# НАДФ УВЕЛИЧИВАЕТ УРОВЕНЬ ФОСФОРИЛИРОВАННОГО ГИСТОНА H2AX В СЕРДЦЕ МЫШЕЙ ПОСЛЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ

© Д. В. Фирсанов, <sup>1</sup> А. В. Кропотов, В. М. Михайлов

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург; <sup>1</sup> электронный адрес: dfirsanov@gmail.com

Фосфорилирование вариантного корового гистона H2AX происходит в мегабазных доменах хроматина вокруг двухнитевых разрывов ДНК (ДР ДНК). Эта модификация, названная  $\gamma$ -H2AX, может использоваться как маркер репарации ДР ДНК и ответа клеток на возникновение повреждений ДНК. Никотинамид аденин динуклеотид (НАД<sup>+</sup>) является субстратом для поли-АДФ-рибозы полимеразы (PARP) в реакциях рибозилирования белков хроматина в ответ на повреждения ДНК. В этой работе, пользуясь методиками иммуноблотинга и иммуногистохимии, мы исследовали влияние экзогенного НАДФ, который может косвенно влиять на концентрацию внутриклеточного НАД<sup>+</sup> и на уровень образования  $\gamma$ -H2AX в клетках миокарда мышей линии C57Bl/6 после рентгеновского облучения (PO). Мы обнаружили, что однократное внутрибрюшинное введение НАД<sup>+</sup> в различных дозах сразу же после PO увеличивает количество  $\gamma$ -H2AX в клетках миокарда мышей через 20 мин после PO. Это свидетельствует о том, что существует взаимосвязь внутриклеточного содержания НАД<sup>+</sup> и ответа клеток на повреждения ДНК in vivo.

Ключевые слова: гистон γ-H2AX, двухнитевые разрывы ДНК, никотинамид аденин динуклеотид, поли-АДФ-рибоза-полимераза, линия мышей C57Bl/6.

Принятые сокращения: ДР ДНК — двухнитевые разрывы ДНК, НАД<sup>+</sup> — никотинамид аденин динуклеотид, РО — рентгеновское облучение.

Ежедневно клетки эукариот сталкиваются с большим количеством повреждений ДНК, которые необходимо репарировать для обеспечения стабильности генетического материала. В эукариотических клетках двухнитевые разрывы ДНК (ДР ДНК) считаются наиболее опасными повреждениями генома. Даже один нерепарированный ДР ДНК может привести к гибели клетки или канцерогенезу. Одним из ранних ответов клеток на появление ДР ДНК, вызванных рентгеновским облучением (РО) или химическими мутагенами, является фосфорилирование вариантного корового гистона H2AX по серину 139 в мегабазных доменах хроматина с образованием дискретных фокусов ү-Н2АХ вокруг ДР ДНК (Rogakou et al., 1998, 1999; Tomilin et al., 2001). Фосфорилирование гистона H2AX осуществляется семейством фосфотидил-инозитол-3-киназ, включая АТМ, DNA-PK и АТК (Motoyama, Naka, 2004: Stiff et al., 2004). В клетках человека максимальное накопление у-Н2АХ наблюдается через 1 ч после РО. Затем происходит его медленная элиминация, которая коррелирует с кинетикой репарации ДР ДНК (Nazarov et al., 2003; Svetlova et al., 2007). Было показано, что время половинной элиминации у-H2AX коррелирует с радиочувствительностью клеток человека (Olive, Banath, 2004).

Существуют данные о межтканевой вариации в эффективности фосфорилирования и элиминации гистона γ-H2AX после PO (Gavrilov et al., 2006; Koike et al., 2008). Ранее нами было показано, что в сердце мышей наблюдается замедленная элиминация  $\gamma$ -H2AX и ~25 % ядер остаются  $\gamma$ -H2AX-положительными через 23 ч после РО. В почке в это же время число  $\gamma$ -H2AX-положительных ядер доходило до уровня необлученного контроля (Gavrilov et al., 2006; Гаврилов и др., 2007).

