

**ИЗМЕНЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ КЛЕТОК КОЖИ МЫШЕЙ
К ОБЛУЧЕНИЮ УЛЬТРАФИОЛЕТОМ ТИПА В ПОСЛЕ УДАЛЕНИЯ ГЕНА
ФОСФАТАЗЫ WIP1**

© Е. Ю. Кочеткова,^{1,*} Т. В. Поспелова,¹ О. Н. Демидов^{1, 2}

¹ Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

^{и 2} INSERM UMR 866, Университета Бургундии, Франция;

* электронный адрес: lena.linnaea@gmail.com

Ультрафиолетовое (УФ) облучение вызывает повреждения ДНК, которые могут привести к гибели или старению клетки, а также к развитию злокачественных опухолей. Важную роль в устойчивости клеток к облучению УФ играют системы генов-участников ответа на повреждения ДНК, а также их регуляторы. Одним из таких регуляторов является фосфатаза Wip1, которая вовлечена в регуляцию сигнальных каскадов в ответ на повреждение ДНК и онкогенном стрессе. В настоящей работе изучен ответ на облучение УФ подтипа В (УФ-В) клеток дикого типа и клеток с нокаутом по гену фосфатазы Wip1, имеющих эпидермальное и мезенхимное происхождение. Было показано, что кератиноциты и фибробласти с нокаутом по гену фосфатазы Wip1 более чувствительны к облучению УФ-В, чем клетки дикого типа. Количество фокусов фосфорилированной формы гистона H2A-X (маркера повреждений ДНК и мишени Wip1) было значительно больше в кератиноцитах Wip1^{-/-} как до, так и после облучения УФ-В. У кератиноцитов с нокаутом по гену Wip1 наблюдали 2-кратное увеличение количества активной формы каспазы 3 по сравнению с клетками дикого типа. Таким образом, отсутствие фосфатазы Wip1 повышает чувствительность кожи мышей и клеток, выделенных из кожи, к облучению УФ-В.

Ключевые слова: УФ-облучение, Wip1-нокауты мыши, кератиноциты, эмбриональные фибробласти, повреждения ДНК.

Принятые сокращения: УФ-облучение — ультрафиолетовое облучение.

Ультрафиолетовое (УФ) излучение, широко распространенное как в природе (например, солнечный свет), так и в техногенной сфере (например, бактерицидные лампы), может вызывать значительные повреждения в клетках и тканях. У человека, как и у других млекопитающих, в первую очередь важны повреждения кожных покровов, которые со временем и в зависимости от расовых различий могут приводить к возникновению доброкачественных и злокачественных опухолей кожи (Leiter, Garbe, 2008; Polefka et al., 2012). Различают несколько подтипов УФ-излучения в зависимости от зоны спектра: длинноволновое (УФ-А, 315—400 нм), средневолновое (УФ-В, 280—315 нм) и коротковолновое (УФ-С, 100—280 нм). УФ-С вызывает наибольшие повреждения в тканях, однако оно задерживается атмосферой Земли, не доходя до земной поверхности. Основным компонентом солнечного света является УФ-А, вызывающее минимальные повреждения в органах и тканях. УФ-В, задерживаясь частично атмосферой, меньше представлено в солнечном свете, достигающем поверхности Земли, чем УФ-А, но при этом является сильным канцерогеном, способным вызывать серьезные повреждения молекул ДНК. Непосредственное повреждение ДНК облучением УФ-В может приводить к возникновению мутаций, приводящих, в частности, к опухоловой трансформации клеток кожного покрова и некоторых других тканей (Budden,

Bowden, 2013). Огромное значение в репарации ДНК после повреждений, вызванных УФ, и в предотвращении злокачественных перерождений клеток играют системы генов, участвующих в ответе на повреждение ДНК, и опухолевые супрессоры, такие как p53. Кроме того, очень важна правильная регуляция работы этих белков (Zhou, Elledge, 2000; Marechal, Zou, 2013; Menon, Povirk, 2014).

