ (*) считались статистически достоверными.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

1. Организация актиновых микрофиламентов в нормальных и опухолевых кератиноцитах. Влияние мАО на распределение изоформ актина. Из всех рассмотренных культур immortalized кератиноциты культуры **HaCaT** наиболее близки по организации к нормальным эпителиальным клеткам. В цитоплазме клеток HaCaT выявляется хорошо развитая система пучков β -актиновых микрофиламентов. После инкубации с SkQ1 (40 нМ, 7 сут.) кольцевые пучки β -актина на периферии островков становятся немного толще, радиальная система β -актина в зоне межклеточных контактов выявляется лучше. Густая сеть γ -актина в клетках HaCaT после инкубации с мАО не меняется.

В неопластически трансформированных клетках, в основном, выявляется диффузный β -актин и лишь небольшая часть β -актиновых микрофиламентов организована в тонкие короткие ненаправленные фибриллы. По периметру клеток видны ламеллярные участки с повышенным окрашиванием β -актина в раффлах (рис.1). Во всех культурах наблюдается интенсивное окрашивание густой кортикальной и ламеллярной сети γ -актиновых филаментов. В результате инкубации клеток SiHa, Caski и C33A с мАО в течение 4 - 7 суток пучки β -актина становятся толще. В клетках выявляется система тангенциальных и радиальных пучков β -актина (рис.1). Распределение γ -актина в неопластически трансформированных клетках после инкубации с мАО не меняется. Схожие изменения организации цитоскелета под действием мАО в вирус-содержащих (SiHa и Caski) и безвирусной (C33A) культурах, позволили сделать вывод о том, что механизм действия мАО не затрагивает белки вируса папилломы человека (ВПЧ).

Изменения экспрессии цитоплазматических изоформ актина в зависимости от степени трансформации клеток показаны на рис.2. Наблюдается увеличение экспрессии γ -актина и достоверное снижение экспрессии β -актина в более трансформированных клетках SiHa, по сравнению с клетками HaCaT.

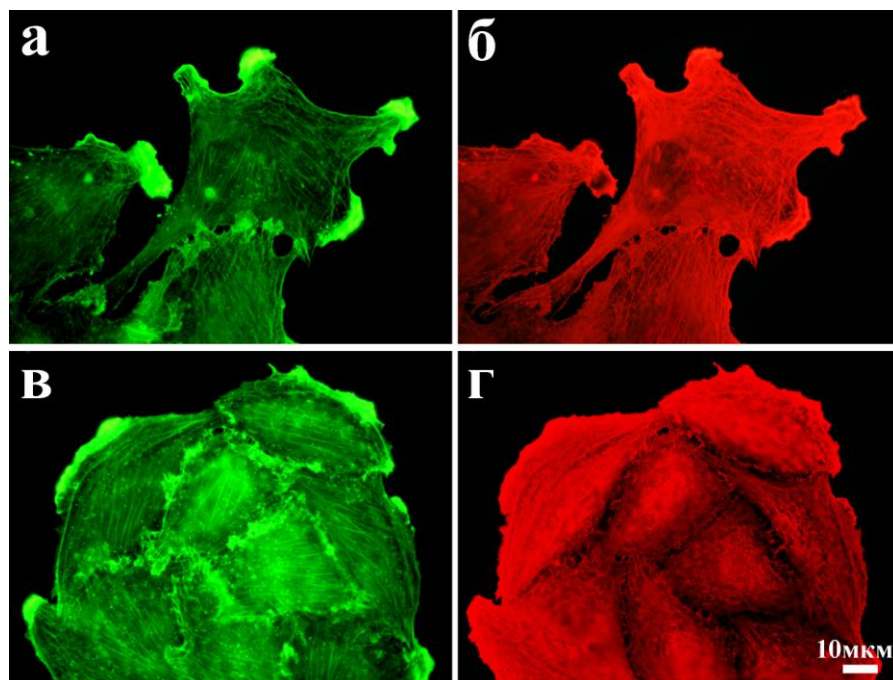


Рис.1. Организация актинового цитоскелета в клетках культуры SiHa. β-Актин – зеленый; γ-актин – красный; а, б) контроль; в, г) SkQ1 (40нМ, 7сут.), Иммунофлуоресцентная микроскопия.

В нашей работе (Шагиева и др., 2012) было показано снижение количества β-актина при усилении трансформации клеток при помощи ЭФР *in vitro* и в опухолевых клетках гистологических срезов цервикальных интраэпителиальных неоплазий по сравнению с клетками нормального экзоцервикса.

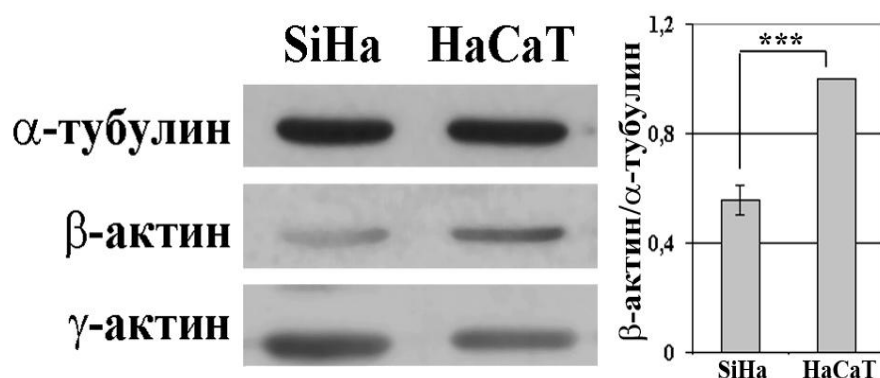


Рис.2. Изменение экспрессии цитоплазматических изоформ актина при трансформации кератиноцитов. Экспрессия β-актина в клетках SiHa достоверно ниже, чем в HaCaT ($p < 0,001$).

Иммуноблоттинг белков.

Нарушение организации системы актиновых микрофиламентов вызывает изменения упорядоченности и ориентации клеток, неконтролируемый рост клеток, неправильный ответ на внешние стимулы, опухолевую трансформацию клеток (Prasad, 2005; Yamaguchi and Condeelis, 2007). Мы показали, что мАО вызывают реорганизацию актинового цитоскелета опухолевых клеток. После воздействия мАО в клетках карциномы появляются упорядоченные пучки β-актина, образующие характерные для нормального эпителия структуры.

Учитывая роль актинового цитоскелета в поддержании и регуляции адгезионных контактов, следующим этапом нашего исследования было наблюдение за реорганизацией комплекса адгезионных межклеточных контактов в нормальных и опухолевых клетках под действием мАО.

