

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ИНСТИТУТ МОЛЕКУЛЯРНОЙ БИОЛОГИИ
им. В. А. ЭНГЕЛЬГАРДТА

На правах рукописи

СТРУНИНА Светлана Михайловна

ТРАНСАКТИВАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА АНТИОНКОГЕНА
p53 В РАЗЛИЧНЫХ КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК: РАЗРАБОТКА
ЭФФЕКТИВНОЙ РЕПОРТЕРНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ
КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ АКТИВНОСТИ p53

Специальность 03.00.03 - молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

МОСКВА - 2004

Работа выполнена в лаборатории пролиферации клеток Института молекулярной биологии им В А Энгельгардта РАН

Научный руководитель доктор биологических наук, профессор
П.М. Чумаков

Официальные оппоненты доктор биологических наук
Н.Л. Лазаревич
кандидат биологических наук
Д.В. Купраш


Ведущая организация ГНИИ Генетики и селекции промышленных микроорганизмов

Защита диссертации состоится "16" сентября 2004 года в 1-100
час на заседании Диссертационного совета Д 002 235 01 в Институте молекулярной биологии им В А Энгельгардта РАН по адресу 119991, Москва, ул Вавилова, д 32

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии им В А Энгельгардта РАН

Автореферат разослан "16" сентября 2004 года

Ученый секретарь
Диссертационного совета
кандидата химических наук


А. М. Крыжановский

2005-4
16736

1

891847

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

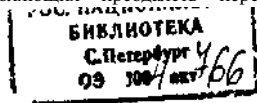
Возникновение злокачественных клеток в организме может быть связано с накоплением генетических повреждений, приводящих к нарушениям контроля деления и гибели клеток. Антионкоген p53 участвует в ликвидации генетически дефектных клеток организма. Продукт гена p53 представляет собой транскрипционный фактор, активирующий ряд генов, которые задерживают клеточное деление или запускают запрограммированную клеточную смерть - апоптоз. Широкий спектр внешних воздействий, стрессов и внутренних сбоев клеточной физиологии функционально активирует белок p53, который накапливается благодаря выключению механизмов его деградации и повышает свою транскрипционную активность за счет конформационных перестроек внутри белковой молекулы. Процесс активации белка p53 может контролироваться посредством множества сигнальных механизмов, отвечающих многообразно стрессовых воздействий, внутренних нарушений и различной функциональной специфичности тканей.

Функциональная инактивация гена или белка p53 - наиболее часто встречающийся дефект в раковых опухолях человека. Поэтому выявление конкретных механизмов повреждений биохимических путей, ведущих к активации p53, важно для понимания природы канцерогенеза, а также для разработки адекватных терапевтических и профилактических схем для лечения рака.

Основная активность белка p53 - функционирование в качестве транскрипционного фактора, что и определяет его супрессирующую пролиферацию активность. Белок p53 связывается с определенными последовательностями ДНК палиндромной структуры, называемыми p53-респонсивными элементами, и, как правило, активирует промоторы, содержащие такие элементы. Поэтому изучение повреждений сигнальных путей, ведущих к активации p53, удобно проводить, ориентируясь на изменения характера индукции p53-зависимых генов в ответ на известные активаторы p53. Такого рода анализ в конкретных опухолевых клетках может привести к обнаружению тех звеньев сигнальных путей, активирующих p53, в которых локализован дефект передачи сигнала.

Ранее показана достаточно четкая корреляция между активностью p53-зависимого репортера и супрессорной активностью белка p53. Обычно репортерная конструкция вводится в клетку временно, а затем клетки подвергаются воздействиям, индуцирующим активность p53. Для сравнения состояния биохимических путей активации p53 требуется доставлять репортерную конструкцию в различные типы клеток с высокой и стандартной эффективностью. Это требование трудно достижимо, поскольку имеются значительные различия в эффективности трансфекции и интеграции трансгенов в клетки различного происхождения. В нормальных клетках процедура трансфекции, сопровождающаяся введением экзогенной ДНК, как правило, приводит к активации p53. Это, в свою очередь, может приводить к ограничению пролиферации, или даже гибели обработанных клеток. В опухолевых клетках могут наблюдаться различного рода эффекты, приводящие к интеграции нескольких копий трансгена, к перестройкам репортерной конструкции, к интеграции в области гетерохроматина, и, в случае двух последних событий - к инактивации работы трансгена. Кроме того, обычные методы трансфекции часто сопровождаются затухающей во времени экспрессией трансгена, что связано с влиянием эпигенетической супрессии на экспрессию трансгена. В дополнение к перечисленным артефактам при эффективно прошедшей кальций-фосфатной трансфекции клеток, методом которой мы вначале пользовались, не более 10% клеток получают репортерную конструкцию. Этот факт, конечно, приводит к неадекватному отражению результатов активации репортера в малой части выживших после селекции на антибиотике клеток массовой культуры или отдельно выделенных клонов культуры.

В отличие от пассивной трансфекции ДНК, перенос генов с помощью ретровирусных векторов обеспечивает ряд преимуществ, позволяющих преодолеть перечисленные



трудности Ретровирусный перенос - наиболее физиологический метод доставки генетического материала Ретровирусный вектор интегрируется преимущественно в транскрипционно-активные участки генома в виде единичной копии, причем структура интегрированной вставки предсказуема, а индукции стрессовых сигнальных путей не происходит. Высокая эффективность и стандартизованность интеграции позволяет в дальнейшем работать на поликлональных популяциях трансгенных клеток, избегая тем самым возникновения нежелательных эффектов клональной вариабильности

Исходя из вышеизложенных преимуществ ретровирусной доставки генетического материала, для создания эффективной репортерной системы для определения активности р53 в клетках мы решили использовать самоинактивирующийся ретровирусный вектор. До настоящего времени не предлагался универсальный инструмент, позволяющий проводить подробный количественный анализ транскрипционной активности р53 в любых типах эукариотических клеток.

Цель и задачи исследования

Основная цель работы заключалась в создании универсальной ретровирусной репортерной системы, которая бы позволила проводить количественное определение и сравнение трансактивационных свойств антионкогена р53 в культурах клеток различного происхождения

В задачи исследования входило.

1. Получить ряд ретровирусных самоинактивирующихся репортерных конструкций, несущих гены зеленого флуоресцентного белка (GFP), бактериальной β -галактозидазы (lacZ), а также гена устойчивости к антибиотику гиромоцину (hygro) под р53-зависимым промотором
2. Провести тестирование р53-зависимой экспрессии полученных конструкций в крысиных, мышиных и человеческих культурах клеток различного происхождения, используя системы транзиторной, регулируемой и эндогенной экспрессии р53, разработать метод количественного измерения транскрипционной активности р53.
3. Провести сравнительный количественный анализ транскрипционной активности р53 в культуре карциномы толстого кишечника человека HCT116 в ответ на обработку клеток химиотерапевтическими агентами в зависимости от внутриклеточного контекста - наличия активной экспрессии гена-ингибитора транскрипционной активности р53 - mdm2 или гена-стимулятора активности р53 - ARF; провести подобный сравнительный количественный анализ транскрипционной активности р53 в ответ на обработку клеток химиотерапевтическими агентами в четырех культурах, являющихся производными клеток соединительной ткани человека.
4. На основе разработанной репортерной системы с геном lacZ получить линии клеток опухолей человека, в которых активность р53 подавлена либо точечной мутацией в кодоне 273 гена р53 (эпидермоидная карцинома A431), либо за счет деградации р53 под действием вируса папилломы 16 типа (карцинома шейки матки SiHa); провести скрининг химической библиотеки соединений на реактивацию транскрипционной функции р53 в клетках A431 и SiHa

Научная новизна и практическая ценность работы

Созданы и проверены самоинактивирующиеся ретровирусные конструкции рSIP-ConA-GFP, рSIP-ConA-lacZ и рSIP-ConA-hygro, несущие репортерные гены белков GFP, β -галактозидазы, а также гена устойчивости к гиромоцину (hygro) под контролем промотора, содержащего р53-респонсивные элементы. С помощью полученных конструкций можно добиваться до 100% эффективности доставки репортерных генов в высокопролиферативные культуры клеток. Экспрессия репортеров сравнительно гомогенна в клетках каждой используемой культуры. Первые две конструкции позволяют количественно оценивать уровень активности р53 в культурах клеток в ответ на различные воздействия

Впервые предложен инструмент в виде ретровирусного самоинактивирующегося репортерного вектора для количественной оценки транскрипционной активности p53. Преимущество репортерной конструкции с геном lacZ заключается в недолгом времени жизни Р-галактозидазы (около 2 ч), что позволяет с помощью pSIP-ConA-lacZ изучать динамику повышения и понижения активности p53 в реальном времени. Система pSIP-ConA-GFP менее пригодна для изучения динамики, поскольку белок GFP является более долгоживущим. Однако эта система оказывается удобной для наблюдения за активацией p53 в живых клетках, без предварительной фиксации, а также для изучения кинетики p53-зависимой транскриптации в отдельных клетках. Это позволяет, например, проводить отбор клеток с активированным p53 с помощью клеточного сортера. Конструкция pSIP-ConA-hygro теоретически может позволить отбирать клетки с постоянно активным p53 с помощью селекции на антибиотике гиромидине, хотя успех такой селекции во многом может зависеть от чувствительности данного типа клеток к супрессорному действию самого p53.

С использованием конструкции pSIP-ConA-lacZ проведен сравнительный анализ активации p53 в ответ на обработку двенадцатью различными химиотерапевтическими агентами в клетках трех сублиний карциномы человека HCT116, HCT116/mdm2 и HCT116/ARF, которые экспрессируют гены, влияющие на транскрипционную активность p53. Проведен также анализ активации p53 в четырех культурах клеток человека, имеющих соединительнотканное происхождение - HEF, WI-38, U2OS и HT1080. Результаты свидетельствуют о том, что становится возможным выявлять с помощью созданной системы тонкие различия в способности клеток активировать p53 в ответ на разнообразные стрессовые воздействия.

