

УДК 621.17.1

## PARP10 ВЛИЯЕТ НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ КЛЕТОК КОЛОРЕКТАЛЬНОГО РАКА: ПРЕДВАРИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ<sup>1</sup>

© 2020 г. С. F. Wu<sup>a, 2</sup>, М. Xiao<sup>a, 2</sup>, Y. L. Wang<sup>a, \*</sup>, М. D. Threadgill<sup>b</sup>, М. Li<sup>a</sup>,  
Y. Tang<sup>a</sup>, X. Lin<sup>a</sup>, L. Yang<sup>a</sup>, Q. S. Li<sup>a</sup>, X. Li<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Pathology, Molecular Medicine and Cancer Research Center,  
Chongqing Medical University, Chongqing, 400016 China

<sup>b</sup>Department of Pharmacy and Pharmacology, University of Bath, Bath BA2 7AY, United Kingdom

\*e-mail: wangyalan@cqmu.edu.cn

Поступила в редакцию 02.03.2019 г.

После доработки 28.03.2019 г.

Принята к публикации 29.05.2019 г.

Внутриклеточная моно(ADP)-рибозилтрансфераза PARP10 регулирует пролиферацию некоторых типов клеток. Однако влияние этого фермента на пролиферацию клеток колоректального рака до сих пор систематически не изучали. Предварительное исследование механизмов, лежащих в основе влияния PARP10 на пролиферацию клеток колоректального рака, проведено нами на примере клеток LoVo и CT26. Ингибирование ферментативной активности PARP10 приводит к значительному снижению пролиферативной способности клеток LoVo и CT26 *in vitro* и подавлению роста опухолей CT26 в подмышечной области мышей BALB/c *in vivo*, а также к задержке клеточного цикла. Отмечены изменения экспрессии β-катенина и его транслокации в ядро, а также связанных с ним сигнальных белков аксина-2 и с-Муб — экспрессия аксина-2 увеличилась, а с-Муб уменьшалась. Показано, что PARP10 способствует пролиферации тех клеток колоректального рака, которые продуцируют значительные количества PARP10. Этот эффект подавляется при ингибировании ферментативной активности. По всей видимости, β-катенин можно рассматривать как медиатор антипролиферативного эффекта.

**Ключевые слова:** PARP10, β-катенин, колоректальный рак, пролиферация клеток

**DOI:** 10.31857/S0026898420020184

Поли(ADP)-рибоза-полимераза-10 (PARP10/ARTD10) входит в семейство PARP и обладает моно(ADP)-рибозилтрансферазной (MAR) активностью. Первоначально PARP10 был идентифицирован как белок, взаимодействующий с MYC и способный моно(ADP)-рибозилировать и себя, и коровые гистоны [1]. Впоследствии установили, что PARP10 действует на различные клеточные процессы [2], в том числе контролирует апоптоз и пролиферацию опухолевых клеток [3, 4], метастазирование опухолей [5], модулирует функции митохондрий [6]. PARP10 присутствует как в ядре, так и в цитоплазме [7]. Сообщается, что локализованный в ядре PARP10 способствует пролиферации опухолевых клеток [4], участвуя в репарации повреждений ДНК [8] и изменении клеточного цикла [9]. С другой стороны, PARP10 может моно(ADP)-рибозилировать один из сигнальных белков, который регулирует пролиферацию клеток посредством транслокации β-катенина в ядро [10, 11].

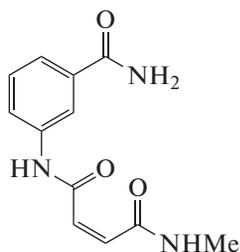
В представленной работе изучено влияние PARP10 на пролиферацию клеток колоректального рака в условиях *in vitro* и *in vivo*. С этой целью использованы линии клеток со значительной экспрессией PARP10 и селективный ингибитор PARP10. Исследованы также некоторые сигнальные пути, участвующие в этих процессах.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Клеточные линии колоректального рака и PARP10-селективный ингибитор.** Клетки LoVo и CB480 любезно предоставлены Wei Xue Tang (Chongqing Medical University, КНР). Клетки CT26 получены от Yu Quan Wei (Sichuan University, КНР). Клетки LoVo культивировали в среде DMEM (“Hyclone” США) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (“Hyclone”) и 1% пенициллина/стрептомицина (“Beyotime”, КНР). Клетки CT26 и SW480 культивировали в среде RPMI-1640 (“Hyclone”), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота и 1% пенициллина/стрептомицина, инкубировали в условиях 5% CO<sub>2</sub> при 37°C.

<sup>1</sup> Статья представлена на английском языке.

<sup>2</sup> Эти авторы внесли одинаковый вклад в выполнение работы и должны рассматриваться как первые авторы.



**Рис. 1.** Структура PARP10-селективного ингибитора 3-(Z-4-метиламинометокси-4-оксобутенамино)-бензамида.

PARP10-селективный ингибитор — 3-(Z-4-метиламинометокси-4-оксобутеноиламино)-бензамид — любезно предоставлен Mikael Elofsson (Umeå University, Швеция). Этот ингибитор выбран из 26 аналогов, разработанных в качестве ингибиторов PARP10, ARTD8 и ARTD7 (рис. 1) [12]. Ингибитор растворяли в DMSO (“Sigma”, США), добавляли RPMI-1640 до концентрации от 0.5 до 4 мкМ и хранили при 4°C в темноте.