2. Выявление белков межклеточных контактов в нормальных и опухолевых кератиноцитах. Разрушение адгезионных межклеточных контактов является ключевым шагом опухолевой прогрессии, приводящим к инвазии и метастазированию. Основными маркерами адгезионных межклеточных контактов являются белки Е-кадгерин, α - и β -катенины. Во многих опухолевых клетках отмечается значительное снижение или потеря экспрессии Е-кадгерина (Wheelock et al., 2001).

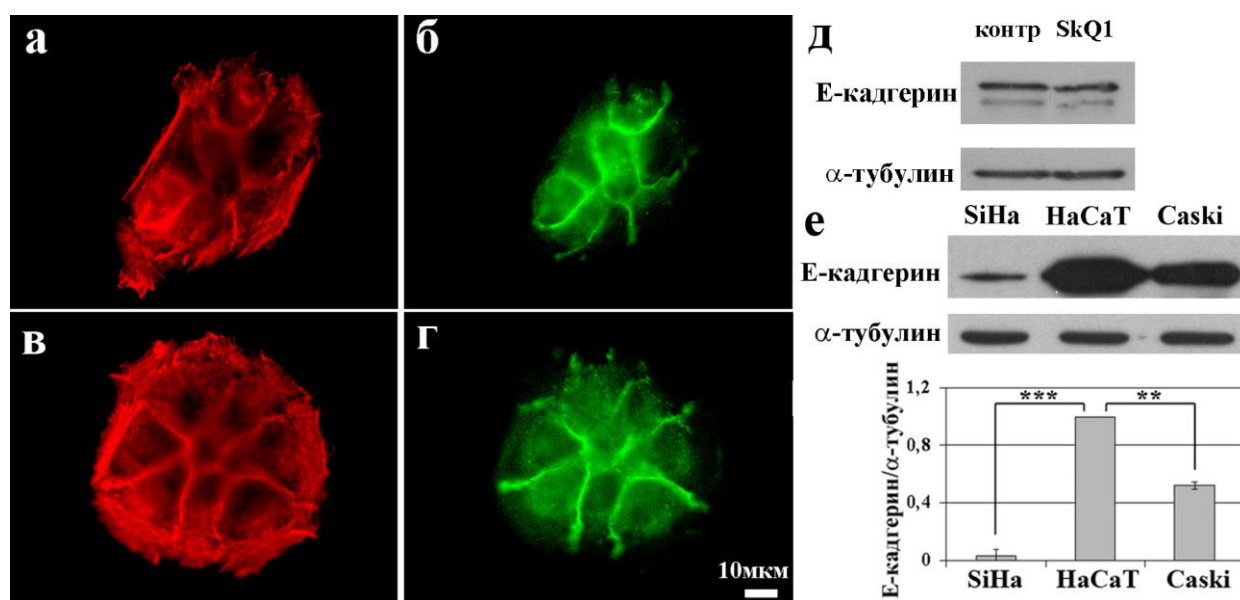


Рис.3. Е-кадгерин и β -актин в клетках культуры HaCaT.

β -Актин- красный; Е-кадгерин-зеленый); а, б) контроль, в, г) SkQ1 (40нМ, 7 сут.); иммунофлуоресцентная микроскопия; д) уровень Е-кадгерина в клетках HaCaT: контроль (7 сут.), SkQ1 (40нМ, 7 сут.); иммуноблоттинг белков, статистически достоверных различий не выявлено; е) достоверное снижение уровня экспрессии Е-кадгерина в клетках опухолевых линий по сравнению с неопухолевыми кератиноцитами HaCaT, $p < 0,001$ (***) и $p < 0,01$ (**); иммуноблоттинг белков.

Е-кадгерин экспрессируется в большинстве нормальных эпителиальных тканей. В клетках культуры HaCaT Е-кадгерин присутствует в больших количествах и концентрируется в зоне межклеточных контактов (рис.3б), где он колокализован

с β -актином (рис.3а). Изменений в распределении и количестве Е-кадгерина в клетках HaCaT после инкубации с MAO не наблюдалось (рис.3г, д). С помощью иммуноблоттинга белков нам удалось выявить достоверную разницу уровней экспрессии Е-кадгерина в клетках опухолевых линий по сравнению с неопухолевыми кератиноцитами (рис.3е).

В клетках культур SiHa и Caski выявляется диффузное распределение Е-кадгерина в цитоплазме, межклеточные контакты выявляются слабо, Е-кадгерин концентрируется в ламеллах (рис.4б, на примере SiHa). После инкубации с MAO Е-кадгерин локализуется в зоне межклеточных контактов (рис.4г).

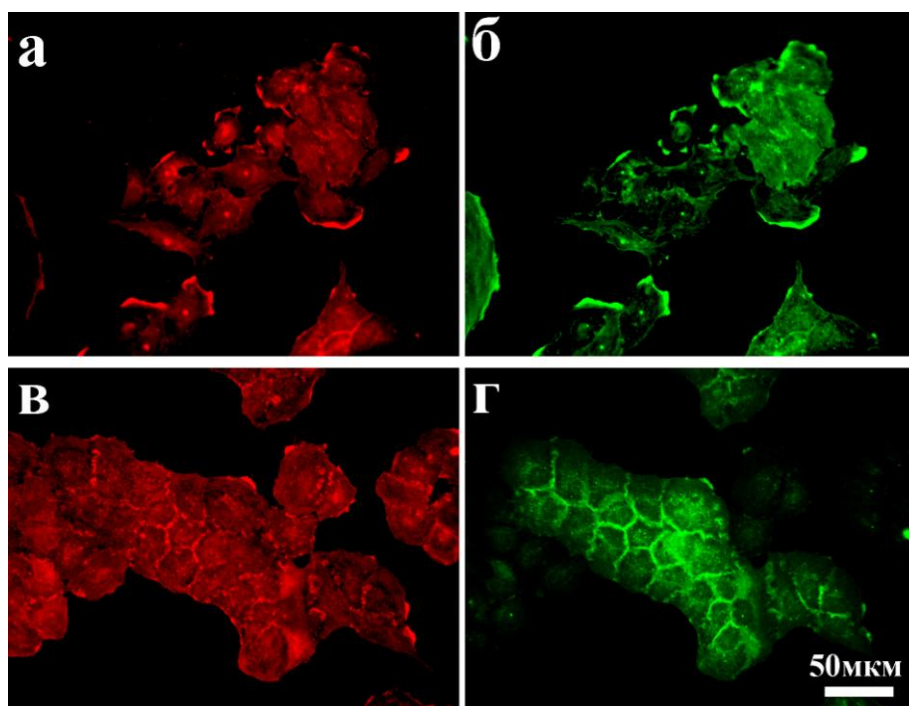


Рис.4. Е-кадгерин и β -актин в клетках культуры SiHa. β -Актин – красный. Е-кадгерин – зеленый, а, б) контроль; в, г) SkQ1 (40 нМ, 7сут.). Иммунофлуоресцентная микроскопия.

