

ВЛИЯНИЕ ТОЧЕЧНЫХ МУТАЦИЙ В ЛОКУСЕ INK4A/ARF НА ARF-ОПОСРЕДОВАННУЮ АУТОФАГИЮ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

EFFECT OF POINT MUTATIONS IN THE INK4A/ARF LOCUS ON ARF-MEDIATED AUTOPHAGY IN TUMOR CELLS

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

Summary. The article presents data on the effect of tumor-derived point mutations in the INK4a/ARF locus on ARF-mediated autophagy in human tumor cells. In experiments on cells of an osteosarcoma it is shown that a point mutations of the gene ARF, located in a plot of activation of autophagy, impair the ability of tumor suppressor ARF to induce autophagy in tumor cells.

Keywords: autophagy, tumor suppressor, ARF, point mutations.

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

Анащенкова Татьяна Александровна

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

Аннотация. В статье представлены данные о влиянии опухоль-ассоциированных точечных мутаций в локусе INK4a/ARF на ARF-опосредованную аутофагию в опухолевых клетках человека. В экспериментах на клетках остеосаркомы показано, что точечные мутации гена ARF, расположенные в участке активации аутофагии, блокируют способность опухолевого супрессора ARF индуцировать аутофагию в опухолевых клетках.

Ключевые слова: аутофагия, опухолевой супрессор, ARF, точечные мутации.

Актуальность проблемы

Локус INK4a/ARF находится на коротком плече девятой хромосомы человека (9p21). Уникальность организации и биологическая значимость этого локуса состоит в том, что он кодирует сразу два разных транскрипта, генерирующих опухолевые супрессоры p16INK4a и p14ARF [15]. Эти два транскрипта кодируются разными первыми экзонами, находящимися под контролем собственных промоторов (экзон 1α для гена INK4a и экзон 1β для гена ARF) и одинаковым экзоном 2 с разными рамками считывания информации [3]. В этой связи эти белки не имеют аминокислотного тождества и выполняют различные функции [20,23]. Опухолевый супрессор p16INK4a является важным регулятором клеточного цикла, что связано с ингибированием активности циклин-зависимой киназы CDKN4 [21]. Наиболее изученной биологической функцией ARF является стабилизация опухолевого супрессора p53. В клетках человека p14ARF освобождает p53 от связи с убиквитин — лигазой HDM2, активируя, таким образом, p53-опосредованный апоптоз или блокаду клеточного цикла [2, 9]. В то же время ARF может действовать как опухолевый супрессор независимо от присутствия p53 в клетке [4,22]. Повышение его экспрессии в опухолевых клетках приводит к остановке клеточного цикла и апоптозу даже при отсутствии в них опухолевого супрессора p53 [7].

Локус INK4a/ARF играет важную роль в подавлении канцерогенеза [6]. Он является вторым по частоте встречаемости мутантным локусом в опухолях человека после гена TP53, кодирующего опухолевый супрессор p53, и инактивируется приблизительно в 50% всех опухолей человека [9, 18]. При различных видах рака человека были найдены мутации в экзоне 1α, нарушающие функции только супрессора p16INK4a [23]. Мутации в экзоне 1β, повреждающие функцию только ARF, были обнаружены во многих случаях меланомы, астроцитомы, аденокарциномы и других типах опухолей человека [12, 17]. Однако подавляющее большинство точечных мутаций в локусе INK4a/ARF происходит в экзоне 2, в котором гены p16INK4a и ARF кодируются общей последовательностью [5, 7]. Значительная часть опухоль-индуцированных точечных мутаций в экзоне 2 влияет на аминокислотные последовательности только ARF, но не p16INK4a, что подтверждает роль ARF в опухолевом росте [6, 7].

