

## МЕХАНИЗМЫ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОГО ДЕЙСТВИЯ ИНГИБИТОРОВ ДЕАЦЕТИЛАЗ ГИСТОНОВ НА ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ МЫШИ

© И. А. Чуйкин,<sup>1</sup> М. С. Лянгузова, В. А. Поспелов

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

<sup>1</sup> электронный адрес: chuykin79@mail.ru

Недифференцированные эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мыши характеризуются высокой скоростью пролиферации в культуре и неспособностью реализовать долговременные блоки клеточного цикла после действия ДНК-повреждающих агентов. Ингибиторы активности гистондеацетилаз (HDAC) способны модулировать баланс ацетилирования нуклеосомных гистонов и других белков и тем самым изменять уровень транскрипции генов, кодирующих как негативные, так и позитивные регуляторы клеточного цикла. В работе показано, что ингибиторы HDAC трихостатин А (TSA) и бутират натрия (NaBut) подавляют рост популяции ЭСК мыши и образование клонов. Антипролиферативное действие TSA и NaBut выражается в индукции блока клеточного цикла, и это сопровождается подавлением транскрипции позитивных регуляторов пролиферации (генов *циклин D1*, *циклин A*, *c-myc*, *cdc25A* и *e2f1*) и активацией транскрипции негативного регулятора пролиферации *p21<sup>Waf1</sup>* и члена семейства KIP *p57<sup>kip</sup>*. Соответственно при действии TSA и NaBut снижается уровень транскрипции гена *e2f1* и активности транскрипционных факторов семейства E2F. При длительном (более 24 ч) действии ингибиторов HDAC клетки открепляются от подложки и затем погибают апоптотически. Несмотря на то что действие TSA и NaBut в течение 1 сут вызывает блок клеточного цикла в ЭСК мыши, при этом не наблюдается активации маркера клеточного старения SA-βGal. Подавление активности HDAC не приводит к реализации долговременных остановок пролиферации ЭСК мыши, так как индукция блока клеточного цикла инициирует в клетках программу апоптотической гибели.

**Ключевые слова:** эмбриональные стволовые клетки мыши, пролиферация, регуляторы клеточного цикла, клеточная гибель, ингибиторы гистондеацетилазы.

**Принятые сокращения:** ПААГ — полиакриламидный гель, п. о. — пары оснований, ЭСК — эмбриональные стволовые клетки, HDAC — (histone deacetylase) — деацетилаза гистонов, NaBut — бутират натрия, TSA — трихостатин А, SA-βGal (Senescence Associated β-Galactosidase) — β-галактозидаза, ассоциированная со старением.

ЭСК мыши обладают неограниченной способностью к размножению при длительном культивировании, а интенсивность их деления не зависит от внешних стимулов и ростовых факторов (Schratt et al., 2001; Малашичева и др., 2002). В то же время ЭСК мыши сохраняют плюрипотентность и стабильность генома. В настоящее время механизмы автономной пролиферации ЭСК мыши изучены мало, нет четких данных о том, какие сигнальные пути вовлечены в этот процесс. Баланс ацетилирования и деацетилирования гистонов, регулируемый группами ферментов гистонацетилтрансфераз и гистондеацетилаз (HDAC), имеет большое значение в регуляции транскрипции. Характерная для ЭСК система регуляции клеточного цикла может быть связана с постоянной активацией позитивных и подавлением негативных регуляторов клеточного цикла. Ферменты HDAC участвуют в репрессии гена *p21<sup>Waf1</sup>*, который кодирует ингибитор циклин-киназных комплексов — негативный регулятор клеточного цикла. Транскрипция гена *p21<sup>Waf1</sup>* может активироваться в результате обработки ингибиторами HDAC (Xiao et al., 1997; Burgess et al., 2000; Richon et al., 2001; Gui et al., 2004).

Ингибиторы HDAC меняют уровень ацетилирования гистонов и других белков и оказывают негативное влияние на рост клеток многих типов, вызывая в зависимости от происхождения и функционального статуса индукцию блока G<sub>1</sub>/S или G<sub>2</sub>/M клеточного цикла, дифференцировку, старение или гибель (Dokmanovic, Marks, 2005). Ингибиторы HDAC вызывают активацию и (или) репрессию большой группы генов (Peart et al., 2005). Представляет большой интерес исследовать влияние ингибиторов HDAC на пролиферацию ЭСК мыши и экспрессию позитивных и негативных регуляторов клеточного цикла.

Как было показано ранее, ЭСК мыши не способны реализовать блок клеточного цикла после действия стрессовых и ДНК-повреждающих факторов; одной из причин является низкий уровень экспрессии ингибитора циклин-киназных комплексов *p21<sup>Waf1</sup>* (Малашичева и др., 2002). ЭСК мыши не останавливаются на границе фаз G<sub>1</sub>/S при повышенной экспрессии ингибитора комплексов циклин D—CDK4,6 *p16<sup>ink4a</sup>*. *p16<sup>ink4a</sup>* необходим для реализации длительного блока клеточного цикла и защиты от клеточной гибели после воздействия ингибиторов

HDAC (Peart et al., 2003; Munro et al., 2004). Представляет большой интерес выяснить, запускают ли ингибиторы HDAC длительную остановку пролиферации и процесс старения в ЭСК мыши, которые не чувствительны к действию *p16<sup>ink4a</sup>*.

Поскольку структурные преобразования хроматина имеют большое значение для дифференцировки и трансформации клеток, в настоящей работе были изучены хроматин-зависимые механизмы регуляции клеточного цикла и пролиферации ЭСК *in vitro*. Проведено исследование влияния ингибиторов HDAC на параметры клеточного цикла и экспрессию генов, кодирующих как позитивные, так и негативные регуляторы клеточного цикла. Также оценивали жизнеспособность ЭСК мыши после воздействия ингибиторов HDAC. Поскольку при действии ингибиторов HDAC на некоторые линии клетки параллельно с остановкой пролиферации подвергаются старению (Ogryzko et al., 1996), мы также исследовали способность ингибиторов HDAC индуцировать в ЭСК мыши клеточное старение, оценивая активность маркера старения SA- $\beta$ Gal и транскрипцию гена *p16<sup>ink4a</sup>*.

### Материал и методика

**Культивирование.** ЭСК мыши линии IOUD2, любезно предоставленные P. Savatier (Лаборатория клеточной и молекулярной биологии, Лион, Франция), культивировали на пластиковых чашках Петри (Corning, США), покрытых 0.2%-ным раствором желатина (Sigma, США) в среде DMEM (Gibco BRL, США), содержащей 40 мкг/мл гентамицина, 10 % сыворотки (РАА, Австрия) и 25 ед./мл фактора LIF (Sigma, США). Дифференцировку индуцировали, рассеивая клетки в среде, не содержащей фактора LIF, через 1 сут культивирования добавляли 1 мкМ ретиноевой кислоты (All-trans retinoic acid, Sigma, США), еще через 7 сут добавляли 100 мкМ дибутирил-цАМФ (Sigma, США) и культивировали еще 2 сут. Контрольные чашки культивировали только 9 сут в присутствии ретиноевой кислоты (Strickland, 1981). В качестве ингибиторов HDAC использовали TSA и NaBut (Sigma, США).

Для изучения динамики роста популяции клетки сеяли по  $2 \cdot 10^5$  клеток на чашку (60 мм), через 1 сут добавляли ингибиторы HDAC и проводили подсчет клеток каждые 2 сут.

Для оценки клоногенной выживаемости сеяли по 500 клеток на чашку (60 мм), через 10 сут клоны фиксировали смесью 30%-ного этанола и 10%-ной уксусной кислоты с одновременным окрашиванием бриллиантовым синим, затем фотографировали.

Для подсчета плавающих и прикрепленных клеток после действия TSA клетки сеяли по 1 млн на чашку, через 1 сут добавляли TSA и проводили подсчет клеток через 1 и 2 сут.

