

УДК 576.32/.36

Роль дигидрооротатдегидрогеназы в индукции апоптоза при ингибировании III комплекса дыхательной цепи митохондрий

А. А. Хуторненко¹, А. А. Далина³, Б. В. Черняк¹, П. М. Чумаков³, А. Г. Евстафьева^{1,2*}¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40²Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119992, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

*E-mail: Evstaf@genebee.msu.ru

Поступила в редакцию 12.08.2013

РЕФЕРАТ Изучен механизм включения программируемой клеточной смерти (апоптоза) при нарушении функционирования дыхательной цепи митохондрий. Ранее мы обнаружили, что ингибирование митохондриального цитохрома *bc1* (комплекса III дыхательной цепи) приводит к повышению уровня и активности опухолевого супрессора p53 и индукции апоптоза. С дыхательной цепью сопряжен путь биосинтеза пиримидинов *de novo* через митохондриальную дигидрооротатдегидрогеназу (ДГОДГ). Нами показано, что причиной активации p53 при ингибировании комплекса III дыхательной цепи митохондрий служит нарушение работы ДГОДГ и биосинтеза пиримидинов *de novo*. Однако является ли подавление функционирования ДГОДГ основной причиной включения апоптотической программы клетки при ингибировании комплекса III дыхательной цепи, оставалось не выясненным. В настоящей работе установлено, что апоптотическую гибель клеток рака толстого кишечника человека при действии миксотиазола – ингибитора комплекса III дыхательной цепи митохондрий – предотвращают уридин и оротат (продукт реакции, катализируемой ДГОДГ), но не дигидрооротат (субстрат ДГОДГ). Следовательно, индукция апоптоза при нарушении работы комплекса III обусловлена ингибированием ДГОДГ и, как следствие, биосинтеза пиримидинов *de novo*. Этот вывод подтвержден результатами опытов по подавлению экспрессии ДГОДГ с помощью РНК-интерференции. Оказалось, что нокдаун ДГОДГ приводит к аккумуляции опухолевого супрессора p53 и способствует программируемой клеточной смерти.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА апоптоз, биосинтез пиримидинов *de novo*, дигидрооротатдегидрогеназа, дыхательная цепь митохондрий, опухолевый супрессор p53.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ДГОДГ – дигидрооротатдегидрогеназа; ДЦМ – дыхательная цепь митохондрий; ДСН – додецилсульфат натрия; ПААГ – полиакриламидный гель; shRNA – малые шпилечные РНК; PrI – йодид пропидия; FITC – флуоресцеинизотиоцианат.

ВВЕДЕНИЕ

Митохондрии играют центральную роль в гомеостазе эукариотической клетки. Они не только снабжают клетку энергией за счет окислительного фосфорилирования, но и служат важными медиаторами программируемой клеточной смерти, а также внутриклеточных сигнальных каскадов, опосредуемых ионами кальция и активными формами кислорода [1]. Дыхательная цепь митохондрий (ДЦМ) состоит из интегрированных во внутреннюю митохондриальную мембрану мультикомпонентных белковых комплек-

сов I–IV, которые катализируют перенос электронов от NADH на молекулярный кислород. Это приводит к образованию электрохимического протонного градиента на внутренней мембране митохондрий, который является движущей силой синтеза АТФ с помощью АТФ-синтазы (комплекс V).

Установлено, что многие заболевания человека связаны с нарушениями функций митохондрий, причем так называемые «митохондриальные болезни» обусловлены, как правило, дефектами дыхательной цепи этих органелл [2]. Отклонения в работе мито-

хондрией вовлечены в процесс старения [3]. С возрастом в митохондриальной ДНК млекопитающих увеличивается число мутаций и наблюдается нарушение функций дыхательной цепи. Клетки с дефектами в ДЦМ склонны к апоптозу, и усиленная потеря клеток является важным следствием митохондриальной дисфункции. В данной работе мы обратились к механизму включения апоптотической программы при нарушении функционирования ДЦМ.

Опухолевый супрессор p53 – это ключевой регуляторный белок, от которого во многих случаях зависит поведение клетки при разных видах стресса: произойдет ли арест клеточного цикла, сопровождающийся репарацией повреждений, или включатся механизмы программируемой клеточной смерти, направленные на удаление клеток с нерепарируемыми повреждениями [4]. Ранее мы обнаружили, что ингибирование комплекса III ДЦМ приводит к повышению уровня p53 и его активности, к включению программируемой смерти раковых клеток человека [5]. Оказалось, что к активации p53 приводит не ингибирование ДЦМ само по себе, а нарушение функционирования именно комплекса III (комплекс цитохрома bc1), который переносит электроны от восстановленного убихинона (убихинола) на цитохром c. С ДЦМ сопряжен один из важнейших метаболических путей в клетке – биосинтез пиримидинов *de novo* [6]. Единственный митохондриальный фермент этого пути – это дигидрооротатдегидрогеназа (ДГОДГ), окисляющая дигидрооротат до оротата и использующая убихинон в качестве акцептора электронов [6]. Нарушение работы комплекса III ДЦМ приводит к переходу убихинона в восстановленное состояние, что, в свою очередь, может ингибировать работу ДГОДГ и вести к нарушению биосинтеза пиримидинов. Нам действительно удалось показать, что возрастание уровня и активности p53 при ингибировании комплекса III ДЦМ обусловлено нарушением работы ДГОДГ и биосинтеза пиримидинов *de novo* [5]. Однако служит ли подавление функционирования ДГОДГ основной причиной включения апоптотической программы клетки при ингибировании комплекса III ДЦМ, оставалось не выясненным.