Созданные ретровирусные репортерные конструкции позволяют создавать из любых культур клеток репортерные линии, пригодные для отбора химических и генетических модуляторов активности p53 с помощью библиотек химических соединений и генетических элементов. В результате скрининга химической библиотеки отобраны соединения, реактивирующие транскрипционную функцию p53 в клетках A431 и SiHa, в которых подавлена функция эндогенного p53. Показано, что реактивированный p53 способен индуцировать p53-зависимые гены и вызывать апоптоз. Идентифицированные модуляторы активности p53 в дальнейшем могут быть использованы в качестве новых противоопухолевых препаратов.

Апробация диссертации

Материалы диссертации были доложены на школе-конференции "Горизонты физико-химической биологии" (Пушино, май 2000); XVI зимней молодежной научной школе "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии" (Москва, февраль 2004); на лабораторном научном коллоквиуме лаборатории пролиферации клеток ИМБРАН.

Структура и объем работы

Диссертация изложена на **135** страницах машинописного текста, содержит **26** рисунков, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы (всего **378** ссылок).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Изучение p53-зависимой транскрипции проводят с использованием репортерных конструкций, в которых такие репортерные гены, как гены CAT (хлорамфеникол-ацетилтрансферазы), р-галактозидазы, люциферазы, GFP (green fluorescent protein - зеленого флуоресцентного белка) или других находятся под контролем промоторов, содержащих p53-респонсивные элементы. Для сравнения состояния p53-зависимых путей необходимо добиться эффективного попадания репортерного трансгена в клетки культуры, предсказуемого встраивания в геном и возможности стабильной, чувствительной к

функциональной активации p53 экспрессии трансгена в каждой клетке культуры. Мы поставили перед собой задачу создания такой универсальной ретровирусной репортерной системы, которая бы позволила проводить количественное определение и сравнение транскрипционной активности p53 в культурах клеток различного происхождения.

1. Создание самоинактивирующихся ретровирусных конструкций, несущих различные гены, для оценки транскрипционной активности p53 в клетках

Для обеспечения максимально стандартного и не зависящего от типа клеточной линии способа введения репортерной кассеты мы решили использовать самоинактивирующийся ретровирусный вектор. В ДНК самоинактивирующегося вектора внесена делеция 3'-LTR, которая в процессе ретровирусного заражения благодаря особенностям обратной транскрипции ретровирусной РНК переходит в ДНК левого 5'-LTR. Таким образом, интегрирующаяся в геном клетки ретровирусная ДНК, ограниченная двумя последовательностями LTR, оказывается неспособной экспрессировать вирусные элементы и влиять на экспрессию внутренней репортерной кассеты из-за инактивации промоторных свойств левого 5'-LTR. Эта особенность конструкции отвечает важному требованию - отсутствию в репортерной конструкции каких-либо транскрипционных энхансеров, активность которых могла бы повлиять на работу p53-зависимого промотора. При длительном пассировании некоторые конструкции могут инактивироваться за счет эпигенетических механизмов (метилирование, деацетилирование и прочее) или утраты трансгена. От подобных последствий позволяет избавиться постоянное культивирование клеток в среде с селективным антибиотиком. Поэтому конструкция должна содержать ген устойчивости к какому-либо антибиотику, позволяющий отбирать клетки, в которые попадает репортерная кассета.

Нами были созданы репортерные конструкции pSIP-ConA-GFP (с геном зеленого флуоресцентного белка), pSIP-ConA-lacZ (с геном бактериальной β -галактозидазы), pSIP-ConA-AP (с геном щелочной фосфатазы), а также конструкция pSIP-ConA-hygro (с геном устойчивости к антибиотику гиромоцину). Конструкции были построены на основе самоинактивирующегося ретровирусного вектора pSIP, в котором ген устойчивости к пуromицину находится под контролем промотора гена гистона H4 человека, не содержащего энхансера. Репортерная кассета расположена слева от промотора H4 и контролируется минимальным промотором гена основного белка теплового шока Hsp70 (45 п.н.) и блоком p53-респонсивных элементов ConA, состоящим из высокоаффинного консенсусного p53-связывающего сайта CON (20 п.н.) и фрагмента A (49 п.н.) рибосомного кластера генов (рис.1).

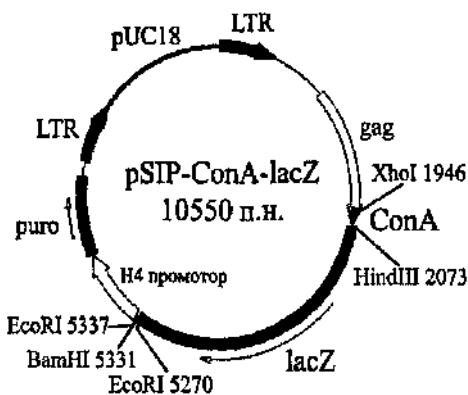


Рис.1. Схема репортерной конструкции pSIP-ConA-lacZ. Схемы pSIP-ConA-GFP, pSIP-ConA-AP, pSIP-ConA-hygro аналогичны, вместо гена бактериальной β -галактозидазы (lacZ) они содержат гены зеленого флуоресцентного белка (GFP), щелочной фосфатазы (AP), антибиотика гиромоцина (hygro) соответственно.

2. Проверка системы р53-зависимой активации искусственного промотора

Проверку системы р53-зависимой активации искусственного промотора проводили на зараженных полученных векторами и прошедших селекцию на пуromинине культурах клеток как содержащих, так и не содержащих эндогенный р53 дикого типа.

Первоначально, когда вектор рSIP-ConA-GFP был введен в культуру крысиных фибробластов Ref52, мы наблюдали зеленую флуоресценцию этих клеток. Клетки Ref52 обладают высоким пролиферативным потенциалом, поэтому процент заражения этой культуры оказался высоким, и не было острой необходимости проводить длительную селекцию на антибиотике пуromинине для отбора клеток, содержащих конструкцию. Большинство клеток Ref52/ConA-GFP проявляли специфическую гомогенную флуоресценцию в ультрафиолетовом свете (УФ) (данные не показаны). Как известно из ранее проведенных исследований, р53 в клетках Ref52 транскрипционно активен, несмотря на то, что содержание самого белка находится ниже предела чувствительности метода. При обработке клеток Ref52 ДНК-повреждающим агентом этопозидом (ингибитор топоизомеразы II) мы наблюдали заметное усиление флуоресценции (данные не показаны).

Интересным представлялось введение репортерной конструкции в клетки, не содержащие эндогенного р53, поскольку в такой системе возможна отработка минимального фонового уровня экспрессии репортера. Для этой цели мы выбрали линию спонтанно иммортализованных 3Т3-подобных мышечных фибробластов 10(1), утративших экспрессию р53 благодаря делециям обеих аллелей гена.

С целью достижения высокой чувствительности и гомогенности эффектов экспрессии репортера мы решили получить индивидуальный клон 10(1)'ConA-GFP. Первый же взятый клон, полученный предельным разведением в 96-луночном плато, оказался чувствительным к экспрессии р53 дикого типа. Как мы и ожидали, клетки, не содержащие эндогенного р53, проявляли лишь невысокую зеленую флуоресценцию, связанную с неспецифическим свечением клеток в УФ (рис.2). При заражении клеток 10(1) ретровирусом, несущим ген дикого р53 под сильным промотором LTR мышечного ретровируса (вектор рPS-wtp53) через 3-4 суток после заражения мы наблюдали появление в культуре флуоресцирующих клеток. Этот эффект усиливался обработкой клеток 10/ConA-GFP этопозидом. Культура 10(1)ConA-GFP, зараженная ретровирусом, полученным на основе контрольного вектора рPS-нео, лишенного гена дикого р53, проявляла только неспецифическую флуоресценцию.

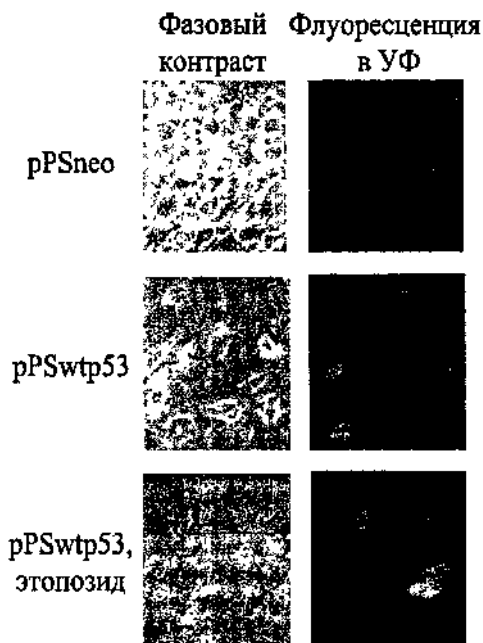


Рис.2. Фотографии клона 10(1), несущего конструкцию ConA-GFP, через 4 суток после заражения ретровирусными векторами рPS-нео (А) и рPS-wtp53 (Б, В), в случае В клетки обрабатывались этопозидом (200 нг/мл) в течение последних 36 часов.

