

УДК 577.29

УДАЛЕНИЕ ФЕРМЕНТА NSDHL СПОСОБСТВУЕТ КЛЕТОЧНОМУ СТАРЕНИЮ МЫШИНЫХ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТОВ

Л.Р. Габитова, И.А. Асцатуров

Аннотация

Холестерол, его производные и метаболиты процесса его биосинтеза являются важными компонентами клетки и играют существенную роль во многих процессах её жизнедеятельности, включая передачу внутриклеточных сигналов, регуляцию клеточного цикла и др. В работе мы показали, что выключение фермента биосинтеза холестерина NSDHL (NAD(P)H-зависимая стероидная дегидрогеназа) и накопление её метаболитов приводит к ускоренному старению мышечных эмбриональных фибробластов и подавлению их пролиферации. Описанное явление может быть использовано в создании стратегии воздействия на холестерольный биосинтез в опухолевых клетках для индукции их старения и подавления пролиферации.

Ключевые слова: холестерол, метаболиты биосинтеза холестерина, NAD(P)H-зависимая стероидная дегидрогеназа, клеточное старение, подавление пролиферации.

Введение

Холестерол и его метаболизм играют существенную роль в жизни клеток растений, грибов и животных, и путь холестерольного биосинтеза сохранён в процессе эволюции от дрожжей до человека [1]. Непосредственно холестерол является важным компонентом клеточной мембраны, участвуя в формировании микродоменов липидного бислоя плазматической мембраны, обогащённых гликофинголипидами и холестеролом и играющих важную роль в процессах клеточной сигнализации, регулируя различные функции, такие как апоптоз, клеточная пролиферация, адгезия, миграция и др. [1, 2]. Изменение уровня холестерина в липидных микродоменах приводит к их разрушению и деактивации ассоциированных с ними белков [2]. Воздействие на состав и структуру липидных микродоменов, приводящее к подавлению клеточного роста и пролиферации и к индукции апоптоза, было положено в основу попыток создания ряда противоопухолевых химиотерапевтических препаратов [3–6].

Кроме того, холестерол и изопреноидные метаболиты ранних этапов холестерольного биосинтеза служат предшественниками соединений, играющих важную роль как на клеточном, так и на организменном уровнях. Среди таких соединений можно выделить стероидные гормоны и желчные кислоты; изопентил тРНК, необходимую для белкового синтеза; долихол, участвующий в N-гликозилировании белков; убиквинон и гем А – кофакторы ферментов дыхательной цепи в митохондриях; а также фарнезилные и геранилгеранильные

лиганды, участвующие в созревании некоторых ключевых белков и закоривании их в клеточной мембране [7–9].

В процессе метаболизма холестерол и его производные могут превращаться в оксистеролы, которые, в свою очередь, также играют важную роль в жизни клетки, в частности, благодаря способности связываться с орфановыми ядерными рецепторами, как, например, с рецептором LXR α [10]. Такие ядерные рецепторы, функционирующие как транскрипционные факторы, регулируют экспрессию генов-мишеней, влияя, таким образом, как на метаболические, так и на сигнальные пути в клетке [11, 12].

Нарушения биосинтеза холестерола, вызванные генетическими изменениями, могут приводить либо к серьёзным отклонениям в развитии организма, либо, в худшем случае, даже к летальному исходу в эмбриогенезе [13]. Так, например, ряд мутаций в генах стерольного синтеза в растениях приводит к нарушению их развития и роста [14]. Дефекты холестерольного биосинтеза в человеческом организме являются причиной таких заболеваний развития, как синдром Смита – Лемли – Опитца (SLOS), латостеролоз, десмостеролоз, а также других связанных с X-хромосомой заболеваний [13].

Нужно отметить, что повышенный липидный синтез, в дополнение к усиленному метаболизму глюкозы и глутамина, является характерной чертой метаболического перепрограммирования опухолевых клеток [15]. Активно пролиферирующие опухолевые клетки обладают обычно повышенной потребностью в холестероле, что объясняет активацию как биосинтеза холестерола *de novo* [16, 17], так и потребления холестерола извне [18].

Незаменимая роль холестерола и его метаболитов, а также зависимость клеток, особенно опухолевых, от целостности его гомеостаза делают метаболизм холестерола привлекательной мишенью в создании противоопухолевых препаратов [19, 20]. Такая стратегия воздействия на биосинтез холестерола в клетке была успешно использована в работе Сухановой и др. [20], где было показано, что потеря ферментов холестерольного биосинтеза NSDHL и SC4MOL повышает чувствительность ряда опухолевых клеток к ингибиторам рецептора эпидермального фактора роста EGFR, нарушая внутриклеточный везикулярный транспорт и сигнальную активность EGFR и влияя на скорость его деградации. NSDHL – β -гидроксистерол дегидрогеназа, или декарбоксилаза, – фермент, кодируемый геном *NSDHL* (NAD(P)H-зависимая стероидная дегидрогеназа). NSDHL участвует в последовательных реакциях отщепления двух C-4-метильных групп от предшественника холестерола на постскваленовом этапе [7]. Известно, что мутации в этом гене вызывают развитие синдрома CHILD (от англ. *congenital hemidysplasia with ichthyosiform nevus and limb defects* – врождённая гемидисплазия с ихтиозиформной эритродермией и дефектами конечностей). Это заболевание связано с X-хромосомой, является летальным в мужских организмах и характеризуется унилатеральными ихтиозиформными кожными повреждениями и редукцией конечностей [21]. Впервые такие мутации были определены в мышинном гене [22]. Они получили название *Bpa* (от англ. *bare patches* – проплешины), так как у гетерозиготных самок мышей, несущих *Bpa*-мутацию, на 5–7-й день постнатального развития появляются гиперкератозные кожные повреждения, обуславливающие «полосатый» (из-за проплешин) фенотип волосяного

покрова, соответствующий рандомной инактивации X-хромосомы [22]. Было показано, что отсутствие NSDHL препятствует нормальному развитию волосяных фолликулов и подавляет пролиферацию в кератиноцитах кожи [23].

