

ФУНДАМЕНТАЛЬНАЯ БИОЛОГИЯ И МЕДИЦИНА

УДК 577.34-576.32/36:616-006.446

ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ ТРАНСКРИПТОМА РАКОВЫХ КЛЕТОК С НОРМАЛЬНЫМ И МУТАНТНЫМ ГЕНОМ TP53 В УСЛОВИЯХ РАДИАЦИОННО- ИНДУЦИРОВАННОГО ОКСИДАТИВНОГО СТРЕССА*

Ю.В. Саенко, Е.С. Глущенко, А.В. Антонова,
И.В. Живодерников, В.П. Свеколкин, П.В. Белогубов

Ульяновский государственный университет

Целью работы стал поиск кластеров генов, скоординированная экспрессия которых повторяет динамику изменения внутриклеточной концентрации активных форм кислорода (АФК) после радиационного облучения в раковых клетках с мутантным и нормальным геном TP53. Выявлено, что экспрессия гена FOS зависит от внутриклеточной концентрации АФК в облученных клетках. В TP53-мутантных клетках происходит увеличение экспрессии гена FOS, сопровождающееся увеличением экспрессии гена GDF15, продукт которого, белок ростовой фактор дифференциации-15, является репрессором белка c-FOS, тогда как в клетках с геном TP53 дикого типа экспрессия гена GDF15 не зависит от внутриклеточной концентрации АФК и не скоординирована с экспрессией гена FOS.

Ключевые слова: активные формы кислорода, ген TP53, ген FOS, ген GDF15, повреждение ДНК, транскриптом, апоптоз, рентгеновское излучение.

Введение. Активные формы кислорода (АФК) являются одним из основных повреждающих факторов, возникающих при радиационном воздействии на клетку. АФК возникают в результате радиолитической воды – являются продуктом непосредственного взаимодействия ионизирующего излучения с водой [8]. К ним относят короткоживущие радикалы: гидроксильный радикал и супероксид-анион-радикал, а также перекись водорода. Из трех представителей АФК только гидроксильный радикал является непосредственным продуктом радиолитической воды [7]. Супероксид-анион-радикал и перекись водорода являются вторичными АФК. Они генерируются в результате протекания цепных радикальных реак-

ций, инициируемых гидроксильным радикалом. АФК могут выступать в качестве повреждающих агентов и инициировать клеточное повреждение и смерть. Клеточная смерть может наступать непосредственно в результате гиперпродукции АФК, что связано с инициированием свободнорадикальных реакций в мембранах и их разрушением [7]. В этом случае клеточная смерть реализуется через механизм некроза. При более низких значениях концентрации АФК на первое место выходит гибель клетки в результате запуска апоптоза. Апоптоз относится к типу активной клеточной смерти и требует энергетического обеспечения. Индукция апоптоза в ряде случаев связана с невозможностью репарации возникших повреждений ДНК, которые могут возникать после радиационного воздействия в присутствии АФК. Облучение клеток радиацией ведет к разнообразным повреждениям

* Работа выполнена при поддержке федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007–2013 годы» ГК № 14.512.11.0058.

ДНК, к которым относятся: повреждение азотистых оснований, одно- и двуцепочечные разрывы цепей ДНК, образование ковалентных сшивок между азотистыми основаниями ДНК и между ДНК и белками [14].

