

УДК 616-006.484:576.385.5

А.Ю. Журавская, А.В. Комельков, Е.М. Чевкина

МАЛАЯ ГТФАЗА ARF6 АКТИВИРУЕТ mTORC1-ЗАВИСИМЫЙ СИГНАЛЬНЫЙ ПУТЬ И СТИМУЛИРУЕТ РОСТ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ

ФГБУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина», Москва

Контактная информация

Журавская Анна Юрьевна – н.с. лаборатории регуляции клеточных и вирусных онкогенов НИИ канцерогенеза ФГБНУ «РОНЦ им. Н.Н. Блохина».

e-mail: jurkasun@gmail.com тел.: +7 (926) 163-21-38.**Резюме**

В работе впервые идентифицировано участие малой ГТФазы Arf6 в стимуляции пролиферации и автономного роста клеток глиобластомы. Показано, что белок Arf6 активирует комплекс mTORC1, и этот процесс представляет собой альтернативный, независимый от PI3K/Akt-сигнального каскада, механизм активации mTORC1-зависимого пути. Кроме того, обнаружено, что Arf6 является негативным регулятором протеинкиназы ERK1/2 в клетках глиобластомы.

Ключевые слова: пролиферация, Arf6, mTORC1, p70S6K1, ERK1/2, линии клеток глиобластомы.

A.Yu. Zhuravskaya, A.V. Komelkov, E.M. Tchekina

SMALL GTPASE ARF6 ACTIVATES mTORC1-DEPENDENT SIGNALING PATHWAY AND STIMULATES GLIOBLASTOMA CELL GROWTH

FSBSI "N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center", Moscow

Abstract

In this study we first identified role of small GTPase Arf6 in stimulation of proliferation and autonomous growth of human glioblastoma cells. We revealed that Arf6 activates the mTOR complex 1 (mTORC1) and this process is appeared to be an alternative mechanism of mTORC1-signaling activation, independent of PI3K/Akt-signaling pathway. We also showed that Arf6 is a negative regulator of protein kinase ERK1/2 in glioblastoma cells.

Key words: proliferation, Arf6, mTORC1, p70S6K1, ERK1/2, glioblastoma cells.**Введение**

В процессе опухолевой прогрессии первично трансформированные клетки помимо способности к неограниченному делению приобретают целый ряд дополнительных характеристик, необходимых для их выживания и распространения по организму, включая «уход» от апоптоза и других форм программируемой клеточной гибели, уклонение от иммунного надзора, приобретение ряда свойств, обеспечивающих способность к автономному росту и выживанию в условиях гипоксии, приобретение миграционного и инвазивного фенотипа и др. Очевидно, что повышенная пролиферативная активность является одним из ключевых компонентов формирования малигнизированного фенотипа опухолевых клеток. Ведь именно это свойство в совокупности с генетической нестабильностью позволяет образовываться огромному количеству разнообразных по свойствам клонов и создает материал для селекции. Несмотря на большие достижения последних лет, молекулярные механизмы, регулирующие пролиферацию, остаются не до конца выясненными, и продолжается поиск новых биологических молекул и сигнальных путей, определяющих пролиферативный потенциал трансформированных клеток.

Малая ГТФаза Arf6 (ADP-ribosylation factor 6) является членом семейства белков Arf, входящего в суперсемейство малых ГТФаз Ras. Arf6, как и прочие G-белки суперсемейства Ras, циклирует в клетке между ГДФ- и ГТФ-связанным состояниями, которые сопровождаются конформационными изменениями белка. Эти структурные изменения обеспечивают его компарментализацию и функциональную активность. Белок Arf6 считается преимущественно активным в ГТФ-связанной форме, которая обеспечивает его взаимодействие с большинством эффекторных молекул [1]. Arf6 известен, главным образом, как регулятор процессов, связанных с мембранным транспортом, а также с разного рода изменениями в цитоплазматической мембране клетки и во внутриклеточных мембранных компартаментах. В частности, Arf6 опосредует различные типы эндоцитоза [2], участвует в экзоцитозе [3] и сортировке транспортируемых молекул [4], влияет на реорганизацию актинового цитоскелета [5], а также регулирует липидный состав [6] и радиус кривизны клеточных мембран. Участие в этих процессах обуславливает и роль данного белка в канцерогенезе: Arf6 регулирует интернализацию и рециклирование β -интегрина [7] и Е-кадгерина [8], секрецию опухолевых микрочастиц, содержащих

протеазы MMP-2, MMP-9, MT1-MMP и зимогены uPA и EMMPRIN [9]. Arf6 также является одним из важнейших регуляторов миграции [10] и инвазии [11] опухолевых клеток. В то же время, практически ничего не известно о возможном участии Arf6 в регуляции пролиферативного потенциала трансформированных клеток.

Ранее нами впервые была показана роль малой ГТФазы Arf6 в усилении пролиферативной активности опухолевых клеток на экспериментальной модели фибробластов сирийского хомяка, трансформированных вирусом саркомы Рауса [12].

