

БУТИРАТ НАТРИЯ УСИЛИВАЕТ АНТИПРОЛИФЕРАТИВНОЕ ДЕЙСТВИЕ НИЗКИХ КОНЦЕНТРАЦИЙ АКТИНОМИЦИНА Д

© М. В. Изотти,^{1,*} О. О. Гнедина,² С. Б. Светликова,¹
Е. А. Филиппова,² В. А. Поспелов^{1, 2}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, и

² С.-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034;

* электронный адрес: marie.igotti@gmail.com

Ингибиторы гистоновых деацетилаз (ИГД) вызывают необратимый блок клеточного цикла в фазе G₁ и старение трансформированных фибробластов E1A + Ras. В работе исследовали модулирование бутиратом натрия (NaBut) антипролиферативного действия ингибитора синтеза РНК актиномина Д (АМД). Показано, что NaBut усиливает цитотоксическое действие низких концентраций АМД (<8 нМ). Однако при высоких концентрациях АМД NaBut, наоборот, незначительно увеличивает жизнеспособность клеток E1A + Ras. При низкой концентрации АМД NaBut резко снижает клоногенную способность трансформированных клеток одновременно с увеличением их гибели. Изучение механизмов клеточной гибели, индуцированной совместным действием низких концентраций АМД и NaBut, показало, что при совместной обработке активировался проапоптотический транскрипционный фактор p53 и подавлялась активность антиапоптотического фактора NF-κB. Таким образом, NaBut усиливает цитотоксическое действие низких концентраций АМД на онкогенотрансформированные клетки, увеличивая их апоптотическую гибель. Полученные результаты могут быть использованы при подборе оптимальных сочетаний АМД и ИГД в комбинированной терапии опухолей.

Ключевые слова: ингибиторы гистоновых деацетилаз, актиномина Д, апоптоз, трансформированные клетки.

Принятые сокращения: АМД — актиномина Д, ИГД — ингибиторы гистоновых деацетилаз, NaBut — бутират натрия.

Ингибиторы гистоновых деацетилаз (ИГД) индуцируют блок клеточного цикла, апоптоз и дифференцировку опухолевых клеток, оставляя относительно нетронутыми нормальные клетки (Schump, 2009). В связи с этим ИГД относятся к веществам, имеющим перспективы для использования в качестве противораковых препаратов. Изначально противораковую активность ИГД связывали в основном с модулированием транскрипции ряда важных пролиферативных генов (Chiba et al., 2004). Соответственно использование ИГД совместно с агентами, которые вызывают подавление транскрипции генов или синтеза белка, может усиливать действие ИГД. Известно, что обработка клеток ИГД в сочетании с ингибиторами киназы mTOR, регулирующей белковый синтез, приводит к синергическому эффекту в отношении подавления пролиферации (Patel et al., 2007; Pospelova et al., 2012; Dong et al., 2013; Beagle et al., 2015). Также для ИГД трихостатина А (TSA) показано, что актиномина Д (АМД) отменяет TSA-индуцированную задержку в фазе G₂ клеточного цикла клеток HeLa (Noh et al., 2009), что указывает на транскрипционную зависимость вклада ИГД в этот процесс. Принимая во внимание, что ИГД, усиливая ацетилирование коровых гистонов, вызывают релаксацию хроматина, можно предположить, что их действие также приведет к расширению областей для связывания инги-

битора транскрипции АМД, облегчая его цитотоксическое воздействие.

АМД — цитостатический препарат из группы противоопухолевых антибиотиков, подгруппы актиномицинов, синтезируемый бактерией *Streptomyces parvillum*, который специфически ингибирует процесс транскрипции РНК эукариот, образуя стабильные комплексы с двойной цепочкой ДНК через дезоксигуанозиновые остатки, и синтез РНК, блокируя элонгацию цепей РНК (Sobell, 1985). Использование высоких концентраций АМД (>800 нМ) ограничено его высокой токсичностью вследствие полного блока транскрипции. Однако в низких концентрациях (10—100 нМ) он увеличивает экспрессию p53 и не очень токсичен (Choong et al., 2009; Van Leeuwen et al., 2011). Кроме того, в низкой концентрации (2 нМ) АМД вызывает рибосомальный стресс, ведущий к снижению активности ингибитора p53, белка MDM2 (Mouse double minute 2), что также ведет к стабилизации и активации p53. Соответственно использование низких концентраций АМД в комбинации с другими химиотерапевтическими агентами представляется перспективным подходом в противоопухолевой терапии.

В настоящей работе исследовали совместное влияние АМД и бутирата натрия (NaBut) на пролиферацию клеток, трансформированных онкогенами E1A и cHa-Ras.

Известно, что NaBut индуцирует блок клеточного цикла на стадии G₁ и старение в E1A + Ras-трансформантах (Abramova et al., 2006). Мы предположили, что можно ожидать усиление цитотоксического действия АМД при совместной обработке с NaBut. Оказалось, что NaBut усиливает цитотоксическое действие низких концентраций АМД за счет активации транскрипционного фактора p53 и ингибирования антиапоптотического комплекса NF-κB.

Материал и методика

Клеточные линии. Исследования проводили на линии стабильно трансформированных клеток, полученных из эмбриональных фибробластов мыши путем переноса пары комплементирующих онкогенов *E1A* и *cHa-ras* (линия E1A + Ras; Pospelova et al., 1999). Клетки обрабатывали в течение 24 ч NaBut (4 мМ) или АМД (Sigma-Aldrich, США).

Распределение клеток по фазам клеточного цикла анализировали методом проточной цитофлуориметрии. Клетки промывали раствором PBS (рН 7.2), пермеабилizовывали сапонином в конечной концентрации 0.01 % в течение 30 мин и многократно отмывали от сапонины раствором PBS. Затем клетки инкубировали 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 (Becton Dickinson, США).

Иммуноблотинг. Клетки лизировали в PBS, 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 (Immobilon, США). Мембраны со связанными на них белками промывали в TBST (буфер TBS с 0.5 % Tween 20), инкубировали в течение 2 ч в 5%-ном обезжиренном молоке, приготовленном на TBST. После этого мембраны в течение ночи инкубировали в TBST, содержащем 1 % BSA и соответствующие специфические антитела, при 8 °С. Затем мембраны отмывали в TBST и инкубировали 1 ч при комнатной температуре в TBST с 5%-ным молоком, содержащим вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США). Белки на мембранах выявляли методом усиления хемилюминесценции (Thermo Sci., США) и экспонировали с рентгеновской пленкой при комнатной температуре. Использовали следующие антитела против белков: cleaved Caspase-3 (Asp175) (Antibody #9661); phospho-p53 (Ser15) (Antibody #9284); p53 (1C12) (Mouse mAb #2524), Gapdh (14C10) (Cell Signaling, США).

