

## ДЕЙСТВИЕ ИНГИБИТОРА ГИСТОНОВЫХ ДЕАЦЕТИЛАЗ НА ТРАНСФОРМАНТЫ E1A+cHa-Ras, ЭКСПРЕССИРУЮЩИЕ p53 ДИКОГО ТИПА С ПОДАВЛЕННОЙ ТРАНСАКТИВИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТЬЮ

© Е. И. Букреева, Н. Д. Аксенов, А. А. Бардин, В. А. Поспелов, Т. В. Поспелова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: cheverd@gmail.com

В работе изучали способность ингибитора гистоновых деацетилаз (HDAC) бутирата натрия (NaB) реактивировать программу клеточного старения в трансформантах из эмбриональных фибробластов крысы (ERas<sup>WT</sup>), экспрессирующих опухолевый супрессор p53 дикого типа и в изогенной линии ERas<sup>GSE56</sup> (genetic suppression element) с подавленной трансактивирующей активностью p53. Методом временных трансфекций с использованием репортерных p53-люциферазных (p53-LUC) конструкций показано, что после рентгеновского облучения трансформантов ERas<sup>GSE56</sup> активность p53-LUC как показателя трансактивирующей функции p53 не возрастает. В трансформантах ERas<sup>WT</sup> активность p53-LUC возрастает как после облучения, так и при действии NaB, причем долговременная обработка клеток NaB, вызывающая блок клеточного цикла на границе фаз G<sub>1</sub>/S, повышает активность репортеров p53-LUC по мере удлинения срока культивирования с ингибитором HDAC. Однако экспрессия маркера старения SA-β-галактозидазы (SA-β-Gal) и подавление способности клонироваться наблюдаются независимо от блока на границе фаз G<sub>1</sub>/S клеточного цикла в трансформантах обеих клеточных линий. Полученные данные позволяют предполагать, что транскрипционная активность p53 может быть одним из решающих событий, приводящих к блоку клеточного цикла как основного маркера программы старения в опухолевых клетках при действии ингибитора HDAC бутирата натрия.

Ключевые слова: онкогены *E1A* и *cHa-ras*, трансформация, транскрипционный фактор p53, клеточное старение, ингибитор гистоновых деацетилаз, бутират натрия.

Принятые сокращения: п. н. — пара нуклеотидов, HDAC — гистоновые деацетилазы, NaB — бутират натрия, PBS — фосфатно-солевой буферный раствор, SA-β-Gal — ассоциированная со старением β-галактозидаза.

В ответ на разнообразные ДНК-повреждающие или стрессовые воздействия, а также внеплановую экспрессию онкогенов нормальные клетки останавливают прохождение по циклу и прекращают пролиферировать. Блок клеточного цикла длится до полной коррекции генетических повреждений, после чего клетки вновь могут начать пролиферировать. В случае массового поражения генетического материала включается программа апоптотической, генетически запрограммированной гибели клетки. В настоящее время установлено, что главным координатором ответа клетки на повреждения является опухолевый супрессор — ген *p53* (Harms et al., 2004; Toledo, Wahl, 2006), который как транскрипционный фактор активирует опухоль-супрессорные или проапоптотические гены, приводящие к разным ответам клетки на генотоксический стресс.

После повреждения клетки могут уходить не только в кратковременный блок, но и в необратимый блок клеточного цикла, появление которого коррелирует с определенными морфофункциональными изменениями клетки (Collado, Serrano, 2006; Zhang, 2007). Эта программа получила название ускоренного старения. Описаны различные варианты запуска программы старения в клетках млекопитающих. Как и в случае кратковременного блока клеточ-

ного цикла, старение может активироваться экспрессией онкогенов (Bartkova et al., 2006; Di Micco et al., 2006), радиационным повреждением ДНК, УФ-облучением или окислительным стрессом (Te Poele et al., 2002; Parrinello et al., 2003). Следует подчеркнуть, что многие морфологические черты и маркеры программы старения, индуцированные разными повреждениями, сходны, однако насколько одинаковы процессы, обеспечивающие их, пока сказать сложно. Многочисленные исследования показали, что и в случае активации программы старения важная роль также принадлежит опухолевому супрессору p53 (Rodier et al., 2007).

Исследования *in vivo* показали, что маркеры старения выявляются в доброкачественных опухолях (Collado et al., 2005). Это говорит о том, что старение выступает как уникальный барьер, предотвращающий размножение поврежденных клеток и клеток с нарушенным контролем за пролиферацией. Однако по мере накопления новых генетических повреждений и появления признаков злокачественности клетки с маркерами старения в опухолях пропадают (Collado et al., 2007), что говорит о необходимости супрессии программы старения при опухолевой трансформации.

При воздействии на раковые клетки различных цитостатиков и облучения удается добиться кратковременной остановки роста опухоли. Однако действие отбора приводит к размножению клеток, устойчивых к повреждающим воздействиям, и появлению в опухоли клеточных популяций, отличающихся, как правило, еще более высокой скоростью пролиферации и генетической нестабильностью. В настоящее время проблема поиска новых агентов, способных активировать программы апоптоза или вызывать необратимый блок клеточного цикла в раковых клетках, является чрезвычайно актуальной. Перспективным является применение ингибиторов гистоновых деацетилаз (HDAC), которые за счет модификации гистоновых и негистоновых белков меняют структуру хроматина, транскрипцию генов, а значит, эпигенотипические характеристики клетки. Использование ингибиторов HDAC является новым подходом в решении проблемы подавления пролиферации опухолевых клеток, особенно устойчивых к действию повреждающих агентов (Lindemann et al., 2004).

В исследованиях, посвященных изучению реактивации программы старения в опухолевых клетках, роль опухолевого супрессора p53 также далека от понимания. Показано, что p53 мутирован или делегирован более чем в половине злокачественных опухолей человека (Hamgoun et al., 2006; Petitjean et al., 2007). Описаны различные случаи p53-независимого старения *in vitro* и *in vivo* в опухолях различного гистогенеза у представителей различных видов (Aliouat-Denis et al., 2005; Coles et al., 2007; Ha et al., 2007). Последние эксперименты *in vivo* говорят в пользу того, что необратимый запуск программы клеточного старения, или апоптоза, в опухолевых клетках невозможен в отсутствие активности p53. При этом активация p53 не только блокирует рост опухоли, но может приводить к ее уменьшению (Martins et al., 2006; Ventura et al., 2007; Xue et al., 2007).

В связи с тем, что данные о роли p53 в реактивации программы старения крайне противоречивы, целью настоящей работы было изучение процесса старения в трансформантах ERas, экспрессирующих p53 дикого типа — ERas<sup>WT</sup> (Bulavin et al., 1999), и клеточной линии ERas<sup>GSE56</sup>, полученной из ERas<sup>WT</sup> путем ретровирусного переноса в векторе pLXSN вставки GSE56 (823—105 п. н.), соответствующей 275—368-му аминокислотному району белка p53 в его олигомеризующем домене (Ossovskaya et al., 1996). В этой линии белок p53 не изменен, его содержание сравнимо с уровнем p53 в родительской линии, однако после повреждения ДНК транскрипционная активность его не возрастает. Используя клетки таких линий, можно оценить роль трансактивирующей функции белка p53 в реактивации программы старения, которая в нашей работе индуцируется ингибитором HDAC бутиратом натрия (NaB).

