

УДК 577.24

ДЕЙСТВИЕ БЕЛКА p66shc НА УСТОЙЧИВОСТЬ КЛЕТОК РАКА ТОЛСТОГО КИШЕЧНИКА RKO К ОКИСЛИТЕЛЬНОМУ СТРЕССУ

© 2012 г. Е. Р. Галимов^{1,2}, А. С. Сидоренко², А. В. Терешкова², О. Ю. Плетюшкина¹,
Б. В. Черняк¹, П. М. Чумаков^{2,3,4*}

¹Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

³Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

⁴Lerner Research Institute, Cleveland 44195, OH USA

Поступила в редакцию 10.08.2011 г.

Принята к печати 19.08.2011 г.

Белок p66shc, как и его изоформы p52shc и p46shc, является продуктом альтернативного сплайсинга гена *SHC*. Изоформы p52shc и p46shc выполняют адапторные функции в сигнальном пути активации белка Ras, тогда как p66shc принимает участие в регуляции уровня активных форм кислорода в клетке. Геномный нокаут p66shc существенно увеличивает максимальную продолжительность жизни мышей. Белок p66shc способен перемещаться в митохондрии и повышать внутриклеточный уровень активных форм кислорода, однако механизм участия этого белка в сигнальных путях, регулирующих выживаемость клеток под действием стресса, остается малоизученным. Белок p66shc вовлечен также в канцерогенез, повышение его уровня при раке толстого кишечника коррелирует с неблагоприятным прогнозом. В представленной работе мы использовали РНК-интерференцию с помощью лентивирусных конструкций, экспрессирующих короткие шпилечные РНК (shRNA), нацеленные на уникальный N-концевой CH2-домен p66shc. Этот подход позволил специфически подавить синтез изоформы p66, но не p52 и p46, кодируемых геном *SHC1*, в клетках RKO рака толстого кишечника. Клетки линии RKO с нокаутом p66shc оказались более устойчивыми к окислительному стрессу, вызванному перекисью водорода и отсутствием сыворотки. В этих же клетках наблюдалось значительное снижение фрагментации митохондрий, зависящей от накопления в них активных форм кислорода при окислительном стрессе. Полученные данные согласуются с гипотезой о том, что p66shc участвует в повышении уровня активных форм кислорода в митохондриях и способствует тем самым индукции апоптоза.

Ключевые слова: p66shc, активные формы кислорода, митохондрии.

p66shc ACTION ON RESISTANCE OF COLON CARCINOMA RKO CELLS TO OXIDATIVE STRESS,
by E. R. Galimov^{1,2}, A. S. Sidorenko², A. V. Tereshkova², O. Y. Pletyushkina¹, B. V. Chernyak¹, P. M. Chumakov^{2,3,4*}
(¹Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow 119991 Russia;
²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow 119991 Russia; ³Novosibirsk
State University, Novosibirsk 630090 Russia; ⁴Lerner Research Institute, Cleveland 44195 OH USA; *e-mail:
peter@chumakov.com). p66shc protein is an alternative transcript product of *SHC1* gene. While two other
isoforms (p52shc and p46shc) have adaptor function in RAS signaling pathway, p66shc regulates reactive
oxygen species (ROS) level. P66shc genome knockout significantly extends lifespan in mice. Though
p66shc was determined to translocate into mitochondria and led to increase in intracellular ROS, the
mechanism by which the protein take part in signaling pathways that regulates resistance to cellular stress-
es remains poorly studied. P66shc has an important role in carcinogenesis and its increased expression
correlates with poor prognosis in colon cancer. In this work we have applied RNA interference using len-
tivial constructions that express short hairpin RNA (shRNA) against N-terminal CH2 domain of p66shc
isoform. Using this approach p66 but not p52 and p46 *SHC1* isoform expression was selectively suppressed

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ГАФД – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; Grb2 – белок, связывающий рецепторы факторов роста; DCF-DA 2,7 – дихлордигидрофлуоресцеиндиацетат; e3b1 (eps8 SH3 domain-binding protein) – сигнальный белок, связывающий SH3-домен белка eps8; eps8 – субстрат 8 тирозинкиназных рецепторов фактора роста эпидермиса; MAPK – протеинкиназы, активируемые митогенами; MnSOD – Mn-зависимая супероксид-дисмутаза; Rac1 – Ras-подобный субстрат 1 ботулотоксина C3; RAS – онкоген вируса саркомы крыс; REF-1 – редоксфактор-1; Romo1 – белок-модулятор активных форм кислорода 1; shRNA (small hairpin RNA) – короткие РНК, образующие шпильки; SOS1 (Son of Sevenless) – фактор обмена нуклеотидов.

* Эл. почта: peter@chumakov.com

in colon carcinoma RKO cells. RKO cells with p66shc knockdown have shown to be more resistant to oxidative stress induced by hydrogen peroxide or serum starvation. Fragmentation of mitochondria that depends on mitochondrial ROS accumulation during oxidative stress was significantly decreased in this cells. The data obtained are in agreement with hypothesis that p66shc participates in ROS accumulation in mitochondria and by this means promotes induction of apoptosis.

Keywords: p66shc, reactive oxygen species, mitochondria.