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. Для этого клетки рассеивали на 96-луночные планшеты в количестве $2 \cdot 10^3$ клеток на ячейку и культивировали в присутствии или без соответствующих ингибиторов в течение 24 ч. Клетки в лунках суспендировали в буфере PBS, содержащем реагент МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид) (Sigma, США) в конечной концентрации 0.5 мг/мл, и инкубировали в течение 1.5 ч при 37 °С в CO₂-инкубаторе. За это время в митохондриях живых клеток в результате клеточного дыхания вещество МТТ, имеющее желтую окраску, восстанавливалось до формазана, имеющего фиолетовую окраску. Лизировали клетки добавлением

1.5 объема 100%-ного ДМСО и инкубировали 10 мин на орбитальном шейкере. Количество образовавшегося формазана определяли спектрофотометрически при длине волны 570 нм на Multiscan-EX (Labsystems, США).

Активность каспаз in vitro оценивали с помощью специфических флуоресцентных субстратов. Для этого клетку на чашках обрабатывали агентами, после чего снимали с чашек раствором трипсина—версена и лизировали 20 мин при 4 °С в лизисном буфере (10 мМ HEPES-HCl, рН 7.4, 0.5 % IGEPAL (об./об.), 0.1 % CHAPS и 5 мМ DTT). Затем 50 мкг клеточных лизатов смешивали с реакционным буфером (10 мМ HEPES-HCl, рН 7.4, 0.1 % CHAPS и 1 мМ DTT) без субстрата (до конечного объема 300 мкл), добавляли равный объем реакционного буфера с 40 мкМ флуорогенного субстрата AcDEVD-AMC и инкубировали пробы в течение 1 ч при 37 °С. Флуоресценцию расщепленного субстрата определяли при длине волны 380 нм на флуориметре GloMax-Multi (Promega, США). Получение клеточных лизатов и анализ каспазной активности с использованием колориметрического субстрата проводили, как описано ранее (Abramova et al., 2010). Изменение окрашивания при разрезании соответствующего колориметрического субстрата оценивали при длине волны 405 нм на микропланшетном ридере Multiscan-EX (Labsystems, США).

Временные трансфекции и анализ люциферазной активности. E1A + Ras-клетки трансфицировали репортерными плазмидами, используя реагент Lipofectamine-2000 (Invitrogen, США), согласно протоколу фирмы-производителя. Для трансфекции использовали люциферазный репортерный вектор, содержащий 13 копий p53-связывающих последовательностей (pG13-luc), любезно предоставленный д-ром Bert Vogelstein (plasmid # 16442, Addgene, Великобритания). В качестве внутреннего контроля трансфекции использовали экспрессию реиниллы. Через 24 ч после трансфекции клетки обрабатывали соответствующими агентами. Через 48 ч после трансфекции клетки снимали и процессировали согласно инструкции фирмы-производителя для измерения активности люциферазы. Люциферазную активность определяли на люцинометре TD-20/20 (Turner Designs, США). Каждый эксперимент повторяли не менее трех раз.

Эффективность клонирования (клоногенную способность) клеток после действия агентов определяли по их способности формировать клоны при культивировании на обычной среде на пластиковых чашках. Клетки E1A + Ras обрабатывали АМД или NaBut в течение 24 ч. После этого клетки снимали, трипсинизировали и пересевали в одинаковой плотности 200 клеток на чашку Петри (30 мм²). Через 10—14 сут клетки фиксировали в 100%-ном метаноле в течение 30 мин при комнатной температуре и окрашивали в течение 1 ч в 0.1%-ном трипановом синем (Sigma, США). Число окрашенных колоний подсчитывали и сравнивали с необработанным контролем.

Данные представлены в виде среднего из трех независимых экспериментов. Различия средних оценивали с помощью *t*-теста с использованием программного продукта SigmaPlot (Systat software, США).

Результаты

Влияние совместного действия АМД и NaBut (АМД + NaBut) на жизнеспособность клеток E1A + Ras. Для выявления возможности сен-

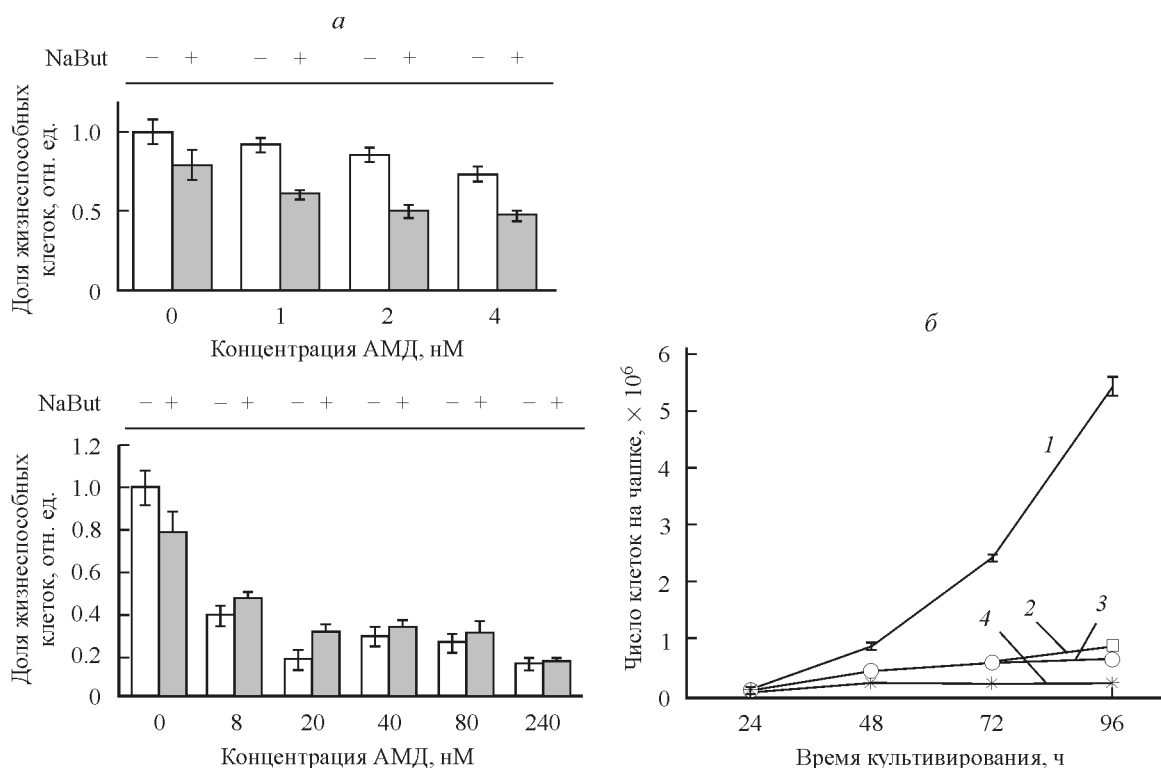


Рис. 1. Антипролиферативное действие актиномицина Д (АМД) в присутствии бутирата натрия (NaBut) и без него.