Методом иммуноблоттинга белков было показано повышение экспрессии Е-кадгерина в клетках SiHa после инкубации с MAO (рис.5а), а также с NAC (данные не показаны). Эффект имел дозозависимый характер (рис.5б).

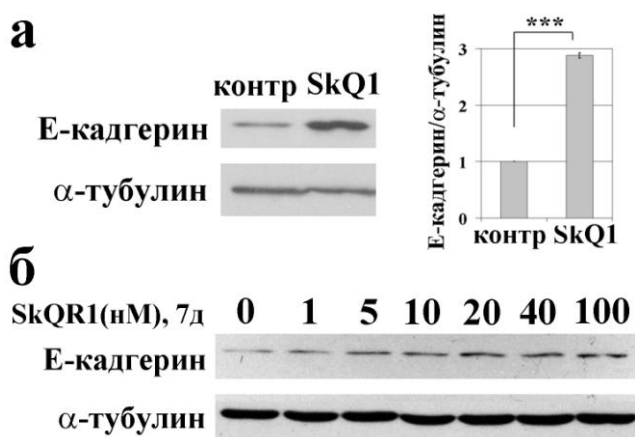


Рис.5. Повышение количества Е-кадгерина в клетках SiHa после инкубации с SkQ1:

а) 7 сут. воздействия SkQ1 (20нМ), $p < 0,001$ (***);

б) зависимость повышения количества Е-кадгерина от концентрации SkQR1 (0 - 100нМ, 7 сут.).

Иммуноблоттинг белков.

В состав адгезионных контактов также входят β - и α -катенины. Регуляция уровня цитозольного β -катенина важна, поскольку β -катенин может взаимодействовать с транскрипционными факторами и управлять транскрипцией генов, вовлеченных в пролиферацию. Для β -катенина в клетках SiHa характерна диффузная окраска. После инкубации с мАО интенсивная флуоресценция концентрируется в области межклеточных контактов (рис.6).

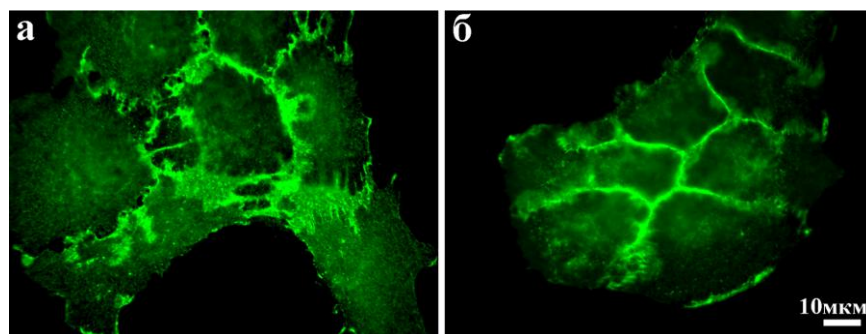


Рис.6. Распределение β -катенина в клетках культуры SiHa. а) контроль; б) SkQ1 (40 нМ, 7 сут.). Иммунофлуоресцентная микроскопия.

α -Катенин является связующим звеном между E-кадгерином и актиновым цитоскелетом. Потеря или снижение уровня экспрессии α -катенина, как и E-кадгерина, ведет к разрушению межклеточных контактов. Инкубация с мАО повышает количество α -катенина в клетках культур карциномы шейки матки.

3. Воздействие мАО на рост нормальных и опухолевых кератиноцитов в культуре. Для анализа воздействия мАО на пролиферацию опухолевых и нормальных кератиноцитов было подсчитано количество клеток на единицу площади (диаграммы зависимости количества клеток от времени инкубации с SkQ1-рис.7). Аналогичные данные были получены для других мАО.

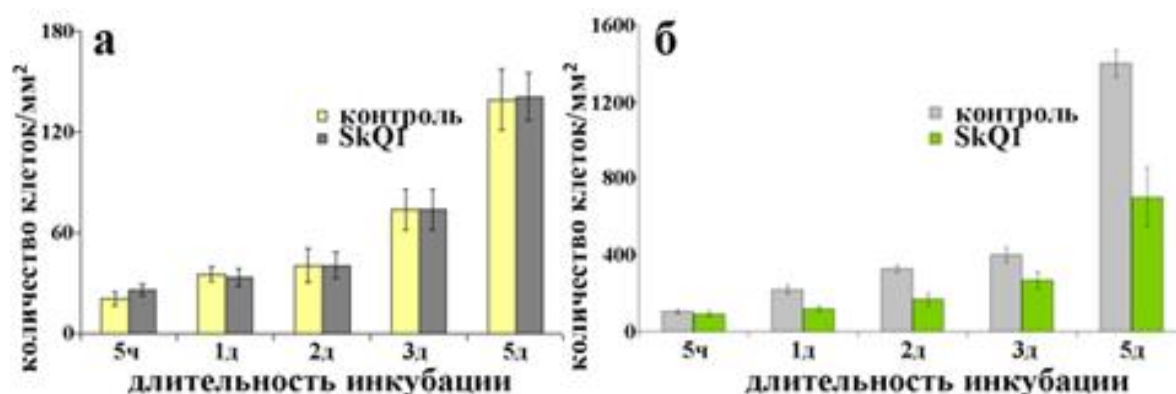


Рис.7. Воздействие мАО на рост клеток культуры HaCaT и SiHa. мАО не влияли на пролиферацию неопухолевых HaCaT (а), но подавляли пролиферацию опухолевых клеток SiHa (б). а) HaCaT, SkQ1 (40 нМ); б) SiHa, SkQ1 (40 нМ).

Инкубация клеток SiHa с мАО ведет к замедлению скорости роста культуры (Рис.7 б). Эффект выражен на всех рассмотренных сроках инкубации с веществом, наибольшая разница наблюдается на пятые сутки инкубации (максимальный рассмотренный срок). На скорость пролиферации клеток культуры HaCaT мАО не влияли (Рис.7 а).

Таким образом, при изучении клеток карциномы шейки матки в культуре, мы обнаружили изменение фенотипа опухолевых клеток с усилением признаков эпителиальной дифференцировки под воздействием мАО: реорганизации актинового цитоскелета и адгезионных контактов опухолевых кератиноцитов, замедлении их пролиферации, увеличении количества эпителиальных маркеров - опухолевых супрессоров E-кадгерина и α -катенина (Таблица 1).