Белок p66shc — одна из трех изоформ, кодируемых геном *SHC1*. Две другие изоформы, p52shc и p46shc, служат адапторными белками, вовлеченными в передачу сигналов от различных рецепторных тирозинкиназ [1]. В частности, в комплексе с адапторным белком Grb2 и фактором обмена нуклеотидов SOS они участвуют в активации малой GTPазы Ras и запуске MAP-киназного каскада. В отличие от этих изоформ, p66shc, по-видимому, не активирует, но, напротив, тормозит MAPK, конкурируя с p52shc за связывание с Grb2 [2]. Помимо доменов, общих для всех продуктов гена *SHC1* (PTB, SH1 и SH2), белок p66shc содержит уникальный N-концевой домен SH2, а также общий с p52shc домен CB, связывающий цитохром c. Эти домены не выполняют адапторных функций, но, как оказалось, необходимы для прооксидантного и апоптогенного действия p66shc [2, 3].

Геномный нокаут p66shc приводит к увеличению на 30% продолжительности жизни мышей, большей устойчивости к окислительному стрессу, вызванному прооксидантом паракватом, и к защите от различных патологических состояний, связанных с повышенным образованием активных форм кислорода (АФК) [4]. На модели эмбриональных фибробластов мышей с нокаутом p66shc установлено, что этот белок необходим для развития p53-зависимого апоптоза в ответ на обработку перекисью водорода [5]. Совокупность данных, полученных на “нокаутных” мышах, позволила предложить следующую схему участия p66shc в выработке АФК и индукции апоптоза. При развитии окислительного стресса цитоплазматический p66shc перемещается в межмембранное пространство митохондрий, где находится в комплексе с белками TIM, TOM и mHSP70 [6]. За счет CB-домена p66shc взаимодействует с цитохромом c, что способствует переносу электрона на молекулярный кислород, минуя цитохромоксидазу, и, в конечном счете, ведет к образованию перекиси водорода. Накопление АФК вызывает открытие митохондриальных пор и индукцию апоптоза [3]. Важную роль в функционировании p66shc играет фосфорилирование остатка Ser36, необходимое для транспорта этого белка в митохондрии [7].

Белок p66shc может стимулировать образование АФК и вне митохондрий. В эмбриональных фибробластах p66shc способствует высвобождению белка SOS из комплекса с Grb2 и его фосфорилированию в комплексе с белками eps8 и e3b1

[8]. В результате SOS активирует малую GTPазу Rac1, которая стимулирует образование АФК NADPH-оксидазами плазматических мембран [9]. При этом митохондрии способны усиливать Rac1-зависимое образование АФК [10, 11]. Возможно, p66shc способствует координации образования АФК в митохондриях и на плазматической мембране. Известно, что NOX4-изоформа NADPH-оксидазы локализуется во внутриклеточных мембранах, в частности, в митохондриях [12–14]. Активация митохондриальной NADPH-оксидазы также может быть связана с p66shc.

Совсем недавно появились данные о том, что p66shc участвует в развитии окислительного стресса, вызванного диаллилтрисульфидом, компонентом чеснока, обладающим противоопухолевой активностью. p66shc способствует накоплению АФК за счет снижения экспрессии ферритина H и повышения количества свободного железа в клетке [15].

Прооксидантное действие p66shc может дополнительно определяться снижением антиоксидантной защиты клетки. Так, на культурах трансформированных клеток человека показано, что снижение уровня p66shc приводит к усилению синтеза антиоксидантных ферментов и факторов, таких как глутатионпероксидаза (GPX1), Mn-зависимая супероксиддисмутаза (MnSOD) и фактор REF-1 [16–18]. Однако в опытах на мышах *in vivo* и эмбриональных фибробластах мыши *in vitro* установлено, что p66shc не влияет на уровень антиоксидантных ферментов [3, 19–21]. Можно предположить, что в нормальных и трансформированных клетках p66shc-зависимые сигнальные пути могут различаться, либо существуют различия между клетками человека и мыши. В этой связи необходимо отметить еще одно видимое противоречие, а именно, способность p66shc защищать некоторые трансформированные клетки от апоптоза. На модели рака молочной железы показано, что подавление синтеза p66shc усиливает цитотоксическое действие гипоксии. Выяснилось, что повышенный при гипоксии уровень p66shc способствует синтезу белков Notch-3 и карбоангидразы IX, что характерно для фенотипа устойчивости к гипоксии [22]. Возможно, подобные механизмы объясняют положительную корреляцию между уровнем p66shc и неблагоприятным прогнозом при злокачественных опухолях толстой кишки [23]. Известно, что белок p53, который определяет апоптогенные свойства p66shc,

мутирован в 40–60% случаев рака толстой кишки [24–26]. Вероятно, по этой причине в опухолях толстого кишечника не происходит негативной селекции клеток, продуцирующих p66shc [27]. Повышение уровня p66shc, а также Rac1 и eps8 часто обнаруживают и при раке пищевода. Имеются данные и о том, что p66shc ассоциирован с ускоренной пролиферацией и злокачественной трансформацией в модели эпителиальных клеток человека [28, 29].