Оценку жизнеспособности популяции проводили с помощью окраски метилтиазиолилдибензилтетразолиум бромидом (MTT; Sigma, США). Метод основан на том, что дегидрогеназы митохондрий восстанавливают желтый MTT до пурпурного формазана. Реакция происходит только в живых клетках с активными митохондриальными ферментами. Для MTT-теста клетки рассевали на 96-луночную плату, через 1 сут меняли среду и добавляли ингибиторы HDAC. Через 24 или 48 ч в каждую лунку добавляли 0.5 мг/мл MTT в PBS и инку-

бировали 1 ч при 37 °C в атмосфере 7.5 % CO<sub>2</sub>. Образовавшийся формазан экстрагировали в 0.04 М HCl на изопропанол. Оптическую плотность измеряли спектрофотометрически при длине волны 570 нм против раствора MTT в 0.04 М HCl на изопропанол. За 100 % на калибровочной прямой принимали оптическую плотность клеток, не обработанных ингибиторами HDAC.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла изучали с помощью однопараметрического анализа методом проточной цитофлуориметрии (Розанов, 1987). Клетки промывали раствором PBS, снимали с чашек раствором PBS, содержащим 0.03 % эмбриональной сыворотки, пермеабилizовывали в растворе 0.01%-ного сапонина 30 мин при 20 °C, затем добавляли РНКазу А (100 мкг/мл) и иодид пропидия (40 мкг/мл), инкубировали 15 мин при 37 °C и анализировали на проточном цитофлуориметре АТС300 (Brucker, Франция). Полученные результаты обрабатывали с помощью программы Modfit.

Анализ активации транскрипции репортерной плазмиды e2f-luc. Для получения постоянных клеточных линий плазмиду e2f-luc котрансфецировали в ЭСК мыши вместе с плазмидой pBABEneo, кодирующей ген устойчивости клеток к пуromицину под контролем промотора вируса SV40. Количественное соотношение плазмид при трансфекции было 10 : 1. Трансфекцию проводили с помощью липофектамина-2000 (Invitrogen, США). Популяцию клеток ЭСК мыши, содержащую интегрированную репортерную конструкцию, обрабатывали TSA и NaBut, затем выделяли клеточные экстракты, в которых определяли люциферазную активность с помощью специального набора (Promega, США) на люцинометре TD-20 (Turner Design, США).

Выявление активности SA- $\beta$ Gal проводили под световым микроскопом после фиксации клеток в 4%-ном формалине и последующего окрашивания в буфере, содержащем X-Gal, pH 6.0 (Dimri et al., 1995), при 37 °C в течение 1 сут.

Для выявления олигонуклеосомной фрагментации проводили выделение экстрахромосомной ДНК. Собирали все (плавающие и прикрепленные) или отдельно плавающие и прикрепленные клетки, промывали PBS, лизировали 20 мин при 4 °C в буфере, содержащем 5 мМ Трис-HCl, 0.5 % Тритона X-100 и 100 мМ ЭДТА, pH 8.0. Лизат центрифугировали 20 мин при 14 000 g. Супернатант отбирали в отдельные пробирки, в которые добавляли NaCl и РНКазу А (конечные концентрации 0.15 М и 100 мкг/мл соответственно), а затем инкубировали 1 ч при 37 °C. В пробы добавляли SDS и протеиназу К (конечные концентрации 0.5 % и 200 мкг/мл соответственно) и инкубировали 2 ч при 37 °C. Депротеинизацию проводили смесью фенола с хлороформом. Затем проводили переосаждение и промывку ДНК. ДНК растворяли в буфере TE и проводили вертикальный электрофорез в 2%-ном агарозном геле. Гель окрашивали бромистым этидием и фотографировали.

Для исследования содержания белков Oct-4, циклина D1, циклина А, p27<sup>Kip</sup> и p21<sup>Waf1</sup> и методом иммуноблотинга клеточные экстракты получали путем лизиса клеток в буфере PBS, содержащем 1 % NP-40, 0.5 % деоксихолата нартия, 0.1 % SDS, ингибиторы протеаз (1 мМ PMSF, по 10 мкг/мл пепстатина А, леупептина и апротинина) и ингибиторы фосфатаз (1 мМ ортованадата натрия, 5 мМ EGTA и 10 мМ NaF), с последующим центрифугированием. Количество белка в пробах измеряли по методу Брэдфорд (Bradford, 1976) и уравнивали про-

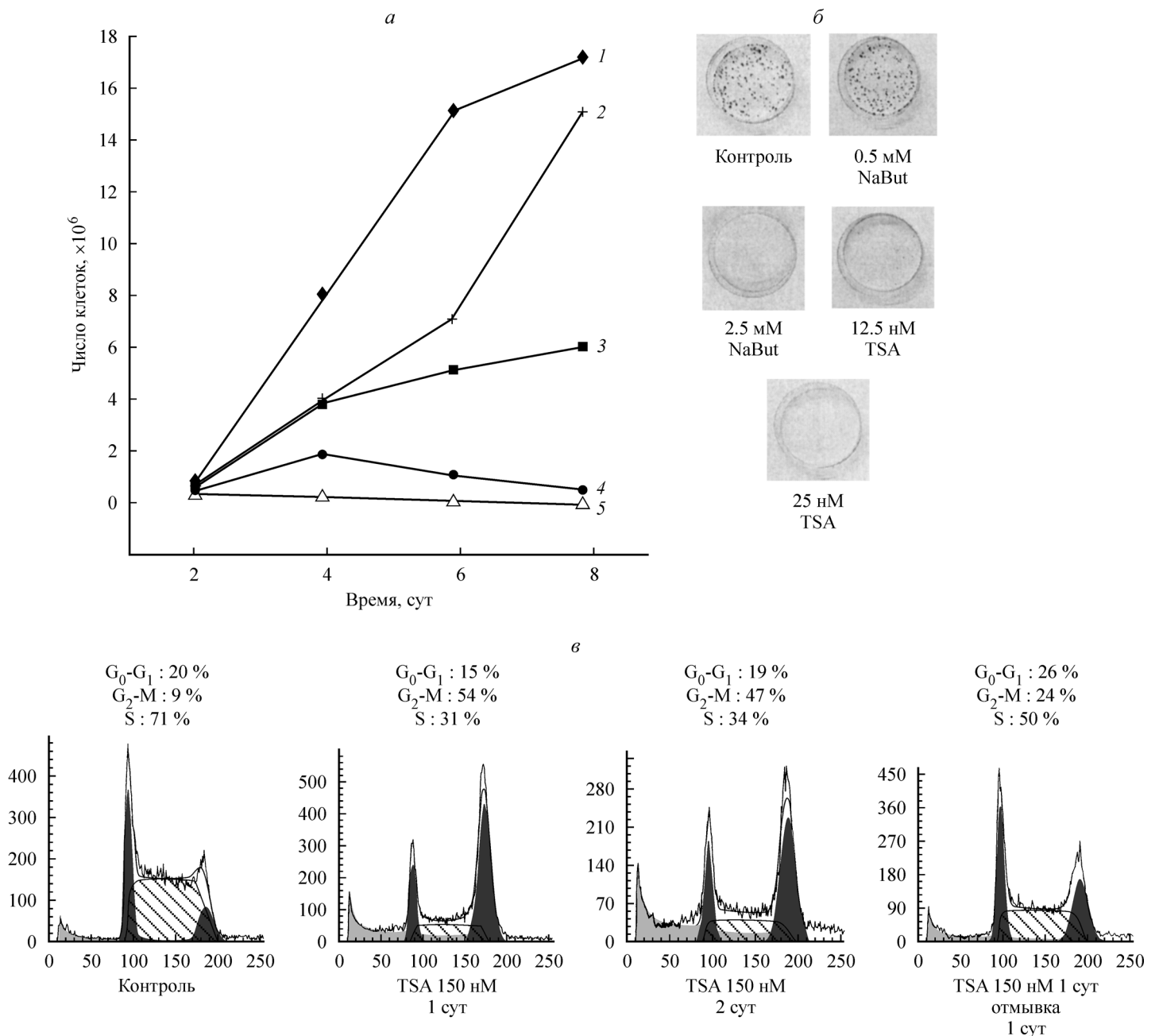


Рис. 1. Ингибиторы гистондеацетилаз (HDAC) TSA и NaBut подавляют пролиферацию ЭСК мыши.