Эффективная работа опухолевых супрессоров во многом зависит от их способности активировать аутофагию, которая в свою очередь, обладает различными механизмами противоопухолевой защиты [1, 10, 19]. Способность активировать аутофагию установлена и для опухолевого супрессора ARF [2, 13]. Поскольку аутофагия является сдерживающим фактором опухолевого роста, стимуляция аутофагии супрессором ARF может быть одним из механизмов, с помощью которого ARF

подавляет канцерогенез [4, 14]. Основываясь на этих данных, можно предположить, что точечные мутации локуса INK4a/ARF, встречающиеся в опухолях человека и влияющие на аминокислотную последовательность только ARF, могут негативно влиять на ARF-опосредованную аутофагию.

Цель исследования

Целью исследования явилось изучение влияния точечных мутаций в локусе INK4a/ARF, которые изменяют ARF и не затрагивают область белка p16INK4a, на ARF-опосредованную аутофагию.

Материалы и методы

ARF человека содержит на своем N-конце два метионина. Инициация трансляции может начинаться с любого из них, в результате чего могут синтезироваться полноразмерный белок 1–173 ARF и укороченная форма ARF [16]. Преимущественной формой ARF в клетках человека является укороченная форма белка p14ARF с размером 14кДа [11,16]. Для получения мутантных форм ARF человека использована кДНК полноразмерной формы ARF (1–173), полученная на основе мРНК, выделенной из клеток аденокарциномы поджелудочной железы человека. Мутантные варианты ARF были созданы путем введения в участок кДНК трех нуклеотидных замен, вызывающих изменение аминокислотной последовательности в белке ARF: R139L (аминокислота аргинин в 139 положении на лейцин), L145I (аминокислота лейцин в 145 положении на изолейцин) и R156G (аминокислота аргинин в 156 положении на глицин). Сайты мутирования R139L ARF, L145I ARF и R156G ARF, согласно нашим исследованиям, находятся в участке гена ARF, кодирующем мотив активации аутофагии. Подобные точечные мутации, влияющие только на функции ARF, были обнаружены в локусе INK4a/ARF у пациентов с меланомой [5]. В качестве контроля была создана точечная мутация в гене ARF, которая не затрагивает мотив активации аутофагии в гене: R135L (аминокислота пролин в 135 положении на лейцин). Введение сайт-специфических мутаций в ген ARF осуществляли с использованием коммерческого набора QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, США) в соответствии с протоколом производителя. Для каждого мутантного варианта ARF были сконструированы и синтезированы соответствующие праймеры. В качестве исходной матрицы была использована плаزمида pcDNA 4/TO с геном ARF дикого типа. Полученные векторы трансфецировали в клетки остеосаркомы U2OS-ARF для создания стабильных клеточных линий, содержащих тетрациклин-регулируемую экспрессию генов. Инкубация U2OS-ARF клеток в присутствии доксициклина приводит к повышению экспрессии гена белка ARF, что облегчает изучение этого опухолевого супрессора [13].

Экспрессию исследуемых белков в клеточных лизатах определяли методом Вестерн — блоттинга с использованием соответствующих антител к белкам. Уровень аутофагии оценивали по накоплению модифицированной формы белка LC3 (LC3-II). При запуске аутофагии катализируется образование белка LC3, что обуславливает его включение в растущую мембрану аутофагосомы. По количеству мембраносвязанного белка LC3-II можно судить о количестве аутофагосом, что делает LC3 хорошим маркером для изучения динамики процесса аутофагии [24]. Активацию аутофагии определяли также методом иммуноцитофлуоресцентного анализа. С этой целью клетки остеосаркомы U2OS-ARF трансфецировали плазмидой GFP-LC3, кодирующей зеленый флуоресцентный белок GFP (Green Fluorescent Protein), слитый с белком аутофагосом LC3. При активации аутофагии белок LC3 накапливается в аутофагосомах, что приводит к накоплению GFP в цитоплазматических вакуолях-аутофагосомах. Формирование аутофагосом анализировали с помощью конфокальной микроскопии, используя микроскоп Nikon E600. Скопление аутофагосом в клетках исследовали и методом трансмиссионной электронной микроскопии с расчетом среднего значения площади аутофагосом в клетке.