Механизмы индукции апоптоза вследствие повреждения ДНК связаны с изменением экспрессии большого числа генов и являются скоординированным клеточным ответом, ключевую роль в котором играет белок p53, который способен вызвать апоптоз клеток в ответ на повреждение ДНК [11]. Генетический анализ опухолевых клеток человека продемонстрировал ключевую роль p53 в подавлении онкологических процессов. Больше половины опухолей человека из всего широкого спектра типов несут мутации p53 (TP53), а наследование мутантного гена TP53 делает его носителей предрасположенными к онкологическому синдрому Ли-Фраумени [10]. Мутация гена TP53 затрагивает целый кластер других генов, экспрессия которых зависит от белка p53. Например, запуск p53-зависимого апоптоза связан с индукцией транскрипции компонентов как внешним и внутренним механизмами клеточной смерти, включая такие белки, как BAX, FAS, NOXA и PUMA [13]. Известно, что мутации гена TP53 приводят к существенным изменениям в механизме клеточного ответа на стрессовые воздействия, в частности на радиационно-индуцированное увеличение внутриклеточной концентрации АФК. Опухоли с мутантным геном TP53 обладают высокой радиорезистентностью и способностью к метастазированию, что, как полагают, связано с их генетической нестабильностью [15]. Результатом мутации гена TP53 может стать разрушение нормальных и возникновение новых сетей экспрессирующихся генов, возникновение новых белковых взаимодействий, приводящих к появлению радиорезистентности.

Цель исследования. Поиск кластеров генов, скоординированная экспрессия генов которых повторяет динамику изменения внутриклеточной концентрации АФК после радиационного облучения в раковых клетках с мутантным и нормальным геном TP53.

Материалы и методы. В экспериментах использовали следующие клеточные линии:

1) клеточная линия костномозговой лейкемии K562 (мутантная по гену TP53); 2) клеточная линия рака кишечника HCT-116 p53^{-/-} (мутантная по гену TP53); 4) клеточная линия рака кишечника HCT-116 p53^{+/+} (гены TP53 дикого типа). Клетки культивировали при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5 % CO₂. Для культивирования использовали среду RPMI-1649 или DMEM, содержащую L-глутамин, 12 % фетальной коровьей сыворотки и 50 мкг/мл гентамицина. Клетки облучали рентгеновским излучением, генерируемым терапевтическим акселератором Clinac 600, при комнатной температуре в дозах 4 Гр одноразово. Мощность дозы составляла 0,03 Гр/с при фокусном расстоянии 104 см. Высота водяного столба над клетками – 1 см. Клетки облучались в 24-луночных планшетах (объем лунки 2,5 мл).

Внутриклеточную концентрацию активных форм кислорода определяли с использованием 2',7'-дихлородигидрофлуоресцеиндиацетата (DCFH-DA). Это вещество быстро проникает в цитоплазму и, взаимодействуя с АФК, окисляется до флуоресцирующего дихлорофлуоресцеина [2]. DCFH-DA добавляли в среду с клетками в конечной концентрации 30 мкМ за 30 мин до анализа и держали в CO₂-инкубаторе при 37 °С в темноте. После инкубации среду удаляли, добавляли равный объем фосфатного буферного раствора pH 7,4 и оставляли на льду на 15 мин в темноте. Интенсивность флуоресценции дихлорофлуоресцеина измеряли с использованием проточного цитометра Becton Dickinson FACS Canto (лазер – 488 нм, LP-зеркало – 503, ВР-фильтр – 530/30). Параметры оксидативного стресса оценивали через 30 мин, 1, 4, 8, 12, 24, 48 ч. Все эксперименты и определения параметров были выполнены как минимум с трехкратным повторением. Результаты выражались в виде среднего значения и стандартного отклонения (M±SD). Результаты обработаны статистически с использованием t-критерия Стьюдента для парных переменных. Различия между группами считали достоверными при p<0,05.

Профили экспрессии генов изучались с использованием гибридационных ДНК-микроматриц высокой плотности серии

HGU133A (Human Genome U133A) фирмы Affymetrix (Санта-Клара, Калифорния, США) через 15 мин, 12 и 24 ч после радиационного воздействия. РНК выделялась с использованием набора RNeasyMini (Qiagen, США). Качество выделенной РНК оценивалось по целостности 18S- и 28S-рибосомальной РНК с использованием электрофореза в 1 % агарозном геле. Библиотека клонированных ДНК готовилась с использованием набора Gene Chip Expression 3'-Amplification One-Cyclec DNA Synthesis Kit (Affymetrix). Мечение биотином антисмысловых библиотек клонированных РНК и очистка проводились с использованием набора Gene Chip Expression 3'-Amplification Reagentsfor IVT Labeling (Affymetrix). Матрица окрашивалась стрептовидин-фикоэритрином и сканировалась на сканере Gene Atlas System (Affymetrix, Санта-Клара, Калифорния, США) [5]. Обработка данных, полученных после сканирования ДНК-микроматриц, проводилась с использованием алгоритмов MAS5. Статистическая обработка данных экспрессии генов выполнялась с использованием программного пакета SAM (<http://stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>). Сравнительный анализ существующих взаимодействий среди белков проводился при помощи программы STRING 9.0 (доступна по адресу: <http://string-db.org>).