a — МТТ-тест жизнеспособности клеток E1A + Ras, обработанных в течение 24 ч АМД в указанных концентрациях без NaBut (светлые столбики) либо с добавлением 4 мМ NaBut (темные столбики). По вертикали — относительная оптическая плотность, измеренная при 570 нм. Данные представлены в виде среднего из не менее трех независимых экспериментов, $P < 0.01$. Здесь и на рис. 2—6 вертикальные отрезки — стандартные ошибки средних. *б* — кривые роста клеток E1A + Ras при отсутствии добавок (кривая 1), в присутствии 4 мМ NaBut (кривая 2), 1 нМ АМД (кривая 3) или при сочетании 1 нМ АМД + 4 мМ NaBut (кривая 4).

сублизации NaBut онкоген-трансформированных клеток E1A + Ras к действию АМД исследовали влияние АМД и АМД + NaBut на жизнеспособность клеток. Клетки обрабатывали агентами по отдельности или совместно в течение 24 ч, после чего оценивали количество жизнеспособных клеток с помощью теста МТТ. Мы показали, что низкие концентрации АМД (< 20 нМ) снижают жизнеспособность трансформированных клеток (рис. 1, *a*, верхняя панель), причем с увеличением концентрации (до 20 нМ) антипролиферативное действие АМД увеличивается. Использование АМД в более высоких концентрациях (≥ 30 нМ) уже не приводит к дальнейшему снижению жизнеспособности трансформированных клеток (рис. 1, *a*, нижняя панель). Кривые роста также демонстрируют снижение количества клеток при совместном действии NaBut и АМД в низкой концентрации (1 нМ) (рис. 1, *б*). Полученные нами данные согласуются с результатами Чен и соавторов (Chen et al., 2014), которые также показали, что в клетках НЕК 293 антипролиферативное действие АМД растет с повышением концентрации в пределах до 10 нМ. Однако дальнейшее увеличение концентрации АМД (30 нМ) не приводило более к снижению жизнеспособности клеток.

В зависимости от концентрации АМД сенсibiliзирующее действие NaBut различалось. Так, при обработке АМД (не более 4 нМ) + NaBut жизнеспособность клеток снижалась по сравнению с действием одного АМД. Однако при действии более высоких концентраций АМД (> 8 нМ) совместно с NaBut наблюдается даже незначительное увеличение жизнеспособности клеток по сравнению с монотерапией АМД. Иными словами, NaBut

снижает антипролиферативное действие высоких концентраций АМД в трансформированных клетках.

Таким образом, сенсibiliзация трансформированных клеток NaBut к антипролиферативному действию АМД зависит от используемой концентрации АМД.

Анализ апоптотической гибели клеток при действии АМД + NaBut. Для дальнейших экспериментов мы использовали концентрацию АМД около 2 нМ, поскольку сочетанное действие 2 нМ АМД и 4 мМ NaBut приводило к наибольшему синергическому эффекту подавления жизнеспособности трансформированных клеток (рис. 1, *б*). Мы анализировали механизмы снижения жизнеспособности клеток при действии АМД + NaBut. Исследование эффективности клонирования трансформированных клеток показало, что терапия низкими дозами АМД с добавлением NaBut приводит к снижению способности трансформированных клеток образовывать клоны по сравнению с клетками, подвергнутыми монотерапии. Повышение концентрации АМД до 4 нМ приводило к тому, что число клонов, образующихся после обработки АМД + NaBut, фактически не отличалось от числа клонов при монотерапии (рис. 2). Апоптотическую гибель определяли по увеличению доли клеток с субдиплоидным содержанием ДНК (суб-G₁), характерным для клеток, погибающих по механизму апоптоза. Анализ распределения клеток по содержанию ДНК после действия исследуемых агентов показал, что ни NaBut, ни АМД в низких концентрациях за 24 ч не вызывают увеличения доли клеток с субдиплоидным содержанием ДНК (рис. 3, *a*). При этом высокие концентрации АМД очень токсичны и вызывают массовую гибель клеток E1A + Ras после обработки в те-

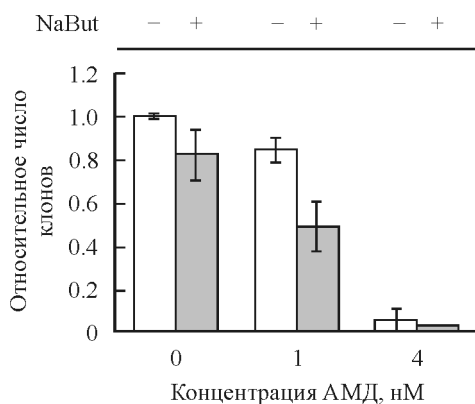


Рис. 2. Эффективность клонирования клеток E1A + Ras в присутствии АМД с добавлением 4 мМ NaBut (темные столбики) и без них (светлые столбики).

На гистограмме представлено относительное число клонов, где за единицу принято количество клонов в контроле без обработки.

чение 24 ч. При обработке клеток 2 нМ АМД + 4 мМ NaBut в течение 24 ч наблюдали увеличение субдиплоидного пика на FACS-диаграмме распределения клеток по сравнению с результатом действия одного АМД. Однако доля гибнущих клеток снижалась при использовании NaBut в комбинации с высокими концентрациями АМД по сравнению с монотерапией 20 нМ АМД (рис. 3, а).

Усиление апоптотической гибели клеток E1A + Ras при действии низких концентраций АМД + NaBut подтверждается данными электрофоретического разделения ДНК в агарозном геле. АМД в низкой концентрации не вызывает межнуклеосомной фрагментации ДНК. Однако действие АМД + NaBut приводило к межнуклеосомной фрагментации ДНК (рис. 3, б).

