

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРОВ ГИСТОНОВЫХ ДЕАЦЕТИЛАЗ НА РОЛЬ Gadd45 В РЕПАРАЦИИ ДНК

© М. В. Иготти,¹ Е. А. Филиппова, О. О. Гнедина, С. Б. Светликова

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: marie.igotti@gmail.com

Ингибиторы гистоновых деацетилаз (ИГД) вызывают необратимый блок клеточного цикла и старение трансформированных клеток E1A+Ras. ИГД бутират натрия (NaB) вызывает нарушение репарации ДНК и, как следствие, фосфорилирование маркера разрывов ДНК — гистона H2AX. Для белков семейства Gadd45 показана роль в регулировании пролиферации, апоптоза и репарации. В настоящей работе мы изучали влияние NaB на репарацию через модулирование белка Gadd45 α . Наши результаты, полученные с использованием Gadd45-дефицитных клеток, показали, что супрессия Gadd45 приводит к снижению эффективности репарации ДНК — как базальной, так и в присутствии NaB. Однако в экспрессирующих Gadd45 клетках подавление репарации NaB снижено, что, возможно, является следствием NaB-зависимого накопления Gadd45 в ядре и перераспределения его олигомерных форм. Вследствие этого происходит изменение характера взаимодействия Gadd45 с белками-партнерами, принимающими участие в регулировании пролиферации и репарации, что в свою очередь приводит к иницированию процессов восстановления поврежденной ДНК. Так, при действии NaB происходит усиление конкурентного взаимодействия p21/Waf1 с белком Gadd45, в результате чего снижается количество комплекса p21/Waf1 с PCNA, инактивирующего активность PCNA в репарации. Таким образом, в отсутствие Gadd45 происходит накопление разрывов ДНК вследствие сниженной эффективности репарации, тогда как индуцированная ИГД активация Gadd45 способствует восстановлению поврежденной ДНК. В условиях дефицита Gadd45 индуцированные генотоксическими агентами или ИГД повреждения ДНК не могут быть восстановлены, вследствие чего в трансформированных клетках Gadd45^{-/-} запускается программа апоптотической гибели.

Ключевые слова: Gadd45, ингибиторы гистоновых деацетилаз, репарация ДНК, онкогены E1A и cHa-ras, трансформированные клетки.

Принятые сокращения: ИГД — ингибиторы гистоновых деацетилаз (histone deacetylase inhibitors), NaB — бутират натрия, PCNA — proliferating cell nuclear antigen.

ИГД подавляют рост опухолевых клеток, вызывая остановку клеточного цикла, старение или апоптоз (Schrumpp, 2009). Последние данные указывают на связь ИГД и сигнальной системы ответа клетки на повреждения ДНК (DNA Damage Response, DDR), что приводит к увеличению чувствительности опухолевых клеток к действию ДНК-повреждающих агентов в присутствии ИГД. Подобно другим опухолевым клеткам, эмбриональные фибробласты грызунов, трансформированные онкогенами E1A и Ras (E1A+Ras), не останавливают деления при облучении или действии цитостатиков. Однако ранее мы показали, что ИГД способны вызывать остановку пролиферации трансформантов E1A+Ras и индуцировать старение (Abramova et al., 2006). Нами также показано, что при этом происходит накопление фосфорилированного гистона H2AX — маркера повреждений ДНК, что указывает на возможность нарушения процесса репарации в трансформантах E1A+Ras при действии ИГД (Abramova et al., 2011).

Существует ряд данных о роли ИГД в репарации ДНК. Так, ИГД способствуют репарации через релаксацию структуры хроматина вследствие ацетилирования гистонов и облегчения доступности области повреждения

ДНК для белковых факторов репарации. С другой стороны, известно, что ИГД подавляют ряд белков репарационного комплекса, таких как Ku70, Ku86 и RAD50 (Munshi et al., 2006; Lee et al., 2010).

Белки семейства Gadd45 (Growth Arrest and DNA Damage-inducible protein) описаны как клеточные сенсоры стрессорного воздействия. Транскрипция генов, кодирующих Gadd45, увеличивается при стрессе и действии ДНК-повреждающих агентов по p53-зависимому или p53-независимому механизму. Белки Gadd45 выполняют важную роль в регулировании клеточного цикла, выживания клеток, апоптоза и репарации ДНК. Они относятся к суперсемейству РНК-связывающих белков L7Ae/L30e/S12e и включают в себя три члена семейства — Gadd45 α , Gadd45 β и Gadd45 γ (Niehrs, Schafer, 2012). Хотя белки Gadd45 имеют много общего в строении и функциях, существуют различия в механизмах регуляции их активности и функций (Liebermann, Hoffman, 2003). В частности, ростовой фактор TGF β индуцирует экспрессию только Gadd45 β , при этом только Gadd45 α является мишенью для транскрипционного фактора p53 (Fornace et al., 1989; Kastan et al., 1992; Hollander et al.,

1993; Selvakumaran et al., 1994). Свои функции в клетке Gadd45 реализуют посредством взаимодействия с белками, вовлеченными в контроль клеточного цикла, репарации и апоптоза: PCNA (Smith et al., 1994), p21/Waf1 (Kearsey et al., 1995), Cdc2/cyclinB1 (Zhan et al., 1999), коровыми гистонами (Carrier et al., 1999), а также киназами MAP каскада MEKK4 (Takekawa et al., 1998) и стресс-киназой p38 (Liebermann et al., 2011; Tamura et al., 2012).

Мыши с инактивированным геном *gadd45* демонстрируют нестабильность генома, у них наблюдаются анеуплоидия, хромосомные aberrации и амплификации генов (Hollander et al., 1999). Поэтому Gadd45 отводят важную роль в поддержании геномной стабильности. Известно, что ингибирование Gadd45 приводит к снижению репарации ДНК в клетке, тогда как накопление Gadd45 способствует репарации (Marx, 1994). Данные Каррера с соавторами указывают на то, что Gadd45 распознает поврежденный хроматин и увеличивает доступность области повреждения для белков репарационного комплекса, а также облегчает функционирование топоизомеразы II (Carrier et al., 1999). Кроме того, белки семейства Gadd45 опосредуют деметилирование ДНК во время клеточной дифференциации и ответа на стресс (Niehrs, Schafer, 2012).

