

ВЕЛИЧКО АРТЁМ КОНСТАНТИНОВИЧ

**ВЛИЯНИЕ ТЕПЛОВОГО ШОКА НА РЕПЛИКАЦИЮ ДНК, СТАБИЛЬНОСТЬ
ГЕНОМА И СТРУКТУРУ ХРОМАТИНА**

03.01.03 – молекулярная биология

03.01.07 – молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва - 2012

Работа выполнена в лаборатории структурно-функциональной организации хромосом
Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена
Российской академии наук.

Научные руководители: Разин Сергей Владимирович
член-корреспондент РАН,
доктор биологических наук, профессор

Кантидзе Омар Леванович
кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: Коробко Игорь Викторович
доктор биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт биологии гена Российской академии наук,
заведующий лабораторией молекулярной онкогенетики

Гиева Фатима Константиновна
кандидат биологических наук,
Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт белка Российской академии наук,
старший научный сотрудник

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение
науки Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук

Защита состоится ___ ноября 2012 года в 11 час. на заседании
диссертационного совета Д 002.037.01 при Федеральном государственном бюджетном
учреждении науки Институте биологии гена Российской академии наук по адресу:
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного
бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук по адресу:
119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.

Автореферат разослан ____ октября 2012 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Механизмы реакции эукариотической клетки на стресс сложны и многообразны. Тепловой шок является одним из наиболее агрессивных типов стресса, поскольку он оказывает повреждающее действие практически на все клеточные компоненты. При тепловом стрессе происходит остановка процессов макромолекулярного синтеза, денатурация и агрегация белков, дестабилизация систем регуляции клеточного цикла, нарушение процессов сплайсинга, репарации и др. При этом для предотвращения фатальных последствий клетки запускают экспрессию высококонсервативных белков, известных как белки теплового шока. На нескольких модельных организмах было показано, что в условиях гипертермии более сотни генов начинают активно транскрибироваться. Однако экспрессия многих других генов может быть репрессирована. К ним относятся гены, кодирующие компоненты сигнальных путей, ферменты метаболизма РНК и биосинтеза нуклеотидов, компоненты систем транскрипции, трансляции, контроля клеточного цикла и др. Долгое время механизмы специфичной термоиндуцируемой репрессии генов оставались неясными. Сейчас стало известно, что РНК, кодируемая Alu-повторами (один из типов SINE), может выступать в роле транскрипционного репрессора, ингибируя РНК-полимеразу II в условиях гипертермии. Однако до сих пор нет сведений об участии репрессорных белков в регуляции транскрипции при тепловом шоке. На роль таковых лучше всего подходят белки гетерохроматиновых доменов, осуществляющие сайленсинг специфичных генов. Один из них, белок HP1 α (гомолог белка HP1 *Drosophila melanogaster*) не связывается с ДНК напрямую, а образует макромолекулярные комплексы с метилированным остатком лизина 9 в гистоне H3 и гистонметилазой SUV39H1, что является сигналом для инактивации транскрипционно-активных хроматиновых доменов. Между тем, функциональная активность HP1 α и других репрессорных белков при гипертермии практически не изучена. Поэтому исследование роли белка гетерохроматина HP1 α в клеточном ответе на тепловой стресс, позволит лучше понять фундаментальные механизмы, лежащие в основе масштабной транскрипционной репрессии генов. Более того, изучение поведения белка HP1 α при гипертермии расширит наше представление о структуре хроматина и изменениях в ней, связанных с клеточным ответом на стресс.

Кроме белков, тепловой шок имеет ещё одну возможную мишень – ДНК. В истории изучения действия высоких температур на клетку был период, когда считалось, что тепловой шок не приводит к возникновению двуцепочечных разрывов ДНК (ДЦР), а

вызывает только одностранные разрывы, связанные исключительно с ингибированием репликации. Однако за последние десять лет несколько исследовательских групп продемонстрировали, что тепловой шок может индуцировать фосфорилирование гистона H2AX, что является одним из первых событий в процессах узнавания и репарации ДЦР. Тем не менее, интерпретация этих результатов достаточно противоречива: некоторые исследовательские группы утверждают, что фокусы фосфорилированного гистона H2AX (γ H2AX) маркируют исключительно двуцепочечные разрывы ДНК, индуцированные температурой; другие авторы склонны считать, что тепловой шок сам по себе не приводит к повреждению ДНК, а γ H2AX в этом случае является побочным продуктом клеточного ответа на стресс. Исходя из этого, изучение роли фосфорилирования H2AX при тепловом шоке представляет значительный интерес. Потенциально это может раскрыть новые функциональные свойства γ H2AX, а также лучше понять принципы поддержания структурной и функциональной стабильности генома в условиях стресса.

Хотя настоящая работа имеет четко выраженный фундаментальный характер, полученные результаты могут иметь и определенное практическое приложение. Гипертермия является общеизвестным методом лечения онкозаболеваний. Сочетание химиотерапии и гипертермии увеличивает эффективность терапии различных форм опухолей. Поэтому результаты настоящей работы могут быть использованы для создания более эффективных терапевтических стратегий. Все сказанное определяет актуальность темы данной диссертационной работы, которая посвящена изучению эпигенетических механизмов клеточного ответа на тепловой стресс.

Цель и задачи исследования. Целью работы было изучение влияния теплового шока на структуру хроматина, репликацию ДНК и целостность генома.

Для реализации поставленной цели были определены следующие экспериментальные задачи:

1. Изучение ядерной динамики белка гетерохроматина HP1 α в условиях теплового шока;
2. Исследование возможности температурной индукции двуцепочечных разрывов ДНК;
3. Изучение влияния теплового шока на репликацию ДНК;

4. Идентификация функциональной роли фосфорилирования гистона H2AX в процессе репликации ДНК и механизмах поддержания стабильности генома при тепловом шоке.

Научная новизна и практическое значение работы. Нами впервые продемонстрировано, что при острой гипертермии (45,5°C, 30 мин) большая часть пула белка гетерохроматина HP1 α диссоциирует из центромер и перераспределяется по другим (возможно, эухроматиновым) компартментам. Важно, что при этом степень компактизации центромерного гетерохроматина не изменяется. Результаты наших наблюдений позволяют предположить, что HP1 α не является необходимым компонентом для поддержания компактной структуры прицентромерного гетерохроматина, и в собранных гетерохроматиновых доменах HP1 выступает скорее как транскрипционный репрессор, чем структурный компонент.

Наше исследование доказывает способность гипертермии индуцировать образование двуцепочечных разрывов ДНК. Продемонстрировано, в частности, что эффект температурной индукции ДЦР зависит от стадии клеточного цикла, и характерен только для клеток, находящихся в G1- и G2-фазах. Эти двуцепочечные разрывы маркируются фосфорилированным H2AX, причем в данном случае фосфорилирование является АТМ-зависимым. Кроме того, наши результаты позволяют однозначно утверждать, что тепловой шок приводит к аресту репликации в клетках человека. Мы продемонстрировали, что при тепловом стрессе в сайтах репликации также происходит фосфорилирование гистона H2AX. Однако такое фосфорилирование осуществляется не АТМ, а ДНК-зависимой протеинкиназой. В работе впервые показано, что формирование доменов γ H2AX в сайтах репликации предотвращает репликативный арест при умеренной гипертермии (42, 44°C), а при остром тепловом шоке (45,5°C) «спасает» остановленные вилки от коллапса, который может служить причиной формирования двуцепочечных разрывов ДНК.

Результаты данной работы вносят существенный вклад в развитие представлений о механизмах поддержания структурной и функциональной стабильности генома, и процессов макромолекулярного синтеза в условиях стресса.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на пятнадцатой международной Пущинской школе-конференции молодых учёных (Пущино,

2011), на международной конференции «22nd Wilhelm Berhard Workshop» (Рига, 2011), международной конференции «Хромосома 2012» (Новосибирск, 2012).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ. Из них статей – 2, материалов конференций – 3.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 102 страницах, содержит 21 рисунок, 2 таблицы и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Постановка задачи и методические подходы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список литературы» (219 цитированных работ).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Роль белка гетерохроматина 1 в клеточном ответе на тепловой стресс

1.1. Кратковременный тепловой стресс не влияет на жизнеспособность и пролиферативную активность клеток человека.

Для анализа ядерной динамики HP1 в условиях теплового стресса было использовано несколько культур клеток человека. Основные эксперименты были проведены на культуре клеток рака молочной железы (линия mcf-7). Однако наиболее важные результаты были подтверждены с использованием двух других клеточных культур: иммортализованных Т-лимфоцитов (линия Jurkat) и первичной культуры фибробластов. В работе был использован короткий тепловой стресс (30 минут) в диапазоне 42-45,5°C. На первом этапе работы необходимо было выяснить, индуцируется ли в таких условиях классическая реакция клеток на тепловой стресс, т.е. увеличивается ли уровень транскрипции генов белков теплового шока (HSP). Для этого с помощью количественной ОТ-ПЦР мы измеряли уровень мРНК HSP70, HSP40 и HSP105/110 в контрольных клетках и клетках, подвергнутых гипертермии. Было показано, что уровень всех перечисленных выше мРНК резко возрастал в каждой из проверенных температурных точек.