Целью данной работы стало изучение роли Arf6 в изменении пролиферации клеток глиобластомы человека и участия данного белка во внутриклеточных сигнальных путях, регулирующих пролиферативную активность клеток.

Материалы и методы

Культивирование клеток

В качестве экспериментальной модели мы использовали клеточные линии глиобластомы человека LN229 и U87. Для получения ретро- и лентивирусных частиц использовали линии эпителиальных клеток GP293 (Clontech, Япония) и 293FT (Invitrogen, США; производные линии HEK-293 – линии эмбриональных клеток почки человека). Все эукариотические линии культивировали в CO₂-инкубаторе (при 37 °C, в атмосфере 5 %-ного CO₂). В качестве среды для культивирования применяли DMEM с добавлением 0,294 мг/мл L-глутамина и 10%-ной ТЭС (PAA Laboratories, Австрия), 0,1 мг/мл стрептомицина, 100 ЕД/мл пенициллина. Подсчет клеток производили с помощью камеры Горяева.

Получение экспрессирующих векторов

Кодирующие последовательности белка Arf6 человека (Arf6WT, Arf6(Q67L)), конъюгированные с гемагглютининовой меткой (HA-tag), были клонированы в ретровирусный вектор pLXSN-neo. Плазмида pLXSN-neo любезно предоставлена доктором J. Camonis (Институт Кюри, Париж, Франция).

Мы использовали следующие последовательности малых шпилечных РНК:

shA Arf6:

5'-CCGGGCATTATCAATGACCGGGAGACTCGAGTCTCCGGTCATGTGATAATGCTTTTGG-3';

shB Arf6:

5'-CCGGGCTCACATGGTTAACCCTCTAAGCTCGAGTTAGAGGTTAACCATGTGAGCTTTTGG-3'

(смысловая и антисмысловая последовательности подчеркнуты).

Для клонирования каждого конструкта в вектор pLKO.1 puro (Addgene, США) синтезировали олигонуклеотиды (F и R для каждой конструкции), модифицированные липкими концами для соответствующих рестриктных сайтов. Полученные конструкции проверялись секвенированием.

Трансфекция

Для получения псевдоретровирусных частиц клетки GP293 наращивали до 70 %-ной конфлюентности. Для трансфекции брали 2 мкг ДНК – рет-

ровирусный вектор pLXSN (Clontech, Япония) с целевым геном и плазмиду pVSV-G (Clontech, Япония), кодирующую белок оболочки вируса везикулярного стоматита, необходимый для сборки вируса и увеличения тропности вирусных частиц к эукариотическим клеткам. Плазмиды смешивали в эквимольном соотношении. Трансфекцию проводили с использованием липофектамина 2000 (Lipofectamine 2000™ Reagent, Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Среда собирали через 24; 48 и 72 ч; центрифугировали 10 мин при 1500 g для удаления клеточного дебриса и использовали для инфекции. Для получения псевдолентивирусных частиц использовали клеточную линию 293FT. Для трансфекции брали 2 мкг плазмидной ДНК – лентивирусный вектор pLKO.1 puro (Addgene, США), несущий последовательность малой шпилечной РНК, pVSV-G и пакующую плазмиду pDeltaR8.2, кодирующую вирусные белки, в эквимольном соотношении. В остальном процедура трансфекции не отличалась от таковой для клеток GP293.

Инфекция псевдовирусными частицами

Среду клеткам-мишеням заменяли на смесь вирусного супернатанта и обычной среды в соотношении 1 : 1 с добавлением полибрена (Sigma, США) до конечной концентрации 8 мкг/мл. Использовали 24-, 48- и 72-часовые инокуляты вируса. Для контроля селекции использовали неинфицированные клетки. В случае ретровирусной инфекции селекцию проводили на G418 (1200 мкг/мл, Sigma, США) в течение 8–9 дней. В случае лентивирусной инфекции отбор проводили с добавлением пурамицина (4,5 мкг/мл, Sigma, США) в течение 5 дней. Для дальнейших экспериментов использовали свежеразмороженные аликвоты полученных клеточных линий.

Иммуноблоттинг

Клеточные лизаты получали из субконфлюентного монослоя клеток с использованием буфера RIPA, содержащего смесь ингибиторов протеаз (25× protease cocktail inhibitor, Roche, Швейцария) и фосфатаз (Thermo Scientific, США). Полученные лизаты нормализовали по количеству белка, используя метод Бредфорд, на гель наносили 20 мкг белка. Белки разделяли в SDS-полиакриламидном геле, после чего переносили на PVDF мембрану (Millipore, США) методом мокрого переноса по стандартному протоколу (прибор Mini Trans-Blot, Bio-Rad Laboratories Inc., США). Мембрану инкубировали в 0,5 %-ном р-ре обезжиренного молока (Bio-Rad Laboratories Inc., США) в течение 1 ч. Затем мембрану инкубировали в течение 12 ч с соответствующими первичными антителами при +4 °C, с последующей стандартной отмывкой, после чего мембрану инкубировали 1–1,5 часа при комнатной температуре с вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. После стандартной отмывки мембрану проявляли с помощью реагента для хемилюминесцентной реакции ECL

(Milipore, США). Хемилюминесцентную реакцию регистрировали на приборе Kodak GelLogic 2200 Imaging system с последующей обработкой с помощью программы Kodak Molecular Imaging Software SE ver. 5.0.1.27.

