

РОЛЬ БЕЛКА P53 В АТМ- И PARP-ЗАВИСИМЫХ ПУТЯХ РЕПАРАЦИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК, ВЫЗВАННЫХ ИНГИБИТОРОМ ТОПОИЗОМЕРАЗЫ II ТИПА

Булат Рашитович Рамазанов, Рамиль Рамисович Хуснутдинов, Айгуль Рафиковна Галембикова, Павел Дмитриевич Дунаев, Сергей Васильевич Бойчук*

Казанский государственный медицинский университет, г. Казань, Россия

Поступила 18.12.2015; принята в печать 19.01.2016.

Реферат

DOI: 10.17750/KMJ2016-245

Цель. Изучение механизмов генотоксического действия доxorубина в условиях ингибирования поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) и АТМ-киназы (от англ. Ataxia Telangiectasia Mutated) в клеточных линиях с различным p53-статусом.

Методы. Исследование проводили на фибробластах человека линий BJ и BJp53DD, культивированных в среде DMEM с добавлением эмбриональной телячьей сыворотки, L-глутамина и антибиотиков. Ингибирования активности PARP и АТМ-киназы достигали добавлением синтетических ингибиторов Nu1025 и Ku55933 соответственно. Для индукции повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) использовали химиопрепарат доxorубин. Анализ жизнеспособности клеток производили с помощью MTS-теста. Экспрессию белков системы репарации и маркеров апоптоза оценивали методом иммуноблоттинга. Распределение клеток по фазам клеточного цикла производили методом проточной цитометрии.

Результаты. Внесение в культуру клеток линии BJ p53DD ингибиторов активности PARP и АТМ-киназы приводило к значимому снижению количества жизнеспособных клеток на фоне индукции повреждений ДНК, вызываемых доxorубином. Гибель клеток в данных образцах происходит по механизму апоптоза, что было подтверждено увеличением количества гиподиплоидных клеток и увеличением экспрессии расщеплённых форм PARP-1 и каспазы-3. Вышеописанные эффекты ингибитора топоизомеразы II типа доxorубина были достоверно выше в фибробластах линии BJ с нефункциональным белком p53 (p53DD) по сравнению с обычными фибробластами человека линии BJ.

Вывод. В условиях несостоятельности p53-зависимых механизмов регуляции клеточного цикла в фибробластах человека BJ p53DD ингибирование активности PARP и АТМ-киназы приводит к усилению гибели клеток по механизму апоптоза, вызванного действием доxorубина.

Ключевые слова: АТМ-киназа, PARP, белок p53, репарация повреждений ДНК, противоопухолевые средства, апоптоз, фибробласты.

ROLE OF P53 PROTEIN IN ACTIVATION OF ATM- AND PARP-MEDIATED DNA DAMAGE REPAIR (DDR) PATHWAYS INDUCED BY TOPOISOMERASE TYPE II INHIBITORS

B.R. Ramazanov, R.R. Khunutdinov, A.R. Galembikova, P.D. Dunaev, S.V. Boichuk

Kazan State Medical University, Kazan, Russia

Aim. To study the mechanisms of doxorubicin genotoxic effects in terms of poly-(ADP-ribose-polymerase (PARP) and the ATM-kinase (Ataxia Telangiectasia Mutated) inhibition in cell lines with different p53 status.

Methods. The study was conducted on BJ and BJp53DD human fibroblasts cell lines, cultured in DMEM medium supplemented with fetal bovine serum, L-glutamine and antibiotics. Inhibition of PARP and ATM-kinase activity was attained by adding synthetic inhibitors Nu1025 and Ku55933 respectively. Chemotherapy drug doxorubicin was used to induce deoxyribonucleic acid (DNA) damages. Cell viability analysis was performed using MTS-test. Repair system proteins and apoptotic markers expression was assessed by western blotting. Cells distribution by cell cycle phases was performed by flow cytometry.

