

## ИНГИБИТОРЫ ГИСТОНОВЫХ ДЕАЦЕТИЛАЗ ВЫЗЫВАЮТ TP53-ЗАВИСИМУЮ ИНДУКЦИЮ p21/Waf1 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ, НЕСУЩИХ МУТАЦИИ В ГЕНЕ TP53

© Р. А. Ковалев,<sup>1</sup> Т. А. Штам,<sup>1</sup> Д. В. Карелов,<sup>1, 2</sup> В. С. Бурдаков,<sup>1, 2</sup>  
А. В. Волницкий,<sup>1</sup> Е. М. Макаров,<sup>3</sup> М. В. Филатов<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
НИЦ «Курчатовский институт», Гатчина;

<sup>2</sup>С.-Петербургский государственный политехнический университет

и <sup>3</sup>Брунельский университет (Brunel University), Лондон, Великобритания;

\* электронный адрес: [fil\\_53@mail.ru](mailto:fil_53@mail.ru)

p21/Waf1 — один из основных регуляторов остановки клеточного цикла, и одна из наиболее известных мишеней функционально активного в качестве транскрипционного фактора белка TP53. В данном исследовании мы продемонстрировали активацию экспрессии гена *p21/Waf1* при воздействии бутирата натрия — одним из естественных ингибиторов деацетилаз. Для изучения зависимости наблюдаемой активации p21/waf1 от наличия в клетке функционально активного TP53 в работе использовали злокачественно трансформированные клетки человека с различным мутационным профилем *TP53*: как экспрессирующие TP53 дикого типа, так и линии, экспрессирующие TP53 с выявленными генетическими нарушениями, в том числе с полным отсутствием гена *TP53*. При культивировании клеток в присутствии бутирата натрия иммуноферментный анализ продемонстрировал значительное увеличение уровня белка p21/Waf1 как в клетках дикого типа *TP53*, так и в клетках с мутационными заменами в гене *TP53*. В то же время индукция белка p21/Waf1 не наблюдалось в клетках с полной делецией гена *TP53*. Результаты, полученные на фоне временного выключения гена *TP53* с помощью коротких интерферирующих молекул РНК, указывают на то, что, индукция белка p21/Waf1 в ответ на воздействие ингибитором деацетилаз является TP53-зависимым событием.

Ключевые слова: ингибиторы гистоновых деацетилаз, бутират натрия, TP53, *p21/Waf1*, интерференция РНК, мутации *TP53*.

Принятые сокращения: ДСД — ДНК связывающий домен, NaBu — бутират натрия, siРНК — короткие интерферирующие РНК, БУДР — бромдезоксисуридин.

Транскрипционный фактор TP53 является ключевым компонентом клеточного ответа на различные стрессовые ситуации, такие как повреждения ДНК, онкогенная стимуляция, голодание, гипоксия и др. (Vogelstein et al., 2000; Чумаков, 2007). Его критическая роль в канцерогенезе подчеркивается тем фактом, что большинство опухолей имеет мутационные изменения *TP53* или сигнальных путей, зависящих от TP53 (Vogelstein et al., 2000; Vousden, Prives, 2009). Несмотря на то, что TP53 способен выполнять в клетке самые разнообразные функции, участвуя непосредственно в качестве адаптерного белка и компонента ряда активных белковых комплексов, наиболее функционально значимой активностью TP53 на сегодняшний день считается его способность регулировать транскрипцию генов, выступая в качестве транскрипционного фактора (Rauscroft et al., 1990; Liu, Chen, 2006). Роль TP53 в транскрипции разнообразна и имеет массу нюансов. Белок TP53 узнает специфические элементы ДНК и взаимодействует с ними за счет своего центрального ДНК-связывающего домена (ДСД). При заменах практически любой аминокислоты ДСД возникают в

той или иной степени нарушения связывания TP53 с ДНК-элементом (Brosh, Rotter, 2009). Тем не менее на сегодняшний день нет достаточных оснований полагать, что наличие мутаций в ДСД гена *TP53* однозначно приводит к инактивации этого онкосупрессора как транскрипционного фактора при воздействии на опухолевые клетки фармакологическими препаратами, не являющимися прямыми ДНК-повреждающими агентами.

К таким препаратам относятся ингибиторы деацетилаз (Yoo, Jones, 2006). Неоднократно показано, что ингибиторы гистоновых деацетилаз вызывают остановку клеточного цикла, запускают программу клеточного старения и приводят к гибели культивируемых *in vitro* различных типов клеток (Yoo, Jones, 2006; Букреева и др., 2009; Ковалев и др., 2012). Существуют некоторые указания на участие TP53 в реализации клеточного ответа на изменение общего уровня ацетилирования в клетке (Condorelli et al., 2007). В том числе показано, что при воздействии ингибиторов деацетилаз, в частности бутирата натрия (NaBu), белок TP53 подвергается ацетилированию по лизиновым остаткам в положениях 320, 373 и 382 (Zhao

Таблица 1

**Последовательности праймеров и флуоресцентно меченных зондов  
для идентификации экспрессии гена *p21/waf1***

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Зонд (FAM-BHQ1)
<i>p21/waf1</i>	<i>acagcagaggaagaccatgt</i>	<i>ttagggcttctcttggaga</i>	<i>gtcttgacccttgtgctctgc</i>
<i>GAPDH</i>	<i>catgggtgtgaaccatgaga</i>	<i>ggatcatgagtccttccacgat</i>	<i>aacagcctcaagatcatcagaatgctt</i>

et al., 2006; Brochier et al., 2013). По данным некоторых исследователей, эти посттрансляционные модификации активируют белок TP53, иницируют блок клеточного цикла и в конечном итоге приводят к апоптотической гибели трансформированных клеток (Zhao et al., 2006; Oh et al., 2012).

В настоящей работе мы провели оценку зависимости индукции белка p21/Waf1 от активации транскрипционного фактора TP53 при воздействии NaBu на культивируемые *in vitro* злокачественно трансформированные клетки человека с различным мутационным профилем гена TP53.