Было также необходимо проверить, влияют ли использованные нами условия теплового шока на жизнеспособность клеток. С использованием двух экспериментальных подходов – окраски трипановым синим и МТТ-теста мы показали, что клетки остаются живыми после 30-минутной инкубации при температурах 42-45,5°C. Более того, после возвращения в нормальные условия подвергнутые тепловому стрессу клетки продолжали делиться и сохраняли контрольный уровень пролиферативной активности через 3, 6 и 24 часа после стресса.

1.2. Белок гетерохроматина 1 α (HP1 α) диссоциирует из центромерных областей хромосом в условиях теплового стресса

С использованием метода иммуноокрашивания мы проанализировали ядерную локализацию белка гетерохроматина HP1 α в клетках линии mcf-7, культивируемых в обычных условиях и подвергнутых тепловому стрессу (45,5°C, 30 минут).

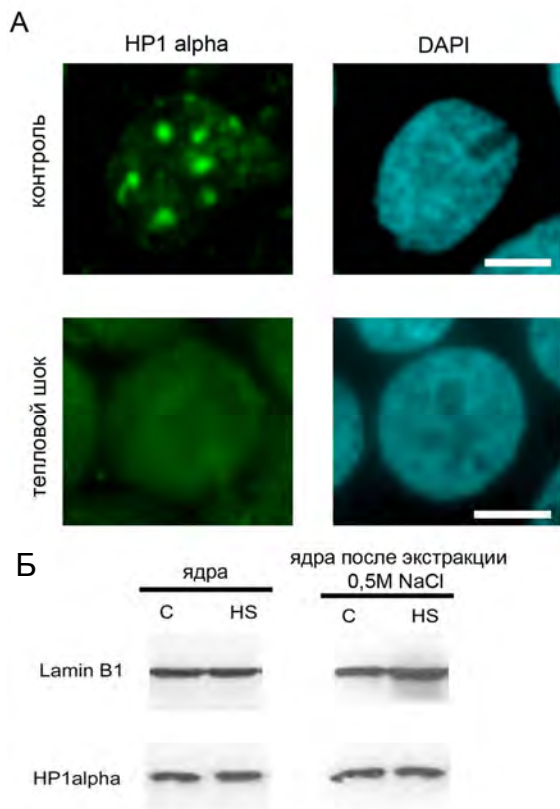


Рис. 1. Перераспределение белка HP1α в ядре при тепловом шоке.

(А) Распределение HP1α в ядрах контрольных и подвергнутых тепловому шоку при 45,5° клетках mcf-7. Клетки окрашивали с помощью моноклональных антител против HP1α. ДНК окрашивали с помощью DAPI. Фотографии получены с помощью сканирующего конфокального микроскопа Leica. Масштабная полоса – 5 мкм.

(Б) Вестерн-блот анализ HP1α в ядрах контрольных (C) и подвергнутых тепловому шоку (HS) клеток mcf-7. Ламин B1 был использован как внутренний контроль.

Результаты проведенных экспериментов представлены на рисунке 1А. Можно видеть, что в контрольных клетках HP1α организован в кластеры конденсированного хроматина. Основываясь на предыдущих исследованиях, мы предположили, что такие кластеры HP1α могут соответствовать центромерному гетерохроматину. Чтобы подтвердить это предположение, мы провели двойное иммуноокрашивание клеток антителами против HP1α и CENP-A, центромерного варианта гистона H3. В самом деле, оказалось, что регионы окрашенные антителами против HP1α колокализуются с CENP-A-содержащими компартментами (Рис. 2А). Интересно, что в условиях острого теплового шока (30 минут 45,5°С) кластеры, сформированные HP1α, распадаются (Рис. 1А). При этом сам HP1α практически равномерно распределяется по всему пространству ядра, в то время как гистон CENP-A сохраняет свою локализацию в ограниченном числе компартментов (Рис. 2А). На основании этого можно утверждать, что особая организация центромерного хроматина сохраняется в условиях теплового стресса несмотря на диссоциацию из него белка HP1α. Подобный эффект не был уникален для клеток mcf-7. Аналогичные результаты были получены на лимфоидных клетках Jurkat и первичных фибробластах человека. Удаление HP1α из центромерного гетерохроматина в клетках, подвергнутых тепловому стрессу, можно объяснить двумя способами. В силу тех или иных причин может происходить релокализация белка в другие геномные локусы. С другой стороны, наблюдаемый эффект может быть и следствием деградации HP1α. Чтобы

проверить, какая из возможностей реализуется на самом деле, мы сравнили с помощью вестерн-блот анализа общее количество белка HP1 α в контрольных клетках, и клетках после теплового шока. Кроме того, мы сравнили количество связанного с хроматином HP1 α , который остаётся в ядрах контрольных и подвергнутых стрессу клеток после мягкой солевой экстракции (0,5M NaCl). Полученные результаты показывают, что в условиях теплового стресса не происходит деградации HP1 α (Рис. 1Б). Более того, количество связанного с хроматином HP1 α до и после теплового шока остаётся неизменным (Рис. 1Б). Эти данные говорят о том, что тепловой шок приводит именно к перераспределению HP1 α из центромер в другие геномные локусы. Следует отметить, что перераспределение HP1 α является не перманентным событием, а носит обратимый характер. С использованием техники иммуоокрашивания мы продемонстрировали, что в подвергнутых тепловому стрессу клетках центромерная локализация HP1 α восстанавливается после 20 часов культивирования в нормальных условиях.

1.3. Диссоциация HP1 α из центромерных участков хромосом не связана с деметилированием остатков лизина 9 гистона H3 (H3K9)

Белок HP1 α содержит хромодомен, благодаря чему способен распознавать и связывать ди- и триметилированный по лизину в 9 позиции гистон H3 (H3K9me2 и H3K9me3). Предполагается, что взаимодействие между HP1 α и H3K9me3 необходимо для сборки и стабилизации гетерохроматина. Также известно, что у эукариотических клеток существуют ферменты способные удалять метильные группы из H3K9. В этой связи нам представлялось интересным выяснить, происходит ли временное деметилирование H3K9 в центромерных областях в условиях теплового стресса. Для этого контрольные и подвергнутые тепловому стрессу клетки фиксировали и окрашивали с помощью антител против H3K9me3. В контрольных клетках H3K9me3 иммуоцитохимически выявляется в виде компактных фокусов, колоколизующихся с HP1 α и CENP-A (Рис. 2А,Б). После теплового шока не происходит видимых изменений в характере распределения H3K9me3. Иными словами, тепловой шок не вызывает массивного деметилирования H3K9 в центромерных районах хромосом (Рис. 2Б). В полном соответствии с этим результатом, общее количество H3K9me3, которое мы оценивали с использованием техники вестерн-блота, оказалось примерно одинаковым в контрольных и подвергнутых гипертермии клетках (Рис. 2В). Таким образом, ясно, что диссоциация HP1 α из центромерных участков

хромосом при тепловом стрессе не связана с деметилированием H3K9. Это свидетельствует о том, что метилирование H3K9 в центромерных областях само по себе не является достаточным условием для депонирования HP1α в центромерном гетерохроматине.

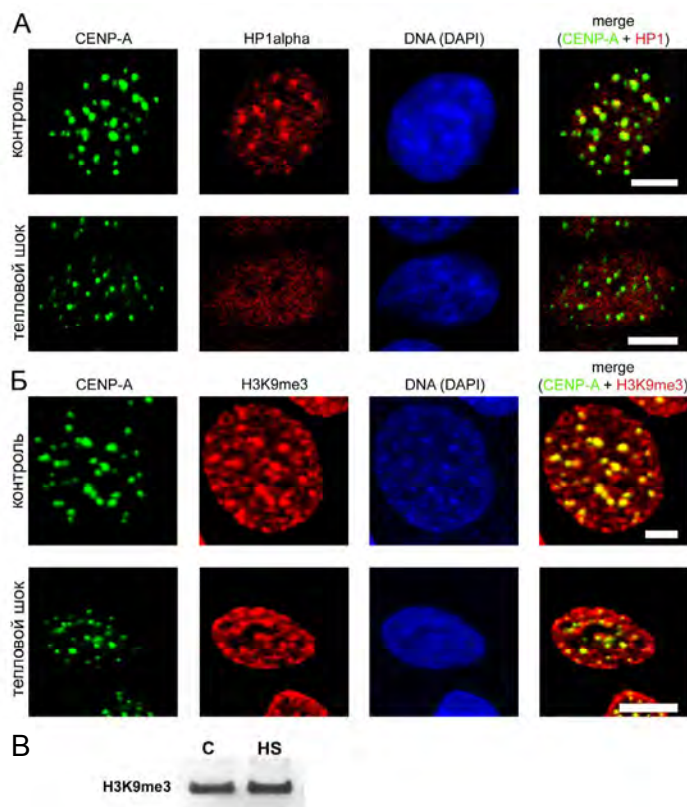


Рис. 2. Перераспределение HP1α в условиях теплового шока не приводит к декомпактизации центромерной ДНК.