В представленной работе с помощью РНК-интерференции получена линия клеток RKO рака толстой кишки, в которой стабильно и избирательно подавлен синтез изоформы p66shc. Показано, что в данной модели p66shc ведет себя как прооксидантный белок, способствующий гибели клеток в условиях окислительного стресса. Полученная клеточная модель, а также interfering-конструкции могут использоваться для дальнейшего изучения роли p66shc в регуляции уровня АФК, контроле апоптоза и в канцерогенезе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР). Суммарную РНК выделяли из клеток RKO с помощью Trizol (“Invitrogen”). кДНК синтезировали с помощью обратной транскриптазы SuperScript II (“Invitrogen”). Для получения кДНК p66shc проводили ПЦР с праймерами: прямым – p66m-cf-dir 5'-CAC-CTCTAGAATGGATCTTCTACCC, и обратным – p66m-cf-rev 5'-TGAGATCTAACACTTTCGGATC-CAC, которые содержали XbaI- и BamHI-сайты.

Лентивирусные конструкции. Лентивирусную конструкцию, экспрессирующую изоформу p66shc, получали лигированием кДНК p66shc в вектор pLCMV по XbaI- и BamHI-сайтам.

С целью специфического подавления изоформы p66shc в лентивирусный вектор pLSLP встроили следующие олигонуклеотиды, представляющие shRNA:

shRNAp66-1 соответствует нуклеотидам 40–60 в кДНК изоформы p66shc;

shRNAp66-1-sense:

5'-catccgtCGGAATGAGTCTCTGTCATCG-tcaagagCGATGACAGAGACTCATTCGGtttttg;

shRNA-p66-1-antisense:

5'-aattcaaaaaCGGAATGAGTCTCTGTCATCG-ctcttgaCGATGACAGAGACTCATTCGGacg;

shRNA-p66-2 соответствует нуклеотидам 27–46 в гене p66shc;

shRNA-p66-2-sense:

5'-catccgtGTACAATCCACTCCGGAATG-tcaagagCATTCGGAGTGGATTGTACTttttg;

shRNA-p66-2-antisense:

5'-aattcaaaaaGTACAATCCACTCCGGAATG-ctcttgaCATTCGGAGTGGATTGTACacg;

Контрольная shRNA-Con – представлена шпилькой, содержащей случайную последовательность; sh-Con-sense:

5'-gatccgtTTCTCCGAACGTGTCACGT-tcaagagACGTGACACGTTTCGGAGAAttttg;

sh-Con-antisense:

5'-aattcaaaaaTTCTCCGAACGTGTCACGT-ctcttgaACGTGACACGTTTCGGAGAAacg.

Получение лентивирусных частиц, заражение и селекция клеток. Лентивирусные конструкции вводили с помощью липофекции (Lipofectamin LTX, “Invitrogen”) в линию клеток 293T вместе с упаковывающими плазмидами pCMV-deltaR8.2 и pCMV-VSV-G. Через 24 ч собирали вирусные частицы и заражали ими клетки-мишени после добавления 5 мкг/мл Polybrene (“Sigma”). Инфицированные клетки отбирали на стандартной среде с добавлением 1 мкг/мл пуромицина (“Sigma”).

Измерение активных форм кислорода. За сутки до исследования клетки рассаживали на шестилучный планшет по 80000 клеток на лунку. Клетки обрабатывали 900–1200 мкМ перекиси водорода в течение 3 ч или помещали в бессывороточную среду на 24 ч, после чего добавляли флуоресцентный краситель DCF-DA (“Sigma”, 10 мкМ) и инкубировали в течение 30 мин. После окрашивания клетки снимали трипсином и анализировали на проточном флуориметре Beckman Coulter Epix XL4 (“Beckman Coulter”). Флуоресценцию возбуждали лазером с длиной волны, равной 488 нм. Эмиссию измеряли при 535 нм.

Измерение выживаемости клеток. Клетки рассевали на 96-лучный планшет по 5000 клеток на лунку. На следующий день добавляли от 600 до 1200 мкМ перекиси водорода, через сутки в лунках заменяли среду (100 мкл) и добавляли 20 мкл реактива Cell Titer Blue (“Promega”). Через 2 ч флуоресцентный сигнал измеряли на планшетном флуориметре. Флуоресценцию возбуждали при $\lambda = 544$ нм, эмиссию измеряли при $\lambda = 590$ нм.

Окрашивание митохондрий и оценка степени дробления митохондрий. Клетки рассевали на 35 мм чашки (по 80000 клеток). На следующий день добавляли от 600 до 1200 мкМ перекиси водорода и инкубировали в течение 20 ч. Клетки окрашивали красителем Mitotracker Red (“Molecular probes”, 100 нМ) в атмосфере с 5% CO₂ в течение 15 мин при 37°C. Далее инкубировали в среде без красителя в тех же условиях в течение 15 мин. Клетки фотографировали на инвертированном флуоресцентном микроскопе Leica DMI4000 В. Содержание клеток с фрагментированными митохондриями определяли после анализа 200 клеток в каждом опыте.