*а* — динамика роста популяции в контроле (кривая 1) при действии 0.5 или 2.5 mM NaBut (кривые 2, 4 соответственно) и при действии 12.5 или 25 nM TSA (кривые 3, 5 соответственно); *б* — фотографии клонов клеток на чашках, образованных в среде без ингибитора и в среде, содержащей 12.5 и 25 nM TSA и 0.5 и 2.5 mM NaBut; *в* — гистограммы распределения клеток по фазам клеточного цикла в контроле и после обработки 150 nM TSA; по оси абсцисс — количество ДНК, усл. ед.; по оси ординат — число клеток.

Fig. 1. HDAC inhibitors suppress proliferation of murine ES cell line IOUD2.

*а* — population growth of cells treated with HDAC inhibitors TSA and NaBut; *б* — clonability of cells in the medium containing TSA and NaBut; *в* — cell cycle distribution of population cultivated upon normal conditions and in the presence of 150 nM TSA.

бы для электрофореза между собой по количеству белка. После диск-электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях белки из геля переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Amersham, Великобритания). В качестве первых использовали антитела к Oct-4 (кат. № sc-5279), p27<sup>Kip1</sup> (кат. № sc-1641), циклину D1 (кат. № sc-717), циклину A (кат. № sc-751) (Santa Cruz, США) и p21<sup>Waf1</sup> (кат. № Ab-3, Calbiochem, США). В качестве вторых ан-

тител использовали козы антигела против иммуноглобулинов кролика и мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена. Белки выявляли методом усиленной хемилюминесценции (ECL, Amersham, Великобритания).

Функциональную активность киназ, иммунопреципитированных антителами к CDK2 (кат. № 610145, BD Pharmingen, США), оценивали по реакции фосфорилирования гистона H1 *in vitro*. Клеточные лизаты полу-



чали после инкубации клеток на льду в течение 45 мин в лизирующем буфере (10 мМ Трис-НСl, рН 7.4, 150 мМ NaCl, 0.5 % NP-40, 1 % Тритона X-100, ингибиторы протеаз и фосфатаз) с последующим центрифугированием. Для иммунопреципитации клеточные экстракты (500—1000 мкг белка) инкубировали с антителами к CDK2 в течение 12 ч при 4 °С, полученные комплексы осаждали, инкубируя с протеин А-сефарозой 30—60 мин при 4 °С с последующим центрифугированием. Осадок использовали в киназной реакции, проводимой в буфере, содержащем 20 мМ HEPES, рН 7.9, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ MnCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, 25 мкМ немеченого АТФ, 74 кБк [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]АТФ и 1 мкг гистона H1. Реакцию проводили 15 мин при 30 °С и останавливали добавлением буфера Лэммли (50 мМ Трис-НСl, рН 6.8, 100 мМ  $\beta$ -меркаптоэтанол, 1 % додецилсульфата натрия, 0.0025 % бромфенолового синего и 10 % глицерина). Пробы кипятили 5 мин, наносили на гель и после электрофореза гель сушили и экспонировали с рентгеновской пленкой.

Тотальную клеточную РНК выделяли с помощью Trizol® (Gibco BRL, США). Реакции обратной транскрипции (РТ) и амплификации (ПЦР) проводили по протоколу, описанному ранее (Kukushkin et al., 2002). Праймеры для генов *gapdh*, *oct-4*, *циклин E*, *циклин D1*, *c-мус*, *cdc25A*, *p27<sup>kip1</sup>* и *p21<sup>Waf1</sup>* были описаны ранее (Kukushkin et al., 2002; Абрамова и др., 2003; Лянгузова и др., 2004). Последовательности использованных праймеров к генам: *p27<sup>kip2</sup>* — 5'-CCCGGACGCGAACCCGGACG-3'/5'-CGAGAGAGGCTGGTCCTTCA-3' (расчетная длина продукта 312 п. о.); *циклин A2* — 5'-GCATGAGGGCGATCCTTGTG-3'/5'-ACAGTTTGCAGGCTGCAGGTG-3' (расчетная длина продукта 355 п. о.); *p16<sup>ink4a</sup>* — 5'-CCGAACSTTTTCGGTCGTAC-3'/5'-GGGTCGCAGGTTCTTGGTCA-3' (расчетная длина продукта 280 п. о.). Температура отжига всех трех пар приведенных праймеров составляла 58 °С. Электрофорез ПЦР-продуктов с маркером молекулярной массы ДНК 100 bp-ladder (Gibco BRL, США) проводили в 2%-ном агарозном геле на буфере TBE. Денатурирующий электрофорез рибосомных РНК приведен в качестве контроля нагрузку.

### Результаты

Подавление пролиферации ЭСК мыши после действия ингибиторов HDAC. Чтобы оценить эффект ингибиторов HDAC на пролиферацию ЭСК мыши, сравнивали динамику роста популяции клеток в контроле и в присутствии различных концентраций TSA и NaBut. Оказалось, что даже небольшие концентрации ингибиторов производят сильный эффект на прирост популяции ЭСК мыши. Количество клеток на 4-е сут после посева составляло  $8 \cdot 10^6$  в контроле и уменьшалось более чем в 2 раза в клетках, обработанных 12.5 нМ TSA и 2.5 мМ NaBut ( $3.8 \cdot 10^6$  и  $1.76 \cdot 10^6$  клеток соответственно) (рис. 1, а). Ингибиторы HDAC оказывают влияние на клоногенную выживаемость клеток; в присутствии 12.5 нМ TSA и 2.5 мМ NaBut количество образуемых клонов снижается (рис. 1, б). Механизм антипролиферативного действия ингибиторов HDAC, вероятно, основан на их негативном влиянии на клеточный цикл ЭСК мыши. Поэтому методом проточной цитометрии исследовали распределение ЭСК мыши по фазам клеточного цикла. Было установлено, что при действии