Известно, что белки семейства Gadd45 участвуют в эксцизионной репарации ДНК (NER/BER): они привлекают факторы репарации (оснований и(или) нуклеотидов) к специфическим областям гена и, действуя как адаптеры между репарационными факторами и хроматином, создают связь между эпигенетической регуляцией и репарацией ДНК (Niehrs, Schafer, 2012).

В настоящей статье мы изучали влияние ИГД на репарацию через модулирование белка Gadd45 α (в дальнейшем Gadd45). В трансформированных онкогенами клетках E1A+Ras ИГД подавляют репарацию ДНК, однако в присутствии Gadd45 степень снижения эффективности репарации меньше. Это происходит за счет того, что ИГД влияют на способность Gadd45 взаимодействовать с белками-партнерами, принимающими участие в регулировании пролиферации и репарации, что приводит к иницированию процессов восстановления поврежденной ДНК.

Материал и методика

Клеточные линии. Исследования проводили на линии стабильно трансформированных клеток, полученных из эмбриональных фибробластов мыши (Gadd45^{+/+} и нокаутированных по гену *gadd45*) путем переноса пары комплементирующих онкогенов *E1A* и *cHa-ras* (линии Gadd45^{+/+} и Gadd45^{-/-} соответственно). Клетки обрабатывали NaB (4 мМ) в течение 24—72 ч или генотоксическим агентом этопозидом (12.5 мкМ) в течение 40 мин. После воздействия клетки помещали в свежую среду и снимали для дальнейшего анализа через указанные на рисунках интервалы времени.

Распределение клеток по содержанию ДНК изучали методом проточной цитофлуориметрии. Клетки промывали раствором PBS (0.14 М NaCl, 2.7 мМ KCl, 6.5 мМ Na₂HPO₄ и 1.5 мМ KH₂PO₄, pH 7.2), пермезабелизировали сапонином (0.01 %) в течение 0.5 ч и многократно отмывали раствором PBS. Затем инкубировали клетки в присутствии РНКазы А (100 мкг/мл) и иодида пропидия (10 мкг/мл) 15 мин при 37 °С с последующим анализом на проточном цитофлуориметре Coulter Epicks XL (Bechman, США).

Иммунопреципитация. Для иммунопреципитации клетки лизировали в буфере, содержащем 10 мМ Трис-НСl, pH 7.4, 150 мМ NaCl, 0.5 % NP-40, 1 % Тритона X-100, а также коктейль ингибиторов протеаз, 1 мМ PMSF и ингибиторы фосфатаз (1 мМ ортованадата натрия, 5 мМ EGTA и 10 мМ фторида натрия). Клеточные лизаты иммунопреципитировали соответствующими антителами при 8 °С при постоянном перемешивании в течение 2 ч или ночи. К пробам добавляли суспензию протеин А-сефарозы и продолжали инкубировать еще 1 ч при 8 °С с перемешиванием. После инкубации преципитаты дважды промывали в буфере для выделения клеточных экстрактов с ингибиторами, доводили объем до 20 мкл, кипятили с буфером для проб (250 мМ Трис-НСl, pH 6.7, 6 % SDS, 20 % глицерина, 8 % 2-меркаптоэтанола и 0.25 % бромфенолового синего) и разделяли белковые комплексы электрофоретически в полиакриламидном геле (ПААГ).

Иммуноблоттинг белков. Клетки лизировали в PBS-буфере, содержащем 1 % NP-40, 0.5 % дезоксихолата натрия, 0.1 % додецилсульфата натрия (SDS), ингибиторы протеаз, фосфатаз (1 мМ ортованадата натрия, 5 мМ EGTA и 10 мМ фторида натрия) и 1 мМ PMSF. Белки разделяли электрофоретически в 8—12%-ном ПААГ и переносили на мембрану PVDF. Затем мембраны промывали в PBST (PBS с 0.5 % Tween 20) и инкубировали в течение 2 ч в 5%-ном обезжиренном молоке, приготовленном на PBST, а потом в течение ночи инкубировали в PBST, содержащем 1 % BSA и соответствующие специфические антитела, при 8 °С. Мембраны отмывали в PBST и инкубировали 1 ч при комнатной температуре в PBST с 5%-ным молоком, содержащим вторые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Белки на мембранах выявляли методом усиления хемилюминесценции (Thermo Sci., США) и экспонировали с рентгеновской пленкой при комнатной температуре. Использовали антитела против белков Gadd45 α (C20), PCNA (PC10), E1A (M73) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США), p21/Waf1 (Ab-6) (Calbiochem, США), Gapdh (14C10) (CellSignalling, США) и pan-Ras (Oncogene Sci., США).

Анализ транскрипции генов. Общую клеточную РНК выделяли гуанидинтиоционатным методом (Chomczynski et al., 1987). Реакцию обратной транскрипции (ОТ) проводили с использованием 3 мкг РНК и 1 мкг случайных гексапраймеров. Реакцию амплификации (ПЦР) проводили в присутствии всех необходимых компонентов, а также 100 нг соответствующих праймеров кДНК одного из генов мыши (*gadd45 α* : 5'-TGTTTCGTG-GCCTCTAAGATG-3'/5'-TCTGGAAGAAAGTG CTTG-3' (386 п. н.); *gapdh*: 5'-TGTGATGGGTGTGAACCA-CG-3'/5'-CCAGTGAGCTTCCCGTTCAG-3' (297 п. н.)).

ПЦР в пределах линейной амплификации фрагментов ДНК продолжалась в течение 25—32 циклов, каждый из которых включал в себя денатурацию при 95 °С в течение 1 мин, отжиг в течение 1 мин при 58 °С и полимеризацию при 72 °С (2 мин). Специфический продукт реакции анализировали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле на 40 мМ Трис-ацетатном буфере (pH 7.8). В качестве маркера использовали набор фрагментов ДНК, кратных 100 п. н. (Gibco BRL, США).

