

## ВЛИЯНИЕ БУТИРАТА НАТРИЯ НА ПРОЛИФЕРАТИВНЫЕ СИГНАЛЬНЫЕ КАСКАДЫ В КЛЕТКАХ, ЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И УСТОЙЧИВЫХ К ИНГИБИТОРАМ ГИСТОНОВЫХ ДЕАЦЕТИЛАЗ

© 2020 г. О. О. Гнедина<sup>1</sup>, М. В. Иготти<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

\*E-mail: marie.igotti@gmail.com

Поступила в редакцию 15.07.2020 г.

После доработки 03.08.2020 г.

Принята к публикации 05.08.2020 г.

Для выявления факторов, способствующих устойчивости трансформированных клеток к действию ингибиторов гистондеацетилаз (HDAC), сравнивали изменения активностей основных пролиферативных сигнальных каскадов в клетках, чувствительных и устойчивых к проапоптотическому действию ингибиторов HDAC. Было установлено, что индукция апоптоза ингибитором HDAC бутиратом натрия в трансформированных клетках происходила на фоне конститутивно активированного состояния киназы PKB/Akt, тогда как в устойчивых к ингибиторам HDAC клетках фосфорилирование PKB/Akt снижалось при действии бутирата натрия. Была показана нелинейная временная динамика изменения активности киназы ERK. Фосфорилирование киназы ERK в устойчивых клетках увеличивалось в первые 24 ч действия агента с последующим снижением активности, тогда как в апоптотических трансформированных клетках наблюдали обратную, зависящую от времени, динамику активности ERK. Установлено, что преодоление устойчивости к ингибиторам HDAC возможно при ингибировании MEK/ERK пути: устойчивые клетки начинали погибать через 48 ч совместного действия бутирата натрия и ингибитора MEK/ERK-пути вещества PD098059. Исследование сигнального каскада Wnt/ $\beta$ -катенин показало, что  $\beta$ -катенин накапливается и активируется только в устойчивых к ингибиторам HDAC клетках. Таким образом, полученные результаты указывают, что изменение активности  $\beta$ -катенина является одной из причин устойчивости к апоптотическому действию бутирата натрия, а повышенная активность киназных путей PI3K/PKB/Akt и MEK/ERK является предпосылкой для наиболее эффективного антипролиферативного действия ингибиторов HDAC.

**Ключевые слова:** опухолевые клетки, ингибитор гистондеацетилаз, апоптоз, устойчивость,  $\beta$ -катенин, киназы PKB/Akt, ERK

DOI: 10.31857/S0041377120110048

Ингибиторы HDAC вызывают разнообразные антипролиферативные эффекты в трансформированных клетках: остановку клеточного цикла, дифференцировку, аутофагию, старение или клеточную гибель (апоптоз) в зависимости от клеточного контекста, а также от мутаций, вызвавших конкретное злокачественное преобразование. В связи с мощным антипролиферативным потенциалом ингибиторов HDAC в отношении раковых клеток и отсутствием токсичности в нормальных клетках (Bolden et al., 2013; Insinga et al., 2005) эти вещества в настоящее время являются объектом интенсивных исследований, как перспективные для противораковой терапии. Однако, как было отмечено выше, не во всех опухолевых клетках ингибиторы HDAC индуцируют гибель, что снижает потенциал этих агентов в отношении противоопухолевой терапии и ставит вопрос о поиске механизмов преодоления устойчивости опухолевых клеток к ингибиторам HDAC.

Во многих исследованиях отмечается, что активация MAP-киназных сигнальных путей является одним из механизмов устойчивости к противораковым агентам, включая ингибиторы HDAC. Так, было показано, что ингибитор HDAC депсипептид FK228 индуцирует апоптоз в клетках рака легких A549, который сопровождается снижением фосфорилирования киназ ERK1/2 и PKB/Akt. При этом подчеркивается важность сигнального киназного пути MEK/ERK в устойчивости к апоптозу, индуцированному ингибиторами HDAC, поскольку повышенная активность только MEK/ERK-пути, но не PKB/Akt, снижала проапоптотическое действие ингибиторов HDAC (Yu et al., 2007). В работе других авторов показана обратная картина для тех же опухолевых клеток (A549 и HCT116, несущих мутации в белке Ras), в которых усиление цитотоксического эффекта ингибитора HDAC ромидепсина происходило при ингибировании любого из киназных путей — MEK/ERK или PI3K/PKB/Akt (Bahr et al., 2016). Принимая во внимание, что MAP-сигнальные киназные пути обычно конститутивно активированы

**Принятые сокращения:** HDAC — гистоновые деацетилазы; SA  $\beta$ -Gal — связанная со старением бета-галактозидаза.

при злокачественной трансформации клеток, можно предположить, что устойчивость или чувствительность клеток к действию цитотоксических агентов является результатом соответствующей адаптации MAP-киназных сигнальных путей.

Ранее нами было показано, что антипролиферативный эффект бутирата натрия связан со стабилизацией ключевого регулятора сигнального пути Wnt  $\beta$ -катенина (Abramova et al., 2006, 2010). Данные о роли Wnt/ $\beta$ -катенинового сигнального пути в процессах онкогенеза и апоптоза в настоящий момент противоречивы. Существуют данные как о стимулировании онкопатологии при конститутивной активации  $\beta$ -катенина (Conrad et al., 2012; Kageshita et al., 2001), так и о более положительном прогнозе для пациентов с высоким цитоплазматическим и ядерным уровнем  $\beta$ -катенина (Maeldandsmo et al., 2003; Chien et al., 2009; Meyer et al., 2012; Zimmerman et al., 2013).

Показано, что активированный сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин приводил к ингибированию высвобождения цитохрома *c* и последующую активацию каспазы-9, индуцированных химиотерапевтическими препаратами (Chen et al., 2001). Также показано, что активность сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин снижается в апоптотирующих клетках, тогда как в устойчивых эпителиальных клетках путь Wnt/ $\beta$ -катенин активирован (Donmez et al., 2016). Существуют также противоположные данные об индукции апоптоза при гиперэкспрессии  $\beta$ -катенина (Kim et al., 2000; Zimmerman et al., 2013). Поскольку установлено вовлеченность пути Wnt/ $\beta$ -катенин в регулирование апоптоза, в настоящее время активно изучается взаимосвязь  $\beta$ -катенина и антиапоптотического сигнального пути, ключевым игроком которого является транскрипционный фактор NF $\kappa$ B. Было показано взаимное влияние сигнальных путей  $\beta$ -катенин/TCF и NF $\kappa$ B в разных раковых клетках (Cho et al., 2008; Nejak-Bowen et al., 2013; Le Henaff et al., 2015; Liu et al., 2016). В целом, молекулярные основы чувствительности опухолевых клеток к химиотерапевтическим агентам далеки от понимания.

Цель представленной работы заключалась в выяснении молекулярных механизмов, определяющих устойчивость трансформированных клеток к действию ингибиторов HDAC. Сравнивали влияние пролонгированного действия бутирата натрия на активность сигнальных каскадов, регулирующих клеточный ответ на стрессовые воздействия, в клетках, чувствительных и устойчивых к действию ингибиторов HDAC. Исследовали активность сигнальных каскадов PKB/Akt, MEK/ERK, NF $\kappa$ B, а также Wnt/ $\beta$ -катенина в нескольких линиях клеток человека, несущих мутации, наиболее часто встречающиеся в опухолях человека — мутации гена *ras*.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Клеточные линии.** Клетки колоректальной карциномы человека HCT116, аденокарциномы легкого человека A549 и эмбриональные клетки почки человека HEK293 были получены из Российской коллек-

ции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, Россия). Кроме того, исследования проводили на линии стабильно трансформированных клеток, полученных из эмбриональных фибробластов мыши путем переноса пары комплементирующих онкогенов *E1A* и *cHa-ras* (линия mERas) (Pospelova et al., 1999). Все клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки и антибиотик гентамицин. Клетки обрабатывали в течение 24–72 ч одним из следующих ингибиторов HDAC: бутиратом натрия (4 мМ), вальпроевой кислотой (2 мМ), трихостатином А (TSA; 200 нМ) или вориностатом (SAHA; 2.5 мкМ) (все от Sigma-Aldrich, США), а также ингибитором киназы MEK веществом PD098059 (Calbiochem, США).

**Жизнеспособность клеток.** Оценивали метаболическую активность клеток по способности восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид (реагент МТТ) (Sigma) в нерастворимый формазан, который имеет пурпурное окрашивание. Для этого клетки засеивали на 96-луночные платы при плотности  $2 \times 10^3$  клеток на ячейку и культивировали в присутствии или отсутствии соответствующих ингибиторов в течение 24–72 ч. Клетки инкубировали в растворе МТТ в конечной концентрации 0.5 мг/мл, приготовленном на PBS, 1.5 ч при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе, после чего среду культивирования удаляли, а клетки лизировали в ДМСО. Оптическую плотность продукта реакции определяли в каждой лунке при длине волны 570 нм на Multiscan-EX (Thermo Labsystems Co., Китай), используя ДМСО в качестве нулевого контроля.