(А) Контрольные и подвергнутые тепловому шоку при 45,5°C клетки mcf-7 были иммуноокрашены антителами против HP1α и CENP-A. Колокализация фокусов CENP-A и HP1 представлена жёлтым цветом на совмещённом изображении (merge).

(Б) Контрольные и подвергнутые тепловому шоку клетки mcf-7 были иммуноокрашены антителами против HP1α и гистона H3 триметилированного по лизину 9 (H3K9me3). Колокализация фокусов CENP-A и H3K9me3 представлена жёлтым цветом на совмещённом изображении (merge). В (А и В) ДНК окрашена с помощью DAPI. Фотографии получены с помощью мультифотонного микроскопа Zeiss LSM 510 META NLO. Масштабная полоса – 5 мкм

(В) Количество гистона H3 метилированного по лизину 9 (H3K9me3) не изменяется при тепловом шоке. Гистоны экстрагировали из контрольных (С) и подвергнутые тепловому шоку (HS) при 45,5°C клеток mcf-7. Разделение гистонов проводили с помощью гель-электрофореза в системе уксусная кислота/мочевина с последующей визуализацией H3K9me3 на вестерн-блоте.

1.4. Диссоциация HP1α не приводит к декомпактизации центромерных участков

Согласно современным представлениям, HP1α играет ключевую роль в формировании гетерохроматина. В силу этого представлялось интересным выяснить, изменяется ли степень компактизации центромерных участков хромосом после индуцированной тепловым стрессом диссоциации HP1α. Чтобы получить ответ на этот вопрос мы сравнили чувствительность к ДНКазе I центромерных повторов в контрольных и подвергнутых гипертермии клетках mcf-7, используя количественную ПЦР. Этот

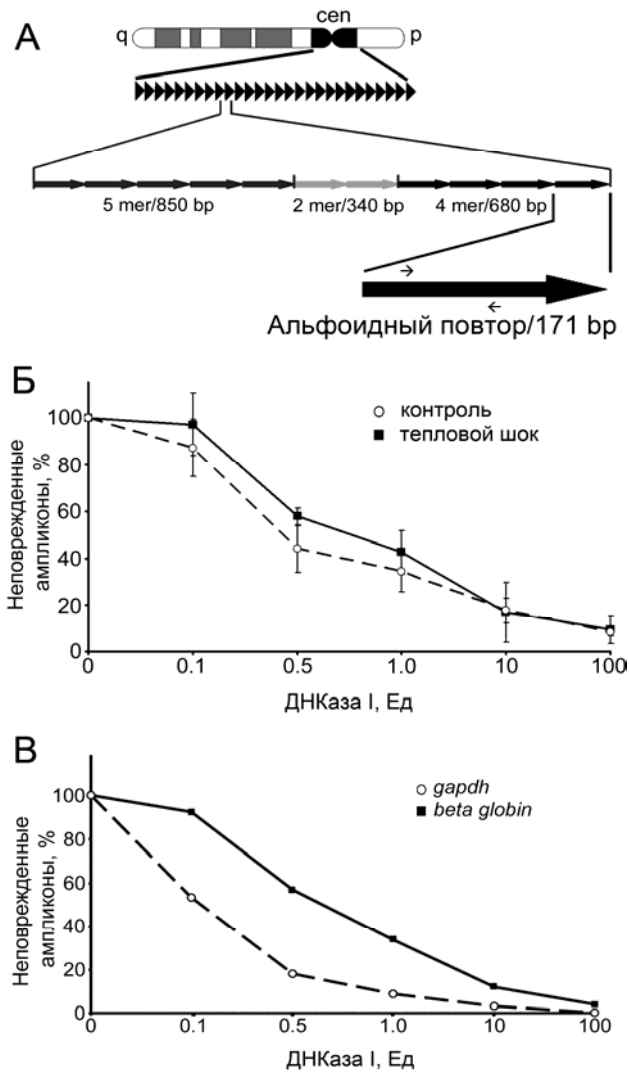


Рис. 3. Чувствительность центромерных повторов к ДНКазе I не изменяется при тепловом стрессе.

(А) Схема организации центромерных альфа-сателлитных повторов. Позиции праймеров, использованных для количественной ПЦР, показаны маленькими стрелками. Большая чёрная стрелка обозначает один мономер альфоидного сателлита.

(Б) Динамика расщепления сателлитной ДНК с помощью ДНКазы I в контрольных (пунктирная линия) и подвергнутых тепловому шоку (сплошная линия) при 45,5°C клетках mcf-7. 50 нг геномной ДНК, экстрагированной из ядер, было использовано в реакции расщепления с увеличивающимися концентрациями ДНКазы I. ДНКазная чувствительность представлена как процент нерасщеплённой матрицы, рассчитанный с помощью ПЦР в реальном времени.

(В) Чувствительность к ДНКазе I гена «домашнего хозяйства» *gapdh* и тканеспецифичного гена *beta globin* в клетках mcf-7.

подход основывается на допущении, что при обработке ядер увеличивающимися концентрациями ДНКазы I, скорость деградации тестируемых ампликонов будет обратно зависима от степени компактизации ДНК.

Результаты предыдущих исследований демонстрируют, что с использованием этого подхода можно дифференцировать активно транскрибируемые и репрессированные гены. Более того, мы применяли эту технику на клетках mcf-7, используя в качестве геномной модели β -глобин, как неактивный в этой клеточной линии ген, и *GAPDH*, как активный ген «домашнего хозяйства». Мы обнаружили ожидаемую разницу в чувствительности этих генов к ДНКазе I (Рис. 3В). Для оценки чувствительности центромерных регионов к ДНКазе I были тестированы ампликоны внутри D1Z7-повтора.

Центромерный гетерохроматин всех хромосом человека состоит из тандемно-повторяющихся последовательностей так называемой альфа-сателлитной ДНК, элементарной единицей которой является мономер длиной 171 н.п. (Рис. 3А). Используемый нами альфоидный повтор D1Z7, присутствует в центромерных областях нескольких хромосом, включая хромосомы 1, 5 и 19. Мы сравнили чувствительность к ДНКазе I этого ампликона в контрольных и

подвергнутых гипертермии клетках. Представленные на рисунке 3Б результаты ясно демонстрируют, что уровень чувствительности к ДНКазе I тестируемого ампликона не изменяется в условиях теплового шока. Таким образом, можно утверждать, что диссоциация белка HP1 α из центромерных областей хромосом, не приводит к их декомпактизации в условиях гипертермического стресса.

Полученные нами результаты ставят под сомнение ключевую роль белка HP1 α в поддержании компактного состояния центромерного гетерохроматина. Можно предположить, что в центромерных участках хромосом этот белок функционирует прежде всего как транскрипционный репрессор, а не как архитектурный белок гетерохроматина. Чрезвычайно интересным представляется вопрос о биологической роли делокализации HP1 α из центромер в условиях теплового шока. Одной из интригующих возможностей является то, что HP1 перераспределяется из центромерного гетерохроматина в эухроматиновые компартменты, репрессируя в них транскрипцию специфичных генов. В 2012 году, была опубликована работа, в которой демонстрируется, что белки HP1 α и HP1 β связывают промоторы некоторых ZNF-белков, блокируя таким образом их экспрессию. Другими словами, перераспределение белка HP1 α предполагает существование механизма изменения транскрипционного статуса гетеро- и эухроматиновых компартментов при стресс-реакции на тепловой шок.

2. Роль гистона γ H2AX в клеточном ответе на тепловой стресс

2.1. Тепловой шок индуцирует фосфорилирование гистона H2AX в клетках человека

Вариантный гистон H2AX составляет около 10-15% от общего пула гистона H2A. Простой подсчет показывает, что этот вариантный гистон должен присутствовать примерно в каждой пятой нуклеосоме. Ранее было показано, что индукция двунитевых разрывов в ДНК стимулирует фосфорилирование H2AX в протяженном геномном домене вокруг точки разрыва. В последние годы было показано, что домены (фокусы) фосфорилированного H2AX (γ H2AX) могут формироваться в клетках, подвергнутых тепловому шоку. При этом оставался неясным вопрос о том, связано ли это и в данном случае с внесением двунитевых разрывов в ДНК. Мы проверили, насколько общим для различных клеток является феномен температурной индукции фокусов γ H2AX. Для этого

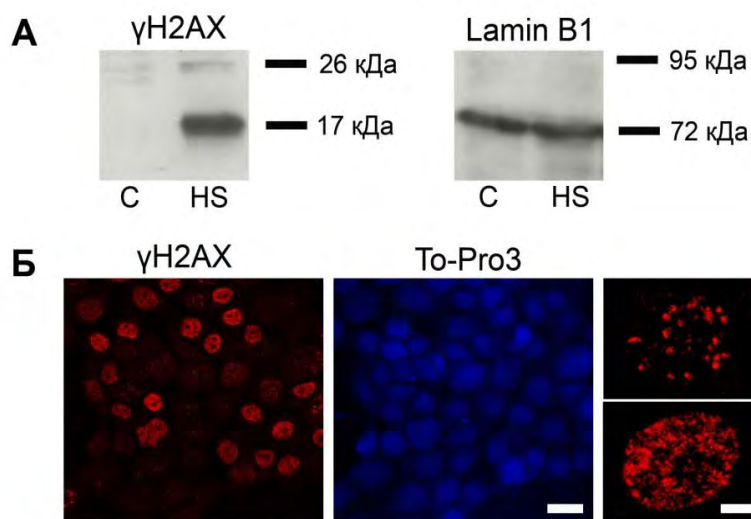


Рис. 4. Тепловой шок индуцирует фосфорилирование H2AX по серину 139 в клетках mcf-7.