В работе использовали следующие антитела: anti-Arf6 (Clone ARFAG) A5230 (Sigma, США), anti-HA-tag 2367 (Cell Signaling, США), anti-ERK1/2 4696S (Cell Signaling, США), anti-pERK-1/2 (T202/Y204) 9106S (Cell Signaling, США), anti-p70S6K1 2708S (Cell Signaling, США), anti-p-p70S6K1 (T389) 9205S (Cell Signaling, США), anti-S6 2217S (Cell Signaling, США), anti-pS6 (S235/236) 4858S (Cell Signaling, США), anti-Akt (pan) 4691S (Cell Signaling, США), anti-pAkt (S473) 4060S (Cell Signaling, США), anti-beta-actin ab8227 (Abcam, Великобритания).

Стимуляция EGF

Клетки рассевали на 6-луночные плашки в количестве 4×10^5 на лунку. На следующий день среду меняли на бессывороточную и инкубировали в течение суток. Далее кондиционированную бессывороточную среду меняли на бессывороточную среду с EGF (концентрация 50 нг/мл) и инкубировали 2 минуты. После этого клетки лизировали.

Анализ динамики роста клеток

Для анализа скорости пролиферации клетки каждой культуры рассевали на 6-луночные плашки (по 2×10^4 клеток на лунку в 2 повторностях для каждой временной точки). Клетки культивировались в стандартных условиях. Для анализа ежедневно из двух лунок снимали клетки раствором Версена. Полученную клеточную суспензию смешивали с 0,4 %-ным раствором трипанового синего в отношении 1 : 1 и подсчитывали количество клеток в камере Горяева.

Тест на образование колоний в условиях разреженной популяции (клоногенность)

Культуры клеток рассаживали по 200 шт клеток на 60 мм культуральные чашки Петри в стандартных условиях. Спустя 10 дней образовавшиеся колонии фиксировали 96 %-ным спиртом, окрашивали водным раствором кристаллического фиолетового и фотографировали. Размер колоний оценивали с помощью программы ImageJ.

Результаты

Arf6 стимулирует рост клеток глиобластомы

В качестве экспериментальной модели были выбраны две линии клеток глиобластомы человека, LN229 и U87. Для исследования влияния Arf6 на динамику роста клеток были получены производные данных линий с гиперэкспрессией экзогенного (рис. 1, А) или подавлением эндогенного Arf6 (рис. 1, Б). Гиперэкспрессию Arf6 осуществляли с помощью трансдукции последовательностей, кодирующих Arf6 "дикого" типа (Arf6 WT) либо белок

Arf6(Q67L), являющийся активированной мутантной формой (с заменой глутамина на лейцин в 67 положении, обеспечивающей конститутивную связь белка с ГТФ). Для облегчения детекции экзогенного и эндогенного Arf6 последовательности были конъюгированы с гемагглютининовой меткой. Подавление экспрессии эндогенного Arf6 осуществляли при помощи двух различных малых шпилечных РНК – shA Arf6 и shB Arf6 (последовательности приведены в разделе «Материалы и методы»). Трансдукцию экзогенных последовательностей Arf6 в векторе pLXSN проводили методом ретровирусной инфекции, трансдукцию малых шпилечных РНК в векторе pLKO.1-puro – методом лентивирусной инфекции. В качестве контроля изменения уровня продукции Arf6 при его гиперэкспрессии здесь и далее использовали производные линии LN229 и U87, экспрессирующие «пустой» вектор pLXSN. В качестве контроля специфичности подавления эндогенного Arf6 малыми шпилечными РНК использовали производные линий LN229 и U87, экспрессирующие малые шпилечные РНК к зеленому флуоресцентному белку GFP (shGFP). Анализ изменения экспрессии проводили методом вестерн-блот гибридизации. По результатам сравнительного анализа продукции Arf6 важно отметить, что, в отличие от производных линий LN229, где наблюдался равно высокий уровень экспрессии обеих форм экзогенного Arf6, в производных линий U87 (в трех независимых повторностях получения линий) экспрессия активированного Arf6 оказывалась существенно ниже, чем экспрессия Arf6 "дикого" типа. Это не позволяло оценить роль активации Arf6 на данной линии клеток. Таким образом, при сравнительной оценке результатов экспериментов для линии U87 необходимо учитывать различия в уровне экспрессии Arf6(Q67L) и Arf6 "дикого" типа. В случае подавления экспрессии Arf6 малыми шпилечными РНК, как в линии LN229, так и в линии U87, shB Arf6 снижал продукцию эндогенного Arf6 более эффективно, в то время как эффект shA на экспрессию Arf6 был менее выражен.