Одним из таких регуляторов является серин-треониновая фосфатаза Wip1 со свойствами онкогена, кодируемая геном *Ppm1d* и являющаяся транскрипционной мишенью p53 (Lu et al., 2008). В состоянии стресса, например при повреждении ДНК, запускается череда реакций, направленных на активацию p53, координирующую работу различных систем ответа на стресс, включая стимуляцию экспрессии гена фосфатазы Wip1. Wip1 посредством дефосфорилирования сайтов активации на молекулах-участниках каскадного ответа на стресс снижает активность p53 и тем самым переключает молекулярные системы клетки из стрессового состояния в состояние покоя. Так как система ответа на повреждение ДНК тесно сопряжена с системами подавления опухолевого роста, а элементы этой системы чрезвычайно важны для эффективного использования противораковых химиотерапевтических препаратов, Wip1 может являться негативным регулятором опухолевых супрессоров и модулятором опу-

холевого ответа на противораковую терапию (Lu et al., 2005; Fujimoto et al., 2006). Была показана проопухолевая роль Wip1 в развитии рака груди, лимфоидной системы и кишечника (Bulavin et al., 2004; Harrison et al., 2004). В частности, было замечено, что в опухолях кишечника Wip1 действует главным образом на уровне стволовых клеток кишечного эпителия. Wip1 накапливается в стволовых клетках кишечного эпителия, что может быть связано с более высокой активностью p53-каскада в этих клетках. Генетические модификации, направленные на удаление гена фосфатазы Wip1, препятствуют превращению стволовых клеток в раковые клетки посредством снижения порога запуска программы апоптотической гибели клеток при онкогенном стрессе, вызванном дерегуляцией онкогена бета-катенина. Таким образом, мыши с делецией Wip1 более устойчивы к возникновению опухолей в модели кишечного полипоза, вызванного мутацией в гене опухолевого супрессора APC (Demidov et al., 2007). В целом экспрессия Wip1 и ее роль в кожной ткани в поддержании гомеостаза и при стрессорных воздействиях пока недостаточно исследована.

Целью настоящей работы является исследование влияния нокаута гена фосфатазы Wip1 на чувствительность клеток кожи *in vitro* и *in vivo* к облучению УФ-В.

Материал и методика

Мыши. В работе использованы мыши линии c57Bl/6 дикого типа (*Wip1^{+/+}*) и с нокаутом по гену фосфатазы *Wip1 Ppm1d* (*Wip1^{-/-}*). Мышей содержали в стандартных лабораторных условиях (22 °C, 12-часовой световой период). Они имели неограниченный доступ к питанию и воде.

Кератиноциты получали из кожи новорожденных мышат дикого типа и мышат с нокаутом по *Ppm1d*. Выделение проводили по модифицированному протоколу Рейнвальда (Rheinwald, 1980; Спичкина и др., 2006). С новорожденных мышат снимали шкурки, помешали шкурки в смесь 0.5%-ной диспазы II (Sigma, США) и 0.2%-ной коллагеназы I (Gibco, Life Technologies, США) дермой вниз и инкубировали при 4 °C в течение ночи. На следующий день эпидермис аккуратно отделяли, измельчали и помещали в раствор 0.125%-ного трипсина на 5 мин при 37 °C. Инактивировав трипсин сывороткой крупного рогатого скота (HyClone, США), клетки фильтровали (фильтр 70 мкм), осаждали центрифугированием (600 g, 5 мин) и ресуспендировали в среде для кератиноцитов. Клетки высевали на 35-миллиметровые чашки, покрытые коллагеном I типа (100 мкг/мл в растворе уксусной кислоты) из расчета примерно 60 тыс. клеток на 1 чашку. Клетки культивировали на стандартной среде для кератиноцитов KBM Gold (Lonza, Швейцария), содержащей KGM-Gold SingleQuots (Lonza, Швейцария) и 60 мкМ CaCl₂.

Эмбриональные фибробlastы получали из эмбрионов в возрасте 12 сут. Эмбрионы извлекали, очищали, промывали стерильным фосфатно-солевым буферным раствором и измельчали на кусочки, затем помещали в раствор 0.25%-ного трипсина, сусpendировали и инкубировали 5 мин при 37 °C. Затем раствор трипсина с клетками отбирали, а осевшие на дно флакона кусочки вновь покрывали трипсином и повторяли процедуру. Реакцию трипсинизации останавливали сывороткой круп-

ного рогатого скота, клетки в растворе трипсина осаждали центрифугированием (600 g, 5 мин), ресуспендировали в среде DMEM и высевали на 35-миллиметровые чашки. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10 % сыворотки крупного рогатого скота.