Таблица 1. Влияние мАО на кератиноциты разной степени опухолевой трансформации

Линии клеток	SkQ вызывает		
	угнетение пролиферации	реорганизацию актинового цитоскелета	улучшение АК*
HaCaT	-	+	+
SiHa	+	+	+
Caski	+	+	+
C33A	-	+	+

*(адгезионные межклеточные контакты)

4. Изучение воздействия эпидермального фактора роста на актиновый цитоскелет и кадгерины в культурах опухолевых клеток. Инвазивные свойства опухолевых клеток связаны с понижением экспрессии молекул адгезионных контактов и повышением экспрессии мезенхимальных маркеров – процессом, названным эпителиально-мезенхимальным переходом (ЭМП). В культурах SiHa и Caski признаки ЭМП хорошо выражены, поэтому мы выбрали их для дальнейших экспериментов. Для выяснения возможных механизмов фенотипической нормализации опухолевых клеток под действием SkQ1 и его аналогов мы моделировали дальнейшую активацию ЭМП в опухолевых клетках с помощью эпидермального фактора роста (ЭФР) и оценивали влияние мАО на активацию ЭМП.

Контрольные клетки Caski - дисковидные или фибробластоподобные с выраженными псевдоподиями и диффузным β -актином в цитоплазме и короткими тонкими пучками β -актина в ламеллах (рис.8 а). Инкубация с SkQ индуцирует образование островков клеток с Е-кадгерин-позитивными адгезионными межклеточными контактами, β -актин концентрируется в зоне межклеточных контактов (рис.8 б). Под воздействием ЭФР клетки Caski образуют многочисленные ламеллиподии на ведущем крае, плотных островков клеток не образуется, β -актин диффузный с концентрацией в ламеллах (рис.8 в). Совместная инкубация с SkQ и ЭФР ведет к образованию островков клеток с Е-кадгерин-позитивными межклеточными контактами и концентрацией β -актина в области межклеточных контактов (рис.8 г).

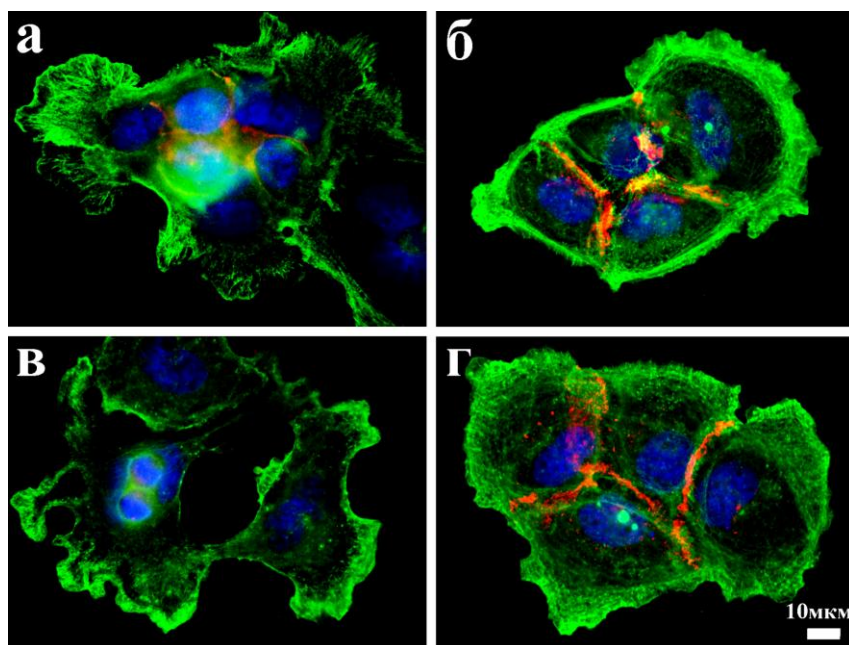


Рис.8. Изменения актинового цитоскелета и адгезионных контактов клеток Caski после инкубации с MAO и стимуляции ЭФР. β -Актин – зеленый, ДНК – синий, Е-кадгерин – красный. а) контроль; б) SkQ1 (40 нМ, 7 сут.); в) ЭФР (5 нМ, 3 сут.); г) SkQ1 (40 нМ, 7 сут.) с ЭФР (5 нМ, 3 сут.). Иммунофлуоресцентная микроскопия.

Важным процессом при ЭМП является переключение типов синтезируемых кадгеринов с эпителиального Е- на N-кадгерин, характерный для мезенхимальных клеток. В клетках Caski признаки ЭМП, такие как экспрессия мезенхимальных маркеров виментина и N-кадгерина, выражены наиболее ярко из всех исследованных культур. С помощью иммунофлуоресцентного окрашивания показано, что в контрольных клетках линии Caski присутствуют в равной степени как Е-, так и N-кадгерин. С помощью иммунофлуоресценции и иммуноблоттинга белков мы обнаружили, что ЭФР и SkQ влияют на

количественные соотношения двух типов кадгеринов в клетках Caski. После инкубации с МАО повышается уровень экспрессии Е-кадгерина и понижается уровень экспрессии N-кадгерина. ЭФР значительно повышает экспрессию N-кадгерина в клетках Caski. При совместном воздействии SkQ и ЭФР в межклеточных контактах преимущественно выявляется Е-кадгерин.

Виментин является маркером мезодермальных тканей. Появление этого маркера в клетках эпителиального происхождения свидетельствует о том, что клетки претерпели ЭМП. Для клеток Caski характерно наличие виментиновых филаментов (рис.9, а). По данным иммунофлуоресцентной микроскопии, инкубация с SkQ ведет к снижению уровня виментина в клетках (рис. 9, б), тогда как ЭФР увеличивает количество виментина в клетках по сравнению с контролем (рис.9, в). При совместном действии SkQ1 и ЭФР окрашивание антителами к виментину в клетках Caski снижается по сравнению с контролем (рис.9, г).

Инкубация с ЭФР вызывала усиление процесса ЭМП, сдвигая фенотип исследуемых клеток к мезенхимальному типу. МАО частично подавляли изменения, вызванные ЭФР. Это выражалось в увеличении экспрессии эпителиального маркера Е-кадгерина, и уменьшении экспрессии мезенхимальных маркеров, таких как Snail (см. далее), N-кадгерин, виментин.