Сравнение скорости пролиферации клеток с модифицированной экспрессией Arf6 по сравнению с соответствующими контролями показал, что гиперэкспрессия обеих форм белка Arf6 в линии LN229 приводит к достоверному увеличению скорости деления клеток, причем в большей степени эффект выражен в клетках, экспрессирующих Arf6(Q67L) (рис. 1, В). В линии U87 увеличение пролиферации наблюдается в клетках, гиперэкспрессирующих Arf6 "дикого" типа. В случае подавления экспрессии Arf6 как в клетках линии LN229, так и U87, наиболее выраженное снижение пролиферации наблюдалось в клетках, экспрессирующих shB Arf6. Таким образом, мы показали, что белок Arf6 усиливает пролиферацию клеток глиобластомы, причем его влияние прямо пропорционально уровню экспрессии Arf6. В то же время, при равном уровне экспрессии экзогенных форм Arf6 конститутивная активация белка также вносит дополнительный вклад в увеличение пролиферативного потенциала клеток.

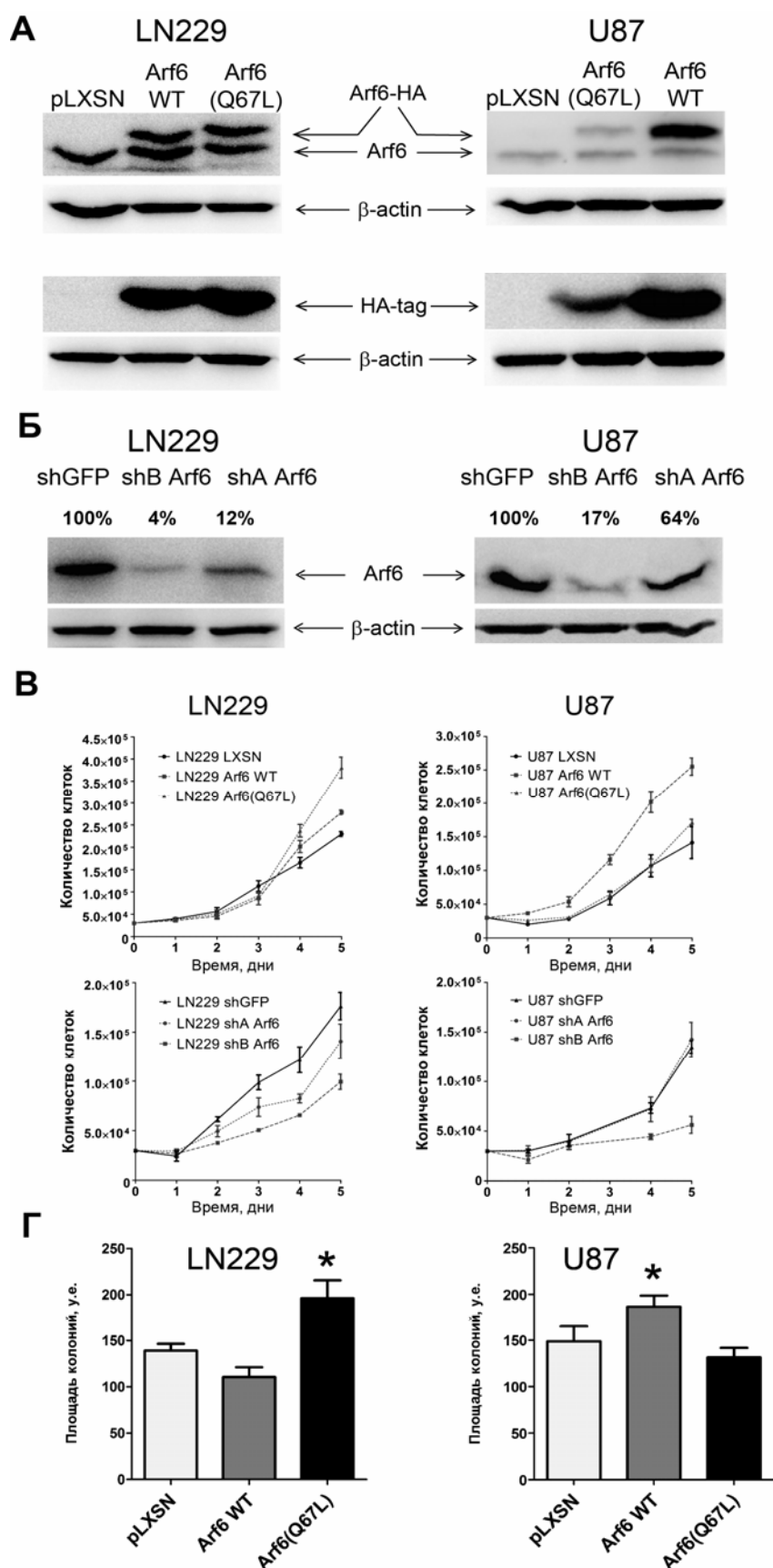


Рис. 1. Arf6 стимулирует рост клеток глиобластомы.