Иммунофлуоресценция. Клетки выращивали на покровных стеклах, фиксировали свежеприготовленным 3.7%-ным раствором формалина в течение 15 мин при комнатной температуре, отмывали в PBS в течение 10 и 15 мин в 0.15 М глицине. После фиксации проводи-

ли пермеабиллизацию в 0.2%-ном растворе Тритона X-100 15 мин и блокировали в 3%-ном растворе BSA на PBS в течение 1.5 ч. Окрашивание проводили антителами к *Gadd45α*, разведенными в блокирующем буфере, в течение ночи при 4 °С, после чего окрашивали вторичными антителами, сшитыми с флуоресцентным красителем Alexa Fluor, в течение 1 ч при комнатной температуре, одновременно окрашивая ядра 1 мМ Торго III. Анализ и фотографирование препаратов производили на флуоресцентном микроскопе DMR (Leica, Германия).

Метод ДНК-комет. Для изучения репарации проводили регистрацию повреждений ДНК на уровне одиночных клеток с помощью метода «ДНК-комет» (Olive, Vanath, 2006). Для этого одиночные клетки суспендировали в ледяном PBS в концентрации $(2-4) \cdot 10^4$ клеток на 1 мл среды. Затем 400 мкл суспензии (10^4 клеток) смешивали с 1.2 мл 1%-ного водного раствора легкоплавкой агарозы (37—40 °С). Наносили 1.2 мл получившейся смеси на матовое предметное стекло, предварительно покрытое 1%-ной агарозой. После полимеризации в течение 15 мин при комнатной температуре, а также 1 ч при 4 °С стекла помещали в лизирующий буфер (30 мМ NaOH, 1 М NaCl, pH 13.3 и 0.2%-ный саркозил). Проводили лизис в течение 15—18 ч при 4 °С. Препараты отмывали в двух сменах электрофорезного буфера (30 мМ NaOH и 2 мМ ЭДТА, pH 12.3) по 30 мин и проводили электрофорез при 9 В (19 мА) в течение 25 мин. Промывали стекла 5 мин в воде, красили 10 мин в 2.5 мкг/мл раствора PJ в H₂O, снова отмывали в воде 5 мин и анализировали с помощью микроскопа Axioscope (об. 10×). Для каждой экспериментальной точки анализировали 4—5 полей (около 300 клеток). Величину, обозначенную как момент хвоста Олив, определяли как произведение процентного содержания ДНК в «хвосте кометы» на соответствующее значение длины «хвоста кометы». Представлены усредненные результаты не менее трех экспериментов.

Реактивация транскрипции. Клетки рассеивали на 96-луночные плато в количестве 10^4 клеток на 1 ячейку, в среду без антибиотика и трансфицировали интактной плазмидной ДНК pGL3-luc (Promega, США) либо линейаризованной pGL3-luc, а также контрольным вектором pRL-TK с помощью реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) согласно инструкциям изготовителей. Спустя 24 ч после трансфекции клетки обрабатывали NaB. Для анализа активности люциферазы (RLU) и рениллы (RenillaRLU) клетки лизировали через 48—72 ч после трансфекции, используя набор Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega, США). Измерения проводили с помощью люцинометра TD-20/20 (Turner Designs, США) согласно инструкции фирмы-производителя. Активность люциферазы выравнивали путем деления значений RLU на RenillaRLU. Каждый эксперимент проводили не менее трех раз. На гистограммах приведены относительные величины, полученные путем деления средней относительной люциферазной активности, измеренной в клетках, трансфицированных поврежденной pGL3, на значения средней относительной люциферазной активности, измеренной в клетках, трансфицированных интактной pGL3.

Результаты и обсуждение

Роль белка *Gadd45* в ИГД-зависимой регуляции репарации ДНК. Для того чтобы исследовать роль *Gadd45* в ИГД-зависимой регуляции репарации

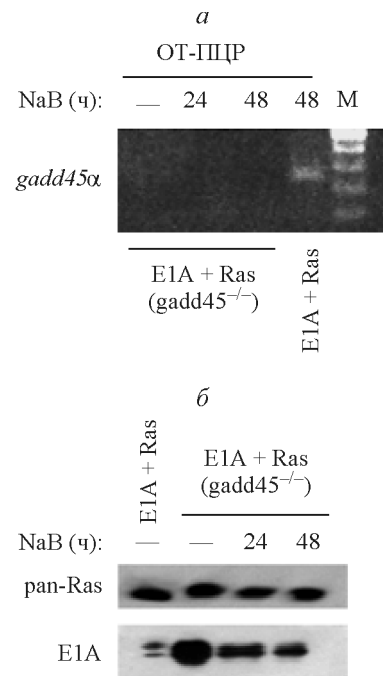


Рис. 1. Характеристика клеток *Gadd45*^{-/-} E1A+Ras.

a — ОТ-ПЦР-анализ мРНК из клеток *Gadd45*^{+/+} и *Gadd45*^{-/-} E1A+Ras с праймерами к гену *gadd45α*, демонстрирующий подавленную экспрессию гена *gadd45α* в *Gadd45*^{-/-}-трансформантах; *b* — иммуноблоттинг белков из клеток *Gadd45*^{+/+} и *Gadd45*^{-/-} с антителами к pan-Ras и E1A.

в трансформированных онкогенами клетках, мы использовали линию E1A+Ras трансформированных фибробластов, полученных из эмбрионов мышей с делецией гена *gadd45* (рис. 1).