Облучение. Мышей 3-месячного возраста облучали УФ-В в дозе 5000 Дж/м² в области спины, предварительно удалив волосяной покров, с помощью лампы Vilber single/double 15W UV-B VL 115M and C (Франция). Мощность излучения измеряли сенсором Vilber VLX-3W CX 312 (Франция). После облучения мышей осматривали 1 раз в 2 сут и анализировали скорость восстановления волосяного покрова. Клетки в культуре подвергали облучению с помощью той же лампы, доза составляла 500 Дж/м².

Жизнеспособность клеток оценивали либо с помощью МТТ-теста, либо по окрашиванию приживленным красителем трипановым синим. Для МТТ-теста клетки высевали в 24-луночный плинтез из расчета примерно 20 тыс. клеток на 1 лунку, подвергали облучению и культивировали необходимое время. Затем среду культивирования заменяли на раствор 3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразол-бромида (тиазолового синего) в стерильном растворе PBS (0.5 мг/мл; Sigma, США). Клетки в растворе инкубировали 1 ч при 37 °C. Конверсию клетками красителя в фиолетовый формазан контролировали под световым микроскопом. Через 1 ч инкубации раствор заменяли на DMSO и инкубировали 30 мин до полного растворения формазана в DMSO. Измерение количества формазана проводили на спектрофотометре при длине волны 572 нм.

Клетки после облучения и культивирования в течение необходимого времени трипсинизировали и промывали стерильным PBS. К 90 мкл суспензии клеток в PBS добавляли 10 мкл трипанового синего на 10 мин при комнатной температуре. Подсчет окрашенных (мертвых) и неокрашенных (живых) клеток производили в камере Горяева под световым микроскопом в проходящем свете.

Иммунофлуоресцентный анализ. Клетки культивировали на покровных стеклах в чашках Петри в течение времени, необходимого по условиям эксперимента после облучения, затем фиксировали 4%-ным формальдегидом в течение 20 мин при комнатной температуре. Стекла промывали стерильным PBS и пермабилизовывали клетки при помощи 0.2%-ного Тритона X-100. Для снижения неспецифического связывания клетки инкубировали в растворе 3%-ного BSA/TBS-T в течение 1.5 ч, а затем с первичными антителами в 3%-ном BSA/TBS-T к расщепленной (активной) каспазе 3 (R&D Systems, США) или γH2A-X (Cell Signaling, США) в течение ночи при 4 °C. После инкубации с первичными антителами клетки промывали и инкубировали со вторичными антителами козы (антикроличьими), несущими флуоресцентную метку AlexaFluor 488 (Invitrogen, США). Затем стекла промывали и заключали в среду ProLong Gold (Invitrogen, США), содержащую DAPI для визуализации ядер. Изображения получали при помощи конфокального микроскопа Leica TCS SL. Анализ изображений и измерение интенсивности свечения проводили с помощью программы ImageJ. Подсчет числа клеток, содержащих фокусы γH2A-X, и числа фокусов на клетку проводили с помощью конфокального микроскопа LeicaTCS SL из расчета 100 клеток на точку.