(А) Вестерн-блот анализ γ H2AX в контрольных (С) и подвергнутых тепловому шоку при $45,5^{\circ}\text{C}$ (HS) клетках mcf-7. Ламин В1 использовали в качестве внутреннего контроля.

(Б) Иммунофлуоресцентный анализ γ H2AX в подвергнутых тепловому шоку ($45,5^{\circ}\text{C}$) клетках mcf-7. Фотографии получены с помощью сканирующего конфокального микроскопа Leica. Масштабная полоса – 20 мкм. В правой части рисунка представлены увеличенные клетки с двумя профилями распределения γ H2AX (масштабная полоса – 5 мкм). ДНК окрашена с помощью TO-PRO 3 иодида.

4Б). Дополнительно, с помощью вестерн-блот анализа мы показали, что фосфорилированная форма гистона H2AX обнаруживается в ядерных экстрактах, полученных из клеток, подвергнутых воздействию гипертермии (Рис. 4А). Таким образом, наши данные дают повод предполагать, что индуцируемое тепловым стрессом фосфорилирование H2AX является общим феноменом для различных клеток человека.

2.2. Профиль распределения γ H2AX, индуцированного тепловым шоком, зависит от стадии клеточного цикла

Наше внимание привлёк тот факт, что в несинхронизированной культуре клеток mcf-7, подвергнутой тепловому стрессу, можно было чётко выделить две группы клеток, отличающиеся по профилю распределения γ H2AX в ядрах. Первую группу составляют клетки, имеющие небольшое число (от 5 до 30) крупных фокусов γ H2AX, а вторую - клетки с большим количеством (более 100) мелких фокусов (Рис. 4Б и Рис. 5А). В

мы использовали три типа клеток: mcf-7, Jurkat и первичную культуру фибробластов человека. Клетки подвергали воздействию теплового шока в температурном диапазоне от 42 до $45,5^{\circ}\text{C}$ и иммуноокрашивали с помощью антител против γ H2AX.

Полученные результаты, свидетельствуют о том, что тепловой шок в температурном диапазоне от 42 до $45,5^{\circ}\text{C}$ приводит к формированию фокусов γ H2AX, которые отсутствуют в контрольных клетках (рис.

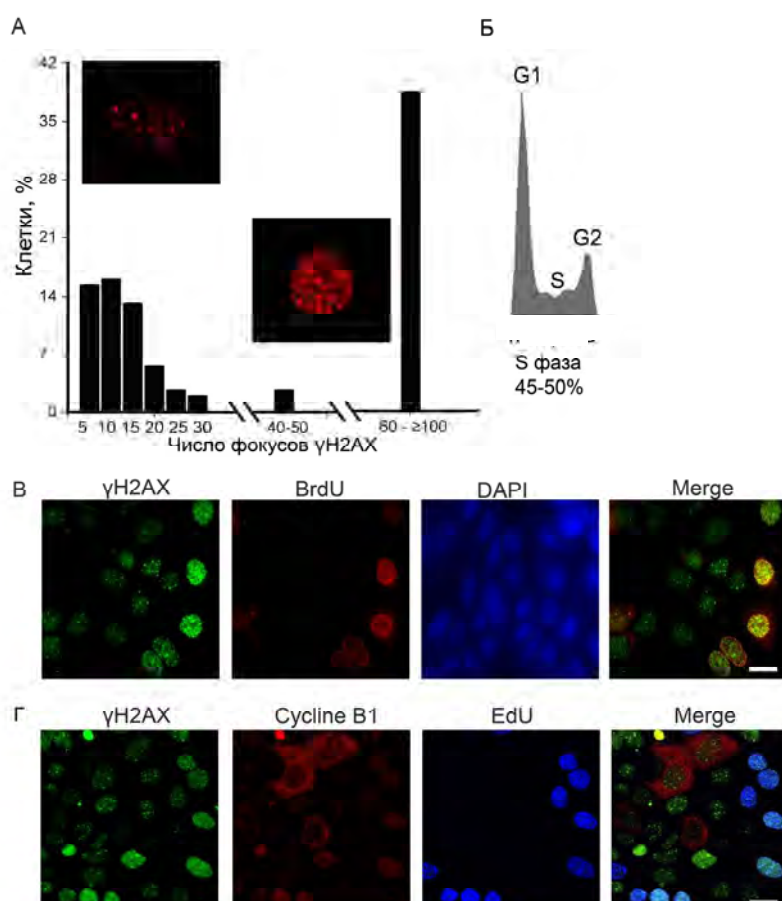


Рис. 5. Профиль распределения γ H2AX при тепловом шоке зависит от стадии клеточного цикла.

(А) Клетки mcf-7 подвергнутые тепловому шоку (45,5°C) содержат разное число фокусов γ H2AX. Проанализировано более 200 клеток, иммуноокрашенных антителами против γ H2AX.

(Б) Распределение по фазам клеточного цикла для подвергнутых тепловому шоку (45,5°C) клеток mcf-7, полученное с помощью метода проточной цитометрии. Для анализа использовали популяцию несинхронизированных клеток.

(В) Клетки mcf-7 инкубировали с BrdU (100 мкМ, 20 мин), подвергали тепловому шоку при 45,5°C и иммуноокрашивали антителами против BrdU и γ H2AX. ДНК окрашивали с помощью DAPI. Масштабная полоса – 20 мкм.

(Г) Клетки mcf-7 инкубировали с EdU (10 мкМ, 30 мин), подвергали тепловому шоку при 45,5°C и иммуноокрашивали антителами против циклина B1 и γ H2AX. EdU выявляли с помощью набора реагентов Click-iT EdU Imaging kit. ДНК окрашивали с помощью DAPI. Масштабная полоса – 20 мкм.

всех остальных с помощью непрямо́й иммунофлуоресцентной окраски антителами против BrdU. Для этого культуру клеток mcf-7 инкубировали в среде, содержащей бромодезоксиуридин, после чего подвергали гипертермии и иммуноокрашивали антителами против γ H2AX и BrdU. Результаты, представленные на рисунке 5В, демонстрируют, что клетки с большим количеством мелких фокусов γ H2AX являются

популяции присутствовало примерно равное количество клеток обеих групп. В этой связи мы обратили внимание на то, что около половины всех клеток находится в фазе S клеточного цикла, как было определено с помощью проточной цитометрии (Рис. 5Б).

Это позволило предположить, что выявленные нами группы клеток, характеризующиеся разным распределением возникающих в ответ на тепловой стресс фокусов γ H2AX, соответствуют клеткам, находящимся в S-фазе и вне S-фазы. Для проверки этого предположения мы провели эксперимент с включением аналога нуклеотида - бромодезоксиуридина (BrdU) в ДНК. Так как BrdU встраивается в ДНК в процессе репликации, S-фазные клетки можно дифференцировать от

исключительно S-фазными (включают BrdU). Более того, в этих клетках γ H2AX практически полностью колокализуется с сайтами включения аналога нуклеотида (Рис. 8А). И наоборот, клетки, формирующие при тепловом шоке небольшое количество крупных фокусов γ H2AX, не включают BrdU, т.е. относятся либо к G1, либо к G2, либо к обоим из этих фаз. Чтобы установить, какая из этих возможностей реализуется мы проводили иммуноокрашивание клеток антителами против γ H2AX, циклина В1 (маркера G2-фазы) и EdU, другого аналога тимидина, которым маркировали S-фазные клетки перед тепловым шоком. Было продемонстрировано, что присутствие небольшого числа крупных фокусов γ H2AX характерно как для G1- (EdU-отрицательные, циклин-отрицательные), так и для G2- (EdU-отрицательные, циклин-положительные) клеток (Рис. 5Г).