## Материал и методика

Клеточные линии. Работа проведена на трансформантах E1A+cHa-Ras, полученных из эмбриональных фибробластов крысы, экспрессирующих белок p53 дикого типа (клетки ERas<sup>WT</sup>) и на изогенной линии, полученной путем ретровирусного переноса в векторе pLXSN вставки GSE56 с 823 по 1105 п. н., соответствующей аминокислотному району 275—368 белка p53 в его олигомеризующем домене (клетки ERas<sup>GSE56</sup>). Клетки культивиро-

вали на среде Игла в модификации Дальбекко (DMEM) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота. Клеточное старение вызывали действием NaB в концентрации 4 мМ. Процесс клеточного старения оценивали через определенные промежутки времени культивирования клеток в присутствии ингибитора HDAC.

Трансфекция и измерение люциферазной активности. Клетки линий ERas<sup>WT</sup> и ERas<sup>GSE56</sup> сеяли в 24-луночные пластины с плотностью, составляющей 70—80 % от максимальной насыщающей плотности. Для проведения трансфекции через 24 ч среду культивирования заменяли на Opti-MEM (Invitrogen, США) и клетки котрансфицировали плазмидой p53-LUC и плазмидной ДНК с геном *Renilla* под конститутивно активным промотором для контроля эффективности трансфекции в соотношении: 2 мкл Lipofectamine-2000 (Invitrogen, США), 0.8 мкг репортерной p53-LUC и 0.05 мкг ДНК с геном *Renilla*. Через 24 ч после трансфекции клетки были обработаны NaB или подвергнуты рентгеновскому облучению. Для каждого случая анализировали не менее трех лунок. Через 4 и 24 ч после воздействий клетки промывали PBS и лизировали в Passive lysis buffer (Promega, США). Люциферазную активность измеряли в соответствии с протоколом фирмы-производителя с использованием Luciferase kit (Promega, США).

Пролиферативную активность оценивали по кривым клеточного роста. Для этой цели клетки высаживали по 50 000 на чашки диаметром 30 мм. Подсчет клеток проводили через 24, 72 и 96 ч культивирования в присутствии и в отсутствие NaB, используя 3 чашки на точку. Подсчет времени удвоения клеток проводили по формуле  $t = \log_2 \cdot T / \log_2(N/n)$ , где  $T$  — время, в течение которого проводили эксперимент,  $n$  — начальное число клеток,  $N$  — конечное число клеток.

Эффективность клонирования клеток после действия NaB определяли по способности клеток формировать клоны при культивировании на обычной среде на пластиковых чашках. Для этой цели необработанные и обработанные NaB в течение 24, 72 и 120 ч клетки высевали по 200 клеток на чашку Петри диаметром 30 мм. Через 10 сут выросшие клоны окрашивали 0.4%-ным раствором кристалл-виолета, содержащим 30 % этанола и 10 % уксусной кислоты. Подсчет клонов производили на инвертированном микроскопе Leica, используя объектив с увеличением 10×.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла исследовали методом проточной цитометрии. Клетки снимали с чашек смесью растворов трипсина и версена в соотношении 1 : 1, затем осаждали 3 мин центрифугированием при 350 g и промывали PBS. Клетки инкубировали в течение 30 мин в растворе 0.01%-ного сапонина при комнатной температуре, после чего вновь промывали PBS и обрабатывали раствором РНКазы А (0.1 мг/мл в PBS) в присутствии пропидиа иодида (40 мкг/мл) в течение 15 мин при 37 °С. Анализ проводили на цитометре типа Odam (Brucker, Франция).

Выявление активности SA-β-Gal проводили по ранее описанному методу (Dimri et al., 1995). Клетки выращивали в чашках Петри на покровных стеклах, обрабатывали 4 мМ NaB в течение 120 ч, промывали PBS и фиксировали в 3%-ном формальдегиде в течение 20 мин при комнатной температуре. Для выявления активности SA-β-Gal фиксированные клетки промывали раствором PBS и инкубировали в течение 18 ч при 37 °С в растворе, содержащем 1 мг/мл 5-бром-4-хлор-3-индолил β-D-галак-

тозида (X-Gal), 40 мМ буфера, содержащего лимонную кислоту и фосфат натрия, pH 6.0, 5 мМ красной кровяной соли, 5 мМ желтой кровяной соли, 150 мМ NaCl и 2 мМ MgCl<sub>2</sub>. Анализ и фотографирование препаратов производили в проходящем свете на микроскопе Leica.

### Результаты

Для изучения роли p53 в реактивации программы NaB-индуцированного старения использовали трансформанты ERas<sup>WT</sup>, экспрессирующие опухолевый супрессор — белок p53 дикого типа (Bulavin et al., 1999) — и изогенную линию, содержащую p53 с предположительно подавленной функцией активации транскрипции (ERas<sup>GSE56</sup>), селективную в лаборатории проф. А. Гудкова (Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, США). Для анализа активности p53 как транскрипционного фактора при действии NaB использовали метод определения люциферазной активности с помощью репортеров p53-LUC, содержащих перед геном люциферазы 12 копий p53-регуляторного элемента. Люциферазную активность определяли после уравнивания проб по эффективности трансфекции, которую определяли, используя одновременное введение плазмиды с геном *Renilla*. Активность люциферазы определяли через 4 и 24 ч действия NaB, сравнивая с активностью репортеров p53-LUC после облучения. На рис. 1 видно, что активность p53 через 4 ч после облучения возрастает в трансформантах ERas<sup>WT</sup> в 6.9 раза, тогда как в линии ERas<sup>GSE56</sup> не меняется по сравнению с уровнем активности p53 в необработанных клетках. Через 24 ч после рентгеновского облучения активность p53 возвращается в клетках ERas<sup>WT</sup> к исходным значениям, что согласуется с многочисленными данными о кратковременном повышении трансактивирующих свойств p53 после действия ДНК-повреждающих агентов.

Известно, что NaB не является ДНК-повреждающим агентом, однако мы исследовали возможность вовлечения p53 как транскрипционного фактора в ответ клетки на действие ингибитора HDAC. Для этой цели обе клеточ-

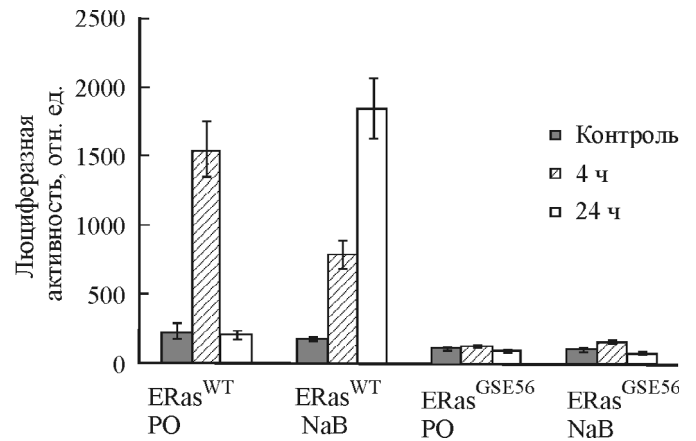


Рис. 1. Люциферазная активность в трансформантах ERas<sup>WT</sup> и изогенной линии ERas<sup>GSE56</sup> в контроле, после воздействия рентгеновского облучения (PO) или бутирата натрия (NaB) в течение 4 и 24 ч.