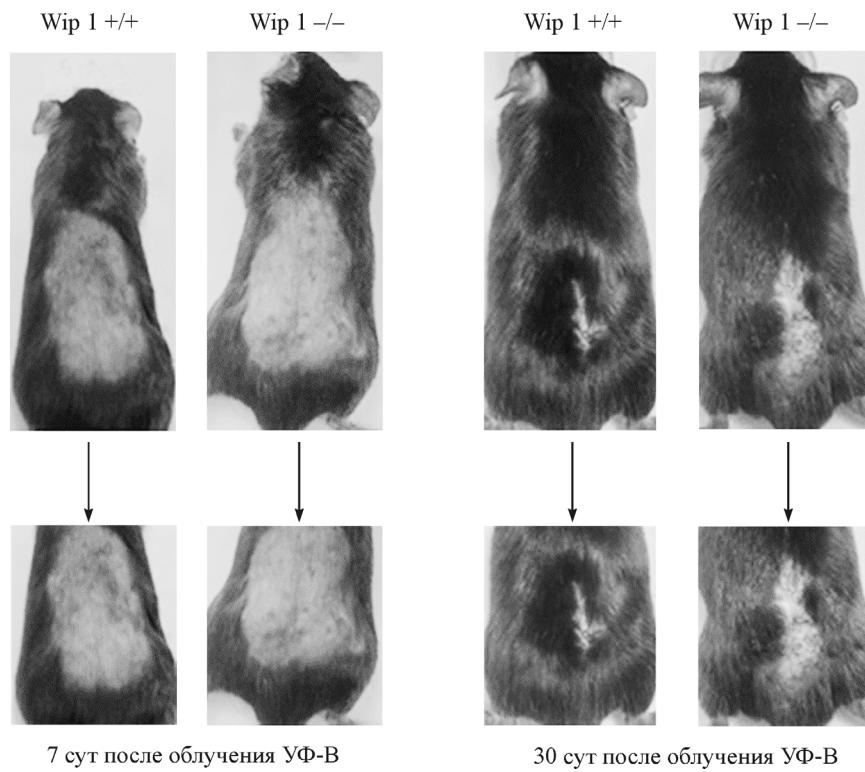


Рис. 1. Восстановление волосяного покрова у мышей дикого типа ($Wip1^{+/+}$) и у мышей с нокаутом по гену фосфатазы $Wip1^{-/-}$ в возрасте 3 мес через 7 и 30 сут после облучения УФ-В в дозе 5000 кДж/м².

Результаты

Для выявления роли $Wip1$ в ответе на облучение УФ-В мышей дикого типа и мышей $Wip1^{-/-}$ трехкратно облучали с интервалом 24 ч. Облучали область спины после удаления волосяного покрова. Доза УФ составляла 5000 Дж/м². Состояние кожи и восстановление волосяного покрова оценивали каждые 2 сут. Согласно полученным результатам, первоначальная реакция на УФ-облучение была типичной для этой дозы облучения и не различалась у мышей дикого типа и $Wip1^{-/-}$. Облучение приводило к гиперкератозам, гиперплазии базального слоя эпидермиса и появлению признаков воспалительной реакции. На 30-е сут после облучения наблюдали активное восстановление волосяного покрова у мышей дикого типа, в то время как у нокаутов по гену $Ppm1d$ задерживался рост волос в области, подвергшейся облучению (рис. 1). Быстрое восстановление волосяного покрова после повреждений отражает нормальное функционирование reparatивных процессов в коже.

Для понимания роли $Wip1$ в ответе клеток на облучение УФ-В из мышат дикого типа и нокаутов по $Ppm1d$ получали кератиноциты, которые облучали тем же УФ-В в дозе 500 Дж/м². Для оценки жизнеспособности клеток после облучения проводили МТТ-тест. Согласно полученным данным, кератиноциты с нокаутом по гену фосфатазы $Wip1$ отвечают на УФ-облучение большим снижением жизнеспособности, чем клетки дикого типа (рис. 2, а). МТТ-анализ показал, что интенсивность превращения субстрата в формазан снижается клетками дикого типа после облучения примерно в 2 раза, тогда как интенсивность поглощения красителя нокаутами снижается в 10 раз. Интересно отметить, что клетки мезенхимного ростка фибробласти $Wip1^{-/-}$ тоже подвержены боль-

шей гибели чем клетки дикого типа после облучения (рис. 2, б).

Фосфорилирование гистона H2A-X, являющегося мишенью фосфатазы $Wip1$, маркирует места разрывов ДНК и необходимо для запуска процессов клеточного ответа на УФ-облучение, включающих остановку клеточного цикла, reparативные процессы и выработку решения о дальнейшей судьбе клетки — выжить или запустить один из механизмов программируемой клеточной гибели (Cha et al., 2010; Moon et al., 2010). Нами проанализировано накопление фокусов фосфорилированного H2A-X (γ H2A-X) в клетках после облучения. В необлученном контроле большее количество клеток $Wip1^{-/-}$ содержит фокусы γ H2A-X, и среднее число фокусов в ядрах превышает их число в ядрах дикого типа в 4 раза (рис. 3). И у клеток дикого типа, и у клеток-нокаутов после облучения количество клеток с фокусами поднимается до 90 %. Однако в кератиноцитах $Wip1^{-/-}$ после облучения число фокусов поднимается в среднем до 18 на клетку, что в 3 раза больше среднего числа фокусов после облучения в ядрах дикого типа. Поскольку $Wip1$ является регулятором молекул-участниц ответа на поврежденную ДНК (не только H2A-X, но и других — ATM, p53 и Chk1,2), отсутствие активности $Wip1$, видимо, приводит к deregуляции процессов ответа на УФ-облучение. Усиление амплитуды сигнала от поврежденной ДНК в кератиноцитах $Wip1^{-/-}$, посредником которого выступает фосфорилированная форма H2A-X, может приводить к клеточной смерти, а не reparации. Клетки гибнут, возможно, по механизму апоптоза. Анализ накопления активной каспазы 3, которая является финальной каспазой апоптотического процесса, показывает, что у клеток-нокаутов количество расщепленной каспазы 3 превышает контрольный уровень почти в 2 раза (рис. 4). Тем не менее вопрос о том, по ка-