Аналогичным образом были получены клоны 10(1)ConA-lacZ. Как видно на фотографии (рис 3), только при заражении клеток тем же ретровирусом, несущим ген дикого p53 под сильным промотором, в фиксированной и окрашенной на стекле культуре 10(1)/ConA-lacZ появляются синеготубые клетки

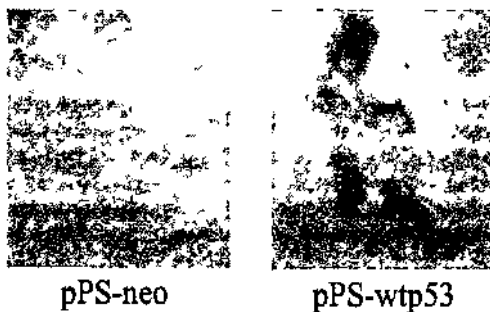


Рис. 3. Фотографии клона 10(1), несущего конструкцию ConA-lacZ, через 4 суток после заражения ретровирусными векторами pPS-neo и pPS-wtp53

Мы также ввели репортерные конструкции в культуру мелкоклеточной карциномы легкого H1299 человека, которая утратила экспрессию эндогенного p53. Предельным разведением в 96-луночном плато были получены клоны H1299/ConA-GFP и H1299/ConA-lacZ. При заражении вектором pPS-wtp53 мы наблюдали в этих клетках активацию экспрессии соответствующих репортерных генов. Эффект активации репортерных генов за счет экспрессии p53 дикого типа усиливался обработкой клеток эпопозидом (данные не показаны).

Важной характеристикой репортерных линий является кинетика активации репортера под действием индукторов. Для этих целей мы использовали клон H1299/Twtp53 с тетрациклин-регулируемым p53. Поскольку в клетках H1299 нет эндогенного p53, это позволило превратить их в систему для регулируемой экспрессии p53. В эту культуру были последовательно введены ген тетрациклинового активатора tTA и кДНК p53 дикого типа, клонированная под тетрациклин-регулируемый промотор. При удалении тетрациклина из среды тетрациклин-зависимый активатор tTA в клетках H1299/Twtp53 связывается с элементом TRE синтетического промотора и таким образом запускает экспрессию p53. В свою очередь белок p53 активирует промотор с элементом ConA, что приводит к экспрессии репортерных генов и накоплению белков - GFP или Р-галактозидазы.

Для тщательного исследования кинетики мы по-прежнему преследовали цель достижения высокой чувствительности к присутствию p53 дикого типа, также гомогенности экспрессии и синтеза репортера в разных клетках культуры. Поэтому предельным разведением в 96-луночном плато нами были отобраны индивидуальные клоны H1299/Twtp53/ConA-GFP с введенным репортером pSIP-ConA-GFP и H1299/Twtp53/ConA-lacZ с введенным репортером pSIP-ConA-lacZ. В клетках культур H1299/Twtp53/ConA-GFP, начиная с четвертых-пятых суток культивирования в среде без тетрациклина, наблюдается флуоресценция зеленого бежа (рис 5).

Подобно заражению клеток H1299/ConA-GFP ретровирусом, несущим вектор pPS-wtp53, эффект активации репортерного GFP в клетках H1299/Twtp53/ConA-GFP за счет активации p53 при удалении тетрациклина из среды культивирования усиливался обработкой клеток эпопозидом (данные не показаны).

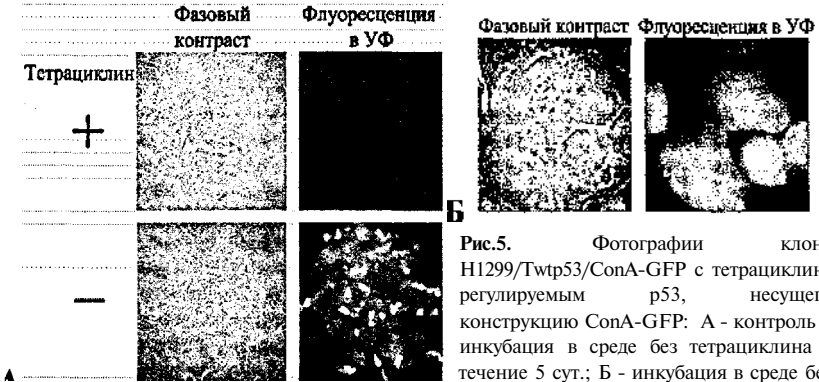
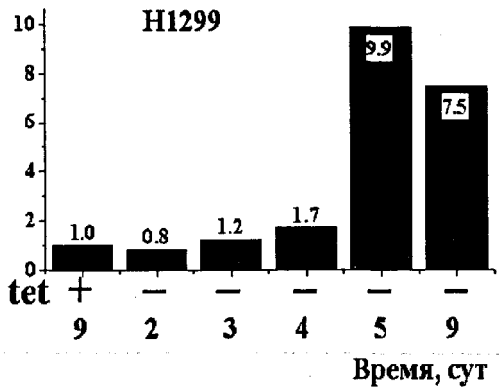


Рис.5. Фотографии клона H1299/Twtp53/ConA-GFP с тетрациклин-регулируемым p53, несущего конструкцию ConA-GFP: А - контроль и инкубация в среде без тетрациклина в течение 5 сут.; Б - инкубация в среде без тетрациклина в течение 5 сут., крупный план.

Диаграмма индукции репортерного гена β -галактозидазы во времени на примере культуры клеток H1299/Twtp53, содержащих конструкцию pSIP-ConA-lacZ, показывает, как происходит функциональная активация p53 во времени (рис.6). Синтез β -галактозидазы на порядок возрастает только на 5-е сутки после культивирования клеток H1299/Twtp53/ConA-lacZ в среде без тетрациклина. Действительно, для активации синтеза β -галактозидазы должно произойти несколько событий: освобождение тетрациклин-зависимого активатора tTA, активация экспрессии p53, накопление белка p53, активация экспрессии гена β -галактозидазы и, наконец, накопление в клетке самой β -галактозидазы.

Рис.6. Кинетика индукции экспрессии репортерного гена β -галактозидазы, контролируемого p53-зависимым промотором, в клетках H1299/Twtp53/ConA-lacZ (клона 3), содержащих тетрациклин-регулируемый p53. Экспрессия p53 начинается при удалении тетрациклина (tet) из среды. По оси ординат отложен относительный уровень β -галактозидазы. Уровень β -галактозидазы в клетках, культивированных в среде с тетрациклином, принят за единицу.



Мы проверяли ряд клонов H1299/Twtp53/ConA-lacZ, фиксированных и окрашенных на стекле X-gal после 3-х и 6-ти суток культивирования в среде без тетрациклина (рис.7). На фотографиях видно, что после 3-х суток культивирования в среде без тетрациклина лишь у небольшой группы клеток H1299/Twtp53/ConA-lacZ появляется слабая голубая окраска. На парных фотографиях, соответствующих тем же клонам после 6-ти суток культивирования в среде без тетрациклина, появляется значительное количество клеток, окрашенных в интенсивно-синий цвет.

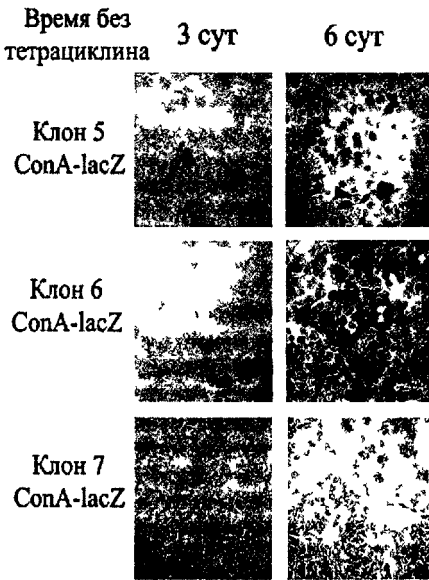


Рис. 7. Фотографии клонов H1299T\wtp53 ConA-lacZ с тетрациклин-регулируемым p53, несущих конструкцию ConA-lacZ. Клетки инкубировали в среде без тетрациклина в течение 3 и 6 суток.

Практически все клетки каждого клона к 6 дню культивирования синтезируют β -галактозидазу и окрашиваются в синий цвет. Интенсивность окраски клеток в популяции может варьировать, возможно, в зависимости от стадии клеточного цикла. Среди полученных клонов H1299/Twtp53/ConA-lacZ встречаются также клоны очень слабо экспрессирующие p-галактозидазный репортер (например, клон 7).

При раститровке ингибирующего действия тетрациклина клетки H1299/Twtp53/ConA-GFP выдерживали 5 суток в среде с малыми концентрациями тетрациклина (0001-0 05 мкг/мл). Было обнаружено небольшое различие в свечении клеток, выдержанных в среде без тетрациклина и клеток, выдержанных в среде с небольшими концентрациями тетрациклина (данные не показаны). Для получения более наглядных результатов подобный опыт был проведен на клонах H1299/Twtp53/ConA-lacZ (рис 8). Содержание 0,050 мкг/мл тетрациклина в среде практически полностью отменяет экспрессию p-галактозидазы с промотора ConA. В исходной культуре H1299, не содержащей p53, при введении pSIP-ConA-lacZ голубой окраски клеток не наблюдается (данные не показаны), что указывает на строгую зависимость экспрессии от p53.

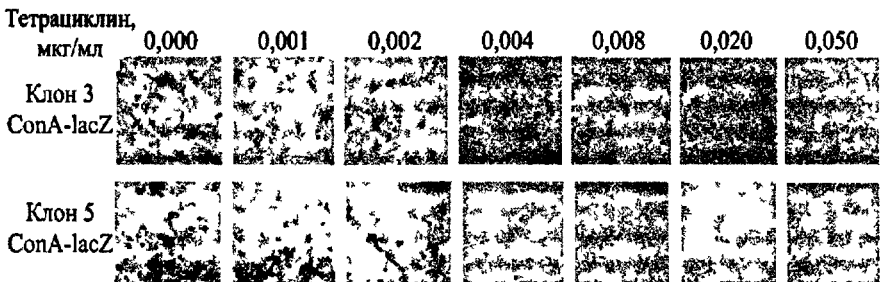


Рис 8. Фотографии клонов H1299/Twtp53/ConA-lacZ с тетрациклин-регулируемым p53, несущих конструкцию ConA-lacZ. Клетки инкубировали в среде с различными концентрациями тетрациклина в течение 5 суток.