Статистическую достоверность различий оценивали путем расчета *t* критерия Стьюдента в программе SigmaProt V.10. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты исследования

В результате предварительных экспериментов нами были получены клеточные линии остеосаркомы с доксициклин-зависимой экспрессией p14ARF дикого типа и его мутантов. Чтобы убедиться в способности мутантных форм продуцировать ARF, необходимо было определить степень экспрессии мутантных генов в клетках U2OS-ARF в ответ на инкубацию с доксициклином. Вестерн — блоттинг анализ уровней ARF и p53 через 24 часа после инкубации с доксициклином показал, что все мутанты подобно гену дикого типа экспрессируют одинаковый уровень ARF и каждый имеет способность стабилизировать белок p53, что свидетельствует об их функциональности (рис. 1А).

Убедившись, что полученные линии клеток с точечными мутациями в гене ARF способны экспрессировать p14ARF, в дальнейшем эксперименте мы провели сравнение уровня аутофагии в клетках U2OS-ARF после суперэкспрессии ARF дикого типа с уровнем аутофагии, наблюдаемым после активации мутантных форм.

Количественный анализ LC3 в клетках с суперэкспрессией методом Вестерн — блоттинга выявил увеличе-

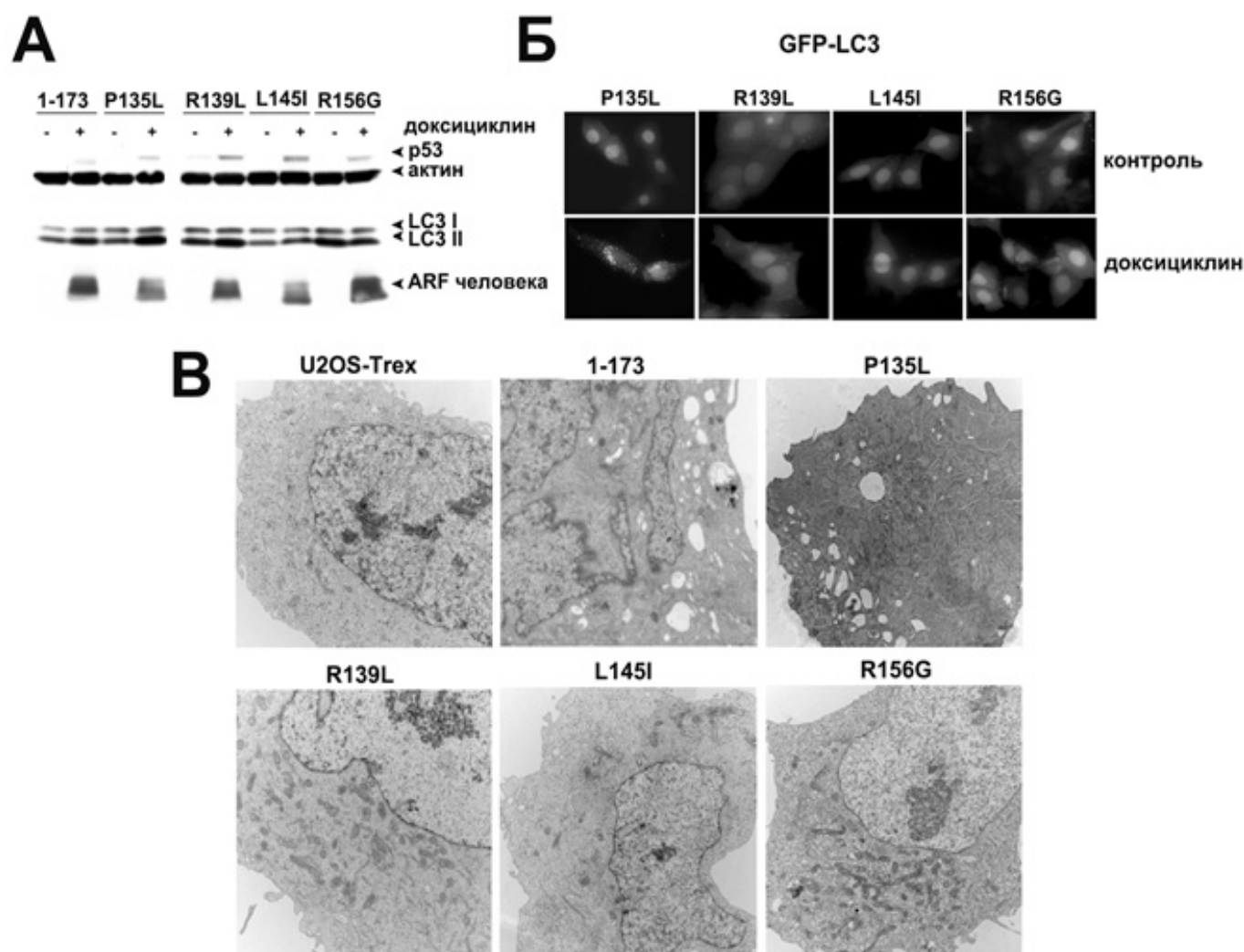


Рис. 1. Определение влияния опухоль-ассоциированных точечных мутаций гена ARF на ARF-опосредованную аутофагию. **А** — Вестерн-блоттинг анализ уровня белков ARF, LC3 и p53 в клетках U2OS-ARF до и после активации точечных мутантов ARF доксициклином. **Б** — конфокальная микроскопия клеток остеосаркомы предварительно трансфицированных вектором GFP-LC3 до и после повышения экспрессии ARF. **В** — электронная микроскопия клеток U2OS-ARF после повышения экспрессии белка ARF с указанными аминокислотными заменами по сравнению с контролем.

ние образования модифицированного белка LC3-II в случае экспрессии ARF дикого типа (1–173) и P135L ARF, что характерно для активации аутофагии. При повышении экспрессии L145I ARF, R139L ARF и R156G ARF подобного эффекта не наблюдалось, что указывает на нарушение способности p14ARF этих мутантных форм к активации аутофагии (рис. 1А).