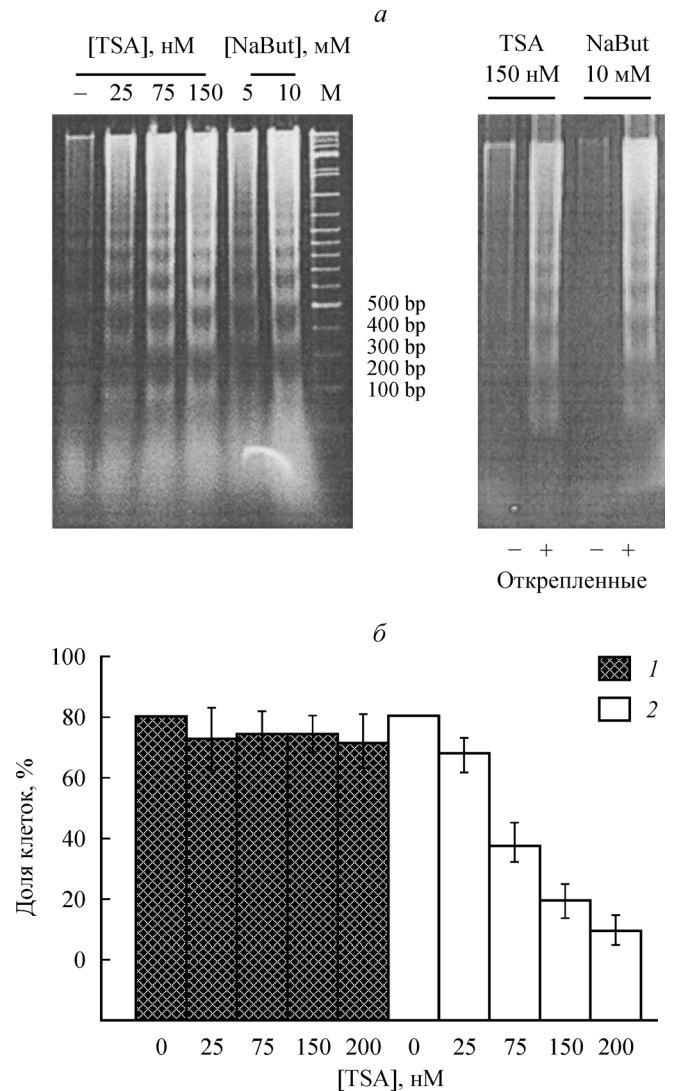


Рис. 2. Обработка ингибиторами HDAC TSA и NaBut приводит к апоптотической гибели ЭСК мыши.

а — олигонуклеосомная фрагментация ДНК в клетках через 2 сут после действия TSA и NaBut, а также в прикрепленных (–) и открепившихся (+) клетках под воздействием 150 нМ TSA или 10 мМ NaBut; б — MTT-тест клеток через 1 и 2 сут воздействия различных концентраций TSA.

Fig. 2. HDAC inhibitors induce detachment and cell death in murine ES cells.

а — DNA ladder electrophoresis of fragmented DNA from cells treated with TSA and NaBut, DNA fragmentation in attached and detached cells; б — MTT-test of cells treated with different concentrations of TSA.

TSA доля клеток в фазе S снижается с 71 до 31 %, а доля клеток, находящихся в G<sub>2</sub>-фазе, увеличивается с 9 до 54 %. Эффект TSA на клетки является обратимым, и после отмывки средой, не содержащей TSA, доля клеток в фазе S возрастает до 50 %, в то время как в фазе G<sub>2</sub> остается около 24 % клеток (рис. 1, в).

Ингибиторы HDAC вызывают гибель и открепление ЭСК мыши. Влияние ингибиторов HDAC на клеточный цикл сохраняется на 2-е сут их воздействия (рис. 1, в). Блок клеточного цикла после воздействия TSA сопровождается увеличением количества плавающих клеток, что особенно заметно на 2-е сут воздействия ингибитора. Предполагая, что открепление



Подсчет плавающих и прикрепленных клеток  
через 1 и 2 сут воздействия 150 нМ TSA

Время, сут	Число клеток, $\times 10^3$			
	контроль		150 нМ TSA	
	прикреп- ленные	плавающие	прикреп- ленные	плавающие
0	1783 $\pm$ 138	0	1783 $\pm$ 138	0
1	4967 $\pm$ 58	0	2800 $\pm$ 173	67 $\pm$ 43
2	8667 $\pm$ 2082	0	667 $\pm$ 153	137 $\pm$ 37

Примечание. Клетки сеяли по 1 млн, на следующие сут (0) добавляли TSA и проводили подсчет через 1 и 2 сут.

клеток связано с их гибелью, мы провели подсчет прикрепленных и открепившихся клеток после воздействия 150 нМ TSA. Количество прикрепленных клеток оказалось пониженным и составляло  $0.7 \cdot 10^6$  через 2 сут после воздействия TSA (в контрольной чашке количество клеток, растущих в отсутствие ингибитора, составляло  $8.7 \cdot 10^6$ ; см. таблицу). TSA существенно увеличивает долю открепленных клеток, количество которых составляет  $0.14 \cdot 10^6$  через 2 сут. Очевидно, что учтенное количество плавающих клеток не в полной мере отражает

долю погибших клеток популяции, поскольку погибшие клетки быстро распадаются на фрагменты. Наибольшая часть погибших клеток представляет собой фрагменты, которые невозможно учесть. Однако учитывая долю открепившихся клеток, можно проследить тенденцию к массовой гибели ЭСК мыши на 2-е сут после добавления TSA. В контроле плавающих клеток не наблюдается (см. таблицу). Гибель клеток после воздействия ингибиторов HDAC подтверждается анализом олигонуклеосомной фрагментации ДНК. Более того, характерная для апоптотических клеток «лесенка» на электрофореграммах отмечается именно в случае открепленных клеток (рис. 2, б), а это значит, что гибель и открепление клеток происходят практически одновременно. Чтобы оценить долю живых (метаболически активных) клеток был использован МТТ-тест, результаты которого показывают, что существенное снижение числа метаболически активных клеток происходит после 2-суточного действия TSA, причем эффект прямо зависит от концентрации TSA (рис. 2, в). В 1-е сут действия TSA эффект незначителен. Приведенные данные говорят о том, что TSA вызывает сначала остановку клеточного цикла, а затем — гибель и открепление клеток.

Ингибиторы HDAC подавляют E2F-зависимую транскрипцию генов в ЭСК мыши. Транскрипционные факторы семейства E2F регулируют транскрипцию генов, функционирующих на разных ста-

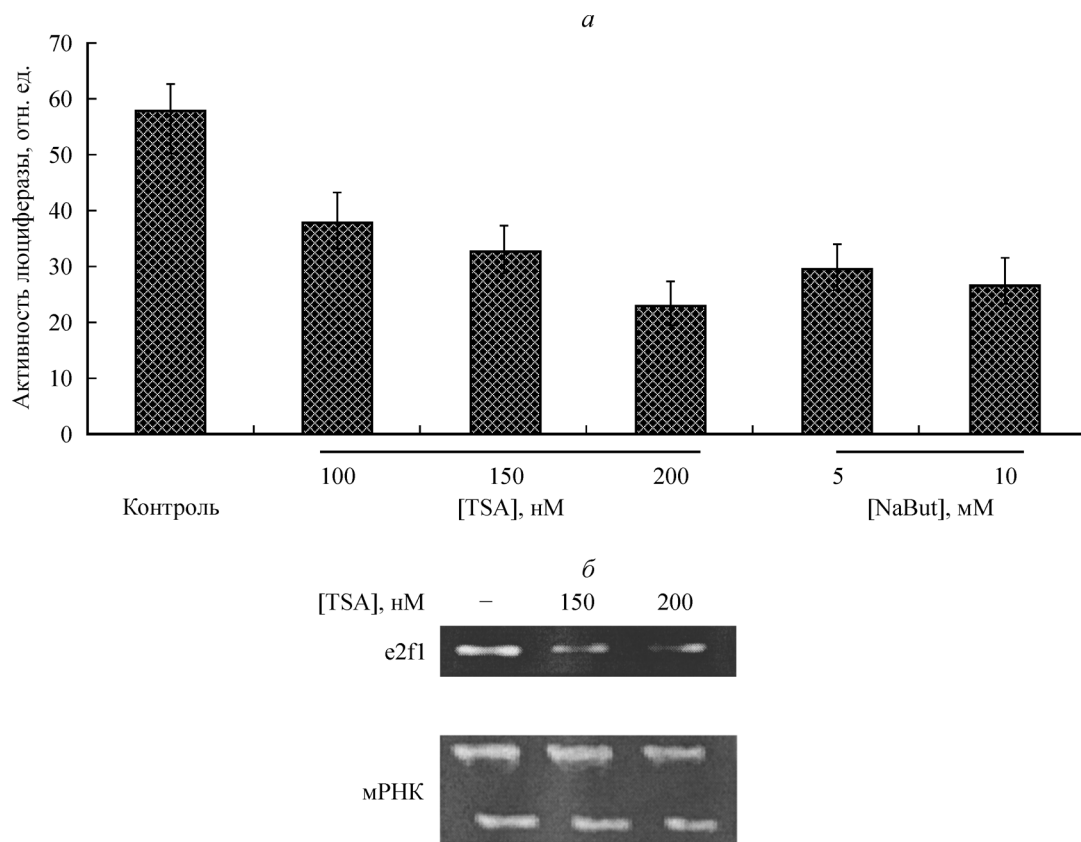


Рис. 3. Ингибиторы HDAC подавляют активность транскрипционных факторов e2F.

