

На правах рукописи

Казанцева Юлия Александровна

**РОЛЬ КОНСТИТУТИВНОГО АНДРОСТАНОВОГО РЕЦЕПТОРА В
РЕГУЛЯЦИИ ИНГИБИТОРА КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА p21**

03.01.04 – биохимия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Новосибирск - 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики» г. Новосибирск, Россия

Научный руководитель: кандидат биологических наук, доцент
Пустыльняк Владимир Олегович

Официальные оппоненты: **Меркулова Татьяна Ивановна**
доктор биологических наук, профессор,
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт цитологии и генетики» Сибирского отделения Российской академии наук, заведующая лабораторией регуляции экспрессии генов

Попова Нэлли Александровна
кандидат биологических наук, доцент,
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», факультет естественных наук, кафедра цитологии и генетики, профессор

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт молекулярной и клеточной биологии» Сибирского отделения Российской академии наук

Защита состоится «__» _____ 2015 г. в _____ на заседании диссертационного совета Д001.034.01 в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт биохимии» (630117, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2; тел. 8 (383) 333-54-81)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт биохимии» по адресу: <http://www.niibch.ru>

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Г.С. Русских

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Конститутивный андростановый рецептор (CAR) принадлежит к суперсемейству ядерных рецепторов. На сегодняшний день утвердилось представление о нем как о ксенобиотик-чувствительном ядерном рецепторе, который регулирует экспрессию ферментов метаболизма и элиминации как эндогенных, так и экзогенных соединений (Wei et al., 2000; Sugatani et al., 2001). Показано также, что экспрессируясь преимущественно в печени, рецептор CAR вовлечен во множество физиологических и патологических процессов в организме, таких как метаболизм углеводов и жиров, регуляция клеточного деления, рост и дифференцировка клеток (Banerjee et al., 2014). Существуют данные свидетельствующие о том, что активация CAR может являться одним из ключевых моментов при формировании опухоли печени грызунов. Длительное введение активаторов рецептора мышам и крысам приводит к развитию гепатоцеллюлярной карциномы (Yamamoto et al., 2004; Deguchi et al., 2009). Однако механизм возникновения опухоли под действием рецептора CAR остается неясным.

Показано, что активация рецептора CAR в клетках печени мышей ассоциирована с сильным пролиферирующим эффектом. Введение мощного прямого активатора CAR мыши ТСРОВОР приводит к развитию гиперплазии печени грызунов (Costa et al., 2005). Потеря способности печени соблюдать баланс между индуцирующими и ингибирующими рост сигналами является онкогенным событием и связана, в первую очередь, с нарушением регуляции клеточных процессов, ответственных за контроль клеточного цикла. Клеточный цикл состоит из нескольких фаз. Закономерная последовательность смены фаз клеточного цикла строго контролируется специальными регуляторными белками, которые обеспечивают как прохождение клетки по определенному периоду, так и переход из одной фазы клеточного цикла в другую. G1 фаза является критическим периодом

клеточного цикла, когда под влиянием разных факторов принимается решение: вступает клетка в митотический цикл или нет. И с некоторого момента времени выбранный путь становится необратимым. Активация рецептора CAR является митогенным стимулом в клетках печени мышей. Рецептор стимулирует экспрессию ключевого регулятора G1 фазы клеточного цикла белка циклина D1 (Ledda-Columbano et al., 2000). Однако за счет ингибирующего влияния белка p21 на циклин D1 может произойти остановка клеточного деления в G1 фазе митотического цикла (Ball et al., 1997). В настоящей работе для того, чтобы подойти ближе к пониманию механизмов индукции пролиферативных процессов при активации CAR, было исследовано влияние ядерного рецептора на уровень белка p21 в клетках печени мышей.

Целью данного исследования является изучение роли ядерного рецептора CAR в регуляции ингибитора клеточного цикла p21 в клетках печени.

В связи с поставленной целью решались следующие основные задачи:

1) Оценить влияние активированного ядерного рецептора CAR на изменение массы печени лабораторных животных и сопоставить данный показатель с уровнем экспрессии маркерного белка циклина D1, ответственного за вхождение клетки в клеточный цикл.

2) Оценить изменение экспрессии универсального ингибитора клеточного цикла белка p21 при хроническом введении известного митогена ТСРОВОР, обладающего активирующим эффектом на CAR в печени мышей.

3) Установить молекулярный механизм изменения содержания белка p21 в клетках печени лабораторных животных с участием рецептора CAR.

4) Проанализировать изменение уровня белков-регуляторов клеточного цикла pRb, Cdk4, cMyc, E2F1 после длительного применения активатора CAR.

Научная новизна

Показано, что при хроническом введении активатора CAR ТСРОВОР происходит снижение экспрессии белка-ингибитора клеточного цикла p21 в печени мышей.

Продемонстрировано, что активация рецептора CAR ТСРОВОР сопряжена со значительным снижением функциональной активности онкосупрессоров p53 и FoxO1 в качестве транскрипционных факторов, что приводит к подавлению экспрессии гена *Cdkn1a* (p21).

В опытах *in vivo* показано прямое взаимодействие белков CAR и FoxO1.

Выявлены особенности молекулярных процессов, протекающих в печени экспериментальных животных, подтверждающие, что активация CAR может приводить к прогрессии клеточного цикла.

Научно-практическая значимость

По своему содержанию данная работа имеет преимущественно фундаментальный характер и представляет собой исследование молекулярных механизмов нарушения регуляции клеточного цикла с участием ядерного рецептора CAR. Активируясь под действием различных структурно-несвязанных соединений, рецептор вовлечен во множество физиологических процессов, протекающих в печени. Следствием этого является потенциальная возможность использования активаторов CAR для коррекции различных патологических состояний органа (Banerjee et al., 2014). Однако данные, свидетельствующие о том, что активация CAR приводит к формированию гепатоцеллюлярной карциномы у грызунов, ставят под сомнение использование агонистов CAR в терапевтической практике. Неотъемлемым признаком опухолевой трансформации клетки является неограниченная пролиферативная активность. В настоящем исследовании показано, что активация ядерного рецептора CAR приводит к подавлению содержания универсального ингибитора клеточного цикла p21 в

печени экспериментальных животных на уровне транскрипции гена, через подавление функциональной активности регуляторов его экспрессии p53 и FoxO1. Результаты работы имеют значение, прежде всего, для понимания механизмов активации клеточного деления и могут быть полезны в борьбе с нерегулируемой пролиферацией клеток печени.