В настоящей работе показано, что нарушение работы ДГОДГ и, как следствие, биосинтеза пиримидинов *de novo* служит причиной индукции апоптоза в клетках рака толстого кишечника человека при ингибировании комплекса III ДЦМ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Условия выращивания и обработки клеток

Клетки RKO и HCT116 рака толстого кишечника человека выращивали на среде DMEM, содержащей

10% телячьей эмбриональной сыворотки (HyClone), при 37°C и 5% CO₂ до состояния 50–70% конfluence. После этого клетки инкубировали в течение 12 ч для определения уровня p53 и в течение 20–26 ч для анализа апоптоза в присутствии 200 нМ миксотриазола (Sigma-Aldrich Inc.). В некоторых опытах в среду добавляли уридин до конечной концентрации 50 мкг/мл, оротат или дигидрооротат (Sigma-Aldrich Inc.) до конечной концентрации 1 мМ.

Оценка апоптоза методом проточной цитофлуориметрии

Клетки снимали с подложки трипсинолизом, промывали раствором фосфатно-солевого буфера (PBS, 0.14 М NaCl; 2.7 мМ KCl; 10 мМ Na₂HPO₄; 1.8 мМ KH₂PO₄, pH 7.3) и суспендировали в 100 мкл аннексина V (10 мМ HEPES; 140 мМ NaCl; 2.5 мМ CaCl₂, pH 7.4). Затем к клеткам добавляли 7.5 мкл аннексина V, конъюгированного с FITC (Invitrogen), и йодид пропидия (Clontech) до конечной концентрации 100 мкг/мл, инкубировали в течение 15 мин в темноте. После этого добавляли еще 500 мкл аннексина V, суспензию клеток фильтровали через фильтр с диаметром пор 30 мкм и анализировали с помощью проточного цитометра Partec PASIII.

Иммуноблоттинг

Клетки лизировали в буфере RLB (Promega Inc.). Одинаковые количества белковых экстрактов (50–100 мкг) фракционировали электрофорезом в 12% ДСН-ПААГ, затем осуществляли электроперенос белков на нитроцеллюлозную мембрану и обработку мембраны как описано ранее [7]. Мембрану инкубировали с моноклональными мышинными антителами к ДГОДГ (ab54621, Abcam), к p53 (DO-1) или актину (C-2) (Santa Cruz Biotechnology Inc.), разведенными в соотношении 1 : 500 буфером TBST (20 мМ Трис-НСl, pH 7.5; 140 мМ NaCl; 0.05% Твин-20) в течение 2 ч. С целью контроля нагрузки мембраны инкубировали с антителами к актину. Детекцию проводили с помощью вторичных антимышиных антител овцы, конъюгированных с пероксидазой хрена (GE Healthcare), и усиленной хемилюминесценции по стандартной методике (Western Lightning Chemiluminescence Reagent, Perkin Elmer Life Sciences).

Получение клеточных линий с пониженным уровнем ДГОДГ

Лентивирусные векторы на основе плазмиды pLKO.1-puro (Sigma-Aldrich Inc.) содержали гены коротких шпилечных РНК к ДГОДГ со следующими последовательностями: si21 – CCGGTC-CGGGATTTTATCAACTCAAACCTCGAGTTTGA GTT-GATAAATCCCGGATTTTTT, si32 – CCGGCGGACTT-

TATAAGATGGGCTTCTCGA GAAGCCCATCT-TATAAAGTCCG TTTTT.

Для каждого из лентивирусных векторов, рLKO-si21 и рLKO-si32, были получены вирусные стоки. Для этого клетки эмбриональной почки человека HEK293T на 10-см чашках Петри трансфицировали соответствующим лентивирусным вектором и набором упаковочных плазмид [8] с помощью реагента LipofectAMIN 2000 (Invitrogen) по методике производителя. Использовали смесь четырех плазмид: 3 мкг лентивирусного вектора, 12 мкг плазмиды рRev2, экспрессирующей белок Rev, 6 мкг плазмиды рGag1, экспрессирующей белки Pol и Gag, и 3 мкг плазмиды рVSV-G, экспрессирующей гликопротеин G вируса везикулярного стоматита (всего 24 мкг ДНК). Разведенную средой DMEM смесь плазмид смешивали с разведенным реагентом LipofectAMIN 2000 (60 мкл), интенсивно перемешивали, инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре и раскапывали на чашку с клетками. На следующий день среду заменяли на 10 мл DMEM, содержащей 2% телячьей эмбриональной сыворотки.