Results. Adding PARP and ATM-kinase inhibitors to the BJ p53DD cell line culture resulted in a significant reduction in the viable cells number amid DNA damage induction caused by doxorubicin. Cell death in these samples occurs according to the apoptosis mechanism, what was confirmed by the increase in hypodiploid cells number and increased expression of cleaved forms of PARP-1 and caspase-3. The above-described effects of the type II topoisomerase inhibitor doxorubicin were significantly higher in BJ fibroblasts line with non-functional p53 protein (p53DD) compared with conventional BJ human fibroblasts line.

Conclusion. In the context of the failure of p53-dependent mechanisms of cell cycle regulation in BJ p53DD human fibroblasts, PARP and ATM-kinase activity inhibition leads to increased cell death by apoptosis mechanism induced by the doxorubicin action.

Keywords: ATM-kinase, PARP, p53 protein, DNA damage response, anti-cancer agents, apoptosis, fibroblasts.

Репарация повреждений дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) клеток млекопитающих представляет собой многоступенчатый сигнальный механизм, включающий сотни белков, способных образовывать множество сигнальных путей, формировать белковые комплексы, своевременно распознавать и устранять различные по природе повреждения ДНК.

В зависимости от характера и объёма повреждений ДНК комплекс белков и сигнальных молекул, входящих в систему репарации повреждений ДНК, способен останавливать дальнейшее продвижение по клеточному циклу, тем самым обеспечивая время для восстановления целостности ДНК, прежде чем клетка запустит репликацию и/или вступит в митоз [1]. В тех случаях, когда существуют препятствия для восстановления повреждённых

ного участка ДНК или объём повреждений слишком велик, что создаёт угрозу для жизнедеятельности всего организма, система репарации запускает механизм программированной клеточной гибели — апоптоза [6].

Процессы распознавания и репарации повреждений ДНК инициируются активностью специальных участников каскада сигнализации повреждения ДНК — в большинстве случаев протеинкиназ ATR (от англ. Ataxia Telangiectasia and Rad3 related) и ATM (от англ. Ataxia Telangiectasia Mutated) [5], принадлежащих к одному семейству — PIKK-киназ (от англ. PhosphoInositide-3 Kinase-related protein Kinase) [9].

Активированные ATM/ATR-киназы фосфорилируют большое количество белков, включая белки, вовлечённые в активацию так называемых «чек-пойнтов» (p53, CHK1, CHK2), и белки, принимающие непосредственное участие в репарации, например такие, как BRCA1 и 53BP1 [8, 11]. ATM- и ATR-киназы, а также ДНК-зависимая протеинкиназа (DNA-ПК) служат ключевыми ферментами системы репарации ДНК, запускающими защитный ответ на генотоксический стресс в клетке [9, 10]. Приобретённые и наследственные дефекты данных сигнальных путей в большинстве случаев становятся причиной повышенной чувствительности таких клеток к генотоксическому стрессу [1].

Известно, что отсутствие или снижение функциональной активности белка p53, возникающие вследствие мутаций одноимённого гена, создают предпосылки для выживания опухолевых клеток на фоне имеющихся повреждений ДНК и тем самым способствуют прогрессированию злокачественных новообразований вследствие развития химио- и радиорезистентности опухолевых клеток [3, 6]. Данная резистентность опухолевых клеток к химиопрепаратам отчасти обусловлена компенсаторными механизмами в системе репарации повреждений ДНК, в первую очередь репарации одно- и двунитевых разрывов ДНК [4].

В исследовании использовали следующие клеточные линии: фибробласты человека линии VJ TERT (фибробласты человека, immortalized введением вектора TERT методом ретровирусной трансфекции), фибробласты человека линии VJ TERT p53DD (фибробласты человека линии VJ TERT, экспрессирующие неактивную форму белка p53). Обе исследуемые клеточные линии культивировали согласно общепринятой методике — с использованием полной культураль-

ной среды на основе DMEM с добавлением L-глутамина, антибиотиков (пенициллин, стрептомицин) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки в условиях CO₂-инкубатора, обеспечивающего постоянную температуру и атмосферу CO₂ (37 °C и 5% CO₂). Рост и жизнеспособность клеток оценивали методом световой микроскопии.