### Материал и методика

Клеточные культуры, условия культивирования, оценка выживаемости клеток и анализ параметров клеточного цикла. Работа проведена на перевиваемых культурах клеток человека: HeLa (аденокарцинома шейки матки), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), HT-1080 (фибросаркома), ECV-304 (трансформированные клетки эндотелия, полученные из коллекции Института цитологии РАН), глиома-Г и глиома-В (первичные культуры глиомных клеток, полученные в нашей лаборатории), K-562 (хроническая миелогенная лейкемия) и U-937 (гистиоцитарная лимфома). Клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Биолот, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Биолот, Россия), без антибиотиков, в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С. Суспензионные культуры K-562 и U-937, полученные из коллекции Института цитологии РАН, культивировали в среде RPMI 1640 (Биолот, Россия) с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки.

Для изучения пролиферации клеток, экспрессии генов TP53 и p21/Waf1 а также параметров клеточного цикла в условиях ингибирования клеточных деацетилаз в культуральную среду добавляли NaBu до конечной концентрации 10 мМ. По истечении 24—96 ч клетки переводили в суспензию раствором Версена/Трипсина и либо проводили количественную оценку пролиферации путем прямого подсчета числа клеток с помощью ручного автоматического счетчика клеток Scepter (Millipore, Германия) или редкого посева во флаконы Карреля для определения способности давать колонии, либо лизировали для дальнейшего изучения экспрессии генов TP53 и p21/Waf1 методом ПЦР в реальном времени или иммуноблота, либо анализировали методом проточной цитофлуориметрии для выявления возможных нарушений в прохождении клеточного цикла. Для выявления доли клеток, прошедших минимум один полный клеточный цикл, проводили анализ синтеза ДНК по включению бромдезоксисуридина (БУДР) по методике, опубликованной ранее (Filatov et al., 1998). Клетки выращивали, как описано выше, и инкуби-

ровали в присутствии 2.5 мМ NaBu и(или) 10 % БУДР (BD, США) в течение 24—48 ч. Для определения доли клеток, реплицирующих ДНК, клетки переводили в суспензию раствором Версена/Трипсина, окрашивали специфичным для ДНК флуоресцентным красителем Hoechst 33342 в присутствии неионного детергента Тритона X-100 (0.2 %) и анализировали с помощью проточного цитофлуориметра. Процентное содержание БУДР-положительных клеток (БУДР+), а также количественную оценку выживаемости клеток в присутствии NaBu оценивали по результатам трех независимых экспериментов.

Количественная оценка экспрессии генов TP53 и p21/Waf1. Изменение экспрессии гена p21/Waf1 при воздействии NaBu оценивали по уровню мРНК p21/Waf1 до и после воздействия в течение 24 ч ингибитором деацетилаз. Для этого общую РНК выделяли из 2 млн клеток с помощью набора Gene JETRNA Purification Kit (Thermo Scientific, США) с добавлением ДНКазы-1 (Thermo Scientific, США) для деградации геномной ДНК, а обратную транскрипцию осуществляли с помощью набора «Синтез первой цепи кДНК» (Sileks, Финляндия) и олиго(дТ) праймеров в соответствии с протоколами производителей. Реакционная смесь для ПЦР является однократным трисовым буфером для Taq-полимеразы (рН 8.6) и содержит хлорид магния (1 ммоль/л), Taq-полимеразу (0.05 ед./мкл) (Sileks, Финляндия), 250 мкмоль/л каждого dNTP, 300 нмоль/л прямого и обратного праймеров, 300 нмоль/л флуоресцентно меченного зонда (Синтол, Россия) и 2 мкг кДНК. Конструкции праймеров и флуоресцентно меченных зондов для идентификации экспрессии гена p21/Waf1 приведены в табл. 1. Реакцию проводили в 50 мкл смеси на детектирующем амплификаторе ДТ-322 в течение 45 циклов. На каждом цикле денатурацию двунитевой ДНК осуществляли при 95 °С в течение 15 с, а отжиг праймеров и амплификацию — при 60 °С в течение 1 мин. Транскрипционный уровень гена p21/Waf1 нормировали на транскрипционный уровень гена GAPDH. Определение пороговых циклов и расчет относительных транскрипционных уровней исследуемых генов производили с помощью программы RealTime PCRv7.3 (НПО ДНК-Технология, Россия).

Изменения экспрессии генов p53 и p21/Waf1 оценивали также по уровню содержания белков TP53 и p21/Waf1, выявляемого с помощью иммуноферментного анализа электрофоретически разделенных и иммобилизованных на PVDF мембране белков исследуемых клеток. Для этого клетки (1—2·10<sup>6</sup>), инкубируемые с NaBu, анти-P53—siРНК, со смесью анти-P53—siРНК и NaBu, а также контрольные, снимали раствором Версена/Трипсина, дважды промывали раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ), подсчитывали число клеток в каждой пробе для дальнейшего выравнивания нагрузки дорожек, инкубировали при 4 °С в течение 30 мин с лизирующим буфером (10 мМ Tris-HCl, рН 7.4, 0.1 % Triton X-100, 5 мМ

Таблица 2

Последовательности праймеров для амплификации фрагментов гена *TP53*

Эзоны	Прямой праймер	Обратный праймер	Длина фрагмента, н. п.
5—6	CTTGTGCCCTGACTTTCA	CCCTACTGCTCACCTGGA	498
7	GAGCTGAGATCACGCCA	CAAACACGCACCTCAA	637
8—9	CAAGGGTGGTTGGGAGTA	GCATTTTGAGTGTTAGACTGGA	462

PMSF, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 ед./мл ДНКазы I и 20 mM β-меркаптоэтанол), полученные клеточные лизаты кипятили в стандартном буфере для нанесения (0.25 M Tris, pH 6.8, 8 % SDS, 40%-ный глицерин, 20%-ный β-меркаптоэтанол и 0.2%-ный бромфеноловый синий) в течение 5 мин. Электрофоретическое разделение белков проводили в 10%-ном полиакриламидном геле, содержащем 0.1 % SDS, с последующим переносом белков на мембрану PVDF. После переноса мембрану вымачивали в метаноле (10 с) и белки окрашивали инкубацией в 0.1%-ном растворе Кумасси R в 30%-ном метаноле, содержащем 10%-ную уксусную кислоту (1 мин) и дважды промывали в 50%-ном метаноле (1 мин). Визуализированные на мембране белки позволяют оценить эффективность переноса и нагрузку дорожек. Мембрану полностью высушивали для последующего иммунодетектирования без интенсивного фона. Визуализацию белков TP53, TP53-Ас и p21/Waf1 на мембране осуществляли с помощью моноклональных антител (mouse antiP53, mouse antiP53-Ас-382K, Sigma, США; mouse antiP21, Upstate), используя метод Голубой Сухой Вестерн (Naryzhny, 2009). В качестве дополнительного контроля выравнивания нагрузки дорожек использовали метод Брэдфорд для определения концентрации тотального белка в лизатах исследуемых клеток, при этом количество общего белка составляло 20—40 мкг на дорожку и было одинаковым для клеток каждого типа внутри одного опыта.