**Распределение клеток по фазам клеточного цикла.** Использовали метод проточной цитофлуориметрии. Клетки промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), обрабатывали сапонином в конечной концентрации 0.01% в течение 30 мин и отмывали от сапониона раствором PBS. Пермеабелизованные клетки инкубировали в присутствии РНКазы А (100 мкг/мл) и иодида пропидия (10 мкг/мл) 15 мин при 37°C с последующим анализом на проточном цитофлуориметре Coulter Epicks XL (Bechman, США).

**Выявление маркера старения SA  $\beta$ -Gal.** Клетки, посеянные на стеклах, промывали PBS и фиксировали в 3%-ном формальдегиде в течение 20 мин при комнатной температуре, промывали PBS и инкубировали в течение 18 ч при 37°C в растворе для выявления активности SA  $\beta$ -Gal следующего состава: 1 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил- $\beta$ -D-галактозида (X-Gal); 40 мМ буфера, содержащего лимонную кислоту и фосфат натрия pH 6.0; 5 мМ красной кровяной соли и 5 мМ желтой кровяной соли; 150 мМ NaCl и 2 мМ MgCl<sub>2</sub> (Dimri et al., 1995). Анализ (выявление SA  $\beta$ -Gal по голубой окраске) и фотографирование готовых препаратов проводили на микроскопе Leica (Германия) в проходящем свете.

**Вестерн-блот-анализ.** Клетки лизировали в буфере PBS, содержащем 1% NP-40, 0.5% дезоксихолата

натрия, 0.1% додецилсульфата натрия (SDS), ингибиторы протеаз, фосфатаз (1 мМ ортованадата натрия, 5 мМ EGTA, 10 мМ фторида натрия) и 1 мМ PMSF. Белки разделяли электрофоретически в 8–12%-ном полиакриламидном геле и переносили на мембрану PVDF. Мембраны со связанными на них белками промывали в растворе PBST (PBS, содержащий 0.5% Tween 20), инкубировали 2 ч в 5%-ном обезжиренном молоке, приготовленном на PBST. После этого мембраны в течение ночи инкубировали в растворе PBST, содержащем 1% бычьего сывороточного альбумина и соответствующие специфические антитела при 4°C. Мембраны отмывали PBST и инкубировали 1 ч при комнатной температуре в 5%-ном молоке на PBST, содержащем вторые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Белки на мембранах выявляли методом усиления хемилюминесценции (Thermo Sci., США). В качестве первичных были использованы моноклональные антитела против следующих белков:  $\alpha$ -тубулина (T5168; Sigma), субъединицы p65 фактора NF $\kappa$ B (sc-372) и его ингибиторного белка I $\kappa$ B $\alpha$  (sc-371), киназ ERK1/2 (sc-94) и Akt (sc-5298),  $\beta$ -катенина (sc-7963) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США), а также против фосфорилированных форм киназ pERK (4377) и pAkt (4060), а также Gapdh (14C10) (все от Cell Signalling, США). В качестве вторичных использовали антитела кролика против иммуноглобулинов мыши или антитела козла против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США).

**Временные трансфекции и анализ люциферазной активности.** Для исследования активности транскрипционного фактора NF $\kappa$ B клетки трансфицировали репортерным вектором, кодирующим люциферазу светлячка, под контролем промотора, содержащего каноническую последовательность для связывания транскрипционного комплекса NF $\kappa$ B (NF $\kappa$ B-luc). Для изучения влияния бутирата натрия на активность транскрипционного комплекса TCF/ $\beta$ -катенин использовали кодирующую люциферазу светлячка репортерную конструкцию TOP-flash, которая содержит минимальный промотор гена *c-fos*, включающий в себя область для связывания транскрипционного фактора TCF, а также конструкцию FOP-flash, содержащую мутацию в области связывания TCF. Репортерные плазмиды TOP-Flash и FOP-Flash были любезно предоставлены доктором М. Бордонаро (Geisinger Commonwealth School of Medicine, Скрантон, США). В качестве внутреннего контроля трансфекции использовали экспрессию люциферазы *Renilla*. Клетки трансфицировали репортерными плазмидами, используя реагент Lipofectamine-2000 (Invitrogen, США), согласно протоколу фирмы производителя. Через 24 ч после трансфекции клетки обрабатывали соответствующими агентами. Через 48–72 ч после трансфекции клетки снимали и процессировали согласно инструкции производителя для измерения активности люциферазы. Люциферазную активность определяли на лю-

минометре TD-20/20 (Turner Designs, США). Каждый эксперимент повторяли не менее трех раз.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

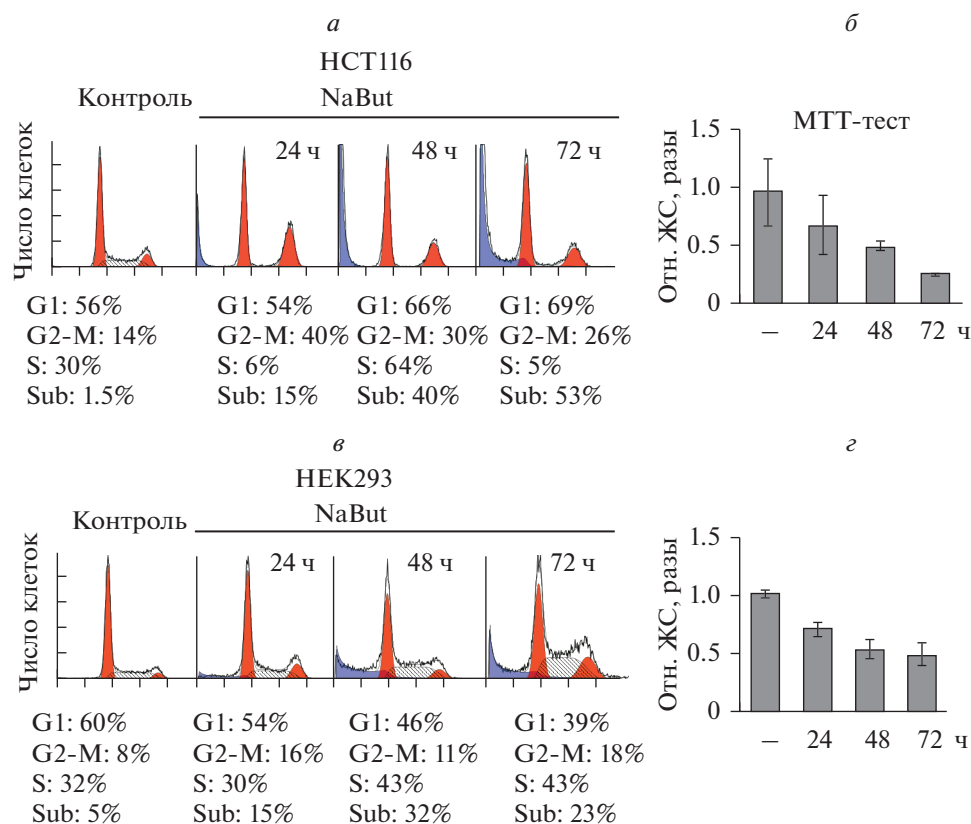
**Различный пролиферативный ответ опухолевых клеток на действие бутирата натрия.** Методом проточной цитофлюориметрии было показано, что бутират натрия вызывает апоптоз в двух линиях из четырех исследованных – в НСТ116 и НЕК293. Так, в клетках НСТ116 бутират натрия вызывает снижение доли клеток в фазе синтеза S и накопление в фазе G<sub>2</sub> клеточного цикла (рис. 1а). При более продолжительных временах действия агента (более 24 ч) индуцируется апоптоз, что видно по накоплению субдиплоидного пика в гистограммах распределения клеток по содержанию ДНК, определяемому цитофлюориметрически. Снижение пролиферативного потенциала клеток НСТ116 при действии бутирата натрия также было подтверждено методом МТТ, определяющим жизнеспособность клеток по интенсивности клеточного дыхания (рис. 1б).

В клетках НЕК293 бутират натрия не вызывает перераспределения по фазам клеточного цикла, но индуцирует апоптоз при продолжительных временах действия (более 24 ч) (рис. 1в, г).

