

Механизм проапоптотического действия N-ацилдофаминов по отношению к клеткам линии феохромоцитомы PC12

Научный руководитель – Акимов Михаил Геннадьевич

Ашба Алина Мухадиновна

Аспирант

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, Москва, Россия
E-mail: alyafonya@mail.ru

N-ацилдофамины (NADA) - биогенные конъюгаты дофамина с длинноцепочечными жирными кислотами. NADA индуцируют гибель раковых клеток различного гистологического происхождения с полудлетальными дозами в диапазоне 2-50 мкМ. Активность зависит от структуры остатка жирной кислоты и модификации дофамина, и является специфической. NADA проявляют свойства агонистов рецепторов каннабиноидно-ванилоидной системы, однако молекулярная мишень NADA, обеспечивающая индукцию гибели клеток, до сих пор неизвестна. Цель данной работы - идентифицировать рецептор NADA в клеточной линии феохромоцитомы PC12 и изучить пути передачи внутриклеточного сигнала при индукции клеточной гибели.

Мы установили, что мишенью NADA является рецептор non-CB1/CB2 GPR55 (подтверждено с помощью фармакологической блокады под действием ингибитора O-1918 и известных агонистов, а также путем нокдауна siRNA). Этот рецептор передает сигнал на фосфолипазу C (установлено с помощью использования специфического ингибитора и измерения уровня NO), которая генерирует инозиттрифосфат (IP3), вызывающий высвобождение Ca^{2+} из внутриклеточных пулов через IP3-рецептор (специфический ингибитор рецептора, измерение уровня NO). Ca^{2+} (измерение концентрации кальция, использован хелатор кальция, анализ экспрессии мРНК nNOS на фоне хелатора) через кальмодулин (ингибитор кальмодулина) и протеинкиназу CaMKIV (ингибитор CaMKIV) активирует фактор транскрипции CREB (измерен уровень АФК на фоне ингибитора CREB, анализ экспрессии мРНК nNOS на фоне ингибитора, репортерная система на основе люциферазы), который обеспечивает экспрессию нейрональной NO-синтазы (анализ экспрессии мРНК nNOS, iNOS, eNOS, использование ингибитора nNOS), последующую генерацию NO (измерение уровня NO, использование хелатора NO) и АФК (измерение АФК, ингибирование цистеином и аскорбатом для подтверждения окислительного стресса). Далее сигнал через чувствительную к АФК протеинкиназу ASK1 передается на протеинкиназу JNK (установлено с помощью ингибиторов данных киназ) и происходит запуск внутреннего пути апоптоза (измерение активности каспаз, использование панкаспазного и ингибитора аутофагии, анализ фрагментации ДНК, с помощью флуоресцентного красителя ApoTRACE и окраски аннексином) с активацией каспаз 9 и 3. В дополнение к данному пути зафиксированы дополнительные ветви с участием протеинкиназы G, гуанилилциклазы, белка Ras и калпаина (установлено с помощью специфических ингибиторов, измерения NO и АФК на фоне этих ингибиторов), которые предположительно служат для усиления и дублирования сигнала.

Таким образом, нам впервые удалось полностью и детально охарактеризовать передачу сигнала NADA при индукции клеточной смерти.

Работа была частично поддержана грантом РФФИ № 16-04-00729a.