Система РНК-интерференции для подавления экспрессии гена *TP53*. Подавление экспрессии гена *TP53* проводили с помощью трансфекции коротких интерферирующих молекул РНК (анти-P53—siРНК) через 24 ч после посева клеток в планшеты, при этом количество клеток составляло приблизительно 10<sup>4</sup> на лунку. Трансфекцию анти-P53—siРНК (ON-TARGET-plus SMARTpool, Dharmascon, США) в концентрации 100 нМ в трансфекционном буфере (Dharmascon, США) проводили с использованием липофектамина (Dharmascon-FECT, США) по методике, предложенной фирмой-производителем. С учетом возможной токсичности липофектамина в каждый опыт включали отрицательный контроль трансфекции без siРНК. Добавление NaBu к трансфицированным анти-P53—siРНК и контрольным клеткам осуществляли во временном промежутке, определяемом для каждой линии клеток отдельно и соответствующем максимальному подавлению экспрессии гена *TP53* в данном типе клеток (24—72 ч). По истечении 24 ч комбинированной инкубации с NaBu и анти-P53—siРНК опытные и контрольные клетки переводили в суспензию раствором Версена/Трипсина и лизировали для дальнейшего анализа уровня исследуемых белков.

Выявление мутаций в ДНК связывающем домене гена *TP53*. ДНК из злокачественно трансформированных клеток выделяли по методикам, описанным ранее (Вострухина и др., 2004). Концентрацию и ка-

чество выделенной ДНК контролировали с помощью спектрофотометра и электрофореза в агарозе. ДНК *TP53* амплифицировали в виде трех перекрывающихся фрагментов, захватывающих экзоны 5—9, с использованием набора праймеров, последовательности которых представлены в табл. 2. ПЦР проводили в объеме 50 мкл с использованием набора для амплификации ДНК с Taq-полимеразой (Promega, США) по протоколу фирмы-производителя. Продукты ПЦР очищали электрофорезом в агарозном геле и секвенировали с тех же праймеров в двух направлениях.

## Результаты

Мутационный профиль ДСД гена *TP53* в исследуемых клеточных линиях. Исследовали ряд клеточных линий на наличие мутаций в ДСД гена *TP53*. Следует заметить, что некоторые из них (MCF-7, HeLa и HT-1080) представляют собой стандартные клеточные модели с описанным как дикий тип статусом *TP53* (IARCTP53 database, <http://www-p53.iarc.fr>; UMDP53 MutationsDatabase, <http://www.umd.be:2072/>). Однако, так как некоторые анализируемые клетки представляют собой первичные опухолевые культуры глиального происхождения, клеточная линия ECV-304 не представлена в базах описанных мутаций *TP53*, а вышеупомянутые стандартные клеточные линии ведутся в лаборатории в течение нескольких десятков лет, ДНК клеток всех описываемых линий секвенировали на протяжении экзонов 5—9, кодирующих центральный домен связывания белка TP53 с ДНК, с целью выявить возможные генетические нарушения *TP53*. В 60 % случаев (3/5) были выявлены мутации гена *TP53* (табл. 3), что в целом согласуется с представленными ранее результатами других авторов по частоте встречаемости генетических нару-

Таблица 3

Мутации *TP53* в злокачественно трансформированных клеточных культурах

Линия	Статус <i>TP53</i>	Экзон	Нуклеотидная (аминокислотная) замена
HT-1080	wt <sup>a</sup>	5—9	Нет
MCF-7	mut <sup>b</sup>	8	797G_A (G266E)
HeLa	wt	5—9	Нет
ECV-304	mut	5	378C_G (Y126X)
Гл-Т	mut	7	733G_A (G245S)
Гл-В	del <sup>b</sup>	5—9	Нет

Примечание. <sup>a</sup>wt — ген *TP53* дикого типа; <sup>b</sup>mut — ген *p53* с выявленной мутацией; <sup>c</sup>del — делеция фрагмента ДНК.

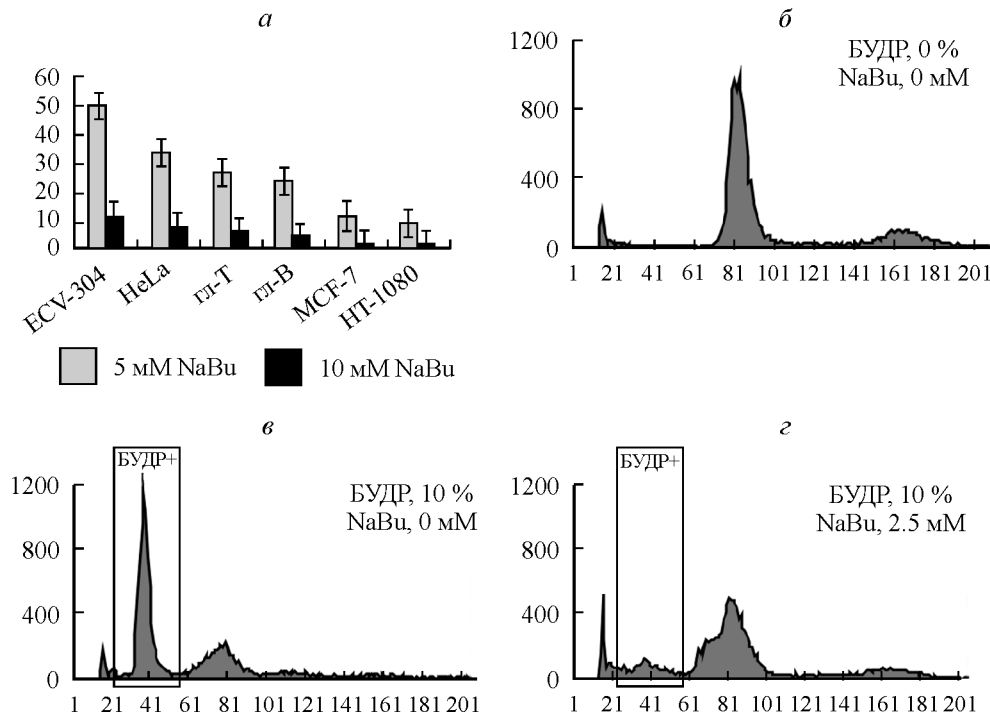


Рис. 1. Пролиферативная активность (а) и параметры клеточного цикла (б—г) трансформированных клеток человека при действии NaBu.