Для индукции повреждений ДНК использовали химиопрепарат доксорубин (Sigma, США). Конечная концентрация препарата в питательной среде была выбрана согласно данным литературы и составляла 0,25 мкг/мл. Для ингибирования активности ферментов репарации ДНК — ATM-киназы и поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (ПАРП) — использовали препараты KU-55933 и NU-1025 соответственно (Santa Cruz).

Распределение клеток по фазам клеточного цикла, а также оценку состоятельности регуляции точек рестрикции в условиях генотоксического стресса проводили методом проточной цитофлуориметрии на приборе FC500 (Beckman Coulter). В качестве красителя геномной ДНК использовали флюорохром йодистый пропидий (Sigma). Интенсивность свечения оценивали по каналу FL-3 (PerCP). Одновременно производили подсчёт количества апоптотных (то есть гиподиплоидных) клеток. Построение гистограмм и анализ полученных данных проводили на программном обеспечении Kaluza (Beckman Coulter).

Оценку экспрессии исследуемых белков, а также их фосфорилированных форм проводили методом иммуноблоттинга. Электрофорез белков осуществляли с использованием градиентных 4–12% ПААГ-гелей (Invitrogen). Для переноса белков на нитроцеллюлозную мембрану использовали оборудование и расходные материалы производства BioRad (США). Хемилюминисцентную детекцию производили на гель-документирующей системе Fusion Solo (Vilber Lourmat, Франция). Для окраски использовали соответствующие МАТ производства Santa Cruz, Abcam и Cell Signaling (США).

Жизнеспособность клеток оценивали колориметрическим методом с помощью реагента MTS (Promega).

Анализ жизнеспособности клеток с использованием MTS-теста показал, что фибробласты линии VJ p53DD (экспрессирующие укороченную и поэтому неактивную форму белка p53) обладают резистентностью к генотоксическому действию доксорубина в стандартной дозе (0,25 мкг/мл) — по сравне-

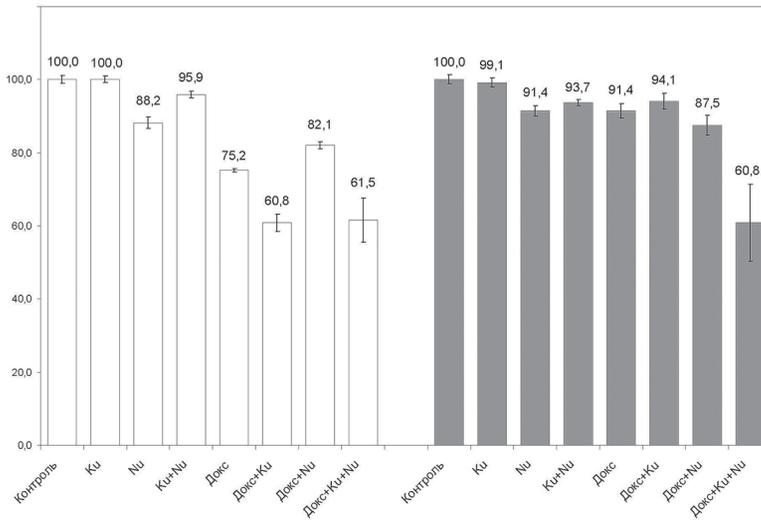


Рис. 1. Доля жизнеспособных клеток фибробластов человека линий BJ и BJ p53DD после инкубации с ингибиторами АТМ-киназы (Ku55933), поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (Nu1025) и доксорубицином в клеточных линиях фибробластов BJ и BJ p53DD. MTS-тест через 48 ч инкубации с препаратами. Ku – ингибитор АТМ-киназы (Ku55933); Nu – ингибитор поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (Nu-1025); Докс – доксорубицин