Мы сравнили степень повреждения ДНК в клетках, экспрессирующих *Gadd45*, и в клетках с делецией *gadd45*. Анализируя разрывы ДНК с помощью метода электрофореза одиночных клеток в геле после щелочного лизиса (метод комет), мы показали, что в клетках *Gadd45*^{-/-} ДНК исходно содержит повышенное количество разрывов по сравнению с клетками *Gadd45*^{+/+} (рис. 2, *a*). Также после повреждения ДНК количество разрывов уменьшается в клетках *Gadd45*^{+/+} быстрее по сравнению с клетками *Gadd45*^{-/-}. Оценивали целостность ДНК спустя различные промежутки времени после действия генотоксического агента этопозида, который, ингибируя топоизомеразу, вызывает накопление двухнитевых разрывов ДНК. Метод комет показал, что в клетках *Gadd45*^{+/+} количество индуцированных разрывов сокращается быстрее, чем в клетках *Gadd45*^{-/-}, где определяемая из размера комет величина момента Олив снижается медленнее (рис. 2, *b*). Таким образом, полученные данные указывают на снижение эффективности репарации поврежденной ДНК при супрессии *gadd45*.

Для исследования вопроса об изменении эффективности репарации при ингибировании *Gadd45* использовали метод реактивации транскрипции (The Host Cell Reactivation Assay, HCR). В кодирующую область гена люциферазы репортерной плазмидной ДНК pGL3basic-luc были внесены разрывы эндонуклеазой рестрикции. Клетки *Gadd45*^{+/+} и *Gadd45*^{-/-} трансфицировали контрольным вектором pGL3-luc или предварительно линейаризованным pGL3-luc. Люциферазную активность измеряли в клетках с интактной репортерной плазмидой, а также трансфицированных поврежденной pGL3-luc спустя

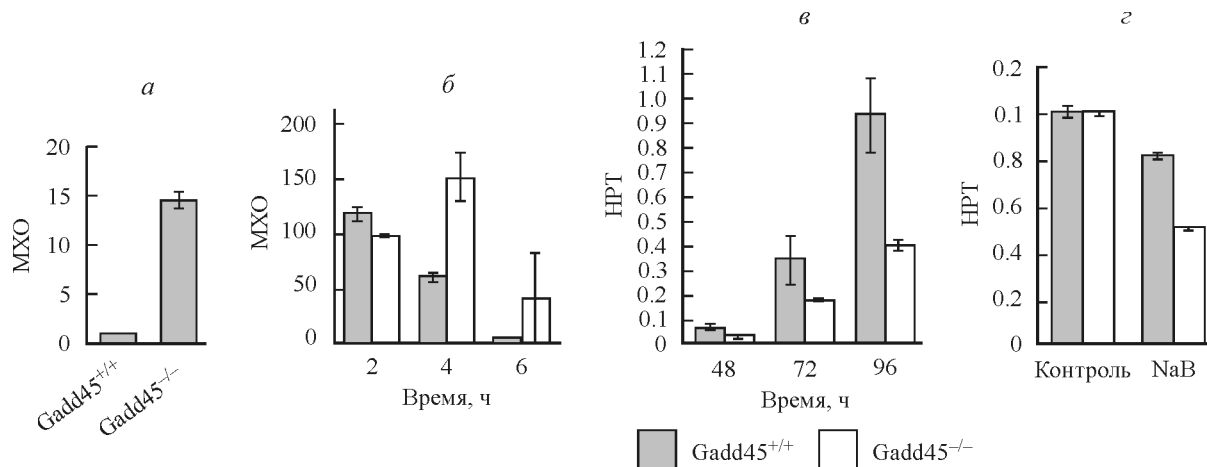


Рис. 2. В клетках Gadd45^{-/-} репарация ДНК снижена по сравнению с клетками Gadd45^{+/+}.

a, б — результаты анализа разрывов ДНК, полученные с помощью метода комет в необработанных клетках (*a*) и через 2—6 ч после воздействия этопоза (*б*); *в* — результаты метода реактивации транскрипции репортерного вектора pGL3-luc, поврежденного эндонуклеазой, относительно экспрессии интактного pGL3-luc в клетках Gadd45^{+/+} и Gadd45^{-/-}; *г* — влияние NaB на реактивацию транскрипции поврежденного вектора pGL3-luc в клетках Gadd45^{+/+} и Gadd45^{-/-}. MXO — момент хвоста Олив, НРТ — нормализованная реактивация транскрипции, разы.

48—96 ч после трансфекции. На гистограммах рис. 2, *в* представлено частное, полученное в результате деления относительной люциферазной активности (RLU) поврежденной pGL3-luc на RLU интактной pGL3-luc в каждый указанный момент времени для каждой клеточной линии соответственно. Иными словами, на гистограммах отражено, во сколько раз экспрессия поврежденной плазмиды меньше экспрессии интактной pGL3 в определенный момент времени. Из представленных результатов видно, что в клетках Gadd45^{-/-} восстановление транскрипции плазмидной ДНК pGL3-luc происходит в несколько раз медленнее по сравнению с клетками Gadd45^{+/+}, где спустя 96 ч экспрессия поврежденной pGL3-luc сравнивается с экспрессией интактной (рис. 2, *в*).

Исследовали влияние ингибиторов гистоновых деацетилаз на эффективность репарации в клетках с различным статусом белка Gadd45. На гистограммах рис. 2, *г* представлен результат деления RLU поврежденной pGL3 на RLU интактной в разные временные промежутки для каждой клеточной линии соответственно. Приведенная активность для клеток без обработки NaB принята за единицу для каждой клеточной линии для более удобного сравнения эффекта влияния NaB на репарацию в клетках Gadd45^{+/+} и Gadd45^{-/-}. Исследование показало, что NaB снижает эффективность восстановления линеаризованной плазмидной ДНК как в клетках Gadd45^{+/+}, так и в клетках Gadd45^{-/-} (рис. 2, *г*). Однако в клетках Gadd45^{+/+} NaB ингибирует репарацию в меньшей степени по сравнению с клетками Gadd45^{-/-}, где восстановление поврежденной ДНК снижается вдвое в присутствии NaB.