2.3. Тепловой шок индуцирует формирование двуцепочечных разрывов ДНК в G1- и G2-клетках

Как отмечалось выше, γ H2AX является маркером двуцепочечных разрывов (ДЦР) ДНК. Представлялось интересным выяснить, связано ли фосфорилирование H2AX в условиях теплового стресса с появлением в этих условиях ДЦР. Для решения данной задачи мы использовали так называемый «метод ДНК-комет», также известный как электрофорез одиночных клеток (SCGE). Мы использовали нейтральную версию этой техники, позволяющую детектировать в отдельных клетках только двуцепочечные разрывы ДНК. На наш взгляд, наиболее показательным из измеряемых параметров комет является «момент хвоста» (tail moment, ТМ), равный произведению длины хвоста и процента ДНК в нем. Этот критерий мы использовали для оценки степени повреждения ДНК. В качестве положительного контроля мы использовали клетки mcf-7, обработанные этопозидом - ингибитором ДНК-топоизомеразы II, способным индуцировать ДЦР. Тепловому шоку клетки подвергали при 45,5°C в течение 30 мин. Несмотря на масштабное фосфорилирование H2AX в таких температурных условиях, мы обнаружили очень незначительное увеличение величины ТМ для общей популяции клеток (Рис. 6А). Принимая во внимание тот факт, что тепловой шок индуцирует два типа фокусов γ H2AX в зависимости от стадии клеточного цикла, мы решили проанализировать количество ДЦР после гипертермии отдельно в S-фазных и не-S-фазных клетках. Для этого мы использовали иммунофлуоресцентную версию нейтрального SCGE, позволяющую дискриминировать кометы, полученные из S-фазных клеток, по включению BrdU в их ДНК (Рис. 6Б). Результаты эксперимента с использованием этого подхода демонстрируют,

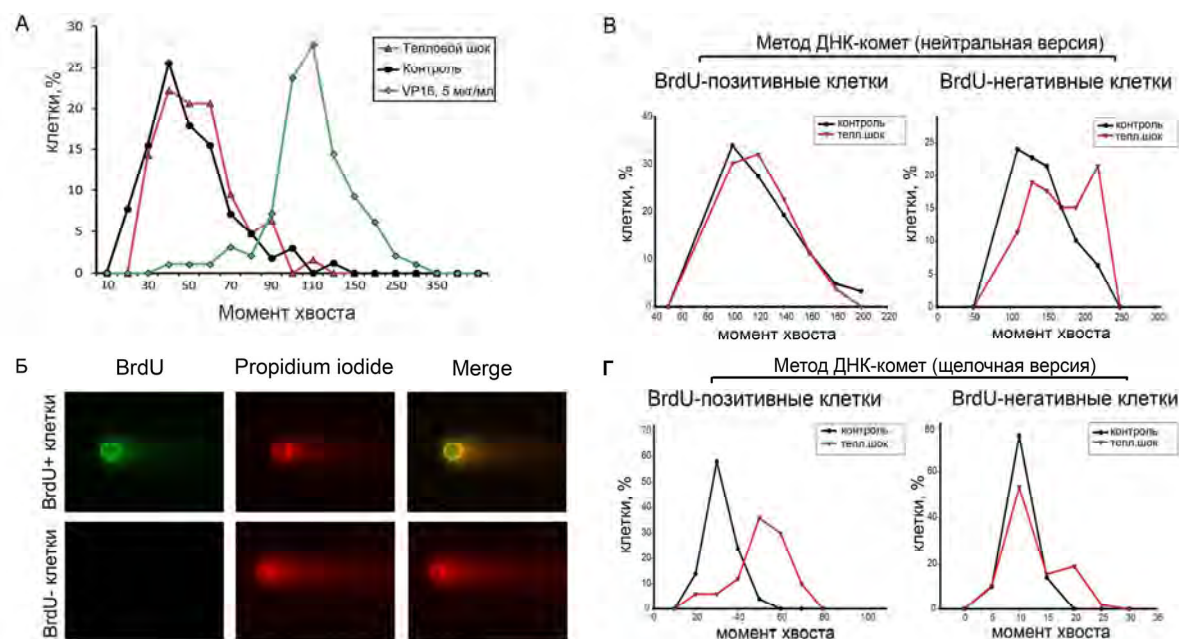


Рис. 6. Анализ индуцированного тепловым шоком повреждения ДНК с помощью метода SCGE («ДНК-комет»)

(А) Контрольные, подвергнутые тепловому шоку (45,5°C) и обработанные этопозидом (5 мкг/мл, 30 мин) клетки *mcf-7* анализировали с помощью нейтральной версии SCGE. На рисунке представлено распределение клеток по величине «момента хвоста» (Tail moment). По оси «Y» показан процент клеток с определённым значением «момента хвоста», по оси «X» указаны величины «момента хвоста».

(Б) Репрезентативные фотографии BrdU-позитивных и BrdU-негативных комет полученных с помощью нейтральной версии SCGE из клеток *mcf-7* подвергнутых тепловому шоку.

(В) и (Г) Асинхронно делящиеся клетки *mcf-7* инкубировали с BrdU (100 мкМ, 60 мин), подвергали тепловому шоку (45,5°C 30 мин) и использовали для иммунофлуоресцентной версии нейтрального или щелочного SCGE. BrdU-позитивные и -негативные клетки анализировали отдельно.

что тепловой шок индуцирует ДЦР только в G1- и G2-клетках (Рис. 6В). Удивительно, что величина ТМ для S-фазных клеток, несмотря на значительно большее количество γ H2AX в этих клетках, остается неизменной по сравнению с контролем (Рис. 6В). В то же время в S-фазных клетках после теплового шока обнаруживается большое количество одностранных разрывов. Мы продемонстрировали это с помощью иммунофлуоресцентной версии щелочного SCGE, которая позволяет детектировать как дву-, так и одноцепочечные разрывы ДНК (Рис. 6Г).

Полученные с помощью метода «ДНК-комет» результаты были воспроизведены с помощью техник мечения концов ДНК *in situ* (в пермеабелизированных клетках). Для этого мы использовали два различных фермента: бактериальную ДНК-полимеразу I (Pol I), и терминальную дезоксирибонуклеотидилтрансферазу (TdT). Pol I может распознавать и достраивать только одноцепочечные разрывы, используя для этого неповрежденную цепь ДНК в качестве матрицы, в то время как TdT, для работы которой матрица не требуется, просто добавляет нуклеотиды к дву-, и одноцепочечным концам ДНК. Результаты этой серии экспериментов представлены на рисунке 7.

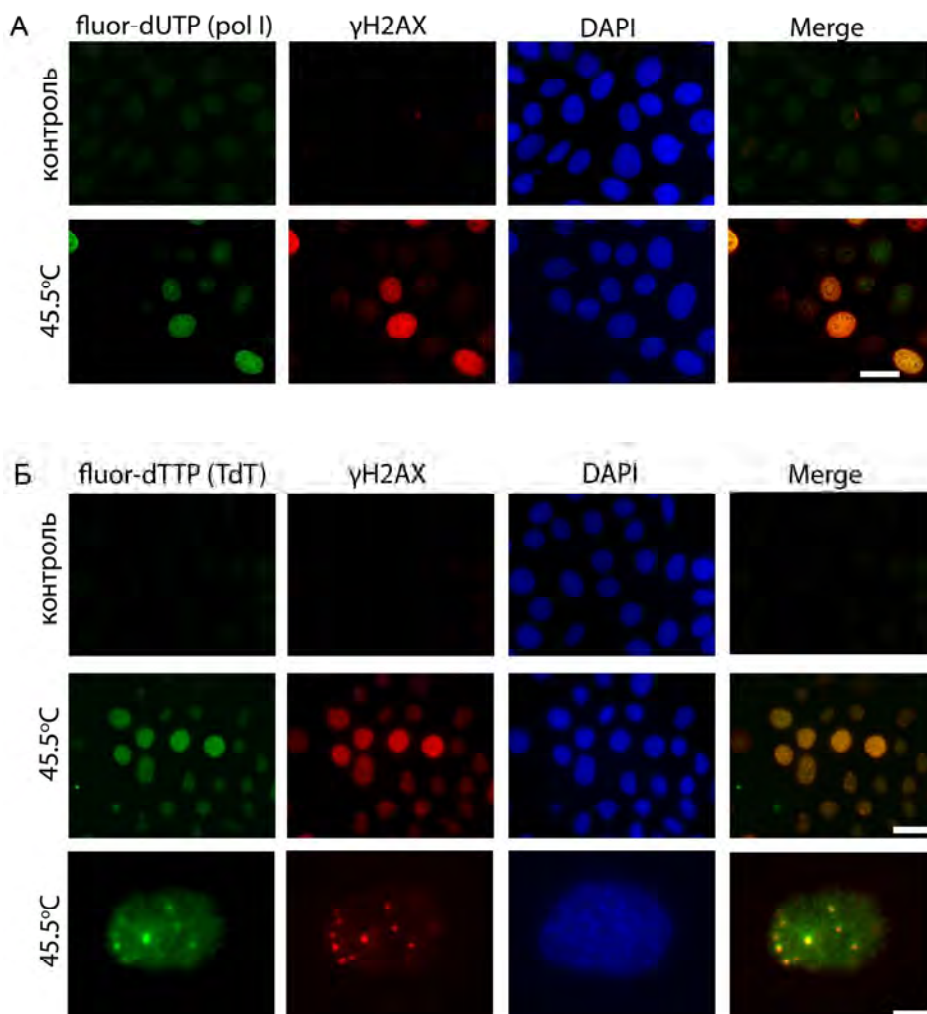


Рис. 7. Анализ индуцированного гипертермией повреждения ДНК с помощью мечения ДНК *in situ*. Контрольные и подвергнутые тепловому шоку (45,5°C) клетки *tcf-7* фиксировали, пермеабелизировали и проводили ограниченный синтез ДНК с помощью ДНК полимеразы I *E. coli* (А) и терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазы (Б). После реакции мечения, клетки иммуноокрашивали антителами против γH2AX. ДНК окрашивали с помощью DAPI. Масштабная полоса - 20 мкм и 5 мкм для нижней секции.