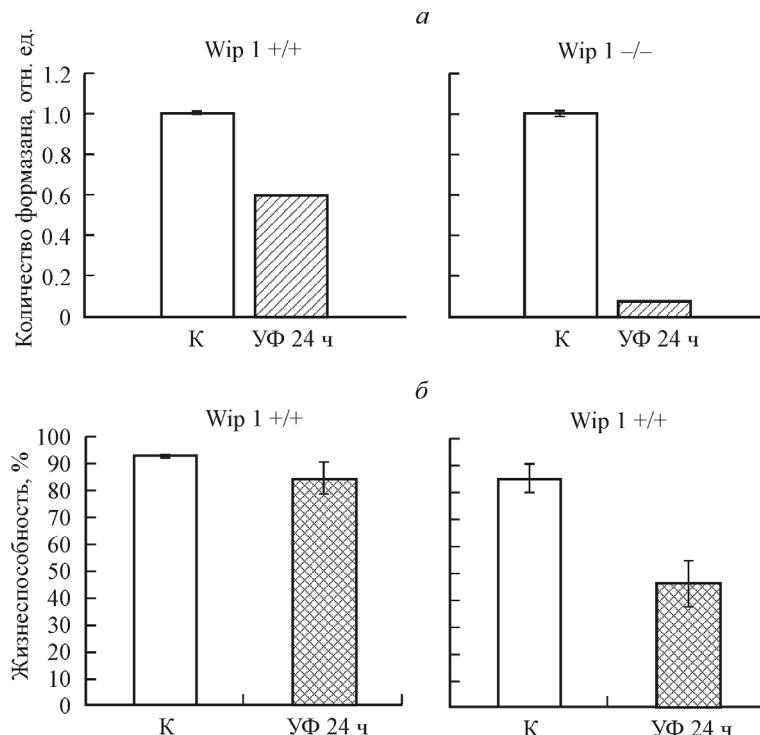


Рис. 2. Изменение жизнеспособности кератиноцитов (а) и эмбриональных фибробластов (б) дикого типа (*Wip1^{+/+}*) и с нокаутом по гену фосфатазы *Wip1* (*Wip1^{-/-}*) в контроле и через 24 ч после облучения УФ-В (500 кДж/м²).

По вертикали — количество образованного формазана (МТТ-тест) относительно контроля (а) или количество живых, не окрашенных трипановым синим клеток (б).

кому механизму протекает гибель клеток *Wip1^{-/-}* при облучении УФ-В, требует дальнейшего исследования.

Таким образом, воздействие облучения УФ-В на кератиноциты вызывает повреждения ДНК. Жизнеспособность клеток с нокаутом по гену фосфатазы *Wip1* снижается больше, чем клеток дикого типа. У мышей-нокаутов по гену фосфатазы *Wip1* замедлялось восстановления волосяного покрова после облучения. По всей видимости, активность *Wip1* способствует поддержанию устойчивости кожи и ее клеток к облучению УФ-В.

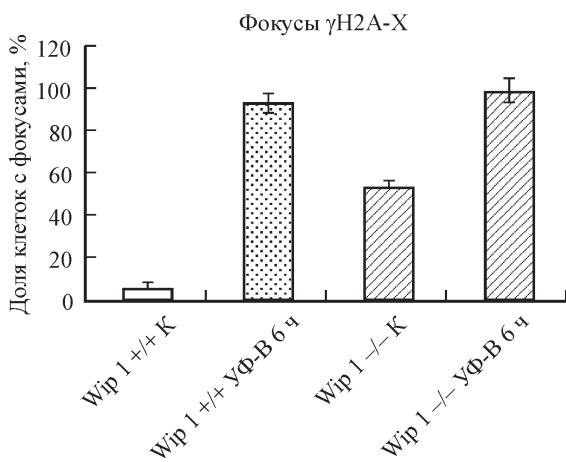


Рис. 3. Доля кератиноцитов, содержащих фокусы фосфорилированного гистона H2A-X (γ H2A-X), дикого типа (*Wip1^{+/+}*) и с нокаутом по *Wip1* (*Wip1^{-/-}*) в контроле (К) и через 6 ч после облучения УФ-В (500 кДж/м²).