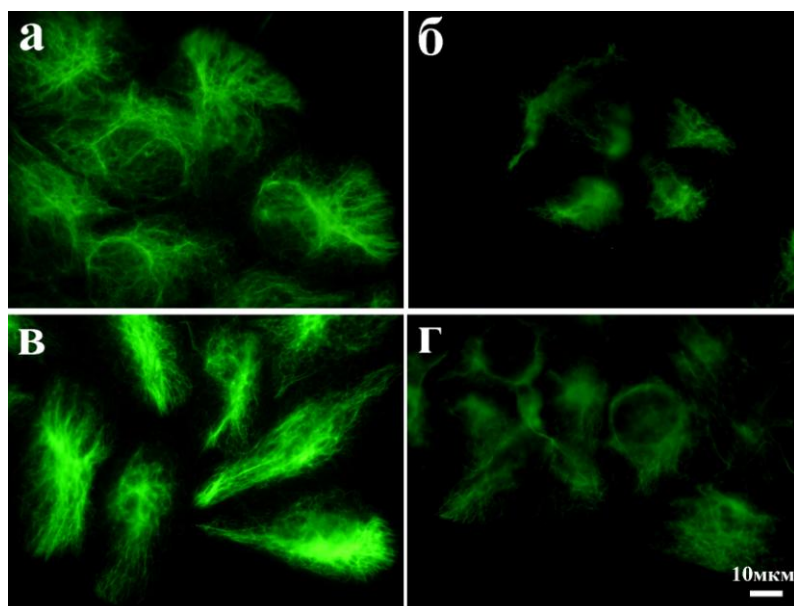


Рис.9. Распределение виментина в клетках культуры Caski после стимуляции ЭФР и инкубации с МАО. Виментин – зеленый.
а) контроль;
б) SkQ1 (40 нМ, 7 сут.);
в) ЭФР (5 нМ, 3 сут.);
г) SkQ1 (40 нМ, 7 сут.) совместно с ЭФР (5 нМ, 3 сут.).
Иммунофлуоресцентная микроскопия.

5. Влияние ЭФР и МАО на транскрипционный фактор Snail и каскады MAP-киназ в клетках карциномы шейки матки. При различных видах опухолей затронуты разные механизмы подавления экспрессии Е-кадгерина (Peinado et al, 2007). Часто экспрессия Е-кадгерина подавляется транскрипционными факторами Snail, Slug, Twist, и др. (Bolos et al, 2003). Базовый уровень экспрессии белка Snail в опухолевых клетках SiHa и Caski значительно выше, чем у клеток HaCaT (рис.10). Мы предположили, что МАО снижают общее содержание транскрипционного фактора Snail в клетках рака шейки матки, что может вызывать повышение экспрессии Е-кадгерина.

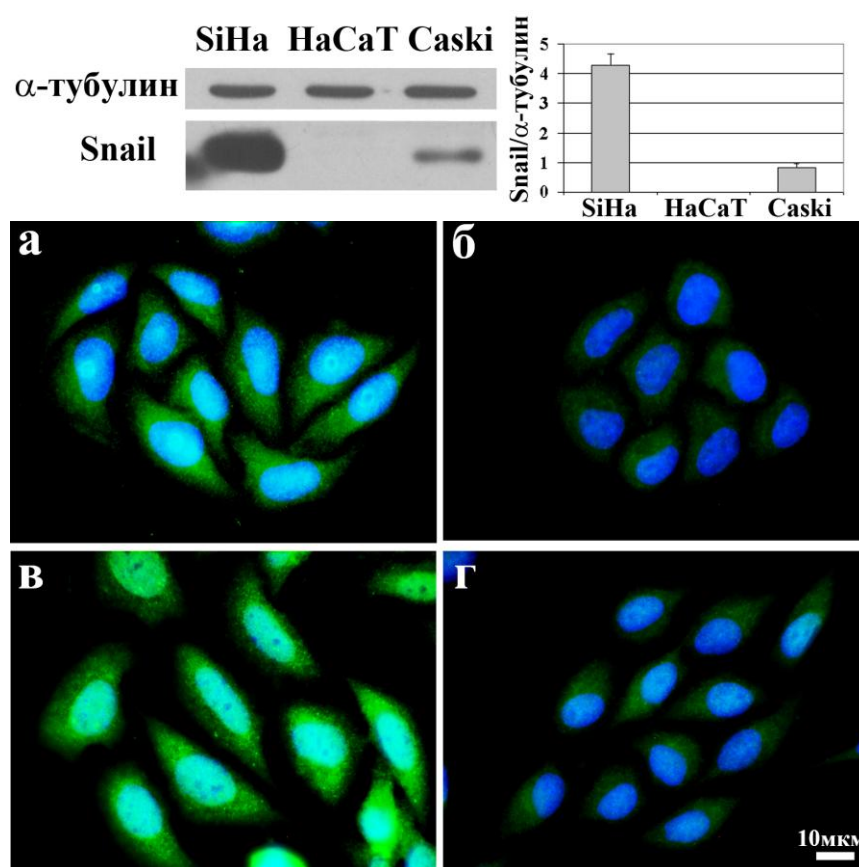
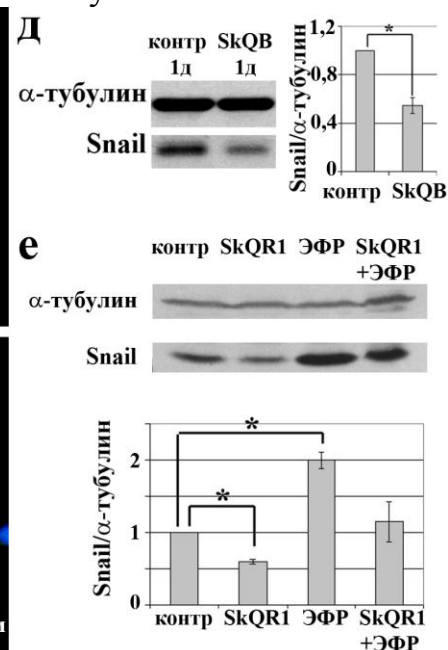


Рис.11. МАО и ЭФР меняют содержание Snail в SiHa. Snail – зеленый, ДНК – синий; а) контроль; б) SkQVerb (20 нМ, 7 сут.); в) ЭФР (5 нМ, 3 сут.); г) SkQVerb (20 нМ, 7 сут.) + ЭФР (5 нМ, 3 сут.); иммунофлуоресцентная микроскопия. д) экспрессия Snail (SkQVerb, 20 нМ, 1 сут.); е) экспрессия Snail после инкубации с ЭФР (5 нМ, 3 сут.) и SkQR1 (20 нМ, 7 сут.); иммуноблоттинг белков.

Выявление Snail в клетках SiHa методом иммуноблоттинга белков показало, что количество этого белка после инкубации с МАО снижается уже через 1 сутки

Рис.10. Экспрессия Snail в опухолевых SiHa и Caski выше, чем в неопухолевых клетках HaCaT.

Иммуноблоттинг белков.



(рис.11д). При стимуляции ЭФР уровень Snail в ядре увеличивался (рис.11в), этот эффект снимала прединкубация клеток с мАО (рис.11г).