В настоящей работе мы продолжили изучение эффектов удаления NSDHL на модели мышинных эмбриональных фибробластов. Мы доказали, что выключение этого фермента способствует развитию клеточного старения и прекращению деления клеток. Более того, добавление экстраклеточного холестерина не спасает клетки от старения, что говорит об уникальной роли метаболитов именно фермента NSDHL в развитии наблюдаемых эффектов. Полученные данные способствуют развитию стратегии индукции клеточного старения посредством ингибирования NSDHL в опухолевых клетках. Такая стратегия, приводящая к старению, а затем и к смерти клеток опухоли путём аутофагии или апоптоза может быть использована в лечении онкологических заболеваний.

1. Материалы и методы

1.1. Получение первичной культуры мышинных эмбриональных фибробластов. Для получения мышинных эмбриональных фибробластов (МЭФ) были использованы мыши с аллелем *NSDHL^{flx5}*, любезно предоставленные доктором Гейл Херман (G.E. Herman) (Исследовательский институт при Общенациональном детском госпитале, г. Колумбус, США). Мыши содержались в стерильных условиях, свободных от патогенов в Питомнике Онкологического центра «Фокс Чейз» (г. Филадельфия, США), одобренном Комитетом по содержанию и использованию лабораторных животных (IACUC).

Генотипирование мышей проводилось методом полимеразно-цепной реакции (ПЦР), описанной в п. 2.4.

МЭФ были получены стандартным методом из мышинных эмбрионов на 13.5-й день развития [24]. Вкратце опишем процесс получения. Эмбрионы на 13.5-й день развития были извлечены из утробы матери в стерильных условиях в ламинарном шкафу. Голова и зачатки внутренних органов эмбрионов были удалены и использованы для последующего генотипирования. Оставшаяся часть эмбриона была гомогенизирована при помощи хирургического скальпеля до состояния мелких тканевых остатков и обработана 0.25%-ным раствором трипсина с ЭДТА в течение 30 мин в атмосфере 5%-ного CO₂ при 37 °C. Полученный гомогенат далее был ресуспендирован в ростовой среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС), L-глутамин и 1% пенициллина-стрептомицина. Суспензии дали отстояться в течение 3–5 мин для осаждения крупных кластеров неразрушенной ткани. Супернатант с суспензией клеток был собран в отдельные чистые пробирки и отцентрифугирован на скорости 900 g в течение 5 мин. Полученный осадок, содержащий клетки, был посажен на матрас для культивирования клеток в ростовой среде DMEM, содержащей 10% ЭБС, L-глутамин и 1% пенициллина-стрептомицина. В результате получали культуру прикреплённых первичных клеток МЭФ.

При работе с прикреплёнными клетками для получения клеточной суспензии монослой клеток трипсинизировался 0.25%-ным раствором трипсина с ЭДТА с последующей его инактивацией добавлением среды DMEM с 10% ЭБС. Клетки затем осаждались центрифугированием на скорости 900 g в течение

5 мин. Определение жизнеспособности и подсчет плотности клеток производили после окраски клеток 0.4%-ным раствором трипанового синего при помощи камеры Горяева под оптическим микроскопом. Расчет количества клеток проводился по формуле:

$$N = \frac{(a-b)}{2} \cdot 10^4, \quad (1)$$

где N – количество клеток на 1 мл объема клеточной суспензии, a – общее количество клеток в четырёх квадратах камеры, b – количество синих клеток.

1.2. Окрашивание клеток на β -галактозидазу, связанную со старением.

Окрашивание клеток на β -галактозидазу, экспрессируемую при старении клеток, проводили при помощи набора реагентов Senescence beta – Galactosidase Staining Kit (Cell Signaling, #9860S) по инструкции производителя. Вкратце, клетки сажали в культуральные 6-луночные планшеты на покровные стёкла в концентрации 10^5 клеток на лунку в 2 мл среды DMEM, содержащей 10% ЭБС, с добавлением пенициллина-стрептомицина и L-глутамина. Инкубировали клетки в течение 24 ч при 37°C в атмосфере 5% CO_2 . По истечении времени инкубации покровные стёкла отмывали добавлением однократного фосфатно-солевого буфера (ФСБ) и фиксировали в растворе из набора в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем повторно отмывали клетки однократным ФСБ. Субстрат β -галактозидазы – X-gal (входил в состав набора) – готовили в соответствии с инструкцией по стандартному методу [25]. Раствор субстрата наносили на покровное стекло и инкубировали в течение 12 ч при температуре 37°C . В результате реакции клетки, экспрессирующие β -галактозидазу, приобретали голубой цвет благодаря продукту реакции фермента с субстратом. По окончании инкубации покровные стёкла ополаскивали дистиллированной водой и помещали на предметные стёкла в среду для заливки гистологических срезов (Molecular Probes, #P36935). Экспрессию β -галактозидазы оценивали по количеству голубых клеток при помощи оптического микроскопа и выражали как процент окрашенных клеток от общего количества клеток.