Иммунофлуоресценция фосфорилированного H2A-X с использованием соответствующих антител.

Обсуждение

В настоящей работе нам удалось показать, что отсутствие серин-треониновой фосфатазы *Wip1* в тканях мыши замедляет восстановительные процессы в коже мышей, подвергнутых УФ-облучению. Одним из факторов, объясняющих подобный фенотип у мышей *Wip1^{-/-}*, может являться повышенная чувствительность клеток кожи к УФ. Мы показали более значительное снижение жизнеспособности в ответ на УФ как у кератиноцитов, так и у фибробластов, выделенных из мышей *Wip1^{-/-}*, и показали, что у клеток от мышей-нокаутов выявляется повышение количества активной каспазы 3. Надо отметить, что в необлученном контроле у *Wip1*-нокаутов больше клеток содержат фокусы γ H2A-X в ядрах. При этом после облучения клетки дикого типа и нокауты демонстрируют сходное количество клеток с фокусами, но в ядрах кератиноцитов *Wip1^{-/-}* число фокусов γ H2A-X повышенено. Похожие данные получены и другими авторами (Lee et al., 2014), которые методом Вестерн-блотинга показали увеличенное присутствие фосфорилированной формы гистона γ H2A-X после УФ-облучения в кератиноцитах *Wip1^{-/-}* по сравнению с кератиноцитами дикого типа. Оценка вовлеченности *Wip1* в ответ на УФ-облучение на более поздних этапах (в период восстановления) требует дальнейших экспериментов.

В клетках дикого типа работа систем reparации обеспечивает выживаемость клеток при стрессовом воздействии. Удаление гена фосфатазы *Wip1*, по всей видимости, может не только усиливать сигнал от поврежденной ДНК, но и ведет к нарушению регуляции работы reparативных систем, вследствие чего жизнеспособность таких клеток при облучении ниже, чем у дикого типа.

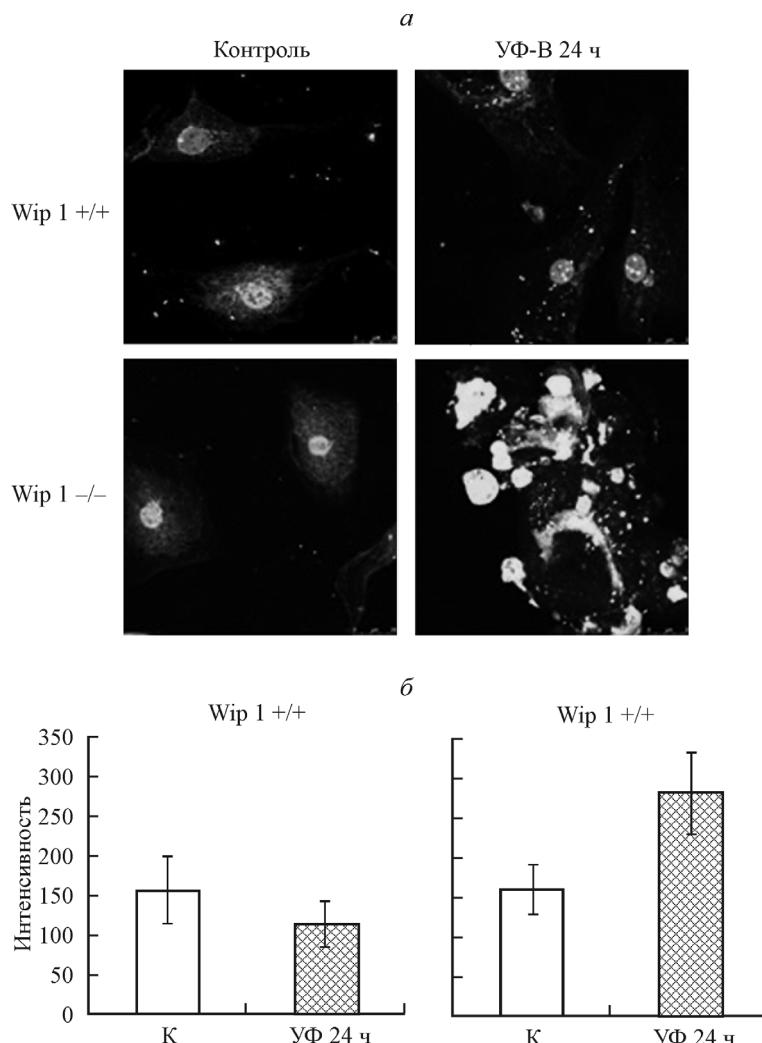


Рис. 4. Изменение интенсивности свечения активной каспазы 3 в кератиноцитах дикого типа (*Wip1*^{+/+}) и с нокаутом (*Wip1*^{-/-}) в контроле (К) и после облучения УФ-В (500 кДж/м²).