Каскады MAP-киназ играют важную роль в опухолевой трансформации и регуляции уровня Snail в различных типах опухолевых клеток (Bonavida & Baritaki, 2011; Montserrat et al, 2012; Nagarajan et al, 2012; Vergara et al, 2011). Сигнальный путь Ras/Raf/MEK/ERK регулирует экспрессию белков, контролирующих процессы пролиферации клеток, дифференцировки и апоптоза. Повышенное содержание фосфо-киназы ERK1/2 (ф-ERK1/2) характерно для различных опухолевых заболеваний (Sivaraman et al, 1997; Gioeli et al, 1999; Tan et al, 2004; Lee et al, 2004; Milella et al, 2005). Существует двусторонняя связь между транскрипционным фактором Snail и MAP-киназными каскадами. Snail активирует сигнальные каскады Raf-1/MEK/ERK и NF-κB (Bonavida and Baritaki, 2011). С другой стороны, активация белка Snail заметно снижается специфическими ингибиторами ERK, p38 или JNK, что указывает на роль каждой из этих MAP-киназ в регуляции Snail (Li et al, 2010). Мы обнаружили, что инкубация с мАО снижает уровень фосфорилированной киназы ф-ERK1/2 в клетках рака шейки матки (рис.12, на примере Caski). Уровень ф-ERK1/2 в SiHa значительно повышался при инкубации клеток с ЭФР, мАО подавляли этот эффект. В клетках Caski ЭФР-индуцированное повышение содержания ф-ERK1/2 не снималось прединкубацией с мАО, но подавлялось ингибитором MEK1/2 – U0126 (рис.12). Уровень неактивной киназы ERK1/2 и фосфорилированной MAP-киназы ф-p38 под действием мАО и ЭФР в клетках Caski не менялся.

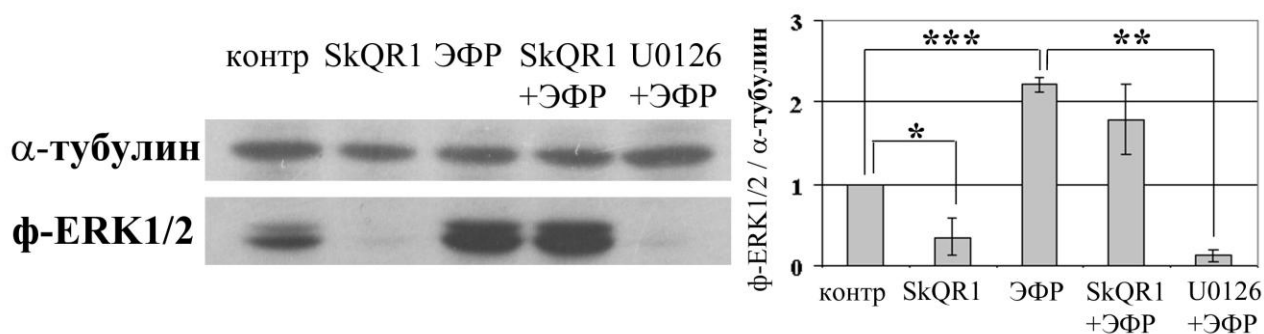


Рис.12. Влияние мАО и ЭФР на активацию MAP-киназ в клетках Caski. Изменения содержания фосфорилированной MAP-киназы ф-ERK1/2 в стимулированных ЭФР (5 нМ, 1 сут.) клетках Caski после инкубации с SkQR1

(20 нМ, 5 сут.) и с ингибитором MEK, U0126 (10 мкМ, 2 сут.). Иммуноблоттинг белков.

6. MAO снижают уровень рецептора к ЭФР в опухолевых клетках. Известно, что при фосфорилировании рецептора к эпидермальному фактору роста (РЭФР) происходит активация каскада ERK. Мы обнаружили, что MAO не влияют на уровень фосфорилирования РЭФР в первые минуты стимуляции с помощью ЭФР в клетках рака шейки матки. По предварительным данным, недельная инкубация с MAO приводит к снижению уровня РЭФР (рис.13), но не его фосфорилирования. Такой же эффект может быть достигнут с помощью ингибитора MEK1/2 – U0126.

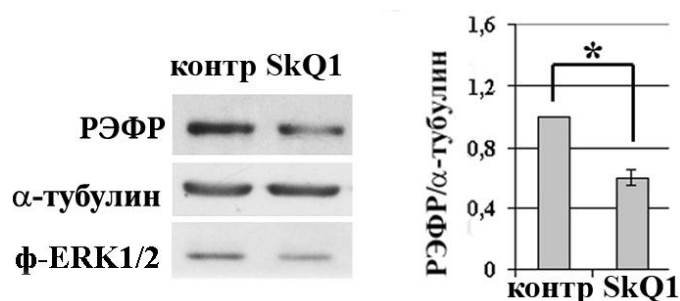


Рис.13. Содержание РЭФР снижается после инкубации клеток SiHa с SkQ1 (20 нМ, 7 сут.). Иммуноблоттинг белков.

7. Изучение митохондриальной направленности и антиоксидантных свойств молекул семейства SkQ. Для выявления клеточной мишени АО группы SkQ, клетки культуры SiHa прижизненно фотографировали с помощью флуоресцентного микроскопа после инкубации с MAO, обладающими флуоресцентными свойствами (SkQR1, SkQBerb и SkQPalm). Выявленное специфическое окрашивание указывает на локализацию вышеуказанных АО в митохондриях.

АО группы SkQ имеют в своем составе положительно заряженные ионы фосфония или родамина, соединенные с пластохиноном. Эти катионы отвечают за накопление MAO внутри митохондрий, эффективно понижая уровень митохондриальных АФК (Antonenko et al., 2008). Для проверки того, действительно ли митохондриальная направленность является необходимым условием вышеописанного действия SkQ на морфологию опухолевых клеток в культуре, мы провели опыты с разобщителем окислительного

фосфорилирования FCCP. После инкубации клеток культуры SiHa с FCCP совместно с мАО, наблюдалось нивелирование эффектов, индуцируемых мАО в трансформированных клетках. FCCP, деполяризуя митохондриальную мембрану, препятствует направленному действию антиоксидантов группы SkQ.

Чтобы проверить, вызывают ли мАО в используемых нами концентрациях снижение уровня АФК в клетках рака шейки матки, мы применяли метод проточной цитофлуориметрии с использованием специфического флуоресцентного красителя DCF (рис.14). Для выявления влияния мАО на митохондриальную продукцию АФК мы использовали линию клеток SiHa, экспрессирующую направленный в митохондрии желтый флуоресцентный белок Нурег, биосенсор АФК (рис.14). Достаточно высокий базовый уровень АФК в клетках SiHa позволил выявить флуоресцентное окрашивание митохондрий с помощью флуоресцентной микроскопии. SkQ понижал базовый уровень митохондриальных АФК. Инкубация клеток с ЭФР, напротив, стимулировала продукцию митохондриальных АФК.