Основные положения, выносимые на защиту

1) Активация ядерного рецептора CAR у мышей приводит к снижению уровня универсального ингибитора клеточного цикла p21.

2) В основе снижения уровня белка p21 с участием рецептора CAR лежит подавление функциональной активности транскрипционных факторов, регулирующих активность гена *Cdkn1a* (p21), p53 и FoxO1.

Апробация работы

Результаты работы обсуждались на следующих конференциях: EMBO Conference Nuclear receptors: Linking molecules, genomes & physiology (г. Сорренто, Италия, 2013); 20th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations (г. Штутгарт, Германия, 2014).

Публикации

По результатам исследований, представленных в диссертации, опубликовано 6 публикаций, из которых 4 в рецензируемых научных изданиях.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов, обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 105 страницах машинописного текста, содержит 20 рисунков. Библиография включает 221 наименование.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обработка животных соединениями. Для исследования влияния активации рецептора CAR на регуляцию клеточного цикла использовали самцов мышей линии C57Bl (20–25 г), полученных из питомника Института клинической иммунологии СО РАМН (Новосибирск). Экспериментальным животным в качестве активатора рецептора CAR вводили ТСРОВОР (3 мг/кг веса животного), в качестве ингибитора рецептора – андростенон (30 мг/кг веса животного). В ходе проведения исследования оценивали влияние однократной инъекции ТСРОВОР и хронического введения соединения мышам (в течение 2-х месяцев) на регуляцию клеточного цикла. Животных содержали группами по 5 особей в условиях естественного освещения при свободном доступе к воде и пище.

Выделение микросомальной фракции печени животных производили при температуре +4 °С общепринятым методом дифференциального центрифугирования. Образцы печени гомогенизировали в растворе, содержащем 20 мМ трис-НСl (рН 7,4), 1,15% КСl. В результате двух последовательных центрифугирований гомогената печени при 10000 об/мин и 32000 об/мин получали осадок микросомальной фракции.

Определение каталитической активности сур2b. Скорость деалкилирования 7-пентоксирезорурфина (PROD) (субстрата, специфичного для сур2b) определяли флюориметрическим методом по скорости образования резорурфина (Burke et al., 1985).

Вестерн-блот анализ. Лизис гомогената печени мышей проводили с использованием буфера RIPA. Выделение ядерных экстрактов проводили с помощью набора реагентов ProteoJET™ Cytoplasmic and Nuclear Protein Extraction Kit («Fermentas») согласно рекомендациям производителя. Концентрацию белка в лизатах/ядерных экстрактах определяли методом Брэдфорд с использованием готового реагента «Bradford reagent, ready-to-use» («Fermentas») согласно рекомендациям производителя. Разделение

белков проводили по методу Лэммли (Laemmli, 1970) в денатурирующих условиях. После электрофоретического разделения белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0,45 μm) методом полусухого переноса. Для блокировки центров неспецифического связывания нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в растворе BSA (либо в растворе обезжиренного сухого молока). Далее мембрану последовательно инкубировали со специфичными и вторичными антителами, мечеными пероксидазой. Визуализацию иммунореактивных полос проводили с использованием набора реагентов для люминесцентной детекции.

Имунопреципитация хроматина. К гомогенату печени добавляли формальдегид до 1 % для образования ковалентных связей между ДНК и близкорасположенными белками. Далее проводили лизис клеток буфером, содержащим ингибиторы протеаз. Для получения фрагментов ДНК, размером 500-1000 п.н., лизат клеток подвергался озвучиванию на ультразвуковом дезинтеграторе. Часть полученного лизата использовалась для контроля Input. Очищенный лизат инкубировали с антителами против специфического белка или нормальной сыворотки кролика (IgG), а потом с суспензией агарозы. Далее после серии очисток иммунокомплекс разрушали добавлением 4М NaCl. Полученные фрагменты ДНК выделяли методом фенол-хлороформной экстракции. Анализ полученной ДНК проводили методом ПЦР.

ПЦР с детекцией в реальном времени. Выделение суммарной РНК из образцов печени мышей проводили с использованием набора Rneasy® Mini Kit (50) («Qiagen») согласно рекомендациям производителя. Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию с помощью набора iScript cDNA Synthesis Kit («BioRad») в соответствии с протоколом производителя. В реакции использовали гексануклеотидные случайные праймеры. Для определения уровня экспрессии исследуемых генов проводили ПЦР с детекцией в реальном времени с использованием iTaq SYBR Green Supermix

with ROX («BioRad»). Относительный уровень экспрессии генов оценивали с использованием значений пороговых циклов Ct по методу $2\Delta Ct$.

Статистическая обработка результатов. Результаты представлены в виде средней величины и стандартного отклонения ($M \pm SD$). Достоверность отличий оценивали с помощью парного t-критерия Стьюдента и однофакторного анализа ANOVA. $P < 0,05$ считалось статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Активация рецептора CAR введением ТСРОВОР приводит к увеличению массы печени грызунов.

Информативным признаком развития патологии печени является изменение ее массы. Поэтому в ходе настоящего исследования были оценены массовые показатели печени и тела лабораторных животных после длительного введения активатора CAR ТСРОВОР (в течение 2-ух месяцев). В результате проведенных измерений выявлено увеличение массы печени мышей, которым длительное время вводился ТСРОВОР, по сравнению с группой контрольных животных (Рис. 1). При этом средняя масса печени грызунов, подверженных длительному введению соединения составила 10% от общего показателя массы тела, что в 2 раза превышает норму.

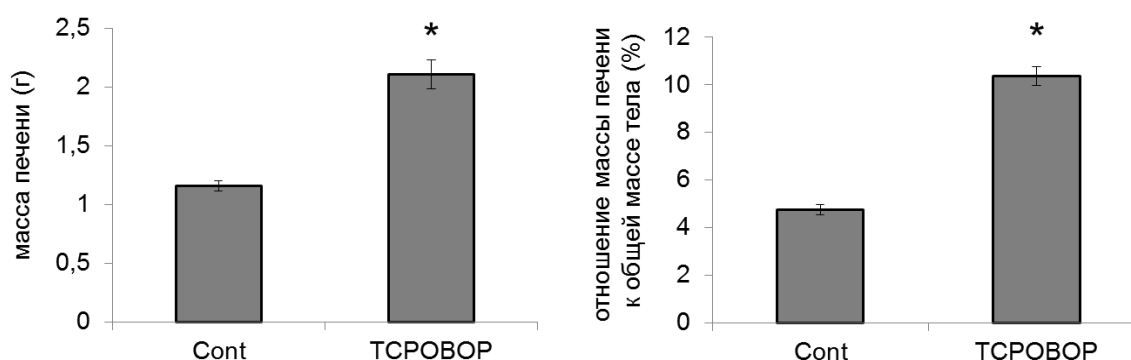


Рис. 1. Изменение показателей массы печени мышей после введения ТСРОВОР мышам в течение 2-ух месяцев. Приведены средние значения $\pm SD$ ($n=5$). * Значимость различий по сравнению с контролем $p < 0,05$.

