

ВЛИЯНИЕ ИНГИБИТОРА HDAC БУТИРАТА НАТРИЯ НА ЭКСПРЕССИЮ РЕПАРАЦИОННЫХ ГЕНОВ *Rad51* и *XRCC5* В ФИБРОБЛАСТАХ ЛИНИЙ *mEras-Waf1+/+* и *mEras-Waf1-/-*

© А. Н. Кукушкин,* С. Б. Светликова, В. А. Поспелов

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

* электронный адрес: kan@incras.ru

Трансформированные мышинные фибробласты с нокаутом гена *CDKN1A*, кодирующего белок p21/Waf1 (клетки *mEras-Waf1-/-*), характеризуются большим количеством однопочечных разрывов ДНК и ассоциированных с ними фокусов гистона γ -H2A.X по сравнению с исходной линией трансформантов E1A+cHa-ras (клетки *mEras-Waf1+/+*). По данным иммунофлуоресценции и иммуноблотинга, ядра клеток обеих исследованных линий *mEras-Waf1+/+* и *mEras-Waf1-/-* содержат значительные количества белков Rad51 и Ku80, участвующих в репарации ДНК, с некоторым преобладанием Ku80 в клетках с нокаутом гена *CDKN1A*. При кратковременном воздействии на клетки обеих линий ДНК-повреждающего агента адриамицина в их ядрах происходит дополнительное накопление фокусов белка Rad51. Однако ингибитор HDAC бутират натрия заметно снижает содержание белков Rad51 и Ku80 как в интактных клетках *mEras-Waf1+/+* и *mEras-Waf1-/-*, так и в клетках, обработанных адриамицином. Результаты ОТ-ПЦР и иммуноблотинга позволили установить, что ингибирующее влияние бутирата натрия (NaBut) проявляется как на уровне транскрипции генов *Rad51* и *XRCC5*, так и на уровне трансляции соответствующих репарационных белков Rad51 и Ku80. Наблюдаемое супрессивное действие NaBut (ингибитора HDAC) на компоненты систем репарации ДНК отчасти можно объяснить антипролиферативной функцией ингибиторов HDAC. Кроме того, в клетках *mEras-Waf1+/+* и *mEras-Waf1-/-* обнаружена транскрипционная активация генов плюрипотентности *Oct-4*, *Sox-2* и *Klf4* при действии NaBut, что предполагает нахождение этих генов под негативным контролем на уровне структуры хроматина.

Ключевые слова: гены *Rad51*, *XRCC5* и *CDKN1A*, репарация ДНК, бутират натрия.

Принятые сокращения: ОТ — обратная транскрипция, ПААГ — полиакриламидный гель, ПЦР — полимеразная цепная реакция, DDR — клеточный ответ на повреждение ДНК, DSB — двухцепочечные разрывы ДНК, HDAC — гистондеацетилазы, NaBut — бутират натрия, NHEJ — негомологичная рекомбинация ДНК.

Эмбриональные фибробласты крысы или мыши, постоянно трансформированные онкогенами *E1A* и *cHa-ras*, проявляют фенотип полностью трансформированных клеток (Поспелова и др., 1990; Romanov et al., 2011). В отличие от них E1A+cHa-ras-трансформанты, нокаутные по гену *CDKN1A*, который кодирует циклинзависимый киназный ингибитор (CDKI) p21/Waf1, являются не полностью трансформированными клетками (сохраняют морфологию исходных фибробластов мыши, не гипертрофированы, меньше подвержены клеточной миграции) (Romanov et al., 2011; Романов и др., 2012). Бутират натрия (NaBut), известный как ингибитор гистондеацетилаз (HDAC), вызывает G₁/S-блок клеточного цикла как у Waf1-позитивных (*mEras-Waf1+/+*), так и у Waf1-нокаутных (*mEras-Waf1-/-*) трансформированных фибробластов мыши. Но только у клеток *mEras-Waf1+/+* этот блок носит необратимый характер и приводит к старению клеток (Romanov et al., 2010). При старении клеток в ядре происходит накопление фокусов гистона γ -H2A.X, связанных с разрывами ДНК (Herbig et al., 2004; Суворова и др., 2013). Однако есть данные о том, что такие фокусы могут не быть ассоциированы с разрывами ДНК; в част-

ности, длительная обработка NaBut трансформированных фибробластов E1A+cHa-ras может приводить к образованию подобных фокусов без разрывов ДНК (Pospelova et al., 2009; Romanov et al., 2010; Rodier et al., 2011).

Белок p21/Waf1 принимает участие во многих клеточных процессах в ядре и цитоплазме — пролиферации, старении, апоптотической гибели и репарации ДНК (Романов и др., 2012). Что касается репарации, то показано, что p21/Waf1 взаимодействует со многими белками, играющими важную роль в репарации: с белком PCNA при участии p300 (Avkin et al., 2006; Cazzalini et al., 2008), с PARP1 (Cazzalini et al., 2010), белком негомологичной рекомбинации (NHEJ) Ku80 (Koike et al., 2011) и белком гомологичной рекомбинации Rad51 (Raderschall et al., 2002). Ингибиторы HDAC1, в частности NaBut, непосредственно не вызывают повреждений ДНК, однако могут способствовать стабилизации двухцепочечных разрывов ДНК (Eot-Houllier et al., 2009), подавляя активность систем репарации, например приводя к ацетилированию белка Ku70 — партнера белка Ku80 в комплексе NHEJ (Chen et al., 2007) — или к подавлению экспрессии Rad51 (Adimoolam et al., 2007).

В этой связи мы посчитали необходимым исследовать экспрессию и локализацию репарационных белков Rad51 и Ku80 в двух клеточных линиях эмбриональных клеток мыши, трансформированных комплементирующими онкогенами *E1A* и *cHa-ras*, — в исходных клетках (mEras-Waf1+/+) и в клетках с нокаутом гена *CDKN1A* (mEras-Waf1-/-), в которых NaBut способен индуцировать образование фокусов γ -H2A.X, сходных с фокусами, возникающими в местах разрывов ДНК, и связанных с комплексами репарации.

Материал и методика

Клетки. Линия mEras-Waf1+/+ эмбриональных фибробластов мыши (MEF), трансформированных онкогенами *E1A* и *cHa-ras*, была получена ранее (Поспелова и др., 1990). Клетки mEras-Waf1-/- были получены из MEF, нокаутных по гену *CDKN1A*, после их трансформации *E1A* и *cHa-ras* (Abramova et al., 2006). Клетки на чашках выращивали в среде DMEM, содержащей 10 % эмбриональной сыворотки теленка (FCS), до 70%-ной плотности. Клетки обрабатывали адриамицином (Sigma, США) в конечной концентрации 200 нг/мл в течение 40 мин и (или) 4 mM NaBut (Sigma, США) в течение 24 или 72 ч.