Результаты и обсуждение. На рис. 1 представлены данные, отражающие внутриклеточную концентрацию АФК в клетках K562, НСТ-116 p53+/+ и НСТ-116 p53-/- после облучения в дозе 4 Гр. Как видно, концентрация АФК имеет два максимума. Первый максимум наблюдается через 30 мин после облучения. В этот момент времени концентрация АФК выше в облученных клетках линий НСТ-116 p53-/-, НСТ-116 p53+/+ и K562 в 1,36, 1,23 и 1,67 раза соответственно по сравнению с контрольными клетками. При определении концентрации АФК через 1 ч после облучения оказалось, что она практически не отличается от таковой в контрольных клетках. Через 8 ч после облучения концентрация АФК была в 1,1–1,4 раза больше, чем в клетках контрольной группы. Далее мы наблюдали рост концентрации АФК. Через 24 ч после облучения мы отметили второй максимум внутриклеточной концентрации АФК, который превосходил по своим значениям первый максимум. При облучении клеток радиационно-индуцированная генерация АФК в клетках с нормальным и мутантным геном TP53 имел схожую динамику, концентрация АФК в мутантных клетках в 1,53, 1,89 и 2,16 раза превосходила аналогичный параметр клеток, не подвергавшихся облучению.

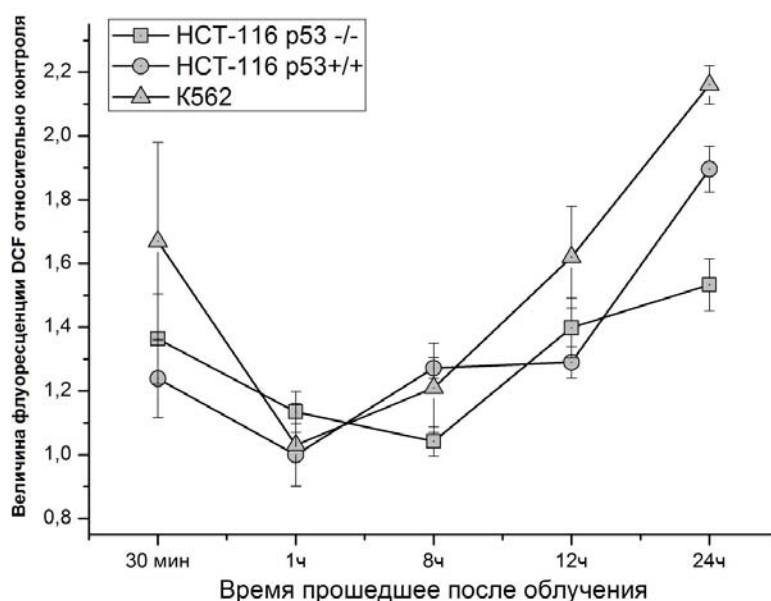


Рис. 1. Динамика изменения активных форм кислорода после облучения клеток линий НСТ-116 p53-/-, НСТ-116 p53+/+ и K562 рентгеновским излучением в дозе 4 Гр. Данные представлены как отношение величины флуоресценции DCFH-DA в клетках, подвергшихся рентгеновскому облучению, к данному показателю в контрольной группе

Дальнейший мониторинг концентрации АФК в культурах клеток, подвергшихся облучению, нами был признан нецелесообразным в связи со старением среды и накоплением большого количества погибших клеток, что препятствовало точному определению концентрации АФК в клеточных культурах старше 24 ч. Таким образом, в результате выполненных экспериментов по изучению динамики изменения внутриклеточной концентрации АФК выявлено, что радиационно-индуцированная генерация АФК в клетках с нормальным и мутантным геном TP53 имеет схожую динамику.