Спустя 2 дня после трансфекции собирали секретуемые вирусные частицы: 10 мл среды от трансфицированных клеток фильтровали через фильтр с низкой сорбцией белков (Durapore membrane, Millex-NV, Millipore) с порами 0.45 мкм, и аликвоты объемом 1 мл хранили при -70°C .

Клетки RKO инфицировали вирусными частицами, несущими два разных варианта гена короткой шпилечной РНК к ДГОДГ (si32 и si21), а также контрольными вирусами, не содержащими короткой шпилечной РНК (рLS-Lpw). Для этого к клеткам, росшим на 35-мм чашках, добавляли 1 мл вирусных частиц, разбавленных 1 мл свежей среды, и 5–8 мкг полибрана (Hexadimethrine bromide, Sigma-Aldrich Inc.). Клетки растили в присутствии уридина (50 мкг/мл). Спустя 3 дня добавляли пурамицин (1 мкг/мл) и вели селекцию в течение еще 3 дней. Затем клетки лизировали, и определяли уровень ДГОДГ с помощью иммуноблоттинга.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Роль нарушения биосинтеза пиримидинов в индукции апоптоза при ингибировании комплекса III дыхательной цепи митохондрий

Нами показано, что действие ингибиторов комплекса III ДЦМ приводит к остановке роста ряда линий клеток эпителиальных опухолей и их массовой гибели. Цитометрический анализ окрашенных FITC-аннексином V и йодидом пропидия (PrI) клеток RKO рака толстого кишечника человека, обработанных миксотиазолом, ингибитором ком-

плекса III ДЦМ, выявил значительную популяцию апоптотических клеток (рис. 1). В целом наблюдали три популяции клеток: нормальные клетки (аннексин V-отрицательные, PrI-отрицательные); апоптотические клетки (аннексин V-положительные, PrI-отрицательные, примерно 20% от всех клеток) и третья, небольшая популяция мертвых клеток (аннексин V-положительные, PrI-положительные, доля которых составляла примерно 3%). Размер последней популяции был больше, когда клетки собирали не только с подложки, но и из среды (данные не приведены), и эти клетки рассматривали как некротические или позднеапоптотические.

Поскольку с дыхательной цепью митохондрий функционально связан путь биосинтеза пиримидинов *de novo* через встроенную в митохондриальную мембрану дигидрооротатдегидрогеназу [6], мы решили проверить как влияет восполнение пула пиримидинов на апоптоз, вызываемый миксотиазолом. С этой целью после обработки клеток RKO миксотиазолом в присутствии уридина проводили цитометрический анализ. Оказалось, что уридин, предшественник как уридиловых, так и цитидиловых нуклеотидов, практически полностью предотвращает накопление апоптотических аннексин V-положительных, PrI-отрицательных клеток, вызванное обработкой миксотиазолом (рис. 1). Это указывает на то, что причиной индукции апоптоза служит нарушение биосинтеза пиримидинов *de novo*, предположительно за счет ингибирования ДГОДГ.

Чтобы прямо оценить роль ДГОДГ, клетки RKO обрабатывали миксотиазолом в присутствии субстрата или продукта катализируемой ДГОДГ реакции, и анализировали уровень апоптоза методом проточной цитометрии. Оказалось, что дигидрооротат (субстрат ДГОДГ) не влияет на индуцированный миксотиазолом апоптоз (рис. 1), а оротат (продукт реакции, катализируемой ДГОДГ) его в значительной степени предотвращает (количество апоптотических клеток в 4 раза ниже, чем при индукции апоптоза под действием миксотиазола, рис. 1).

Аналогичные результаты получены и для другой линии клеток рака толстого кишечника человека, HCT116 (не показано).

Полученные данные свидетельствуют о том, что индукция апоптоза при ингибировании комплекса III ДЦМ в существенной степени обусловлена ингибированием ДГОДГ и нарушением биосинтеза пиримидинов *de novo*. Для более полной уверенности в этом молекулярном механизме было решено провести обратный эксперимент и проверить, действительно ли нарушение работы ДГОДГ вызывает апоптотическую гибель клеток подобно ингибированию комплекса III ДЦМ.

