

УДК 57.085.23:616.-006.66

ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ДЕУБИКВИТИНАЗЫ Usp28 В КЛЕТОЧНОМ ЦИКЛЕ КЛЕТОК АДЕНОКАРЦИНОМЫ КИШЕЧНИКА НСТ116 СВИДЕТЕЛЬСТВУЮТ О ЕЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ РОЛИ В РЕГУЛЯЦИИ ПЕРЕХОДА G₁/S

© 2020 г. В. М. Рябов¹, Е. Н. Петрова¹, Б. В. Попов¹, *

¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: borisvp478@gmail.com

Поступила в редакцию 19.11.2019 г.

После доработки 02.12.2019 г.

Принята к публикации 05.12.2019 г.

Usp28 является деубиквитирующим ферментом, удаляющим убиквитин из его конъюгатов с субстратами, что предотвращает их деградацию в протеасомах. Современные публикации показывают, что Usp28 и убиквитиновая лигаза Fbw7 создают функциональную пару белков, которая контролирует опосредованную убиквитином деградацию ключевых регуляторов клеточных функций, включая Muc, Jun, Ncd, Hif1. В этой паре белков Usp28 противодействует деструктивной активности Fbw7 и играет роль фактора, способствующего опухолевому росту. Поскольку установленными мишенями Usp28 являются белки Muc и Jun, связанные с клеточным циклом, мы предположили, что Usp28 регулирует деление клеток, и ее уровень может изменяться в ходе клеточного цикла. Целью настоящей работы была оценка изменений уровня Usp28 в ходе клеточного цикла в клетках карциномы кишечника человека НСТ116. Клетки НСТ116 синхронизировали путем 72-часового культивирования в ростовой среде с низким содержанием сыворотки. В асинхронно делящихся клетках уровень Usp28 был невысоким и его локализация выявлялась как ядерно-цитоплазматическая. Общий уровень Usp28 и степень его ядерной локализации возрастали в клетках от состояния асинхронного роста к поздней фазе G₁ с последующим снижением и обратным перераспределением белка из ядра в цитоплазму после завершения фазы G₁. По данным иммуноблотинга колебания уровня Usp28 и фосфатазы Cdc25A в синхронизированных клетках НСТ116 в клеточном цикле совпадали. Данные иммунофлуоресценции прямо соответствовали результатам иммуноблотинга. Полученные результаты дают возможность предположить, что Usp28 может регулировать уровень и функциональную активность белка Cdc25A, контролирующего вход клетки в фазу репликации ДНК.

Ключевые слова: аденокарцинома кишечника, деубиквитиназа Usp28, клеточный цикл, регуляция перехода G₁/S

DOI: 10.31857/S0041377120030050

Usp28 является белком с мол. массой 140 кДа, который принадлежит к семейству деубиквитирующих ферментов, удаляющих убиквитин с субстратов и отменяющих активность убиквитиновой лигазы и последующую деградацию субстратов в протеасомах (Amerik et al., 2004). Современные исследования показывают, что Usp28 и убиквитиновая лигаза Fbw7 формируют функциональную пару белков, которая контролирует опосредованную убиквитином деградацию нескольких ключевых регуляторов клеточных функций, включая Muc, Jun, Ncd, Hif1. Деградация этих субстратов с помощью Fbw7 предотвращается деубиквитиной Usp28 (Popov et al., 2007; Flugel et al., 2012; Diefenbacher et al., 2014). В нормальных

условиях Usp28 формирует комплекс с Fbw7 и препятствует убиквитинованию субстратов. В этой паре Usp28 противодействует деструктивной активности Fbw7 и играет роль фактора, способствующего росту опухоли (Popov et al., 2007; Diefenbacher et al., 2014, 2015).

Белковая протеаза Usp28 была открыта при анализе состава комплексов, формирующихся путем физического взаимодействия с p53-связывающим белком (53BP) в ходе ответа на повреждение, вызванного двойными разрывами ДНК (Zhang et al., 2006). Usp28 опосредует стабилизацию Chk2, 53BP и индукцию апоптоза в клетках карциномы человека линии H-460 и мышинных В-клетках с индуцированным ответом на повреждение ДНК. Потеря Usp28 повышает устойчивость клеток к апоптозу, вызванному ультрафиолетовым или рентгеновским облучением, и делает их похожими на мышинные клетки, которые не экспрессируют Chk2 и p53 (Zhang et al.,

Принятые сокращения: Fbw7 — убиквитиновая лигаза 7 (F-box/WD repeat-containing protein 7); Hif1α — фактор, чувствительный к гипоксии 1-альфа; Usp28 — убиквитин-специфическая протеаза.

2006). Ответ на повреждение ДНК включает, в качестве одного из ключевых механизмов, остановку клеточного цикла, которая вызывается путем деградации фосфатазы Cdc25A, формирующей контрольную точку клеточного цикла G₁/S, опосредованную инактивацией комплекса Cdk2/циклин E (Busino et al., 2003; Jin et al., 2003). В ответ на повреждение ДНК Cdc25A полиубиквитинируется и деградирует, тогда как обработка клеток протеасомным ингибитором LLnL немедленно после ультрафиолетового облучения предотвращает снижение уровня фосфатазы Cdc25A (Jin et al., 2003).