Доза PO 6 Гр, концентрация NaB 4 мМ. Измерение проводили на люцинометре Turner-Design 20/20.

ные линии, трансфицированные репортерами p53-LUC, обрабатывали 4 мМ NaB. Как и в случае облучения, трансактивирующую активность p53 измеряли через 4 и 24 ч после обработки клеток NaB. Обнаружено, что активность p53 в ERas<sup>WT</sup> через 4 ч возрастает в 4.5 раза по сравнению с контролем, а через 24 ч — в 10.5 раза. В сублинии ERas<sup>GSE56</sup> транскрипционная активность p53 через 4 ч незначительно возрастает относительно контроля — в 1.1 раза, а через 24 ч после обработки NaB возвращается к исходному уровню (рис. 1). Это позволяет сделать вывод о том, что активность p53 возрастает во времени по мере удлинения срока культивирования трансформантов ERas<sup>WT</sup>, экспрессирующих p53 дикого типа, в среде с NaB, тогда как у клеток ERas<sup>GSE56</sup> в этом же случае активность p53 после незначительного повышения возвращается к контрольным значениям. Обращает на себя внимание

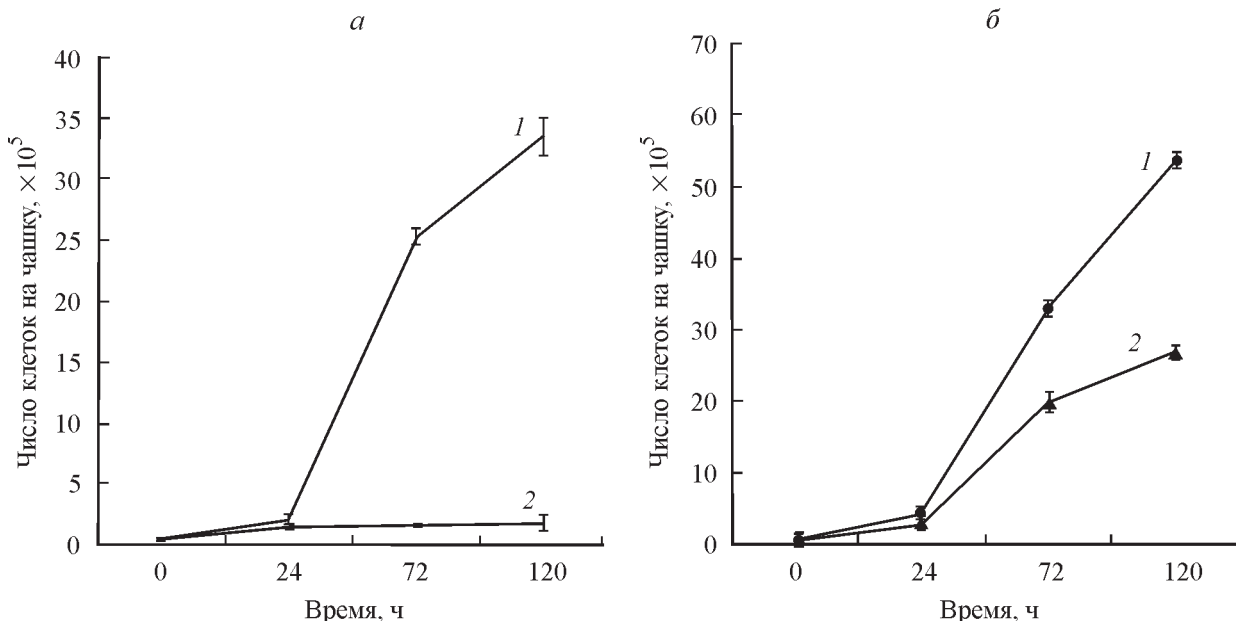


Рис. 2. Кривые роста трансформантов ERas<sup>WT</sup> (а) и изогенной линии ERas<sup>GSE56</sup> (б) в контроле (1) и при действии 4 мМ NaB (2).