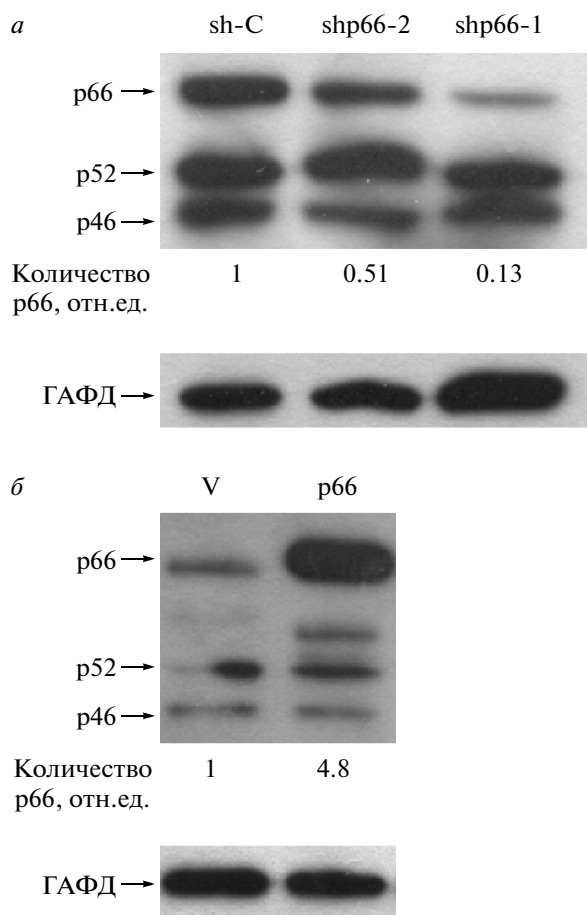


Рис. 1. Иммуноблоттинг белков — продуктов гена *SHC1*, в стабильных субклинах клеток RKO. *а* — Клетки, полученные с помощью лентивирусного введения контрольной shRNA — shRNA-C и shRNA — против CH2-домена p66shc — shRNAp66-1 и shRNAp66-2. Содержание p66shc указано относительно контрольной линии клеток, экспрессирующей shRNA-C. *б* — Клетки, полученные с помощью лентивирусного введения конструкции, экспрессирующей p66. Содержание p66shc указано относительно контрольной линии клеток, экспрессирующей пустой вектор pLCMV (V).

Вестерн-блоттинг. Клетки лизировали в буфере M-PER (“Pierce”), содержащем ингибиторы протеаз Complete Mini (“Roche”). Белковые экстракты (10 мкг суммарного белка) анализировали с помощью электрофореза в денатурирующем 12%-м полиакриламидном геле (ПААГ). Для детекции использовали антитела, узнающие все изоформы белка, кодируемые геном *SHC1* (610082, “BD Biosciences”). С целью контроля нагрузки блот окрашивали антителами к ГАФД (sc-32233, “Santa Cruz”). Денситометрический анализ вестерн-блотов проведен с помощью программы Image J.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы получить клетки с генетическим нокаутом изоформы p66shc создали конструкции на

основе лентивирусного вектора pLSLP [30], экспрессирующие две различные короткие шпилечные РНК (shRNA), нацеленные на CH2-домен p66shc. Для каждой лентивирусной конструкции получены вирусные стоки, которыми заражали клетки RKO рака толстой кишки. Фракцию клеток с интегрированной конструкцией выделяли путем селекции на среде с пуромицином. Степень подавления изоформы p66shc определяли с помощью Вестерн-блоттинга. Как видно из рис. 1*а*, экспрессия shRNAp66-1 приводила к снижению уровня белка p66shc на 87% от исходного уровня, а shRNAp66-2 — на 49%. Используемые антитела выявляли также изоформы p52shc и p46shc. При этом в клетках, экспрессирующих shRNA, уровень этих белков не изменялся.

Влияние повышенного уровня p66shc оценивали, вводя в клетки RKO лентивирусную конструкцию pLCMV-p66shc, в которой область, кодирующая p66shc, находилась под контролем сильного цитомегаловирусного промотора (CMV-промотора). Контролем служил пустой вектор pLCMV. Результаты Вестерн-анализа, представленные на рис. 1*б*, указывают на повышение в 4.8 раза уровня изоформы p66shc в клетках RKO/pLCMV-p66shc. Отмечено также появление дополнительной полосы, не соответствующей ни одной из изоформ. Эта полоса образуется, вероятно, в результате частичной деградации рекомбинантной изоформы p66shc в экстракте клеток.

В работах [3, 5, 8, 16, 31] на различных клеточных моделях показано, что изоформа p66shc участвует в развитии окислительного стресса, индуцированного рядом факторов. Мы проверили как влияет снижение или увеличение содержания p66shc на внутриклеточный уровень АФК в ответ на окислительную нагрузку в клетках RKO. Окислительный стресс индуцировали с использованием обработки перекисью водорода. Подобная обработка, как показано ранее, сопровождается выработкой АФК в митохондриях. Антиоксиданты SkQ, направленные в митохондрии, предотвращают накопление АФК и последующий апоптоз клеток, обработанных перекисью водорода [32–35]. При добавлении перекиси водорода в клетках RKO наблюдалось медленное повышение уровня эндогенных АФК (измеренное с помощью редокс-чувствительного флуоресцентного индикатора DCF-DA методом проточной цитометрии), которое достигало максимума за 2–3 ч (не показано). В клетках с повышенным уровнем p66shc усиливалась продукция эндогенных АФК, в то время как в клетках с подавленным синтезом p66shc образование эндогенных АФК было значительно снижено (рис. 2*а, б*). Аналогичные результаты получены на двух линиях клеток, экспрессирующих shRNAp66-1 и shRNAp66-2. При подавлении изоформы p66shc достоверно снижался