Анализ одноцепочечных разрывов ДНК в отдельных клетках с помощью электрофореза в агарозном геле в денатурирующих условиях проводили методом ДНК-комет, как описано (Olive, Banath, 2006), с некоторыми модификациями. Препараты клеток, окрашенных бромистым этидием (Sigma, США), анализировали с помощью конфокального микроскопа Axiovert 200M (Zeiss, Германия) с камерой DFC420 (Leica, США). Достоверность количественных данных оценивали по *t*-критерию Стьюдента.

Иммуноблотинг. Клеточные экстракты получали, как описано ранее (Kukushkin et al., 2008), в присутствии ингибиторов протеаз (1 mM фенилметилсульфонил-фторида, пепстатина А, леупептина и апротинина по 10 мкг/мл каждого (Sigma)) и ингибиторов фосфатаз (1 mM ортованадата натрия, 5 mM EGTA, 10 mM фторида натрия (Sigma)). Концентрацию белка определяли методом Брэдфорд (Bradford, 1976). Белки клеточных экстрактов в количестве 40—80 мкг разделяли электрофоретически в 10%-ном или 12.5%-ном (в случае гистонов) ПААГ в Трис-глициновом буфере (25 mM, pH 8.5), содержащем 0.1 % SDS. Маркерами молекулярной массы служили цветные белки из набора SeeBluePlus2 (Invitrogen, США). После электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Trans-Blot (Bio-Rad, США). Интересующие белки выявляли на мембране с помощью антител кролика к Rad51 (sc-8349, SantaCruz, США), Ku80 (2753S, Cell Signaling, США), γ -H2A.X (2577S, Cell Signaling) и GAPDH (2118S, Cell Signaling). В качестве вторых антител использовали антитела козла против иммуноглобулинов кролика (GAR и A0545, Sigma), конъюгированные с пероксидазой хрена. Сигналы от антител на мембранах выявляли стандартным методом усиления хемолюминесценции (ECL, Sigma) или его более чувствительным вариантом (Pierce, США) в соответствии с инструкциями фирм-производителей. Для количественной оценки определяли значения интенсивности полос анализируемых

белков в усл. ед., относили их к значениям в контрольных пробах и полученные относительные значения нормировали по отношению к значениям интенсивности полос контрольного белка GAPDH. Иммуноблотинг с антителами повторяли не менее 2 раз.

Обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ОТ-ПЦР). Тотальную клеточную РНК выделяли с использованием реагента Trizol (Invitrogen, США) согласно протоколу фирмы-производителя с последующей проверкой концентрации и целостности РНК электрофорезом в агарозном геле в денатурирующих условиях с формальдегидом (Маниатис и др., 1984). Реакции ОТ и амплификации кДНК (ПЦР), а также последующий электрофорез продуктов ПЦР проводили, как описано ранее (Kukushkin et al., 2002). Нуклеотидные последовательности ПЦР-праймеров для кДНК генов *GAPDH* (внутренний контроль транскрипции) и *Oct-4*, а также условия ПЦР и размеры образующихся фрагментов ДНК были приведены в предыдущих работах (Kukushkin et al., 2002; Sineva, Pospelov, 2010). ПЦР-праймеры для кДНК других исследуемых генов мыши были сгенерированы нами и синтезированы компанией Синтол (Россия): для III экзона *Rad51*: 5'-TAAATGCCAATGATGTGAAG-3'/5'-TTTGTACAGCTTTGGCTTC-3' (размер ПЦР-фрагмента 122 п. н., температура отжига 48 °C); для III экзона *XRCC5*: 5'-TTCGGAGAGCAAAGATGAG-3'/5'-CGATGTCTTCCAGCAAATC-3' (размер ПЦР-фрагмента 143 п. н., температура отжига 51.7 °C); для *Sox-2*: 5'-ACATGACGGCTGGAGCAACG-3'/5'-CATGTAGGTCTGCGAGCTGGTC-3' (размер ПЦР-фрагмента 167 п. н., температура отжига 58 °C); для *Klf4*: 5'-GACTAACCGTTGGCGTGAG-3'/5'-CGGGTTGTTACTGCTGCAAG-3' (размер ПЦР-фрагмента 139 п. н., температура отжига 59 °C). Реакции ПЦР продолжались не более 25 циклов, в ходе которых фрагменты ДНК амплифицировались линейно. Продукты ПЦР разделяли электрофоретически в 2%-ном агарозном геле в Трис-ацетатном буфере (40 mM, pH 7.8). Маркерные фрагменты ДНК Gel Ruler, кратные 100 п. н., были от фирмы Fermentas (Литва). Все эксперименты ПЦР повторяли не менее 3 раз. Интенсивность полос продуктов ПЦР оценивали количественно после денситометрии и выражали в виде значений относительной интенсивности (усл. ед.), нормированных к интенсивности фрагмента ДНК контрольного гена *GAPDH*.

Иммунофлуоресцентную микроскопию проводили, как описано в работе Суворовой и соавторов (2013), с дополнительной промывкой препаратов после фиксации 0.1 M глицином на растворе PBS. Использовали антитела к белкам Rad51, Ku80 и γ -H2A.X (см. описание иммуноблотинга). Вторые антитела козла против иммуноглобулинов кролика (GAR) были конъюгированы с флуорохромами AlexaFluor 488 или AlexaFluor 568 (Invitrogen, США). Ядра клеток окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (Invitrogen, США). Препараты просматривали на конфокальном микроскопе Leica TCS SP5 (США). В препаратах считали клетки с фокусами гистона γ -H2A.X или оценивали интенсивность флуоресценции белков Rad51 и Ku80 с учетом числа клеток на микрофотографиях и площади изображений этих клеток с помощью некоммерческой программы ImageJ. Опыты по иммунофлуоресценции повторяли не менее 3—4 раз для каждого белка.