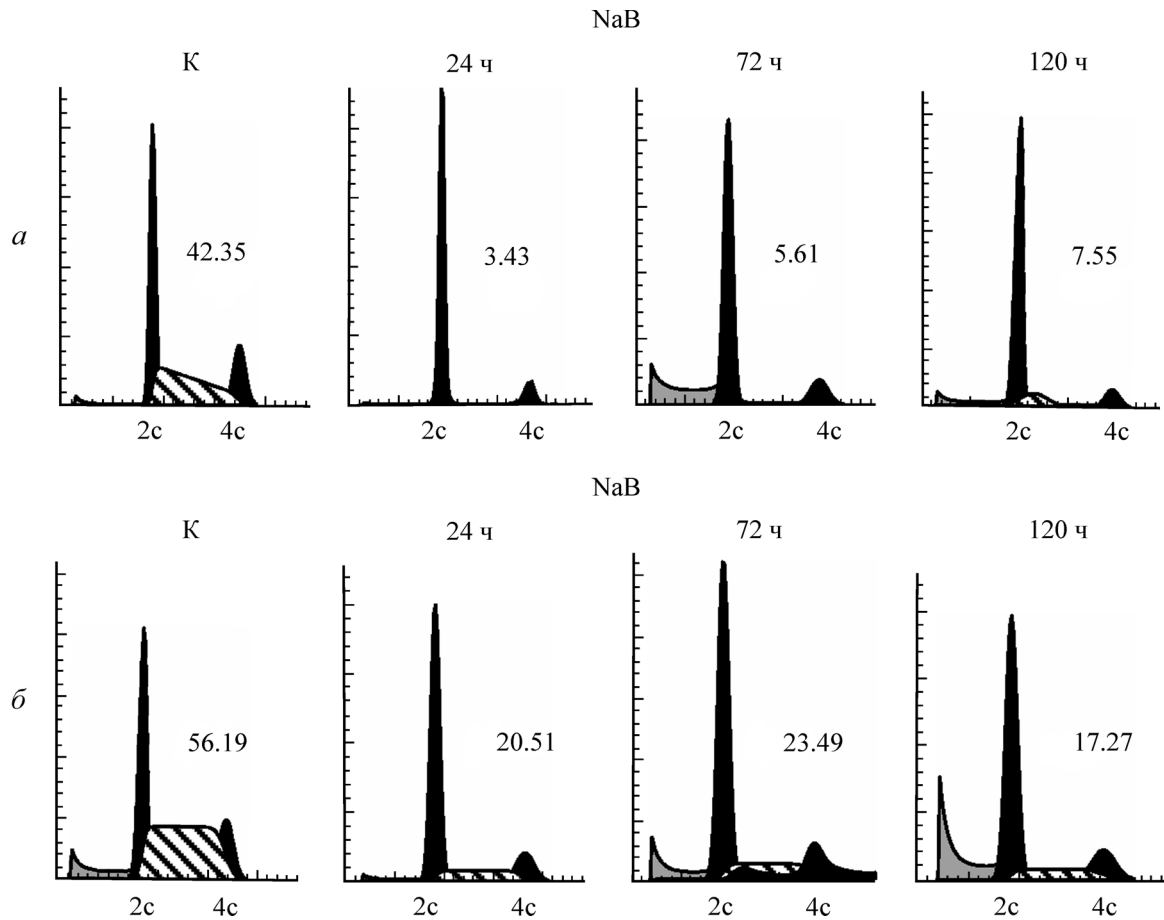


Рис. 3. Зависимость распределения клеток линии ERas<sup>WT</sup> (а) и линии ERas<sup>GSE56</sup> (б) по фазам клеточного цикла от времени действия 4 мМ NaB.

По горизонтали — содержание ДНК, ед. ploидности (с); по вертикали — число клеток. На каждой гистограмме указана доля клеток (%), находящихся в фазе S. К — контроль.

разная кинетика активации p53 при действии NaB и облучения в трансформантах дикого типа. На рис. 1 видно, что через 24 ч после облучения активность p53 в линии ERas<sup>WT</sup> возвращается к норме, тогда как после обработки NaB в течение 24 ч активность p53 возрастает в 10.5 раза, т. е. механизм обратной связи, связанный с подавлением активности p53, в данном случае работает иначе, чем после действия облучения.

Для выяснения антипролиферативного действия NaB на клеточные линии, экспрессирующие опухолевый супрессор p53 с разной транскрипционной активностью, строили кривые роста. Для этой цели клетки высевали на чашки Петри диаметром 30 мм в одинаковой плотности — по 50 000 на чашку. На следующий день добавляли NaB и подсчитывали число клеток в камере Горяева через 24, 72 и 120 ч действия ингибитора HDAC. Как видно на рис. 2, NaB эффективно подавляет пролиферацию опухолевых клеток, содержащих p53 дикого типа. Уже через 24 ч действия NaB на трансформанты ERas<sup>WT</sup> пролиферация их подавляется практически полностью, а через 5 сут число их не возрастает по сравнению с числом клеток после 24-часовой обработки NaB. В клеточной линии ERas<sup>GSE56</sup> после действия NaB пролиферативная способность снижена по сравнению с контрольными клетками, но тем не менее видно, что пролиферация не прекращается (рис. 2), так как число клеток после 5 сут действия NaB всего в 1.5 раза меньше, чем в контроле.

Время удвоения популяции клеток ERas<sup>WT</sup> в контроле составляет 17.8 ч, у ERas<sup>GSE56</sup> оно практически не отличается и составляет 17.7 ч. За 5 сут действия NaB продолжительность времени удвоения для клеток линии ERas<sup>GSE56</sup> составляет 20.7 ч, т. е. популяция за все время действия NaB удваивается в 5.8 раза.

Данные по влиянию NaB на пролиферацию трансформантов с интактным p53 и на трансформанты с подавленной транскрипционной функцией p53, полученные с помощью кривых роста, согласуются с результатами, полученными методом проточной цитометрии (рис. 3), из которых видно, что подавление пролиферации в клетках ERas<sup>WT</sup> при действии NaB связано с появлением выраженного блока клеточного цикла на границе фаз G<sub>1</sub>/S. При этом доля клеток в фазе S может снижаться до 3.43 % после 1 сут обработки клеток NaB (рис. 3). Обработка NaB клеточной линии ERas<sup>GSE56</sup> не приводит к блоку клеточного цикла (рис. 3) даже при длительной (120 ч) обработке ингибитором HDAC, что полностью согласуется с данными, полученными с помощью кривых роста (рис. 2). Полученные результаты позволяют говорить об участии p53 в активации транскрипции генов, ответственных за блок клеточного цикла G<sub>1</sub>/S и подавление пролиферации.

Для клеток с реактивированной программой ускоренного старения характерно также подавление способности пролиферировать в клональном посеве, который используется как метод количественной оценки числа клеток,

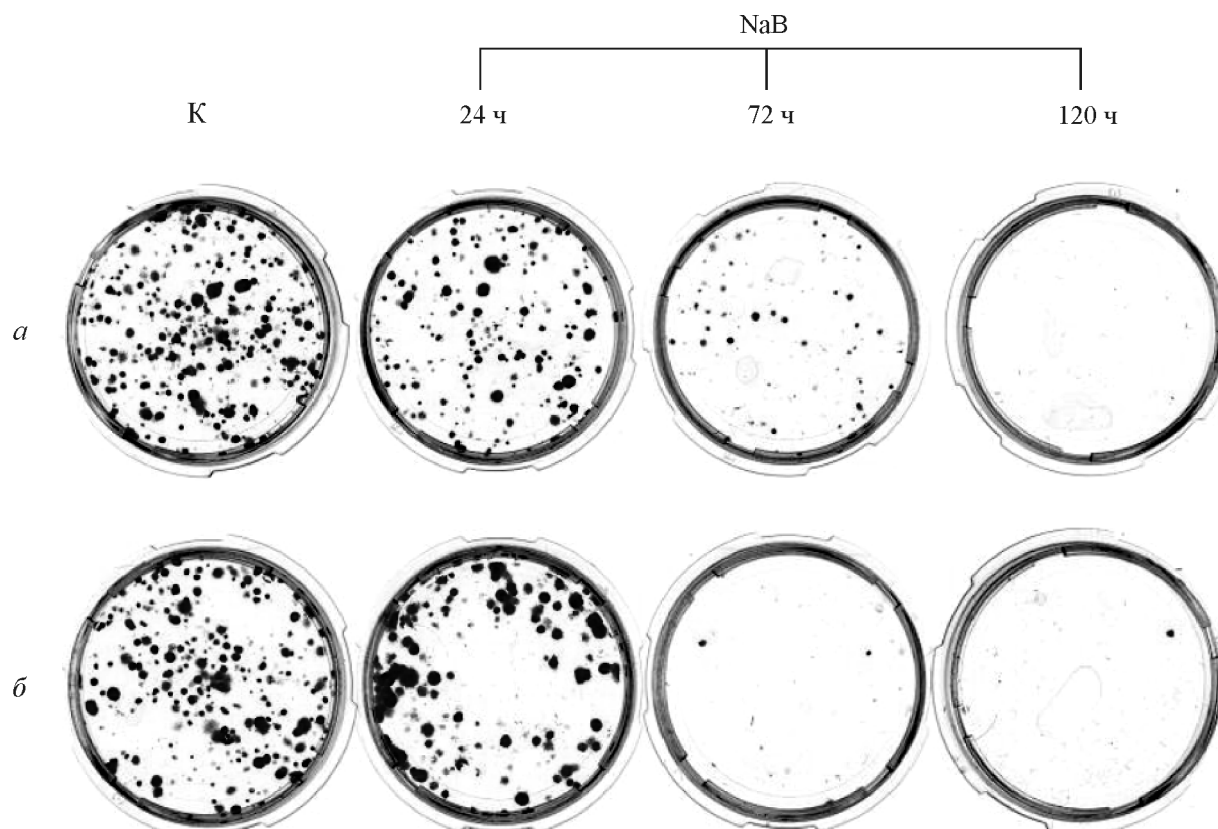


Рис. 4. Эффективность клонирования трансформантов ERas<sup>WT</sup> (а) и ERas<sup>GSE56</sup> (б) в контроле и после обработки 4 мМ NaB в течение 24, 72 и 120 ч.