Функциональная активность онкопротеина Мус связана с регуляцией клеточного деления, роста и апоптоза. Уровень Мус снижается при повреждении ДНК, что вызывается его протеасомной деградацией, опосредованной убиквитиновой лигазой Fbw7, которая в условиях повреждения ДНК теряет связь с Usp28 и вызывает полиубиквитинирование белка Мус, служащее сигналом для его деградации (Porov et al., 2007). *МУС* относится к генам немедленного раннего ответа на индукцию пролиферации митогенами (Waters et al., 1991). Экспрессия Мус в покоящихся клетках достаточна для их входа в клеточный цикл, тогда как торможение его экспрессии в делящихся клетках является причиной их выхода из клеточного цикла (Kaczmarek et al., 1985). К числу генов-мишеней фактора Мус, которые регулируют G₁/S переход, относятся гены циклинов *D2* и *E1*, фосфатазы *CDC25A*, а также факторов *E2F1*, *E2F3* (Meyer et al., 2008). Названные гены содержат в промоторной области сайт связывания с белком Мус, который опосредует их транскрипционную активацию (Adams et al., 2000; Perna et al., 2012).

Цель настоящей работы заключалась в оценке уровней Usp28 и Cdc25A в ходе клеточного цикла в синхронизированных клетках аденокарциномы кишечника человека НСТ116. Клетки НСТ116 синхронизировали с помощью 72-часового культивирования в среде с низким содержанием сыворотки (0.15%) и затем рестимулировали с помощью замены ростовой среды на полную, содержащую 10% сыворотки. Эффективность синхронизации определяли с помощью проточной цитометрии асинхронно делящихся, покоящихся и стимулированных клеток через 0, 6, 12, и 18 ч после рестимуляции. Уровень Usp28 и Cdc25A оценивали в те же временные промежутки, используя иммуноблотинг и иммунофлюоресценцию. Результаты наших экспериментов показали, что в клеточном цикле происходят изменения компартиментализации и уровня деубиквитиказы Usp28, прямо соответствующие в иммуноблотинге связанным с клеточным циклом колебаниям уровня Cdc25A. Эти данные дают возможность предположить, что Usp28 может регулировать уровень и функциональную активность фосфатазы Cdc25A, которая формирует механизм контрольной точки в фазе G₁ клеточного цикла.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Клеточные линии и культивирование клеток. В работе использовали клетки кишечной аденокарциномы человека НСТ116, любезно предоставленные д-ром Н.А. Барлевым (Институт цитологии РАН). Клетки культивировали в пластиковой культуральной посуде в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM; Gibco, США), содержащей 50 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (БиолоТ, Россия), 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ФБС; Gibco, США) в CO₂-инкубаторе при 6% CO₂, 37°C, и влажности 100%. При достижении клетками высокой плотности (80%) проводили пересев культуры, для чего удаляли питательную среду и дважды промывали клетки раствором PBS (БиолоТ, Россия). Для отделения клеток от пластиковой поверхности использовали смесь 0.25%-ного раствора трипсина с Версеном в соотношении 1 : 1 (БиолоТ, Россия). Клетки инкубировали с данным раствором в термостате в течение 5 мин, затем их тщательно ресуспендировали и переносили в новую чашку, нейтрализуя трипсин ростовой средой с 10% ФБС. Суспензию объемом 15 мкл помещали в камеру Горяева для подсчета клеток под микроскопом. Для длительного хранения клетки ресуспендировали в 10%-ном растворе криопротектора ДМСО (Helicon, Россия) в DMEM, содержащей 10% ФБС, переносили в криовials и замораживали в жидком азоте.

Синхронизация клеток в клеточном цикле и проточная цитометрия. НСТ116 клетки культивировали для асинхронного роста плотностью 50–70% в 60 мм культуральных чашках, содержащих 9 мм покровные стекла (Биовитрум, Россия). Для синхронизации в клеточном цикле клетки в чашках дважды промывали PBS и культивировали в течение 72 ч в условиях голодания (в среде DMEM, содержащей 0.15% ФБС). Для активации роста клетки рестимулировали с помощью замены в культуральных чашках среды с низким содержанием сыворотки на полную, содержащую 10% ФБС. Покровные стекла с распластанными на них клетками и соответствующие клеточные осадки собирали через 0, 6, 12, и 18 ч после начала рестимуляции полной ростовой средой. Для анализа клеточного цикла путем проточной цитометрии клетки в различных точках после рестимуляции дважды промывали PBS, трипсинизировали, удаляли трипсин путем ресуспендирования в 10 мл PBS и центрифугирования при 200 g в течение 5 мин. Для окраски ядер клетки ресуспендировали в PBS, содержащем 200 мкг/мл сапонина, 50 мкг/мл йодистого пропидия, 250 мкг/мл РНКазы А (Thermo Fisher Scientific, США), 1% бычьего сывороточного альбумина (BCA) (Amresco, США) и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. Цитометрический анализ проводили на проточном цитометре CytoFLEX (Beckman COULTER, США); для возбуждения и регистрации флюоресценции применяли фильтры 488 и 585–690 нм соответственно.