1.3. Анализ уровня экспрессии белков методом Вестерн-блота. Для анализа уровня экспрессии белков методом Вестерн-блота использовали клеточные лизаты, полученные нижеописанным образом. Клетки, посаженные на 6-луночный планшет, помещали на лёд для остановки всех внутриклеточных процессов и отмывали два раза в однократном ФСБ. Этот и все последующие этапы проводили при температуре 4°C . Клетки лизировали в буфере RIPA с добавлением ингибиторов протеаз и фосфатаз (из расчёта 60 мкл буфера на лунку 6-луночного планшета). Разрушенные клетки соскабливали пластиковым скребком для клеток и полученные лизаты помещали в пробирки и центрифугировали для осаждения неразрушенных клеток со скоростью 13000 g в течение 30 мин. Полученные супернатанты собирали в чистые пробирки. Концентрацию белка в лизатах определяли по методу Лоури [26]. Затем выравнивали концентрацию образцов добавлением лизирующего буфера до концентрации наиболее разбавленного. После этого лизаты кипятили в растворе 2%-ного додецилсульфата

натрия (SDS) в течение 10 мин для полной денатурации белков. Далее образцы разгоняли методом электрофореза в градиентном (4–12%) полиакриламидном геле при напряжении 120 В. С геля белки переносили на поливинилиденфторидную (PVDF) мембрану методом электроблоттинга при напряжении 30 В в течение 10 ч. Мембрану с белками блокировали в течение 1 ч в блокирующем буфере Odyssey (LI-COR, #927-40000). После этого мембрану инкубировали с первичными антителами (антитела против p16^{INK4A} (Santa Cruz, sc-1207), α -тубулина (Cell Signaling, #3873S) и NSDHL (Proteintech Group, #15111-1-AP), разведёнными в блокирующем буфере в конечной концентрации 100 нг/мл, в течение 12 ч при 4 °С. Мембрану отмывали в однократном трис-боратном буфере, содержащем 0.05% Твин-20 (TBS-T) три раза по 5 мин и в течение 1 ч инкубировали с вторичными антителами, мечеными флуоресцентной меткой (LI-COR, #926-68070, #926-32211), разведёнными в концентрации 1 мкг/мл в блокирующем буфере. По окончании инкубации мембраны отмывали три раза по 5 мин в TBS-T. Белки визуализировали сканированием с детекцией флуоресценции на сканере Licor Odyssey Scanner.

1.4. Анализ генетического материала методом ПЦР. Для генотипирования мышей, а также для анализа уровня генетической реаранжировки *NSDHL*^{flx5} использовали метод ПЦР. Реакцию проводили при помощи смеси для ПЦР GoTaq Green Master Mix (Promega) в соответствии с инструкцией производителя с использованием следующих праймеров:

Прямой праймер: 5' gtg cta ctg tag act gaa cc 3'.

Обратный праймер: 5' gtg tcc ttg caa tct cag tg 3'.

Результат: дикий тип – 977 п.н.; экзон 5, фланкированный *loxP*-сайтами – 1106 п.н. и продукт вырезания экзона 5 – 271 п.н.

Для определения ПЦР-продуктов проводили электрофорез в агарозном геле (2%) при 120 В в течение 1 ч. ДНК визуализировали при помощи бромистого этидия в ультрафиолетовом свете на приборе FluorChemE (Cell Biosciences).

2. Результаты и их обсуждение

2.1. Повышение уровня маркера старения p16^{INK4A} и β -галактозидазы, связанной со старением (β -ГАСС) в NSDHL-дефицитных *Vra* МЭФ. Клеточное старение может быть вызвано разными причинами, например постепенным укорочением теломер [27], изменением условий окружающей среды [28], активацией онкогенов в клетке [29], потерей опухолевых супрессоров [30]. Основными сигнальными путями, вовлеченными в процесс старения, являются p53- и p^{16INK4A}-RB-сигнальные пути. Чтобы исследовать, как потеря NSDHL влияет на развитие фенотипа старения в клетках фибробластов, мы изучили уровень экспрессии биомаркера старения p16^{INK4A} в этих клетках. Белок p16^{INK4A} ингибирует циклин-зависимые киназы CDK2/6 и, препятствуя, таким образом, фосфорилированию ретинобластомы (RB), способствует остановке клеточного цикла в G1 фазе [31]. Уровень p16^{INK4A} существенно повышается в стареющих клетках, и, соответственно, p16^{INK4A} может служить биомаркером клеточного старения [32]. Для эксперимента были использованы мышинные фибробласты, полученные из генно-модифицированных NSDHL-дефицитных мышей *Vra* (*Vare*

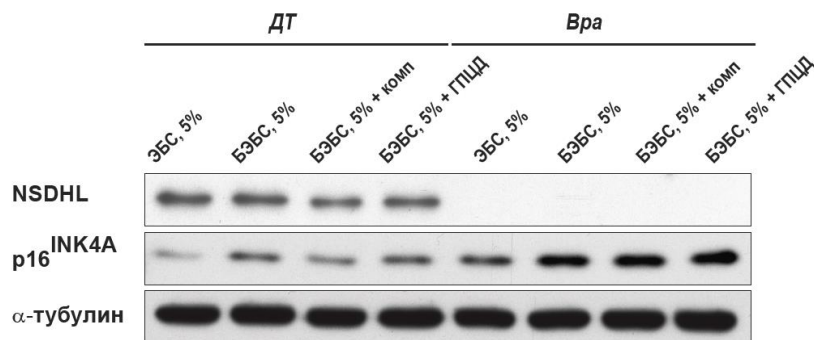


Рис. 1. Повышение экспрессии $p16^{\text{INK4A}}$ в NSDHL-дефицитных (*Bra*) МЭФ по сравнению с МЭФ дикого типа (ДТ). Клетки сажали в среде DMEM с 10% ЭБС. Через сутки заменяли старую среду на свежую DMEM, содержащую соответственно 5% ЭБС, 5% БЭБС, 5% БЭБС с 10 μM компактином (комп) или 5% БЭБС с 1% ГПЦД. Через 4 ч для ГПЦД и через 24 ч для остальных условий клеточные лизаты собирали и анализировали экспрессию белков методом Вестерн-блота. В качестве контроля загрузки белка использовали α -тубулин

patches) доктором Г. Херман и любезно предоставленные нашей лаборатории [22]. Фибробласты первичной культуры с нормальным уровнем NSDHL (дикого типа – ДТ) претерпевают процесс постепенного старения и экспрессируют маркер старения $p16^{\text{INK4A}}$ [31]. Мы показали, однако, что потеря NSDHL вызывает более интенсивную экспрессию $p16^{\text{INK4A}}$ в первичных фибробластах, что говорит о более выраженном клеточном старении (рис. 1). При этом эффект усиливался, если фибробласты находились в безлипидных условиях, вызывающих повышенную метаболическую активность холестерольного пути (безлипидная эмбриональная бычья сыворотка – БЭБС, ингибирование HMG-CoA-редуктазы (фермент начального этапа биосинтеза холестерина) компактином (комп) и связывание мембранного холестерина 2-гидроксипропил- β -циклодекстрином – ГПЦД).