Клетки культивировали в обычной среде на пластиковых чашках.

способных к пролиферации. Однако, с другой стороны, известно, что способность клонироваться является одной из характеристик трансформированного фенотипа и практически отсутствует у нормальных клеток (Blumenthal, 2005). Нами была проведена оценка эффективности клонирования трансформантов ERas<sup>WT</sup> и ERas<sup>GSE56</sup> в контроле и через разные промежутки времени после действия NaB. На рис. 4 приведены данные по эффективности клонирования после действия NaB в течение 1, 3 и 5 сут. Обнаружено, что NaB полностью подавляет клоногенную способность как клеток ERas<sup>WT</sup>, так и ERas<sup>GSE56</sup>. Эффективность клонирования трансформантов ERas<sup>WT</sup> в контроле составляет 80 %, после обработки клеток NaB в концентрации 4 мМ в течение 24 ч — 45 %, через 3 сут падает до 14 %, а через 5 сут обработки ингибитором не вырастает ни одного клона. В случае изогенной линии ERas<sup>GSE56</sup> эффективность клонирования в контроле составляет 90 %, через 1 сут действия NaB в той же концентрации эффективность клонирования — 44 %, через 3 сут — 3 %, через 5 сут — ни одного клона. Таким образом, действие NaB приводит к подавлению пролиферации в клональном посеве как у трансформантов ERas<sup>WT</sup>, прохождение которых по циклу блокировано, так и у ERas<sup>GSE56</sup>, пролиферация которых только замедлена. Известно, что нормальные фибробласты не способны клонироваться в обычных условиях культивирования на пластиковой чашке и изменение этого признака характеризует переход клеток к трансформированному фенотипу. Таким образом, подавление способности трансформированных клеток клонироваться можно рассматривать, с одной стороны, как необ-

ратимое влияние бутирата натрия на процесс пролиферации, а с другой — как фенотипическую реверсию к норме одного из признаков трансформированного фенотипа — независимость пролиферации от контактов.

Известно, что программа ускоренного клеточного старения сопровождается экспрессией маркера SA-β-Gal, а также морфологическими изменениями клетки. Повышенная экспрессия SA-β-Gal и измененный фенотип — распластывание по субстрату, вакуолизация цитоплазмы — были обнаружены после обработки NaB в течение 5 сут и в ERas<sup>WT</sup>, и в ERas<sup>GSE56</sup> (рис. 5), несмотря на то что в клетках ERas<sup>GSE56</sup> блок клеточного цикла на границе фаз G<sub>1</sub>/S как одна из главных характеристик программы клеточного старения не выявляется. Это говорит о том, что экспрессия SA-β-Gal и изменение морфологии не являются достаточными маркерами фенотипа стареющих клеток, для которых характерен полный блок клеточного цикла и пролиферации, как это происходит в случае ERas<sup>WT</sup>. Мы обнаружили, что эти «маркеры» видны в трансформантах ERas<sup>GSE56</sup>, у которых нет полного подавления пролиферации и нет выраженного блока клеточного цикла.

## Обсуждение

Данные о роли опухолевого супрессора — белка p53 в регуляции процесса клеточного старения и апоптоза далеки от полного понимания. Ряд авторов склоняется к мнению о том, что антипролиферативный и апоптотический ответы клетки на действие ДНК-повреждающих агентов и

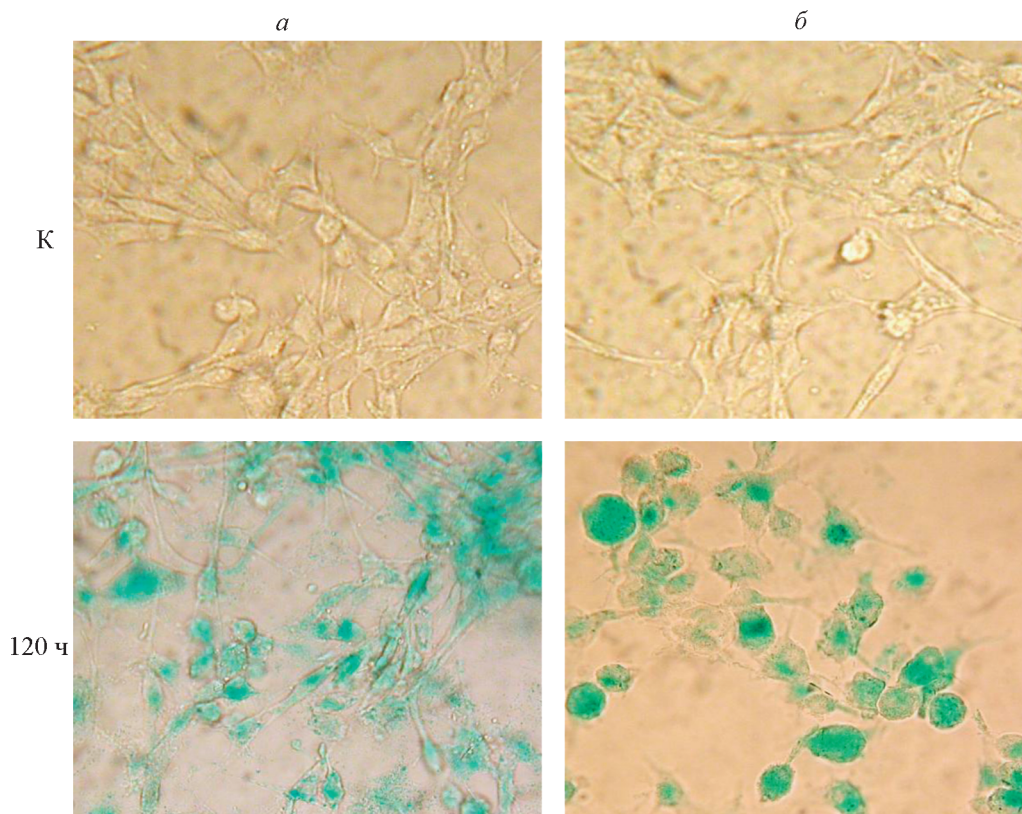


Рис. 5. Активность ассоциированной со старением  $\beta$ -галактозидазы (голубой цвет) в трансформантах ERas<sup>WT</sup> (а) и ERas<sup>GSE56</sup> (б) в контроле (К) и после действия 4 мМ NaB в течение 120 ч.