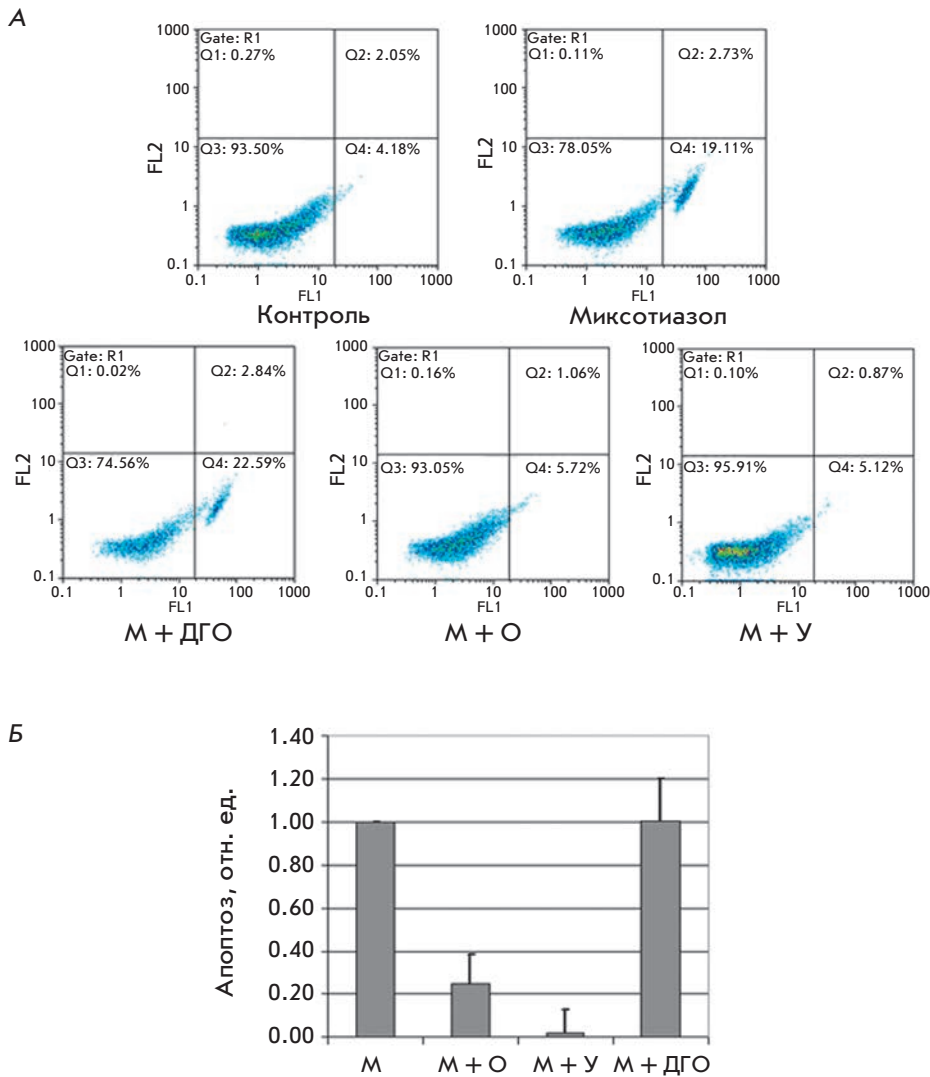


Рис. 1. Уридин и оротат, но не дигидрооротат, защищают клетки РКО от вызываемого миксотиазолом апоптоза. Уровень апоптоза клеток РКО, окрашенных FITC-аннексином V и PriI, определен методом проточной цитофлуориметрии. А – репрезентативная 2D-диаграмма распределения клеток по интенсивности флуоресценции в каналах FL2 (PriI) и FL1 (FITC-аннексин V). Клетки анализировали спустя 26 ч после обработки 200 нМ миксотиазола отдельно (Миксотиазол, М) или совместно с 1 мМ дигидрооротата (М + ДГО), 1 мМ оротата (М + О), 1 мМ уридина (М + У). Контроль – необработанные клетки. Б – статистическая обработка результатов. Процент апоптотических (аннексин V-положительных, PriI-отрицательных) клеток в каждом образце после вычитания контрольных значений был нормирован на процент клеток, в которых апоптоз был индуцирован миксотиазолом без добавок. На диаграмме приведены средние значения относительного уровня апоптоза и SD на основании трех независимых опытов

Влияние нокдауна дигидрооротатдегидрогеназы на опухолевый супрессор p53 и программируемую клеточную смерть

Действительно ли нарушение работы ДГОДГ вызывает апоптотическую гибель клеток подобно ингибированию комплекса III ДЦМ? Чтобы выяснить это, решено было получить линию клеток РКО, в которой экспрессия ДГОДГ подавлена с помощью РНК-интерференции. Для эффективной доставки кассеты, экспрессирующей короткие интерферирующие РНК, использовали лентивирусную систему. Клетки РКО инфицировали лентивирусными частицами, несущими два разных варианта гена короткой шпилечной РНК к ДГОДГ (si32 и si21), а также контрольными вирусами, не содержащими эти гены (pLS-Lpw), и растили в присутствии уридина. Клетки с интегрированными в хромосому экспрессионными кассета-

ми отбирали с помощью пурамицина, лизировали и определяли уровень ДГОДГ с помощью иммуноблотинга (рис. 2).

Таким образом, было выяснено, что в клетках, экспрессирующих две разных коротких шпилечных РНК к ДГОДГ, уровень ДГОДГ значительно ниже, чем в клетках, инфицированных вирусными частицами на основе «пустого» вектора (рис. 2).