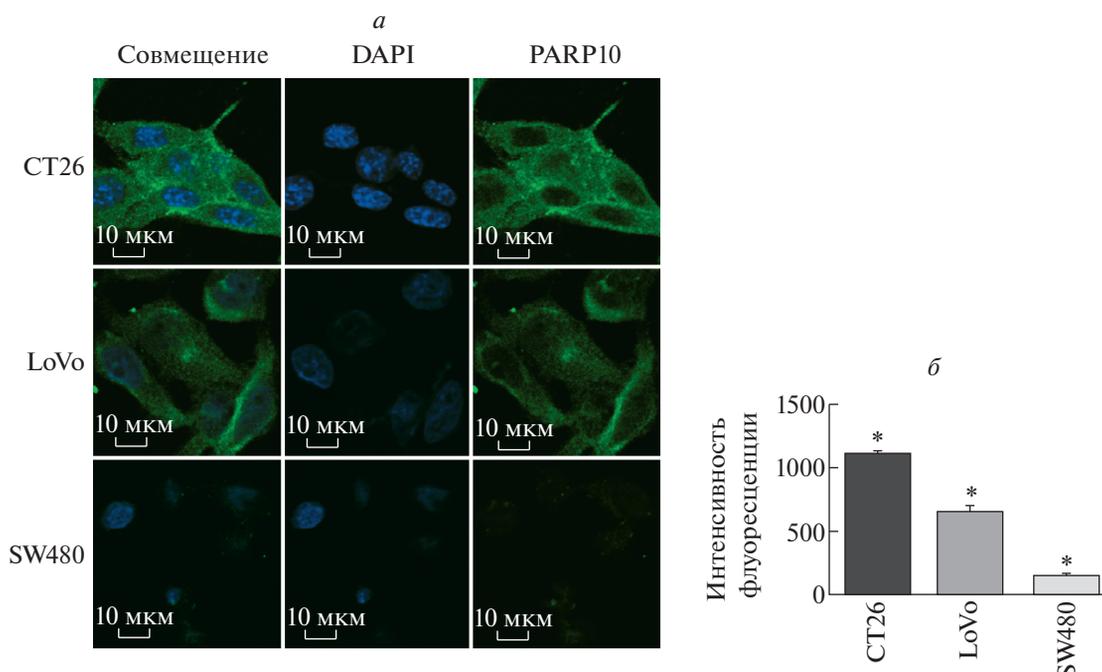
**Определение экспрессии PARP10 в клеточных линиях колоректального рака методом иммунофлуоресценции.** Экспрессию PARP10 в клетках CT26, LoVo и SW480 определяли с помощью иммунофлуоресцентного анализа. Клетки высевали на предметные стекла в 24-луночные планшеты, инкубировали в течение ночи при 37°C, фиксировали в течение 15 мин 4%-ным параформальдегидом, пропитывали в течение 20 мин 0.5%-ным тритоном и блокировали в течение 30 мин козьей сывороткой при комнатной температуре. Антитела против PARP10 (“Santa Cruz”, США 1 : 20) добавляли в каждую лунку и культивировали при 4°C в течение ночи в темноте. После инкубации с вторичными антителами кролика против IgG козы, меченными флуоресцеинизотиоцианатом (FITC, “ZSGB-Bio”, Китай), в течение 1 ч при 37°C и DAPI в течение 5 мин для окрашивания ядер уровень экспрессии и распределение PARP10 оценивали с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа (Leica TCS SP2, “Leica Microsystems GmbH”, Германия). Параметры мощность лазера (laser power) и фотоумножитель (PMT) поддерживали на одном уровне в каждой линии клеток и считывали интенсивность флуоресценции 10 клеток в каждой клеточной линии. Среднее значение определяли как среднюю интенсивность флуоресценции в каждой клеточной линии. Эксперименты проводили в трех параллельных сериях.

**Изучение пролиферации клеток CT26, LoVo и SW480 *in vitro* с использованием анализа ССК-8.** Пролиферацию клеток анализировали с помощью набора ССК-8 (“Beyotime”). Клетки CT26 ( $5 \times 10^3$ ), LoVo ( $5 \times 10^3$ ) и SW480 ( $5 \times 10^3$ ) в логарифмической фазе роста высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали при 37°C в 5% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. В лунки добавляли ингибитор PARP10 в концентрации 0.1, 0.2, 0.5, 2.0 и 4.0 мкМ. Клетки без ингибитора PARP10 использовали как контрольную группу, а культуральную среду — в качестве пустой пробы. Для определения зависимости ингибирования пролиферации клеток от времени клетки CT26 и LoVo обрабатывали ингибитором PARP10 (0.5 мкМ) в течение 24, 48, 72, 96 и 120 ч. Реагент ССК-8 (10 мкл) добавляли в каждую лунку и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Жизнеспособность клеток определяли по оптической плотности (OD) при 450 нм с помощью микропланшетного ридера (“Bio-Tek”, США). В каждом опыте заполняли по пять дублирующих лунок, и испытания повторяли трижды.

**Изучение влияния PARP10 на клеточный цикл клеток CT26 методом проточной цитометрии.** Клетки CT26 ( $1 \times 10^4$ ) собирали, дважды промывали PBS, суспендировали в культуральной среде и центрифугировали при 1000 об./мин в течение 5 мин. Затем клетки промывали 70%-ным этанолом, центрифугировали при 1000 об./мин в течение 5 мин и анализировали методом проточной цитометрии (FACS Vantage SE, “Becton Dickinson”, США). Индекс пролиферации (PI) измеряли по формуле:  $PI = (G2 + S)/(G1 + G2 + S)$ . Измерения повторяли в трех повторностях.

**Исследования на животных: обнаружение роста опухолей из клеток CT26, пересаженных мышам BALB/c.** Все исследования на мышах соответствовали требованиям комитета по этике Chongqing Medical University, получены все необходимые разрешения. Восемь 6–8-недельных мышей-самцов линии BALB/c (Центр лабораторных животных Chongqing Medical University) весом 22–25 г, получавших стандартный корм и воду *ad libitum*, разделили произвольным образом на две группы — группу, получавшую PARP10, и контрольную группу. Клетки CT26 ( $2 \times 10^6$ ) прививали мышам в правую подмышечную область. С восьмого дня после этого мышам опытной группы 1 раз в сутки внутривенно вводили селективный ингибитор PARP10 (2.0 мг/кг, в 200 мкл физиологического раствора), мышам контрольной группы вводили только физиологический раствор (200 мкл). Мышей забивали на 14-й день. Опухоль вырезали, определяли ее вес и объем. Объем опухоли рассчитывали по формуле  $V = ab^2/2$  ( $a$  — наибольший диаметр;  $b$  — наименьший диаметр).

**Обнаружение потенциальных ассоциированных сигнальных белков в клетках CT26 *in vitro* и *in vivo* с помощью Вестерн-блоттинга.** Клетки CT26 культивировали в течение 72 ч с селективным ингибитором PARP10 (0.5 мкМ) или без него. Затем клетки дважды промывали ледяным PBS и собирали. Суммарный клеточный белок и ядерные белки



**Рис. 2.** Экспрессия PARP10 в клеточных линиях колоректального рака. *а* – Экспрессия PARP10 в клетках SW480 слабая или почти отсутствует, но в клетках CT26 и LoVo выражена достаточно сильно. В клетках CT26 и LoVo окрашивание выявлено в основном в цитоплазме. Некоторые ядра также окрашены. *б* – Средняя интенсивность флуоресценции в клетках CT26 и LoVo значительно выше, чем в клетках SW480 (\* $P < 0.001$ ). Использовали одинаковые параметры “мощность лазера” и “фотоумножитель” (PMT).

экстрагировали реагентами для выделения ядерного и цитоплазматического материала (“Pierce”, США). Концентрацию белка определяли с помощью набора BCA protein assay kit (“Biotime”). Белки (20 мкг) разделяли в помощью электрофореза в 8%-ном полиакриламидном геле и переносили на поливинилденфторидную мембрану Hybond™ (“Amersham™”, “GE Healthcare Life Sciences”, США). Затем мембраны в течение 2 ч блокировали 5%-ным обезжиренным молоком при комнатной температуре и инкубировали с  $\beta$ -катенином (“Cell Signaling”, 1 : 1000), аксином-2 (“Proteintech”, США, 1 : 200), с-Myb (“Proteintech”, 1 : 500), ламинном B1 (“Proteintech”, 1 : 1000) и  $\beta$ -актином (“Ding Guo”, Китай, 1 : 1000) в течение ночи при 4°C. Затем мембраны дважды промывали TBST и инкубировали с соответствующими вторичными антителами (конъюгированные с пероксидазой хрена антикроличьи, 1 : 1000, или иммуноглобулин G мыши, 1 : 1000) в течение 2 ч при комнатной температуре. После трехкратного промывания TBST мембраны визуализировали с помощью VeoECL Plus (“Biotime”) и переносили в форму для формирования гелей (“Bio-Rad”, США). Блоты анализировали с помощью программного обеспечения Quantity One (“Bio-Rad”). Все эксперименты повторяли трижды.