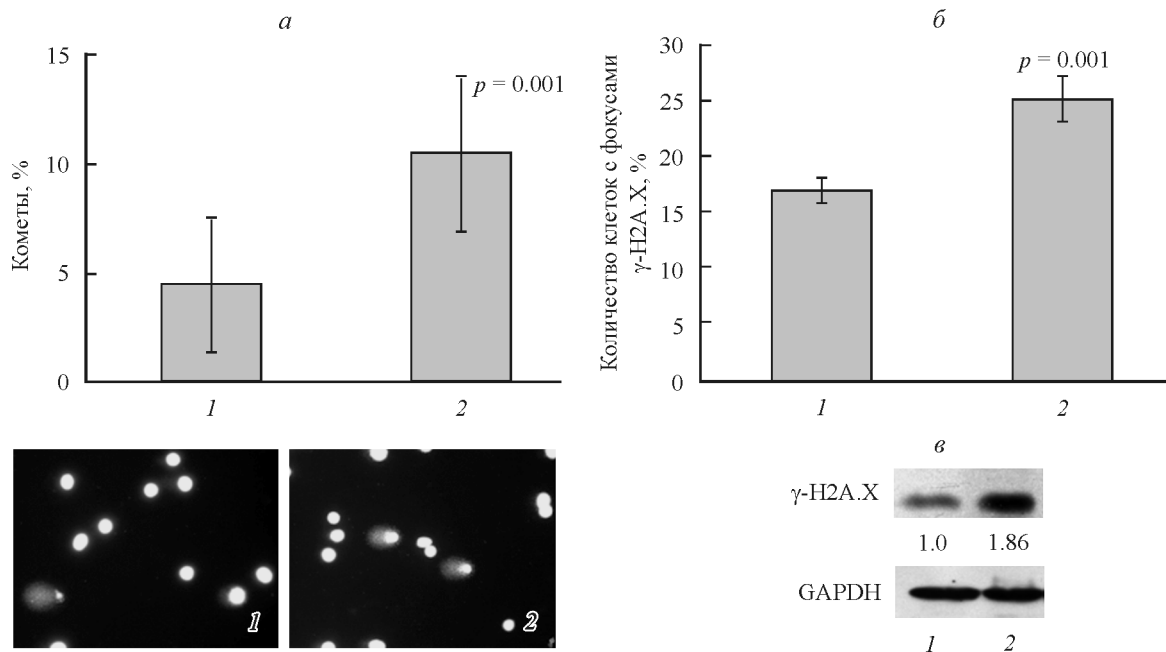


Рис. 1. Количественная оценка разрывов ДНК (а, б) в ядрах клеток mEras-Waf1+/+ (столбцы 1, фото 1) и mEras-Waf1-/- с нокаутом гена *CDKN1A* (столбцы 2, фото 2).

а — количество клеток, образующих ДНК-кометы при электрофорезе одиночных клеток в денатурирующих условиях: mEras-Waf1+/+ — 4.5 ± 3.1 % (столбец 1), mEras-Waf1-/- — 10.5 ± 3.5 % (столбец 2); обсчитывали не менее 30 микрофотографий для каждой линии, $p = 0.001$ — уровень значимости *t*-критерия Стьюдента; представлены типичные микрофотографии ядер и «комет» этих двух линий (фото 1 и 2 соответственно). б — доля клеток с ядерными фокусами гистона γ -H2A.X после иммунофлуоресценции с антителами к этому гистону: mEras-Waf1+/+ — 17 ± 1 % (столбец 1), mEras-Waf1-/- — 25 ± 2 % (столбец 2); обсчитывали клетки на 24 микрофотографиях из 3 экспериментов, $p = 0.001$ — уровень значимости *t*-критерия Стьюдента. в — иммуноблотинг гистона γ -H2A.X и контрольного белка GAPDH для клеток mEras-Waf1+/+ (1) и mEras-Waf1-/- (2); под дорожкой γ -H2A.X приведены относительные значения интенсивности полос γ -H2A.X в усл. ед., нормированные к значениям интенсивности полос GAPDH, для 1 из 3 экспериментов.

Результаты и обсуждение

Поскольку белок p21/Waf1 вовлечен в функционирование различных систем репарации ДНК (Raderschall et al., 2001; Avkin et al., 2006; Koike et al., 2011; Романов и др., 2012), клетки с делецией гена *CDKN1A*, кодирующего p21/Waf1, обнаруживают большее количество одноцепочечных разрывов ДНК по сравнению с клетками, содержащими полный геном. Так, денатурирующий электрофорез ДНК отдельных клеток в геле (метод комет) показывает, что количество одноцепочечных разрывов ДНК, образующих фрагменты ДНК и видимых под микроскопом как «кометные хвосты», в трансформированных фибробластах линии mEras-Waf1-/- с нокаутом гена *CDKN1A* в 2 раза больше (10.5 ± 3.5 %), чем в исходной линии клеток mEras-Waf1+/+ (4.5 ± 3.1 %) (рис. 1, а). Это различие между линиями достоверно согласно *t*-критерию Стьюдента с уровнем значимости $p = 0.001$ для выборки из 30 микрофотографий.

Одно- и двухцепочечные разрывы ДНК (DSB) *in vivo* зачастую ассоциируются с формированием ядерных фокусов фосфорилированного гистона γ -H2A.X, который является маркером DSB (Bonner et al., 2008; Суворова и др., 2013). Подсчет клеток с фокусами γ -H2A.X на микрофотографиях показал, что в трансформантах mEras-Waf1-/- их в 1.5 раза больше (25 ± 2 %) по сравнению с mEras-Waf1+/+ (17 ± 1 %) (рис. 1, б). Это различие также достоверно согласно *t*-критерию Стьюдента с уровнем значимости $p = 0.001$ для выборки из 24 микрофотографий. По данным иммуноблотинга с антителами к γ -H2A.X, общее содержание гистона γ -H2A.X в клетках

mEras-Waf1-/- тоже оказывается почти в 2 раза выше, чем в клетках mEras-Waf1+/+ (рис. 1, в). Таким образом, наши данные демонстрируют, что в клетках mEras-Waf1-/-, не экспрессирующих белок p21/Waf1 (Romanov et al., 2011), накапливается больше одно- и двухцепочечных разрывов хромосомной ДНК по сравнению с исходной линией трансформантов mEras-Waf1+/+.

Логично задаться вопросом: как обстоит дело с системами репарации ДНК в этих двух линиях? Для изучения этого вопроса были выбраны ключевые белки гомологичной (Rad51) и нехомологичной (Ku80) рекомбинации, а также кодирующие их гены. Поскольку NaBut (ингибитор HDAC) способен подавлять репарацию ДНК (Adimoolam et al., 2007; Chen et al., 2007), мы решили проверить его влияние на количество Rad51 и Ku80 в двух анализируемых клеточных линиях.