Другим важным показателем старения клеток является повышенная экспрессия фермента β -галактозидазы, связанной со старением (β -ГАСС) [32]. β -ГАСС – лизосомная гидролаза – фермент, проявляющий активность в стареющих клетках при pH 6.0. Было показано, что интенсивность экспрессии β -ГАСС увеличивается в стареющих клетках *in vivo* и *in vitro* [33]. Для определения уровня экспрессии β -ГАСС в NSDHL-дефицитных клетках была использована первичная культура МЭФ, полученных из мышей с генным нокином *Nsdhl*^{*flx5*} [34]. В клетках таких мышей экзон 5 гена *Nsdhl* фланкирован *loxP*-сайтами рекомбинации. В обычных условиях это не мешает клеткам экспрессировать нормальный уровень функционального фермента. Введение в клетки фермента Cre-рекомбиназы посредством инфекции клеток вирусом, кодирующим этот фермент, приводит к тому, что Cre-рекомбиназа, узнавая *loxP*-сайты, «вырезает» выделенный ими экзон 5 гена *Nsdhl*. Это создаёт сдвиг рамки считывания и остановку экспрессии белка NSDHL [34]. Полученная культура первичных МЭФ была инфицирована вирусом, кодирующим Cre-рекомбиназу или GFP- ('green fluorescent protein' – зелёный флуоресцирующий белок) кодирующим контрольным вирусом. Рекомбинация *Nsdhl* была подтверждена с помощью реакции ПЦР (рис. 2, а, б).

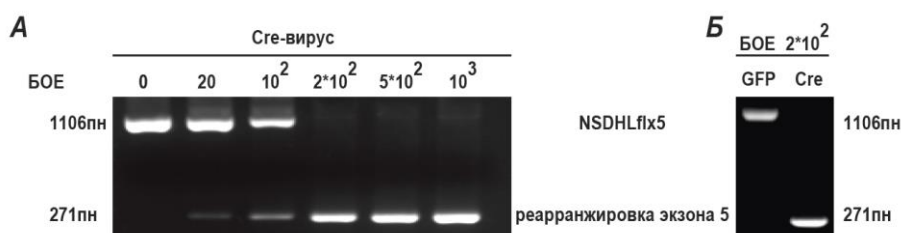


Рис. 2. Анализ генетической реаранжировки *Nsdhl*^{flx5} методом ПЦР: а) титрование вируса, кодирующего Cre-рекомбиназу, в клетках МЭФ; б) реаранжировка гена при инфекции клеток МЭФ вирусом, кодирующим Cre-рекомбиназу, при факторе множественности инфекции $2 \cdot 10^2$ БОЕ. БОЕ – бляшкообразующие единицы; пн – пары нуклеотидов

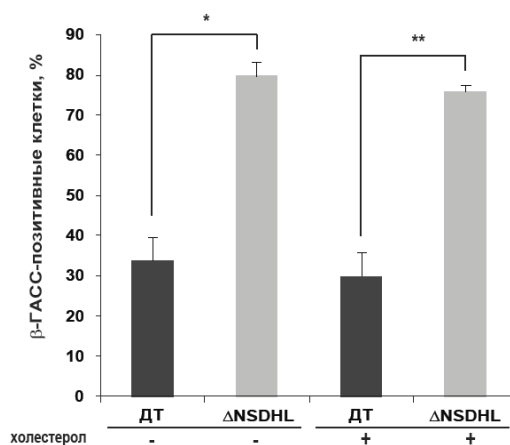


Рис. 3. Увеличение количества β-ГАСС-позитивных клеток МЭФ при удалении NSDHL (ΔNSDHL). Сохранение эффекта при добавлении 20 мкг/мл экстраклеточного холестерина, растворённого в среде DMEM при помощи 0.1% метил-β-циклодекстрина. ДТ – дикий тип; * $p = 0.0286$, ** $p = 0.0189$ (статистический критерий Манна – Уитни)

Подсчёт количества β-ГАСС-положительных МЭФ на 8-м пересеве клеток показал, что удаление NSDHL в клетках способствует более высокой частоте экспрессии этого маркера старения (рис. 3). Полученные результаты свидетельствуют о более высокой скорости старения МЭФ при отсутствии NSDHL.

2.2. Добавление экстраклеточного холестерина не спасает NSDHL-дефицитные МЭФ от ускоренного развития клеточного старения. Несмотря на то что холестерол играет важную роль в жизнедеятельности клетки, ранее в работе Сухановой и др. [20] было показано, что причиной эффектов, наблюдаемых при блокировании NSDHL, является именно накопление метаболитов этого фермента, а не только уменьшение уровня синтезируемого клеткой холестерина. Нами было подтверждено, что именно удаление NSDHL способствует развитию клеточного старения и этот эффект не может быть предотвращён с помощью добавления холестерина извне. Для этого были использованы клетки МЭФ с генным нокином *Nsdhl*^{flx5}, описанные ранее [34]. В течение 48 ч клетки инкубировались в бессывороточной (а значит, и безлипидной) среде, а затем добавлялся холестерол, растворённый в среде в виде комплексов с метил-β-циклодекстрином.