В клетках аденокарциномы легкого человека A549, а также в эмбриональных фибробластах мыши, трансформированных онкогенами *E1A* и *cHras* (линия mERas), бутират натрия не вызывал цитотоксического эффекта (рис. 2). Несмотря на то, что МТТ-тест демонстрирует снижение жизнеспособности клеток A549 и mERas, результаты анализа распределения клеток по содержанию ДНК показывают, что бутират натрия вызывал только остановку клеточного цикла на границе фаз G<sub>1</sub>/S, но не индуцировал накопление клеток с субдиплоидным содержанием ДНК (рис. 2а, б). Методом проточной цитофлюориметрии было показано, что другие ингибиторы HDAC, такие как трихостатин А, вальпроевая кислота и вориностат, также вызывали задержку пролиферации клеток A549 и mERas, но не приводили к гибели этих клеток (данные не представлены). Таким образом, было показано, что клетки A549 и mERas являются устойчивыми к ингибиторам HDAC.

Индукция бутиратом натрия остановка клеточного цикла в клетках линии A549 сопровождается усилением окраски на активность маркера старения SA-b-Gal (рис. 2д). Индукция старения в клетках mERas при продолжительном воздействии ингибиторов HDAC была показана ранее (Igotti et al., 2018). Иными словами, в клетках A549 и mERas бутират натрия индуцирует альтернативную апоптозу антипролиферативную программу – клеточное старение.

**Влияние ингибиторов HDAC на активность транскрипционного фактора NF $\kappa$ B.** Для установления молекулярных механизмов, определяющих различный пролиферативный ответ опухолевых клеток на действие бутирата натрия, исследовали активность ос-



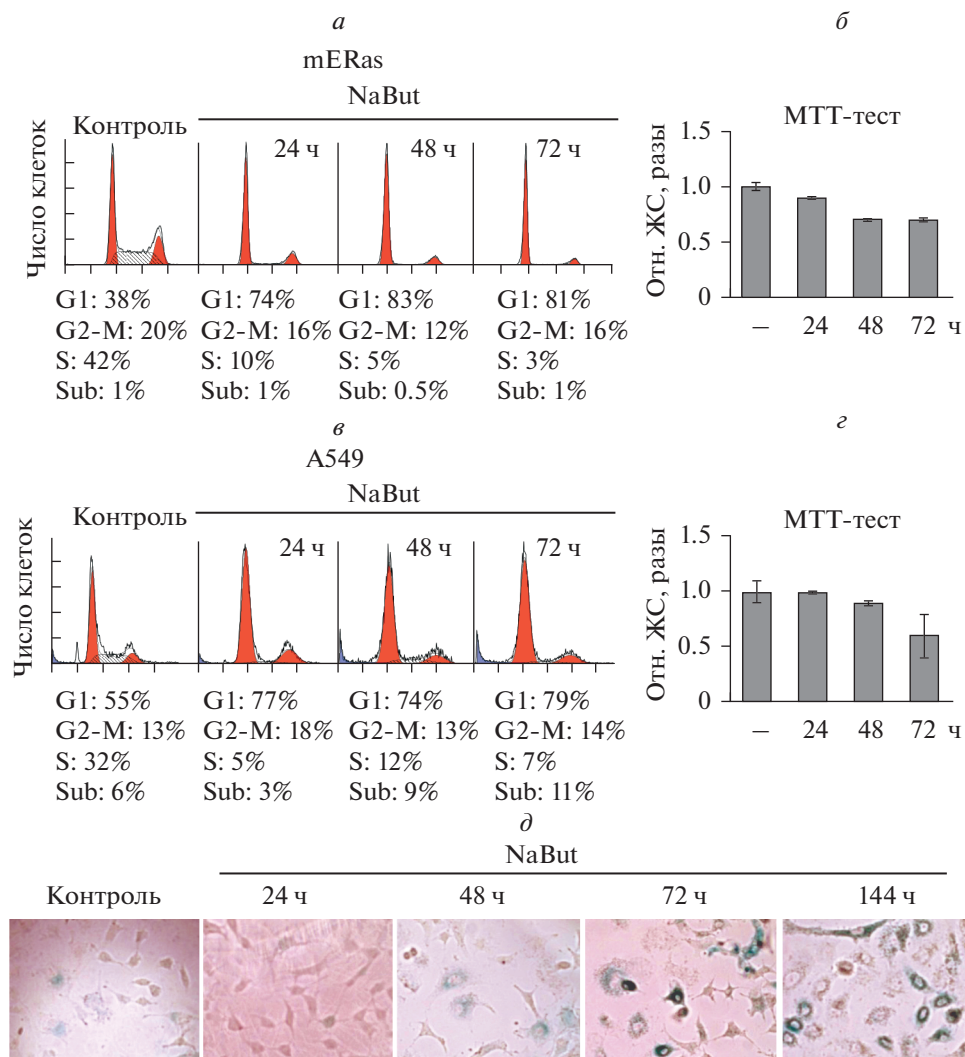
**Рис. 1.** Гистограммы распределения клеток по фазам клеточного цикла, полученные методом проточной цитофлуориметрии (а, в) и относительная жизнеспособность (отн. ЖС) клеток HCT116 и HEK293 (б, г соответственно) необработанных (—) или обработанных бутиратом натрия (NaBut 4 мМ, 24–72 ч) согласно МТТ-тесту. На гистограммах по горизонтали — содержание ДНК, усл.ед. Sub — доля клеток с субдиплоидным содержанием ДНК (синий цвет). Вертикальными отрезками показаны стандартные ошибки среднего. Результаты представляют усредненное значение 3–4 независимых экспериментов, для оценки статистической значимости использован критерий Манна–Уитни ( $p < 0.05$ ).

нового антиапоптотического сигнального пути, ключевым фактором которого является транскрипционный фактор NFκB. Для этого проводили трансфекцию исследуемых клеток репортерным вектором, кодирующим люциферазу, под контролем промотора, содержащего каноническую последовательность для связывания транскрипционного комплекса NFκB (NFκB-luc). По полученным результатам нельзя обнаружить корреляции между изменением активности NFκB и индукцией апоптотической гибели. Так, различные ингибиторы HDAC активировали антиапоптотический транскрипционный фактор NFκB, как в устойчивых клетках (A549 и mERas), так и в клетках, чувствительных (HCT116 и HEK293) к апоптотическому действию ингибиторов HDAC (рис. 3). При этом транскрипционная активность NFκB в устойчивых к ингибиторам HDAC клетках HeLa не менялась при действии бутирата натрия (рис. 3а).

Для выяснения молекулярных механизмов влияния ингибиторов HDAC на активность NFκB, была оценена экспрессия белков, участвующих в регуляции NFκB. Внутриклеточная локализация транскрипционного фактора NFκB регулируется на уровне взаимодействия в цитозоле субъединиц NFκB с белком-инги-

битором IκBα, который может маскировать сигнал ядерной локализации на поверхности рб5-субъединицы NFκB. Методом иммуноблотинга было показано, что бутират натрия увеличивал количество основной субъединицы рб5 комплекса NFκB как в устойчивых, так и в чувствительных к действию ингибиторов HDAC клетках (рис. 3в). При этом содержание ингибирующего белка IκBα снижалось при действии бутирата натрия в исследованных линиях клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что бутират натрия способен активировать NFκB посредством механизмов, включающих деградацию IκBα и стабилизацию рб5 во всех исследованных клеточных линиях. Однако активация NFκB не во всех случаях влечет за собой избегание апоптотической гибели, как было показано выше.

**Активность МАР-киназ в клетках с различным пролиферативным ответом на бутират натрия.** Полагают, что активация сигнального МАР-киназного пути является одним из возможных механизмов устойчивости к цитотоксическому действию ингибиторов HDAC (Chakraborty et al., 2013). Поскольку мутантные белки Ras активируют как МАР-киназный, так и PI3K-сигнальный путь, оба из которых вовлечены



**Рис. 2.** Гистограммы распределения клеток по фазам клеточного цикла, полученные методом проточной цитофлуориметрии (а, в) и относительная жизнеспособность (отн. ЖС) клеток A549 и mERas (б, г соответственно) необработанных (—) или обработанных бутиратом натрия (NaBut 4 мМ, 24–72 ч) согласно МТТ-тесту. На гистограммах по горизонтали — содержание ДНК, усл.ед. Sub — доля клеток с субдиплоидным содержанием ДНК (синий цвет). Вертикальными отрезками отмечены стандартные ошибки среднего. Результаты представляют усредненное значение 3–4 независимых экспериментов, для оценки статистической значимости использован критерий Манна–Уитни ( $p < 0.05$ ); д — Окрашивание на SA-β-Gal (маркер клеточного старения) в клетках A549.