Таким образом, мы показали, что супрессия Gadd45 приводит к снижению эффективности репарации ДНК — как исходной, так и в присутствии ИГД. Однако в клетках Gadd45^{+/+} подавление репарации ИГД снижено.

Влияние ИГД на Gadd45 в трансформированных онкогенами фибробластах. Изучали влияние ИГД на экспрессию и локализацию Gadd45 в трансформантах E1A+Ras. Анализ методами ОТ-ПЦР и иммуноблотинга показал, что ИГД NaB вызывает усиление экспрессии Gadd45, зависящее от времени обработки (рис. 3, *a, б*).

Активация Gadd45 ИГД была также недавно показана в работе, где вальпроевая кислота положительно регулировала экспрессию и активность Gadd45 в клетках N1E-115 (Yamauchi et al., 2007). Однако механизмы ИГД-зависимой активации экспрессии Gadd45 пока не установлены. Известно, что белок с-Мус осуществляет транскрипционную репрессию гена *gadd45* через элемент С/ЕВР в промоторе *gadd45* (Amundson et al., 1998; Amente et al., 2011). Ранее мы показали, что экспрессия с-Мус снижается при действии NaB (Abramova et al., 2006). Следовательно, обусловленное ИГД снижение экспрессии с-Мус, возможно, является причиной активации промотора гена *gadd45*. С другой стороны, в промоторе гена *gadd45* содержится также несколько областей для связывания транскрипционного фактора Sp1, который подавляет транскрипцию генов-мишеней, привлекая гистоновые деацетилазы (Mitra et al., 2014). Поэтому активация транскрипции гена *gadd45* ИГД, возможно, является следствием подавления активности гистоновой деацетилазы, привлекаемой транскрипционным фактором Sp1 к промотору *gadd45*, и релаксации структуры хроматина в этой области.

Известно также, что регуляция Gadd45 осуществляется на уровне стабильности транскриптов (Jackman et al., 1994). В клетках белки Gadd45 α способны образовывать олигомеры, а также связываться с белками Gadd45 β и Gadd45 γ . В основном образование таких комплексов осуществляется за счет гидрофобных, а не ковалентных взаимодействий (Kovalsky et al., 2001), без образования межмолекулярных дисульфидных связей (Papa et al., 2007). Поэтому при проведении электрофоретического разделения белков по Лэммли можно наблюдать различные формы олигомеров Gadd45. Считается, что активной формой Gadd45 для взаимодействия с белками-партнерами являются димеры (Zhang et al., 2011). При этом димеризация Gadd45 необходима как для ингибирования роста, так и для апоптоза. Методом иммуноблотинга мы показали, что ИГД влияют на содержание в клетке различных олигомерных форм белка Gadd45. Так, в присутствии NaB наблюдается накопление белка с мол. массой 19 кДа, что соответствует мономерной форме, а также с молекулярной массой в районе 55 и 98 кДа, что соот-

ветствует формам 3 и 5 N соответственно (рис. 3, б). При этом количество форм, соответствующих димерной форме Gadd45, снижается. Таким образом, мы показали, что ИГД не только активируют экспрессию Gadd45, но в большей степени также влияют на способность Gadd45 к олигомеризации.

Методом иммунофлуоресцентной микроскопии мы исследовали влияние ИГД на локализацию белка Gadd45 в трансформантах E1A+Ras. В контрольных, необработанных, клетках наблюдается равномерное распределение Gadd45 в клетке, а при действии ИГД белок Gadd45 накапливается преимущественно в ядре (рис. 3, в).

Степень олигомеризации Gadd45 влияет на его способность взаимодействовать с белками-партнерами, а также на его функциональность, в частности на регулирование доступности поврежденной ДНК в хроматине (Kovalsky et al., 2001). Принимая во внимание показанное нами выше перераспределение олигомерных форм Gadd45 при действии ИГД, мы исследовали их влияние на взаимодействие Gadd45 с белками-партнерами.

Известно, что белки семейства Gadd45 участвуют в регулировании процесса репарации ДНК. Ингибирование Gadd45 приводит к снижению репарации ДНК, тогда как накопление Gadd45 способствует репарации (Marx, 1994). Gadd45α связывается с хроматином и облегчает действие элементов репарационного комплекса, таких как топоизомеразы (Carrier et al., 1999).

ИГД изменяют характер взаимодействия Gadd45α с его клеточными партнерами. Роль белков семейства Gadd45 в репарации определяется главным образом их способностью взаимодействовать и, таким образом, изменять активность белка PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen). PCNA взаимодействует с ключевым компонентом эксцизионной репарации в ядре — APE1/Ref1 (Xia et al., 2005), что подразумевает роль Gadd45 в регулировании репарации через модулирование взаимодействия PCNA с APE1/Ref1. Gadd45 влияет также на активность PCNA, конкурентно взаимодействуя с белком p21/Waf1, который в не связанной с Gadd45 форме подавляет способность PCNA взаимодействовать с областями репарации (Savio et al., 1996) и с ДНК-полимеразой (Shivji et al., 1998; Waga, Stillman, 1998).

Методом иммунопреципитации с последующим иммуноблоттингом мы показали, что в клетках E1A+Ras при действии NaB наблюдается уменьшение способности белка PCNA связываться с Gadd45 при общем неизменном количестве PCNA (рис. 4). Также мы обнаружили, что при действии NaB в клетках E1A+Ras накапливается белок p21/Waf1 в комплексе с Gadd45α (рис. 4). Вследствие усиления конкурентного взаимодействия между p21/Waf1 и Gadd45α должно происходить ослабление взаимодействия p21/Waf1 с белком PCNA. Методом иммунопреципитации с последующим иммуноблоттингом установили, что обработка NaB клеток E1A+Ras, несмотря на повышение общего уровня белка p21/Waf1 в трансформантах (Abramova et al., 2006), приводит к уменьшению комплексообразования между белками p21/Waf1 и PCNA (рис. 5, а, б). Следовательно, в результате индукции Gadd45 происходит ослабление ингибирующего влияния p21/Waf1 на функции PCNA в репарации. Полученные нами данные указывают на тот факт, что индуцированная NaB активация белка Gadd45 может повлечь за собой усиление репарации поврежденной ДНК.