Нами было показано, что форсколин, являющийся натуральным компонентом многих пищевых добавок и, как показано, активирующий цАМФ, уменьшает количество γ-H2AX после РО в культуре клеток (Solovjeva et al., 2009). Известно, что поли-АДФ-рибоза-полимераза (PARP) активируется в местах повреждений ДНК и рибозилирует белки хроматина вокруг повреждений, используя в качестве субстрата НАД<sup>+</sup> (Surjyana et al., 2010). Гиперактивация PARP может привести к значительному уменьшению содержания внутриклеточного НАД<sup>+</sup> и к клеточной гибели по пути некроза (Carson et al., 1986). В связи с этим энергетические процессы в клетках могут играть одну из ключевых ролей в ответе клеток на повреждения и репарации ДР ДНК.

В нашей работе мы исследовали влияние НАДФ, который может косвенно влиять на концентрацию внутриклеточного НАД<sup>+</sup> и на образование γ-H2AX в клетках миокарда мышей линии C57Bl/6 после РО в дозе 3 Гр. Мы показали, что внутрибрюшинное введение НАДФ в трех различных дозах сразу же после РО вызывает через 20 мин повышение уровня γ-H2AX.



Рис. 1. Влияние внутрибрюшинного введения НАДФ на образование γ-H2AX в клетках сердца мышей.

а — введение НАДФ в дозе 3.8 мг/кг не вызывает образования γ-Н2АХ в сердце мышей в отсутствие рентгеновского облучения (PO); через 20 мин после PO наблюдается фосфорилирование гистона Н2АХ. б — введение НАДФ в дозе 37.5 мг/кг сразу же после PO увеличивает уровень накопления γ-H2AX в сердце мышей через 20 мин после PO в сравнении с контрольными.

#### Материал и методика

Животные, облучение и воздействие. Эксперименты проводили на самцах мышей линии C57Bl/6 и массой около 20 г. Облучение осуществляли на аппарате РУМ-17 при 200 кВ, 13 мА, фильтр Cu-Al 0.5 см, 0.45 Гр/мин. Криостатные срезы приготавливали на аппарате Bright Co LTD (Великобритания). Раствор кофермента НАДФ приготавливали перед каждым экспериментом, разводя порошок никотинамида аденин динуклеотида фосфата Na (Reanal, Венгрия) в PBS. Введение НАДФ животным осуществляли внутрибрюшинно сразу же после PO.

Иммуноблотинг. Сердца мышей помещали в керамическую ступку и заливали жидким азотом для гомогенизации. После гомогенизации к 5 мг ткани добавляли 300 мкл буфера 4× для образцов на форез и кипятили 10 мин при 95 °С. После центрифугирования пробы разделяли в 15%-ном полиакриламидном геле (ПААГ) и осуществляли перенос белков на мембраны Hybond-C (Amersham, Швеция) с помощью электроблотинга. Мембраны блокировали в 5%-ном сухом молоке в течение ночи при 4 °С. Далее мембраны отмывали в PBS, содержащем 0.1 % Tween-20 (PBST), 2 раза по 10 мин. После этого мембраны инкубировали с первичными моноклональными мышиными антителами на фосфорилированную форму у-H2AX (1:1500; Abcam, США) или первичными поликлональными кроличьими антителами против бета-актина (1:4000; Abcam, США), разведенными в PBST, в течение 2 ч при комнатной температуре. После трех отмывок по 10 мин в PBST мембраны инкубировали с соответствующими вторичными антителами против IgG мыши или кролика, конъюгированными с пероксидазой (1:15 000; Zymax, США), в течение 1 ч при комнатной температуре. Далее мембраны отмывали 3 раза в PBST по 10 мин и инкубировали с хемилюминесцентным субстратом (Millipore, США). Обработку иммуноблотов осуществляли с помощью программы ImageJ.