маркируются фокусами γH2AX, которые в дальнейшем мы будем называть D-фокусами (от англ. **D**amage-associated foci).

2.4. Тепловой шок оказывает пропорциональный своей силе эффект на репликацию ДНК

Наблюдая большое количество одноцепочечных разрывов ДНК в S-фазных клетках после теплового шока (Рис. 6Г, Рис. 7А,Б), мы предположили, что этот эффект может указывать на дестабилизацию репликации ДНК.

Оба фермента включают флуоресцентно-меченные нуклеотиды (fluor-dUTP) в клетках с S-фазным профилем распределения γH2AX (Рис. 7А,Б), но в отличие от Pol I, TdT также хорошо включает fluor-dUTP в ядрах не-S-фазных клеток (Рис. 7Б). Важно, что TdT включает нуклеотиды точно в сайтах фосфорилирования H2AX (Рис. 7Б). Суммируя, можно заключить, что тепловой шок индуцирует двуцепочечные разрывы ДНК только в клетках, находящихся в G1- и G2-стадиях клеточного цикла. Эти повреждения

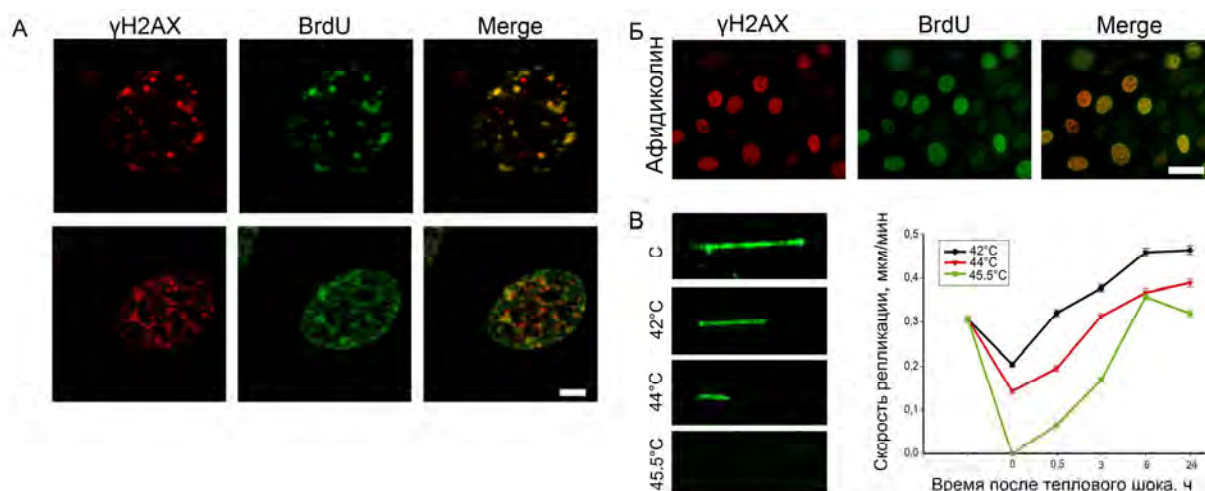


Рис. 8. Тепловой шок оказывает пропорциональный своей силе эффект на репликацию.

(А) Клетки mcf-7 инкубировали с BrdU (100 мкМ 20 мин), подвергали тепловому стрессу (30 мин, 45,5°C) и иммуноокрашивали антителами против BrdU и γ H2AX. Масштабная полоса – 5 мкм.

(Б) Клетки mcf-7 инкубировали с BrdU (100 мкМ 20 мин), обрабатывали афидиколином (6 мМ, 60 мин) и иммуноокрашивали антителами против BrdU и γ H2AX. Масштабная полоса – 20 мкм.

(В) Определение скорости репликации в условиях теплового шока с помощью метода ДНК-нитей (молекулярного комбинга). Клетки mcf-7 подвергали тепловому стрессу (30 мин, 42, 44 и 45,5°C) и затем инкубировали в нормальных температурных условиях в течение 0, 0,5, 3, 6 и 24 часов. После указанных временных интервалов клетки инкубировали с BrdU (100 мкМ 20 мин) и использовали для молекулярного комбинга. Треки включения BrdU выявляли иммуноокрашиванием. В левой части рисунка, представлены репрезентативные фотографии треков BrdU. Справа показана зависимость скорости репликации от времени её восстановления после теплового шока. По оси «X» указаны временные промежутки после теплового шока, по оси «Y» - рассчитанная скорость движения репликативных вилок, выраженная в мкм/мин.

Как уже отмечалось, в S-фазных клетках фокусы γ H2AX колокализуются с кластерами репликации (Рис. 8А). Это особенно наглядно продемонстрировано в клетках с небольшим количеством сайтов репликации (Рис. 8А). Фокусы γ H2AX, маркирующие такие сайты при тепловом шоке, в дальнейшем мы будем обозначать как R-фокусы (от англ. **R**eplication-associated foci). Известно, что фосфорилирование H2AX может быть индуцировано агентами, ингибирующими репликацию, например, афидиколином или гидроксимочевинной (Рис. 8Б). Можно было предположить, что тепловой шок приводит к аресту активных репликативных вилок, что, по тем или иным причинам, индуцирует фосфорилирование H2AX. Для проверки справедливости этого предположения нужно было ответить на вопрос, сохраняют ли клетки после теплового шока различной силы (42, 44 и 45,5°C) способность включать BrdU в фокусы репликации. Результаты проведенных нами экспериментов продемонстрировали, что после теплового шока при 45,5°C репликация в клетках полностью останавливается, чего не происходит при меньших значениях температур (42 и 44°C). Для детального изучения этого феномена, мы применили метод ДНК-нитей, известного также как метод «молекулярного комбинга». Эта процедура заключается в «растягивании» на микроскопическом стекле отдельных

нитей депротенизированной ДНК, и визуализации на них треков включения аналогов нуклеотидов с помощью непрямой иммунофлуоресценции. Длина таких треков является адекватным критерием для оценки скорости репликации. Клетки линии mcf-7 подвергали тепловому шоку при 42, 44 и 45,5°C. Сразу после воздействия или после дополнительного культивирования в нормальных условиях в течение различных временных интервалов (0,5, 3, 6, 24 часа) клетки инкубировали с BrdU в течение 15 мин и затем использовали для молекулярного комбинга. Для каждой из вышеуказанных временных точек измеряли длины не менее 150 треков включения BrdU и вычисляли среднее значение скорости репликации (Рис. 8В). Полученные результаты демонстрируют, что тепловой шок оказывает зависящий от температуры эффект на репликацию (Рис. 8В): при 45,5°C происходит полный арест репликативных вилок, в то время как при 42 и 44°C скорость репликации замедляется пропорционально температуре (Рис. 8В). Возобновление (restart) репликации для всех температурных точек начинается после 30 минут культивирования клеток в нормальных условиях, причем скорость репликации достигает контрольного уровня приблизительно через 6 часов. Интересно, что после шестичасового периода восстановления, скорость движения репликативных вилок начинает превышать контрольный уровень (Рис. 8В), что может являться компенсаторным механизмом обеспечивающим своевременное завершение репликации.