В свою очередь в клетках Gadd45^{-/-} белок p21/Waf1 беспрепятственно взаимодействует с PCNA (рис. 5, б).

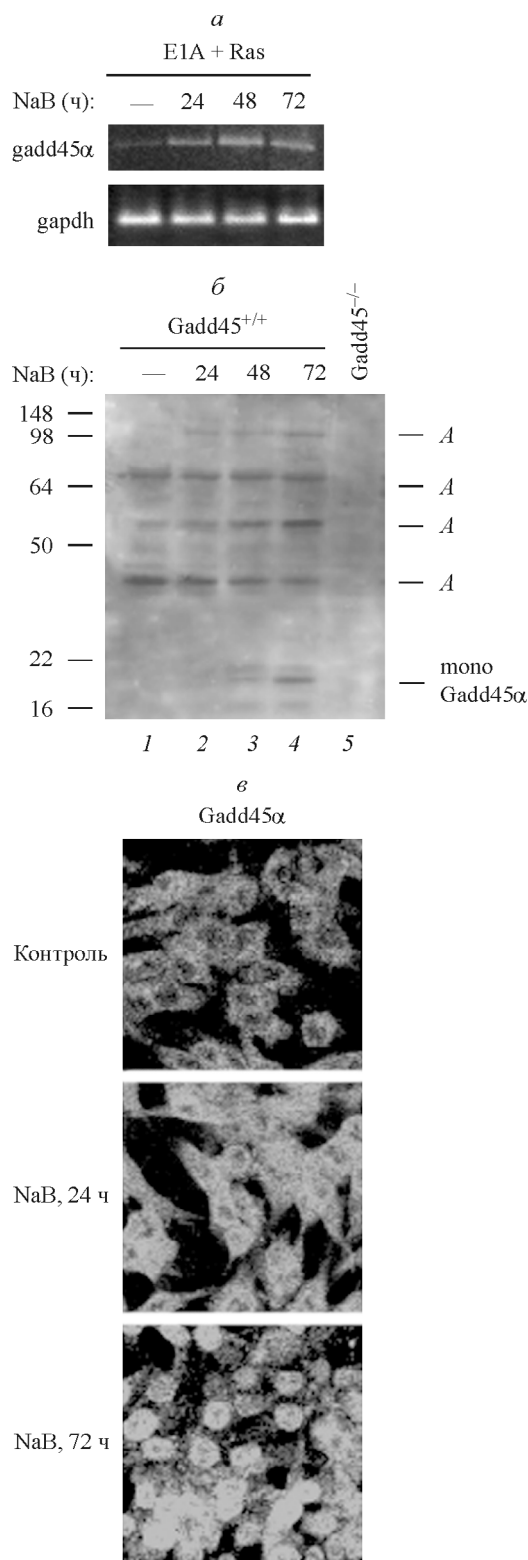


Рис. 3. Экспрессия гена *gadd45α* (а), а также содержание (б) и локализация (в) белка Gadd45α при действии NaB на трансформанты E1A+Ras. NaB индуцирует Gadd45 в трансформантах E1A+Ras.

а — результаты ОТ-ПЦР-анализа экспрессии гена *gadd45α*. В качестве контроля нагрузки использованы праймеры к гену *gapdh*; б — иммуноблоттинг белков из клеток E1A+Ras (Gadd45^{+/+}), обработанных NaB в течение 0—72 ч (дорожки 1—4), и клеток Gadd45^{-/-} (дорожка 5) с антителами к белку Gadd45. Буквой А отмечены олигомеры Gadd45; в — иммунофлуоресцентный анализ локализации Gadd45 в трансформантах E1A+Ras при действии NaB.

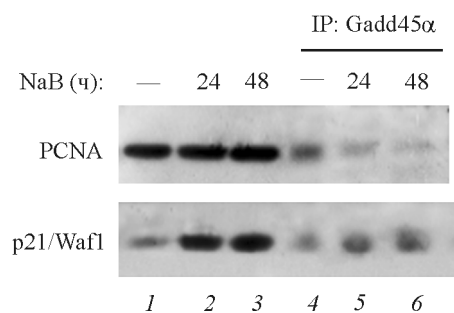


Рис. 4. NaB вызывает изменение характера взаимодействия Gadd45 с белками-партнерами.

Верхняя панель — иммуноблоттинг с антителами к PCNA; нижняя панель — иммуноблоттинг с антителами к p21/Waf1 тотальных клеточных экстрактов трансформантов E1A+Ras (Gadd45^{+/+}), обработанных NaB в течение 24—48 ч (дорожки 1—3), или белковых комплексов, сосаженных с антителами к Gadd45 (дорожки 4—6).

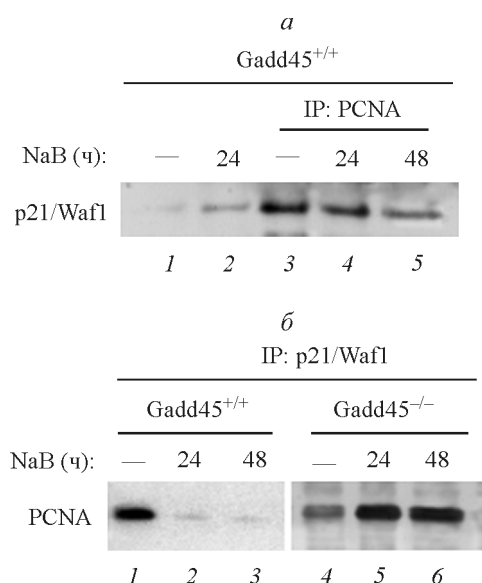


Рис. 5. NaB вызывает ослабление ингибирующего взаимодействия PCNA с белком p21/Waf1 только в Gadd45^{+/+} клетках.