Интенсивность иммунофлуоресценции белков Rad51 и Ku80 оценивали не только визуально, но и количественно с учетом числа клеток на микрофотографиях и площади изображений этих клеток с помощью программы ImageJ. На рис. 2, а видно, что распределение белка Rad51 преимущественно в ядрах клеток имеет дисперсный характер или он образует мелкие фокусы. Интенсивность иммунофлуоресценции приблизительно одинакова в клеточных линиях mEras-Waf1+/+ и mEras-Waf1-/. Однако обработка клеток обеих линий 4 mM NaBut в течение 3 сут приводила к заметному уменьшению интенсивности иммунофлуоресценции Rad51 в клетках обоих типов (рис. 2, а), что, скорее всего, означает снижение его содержания.

Основная масса белка Ku80 образует в ядрах крупные фокусы на фоне более слабой окраски остальной части

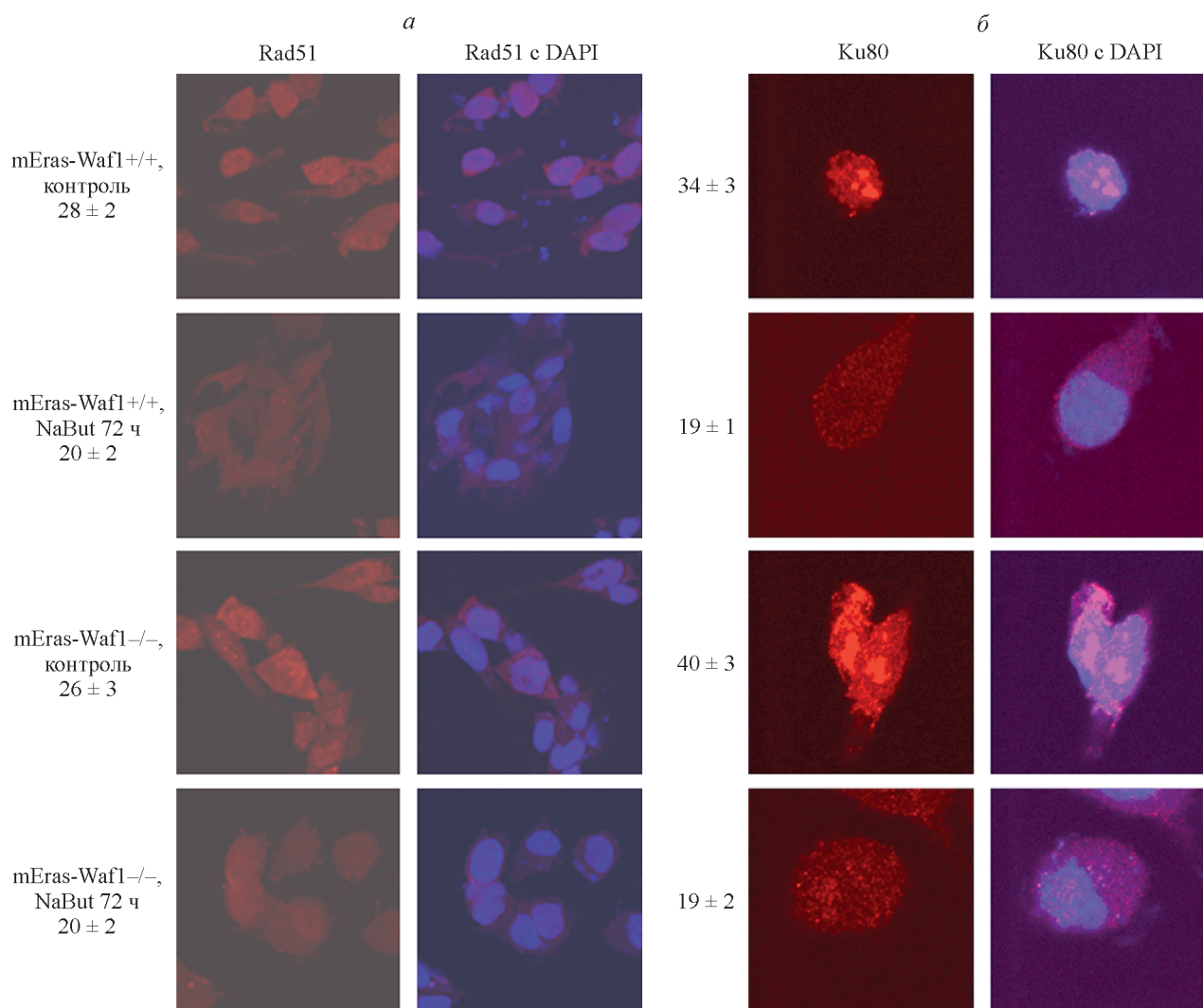


Рис. 2. Иммунофлуоресценция белков Rad51 (а) и Ku80 (б) в контрольных клетках mEras-Waf1+/+ и mEras-Waf1-/- и после их обработки бутиратом натрия (NaBut, 4 мМ) в течение 72 ч. Ядра клеток окрашены DAPI.

Слева от соответствующих микрофотографий указаны средние значения и их ошибки интенсивности красной флуоресценции Rad51 или Ku80, нормированные по числу клеток и площади их изображений. Подсчеты интенсивности проводили для не менее 20 микрофотографий в 3 микроскопических препаратах для каждого опыта.

ядер, также наблюдается некоторое фоновое окрашивание цитоплазмы (рис. 2, б). Интенсивность иммунофлуоресценции Ku80 в трансформантах mEras-Waf1-/- несколько выше (40 против 34 усл. ед.), чем в mEras-Waf1+/+. Кроме того, следует отметить обычно более крупные фокусы Ku80 в клетках без экспрессии белка p21/Waf1. В случае Ku80 особенно выражено ингибирующее действие NaBut, когда интенсивность иммунофлуоресценции Ku80 падала приблизительно в 2 раза у обеих линий (рис. 2, б). Для отдельных клеток, представленных на этом рисунке, хорошо заметен уже известный факт, что длительное действие NaBut вызывает гипертрофию клеток.