**Статистический анализ.** Все количественные данные представлены как среднее  $\pm$  стандартное отклонение (SD). Статистический анализ прово-

дили с помощью одностороннего теста ANOVA или *t*-критерия Стьюдента с использованием пакета программ SPSS 19.0.  $P < 0.05$  считали статистически значимыми.

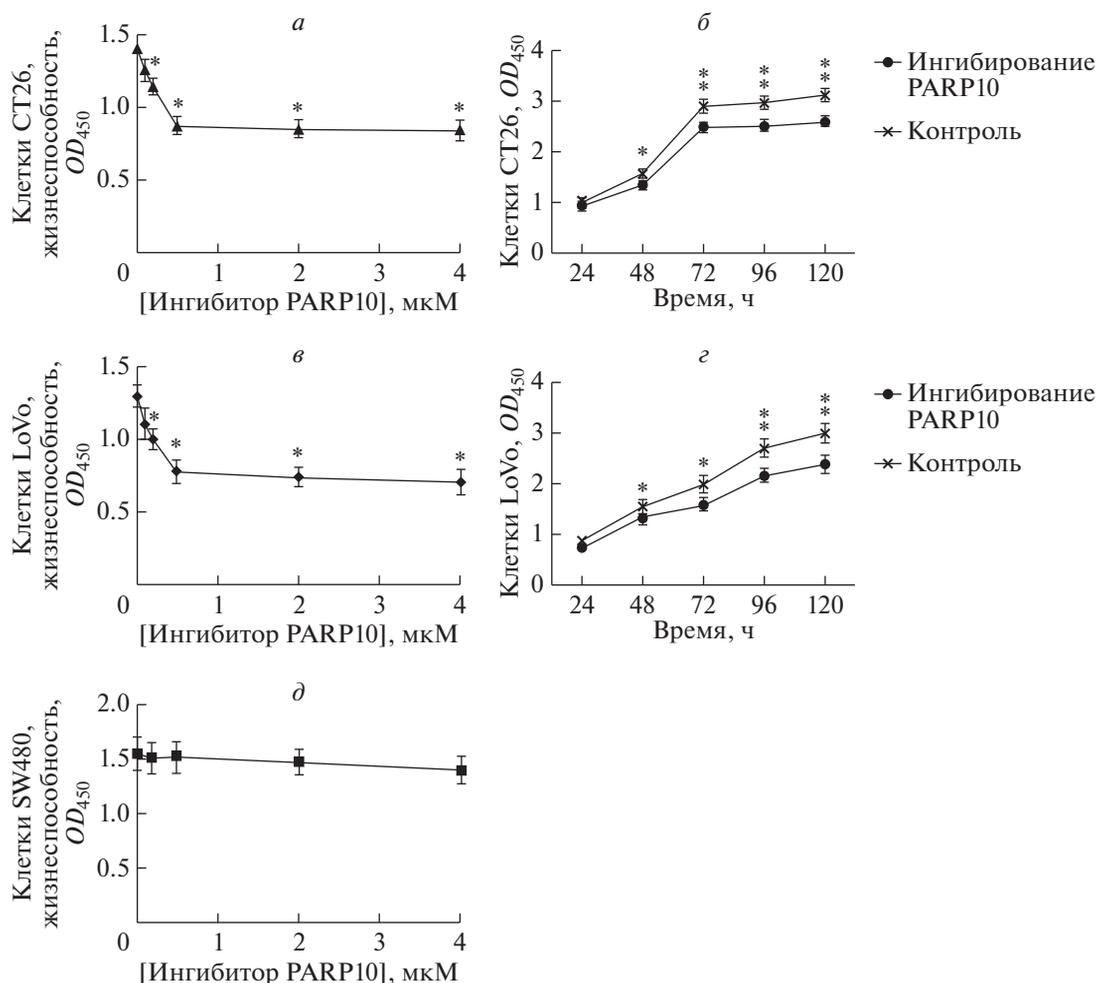
## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *PARP10* экспрессируется в двух клеточных линиях колоректального рака

Нами выявлены различия в экспрессии PARP10 в трех клеточных линиях – от очень слабой, практически отсутствующей в клетках SW480, до сильно выраженной в клетках CT26 и LoVo, со статистически значимыми различиями при средней интенсивности флуоресценции ( $P < 0.001$ ). Большая часть положительного сигнала находилась в цитоплазме, при этом несколько ядер были окрашены положительно (рис. 2).

### *Ингибирование ферментативной активности PARP10 подавляет пролиферацию клеток CT26 и LoVo in vitro*

Явное ингибирование пролиферации наблюдали при культивировании клеток CT26 с различными концентрациями ингибитора PARP10 в течение 72 ч. Выявлены статистически значимые различия между клетками, получавшими ингибитор PARP10 и контрольной группой ( $P < 0.05$ ), за исключением концентрации ингибитора