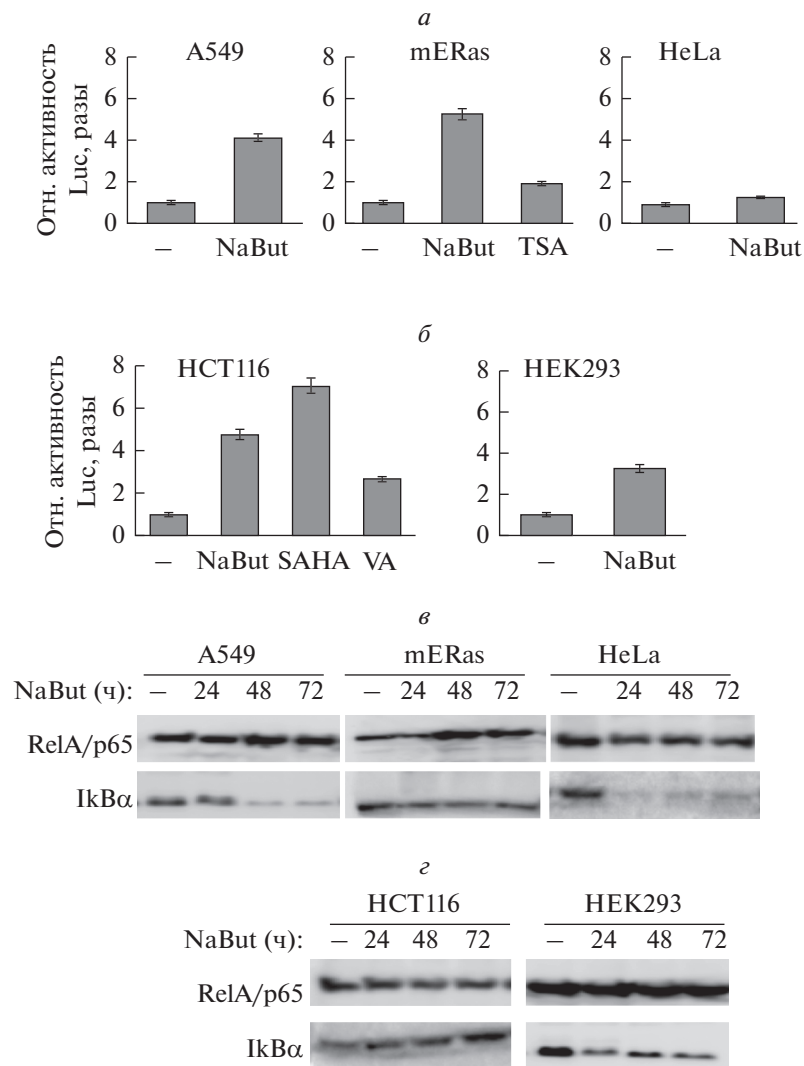
в регулирование апоптотической гибели, мы сравнивали влияние длительного воздействия бутирата натрия на активность нижележащих эффекторов этих сигнальных каскадов в клеточных линиях с диким и мутантным белком Ras.

Как показано на рис. 4, динамика изменения содержания фосфорилированной формы киназы РКВ/Akt в устойчивых и чувствительных к действию ингибиторов HDAC клетках была различной. При долговременной обработке клеток бутиратом натрия в устойчивых клетках A549 и mERas количество фосфорилированной по остатку Ser473 киназы РКВ/Akt (pAkt) снижалось, тогда как в апоптотирующих клетках НСТ116 и НЕК293 при том же действии фосфорилирование РКВ/Akt оставалось на высоком

уровне. Повышенный по сравнению с другими клеточными линиями базальный уровень фосфорилирования РКВ/Akt в клетках НСТ116 и A549 можно объяснить экспрессией мутантного Ras, что приводит к конститутивно активированному состоянию киназы РКВ/Akt даже в отсутствие агонистов.

Таким образом, бутират натрия индуцирует апоптоз в клетках НСТ116 и НЕК293 на фоне активированного состояния киназы РКВ/Akt, из чего можно предположить, что повышенной активности антиапоптотического сигнального пути РКВ/Akt недостаточно для предотвращения бутират-индуцированного апоптоза.

С помощью метода иммуноблотинга было установлено, что динамика изменения количества акти-

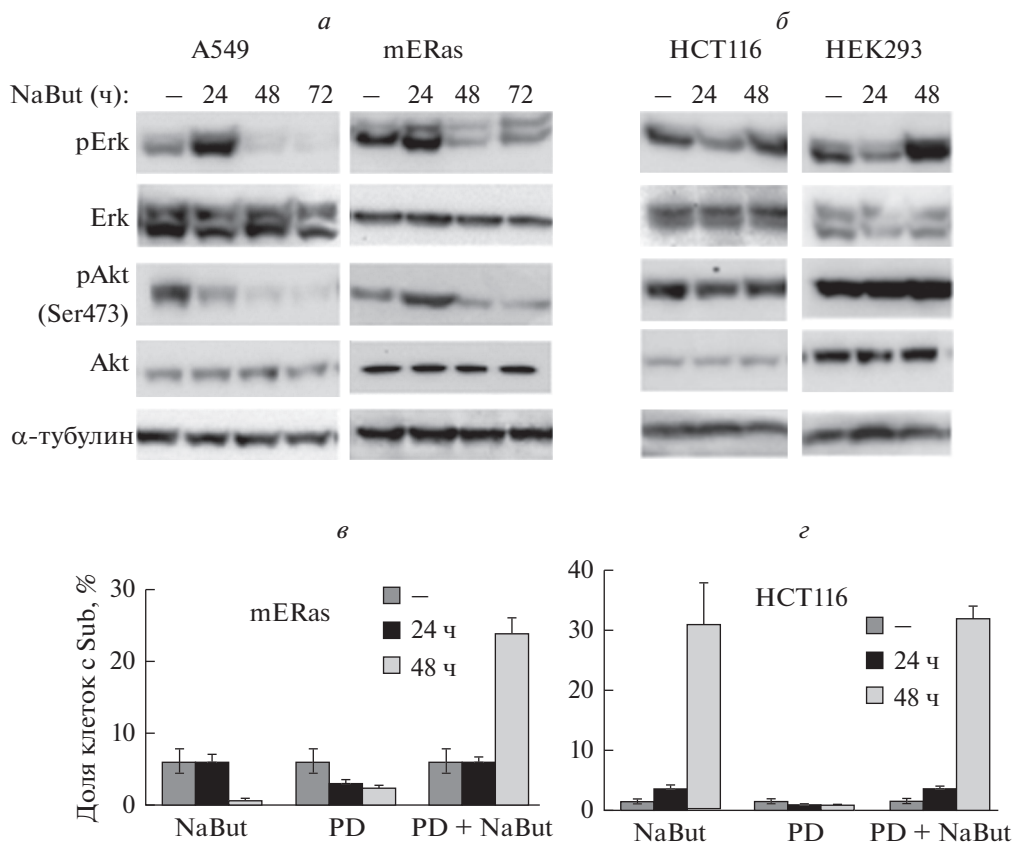


**Рис. 3.** Влияние бутирата натрия на активность транскрипционного фактора NFκB. *а, б* – Изменение активности NFκB в устойчивых и чувствительных клетках (*а, б* соответственно) при действии бутирата натрия, определенное по активности люциферазы, синтезируемой с репортерного вектора NFκB-luc. Клетки трансфицировали вектором NFκB-luc, через 24 ч клетки либо оставляли необработанными (–), либо обрабатывали одним из ингибиторов HDAC: бутиратом натрия (NaBut), TSA, SAHA или вальпроевой кислотой (VA) в течение 24 ч, после чего измеряли активность люциферазы. Приведены средние значения из трех независимых экспериментов для каждой клеточной линии, для оценки статистической значимости использован критерий Манна–Уитни ( $p < 0.05$ ). *Вертикальные отрезки* – стандартные ошибки среднего. *в, з* – Иммуноблоты клеточных экстрактов устойчивых (*в*) и чувствительных (*з*) к ингибиторам HDAC клеток, обработанных 4 mM NaBut в течение 24–72 ч; использовали антитела против субъединицы p65 фактора NFκB и фактора IκBα.

вированной (фосфорилированной) формы киназы ERK (pERK) при действии бутирата натрия не линейна во времени. Так, кратковременная обработка бутиратом натрия (в течение 24 ч) приводит к накоплению фосфорилированной ERK (pERK) в устойчивых к ингибиторам HDAC клеточных линиях A549 и mERas, обе из которых экспрессируют мутантный Ras; при более продолжительном времени действия бутирата натрия (более 48 ч) фосфорилирование киназы ERK снижается (рис. 4а). В чувствительных к ингибиторам HDAC клетках HCT116 и HEK293 также наблюдается нелинейная зависимость изменения активности киназы ERK от времени действия бути-

рата натрия, однако с противоположной динамикой. Через 24 ч действия бутирата натрия количество pERK уменьшается при неизменном уровне тотального количества ERK с последующим восстановлением и увеличением количества pERK при более продолжительном действии бутирата натрия (рис. 4б).

Чтобы проверить роль киназы ERK в пролиферативном ответе устойчивых и чувствительных к ингибиторам HDAC клеток был проведен анализ распределения клеток по содержанию ДНК (FACS-анализ), подвергнутых действию ингибитора пути MEK/ERK (одной из ветвей Ras-сигналинга) – специфического химического ингибитора PD098059.