Ранее мы показали, что при ингибировании комплекса III ДЦМ происходит активация опухолевого супрессора p53 за счет нарушения работы ДГОДГ [5]. Чтобы проверить, вызывает ли нокдаун ДГОДГ аккумуляцию p53, методом иммуноблотинга сравнили уровень p53 в контрольных клетках и в клетках со специфичной к ДГОДГ интерференцией РНК, культивируемых в отсутствие внешнего источника уридина. Оказалось, что в клетках с нокдауном ДГОДГ

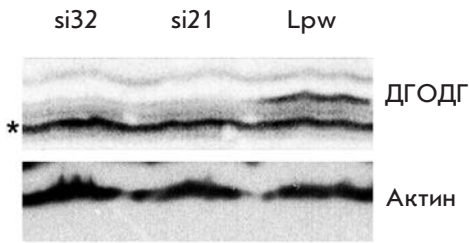


Рис. 2. Оценка эффективности РНК-интерференции ДГОДГ. Иммуноблот лизатов клеток RKO, инфицированных pLKO-si21 (si21), или pLKO-si32 (si32), или пустым вектором pLS-Lpw (Lpw). Верхняя панель – с антителами к ДГОДГ, нижняя панель – с антителами к β-актину, используемыми в качестве контроля нанесения. Звездочкой (*) отмечена неспецифическая полоса, которая также может служить контролем нанесения образцов



Рис. 3. Интерференция ДГОДГ в клетках RKO приводит к индукции p53 аналогично действию миксотиазола, ингибитора комплекса III ДЦМ. Иммуноблот лизатов клеток RKO, инфицированных pLKO-si21 (si21), pLKO-si32 (si32) или пустым вектором pLS-Lpw (Lpw). Клетки культивировали в отсутствие уридина в течение 24 ч. Справа для сравнения приведен иммуноблот лизатов клеток RKO, не обработанных (К) или обработанных 200 нМ миксотиазолом (М) в течение 12 ч. Верхняя панель – с антителами к p53, нижняя панель – с антителами к β-актину

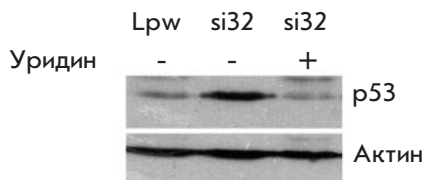


Рис. 4. Уридин предотвращает индукцию p53 в клетках со специфичной к ДГОДГ интерференцией РНК. Иммуноблот лизатов клеток RKO, инфицированных pLKO-si32 (si32) или пустым вектором pLS-Lpw (Lpw). Клетки культивировали в отсутствие (-) или в присутствии (+) уридина в течение 24 ч. Верхняя панель – с антителами к p53, нижняя – с антителами к β-актину

уровень p53 возрастает так же, как при ингибировании комплекса III ДЦМ (рис. 3).

Добавление уридина предотвращало накопление p53 в клетках со специфичной к ДГОДГ интерференцией РНК (рис. 4). Следовательно, наиболее вероятной причиной повышения уровня p53 в этих клетках можно считать нарушение биосинтеза пиримидинов *de novo*.

Далее проводили цитометрический анализ окрашенных FITC-аннексином V и йодидом пропидия клеток со специфичной к ДГОДГ интерференцией РНК, культивируемых в отсутствие внешнего источника уридина. Оказалось, что функциональным следствием подавления экспрессии ДГОДГ и стабилизации p53 является возрастание доли апоптотических аннексин V-положительных, PrI-отрицательных клеток (рис. 5). Добавление в ростовую среду уридина снижало процент апоптотических клеток до контрольного уровня, что свидетельствует о специфичности наблюдаемого эффекта.

Таким образом, с помощью подавления экспрессии ДГОДГ методом РНК-интерференции показано, что как нарушение работы ДГОДГ, так и ингибирование комплекса III ДЦМ приводят к повышению внутриклеточного уровня опухолевого супрессора p53 и возрастанию уровня программируемой клеточной смерти – апоптоза. Эти результаты подтверждают нашу модель, в соответствии с которой индукция апоптоза при ингибировании комплекса III ДЦМ, так же как и стабилизация и активация p53, происходят за счет ингибирования ДГОДГ и нарушения биосинтеза пиримидинов *de novo*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Митохондрии – это «энергетические станции» клетки, являющиеся одновременно медиаторами ряда регуляторных путей, включая индукцию апоптоза [1]. Ранее мы показали, что ингибирование комплекса III ДЦМ приводит к активации опухолевого супрессора p53 и включению программы клеточной смерти [5]. Оказалось, что к активации p53 приводит не само ингибирование цепи переноса электронов, а нарушение функционирования именно комплекса цитохрома bc1. Было показано, что это происходит вследствие ингибирования дигидрооротатдегидрогеназы, единственного митохондриального фермента пути биосинтеза пиримидинов *de novo*. Однако оставалось не известным, служит ли ингибирование ДГОДГ единственной причиной включения программируемой клеточной смерти при ингибировании комплекса III ДЦМ.