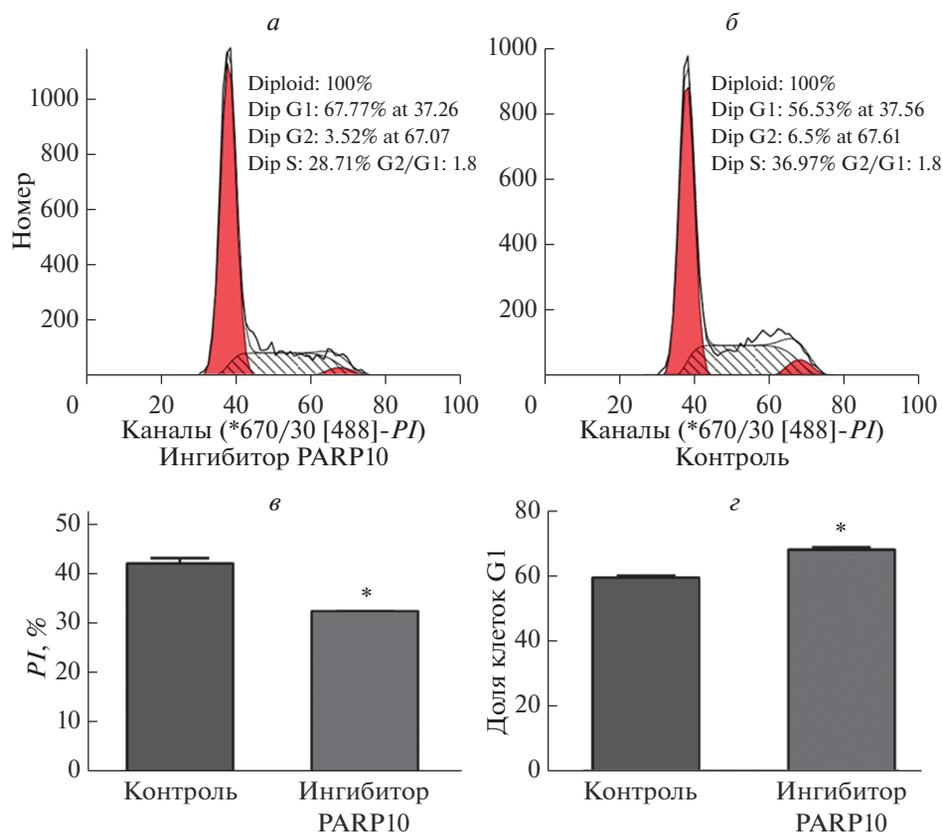
**Рис. 3.** Влияние PARP10 на пролиферацию клеток СТ26. Жизнеспособность клеток определяли с помощью ССК-8-анализа. *а* – Клетки СТ26 инкубировали с PARP10-селективным ингибитором (0.1, 0.2, 0.5, 2.0, 4.0 мкМ) в течение 72 ч. Видно, что влияние ингибитора на жизнеспособность клеток СТ26 зависит от его концентрации (0.5 мкМ и более). Результаты выражены как среднее значение  $\pm$  SD ( $*P < 0.05$ ). *б* – Клетки СТ26 обрабатывали ингибитором PARP10 в течение 24, 48, 72, 96 и 120 ч. Ингибирующий эффект значительно зависел от времени. Результаты выражены в виде среднего значения  $\pm$  SD ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ). *в* – Клетки LoVo инкубировали с PARP10-селективным ингибитором (0.1, 0.2, 0.5, 2.0, 4.0 мкМ) в течение 72 ч. Показано, что жизнеспособность клеток зависит от дозы ингибитора (эффекты выражены при 0.5 мкМ и выше). Приведены средние значения  $\pm$  SD ( $*P < 0.05$ ). *г* – Клетки LoVo обрабатывали PARP10-селективным ингибитором в течение 24, 48, 72, 96 и 120 ч. Эффект ингибитора существенно зависел от времени инкубации. Данные выражены как: среднее значение  $\pm$  SD ( $*P < 0.05$ ,  $**P < 0.01$ ). *д* – Клетки SW480 инкубировали с PARP10-селективным ингибитором в разных концентрациях (0.1, 0.2, 0.5, 2.0, 4.0 мкМ) в течение 72 ч. Не выявлено статистически значимого эффекта ингибитора ( $P > 0.05$ ).

0.1 мкМ ( $P > 0.05$ ). Интенсивность подавления пролиферации клеток становится более выраженной при увеличении концентрации ингибитора, что указывает на значительную дозозависимость ( $P < 0.05$ ) (рис. 3а). Кроме того, временная зависимость эффекта была существенной, когда клетки СТ26 культивировали с 0.5 мкМ PARP10-селективного ингибитора ( $P < 0.05$ ) (рис. 3б). Результаты, полученные на клетках LoVo, соответствовали результатам на клетках СТ26 ( $P < 0.05$ ) (рис. 3в, г). Напротив, никакие концентрации PARP10-селективного ингибитора не смогли значимо подавить пролиферацию клеток SW480; эта клеточная линия отличается низким уровнем

PARP10. Это подтверждает селективность используемого ингибитора ( $P > 0.05$ ) (рис. 3д). В свете этих данных в дальнейшем клетки обрабатывали ингибитором в концентрации 0.5 мкМ в течение 72 ч.

#### *Ингибирование ферментативной активности PARP10 блокирует клеточный цикл клеток СТ26 и LoVo с остановкой в фазе G1*

Ингибирование PARP10 приводило к увеличению содержания клеток СТ26 в фазе G1 с  $58.1 \pm 1.1$  до  $67.4 \pm 0.2\%$  ( $P < 0.001$ ). При этом величина индекса пролиферации (PI) в группе с ингибитором



**Рис. 4.** Проточная цитометрия клеток СТС26, обработанных ингибитором PARP10 (а), и клеток контрольной группы (б). Красный пик слева – число клеток в фазе G1, заштрихованный участок – число клеток в S-фазе, красный участок справа – число клеток в фазе G2. Определение индекса пролиферации (PI) в группе, получавшей ингибитор PARP10, и в контроле (в). Видно, что в группе, обработанной ингибитором PARP10, величина PI статистически значимо ниже, чем в контроле (\* $P < 0.001$ ). Доля клеток СТС26 в фазе G1 значительно выше в группе, обработанной ингибитором PARP10 ( $67.4 \pm 0.2\%$ ), чем в контрольной группе –  $58.1 \pm 1.1\%$  (\* $P < 0.001$ ) (г).

PARP10 снижалась более существенно, чем в контрольной группе ( $P < 0.001$ ), что свидетельствует о снижении скорости пролиферации клеток СТС26 (рис. 4).

*Ингибирование ферментативной активности PARP10 подавляет рост опухолей из трансплантированных клеток СТС26 у мышей BALB/c*

Объем и масса опухолей из клеток СТС26, подожно трансплантированных мышам BALB/c, получавшим ингибитор PARP10, была значительно меньше, чем в контрольной группе ( $P < 0.001$ ) (рис. 5 и табл. 1), т.е. ингибирование PARP10 оказывало постоянный эффект на пролиферацию клеток СТС26 *in vitro* и *in vivo*.

*Ингибирование активности PARP10 снижает экспрессию и перенос β-катенина в клеточное ядро*

Нами обнаружена экспрессия β-катенина в клетках СТС26. Методом Вестерн-блоттинга показано, что ингибирование PARP10 приводило к

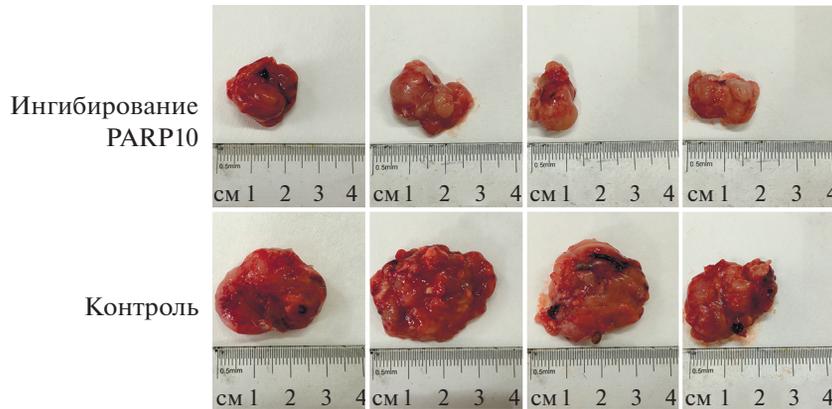
статистически значимому снижению экспрессии β-катенина по сравнению с контрольной группой, причем как в целых клетках, так и в клеточных ядрах ( $P < 0.05$ ) (рис. 6).