а — иммуноблоттинг с антителами к p21/Waf1 тотальных клеточных экстрактов трансформантов E1A+Ras (Gadd45^{+/+}) (дорожки 1—2) или белковых комплексов, сосаженных с антителами к PCNA (дорожки 3—5); б — иммуноблоттинг с антителами к PCNA белковых комплексов, сосаженных с антителами к p21/Waf1, из клеток Gadd45^{+/+} (дорожки 1—3) и из клеток Gadd45^{-/-} (дорожки 4—6), обработанных NaB в течение 24—48 ч.

Более того, в отсутствие Gadd45 это взаимодействие усиливается при действии NaB, отрицательно влияя на способность клеток к репарации и соответственно к выживаемости после действия ДНК-повреждающих агентов и ИГД.

Полученные нами данные показывают, что при действии ИГД происходят перераспределение олигомерных форм Gadd45 и изменение способности белка Gadd45α взаимодействовать с белками-партнерами, участвующими в регуляции контроля клеточного цикла и репарации ДНК. В результате связывания p21/Waf1 индуцированным Gadd45α происходит ослабление ингибирующего влияния p21/Waf1 на функции PCNA в репарации. Поэтому в трансформированных клетках, где происходит индукция Gadd45 NaB, подавление репарации ИГД меньше

по сравнению с клетками, дефицитными по Gadd45. В условиях дефицита Gadd45 репарация затруднена, что приводит к накоплению большого количества разрывов ДНК как базальных, так и индуцированных генотоксическими агентами.

Авторы статьи выражают благодарность д-ру А. Форнейсу (Georgetown University, Department of Biochemistry and Molecular & Cellular Biology, Washington DC 20057, США) за предоставление клеточной линии эмбриональных фибробластов мыши с нокаутированным геном *gadd45*, а также Н. Д. Аксенову за помощь в проведении проточного цитофлуориметрического анализа.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-01554-а), С.-Петербургского государственного университета (проект 1.38.247.2014) и Российского научного фонда (проект 14-50-00068).

Список литературы

- Abramova M. V., Pospelova T. V., Nikulenkov F. P., Hollander C. M., Fornace A. J., Jr., Pospelov V. A. 2006. G₁/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.
- Abramova M. V., Svetlikova S. B., Kukushkin A. N., Akse-nov N. D., Pospelova T. V., Pospelov V. A. 2011. HDAC inhibitor sodium butyrate sensitizes E1A+Ras-transformed cells to DNA damaging agents by facilitating formation and persistence of γH2AX foci. *Cancer Biol. Ther.* 12 : 1069—1077.
- Amente S., Zhang J., Lavadera M. L., Lania L., Avvedimen-to E. V., Majello B. 2011. Myc and PI3K/AKT signaling cooperatively repress FOXO3a-dependent PUMA and Gadd45α gene expression. *Nucleic Acids Res.* 39 : 9498—9507.
- Amundson S. A., Zhan Q., Penn L. Z., Fornace A. J., Jr. 1998. Myc suppresses induction of the growth arrest genes *gadd34*, *gadd45*, and *gadd153* by DNA-damaging agents. *Oncogene.* 17 : 2149—2154.
- Carrier F., Georgel P. T., Pourquier P., Blake M., Kontny H. U., Antinore M. J. 1999. Gadd45, a p53-responsive stress protein, modifies DNA accessibility on damaged chromatin. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 1673—1685.
- Fornace A. J., Jr., Nebert D. W., Hollander M. C., Luet-hy J. D., Papathanasiou M., Fargnoli J., Holbrook N. J. 1989. Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Mol. Cell. Biol.* 9 : 4196—4203.
- Hollander M. C., Alamo I., Jackman J., Wang M. G., McBride O. W., Fornace A. J., Jr. 1993. Analysis of the mammalian *gadd45* gene and its response to DNA damage. *J. Biol. Chem.* 268 : 24 385—24 393.
- Hollander M. C., Sheikh M. S., Bulavin D. V., Lundgren K., Augeri-Henmueller L., Shehee R. 1999. Genomic instability in Gadd45α-deficient mice. *Nat. Genet.* 23 : 176—184.
- Hollander M. C., Sheikh M. S., Bulavin D. V., Lundgren K., Augeri-Henmueller L., Shehee R., Molinaro T. A., Kim K. E., Tolo-sa E., Ashwell J. D., Rosenberg M. P., Zhan Q., Fernandez-Sal-gue-ro P. M., Morgan W. F., Deng C. X., Fornace A. J., Jr. 1999. Genomic instability in Gadd-deficient mice. *Nat. Genet.* 23 : 176—184.
- Jackman J., Alamo I., Jr., Fornace A. J., Jr. 1994. Genotoxic stress confers preferential and coordinate messenger RNA stability on the five *gadd* genes. *Cancer Res.* 54 : 5656—5662.
- Kastan M. B., Zhan Q., El-Deiry W. S., Carrier F., Jacks T., Walsh W. V., Plunkett B. S., Vogelstein B., Fornace A. J., Jr. 1992. A mammalian cell cycle checkpoint utilizing p53 and Gadd45 is defective in Ataxia-telangiectasia. *Cell.* 71 : 587—597.