На основании литературных данных, свидетельствующих о том, что введение ТСРОВОР мышам приводит к гиперплазии печени (Costa et al., 2005), было сделано предположение, что наблюдаемое изменение массы печени грызунов также признак избыточного деления гепатоцитов. Для исследования митогенного эффекта ТСРОВОР был оценен уровень экспрессии белка циклина D1, запускающего клеточный цикл. Исследование транскрипции гена *Ccnd1* (циклин D1) методом ОТ-ПЦР продемонстрировало, что при длительном введении активатора CAR в течение 2-ух месяцев происходит увеличение относительного уровня мРНК циклина, а, в ходе проведения иммуноблот анализа, было показано увеличение относительного содержания самого белка (Рис. 2А, Б).

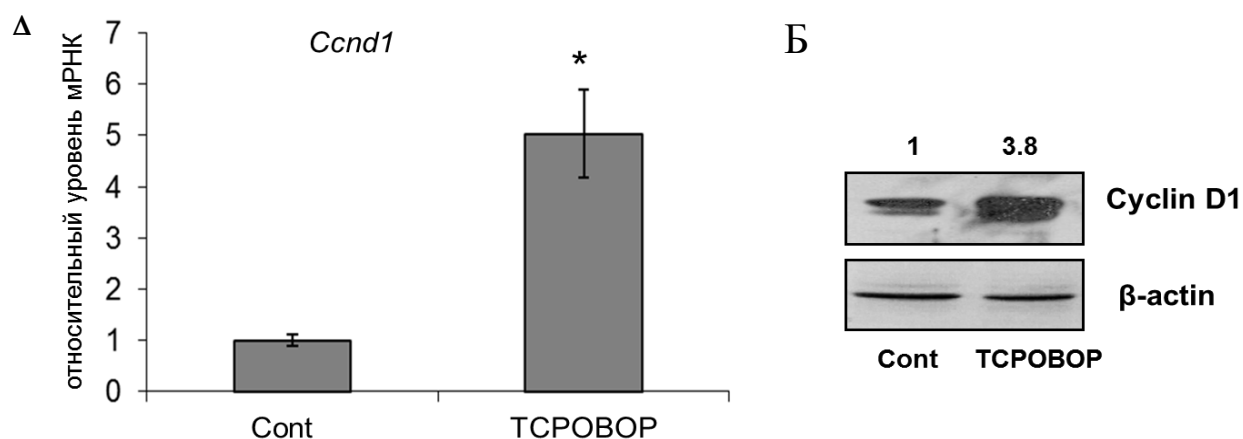


Рис. 2. Эффект влияния введения ТСРОВОР мышам в течение 2-ух месяцев на экспрессию регулятора клеточного цикла циклин D1. (А) Относительное содержание мРНК *Ccnd1* в печени мышей анализировали методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени. В качестве гена сравнения использовали «ген домашнего хозяйства» β -актин. Приведены средние значения \pm SD (n=5). * Значимость различий по сравнению с контролем $p < 0,05$. (Б) Иммуноблот анализ содержания белка циклина D1 в печеночных лизатах мышей. Уровень белка β -актина использовали в качестве контроля.

Таким образом, следствием длительного введения активатора CAR мышам может быть перманентное повышение экспрессии циклина D1, что приводит к постоянной стимуляции клеточного деления, и, в конечном счете, такое развитие событий может стать причиной развития опухоли.

Следствием активации рецептора CAR является снижение содержания ингибитора клеточного цикла белка p21 в клетках печени.

Для ограничения нерегулируемой пролиферативной активности клеток существуют особые белки – ингибиторы циклинов и циклин-зависимых киназ (Sherr and Roberts, 1995). Существуют данные о том, что повышенный уровень циклина D1 не всегда коррелирует с усиленной пролиферацией клеток, и причиной этому может быть резкое увеличение уровня ингибитора циклин-зависимых киназ p21 (Ullmannova et al., 2003). Известно, что белок избирательно связывает и инактивирует комплекс циклин D-Cdk4, способствуя задержке клеток в фазе G1 (Ball et al., 1997). Для определения влияния длительного введения активатора CAR ТСРОВОР мышам в течение 2-ух месяцев на содержание ингибитора p21 в клетках печени лабораторных животных, был исследован уровень экспрессии гена, кодирующего данный белок - *Cdkn1a*, а также количество его белкового продукта. Длительное введение ТСРОВОР грызунам привело к статистически значимому снижению экспрессии гена *Cdkn1a* (Рис. 3А).