Пероксидазный — антипероксидазный (ПАП) метод. Криостатные срезы фиксировали в метанол-этаноле (1:1) в течение 3 мин при –20 °С и подсушивали их 15 мин при комнатной температуре. После этого препараты отмывали 3 раза по 5 мин в PBS. Затем стекла инкубировали в 30%-ном метаноле, содержащем 0.03 %  $H_2O_2$ , в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее стекла отмывали 3 раза по 5 мин в PBS и блокировали в 1%-ном бычьем сывороточном альбумине в течение 30 мин. После отмывки в PBS стекла инкубировали с первичными поликлональными кроличьими антителами (1:200; Abсат, США) при 4 °С в течение ночи. Локализацию антител выявляли с помощью кроличьих антипероксидазных антител и пероксидазы (комплекс ПАП; Sigma, США) по описанной схеме (Полак, Ван Норден, 1987). Пероксидазную активность определяли с помощью диаминобензидина. Ядра клеток визуализировали при помощи красителя Гимза.

## Результаты и обсуждение

Существует очень мало данных о фосфорилировании гистона H2AX в клетках, находящихся в стадии терминальной дифференцировки, и большинство результатов получено на культурах клеток. По нашим данным, в сердце мышей через 23 ч после PO в дозе 3 Гр у половины клеток (в 25%) обнаруживаются  $\gamma$ -H2AX-положительные ядра, среди них ~86% являются кардиомиоцитами, остальные принадлежат к немышечным клеткам миокарда. В клетках почечного эпителия через 23 ч после PO в дозе 3 Гр число  $\gamma$ -H2AX-положительных ядер сопоставимо с контрольными значениями (Gavrilov et al., 2006). Мы полагаем, что это наблюдение может быть связано с низкой



Рис. 2. Интегрированная плотность γ-H2AX, нормированная к уровню в контрольных мышах через 20 мин после рентгеновского облучения в дозе 3 Гр.

Иммуноблоты анализировали с помощью программы ImageJ. Вертикальные отрезки — ошибка среднего.



Рис. 3. Уровень фосфорилирования H2AX в криостатных срезах сердца мышей через 20 мин после рентгеновского облучения и инъекции НАДФ в различных дозах.

Вертикальные отрезки — ошибка среднего.

активностью белков, участвующих в репарации ДР ДНК в кардиомиоцитах мышей.

Хорошо известно, что при возникновении повреждений ДНК активируется полимераза PARP, которая рибозилирует белки хроматина вокруг повреждений и использует в качестве субстрата НАД<sup>+</sup>. Истощение пула НАДФ может привести к клеточной гибели. В связи с этим мы решили проверить, влияет ли введение мышам экзогенного НАДФ сразу же после РО на уровень образования у-H2AX как маркера ответа на возникновение ДР ДНК в ранние сроки после РО в полулетальной для мышей дозе 3 Гр. Для решения этой задачи мы пользовались методикой иммуноблотинга. Введение НАДФ не вызывало фосфорилирования гистона H2AX в отсутствие PO (рис. 1, a). Однако мы обнаружили, что внутрибрюшинное введение НАДФ в дозе 37.5 мг/кг дает достоверное увеличение (~2.3 раза) количества у-Н2АХ через 20 мин после РО в дозе 3 Гр по сравнению с контрольной группой облученных мышей (рис. 1, б). Доза 3.8 мг/кг давала в среднем увеличение уровня у-H2AX примерно в 1.6 раза, однако это увеличение было статистически недостоверным. Удивительно, но доза 0.4 мг/кг достоверно увеличивала количество у-Н2АХ примерно в 2 раза. Исследовав дозу 0.04 мг/кг, мы не получили сколь-либо значимых изменений в уровне фосфорилирования гистона H2AX в клетках миокарда мышей после РО. Внутрибрюшинное введение PBS после PO не вызывало увеличения уровня у-H2AX в сердце мышей в сравнении с контрольными животными после РО. Таким образом, процесс влияния НАДФ на образование у-H2AX является дозозависимым (рис. 2).