Показано, что ингибирование PARP10 уменьшает как содержание внутриклеточного β-катенина, так и перенос β-катенина в ядро. Чтобы сопоставить этот эффект с функционированием PARP10 *in vivo*, мы оценили экспрессию β-катенина в опухолях, которые образовались из клеток СТС26, пересаженных мышам BALB/c подкожно. Результаты

**Таблица 1.** Объем и масса опухолей из клеток СТС26, трансплантированных мышам BALB/c, получавшим селективный ингибитор PARP10, и в контрольной группе

Группа мышей	Объем опухоли, мл	Вес опухоли, г
Ингибитор PARP10	$3.33 \pm 1.13$	$1.94 \pm 0.53$
Контроль	$4.93 \pm 1.03$	$2.16 \pm 0.67$

Примечание.  $P < 0.001$  по данным однофакторного анализа ANOVA.



**Рис. 5.** Влияние PARP10 на рост опухолей из клеток СТ26 в подмышечной области мышей BALB/с. Видно, что объем опухолей в группе с ингибитором меньше, чем в контрольной группе.

этих опытов соответствуют данным, полученным *in vitro*: при подавлении активности PARP10 экспрессия β-катенина как в целых опухолевых клетках, так и в их ядрах была существенно ниже, чем в контроле ( $P < 0.05$ ) (рис. 7).

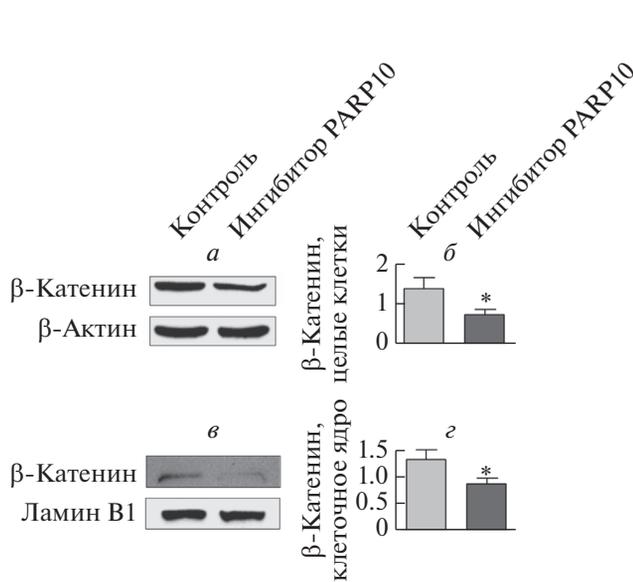
*Ингибирование ферментативной активности PARP10 изменяет экспрессию аксина-2 и белка с-Муб*

Аксин-2 и с-Муб – белки сигнальной системы, функционально тесно связанные с β-катенином, которые участвуют в регуляции пролиферации

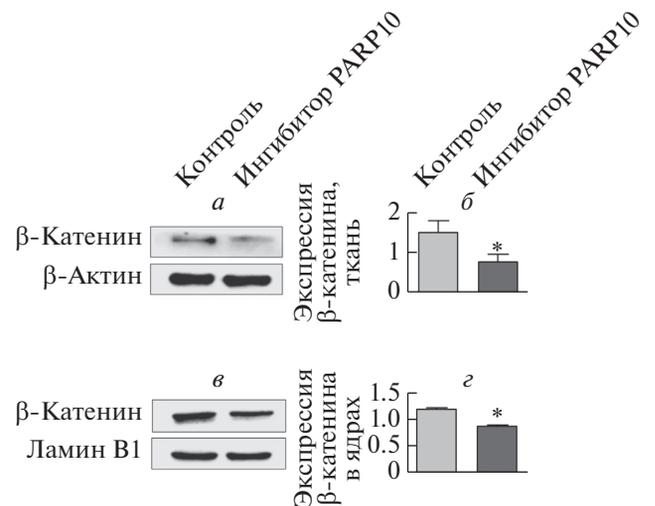
клеток. При ингибировании PARP10 экспрессия аксина-2 значительно повышалась, а экспрессия ядерного с-Муб заметно снижалась ( $P < 0.05$ ) (рис. 8).

**ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Функции недавно обнаруженной моно(ADP)-рибозилтрансферазы PARP10 включают влияние на репликацию вируса [13, 14], регуляцию пролиферации эукариотических клеток, апоптоз, прохождение клеточного цикла, а также на метаста-



**Рис. 6.** Экспрессия β-катенина в клетках СТ26, обработанных PARP10-селективным ингибитором в течение 72 ч. Вестерн-блот-анализ; β-актин и ламин В1 использовали в качестве контроля суммарного и ядерного белка соответственно. *а* и *б* – Ингибирование PARP10 снижает общее содержание β-катенина в клетках СТ26. *в* и *г* – Ингибирование PARP10 снижает количество β-катенина в ядре. Данные представлены как: среднее ± SD (\* $P < 0.05$ ).

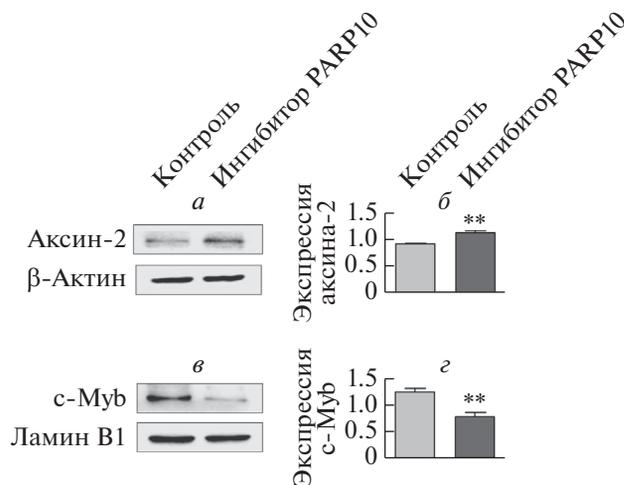


**Рис. 7.** Экспрессия β-катенина в опухолях СТ26 *in vivo*. Мышам BALB/с вводили селективный ингибитор PARP10 (2.0 мг/кг) или 0.9% нормального физиологического раствора внутривенно в течение 1 недели. После этого содержание β-катенина в пересаженной опухоли СТ26 анализировали методом вестерн-блоттинга. При определении содержания суммарного и ядерного белка в качестве контроля использовали β-актин и ламин В1. *а* и *б* – Ингибирование PARP10 снижает суммарное содержание β-катенина в клетках. *в* и *г* – Ингибирование PARP10 снижает количество β-катенина в ядре. Данные выражены как: среднее значение ± SD (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ).

зирование [2]. Сообщается, что нокдаун PARP10 в клетках HeLa приводит к подавлению роста опухолей и замедлению онкогенеза. Повышенная экспрессия PARP10 в нетрансформированных клетках RPE-1 понижает чувствительность клеток к репликационному стрессу, способствует запуску остановленной репликации и после ксено-трансплантации приводит к образованию опухолей у мышей [4]. Сайленсинг PARP10 снижает скорость пролиферации клеток MCF7, в то время как увеличение экспрессии PARP10 может способствовать пролиферации [6]. Однако влияние PARP10 на пролиферацию различных клеток колоректального рака не изучено.