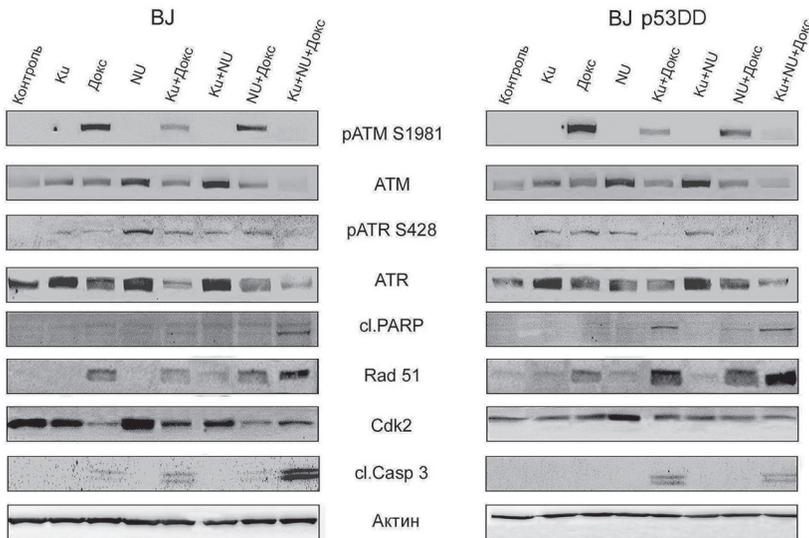


Рис. 2. Анализ уровня экспрессии белков системы репарации повреждений ДНК (общие и фосфорилированные формы АТМ- и АТР-киназ, рекомбиназы Rad51), маркёров апоптоза (расщеплённые формы каспазы-3 и PARP), циклин-зависимой киназы 2 (Cdk2) и актина в линиях фибробластов BJ и BJp53DD. Ku – ингибитор АТМ-киназы (Ku55933); Nu – ингибитор поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы (Nu-1025); Докс – доксорубицин

нию с фибробластами, экспрессирующими функциональный («дикий») тип данного белка (рис. 1). Полученные результаты согласуются с результатами зарубежных авторов, проводивших исследования эффекта ингибиторов топоизомеразы II типа (в том числе доксорубицина) на «p53-дефицитных» клеточных линиях [3].

Было также обнаружено, что внесение в культуру клеток линии BJ p53DD ингибиторов активности поли-(АДФ-рибоза)-

полимеразы-1 (PARP-1) и АТМ-киназы приводило к значимому снижению количества жизнеспособных клеток на фоне индукции повреждений ДНК, вызываемых доксорубицином (см. рис. 1). Обнаруженный нами феномен сенситизации p53-негативных клеток к действию доксорубицина свидетельствует о наличии зависимости между жизнеспособностью p53-негативных клеток и функциональной активностью систем репарации доксорубицин-индуцированных поврежде-