Денатурирующий электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (SDS). Для приготовления экстрактов асинхронно растущие в 100 мм культуральных чашках клетки промывали дважды PBS, отделяли от пластика при помощи специального скребка, осаждали центрифугированием (4000 g, 2 мин), инкубировали в течение 30 мин на льду в 3-х объемах лизирующего раствора, содержащего 50 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 0.1 мМ PMSF, коктейль ингибиторов протеаз (Sigma, США) в разведении 1 : 100. Экстракты клеток центрифугировали 15 мин при 14000 g, 4°C, супернатанты хранили при -80°C и использовали для последующих экспериментов. Концентрацию белка в экстрактах определяли методом Брэдфорд. Для этого к 100 мкл смеси компонентов коммерческого набора Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) добавляли 2 мкл пробы белкового экстракта, смесь инкубировали при 37°C 30 мин, и определяли оптическую плотность при 562 нм на спектрофотометре NanoDrop ND 1000 (США) в объеме 2 мкл. Концентрацию белка рассчитывали по калибровочной кривой, построенной по результатам измерений оптических плотностей образцов с известной концентрацией БСА. Выравнивали количество белка во всех пробах, добавляя соответствующее количество четырехкратного загрузочного буфера (4% SDS, 20% глицерина, 200 мМ дитиотреитола, 120 мМ Трис-HCl (pH 6.8), 0.002% бромфенолового синего) и инкубировали образцы при 95°C 5 мин. Пробу, содержащую 30–45 мкг общеклеточного белка, наносили на одну дорожку ПААГ. Электрофорез проводили в 10%-ном ПААГ с SDS при силе тока 30 мА на один гель. В качестве маркеров мол. массы на одну из дорожек наносили 3 мкл раствора белковых стандартов мол. массы (Thermo Fisher Scientific, США).

Иммуноблотинг. Электрофоретически разделенные белки переносили с геля на мембрану PVDF (Thermo Fisher Scientific, США) при помощи полусухого электропереноса. Перед этим мембрану помещали в метанол на 1 мин, обрабатывали буфером для переноса (48 мМ Трис, 39 мМ глицин, 10% метанол, 0.03% SDS). Гель с белками после электрофореза помещали на мембрану PVDF, сверху и снизу накрывали фильтровальной бумагой, смоченной буфером для переноса, и помещали в камеру Hoefer Semiphor TE 77 (Hoefer, Швеция). Электроперенос белков проводили при силе тока 90 мА в течение 1 ч. Далее производили блокировку сайтов неспецифического связывания обезжиренным 5%-ным молоком, разведенным в буфере TBST (150 мМ NaCl, 10 мМ Трис-HCl (pH 8.0), 0.05% Tween 20) в течение 1 ч. После этого мембрану отмывали в TBST (5 раз по 5 мин) и обрабатывали первыми антителами в течение ночи при 4°C, затем вторыми антителами в течение 2 ч при комнатной температуре. Антитела разводили в блокирующем растворе в соответствии с рекомендациями производителей. В качестве вторых антител использо-

вали видоспецифические антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, которую визуализировали на мембране с помощью коммерческого набора реактивов Clarity Western ECL Substrate (BioRad, США). Изображения препаратов, активированных с помощью хемилюминесценции, получали на приборе ChemiDoc Touch Imaging System (BioRad, США).

Иммунофлюоресцентное окрашивание. Круглые покровные стекла диаметром 9 мм (Биовитрум, Россия) с клетками, распластанными при росте в культуре, переносили в пластиковые 35 мм чашки, однократно отмывали PBS 5 мин, фиксировали 4%-ным параформальдегидом 45 мин, обрабатывали 0.2%-ным детергентом Тритоном X-100 10 мин, промывали PBS 2 раза по 5 мин, сайты неспецифического связывания антител блокировали 1 ч раствором, содержащим 3% БСА и 0.1% Твина 20; затем на клетки наносили специфические антитела в разведении 1 : 200 в блокирующем растворе на 1 ч при комнатной температуре, промывали 3 раза по 5 мин PBS, обрабатывали 1 ч при комнатной температуре вторыми антителами, конъюгированными с флюоресцентной меткой, отмывали 3 раза по 5 мин PBS и заключали в среду Anti-Fade (BioRad, США), уменьшающую неспецифическую флюоресценцию и содержащую краситель DAPI для окраски ДНК. Иммунофлюоресцентные изображения получали на электронном сканирующем конфокальном микроскопе Leica, используя лазеры с длиной волны 405 и 633 нм.

Антитела. В работе использовали следующие антитела: анти-Usp28 (Abcam, США), анти-Cdc25A (Santa Cruz Biotechnology, США), любезно предоставленные д-ром Н. Поповым (University of Wuerzburg, Германия); анти-β-актин (клон AC-15, Sigma, США); для иммуноблотинга использовали вторые антитела, конъюгированные с HRP, против Ig кролика (Cell Signaling, США) и против Ig мыши (BioRad, США); для иммунофлюоресценции в качестве вторых антител брали Alexa Fluor® 633 Fab-фрагмент козлиных антител против легких и тяжелых цепей иммуноглобулинов кролика (Invitrogen, США).