Нами изучено влияние активности PARP10 на пролиферацию трех линий клеток колоректального рака: LoVo, CT26 и SW480. PARP10 экспрессируется как в ядрах, так и в цитоплазме клеток LoVo и CT26, но практически не экспрессируется в клетках SW480, что согласуется с данными [7]. Ингибирование ферментативной активности PARP10 приводит к статистически значимому снижению скорости пролиферации в клетках LoVo и CT26, причем это снижение зависит как от концентрации ингибитора, так и от времени инкубации. Это дает основания полагать, что клетки колоректального рака, экспрессирующие PARP10, могут быть чувствительными к подавлению ферментативной активности PARP10. Для определения эффекта PARP10 в опухоли *in vivo* мы пересадили клетки CT26 в подмышечные области мышей BALB/c и получили таким образом опухолевую модель. Рост этих опухолей был существенно подавлен в группе мышей, которым вводили ингибитор PARP10, что указывает на способность PARP10 стимулировать пролиферацию клеток колоректального рака *in vivo*. Кроме того, при ингибировании PARP10 наблюдалось значительное увеличение доли клеток CT26 в фазе G1 и снижение PI, что позволяет рационально объяснить выявленное ранее снижение пролиферации клеток CT26 при подавлении активности PARP10.

$\beta$ -Катенин – это вторичный посредник, который действует как фактор транскрипции, вовлеченный в стимуляцию пролиферации клеток [15, 16], а также как один из сигнальных белков, связанных с одним или несколькими целевыми белками, регулируемые PARP10 [11]. Для поиска ядерных факторов транскрипции, регулирующих пролиферацию клеток, на которые может влиять PARP10, мы использовали  $\beta$ -катенин. Когда мы избирательно ингибировали PARP10, экспрессия  $\beta$ -катенина снижалась статистически значимо и в клетках CT26, и в клетках перевиваемых CT26-опухолей у мышей BALB/c, указывая на снижение содержания  $\beta$ -катенина и в клетках CT26, и в ядрах этих клеток *in vitro* и *in vivo*, что позволяет



**Рис. 8.** Экспрессия аксина-2 и белка с-Муб в клетках CT26. После обработки ингибитором PARP10 (0.5 мкМ, 72 ч) с помощью вестерн-блоттинга измеряли уровень аксина-2 в клетках CT26 и белка с-Муб в клеточном ядре. Содержание суммарного клеточного белка и ядерного белка определяли с использованием в качестве контроля  $\beta$ -актина и ламина В1 соответственно. *a* и *б* – Ингибирование PARP10 повышает уровень аксина-2. *в* и *г* – Ингибирование PARP10 снижает экспрессию белка с-Муб по сравнению с контрольной группой. Данные представлены как среднее значение  $\pm$  SD (\*\* $P < 0.01$ ).

говорить о существенной роли PARP10 в регуляции экспрессии  $\beta$ -катенина.

Киназа 3 гликоген-синтазы (GSK3 $\beta$ ) – сигнальный белок, локализованный выше  $\beta$ -катенина в каскаде Wnt-сигнального пути, который участвует в образовании комплекса деградации  $\beta$ -катенина и деградации  $\beta$ -катенина посредством фосфорилирования. При отсутствии сигнала Wnt  $\beta$ -катенин образует комплекс с аксином, GSK3 $\beta$ , APC и Fzd и фосфорилируется GSK3 $\beta$  или гидролизуется лизосомами или убиквитин-протеасомной системой (UPS) [11]. Когда Wnt-путь активирован, комплекс GSK3 $\beta$ /аксин/APC распадается и  $\beta$ -катенин невозможно спасти от деградации. С использованием белковых микрочипов GSK3 $\beta$  недавно была идентифицирована в качестве субстрата катализируемого PARP10 моно(ADP)-рибозилирования, причем киназная активность этого фермента ингибируется при его моно(ADP)-рибозилировании под действием PARP10 [7, 17]. Таким образом, мы предполагаем, что PARP10 может подавлять деградацию  $\beta$ -катенина путем ингибирования киназной активности GSK3 $\beta$  в результате моно(ADP)-рибозилирования. При ингибировании PARP10 киназная активность GSK3 $\beta$  восстанавливается,  $\beta$ -катенин может распадаться, и его содержание в клетках уменьшается. Как именно осуществляется регуляция  $\beta$ -катенина в PARP10-положительных

клетках колоректального рака с помощью PARP10 и GSK3 $\beta$  еще предстоит выяснить.

$\beta$ -Катенин транслоцируется в ядро с помощью нуклеопорина 62 (NUP62), замещая CoR, связывается с такими факторами транскрипции, как TCF/LEF, HIF-1 $\alpha$  и TBX5, и активирует транскрипцию генов, кодирующих сигнальные белки, связанные с пролиферацией, включая аксин-2 и с-Муб [15, 16]. Чтобы определить, как влияет изменение уровня транслокации  $\beta$ -катенина в ядро на экспрессию белков нисходящего сигнального пути, измеряли экспрессию с-Муб — одного из белков, регулируемых  $\beta$ -катенином. Белок с-Муб взаимодействует с большим количеством потенциальных регуляторов, включая протеинкиназы, регуляторы клеточного цикла и факторы транскрипции. Он действует как онкогенный белок, активно экспрессируется в опухолях, в том числе в клетках колоректального рака, и способствует пролиферации опухолевых клеток путем активации генов, ответственных за переходы G/S и G/M [18–20]. Показано, что количество белка с-Муб в ядре снижается в тех клетках CT26, в которых подавлена ферментативная активность PARP10. Это уменьшение указывает на то, что экспрессия и функциональные изменения  $\beta$ -катенина вызывают последующие специфические эффекты. Стоит отметить, что наше предположение о влиянии изменений уровня белка с-Муб на прохождение клеточного цикла клетками CT26 с ингибированным PARP10, подтверждается остановкой клеток в фазе G1. Влияет ли сниженная экспрессия  $\beta$ -катенина и его транслокация в ядро на пролиферацию клеток CT26 с ингибированным PARP10, через с-Муб-опосредованный механизм? Для ответа на этот вопрос необходима дополнительная проверка.