ингибиторов HDAC обусловлены повышением транскриптивной функции p53. Показано, что в клеточных линиях и опухолях, не содержащих p53 или экспрессирующих мутантный p53, запуск программ ускоренного клеточного старения и апоптоза невозможен (Serrano et al., 1997; Beausejour et al., 2003; Roberson et al., 2005). Опухолевый супрессор p53, будучи фактором транскрипции, регулирует экспрессию многих генов, ответственных за апоптоз и блок клеточного цикла. В ответ на различные генотоксические стрессы p53 ингибирует прохождение клетки по циклу, останавливая их на границе фаз G<sub>1</sub>/S или G<sub>2</sub>/M. Главной мишенью p53 после его активации является ген *p21<sup>waf1</sup>* семейства Cip/Kip — ингибитор циклинзависимых киназ фазы G<sub>1</sub>, накопление которого приводит к блоку G<sub>1</sub>/S (Chen et al., 1996). Оверэкспрессия экзогенного *p21<sup>waf1</sup>* в карциномах HCT-116 даже в отсутствие повреждающих воздействий может вызвать блок G<sub>1</sub>/S, морфологические изменения, характерные для стареющих клеток, и экспрессию активности SA- $\beta$ -Gal (Chang et al., 2000).

Однако то, каковы механизмы генетического выбора программы ответа клетки на действие ДНК-повреждающих агентов, в настоящее время неясно. Существует мнение о том, что кроме регуляции транскрипции генов выбор того или иного ответа на генотоксические воздействия зависит от того, с какими белками p53 образует комплексы. Связывание с белками семейства транскрипционных факторов E2F важно для нормальной регуляции клеточного цикла; белки семейства ASPP (Apoptosis Stimulating Proteins of p53) способствуют запуску p53-зависимого апоптоза; белок YB1 (Y-box-binding) не допускает

p53-зависимого апоптоза; Pin1 регулирует оба процесса (Braithwaite et al., 2006).

Согласно данным нашей лаборатории (Bulavin et al., 1999), в трансформантах ERas<sup>WT</sup> в ответ на разные типы повреждения ДНК активируется программа апоптотической гибели, тогда как действие NaB вызывает остановку клеточного цикла на границе фаз G<sub>1</sub>/S (Зубова и др., 2005). Действие NaB на клетки ERas<sup>WT</sup> активирует транскрипцию гена ингибитора циклинзависимых киназ *p21<sup>waf1</sup>* (локус *CDKN1A1*), которая наблюдается также после гамма-облучения (Bulavin et al., 1999). Однако после облучения клетки идут в апоптоз (Bulavin et al., 1999), а после действия NaB в них реализуется блок клеточного цикла. Это говорит в пользу того, что появление NaB-индуцированного блока G<sub>1</sub>/S в этих трансформантах не может объясняться только накоплением ингибитора циклинзависимых киназ, так как блок клеточного цикла G<sub>1</sub>/S наблюдается в трансформантах ERas с нокаутом по гену *p21<sup>waf1</sup>* (Abramova et al., 2006). Подавление пролиферации трансформантов при действии NaB может быть связано с его прямым влиянием на транскрипцию гена *E2F1*, который регулирует экспрессию большого числа генов, кодирующих белки, вовлеченные в процесс репликации ДНК (тимидинкиназа, тимидилатсинтетаза, тетрагидрофолатредуктаза и ряд других). Однако транскрипция самого E2F1 при действии NaB зависит, скорее, не от p53, а от комплекса TCF/Lef с  $\beta$ -катенином, как это показано ранее (Abramova et al., 2006).

Представляет интерес факт, обнаруженный нами при действии NaB, который говорит о принципиальных различиях в картине повышения транскриптивной ак-

тивности p53 во времени при действии NaB и облучения. Облучение приводит к кратковременной активации репортеров p53-LUC, тогда как активность p53 как транскрипционного фактора растет по мере удлинения срока культивирования клеток с NaB. Можно допустить, что NaB, будучи агентом, который ингибирует деацетилазы, поддерживает ацетилирование не только гистонов, но и негистоновых белков, включая p53 (Carlisi et al., 2008). Посттрансляционные модификации p53, в частности его ацетилирование, увеличивают способность связываться с ДНК и транскрипционную активность. Помимо обеспечения гиперацетилирования p53 ингибиторы HDAC восстанавливают опухоль-супрессорную активность p53 путем обеспечения преимущественно ядерной локализации p53 (Condorelli et al., 2008), что является необходимым условием для осуществления опухоль-супрессорных функций p53. Ацетилирование, как и убиквитинирование, протекает по остаткам лизина, конкуренция между этими модификациями влияет на стабильность белка и тем самым регулирует его функцию. Кроме того, ингибиторы HDAC могут способствовать стабилизации некоторых субстратов p53 за счет маскирования сайтов для убиквитинирования, продлевая, таким образом, время взаимодействия p53 с мишенями-субстратами (Grönroos et al., 2002; Caron et al., 2005).

Кроме того, нельзя исключить изменения характера работы негативного регулятора и непосредственной мишени p53 гена *Mdm2* в присутствии NaB, что также может быть одной из причин повышения активности p53 во времени. Эти результаты принципиально важны, так как кратковременное действие NaB может вызывать блок клеточного цикла, однако после удаления NaB такой блок обратим (Зубова и др., 2005). Таким образом, длительная активация p53-зависимых генов также может лежать в основе необратимости блока клеточного цикла как части программы старения.

Известно, что белки p14/p16ARF также участвуют в регуляции активности p53, способствуя его стабилизации и накоплению (Sherr, 2001). Существует ARF-независимый путь активации p53. Этот путь осуществляется через активацию сенсоров повреждений ДНК — киназ семейства ATM/ATR, которые могут фосфорилировать киназу Chk2, или *Mdm2*, или напрямую p53, что влечет за собой блок клеточного цикла на границе фаз G<sub>1</sub>/S или G<sub>2</sub>/M и запуск процессов репарации ДНК. В недавних работах показано, что в ответ на появление в клетке двухнитевых разрывов ДНК p53 не только повышает свою транскрипционную активность, но и обнаруживается непосредственно в местах разрывов ДНК. Установлено, что p53 непосредственно взаимодействует с ДНК-полимеразой β для стабилизации комплекса поврежденной ДНК с белками эксцизионной репарации поврежденных оснований (Zhou et al., 2001). Возможно, что именно таким способом p53 запускает альтернативные пути ответа клетки на повреждения ДНК, которые не связаны с активностью p53 как транскрипционного фактора.

Известно, что NaB способен вызывать временную остановку клеточного цикла, дифференцировку, апоптоз или ускоренное старение в различных типах опухолевых клеток *in vitro* и *in vivo* (Richon et al., 2000; Johnston, 2003; Luong et al., 2006; Marks, Breslow, 2007; Xu et al., 2007). При этом ингибиторы HDAC ремоделируют структуру хроматина, изменяя эпигенетический профиль клетки, что позволяет говорить о NaB как об агенте, обладающем широким спектром действия, способном запускать в опу-

холевой клетке программы, регулирующие клеточное старение.