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили с использованием средней арифметической величины, ее ошибки и критерия Стьюдента (при $P = 0.05$), посчитанных при помощи программы Microsoft Office Excel 2010. Уровень Usp28 определяли по соотношению этого белка с актином на одних и тех же электрофоретических блотах. Каждый эксперимент повторяли трижды, проточную цитометрию — дважды. Результаты иммуноблотинга с антителами против Cdc25A и проточной цитометрии не подвергали статистической обработке. Для количественной оценки и сравнения содержания белков на отдельных электрофоретических полосах использовали приложение GelAnalyzer2010.

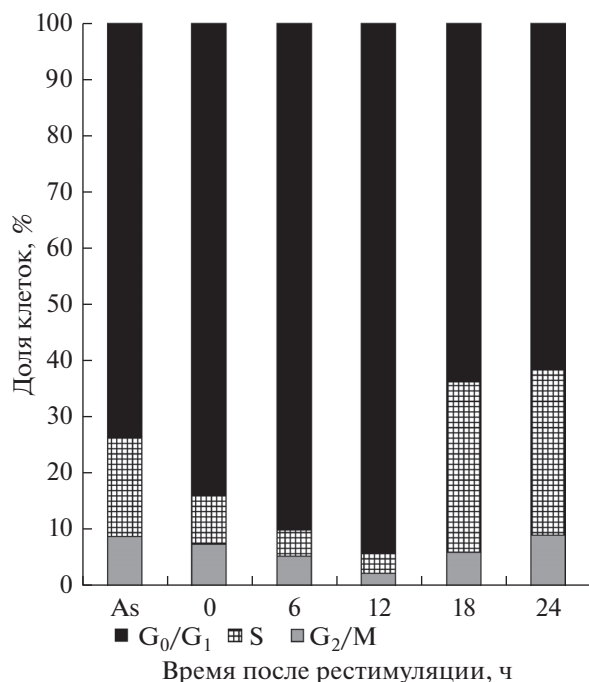


Рис. 1. Распределение клеток аденокарциномы кишечника человека НСТ116 по фазам клеточного цикла в синхронизированных клетках. Клетки культивировали 72 ч в условиях голодания (среда, содержащая 0.15% сыворотки), затем рестимулировали путем смены среды голодания на полную, содержащую 10% ФБС. Результаты оценивали с помощью проточной цитометрии в асинхронно делящихся и синхронизированных клетках через каждые 6 ч после рестимуляции сывороткой. As — асинхронно делящиеся клетки; 0, 6, 12, 18, 24 ч — временные точки после рестимуляции сывороткой, в ходе которых производили цитометрическую оценку распределение клеток по фазам клеточного цикла.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Распределение клеток НСТ116 по фазам клеточного цикла. Цитометрическая оценка показала, что 72-часовое культивирование в условиях голодания (0.15% сыворотки) эффективно синхронизирует клетки в фазах клеточного цикла. При асинхронном росте распределение клеток НСТ116 по фазам клеточного цикла было следующим: G₀/G₁ — 73.8%, S — 17.4%, G₂/M — 8.8%. После культивирования в среде голодания доля клеток в состоянии покоя увеличивалась на 10%, а доля S-фазных клеток уменьшалась вдвое. В ходе фазы G₀/G₁, которая продолжалась до точки рестимуляции 12 ч (рис. 1), доля покоящихся клеток возрастала до 94.3%, а S-фазных уменьшалось до 3.6% (вдвое). Промежуток времени между 12 и 18 ч после рестимуляции клеток полной ростовой средой соответствовал переходу клеток НСТ116 из фазы G₁ в фазу S, после которого доля покоящихся клеток уменьшалась от 94.3 до 63.8%, а доля клеток в S-фазе возрастала от 3.6 до 20.4% (рис. 1).

Связанные с клеточным циклом изменения уровней Usp28 и Cdc25A, выявляемые путем иммуноблотинга. В точке 0 ч в синхронизированных клетках НСТ116 в иммуноблотинге выявлялось довольно большое количество деубиквитиназы Usp28, затем ее уровень возрастал до максимального значения в точке 6 ч после рестимуляции, которая соответствует поздней фазе G₁, после чего уровень белка прогрессивно снижался до минимального значения в точке 18 ч, соответствующей переходу из фазы S в G₂/M (рис. 2a). Сравнение уровней Usp28 в точках 6 и 18 ч выявило их достоверные различия ($P < 0.05$). Изменения уровня Usp28 в ходе клеточного цикла, выявленные с помощью иммуноблотинга, прямо соответствовали колебаниям уровня фосфатазы Cdc25A, который не выявлялся в покоящихся клетках, но далее повышался до максимального уровня в точке 6 ч и резко снижался после завершения фазы G (рис. 2a, б).