На рис. 2 показана диаграмма Венна, отражающая количество генов, динамика экс-

прессии которых повторяет динамику изменения внутриклеточной концентрации АФК в клетках НСТ-116 p53^{-/-}, НСТ-116 p53^{+/+} и K562 после однократного облучения в дозе 4 Гр. Профили экспрессии генов анализировались через 30 мин, 1, 12 и 24 ч после облучения. Нами были проанализированы три массива данных для клеточных линий K562, НСТ-116 p53^{+/+} и НСТ-116 p53^{-/-}, из которых были выделены гены, экспрессия которых соответствует динамике изменения внутриклеточной концентрации АФК. Результатом нашего отбора явился массив данных, который содержит названия генов, экспрессия которых повторяет динамику изменения концентрации АФК после облучения.

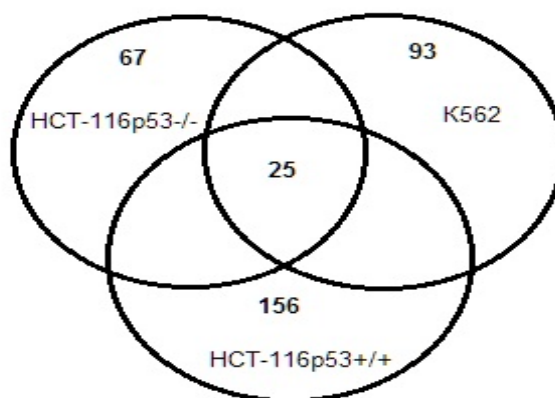


Рис. 2. Диаграмма Венна

Для анализа были введены следующие условия отбора: волнообразное поведение по схеме: 1) 15%-е возрастание по отношению к контрольным значениям в точке 30 мин после облучения; 2) 10%-е убывание значений экспрессии гена в точке 1 ч по отношению к предыдущему значению экспрессии гена в точке 30 мин; 3) 10%-е возрастание экспрессии гена в точке 12 ч по отношению к предыдущему значению экспрессии гена в точке 1 ч; 4) 10%-е возрастание экспрессии гена в точке 24 ч по отношению к предыдущему значению экспрессии гена в точке 12 ч.

В результате мы получили перечень генов, которые удовлетворяли условиям отбора. В клетках линий НСТ-116 p53^{-/-}, НСТ-116 p53^{+/+} и K562 было обнаружено изменение экспрессии 67, 93 156 генов соответственно, синхронизированных с изменением концен-

трации АФК (рис. 2). Анализ выявил 25 генов, характерных для всех клеточных линий. Экспрессия остальных генов была характерна только для определенной клеточной линии.

При помощи программы STRING 9 был проведен сравнительный анализ существующих взаимодействий среди белков, экспрессия генов которых повторяет динамику изменения АФК после радиационного облучения в клетках мутантных (клетках линий НСТ-116 p53^{-/-} и K562) и нормальных по гену TP53 (НСТ-116 p53^{+/+}). На рис. 3 представлена схема взаимодействий сигнальных белковых молекул в нормальных и мутантных по гену TP53 (выделено серым цветом) клетках. Как видно из рисунка, белки, кодируемые генами, экспрессия которых зависит от уровня АФК, после радиационного облучения могут формировать несколько связанных между со-

бой сигнальных каскадов. Как видно из рис. 3, во всех изученных клеточных линиях (K562, НСТ-116 p53^{+/+} и НСТ-116 p53^{-/-}) существует каскад белков, кодируемых генами PTPRE (proteintyrosinephosphatase, receptortype), EIF2S3 (eukaryotictranslationalinitiationfactor 2, subunit 3 gamma, 52kDa), MAPK3 (митоген-активируемая протеинкиназа 3), FOS (протоонкоген c-Fos) и RGS2 (G0/G1 switchregulatoryprotein). В клетках линий НСТ-116 p53^{-/-} и K562, содержащих