ДГОДГ – это флавопротеин, встроенный во внутреннюю мембрану митохондрий. ДГОДГ окисляет дигидрооротат до оротата и использует убихинон в качестве акцептора электронов [6]. В настоящей ра-

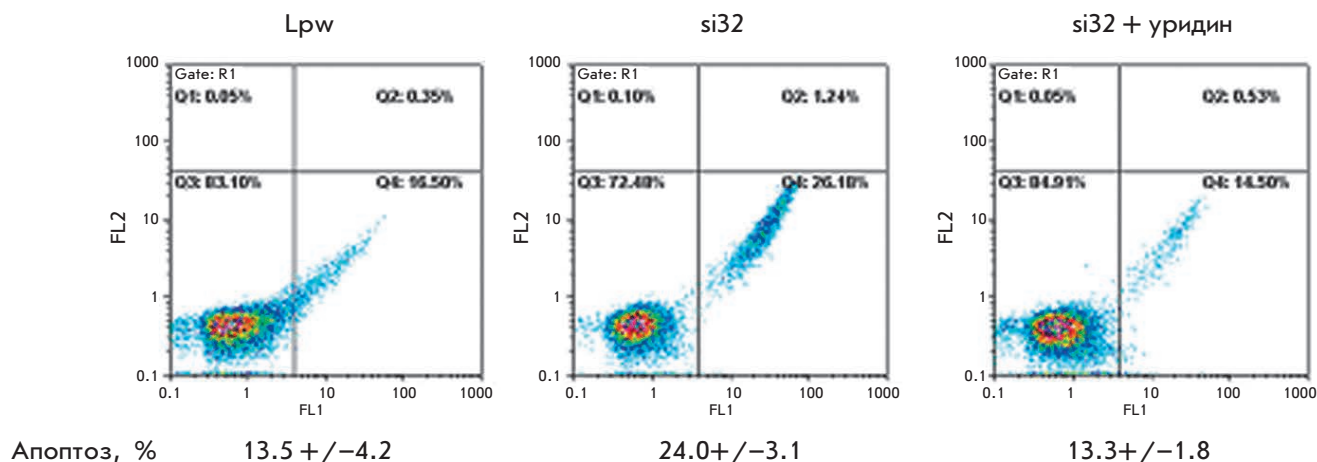


Рис. 5. Уридин защищает клетки RKO с нокдауном ДГОДГ от апоптоза. Уровень апоптоза клеток RKO контрольных (Lpw) или со специфичной к ДГОДГ интерференцией РНК, культивируемых в отсутствие внешнего источника уридина (si32) или в присутствии уридина (si32 + уридин), оцененный методом проточной цитофлуориметрии. Результаты представлены в виде репрезентативной 2D-диаграммы распределения клеток по интенсивности флуоресценции в каналах FL2 (Pr1) и FL1 (FITC-аннексин V). Внизу приведен процент апоптотических (аннексин V-положительных, Pr1-отрицательных) клеток (среднее значение +/- SD на основании трех независимых опытов)

боте показано, что апоптотическую гибель клеток, индуцируемую миксотиазолом, ингибитором комплекса III ДЦМ, полностью предотвращает уридин – предшественник биосинтеза уридилловых и цитидилловых нуклеотидов, и в значительной степени – оротат, продукт реакции, катализируемой дигидрооротат-дегидрогеназой. В то же время дигидрооротат, субстрат ДГОДГ, таким свойством не обладает. Из этих данных следует, что апоптотическая гибель клеток при ингибировании комплекса III ДЦМ действительно обусловлена ингибированием ДГОДГ, митохондриального фермента пути биосинтеза пиримидинов *de novo*. Этот вывод подтвержден результатами опытов по подавлению экспрессии ДГОДГ с помощью РНК-интерференции. Оказалось, что нокдаун ДГОДГ приводит к аккумуляции опухолевого супрессора p53 и увеличению уровня программируемой клеточной смерти – апоптоза.

На рис. 6 приведена предполагаемая схема событий, приводящих к апоптозу, при ингибировании комплекса III ДЦМ. В нормальных условиях убихинон принимает электроны от комплекса I, комплекса II и дигидрооротат-дегидрогеназы. При этом убихинон восстанавливается до убихинола, который затем отдает электроны через комплекс III на цитохром c (рис. 6А). Ингибирование комплекса III ДЦМ под действием миксотиазола приводит к блокированию окисления убихинола, убихинон переходит в полностью восстановленное состояние, после чего теряет способность акцептировать электроны

в процессе окисления дигидрооротата. Это приводит к нарушению работы ДГОДГ и, как следствие, нарушению биосинтеза пиримидинов *de novo*, стабилизации и активации опухолевого супрессора p53 и индукции программируемой клеточной смерти (рис. 6Б). Значимость регенерации убихинона в дыхательной цепи для биосинтеза пиримидинов *de novo* подтверждается тем, что, как установлено недавно, малярийный паразит *Plasmodium falciparum*, по-видимому, поддерживает активную митохондриальную электрон-транспортную цепь исключительно для этой цели [9].