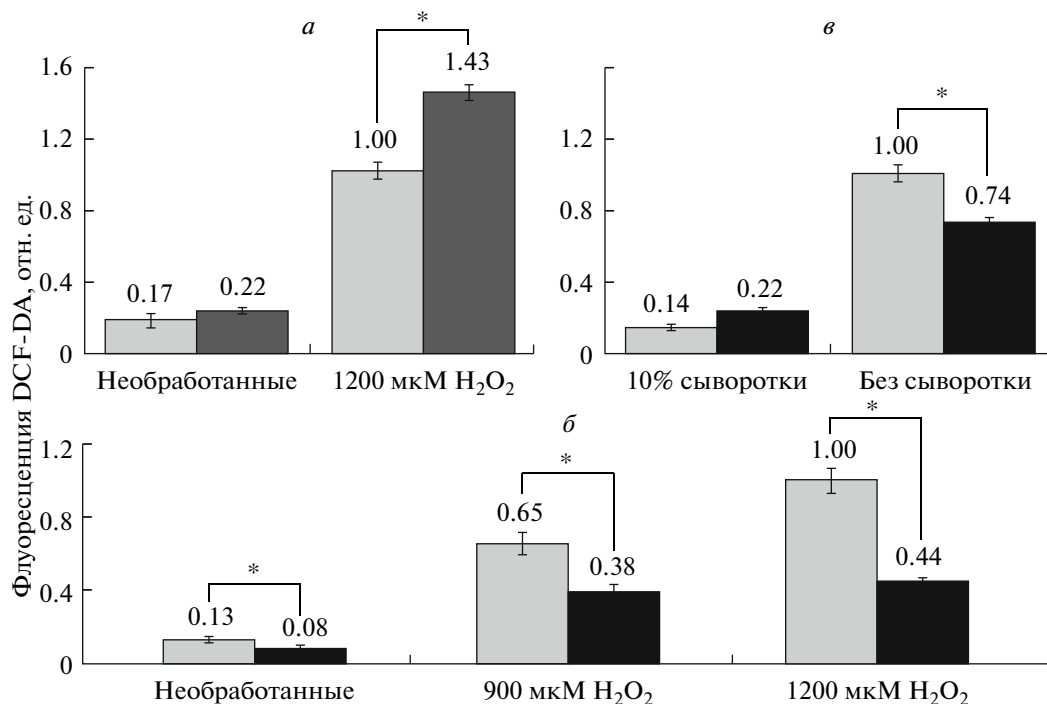


Рис. 2. p66shc действует как прооксидантный белок в клетках RKO. *a* – Уровень флуоресценции DCFDA в клетках, не обработанных и обработанных перекисью водорода в указанных концентрациях в течение 3 ч. Клеткам с контрольным вектором pLCMV соответствуют светлые столбцы, клеткам, сверхэкспрессирующим p66, – темные столбцы. *б* – Уровень флуоресценции DCFDA в клетках, обработанных перекисью водорода в указанных концентрациях в течение 3 ч. Клеткам с контрольной shRNA (sh-C) соответствуют светлые столбцы, клеткам, экспрессирующим shRNAp66-1, – черные столбцы. *в* – Уровень флуоресценции DCFDA в клетках, культивируемых в бессывороточной среде в течение 24 ч. Клеткам с контрольной shRNA (sh-C) соответствуют светлые столбцы; клеткам, экспрессирующим shRNAp66-2, – черные столбцы. Представлены средние значения интенсивности флуоресценции DCFDA, измеренные параллельно в трех культурах клеток. Показаны значения стандартного отклонения; * $p < 0.05$, значимые различия между указанными группами определены с помощью парного Т-теста. Данные воспроизведены в трех независимых опытах.

уровень АФК в клетках, не обработанных перекисью водорода (рис. 2б).

Мы также оценили влияние изоформы p66shc на клетки, культивируемые на среде без сыворотки. Попадание клеток в бессывороточную среду сопровождается окислительным стрессом, обусловленным выработкой эндогенных АФК, до уровней, вызываемых обработкой перекисью водорода, что может приводить к запуску внутреннего пути развития апоптоза [36–38]. Показано, что по крайней мере часть АФК вырабатываются в митохондриях, и они связаны с активностью митохондриального белка Romo1 [39]. Подавление синтеза p66shc приводило к снижению на 26% уровня АФК в клетках, подвергнутых окислительному стрессу, вызванному культивированием в среде без сыворотки (рис. 2в).

Одним из ранних маркеров окислительного стресса считается фрагментация митохондрий. В покое митохондрии имеют, как правило, вытянутую форму и образуют разветвленную сеть [40]. Окислительный стресс, вызванный перекисью водорода, приводит к фрагментации митохондриальной сети в линии клеток RKO. Отмечено

последовательное набухание митохондрий и их фрагментация, после чего митохондрии распались на множество шарообразных структур (рис. 3б, отмечено стрелкой). Эти процессы наблюдались при сублетальных дозах перекиси водорода, когда гибель клеток не превышала 20–25% (рис. 4б).