Иммунофлуоресцентная оценка уровня Usp28 в ходе клеточного цикла. Результаты иммунофлуоресцентной оценки уровня протеазы Usp28 в ходе клеточного цикла соответствовали таковым иммуноблотинга. В асинхронно делящихся клетках выявлялось довольно много белка, который локализовался как в ядре, так и в цитоплазме (рис. 3). Уровень Usp28 повышался, а его ядерная локализация возрастала, начиная с клеток в состоянии покоя до точки 12 ч в рестимулированных клетках с последующим снижением уровня продукции белка и его ядерной локализации в точке 18 ч (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Деубиквитиназа Usp28 участвует в регуляции различных клеточных функций, включая апоптоз, перенос белков через мембрану, прогрессия клеточного цикла, ответ на повреждение ДНК, ремоделирование хроматина, и модуляция передачи сигналов (Komander et al., 2009; Fraile et al., 2012). Вклад Usp28 в регуляцию хода клеточного цикла был выявлен при анализе механизма ответа на повреждение ДНК, при котором клетки прекращают деление. Механистически это связано с опосредованной убиквитином деградацией фосфатазы Cdc25A, контролирующей переход G₁ → S. Деградация Cdc25A вызывает остановку клеточного цикла в фазе G₁ (Mailand et al., 2000). Уровень Cdc25A возрастает в фазе G₁ благодаря действию транскрипционных факторов E2f1 и E2f3. В поздней фазе G₁ фосфатаза Cdc25A убиквитинируется и деградирует (Busino et al., 2004). Гены *E2F1* и *E2F3* являются мишенями транскрипционного фактора с-Мус, поскольку содержат в промоторных областях сайты связывания с-Мус, которые в G₁-фазных клетках взаимодействуют с белком с-Мус, индуцирующим их переход в фазу репликации ДНК (Leone et al., 2001). В свою очередь, уровень с-Мус поддерживается, например, при повреждении ДНК (в некоторых экспериментальных модельных