Мы показали, что количество клеток, экспрессирующих маркер старения β -ГАСС, не изменяется и остаётся большим в клетках с удалённым белком NSDHL даже после добавления внеклеточного холестерина (рис. 3).

2.3. Замедление пролиферации МЭФ при удалении фермента NSDHL.

Известно, что одной из главных характеристик клеточного старения является остановка клеточного цикла и, как следствие, подавление пролиферации клеток [32]. Принимая во внимание полученные ранее данные о том, что удаление NSDHL способствует проявлению клетками маркеров старения β -ГАСС и p16^{INK4A} в клетках МЭФ, мы исследовали, как удаление NSDHL влияет непосредственно на уровень пролиферации фибробластов. Для эксперимента были использованы клетки МЭФ с генным нокином *Nsdhl*^{flx5}, описанные ранее. Подсчёт клеток на 10 последовательных этапах пересевов показал, что клетки, в которых произошло удаление NSDHL вследствие рекомбинации после инфицирования клеток вирусом, кодирующим Cre-рекомбиназу, пролиферируют медленнее, чем клетки с нормальным уровнем экспрессии NSDHL (рис. 4).

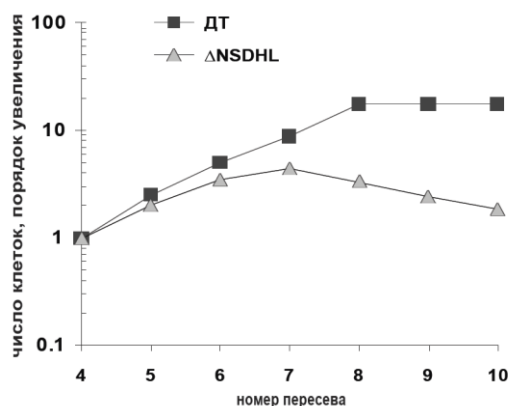


Рис. 4. Уменьшение скорости пролиферации клеток МЭФ при удалении NSDHL (Δ NSDHL) в сравнении со скоростью клеток дикого типа (ДТ)

Таким образом, нами было показано, что удаление фермента NSDHL в клетках МЭФ способствует развитию клеточного старения и наблюдаемые эффекты являются следствием накопления уникальных метаболитов этого фермента и не могут быть устранены добавлением конечного продукта холестерина *in vivo*.

Литература

1. Murai T. Cholesterol lowering: role in cancer prevention and treatment // Biol. Chem. – 2015. – V. 396, No 1. – P. 1–11. – doi: 10.1515/hsz-2014-0194.
2. George K.S., Wu S. Lipid raft: A floating island of death or survival // Toxicol. Appl. Pharmacol. – 2012. – V. 259, No 3. – P. 311–319. – doi: 10.1016/j.taap.2012.01.007.
3. Gajate C., Gonzalez-Camacho F., Mollinedo F. Involvement of raft aggregates enriched in Fas/CD95 death-inducing signaling complex in the antileukemic action of edelfosine in Jurkat cells // PLoS ONE. – 2009. – V. 4, No 4. – Art. e5044, P. 1–10. – doi: 10.1371/journal.pone.0005044.

4. *Gajate C., Mollinedo F.* Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH(3) (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells // *Curr. Drug Metab.* – 2002. – V. 3, No 5. – P. 491–525.
5. *Reis-Sobreiro M., Roue G., Moros A., Gajate C., de la Iglesia-Vicente J., Colomer D., Mollinedo F.* Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma // *Blood Cancer J.* – 2013. – V. 3. – Art. e118, P. 1–18. – doi: 10.1038/bcj.2013.15.
6. *Reis-Sobreiro M., Gajate C., Mollinedo F.* Involvement of mitochondria and recruitment of Fas/CD95 signaling in lipid rafts in resveratrol-mediated antimyeloma and antileukemia actions // *Oncogene.* – 2009. – V. 28, No 36. – P. 3221–3234. – doi: 10.1038/onc.2009.183.
7. *Caldas H., Herman G.E.* NSDHL, an enzyme involved in cholesterol biosynthesis, traffics through the Golgi and accumulates on ER membranes and on the surface of lipid droplets // *Hum. Mol. Genet.* – 2003. – V. 12, No 22. – P. 2981–2991.
8. *Pikuleva I., Waterman M.* Cytochromes P450 in synthesis of steroid hormones, bile acids, vitamin D3 and cholesterol // *Mol. Aspects Med.* – 1999. – V. 20, No 1–2. – P. 33–42.
9. *Ahearn I.M., Haigis K., Bar-Sagi D., Phillips M.R.* Regulating the regulator: post-translational modification of RAS // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2011. – V. 13, No 1. – P. 39–51. – doi: 10.1038/nrm3255.
10. *Hong C., Tontonoz P.* Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery // *Nat. Rev. Drug Discov.* – 2014. – V. 13, No 6. – P. 433–444. – doi: 10.1038/nrd4280.
11. *Bensinger S.J., Bradley M.N., Joseph S.B., Zelcer N., Janssen E.M., Hausner M.A., Shih R., Parks J.S., Edwards P.A., Jamieson B.D., Tontonoz P.* LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response // *Cell.* – 2008. – V. 134, No 1. – P. 97–111. – doi: 10.1016/j.cell.2008.04.052.
12. *Traversari C., Sozzani S., Steffensen K.R., Russo V.* LXR-dependent and -independent effects of oxysterols on immunity and tumor growth // *Eur. J. Immunol.* – 2014. – V. 44, No 7. – P. 1896–1903. – doi: 10.1002/eji.201344292.
13. *Porter F.D., Herman G.E.* Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis // *J. Lipid Res.* – 2011. – V. 52, No 1. – P. 6–34. – doi: 10.1194/jlr.R009548.
14. *Souter M., Topping J., Pullen M., Friml J., Palme K., Hackett R., Grierson D., Lindsey K.* *hydra* Mutants of *Arabidopsis* are defective in sterol profiles and auxin and ethylene signaling // *Plant cell.* – 2002. – V. 14, No 5. – P. 1017–1031.
15. *Hirsch H.A., Iliopoulos D., Joshi A., Zhang Y., Jaeger S.A., Bulyk M., Tschlis P.N., Shirley Liu X., Struhl K.* A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases // *Cancer cell.* – 2010. – V. 17, No 4. – P. 348–361. – doi: 10.1016/j.ccr.2010.01.022.
16. *Pitroda S.P., Khodarev N.N., Beckett M.A., Kufe D.W., Weichselbaum R.R.* MUC1-induced alterations in a lipid metabolic gene network predict response of human breast cancers to tamoxifen treatment // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009. – V. 106, No 14. – P. 5837–5841. – doi: 10.1073/pnas.0812029106.
17. *Silvente-Poirot S., Poirot M.* Cancer. Cholesterol and cancer, in the balance // *Science.* – 2014. – V. 343. – P. 1445–1446. – doi: 10.1126/science.1252787.
18. *Guo D., Reinitz F., Youssef M., Hong C., Nathanson D., Akhavan D., Kuga D., Amzajerdi A.N., Soto H., Zhu S., Babic I., Tanaka K., Dang J., Iwanami A., Gini B., Dejesus J., Lisiero D.D., Huang T.T., Prins R.M., Wen P.Y., Robins H.I., Prados M.D., Deangelis L.M., Mellinshoff I.K., Mehta M.P., James C.D., Chakravarti A., Cloughesy T.F., Tontonoz P., Mischel P.S.* An LXR agonist promotes glioblastoma cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway // *Cancer Discov.* – 2011. – V. 1, No 5. – P. 442–456. – doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0102.