Мы исследовали активность белков репарации в интактных клетках или в присутствии NaBut, который сам по себе не может нарушить целостность ДНК. Однако есть много агентов, действие которых вызывает двухцепочечные разрывы ДНК (DSB) и соответствующий ответ клеток на это повреждение (DDR), включающий активацию систем репарации, в частности гомологичной рекомбинации с белком Rad51. Среди ДНК-повреждающих агентов часто используют адриамицин, который в низкой

концентрации (200 нг/мл) за короткое время вызывает DSB. Мы обрабатывали клетки обеих линий адриамицином в указанной концентрации в течение 40 мин, а затем инкубировали в присутствии NaBut 3 сут. Рис. 3, а показывает, как быстро происходит накопление белка Rad51 в ядрах клеток mEras-Waf1+/+, причем это настолько выражено, что сигналы от фокусов Rad51 сливаются. Дальнейшее действие NaBut приводит к резкому снижению интенсивности иммунофлуоресценции Rad51 в ядрах mEras-Waf1+/+, не связанному с сопутствующей гипертрофией клеток, судя по площади изображений клеток при оценке интенсивности сигнала, а также к появлению мелких фокусов Rad51 в цитоплазме (рис. 3, а).

Для клеток mEras-Waf1-/- картина действия адриамицина количественно не столь выразительна, как для mEras-Waf1+/+, но тем не менее видно, что адриамицин вызывает структурирование сигнала от Rad51 в виде многочисленных мелких фокусов в ядрах (рис. 3, б). NaBut существенно снижает число фокусов Rad51, оставляя только фоновое свечение в клетках mEras-Waf1-/- (рис. 3, б).

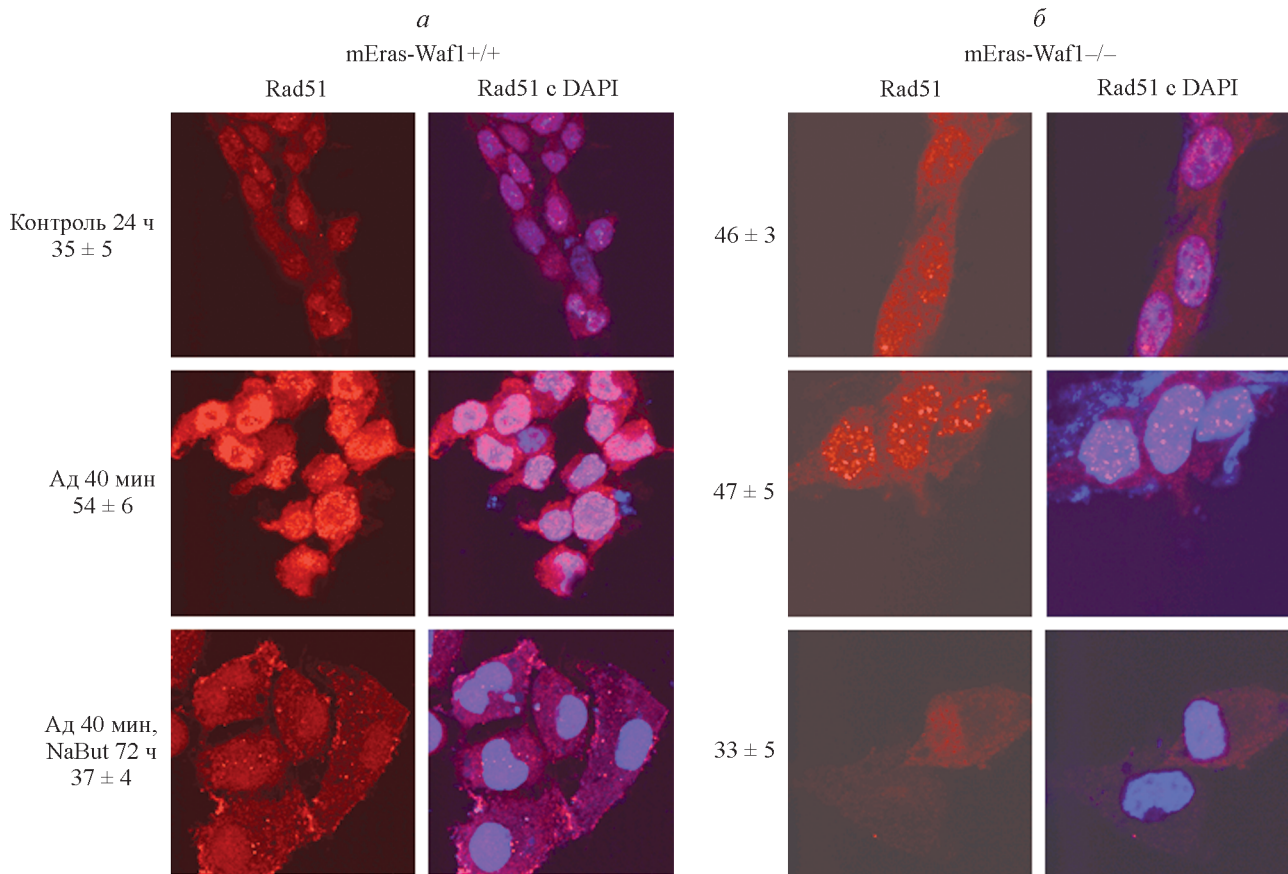


Рис. 3. Иммунофлуоресценция белка Rad51 в ядрах клеток mEras-Waf1+/+ (a) и mEras-Waf1-/- (б) до и после действия ДНК-повреждающего агента адриамицина (Ад, 200 нг/мл, 40 мин) и последующей обработки 4 мМ NaBut. Слева от соответствующих микрофотографий указаны средние значения и их ошибки интенсивности красной флуоресценции Rad51, нормированные по количеству клеток и площади их изображений. Подсчеты интенсивности проводили для не менее 20 микрофотографий в 3 препаратах для каждого опыта.

Таким образом, система гомологичной рекомбинации на примере белка Rad51 приблизительно одинаково активна в обеих линиях клеток, тогда как компонент негомологичной рекомбинации белок Ku80 более активен в клетках mEras-Waf1-/- . Длительное действие NaBut заметно подавляет активность обеих репарационных систем независимо от экспрессии белка p21/Waf1 в исследованных клетках. Получив подобные данные с NaBut, нам представилось интересным проанализировать, какие молекулярные механизмы участвуют в этом процессе.

Иммуноблотинг белков, полученных из клеток обеих линий, показывает высокий уровень экспрессии Ku80 и Rad51 в контрольных клетках (рис. 4, a), причем уровень экспрессии белка Rad51 заметно выше в клетках mEras-Waf1-/- . Длительная обработка клеток NaBut в течение 72 ч вызвала снижение содержания белков Ku80 и Rad51 приблизительно в 2 раза в обеих клеточных линиях (рис. 4, a). Такая регуляция трансляции белков Ku80 и Rad51 в присутствии NaBut вполне согласуется с приведенными выше данными иммунофлуоресценции.