Можно предположить, что изменение чувствительности кератиноцитов к УФ-облучению (MTT-тест) может объясняться не только усиленной гибелью клеток, но и, например, подавлением пролиферации. Отсутствие активности *Wip1* (в частности, как регулятора фосфорилирования гистона H2A-X) может иметь значение не только для работы репаративных систем, но и для регуляции клеточного цикла. При УФ-повреждении ДНК регуляция клеточного цикла важна для предотвращения пролиферации клеток с поврежденной ДНК. В частности, клетка может ответить на облучение старением — программой, связанной с подавлением пролиферации. Относительно недавно на эмбриональных фибробластах мыши с нокаутом по гену фосфатазы *Wip1* было показано вовлечение *Wip1* в негативную регуляцию процессов развития клеточного старения (Sakai et al., 2014). *Wip1* может препятствовать развитию фенотипа старения как за счет регуляции ответа на повреждение ДНК при репликации (Sakai et al., 2014), так и за счет дефосфорилирования киназы p38 (Зубова и др., 2007). Таким образом, можно предполагать, что *Wip1* играет роль некоего связующего звена между ответом на повреждение ДНК и регуляцией клеточного цикла, а также, по всей видимости, регуляцией клеточного старения.

Оценка вовлеченности *Wip1* на более поздних этапах ответа на УФ-облучение, в период восстановления, требует дальнейших экспериментов. В целом нам удалось показать, что в коже мыши, как и в других типах тканей, *Wip1* является важным регулятором ответа на повреждение ДНК, необходимым для нормального протекания репаративных процессов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 14-15-00636; О. Н. Демидов, Е. Ю. Кочеткова), Российского фонда фундаментальных исследований (проект 13-04-00552) и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

Список литературы

- Зубова С. Г., Быкова Т. В., Зубова Ю. Г., Романов В. С., Аксенов Н. Д., Поступолов В. А., Поступолова Т. В. 2007. Роль киназы p38 α в активации программы «ускоренного старения» в трансформированных фибробластах мыши. Цитология. 49 (2): 115—124. (Zubova S. G., Bykova T. V., Zubova Yu. G., Romanov V. S., Aksenov N. D., Postupolov V. A., Postupolova T. V. 2007. Role of p38 α kinase in activation of premature sen-