19. Huang C., Freter C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – V. 16, No 1. – P. 924–949. – doi: 10.3390/ijms16010924.
20. Sukhanova A., Gorin A., Serebriiskii I.G., Gabitova L., Zheng H., Restifo D., Egleston B.L., Cunningham D., Bagnyukova T., Liu H., Nikonova A., Adams G.P., Zhou Y., Yang D.H., Mehra R., Burtmess B., Cai K.Q., Klein-Szanto A., Kratz L.E., Kelley R.I., Weiner L.M., Herman G.E., Golemis E.A., Astsaturov I. Targeting C4-demethylating genes in the cholesterol pathway sensitizes cancer cells to EGF receptor inhibitors via increased EGF receptor degradation // *Cancer Discov.* – 2013. – V. 3, No 1. – P. 96–111. – doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0031.
21. König A., Happle R., Bornholdt D., Engel H., Grzeschik K.H. Mutations in the NSDHL gene, encoding a 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, cause CHILD syndrome // *Am. J. Med. Genet.* – 2000. – V. 90, No 4. – P. 339–346.
22. Liu X.Y., Dangel A.W., Kelley R.I., Zhao W., Denny P., Botcherby M., Cattanach B., Peters J., Hunsicker P.R., Mallon A.M., Strivens M.A., Bate R., Miller W., Rhodes M., Brown S.D., Herman G.E. The gene mutated in bare patches and striated mice encodes a novel 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase // *Nat. Genet.* – 1999. – V. 22, No 2. – P. 182–187.
23. Cunningham D., Spsychala K., McLarren K.W., Garza L.A., Boerkoel C.F., Herman G.E. Developmental expression pattern of the cholesterologenic enzyme NSDHL and negative selection of NSDHL-deficient cells in the heterozygous Bpa(1H)/+ mouse // *Mol. Genet. Metab.* – 2009. – V. 98, No 4. – P. 356–366. – doi: 10.1016/j.ymgme.2009.06.016.
24. Xu J. Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* – 2005. – Chapter 28, Unit 28.1. – doi: 10.1002/0471142727.mb2801s70.
25. Debacq-Chainiaux F., Erusalimsky J.D., Campisi J., Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo // *Nat. Protoc.* – 2009. – V. 4, No 12. – P. 1798–1806. – doi: 10.1038/nprot.2009.191.
26. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent // *J. Biol. Chem.* – 1951. – V. 193, No 1. – P. 265–275.
27. Shay J.W., Wright W.E. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase // *Carcinogenesis.* – 2005. – V. 26, No 5. – P. 867–874.
28. Sherr C.J., DePinho R.A. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? // *Cell.* – 2000. – V. 102, No 4. – P. 407–410.
29. Serrano M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D., Lowe S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a // *Cell.* – 1997. – V. 88, No 5. – P. 593–602.
30. Chen Z., Trotman L.C., Shaffer D., Lin H.K., Dotan Z.A., Niki M., Koutcher J.A., Scher H.I., Ludwig T., Gerald W., Cordon-Cardo C., Pandolfi P.P. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis // *Nature.* – 2005. – V. 436. – P. 725–730.
31. Zindy F., Quelle D.E., Roussel M.F., Sherr C.J. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging // *Oncogene.* – 1997. – V. 15, No 2. – P. 203–211.
32. Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W.J., Peeper D.S. The essence of senescence // *Genes Dev.* – 2010. – V. 24, No 22. – P. 2463–2479. – doi: 10.1101/gad.1971610.
33. Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1995. – V. 92, No 20. – P. 9363–9367.

34. *Cunningham D., DeBarber A.E., Bir N., Binkley L., Merkens L.S., Steiner R.D., Herman G.E.* Analysis of hedgehog signaling in cerebellar granule cell precursors in a conditional *Nsdhl* allele demonstrates an essential role for cholesterol in postnatal CNS development // *Hum. Mol. Genet.* – 2015. – doi: 10.1093/hmg/ddv042.

Поступила в редакцию
23.01.15

Габитова Линара Рустамовна – аспирант кафедры биохимии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия; аспирант, Онкологический центр «Фокс Чейз», г. Филадельфия, США.