Чтобы доказать, что активация аутофагии происходит вследствие индукции ARF, а не действия доксициклина на клетки, было исследовано изменение маркера аутофагии LC3 при действии доксициклина в родительской клеточной линии, не содержащей ген ARF. Установлено, что доксициклин не активирует аутофагию в клетках

остеосаркомы в отсутствие экспрессии ARF. Инкубация U2OS-Tex клеток с доксициклином не сопровождалась изменением уровня белка LC3, что подтверждает ARF-опосредованный характер аутофагии в предыдущем эксперименте (рис. 2).

Уровень аутофагии исследовали также по накоплению GFP-LC3 вакуолей методом иммуноцитофлуоресцентного анализа в клетках U2OS-ARF предварительно трансфицированных вектором GFP-LC3, содержащем белок аутофагосом LC3 с зеленой меткой GFP. С использованием конфокальной микроскопии было выявлено, что стимуляция аутофагии наблюдалась только в результате индукции P135L ARF и сопровождалась образованием



Рис. 2. Количественный анализ белка LC3 в клетках U2OS-Trex до и после индукции с доксициклином методом Вестерн — блоттинга.

GFP-LC3 позитивных вакуолей — аутофагосом в клетках, определяемых методом конфокальной микроскопии. У других мутантных форм эта способность полностью отсутствовала (рис. 1Б).

Неспособность мутантных форм L145I ARF, R139L ARF и R156G ARF индуцировать аутофагию, зарегистрированную иммуноблоттингом и конфокальной микроскопией, была подтверждена методом трансмиссионной электронной микроскопии аутофагосом. Подсчет средней площади клеток занятых аутофагосомами после активации указанных мутантных форм показал отсутствие изменений в активности аутофагии по сравнению с контролем (рис. 1В).

Таким образом, из всех мутантных форм стимуляция аутофагии наблюдалась только в результате индукции P135L ARF и сопровождалась увеличением количества белка LC3, образованием GFP-LC3 позитивных вакуо-

лей, выявляемых методом конфокальной микроскопии, скоплением аутофагосом при изучении клеток методом трансмиссионной электронной микроскопии. В отличие от L145I ARF, R139L ARF и R156G ARF сайт мутирования P135L ARF расположен вне участка гена ARF, ответственного за активацию аутофагии. С этим, вероятно, связана интактность данной функции у P135L ARF.