Анализ активности каспаз при действии АМД + NaBut. Для выяснения механизмов клеточной гибели, индуцированной действием АМД + NaBut, мы исследовали активность каспаз, вовлеченных в каскад пе-

редачи апоптотического сигнала. Анализовали активность каспазы-3 — центрального медиатора апоптотического сигнального каскада. Результаты иммуноблоттинга показали, что только при совместной обработке трансформантов АМД + NaBut в течение 24 ч происходит появление активной расщепленной формы каспазы-3 (рис. 4, а). Соответственно ни NaBut, ни АМД по отдельности не вызывают разрезания каспазы-3. Активность каспаз определяли *in vitro* с использованием специфических субстратов. Измерение активности каспазы-3 также показало, что только действие АМД + NaBut вызывает ее активацию. При этом мы подтвердили, что активность каспазы-9 достоверно не меняется как при монотерапии, так и при действии АМД + NaBut в течение 24 ч (рис. 4, б). Активность каспазы-8 увеличивается как при раздельном, так и при совместном действии агентов по сравнению с необработанными клетками.

Также мы оценили активность ключевого фактора каскада передачи антиапоптотического сигнала NF-κB. Клетки E1A + Ras трансфицировали репортерным вектором рGL3-luc, кодирующим ген люциферазы, под контролем NF-κB-регулируемого промотора. Анализ экспрессии люциферазы показал, что активность NF-κB-регулируемого промотора индуцируется как АМД, так и NaBut (рис. 5). Однако при их совместном действии наблюдали противоположный результат. Из данных, представленных на рис. 5, видно, что действие АМД + NaBut приводит к снижению активности NF-κB-зависимого промотора до уровня ниже базального. Это, возможно, указывает на ослабление механизмов защиты от апоптотической гибели при совместном действии АМД и NaBut.

Активность антиапоптотического фактора p53 при действии АМД + NaBut. Мы исследовали активность транскрипционного фактора p53 — одного из ключевых регуляторов апоптоза в клетках и с использованием иммуноблоттинга показали, что экспрессия опухолевого супрессора p53 одинаково увеличивается при действии как АМД, так и АМД + NaBut (рис. 6, а). Однако содержание активной, фосфорилированной по

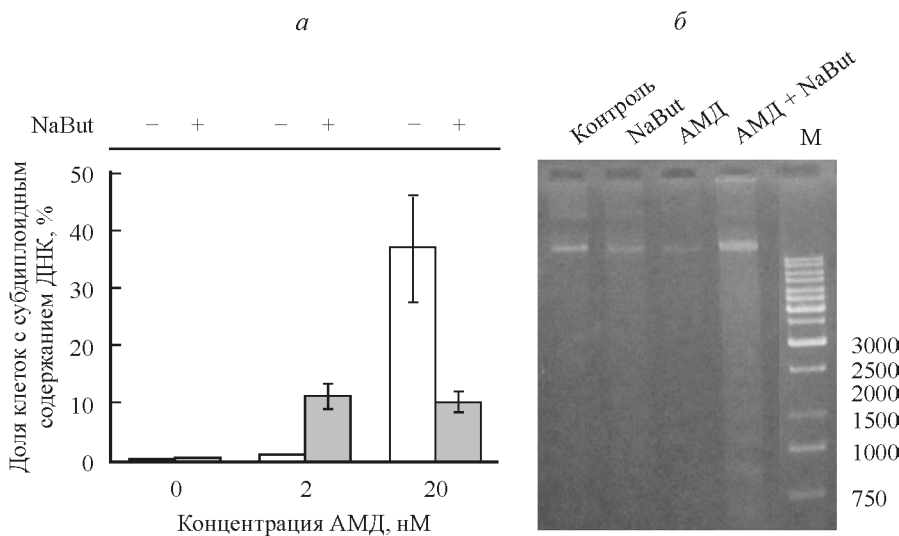


Рис. 3. Признаки апоптоза в трансформантах E1A + Ras при совместном действии АМД в низкой концентрации и NaBut.

а — гистограмма, отражающая долю клеток, имеющих субдиплоидное содержание ДНК, по результатам проточной цитофлуориметрии, после обработки АМД в указанных концентрациях без NaBut (светлые столбики) или с его добавлением (темные столбики), $P < 0.001$. б — электрофоретическое разделение хромосомной ДНК из клеток E1A + Ras без обработки (Контроль) либо обработанных 4 мМ NaBut (NaBut), 2 нМ АМД (АМД) или их сочетанием (АМД + NaBut) в течение 24 ч. М — маркер GeneRuler(tm) 1 kb DNA Ladder. Цифры справа — молекулярные массы (г. п. о.) соответствующих полос.

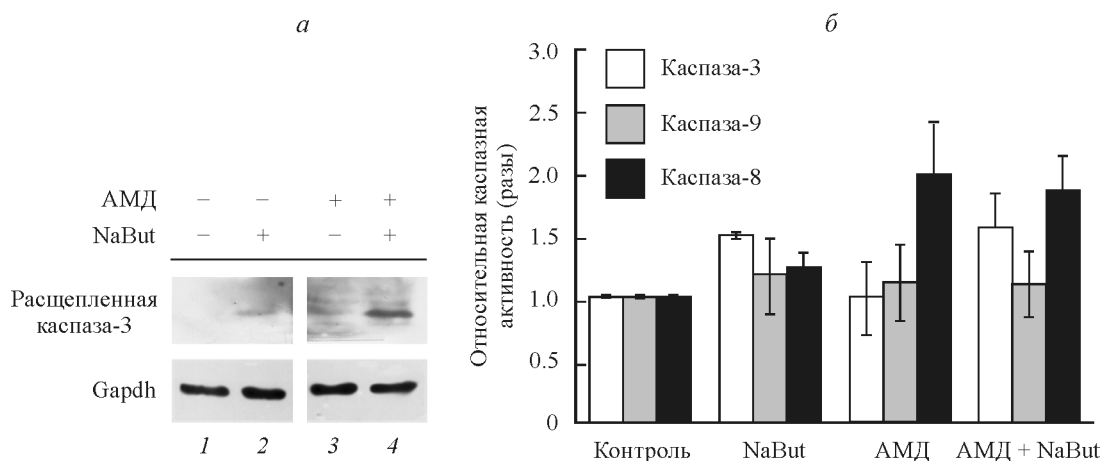


Рис. 4. Активность каспаз при действии AMД и NaBut в клетках E1A + Ras.

