

Е.В. Шахристова¹, Е.А. Степовая¹, О.Л. Носарева¹, Н.В. Рязанцева^{2,3}**КАРБОНИЛИРОВАНИЕ БЕЛКОВ КАК МЕХАНИЗМ РЕГУЛЯЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ MCF-7**¹ ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Россия² ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», Красноярск, Россия³ ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, Красноярск, Россия

Оценивали роль карбонилирования белков в молекулярных механизмах регуляции пролиферации опухолевых клеток линии MCF-7 при действии росковитина – селективного ингибитора циклинзависимых киназ. Росковитин приводил к снижению редокс-потенциала системы глутатиона, увеличению карбонильных производных белков и способствовал остановке клеточного цикла в G₂/G₁ и G₂/M фазах за счет взаимодействия с циклин-зависимыми киназами, а также мог способствовать карбонилированию ферментов.

Ключевые слова: карбонильные производные белков, пролиферация, окислительный стресс, редокс-статус, аденокарцинома молочной железы

PROTEIN CARBONYLATION AS A MECHANISM OF REGULATION OF MCF-7 BREAST CANCER CELL PROLIFERATIONE.V. Shakhristova¹, E.A. Stepovaya¹, O.L. Nosareva¹, N.V. Ryazantseva^{2,3}¹ Siberian State Medical University, Tomsk, Russia² Siberian Federal University, Krasnoyarsk, Russia³ Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voino-Yasenetsky, Krasnoyarsk, Russia

Tumor progression is accompanied by dysregulation of cell proliferation and apoptosis, which plays an essential role in breast cancer pathogenesis and cell resistance to chemotherapy. The role of protein carbonylation in molecular mechanisms of regulating MCF-7 breast cancer cell proliferation under the effect of roscovitine, a selective inhibitor of cyclin-dependent kinases, was evaluated. The cells were grown in adherent cell culture with or without roscovitine. The levels of reduced/oxidized glutathione and the concentration of protein carbonyl derivatives were determined by spectrophotometry. The cell cycle was evaluated by the flow cytometry; the same technique was used to measure the reactive oxygen species (ROS) concentration. Cell culture with roscovitine resulted in a decrease in the redox potential of the glutathione system and a rise in the ROS and protein carbonyl derivative concentrations. Roscovitine contributed to the G₂/G₁ and G₂/M phase arrest due to its interaction with ATP-binding sites of cyclin-dependent kinases. Roscovitine could also promote enzyme carbonylation. The obtained results can be further used for development of personalized approaches to breast cancer therapy.

Key words: protein carbonyl derivatives, proliferation, oxidative stress, breast adenocarcinoma

В настоящее время исследования в области молекулярно-клеточных взаимодействий позволяют выявить фундаментальные механизмы развития различных патологических состояний. Актуальность данного исследования обоснована тем, что опухолевая прогрессия сопровождается дисрегуляцией пролиферации и апоптоза на фоне развития окислительного стресса, выражающегося в дисбалансе процессов образования и утилизации активных форм кислорода, изменении состояния антиоксидантной системы защиты и активации окислительной модификации макромолекул, что играет важную роль в патогенезе злокачественных новообразований молочной железы и их устойчивости к химиотерапии. Оценка вклада окислительно модифицированных форм белков в регуляцию пролиферации опухолевых клеток представляется весьма перспективным направлением поиска молекулярных мишеней социально значимых заболеваний, в том числе злокачественных новообразований молочной железы, являющихся ведущими в структуре онкологической заболеваемости у женщин. Цель работы: оценить роль карбонилирования белков в молекулярных механизмах регуляции проли-

ферации клеток аденокарциномы молочной железы линии MCF-7 при действии селективного ингибитора циклин-зависимых киназ – росковитина.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования были выполнены с использованием опухолевой клеточной линии MCF-7 (аденокарцинома молочной железы человека), полученной из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (г. Санкт-Петербург). Опухолевые клетки линии MCF-7 культивировали адгезионным методом в полной питательной среде. Жизнеспособность клеток оценивали микроскопическим методом с трипановым синим (Serva, США). Клетки линии MCF-7 инкубировали в присутствии или отсутствии селективного ингибитора циклин-зависимых киназ – росковитина (ROSC, «Sigma Aldrich», США) – в конечной концентрации 20 мкМ [7] в течение 18 ч при 37 °С и 5%-м CO₂.