Полученные нами результаты хорошо согласуются с данными о том, что ингибитор ДГОДГ лефлюномид/терифлюномид вызывает апоптоз в ряде раковых клеточных линий человека [10–12]. Однако, согласно работе [12], трансформированные кератиноциты с мутантным геном p53, в которых отсутствует транскрипционно активный p53, более чувствительны к апоптозу, вызванному терифлюномидом, чем нормальные кератиноциты с p53 дикого типа. Длительная обработка нормальных кератиноцитов ННЕК терифлюномидом вызывала задержку клеточного цикла в фазе G₀/G₁, что коррелирует с индукцией экспрессии ингибитора циклинзависимых киназ p21, гена-мишени p53 и свидетельствует о цитопротекторной роли p53 при индуцированном терифлюномидом апоптозе [12]. Обработка фибробластов человека PALA, другим ингибитором биосинтеза пиримидинов (N-phosphonacetyl-L-aspartate, ингибитор транскар-

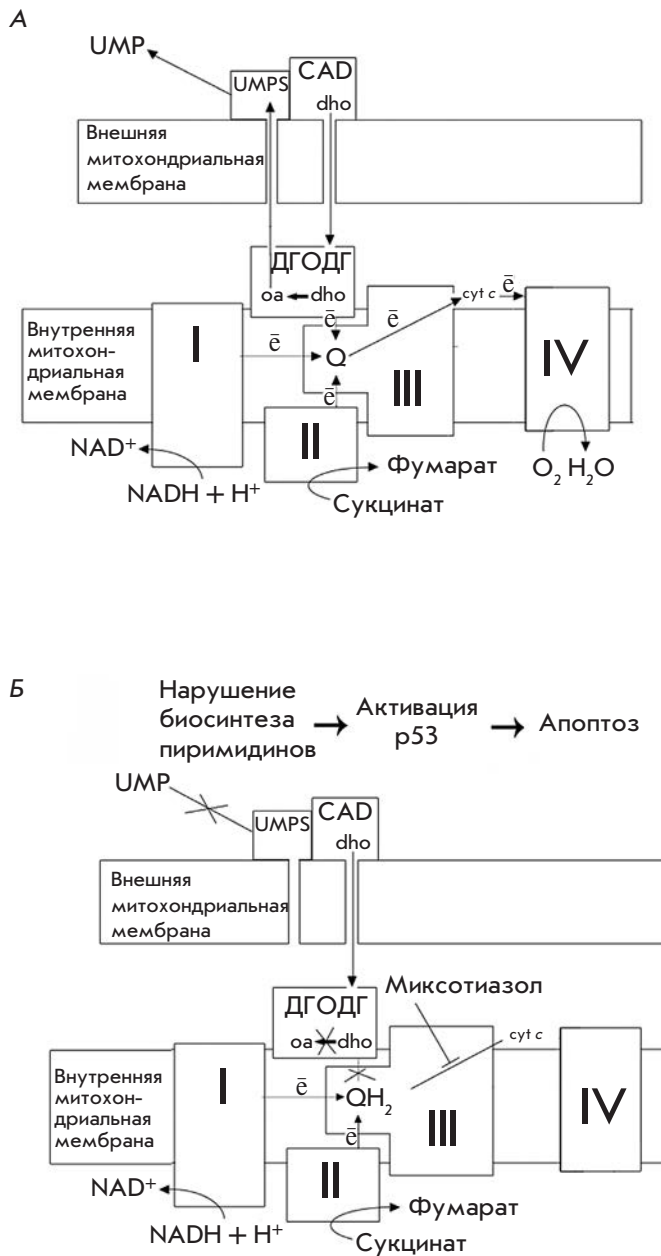


Рис. 6. Схема индукции p53-зависимого апоптоза в ответ на ингибирование комплекса III ДЦМ через блокирование работы ДГОДГ. I, II, III, IV – комплексы ДЦМ; Q – убихинон; QH₂ – убихинол; cyt c – цитохром c; ДГОДГ – дигидрооротатдегидрогеназа; dho – дигидрооротат; oa – оротат; CAD – многофункциональный фермент, катализирующий начальные ступени биосинтеза пиримидинов (карбамоилфосфатсинтаза, аспарат-транскарбамилаза, дигидрооротаза); UMP – уридинмонофосфат; UMPs – уридилмонофосфатсинтаза. Электроны показаны как e⁻. А – контрольные клетки, Б – клетки после обработки миксотиазолом. Объяснения в тексте статьи

бамилазы) приводила к обратимой задержке клеточного цикла и выживанию клеток, экспрессирующих транскрипционно активный p53, и к апоптотической гибели клеток в отсутствие p53 [13–15]. Предполагается, что в условиях подавленного биосинтеза пиримидинов цитопротекторные свойства p53, способствующие выживанию нормальных клеток с p53 дикого типа и гибели раковых клеток с инактивированным p53, могут стать основой для противоопухолевой терапии с использованием соответствующих ингибиторов [12].