Нами была предпринята попытка разработать систему позитивной селекции клеток, экспрессирующих функциональный p53. Для этого мы создали конструкцию pSIP-ConA-hygro, которая содержит два гена устойчивости к антибиотикам - ген устойчивости к пурамицину (puro), контролируемый конститутивным промотором гена H4, и ген устойчивости к гиромоцину (hygro), находящийся под контролем p53-зависимого промотора. Конструкция pSIP-ConA-hygro была испытана на фибробластах крысы Ref52, содержащих p53 дикого типа, и клетках Ref52 с введенным доминантно-негативным мутантом p53 (Ref52/GSE22).

Контрольные клетки Ref52, а также клетки Ref52/GSE22, несущие конструкцию pSIP-ConA-hygro, рассеивали с одинаковой плотностью и культивировали в присутствии гиромоцицина (данные не показаны). Для контроля клетки каждой линии культивировали в среде без антибиотика и в среде с пурамицином. При большой плотности посева заметной разницы в пролиферации клеток Ref52 и Ref52/GSE22, несущих конструкцию ConA-hygro и культивирующихся в среде в гиромоцином не было обнаружено. При меньшей плотности посева и большей концентрации гиромоцицина (1000 мкг/мл) обнаруживалось некоторое уменьшение числа колоний Ref52/GSE22 по сравнению с Ref52, хотя они имели больший размер, вероятно, за счет более высокого пролиферативного потенциала, связанного со снижением активности p53.

В альтернативной постановке эксперимента мы использовали p53-негативные клетки H1299 и клетки H1299 с тетрациклин-регулируемым p53 дикого типа (H1299/Twtp53), несущие конструкцию ConA-hygro.

Клетки рассеивали с одинаковой плотностью и инкубировали часть посева H1299/Twtp53 с тетрациклином, а часть без добавления тетрациклина, тем самым, влияя на экспрессию p53 в клетках H1299/Twtp53. При этом культуры инкубировали с различными концентрациями гиромоцицина. Как и в случае опыта с культурами Ref52, негативное влияние p53 на пролиферацию клеток не позволило выявить достоверного снижения числа гиромоцин-устойчивых колоний p53-негативных клеток (данные не приведены).

Таким образом, указанным способами нам не удалось провести позитивную селекцию клеток, экспрессирующих p53 дикого типа. С одной стороны, присутствие гиромоцицина в среде дает преимущество пролиферации клеток с активным p53, несущих конструкцию ConA-hygro; с другой - клетки, экспрессирующие активный p53, подвергаются задержке пролиферации.

Учитывая эти данные, мы сосредоточились на использовании репортерных конструкций на основе GFP и lacZ. Мы получили ряд культур клеток человека из нормальных и опухолевых тканей, сохранивших эндогенный p53 дикого типа, с введенными pSIP-ConA-GFP и pSIP-ConA-lacZ, и протестировали индукцию репортеров после обработки несколькими химиотерапевтическими препаратами, приводящими к активации p53. Мы исходили из предположения, что по характеру активации репортерного гена можно достаточно уверенно судить о состоянии p53-зависимых сигнальных путей в данном типе клеток. В данных экспериментах, а также в последующих опытах мы использовали поликлональные массовые культуры, прошедшие селекцию на пурамицине и содержащие репортерные конструкции.

После обработки повреждающим ДНК агентом доксорубицином клеток карциномы HCT116 (рис. 9 А, Б) и клеток рака легкого человека A549 (рис. 9 В, Г) (оба типа клеток содержат ген p53 дикого типа) с введенной конструкцией pSIP-ConA-lacZ, наблюдается значительный синтез р-галактозидазы, которая при окраске X-gal придает клеткам синий цвет. В клетках HCT116 с введенным репортером pSIP-ConA-GFP после обработки доксорубицином наблюдается хорошо видимая зеленая флуоресценция (Рис. 9 Д, Е).

Рис.9. Фотографии клеток НСТ116, несущих конструкцию ConA-lacZ

А - контроль, Б - обработка клеток доксорубицином (100 нг/мл) в течение 20 час

Фотографии клеток А549, несущих конструкцию ConA-LacZ В

контроль, Г - обработка клеток доксорубицином (100 нг/мл) в течение 20 час

Фотографии клеток НСТ116, несущих конструкцию ConA-GFP Д

- контроль, Е - обработка клеток доксорубицином (100 нг/мл) в течение 20 час



3. Разработка метода количественного измерения транскрипционной активности p53

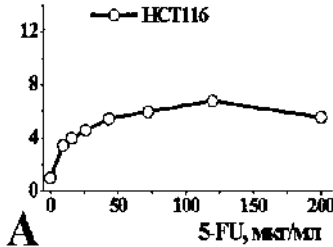
Измерение уровня β -галактозидазы можно проводить количественно в цветной реакции с *o*-нитрофенилгалактопиранозидом (ONPG) Это позволило нам разработать количественный метод для оценки транскрипционной активности p53 в изучаемых типах клеток Активность β -галактозидазы в клетках, выращиваемых в 96-луночных плато и обработанных тем или иным индуктором p53, оценивалась нами следующим образом Сначала измеряли величины поглощения реакционной смеси в лунках и нормировали эти величины на величину поглощения в лунке с необработанными клетками (рис 10 А) Чтобы ввести поправку на гибель клеток под действием проводимых обработок, измеряли величины поглощения раствора в лунках с клетками, прошедшими подобную обработку тем же агентом после окраски по методу Гимза, и нормировали эти величины на величину поглощения лунки с необработанными клетками Таким образом, получали кривые гибели клеток (рис 10 Г)

Поэтому график реальной активации β -галактозидазы учитывал только вклад выживших клеток (рис 10 Б) Активация экспрессии β -галактозидазы в клетках карциномы НСТ116 (содержит эндогенный p53 дикого типа) после обработки химиотерапевтическим препаратом 5-фторурацилом (5-FU) (рис 10 А, Б) сопровождается накоплением белка p53, что хорошо согласуется с накоплением белка p21 (рис 10 В) - продукта эндогенной транскрипционной мишени p53, гена p21^{WAF1/Cip1}, ответственного за остановку клеток в фазе G1 клеточного цикла Таким образом, нами было установлено, что данная репортерная система вполне адекватно отражает изменения функциональной активности p53

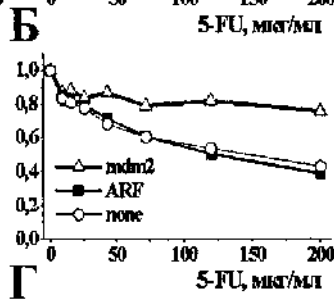
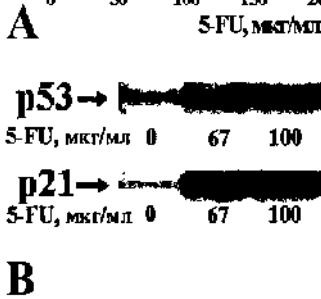
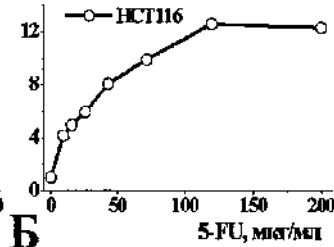
И

Рис.10 Демонстрация результатов измерения в 96-луночном плато на примере обработки клеток НСТ116 5-фторурацилом (5-FU):

А - Изменение относительного уровня β -галактозидазы (отложен по оси ординат) в клетках НСТ116 после обработки 5-FU без нормирования на количество живых клеток в лунке. Уровень β -галактозидазы в необработанных клетках НСТ116 принят за единицу.



Б - Изменение относительного уровня β -галактозидазы (отложен по оси ординат) в клетках НСТ116 после обработки 5-FU с нормированием по количеству живых клеток в лунке. Уровень β -галактозидазы в необработанных клетках НСТ116 принят за единицу.



В - Вестерн-блот анализ изменения количества белков p53 и p21 в клетках НСТ116 после обработки 5-FU.

Г - Зависимость гибели трех сублиний НСТ116/mdm2, НСТ116 и НСТ116/ARF под действием 5-FU, полученная путем измерения интенсивности окраски фиксированных клеток по методу Гимза. Интенсивность окраски на количество живых клеток в лунках, не обработанных 5-FU, принята за единицу для каждой линии.

Л Сравнительный анализ трансаактивационных свойств p53 в различных культурах клеток

Для определения тонких различий в характере функционирования p53-зависимых сигнальных путей нами были использованы субкультуры клеток карциномы толстого кишечника НСТ116 с введенными генами, для которых известно, что они влияют на транскрипционную активность p53. Культура НСТ116/mdm2 экспрессирует ген введенного природного ингибитора белка p53, белка mdm2. Культура НСТ116/ARF экспрессирует ген ARF, продукт которого препятствует tcl2-зависимой деградации p53. Данные клетки, а также контрольную культуру НСТ116, высевали на 96-луночные плато и обрабатывали параллельно двенадцатью веществами, известными как индукторы активности p53 и применяющимися в химиотерапии рака. Результаты данного опыта могли указывать на роль генов mdm2 и ARF в модуляции ответа опухолевых клеток на химиотерапевтическую индукцию p53.