Чтобы проверить наши данные, мы окрасили криостатные срезы сердец мышей методом ПАП. По нашим данным, НАДФ в дозе 37.5 мг/кг вызывает образование ~82 %  $\gamma$ -H2AX-положительных ядер, в то время как НАД<sup>+</sup> в дозе 3.8 мг/кг вызывает образование ~53 %  $\gamma$ -H2AX-положительных ядер по сравнению с облученным контролем, где количество  $\gamma$ -H2AX-положительных ядер составляло ~42 % через 20 мин после РО в дозе 3 Гр (рис. 3). Таким образом, эти данные подтверждают результаты, полученные нами с помощью иммуноблотинга.

На культуре клеток было показано, что существуют функциональные и физические взаимодействия между киназой ATM и белком PARP-1, играющим ключевую роль в ремоделировании хроматина. Нокаут гена *PARP-1* или ингибирование белка PARP-1 вызывает сниженный уровень γ-H2AX после возникновения ДР ДНК (Haince et al., 2007). Оценивая наши результаты в концепции этой модели, можно предположить, что введение НАДФ увеличивает внутриклеточное содержание НАД<sup>+</sup>, не приводя к истощению его пула после гиперактивации полимеразы PARP, что в свою очередь может влиять на активность киназы ATM и соответственно на уровень фосфорилирования гистона H2AX.

В качестве второй гипотезы можно предположить, что увеличение уровня  $\gamma$ -H2AX происходит из-за повышенной активности ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PK), которая, как показано, образует макромолекулярный комплекс с сиртуином SIRT6, который также использует НАД<sup>+</sup> в качестве субстрата, участвуя в репарации ДР ДНК (McCord et al., 2009). Кроме того, показано, что динамика образования и элиминации  $\gamma$ -H2AX в селезенке мышей является DNA-PK-зависимым процессом (Koike et al., 2008). Это также говорит в пользу этой гипотезы, поскольку киназа DNA-PK может быть основной киназой, фосфорилирующей  $\gamma$ -H2AX in vivo.

Дальнейшие исследования необходимы для идентификации механизма влияния НАДФ на уровень образования  $\gamma$ -H2AX. Также остается пока неясным, влияет ли повышение уровня  $\gamma$ -H2AX на эффективность репарации ДР ДНК в кардиомиоцитах и влияет ли этот процесс на их гибель.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 10-04-00807-а) и программы «Молекулярно-клеточная биология» президиума РАН.

#### Список литературы

Гаврилов Б. А., Фирсанов Д. В., Веженкова И. В., Соловьева Л. В., Михайлов В. М., Томилин Н. В. 2007. Выявление фосфорилированного гистона H2AX в дифференцированных клетках после рентгеновского облучения. Докл. РАН. 414(1): 123—125.

Полак Д., Ван Норден С. 1987. Введение в иммуноцитохимию: современные методы и проблемы. М.: Мир. 78 с.

*Carson D. A., Seto S., Wasson D. B., Carrera C. J. 1986.* DNA strand beaks, NAD metabolism, and programmed cell death. Exp. Cell Res. 164 : 273–281.

Gavrilov B., Vezhenkova I., Firsanov D., Solovjeva L., Svetlova M., Mikhailov V., Tomilin N. 2006. Slow elimination of phosphorylated histone  $\gamma$ -H2AX from DNA of terminally differentiated mouse heart cells *in situ*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 347 : 1048—1052.

Haince J. F., Kozlov S., Dawson V. L., Dawson T. M., Hendzel M. J., Lavin M. F., Poirier G. G. 2007. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents. J. Biol. Chem. 282 : 16 441—16 453.

*Koike M., Mashino M., Sugasawa J., Koike A. 2008.* Histone H2AX phosphorylation independent of ATM after X-irradiation in mouse liver and kidney *in situ.* Radiat. Res. 49 : 445–449.