а — иммуноблоттинг лизатов клеток E1A + Ras с антителами к расщепленной каспазе-3 без обработки (дорожка 1), обработанных 4 мМ NaBut (дорожка 2), 2 нМ AMД (дорожка 3) или их комбинацией в течение 24 ч (дорожка 4). *б* — изменения активности каспазы-3 (светлые столбики), каспазы-9 (темные столбики) и каспазы-8 (черные столбики) при действии исследуемых агентов. Активность каспаз в необработанных клетках принята за единицу (Контроль). Активность в обработанных клетках приведена относительно контроля.

остатку Ser15, формы белка p53 не меняется при любом варианте воздействия.

Мы исследовали влияние AMД и NaBut на активность p53-зависимого промотора. Для этого клетки E1A + Ras трансфицировали репортерным вектором, кодирующим люциферазу, под контролем промотора, содержащего 13 канонических последовательностей для связывания транскрипционного фактора p53. После этого клетки обрабатывали AMД или AMД + NaBut в течение 24 ч, лизировали и измеряли активность люциферазы в лизатах. Данные люциферазного анализа показывают, что AMД в низкой концентрации не активирует p53-зависимый промотор (рис. 6, б). Однако активность p53-Luc возрастала в несколько раз при действии AMД + NaBut. Это объясняется, по-видимому, способностью NaBut активировать p53 в трансформантах E1A + Ras благодаря ацетилированию, что показано нами ранее (Igotti Abramova et al., 2014). Стоит отметить, что активация p53-Luc при совместном действии AMД и NaBut происходит интенсивнее, чем при действии одного NaBut. Это, по-видимому, указывает на вклад p53 в реализацию программы клеточной гибели, индуцированной действием AMД + NaBut.

Обсуждение

В настоящей работе исследовали сенсibilизацию ИГД NaBut трансформантов E1A + Ras к действию цитотоксического противоопухолевого агента AMД. Мы показываем, что NaBut усиливает цитотоксическое действие низких концентраций AMД, снижая, однако, антипролиферативное действие высоких концентраций AMД. Так, высокие концентрации AMД (> 10 нМ) вызывают апоптоз в трансформированных клетках E1A + Ras (рис. 3), тогда как NaBut, наоборот, слегка увеличивает жизнеспособность клеток, обработанных высокими дозами AMД (рис. 1). Длительная активация PI3K-зависимых сигнальных путей, в том числе PKB/Akt и p70S6K, предотвращает апоптоз, индуцируемый AMД в трансформированных клетках (Shim et al., 2004; Yamada et al., 2004). Ранее нами показано, что NaBut активирует сигнальный путь PI3K/Akt в трансформантах E1A + Ras (Abramova et al., 2006), поэ-

тому снижение цитотоксического действия высоких концентраций AMД в сочетании с NaBut может быть обусловлено NaBut-зависимой активацией PI3K/Akt.

Таким образом, мы сфокусировали свое внимание на факте сенсibilизации NaBut трансформированных клеток к действию низких концентраций AMД и использовали AMД в концентрации 2 нМ, поскольку действие AMД (2 нМ) + NaBut приводило к наибольшему подавлению жизнеспособности трансформированных клеток (рис. 1). Показано, что жизнеспособность трансформированных клеток снижается вдвое при использовании AMД (2 нМ) + NaBut, при этом данная комбинация не является токсичной для нормальных клеток (Choong et al., 2009). Монотерапия AMД (2 нМ) практически не влияет на пролиферацию трансформантов E1A + Ras (рис. 1). AMД по-разному влиял на антипролиферативное действие различных цитотоксических агентов и в разных линиях клеток. Известны примеры как положительного, так и отрицательного влияния AMД на индукцию апоптоза. В некоторых линиях опухолевых клеток (СМК-7 и U-937, HeLa S3 и Colo320) AMД усиливал апоптоз, индуцированный

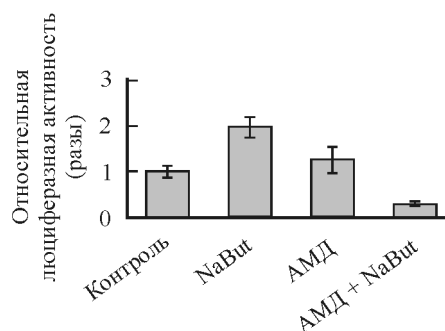


Рис. 5. Активность NF-κB при действии 2 нМ AMД и(или) NaBut в клетках E1A + Ras.

Изменения относительной активности репортера 3*κB-luc под контролем промотора, содержащего консенсусный сайт области связывания транскрипционного комплекса NF-κB, после трансфекции в клетки E1A + Ras при действии исследуемых агентов. Активность люциферазы в необработанных клетках принята за единицу (Контроль). Активности в обработанных клетках приведены относительно контроля.

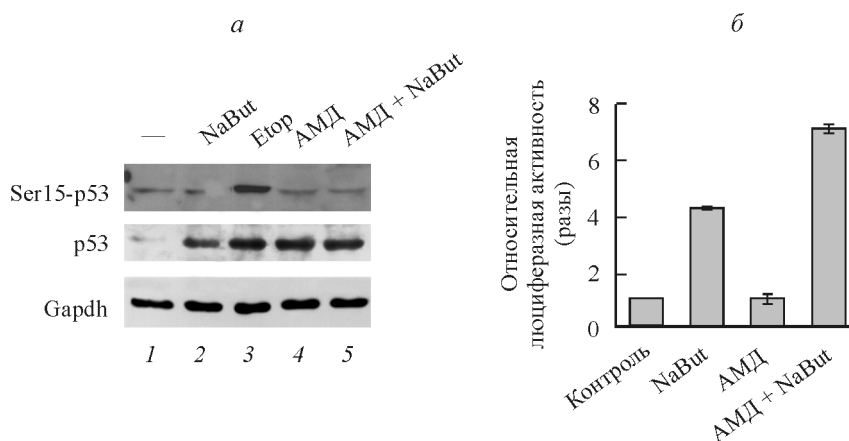


Рис. 6. Активность транскрипционного фактора p53 при действии АМД и(или) NaBut в клетках E1A + Ras.