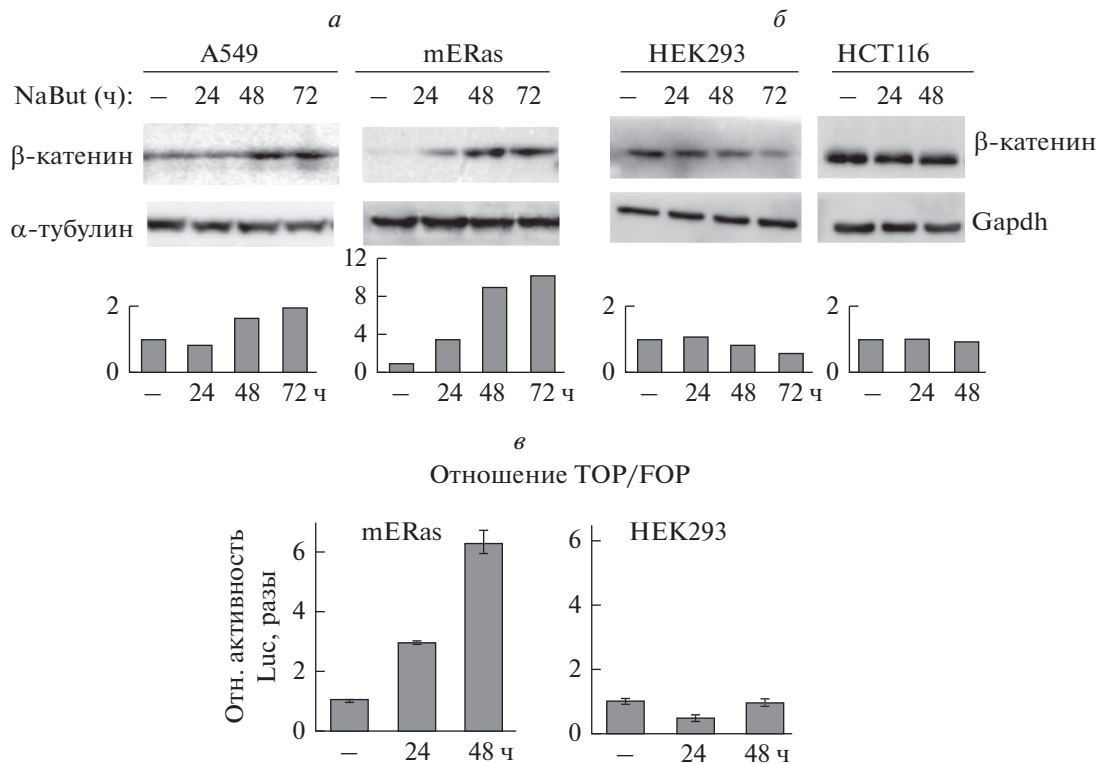
**Рис. 4.** (а, б) Иммуноблоты клеточных экстрактов устойчивых (а) и чувствительных (б) к ингибиторам HDAC клеток, обработанных бутиратом натрия (4 мМ, NaBut,) в течение 24–72 ч; использовали антитела против тотальных киназ ERK и РКВ/Akt (Akt) и их фосфорилированных форм (pERK и pAkt). в, г – Гистограммы представляют изменение доли клеток с субдиплоидным содержанием ДНК (Sub). Клетки устойчивые (mERas) и чувствительные (HEK293) к действию ингибиторов HDAC обрабатывали 4 мМ NaBut или ингибитором MEK веществом PD098059 (PD, 50 мкМ) по отдельности или совместно (PD + NaBut) в течение 24–48 ч; даны средние значения и стандартные ошибки среднего по крайней мере из 3-х независимых экспериментов.

Его действие приводит к незначительному снижению клеток в фазе S без появления признаков гибели (клеток с субдиплоидным содержанием ДНК) как устойчивых клеток mERas, так и чувствительных клеток HCT116 (рис. 4в, г). При этом, подавление активности ERK не отменяет индуцированный бутиратом натрия апоптоз в клетках HCT116, тогда как устойчивые клетки mERas оказались чувствительны к ингибитору MEK/ERK, демонстрируя признаки апоптотической гибели через 48 ч совместного действия бутирата натрия и PD098059 (рис. 4в, г). Полученные данные дают основание предположить важность начальной активации киназы ERK в предотвращении апоптотической гибели и временного снижения активности киназы ERK для индукции апоптоза.

**Влияние бутирата натрия на активность  $\beta$ -катенина в клетках с различным пролиферативным ответом.** Клетки карциномы кишечника HCT116 и карциномы легкого человека A549 несут мутации в *ras*-онкогене (Ahmed et al., 2013), вследствие чего имеют высокий базальный уровень активности Ras-зависи-

мых сигнальных каскадов. В связи с этим в исследованиях часто проводят параллели ответа клеток HCT116 и A549 на действие химиотерапевтических агентов (Lai et al., 2012; Tammina et al., 2017; Wang et al., 2019). Однако как было показано выше, бутират натрия по-разному влияет на эти клеточные линии. В клетках HCT116 индуцируется апоптоз, а в клетках A549 – остановка клеточного цикла и старение при продолжительных временах действия бутирата натрия. В дополнении к мутации гена *ras* клетки HCT116 содержат мутацию в гене, кодирующем  $\beta$ -катенин, которая приводит к стабилизации  $\beta$ -катенина, вследствие чего  $\beta$ -катенин присутствует в HCT116 на постоянно высоком уровне, независимо от сигнала Wnt. Ранее нами было показано, что антипролиферативный эффект бутирата натрия связан со стабилизацией  $\beta$ -катенина (Abramova et al., 2006, 2010). Поэтому далее мы исследовали влияния бутирата натрия на активность сигнального пути Wnt/ $\beta$ -катенин.

Методом иммуноблотинга было показано, что в клетках A549 и mERas, устойчивых к апоптотиче-



**Рис. 5.** Влияние бутирата натрия на активность  $\beta$ -катенина в устойчивых и чувствительных к ингибиторам HDAC клетках. *a*, *b* – Иммуноблоты белков клеточных экстрактов устойчивых (*a*) и чувствительных к ингибиторам HDAC клеток (*b*), обработанных 4 мМ бутиратом натрия (NaBut) в течение 24–72 часов, с антителами против  $\beta$ -катенина. Гистограммы показывают относительный уровень  $\beta$ -катенина по сравнению с уровнем  $\beta$ -катенина в необработанных клетках, который принят за единицу, нормированный на уровень нагрузки ( $\alpha$ -тубулин или Gapdh). (*c*) влияние бутирата натрия на транскрипционную активность  $\beta$ -катенина. Клетки mERas и HEK293 трансфицировали репортерами TOP-flash (канонический элемент TCF) и FOP-flash (мутантный элемент TCF) и обрабатывали бутиратом натрия в течение 24–48 ч. На гистограммах приведено соотношение TOP/FOP

скому действию ингибиторов HDAC, бутират натрия вызывает накопление  $\beta$ -катенина (рис. 5*a*), тогда как в клетках HCT116 и HEK293 количество  $\beta$ -катенина не изменяется или даже снижается на фоне развития апоптоза со временем действия бутирата натрия (рис. 5*b*). При этом, как и ожидалось, в клетках HCT116 выявляется повышенное базальное содержание  $\beta$ -катенина. В клетках HEK293 базальный уровень  $\beta$ -катенина очень низкий (рис. 5*b*).

Для изучения влияния бутирата натрия на транскрипционную активность  $\beta$ -катенина клетки трансфицировали репортерной конструкцией TOP-flash, кодирующей люциферазу, под минимальным промотором гена *c-fos*, содержащим область для связывания транскрипционного комплекса TCF/ $\beta$ -катенин. В качестве контроля клетки параллельно трансфицировали такой же конструкцией, но содержащей мутацию в области связывания TCF (FOP-flash). Транскрипционную активность TCF/ $\beta$ -катенина оценивали по отношению активности люциферазы, синтезируемой с вектора TOP-flash, к активности люциферазы, синтезируемой с вектора FOP-flash. Как показано на рис. 5*c*, в устойчивых к апоптотическому действию клетках mERas транскрипционная ак-

тивность  $\beta$ -катенина увеличивалась со временем действия бутирата натрия. При этом в апоптотирующей при действии бутирата натрия клетках HEK293 транскрипционная активность  $\beta$ -катенина снижалась.