В необработанных перекисью водорода клетках, экспрессирующих либо контрольную shRNA, либо shRNAp66, не отмечено изменений в митохондриальной сети (рис. 3а, в). Фрагментация митохондрий значительно реже наблюдалась в клетках с подавленным синтезом изоформы p66shc, которые обработали умеренной дозой перекиси водорода (до 800 мкМ), чем в контрольных клетках (рис. 4а). При повышении концентрации перекиси водорода до 1000 мкМ число клеток с фрагментированными митохондриями резко возрастало, а защитный эффект нокдауна p66shc пропадал. Возможно, в этих условиях основной причиной фрагментации митохондрий служило не накопление АФК, а снижение мембранного потенциала. Известно, что антиоксиданты, направленные в митохондрии, предотвращают фрагментацию митохондрий в клетках, обработанных перекисью водорода, значительно

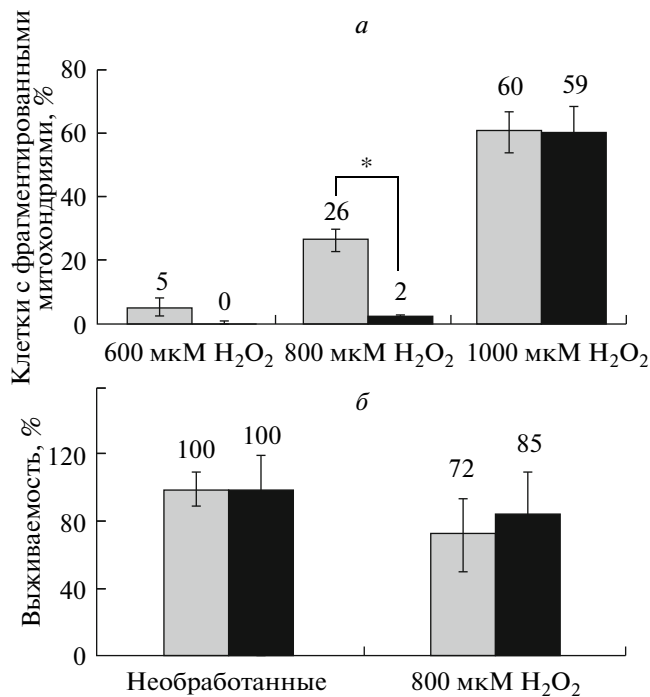


Рис. 4. Генетический нокадаун *rbb6shc* защищает митохондриальную сеть от фрагментации под действием перекиси водорода. *a* – Содержание клеток с фрагментированными митохондриями после обработки перекисью водорода в указанных концентрациях в течение 20 ч. *б* – Выживаемость клеток после обработки перекисью водорода (800 мкМ) в течение 20 ч. Клеткам с контрольной shRNA (*sh-C*) соответствуют светлые столбцы; клеткам, экспрессирующим shRNA *rbb6-2*, – черные столбцы. Данные воспроизведены в трех независимых опытах. Представлены средние значения и стандартные отклонения; **p* < 0.05. Значимые различия между указанными группами определены с помощью парного Т-теста.

быстрее, чем в них накапливаются АФК, а затем индуцируется апоптоз [35, 42]. Антиоксиданты, направленные в митохондрии, так же как и нокадаун *rbb6shc*, не защищали митохондрии, подвергнутые воздействию повышенных концентраций перекиси водорода. Эти данные указывают на то, что фрагментация митохондриальной сети при окислительном стрессе зависит от накопления АФК в митохондриях.

Ранее установили, что генный нокаут *rbb6shc* у мышей приводит к повышению устойчивости клеток к окислительному стрессу [3, 5, 43–45]. Мы показали, что снижение уровня изоформы *rbb6shc* в клетках RKO человека значительно повышает их устойчивость к токсическому действию перекиси водорода (рис. 5). Этот эффект согласуется со снижением окислительного стресса, индуцированного перекисью водорода в клетках. Защитный эффект нокадауна *rbb6shc* может быть связан с активацией NF-κB, как это показано на клетках пигментного эпителия сетчатки человека [16]. На

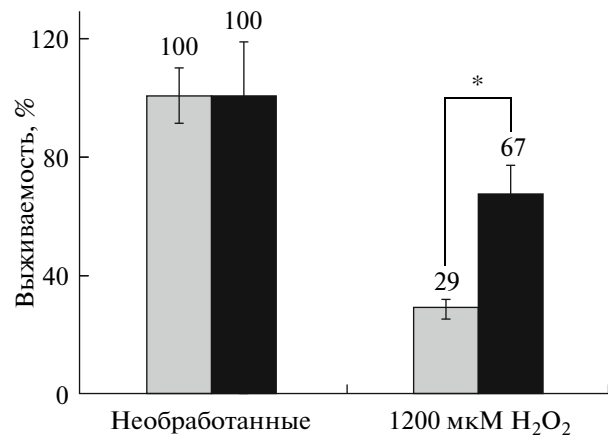


Рис. 5. Генетический нокадаун *rbb6shc* защищает клетки RKO от токсического действия перекиси водорода. Выживаемость клеток измеряли после обработки перекисью водорода (1200 мкМ) в течение 20 ч. Клеткам с контрольной shRNA (*sh-C*) соответствуют светлые столбцы, клеткам, экспрессирующим shRNA *rbb6-2*, – черные столбцы. Представлены средние значения выживаемости, определенные параллельно в пяти культурах клеток. Показаны значения стандартного отклонения; **p* < 0.05. Значимые различия между указанными группами определены с помощью парного Т-теста. Данные воспроизведены в трех независимых опытах.

культурах клеток человека показано, что *rbb6shc* может участвовать в запуске апоптоза как на p53-зависимой, так и на p53-независимой модели [46]. Молекулярные пути, приводящие к гибели клеток RKO при окислительном стрессе, составляет предмет наших дальнейших исследований.

