

Изучение механизмов некроптоза опухолевых клеток под действием цитотоксических лимфоцитов, активированных белком Tag7.

Научный руководитель – Яшин Денис Владимирович

Калинкина Л.М.¹, Шарпова Т.Н.¹, Яшин Д.В.²

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра вирусологии, Москва, Россия; 2 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Физический факультет, Кафедра биофизики, Москва, Россия

Программируемая клеточная смерть (ПКС) играет важную роль в элиминации опухолевых клеток. На данный момент известно два типа ПКС: апоптоз и некроптоз, запускаемые через рецепторы смерти (Fas-рецептор, TNFR1 и TRAIL). Апоптоз является преобладающим способом уничтожения дефектных клеток. Однако в опухолевых клетках данный процесс часто блокируется из-за мутаций. В таких случаях может реализовываться элиминация опухолевых клеток путем некроптоза. В нашей лаборатории было показано, что под действием лимфоцитов, активированных белком врожденного иммунитета Tag7, в HLA-негативных клетках K562 и Molt4 запускается некроптоз. Исследование его механизмов ведется в основном при активации рецептора TNFR1, в то время как в нашей системе впервые показана активация некроптоза через Fas-рецептор. Сигнальные пути некроптоза могут сильно отличаться в разных типах клеток и их изучение является важной задачей клеточной биологии.

Эксперименты проводились на линии клеток K562 эритромиелоидного лейкоза человека. Инкубация клеток K562 в течении 24 ч. с Tag7-активированными лимфоцитами, вызывала некроптоз. Цитотоксичность измерялась с помощью красителя трипанового синего.

Для подтверждения того, что некроптоз осуществляется через Fas-рецептор, перед добавлением Tag7-активированных лимфоцитов клетки K562 в течении 1 ч. инкубировали с антителами к Fas-рецептору и FasL. В результате блокировалась цитотоксическая активность лимфоцитов.

Для выявления основных участников некроптоза использовались следующие ингибиторы: некростатин-1, некрсульфонамид, хелатирующий агент ЭГТА, ингибитор кальпаина, хлороквин, ингибитор катепсина В и пепстатин А (ингибитор катепсина D), ионол и песох-2. Перед добавлением Tag7-активированных лимфоцитов клетки K562 в течении 1 ч. инкубировали с ингибиторами. В результате было показано подавление некроптоза. Ингибиторный анализ позволил определить следующую последовательность сигнальных механизмов: после активации Fas-рецептора происходит фосфорилирование и активация RIP1 киназы. Данный фермент взаимодействует с RIP3 киназой, образуя комплекс (некросома), который фосфорилирует белки-мишени. Например, mixed lineage kinase domain like pseudokinase (MLKL), активность которой приводит к повышению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} . В результате в цитоплазме активируется Ca^{2+} -зависимый фермент кальпаин. Активированный кальпаин встраивается в лизосомальную мембрану и приводит к выбросу лизосомальных протеаз (катепсинов) в цитоплазму. Катепсины В и D участвуют в нарушении целостности митохондриальной мембраны, что приводит к повышению концентрации АФК в цитоплазме и последующей клеточной смерти.

Таким образом, благодаря ингибиторному анализу установлены ключевые молекулы, участвующие в некроптозе.