а — воздействие TSA и NaBut снижает активность репортерной конструкции e2f-luc; б — транскрипция гена *e2f1* методом РТ-ПЦР; денатурирующий электрофорез РНК приведен в качестве контроля нагрузки.

Fig. 3. HDAC inhibitors suppress e2f-dependent transcription.

а — activity of e2f-luc reporter construction upon treatment with TSA and NaBut; б — RT-PCR of *e2f1* gene expression.

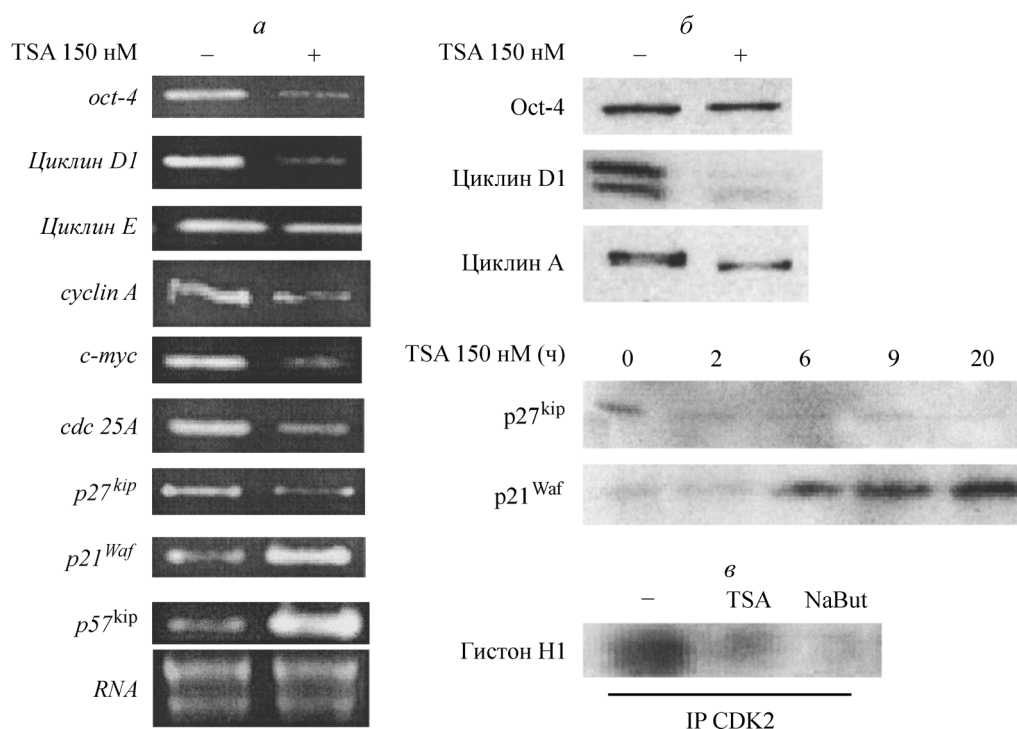


Рис. 4. Влияние ингибитора HDAC и TSA на экспрессию генов клеточного цикла.

*a* — RT-PCR-анализ генов *oct-4*, позитивных (*циклин D1*, *циклин E*, *циклин A*, *cdc25A* и *c-myc*) и негативных (*p21<sup>Waf1</sup>*, *p27<sup>kip1</sup>* и *p57<sup>kip2</sup>*) регуляторов клеточного цикла; денатурирующий электрофорез РНК приведен в качестве контроля нагрузки. *б* — Вестерн-блот-анализ экспрессии позитивных (Циклин D1 и Циклин А) и негативных (*p21<sup>Waf1</sup>* и *p57<sup>kip2</sup>*) регуляторов клеточного цикла. *в* — киназная активность *in vitro* комплексов, преципитированных антителами к CDK2.

Fig. 4. Expression of cell cycle regulators upon treatment with TSA.

*a* — RT-PCR analysis of *oct-4*, positive (*cyclin D1*, *cyclin E*, *cyclin A*, *cdc25A*, *c-myc*) and negative (*p21<sup>Waf1</sup>*, *p27<sup>kip1</sup>*, *p57<sup>kip2</sup>*) regulators of the cell cycle gene transcription; *б* — Western blot analysis of Oct-4, Cyclin D1, Cyclin A, *p21<sup>Waf1</sup>*, *p27<sup>kip1</sup>* protein level; *в* — *in vitro* kinase assay of immunocomplexes precipitated with CDK2 antibodies.

дях клеточного цикла и имеющих отношение к прогрессии G<sub>1</sub>/S. Влияние ингибиторов HDAC на клеточный цикл может быть связано с их влиянием на уровень транскрипции генов, регулируемых E2F. Была получена линия ЭСК мыши, стабильно экспрессирующая репортерную плазмиду *e2f-luc*. Оказалось, что обработка NaBut и TSA приводит к снижению активности люциферазы в популяции клеток со стабильно интегрированной репортерной конструкцией (рис. 3, *a*). Факторы E2F позитивно регулируют экспрессию гена *e2f1* (Araki et al., 2003). TSA снижает транскрипцию гена *e2f1* (рис. 3, *б*), что согласуется с подавлением активности репортерной конструкции *e2f-luc* и свидетельствует о подавлении транскрипции генов, содержащих сайты связывания E2F в промоторах после воздействия TSA и NaBut.

Обработка TSA ЭСК мыши изменяет экспрессию генов, позитивно и негативно регулирующих клеточный цикл. Чтобы выяснить механизмы влияния ингибиторов HDAC на клеточный цикл, мы сравнили экспрессию генов-регуляторов клеточного цикла до и после воздействия TSA. На рис. 4 видно, что после воздействия TSA снижается содержание позитивных регуляторов клеточного цикла *циклина D1*, *циклина A*, *c-myc* и *cdc25A* на уровне мРНК. Снижение содержания белка Oct-4, циклинов D1 и А показано с помощью иммуноблотинга (рис. 4, *б*). На уровне мРНК и белка показано увеличение экспрессии ингибитора циклин-киназных комплексов *p21<sup>Waf1</sup>*, в то время как экс-

прессия ингибитора *p27<sup>kip1</sup>* снижается (рис. 4, *a*, *б*). Возможно, индукция экспрессии *p21<sup>Waf1</sup>* является одной из причин, вызывающих блок клеточного цикла при действии TSA. Отмечено также усиление транскрипции ингибитора циклин-киназных комплексов *p57<sup>kip2</sup>* (рис. 4, *a*). Поскольку скорость прохождения по клеточному циклу коррелирует с активностью циклин-киназных комплексов, был проведен анализ киназной активности комплексов, содержащих CDK2. Выявлено, что после воздействия TSA и NaBut фосфорилирование субстрата гистона H1 CDK2-содержащими комплексами снижается (рис. 4, *в*).