а — выживаемость клеток линий MCF-7, глиомы-Т (гл-Т), HT-1080, глиомы-В (гл-В), ECV-304 и HeLa, культивируемых в присутствии NaBu в концентрациях 5 и 10 мМ в течение 72 ч; б—г — параметры цикла клеток линии гл-Т, культивируемых при стандартных условиях (б), через 48 ч после инкубации с 10 % БУДР (в), после культивирования в присутствии NaBu (2,5 мМ) и 10 % БУДР в течение 48 ч (г). б—г: по оси абсцисс — номер цикла счетчика клеток; по оси ординат — интенсивность флуоресценции, отн. ед. Рамкой отмечены пики, соответствующие БУДР-положительным клеткам (БУДР+).

шений TP53 (Petitjean et al., 2007). Кроме того, в клетках линии глиома-В (гл-В) выявили делецию TP53 (табл. 3), что определялось по невозможности амплифицировать ни один из фрагментов гена TP53, при наличии положительных контролей амплификации ДНК по локусам, картированным на других хромосомах (данные не представлены).

Пролиферативная активность и параметры клеточного цикла трансформированных клеток человека при изменении общего уровня ацетилирования с помощью NaBu. Влияние NaBu на пролиферацию клеток линий HT-1080, MCF-7, гл-В, глиомы-Т (гл-Т), HeLa и ECV-304 оценивали по числу жизнеспособных клеток, выявляемых после инкубации с ингибитором в концентрациях 5 и 10 мМ в течение различных промежутков времени. Обнаружено, что NaBu с разной эффективностью подавляет пролиферацию злокачественно трансформированных клеток человека, а при длительной инкубации приводит к их гибели. На рис. 1, а представлены данные о выживаемости клеток, инкубированных с NaBu в концентрациях 5 и 10 мМ в течение 72 ч. После культивирования в присутствии NaBu (5 мМ) выживаемости клеток линий HT-1080, MCF-7, гл-В, гл-Т, HeLa и ECV-304 составили 8, 11, 24, 25, 32 и 50 % соответственно. При повышении концентрации NaBu до 10 мМ наблюдали значительное снижение жизнеспособности исследуемых клеток до 0,03, 0,04, 3, 5, 7 и 11 % соответственно. Данные по влиянию NaBu на пролиферацию трансформированных клеток, полученные при оценке выживаемости, согласуются с результатами, полученными методом проточной цитометрии (рис. 1, б—г), из которых видно, что подавление пролиферации в

опухолевых клетках при действии NaBu связано с появлением выраженного блока клеточного цикла на границе фаз G<sub>1</sub>/S. Так, например, для линии гл-Т доля БУДР-положительных клеток (БУДР+), т. е. прошедших в течение 48 ч полный клеточный цикл, составляет около 55 % в отсутствие NaBu (рис. 1, в) и значительно снижена до 9 % при добавлении NaBu в среду для культивирования (рис. 1, г). Однако полученные данные о выживаемости клеток исследованных линий, а также наблюдаемые во всех типах клеток блоки клеточного цикла при воздействии NaBu не позволяют проследить какую-либо зависимость этих параметров от наличия в клетке белка TP53 дикого типа или мутантного белка. Тем не менее эти результаты не исключают возможности участия TP53, в том числе и с генетическими нарушениями в соответствующем гене TP53, в активации транскрипции генов, ответственных за блок клеточного цикла G<sub>1</sub>/S и подавление пролиферации клеток при воздействии ингибитором гистоновых деацетилаз NaBu.

Уровень белка TP53 и его активация как транскрипционного фактора при обработке клеток NaBu. Исследование экспрессии белка TP53 проводили в лизатах клеток через 24 ч после обработки NaBu в концентрации 10 мМ. Во всех исследованных клеточных культурах наблюдали изменение уровня белка TP53, причем в большинстве линий в сторону его уменьшения. На рис. 2, а представлены результаты иммуноблоттинга клеточных лизатов, иллюстрирующие изменения уровня белка TP53 после инкубации клеток с NaBu в течение 24 ч. Так как наблюдаемое снижение уровня TP53 отличается от ситуации, обычно возникающей при обработке клеток повреждающими ДНК агентами, мы прове-

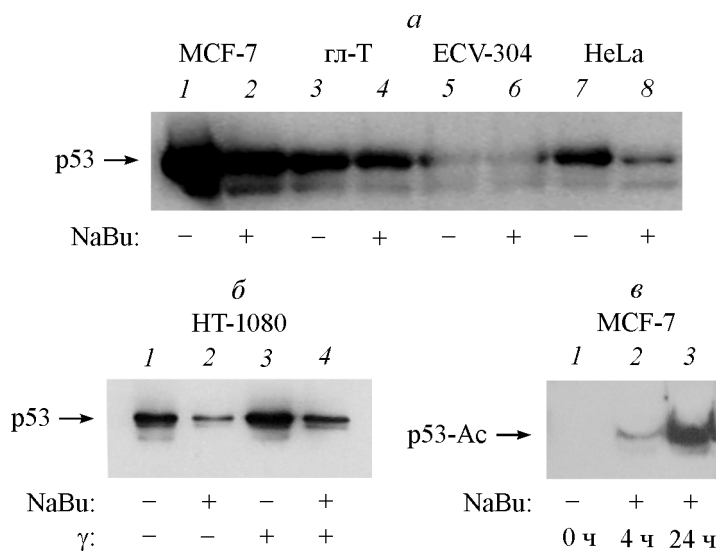


Рис. 2. Иммунодетекция белка TP53 в лизатах клеток различных линий.