E-mail: *Linara.Gabitova@fcc.edu*

Асцатуров Игорь Александрович – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник кафедры биохимии, Казанский (Приволжский) федеральный университет, г. Казань, Россия; руководитель лаборатории, Онкологический центр «Фокс Чейз», г. Филадельфия, США.

E-mail: *Igor.Astsaturov@fcc.edu*

* * *

NSDHL DEPLETION PROMOTES CELLULAR SENEESCENCE IN MOUSE EMBRYONIC FIBROBLASTS

L.R. Gabitova, I.A. Astsaturov

Abstract

Cholesterol, its derivatives, and metabolites from its biosynthesis are important components of the cell and play an essential role in many intracellular processes, including cell signaling, regulation of the cell cycle, etc. In this paper, it has been shown that depletion of the cholesterol biosynthesis pathway enzyme NSDHL (NAD(P)H-dependent steroid dehydrogenase-like) and accumulation of its metabolites lead to an increased rate of cellular senescence and reduction of proliferation in mouse embryonic fibroblasts. The phenomenon described can be useful for developing new strategies of targeting cholesterol biosynthesis pathway in cancer cells in order to increase their senescence and inhibit proliferation.

Keywords: cholesterol, cholesterol biosynthesis pathway metabolites, NAD(P)H-dependent steroid dehydrogenase-like, cellular senescence, inhibition of proliferation.

References

1. Murai T. Cholesterol lowering: role in cancer prevention and treatment. *Biol. Chem.*, 2015, vol. 396, no. 1, pp. 1–11. doi: 10.1515/hsz-2014-0194.
2. George K.S., Wu S. Lipid raft: A floating island of death or survival. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2012, vol. 259, no. 3, pp. 311–319. doi: 10.1016/j.taap.2012.01.007.
3. Gajate C., Gonzalez-Camacho F., Mollinedo F. Involvement of raft aggregates enriched in Fas/CD95 death-inducing signaling complex in the antileukemic action of edelfosine in Jurkat cells. *PLoS ONE*, 2009, vol. 4, no. 4, Art. e5044, pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0005044.
4. Gajate C., Mollinedo F. Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH(3) (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. *Curr. Drug Metab.*, 2002, vol. 3, no. 5, pp. 491–525.
5. Reis-Sobreiro M., Roue G., Moros A., Gajate C., de la Iglesia-Vicente J., Colomer D., Mollinedo F. Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Blood Cancer J.*, 2013, vol. 3, Art. e118, pp. 1–18. doi: 10.1038/bcj.2013.15.
6. Reis-Sobreiro M., Gajate C., Mollinedo F. Involvement of mitochondria and recruitment of Fas/CD95 signaling in lipid rafts in resveratrol-mediated antimyeloma and antileukemia actions. *Oncogene*, 2009, vol. 28, no. 36, pp. 3221–3234. doi: 10.1038/onc.2009.183.

7. Caldas H., Herman G.E. NSDHL, an enzyme involved in cholesterol biosynthesis, traffics through the Golgi and accumulates on ER membranes and on the surface of lipid droplets. *Hum. Mol. Genet.*, 2003, vol. 12, no. 22, pp. 2981–2991.
8. Pikuleva I., Waterman M. Cytochromes P450 in synthesis of steroid hormones, bile acids, vitamin D3 and cholesterol. *Mol. Aspects Med.*, 1999, vol. 20, nos. 1–2, pp. 33–42, 43–37.
9. Ahearn I.M., Haigis K., Bar-Sagi D., Philips M.R. Regulating the regulator: post-translational modification of RAS. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2011, vol. 13, no. 1, pp. 39–51. doi: 10.1038/nrm3255.
10. Hong C., Tontonoz P. Liver X receptors in lipid metabolism: opportunities for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery*, 2014, vol. 13, no. 6, pp. 433–444. doi: 10.1038/nrd4280.
11. Bensinger S.J., Bradley M.N., Joseph S.B., Zelcer N., Janssen E.M., Hausner M.A., Shih R., Parks J.S., Edwards P.A., Jamieson B.D., Tontonoz P. LXR signaling couples sterol metabolism to proliferation in the acquired immune response. *Cell*, 2008, vol. 134, no. 1, pp. 97–111. doi: 10.1016/j.cell.2008.04.052.
12. Traversari C., Sozzani S., Steffensen K.R., Russo V. LXR-dependent and -independent effects of oxysterols on immunity and tumor growth. *Eur. J. Immunol.*, 2014, vol. 44, no. 7, pp. 1896–1903. doi: 10.1002/eji.201344292.
13. Porter F.D., Herman G.E. Malformation syndromes caused by disorders of cholesterol synthesis. *J. Lipid Res.*, 2011, vol. 52, no. 1, pp. 6–34. doi: 10.1194/jlr.R009548.
14. Souter M., Topping J., Pullen M., Friml J., Palme K., Hackett R., Grierson D., Lindsey K. *hydra* mutants of Arabidopsis are defective in sterol profiles and auxin and ethylene signaling. *Plant Cell*, 2002, vol. 14, no. 5, pp. 1017–1031.
15. Hirsch H.A., Iliopoulos D., Joshi A., Zhang Y., Jaeger S.A., Bulyk M., Tschlis P.N., Shirley Liu X., Struhl K. A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases. *Cancer Cell*, 2010, vol. 17, no. 4, pp. 348–361. doi: 10.1016/j.ccr.2010.01.022.
16. Pitroda S.P., Khodarev N.N., Beckett M.A., Kufe D.W., Weichselbaum R.R. MUC1-induced alterations in a lipid metabolic gene network predict response of human breast cancers to tamoxifen treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, vol. 106, no. 14, pp. 5837–5841. doi: 10.1073/pnas.0812029106.
17. Silvente-Poirot S., Poirot M. Cancer. Cholesterol and cancer, in the balance. *Science*, 2014, vol. 343, pp. 1445–1446. doi: 10.1126/science.1252787.
18. Guo D., Reinitz F., Youssef M., Hong C., Nathanson D., Akhavan D., Kuga D., Amzajerdi A.N., Soto H., Zhu S., Babic I., Tanaka K., Dang J., Iwanami A., Gini B., Dejesus J., Lisiero D.D., Huang T.T., Prins R.M., Wen P.Y., Robins H.I., Prados M.D., Deangelis L.M., Mellinghoff I.K., Mehta M.P., James C.D., Chakravarti A., Cloughesy T.F., Tontonoz P., Mischel P.S. An LXR agonist promotes glioblastoma cell death through inhibition of an EGFR/AKT/SREBP-1/LDLR-dependent pathway. *Cancer Discovery*, 2011, vol. 1, no. 5, pp. 442–456. doi: 10.1158/2159-8290.CD-11-0102.
19. Huang C., Freter C. Lipid metabolism, apoptosis and cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, vol. 16, no. 1, pp. 924–949. doi: 10.3390/ijms16010924.
20. Sukhanova A., Gorin A., Serebriiskii I.G., Gabitova L., Zheng H., Restifo D., Egleston B.L., Cunningham D., Bagnyukova T., Liu H., Nikonova A., Adams G.P., Zhou Y., Yang D.H., Mehra R., Burtness B., Cai K.Q., Klein-Szanto A., Kratz L.E., Kelley R.I., Weiner L.M., Herman G.E., Golemis E.A., Astsaturov I. Targeting C4-demethylating genes in the cholesterol pathway sensitizes cancer cells to EGF receptor inhibitors via increased EGF receptor degradation. *Cancer Discovery*, 2013, vol. 3, no. 1, pp. 96–111. doi: 10.1158/2159-8290.CD-12-0031.
21. König A., Happle R., Bornholdt D., Engel H., Grzeschik K.H. Mutations in the NSDHL gene, encoding a 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, cause CHILD syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, 2000, vol. 90, no. 4, pp. 339–346.
22. Liu X.Y., Dangel A.W., Kelley R.I., Zhao W., Denny P., Botcherby M., Cattanaach B., Peters J., Hunsicker P.R., Mallon A.M., Strivens M.A., Bate R., Miller W., Rhodes M., Brown S.D., Herman G.E. The gene mutated in bare patches and striated mice encodes a novel 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Nat. Genet.*, 1999, vol. 22, no. 2, pp. 182–187.
23. Cunningham D., Spychala K., McLarren K.W., Garza L.A., Boerkoel C.F., Herman G.E. Developmental expression pattern of the cholesterologenic enzyme NSDHL and negative selection of NSDHL-deficient cells in the heterozygous Bpa(1H)/+ mouse. *Mol. Genet. Metab.*, 2009, vol. 98, no. 4, pp. 356–366. doi: 10.1016/j.ymgme.2009.06.016.