- Kearsey J. M., Coates P. J., Prescott A. R., Warbrick E., Hall P. A. 1995. Gadd45 is a nuclear cell cycle regulated protein which interacts with p21Cip1. *Oncogene*. 11 : 1675—1683.
- Kovalsky O., Lung F. D., Roller P. P., Fornace A. J., Jr. 2001. Oligomerization of human Gadd45 α protein. *J. Biol. Chem.* 276 : 39 330—39 339.
- Lee J. H., Choy M. L., Ngo L., Foster S. S., Marks P. A. 2010. Histone deacetylase inhibitor induces DNA damage, which normal but not transformed cells can repair. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 107 : 14 639—14 644.
- Liebermann D. A., Hoffman B. 2003. Myeloid differentiation (MyD) primary response genes in hematopoiesis. *Blood Cells Mol. Dis.* 31 : 213—228.
- Marx J. 1994. New link found between p53 and DNA repair. *Science*. 266 : 1321—1322.
- Mitra S., Wade M. S., Sun X., Moldobaeva N., Flores C., Ma S.-F., Zhang W., Garcia J. G. N., Jacobson J. R. 2014. GADD45a promoter regulation by a functional genetic variant associated with acute lung injury. *PLoS ONE*. 9 (6) : e100169.
- Munshi A., Tanaka T., Hobbs M., Tucker S., Richon V., Meyn R. 2006. Vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to ionizing radiation through prolongation of gammaH2AX foci. *Mol. Cancer Ther.* 5 : 1967—1974.
- Niehrs C., Schafer A. 2012. Active DNA demethylation by Gadd45 and DNA repair. *Trends Cell Biol.* 22 : 220—227.
- Olive P. L., Banath J. P. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protocols*. 1 : 23—29.
- Papa S., Monti S. M., Vitale R. M., Bubici C., Jayawardena S., Alvarez K., De Smaele E., Dathan N., Pedone C., Ruvo M., Franzoso G. 2007. Insights into the structural basis of the GADD45 β -mediated inactivation of the JNK kinase, MKK7/JNKK2. *J. Biol. Chem.* 282 : 19 029—19 041.
- Savio M., Stivala L. A., Scovassi A. I., Bianchi L., Prosperi E. 1996. p21waf1/cip1 protein associates with the detergent-insoluble form of PCNA concomitantly with disassembly of PCNA at nucleotide excision repair sites. *Oncogene*. 13 : 1591—1598.
- Schrump D. S. 2009. Cytotoxicity mediated by histone deacetylase inhibitors in cancer cells: mechanisms and potential clinical implications. *Clin. Cancer Res.* 15 : 3947—3957.
- Selvakumaran M., Lin H. K., Miyashita T., Wang H. G., Krajewski S., Reed J. C., Hoffman B., Liebermann D. 1994. Immediate early up-regulation of bax expression by p53 but not TGF β 1: a paradigm for distinct apoptotic pathways. *Oncogene*. 9 : 1791—1798.
- Shivji M. K., Ferrari E., Ball K., Hubscher U., Wood R. D. 1998. Resistance of human nucleotide excision repair synthesis *in vivo* to p21Cdn1. *Oncogene*. 17 : 2827—2838.
- Smith M. L., Chen I. T., Zhan Q., Bae I., Chen C. Y., Gilmer T. M., Kastan M. B., O'Connor P. M., Fornace A. J., Jr. 1994. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science*. 266 : 1376—1380.
- Takekawa M., Saito H. 1998. A family of stress-inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress-responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK. *Cell*. 95 : 521—530.
- Waga S., Stillman B. 1998. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 modulates the DNA primer-template recognition complex. *Mol. Cell. Biol.* 18 : 4177—4187.
- Xia L., Zheng L., Lee H. W., Bates S. E., Federico L., Shen B. 2005. Human 3-methyladenine-DNA glycosylase: effect of sequence context on excision, association with PCNA, and stimulation by AP endonuclease. *J. Mol. Biol.* 346 : 1259—1274.
- Yamauchi J., Miyamoto Y., Murabe M., Fujiwara Y., Sanbe A., Fujita Y., Murase S., Tanoue A. 2007. Gadd45 α , the gene induced by the mood stabilizer valproic acid, regulates neurite outgrowth through JNK and the substrate paxillin in N1E-115 neuroblastoma cells. *Exp. Cell Res.* 313 : 1886—1896.
- Zhan Q., Antinore M. J., Wang X. W., Carrier F., Smith M. L., Harris C. C., Fornace A. J., Jr. 1999. Association with Cdc2 and inhibition of Cdc2/cyclin B1 kinase activity by the p53-regulated protein Gadd45. *Oncogene*. 18 : 2892—2900.
- Zhang W., Fu S., Liu X., Zhao X., Zhang W., Peng W., Wu C., Li Y., Li X., Bartlam M., Zeng Z. H., Zhan Q., Rao Z. 2011. Crystal structure of human Gadd45 reveals an active dimer. *Protein Cell*. 2 : 814—826.

Поступила 19 XII 2014

EFFECT OF HDAC INHIBITORS ON THE ROLE OF Gadd45 IN THE DNA REPAIR

M. V. Igotti,¹ E. A. Filippova, O. O. Gnedina, S. B. SvetlikovaInstitute of Cytology RAS, St. Petersburg;
¹ e-mail: marie.igotti@gmail.com

Histone deacetylase inhibitors (HDIs) causes irreversible cell cycle arrest and senescence of E1A+Ras transformed cells. HDI sodium butyrate (NaB) affects the DNA repair and consequently modulates the phosphorylation of DNA breaks marker histone H2AX. For Gadd45 family proteins shown the role in regulation of cell proliferation, apoptosis and DNA repair. In the present paper, we studied the effect of NaB on the DNA repair through Gadd45 α protein modulation. Our results indicate that suppression of Gadd45 α reduces the DNA repair efficiency, in both basal, and NaB-dependent. However NaB-induced suppression of DNA repair is reduced in Gadd45-expressing transformed cells. This is the result of Gadd45 α accumulation in the nucleus and redistribution of oligomeric forms of Gadd45 under NaB treatment. This results in changing of Gadd45 α interaction with proteins involved in the cell cycle progression and DNA repair regulation. NaB amplified the interaction of Gadd45 with p21 / Waf1 protein, thereby reducing the amount of the p21 / Waf1 in complex with PCNA. Thus, in the absence Gadd45 α the amount of DNA breaks accumulates due to the reduced efficiency of repair, while HDIs dependent induction of Gadd45 α promotes the DNA repair. DNA damages induced with HDIs or genotoxic agents could not be repaired under the lack of Gadd45 α . As a result Gadd45 deficient transformed cells initiate apoptotic death program.

Key words: Gadd45 α , histone deacetylase inhibitors (HDIs), DNA repair, oncogenes E1A and cHa-ras, transformed cells.