*а* — линии MCF-7, глиомы-T (гл-T), ECV-304 и HeLa, культивируемые при стандартных условиях и в присутствии NaBu (10 мМ, 24 ч); *б* — линия HT-1080, культивируемая при стандартных условиях, через 2 ч после облучения ионизирующим излучением (10 Гр), после культивирования в присутствии NaBu (10 мМ, 24 ч) и после комбинированного воздействия NaBu и  $\gamma$ -облучения; *в* — иммуноблоттинг лизатов клеток MCF-7 с антителами, узнающими ацетилированные остатки лизина в положении 382 белка TP53, до (дорожка 1) и после инкубации клеток в присутствии NaBu (10 мМ) в течение 4 (дорожка 2) и 24 (дорожка 3) ч.

рили изменение уровня белка TP53 при воздействии на клетки, несущие TP53 дикого типа, ионизирующим излучением. Во всех экспериментах доза облучения составляла 10 Гр ( $^{137}\text{Cs}$ ) и время инкубации после облучения — 2 ч. Выбранные условия соответствуют условиям, принятым в литературе (Kastan et al., 1991). В клетках, экспрессирующих дикий тип гена TP53, наблюдали увеличение уровня белка TP53 после воздействия ионизирующего излучения (рис. 2, *б*). Таким образом, мы продемонстрировали возможность как увеличения, так и уменьшения уровня белка TP53 в зависимости от использованного индуктора его активности.

Поскольку NaBu является ингибитором деацетилаз, можно предположить увеличение уровня ацетилированных белков, в том числе и TP53, в клетках, подвергшихся инкубации с этим препаратом. Для проверки этой гипотезы мы использовали антитела, специфичные к ацетилированному TP53 по лизину в положении 382. Результаты, представленные на рис. 2, *в*, демонстрируют увеличение количества ацетилированного TP53 в клетках, инкубированных в присутствии NaBu. Известно, что наряду с другими посттрансляционными модификациями ацетилирование в С-концевых участках TP53 может приводить к позитивной модуляции его активности (Marouso et al., 2013). Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что NaBu активирует TP53.

Результатом активности TP53 как фактора транскрипции является индукция экспрессии ряда генов-мишеней. Для подтверждения активации TP53 как транскрипционного фактора в ответ клетки на воздействие ингибитором деацетилаз мы проводили определение белкового продукта одной из мишеней TP53, а именно белка p21/Waf1 (Nakamura, 2004). Во всех клеточных линиях, за исключением клеток линии гл-B, в которой ген TP53 делетирован, экспрессия p21/Waf1 контрольных клеток не определялась или детектировалась на базальном уровне, но появлялась после инкубации исследуемых клеток с NaBu в течение 24 ч (рис. 3, *а*). Наблюдаемое увеличение уровня белка p21/Waf1 напрямую связано с активацией

транскрипции гена p21/Waf1, о чем свидетельствуют результаты сравнительной оценки количества мРНК данного гена до и после инкубации клеток в присутствии NaBu (рис. 3, *б*).

Дополнительным доказательством связи активации онкосупрессора TP53 с индукцией экспрессии гена p21/Waf1 в клетках, подвергнутых воздействию ингибитора гистоновых деацетилаз, могут служить эксперименты по нокдауну гена TP53. Для разрешения этого вопроса мы использовали систему РНК-интерференции, временно подавляя экспрессию гена TP53 в исследуемых клетках и при этом наблюдая экспрессию гена p21/Waf1 после воздействия NaBu. Введение NaBu в культуральную среду клеток, трансфицированных анти-TP53—siРНК, и контрольных клеток осуществляли во временном промежутке (24—72 ч), определяемом для каждой линии клеток отдельно и соответствующем максимальному подавлению экспрессии гена p53 в данном типе клеток (рис. 3, *в*, дорожка 2). По истечении 24 ч комбинированной инкубации с NaBu и анти-TP53—siРНК в опытных и контрольных клетках анализировали уровень белка p21/Waf1 и его транскрипционного активатора TP53. В подавляющем большинстве исследованных клеток повышенную экспрессию гена p21/Waf1 наблюдали только в клетках, обработанных NaBu в течение 24 ч (рис. 3, *в*, дорожка 3). При этом не было зафиксировано повышенного уровня белка p21/Waf1 в клетках линий HeLa, HT-1080, ECV-304 и гл-T, инкубированных с NaBu на фоне подавления экспрессии TP53 с помощью системы РНК-интерференции (рис. 3, *в*, дорожка 4). Клетки линии MCF-7, в которых не удалось значительно снизить уровень TP53 при трансфекции анти-TP53—siРНК, демонстрировали повышенный уровень белка p21/Waf1 как в клетках, обработанных только NaBu, так и в клетках, обработанных комбинацией NaBu и анти-TP53—siРНК, однако в последних индукция негативного регулятора клеточного цикла p21/Waf1 была несколько снижена (данные не представлены).

В целом результаты, полученные на фоне подавления экспрессии TP53 с помощью РНК-интерференции,