А – экспрессия экзогенного белка Arf6 в линиях LN229 и U87.

Б – подавление экспрессии эндогенного белка Arf6 в линиях LN229 и U87.

В – влияние экспрессии различных форм белка Arf6 на пролиферацию клеток.

Г – влияние экспрессии различных форм белка Arf6 на автономный рост клеток.

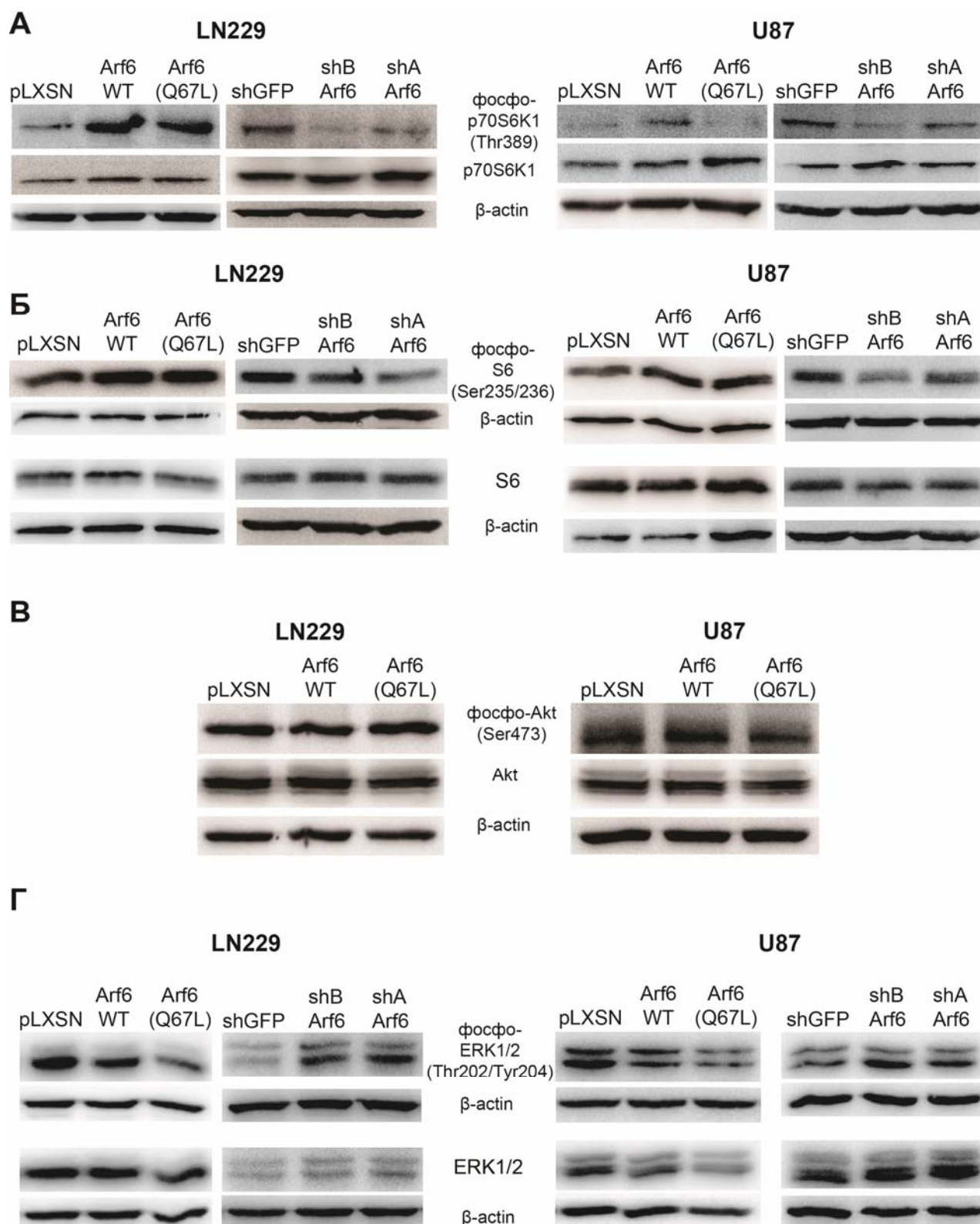


Рис. 2. Влияние Arf6 на активацию mTOR-зависимого сигнального пути и MAP-киназы ERK1/2.

А – анализ изменения фосфорилирования киназы p70S6K1.

Б – анализ изменения фосфорилирования рибосомального белка S6.

В – анализ изменения фосфорилирования киназы Akt.

Г – анализ изменения фосфорилирования MAP-киназы ERK1/2.