Мы показали, что антиоксиданты группы SkQ имеют митохондриальную локализацию в клетках карциномы шейки матки и способны снижать как общий уровень АФК в опухолевых клетках, так и уровень митохондриальных АФК. Контрольные молекулы, содержащие проникающие катионы без пластохинона, не вызывали отмеченных для мАО изменений в исследованных клетках.

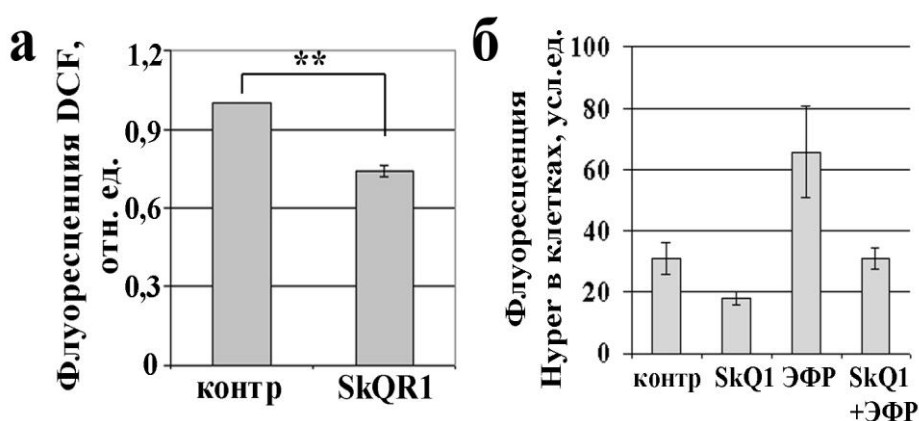


Рис.14. мАО снижают уровень АФК в клетках SiHa. а) снижение уровня цитоплазматических АФК после инкубации с SkQR1 (20 нМ, 7 сут.), $p < 0,01$ (**); статистический

анализ данных проточной цитофлуориметрии; б) измерение интенсивности флуоресценции биосенсора Нурег; статистический анализ данных иммунофлуоресцентной микроскопии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Наличие сильно выраженного антиапоптозного эффекта SkQ, описанного в статье Антоненко и др. (2008), поставило вопрос о том, не обладают ли вещества семейства SkQ свойствами канцерогенов, поскольку апоптоз служит одним из главных механизмов антираковой защиты организма. Наши данные свидетельствуют против такой возможности. SkQ обнаруживает выраженный противопухолевый эффект. Можно предполагать, что несколько аспектов физиологии опухолей существенно зависят от продукции митохондриальных АФК. Во-первых, нейтрализация митохондриальных АФК с помощью SkQ ингибирует пролиферацию опухолевых клеток. Возможно, этот эффект определяется подавлением каких-либо АФК-зависимых митоген-активируемых сигнальных путей, таких например, как активация MAP-киназ (Wu, 2006; Nagai et al., 2007; Агапова и др., 2008). Во-вторых, SkQ вызывает процессы дифференцировки в различных опухолевых клетках. Нами были обнаружены координированные изменения морфологии, цитоскелета, организации межклеточных контактов в клетках эпителиальных опухолей. Возможно, гиперпродукция митохондриальных АФК стимулирует Ras-зависимый и другие сигнальные пути, ведущие к дедифференцировке и трансформированному фенотипу. Напротив, усиление дифференцировки опухолевых клеток может приводить к уменьшению инвазивности и общей агрессивности опухоли. Мы полагаем, что механизм действия SkQ может быть связан с активацией внутриклеточных фосфатаз (рис.15).

Получены предварительные данные о том, что SkQ вызывает увеличение содержания фосфатазы DUSP6, препятствуя активации ERK1/2. Влияние DUSP6 на процесс ЭМП и опухолевую прогрессию изучено мало. Значительное снижение экспрессии DUSP6 наблюдалось в клеточных линиях и образцах тканей эзофагального плоскоклеточного рака и рака носоглотки (Wong et al., 2012). Возобновление экспрессии DUSP6 в клетках рака яичника значительно подавляло активность ERK1/2, пролиферацию клеток, способность к

неприкрепленному росту и развитие опухолей у бестимусных мышей (Chan et al., 2008).

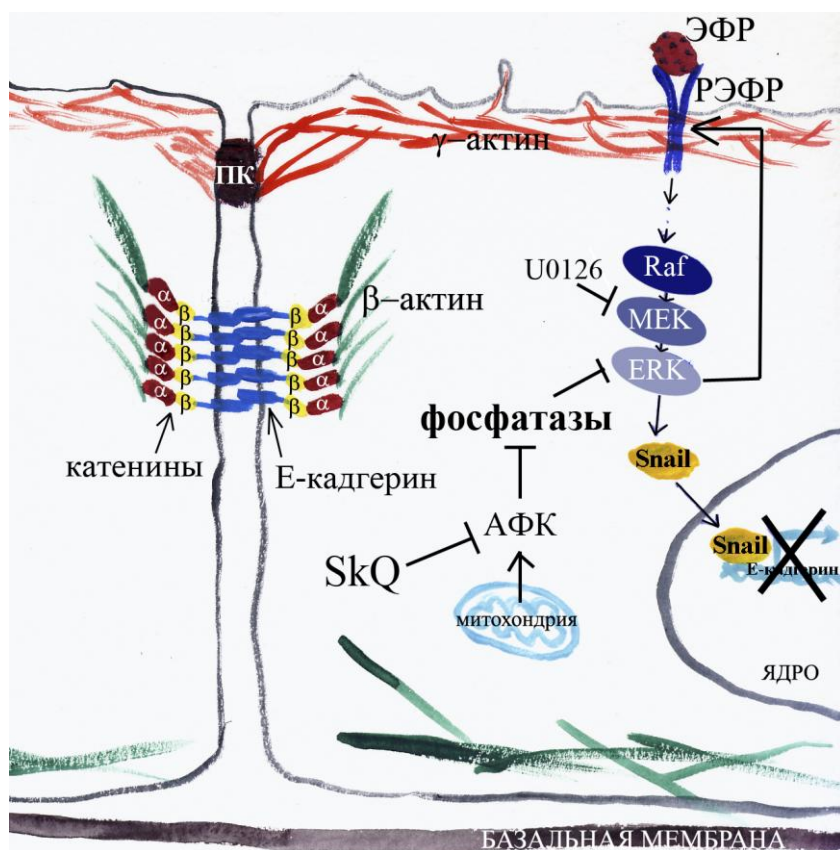


Рис.15. Гипотетическая схема действия SkQ на клетки рака шейки матки.

Мы предполагаем существование механизма, благодаря которому накопление АФК при опухолевой прогрессии вызывает деградацию DUSP6, что ведет к постоянной активации ERK1/2, обеспечивающей онкогенность и устойчивость к

химиотерапии раковых клеток. Для проверки нашей гипотезы проводятся дальнейшие эксперименты.