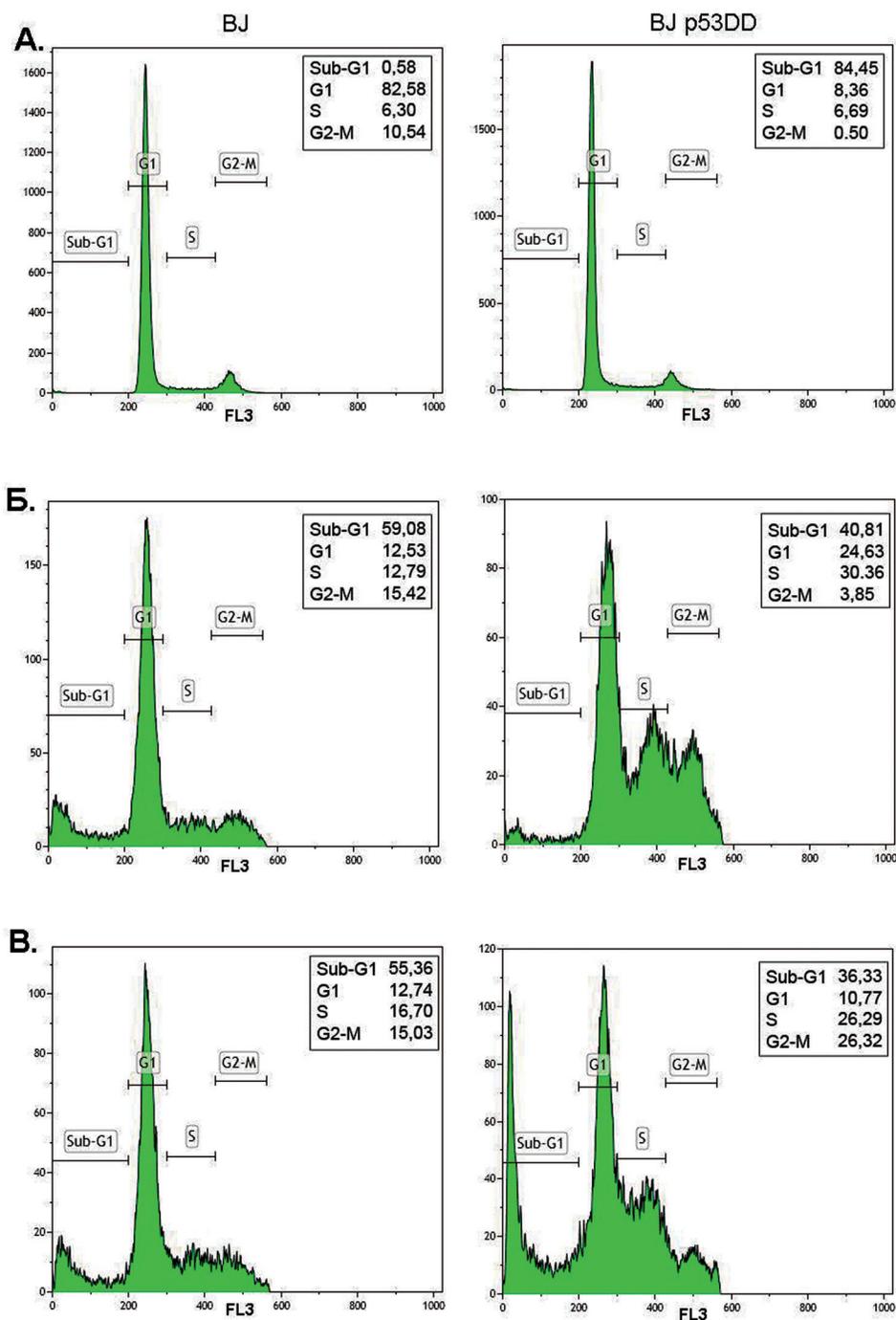


Рис. 3. Влияние доксорубина и ингибиторов активности АТМ-киназы (Ku55933), а также ПАП1 (Nu1025) на распределение клеток по фазам клеточного цикла фибробластов человека линий BJ (слева) и BJ p53DD (справа). А. Контроль. Б. Доксорубин. В. Доксорубин + Nu1025 + Ku55933

ний ДНК, протекающих с участием АТМ-киназы и ПАП1.

Анализ уровня экспрессии некоторых белков-репарантов повреждений ДНК показал, что в результате воздействия доксорубина на фибробласты линии BJ (как с

диким, так и с мутантным белком р53) происходит активация АТМ-киназы, что проявляется в увеличении уровня экспрессии её фосфорилированной формы – рАТМ (S1981). Как и ожидалось, внесение в культуру клеток ингибитора активности АТМ-киназы

Ku55933 препятствовало фосфорилированию (то есть активации) данной киназы (рис. 2).

Кроме того, было выявлено, что в результате повреждений ДНК, индуцированных доксорубицином, в фибробластах происходит активация процессов их репарации по механизму гомологичной рекомбинации, о чём свидетельствовало увеличение экспрессии рекомбиназы Rad51.

Анализ уровня экспрессии маркёров апоптоза [расщеплённые формы каспазы-3 (cl. caspase-3) и ПАРП (cl. PARP) в клетках линии VJ, подвергнутых действию доксорубицина] показал наличие вышеуказанных расщеплённых форм во всех исследуемых образцах линии VJ (см. рис. 2, левая панель), в то время как в клетках VJ p53DD аналогичные изменения наблюдались только на фоне сочетанного действия доксорубицина и ингибиторов активности АТМ-киназы и ПАРП (см. рис. 2, правая панель).

Анализ распределения фаз клеточного цикла показал, что фибробласты линии VJ p53DD имеют специфичный механизм ответа на воздействие доксорубицина (накопление клеток в S-фазе) по сравнению с клетками линии VJ, экспрессирующими «дикий тип» белка p53 (рис. 3). Более того, отмечалось значимое (по сравнению с фибробластами линии VJ) увеличение количества гиподиплоидных (то есть апоптотных) клеток при инкубации p53-негативных фибробластов с доксорубицином на фоне сочетанного «выключения» активности АТМ-киназы и ПАРП (15,03 и 26,32% соответственно).