Помимо анализа пролиферации клеток в стандартных условиях культивации, мы исследовали влияние Arf6 на динамику клеточного роста в условиях сильно разреженной популяции, когда имеет место дефицит стимулирующих пролиферацию цитокинов, секретируемых клетками микроокружения. Данный тест оценивает формирование и рост колоний, образуемых единичными клетками, при этом основным критерием способности клеток к автономному росту является размер колоний. Результаты анализа показали, что в обеих клеточных линиях экспрессия Arf6 достоверно увеличивает размер колоний по сравнению с контролями, при этом в производных линиях LN229 эффект наиболее выражен в клетках Arf6(Q67L), а в производных U87 – в клетках, экспрессирующих Arf6 WT (Рис. 1, Г). Полученные результаты хорошо согласуются с данными анализа пролиферации и свидетельствуют о том, что Arf6 усиливает рост клеток – как в условиях стандартной культивации, так и при недостатке пролиферативных стимулов от клеток микроокружения. При этом в обоих случаях промитогенный эффект пропорционален экспрессии экзогенного белка Arf6, а его активация дополнительно усиливает рост клеток.

Полученные результаты являются первыми доказательствами промитогенной активности Arf6. В единственной работе, затрагивающей данную тематику и выполненную также на клетках глиобластомы, продемонстрировано влияние стимуляции EGF на Arf6-зависимое усиление EGFR-опосредованной пролиферации [13]. При этом авторы статьи не исследовали роль собственно белка Arf6 в усилении клеточной пролиферации.

Arf6 активирует mTOR-сигнальный путь

Одним из основных эффекторов малой ГТФазы Arf6 является фосфолипаза D, которая, согласно некоторым литературным данным, способна активировать протеинкиназу mTOR [14]. Протеинкиназа mTOR является «центральным узлом» одного из ключевых сигнальных каскадов, регулирующих пролиферацию и рост клеток в ответ на внешние стимулы (ростовые факторы, гормоны и пр.). mTOR функционирует в клетке в составе двух комплексов – mTORC1 и mTORC2, каждый из которых имеет собственные эффекторы. «Классическую» активацию комплекса mTORC1 в ответ на стимуляцию ростовыми факторами осуществляет PI3K/Akt-зависимый сигнальный путь. Наиболее хорошо изученными субстратами mTORC1 являются белки p70S6K (киназы, фосфорилирующие рибосомальный белок S6 (rpS6)) и белок 4E-BP1 (белок, связывающий эукариотический фактор инициации трансляции eIF4E), при помощи которых данный комплекс осуществляет регуляцию биосинтеза белка и роста клетки [15]. В благоприятных для клетки условиях mTORC1 промотирует белковый синтез, клеточный рост и пролиферацию, а в условиях стресса и дефицита питательных веществ ингибирует процессы биосинтеза и инициатирует процесс аутофагии. Нарушения

регуляции mTORC1 и гиперактивация mTOR-зависимого сигнального каскада характерна для целого ряда злокачественных новообразований [16], а ингибиторы активности mTOR-ассоциированного сигнального пути используются в качестве противоопухолевых терапевтических средств. [17]. Ранее мы показали, что Arf6 способен активировать mTOR-зависимый сигнальный путь на модели трансформированных фибробластов сирийского хомяка [12]. Данные о возможном влиянии Arf6 на этот сигнальный путь в клетках человека в литературе отсутствуют.

Для изучения влияния Arf6 на активацию mTORC1-зависимого сигнального пути в клетках глиобластомы мы проанализировали уровень активирующего фосфорилирования основного эффектора mTORC1 – киназы p70S6K1 – в полученных производных клеточных линиях LN229 и U87 с модифицированной экспрессией Arf6. Киназа p70S6K1 напрямую фосфорилируется белком mTOR, находящимся в составе комплекса mTORC1, по 389 треонину [18], поэтому активирующее фосфорилирование p70S6K1 по данному сайту является общепризнанным маркером активации протеинкиназы mTOR [15]. Анализ проводили методом вестерн-блот гибридизации с использованием антител к фосфорилированной форме p70S6K1(Thr389) в сравнении с соответствующими контролями.

В результате эксперимента установлено, что фосфорилирование p70S6K1 значительно усиливается в клетках LN229, гиперэкспрессирующих экзогенный Arf6 как дикого типа, так и его конститутивно-активную форму. Среди производных клеточных линий U87 фосфорилирование p70S6K1 усиливается по сравнению с контролем в клетках, гиперэкспрессирующих Arf6 "дикого" типа (рис. 2, А). При подавлении экспрессии Arf6 как в линии LN229, так и в линии U87, наблюдается сильное снижение фосфорилирования p70S6K1, наиболее выраженное при экспрессии малой шпилечной РНК shB. Соответственно, изменение количества фосфорилированной формы белка p70S6K1 происходит пропорционально уровню экспрессии малой ГТФазы Arf6.