Основываясь на результатах наших экспериментов, можно говорить, что NaB активирует в трансформантах различные варианты ответа, которые свидетельствуют о решающей роли транскрипционной функции p53 в регуляции блока клеточного цикла G<sub>1</sub>/S и пролиферации. В то же время клетки линии ERas<sup>GSE56</sup>, обработанные NaB, даже в отсутствие блока клеточного цикла обладают признаками стареющих клеток (увеличение размеров, распластывание по субстрату, повышенный уровень содержания SA-β-Gal). Возможно, существуют сигнальные пути, запускаемые NaB в трансформированных клетках, приводящие к фенотипическим изменениям и повышению лизосомальной активности, характерной для стареющих клеток. С другой стороны, в последнее время появились данные о запуске программы старения в клеточных линиях, нокаутированных по гену SA-β-Gal, что говорит об относительной надежности использования SA-β-Gal как главного маркера клеточного старения (Lee et al., 2006). Увеличение размеров стареющей клетки не может продолжаться бесконечно; возможно, активация лизосомальных энзимов помогает клетке справиться с ростом, но нельзя сказать, что именно SA-β-gal играет в этом процессе решающую роль.

Известно, что опухолевые клетки характеризуются способностью пролиферировать в редком посеве, давая клоны. Нами показано, что при действии NaB опухолевые клетки как с диким типом p53, так и ERas<sup>GSE56</sup> утрачивают способность к клонированию, что напоминает реверсию к норме этого признака при действии NaB и говорит о том, что этот процесс не зависит от транскрипционной функции p53. Наши эксперименты говорят в пользу зависимости ответа клеток на действие NaB от плотности. Поведение клеток в редком посеве не зависит от наличия или отсутствия активности p53 как транскрипционного фактора. В обеих клеточных линиях клетки не способны пролиферировать в клональном посеве после длительной обработки NaB, однако в условиях логарифмического роста культуры остановка клеточного цикла и подавление пролиферации возможны только при наличии транскрипционной функции p53.

Авторы глубоко признательны проф. А. Гудкову (Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, США) за идею создания линии ERas<sup>GSE56</sup> и Н. Д. Тараровой (Lerner Research Institute, Cleveland, США) за селекцию этой линии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 07-04-01537), АФГИР-РФФИ (RUB-2868-ST-07/07-04-91154) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

#### Список литературы

- Зубова Ю. Г., Быкова Т. В., Зубова С. Г., Абрамова М. В., Аксенов Н. Д., Поспелов В. А., Поспелова Т. В. 2005. Индукция программы ускоренного старения ингибитором гистоновых деацетилаз бутиратом натрия в нормальных и трансформированных фибробластах крысы. Цитология. 47 (12) : 1055—1062.
- Abramova M. V., Pospelova T. V., Nikulenkov F. P., Hollander C. M., Fornace A. J., Jr., Pospelov V. A. 2006. G<sub>1</sub>/S arrest induced by histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in E1A+ +Ras-transformed cells is mediated through down-regulation of