Интенсивность необратимой окислительной модификации протеинов в клетках линии MCF-7 определяли по содержанию карбонильных производных белков методом, основанным на реакции

взаимодействия окисленных аминокислотных остатков с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые регистрировали спектрофотометрически [1]. Содержание восстановленного (GSH) и окисленного (GSSG) глутатиона в клетках линии MCF-7 оценивали методом, предложенным М. Андерсон (1985) в модификации И. Рахмана с соавт. (2006) [6]. В результатах исследования приводили только величину отношения GSH/GSSG, поскольку она отражает редокс-статус клетки. Содержание активных форм кислорода (АФК) определяли методом проточной цитофлуориметрии на проточном лазерном цитометре «FaCSCanto II» (Becton Dickinson, США). Оценку распределения клеток линии MCF-7 по фазам клеточного цикла проводили методом проточной цитофлуориметрии по протоколу Cycle Test Plus (Becton Dickinson, США). Статистическую обработку полученных результатов проводили при помощи программы SPSS 11.0. Проверка на соответствие выборки нормальному закону распределения проводилась критерием Шапиро – Вилка. В связи с отсутствием согласия данных с нормальным распределением на уровне значимости $p < 0,01$ и $p < 0,05$ вычисляли средневыворочные характеристики: медиана (Me), первый и третий квартили (Q_1 – Q_3). Статистическую значимость различий независимых выборок оценивали с помощью непараметрического критерия Манна – Уитни для малых групп.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Культивирование клеток линии MCF-7 в присутствии ROSC вызывало развитие окислительного стресса, сопровождающегося увеличением внутриклеточной продукции АФК в 1,6 раза ($p < 0,01$) и снижением величины отношения GSH/GSSG в 2,1 раза ($p < 0,01$), по сравнению с интактной культурой (табл. 1).

В клетках аденокарциномы молочной железы при действии ROSC нами выявлено повышение уровня окислительно модифицированных белков. При этом

альдегидфенилгидразоны, регистрируемые при длине волны 274 нм, являются ранними маркерами окислительного повреждения протеинов, кетондинитрофенилгидразоны, регистрируемые при 363 нм – маркерами поздней деструкции белков. На фоне развития окислительного стресса при действии ROSC в клетках линии MCF-7 нами выявлено увеличение ($p < 0,01$) уровня карбонильных производных белков в условиях спонтанного и катализируемого металлами с переменной валентностью окисления протеинов при длинах волн 274 нм и 363 нм, по сравнению с уровнем окислительной модификации белков в интактной культуре (табл. 1). Полученные результаты показывают, что белки выступают в роли эффективных ловушек генерируемых активных форм кислорода. Окислительная модификация белковых молекул с образованием карбонильных производных – необратимый процесс, репарации могут подвергаться лишь окисленные тиоловые группы протеинов. Белки, подвергшиеся карбонилированию, образуют агрегаты, а также фрагментируются. Продукты свободнорадикального окисления белков способны потенцировать окислительные повреждения других макромолекул, в частности ДНК [3, 4, 8]. Окислительная модификация белков также приводит к снижению активности ферментов в цепи переносчиков электронов, АТФ-синтазы, нарушает избирательность транспортных белков и тем самым потенцирует наработку АФК [2, 5].

Росковитин, действуя на клетки аденокарциномы молочной железы, способствовал снижению прогрессии фаз клеточного цикла. Мы установили уменьшение числа клеток линии MCF-7 в 1,4 раза ($p < 0,01$) в G_0/G_1 фазах и в 2,5 раза ($p < 0,01$) – в G_2/M фазах, по сравнению с соответствующими показателями в интактной культуре (табл. 1). Остановка клеточного цикла в G_0/G_1 и G_2/M фазах реализовывалась за счет способности ROSC по конкурентному механизму взаимодействовать с АТФ-связывающими участками циклин-зависимых киназ (cdc2/циклин В, cdk2/циклин А, cdk2/циклин Е, cdk5/p35), контролирующих пере-

Таблица 1
Изменение пролиферации клеток линии MCF-7, редокс-статуса, окислительной модификации белков и концентрации активных форм кислорода при действии селективного ингибитора циклин-зависимых киназ росковитина (ROSK), Me (Q_1 – Q_3)

Показатели		Группы		
		Интактные MCF-7	MCF-7 + ROSC	
Активные формы кислорода, условные единицы		0,81 (0,80–0,83)	1,27 (1,26–1,28)*	
Величина отношения GSH/GSSG		9,71 (9,55–9,73)	4,69 (4,67–5,54)*	
Количество клеток в G_0/G_1 фазе, %		56,37 (55,89–56,57)	41,70 (40,86–42,91)*	
Количество клеток в G_2/M фазе, %		7,92 (5,82–10,11)	20,11 (18,90–20,58)*	
Количество клеток в S фазе, %		36,40 (34,43–37,67)	39,03 (37,51–39,33)	
Карбонильные производные белков, условные единицы/мг белка	Спонтанная окислительная модификация белков	$\lambda = 274$ нм	4,52 (3,26–7,34)	11,36 (10,98–12,00)*
		$\lambda = 363$ нм	5,48 (5,01–6,28)	8,81 (8,70–9,37)*
	Металл-катализируемая окислительная модификация белков	$\lambda = 274$ нм	16,34 (15,27–19,38)	23,77 (21,28–26,13)*
		$\lambda = 363$ нм	20,22 (20,09–20,84)	28,00 (27,32–28,95)*

Примечание. * – различия статистически значимы, по сравнению с интактными клетками MCF-7, при $p < 0,01$.