Далее мы проанализировали изменение статуса фосфорилирования рибосомального белка S6 (rpS6), являющегося мишенью S6-киназы, для чего методом вестерн-блот гибридизации оценили уровень активирующего фосфорилирования двух сайтов rpS6: Ser235 и Ser236 (рис. 2, Б). В производных линиях LN229 и U87 наблюдалось усиление фосфорилирования белка S6 по данным сайтам как при экспрессии Arf6 дикого типа, так и при экспрессии Arf6(Q67L). При подавлении экспрессии эндогенного Arf6 фосфорилирование rpS6 по сайтам Ser235/236 снижалось в обеих линиях (при этом эффект выражен сильнее в клетках линии U87). Описанные изменения статуса фосфорилирования белков p70S6K1 и rpS6 не сопровождалось изменением общего количества данных белков в клетках, что свидетельствует о том, что Arf6 влияет на активацию белков-мишеней mTOR, а не на их продукцию.

Поскольку основным путем активации mTORC1 в ответ на ростовые стимулы считается PI3K/Akt-сигнальный каскад, мы проверили возможность влияния Arf6 на данный сигнальный путь. Для этого мы проанализировали уровень активирующего фосфорилирования киназы Akt (Ser473) при гиперэкспрессии Arf6 (рис. 2, В). Результаты вестерн-блот анализа не выявили различий в статусе фосфорилирования Akt в производных обеих исследуемых линий по сравнению с контрольными линиями. Таким образом, Arf6 активирует mTORC1 независимо от PI3K/Akt-сигнального пути. Эти результаты соответствуют данным, полученным ранее на экспериментальной модели трансформированных фибробластов хомяка [12] и свидетельствуют об альтернативном механизме активации mTORC1 малой ГТФазой Arf6.

Arf6 негативно регулирует фосфорилирование ERK1/2

Другим хорошо известным сигнальным путем, регулирующим пролиферацию клеток, является каскад MAPK. Данный путь активируется гормонами, факторами роста, различными хемокинами и нейротрансмиттерами, которые распознаются соответствующими рецепторными тирозинкиназами или рецепторами, ассоциированными с G-белками, что приводит к передаче сигнала по пути Ras-MAPK-ERK1/2. Важно отметить, что ряд белков MAPK-ERK1/2 сигнального пути способен активировать как сам mTORC1-комплекс, так и его мишени [19].

Поэтому мы проанализировали возможное влияние Arf6 на активность Erk1/2 как возможного посредника Arf6 в стимуляции пролиферации и в активации mTOR-сигнального пути. В литературе имеется несколько указаний на связь Arf6 с ERK-путем, однако эти данные противоречивы и свидетельствуют как о возможном стимулирующем [20], так и о негативном [21; 22] влиянии белка Arf6 на ERK1/2, а также об участии ERK1/2 в активации Arf6 [13].

Литература

1. Donaldson J.G., Jackson C.L. ARF family G proteins and their regulators: roles in membrane transport, development and disease. // Nature reviews Molecular cell biology. – 2011. – Vol. 12. – P. 362-75.
2. D'Souza-Schorey C, Chavrier P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. // Nature reviews Molecular cell biology. – 2006. – Vol. 7. – P. 347-58.
3. Prigent M, Dubois T, Raposo G, Derrien V, Tenza D, Rosse C, et al. ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector. // The Journal of cell biology. – 2003. – Vol. 163. – P. 1111-21.
4. Shteyn E, Pigati L, Folsch H. Arf6 regulates AP-1B-dependent sorting in polarized epithelial cells. // The Journal of cell biology. – 2011. – Vol. 194. – P. 873-87.
5. Myers KR, Casanova JE. Regulation of actin cytoskeleton dynamics by Arf-family GTPases. // Trends in cell biology. – 2008. – Vol. 18. – P. 184-92.
6. Schweitzer JK, Sedgwick AE, D'Souza-Schorey C. ARF6-mediated endocytic recycling impacts cell movement, cell division and lipid homeostasis. // Seminars in cell & developmental biology. – 2011. – Vol. 22. – P. 39-47.
7. Dunphy JL, Moravec R, Ly K, Lasell TK, Melancon P, Casanova JE. The Arf6 GEF GEP100/BRAG2 regulates cell adhesion by controlling endocytosis of beta1 integrins. // Current biology : CB. – 2006. – Vol. 16. – P. 315-20.