2.5. Молекулы H2AX, формирующие D- и R-фокусы, фосфорилируются с помощью разных киназ

Известно, что за фосфорилирование H2AX отвечают фосфатидилинозитол-3-киназа-подобные киназы – ATM, ATR и DNA-ПК. Целью следующего цикла экспериментов было выяснение вопроса о том, какие именно киназы осуществляют фосфорилирование H2AX в D- и R-фокусах при тепловом шоке. Для проверки этого предположения мы провели ингибиторный анализ с использованием кофеина, специфичного ингибитора киназ ATM и ATR, и NU7026, ингибитора ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-ПК). Клетки mcf-7 инкубировали в течение 3-6 часов при 37°C в среде с ингибиторами, после чего S-фазные клетки метили включением BrdU. Тепловой шок осуществляли при 45,5°C, и затем проводили двойное иммуноцитохимическое окрашивание антителами против BrdU и γ H2AX. Результаты экспериментов представлены на рисунке 9. В клетках, обработанных кофеином, после теплового шока формируются

только R-фокусы, в то время как в клетках, обработанных NU7026, γ H2AX образует только фокусы типа «D». На основании данных результатов можно заключить, что при тепловом стрессе фосфорилирование H2AX в окрестностях сайтов двуцепочечных разрывов ДНК (D-фокусы) осуществляется ATM, либо ATR. В R-фокусах, ассоциированных с арестом репликативных вилок, H2AX фосфорилируется DNA-PK. Этот вывод был дополнительно подтвержден в экспериментах с подавлением экспрессии генов ATM, ATR и DNA-PKcs с помощью РНК-интерференции (Рис. 10). Более того, данный подход позволил дифференцировать роли ATM и ATR в формировании D-фокусов γ H2AX. Мы продемонстрировали, что в этих фокусах фосфорилирование H2AX осуществляет ATM, но не ATR (Рис. 10).

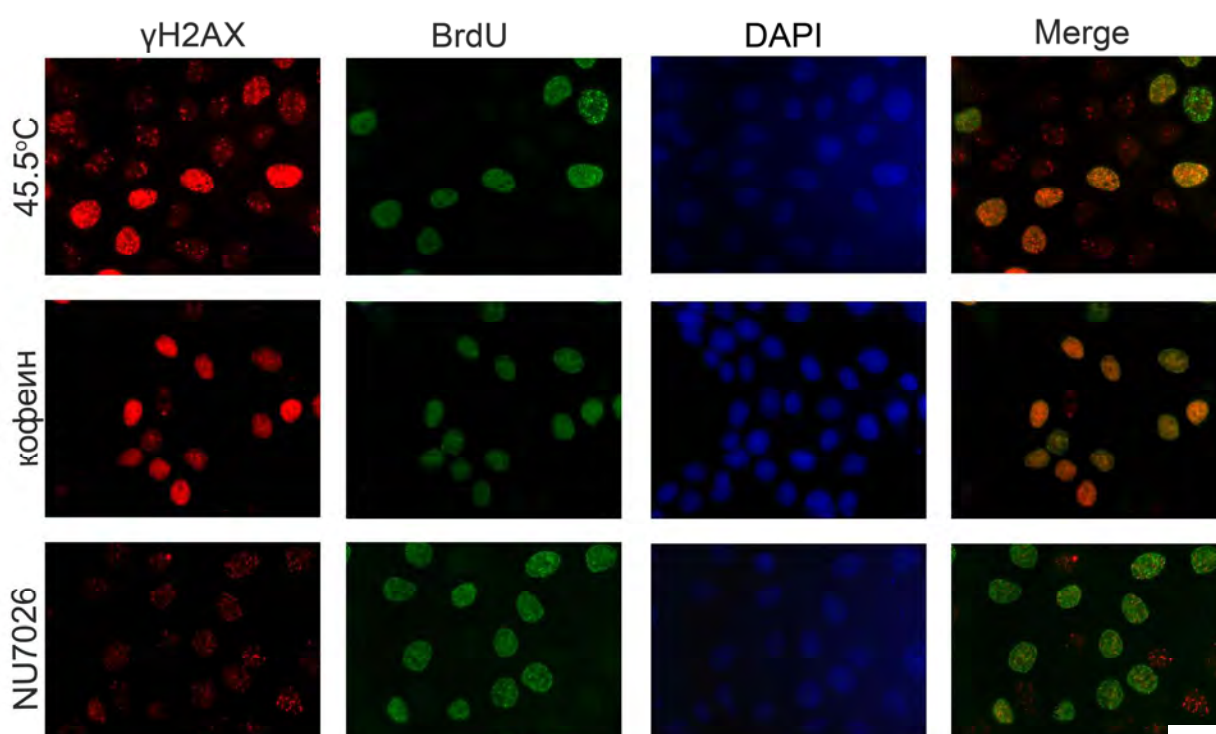


Рис. 9. Характеристика фокусов γ H2AX индуцированных тепловым шоком.

Клетки mcf-7 обрабатывали ингибитором ATM/ATR (кофеином; 10 мМ 3 часа) или ингибитором DNA-PK (NU7026; 10 мкМ, 6 часов). Затем клетки инкубировали с BrdU (100 мкМ, 20 мин), подвергали тепловому шоку при 45,5°C и иммуноокрашивали антителами против BrdU и γ H2AX. Масштабная полоса – 20 мкм.

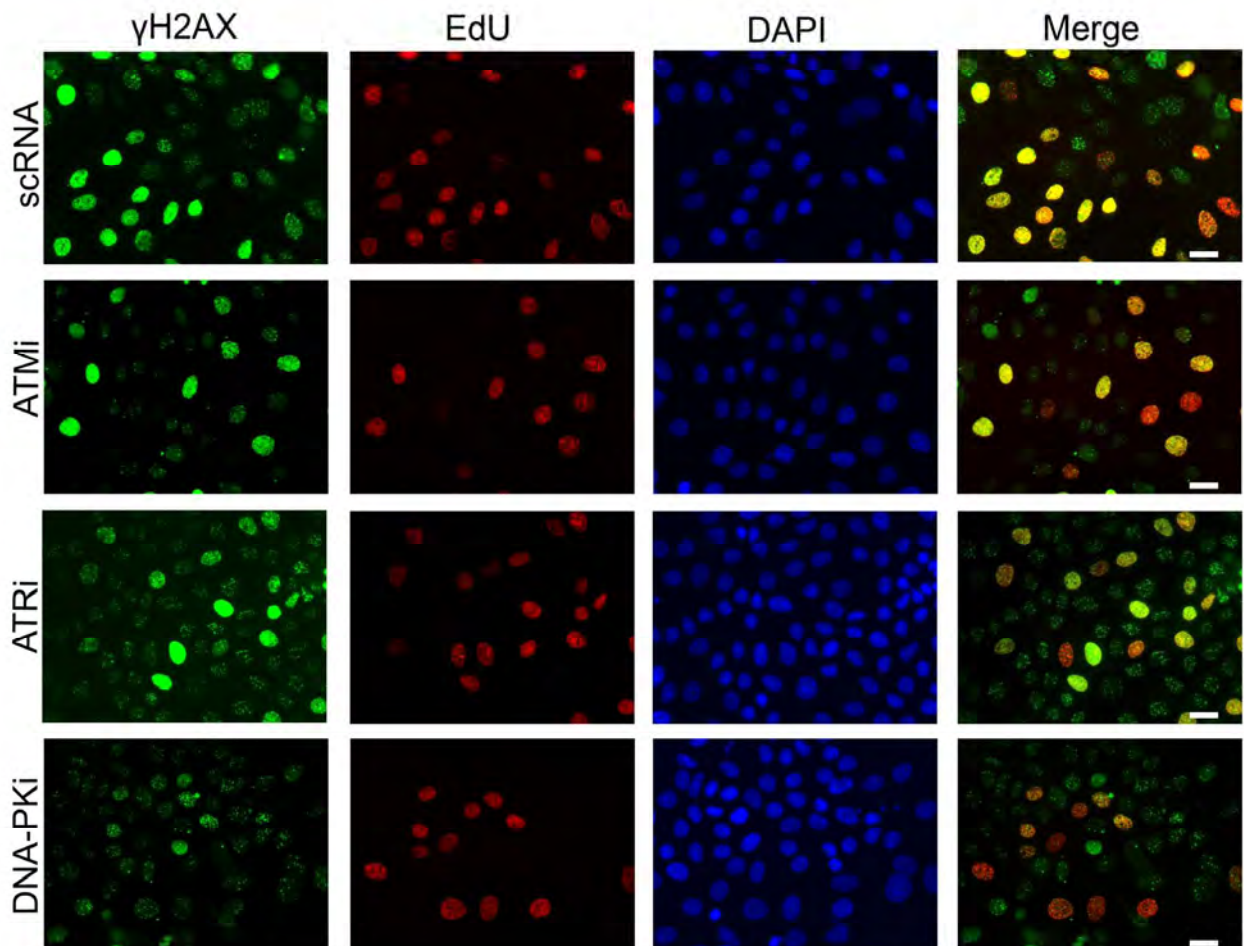


Рис. 10. Фосфорилирование H2AX в сайтах двуцепочечных разрывов ДНК осуществляет ATM. Клетки *msf-7* были трансфицированы наборами миРНК для подавления экспрессии ATM, ATR и DNA-ПКcs. Спустя 48 часов клетки инкубировали с EdU (10 μ M, 30 мин), подвергали тепловому шоку при 45,5°C и иммуноокрашивали антителами против γ H2AX. EdU выявляли с помощью набора реагентов Click-iT EdU Imaging kit. ДНК окрашивали с помощью DAPI. Масштабная полоса – 15 мкм.