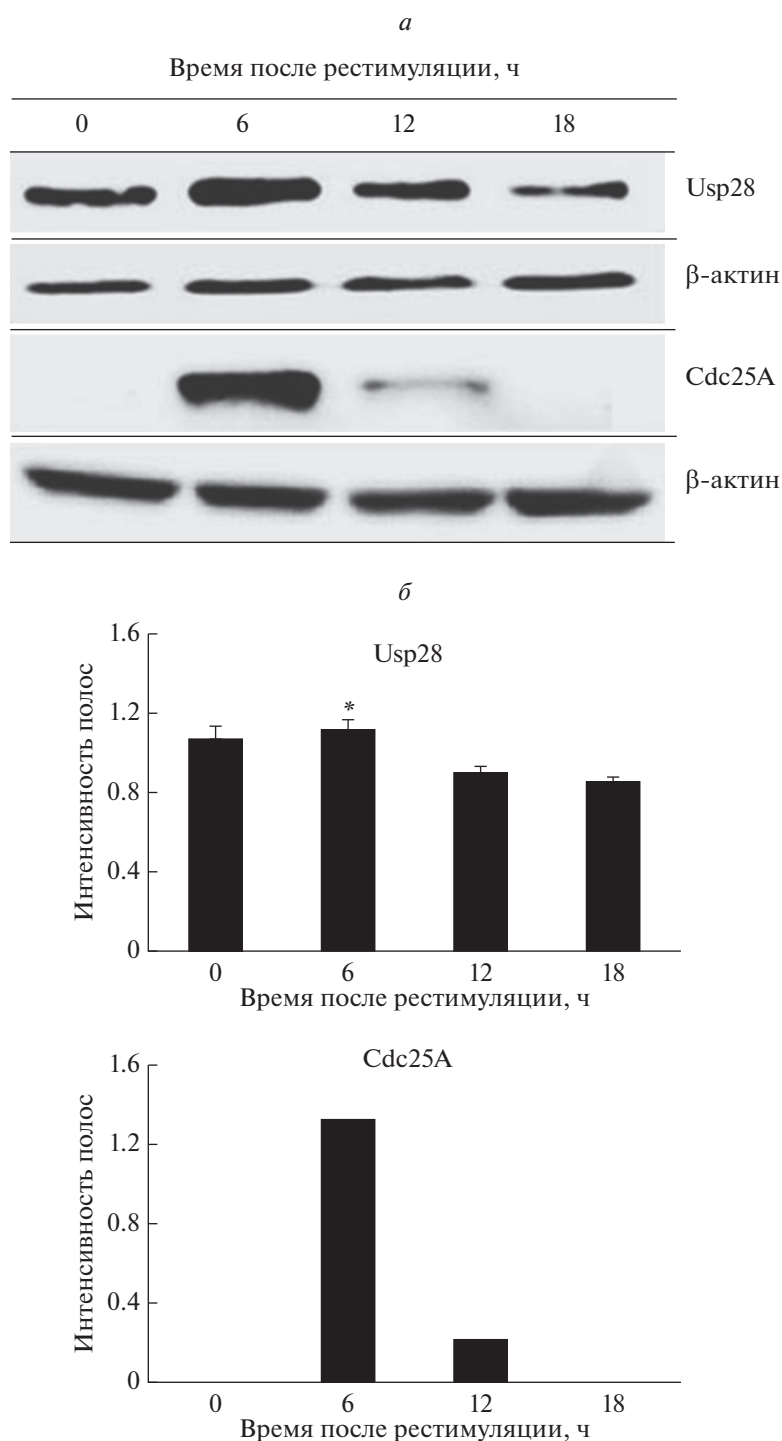


Рис. 2. Изменения уровня убиквитинной протеазы Usp28 и фосфатазы Cdc25A в экстрактах клеток аденокарциномы кишечника НСТ116, полученных в различных фазах клеточного цикла. Клетки синхронизировали как описано в подписи к рис. 1. *a* – Имиджи полос Usp28 и Cdc25A в иммуноблоте. *б* – Диаграммы количественных изменений Usp28 и Cdc25A (относительно β -актина) в ходе клеточного цикла, полученные на основании данных иммуноблотинга; данные представляют собой средние арифметические значения и их ошибки, *звездочка* показывает достоверные различия по сравнению с тем же показателем в точке 18 ч, $P < 0.05$. Экстракты клеток, содержащие 40 мкг общего белка, разделяли в 10%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия с последующим иммуноблотингом. Распределение клеток по фазам клеточного цикла в указанных временных точках см. на рис. 1.

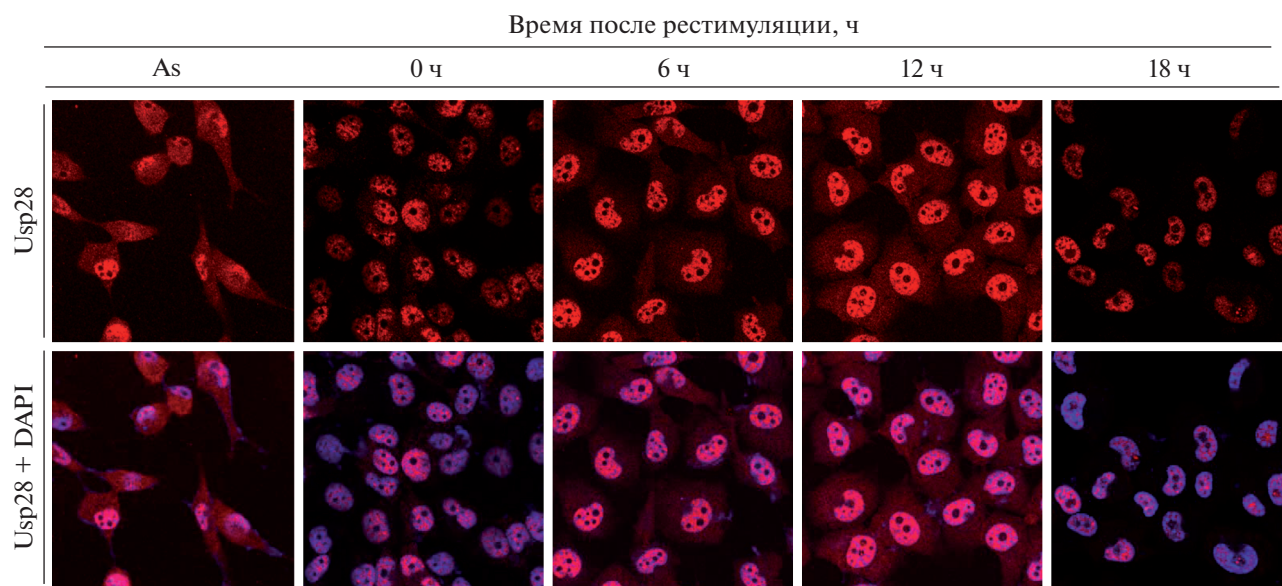


Рис. 3. Иммунофлуоресцентный анализ уровня и локализации Usp28 в клетках аденокарциномы кишечника человека HCT116, синхронизированных в клеточном цикле в различное время после рестимуляции сывороткой. Имиджи получены на конфокальном сканирующем электронном микроскопе Leica (Германия) с использованием лазеров 405 и 633 нм и объектива 40×. *Верхний ряд* – имиджи клеток, окрашенных антителами против Usp28, *нижний ряд* – совмещенные изображения (антитела против Usp28 + DAPI). Обозначения те же, что и на рис. 1.

системах) и в отдельных тканях, включая тонкий кишечник, с помощью Usp28, которая препятствует деградации этого белка убиквитиновой лигазой Fbw7 (Popov et al., 2007; Diefenbacher et al., 2014). Результаты опубликованных исследований свидетельствуют, что изменения уровня ключевых регуляторных белков клеточного цикла, которые индуцируются белком с-Мус, опосредуются деубиквитиназами. Например, уровень циклина D1 – деубиквитиназой Usp2, циклина A – деубиквитиназой Usp37, а циклина E – деубиквитиназой Usp27 (Shan et al., 2009; Huang et al., 2011; Dong et al., 2018).