мутантный ген TP53, дополнительно появляются три белковых сигнальных каскада: 1) RUNX1T (runt-relatedtranscriptionfactor), BCL6 (B-cell CLL/lymphoma), MXI1 (MAX interactingprotein); 2) BHLHE40 (basichelix-loop-helixfamily, member e40), ACSL1 (acyl-Co Asynthetasealong-chainfamily member), DHRS7 (dehydrogenase/reductase (SDR family) member 7); 3) GDF15 (ростовой фактор дифференциации 15), KDM5B (лизин(К)-специфическая деметилаза 5B).

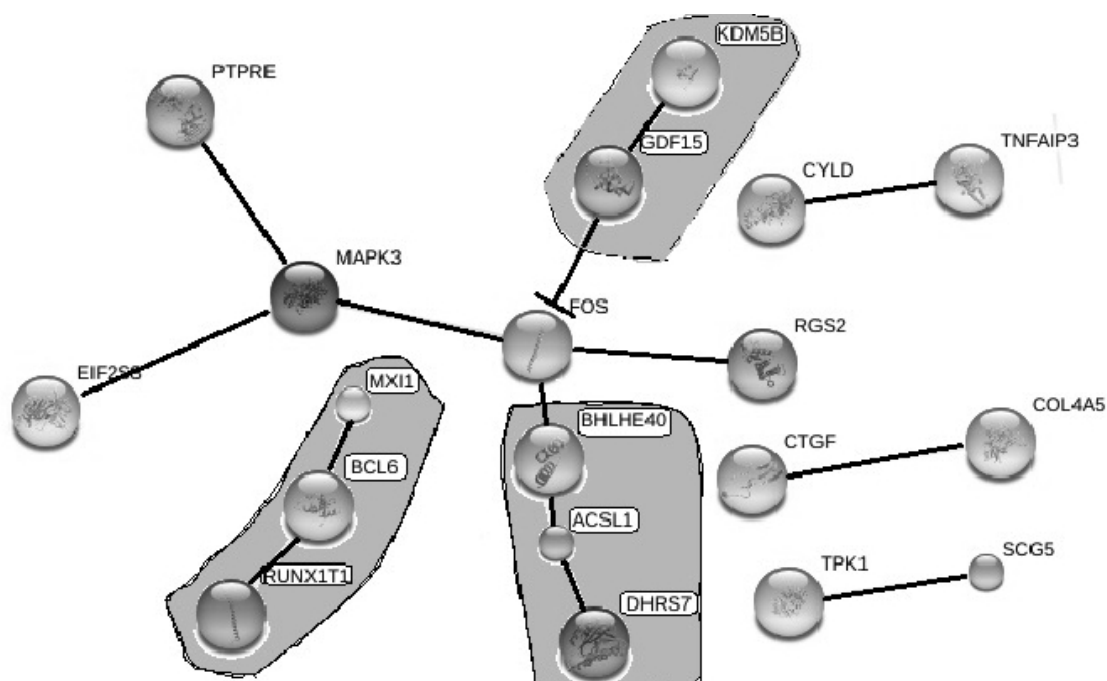


Рис. 3. Схема взаимодействия белков – продуктов генов, экспрессия которых повторяет динамику изменения АФК после радиационного облучения клеток линий НСТ-116 p53^{-/-}, НСТ-116 p53^{+/+} и K562

В результате исследования нами установлено, что радиационно-индуцированная генерация АФК в клетках с нормальным и мутантным геном TP53 имеет схожую динамику (рис. 1). После анализа транскриптома клеток линий НСТ-116 p53^{-/-}, НСТ-116 p53^{+/+} и K562 были выявлены гены, экспрессия которых соответствует динамике изменения внутриклеточной концентрации АФК (рис. 2). После проведения сравнительного анализа существующих взаимодействий среди белков, экспрессия генов которых повторяет динамику изменения АФК после радиационного облучения, нами были выявлены