Как видно из диаграмм рис. 11, во всех трех линиях транскрипционная активность белка р53 относительно активности в контрольных необработанных клетках, повышается приблизительно одинаково в ответ на обработку всеми исследованными веществами, за исключением 5-FU и PALA.

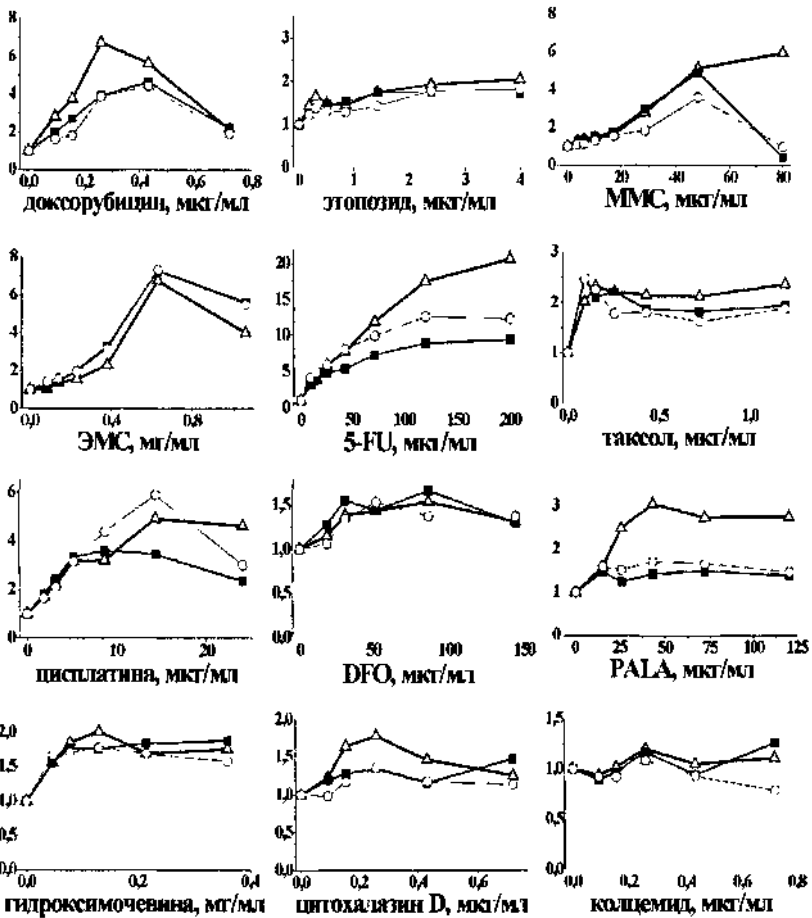
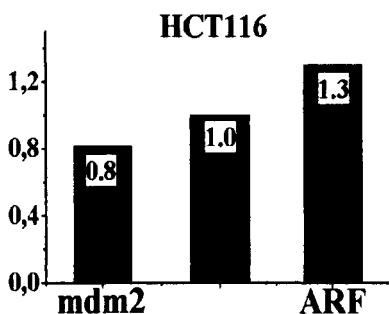


Рис.11. Сравнительный анализ изменения относительного уровня р-галактозидазы (отложен по оси ординат) в клетках трех сублиний НСТ116/mdm2, НСТ116/ARF и НСТ116 под действием различных химиотерапевтических агентов с нормированием по количеству живых клеток.

Уровень Р-галактозидазы в необработанных клетках принят за единицу для каждой линии. Клетки обрабатывали в течение 24 час. каждым из веществ, за исключением доксорубина и этопозид, в случае которых обработку проводили в течение 36 часов. Принятые сокращения: MMC - метил-метан сульфонат, ЭМС - этил-метан сульфонат, 5-FU - 5-fluoro uracil (5-фторурацил), DFO - deferoxaminum (дефероксамин), PALA - N-(phosphonacetyl)-L-aspartic acid (N-фосфонацетил-L аспарагиновая кислота). Полученные результаты - усреднение трех независимых опытов.

По-видимому, расхождение графиков активности р-галактозидазы в случае обработки 5-FU (приводит к блокированию синтеза ДНК и к образованию структурно несовершенной РНК) клеток НСТ116/mdm2, НСТ116/ARF и НСТ116 обусловлено большой относительной величиной активации р53 (больше, чем в 7 раз). В случаях обработки всеми остальными веществами при невысокой степени активации р53 (меньше, чем в 7 раз) очевидно пропорциональное элиминирование различий, обусловленных разницей между уровнями Р-галактозидазы (рис.12) в клетках трех линий НСТ116, при подсчете относительного уровня активности р-галактозидазы в ответ на обработку в клетках каждой линии (рис.11). Возможно, предел ингибирующего действия mdm2 на трансактивацию р53 объясняет то, почему при существенной активации р53 (больше, чем в 7 раз) в клетках НСТ116/mdm2 в ответ на 5-FU относительная активность Р-галактозидазы проявляется сильнее, чем в родительской линии НСТ116. Подобно последнему замечанию, возможно, активирующего действия ARF при высокой активации р53 в клетках НСТ116/ARF недостаточно, и график относительной активности р-галактозидазы в клетках НСТ116/ARF проходит ниже графика родительской линии НСТ116.

Рис 12. Соотношение уровней р-галактозидазы в необработанных клетках трех сублиний НСТ116/mdm2, НСТ116 и НСТ116/ARF. За единицу принят уровень Р-галактозидазы в клетках НСТ116.



Определение количества белка в этих клетках с помощью метода вестерн-блоттинга указывает на то, что уровень р53 и его транскрипционной мишени - белка р21 - в контрольных необработанных клетках НСТ116/ARF (по сравнению с контрольными необработанными клетками НСТ116/mdm2 и НСТ116) более высок (рис. 13). Повышенное содержание белков р53 и р21 в контролях согласуется с данными, представленными на диаграмме рис. 12 и может быть объяснено активирующим действием ARF на р53. В случае обработки 5-FU во всех трех культурах накапливается р53, и р21; однако в клетках НСТ116/ARF различие в количестве белка р53 между контролем и обработанными клетками невелико, поскольку уровень белка р53 в контрольных клетках достаточно высок и без обработок (рис. 13).

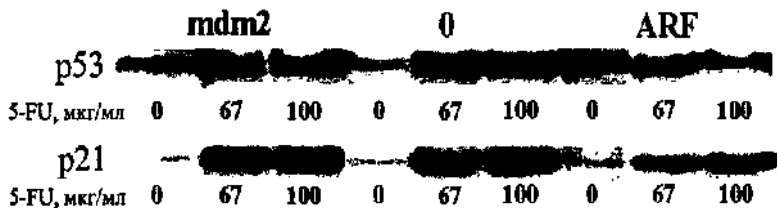


Рис.13. Вестерн-блот анализ изменения количества белков р53 и р21 в клетках НСТ 116, содержащих эндогенный р53 дикого типа, после обработки 5-фторурацилом (5-FU) в течение 24 час.

Следует отметить, обработка PALA приводит к реактивации подавленных путей индукции белка p53 в клетках HCT116/mdm2, в результате чего в этих клетках наблюдается в два раза более высокое повышение относительного уровня β -галактозидазы в ответ на обработку PALA по сравнению с контролем, чем в клетках HCT116 и HCT116/ARF (рис. 11). В ответ на обработку PALA происходит накопление белка p53 во всех трех культурах, но это не сопровождается увеличением синтеза белка p21 (данные не показаны). Возможно, это объясняется относительно слабой индукцией активности p53. Эффект PALA связан с угнетением фермента аспаргат-транскарбамилазы, что приводит к подавлению в клетках синтеза цитозин- и уридинтрифосфатов, которое через определенный промежуток времени приводит к нарушениям синтеза нуклеиновых кислот, повреждениям ДНК и активации p53. Интересно отметить, что PALA используется для повышения терапевтического действия 5-FU при раке толстого кишечника.

Клетки HCT116 являются классической моделью клеток рака толстого кишечника, использованной для выявления ряда конкретных генетических повреждений, имеющих место в этом типе раковых клеток. В клетках HCT116 из-за мутации в 13 кодоне постоянно активирован Ki-ras ген. В них также отсутствует одна аллель гена-стимулятора апоптоза Bax, который также является транскрипционной мишенью p53. Это может частично объяснять тот факт, что устойчивость клеток HCT116 к апоптозу в ответ на обработку 5-FU повышена. Наблюдается в этих клетках также гиперэкспрессия гена белка mdm2, что, вероятно, обуславливает высокую пролиферативную активность клеток HCT116 и, соответственно, их устойчивость к обработке химиотерапевтическими агентами. В наших опытах мы наблюдали, что при дополнительной экспрессии mdm2 выживаемость клеток HCT116/mdm2 в ответ на обработку практически всеми химиотерапевтическими препаратами по сравнению с клетками HCT116 и HCT116/ARF повышается еще более (рис. 10, пример обработки 5-FU).