Обработка ЭСК мыши ингибиторами HDAC не вызывает клеточного старения. Экспрессия маркера недифференцированных ЭСК Oct-4 снижается на уровне мРНК и белка после воздействия ингибиторов HDAC (рис. 4, *a*, *б*). Поскольку TSA и NaBut могут запускать процесс клеточного старения в некоторых клеточных линиях (Ogryzko et al., 1996), мы проверили активность маркера клеточного старения SA-βGal в ЭСК мыши, обработанных этими ингибиторами. Характерная синяя окраска клеток, свидетельствующая об активности SA-βGal, обнаруживается в дифференцированных клетках, но не видна в контрольных недифференцированных ЭСК мыши или после обработки недифференцированных ЭСК мыши 150 нМ TSA в течение 1 сут или 25 нМ TSA в течение 2 или 5 сут (рис. 5, *a*). Мы проверили транскрипцию гена, кодирующего ингибитор комплексов циклин D—CDK4 *p16<sup>ink4a</sup>*, который ак-

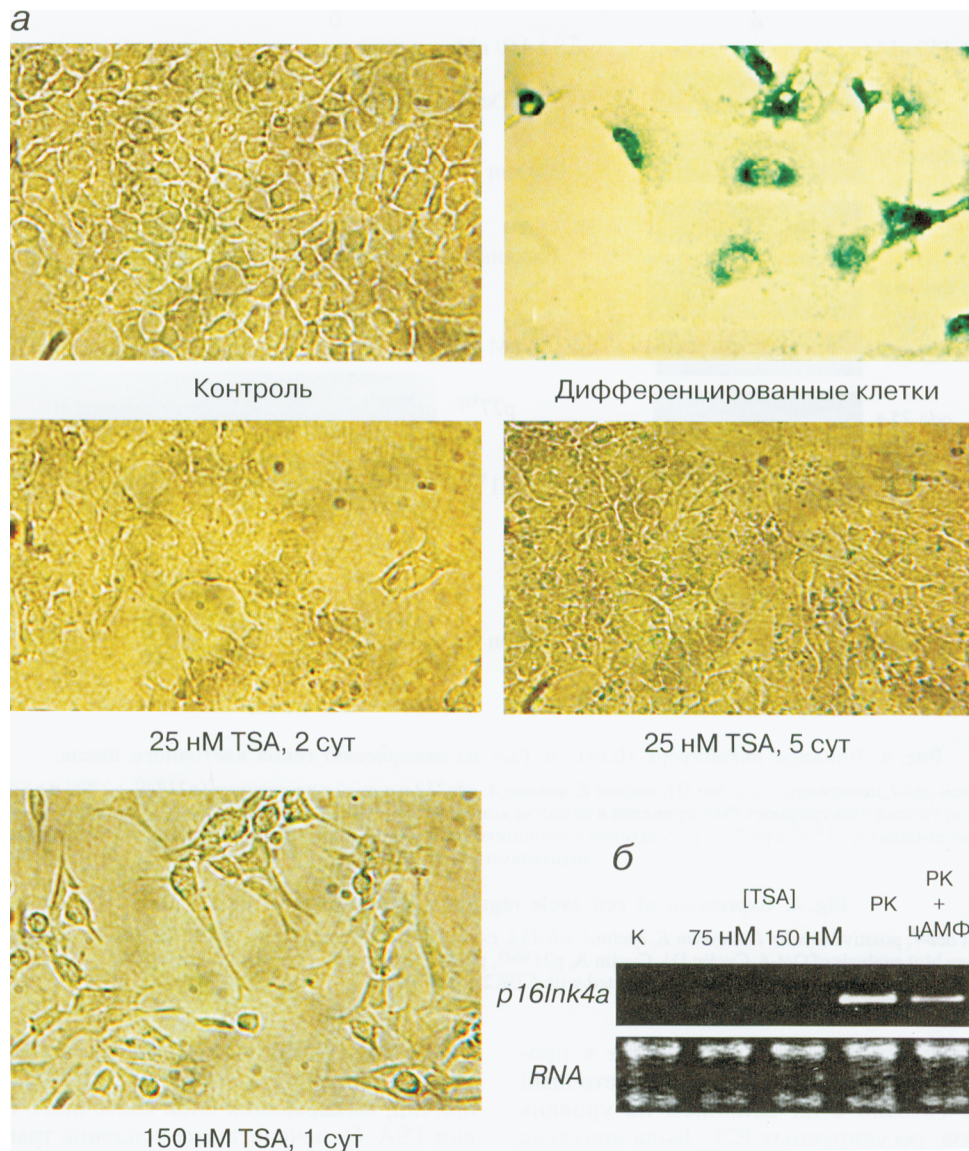


Рис. 5. Обработка ингибиторами HDAC не вызывает клеточного старения ЭСК мыши.

*a* — выявление активности SA-βGal в ЭСК мыши через 2 или 5 сут обработки 25 нМ TSA и через 1 сут обработки 150 нМ TSA; позитивный контроль — дифференцированные ЭСК мыши; фото в проходящем свете; об. 40×. *б* — RT-PCR-анализ транскрипции *p16<sup>ink4a</sup>* в ЭСК мыши через 1 сут обработки TSA и дифференцированных 9 сут в присутствии ретиноевой кислоты (РК) или ретиноевой кислоты с добавлением дибутрил-цАМФ (РК + цАМФ); К-контроль.

Fig. 5. SA-βGAL activity and *p16<sup>ink4a</sup>* expression upon treatment with HDAC inhibitors.

*a* — SA-βGal assay of cells treated with TSA, positive control — differentiated cells; *б* — RT-PCR analysis *p16<sup>ink4a</sup>* gene transcription.

тивируется в процессе клеточного старения (Munro et al., 2004). RT-PCR-анализ показал, что транскрипция *p16<sup>ink4a</sup>* усиливается при дифференцировке, вызванной ретиноевой кислотой, но не детектируется в контроле и после воздействия TSA на недифференцированные клетки (рис. 5, *б*).

### Обсуждение

Ингибиторы HDAC обладают антипролиферативным действием, вызывая длительные и кратковременные остановки клеточного цикла, старение и апоптоз в зависимости от происхождения клеточной линии и ее функционального статуса (Ogryzko et al., 1996; Peart et al.,

2003; Dokmanovic, Marks, 2005). В настоящей работе изучались антипролиферативное действие двух ингибиторов HDAC — TSA и NaBut — на ЭСК мыши, их влияние на жизнеспособность клеток, экспрессию позитивных и негативных регуляторов клеточного цикла и индукцию процесса дифференцировки.

Согласно полученным нами данным, TSA и NaBut подавляют рост популяции ЭСК мыши и снижают их клоногенную выживаемость (рис. 1, *a*, *б*). Полученные нами данные об остановке клеток на границе фаз G<sub>2</sub>/M через 1 и 2 сут действия TSA и последующая гибель ЭСК мыши совпадают с данными для ряда линий опухолевых клеток (линии HeLa и MM96L), не способных к реализации полноценной сверхочной точки в G<sub>2</sub> (Warrener et al., 2003). При отмывке клеток от TSA чистой средой через



1 сут действия агента заметна тенденция к восстановлению исходного распределения ЭСК по фазам клеточного цикла (доля S-фазных клеток вырастает с 31 до 50 %, а доля клеток G<sub>2</sub> снижается с 54 до 24 %). Обратимость влияния TSA на распределение клеток по фазам клеточного цикла может объясняться восстановлением уровня ацетилирования гистонов до исходного после удаления ингибитора (Karasawa, Okisaka, 2004).