несколько белковых каскадов, характерных как для всех изученных клеточных линий, так и для линий, различных по статусу гена TP53 (рис. 3). По нашему мнению, наиболее важным из найденных белковых каскадов, активность которых соответствует изменению концентрации АФК в облученных клетках, является сигнальный каскад с белком FOS. Этот белок является ключевым в ряде функций, связанных с пролиферацией, апоптозом, а также участвует в регуляции клеточного метаболизма на различных уровнях. Белок c-Fos выполняет функции проапоптотического агента, подавляя синтез антиапоптотиче-

ской молекулы с-FLIP(L) (ген CFLAR). с-Fos связывает промотором с-FLIP(L) и подавляет его транскрипционную активность, при этом снижает уровни мРНК и белка с-FLIP(L). Таким образом, с-Fos является ключевым регулятором гена с-FLIP(L), и активация с-Fos определяет, будут раковые клетки подвергаться TRAIL-индуцированному апоптозу или нет. Апоптоз-индуцирующий лиганд, связанный с фактором некроза опухолей TRAIL, индуцирует апоптоз в раковых клетках [1]. В нормальных клетках активация рецептора TRAIL не вызывает апоптоза. Многие виды рака чувствительны к TRAIL-индуцированному апоптозу, и в связи с этим в настоящее время ведутся работы над созданием агонистических к рецептору антител (Human agonistic anti-TRAIL receptor antibodies, HGS-ETR1 and HGS-ETR2) [9]. Однако существует много типов раковых опухолей, не чувствительных к TRAIL-индуцированному апоптозу [6]. В TP53-мутантных клетках экспрессия гена с-FOS подавляется в результате активации сигнального каскада GDF15 (ростовой фактор дифференциации 15) – KDM5B (лизин(К)-специфическая деметилаза), который оказывает ингибирующее действие на белок FOS [3]. Подавление экспрессии гена FOS связано с внутриклеточной концентрацией свободнорадикальных молекул: с увеличением концентрации экспрессия гена FOS увеличивается, а при уменьшении концентрации АФК – снижается. Основным супрессором гена FOS считается белок GDF15, который ранее уже был предложен в качестве кандидата на роль маркера радиорезистентных клеток, кроме этого GDF-15 является важным медиатором, активирующимся в ответ на повреждение ДНК и оказывающим влияние на транскрипцию гена TP53 [4]. Сверхэкспрессия GDF15 приводит к индукции p21, увеличению времени задержки клеточного цикла в фазе G1 и апоптозу [12]. Анализ литературных данных позволяет сказать, что ген GDF15 выполняет цитопротективные функции. Увеличение уровней мРНК GDF15 в TP53-мутантных клетках в наших экспериментах также подтверждает ранее обозначенную роль этого гена в процессах клеточной гибели.

Заключение. Таким образом, анализ динамики транскрипта в процессе развития радиационно-индуцированного оксидативного стресса в раковых клетках с нормальным и мутантным геном TP53 продемонстрировал, что экспрессия гена FOS зависит от внутриклеточной концентрации АФК в облученных клетках. В TP53-мутантных клетках происходит увеличение экспрессии гена FOS, сопровождающееся увеличением экспрессии гена GDF15, продукт которого, белок ростовой фактор дифференциации-15, является репрессором белка с-FOS, тогда как в клетках с геном TP53 дикого типа экспрессия гена GDF15 не зависит от внутриклеточной концентрации. Этот механизм можно предложить в качестве одного из объяснения радиорезистентности TP53-мутантных опухолей.