Таким образом, мы показали, что накопление  $\beta$ -катенина происходит только в клетках, устойчивых к апоптотическому действию ингибиторов HDAC. Тогда как в чувствительных к ингибиторам HDAC клетках  $\beta$ -катенин не накапливается.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В представленной работе показан дифференцированный ответ трансформированных клеток на долговременное воздействие ингибитора HDAC бутирата натрия. Показано, что бутират натрия вызывает апоптоз в клетках HCT116 и HEK293, а в клетках A549 и mERas – остановку пролиферации в контрольной точке  $G_1/S$ , сопровождающуюся появлением признаков старения при продолжительных временах действия агента. Индукция апоптоза в клетках HCT116 бутиратом натрия и другими ингибиторами HDAC (вориностатом и ромидепсином) была показана ранее (Hinnebusch et al., 2002; Bordonaro et al., 2007; Luchenko et al., 2014). Данных о влия-



нии ингибиторов HDAC на пролиферацию клеток HEK293 очень мало. Недавно было показано, что ингибиторы SAHA, этиностат и моцетиностат снижают жизнеспособность клеток HEK293 (Lillico et al., 2016). Однако использованный метод, определяющий жизнеспособность клеток по уровню клеточного дыхания, не способен отличить снижение пролиферативного потенциала от апоптоза или иного механизма клеточной гибели.

Для того, чтобы выявить факторы, определяющие различный ответ клеток на действие бутирата натрия, сравнивали изменения активностей основных пролиферативных сигнальных каскадов в клетках, чувствительных и устойчивых к апоптозу, индуцированному ингибиторам HDAC. Полученные данные показывают, что изменения активности MAP-киназ при действии бутирата натрия в устойчивых и чувствительных к ингибиторам HDAC клетках разные. Показана нелинейная зависимость изменения уровня фосфорилирования киназы ERK от времени действия ингибитора HDAC: ее активность увеличивается в первые 24 ч действия бутирата натрия, а далее уменьшается в устойчивых клетках A549 и mERas; в чувствительных к ингибиторам HDAC клетках HCT116 и HEK293, наоборот, количество фосфорилированной ERK сначала временно снижается, а далее при продолжающемся действии агента возвращается к высокому базальному уровню.

Другие авторы также отмечали ослабление фосфорилирования ERK через 24 ч действия ингибиторов HDAC на фоне апоптоза в клетках HCT116 как базальное (Li et al., 2017), так и индуцированное (Chou et al., 2011). В литературе показана роль ERK в реализации и проапоптотического сигнала (Ma et al., 2008; Stang et al., 2009; Lim et al., 2012), и антиапоптотического (Allan et al., 2003; Mebratu, Tesfaigzi, 2009; Mandal et al., 2014).

Известно, что активация киназ ERK1/2 защищает опухолевые клетки от апоптоза, индуцированного стимулами широкого спектра, такими как облучение (Park et al., 1999; Kitagawa et al., 2002), осмотический стресс (Nagata, Todokoro, 1999), гипоксия (Buckley et al., 1999), голодание (Erhardt et al., 1999), окислительный стресс и химиотерапевтические агенты (Lu, Xu, 2006). Молекулярные механизмы ингибирования апоптоза посредством активации киназы ERK1/2 сложны и варьируют в зависимости от типа клеток и стимула.

В целом, ERK1/2 реализует антиапоптотический эффект через подавление активности проапоптотических молекул или через транскрипционную репрессию кодирующих их генов. Известно, что киназы ERK1/2 могут фосфорилировать каспазу 9 и ингибировать ее энзиматическую активность (Allan et al., 2003). Кроме того, фосфорилируя про-каспазу 8, ERK1/2 ингибируют ее активацию и опосредованный рецептором смерти апоптоз (Mandal et al., 2014). Фосфорилирование киназой ERK1/2 транскрипционных факторов FoxO дестабилизирует их, что приводит к изменению экспрессии многих генов-мише-

ней FoxO, участвующих в индукции апоптоза (Mebratu, Tesfaigzi, 2009). В некоторых опухолевых клетках устойчивость к индуцированному апоптозу достигается через подавление механизмов, регулирующих проницаемость митохондриальных пор, благодаря активности митохондриальной фракции киназы ERK (Rasola et al., 2010). Хотя активация ERK обычно ассоциируется с выживанием клеток, ряд исследований показывает, что в зависимости от силы и продолжительности индуцирующего апоптоз стимула и типа клеток активация ERK необходима для проведения проапоптотического сигнала (Cagnol, Chambard, 2010; Stang et al., 2009).

Проапоптотическая роль сигнального пути Ras/Raf/ERK достаточно хорошо продемонстрирована для клеточной гибели, вызванной агентами, повреждающими ДНК (этопозидом, доксорубицином, ультрафиолетовым и гамма-облучением) (Cagnol, Chambard, 2010). Неоднозначность влияния ERK на апоптотический путь можно продемонстрировать на примере каспазы-8. Как было сказано выше, непосредственное фосфорилирование киназой ERK про-каспазы 8 ингибирует активацию каспазы (Mandal et al., 2014). Однако продолжительная активация ERK1,2 индуцирует активацию каспазы 8 и гибель клеток (Cagnol et al., 2006). По-видимому, показанное нами временное снижение активности ERK в клетках HCT116 и HEK293 необходимо для запуска бутиратом натрия апоптотической программы, а последующая инактивация ERK способствует поддержанию проапоптотического сигнала.

Важность начальной активации киназы ERK с последующим спадом активности в предотвращении апоптотической гибели и временного снижения активности ERK при индукции апоптоза показана нами в настоящей работе в экспериментах, в которых подавление MEK/ERK-пути специфическим химическим ингибитором PD098059 не отменяло индуцированного бутиратом натрия апоптоза в клетках HCT116, тогда как устойчивые клетки mERas погибали при совместном действии бутирата натрия и PD098059. Полученные данные дают основание предположить, что резистентность к ингибиторам HDAC является результатом адаптации (активации) MAP-киназного сигнального пути. Таким образом, можно предположить, что повышенная активность киназных путей MEK/ERK является предпосылкой для наиболее эффективного антипролиферативного действия ингибиторов HDAC.

Сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенина контролирует многие клеточные процессы во время неопластической трансформации, в связи с чем представляет интересную терапевтическую мишень. При активации пути Wnt его центральный игрок, белок  $\beta$ -катенин, накапливается в цитоплазме и транслоцируется в ядро. Ядерный  $\beta$ -катенин ассоциируется с транскрипционными факторами семейства TCF/LEF и рекрутирует ко-активаторы транскрипции для регулирования экспрессии генов-мишеней (Willert, Jones, 2006). Данные о роли сигнального пути Wnt/ $\beta$ -кате-

нина в регулировании апоптоза в настоящее время противоречивы. Существуют данные об индукции апоптотической гибели в случаях, когда  $\beta$ -катенин активируется (Kim et al., 2000; Zimmerman et al., 2013), а также при которых  $\beta$ -катенин не может активироваться (Morin et al., 1996; Ahmed et al., 1998). С другой стороны, показано ослабление апоптоза, индуцированного химиотерапевтическими агентами, при активации пути Wnt/ $\beta$ -катенина (Chen et al., 2001; Donmez et al., 2016; Wang et al., 2018).

Поскольку нарушение регуляции этого важного сигнального пути тесно связано с изменением апоптотического ответа опухолевых клеток, в настоящей работе нами исследована роль сигнального каскада Wnt/ $\beta$ -катенин в устойчивости клеток к апоптозу, индуцированному бутиратом натрия. Представленные в работе исследования показали, что в клетках, устойчивых к проапоптотическому действию ингибиторов HDAC, происходит накопление и транскрипционная активация  $\beta$ -катенина. Тогда как в апоптотирующих клетках  $\beta$ -катенин не накапливается, а его трансактивирующая способность не усиливается при действии бутирата натрия. Влияние ингибиторов HDAC на сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин к настоящему времени еще недостаточно четко определено, поскольку существует множество противоречащих друг другу данных. С одной стороны, ряд исследований показывает, что ингибиторы HDAC снижают активность Wnt/ $\beta$ -катенина в клетках карциномы кишечника (Bordonaro et al., 2002; Götze et al., 2014) и подавляет экспрессию ряда его генов-мишеней (Lallemant et al., 1996; Kim et al., 2001). С другой стороны, представлены данные об активации передачи сигналов Wnt при действии ингибиторов HDAC (Bordonaro et al., 2007; Shao et al., 2012).

Тем не менее, наши результаты о роли активации  $\beta$ -катенина в устойчивости к апоптозу, индуцированному ингибиторами HDAC, согласуются с данными Бордонаро с коллегами (Bordonaro et al., 2002). В этой работе авторы сравнивали активность и экспрессию  $\beta$ -катенина в двух линиях рака кишечника с различным пролиферативным ответом на бутират натрия: в одной линии возникали терминальная дифференцировка и апоптоз в ответ на бутират натрия, а в другой – индуцировался обратимый блок клеточного цикла, но без апоптотической гибели клеток. Соответственно, в апоптотических клетках бутират натрия подавлял экспрессию TCF/ $\beta$ -катенин-зависимых промоторов, а в устойчивых клетках усиливал транскрипционную активность  $\beta$ -катенина (Bordonaro et al., 2002).