В зависимости от исследуемой линии клеток, типа ингибитора и метода детекции воздействие ингибиторов HDAC приводит к модуляции транскрипции 10—22 % генома (Villar-Garea, Esteller, 2004; Peart et al., 2005). В настоящей работе мы исследовали влияние TSA на экспрессию регуляторов клеточного цикла на ЭСК мыши, которые, подобно опухолевым клеткам, имеют иммортальный клеточный фенотип. Подавление экспрессии позитивных регуляторов клеточного цикла после воздействия TSA согласуется с данными из литературы. Так, известно, что воздействие ингибиторов HDAC может приводить к снижению содержания гиперфосфорилированной формы белка Rb в фибробластах человека (Ogryzko et al., 1996) и, следовательно, подавлению активации транскрипционного фактора E2F. Наблюдаемое в наших экспериментах снижение E2F-зависимой транскрипции вызывает не только уменьшение содержания мРНК собственного гена *e2f1* (рис. 3, б), но и генов *циклина D1*, *циклина A2* и *cdc25A* (рис. 4), содержащих в промоторах сайты связывания E2F (Araki et al., 2003; Stevens, La Thangue, 2003). Подавление транскрипции гена *c-myc* после действия ингибиторов HDAC также согласуется с известными данными из литературы (Peart et al., 2005). Известно, что HDAC оказывают негативное влияние на транскрипцию гена ингибитора циклин-киназных комплексов *p21<sup>Waf1</sup>* и что после воздействия ингибиторов HDAC происходит его экспрессия по не зависимо от белка p53 механизм (Xiao et al., 1997). Количество белка *p21<sup>Waf1</sup>* в ЭСК мыши мало, в результате чего не происходит реализации блоков клеточного цикла при действии ДНК-повреждающих агентов (Малашичева и др., 2002). Таким образом, способность ингибиторов HDAC вызывать блок клеточного цикла коррелирует с активацией экспрессии *p21<sup>Waf1</sup>*. Согласно полученным нами данным, TSA вызывает в ЭСК мыши активацию транскрипции не только *p21<sup>Waf1</sup>*, но и другого члена семейства, *p57<sup>Kip</sup>*. Как и другие авторы (Gui et al., 2004), мы не наблюдали увеличения транскрипции еще одного ингибитора циклин-киназных комплексов — *p27<sup>Kip1</sup>* — после воздействия TSA. Более того, данные RT-PCR и Вестерн-блоттинга показывают тенденцию к снижению экспрессии *p27<sup>Kip1</sup>* на уровне и мРНК, и белка (рис. 4).

Кроме влияния на систему регуляции клеточного цикла антипролиферативное действие ингибиторов HDAC связано с индукцией гибели, которая явственно выявляется на 2-е сут воздействия TSA на ЭСК мыши с помощью МТТ-теста и подтверждается олигонуклеосомной фрагментацией ДНК в этих клетках (рис. 2). Ингибиторы HDAC влияют на транскрипцию большого спектра генов — регуляторов процессов гибели и выживания клеток; в частности, ингибиторы HDAC могут увеличивать транскрипцию проапоптотических генов *apaf-1*, *bak* и *каспазы 3* (Peart et al., 2005). Опухолевые клетки имеют большую склонность к гибели при действии ингибиторов HDAC, чем нормальные клетки. Интересно, что в фибробластах WI38, трансформированных вирусом SV40, ингибиторы HDAC стимулируют увеличение со-

держания свободных радикалов и снижение количества живых клеток, причем гибель не предотвращалась ингибиторами каспаз. Авторы связывают устойчивость к гибели WI38 с более высоким (по сравнению с трансформантами) уровнем экспрессии тиоредоксина (Ungerstedt et al., 2005).

В клетках эмбриональной карциномы мыши линии F9, близких по свойствам ЭСК мыши, ингибиторы HDAC активируют транскрипцию маркеров париетальной эндодермы цитокератина А (Miyashita et al., 1994) и активатора плазминогена (Ichikawa et al., 1984). Поскольку подавление пролиферации является одним из признаков дифференцировки, мы решили выяснить, вызывают ли ингибиторы HDAC изменение плюрипотентного статуса ЭСК мыши. После воздействия TSA экспрессия Oct-4 — маркера ЭСК — падает на уровне и мРНК, и белка. Однако длительная (более 5 сут) обработка ингибиторами HDAC даже в низких концентрациях (2.5 mM NaBut и 12.5 nM TSA) приводит к откреплению и гибели ЭСК мыши. Эти наблюдения повторяют результаты работы, выполненной на клетках ретинобластомы Y79, где воздействие TSA и NaBut вызывало изменение морфологии, а затем приводило к гибели клеток (Karasawa, Okisaka, 2004). Морфологические преобразования, вероятно, обусловлены изменением транскрипции генов, в частности гена *gelsolin*, продукт которого регулирует структуру актинового цитоскелета (Hoshikawa et al., 1994).

Поскольку TSA вызывает снижение количества Oct-4, а также блок клеточного цикла и накопление *p21<sup>Waf1</sup>* — события, наблюдаемые при клеточном старении (Ishikawa, 2003), можно ожидать, что ингибиторы HDAC будут вызывать клеточное старение в ЭСК мыши так же, как в фибробластах WI38 (Ogryzko et al., 1996). Однако в ЭСК мыши тест на активность SA-βGal не показал синего окрашивания, характерного для дифференцированных и стареющих клеток после воздействия TSA. Кроме того, ген *p16<sup>ink4a</sup>*, необходимый для старения фибробластов человека (Munro et al., 2004), не индуцируется при действии TSA, но транскрипция *p16<sup>ink4a</sup>* отмечается в клетках, дифференцированных в присутствии ретиноевой кислоты (рис. 5, б). Показано, что TSA в низкой концентрации препятствует дифференцировке в суспензии, изменяя уровень ацетилирования и метилирования гистонов (Lee et al., 2004). Экспрессия *p16<sup>ink4a</sup>* зависит от активности метилтрансфераз и может усиливаться при воздействии их ингибиторов (Coombes et al., 2003), и возможно, активация этого гена при дифференцировке связана с изменением метилирования ДНК и гистонов.

Таким образом, результаты настоящей работы показывают, что блок клеточного цикла, вызванный воздействием ингибиторов HDAC, приводит к клеточной гибели. Индукция блока клеточного цикла коррелирует с изменением экспрессии регуляторов клеточного цикла, в частности с индукцией негативного регулятора — гена *p21<sup>Waf1</sup>*, однако не сопровождается накоплением ингибиторов *p27<sup>Kip1</sup>* и *p16<sup>ink4a</sup>* и появлением активности SA-βGal — маркера клеточного старения. В то же время следует отметить, что ингибиторы HDAC вызывают изменение активности ряда сигнальных путей (Peart et al., 2005) и при подборе условий могут оказаться полезными для управления дифференцировкой ЭСК мыши. В связи с этим в дальнейшем необходимо более подробное исследование механизмов гибели ЭСК мыши после воздействия ингибиторов HDAC. Важно проанализировать, с одной стороны, их влияние на экспрессию генов, регули-

рующих апоптоз, а с другой — возникновение окислительного стресса при их действии, а также выяснить, зависит ли гибель ЭСК мышцы от активности каспаз. Эти исследования могут помочь в создании условий, при которых ингибиторы HDAC смогут быть использованы для индукции дифференцировки ЭСК мышцы.

Авторы благодарят Н. Д. Аксенова за проведение цитофлуориметрического анализа, В. В. Зенина за помощь в фотографировании клеток, А. М. Малашичеву и П. Саватьера за предоставленную линию ЭСК мышцы IOUD2.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 03-04-49377 и 06-04-49058), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и гранта CRDF (RB-2511-ST-03).