Транскрипцию генов *Rad51* и *XRCC5*, которую кодирует белок Ku80, оценивали с помощью ОТ-ПЦР. Эксперименты показали, что оба гена транскрибируются в контрольных клетках обеих линий на заметном уровне (рис. 4, б), который в случае необработанных клеток mEras-Waf1+/+ принимался за условную единицу, нормированную по отношению к контрольному гену *GAPDH*. Однако инкубация клеток с NaBut в течение 24 или 72 ч

приводит к подавлению транскрипции *XRCC5* и *Rad51* в клетках mEras-Waf1+/+ . А в клетках, дефицитных по p21/Waf1, NaBut ингибирует транскрипцию только гена *XRCC5*, а транскрипцию гена *Rad51* меняет мало (рис. 4, б). Таким образом, NaBut, будучи ингибитором HDAC, вероятно, так меняет конформацию хроматина в области активно транскрибируемых генов *XRCC5* и *Rad51* в контрольных клетках, что транскрипция этих генов частично подавляется.

Статус плюрипотентности эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) обусловлен экспрессией эмбриональных генов, таких как *Oct-4*, *Sox-2*, *Klf4* и др. Однако эти гены могут транскрибироваться не только в ЭСК, но и в других клетках, особенно опухолевых и трансформированных (Ambady et al., 2010; Hu et al., 2011; Shan et al., 2012). В этой связи мы решили проанализировать, каков уровень транскрипции генов плюрипотентности *Oct-4*, *Sox-2* и *Klf4* в E1A+cHa-ras-трансформированных клетках и насколько он зависит от присутствия эндогенного белка p21/Waf1 и (или) NaBut, который как ингибитор HDAC может модулировать транскрипционную активность генов. Данные ОТ-ПЦР показали, что в трансформантах mEras-Waf1+/+ и mEras-Waf1-/- транскрипция генов *Oct-4*, *Sox-2* и *Klf4* находится на низком уровне (рис. 5), за исключением гена *Sox-2* в трансформантах mEras-Waf1-/- , в которых его уровень в 3 раза выше, чем в клетках mEras-Waf1+/+ . При такой высокой транскрипционной активности ген *Sox-2* в клетках mEras-Waf1-/-

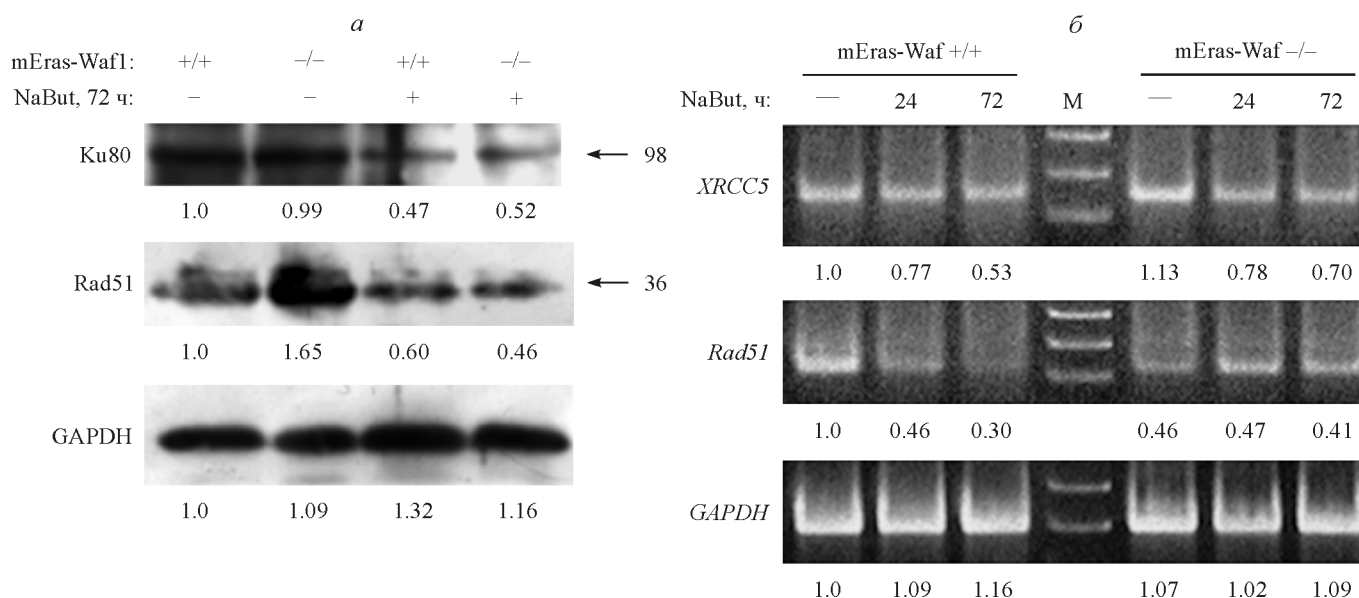


Рис. 4. Экспрессия белков Ku80 и Rad51 (а) и транскрипция мРНК их генов (б) в клетках mEras-Waf1+/+ и mEras-Waf1-/- в контроле и после действия 4 мМ NaBut.

а — иммуноблот белков из клеток mEras-Waf1+/+ (+/+) и mEras-Waf1-/- (-/-) в контроле (-) и после 72-часового действия NaBut (+). Справа — положения белковых маркеров, кДа. б — электрофоретическое разделение продуктов ОТ-ПЦР с праймерами к кДНК генов XRCC5 (кодирует Ku80, размер PCR-фрагмента 143 п. н.), Rad51 (122 п. н.) и GAPDH (297 п. н.) в 2%-ном агарозном геле. Клетки инкубировали в присутствии NaBut 24 или 72 ч или без него (-); М — маркерные фрагменты ДНК, кратные 100 п. н. Под каждой дорожкой приведены относительные значения (усл. ед.) интенсивности полос анализируемых белков (а) или ПЦР-фрагментов (б), нормированные по отношению к значениям интенсивности полос контрольного белка или гена GAPDH, для 1 из 3 экспериментов.