В настоящей работе мы исходили из идеи, что действие Usp28 на Cdc25A, которое выявлено при ответе на повреждение ДНК, может носить более общий характер и распространяться на фазу G_1 клеточного цикла, в которой фосфатаза Cdc25A формирует контрольную точку перехода в стадию репликации ДНК. В задачу работы входила оценка изменения уровня Usp28 в ходе клеточного цикла в клетках кишечной аденокарциномы человека HCT116. Опубликованные работы свидетельствуют, что в ткани тонкого кишечника человека Usp28 стабилизирует уровень белка с-Мус и облегчает развитие опухоли (Diefenbacher et al., 2014). Поскольку, с одной стороны, клетки линии HCT116 происходят из тонкого кишечника, а с другой, с-Мус выполняет роль индуктора перехода $G_1 \rightarrow S$, активируя ключевые регуляторные гены циклина D1, CDC25A, E2F1, E2F3, циклина E, мы предположили, что в клетках этой линии Usp28 может выполнять регуляторную роль в пе-

реходе $G_1 \rightarrow S$, и ее уровень будет изменяться в ходе клеточного цикла подобно тому, как изменяется уровень Usp27, стабилизирующей циклин E (Dong et al., 2018).

В настоящей работе клетки линии HCT116 были синхронизированы в клеточном цикле с помощью 72-часового культивирования в условиях голодания. Эффективность синхронизации оценивали с помощью проточной цитометрии, которая позволила установить, что в клетках линии HCT116 точка 12 ч после рестимуляции ФБС соответствует G_1/S -переходу (рис. 1). Иммунофлуоресцентно белок Usp28 ясно выявляется в асинхронно делящихся клетках и локализуется как в ядре, так и в цитоплазме (рис. 3). В ходе клеточного цикла от точки 0 ч, соответствующей состоянию покоя, до точки 12 ч, соответствующей G_1/S -переходу, уровень Usp28 возрастает, и белок перемещается в ядро. Затем в точке 18 ч, соответствующей переходу из фазы S в фазы G_2/M , уровень Usp28 снижается и белок перемещается в цитоплазму (рис. 3). Результаты иммуноблоттинга подтверждают данные иммунофлуоресценции, уровни Usp28 и Cdc25A возрастают в клетках HCT116 от состояния покоя до G_1/S -перехода и затем снижаются (рис. 2а, б).

Полученные нами результаты показывают, что в синхронизированных клетках аденокарциномы кишечника человека линии HCT116 уровень убиквитинпротеазы Usp28 повышается в поздней фазе G_1 и этот белок транслируется в ядро. Мы предполагаем, что колебания уровня Usp28, ассоциированные с

клеточным циклом, могут быть связаны с ее участием в регуляции активности ее потенциальной мишени — фосфатазы Cdc25A.

БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящая работа была инициирована д-ром Н.Б. Поповым (Comprehensive Cancer Center Mainfranken, University Hospital Würzburg, Германия), чья идея заключалась в том, что деубиквитиновая протеаза Usp28 и убиквитиновая лигаза Fbw7 могут формировать функциональную пару белков, регулирующих уровень Cdc25A, которая формирует контрольную точку перехода фаз G₁/S. Наш собственный подход включал оценку роли Usp28 в стабилизации Cdc25A в ходе клеточного цикла клеток НСТ116, а на первом этапе — в оценке изменений уровня и локализации Usp28 в ходе клеточного цикла. Клетки линии НСТ116 были любезно предоставлены нам д-ром Н.А. Барлевым (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Иммунофлюоресцентные имиджи были получены в Коллективном центре микроскопии Института цитологии РАН.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках бюджетной темы Института цитологии РАН № 0124-2019-0004.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Экспериментов с участием животных или людей авторы не проводили.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Adams M.R., Sears R., Nuckolls F., Leone G., Nevins J.R. 2000. Complex transcriptional regulatory mechanisms control expression of the E2F3 locus. *Mol. Cell Biol.* V. 20. P. 3633.
- Amerik A.Y. Hochstrasser M. 2004. Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* V. 1695. P. 189.
- Busino L., Chiesa M., Draetta G.F., Donzelli M. 2004. Cdc25A phosphatase: combinatorial phosphorylation, ubiquitylation and proteolysis. *Oncogene.* V. 23. P. 2050.
- Busino L., Donzelli M., Chiesa M., Guardavaccaro D., Ganoh D., Dorrello N.V., Hershko A., Pagano M., Draetta G.F. 2003. Degradation of Cdc25A by beta-TrCP during S phase and in response to DNA damage. *Nature.* V. 426. P. 87.
- Diefenbacher M.E., Chakraborty A., Blake S.M., Mitter R., Popov N., Eilers M., Behrens A. 2015. Usp28 counteracts Fbw7 in intestinal homeostasis and cancer. *Cancer Res.* V. 75. P. 1181.
- Diefenbacher M.E., Popov N., Blake S.M., Schüle-Völk C., Nye E., Spencer-Dene B., Jaenicke L.A., Eilers M., Behrens A. 2014. The deubiquitinase USP28 controls intestinal ho-