а — иммуноблоттинг с антителами к Ser15-p53 (верхняя панель) и тотальному p53 (средняя панель) экстрактов клеток E1A + Ras без обработки (дорожка 1) либо обработанных 4 мМ NaBut (дорожка 2), 2.5 мкМ этопозидом в качестве положительного контроля (дорожка 3), 2 нМ АМД (дорожка 4) или комбинацией АМД+NaBut (дорожка 5) в течение 24 ч. *б* — влияние АМД или АМД + NaBut на активность p53-регулируемых промоторов. Изменения активности люциферазы, экспрессируемой с репортерного вектора pG13-luc, содержащего последовательности для связывания транскрипционного фактора p53, при действии исследуемых агентов. Активность люциферазы в необработанных клетках принята за единицу (Контроль). Активность в обработанных клетках приведена относительно контроля.

агентами, нарушающими цитоскелет (колцемид и цитохалазин Д), однако в других линиях он не оказывал подобного действия (Shang et al., 2001). В клетках K562 АМД также увеличивал цитотоксическое действие ингибитора топоизомеразы II по механизму, отличному от апоптоза (Qing et al., 2003). В клетках с дефектом биосинтеза пуринов АМД снижал уровень апоптотической гибели, индуцированный аминоптеринном — ингибитором дегидрофолатредуктазы, что указывает на необходимость активного синтеза РНК для проапоптотического действия аминоптерина (Chung et al., 2001). Встраиваясь между нитями ДНК, АМД ингибирует топоизомеразу, увеличивая накопление разрывов ДНК (Ross, Bradley, 1981; Liu et al., 1991; Yu, Tseng, 1992). Ранее мы показали, что NaBut продлевает индуцированное облучением или ДНК-повреждающими агентами фосфорилированное состояние гистона H2AX, являющееся маркером двухнитевых разрывов ДНК (Abramova et al., 2011). Предполагается, что это происходит вследствие подавления репарации ДНК. В случае действия АМД + NaBut, возможно, также имеют место ИГД-зависимое подавление репарации ДНК, поврежденной действием АМД, и активация механизмов элиминации клеток с поврежденной ДНК.

В ходе изучения молекулярных механизмов сенсibilизации трансформированных клеток к малым дозам АМД при совместном использовании с NaBut анализировали активность опухолевого супрессора p53. Мы показали, что АМД и АМД + NaBut приводили к накоплению p53, не изменяя статуса его фосфорилирования (рис. 6, *а*). Фосфорилирование p53 определенно способствует стабилизации p53 при некоторых условиях через предотвращение взаимодействия p53 с убиквитинлигазой MDM2 (Shieh et al., 1997). Однако показано, что N-концевое фосфорилирование не является необходимым условием стабилизации p53, индуцированной повреждением ДНК, в частности в ответ на действие АМД (Ashcroft et al., 1999). Также показано, что механизм стабилизации p53 при действии АМД отличается от механизма стабилизации, индуцированного другими агентами стресса, и не обусловлен фосфорилированием p53 (Ashcroft et al., 1999; Blatner et al., 1999; Choong et al., 2009). Гипоксия и

ингибитор топоизомеразы камптотecin вызывали стабилизацию p53 через его фосфорилирование, тогда как накопление p53, индуцированное 5 нМ АМД, не сопровождалось фосфорилированием p53 по остаткам Ser15 и Ser20 как в нормальных (MRC-5), так и в опухолевых клетках (RKO, MCF-7 и U2OS) (Ashcroft et al., 2000). Происходило это за счет индуцированной АМД реклокализации MDM2 и p53 в различные области ядра, что предотвращало или снижало возможность их взаимодействия. Этот механизм сходен со стабилизацией нефосфорилированного p53 через секвестрирование MDM2 в ядрышках благодаря его взаимодействию с ARF (Tao, Levine, 1999; Weber et al., 1999). В концентрации 1 нМ АМД вызывал накопление p53, не сопровождающееся фосфорилированием по Ser15, в клетках HCT116 (Choong et al., 2009). Однако повышение концентрации АМД до 10 нМ приводило к фосфорилированию p53 (Choong et al., 2009).

В настоящей работе стабилизация p53, индуцированная 2 нМ АМД, не сопровождалась повышением транскрипционной способности p53 в трансформантах E1A + Ras (рис. 6, *б*). Однако при совместном действии АМД и NaBut наблюдали суперактивацию p53. Ранее Чен и соавторы (Chen et al., 2014) показали, что в линии 293 эмбриональных клеток почки человека АМД (10 нМ) приводил к фосфорилированию p53 и активировал p53-зависимые промоторы в аналогичных экспериментах, но не более чем в 2 раза. В свою очередь наши данные демонстрируют, что значительно большая активация p53 достигается при совместном использовании меньшей концентрации АМД (2 нМ) и NaBut (рис. 6, *б*). Полученные результаты имеют большое значение, поскольку снижение концентрации АМД в случае использования его в противоопухолевой терапии позволит уменьшить потенциальный вред для нормальных клеток. Так, Чунг и соавторы (Choong et al., 2009) показали, что ингибирование клеточного цикла низкими концентрациями АМД (1 нМ) является обратимым и нетоксичным для нормальных клеток (эпидермальные кератиноциты человека).

АМД-зависимая индукция p53 обусловлена киназой PKB/Akt (Chen et al., 2014). Как АМД, так и NaBut активируют сигнальный путь PI3K/Akt (Abramova et al., 2006;

Chen et al., 2014). Возможно, синергетический эффект активации киназы Akt/PKB при действии АМД + NaBut и обуславливает супериндукцию транскрипционного фактора p53. Показанная активация p53 имеет большое значение. Многими авторами предлагается стратегия защиты нормальных клеток от цитотоксичности химиотерапевтических агентов во время лечения рака, которая подразумевает использование индукции p53 для защиты нормальных клеток (Blagosklonny, Pardee, 2001; Blagosklonny, 2002; Blagosklonny, Darzynkiewicz, 2002; Keyomarsi, Pardee, 2003).