- science program in transformed mouse fibroblasts. *Tsitologiya*. 49 (2) : 115—124.)
- Спичкина О. Г., Калмыкова Н. В., Кухарева Л. В., Воронкина И. В., Блинова М. И., Пинаев Г. П. 2006. Выделение популяции базальных кератиноцитов человека путем их селективной адгезии к белкам внеклеточного матрикса. *Цитология*. 48 (10) : 841—847. (Spichkina O. G., Kalmykova N. Y., Kukhareva L. V., Voronkina I. V., Blinova M.I., Pinaev G.P. 2006. Isolation of human basal keratinocytes by selective adhesion to extracellular matrix proteins. *Tsitologiya*. 48 (10) : 841—847.)
- Budden T., Bowden N. A. 2013. The role of altered nucleotide excision repair and UVB-induced DNA damage in melanomagenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 14 (1) : 1132—1151.
- Bulavin D. V., Philips C., Nannenga B., Timofeev O., Donehower L. A., Anderson C. W., Appella E., Fornace A. J., jr. 2004. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(INK4a)-p19(Arf) pathway. *Nat. Genet.* 36 : 343—350.
- Cha H., Lowe J. M., Li H., Lee J. S., Belova G. I., Bulavin D. V., Fornace A. J., jr. 2010. Wip1 directly dephosphorylates gamma-H2AX and attenuates the DNA damage response. *Cancer Res.* 70 : 4112—4122.
- Demidov O. N., Timofeev O., Lwin H. N., Kek C., Appella E., Bulavin D. V. 2007. Wip1 phosphatase regulates p53-dependent apoptosis of stem cells and tumorigenesis in the mouse intestine. *Cell Stem Cell*. 1 : 180—190.
- Fujimoto H., Onishi N., Kato N., Takekawa M., Xu X. Z., Kosugi A., Kondo T., Imamura M., Oishi I., Yoda A., Minami Y. 2006. Regulation of the antioncogenic Chk2 kinase by the oncogenic Wip1 phosphatase. *Cell Death and Differentiation*. 13 : 1170—1180.
- Harrison M., Degenhardt Y., Hoey T., Powers S. 2004. Wip1-deficient mice are resistant to common cancer genes. *Trends Mol. Med.* 10 : 359—361.
- Lee J., Park J., Kwon O., Kim H., Fornace A. J. Jr., Cha H. 2014. Off-target response of a Wip1 chemical inhibitor in skin keratinocytes. *J. Derm. Sci.* 73 : 125—134.
- Leiter U., Garbe C. 2008. Epidemiology of melanoma and non-melanoma skin cancer — the role of sunlight. *Adv. Exp. Med. Biol.* 624 : 89—103.
- Lu X., Nannenga B., Donehower L. A. 2005. Ppm1d dephosphorylates Chk1 and p53 and abrogates cell cycle checkpoints. *Genes Develop.* 19 : 1162—1174.
- Lu X., Nguyen T., Moon S., Darlington Y., Sommer M., Donehower L. 2008. The type 2C phosphatase Wip1 : an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways. *Cancer Metastasis Rev.* 27 : 123—135.
- Marechal A., Zou L. 2013. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5 : a012716. doi: 10.1101/cshperspect.a012716.
- Menon V., Povirk L. 2014. Involvement of p53 in the repair of DNA double strand breaks: multifaceted roles of p53 in homologous recombination repair (HRR) and non-homologous end joining. *Subcell. Biochem.* 85 : 321—336.
- Moon S. H., Lin L., Zhang X., Nguyen T. A., Darlington Y., Waldman A. S., Lu X., Donehower L. A. 2010. Wild-type p53-induced phosphatase 1 dephosphorylates histone variant gamma-H2AX and suppresses DNA double strand break repair. *J. Biol. Chem.* 285 : 12935—12947.
- Polefska T. G., Meyer T. A., Agin P. P., Bianchini R. G. 2012. Effects of solar radiation on skin. *J. Cosmet. Dermatol.* 11 : 134—143.
- Rheinwald J. G. 1980. Serial cultivation of normal epidermal keratinocytes. *Meth. Cell Biol.* 21A: 229—254.
- Sakai H., Fujigaku H., Mazur S. J., Appella E. 2014. Wild-type p53-induced phosphatase 1 (Wip1) forestalls cellular premature senescence at physiological oxygen levels by regulating DNA damage response signalling during DNA replication. *Cell Cycle*. 13 : 1015—1029.
- Zhou B. B., Elledge S. J. 2000. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature*. 408 : 433—439.

Поступила 27 XI 2015

Wip1 PHOSPHATASE AFFECTS SENSITIVITY OF MURINE SKIN CELLS TO UV-B IRRADIATION

Y. Yu. Kochetkova,¹ T. V. Pospelova,¹ O. N. Demidov^{1,2}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064, and ² INSERM UMR866, University of Burgundy, France;
¹ lena.linnaea@gmail.com

UV irradiation is one of the major natural and artificial stress factors which may cause severe damage to the skin. UV irradiation induces DNA damage in cells that eventually could lead to cell death, senescence or acquiring oncogenic mutations and tumor growth. Wip1 is a phosphatase involved in regulation of signaling in DNA damage response and oncogenic stress. Here we studied response to UV-B irradiation in wild type and Wip1 depleted murine cells of epidermal and mesenchymal lineages. We found that both cell types, skin keratinocytes and fibroblasts, respond to UV-B in a similar manner with increased cytotoxicity in Wip1^{-/-} cells. The number of nuclear foci of Wip1 target protein, DNA damage marker, histone γH2A-X, was highly elevated in Wip1^{-/-} cells before and after UV-B. We observed two-fold increase in number of cells with active caspase-3 in keratinocytes with Wip1 deletion. Thus, Wip1 deficiency sensitizes cells to UV-B irradiation by promoting cell death, possibly by caspase-3 dependent apoptosis.

Key words: UV irradiation, Wip1 knockout mice, keratinocytes, fibroblasts, DNA damage.