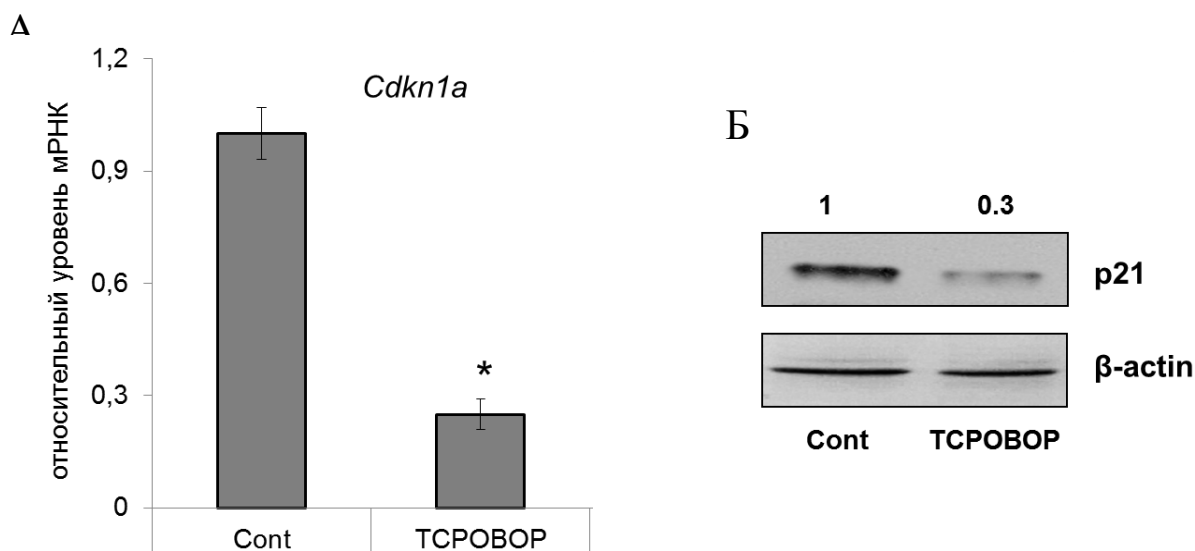


Рис. 3. Эффект влияния введения ТСРОВОР мышам в течение 2-ух месяцев на экспрессию ингибитора клеточного цикла p21. (А) Относительное содержание мРНК *Cdkn1a* оценивали методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени. В качестве гена сравнения использовали «ген домашнего хозяйства» β -актин. Приведены средние значения \pm SD (n=5). * Значимость различий по сравнению с контролем $p < 0,05$. (Б) Иммуноблот анализ содержания белка p21 в печеночных лизатах. Уровень белка β -актина использовали в качестве контроля.

Результаты иммуноблот анализа согласуются с результатами, полученными при исследовании экспрессии гена – при введении ТСРОВОР наблюдается падение относительного уровня белка p21 (Рис. 3Б).

Для того чтобы установить по какому механизму введение активатора CAR ТСРОВОР приводит к снижению уровня ингибитора клеточного цикла p21 был проведен ряд экспериментов.

Снижение функциональной активности транскрипционного фактора p53 при активации рецептора CAR.

Известно, что белок p21 является одной из основных мишеней трансактивационного действия белка-онкосупрессора p53 (el-Deiry et al., 1993). В настоящем исследовании для оценки транскрипционной активности белка p53 после введения активатора CAR ТСРОВОР была оценена способность транскрипционного фактора взаимодействовать с промоторной

областью его целевого гена *Cdkn1a* (p21) методом иммунопреципитации хроматина. Были получены результаты, свидетельствующие о снижении аккумуляции p53 на промоторном участке гена *Cdkn1a* при введении активатора CAR (Рис. 4А).

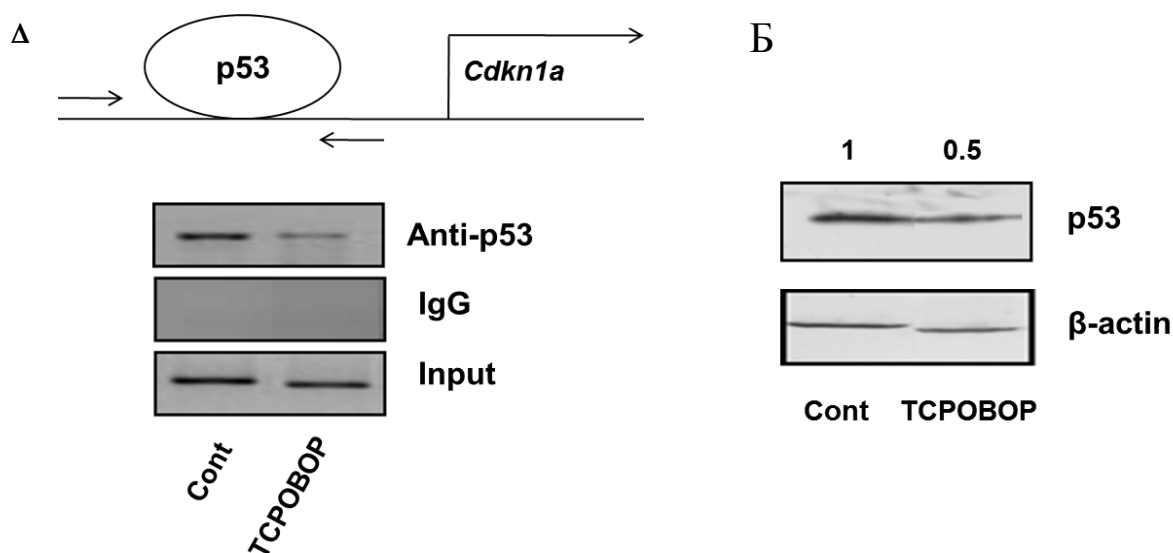


Рис.4. Эффект влияния введения ТСРОВОР мышам на функциональную активность, а также содержание транскрипционного фактора p53 в клетках печени мышей. (А) Иммунопреципитация хроматина после однократного введения ТСРОВОР с применением антител против p53 и нормальных IgG кролика в качестве контроля на специфичность связывания. ПЦР преципитированных фрагментов проводили, используя праймеры специфичные к промотору гена *Cdkn1a*. (Б) Иммуноблот анализ печеночных лизатов после однократного введения ТСРОВОР с применением антител против p53. Уровень белка β-актина использовали в качестве контроля.

В ходе проведения иммуноблот анализа было показано, что снижение связывания транскрипционного фактора p53 с регуляторной областью промотора гена *Cdkn1a* обусловлено падением уровня белка p53 в клетках печени мышей (Рис. 4Б).

Из литературы известно, что снижение содержания p53 в клетке осуществляется за счет усиления его распада. Основной лигазой, стимулирующей деградацию p53 является белок Mdm2 (Haupt et al., 1997). В связи с этим в ходе дальнейшего исследования был также оценен уровень экспрессии гена *Mdm2* и количество его белкового продукта.