неспособен активироваться NaBut, тогда как другие исследованные гены претерпевают заметную активацию транскрипции в 1.5—6 раз (рис. 5). Эта активация транскрипции в присутствии NaBut носит двойственный ха-

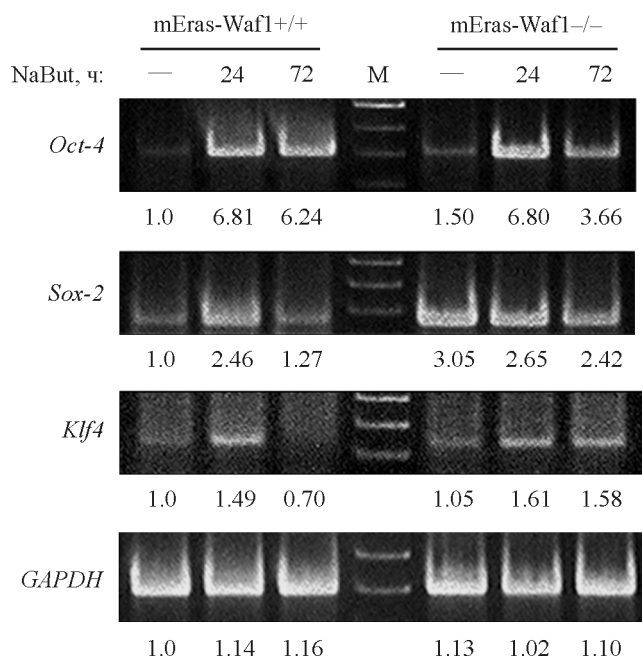


Рис. 5. Электрофоретическое разделение продуктов ОТ-ПЦР с праймерами к кДНК генов Oct-4 (размер фрагмента 307 п. н.), Sox-2 (167 п. н.), Klf4 (139 п. н.) и GAPDH в 2%-ном агарозном геле для клеток mEras-Waf1+/+ и mEras-Waf1-/- в контроле и после действия 4 мМ NaBut.

Объяснения те же, что и в подписи к рис. 4.

рактер: в одних случаях пик активации приходится на 24 ч, а затем через 72 ч следует ее спад (гены Sox-2 и Klf4 в клетках mEras-Waf1+/+, Oct-4 в клетках mEras-Waf1-/-); в других — транскрипционная активность также возрастает через 24 ч, но далее не падает, а выходит на плато на протяжении 72 ч (Oct-4 в клетках mEras-Waf1+/+; Klf4 в клетках mEras-Waf1-/-) (рис. 5). По-видимому, тут действуют более тонкие механизмы регуляции транскрипции, нежели дополнительное ацетилирование гистонов-мишеней H3 и H4 гистонацетилазными ферментами в промоторах анализируемых эмбриональных генов в присутствии ингибитора HDAC (NaBut). Впрочем, их детальный анализ выходит за рамки настоящей статьи. Так как картина подобной активации транскрипции довольно разнообразна у разных генов в двух клеточных линиях, не исключено, что свой вклад в этот процесс вносит экспрессия гена CDKN1A, кодирующего белок p21/Waf1, или ее отсутствие.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» (данные по ОТ-ПЦР и анализу «комет») и Российского научного фонда (проект 14-50-00068; данные по иммуноблотингу и иммунофлуоресценции).

Список литературы

- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. 1984. Молекулярное клонирование. М.: Мир. 480 с. (Maniatis T., Fritsch E. E., Sambrook J. 1982. Molecular cloning. Cold Spring Harbor Lab. 545 p.)
- Поспелова Т. В., Кислякова Т. В., Медведев А. В., Светликова С. Б., Поспелов В. А. 1990. Характеристика трансформированного фенотипа и экспрессии САТ-плазмид в клетках эмбриональных фибробластов крысы, трансформированных онкогенами E1A + cHa-ras. Цитология. 32 (2) : 148—155. (Pos-