Данная форма ответа клеток с «дефектным» p53 на генотоксический стресс, вызываемый ингибитором топоизомеразы II типа — доксорубицином, обусловлена несостоятельностью клеток в плане активации точки рестрикции между фазой G1 и фазой S, которая, как известно, зависит от функциональной активности белка p53.

Данный феномен характерен и для ряда опухолевых линий, дефектных по экспрессии белка p53, что определяет их фенотипическую особенность — беспрепятственное продвижение по клеточному циклу с накоплением персистирующих повреждений ДНК [8]. Беспрепятственный переход клеток с повреждённой ДНК в S-фазу создаёт предпосылки для образования двунитевых разрывов ДНК ввиду блока активности репликативных вилок и таким образом делает клетки чрезвычайно зависимыми от процессов репарации, преимущественно одно- и двунитевых разрывов ДНК [2, 7].

ВЫВОДЫ

1. Полученные нами результаты показали, что в условиях несостоятельности p53-зависимых механизмов регуляции продвижения клеток по фазам клеточного цикла ингибирование активности поли-(АДФ-рибоза)-полимеразы и АТМ-киназы приводит к усилению их апоптоза.

2. Обнаруженный нами факт согласуется с концепцией «синтетической летальности» и указывает на усиление гибели клеток в условиях генотоксического стресса и одновременного «выключения» нескольких, перекрывающих по своей функциональности друг друга, путей репарации повреждений ДНК.

Исследования частично финансировались за счёт средств грантов Российского фонда фундаментальных исследований — РФФИ №14-04-32304 мол_a и РФФИ №13-04-00255A.

ЛИТЕРАТУРА

1. Бойчук С.В., Рамазанов Б.Р. Нарушения системы репарации ДНК — роль в онкогенезе и терапии злокачественных новообразований. *Казанский мед. ж.* 2014; 95 (3): 307–314. [Boychuk S.V., Ramazanov B.R. DNA repair system defects — role in oncogenesis and cancer therapy. *Kazanский meditsinskiy zhurnal.* 2014; 95 (3): 307–314. (In Russ.)]
2. Arnaudeau C., Lundin C., Helleday T. DNA double-strand breaks associated with replication forks are predominantly repaired by homologous recombination involving an exchange mechanism in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 2001; 307: 1235–1245.
3. Dunkern T.R., Wedemeyer I., Baumgartner M. et al. Resistance of p53 knockout cells to doxorubicin is related to reduced formation of DNA strand breaks rather than impaired apoptotic signaling. *DNA Repair (Amst).* 2003; 2: 49–60.
4. Fedier A., Moawad A., Haller U., Fink D. p53-deficient cells display increased sensitivity to anthracyclines after loss of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Int. J. Oncol.* 2003; 23 (5): 1431–1437.
5. Matsuoka S., Ballif B.A., Smogorzewska A. et al. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science.* 2007; 316: 1160–1166.
6. Norbury C.J., Zhitovskiy B. DNA damage-induced apoptosis. *Oncogene.* 2004; 23 (16): 2797–2808.
7. Serrano M.A., Li Z., Dangeti M. et al. DNA-PK, ATM and ATR collaboratively regulate p53-RPA interaction to facilitate homologous recombination DNA repair. *Oncogene.* 2013; 32: 2452–2462.
8. Shiloh Y. The ATM-mediated DNA-damage response: taking shape. *Trends Biochem. Sci.* 2006; 31 (7): 402–410.
9. Smith G.C., Divecha N., Lakin N.D., Jackson S.P. DNA-dependent protein kinase and related proteins. *Biochem. Soc. Symp.* 1999; 64: 91–104.
10. Yang J., Yu Y., Hamrick H.E., Duerksen-Hughes P.J. ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses. *Carcinogenesis.* 2003; 24 (10): 1571–1580.
11. Zhou B.B., Elledge S.J. DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature.* 2000; 408: 433–439.