Таким образом, полученные нами данные указывают, что бутират натрия по-разному регулирует сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин в устойчивых и чувствительных к ингибиторам HDAC клетках, и что модулирование экспрессии и активности  $\beta$ -катенина является одной из причин устойчивости к апоптозу, индуцированному бутиратом натрия.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Комитета по науке и высшей школы при правительстве Санкт-Петербурга и фонда Директора Института цитологии РАН.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

В экспериментах представленной работы животные и люди не участвовали.

## КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Abramova M.V., Pospelova T.V., Nikulenkov F.P., Hollander C.M., Fornace A.J., Pospelov V.A. 2006. G1/S arrest induced by histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in E1A + Ras-transformed cells is mediated through down-regulation of E2F activity and stabilization of beta-catenin. *J. Biol. Chem.* V. 281. P. 21040.
- Abramova M.V., Zatulovskiy E.A., Svetlikova S.B., Kukushkin A.N., Pospelov V.A. 2010. e2f1 Gene is a new member of Wnt/beta-catenin/Tcf-regulated genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 391. P. 142.
- Ahmed D., Eide P.W., Eilertsen I.A., Danielsen S.A., Eknæs M., Hektoen M., Lind G.E., Lothe R.A. 2013. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis.* V. 2. P. e71. <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.35>
- Ahmed Y., Hayashi S., Levine A., Wieschaus E. 1998. Regulation of armadillo by a Drosophila APC inhibits neuronal apoptosis during retinal development. *Cell.* V. 93. P. 1171.
- Allan L.A., Morrice N., Brady S., Magee G., Pathak S., Clarke P.R. 2003. Inhibition of caspase-9 through phosphorylation at Thr 125 by ERK MAPK. *Nat. Cell Biol.* V. 5. P. 647.
- Bahr J.C., Robey R.W., Luchenko V., Basseville A., Chakraborty A.R., Kozlowski H., Pauly G.T., Patel P., Schneider J.P., Gottesman M.M., Bates S.E. 2016. Blocking downstream signaling pathways in the context of HDAC inhibition promotes apoptosis preferentially in cells harboring mutant Ras. *Oncotarget.* V. 7. P. 69804.
- Bolden J.E., Shi W., Jankowski K., Kan C.-Y., Cluse L., Martin B.P., MacKenzie K.L., Smyth G.K., Johnstone R.W. 2013. HDAC inhibitors induce tumor-cell-selective pro-apoptotic transcriptional responses. *Cell Death Dis.* V. 4. P. e519.
- Bordonaro M., Lazarova D.L., Augenlicht L.H., Sartorelli A.C. 2002. Cell type- and promoter-dependent modulation of the Wnt signaling pathway by sodium butyrate. *Int. J. Cancer.* V. 97. P. 42.
- Bordonaro M., Lazarova D.L., Sartorelli A.C. 2007. The Activation of Beta-Catenin by Wnt Signaling Mediates the Effects of Histone Deacetylase Inhibitors. *Exp. Cell Res.* V. 313. P. 1652.
- Buckley S., Driscoll B., Barsky L., Weinberg K., Anderson K., Warburton D. 1999. ERK activation protects against DNA damage and apoptosis in hyperoxic rat AEC2. *Am. J. Physiol.* V. 277. P. L159.
- Cagnol S., Chambard J.-C. 2010. ERK and cell death: mechanisms of ERK-induced cell death—apoptosis, autophagy and senescence. *FEBS J.* V. 277. P. 2.
- Cagnol S., van Obberghen-Schilling E., Chambard J.-C. 2006. Prolonged activation of ERK1,2 induces FADD-indepen-

- dent caspase 8 activation and cell death. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death.* V. 11. P. 337.
- Chakraborty A.R., Robey R.W., Luchenko V.L., Zhan Z., Piekarczyk R.L., Gillet J.-P., Kossenkov A.V., Wilkerson J., Showe L.C., Gottesman M.M., Collie N.L., Bates S.E. 2013. MAPK pathway activation leads to Bim loss and histone deacetylase inhibitor resistance: rationale to combine romidepsin with an MEK inhibitor. *Blood.* V. 121. P. 4115.
- Chen S., Guttridge D.C., You Z., Zhang Z., Fribley A., Mayo M.W., Kitajewski J., Wang C.-Y. 2001. WNT-1 Signaling Inhibits Apoptosis by Activating  $\beta$ -Catenin/T Cell Factor-Mediated Transcription. *J. Cell Biol.* V. 152. P. 87.
- Chien A.J., Moore E.C., Lonsdorf A.S., Kulikauskas R.M., Rothberg B.G., Berger A.J., Major M.B., Hwang S.T., Rimm D.L., Moon R.T. 2009. Activated Wnt/beta-catenin signaling in melanoma is associated with decreased proliferation in patient tumors and a murine melanoma model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 106. P. 1193.
- Cho H.H., Song J.S., Yu J.M., Yu S.S., Choi S.J., Kim D.H., Jung J.S. 2008. Differential effect of NF-kappaB activity on beta-catenin/Tcf pathway in various cancer cells. *FEBS Lett.* V. 582. P. 616.
- Chou C.-W., Wu M.-S., Huang W.-C., Chen C.-C. 2011. HDAC Inhibition Decreases the Expression of EGFR in Colorectal Cancer Cells. *PLoS One.* V. 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0018087>
- Conrad W.H., Swift R.D., Biechele T.L., Kulikauskas R.M., Moon R.T., Chien A.J. 2012. Regulating the response to targeted MEK inhibition in melanoma: enhancing apoptosis in NRAS- and BRAF-mutant melanoma cells with Wnt/ $\beta$ -catenin activation. *Cell Cycle Georget. Tex.* V. 11. P. 3724.
- Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 92. P. 9363.
- Donmez H.G., Demirezen S., Beksac M.S. 2016. The relationship between beta-catenin and apoptosis: A cytological and immunocytochemical examination. *Tissue Cell.* V. 48. P. 160.
- Erhardt P., Schremser E.J., Cooper G.M. 1999. B-Raf inhibits programmed cell death downstream of cytochrome c release from mitochondria by activating the MEK/Erk pathway. *Mol. Cell Biol.* V. 19. P. 5308.
- Götze S., Coersmeyer M., Müller O., Sievers S. 2014. Histone deacetylase inhibitors induce attenuation of Wnt signaling and TCF7L2 depletion in colorectal carcinoma cells. *Int. J. Oncol.* V. 45. P. 1715.
- Hinnebusch B.F., Meng S., Wu J.T., Archer S.Y., Hodin R.A. 2002. The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J. Nutr.* V. 132. P. 1012.
- Igotti M.V., Svetlikova S.B., Pospelov V.A. 2018. Overexpression of adenoviral E1A sensitizes E1A+Ras-transformed cells to the action of histone deacetylase inhibitors. *Acta Naturae.* V. 10. P. 70.
- Insinga A., Monestiroli S., Ronzoni S., Gelmetti V., Marchesi F., Viale A., Altucci L., Nervi C., Minucci S., Pelicci P.G. 2005. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat. Med.* V. 11. P. 71.
- Kageshita T., Hamby C.V., Ishihara T., Matsumoto K., Saida T., Ono T. 2001. Loss of beta-catenin expression associated with disease progression in malignant melanoma. *Br. J. Dermatol.* V. 145. P. 210.
- Kim K., Pang K.M., Evans M., Hay E.D. 2000. Overexpression of beta-catenin induces apoptosis independent of its trans-activation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators. *Mol. Biol. Cell.* V. 11. P. 3509.
- Kim M.S., Kwon H.J., Lee Y.M., Baek J.H., Jang J.E., Lee S.W., Moon E.J., Kim H.S., Lee S.K., Chung H.Y., Kim C.W., Kim K.W. 2001. Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat. Med.* V. 7. P. 437.
- Kitagawa D., Tanemura S., Ohata S., Shimizu N., Seo J., Nishitai G., Watanabe T., Nakagawa K., Kishimoto H., Wada T., Tezuka T., Yamamoto T., Nishina H., Katada T. 2002. Activation of extracellular signal-regulated kinase by ultraviolet is mediated through Src-dependent epidermal growth factor receptor phosphorylation. Its implication in an anti-apoptotic function. *J. Biol. Chem.* V. 277. P. 366.
- Lai C.-Y., Tsai A.-C., Chen M.-C., Chang L.-H., Sun H.-L., Chang Y.-L., Chen C.-C., Teng C.-M., Pan S.-L. 2012. Aciculin Induces p53-Dependent Apoptosis via MDM2 Depletion in human cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One.* V. 7. P. e42192. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0042192>
- Lallemant F., Courilleau D., Sabbah M., Redeuilh G., Mester J. 1996. Direct inhibition of the expression of cyclin D1 gene by sodium butyrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* V. 229. P. 163.
- Le Henaff C., Mansouri R., Modrowski D., Zarka M., Geoffroy V., Marty C., Tarantino N., Laplantine E., Marie P.J. 2015. Increased NF- $\kappa$ B activity and decreased Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling mediate reduced osteoblast differentiation and function in  $\Delta$ F508 cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) Mice. *J. Biol. Chem.* V. 290. P. 18009.
- Li Q., Ding C., Meng T., Lu W., Liu W., Hao H., Cao L. 2017. Butyrate suppresses motility of colorectal cancer cells via deactivating Akt/ERK signaling in histone deacetylase dependent manner. *J. Pharmacol. Sci.* V. 135. P. 148.
- Lillico R., Sobral M.G., Stesco N., Lakowski T.M. 2016. HDAC inhibitors induce global changes in histone lysine and arginine methylation and alter expression of lysine demethylases. *J. Proteomics.* V. 133. P. 125.
- Lim S.-C., Duong H.-Q., Parajuli K.R., Han S.I. 2012. Proapoptotic role of the MEK/ERK pathway in ursodeoxycholic acid-induced apoptosis in SNU601 gastric cancer cells. *Oncol. Rep.* V. 28. P. 1429.
- Liu K., Zhang X., Zhang J.T., Tsang L.L., Jiang X., Chan H.C. 2016. Defective CFTR-  $\beta$ -catenin interaction promotes NF- $\kappa$ B nuclear translocation and intestinal inflammation in cystic fibrosis. *Oncotarget.* V. 7. P. 64030.
- Lu Z., Xu S. 2006. ERK1/2 MAP kinases in cell survival and apoptosis. *IUBMB Life.* V. 58. P. 621.
- Luchenko V.L., Litman T., Chakraborty A.R., Heffner A., Devor C., Wilkerson J., Stein W., Robey R.W., Bangiolo L., Levens D., Bates S.E. 2014. Histone deacetylase inhibitor-mediated cell death is distinct from its global effect on chromatin. *Mol. Oncol.* V. 8. P. 1379.
- Ma C., Bower K.A., Chen G., Shi X., Ke Z.-J., Luo J. 2008. Interaction between ERK and GSK3beta mediates basic fibroblast growth factor-induced apoptosis in SK-N-MC neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* V. 283. P. 9248.
- Maeldansmo G.M., Holm R., Nesland J.M., Fodstad Ø., Flørenes V.A. 2003. Reduced beta-catenin expression in the cytoplasm of advanced-stage superficial spreading malignant melanoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* V. 9. P. 3383.