- pelova T. V., Kisliakova T. V., Medvedev A. V., Svetlikova S. B., Pospelov V. A. 1990. The characteristics of the transformed phenotype and the expression of indicator plasmids in the cells of rat embryonic fibroblasts immortalized by oncogene *E1Aad5* and transformed by oncogenes *E1Aad5+c-Ha-ras*. *Tsitologiya*. 32 (2): 148—155.)
- Романов В. С., Поспелов В. А., Поспелова Т. В. 2012. Ингибитор циклин-зависимых киназ p21^{Waf1}: современный взгляд на роль в клеточном старении и онкогенезе. *Биохимия*. 77 (6): 701—712. (Romanov V. S., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 2012. Cyclin-dependent kinase inhibitor p21^{Waf1}: up-to-date view on its role in senescence and oncogenesis. *Biochemistry (Moscow)*. 77 (6): 575—584.)
- Суворова И. И., Кожухарова И. В., Никольский Н. Н., Поспелов В. А. 2013. Активация АТМ/ATR-киназного сигнального пути в эмбриональных стволовых клетках человека после повреждения ДНК. *Цитология*. 55 (12): 841—851. (Suvorova I. I., Kozhukharova I. V., Nikolsky N. N., Pospelov V. A. 2013. ATM/ATR signaling pathway activation in human embryonic stem cells after DNA damage. *Tsitologiya*. 55 (12): 841—851.)
- Abramova M. V., Pospelova T. V., Nikulenkova 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.
- Adimoolam S., Sirisawad M., Chen J., Thiemann P., Ford J. M., Buggy J. J. 2007. HDAC inhibitor PCI-24781 decreases RAD51 expression and inhibits homologous recombination. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 104: 19 482—19 487.
- Ambady S., Malcuit C., Kashpur O., Kole D., Holmes W. F., Hedblom E., Page R. L., Dominko T. 2010. Expression of NANOG and NANOGP8 in a variety of undifferentiated and differentiated human cells. *Int. J. Develop. Biol.* 54: 1743—1754.
- Avkin S., Sevilya Z., Toubé L., Geacintov N., Chaney S. G., Oren M., Livneh Z. 2006. p53 and p21 regulate error-prone DNA repair to yield a lower mutation load. *Mol. Cell*. 22: 407—413.
- Bonner W. M., Redon C. E., Dickey J. S., Nakamura A. J., Sedelnikova O. A., Solier S., Pommier Y. 2008. γ H2AX and cancer. *Nat. Rev. Cancer*. 8: 957—967.
- Bradford M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248—254.
- Cazzalini O., Perucca P., Savio M., Necchi D., Bianchi L., Stivala L. A., Ducommun B., Scovassi A. I., Prosperi E. 2008. Interaction of p21 (CDKN1A) with PCNA regulates the histone acetyltransferase activity of p300 in nucleotide excision repair. *Nucl. Acids Res.* 36: 1713—1722.
- Cazzalini O., Scovassi A. I., Savio M., Stivala L. A., Prosperi E. 2010. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21 (CDKN1A) in the DNA damage response. *Mutat. Res.* 704: 12—20.
- Chen C.-S., Wang Y.-C., Yang H.-C., Huang P.-H., Kulp S. K., Yang C.-C., Lu Y.-S., Matsuyama S., Chen C.-Y., Chen C.-S. 2007. Histone deacetylase inhibitors sensitize prostate cancer cells to agents that produce DNA double-strand breaks by targeting Ku70 acetylation. *Cancer Res.* 67: 5318—5327.
- Eot-Houllier G., Fulcrand G., Magnaghi-Jaulin L., Jaulin C. 2009. Histone deacetylase inhibitors and genomic instability. *Cancer Lett.* 274: 169—176.
- Herbig U., Jobling W. A., Chen B. P., Chen D. J., Sedivy J. M. 2004. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21CIP1, but not p16INK4a. *Mol. Cell*. 14: 501—513.
- Hu J., Qin K., Zhang Y., Gong J., Li N., Lv D., Xiang R., Tan X. 2011. Downregulation of transcription factor Oct4 induces an epithelial-to-mesenchymal transition via enhancement of Ca²⁺ influx in breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 411: 786—791.
- Koike M., Yutoku Y., Koike A. 2011. Accumulation of p21 proteins at DNA damage sites independent of p53 and core NHEJ factors following irradiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 412: 39—43.
- Kukushkin A. N., Abramova M. V., Svetlikova S. B., Darieva Z. A., Pospelova T. V., Pospelov V. A. 2002. Downregulation of *c-fos* gene transcription in cells transformed by *E1A* and *cHa-ras* oncogenes: a role of sustained activation of MAP/ERK kinase cascade and of inactive chromatin structure at *c-fos* promoter. *Oncogene*. 21: 719—730.
- Kukushkin A. N., Svetlikova S. B., Amanzholov R. A., Pospelov V. A. 2008. Anisomycin abrogates repression of protooncogene *c-fos* transcription in E1A+cHa-ras-transformed cells through activation of MEK/ERK kinase cascade. *J. Cell. Biochem.* 103: 1005—1012.
- Olive P. L., Banath J. P. 2006. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells. *Nat. Protoc.* 1: 23—29.
- Pospelova T. V., Demidenko Z. N., Bukreeva E. I., Pospelov V. A., Gudkov A. V., Blagosklonny M. V. 2009. Pseudo-DNA damage response in senescent cells. *Cell Cycle*. 8: 4112—4118.
- Raderschall E., Bazarov A., Cao J., Lurz R., Smith A., Mann W., Hans-Ropers H., Sedivy J. M., Golub E. I., Fritz E., Haaf T. 2002. Formation of higher-order nuclear Rad51 structures is functionally linked to p21 expression and protection from DNA damage-induced apoptosis. *J. Cell Sci.* 115: 153—164.
- Rodier F., Muñoz D. P., Teachenor R., Chu V., Le O., Bhaumik D., Coppé J. P., Campeau E., Beauséjour C. M., Kim S. H., Davalos A. R., Campisi J. 2011. DNA-SCARS: distinct nuclear structures that sustain damage-induced senescence growth arrest and inflammatory cytokine secretion. *J. Cell Sci.* 124: 68—81.
- 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: 1—11.
- Romanov V. S., Bardin A. A., Zubova S. G., Tatiana V., Bykova T. V., Pospelov V. A., Pospelova T. V. 2011. p21^{Waf1} is required for complete oncogenic transformation of mouse embryo fibroblasts by E1Aad5 and c-Ha-ras oncogenes. *Biochimie*. 93: 1408—1414.
- Shan J., Shen J., Liu L., Xia F., Xu C., Duan G., Xu Y., Ma Q., Yang Z., Zhang Q., Ma L., Liu J., Xu S., Yan X., Bie P., Cui Y., Bian X. W., Qian C. 2012. Nanog regulates self-renewal of cancer stem cells through the insulin-like growth factor pathway in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 56: 1004—1014.
- Sineva G. S., Pospelov V. A. 2010. Inhibition of GSK3 β enhances both adhesive and signalling activities of beta-catenin in mouse embryonic stem cells. *Biol. Cell*. 102: 549—560.

INFLUENCE OF HDAC INHIBITOR SODIUM BUTYRATE ON THE EXPRESSION
OF DNA REPAIR GENES *Rad51* AND *XRCC5* IN mEras-Waf1^{+/+} AND mEras-Waf1^{-/-}
TRANSFORMED CELLS

A. N. Kukushkin,* S. B. Svetlikova, V. A. Pospelov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

* e-mail: kan@incras.ru

Mouse embryonal fibroblasts with knockout of *CDKN1A* gene encoding p21/Waf1 protein transformed by oncogenes *E1A* and *cHa-ras* (mEras-Waf1^{-/-} cell line) have been used to assess the level of DNA repair genes expression — *Rad51* and *XRCC5* after treatment with HDAC inhibitor sodium butyrate as compared with their control counterparts (mEras-Waf1^{+/+} cells). mEras-Waf1^{-/-} cells are characterized by the elevated amount of single-stranded DNA breaks and γ -H2A.X histone foci associated with these breaks. According to immunofluorescence and immunoblotting data, *Rad51* and Ku80 proteins are highly expressed in the nuclei of both studied cell lines. The level of Ku80 is higher in cells with *CDKN1A* gene knockout. When cells were treated with DNA-damaging agent adriamycin, there was an additional accumulation of *Rad51* foci in the nuclei. However, sodium butyrate reduced considerably the content of *Rad51* and Ku80 proteins both in mEras-Waf1^{+/+} and mEras-Waf1^{-/-} cells as well as in the cells treated by adriamycin. RT-PCR and immunoblotting data show that inhibitory effect of sodium butyrate takes place at the level of *Rad51* and *XRCC5* gene transcription and the content of *Rad51* and Ku80 proteins. The observed suppressive effect of HDACI on DNA repair components explains in part the mechanisms of antiproliferative function of HDAC inhibitors. Surprisingly, sodium butyrate was shown to activate the pluripotent genes transcription in mEras-Waf1^{+/+} and mEras-Waf1^{-/-} cells, as exemplified by upregulation of *Oct-4*, *Sox-2*, *Klf4*, implying that these pluripotent genes are under negative control at the level of chromatin structure.

Key words: *Rad51*, *XRCC5*, *CDKN1A* genes, DNA repair, sodium butyrate.