Koike M., Sugasawa J., Yasuda M., Koike A. 2008. Tissue-specific DNA-PK-dependent H2AX phosphorylation and  $\gamma$ -H2AX elimination after X-irradiation *in vivo*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 376 : 52—55.

McCord R. A., Michishita E., Hong T., Berber E., Boxer L. D., Kusumoto R., Guan S., Shi X., Gozani O., Burlingame A. L., Bohr V. A., Chua K. F. 2009. SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair. Aging (Albany NY). 1: 109–121.

*Motoyama N., Naka K. 2004.* DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. Curr. Opin. Genet. Develop. 14 : 11—16.

Nazarov I. B., Smirnova A. N., Krutilina R. I., Svetlova M. P., Solovjeva L. V., Nikiforov A. A., Oei S. L., Zalenskaya I. A., Yau P. M., Tomilin N. V. 2003. Dephosphorylation of histone gamma-H2AX during repair of DNA double-strand breaks in mammalian cells and its inhibition by calyculin A. Radiat. Res. 160: 309–317.

*Olive P. G., Banath J. P. 2004.* Phosphorylation of histone H2AX as a measure of radiosensitivity. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 58 : 331–335.

*Rogakou E. P., Boon C., Redon C., Bonner W. M. 1999.* Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo.* J. Cell Biol. 146 : 905–916.

Rogakou E. P., Pilch D. R., Orr A. H., Ivanova V. S., Bonner W. M. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. J. Biol. Chem. 273 : 5858— 5868.

Solovjeva L. V., Pleskach N. M., Firsanov D. V., Svetlova M. P., Serikov V. B., Tomilin N. V. 2009. Forskolin decreases phosphorylation of histone H2AX in human cells induced by ionizing radiation. Radiat. Res. 171 : 419–424. Stiff T., O'Driscoll M., Rief N., Iwabuchi K., Lobrich M., Jeggo P. A. 2004. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. Cancer Res. 64 : 2390–2396.

Surjana D., Halliday G. M., Damian D. L. 2010. Role of nicotinamide in DNA damage, mutagenesis, and DNA repair. J. Nucl. Acids. 2010 : 1–13.

Svetlova M., Solovjeva L., Nishi K., Nazarov I., Siino J., Tomilin N. 2007. Elimination of radiation-induced gamma-H2AX foci in mammalian nucleus can occur by histone exchange. Biochem. Biophys. Res. Commun. 358 : 650—654.

Tomilin N. V., Solovjeva L. V., Svetlova M. P., Pleskach N. M., Zalenskaya I. A., Yau P. M., Bradbury E. M. 2001. Visualization of focal nuclear sites of DNA repair synthesis induced by bleomycin in human cells. Radiat. Res. 156 : 347—354.

Поступила 6 XII 2010

## NADP INCREASES THE LEVEL OF HISTONE H2AX PHOSPHORYLATION IN MOUSE HEART CELLS AFTER IONIZING RADIATION

#### D. V. Firsanov, 1 A. V. Kropotov, V. M. Mikhailov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; <sup>1</sup> e-mail: dfirsanov@gmail.com

Phosphorylation of replaceable histone H2AX occurs in megabase chromatin domains around DNA double-strand breaks (DSBs), and this modification called  $\gamma$ -H2AX can be used as an effective marker for DSBs repair and DNA damage response. Using Western blotting and immunohistochemistry techniques we have studied here the influence of exogenous nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP) which could potentially increase the intracellular level of NAD<sup>+</sup> and on the level of  $\gamma$ -H2AX formation in mouse heart cells after ionizing radiation (IR). We have found that injection of NAD<sup>+</sup> in different doses immediately after IR causes an increased level of  $\gamma$ -H2AX in mouse heart cells 20 min after IR at the dose of 3 Gy compared to control mice after IR exposure. It indicates that it could be a relationship between intracellular NAD<sup>+</sup> content and DNA damage response *in vivo*.

Key words: ionizing radiation, histone H2AX phosphorylation, NADP, DNA damage response.