Таким образом, на основании анализа изменений уровней эндогенных АФК, фрагментации митохондрий и выживаемости клеток можно сделать заключение, что изоформа *rbb6shc* действует как прооксидантный белок, способствующий гибели клеток рака толстой кишки при окислительном стрессе. Полученные данные подтверждают предположение о том, что прооксидантное действие изоформы *rbb6shc* связано с избыточной продукцией АФК в митохондриях. Уровень белка *rbb6shc* в клетках RKO может определять их устойчивость к окислительному стрессу, а также то пороговое значение, за которым следует запуск обратного каскада процессов апоптоза. Более детальное понимание роли *rbb6shc* в физиологии этих клеток может способствовать созданию эффективных подходов к диагностике и терапии злокачественных новообразований и, в частности, рака толстой кишки.

Авторы благодарны В.П. Скулачеву за полезное обсуждение результатов и существенную помощь в планировании экспериментов.

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (11-04-12050-офи-м-

2011, 10-04-01679-а, 09-04-00667-а, 09-04-01454-а, 11-04-00410 (П.М.Ч)), National Institutes of Health (R01 AG25278 (П.М.Ч.)), Howard Hughes Medical Institute (55005603 (П.М.Ч.)), грантом Правительства Российской Федерации (11.G34.31.0034 (П.М.Ч.)) и грантом Министерства образования и науки № 16.552.11.7034.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Luzi L., Confalonieri S., Di Fiore P.P., Pelicci P.G. 2000. Evolution of Shc functions from nematode to human. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 668–674.
- Migliaccio E., Mele S., Salcini A.E., et al. 1997. Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signaling pathway. *EMBO J.* **16**, 706–716.
- Giorgio M., Migliaccio E., Orsini F., et al. 2005. Electron transfer between cytochrome c and p66Shc generates reactive oxygen species that trigger mitochondrial apoptosis. *Cell.* **122**, 221–233.
- Migliaccio E., Giorgio M., Mele S., et al. 1999. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature.* **402**, 309–313.
- Trinei M., Giorgio M., Cicalese A., et al. 2002. A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis. *Oncogene.* **21**, 3872–3878.
- Orsini F., Moroni M., Contursi C., et al. 2006. Regulatory effects of the mitochondrial energetic status on mitochondrial p66Shc. *Biol. Chem.* **387**, 1405–1410.
- Pinton P., Rimessi A., Marchi S., et al. 2007. Protein kinase C beta and prolyl isomerase 1 regulate mitochondrial effects of the life-span determinant p66Shc. *Science.* **315**, 659–663.
- Khanday F.A., Santhanam L., Kasuno K., et al. 2006. Sos-mediated activation of rac1 by p66shc. *J. Cell. Biol.* **172**, 817–822.
- Abo A., Pick E., Hall A., et al. 1991. Activation of the NADPH oxidase involves the small GTP-binding protein p21rac1. *Nature.* **353**, 668–670.
- Radisky D.C., Levy D.D., Littlepage L.E., et al. 2005. Rac1b and reactive oxygen species mediate MMP-3-induced EMT and genomic instability. *Nature.* **436**, 123–127.
- Werner E., Werb Z. 2002. Integrins engage mitochondrial function for signal transduction by a mechanism dependent on Rho GTPases. *J. Cell Biol.* **158**, 357–368.
- Kuroda J., Ago T., Matsushima S., et al. 2010. NADPH oxidase 4 (Nox4) is a major source of oxidative stress in the failing heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **107**, 15565–15570.
- Ago T., Kuroda J., Pain J., et al. 2010. Upregulation of Nox4 by hypertrophic stimuli promotes apoptosis and mitochondrial dysfunction in cardiac myocytes. *Circ. Res.* **106**, 1253–1264.
- Block K., Gorin Y., Abboud H.E. 2009. Subcellular localization of Nox4 and regulation in diabetes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 14385–14390.
- Borkowska A., Sielicka-Dudzin A., Herman-Antosiewicz A., et al. 2011. P66Shc mediated ferritin degradation—A novel mechanism of ROS formation. *Free Radic. Biol. Med.* **51**, 658–663.
- Wu Z., Rogers B., Kachi S., et al. 2006. Reduction of p66Shc suppresses oxidative damage in retinal pigmented epithelial cells and retina. *J. Cell Physiol.* **209**, 996–1005.
- Haga S., Terui K., Fukai M., et al. 2008. Preventing hypoxia/reoxygenation damage to hepatocytes by p66(shc) ablation: up-regulation of anti-oxidant and anti-apoptotic proteins. *J. Hepatol.* **48**, 422–432.
- Koch O.R., Fusco S., Ranieri S.C., et al. 2008. Role of the life span determinant P66(shcA) in ethanol-induced liver damage. *Lab. Invest.* **88**, 750–760.
- Francia P., delli Gatti C., Bachschmid M., et al. 2004. Deletion of p66shc gene protects against age-related endothelial dysfunction. *Circulation.* **110**, 2889–2895.
- Orsini F., Migliaccio E., Moroni M., et al. 2004. The life span determinant p66Shc localizes to mitochondria where it associates with mitochondrial heat shock protein 70 and regulates trans-membrane potential. *J. Biol. Chem.* **279**, 25689–25695.
- Camicci G.G., Schiavoni M., Francia P., et al. 2007. Genetic deletion of p66(Shc) adaptor protein prevents hyperglycemia-induced endothelial dysfunction and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**, 5217–5222.
- Sansone P., Storci G., Giovannini C., et al. 2007. p66Shc/Notch-3 interplay controls self-renewal and hypoxia survival in human stem/progenitor cells of the mammary gland expanded *in vitro* as mammospheres. *Stem Cells.* **25**, 807–815.
- Grossman S.R., Lyle S., Resnick M.B., et al. 2007. p66 Shc tumor levels show a strong prognostic correlation with disease outcome in stage IIA colon cancer. *Clin. Cancer Res.* **13**, 5798–5804.
- Lane D.P. 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* **358**, 15–16.
- Iacopetta B. 2003. TP53 mutation in colorectal cancer. *Hum Mutat.* **21**, 271–276.
- Russo A., Corsale S., Cammareri P., et al. 2005. Pharmacogenomics in colorectal carcinomas: future perspectives in personalized therapy. *J. Cell Physiol.* **204**, 742–749.
- Bashir M., Kirmani D., Bhat H.F., et al. 2010. P66shc and its downstream Eps8 and Rac1 proteins are upregulated in esophageal cancers. *Cell Commun. Signal.* **8**, 13.
- Lee M.S., Igawa T., Chen S.J., et al. 2004. p66Shc protein is upregulated by steroid hormones in hormone-sensitive cancer cells and in primary prostate carcinomas. *Int. J. Cancer.* **108**, 672–678.
- Veeramani S., Igawa T., Yuan T.C., et al. 2005. Expression of p66(Shc) protein correlates with proliferation of human prostate cancer cells. *Oncogene.* **24**, 7203–7212.
- Sablina A.A., Budanov A.V., Ilyinskaya G.V., et al. 2005. The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Medicine.* **11**, 1306–1313.
- Nemoto S., Finkel T. 2002. Redox regulation of forkhead proteins through a p66shc-dependent signaling pathway. *Science.* **295**, 2450–2452.