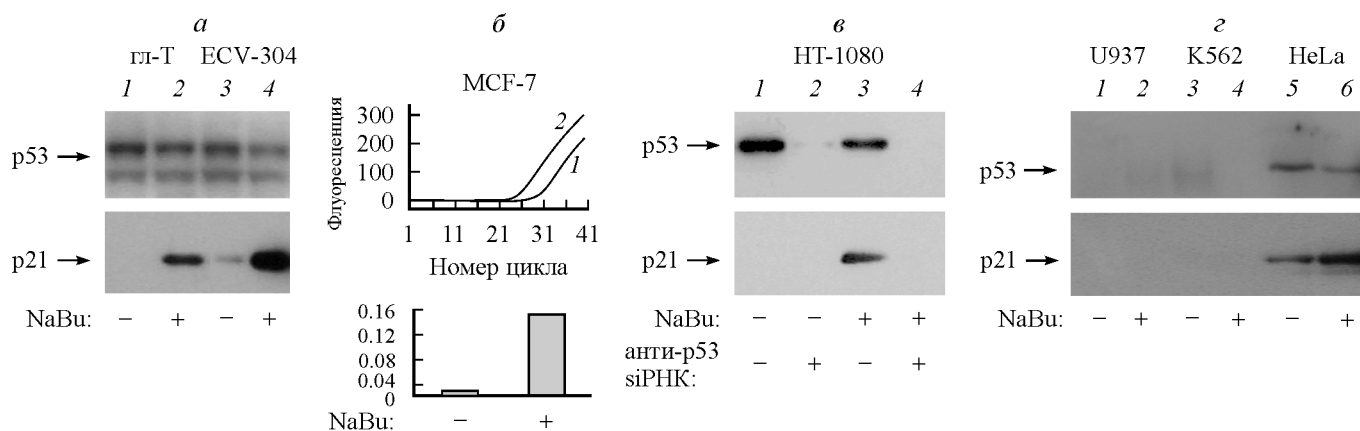


Рис. 3. Экспрессия генов *TP53* и *p21/Waf1* в различных клеточных культурах при воздействии NaBu.

*а* — иммунодетекция белков TP53 и p21/Waf1 в линиях глиома-Т (Гл-т) и ECV-304 до (дорожки 1, 3) и после введения NaBu (10 мМ) в культуральную среду (дорожки 2, 4). *б* — увеличение транскрипции гена *p21/Waf1* после инкубации клеток линии MCF-7 с NaBu в течение 24 ч. Кинетические кривые амплификации кДНК гена *p21/Waf1* до (кривая 1) и после (кривая 2) воздействия ингибитора деацетилаз (верхняя панель). Отношение транскрипционных уровней генов *p21/Waf1* и *GAPDH* в присутствии NaBu (нижняя панель). *в* — иммуноблоттинг линии HT-1080 после культивирования в нормальных условиях (дорожка 1), инкубации в присутствии анти-P53—siPHK (дорожка 2), NaBu (10 мМ) (дорожка 3) и их комбинации (дорожка 4). *з* — иммунодетекция TP53 и p21/Waf1 в клеточных лизатах линий U-937, K-562 и HeLa до (дорожки 1, 3, 5) и после введения NaBu (10 мМ) в культуральную среду (дорожки 2, 4, 6).

позволяют предположить активацию онкосупрессора TP53 как транскрипционного фактора в трансформированных клетках человека при воздействии на них ингибитором гистоновых деацетилаз NaBu. Для однозначного подтверждения TP53-зависимой индукции p21/Waf1 при обработке клеток NaBu мы исследовали экспрессию p21/Waf1 в клетках линий K-562, U-937 и гл-В. Линии K-562 и U-937, по данным литературы, относятся к линиям условно TP53-null, т. е. не экспрессирующим полноразмерный функциональный белок TP53 ([http://p53/free.fr](http://p53.free.fr)). Линия гл-В, проанализированная в этой работе на наличие мутаций в гене *TP53*, была охарактеризована как истинная TP53-null новая перевиваемая клеточная линия глиального происхождения. Во всех исследованных культурах, не экспрессирующих TP53, не было обнаружено индукции p21/Waf1 при инкубации клеток в присутствии NaBu (рис. 3, з), что свидетельствует о зависимости такой индукции от наличия в клетке функционального TP53.

## Обсуждение

В последние годы, наверное, ни один другой белок не изучался так интенсивно, как TP53. За более чем треть века с момента его открытия TP53 было посвящено более 40 000 научных работ, и их число продолжает расти. Поразительным образом функция TP53 оказывалась связанной с механизмами распознавания и проведения сигналов внутри клетки, репарации генома, регуляции клеточных деления и гибели, координации метаболических процессов и регулировании взаимодействий между клетками, причем связи поддерживались на многих уровнях, образуя единую регуляторную сеть (Желтухин, Чумаков, 2010). На ранних этапах изучения индукции TP53 было установлено, что активность TP53 появляется в ответ на повреждение ДНК (Kastan et al., 1991; DiLeonardo et al., 1994).

Однако при дальнейших исследованиях выяснилось, что существует множество альтернативных механизмов индукции TP53 как в ответ на различные типы генотокси-

ческих воздействий, так и при состояниях, непосредственно не влияющих на ДНК (Желтухин, Чумаков, 2010). Ингибиторы гистоновых деацетилаз не являются прямыми ДНК-повреждающими агентами. Известно, что NaBu способен вызывать остановку клеточного цикла, апоптоз или ускоренное старение в различных типах опухолевых клеток *in vitro* (Romanov et al., 2010; Штам и др., 2012; Sossai, 2012). Кроме того, в большинстве работ, касающихся молекулярных аспектов действия ингибиторов деацетилаз, показана значительная индукция p21/Waf1 — наиболее известной транскрипционной мишени TP53 (Rocchi et al., 2005; Romanov et al., 2010). Тем не менее роль TP53 в индукции основного регулятора блоков клеточного цикла остается до сих пор дискуссионной, а оказываемый ингибиторами деацетилаз антипролиферативный эффект не связывается с TP53 или эта связь полагается косвенной.

Так, ряд работ демонстрирует отсутствие изменений уровня экспрессии гена *TP53* при воздействии различными ингибиторами деацетилаз, и подобные наблюдения приводят авторов к выводу о минорном или узком тканеспецифичном участии белка TP53 в клеточном ответе на этот класс противораковых препаратов (Condorelli et al., 2007). В то же время существуют некоторые указания на участие TP53 в реализации клеточного ответа на изменение общего уровня ацетилирования в клетке (Takitomo et al., 2005). В некоторых работах показано, что ингибиторы деацетилаз поддерживают ацетилирование не только гистонов, но и негистоновых белков, в том числе белок TP53 подвергается ацетилированию по лизиновым остаткам в положениях 320, 373 и 382 (Terui et al., 2003; Vandyopadhyay et al., 2004). Такие ковалентные модификации в С-концевых участках TP53 приводят к нейтрализации ингибирующего действия С-концевого сегмента, модуляции активности TP53 и изменением его внутриклеточной локализации (Marouco et al., 2013). Кроме того, за счет модификаций TP53 происходит изменение как его способности взаимодействовать с коактиваторами и корепрессорами транскрипционного аппарата, так и предпочтений в связывании с TP53-респонсивными элементами тех или иных генов (Marouco et al., 2013).