Для многих раковых опухолей характерна гиперэкспрессия mdm2 при сохраненной функции p53. Нам кажется, что более сильное повышение при обработке PALA и 5-FU относительного уровня активности p53 в клетках культуры HCT116/mdm2 по сравнению с родительской линией HCT116, которой уже присуще повышение экспрессии mdm2, и клинически испытанное совместное использование PALA и 5-FU для лечения рака толстого кишечника - неслучайная корреляция. Объяснение этих наблюдений требует дальнейшего исследования. Оба химиотерапевтических антиметаболита вызывают нарушения пула нуклеотидов в клетке: PALA является ингибитором фермента аспаргат-транскарбамилазы, а 5-FU - превращается в раковых клетках в 5-фтор-2-дезоксидеоксиуридин-5'-монофосфат, который является конкурентным ингибитором фермента тимидилатсинтетазы. Кривые гибели клеток линий HCT116/ARF и HCT116 в ответ на обработку PALA (данные не показаны), также как и в ответ на обработку 5-FU (рис. 10, Г) практически совпадают, а кривые гибели клеток HCT116/mdm2 в ответ на обработку PALA и 5-FU идут выше кривых гибели других двух линий. Возможно поэтому, в клетках линии HCT116/mdm2 активация p53 проявляется сильнее в ответ на обработку PALA и 5-FU благодаря завышенному пролиферативному потенциалу HCT116/mdm2 по сравнению с родительской линией HCT116. В клетках HCT116/mdm2 ускоренно протекают такие пролиферативные метаболические процессы, как синтез нуклеиновых кислот. Соответственно, ускоренное накопление повреждений, специфично вызванное именно нарушениями пула нуклеотидов в клетках HCT116/mdm2, может способствовать повышенной относительной активации p53 в этих клетках по сравнению с родительской линией и линией HCT116/ARF.

Кроме различий в активации p53 в трех линиях HCT116 в ответ на обработку 5-FU и PALA заметно также, что в ответ на обработку MMC (алкилирующий ДНК агент) культура HCT116/mdm2 проявляет более высокий цитотоксический порог чувствительности к действию данного агента по сравнению с родительской культурой HCT116, а также с культурой HCT116/ARF.

Активация p53 может происходить с использованием различных сигнальных путей. Например, в отличие от реакции клеток НСТ116 трех сублиний на обработку 5-FU, которая сопровождается повышением уровней белков p53 и p21, обработка ММС не приводит к заметному накоплению этих белков (данные не показаны), хотя активность р-галактозидазы в клетках НСТ116 и повышается в 3-5 раз (рис. 11). Это хорошо согласуется с данными, указывающими на возможность повышения активности p53 под действием ММС за счет конформационных перестроек белка. Как известно, активация белка p53 не всегда сопровождается количественным увеличением его уровня. Аналогично, не наблюдается накопления этих белков в клетках НСТ116/mdm2, НСТ116/ARF и НСТ116 в ответ на обработку цитохалазином D, блокирующим рост актиновых филаментов (данные не показаны), что согласуется с фактом слабой (1,5 раза) активации в них экспрессии репортера Р-галактозидазы (рис. 11). В то же время, в ответ на обработку клеток коллестимидом, разрушающим микротрубочки, происходит накопление небольшого количества белка p53 и слабая активация синтеза p21 (данные не показаны) при относительно низком уровне синтеза репортера.

Для того, чтобы показать другие возможности репортерной системы, мы сравнивали характер индукции p53 в четырех культурах, являющихся производными клеток соединительной ткани человека (рис.14). Клетки HEF (фибробласты 8-недельного эмбриона человека) и WI38 (фибробласты легкого 5-месячного эмбриона человека) представляют собой нормальные первичные клетки. Клетки HT1080 и U2OS соответственно происходят из фибро- и остеосарком человека. Несмотря на то, что культуры нормальных клеток HEF и WI38, как можно ожидать, не должны иметь повреждений в p53-зависимых путях, были отмечены некоторые различия в характере индукции репортерного гена в ответ на различные обработки в этих культурах.

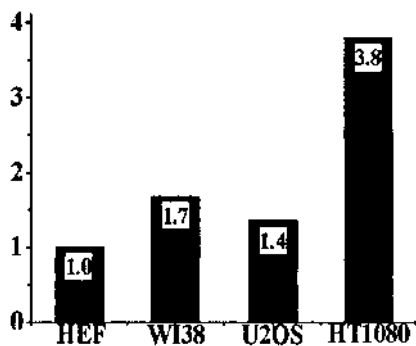


Рис.14. Соотношение уровней р-галактозидазы в необработанных клетках линий HEF, WI-38, HT1080 и U2OS. За единицу принят уровень р-галактозидазы в клетках HEF.

Так, в ответ на добавление доксорубина (блокирует матричную активность ДНК в системах ДНК-полимеразы и ДНК-зависимой РНК-полимеразы) и цисплатины (алкилирует и сшивает нити ДНК) функциональная активация p53 в клетках HEF проявляется сильнее, чем в других клетках; в том числе она выше, чем в клетках WI38 (рис.15). Оба агента (доксорубин и цисплатина) приводят к нарушению синтеза ДНК. Но после обработки цитохалазином D (блокирует рост актиновых филаментов) активация p53 в клетках HEF не наблюдается (рис. 15). В клетках WI38 p53 активируется наиболее заметно при обработке 5-FU (в 10 раз), тогда как в других культурах, в том числе и клетках HEF, он активируется всего лишь в 3-5 раз (рис. 15). При этом наблюдается значительное накопление белка p53 во всех культурах (рис. 16), в том числе в клетках U2OS, где его уровень низок, возможно, вследствие метилирования промотора гена ARF. Активацию синтеза p21 при обработке 5-FU удалось обнаружить только в клетках WI38 и U2OS (рис. 16).

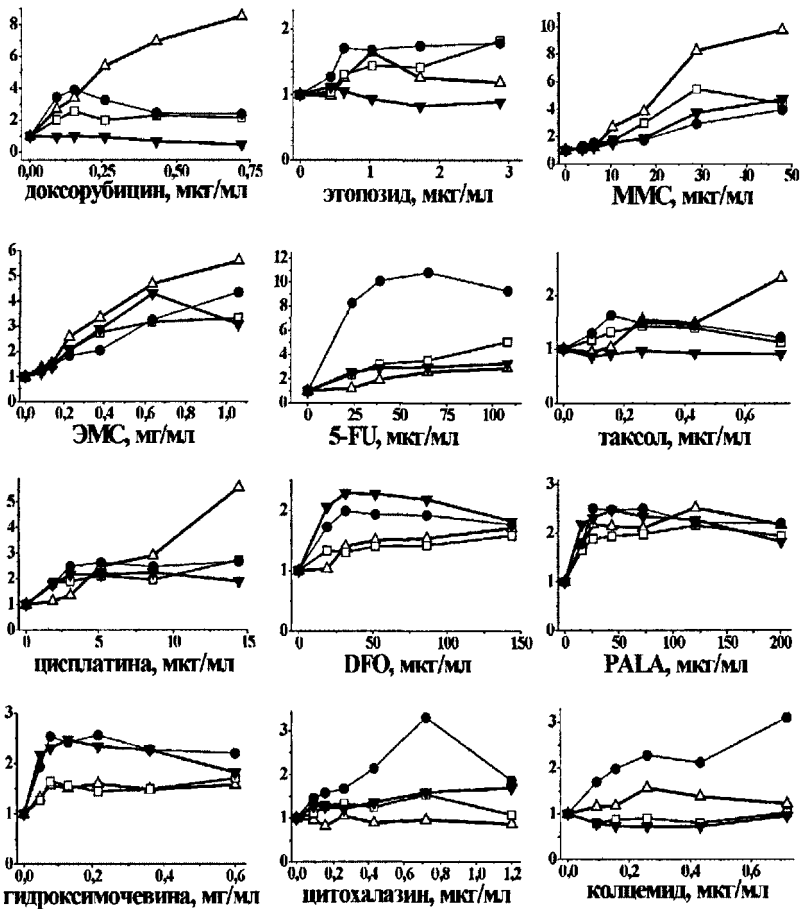
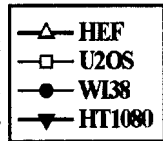


Рис.15. Сравнительный анализ изменения относительного уровня р-галактозидазы (отложен по оси ординат) в клетках четырех фибробластоподобных линий HEF, WI-38, HT1080 и U2OS под действием различных химиотерапевтических агентов с нормированием по количеству живых клеток. Уровень β -галактозидазы в необработанных клетках принят за единицу для каждой линии.



Клетки обрабатывали в течение 24 час. каждым из веществ, за исключением доксорубина и этопозид, в случае которых обработку проводили в течение 36 часов. Принятые сокращения - как на рис. 11. Полученные результаты - усреднение трех независимых опытов.

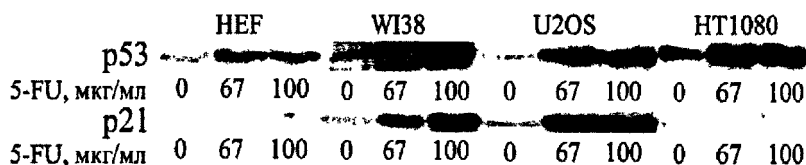


Рис.16. Вестерн-блот анализ изменения количества белков p53 и p21 в клетках четырех линий, содержащих эндогенный p53 дикого типа, после обработки 5-фторурацилом (5-FU) в течение 24 час.

Интересно отметить, что в клетках HT1080, в ответ на обработку ингибиторами топоизомеразы II - доксорубином и этопозидом, а также при обработке таксолом и колцемидом, препятствующими правильной сборке микротрубочек, активность β -галактозидазы практически не повышается (рис. 15). Это не может объясняться только исходно высоким уровнем экспрессии p53-зависимого репортера в необработанных клетках HT1080 (рис. 14), т.к. в ответ на обработку остальными веществами в клетках HT1080 происходит индукция Р-галактозидазной активности, сравнимая с реакцией других типов клеток (рис. 15). Возможно, в активации p53 в ответ на действие этих четырех веществ задействованы сигнальные биохимические пути, испорченные в опухолевых клетках HT1080. Например, известно, что в индукции p53 под действием таксолола участвуют MAP-киназные пути. Клетки HT1080 экспрессируют активированный онкоген Ras, что сопровождается постоянной активацией MAP-киназного каскада в них и, соответственно, повышением уровня белка и активности p53 (см. рис. 14, 16). Если предположить, что за активацию p53 под действием таксолола отвечают те же каскады, которые активированы в клетках HT1080 экспрессией онкогена Ras, становится понятно, почему мы в данном случае не наблюдаем повышения активности p53.