- Mandal R., Raab M., Matthess Y., Becker S., Knecht R., Strebhardt K. 2014. pERK 1/2 inhibit caspase-8 induced apoptosis in cancer cells by phosphorylating it in a cell cycle specific manner. *Mol. Oncol.* V. 8. P. 232.
- Mebratu Y., Tesfaygi Y. 2009. How ERK1/2 activation controls cell proliferation and cell death: Is subcellular localization the answer? *Cell Cycle Georget. Tex.* V. 8. P. 1168.
- Meyer S., Fuchs T.J., Bosserhoff A.K., Hofstädter F., Pauer A., Roth V., Buhmann J.M., Moll I., Anagnostou N., Brandner J.M., Ikenberg K., Moch H., Landthaler M., Vogt T., Wild P.J. 2012. A Seven-marker signature and clinical outcome in malignant melanoma: A large-scale tissue-microarray study with two independent patient cohorts. *PLoS One.* V. 7.
- Morin P.J., Vogelstein B., Kinzler K.W. 1996. Apoptosis and APC in colorectal tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 93. P. 7950.
- Nagata Y., Todokoro K. 1999. Requirement of activation of JNK and p38 for environmental stress-induced erythroid differentiation and apoptosis and of inhibition of ERK for apoptosis. *Blood.* V. 94. P. 853.
- Nejak-Bowen K., Kikuchi A., Monga S.P.S. 2013. Beta-catenin-NF- $\kappa$ B interactions in murine hepatocytes: A complex to die for. *Hepatology.* Baltim. Md. V. 57. P. 763.
- Park J.S., Carter S., Reardon D.B., Schmidt-Ullrich R., Dent P., Fisher P.B. 1999. Roles for basal and stimulated p21(Cip-1/WAF1/MDA6) expression and mitogen-activated protein kinase signaling in radiation-induced cell cycle checkpoint control in carcinoma cells. *Mol. Biol. Cell.* V. 10. P. 4231.
- Pospelova T.V., Medvedev A.V., Kukushkin A.N., Svetlikova S.B., van der Eb A.J., Dorsman J.C., Pospelov V.A. 1999. E1A + cHa-ras transformed rat embryo fibroblast cells are characterized by high and constitutive DNA binding activities of AP-1 dimers with significantly altered composition. *Gene Expr.* V. 8. P. 19.
- Rasola A., Sciacovelli M., Chiara F., Pantic B., Brusilow W.S., Bernardi P. 2010. Activation of mitochondrial ERK protects cancer cells from death through inhibition of the permeability transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 107. P. 726.
- Shao N., Zou J., Li J., Chen F., Dai J., Qu X., Sun X., Ma D., Ji C. 2012. Hyper-activation of WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway mediates anti-tumor effects of histone deacetylase inhibitors in acute T lymphoblastic leukemia. *Leuk. Lymphoma.* V. 53. P. 1769.
- Stang S.L., Lopez-Campistrous A., Song X., Dower N.A., Blumberg P.M., Wender P.A., Stone J.C. 2009. A proapoptotic signaling pathway involving RasGRP, Erk, and Bim in B cells. *Exp. Hematol.* V. 37. P. 122.
- Tamma S.K., Mandal B.K., Ranjan S., Dasgupta N. 2017. Cytotoxicity study of *Piper nigrum* seed mediated synthesized SnO<sub>2</sub> nanoparticles towards colorectal (HCT116) and lung cancer (A549) cell lines. *J. Photochem. Photobiol. B.* V. 166. P. 158.
- Wang H., Chi C.-H., Zhang Y., Shi B., Jia R., Wang B.-J. 2019. Effects of histone deacetylase inhibitors on ATP-binding cassette transporters in lung cancer A549 and colorectal cancer HCT116 cells. *Oncol. Lett.* V. 18. P. 63.
- Wang Y., Tang H., He G., Shi Y., Kang X., Lyu J., Zhou M., Zhu M., Zhang J., Tang K. 2018. High Concentration of aspirin induces apoptosis in rat tendon stem cells via inhibition of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* V. 50. P. 2046.
- Willert K., Jones K.A. 2006. Wnt signaling: is the party in the nucleus? *Genes Dev.* V. 20. P. 1394.
- Yu X.-D., Wang S.-Y., Chen G.A., Hou C.-M., Zhao M., Hong J.A., Nguyen D.M., Schrupp D.S. 2007. Apoptosis induced by depsipeptide FK228 coincides with inhibition of survival signaling in lung cancer cells. *Cancer J. Sudbury Mass.* V. 13. P. 105.
- Zimmerman Z.F., Kulikauskas R.M., Bomsztyk K., Moon R.T., Chien A.J. 2013. Activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling increases apoptosis in melanoma cells treated with trail. *PLoS One.* V. 8. P. e69593. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069593>

## THE INFLUENCE OF A SODIUM BUTYRATE ON PROLIFERATIVE SIGNALING CASCADES IN SENSITIVE AND RESISTANT TO HDAC INHIBITORS ACTION CELLS

O. O. Gnedina<sup>a</sup> and M. V. Igotti<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Institute of Cytology of the Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, 194064 Russia

\*e-mail: marie.igotti@gmail.com

To establish the mechanisms of transformed cells resistance to the histone deacetylase inhibitors (HDACi), we compared the changes of the main proliferative signaling cascades activities in cells that are sensitive or resistant to HDACi-induced apoptosis. The time-dependent dynamics of the ERK kinase activity was shown. Phosphorylation of ERK kinase increased in the first 24 hours of the HDACi sodium butyrate treatment, followed by ERK activity decrease in resistant cells. Whereas in apoptotic cells, an inverse time-dependent dynamics of ERK activity changes was observed. It has been shown that resistance to HDACi can be overcome by inhibiting the MEK/ERK pathway. The resistant cells underwent to apoptotic death after 48 hours of combined treatment with sodium butyrate and the MEK/ERK pathway inhibitor PD098059. The study of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling cascade showed that the accumulation and transcriptional activation of  $\beta$ -catenin occurs only in cells resistant to HDACi-induced apoptosis. Thus, the obtained results indicate that a change in the activity of  $\beta$ -catenin is one of the reasons for the resistance to apoptosis induced by HDACi sodium butyrate, and the increased activity of the PI3K/Akt and MEK/ERK kinase pathways is a prerequisite for the most effective antiproliferative effect of HDACi.

**Keywords:** tumor cells, histone deacetylase inhibitor (HDACi), apoptosis, resistance,  $\beta$ -catenin, PKB/Akt and ERK kinases