32. Skulachev V.P., Antonenko Y.N., Cherepanov D.A., et al. 2010. Prevention of cardiolipin oxidation and fatty acid cycling as two antioxidant mechanisms of cationic derivatives of plastoquinone (SkQs). *Biochim. Biophys. Acta.* **1797**, 878–889.
33. Izyumov D.S., Domnina L.V., Nepryakhina O.K., et al. 2010. Mitochondria as source of reactive oxygen species under oxidative stress. Study with novel mitochondria-targeted antioxidants—the “Skulachev-ion” derivatives. *Biochemistry. (Mosc.).* **75**, 123–129.
34. Skulachev V.P., Anisimov V.N., Antonenko Y.N., et al. 2009. An attempt to prevent senescence: a mitochondrial approach. *Biochim. Biophys. Acta.* **1787**, 437–461.
35. Chernyak B.V., Izyumov D.S., Lyamzaev K.G., et al. 2006. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta.* **1757**, 525–534.
36. Zhuge J., Cederbaum A.I. 2006. Serum deprivation-induced HepG2 cell death is potentiated by *CYP2E1*. *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 63–74.
37. Pandey S., Lopez C., Jammu A. 2003. Oxidative stress and activation of proteasome protease during serum deprivation-induced apoptosis in rat hepatoma cells; inhibition of cell death by melatonin. *Apoptosis.* **8**, 497–508.
38. Satoh T., Sakai N., Enokido Y., et al. 1996. Survival factor-insensitive generation of reactive oxygen species induced by serum deprivation in neuronal cells. *Brain Res.* **733**, 9–14.
39. Lee S.B., Kim J.J., Kim T.W., et al. 2010. Serum deprivation-induced reactive oxygen species production is mediated by Romo1. *Apoptosis.* **15**, 204–218.
40. Skulachev V.P., Bakeeva L.E., Chernyak B.V., et al. 2004. Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis. *Mol. Cell Biochem.* **256–257**, 341–358.
41. Bakeeva L.E., Chentsov Yu S., Skulachev V.P. 1978. Mitochondrial framework (reticulum mitochondriale) in rat diaphragm muscle. *Biochim. Biophys. Acta.* **501**, 349–369.
42. Pletjushkina O.Y., Lyamzaev K.G., Popova E.N., et al. 2006. Effect of oxidative stress on dynamics of mitochondrial reticulum. *Biochim. Biophys. Acta.* **1757**, 518–524.
43. Napoli C., Martin-Padura I., de Nigris F., et al. 2003. Deletion of the *p66Shc* longevity gene reduces systemic and tissue oxidative stress, vascular cell apoptosis, and early atherogenesis in mice fed a high-fat diet. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**, 2112–2116.
44. Smith W.W., Norton D.D., Gorospe M., et al. 2005. Phosphorylation of p66Shc and forkhead proteins mediates Abeta toxicity. *J. Cell. Biol.* **169**, 331–339.
45. Menini S., Amadio L., Oddi G., et al. 2006. Deletion of *p66Shc* longevity gene protects against experimental diabetic glomerulopathy by preventing diabetes-induced oxidative stress. *Diabetes.* **55**, 1642–1650.
46. Tiberi L., Faisal A., Rossi M., et al. 2006. *p66(Shc)* gene has a pro-apoptotic role in human cell lines and it is activated by a p53-independent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **342**, 503–508.