### Список литературы

- Абрамова М. В., Светликова С. Б., Аксенов Н. Д., Поспелова Т. В., Поспелов В. А. 2003. Ингибитор деацетилаз гистонов останавливает пролиферацию клеток, трансформированных онкогенами E1A и cHA-RAS. *Цитология*. 45 (11) : 1100—1108.
- Лянгузова М. С., Чуйкин И. А., Поспелов В. А. 2004. Необходимость активации Р13-киназы для пролиферации клеток эмбриональной карциномы мышцы линии F9. *Цитология*. 46 (1) : 26—34.
- Малашичева А. Б., Кислякова Т. В., Саватьер П., Поспелов В. А. 2002. Эмбриональные стволовые клетки не вступают в арест клеточного цикла под воздействием ДНК-повреждающих факторов. *Цитология*. 44 (7) : 643—648.
- Розанов Ю. М. 1987. Проточная цитометрия. Методы культивирования клеток. Л.: Наука. 136—146.
- Araki K., Nakajima Y., Eto K., Ikeda M. 2003. Distinct recruitment of E2F family members to specific E2F-binding sites mediates activation and repression of the E2F1 promoter. *Oncogene*. 22 : 7632—7641.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* 72 : 248—254.
- Burgess A. J., Pavey S., Warrener R., Hunter L. J., Piva T. J., Musgrove E. A., Saunders N., Parsons P. G., Gabrielli B. G. 2001. Up-regulation of p21 (WAF1/CIP1) by histone deacetylase inhibitors reduces their cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.* 4 : 828—837.
- Coombes M. M., Briggs K. L., Bone J. R., Clayman G. L., El-Naggar A. K., Dent S. Y. 2003. Resetting the histone code at CDKN2A in HNSCC by inhibition of DNA methylation. *Oncogene*. 22 : 8902—8911.
- 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. 1995. A novel biomarker identifies senescent human cells in culture and aging skin *in vivo*. *PNAS*. 92 : 9363—9367.
- Dokmanovic M., Marks P. A. 2005. Prospects: histone deacetylase inhibitors. *J. Cell. Biochem.* 96 : 293—304.
- Gui C. Y., Ngo L., Xu W. S., Richon V. M., Marks P. A. 2004. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21<sup>Waf1</sup> involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *PNAS*. 101 : 1241—1246.
- Hoshikawa Y., Kwon H. J., Yoshida M., Horinouchi S., Bepu T. 1994. Trichostatin A induces morphological changes and gelsolin expression by inhibiting histone deacetylase in human carcinoma cell lines. *Exp. Cell Res.* 214 : 189—197.
- Ichikawa N., Miyashita T., Nishimune Y., Matsushiro A. 1984. Production, purification and characterization of the plasminogen activator in teratocarcinoma stem cells induced with sodium butyrate. *Biken J.* 4 : 143—151.
- Ishikawa F. 2003. Cellular senescence, an unpopular yet trustworthy tumor suppressor mechanism. *Cancer Sci.* 94 : 944—947.
- Karasawa Y., Okisaka S. 2004. Inhibition of histone deacetylation by butyrate induces morphological changes in Y79 retinoblastoma cells. *Jop. J. Ophthalmol.* 48 : 542—551.
- Kukushkin A. N., Abramova M. V., Svetlikova S. B., Darieva Z. A., Pospelova T. V., Pospelov V. A. 2002. Downregulation of *c-fos* gene transcription in cells transformed by E1F and cHa-ras oncogenes: a role of sustained activation of MAP/ERK kinase cascade and of inactive chromatin structure at *c-fos* promoter. *Oncogene*. 21 : 719—730.
- Lee J., Hart S., Skalnik D. 2004. Histone deacetylase activity is required for embryonic stem cell differentiation. *Genesis*. 38 : 32—38.
- Munro J., Barr N. I., Ireland H., Morrison V., Parkinson E. K. 2004. Histone deacetylase inhibitors induce a senescence-like state in human cells by a p16-dependent mechanism that is independent of a mitotic clock. *Exp. Cell Res.* 295 : 525—538.
- Miyashita T., Yamamoto H., Nishimune Y., Nozaki M., Morita T., Matsushiro A. 1994. Activation of the mouse cytokeratin A (endo A) gene in teratocarcinoma F9 cells by the histone deacetylase inhibitor Trichostatin A. *FEBS Lett.* 353 : 225—229.
- Ogryzko V. V., Hirai T. H., Russanova V. R., Barbie D. A., Howard B. H. 1996. Human fibroblast commitment to a senescence-like state in response to histone deacetylase inhibitors is cell cycle dependent. *Mol. Cell. Biol.* 16 : 5210—5218.
- Peart M. J., Smyth G. K., van Laar R. K., Bowtell D. D., Richon V. M., Marks P. A., Holloway A. J., Johnston R. W. 2005. Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *PNAS*. 102 : 3697—3702.
- Peart M. J., Tainton K. M., Ruefli A. A., Dear A. E., Sedelies K. A., O'Reilly L. A., Waterhouse N. J., Trapani J. A., Johnston R. W. 2003. Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res.* 63 : 4460—4471.
- Richon V. M., Sandhoff T. W., Rifkind R. A., Marks P. A. 2000. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21<sup>Waf1</sup> expression and gene-associated histone acetylation. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 18 : 10 014—10 019.
- Savatier P., Lapillonne H., van Grunsven L. A., Rudkin B. B., Samarut J. 1996. Withdrawal of differentiation inhibitory activity/leukemia inhibitory factor up-regulates D-type cyclins and cyclin-dependent kinase inhibitors in mouse embryonic stem cells. *Oncogene*. 12 : 309—322.
- Schratt G., Weinhold B., Lundberg A. S., Schuck S., Berger J., Schwarz H., Weinberg R. A., Ruther U., Nordheim A. 2001. Serum response factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.* 21 : 2933—2943.
- Stevens C., La Thangue N. 2003. E2F and cell cycle control: a double-edged sword. *Arch. Biochem. Biophys.* 412 : 157—169.
- Strickland S. 1981. Mouse teratocarcinoma cells: prospects for the study of embryogenesis and neoplasia. *Cell*. 21 : 277—278.
- Villar-Garea A., Esteller G. 2004. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int. J. Cancer*. 112 : 171—178.
- Ungerstedt J. S., Sowa Y., Xu W. S., Shao Y., Dokmanovic M., Perez G., Ngo L., Holmgren A., Jiang X., Marks P. A. 2005. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *PNAS*. 102 : 673—678.
- Warrener R., Beamish H., Burgess A., Waterhouse N. J., Giles N., Fairlie D., Gabrielli B. 2003. Tumor cell-selective cytotoxicity by targeting cell cycle checkpoints. *FASEB J.* 17 : 1550—1552.
- Xiao H., Hasegawa T., Miyaishi O., Ohkusu K., Isobe K. 1997. Sodium butyrate induces NIH3T3 cells to senescence-like state and enhances promoter activity of p21<sup>Waf1</sup>/CIP1 in p53-independent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237 : 457—460.

ANTI-PROLIFERATIVE EFFECT OF HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS  
ON MURINE EMBRYONIC STEM CELLS

*I. A. Chuykin,<sup>1</sup> M. S. Lianguzova, V. A. Pospelov*

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;  
e-mail: chuykin79@mail.ru

The effect of histone deacetylase (HDAC) inhibitors trichostatin A (TSA) and sodium butyrate (NaBut) on the proliferation of murine embryonic stem cells (MESC) was studied. Both agents suppressed the population growth and clonability of MESC. Flow cytometry analysis showed a decrease in the amount of S-phase cells upon treatment with HDAC inhibitors. TSA treatment caused a decrease in mRNA level of such positive cell cycle regulators as cyclins D1, A, c-myc, cdc25A, and induced transcription of negative regulators of the cell cycle — p21<sup>Waf1</sup> and p57<sup>kip2</sup>. Also, HDAC inhibitors decreased the level of e2f-dependent transcription, with the concomitant reduction of mRNA level of e2f1 gene. HDAC inhibitors also affected the survival of MESC. A 2 day TSA treatment resulted in massive detachment and cell death, as confirmed by DNA laddering and MTT assay. Treatment with TSA for 2 and 5 days did not induce SA $\beta$ GAL, activity and p16<sup>ink4a</sup> transcription, i. e. characteristic features of senescent fibroblasts. In summary, HDAC inhibitors decrease the rate of proliferation affecting cell cycle and viability of MESC. We conclude that MESC are unable to realize a sustainable block of the cell cycle upon treatment with HDAC inhibitors.

**Key words:** murine embryonic stem cells, proliferation, histone deacetylase inhibitors.

—————