В противоположность приведенным данным [12–15] в настоящей работе показано, что подавление функционирования ДГОДГ и нарушение биосинтеза пиримидинов *de novo* приводит к индукции апоптоза в клетках рака толстого кишечника человека, экспрессирующих транскрипционно активный p53. Более того, ранее мы показали, что в клетках НСТ116 p53^{-/-}, в которых отсутствует p53, наблюдается значительное подавление апоптоза по сравнению с клетками НСТ116 дикого типа [5]. Следовательно, в использованных нами опухолевых клетках p53 выполняет не цитопротекторную функцию, а, наоборот, способствует индукции апоптоза при нарушении биосинтеза пиримидинов *de novo*. Расхождение наших результатов с результатами работ [12–15] может быть следствием тканеспецифических вариаций и требует дальнейшего изучения.

Наши данные, как одно из следствий, указывают на возможность использования ингибиторов биосинтеза пиримидинов при экспрессирующих p53 дикого типа злокачественных опухолях толстого кишечника человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследован механизм включения программируемой клеточной смерти при нарушении функционирования дыхательной цепи митохондрий. Показано, что причиной индукции апоптоза в клетках рака толстого кишечника человека при ингибировании комплекса III дыхательной цепи митохондрий является нарушение работы митохондриального фермента дигидрооротатдегидрогеназы, ведущее к блокированию пути биосинтеза пиримидинов *de novo*, активации опухолевого супрессора p53 и, как следствие, индукции p53-зависимого апоптоза.

Наши результаты не согласуются с опубликованными ранее данными, согласно которым в кератиноцитах и фибробластах человека опухолевый супрессор p53 играет цитопротекторную роль и защищает клетки от апоптоза, индуцированного ингибиторами биосинтеза пиримидинов. Мы показали, что подавление функционирования ДГОДГ и нарушение биосинтеза пиримидинов *de novo* приводит к индукции

апоптоза в клетках рака толстого кишечника человека, экспрессирующих транскрипционно активный p53. В использованных нами клеточных линиях, напротив, p53 способствует индукции апоптоза при нарушении биосинтеза пиримидинов *de novo*. Расхождение наших и ранее опубликованных результатов может быть следствием тканеспецифических вариаций и требует дальнейшего изучения. Полученные нами данные указывают на возможность использо-

вания ингибиторов биосинтеза пиримидинов при экспрессирующих p53 дикого типа опухолях толстого кишечника человека. ●

Работа поддержана РФФИ (гранты № 12-04-01444, 12-04-00538 и 12-04-32131-мол_а), а также ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (государственный контракт П334, 2010–2012 г.).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. McBride H.M., Neuspiel M., Wasiak S. // *Curr. Biol.* 2006. V. 16. № 5. P. 551–560.
2. Meunier B., Fisher N., Ransac S., Mazat J.P., Brasseur G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1827. № 11–12. P. 1346–1361.
3. Trifunovic A., Larsson N.-G. // *J. Intern. Med.* 2008. V. 263. № 2. P. 167–178.
4. Чумаков П.М. // *Успехи биол. химии.* 2007. Т. 47. № 1. С. 3–52.
5. Khutorenko A.A., Roudko V.V., Chernyak B.V., Vartapetian A.B., Chumakov P.M., Evstafieva A.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 29. P. 12828–12833.
6. Evans D.R., Guy H.I. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 32. P. 33035–33038.
7. Sukhacheva E.A., Evstafieva A.G., Fateeva T.V., Shakulov V.R., Efimova N.A., Karapetian R.N., Rubtsov Y.P., Vartapetian A.B. // *J. Immunol. Meth.* 2002. V. 266. № 1–2. P. 185–196.
8. Гурьянова О.А., Маханов М., Ченчик А.А., Чумаков П.М., Фролова Е.И. // *Молекуляр. биология.* 2006. Т. 40. № 4. С. 448–459.
9. Painter H.J., Morrisey J.M., Mather M.W., Vaidya A.B. // *Nature.* 2007. V. 446. № 1. P. 88–91.
10. Baumann P., Mandl-Weber S., Völkl A., Adam C., Bumeder I., Oduncu F., Schmidmaier R. // *Mol. Cancer Ther.* 2009. V. 8. № 3. P. 366–375.
11. Hail N.Jr., Chen P., Bushman L.R. // *Neoplasia.* 2010. V. 12. № 4. P. 464–475.
12. Hail N.Jr., Chen P., Кепа J.J., Bushman L.R. // *Apoptosis.* 2012. V. 17. № 2. P. 258–268.
13. Agarwal M.L., Agarwal A., Taylor W.R., Chernova O., Sharma Y., Stark G.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 25. P. 14775–14780.
14. Agarwal M.K., Hastak K., Jackson M.W., Breit S.N., Stark G.R., Agarwal M.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 44. P. 16278–16283.
15. Hastak K., Paul R.K., Agarwal M.K., Thakur V.S., Amin A.R., Agrawal S., Sramkoski R.M., Jacobberger J.W., Jackson M.W., Stark G.R., Agarwal M.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 17. P. 6314–6319.