Особенностью клеток U2OS является отсутствие реакции на обработку колцемидом (рис.15). На остальные вещества клетки реагировали приблизительно одинаково, хотя можно отметить несколько более низкий уровень активации p53 в более медленно растущих клетках U2OS и HEF в опытах, где клетки обрабатывали дефероксамином (имитатор гипоксии) и гидроксимочевинной, ингибирующей синтез ДНК. Практически одинаковая реакция характерна для всех типов клеток в ответ на обработку этилметансульфонатом (ЭМС, алкилирующий агент), хотя заметное накопление белка p53 при этом наблюдалось только в клетках WI38 (данные не показаны).

Каждая человеческая культура, несущая репортерную конструкцию β -галактозидазы, проявляет собственный портрет активации p53 в ответ на различные химиотерапевтические агенты, в соответствии с специфическим состоянием сигнальных путей в клетках этой культуры. Предлагаемый в работе способ оценки транскрипционной активности p53 по p53-зависимому синтезу β -галактозидазы (метод окраски ONPG) в 96-луночном плато позволяет количественно характеризовать изменения активации антионкогена p53 в зависимости от вариаций внутриклеточного контекста. Мы использовали двенадцать химиотерапевтических агентов различной природы, вызывающих повреждение ДНК или цитоскелета. В литературе есть сведения о вызываемой этими веществами активации определенных биохимических каскадов в клетке. При надлежащем выборе химических агентов, вызывающих активацию p53, возможно выбрать тестовую систему для проверки состояния сигнальных путей клетки, связанных с p53.

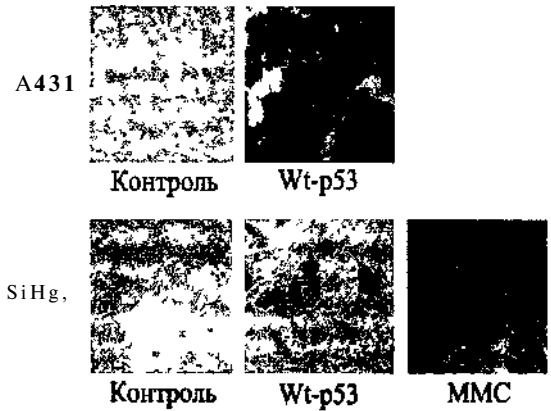
5. Применение р53-зависимых репортерных систем для поиска химических реактиваторов р53 в опухолевых клетках

Как известно, функция р53 повреждена в подавляющем числе злокачественных заболеваний человека. Утрата активности р53 сопровождается значительным уменьшением генетической стабильности и быстрым отбором наиболее агрессивно растущих опухолевых клеток. Известно также, что опухолевые клетки приобретают повышенную чувствительность к экспрессии экзогенно-введенного р53 дикого типа. Это обстоятельство в последнее время служит основой для разработки новых терапевтических схем, например, подхода с использованием рекомбинантных аденовирусов, экспрессирующих дикий р53. Альтернативным подходом для терапевтического восстановления активности р53 в опухолевых клетках может быть химическая реактивация р53. Известно, что приблизительно половина опухолей человека экспрессирует высокий уровень мутантного р53. В случае подбора химического вещества, способного при взаимодействии с мутантным р53 исправлять его конформацию и восстанавливать транскрипционную активность, можно ожидать проявления выраженного токсического эффекта, который должен быть специфичным в отношении опухолевых клеток и не затрагивающим нормальные клетки. Кроме точечных мутаций в самом гене, функция р53 может повреждаться за счет других механизмов. В частности, более 95% случаев рака шейки матки связано с инактивацией р53 под действием продукта гена Е6 вируса папилломы человека HPV16. Взаимодействие белка Е6 с р53 приводит к активации клеточной Е3 лигазы Е6-AP и быстрой протеолитической деградации р53. Благодаря тому, что в клетке сохраняются неповрежденными все компоненты р53-зависимой системы, в случае подавления активности вирусных генов может происходить индукция р53, сопровождающаяся ограничением пролиферации и гибелью клеток рака шейки матки. Таким образом, в данном случае можно проводить поиск химических соединений, препятствующих взаимодействию вирусного белка Е6 с р53, или атакующих другие стадии вирус-специфического подавления активности р53. Подобные соединения могут стать прототипами новых высокоспецифичных химиотерапевтических противоопухолевых препаратов.

Разработанная нами высокочувствительная система определения активности р53 может быть использована для широкомасштабного поиска химических реактиваторов р53 в различных опухолевых клетках человека. Для демонстрации возможностей данного подхода нами были использованы две модели опухолевых клеток человека, в которых р53 инактивирован за счет различных механизмов. В клетках А431 (эпидермоидная карцинома человека) ген р53 мутирован в 273 кодоне, в результате чего клетки экспрессируют высокий уровень мутанта р53-His273. В клетках SiHa (рак шейки матки) активность р53 подавлена за счет экспрессии гена Е6 вируса папилломы HPV16. При введении р53-зависимого репортера рSIP-ConA-lacZ в клетки А431 и SiHa и окраске X-gal активность Р-галактозидазы не детектируется (рис. 17). При заражении клеток А431 рекомбинантным лентивирусом, экспрессирующим р53 дикого типа, появляются клетки с ярко выраженной активностью β -галактозидазы, что указывает на появление в них транскрипционной активности р53. При аналогичном введении р53 дикого типа в клетки SiHa индукция активности р53 происходит слабо, так как экзогенный р53 подвергается быстрой деградации под действием бежа Е6 вируса папилломы. Для подбора условий, при которых активность репортера проявляется, мы провели экспрессию специфической siPHK против гена Е6 HPV16. Мы провели заражение клеток SiHa рекомбинантным лентивирусным конструктором, в котором шпилечная РНК, соответствующая участку гена Е6, экспрессируется под контролем промотора гена HI РНК (транскрибируется РНК полимеразой III). Кроме того, мы провели обработку клеток SiHa рядом известных индукторов активности р53 и обнаружили, что MMC (метилметан сульфонат) вызывает исключительно сильную активацию β -галактозидазы в клетках SiHa (рис.17). Механизм действия MMC на активность р53 в клетках SiHa не совсем ясен.

Однако данная обработка могла служить позитивным контролем при поиске других химических соединений, реактивирующих p53

Рис.17. Фотографии клеток A431 и SiHa, несущих конструкцию ConA-lacZ. контроль, через 4 суток после заражения лентивирусными векторами, экспрессирующими p53 дикого типа, а также обработка MMC (40 мкг/мл) в течение 24 часов в случае клеток SiHa



Из массовых культур клеток A431 и SiHa были отобраны клоны, обладающие минимальным фоном экспрессии β -галактозидазы без действия индуктора, но демонстрирующие максимальную индукцию репортера при контрольных обработках (введение рекомбинантного p53 дикого типа для линии L431 и действие MMC для линии SiHa) Эти клоны были переданы в компанию "Quark Biotech Inc" (Ness Ziona, Israel) для проведения широкомасштабного скрининга химической библиотеки Скрининг проводился следующим образом репортерные линии клеток высевали на 384-луночные плато, в каждую лунку добавляли ростовую среду, содержащую 10 мкг/мл индивидуального соединения из химической библиотеки (46 тыс соединений, производитель - компания "ChemBndge Corp", San Diego, California) После этого клетки инкубировали 20 часов в инкубаторе Далее инкубационную среду удаляли, клетки инкубировали в лизирующе-красящем буфере, содержащем ONPG, в течение 2 часов Реакцию активации β -галактозидазы измеряли с помощью прибора Microplate Reader при длине волны 414 нм Процедуру скрининга проводили трехкратно, усредняли результат, после чего отбирали химические соединения, вызывающие двух и более кратное повышение активности β -галактозидазы Наиболее активные из отобранных соединений затем тестировали на определение дозозависимой индукции репортера в соответствующей репортерной культуре (рис 18) Структура одного из соединений, активирующих репортер в клетках A431 - A-343, и одного соединения, влияющего на p53-зависимую транскрипцию в клетках SiHa - S-742 показана на рис 19

Рис 18. Дозозависимая индукция β -галактозидазного репортера в клетках A431, обработанных четырьмя соединениями, выявленными при скрининге химической библиотеки Уровень активности β -галактозидазы (отложен по оси ординат) в необработанных клетках принят за единицу

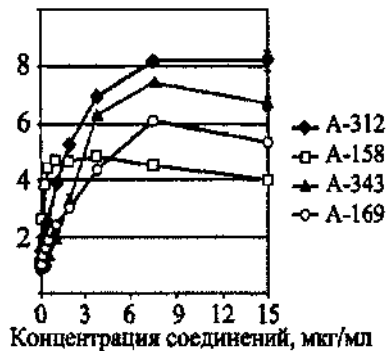
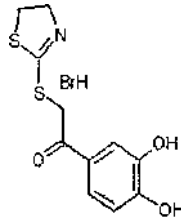
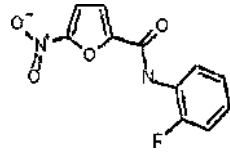


Рис. 19. Структура двух соединений, активирующих р53-зависимый β -галактозидазный репортер в клетках A431 (A-343) nSiHa(S-742).