Заключение

На основании проведенных экспериментов можно констатировать, что точечные опухоль-ассоциированные мутации гена супрессора ARF, расположенные в участке активации аутофагии, блокируют способность опухолевого супрессора к активации аутофагии в опухолевых клетках. Это может являться одним из механизмов «ускользания» опухолевых клеток от антинеопластической активности аутофагии, вызываемой ARF.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Balaburski G.M., Hontz R. D., Murphy M. E. p53 and ARF: unexpected players in autophagy // Trends Cell Biol. — 2010. — № 20 (6). — P. 363–369.
3. Binni F., Antigoni I., De Simone P., et al. Novel and recurrent p14 mutations in Indian familial melanoma // Clin Genet. — 2010. — № 77 (6). — P. 581–586.
4. Fontana R., Vivo M. Dynamics of p14 ARF and focal adhesion kinase-mediated autophagy in cancer // Cancers. — 2018. — № 10. — P. 221.
5. Itahana K., Zhang Y. Mitochondrial p32 is a critical mediator of ARF-induced apoptosis // Cancer Cell. — 2008. — № 13 (6). — P. 542–553.
6. Ko A., Han S. Y., Song J. Regulatory network of ARF in cancer development // Molecules and Cells. — 2018. — № 41 (5). — P. 381–389.
7. 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.
8. Li J., Knobloch T. J., Poi M. J., et al. Genetic alterations of RD Ink4/ARF enhancer in human cancer cells // Mol Carcinog. — 2014. — № 53(3). — P. 211–218.
9. Mrakovcic M, Fronlich LF. P-53 — mediated molecular control of autophagy in tumor cells // Biomolecules. — 2018. — № 8 (2).
10. Ozenne P., Eymin B., Brambilla E., et al. The ARF tumor suppressor: structure, functions and status in cancer // Int. J. Cancer. — 2010. — № 127. — P. 2239–2247.
11. Park Y.B., Park M. J., Kimura K., et al. Alterations in the INK4a/ARF locus and their effects on the growth of human osteosarcoma cell lines // Cancer Genetics and Cytogenetics. — 2002. — № 133. — P. 105–111.
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. Pimkina J., Murphy M. E. ARF, autophagy and tumor suppression // Autophagy. — 2009. — № 5 (3). — P. 397–399.
14. Przybyta A., Lamperska K., Mackiewicz A. Analysis of sequence variants in the 3'UTR of CDKN2A gene in melanoma patients // Contemp Oncol. — 2015. — № 19 (4). — P. 276–279.

15. Reef S., Zalckvar E., Shifman O., et al. A short mitochondrial form of p19ARF induces autophagy and caspase-independent cell death // *Molecular Cell*. — 2006. — № 22. — P. 463–475.
16. Rizos H., Puig S., Badenas C., et al. A melanoma-associated germline mutation in exon 1 β inactivates p14ARF // *Oncogene*. — 2001. — № 20. — P. 5543–5547.
17. 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.
18. Singh SS, Vats S, Chia AY, et al. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer // *Oncogene*. — 2018. — № 37 (9). — P. 1142–1158.
19. Stott F. J., Bates S., James M. C., et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14 ARF, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2 // *The EMBO Journal*. — 1998. — № 17. — P. 5001–5014.
20. Tyagi E., Liu B., Li C., et al. Loss of p16 INK4a stimulates aberrant mitochondrial biogenesis through a CDK4/Rb-independent pathway // *Oncotarget*. — 2017. — № 34 (8). — P. 55848–55862.
21. 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.
22. Zhao R., Choi B. Y., Lee M. H., et al. Implications of genetic and epigenetic alterations of CDKN2A [p16 INK4a] in cancer // *EBioMedicine* — 2016. — № 8. — P. 30–39.
23. Zhang H. M., Li S. P., Yu Y., 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.

© Соловьев Александр Семенович (Aleksolo46@yandex.ru), Будина Анна Павловна, Анащенко Татьяна Александровна.
Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»



Г. Смоленск