2.6. Фосфорилирование H2AX предотвращает коллапс репликативных вилок

Заключительный цикл экспериментов был проведен с целью выяснения вопроса о функциональном значении фосфорилирования H2AX в S-фазных клетках при тепловом стрессе. Мы проанализировали эффект теплового шока на репликацию ДНК в условиях ингибирования DNA-ПК, при котором фосфорилирование H2AX в R-фокусах не происходит. Для этого клетки *msf-7* были обработаны ингибитором NU7026 и подвергнуты тепловому шоку при 42, 44 и 45,5°C. Затем клетки инкубировали с бромодезоксиуридином, после чего анализировали скорость движения репликативных вилок с использованием молекулярного комбинга. Из результатов, представленных на рисунке 11А, следует, что в условиях ингибирования DNA-ПК скорость репликации падает приблизительно в 2 раза уже при 42°C, в то время как при 44°C происходит полный

арест репликации. Недавние исследования показали, что DNA-ПК критически необходима для предотвращения ДЦР в условиях репликативного стресса, индуцированного афидиколином. Поэтому оправдано было предположить, что при отсутствии γ H2AX, в сайтах остановленных репликативных вилок могут возникать двуцепочечные разрывы ДНК. Для проверки этого предположения мы использовали иммунофлуоресцентную версию нейтрального SCGE на клетках, подвергнутых тепловому шоку в условиях ингибирования DNA-ПК. Величина «момента хвоста» для таких клеток сильно возрастала (Рис. 11Б). Этот результат позволил нам заключить, что фосфорилирование H2AX в сайтах репликации предотвращает формирование в них ДЦР, и тем самым «спасает» вилки репликации от полного коллапса.

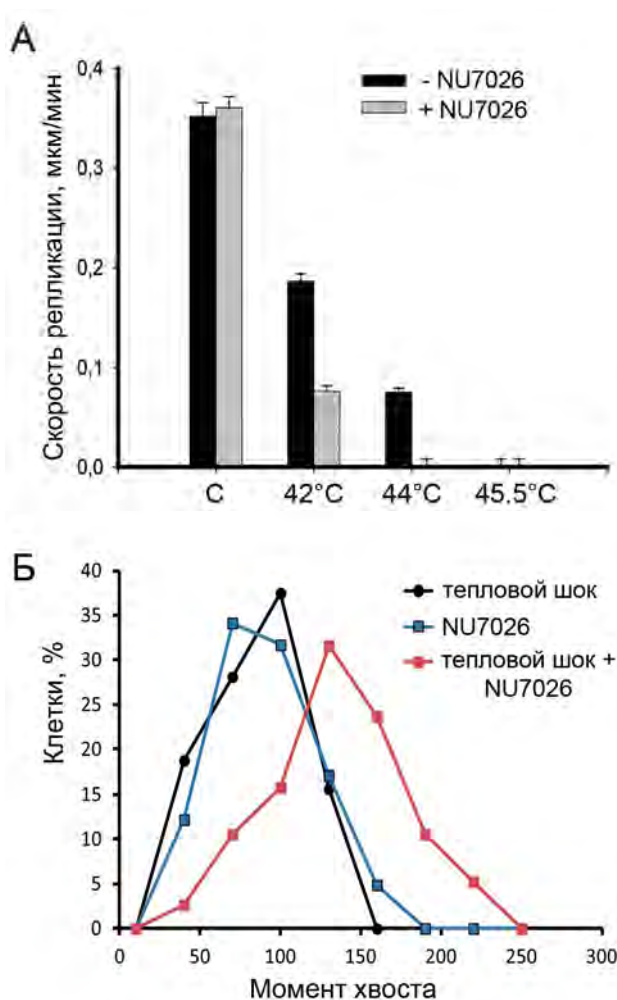


Рис. 11. Фосфорилирование H2AX предотвращает коллапс репликативных вилок.

(А) Определение скорости репликации при тепловом шоке в условиях ингибирования DNA-ПК. Клетки mcf-7 обрабатывали ингибитором DNA-ПК (NU7026; 10 мкМ, 6 часов). Затем клетки подвергали тепловому шоку при различных температурах (42, 44 and 45.5°C), после чего инкубировали с BrdU (100 мкМ, 20 мин) и анализировали скорость движения репликативных вилок с помощью молекулярного комбинга. Треки включения BrdU выявляли иммуноокрашиванием. Для каждой точки измеряли длину не менее 80 – 100 треков и рассчитывали среднее значение скорости движения репликативных вилок.

(Б) Анализ повреждения ДНК при тепловом шоке в условиях ингибирования DNA-ПК. Клетки mcf-7 обрабатывали ингибитором DNA-ПК (NU7026; 10 мкМ, 6 часов), после чего инкубировали с BrdU (100 мкМ, 20 мин). Затем клетки подвергали тепловому шоку при 45,5°C и анализировали с помощью иммунофлуоресцентной версии нейтрального SCGE. Анализировали только BrdU-позитивные клетки. На рисунке представлено распределение клеток по величине «момента хвоста». По оси «Y» показан процент клеток с определённым значением «момента хвоста», по оси «X» указаны величины «момента хвоста».

С момента открытия γ H2AX считается универсальным маркером двуцепочечных разрывов ДНК, служащим для привлечения и сборки факторов репарации в сайте повреждения. Однако результаты, полученные за последние несколько лет независимыми исследовательскими группами, заставляют переосмыслить эту аксиому. В частности было показано, что фосфорилирование H2AX происходит независимо от образования ДЦР в условиях гипоксии, теплового шока или же при репликативном стрессе. Тем не менее, представление об индукции γ H2AX безотносительно ДЦР, не является на сегодняшний день общепринятым. Мы продемонстрировали, что при тепловом шоке в одной клеточной популяции формируются два типа фокусов γ H2AX: первые являются ассоциированными с двуцепочечными разрывами ДНК, вторые не имеют к ДЦР никакого отношения. Более того, H2AX в разных типах фокусов фосфорилируется с помощью разных PIKK-киназ (ATM или DNA-PK). Таким образом, между ферментами существует своеобразное разделение обязанностей по фосфорилированию H2AX в зависимости от ситуации. В случае теплового шока таких ситуации две. Первая - это образование двуцепочечных разрывов ДНК, которые маркируются γ H2AX при помощи ATM-зависимого механизма. Вторая – это репликативный арест, индуцирующий DNA-PK-зависимое фосфорилирование H2AX. В первом случае γ H2AX выступает в роли классического сенсора повреждений ДНК. В случае же репликативного ареста фосфорилирование H2AX необходимо для защиты вилок репликации и предотвращения их коллапса. Таким образом, мы демонстрируем двойственную роль γ H2AX в условиях теплового стресса. Не подлежит сомнению, что при определённых условиях фосфорилированный H2AX нельзя рассматривать как универсальный маркёр двуцепочечных разрывов ДНК.

ВЫВОДЫ

1. Продемонстрировано, что в условиях теплового шока белок HP1 α диссоциирует из центромерного гетерохроматина. Диссоциация HP1 α не влияет на структурную целостность центромерного гетерохроматина.
2. Тепловой шок индуцирует образование двуцепочечных разрывов ДНК в G1- и G2-фазах клеточного цикла. Эти разрывы маркируются с помощью АТМ-зависимого фосфорилирования гистона H2AX.
3. В зависимости от температуры тепловой шок приводит к торможению или полному аресту движения вилок репликации, что стимулирует DNA-РК-зависимое фосфорилирование H2AX в сайтах репликации.
4. Впервые продемонстрировано, что формирование доменов γ H2AX в сайтах репликации предотвращает репликативный арест при умеренной гипертермии (42, 44°C) и образование двуцепочечных разрывов в S-фазе клеточного цикла при остром тепловом шоке (45,5°C).

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Velichko A.K., Kantidze O.L., Razin S.V. 2011. HP1 is not necessary for the structural maintenance of centromeric heterochromatin. *Epigenetics* 6, 380-387.
2. Velichko A.K., Petrova N.V., Kantidze O.L., Razin S.V. 2012. Dual effect of heat shock on DNA replication and genome integrity. *Molecular Biology of the Cell* 23, 3450-3460.

Тезисы конференций:

3. Величко А.К., Кантидзе О.Л., Разин С.В. Диссоциация белка HP1alpha из центромерных областей не приводит к их декомпактизации. 15 международная Пушкинская школа-конференция молодых учёных. 2011. Пущино, Россия, с. 66-67.
4. Velichko A.K., Kantidze O.L., Razin S.V. HP1alpha is not necessary for the structural maintenance of centromeric heterochromatin. 22nd Wilhelm Berhard Workshop, August 25-29, 2011, Latvia, Riga. p.118
5. Величко А.К., Петрова Н.В., Разин С.В., Кантидзе О.Л. Роль гистона γ H2AX в клеточном ответе на стресс. Международная конференция «Хромосома 2012». 2012. Новосибирск, Россия, с. 65.