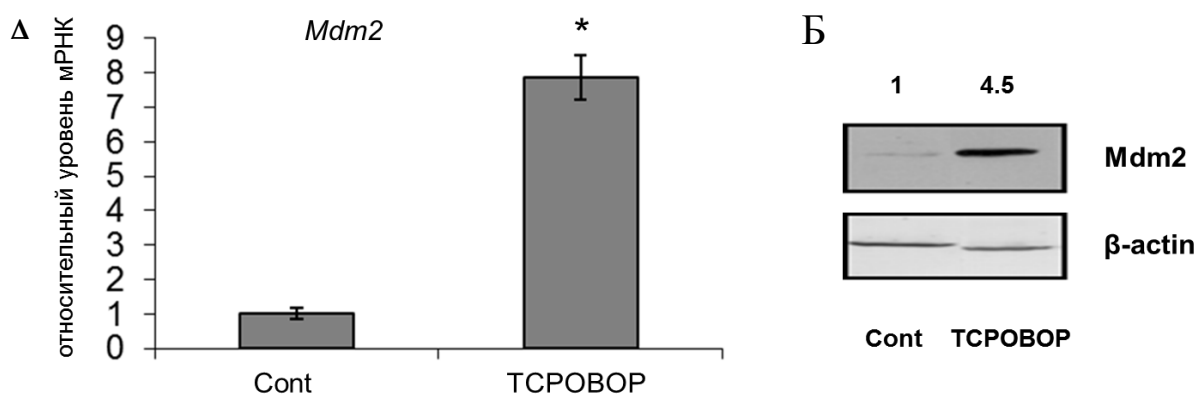


Рис. 5. Эффект влияния введения ТСРОВОР мышам на экспрессию белка Mdm2. (А) Относительное содержание мРНК *Mdm2* анализировали методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени. В качестве гена сравнения использовали «ген домашнего хозяйства» β -актин. Приведены средние значения \pm SD (n=5). * Значимость различий по сравнению с контролем $p < 0,05$. (Б) Иммуноблот анализ содержания белка Mdm2 в печеночных лизатах. Уровень белка β -актина использовали в качестве контроля.

При введении активатора CAR ТСРОВОР мышам в клетках печени лабораторных животных происходит увеличение относительного содержания мРНК *Mdm2* по сравнению с контролем в 8 раз (Рис. 5А). Результаты анализа транскрипции гена *Mdm2* были подтверждены определением его белкового продукта иммунохимическим методом с помощью антител. В клетках печени мышей наблюдается увеличение количества белка Mdm2, негативного регулятора онкосупрессора p53, в 4,5 раза по сравнению с контролем (Рис. 5Б).

Таким образом, на основании полученных данных можно сделать вывод, что рецептор CAR предотвращает накопление p53 в клетках печени лабораторных животных за счет увеличения экспрессии его негативного регулятора Mdm2, способствуя снижению содержания опухолевого супрессора p21.

Подавление функциональной активности транскрипционного фактора Foxo1 под действием активированного введением ТСРОВОР рецептора CAR.

Осуществляя контроль соблюдения баланса между пролиферативными сигналами и доступностью питательных веществ, существенную роль в

регуляции экспрессии гена *Cdkn1a* (p21) играет также белок FoxO1. В ходе проведения исследования было показано, что длительное введение агониста CAR ТСРОВОР сопровождается достоверным снижением экспрессии гена *FoxO1*, а также падением относительного уровня самого белка – как в общем лизате клеток, так и в ядерных экстрактах (Рис. 6А, Б).

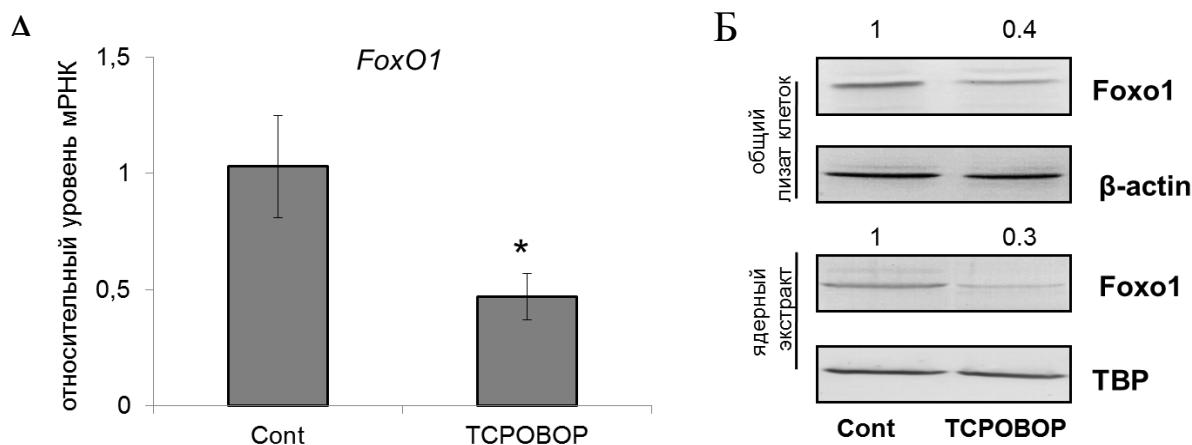


Рис. 6. Эффект влияния введения ТСРОВОР мышам в течение 2-ух месяцев на экспрессию белка FoxO1. (А) Относительное содержание мРНК *FoxO1* анализировали методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени. В качестве гена сравнения использовали «ген домашнего хозяйства» β -актин. Приведены средние значения \pm SD (n=5). * Значимость различий по сравнению с контролем $p < 0,05$. (Б) Иммуноблот анализ содержания белка FoxO1 в печеночных лизатах, а также в ядерных экстрактах. В общем лизате клеток в качестве контроля использовали сигнал на β -актина, в ядерных экстрактах на ТВР.

Анализ транскрипционной активности FoxO1 проводили методом иммунопреципитации хроматина с использованием антител против FoxO1 и праймеров, ограничивающих сайт связывания транскрипционного фактора на промоторе его генов-мишеней *Cdkn1a* и *FoxO1*. Для подтверждения участия CAR в регуляции активности FoxO1, лабораторным животным вводили, помимо активатора ТСРОВОР, обратный агонист рецептора – андростенон. Полученные результаты свидетельствуют о снижении ДНК-связывающей способности белка FoxO1 после однократной инъекции ТСРОВОР. Наблюдается снижение аккумуляции транскрипционного фактора на регуляторной области промотора генов-мишеней: *Cdkn1a* и *FoxO1* (Рис. 7).

Введение обратного агониста CAR - андростенола предотвратило ингибирующее влияние активатора CAR.

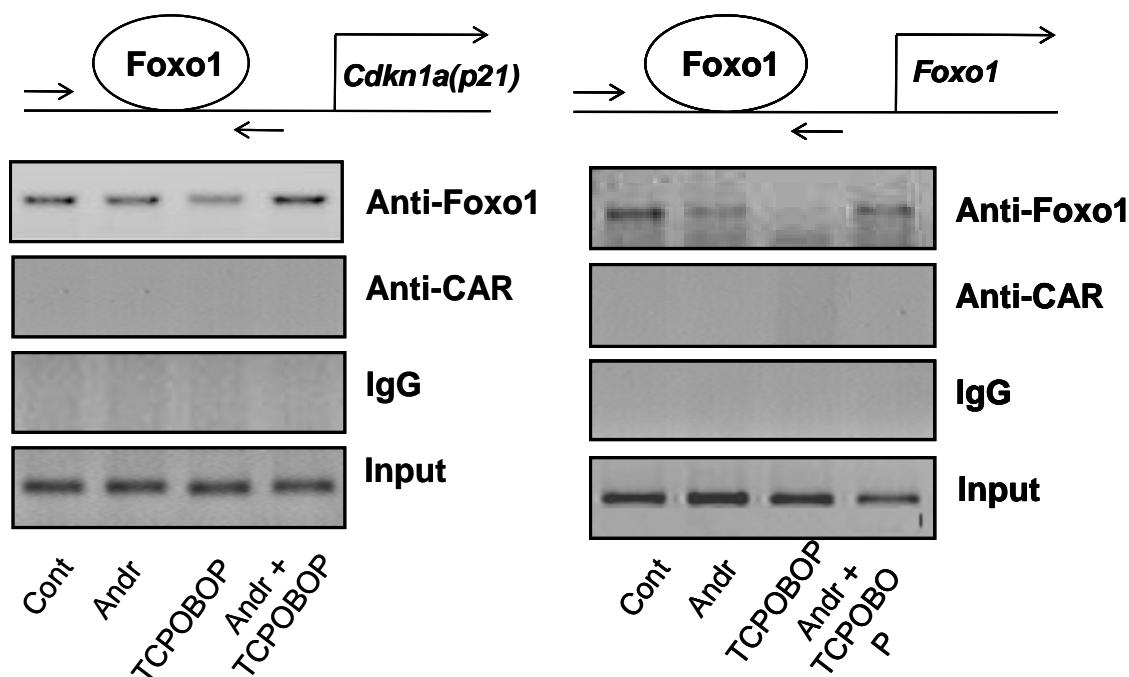


Рис. 7. Эффект введения ТСРОВОР мышам на способность транскрипционного фактора FoxO1 взаимодействовать с регуляторной областью генов-мишеней *Cdkn1a* и *FoxO1*. Иммунопреципитация хроматина из образцов печени мышей после однократного введения ТСРОВОР с применением антител против FoxO1 и нормальных IgG кролика в качестве контроля на специфичность связывания. ПЦР преципитированных фрагментов проводили, используя праймеры специфичные к промотору генов *Cdkn1a* и *FoxO1*.

Падение способности транскрипционного фактора FoxO1 взаимодействовать с регуляторной областью промотора собственного гена под влиянием рецептора CAR объясняет факт снижения экспрессии белка FoxO1 при введении мышам ТСРОВОР (Рис. 6А, Б).

На основании литературных данных, предполагается, что наблюдаемое подавление транскрипционной функции FoxO1 обусловлено способностью CAR напрямую связывать и ингибировать белок FoxO1. Анализ взаимодействия белков проводили с помощью иммунопреципитации белкового комплекса из гомогената печени лабораторных животных, используя антитела против CAR или FoxO1. Затем проводили электрофорез и иммуноблоттинг белков, полученных в результате ко-иммуноперципитации.

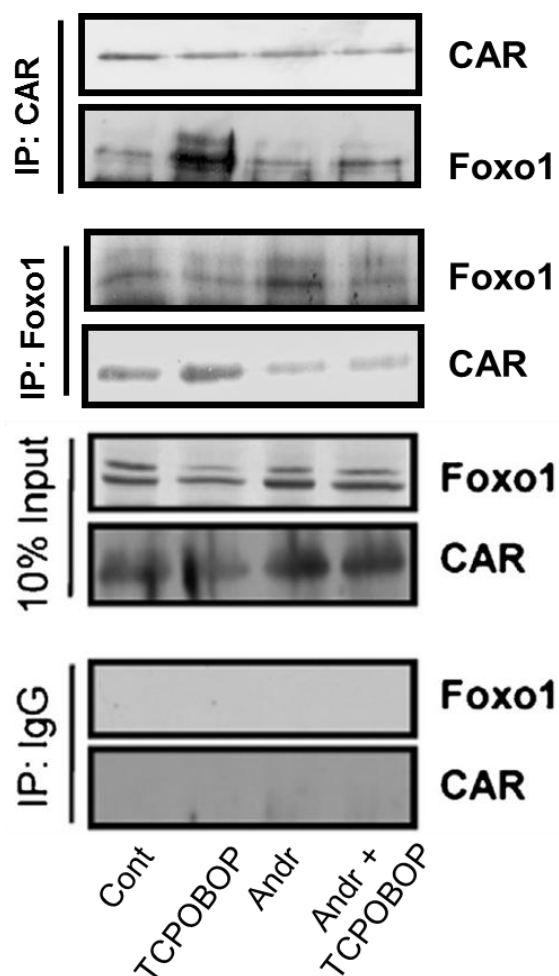


Рис. 8. Исследование взаимодействия белков CAR и FoxO1 после введения ТСРОВОР. Иммунопреципитация белкового комплекса CAR-FoxO1 из гомогената печени мышей с использованием антител против CAR/FoxO1. Иммуноблот анализ преципитированного белкового комплекса.

Из полученных результатов, следует, что введение ТСРОВОР приводит к увеличению взаимодействия CAR и FoxO1, в то время как введение ингибитора рецептора андростенола предотвращает образование белкового комплекса (Рис. 8). Таким образом, было установлено, что рецептор CAR, образуя в ядре гетеродимерный комплекс с FoxO1, выступает в роли корепрессора транскрипционного фактора. Полученные результаты позволяют говорить о способности CAR подавлять содержание p21 в клетке за счет снижения активности белка FoxO1, регулирующего экспрессию гена *Cdkn1a* (p21).

**Следствием активации CAR является увеличение экспрессии
белков-регуляторов клеточного цикла.**

Известно, что в пресинтетической фазе клеточного цикла p21 блокирует ингибирующее фосфорилирование комплексом циклин D-Cdk4 белка Rb, который, в свою очередь, связывает и дезактивирует транскрипционный фактор E2F1, необходимый для перехода из G1 фазы в фазу синтеза ДНК. В ходе настоящей работы для оценки эффективности действия комплекса циклин D-Cdk4 с помощью иммуоблот анализа было исследовано содержание фосфорилированной формы Rb в клетках печени мышей. Результаты анализа, представленные на рисунке 9А, свидетельствуют о накоплении фосфорилированной формы Rb в гепатоцитах грызунов, которые подвергались воздействию ТСРОВОР. Более того, введение активатора CAR привело к усилению экспрессии транскрипционного фактора E2F1. Наблюдается увеличение относительного содержания мРНК гена *E2F1*, а также его белкового продукта (Рис. 9А).

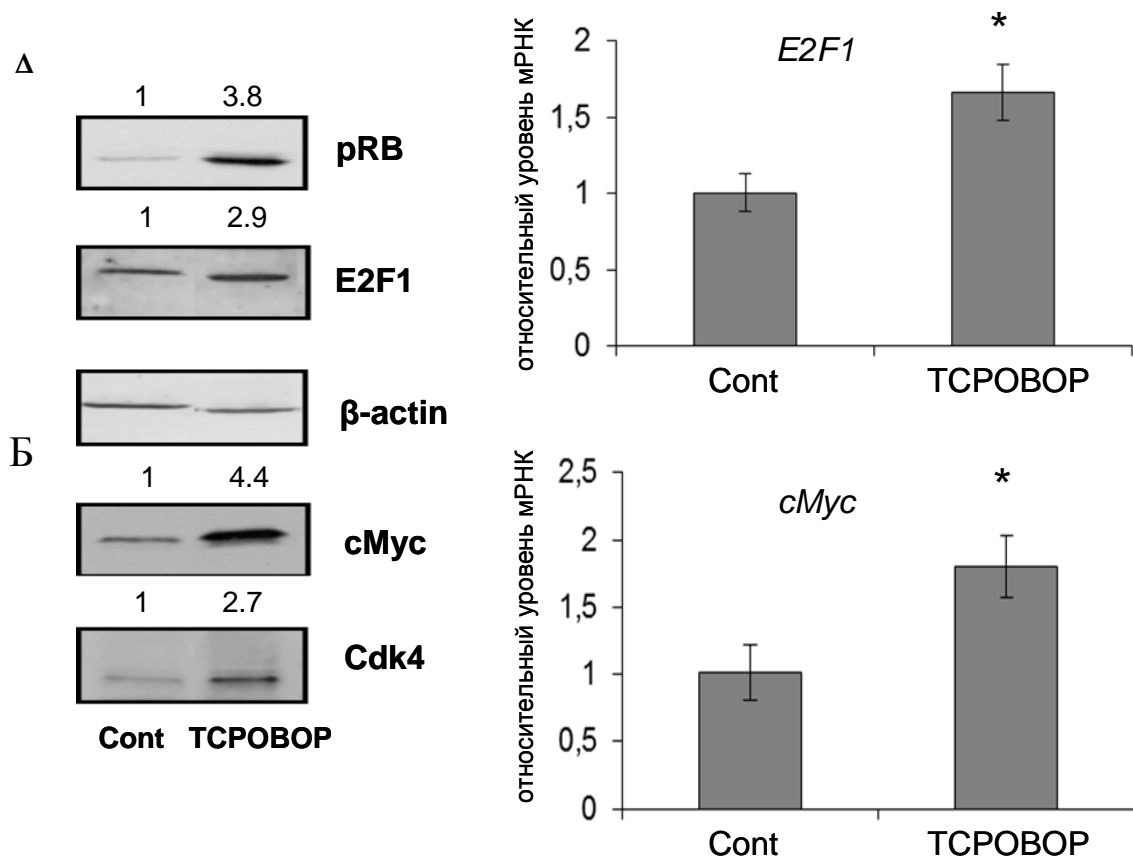


Рис. 9. Эффект введения ТСРОВОР мышам на экспрессию белков-регуляторов клеточного цикла E2F1, cMyc, pRb, Cdk4. (А), (Б) Иммуноблот анализ содержания белков E2F1, cMyc, pRb, Cdk4 в печеночных лизатах после введения ТСРОВОР. Уровень белка β -актина использовали в качестве контроля. Относительное содержание мРНК генов *E2F1* и *cMyc* после введения ТСРОВОР в печени мышей анализировали методом ОТ-ПЦР с детекцией в режиме реального времени. В качестве гена сравнения использовали «ген домашнего хозяйства» β -актин. Приведены средние значения \pm SD (n=5). * Значимость различий по сравнению с контролем $p < 0,05$.

В дополнение к этому, было показано, что при длительном введении активатора CAR наблюдается накопление ключевого позитивного регулятора клеточного цикла белка cMyc в печени мышей (Рис. 9Б). Также было установлено, что увеличению уровня белка предшествовало усиление транскрипции гена *cMyc*. В образцах печени мышей, подверженных влиянию ТСРОВОР наблюдается увеличение относительного уровня мРНК гена *cMyc* (Рис. 9Б). Более того, наблюдается увеличение уровня продукта его гена-мишени Cdk4 (Рис. 9Б).

Известно, что сМус способен ингибировать транскрипцию гена *Cdkn1a*, кодирующего белок p21 (Gartel et al., 2001; Wu et al., 2003). Таким образом, дополнительным механизмом участия CAR в подавлении содержания p21 в клетке может быть стимулирование экспрессии его репрессора сМус.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Активация ядерного рецептора CAR является митогенным стимулом в клетках печени мышей. Вмешиваясь в регуляцию G1 фазы клеточного цикла, усиливая экспрессию белка циклина D1, рецептор запускает клеточное деление. В настоящем исследовании впервые показано, что индукция пролиферации клеток печени под воздействием рецептора CAR ассоциирована со снижением содержания белка p21. В результате проведенных экспериментов было идентифицировано два пути подавления уровня ингибитора клеточного цикла p21: через блокирование функциональной активности регуляторов экспрессии кодирующего его гена (*Cdkn1a*), транскрипционных факторов FoxO1 и p53 (Рис. 20).

Наблюдаемые при активации CAR угнетение экспрессии p21, а также гиперэкспрессия циклина D1 приводят к активации Cdk-сигнального пути. В клетках печени мышей происходит накопление неактивной фосфорилированной формы белка Rb, а также транскрипционных факторов E2F1 и сМус (Рис. 20). Такое развитие событий приводит к индукции клеточного деления, и обуславливает повышенную пролиферацию клеток печени лабораторных животных.

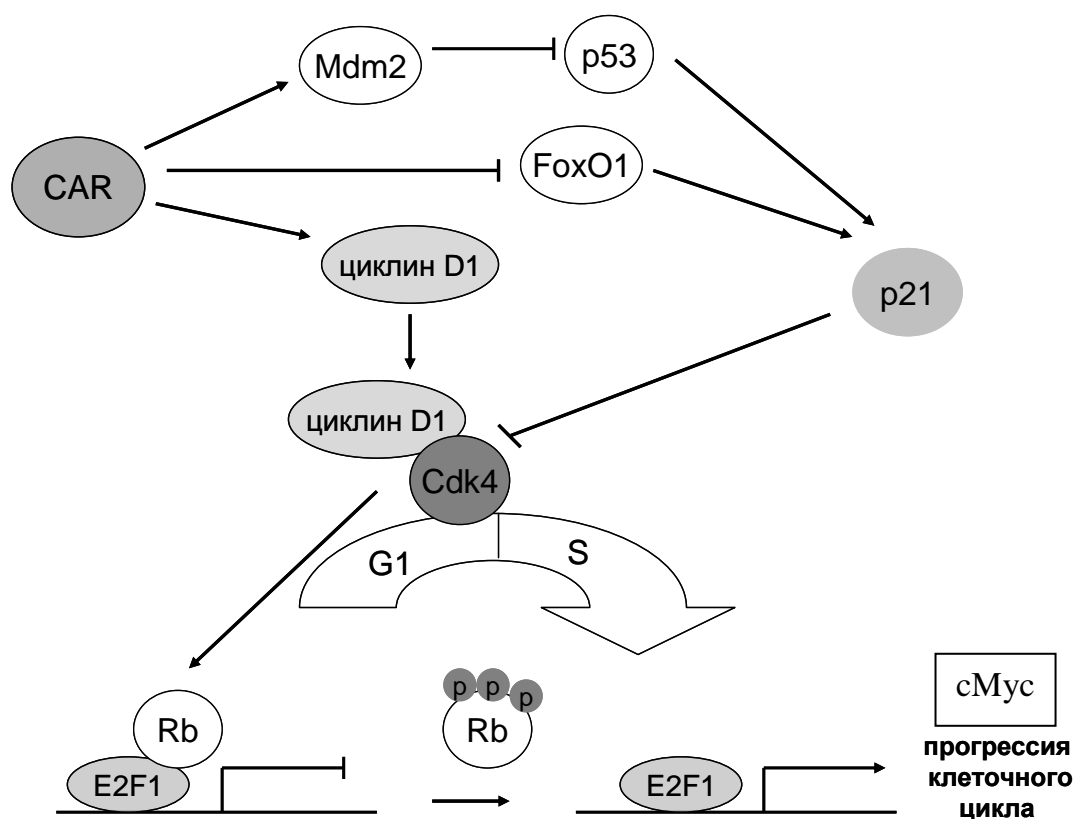


Рис. 20. Схематическое изображение участия ядерного рецептора CAR в прогрессии клеточного цикла посредством ингибирования белка p21.

Таким образом, результаты, полученные в ходе выполнения настоящего исследования, помогли подойти ближе к пониманию механизмов индукции пролиферативных процессов под воздействием ядерного рецептора CAR в клетках печени грызунов. Знание механизмов активации пролиферации имеет большое значение для разработки способов коррекции различных патологических состояний.

ВЫВОДЫ

1) Введение в течение 2-х месяцев активатора CAR (ТСРОВОР) экспериментальным животным сопровождается увеличением массы печени мышей. Увеличение массы органа ассоциировано с накоплением циклина D1 в клетках печени.

2) Введение мышам ТСРОВОР приводит к снижению экспрессии белка p21 за счет активации рецептора CAR по двум молекулярным механизмам:

а) активированный рецептор CAR предотвращает накопление транскрипционного фактора p53 в печени мышей за счет увеличения экспрессии его негативного регулятора Mdm2;

б) активированный рецептор CAR взаимодействует с транскрипционным фактором FoxO1, блокируя его функциональную активность, при этом подавление транскрипционной активности FoxO1 сопровождается снижением уровня самого белка.

3) Введение ТСРОВОР мышам приводит к увеличению уровня белков-регуляторов клеточного цикла pRb, cMyc, E2F1, Cdk4 в печени мышей.

Основные результаты изложены в следующих работах

Статьи в рецензируемых журналах

Kazantseva Y.A., Yarushkin A.A., Pustylnyak V.O. CAR-mediated repression of Foxo1 transcriptional activity regulates the cell cycle inhibitor p21 in mouse livers. *Toxicology*, 2014;321:73-9.

Kazantseva Y.A., Yarushkin A.A., Pustylnyak V.O. Dichlorodiphenyltrichloroethane technical mixture regulates cell cycle and apoptosis genes through the activation of CAR and ER α in mouse livers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013; 271:137–143.

Ярушкин А.А., Казакова Ю.А., Дёмин Д.С., Пустыльняк В.О., Гуляева Л.Ф. Экспрессия генов-мишеней рецепторов CAR и ER α в печени мышей под действием ДДТ. *Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина*, 2012; Т. 10. № 4. С. 5-13.

Pustylnyak V., Kazakova Y., Yarushkin A., Slynko N., Gulyaeva L. Effect of several analogs of 2,4,6-triphenyldioxane-1,3 on CYP2B induction in mouse liver. *Chem Biol Interact*, 2011;194(2-3):134-8.

Тезисы в сборниках международных конференций

Kazantseva Y.A., Yarushkin A.A., Pustylnyak V.O. DDT technical mixture regulates cell cycle and apoptosis genes through the activation of CAR and ER α in mouse livers // *EMBO Conference: Nuclear receptors. Linking molecules, genomes & physiology.* – Sorrento, Italy, 2013. – P. 123

Kazantseva Y.A., Yarushkin A.A., Pustylnyak V.O. Xenosensor CAR-Mediated Repression of FOXO1 Transcriptional Activity Regulates the Cell Cycle Inhibitor p21 in Mouse Livers. // *20th International Symposium on Microsomes and Drug Oxidations.* - Stuttgart, Germany, 2014. – P. 188.