В то же время в опухолях с нарушением функций  $\beta$ -катенина обнаружена аномально высокая экспрессия аксина-2 [21]. Аксин-2 способствует деградации  $\beta$ -катенина путем сборки мультибелкового комплекса GSK3 $\beta$ /аксин/APC/Fzd, который разрушает  $\beta$ -катенин [22, 23]. В настоящем исследовании выявлено повышение экспрессии аксина-2 в группе с ингибированием PARP10 по сравнению с контролем. Таким образом, мы делаем вывод, что в клетках CT26, обработанных ингибитором PARP10, снижение уровня ядерной транслокации  $\beta$ -катенина приводит к регулируемому повышению уровня аксина-2. Затем аксин-2 действует как репрессор по типу обратной связи, способствуя усилению эффекта снижения  $\beta$ -катенина и дальнейшему снижению экспрессии и функции  $\beta$ -катенина. В настоящее время предприняты попытки увеличить экспрессию аксинов-1/2, а следовательно, снизить конститутивную стабильность  $\beta$ -катенина, с целью воз-

можного применения в терапии колоректального рака [24, 25]. Так,  $\beta$ -катенин с высокой вероятностью регулирует экспрессию аксина-2, а также увеличивает эффект снижения уровня аксина-2 по механизму отрицательной обратной связи в клетках колоректального рака с положительной экспрессией PARP10.

На субклеточном уровне PARP10 моно(ADP)-рибозилирует GSK3 $\beta$  в цитоплазме. Нами показано, что PARP10 в основном присутствует в цитоплазме клеток LoVo и CT26. Это дает нам основание полагать, что в цитоплазме PARP10 регулирует пролиферацию клеток колоректального рака, воздействуя на экспрессию и функции  $\beta$ -катенина [7, 10, 17].

Сообщалось также, что ядерная PARP10 принимает прямое и эффективное участие в пролиферации клеток. PARP10 служит партнером PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток), способствуя стабильности генома, а также участвует в трансляции и синтезе ДНК [26, 27]. Пониженная экспрессия PARP10 замедляет прохождение фазы G1 и приводит к гибели клеток HeLa [9]. Среди клеток колоректального рака с заблокированным PARP10 увеличивается доля клеток в фазе G1 и снижается величина *PI*. Эта тенденция согласуется с сообщениями, безусловно поддерживающими этот механизм регуляции пролиферации клеток с участием ядерного PARP10. Мы полагаем, что PARP10, предположительно рекрутируемый PTEN в ядра клеток, в комплексе с PTEN присоединяется к поврежденным участкам ДНК, стимулирует репликацию и репарацию, регулирует клеточный цикл, а также влияет на пролиферацию клеток колоректального рака [4, 26].

Следует отметить, что влияние PARP10 на поведение опухолевых клеток никогда не является простым и односторонним [3, 5, 8, 28]. Более детальное изучение механизма регуляции пролиферации клеток колоректального рака белком PARP10 позволит выяснить роль PARP10. Кроме того, очень важно понять, можно ли распространить представления о способности PARP10 регулировать пролиферацию клеток колоректального рака на другие типы опухолевых клеток.

## ВЫВОДЫ

Обнаружено, что PARP10 способствует пролиферации тех клеток колоректального рака, которые содержат значительное количество PARP10. И наоборот, ингибирование ферментативной активности PARP10 практически нивелирует эту способность. Показано также, что в осуществлении этой функции участвует транслоцированный в ядро  $\beta$ -катенин.

Мы благодарны Mikael Elofsson (Umeå University, Швеция) за любезное предоставление нам селективного ингибитора PARP10; мы благодарны также WeiXue Tang (Chongqing Medical University, КНР) и YuQuan Wei (SiChuan University, КНР) за предоставление клеточных линий колоректального рака, использованных в экспериментах. Мы также благодарны Bin Wang (Chongqing Medical University, КНР) за консультации при проведении лазерных конфокальных экспериментов.

Эта работа получила поддержку Foundation and Cutting-Edge Research Project from the Science and Technology Commission of Chongqing (cstc2016jcyjA0233); Foundation and Cutting-Edge Research Project from the Science and Technology Commission of Chongqing Yuzhong District (20140106); the Nursery Programme of the Basic Medicine College, Chongqing Medical University (JC201509), the Yingyao Project of Basic Medical College, Chongqing Medical University (JCY201701).

В этом исследовании соблюдены все применимые международные, национальные и/или ведомственные правила по уходу и использованию животных. Эта статья не содержит результатов исследований на человеке, выполненных кем-либо из авторов.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kleine H., Poreba E., Lesniewicz K., Hassa P.O., Hotzinger M.O., Litchfield D.W., Shilton B.H., Lüscher B. (2008) Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation. *Mol. Cell.* **32**, 57–69.
2. Bütepage M., Ecker L., Verheugd P., Lüscher B. (2015) Intracellular mono-ADP-ribosylation in signaling and disease. *Cells.* **4**, 569–595.
3. Herzog N., Hartkamp J.D., Verheugd P., Treude F., Forst A.H., Feijs K.L.H., Lippok B.E., Kremmer E., Kleine H., Lüscher B. (2013) Caspase-dependent cleavage of the mono-ADP-ribosyltransferase ARTD10 interferes with its pro-apoptotic function. *FEBS J.* **280**, 1330–1343.
4. Schleicher E.M., Galvan A.M., Imamura-Kawasawa. Y., Moldovan G.-L., Nicolae C.M. (2018) PARP10 promotes cellular proliferation and tumorigenesis by alleviating replication stress. *Nucl. Acids Res.* **46**, 8908–8916.
5. Zhao Y., Hu X., Wei L., Song D., Wang J., You L., Saiyin H., Li Z., Yu W., Yu L., Ding J., Wu J. (2018) PARP10 suppresses tumor metastasis through regulation of Aurora A activity. *Oncogene.* **37**, 2921–2935.
6. Márton J., Fodor T., Nagy L., Vida A., Kis G., Brunyánzski A., Antal M., Lüscher B., Bai P. (2018) PARP10 (ARTD10) modulates mitochondrial function. *PLoS One.* **13**, e0187789.
7. Kleine H., Herrmann A., Lamark T., Forst A.H., Verheugd P., Lüscher-Firzlauff J., Lippok B., Feijs K.L., Herzog N., Kremmer E., Johansen T., Müller-Newen G., Lüscher B. (2012) Dynamic subcellular localization of the mono-ADP-ribosyltransferase ARTD10 and interaction with the ubiquitin receptor p62. *Cell. Commun. Signal.* **10**, 10–28.
8. Kaufmann M., Feijs K.L., Lüscher B. (2015) Function and regulation of the mono-ADP-ribosyltransferase ARTD10. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **384**, 167–188.
9. Chou H.Y., Chou H.T., Lee S.C. (2006) CDK-dependent activation of poly(ADP-ribose) polymerase member 10 (PARP10). *J. Biol. Chem.* **281**, 15201–15207.
10. Feijs K.L., Kleine H., Braczynski A., Forst A.H., Herzog N., Verheugd P., Linzen U., Kremmer E., Lüscher B. (2013) ARTD10 substrate identification on protein microarrays: regulation of GSK3beta by mono-ADP-ribosylation. *Cell. Commun. Signal.* **11**, 11–15.
11. Wu D., Pan W. (2010) GSK3: a multifaceted kinase in Wnt signaling. *Trends Biochem. Sci.* **35**, 161–168.
12. Ekblad T., Lindgren A.E.G., Andersson C.D., Carballo R., Thorsell A.G., Karlberg T., Spjut S., Linusson A., Schüler H., Elofsson M. (2015) Towards small molecule inhibitors of mono-ADP-ribosyltransferases. *Eur. J. Med. Chem.* **95**, 546–551.
13. Atasheva S., Frolova E.I., Frolov I. (2014) Interferon-stimulated poly(ADP-ribose) polymerases are potent inhibitors of cellular translation and virus replication. *J. Virol.* **88**, 2116–2130.
14. Yu M., Zhang C., Yang Y., Yang Z., Zhao L., Xu L., Wang R., Zhou X., Huang P. (2011) The interaction between the PARP10 protein and the NS1 protein of H5N1 AIV and its effect on virus replication. *Virol. J.* **8**, 546.
15. Majidinia M.A.J., Jahanban-Esfahlani R., Yousefi B. (2018) The roles of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in tissue development and regenerative medicine. *J. Cell. Physiol.* **233**, 5598–5612.
16. Yang X., Gu Q., Lin L., Li S., Zhong S., Li Q., Cui Z. (2015) Nucleoporin 62-like protein activates canonical Wnt signaling through facilitating the nuclear import of  $\beta$ -catenin in zebrafish. *Mol. Cell. Biol.* **35**, 1110–1124.
17. Yu M., Schreek S., Cerni C., Schamberger C., Lesniewicz K., Poreba E., Vervoorts J., Walsemann G., Grotzinger J., Kremmer E., Mehraein Y., Mertsching J., Kraft R., Austen M., Lüscher-Firzlauff J., Lüscher B. (2005) PARP-10, a novel Myc-interacting protein with poly(ADP-ribose) polymerase activity, inhibits transformation. *Oncogene.* **24**, 1982–1993.
18. Biroccio A., Benassi B., D'Agnano I., D'Angelo C., Bugliani S., Mottolese M., Ricciotti A., Citro G., Cosimelli M., Ramsay R.G., Calabretta B., Zupi G. (2001) c-Myb and Bcl-x overexpression predicts poor prognosis in colorectal cancer: clinical and experimental findings. *Am. J. Pathol.* **158**, 1289–1299.
19. Ramsay R.G., Gonda T.J. (2008) MYB function in normal and cancer cells. *Nat. Rev. Cancer.* **8**, 523–534.
20. McCubrey J.A., Steelman L.S., Bertrand F.E., Davis N.M., Abrams S.L., Montalto G., D'Assoro A.B., Libra M., Nicoletti F., Maestro R., Basecke J., Cocco L., Cervello M., Martelli A.M. (2014) Multifaceted roles of GSK-3 and Wnt/ $\beta$ -catenin in hematopoiesis and leukemogenesis: opportunities for therapeutic intervention. *Leukemia.* **28**, 15–33.
21. Leung J.Y., Kolligs F.T., Wu R., Zhai Y., Kuick R., Hanash S., Cho K.R., Fearon E.R. (2002) Activation of