В полученных линиях было проанализировано влияние белка Arf6 на статус фосфорилирования MAP-киназы ERK1/2 (активирующее фосфорилирование по сайту Thr202/Tyr204) методом вестерн-блот гибридизации. Эксперимент проводился в условиях стимуляции EGF. Установлено, что в клетках линий LN229 и U87 при гиперэкспрессии малой ГТФазы Arf6 наблюдается снижение уровня фосфорилирования ERK1/2 по сравнению с контрольными линиями (рис. 2, Г). В свою очередь, подавление экспрессии Arf6 малыми шпилечными РНК приводит к усилению фосфорилирования ERK1/2. Таким образом, в линиях глиобластом LN229 и U87 малая ГТФаза Arf6 участвует в негативной регуляции MAP-киназы ERK1/2. При этом активация белка Arf6 оказывает дополнительный вклад в подавление фосфорилирования ERK1/2. Эти результаты хорошо согласуются с некоторыми литературными данными, свидетельствующими об увеличении фосфорилирования ERK1/2 при подавлении экспрессии Arf6 в эндотелиальных клетках линии EaHY 926 [21]. Способность снижать фосфорилирование ERK1/2 также показана для миристоилированного N-концевого пептида Arf6 (аминокислотные остатки со второго по тринадцатый) в клетках линии меланомы B16-BL6 [22]. Результаты данной работы свидетельствуют о том, что в клетках глиобластомы ERK1/2 также является мишенью Arf6, при этом Arf6 осуществляет негативную регуляцию данной киназы. Таким образом, ERK1/2 не может являться посредником Arf6 в проведении промитогенного сигнала, а также не может опосредовать Arf6-зависимую активацию mTORC1-ассоциированного сигнального пути.

Заключение

В работе впервые показано, что Arf6 стимулирует пролиферацию и автономный рост клеток глиобластомы, активирует сигнальный путь mTORC1-S6K1, однако играет негативную роль в регуляции активности протеинкиназы ERK1/2.

Работа поддержана фондом РФФИ (грант №14-04-01706).

8. Paterson AD, Parton RG, Ferguson C, Stow JL, Yap AS. Characterization of E-cadherin endocytosis in isolated MCF-7 and chinese hamster ovary cells: the initial fate of unbound E-cadherin. // The Journal of biological chemistry. – 2003. – Vol. 278. – P. 21050-7.
9. D'Souza-Schorey C, Clancy JW. Tumor-derived microvesicles: shedding light on novel microenvironment modulators and prospective cancer biomarkers. // Genes & development. – 2012. – Vol. 26. – P. 1287-99.
10. Hu Z, Du J, Yang L, Zhu Y, Yang Y, Zheng D, et al. GEP100/Arf6 is required for epidermal growth factor-induced ERK/Rac1 signaling and cell migration in human hepatoma HepG2 cells. // PloS one. – 2012. – Vol. 7. – P. e38777.
11. Hashimoto S, Onodera Y, Hashimoto A, Tanaka M, Hamaguchi M, Yamada A, et al. Requirement for Arf6 in breast cancer invasive activities. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2004. – Vol. 101. – P. 6647-52.
12. Knizhnik AV, Kovaleva OV, Komelkov AV, Trukhanova LS, Rybko VA, Zborovskaya IB, et al. Arf6 promotes cell proliferation via the PLD-mTORC1 and p38MAPK pathways. // Journal of cellular biochemistry. – 2012. – Vol. 113. – P. 360-71.
13. Li M, Wang J, Ng SS, Chan CY, He ML, Yu F, et al. Adenosine diphosphate-ribosylation factor 6 is required for epidermal growth factor-induced glioblastoma cell proliferation. // Cancer. – 2009. – Vol. 115. – P. 4959-72.
14. Foster DA, Xu L. Phospholipase D in cell proliferation and cancer. // Molecular cancer research : MCR. – 2003. – Vol. 1. – P. 789-800.
15. Averous J, Proud CG. When translation meets transformation: the mTOR story. // Oncogene. – 2006. – Vol. 25. – P. 6423-35.
16. Zhou H, Huang S. mTOR signaling in cancer cell motility and tumor metastasis. // Critical reviews in eukaryotic gene expression. – 2010. – Vol. 20. – P. 1-16.
17. Bjornsti MA, Houghton PJ. The TOR pathway: a target for cancer therapy. // Nature reviews Cancer. – 2004. – Vol. 4. – P. 335-48.
18. Dennis PB, Pullen N, Kozma SC, Thomas G. The principal rapamycin-sensitive p70(s6k) phosphorylation sites, T-229 and T-389, are differentially regulated by rapamycin-insensitive kinase kinases. // Molecular and cellular biology. – 1996. – Vol. 16. – P. 6242-51.
19. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. // Trends in biochemical sciences. – 2011. – Vol. 36. – P. 320-8.
20. Tague SE, Muralidharan V, D'Souza-Schorey C. ADP-ribosylation factor 6 regulates tumor cell invasion through the activation of the MEK/ERK signaling pathway. // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2004. – Vol. 101. – P. 9671-6.
21. Daher Z, Noel J, Claing A. Endothelin-1 promotes migration of endothelial cells through the activation of ARF6 and the regulation of FAK activity. // Cellular signalling. – 2008. – Vol. 20. – P. 2256-65.
22. Kato Y, Lambert CA, Colige AC, Mineur P, Noel A, Franken F, et al. Acidic extracellular pH induces matrix metalloproteinase-9 expression in mouse metastatic melanoma cells through the phospholipase D-mitogen-activated protein kinase signaling. // The Journal of biological chemistry. – 2005. – Vol. 280. – P. 10938-44.