Большой интерес представляют наши новые данные об ингибировании активности антиапоптотического транскрипционного комплекса NF-κB при действии АМД + NaBut. АМД или ингибитор белкового синтеза циклогексимид вызвали супериндукцию транскрипционного фактора NF-κB (Newton et al., 1996), что обусловлено подавлением синтеза de novo фактора IκBα, являющегося ингибитором NF-κB. Однако существуют и другие данные о регуляции фактора NF-κB АМД. Так, в панкреатических раковых клетках с высоким конститутивным уровнем NF-κB АМД повышал CD95-зависимый апоптоз, снижая ДНК-связывающую активность NF-κB (Glazyrin et al., 2002). Эти данные говорят о неоднозначной роли АМД в регуляции NF-κB. Для ИГД также показана способность активировать NF-κB (Kim et al., 2006; Abramova et al., 2010). Молекулярные механизмы ИГД-зависимой активации NF-κB включают в себя, в частности, ацетилирование самих субъединиц транскрипционного комплекса NF-κB, а также ингибирование белков, подавляющих активность NF-κB, для чего также необходим синтез de novo (Kim et al., 2006). Полученные нами новые данные о супрессии активности NF-κB при действии АМД + NaBut, возможно, объясняются подавлением синтеза новых факторов, необходимых для ИГД-зависимой активации NF-κB, вследствие АМД-зависимого ингибирования транскрипции.

Возможно и иное объяснение полученных результатов. Для p53 и NF-κB показан взаимный функциональный антагонизм за счет конкуренции за CBP и p300 (Ravi et al., 1998; Webster, Perkins, 1999; Culmsee et al., 2003; Huang et al., 2007), вследствие чего индукция p53 приводит к снижению активности NF-κB. Совместное действие АМД и NaBut активирует p53 в клетках E1A + Ras (рис. 6), что является одной из причин показанного нами ингибирования активности транскрипционного комплекса NF-κB.

Таким образом, в настоящей работе мы показали, что ИГД NaBut сенсibiliзирует онкогенотрансформированные клетки к действию низких доз АМД. Причем концентрация АМД может быть сильно снижена для достижения эквивалентного результата, если использовать его совместно с NaBut. Полученные результаты имеют большое значение при разработке методов комплексной терапии с использованием АМД и ИГД.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-50-00068; поддержание клеточных линий, распределение клеток по фазам клеточного цикла с использованием проточной цитофлуориметрии, временные трансфекции, анализ люциферазной активности, анализ эффективности клонирования) и С.-Петербургского государственного университета (проект 1.38.247.2014; оценка жизнеспособности клеток, иммуноблоттинг белков и анализ активности каспаз).

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.
- Abramova M. V., Zatulovskiy E. A., Svetlikova S. B., Pospelov V. A. 2010. HDAC inhibitor-induced activation of NF-κB prevents apoptotic response of E1A+Ras-transformed cells to proapoptotic stimuli. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 42 : 1847—1855.
- Ashcroft M., Kubbutat M. H., Vousden K. H. 1999. Regulation of p53 function and stability by phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 1751—1758.
- Ashcroft M., Taya Y., Vousden K. H. 2000. Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol. Cell. Biol.* 20 : 3224—3233.
- Beagle B. R., Nguyen D. M., Mallya S., Tang S. S., Lu M., Zeng Z., Konopleva M., Vo T. T., Fruman D. A. 2015. mTOR kinase inhibitors synergize with histone deacetylase inhibitors to kill B-cell acute lymphoblastic leukemia cells. *Oncotarget.* 6 : 2088—2100.
- Blagosklonny M. V. 2002. P53: an ubiquitous target of anticancer drugs. *Int. J. Cancer.* 98 : 161—166.
- Blagosklonny M. V., Darzynkiewicz Z. 2002. Cyclotherapy: protection of normal cells and unshielding of cancer cells. *Cell Cycle.* 1 : 375—382.
- Blagosklonny M. V., Pardee A. B. 2001. Exploiting cancer cell cycling for selective protection of normal cells. *Cancer Res.* 61 : 4301—4305.
- Blattner C., Tobiasch E., Litfen M., Rahmsdorf H. J., Herrlich P. 1999. DNA damage induced p53 stabilization: no indication for an involvement of p53 phosphorylation. *Oncogene.* 18 : 1723—1732.
- Chen C. S., Ho D. R., Chen F. Y., Chen C. R., Ke Y. D., Su J. G. 2014. AKT mediates actinomycin D-induced p53 expression. *Oncotarget.* 5 : 693—703.
- Chiba T., Yokosuka O., Fukai K., Kojima H., Tada M., Arai M. 2004. Cell growth inhibition and gene expression induced by the histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, on human hepatoma cells. *Oncology.* 66 : 481—491.
- Choong M. L., Yang H., Lee M. A., Lane D. P. 2009. Specific activation of the p53 pathway by low dose actinomycin D: a new route to p53 based cyclotherapy. *Cell Cycle.* 8 : 2810—2818.
- Chung Y. H., Youn J., Choi Y., Paik D. J., Cho Y. J. 2001. Requirement of de novo protein synthesis for aminopterin-induced apoptosis in a mouse myeloma cell line. *Immunol. Lett.* 77 : 127—131.
- Culmsee C., Siewe J., Junker V., Retiounskaia M., Schwarz S., Camandola S., El-Metainy S., Behnke H., Mattson M. P., Kriegstein J. 2003. Reciprocal inhibition of p53 and nuclear factor-kappaB transcriptional activities determines cell survival or death in neurons. *J. Neurosci.* 23 : 8586—8595.
- Dong L. H., Cheng S., Zheng Z., Wang L., Shen Y., Shen Z. X., Chen S. J., Zhao W. L. 2013. Histone deacetylase inhibitor potentiated the ability of MTOR inhibitor to induce autophagic cell death in Burkitt leukemia/lymphoma. *J. Hematol. Oncol.* 6 : 53.
- Glazyrin A. L., Chinni S., Alhasan S., Adsay V. N., Vaitkevicius V. K., Sarkar F. H. 2002. Molecular mechanism(s) of actinomycin-D induced sensitization of pancreatic cancer cells to CD95 mediated apoptosis. *Int. J. Oncol.* 20 : 201—205.
- Huang W. C., Ju T. K., Hung M. C., Chen C. C. 2007. Phosphorylation of CBP by IKKalpha promotes cell growth by switching the binding preference of CBP from p53 to NF-kappaB. *Mol. Cell.* 26 : 75—87.