В этой работе на ряде клеточных культур различного тканевого происхождения мы продемонстрировали активацию TP53 при воздействии ингибитором деацетилаз — NaBu. Наши результаты показывают, что, несмотря на неизменность или даже некоторое понижение уровня TP53 в клетках всех исследованных линий, NaBu активирует TP53 как транскрипционный фактор, способствуя индукции p21/Waf1 — одного из основных регуляторов клеточного цикла. Наблюдаемое ацетилирование белка TP53, вызванное снижением уровнем деацетилаз в клетке, вероятно, увеличивает способность TP53 связываться с ДНК и его трансактивационную активность. Более того, в этой работе использование системы РНК-интерференции и клеточных культур, не экспрессирующих TP53, позволило достаточно убедительно продемонстрировать TP53-зависимую индукцию p21/Waf1 в клетках, подвергшихся воздействию NaBu. Выявленная активация TP53 как транскрипционного фактора при воздействии NaBu в исследованных клетках, имеющих мутации в гене TP53, вступает в некоторое противоречие с устоявшимися положениями о возможности такой активации в клетках с генетическими нарушениями в ДНК-связывающем домене гена TP53 (Olivier et al., 2010). По данным Международного агентства исследования рака (IARC), сформировавшего базу данных мутаций гена TP53, преобладающая доля aberrаций TP53 представлена миссенс-мутациями (75 %) в ДНК-связывающем домене, приводящими к аминокислотным заменам в белке TP53 и ингибированию его связывания с генами-мишенями (Petitjean et al., 2007). Представленные в этой работе данные о TP53-зависимой индукции p21/Waf1 при воздействии NaBu приводят к заключению о возможности активного функционирования белка TP53 даже в клетках, несущих генетические нарушения в ДСД гена TP53.

В итоге, основываясь на результатах наших экспериментов, можно говорить, что NaBu, будучи ингибитором деацетилаз, активирует TP53 через ацетилирование лизиновых остатков, при этом наличие мутаций в ДСД TP53 не оказывает существенного влияния на активность TP53 как транскрипционного фактора.

### Список литературы

- Букреева Е. И., Аксенов Н. Д., Бардин А. А., Поспелов В. А., Поспелова Т. В. 2009. Действие ингибитора гистоновых деацетилаз на трансформанты E1A + cHa-Ras, экспрессирующие p53 дикого типа с подавленной трансактивирующей активностью. Цитология. 51 (8) : 697—705. (Bukreeva E. I., Aksenov N. D., Bardin A. A., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 2009. Effect of histone deacetylase inhibitor sodium butyrate (NaBu) on transformants E1A+cHa-Ras expressing wild type p53 with suppressed transactivation function Cell Tissue Biol. 3 (5) : 445—453.)
- Вострухина О. А., Штам Т. А., Мохова Н. В., Ченик О. Ф., Гуляев А. В., Ланцов В. А. 2004. Уровень нестабильности микросателлитов и мутации гена p53 в карциномах желудочно-кишечного тракта человека. Экол. генет. 4 : 22—26. (Vostryuhina O. A., Shtam T. A., Mokhova N. V., Chepik O. F., Gulyaev A. V., Lanzov V. A. 2004. The level of instability of microsatellites and p53 gene mutation in carcinomas of the gastrointestinal tract of man. Ecol. Genet. 4 : 22—26.)
- Желтухин А. О., Чумаков П. М. 2010. Повседневные и индуцируемые функции гена p53. Успехи биол. хим. 50 : 447—516. (Zheltukhin A. O., Chumakov P. M. 2010. Casual and inducible p53 gene function. Successes of biol. chem. 50 : 447—516.)
- Ковалев Р. А., Штам Т. А., Ибатуллин Ф. М., Бондарев Г. Н., Филатов М. В. 2012. Возможности противоопухолевой терапии эпигенетической направленности на моделях in vitro. Вопр. онкол. 58 (6) : 800—8007. (Kovalev R. A., Stam T. A., Ibatulin F. M., Bondarev G. N., Filatov M. V. 2012. Possibilities of epigenetic anti-tumor therapy in vitro models. Voпр. Onkol. 58 (6) : 8000—8007.)
- Чумаков П. М. 2007. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. Успехи биол. хим. 47 : 3—52.
- Штам Т. А., Виноградская Г. П., Волницкий А. В., Ковалев Р. А., Семенова Е. В., Филатов М. В. 2012. Эпигенетическая регуляция функционирования некоторых онкогенов и возможности ее практического использования. Клинико-лабораторный консилуим. 1 (41) : 53—59.
- Bandyopadhyay D., Mishra A., Medrano E. 2004. Overexpression of histone deacetylase 1 confers resistance to sodium butyrate-mediated apoptosis in melanoma cells through a p53-mediated pathway. Cancer Res. 64 (21) : 7706—7710.
- Brochier C., Dennis G., Riviaccio M. A., McLaughlin K., Coppola G., Ratan R. R., Langley B. 2013. Specific acetylation of p53 by HDAC inhibition prevents DNA damage-induced apoptosis in neurons. J. Neurosci. 33 (20) : 8621—8632.
- Brosh R., Rotter V. 2009. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. Nat. Rev. Cancer. 9 : 701—713.
- Condorelli F., Gnemmi L., Vallario A., Genazzani A. A., Canonico P. L. 2007. Inhibitors of histone deacetylase (HDAC) restore the p53 pathway in neuroblastoma cells. Br. J. Pharmacol. 153 (4) : 657—668.
- Di Leonardo A., Linke S. P., Clarkin K., Wahl G. M. 1994. DNA damage triggers a prolonged p53-dependent G<sub>1</sub> arrest and long-term induction of Cip1 in normal human fibroblasts. Genes Develop. 8 : 2540—2551.
- Filatov M. V., Pantina R. A., Noskin L. A. 1998. Methods for registration of spontaneous DNA instability in mammalian cells. Mut. Res. 403 : 1195—1201.
- Kastan M. B., Onyekwere O., Sidransky D., Vogelstein B., Craig R. W. 1991. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res. 51 : 6304—6311.
- Liu G., Chen X. 2006. Regulation of the p53 transcriptional activity. J. Cell. Biochem. 97 : 448—458.
- Marouco D., Garabadgiu A. V., Melino G., Barlev N. A. 2013. Lysine-specific modifications of p53: a matter of life and death? Oncotarget. 4 (10) : 1556—1571.
- Nakamura Y. 2004. Isolation of p53-target genes and their functional analysis. Cancer Sci. 95 : 7—11.
- Naryzhny S. N. 2009. Blue Dry Western: simple, economic, informative, and fast way of immunodetection. Anal. Biochem. 392 (1) : 90—95.
- Oh E. T., Park M. T., Choi B. H., Ro S., Choi E. K., Jeong S. Y., Park H. J. 2012. Novel histone deacetylase inhibitor CG200745 induces clonogenic cell death by modulating acetylation of p53 in cancer cells. Invest. New Drugs. 30 (2) : 435—442.
- Olivier M., Hollstein M., Hainaut P. 2010. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2 (1) : a001008.
- 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. 6 : 622—629.
- Raycroft L., Wu H. Y., Lozano G. 1990. Transcriptional activation by wild-type but not transforming mutants of the p53 anti-oncogene. Science. 249 : 1049—1051.
- Rocchi P., Tonelli R., Camerin C., Purgato S., Fronza R., Bianucci F., Guerra F., Pession A., Ferreri A. M. 2005. p21/Waf1/Cip1 is a common target induced by short-chain fatty acid HDAC inhibitors (valproic acid, tributyrin and sodium butyrate) in neuroblastoma cells. Oncol. Rep. 13 (6) : 1139—1144.
- Romanov V. S., Abramova M. V., Svetlikova S. B., Bykova T. V., Zubova S. G., Aksenov N. D., Fornace A. J., jr., Pospelova T. V., Pospelov V. A. 2010. p21 (Waf1) is required for cellular senescence but not for cell cycle arrest induced by the HDAC inhibitor sodium butyrate. Cell Cycle. 9 (19) : 3945—3955.