1. C-Fos as a Proapoptotic Agent in TRAIL-Induced Apoptosis in Prostate Cancer Cells / X. Zhang [et al.] // *Cancer Research*. – 2007. – Vol. 67, № 19. – P. 9425–9434.
2. Characterization of 2',7'-dichlorofluorescein fluorescence in dissociated mammalian brain neurons: estimation on intracellular content of hydrogen peroxide / Y. Oyama [et al.] // *Brain Res*. – 1994. – Vol. 635, № 1–2. – P. 113–117.
3. Cheng J. C. Wild-type p53 attenuates cancer cell motility by inducing growth differentiation factor-15 expression / J. C. Cheng, H. M. Chang, P. C. Leung // *Endocrinology*. – 2011. – Vol. 152, № 8. – P. 987–995.
4. Differentially expressed genes in radioresistant nasopharyngeal cancer cells: gp96 and GDF15 / J. T.-C. Chang [et al.] // *Mol. Cancer Ther.* – 2007. – Vol. 6. – P. 2271–2279.
5. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion / H. A. Collier [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2000. – Vol. 97, № 7. – P. 3260–3265.
6. French L. E. The TRAIL to selective tumor death / L. E. French, J. Tschopp // *Nat. Med.* – 1999. – Vol. 5, № 2. – P. 146–147.
7. Jones D. P. Radical-free biology of oxidative stress / D. P. Jones // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2008. – Vol. 295. – P. 849–868.
8. Le Caer S. Water Radiolysis: Influence of Oxide Surfaces on H₂O₂ Production under Ionizing Radiation / S. Le Caer // *Water*. – 2011. – Vol. 3. – P. 235–253.
9. Lexatumumab (TRAIL-receptor 2 mAb) induces expression of DR5 and promotes apoptosis in primary and metastatic renal cell carcinoma in a

mouse orthotopic model / L. Zhang [et al.] // *Cancer Lett.* – 2007. – Vol. 251, № 1. – P. 146–157.

10. *Olivier M.* TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use / M. Olivier, M. Hollstein, P. Hainaut // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2010. – Vol. 2, № 1.

11. Selective activation of p53-mediated tumour suppression in high-grade tumours / M. R. Junttila [et al.] // *Nature.* – 2010. – № 468 (7323). – P. 567–571.

12. *Subramaniam S.* Growth Differentiation Factor-15 Prevents Low Potassium-induced Cell Death of Cerebellar Granule Neurons by Differential Regulation of Akt and ERK Pathways / S. Sub-

ramaniam, J. Strelau, K. Unsicker // *J. Biol. Chem.* – 2003. – Vol. 278, № 11. – P. 8904–8912.

13. Transcriptional control of human p53-regulated genes / T. Riley [et al.] // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2008. – Vol. 9, № 5. – P. 402–412.

14. *Wardman P.* The importance of radiation chemistry to radiation and free radical biology / P. Wardman // *The British J. of Radiology.* – 2009. – Vol. 82. – P. 89–104.

15. *Yang J. Y.* ATM, ATR and DNA-PK: initiators of the cellular genotoxic stress responses / J. Y. Yang, H. E. Hamrick, P. J. Duerksen-Hughes // *Carcinogenesis.* – 2003. – Vol. 24, № 10. – P. 1571–1580.

GENE EXPRESSION PROFILES DURING RADIATION-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN CANCER CELLS WITH NORMAL AND MUTANT TP53 GENE

**Y.V. Saenko, E.S. Gluschenko, A.B. Antonova,
I.V. Zhivodernikov, V.P. Svekolkina, P.V. Belogubov**

Ulyanovsk State University

The aim of the present work was to find clusters of genes whose expression is repeating the radiation-induced ROS dynamics in cancer cells with mutant and normal gene TP53. It was revealed that the expression of the gene FOS depends on the intracellular concentration of ROS in irradiated cells. In TP53 mutant cells increased in FOS gene expression is accompanied by increased in GDF15 expression, whose product, protein growth differentiation factor-15 is a repressor of the FOS protein. In cells with wild-type TP53 gene the expression of GDF15 doesn't depend from the intracellular concentration of ROS and doesn't coordinate with the expression of the FOS gene.

Keywords: active forms of oxygen, TP53 gene, FOS gene, GDF15 gene, DNA damage, gene expression, transcriptome, apoptosis, cancer, radiation.