24. Xu J. Preparation, culture, and immortalization of mouse embryonic fibroblasts. *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 2005, chap. 28, unit 28.1. doi: 10.1002/0471142727.mb2801s70.
25. Debacq-Chainiaux F., Erusalimsky J.D., Campisi J., Toussaint O. Protocols to detect senescence-associated beta-galactosidase (SA-beta-gal) activity, a biomarker of senescent cells in culture and in vivo. *Nat. Protoc.* 2009, vol. 4, no. 12, pp. 1798–1806. doi: 10.1038/nprot.2009.191.
26. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 1951, vol. 193, no. 1, pp. 265–275.
27. Shay J.W., Wright W.E. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*, 2005, vol. 26, no. 5, pp. 867–874.
28. Sherr C.J., DePinho R.A. Cellular senescence: mitotic clock or culture shock? *Cell*, 2000, vol. 102, no. 4, pp. 407–410.
29. Serrano M., Lin A.W., McCurrach M.E., Beach D., Lowe S.W. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell*, 1997, vol. 88, no. 5, pp. 593–602.
30. Chen Z., Trotman L.C., Shaffer D., Lin H.K., Dotan Z.A., Niki M., Koutcher J.A., Scher H.I., Ludwig T., Gerald W., Cordon-Cardo C., Pandolfi P.P. Crucial role of p53-dependent cellular senescence in suppression of Pten-deficient tumorigenesis. *Nature*, 2005, vol. 436, pp. 725–730.
31. Zindy F., Quelle D.E., Roussel M.F., Sherr C.J. Expression of the p16INK4a tumor suppressor versus other INK4 family members during mouse development and aging. *Oncogene*, 1997, vol. 15, no. 2, pp. 203–211.
32. Kuilman T., Michaloglou C., Mooi W.J., Peeper D.S. The essence of senescence. *Genes Dev.*, 2010, vol. 24, no. 22, pp. 2463–2479. doi: 10.1101/gad.1971610.
33. Dimri G.P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E.E., Linskens M., Rubelj I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1995, vol. 92, no. 20, pp. 9363–9367.
34. Cunningham D., DeBarber A.E., Bir N., Binkley L., Merkens L.S., Steiner R.D., Herman G.E. Analysis of hedgehog signaling in cerebellar granule cell precursors in a conditional *Nsdhl* allele demonstrates an essential role for cholesterol in postnatal CNS development. *Hum. Mol. Genet.*, 2015. doi: 10.1093/hmg/ddv042.

Received
January 23, 2015

Gabitova Linara Rustamovna – PhD Student, Department of Biochemistry, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia; PhD Student, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA.

E-mail: Linara.Gabitova@fcc.edu

Astsaturov Igor Aleksandrovich – PhD in Medicine, Leading Research Fellow, Department of Biochemistry, Institute of Fundamental Medicine and Biology, Kazan Federal University, Kazan, Russia; Head of the Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA.

E-mail: Igor.Astsaturov@fcc.edu