Sossai P. 2012. Butyric acid: what is the future for this old substance? *Swiss Med. Wkly.* 142 : w13596.

Takimoto R., Kato J., Terui T., Takada K., Kuroiwa G., Wu J., Ohnuma H., Takahari D., Kobune M., Sato Y., Takayama T., Matsunaga T., Niitsu Y. 2005. Augmentation of antitumor effects of p53 gene therapy by combination with HDAC inhibitor. *Cancer Biol. Ther.* 4 (4) : 421—428.

Terui T., Murakami K., Takimoto R., Takahashi M., Takada K., Murakami T., Minami S., Matsunaga T., Takayama T., Kato J., Niitsu Y. 2003. Induction of PIG3 and NOXA through acetylation of p53 at 320 and 373 lysine residues as a mechanism for apoptotic cell death by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res.* 63 (24) : 8948—8954.

Vogelstein B., Lane D., Levine A. J. 2000. Surfing the p53 network. *Nature.* 408 : 307—310.

Vousden K. H., Prives C. 2009. Blinded by the light: the growing complexity of p53. *Cell.* 137 : 413—431.

Yoo C. B., Jones P. A. 2006. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5 (1) : 37—50.

Zhao Y., Lu S., Wu L., Chai G., Wang H., Chen Y., Sun J., Yu Y., Zhou W., Zheng Q., Wu M., Otterson G. A., Zhu W. G. 2006. Acetylation of p53 at lysine 373/382 by the histone deacetylase inhibitor depsipeptide induces expression of p21(Waf1/Cip1). *Mol. Cell. Biol.* 26 (7) : 2782—2790.

Поступила 21 XI 2014

#### HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS CAUSE THE TP53-DEPENDENT INDUCTION OF p21/Waf1 IN TUMOR CELLS CARRYING MUTATIONS IN TP53

R. A. Kovalev,<sup>1</sup> T. A. Shtam,<sup>1</sup> D. V. Karelov,<sup>1,2</sup> V. S. Burdakov,<sup>1,2</sup>  
A. V. Volnitskiy,<sup>1</sup> E. M. Makarov,<sup>3</sup> M. V. Filatov<sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Molecular and Radiation Biophysics, SFBI Petersburg Nuclear Physics Institute (National Research Center «Kurchatov Institute»), Gatchina,

<sup>2</sup>Department of Biophysics, St. Petersburg State Polytechnical University, and

<sup>3</sup>Division of Biosciences, Brunel University, London, Great Britain;

\* e-mail: fil53ster@gmail.com

p21/Waf1 protein is one of the main cell cycle arrest regulators and one of the most well-known transcriptional targets of TP53 protein. Here, we demonstrated the activation of expression of the p21/Waf1 gene when the cells were treated to sodium butyrate (NaBu) — one of the natural inhibitors of deacetylase, and investigated whether this phenomenon depends on the presence of functionally active TP53 protein. We compared the effect of the NaBu treatment on the human cell line with different TP53 mutation profile, including: wild-type TP53, single nucleotide substitutions, and the complete absence of TP53 gene. NaBu activated the TP53 protein via hyper acetylation at lysine residue K382, without significant changes in the level of protein expression. Western blotting demonstrated that the addition of NaBu triggers a significant increase in the p21/Waf1 protein level in both the TP53 wild-type cells and in the cells with single nucleotide substitutions in the domain responsible for the binding of TP53 protein to DNA. At the same time, no the p21/Waf1 protein induction was observed in the cells with complete deletion of the TP53 gene. However, NaBu was not able to induce the p21/Waf1 production when the expression of TP53 was transiently knocked down by the p53 siRNA. Overall, our results suggest that the NaBu-dependent induction of p21/Waf1 does require the presence of TP53 protein but unexpectedly it can occur regardless of mutational changes in the domain responsible for the TP53 binding to DNA. One of the hypothetical explanations is that NaBu increases the level of TP53 acetylation, and the modified protein is able to establish a new network of protein-protein interactions or trigger some conformational changes affecting the TP53-dependent transcriptional machinery even when its DNA binding ability is impaired.

**Key words:** HDAC inhibitors, sodium butyrate, TP53, p21/Waf1/Cip1, RNA interference, TP53 mutations.