- E2F activity and stabilization of  $\beta$ -catenin. *J. Biol. Chem.* 281: 21 040—21 051.
- Aliouat-Denis C. M., Dendouga N., Van den Wyngaert I., Gohelmann H., Steller U., van de Weyer I., Van Slycken N., Andries L., Kass S., Luyten W., Janicot M., Vialard J.E. 2005. p53-independent regulation of p21<sup>Waf1/Cip1</sup> expression and senescence by Chk2. *Mol. Cancer Res.* 3 : 627—634.
- Bartkova J., Rezaei N., Liontos M., Karakaidos P., Kletsas D., Issaeva N., Vassiliou L. V., Kolettas E., Niforou K., Zoumpourlis V. C. 2006. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature.* 444 : 633—637.
- Beauséjour C. M., Krtolica A., Galimi F., Narita M., Lowe S. W., Yaswen P., Campisi J. 2003. Reversal of human cellular senescence: roles of the p53 and p16 pathways. *EMBO J.* 22 : 4212—4222.
- Blumenthal R. D. 2005. An overview of chemosensitivity testing. *Meth. Mol. Med.* 110 : 3—18.
- Braithwaite A. W., Del Sal G., Lu X. 2006. Some p53-binding proteins that can function as arbiters of life and death. *Cell Death Diff.* 13 : 984—993.
- Bulavin D. V., Tararova N. D., Aksenov N. D., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 1999. Deregulation of p53/p21/Cip1/Waf1 pathway contributes to polyploidy and apoptosis of E1A+cHa-ras transformed cells after  $\gamma$ -irradiation. *Oncogene.* 18 : 5611—5619.
- Carlisi D., Vassallo B., Lauricella M., Emanuele S., D'Anneo A., Di Leonardo E., Di Fazio P., Vento R., Tesoriere G. 2008. Histone deacetylase inhibitors induce in human hepatoma HepG2 cells acetylation of p53 and histones in correlation with apoptotic effects. *Int. J. Oncol.* 32 : 177—184.
- Caron C., Boyault C., Khochbin S. 2005. Regulatory cross-talk between lysine acetylation and ubiquitination: role in the control of protein stability. *Bioassay.* 27 : 408—415.
- Chang B. D., Watanabe K., Broude E. V., Fang J., Poole J. C., Kalinichenko T. V., Roninson I. B. 2000. Effects of p21<sup>Waf1/Cip1/Sdi1</sup> on cellular gene expression: implications for carcinogenesis, senescence, and age-related diseases. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 97 : 4291—4296.
- Chen X., Ko L. J., Jayaraman L., Prives C. 1996. P53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells. *Genes Develop.* 10 : 2438—2451.
- Coles A. H., Liang H., Zhu Z., Marfella C. G., Kang J., Imbalzano A. N., Jones S. N. 2007. Deletion of p37<sup>Ingl1</sup> in mice reveals a p53-independent role for *Ingl1* in the suppression of cell proliferation, apoptosis, and tumorigenesis. *Cancer Res.* 67 : 2054—2061.
- Collado M., Blasco M. A., Serrano M. 2007. Cellular senescence in cancer and aging. *Cell.* 130 : 223—233.
- Collado M., Gil J., Efeyan A., Guerra C., Schuhmacher A. J., Barradas M., Benguría A., Zaballos A., Flores J. M., Barbacid M., Beach D., Serrano M. 2005. Tumour biology: senescence in pre-malignant tumours. *Nature.* 436 : 642.
- Collado M., Serrano M. 2005. The senescent side of tumor suppression. *Cell Cycle.* 4 : 1722—1724.
- Collado M., Serrano M. 2006. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat. Rev. Cancer.* 6 : 472—476.
- Condorelli F., Gnemmi I., Vallario A., Genazzani A. A., Canonico P. L. 2008. Inhibitors of histone deacetylase (HDAC) restore the p53 pathway in neuroblastoma cells. *Br. J. Pharmacol.* 153 : 657—668.
- Di Micco R., Fumagalli M., Cicalese A., Piccinin S., Gasparini P., Luise C., Schurra C., Garre M., Nuciforo P. G., Bensi-mon A. 2006. Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature.* 444 : 638—642.
- 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 biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92 : 9363—9367.
- Grönroos E., Hellman U., Heldin C. H., Ericsson J. 2002. Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. *Mol. Cell.* 10 : 438—493.
- Ha L., Ichikawa T., Anver M., Dickins R., Lowe S., Sharpless N. E., Krimpenfort P., Depinho R. A., Bennett D. C., Sviderskaya E. V., Merlino G. 2007. ARF functions as a melanoma tumor suppressor by inducing p53-independent senescence. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 104 : 10 968—10 973.
- Hamroun D., Kato S., Ishioka C., Claustres M., Bérout C., Soussi T. 2006. The UMD TP53 database and website: update and revisions. *Hum. Mutat.* 27 : 14—20.
- Harms K., Nozell S., Chen X. 2004. The common and distinct target genes of the p53 family transcription factors. *Cell. Mol. Life Sci.* 61 : 822—842.
- Johnstone R. W., Licht J. D. 2003. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target. *Cancer Cell.* 4 : 13—18.
- Lee B. Y., Han J. A., Im J. S., Morrone A., Johung K., Goodwin E. C., Kleijer W. J., DiMaio D., Hwang E. S. 2006. Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell.* 5 : 187—195.
- Lindemann R. K., Gabrielli B., Johnstone R. W. 2004. Histone-deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Cell Cycle.* 3 : 779—788.
- Luong Q. T., O'Kelly J., Braunstein G. D., Hershman J. M., Koeffler H. P. 2006. Antitumor activity of suberoylanilide hydroxamic acid against thyroid cancer cell lines *in vitro* and *in vivo*. *Clin. Cancer Res.* 12 : 5570—5577.
- Marks P.A., Breslow R. 2007. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat. Biotechnol.* 25 : 84—90.
- Martins C. P., Brown-Swigart L., Evan G. I. 2006. Modeling the therapeutic efficacy of p53 restoration in tumors. *Cell.* 127 : 1323—1334.
- Ossovskaya V. S., Mazo I. A., Chernov M. V., Chernova O. B., Strezoska Z., Kondratov R., Stark G. R., Chumakov P. M., Gudkov A. V. 1996. Use of genetic suppressor elements to dissect distinct biological effects of separate p53 domains. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 : 10 309—10 314.
- Parrinello S., Samper E., Krtolica A., Goldstein J., Melov S., Campisi J. 2003. Oxygen sensitivity severely limits the replicative lifespan of murine fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* 5 : 741—747.
- Petitjean A., Mathe E., Kato S., Ishioka C., Tavtigian S. V., Hainaut P., Olivier M. 2007. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.* 28 : 622—629.
- 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. Natl. Acad. Sci. USA.* 97 : 10 014—10 019.
- Roberson R. S., Kussick S. J., Vallieres E., Chen S. Y., Wu D. Y. 2005. Escape from therapy-induced accelerated cellular senescence in p53-null lung cancer cells and in human lung cancers. *Cancer Res.* 65 : 2795—2803.
- Rodier F., Campisi J., Bhaumik D. 2007. Two faces of p53: aging and tumor suppression. *Nucl. Acids Res.* 35 : 7475—7484.
- Serrano M., Lin A. W., McCurrach M. E., Beach D., Lowe S. W. 1997. Oncogenic ras provokes premature cell senescence associated with accumulation of p53 and p16<sup>INK4a</sup>. *Cell.* 88 : 593—602.
- Sherr C. J. 2001. The INK4a/ARF network in tumour suppression. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2 : 731—737.
- Te Poele R. H., Okorokov A. L., Jardine L., Cummings J., Joel S. P. 2002. DNA damage is able to induce senescence in tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Res.* 62 : 1876—1883.
- Toledo F., Wahl G. M. 2006. Regulating the p53 pathway: *in vitro* hypotheses, *in vivo* veritas. *Nat. Rev. Cancer.* 6 : 909—923.
- Ventura A., Kirsch D. G., McLaughlin M. E., Tuveson D. A., Grimm J., Lintault L., Newman J., Reczek E. E., Weissleder R., Jacks T. 2007. Restoration of p53 function leads to tumour regression *in vivo*. *Nature.* 445 : 661—665.



Xu W. S., Parmigiani R. B., Marks P. A. 2007. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*. 26 : 5541—5552.

Xue W., Zender L., Miething C., Dickins R. A., Hernando E., Krizhanovsky V., Cordon-Cardo C., Lowe S. W. 2007. Senescence and tumour clearance is triggered by p53 restoration in murine liver carcinomas. *Nature*. 445 : 656—660.

Zhang H. 2007. Molecular signaling and genetic pathways of senescence: its role in tumorigenesis and aging. *J. Cell Physiol.* 210 : 567—574.

Zhou J., Ahn J., Wilson S. H., Prives C. 2001. A role for p53 in base excision repair. *EMBO J.* 20 : 914—923.

Поступила 18 III 2009

EFFECT OF HISTONE DEACETYLASES INHIBITOR SODIUM BUTYRATE (NaB)  
ON TRANSFORMANTS E1A + cHa-Ras EXPRESSING WILD TYPE p53  
WITH SUPPRESSED TRANSACTIVATION FUNCTION

E. I. Bukreeva, N. D. Aksenov, A. A. Bardin, V. A. Pospelov, T. V. Pospelova

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;  
e-mail: cheverd@gmail.com

Induction of cellular senescence by various antitumour agents is a promising strategy of cancer treatment. We assessed the ability of sodium butyrate (NaB), a histone deacetylase inhibitor (HDACi), to reactivate the cellular senescence program in either E1A + cHa-Ras-transformed rat embryo fibroblasts with wild-type p53 (ERas<sup>WT</sup>) and in the isogenic cell line where p53 was inactivated due to expression of the potent genetic suppressor element GSE56 (ERas<sup>GSE56</sup>). NaB treatment increased p53 transcriptional activity and induced an irreversible G<sub>1</sub>/S cell cycle arrest in ERas<sup>WT</sup>, but not in ERas<sup>GSE56</sup> cells. By the transient transfections method using reporter luciferase (p53-LUC) constructions, it was shown that p53-LUC activity as a marker of p53 transactivation function did not increase after X-rays exposure of transformants ERas<sup>GSE56</sup>. p53 activity in transformants ERas<sup>WT</sup> increased both after irradiation or upon NaB treatment. Interestingly, the expression of senescence-associated  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal), widely used as a marker of senescence, as well as loss of clonogenic ability, were observed in both cell lines following NaB treatment. Thus, our results suggest that induction of p53 transcription activity could be the key determinant of HDACi-induced cell cycle arrest and senescence in transformed cells and provide an additional evidence of SA- $\beta$ -Gal invalidity as a sufficient senescence marker.

Key words: oncogenes, E1A and cHa-ras, transformation, p53 transcriptional factor, cell senescence, histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate.