

ОПУХОЛЕВЫЙ СУПРЕССОР p53 КАК РЕГУЛЯТОР МЕТАЛЛОШАПЕРОНА ATOX1 ПРИ ГЕНОТОКСИЧЕСКИХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

Кучур О.А. (Университет ИТМО), Цымбал С.А. (Университет ИТМО)

Введение: С накоплением данных о противоопухолевых эффектах радио- и химиотерапии предприняты многочисленные попытки идентифицировать молекулярные механизмы выживания и гибели злокачественных клеток. Один из таких маркеров – опухолевый супрессор p53 – важнейший регулятор апоптоза, играющий ключевую роль в ответе клеток на повреждающие воздействия и накопление активных форм кислорода [1, 2]. Вместе с тем, существуют немногочисленные данные о наличии корреляции между уровнями экспрессии p53 и металлошаперона меди Atox1. По всей видимости, активация p53 способна влиять на экспрессию Atox1, индукция которого защищает клетку от гибели при ионизирующем излучении путём элиминации АФК [3]. Раскрытие функций и механизмов активации фактора антиоксидантной защиты, регулятора роста и пролиферации Atox1 позволит уточнить защитную функцию p53 при генотоксических воздействиях, что актуально для разработки стратегий противоопухолевой терапии и повышения её эффективности.

Основная часть. Наш проект посвящён изучению связи белка p53 и шаперона Atox1 в опухолевых клетках, что, с одной стороны, позволит заложить фундамент для исследования защитной роли активации p53 с точки зрения метаболизма меди и понять базовые механизмы, активируемые опухолевыми клетками для регуляции ответа на стрессовые воздействия, а с другой – выявить ряд потенциальных вспомогательных мишеней в сигнальных путях для увеличения эффективности противоопухолевой терапии.

В ходе экспериментов нами использованы линия колоректальной карциномы НСТ116 и карциномы лёгкого А549 (с диким типом и нокаутным *TP53*). Было обнаружено, что в ответах генов *ATOX1* и *TP53* на стрессовые воздействия (ионизирующее излучение в терапевтических дозах, противоопухолевые препараты доксорубицин, цисплатин, блеомицин) наблюдаются признаки наличия обратной корреляции: методом ПЦР в реальном времени и иммуноблоттинга установлено, что экспрессия Atox1 снижается при повышении активности p53 на транскрипционном и трансляционном уровнях. Помимо этого, было установлено, что в клетках с инактивированным p53 содержание Atox1 увеличивается в 3-4 раза вне зависимости от индуцирующих воздействий. Данные наблюдения идут в некоторое противоречие с изначальной идеей о синергетическом действии пары белков, совместной активацией генов *ATOX1* и *TP53*. Более того, одновременная супрессия двух генов методом трансфекции siRNA приводила к росту фазы клеточного цикла SubG₁ (апоптозу), при одновременном снижении фазы G₂/M (арест клеточного цикла и репарация), чего не наблюдалось при поочередном их подавлении. Гибель становилась более выраженной при воздействии терапевтическими дозами ионизирующего излучения 4-10 Гр на клетки с инактивированными Atox1 и p53. С помощью флуоресцентной микроскопии проводилась окраска белка Atox1 и окраска ядер DAPI. При воздействии цитостатическими соединениями на клетки с диким типом p53 не удалось зафиксировать сколь-либо значимой транслокации белка Atox1 в ядро, в нокаутных по p53 клетках в интактных условиях также не наблюдалось роста активности цитоплазматического Atox1. Однако в случае воздействия упомянутыми выше препаратами на клетки с инактивированным p53 наблюдалось увеличение ядерной транслокации Atox1 в сравнении с клетками НСТ116 и А549 с диким типом p53: для блеомицина и перекиси водорода в ~2-2.5 раза, для доксорубицина в ~3.

Выводы. Результаты работы свидетельствуют о том, что p53 подавляет экспрессию Atox1 в интактных клетках, ещё более очевидным это становится при индукции гамма-излучением в терапевтической дозе 10 Гр, а также противоопухолевыми препаратами. В клетках с неактивным p53 (нокаут) индукция Atox1 заметно выше. Обоснование этого может лежать в свойствах Atox1 как транскрипционного фактора, запускающего экспрессию циклина D1 – белка, регулирующего прохождение клеткой контрольной точки G₁/S с дальнейшей репарацией. В этом случае роль p53 состоит в ингибировании Atox1 с целью не допустить прохождение клетки с повреждениями ДНК далее по клеточному циклу. В дальнейшем нами планируется изучение морфофункциональных и молекулярных характеристик опухолевых клеток с инактивированными генами *TP53*, *ATOX1*, *CCND1* при химио- и радиотерапевтическом воздействии.

Список использованных источников:

1. Chen J. "The cell-cycle arrest and apoptotic functions of p53 in tumor initiation and progression" Cold Spring Harbor perspectives in medicine. – 2016. – Т.6, №3.
2. Olovnikov I.A., Kravchenko J.E., Chumakov P.M. "Homeostatic functions of the p53 tumor suppressor: regulation of energy metabolism and antioxidant defense" Seminars in cancer biology, Academic Press. – 2009. – Т.19, №1. – С. 32-41.
3. Beaino W., Guo Y., Chang A.J., Anderson C.J. "Roles of Atox1 and p53 in the trafficking of copper-64 to tumor cell nuclei: implications for cancer therapy" JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry. – 2014. – Т.19, №3. – С. 427-438.