A-343



S-742

Отобранные соединения подвергали дополнительному тестированию на специфичность их действия, инкубируя с рядом контрольных репортерных линий. В число контрольных входили следующие линии клеток человека с введенным конструктором рSIP-ConA-LacZ: НСТ116, экспрессирующие р53 дикого типа; Н1299, негативные по экспрессии р53; С33А - клетки рака шейки матки, экспрессирующие мутант р53-Cys273 и негативные по экспрессии генов вируса HPV16; SiHa клетки с подавленной экспрессией эндогенного р53 (за счет введенной siРНК). Обработка клеток А431 (рис. 20 А) и SiHa (рис. 20 Б) отобранными соединениями А-343 и S-742 приводила к зависимому от дозы возрастанию экспрессии Р-галактозидазного репортера. Соединение А-343, отобранное на линии клеток А431, не вызывало индукции репортера на р53-негативных клетках Н1299, также как и на экспрессирующих эндогенный р53 дикого типа клетках НСТ116, что говорит о специфичности соединения А343 к реактивации мутанта р53-His273. Соединение S-742, отобранное на клетках SiHa, не вызывало активации р-галактозидазы в HPV16-негативных клетках С33А. Обработка клеток SiHa siРНК к р53 приводила к практической потере способности индуцировать β -галактозидазу под действием S-742, что указывает на роль реактивированного р53 в индукции репортера.

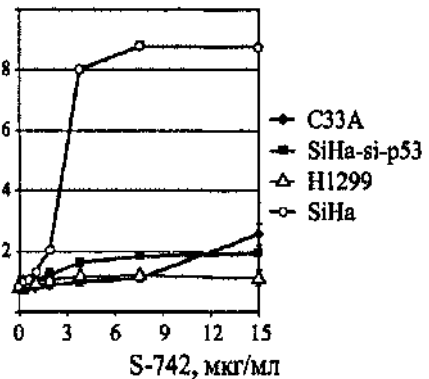
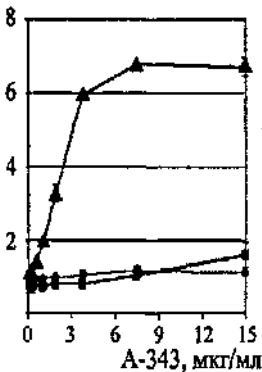


Рис. 20. Определение зависимости индукции β -галактозидазного репортера под действием соединения А-343 (А) и S-742 (Б) от состояния р53-зависимых сигнальных путей в различных культурах клеток. Уровень активности β -галактозидазы в необработанных клетках принят за единицу.

Адекватность индукции репортера по отношению к повышению трансктивирующих свойств p53 была продемонстрирована с помощью Northern-гибридизаций РНК из клеток SiHa, обработанных соединением S-742 с пробами на p53-респонсивные гены p21, IGF-BP3 и hdm2 (рис. 21).

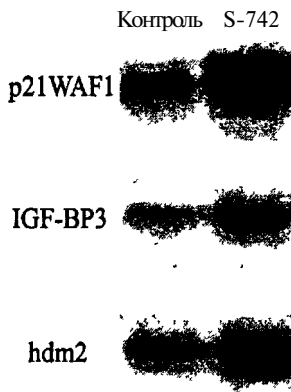


Рис. 21. Индукция p53-зависимых генов после обработки клеток SiHa соединением S-742 (при 10 мкг/мл в течение 20 часов), Northern-гибридизация.

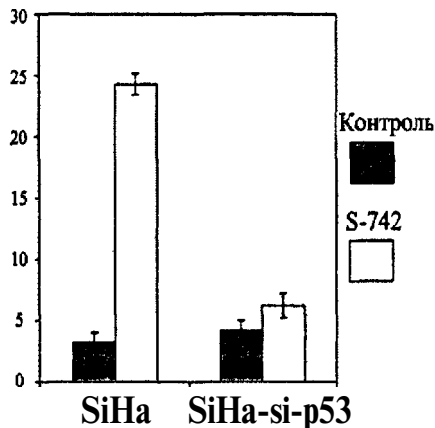


Рис. 22. Индукция апоптоза через 48 часов после добавления к клеткам SiHa и SiHa-si-p53 соединения S-742 (10 мкг/мл), процент Annexin V-положительных клеток.

Кроме того, в клетках SiHa, обработанных соединением S-742 (10 мкг/мл) детектировался повышенный уровень апоптоза при окраске Аннексином V (рис. 22). При обработке клеток SiHa с введенной siРНК к p53 уровень апоптоза был значительно снижен, что указывает на роль реактивированного p53 в индукции апоптоза под действием обработки соединением S-742.

Приведенные примеры применения репортерных систем для идентификации соединений, которые реактивируют поврежденные p53-зависимые пути в опухолевых клетках, указывают на возможности, открываемые использованием данных систем. В настоящее время в нашей лаборатории в сотрудничестве с несколькими компаниями продолжается поиск химических соединений, влияющих на активность p53-зависимых сигнальных путей в нормальных, а также в опухолевых клетках различного происхождения. Такие соединения могут стать прототипами новых противоопухолевых препаратов.

Помимо использования для поиска химических веществ, влияющих на активность p53, данная система может найти применение для поиска новых генов или отдельных генетических элементов, активность которых влияет на функцию p53. Экспрессионные библиотеки кДНК, или библиотеки siРНК, соответствующие различным генам, могут быть введены в культуры, содержащие p53-зависимый GFP-репортер, после чего клетки с измененной активностью p53 могут отбираться на клеточном сортере с последующим анализом кДНК или siРНК. Данный подход в настоящее время активно разрабатывается в нашей лаборатории в сотрудничестве с компанией "System Biosciences" (Mountain View, California). По аналогии с описанной здесь p53-зависимой репортерной системой создаются и используются системы для анализа других транскрипционных факторов, активность которых меняется при различных патологических состояниях, например, факторов E2F, NFkB, p73, H1F1a и других. Создание семейства репортеров, обнаруживающих активность определенных транскрипционных факторов, безусловно, даст новый мощный инструмент¹ для функциональной геномики, а также для поиска новых противоопухолевых препаратов.

Выводы

1. Созданы самоинактивирующиеся ретровирусные р53-зависимые репортерные конструкции рSIP-ConA-GFP (с геном зеленого флуоресцентного белка), рSIP-ConA-lacZ (с геном бактериальной Р-галактозидазы) и конструкция рSIP-ConA-hygro (с геном устойчивости к гиромоцину), которые обеспечивают эффективное и стандартизированное введение репортерного гена в культуры клеток различного происхождения.
2. Получена панель крысиных, мышинных и человеческих культур, гомогенно экспрессирующих полученные репортерные конструкции. Репортерная конструкция рSIP-ConA-lacZ благодаря недолгому времени жизни β -галактозидазы дает преимущество для исследования кинетики активации р53, конструкция рSIP-ConA-GFP удобна для визуального обнаружения отдельных клеток с активным р53. Использование репортерных конструкций рSIP-ConA-GFP и рSIP-ConA-hygro позволяет проводить позитивную селекцию клеток с функционально-активным р53.
3. Метод определения репортерной β -галактозидазы в 96-луночном плато дает количественную оценку транскрипционной активности р53, что подтверждено четкой корреляцией между активацией синтеза репортерной β -галактозидазы, накоплением белка р53 и активацией продукта гена-мишени р53 - белка р21.
4. С использованием конструкции рSIP-ConA-lacZ проведен сравнительный анализ активации р53 в трех сублиниях карциномы человека НСТ116, экспрессирующих гены mdm2 и ARF, влияющие на транскрипционную активность р53, а также в четырех независимых культурах клеток человека, имеющих соединительно-тканное происхождение. Продемонстрирована возможность выявления тонких различий в активации р53 в ответ на различные воздействия, что позволяет оценивать функциональное состояние отдельных элементов сигнальных путей активации р53 и получать индивидуальный портрет клеточной культуры по характерным реакциям на обработку стрессовыми агентами.
5. С использованием полученных конструкций в результате скрининга химической библиотеки отобраны соединения, реактивирующие транскрипционно-активный р53 в репортерных культурах человека А431 (эпидермоидной карциномы с мутантным р53) и SiHa (карциномы шейки матки с инактивированным белком р53). Показано, что реактивированный р53 способен индуцировать р53-зависимые гены и вызывать апоптоз.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Струнина С.М., Иванов А.В., Чумаков П.М. "Разработка репортерной системы для тонкой количественной оценки активности белка р53 в культурах клеток" - Молекулярная биология, 2003, том 37, № 6, с. 1007-1018.
2. Моргункова А.А., Алмазов В.П., Струнина С.М., Копнин Б.П., Чумаков П.М. "Доминантно-негативная инактивация р53: влияние количественных соотношений трансдоминантного ингибитора и его мишени" - Молекулярная биология, 2003, том 37, № 1, с. 112-120.
3. Струнина С.М. "Сравнительное изучение транскрипционной активности белка р53 в иммортализованных фибробластах". - XL Юбилейная научная конференция МФТИ, Долгопрудный, 28-29 ноября 1997. Тезисы докладов, вып.3, с.84.

4. Струнина С.М., Иванов А.В., Чумаков П.М. "Система, позволяющая изучать трансактивационную функцию антионкогена p53". - Школа-конференция "Горизонты физико-химической биологии", Пущино, 28 мая-2 июня 2000. Тезисы, том 2, VIII.28, с.138-139.
5. Струнина С.М. "Измерение функциональной активности онкосупрессора p53: сравнительный портрет активации в человеческих линиях в ответ на обработку химиотерапевтическими агентами" - XVI зимняя молодежная научная школа "Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии", Москва, 9-12 февраля 2004. Тезисы докладов и стендовых сообщений, с.95.

Отпечатано ООО «РЕГЛАНТ»
Бумага офсетная. Печать офсетная.
Тираж 100 экз. Заказ № 327
115230, г. Москва, Электролитный пр., д. 3Б, а р. 1-7.
Тел.: 317-70-09.

№ 19142

РНБ Русский фонд

2005-4

16736