- AXIN2 expression by  $\beta$ -catenin-T cell factor. A feedback repressor pathway regulating Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* **277**, 21657–21665.
22. Herbst A., Jurinovic J., Krebs S., Thieme S.E., Blum H., Göke B., Kolligs F. T. (2014) Comprehensive analysis of  $\beta$ -catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *BMC Genomics.* **15**, 74.
  23. Wu Z.Q., Brabletz T., Fearon E., Willis A.L., Hu C.Y., Li X.Y., Weiss S.J. (2012) Canonical Wnt suppressor, Axin2, promotes colon carcinoma oncogenic activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **109**, 11312–11317.
  24. Nathubhai A., Haikarainen T., Koivunen J., Murthy S., Koumanov F., Lloyd M.D., Holman G.D., Pihlajaniemi T., Tosh D., Lehtiö L., Threadgill M.D. (2017) Highly potent and isoform selective dual site binding tankyrase/Wnt signaling inhibitors that increase cellular glucose uptake and have antiproliferative activity. *J. Med. Chem.* **60**, 814–820.
  25. Jeong W.J., Ro E.J., Choi K.Y. (2018) Interaction between Wnt/ $\beta$ -catenin and RAS-ERK pathways and an anti-cancer strategy via degradations of  $\beta$ -catenin and RAS by targeting the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *N.P.J. Precis Oncol.* **2**, 5.
  26. Nicolae C.M., Aho E.R., Vlahos A.H., Choe K.N., De S., Karras G.I., Moldovan G.L. (2014) The ADP-ribosyltransferase PARP10/ARTD10 interacts with proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and is required for DNA damage tolerance. *J. Biol. Chem.* **289**, 13627–13637.
  27. Shahrour M.A., Nicolae C.M., Edvardson S., Ashhab M., Galvan A.M., Constantin D., Abu-Libdeh B., Moldovan G.L., Elpeleg O. (2016) PARP10 deficiency manifests by severe developmental delay and DNA repair defect. *Neurogenetics.* **17**, 227–232.
  28. Verheugd P., Forst A.H., Milke L., Herzog N., Feijs K.L., Kremmer E., Kleine H., Luscher B. (2013) Regulation of NF- $\kappa$ B signalling by the mono-ADP-ribosyltransferase ARTD10. *Nat. Commun.* **4**, 1683.

## PARP10 INFLUENCES THE PROLIFERATION OF COLORECTAL CARCINOMA CELLS, A PRELIMINARY STUDY

C. F. Wu<sup>1</sup>, M. Xiao<sup>1</sup>, Y. L. Wang<sup>1,\*</sup>, M. D. Threadgill<sup>2</sup>, M. Li<sup>1</sup>, Y. Tang<sup>1</sup>,  
X. Lin<sup>1</sup>, L. Yang<sup>1</sup>, Q. S. Li<sup>1</sup>, and X. Li<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016 China

<sup>2</sup>Department of Pharmacy and Pharmacology, University of Bath, Bath BA2 7AY, United Kingdom

\*e-mail: wangyalan@cqmu.edu.cn

PARP10 is an intracellular mono-ADP ribosyltransferase and recent reports suggest that it regulates proliferation of some cell types. However, its effect on the proliferation of colorectal carcinoma cells has not yet been systematically reported. We explored the influence of PARP10 on the proliferation of several colorectal carcinoma cell types and carried out initial studies on the underlying mechanisms. Inhibition of the enzymatic activity of PARP10 led to significantly decreases in proliferative ability in LoVo cells and CT26 cells *in vitro* and suppressed growth of CT26 tumours in the subaxillary region in Balb/c mice *in vivo*. Cell-cycle arrest accompanied these observations. Expression of the nuclear transfer factor  $\beta$ -catenin and its translocation to the nucleus were also affected and the expression of its associated signal proteins Axin2 and c-Myb were increased and decreased, respectively. We demonstrate that PARP10 promotes proliferation of those colorectal carcinoma cells which express significant levels of PARP10. This promotion is suppressed when the enzymatic activity is inhibited.  $\beta$ -Catenin is likely to be the mediator of the antiproliferative effect.

**Keywords:** PARP10,  $\beta$ -catenin, colorectal carcinoma, proliferation