- meostasis and promotes colorectal cancer. *J. Clin. Invest.* V. 124. P. 3407.
- Dong L., Yu L., Bai C., Liu L., Long H., Shi L., Lin Z. 2018. USP27-mediated Cyclin E stabilization drives cell cycle progression and hepatocellular tumorigenesis. *Oncogene.* V. 37. P. 2702.
- Flügel D., Görlach A., Kietzmann T. 2012. GSK-3 β regulates cell growth, migration, and angiogenesis via Fbw7 and USP28-dependent degradation of HIF-1 α . *Blood.* V. 119. P. 1292.
- Fraile J.M., Quesada V., Rodríguez D., Freije J.M., López-Otín C. 2012. Deubiquitinases in cancer: new functions and therapeutic options. *Oncogene.* V. 31. P. 2373.
- Huang X., Summers M.K., Pham V., Lill J.R., Liu J., Lee G., Kirkpatrick D.S., Jackson P.K., Fang G., Dixit V.M. 2011. Deubiquitinase USP37 is activated by CDK2 to antagonize APC(CDH1) and promote S phase entry. *Mol. Cell.* V. 42. P. 511.
- Jin J., Shirogane T., Xu L., Nalepa G., Qin J., Elledge S.J., Harper J.W. 2003. SCF β -TRCP links Chk1 signaling to degradation of the Cdc25A protein phosphatase. *Genes Dev.* V. 17. P. 3062.
- Kaczmarek L., Hyland J.K., Watt R., Rosenberg M., Baserga R. 1985. Microinjected c-myc as a competence factor. *Science.* V. 228. P. 1313.
- Komander D., Clague M. J., Urbé S. 2009. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* V. 10. P. 550.
- Leone G., Sears R., Huang E., Rempel R., Nuckolls F., Park C.H., Giangrande P., Wu L., Saavedra H.I., Field S.J., Thompson M.A., Yang H., Fujiwara Y., Greenberg M.E., Orkin S., Smith C., Nevins J.R. 2001. Myc requires distinct E2F activities to induce S phase and apoptosis. *Mol. Cell.* V. 8. P. 105.
- Maidland N., Falck J., Lukas C., Syljuåsen R.G., Welcker M., Bartek J., Lukas J. 2000. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science.* V. 288. P. 1425.
- Meyer N., Penn L.Z. 2008. Reflecting on 25 years with MYC. *Nat. Rev. Cancer.* V. 8. P. 976.
- Perna D., Fagà G., Verrecchia A., Gorski M.M., Barozzi I., Narang V., Khng J., Lim K.C., Sung W.K., Sanges R., Stupka E., Oskarsson T., Trumpp A., Wei C.L., Müller H., Amati B. 2012. Genome-wide mapping of Myc binding and gene regulation in serum-stimulated fibroblasts. *Oncogene.* V. 31. P. 1695.
- Popov N., Wanzel M., Madiredjo M., Zhang D., Beijersbergen R., Bernards R., Moll R., Elledge S.J., Eilers M. 2007. The ubiquitin-specific protease USP28 is required for MYC stability. *Nat. Cell Biol.* V. 9. P. 765.
- Shan J., Zhao W., Gu W. 2009. Suppression of cancer cell growth by promoting cyclin D1 degradation. *Mol. Cell.* V. 36. P. 469.
- Waters C.M., Littlewood T.D., Hancock D.C., Moore J.P., Evan G.I. 1991. c-Myc protein expression in untransformed fibroblasts. *Oncogene.* V. 6. P. 797.
- Zhang D., Zaugg K., Mak T.W., Elledge S.J. 2006. A role for the deubiquitinating enzyme USP28 in control of the DNA-damage response. *Cell.* V. 126. P. 529.

OSCILLATIONS OF THE DEUBIQUITASE 28 LEVELS IN CELL CYCLE OF THE HUMAN ADENOCARCINOMA Cell LINE HCT116 SUGGEST ITS FUNCTIONAL ROLE IN REGULATION OF THE G₁/S TRANSITION

V. M. Ryabov^a, E. N. Petrova^a, and B. V. Popov^{a, *}

^a*Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia*

^{*}*e-mail: borisvp478@gmail.com*

Usp28 is a deubiquitylating enzyme which removes ubiquitin from ubiquitin conjugates with substrates and prevents them from degradation in proteasomes. Recent investigations discovered that Usp28 and Fbw7 E3 ubiquitin ligase makes a functional pair of proteins that controls the ubiquitin-mediated degradation of several key regulators of cell functions, including Myc, Jun, Nid, and Hif1 α . In this pair, Usp28 counteracts Fbw7's destructive activity and plays the role of a tumor-promoting factor. Because the Myc and Jun, associated with cell cycle, are the Usp28 targets, we suggested that Usp28 may regulate cell division and its level is cell cycle associated. The goal of this work was to evaluate the cell cycle associated Usp28 oscillations in cells of human adenocarcinoma HCT116. The HCT116 cells were cell cycle synchronized using their 72 hour cell culture in the growth medium with 0.15% of FCS. In asynchronously growing cells the Usp28 level was low and the protein was distributed between nucleus and cytoplasm. The total level of Usp28 increased in and the protein translocated from cytoplasm to nucleus in late G1 phase, while showed back distribution after S phase. The immunoblotting results registering the level and distribution of the Usp28 corresponded to the immunofluorescence data. Our results suggest that Usp28 may regulate the levels and functional activity of the Cdc25A which controls the G₁/S transition.

Keywords: deubiquitinase Usp28, cell cycle, regulation of the G₁/S transition