ВЫВОДЫ

Митохондриально-направленные катионы группы SkQ достоверно снижают уровень АФК в митохондриях и в цитоплазме. Снижение уровня митохондриальных АФК приводит к фенотипической нормализации опухолевых клеток, а именно:

- 1) восстановлению эпителиальной организации клеток рака шейки матки и торможению их пролиферации;
- 2) реорганизации пучков β -актиновых микрофиламентов и адгезионных межклеточных контактов в клетках рака шейки матки человека;
- 3) увеличению общего содержания опухолевых супрессоров E-кадгерина и α -катенина в клетках карциномы;

- 4) уменьшению ядерной локализации и общего количества белка Snail в опухолевых клетках;
- 5) уменьшению количества рецептора к ЭФР и торможению фосфорилирования MAP киназы ERK1/2 в клетках рака шейки матки;
- 6) предотвращению процесса ЭМП в культурах клеток SiHa и Caski.

Таким образом, мАО способны индуцировать процессы эпителиальной дифференцировки неопластически трансформированных клеток и предотвращать процесс ЭМП в культурах клеток рака шейки матки.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в научных журналах, соответствующих перечню ВАК РФ:

1. Агапова ЛС, Черняк БВ, Домнина ЛВ, Дугина ВБ, Ефименко АЮ, Фетисова ЕК, Иванова ОЮ, Калинина НИ, Хромова НВ, Копнин БП, Копнин ПБ, Коротецкая МВ, Личиницер МР, Лукашев АЛ, Плетюшкина ОЮ, Попова ЕН, Скулачев МВ, **Шагиева ГС**, Степанова ЕВ, Титова ЕВ, Ткачук ВА, Васильев ЮМ, Скулачев ВП, SKQ1 подавляет развитие опухолей из p53-дефицитных клеток // Биохимия, 2008, Т.73, с.1622–1640.
1a. Agapova LS, Chernyak BV, Domnina LV, Dugina VB, Efimenko AY, Fetisova EK, Ivanova OY, Kalinina NI, Khromova NV, Kopnin BP, Kopnin PB, Korotetskaya MV, Lichinitser MR, Lukashev AL, Pletjushkina OY, Popova EN, Skulachev MV, **Shagieva GS**, Stepanova EV, Titova EV, Tkachuk VA, Vasiliev JM, Skulachev VP, Inhibitory effect of SkQ1 on tumor development from p53-deficient cells // Biochemistry (Mosc)., 2008, V. 73, p.1300-1316.
2. Черняк БВ, Антоненко ЮН, Галимов ЕР, Домнина ЛВ, Дугина ВБ, Звягильская РА, Иванова ОЮ, Изюмов ДС, Лямзаев КГ, Пустовидко АВ, Рокицкая ТИ, Рогов АГ, Северина ИИ, Симонян РА, Скулачев МВ, Ташлицкий ВН, Титова ЕВ, Тренделева ТА, **Шагиева ГС**, Новые митохондриально-направленные соединения, построенные из природных веществ: конъюгаты растительных алкалоидов берберина и пальматина с пластохиноном // Биохимия, 2012, Т.77(9), с.1186-1200.
2a. Chernyak BV, Antonenko YN, Galimov ER, Domnina LV, Dugina VB, Zvyagilskaya RA, Ivanova OY, Izyumov DS, Lyamzaev KG, Pustovidko AV, Rokitskaya TI, Rogov AG, Severina II, Simonyan RA, Skulachev MV, Tashlitsky VN, Titova EV, Trendeleva TA, **Shagieva GS**, Novel mitochondria-targeted compounds composed of natural constituents: conjugates of plant alkaloids berberine and palmatine with plastoquinone // Biochemistry (Mosc)., 2012, V. 77, p. 983-995.
3. **Шагиева ГС**, Домнина ЛВ, Чипышева ТА, Ермилова ВД, Шапонье К, Дугина ВБ, Реорганизация изоформ актина и адгезионных контактов при

эпителиально-мезенхимальном переходе в клетках цервикальных карцином // Биохимия, 2012, Т.77(11), с.1513-1525.

За. **Shagieva GS**, Domnina LV, Chipysheva TA, Ermilova VD, Chaponnier C, Dugina VB. Actin isoforms and reorganization of adhesion junctions in epithelial-to-mesenchymal transition of cervical carcinoma cells, Biochemistry (Mosc)., 2012, V.77(11), p.1266-1276.

Тезисы и материалы научных конференций:

4. **Шагиева ГС**, Изучение действия митохондриальных антиоксидантов на клетки карциномы шейки матки линии SiHa. Тезисы докладов XV международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов – 2008». Секция «Биология» // Москва, 2008, «Макс Пресс», с.29.
5. Domnina L, Ivanova O, Dugina V, Pletjushkina O, Popova E, **Shagieva G**, EV Titova, BV Chernyak, Vasiliev Y, Skulachev V, Antioxidant SkQ1 leads to morphology differentiation of various transformed cells and protects mitochondria from H₂O₂ induced fragmentation // *ECDO*, 2008, p. 45.
6. **Шагиева ГС**, Домнина ЛВ, Дугина ВБ, Механизмы эпителиально-мезенхимального перехода в культуре клеток рака шейки матки // Цитология, 2012, Т. 54(1), с. 89-101.
7. **Шагиева ГС**, Попова ЕН, Домнина ЛВ, Плетюшкина ОЮ, Дугина ВБ, Изучение действия митохондриально-направленных антиоксидантов на культуры клеток рака шейки матки линий SiHa, C33A и линии кератиноцитов человека HaCaT // Вопросы онкологии, 2010, Т. 56 (2), с. 54-55.
8. **Шагиева ГС**, Попова ЕН, Домнина ЛВ, Плетюшкина ОЮ, Дугина ВБ, Изучение действия митохондриально-направленных антиоксидантов на культуры клеток рака шейки матки линии SiHa, C33A и линии кератиноцитов человека HaCaT // Цитология, 2010, Т.52(3), с. 268.
9. **GS Shagieva**, EN Popova, LV Domnina, OJu Pletjushkina, VB Dugina, The effects of mitochondria-targeted antioxidants on human cervical cancer cells // *Biological Motility*, 2010, p.236-237.
10. **GS Shagieva**, EN Popova, LV Domnina, OJu Pletjushkina, VB Dugina, Skulachev VP, The effect of mitochondria-targeted antioxidants on human cervical cancer cells in culture // International Workshop "From Homo sapiens to Homo sapiens liberatus", 2010, p. 26-27.
11. **Shagieva G**, Domnina L, Chaponnier C, Dugina V, Actin isoforms and adhesion junctions reorganization in epithelial-mesenchymal transition of cervical carcinoma cells // *FEBS Journal*, 2012, V.279, p. 317.