ход клеток по фазам цикла [7]. Кроме того, конформационные изменения различных белковых молекул (в том числе циклинзависимых киназ), вызванные карбонилированием, при действии ингибитора могли привести к нарушению выполняемых ими функций, что привело к остановке пролиферации клеток линии MCF-7. Таким образом, полученные результаты могут использоваться в дальнейшем для разработки персонализированных подходов терапии злокачественных новообразований молочной железы.

ЛИТЕРАТУРА REFERENCES

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной защиты организма. – СПб.: Фолиант, 2000. – 103 с.

Arutyunyan AV, Dubinina EE, Zybina NN (2000). Evaluation methods of free radical oxidation and antioxidant protection of the organism [Metody otsenki svobodnoradikal'nogo okisleniya i antioksidantnoy zashchity organizma], 103.

2. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Соросовский образовательный журнал. – 2000. – Т. 6, № 12. – С. 13–19.

Vladimirov YA (2000). Free radicals in biological systems [Svobodnye radikaly v biologicheskikh sistemakh]. *Sorosovskiy obrazovatel'nyy zhurnal*, 6 (12), 13-19.

3. Дубинина Е.Е. Продукты метаболизма кислорода в функциональной активности клеток (жизнь и

смерть, созидание и разрушение). Физиологические и клинко-биохимические аспекты. – СПб.: Медицинская пресса, 2006. – 400 с.

Dubinina EE (2006). Products of metabolism of oxygen in the functional activity of cells (life and death, creation and destruction). *Physiological and clinical-biochemical aspects* [Produkty metabolizma kisloroda v funktsional'noy aktivnosti kletok (zhizn' i smert', sozidanie i razrushenie)]. *Fiziologicheskie i kliniko-biokhimicheskie aspekty*, 400.

4. Лушчак В.И. Свободнорадикальное окисление белков и его связь с функциональным состоянием организма // Биохимия. – 2007. – Т. 72, № 8. – С. 995–1015.

Lushchak VI (2007). Free-radical oxidation of proteins and its relationship with functional state of the organism [Svobodnoradikal'noe okislenie belkov i ego svyaz' s funktsional'nym sostoyaniem organizma]. *Biokhimiya*, 72 (8), 995-1015.

5. Halliwell B (2007). Biochemistry of oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.*, (5), 1147-1150.

6. Rahman I, Kode A, Biswas SK (2006). Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.*, 1 (6), 3159-3165.

7. Rajnai Z, Méhn D, Beéry E, Okyar A, Jani M, Tóth GK, Fülöp F, Lévi F, Krajcsi P (2010). ATP-binding cassette B1 transports seliciclib (R-roscovitine), a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Drug Metab. Dispos.*, 38 (11), 2000-2006.

8. Stadtman ER, Levine RL (2000). Protein oxidation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, (899), 191-208.

Сведения об авторах Information about the authors

Шахристова Евгения Викторовна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (634050, г. Томск, ул. Московский тракт, 2; тел.: 8 (3822) 901-101, доб. 1853; e-mail: shaxristova@yandex.ru)

Shakhistova Evgeniya Viktorovna – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics of Siberian State Medical University (634050, Tomsk, Moskovskiy Trakt str., 2; tel.: +7 (3822) 901-101 (1853); e-mail: shaxristova@yandex.ru)

Степовая Елена Алексеевна – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (e-mail: muir@mail.ru)

Stepovaya Elena Alekseevna – Doctor of Medical Sciences, Professor, Professor of the Department of Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics of Siberian State Medical University (e-mail: muir@mail.ru)

Носарева Ольга Леонидовна – кандидат медицинских наук, доцент кафедры биохимии и молекулярной биологии с курсом клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России (e-mail: olnosareva@yandex.ru)

Nosareva Olga Leonidovna – Candidate of Medical Sciences, Associate Professor of the Department of Biochemistry and Molecular Biology with the Course of Clinical Laboratory Diagnostics of Siberian State Medical University (e-mail: olnosareva@yandex.ru)

Рязанцева Наталья Владимировна – доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры биофизики Института фундаментальной биологии и биотехнологии ФГАОУ ВПО «Сибирский федеральный университет», профессор кафедры биологической химии с курсами медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России

Ryazantseva Natalya Vladimirovna – Doctor of Medical Sciences, Professor, Professor of the Department of Biophysics of Institute of Fundamental Biology and Biotechnology of Siberian Federal University, Professor of the Department of Biochemistry with the Courses of Medical, Pharmaceutical and Toxicological Chemistry of Krasnoyarsk State Medical University named after professor V.F. Voyno-Yasenevsky