- Igotti Abramova M. V., Pojidaeva A. K., Filippova E. A., Gnedina O. O., Svetlikova S. B., Pospelov V. A. 2014. HDAC inhibitors induce apoptosis but not cellular senescence in Gadd45 α -deficient E1A + Ras cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 51 : 102—110.
- Keyomarsi K., Pardee A. B. 2003. Selective protection of normal proliferating cells against the toxic effects of chemotherapeutic agents. *Prog. Cell. Cycle Res.* 5 : 527—532.
- Kim Y. K., Lee E. K., Kang J. K., Kim J. A., You J. S., Park J. H., Seo D. W., Hwang J. W., Kim S. N., Lee H. Y., Lee H. W., Han J. W. 2006. Activation of NF-kappaB by HDAC inhibitor apicidin through Sp1-dependent *de novo* protein synthesis: its implication for resistance to apoptosis. *Cell Death Differ.* 13 : 2033—2041.
- Liu X., Chen H., Patel D. J. 1991. Solution structure of actinomycin-DNA complexes: drug interaction at isolated G-C sites. *J. Biomol. NMR.* 1 : 323—347.
- Newton R., Adcock I. M., Barnes P. J. 1996. Superinduction of NF-kappaB by actinomycin D and cycloheximide in epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 218 : 518—523.
- Noh E. J., Lim D. S., Jeong G., Lee J. S. 2009. An HDAC inhibitor, trichostatin A, induces a delay at G₂/M transition, slippage of spindle checkpoint, and cell death in a transcription-dependent manner. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378 : 326—331.
- Patel J., Sullivan P., Zhang K., Zhang S., Mock B. 2007. Combined use of HDAC and mTOR inhibitors has synergistic effect on inhibiting B-cell tumor cell lines. *Mol. Cancer Ther.* 6 : 139.
- Pospelova T. V., Leontieva O. V., Bykova T. V., Zubova S. G., Pospelov V. A., Blagosklonny M. V. 2012. Suppression of replicative senescence by rapamycin in rodent embryonic cells. *Cell Cycle.* 11 : 2402—2407.
- Pospelova T. V., Medvedev A. V., Kukushkin A. N., Svetlikova S. B., van der Eb A. J., Dorsman J. C., Pospelov V. A. 1999. E1A + cHa-ras transformed rat embryo fibroblast cells are characterized by high and constitutive DNA binding activities of AP-1 dimers with significantly altered composition. *Gene Expression.* 8 : 19—32.
- Qing C., Miao Z. H., Tong L. J., Zhang J. S., Ding J. 2003. Actinomycin D inhibiting K562 cell apoptosis elicited by salivarin but not decreasing its cytotoxicity. *Acta Pharmacol. Sin.* 24 : 415—421.
- Ravi R., Mookerjee B., van Hensbergen Y., Bedi G. C., Giordano A., El-Deiry W. S., Fuchs E. J., Bedi A. 1998. p53-mediated repression of nuclear factor-kappaB RelA via the transcriptional integrator p300. *Cancer Res.* 58 : 4531—4536.
- Ross W. E., Bradley M. O. 1981. DNA double-strand breaks in mammalian cells after exposure to intercalating agents. *Biochim. biophys. acta.* 654 : 129—134.
- Schrump D. S. 2009. Cytotoxicity mediated by histone deacetylase inhibitors in cancer cells: mechanisms and potential clinical implications. *Clin. Cancer Res.* 15 : 3947—3957.
- Shang X., Shiono Y., Fujita Y., Oka S., Yamazaki Y. 2001. Synergistic enhancement of apoptosis by DNA- and cytoskeleton-damaging agents: a basis for combination chemotherapy of cancer. *Anticancer Res.* 4A : 2585—2589.
- Shieh S.-Y., Ikeda M., Taya Y., Prives C. 1997. DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. *Cell.* 91 : 325—334.
- Shim D., Kang H. Y., Jeon B. W., Kang S. S., Chang S. I., Kim H. Y. 2004. Protein kinase B inhibits apoptosis induced by actinomycin D in ECV304 cells through phosphorylation of caspase 8. *Arch. Biochem. Biophys.* 425 : 214—220.
- Sobell H. M. 1985. Actinomycin and DNA transcription. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 82 : 5328—5331.
- Tao W., Levine A. J. 1999. p19ARF stabilizes p53 by blocking nucleocytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 96 : 6937—6941.
- Van Leeuwen I. M., Higgins M., Campbell J., Brown C. J., McCarthy A. R., Pirrie L., Westwood N., Lain S. 2011. Mechanism-specific signatures for small-molecule p53 activators. *Cell Cycle.* 10 : 1590—1598.
- Weber J. D., Taylor L. J., Roussel M. F., Sherr C. J., Bar-Sagi D. 1999. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat. Cell Biol.* 1 : 20—26.
- Webster G. A., Perkins N. D. 1999. Transcriptional cross talk between NF-kappaB and p53. *Mol. Cell. Biol.* 19 : 3485—3495.
- Yamada M., Banno Y., Takuwa Y., Koda M., Hara A., Nozawa Y. 2004. Overexpression of phospholipase D prevents actinomycin D-induced apoptosis through potentiation of phosphoinositide 3-kinase signalling pathways in Chinese-hamster ovary cells. *Biochem. J.* 378 : 649—656.
- Yu C., Tseng Y. Y. 1992. NMR study of the solution confirmation of actinomycin D. *Eur. J. Biochem.* 209 : 181—187.

Поступила 25 IV 2016

SODIUM BUTYRATE ENHANCES THE ANTIPROLIFERATIVE EFFECT OF HIGH CONCENTRATIONS OF ACTINOMYCIN D

M. V. Igotti,¹* O. O. Gnedina,² S. B. Svetlikova,¹ E. A. Filippova,² V. A. Pospelov,^{1, 2}

¹ Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg, 194064, and

² St. Petersburg State University, 199034;

* e-mail: marie.igotti@gmail.com

In the present article we have studied the combined effect of actinomycin D (AMD) with HDI sodium butyrate (NaBut) on proliferation of transformed cells. It has been shown that NaBut increased the cytotoxic effect of low concentrations of AMD (8 nM). However, the viability of the cells transformed with E1A + Ras was slightly increased under the joint action of high concentrations of AMD and NaBut. Simultaneous action of NaBut and low concentration of AMD sharply reduced the clonogenic survival of transformed cells, in parallel with increased apoptotic cell death. The study of the mechanisms of cell death induced by the combined action of NaBut and low concentrations of AMD showed that the joint treatment resulted in activation of proapoptotic transcription factor p53 and the suppression of the activity of anti-apoptotic factor NF- κ B. Thus, NaBut increased cytotoxic effect of low concentrations of AMD in oncogene-transformed cells under the joint action, increasing their apoptotic death. These results can be used in the selection of the correct dosage of drugs for the effective combined anti-cancer therapy using HDIs and AMD.

Key words: histone deacetylase inhibitors, actinomycin D, apoptosis, transformed cells.