

УДК 577.21

Повреждения ДНК при тепловом стрессе

О. Л. Кантидзе^{1*}, А. К. Величко¹, А. В. Лужин¹, С. В. Разин^{1,2*}¹Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*E-mail: kantidze@gmail.com; sergey.v.razin@usa.net

Поступила в редакцию 17.12.2015

Принята к печати 17.02.2016

РЕФЕРАТ Хотя механизмы клеточного ответа на тепловой стресс изучаются уже несколько десятилетий, многое остается неясным. Это связано с тем, что основное внимание было сконцентрировано на изучении белков и факторов теплового шока, их участии в регуляции транскрипции, поддержании белкового гомеостаза и т.д. В последнее время достигнут определенный прогресс в исследовании влияния теплового стресса на целостность ДНК. В обзоре охарактеризованы и обсуждены известные и потенциальные механизмы образования различных повреждений ДНК при тепловом стрессе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ДНК-топоизомеразы, повреждение ДНК, репарация ДНК, репликация ДНК, тепловой шок.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ОЦР – одноцепочечные разрывы ДНК; ДЦР – двухцепочечные разрывы ДНК; top1 – ДНК-топоизомераза I; top2 – ДНК-топоизомераза II.

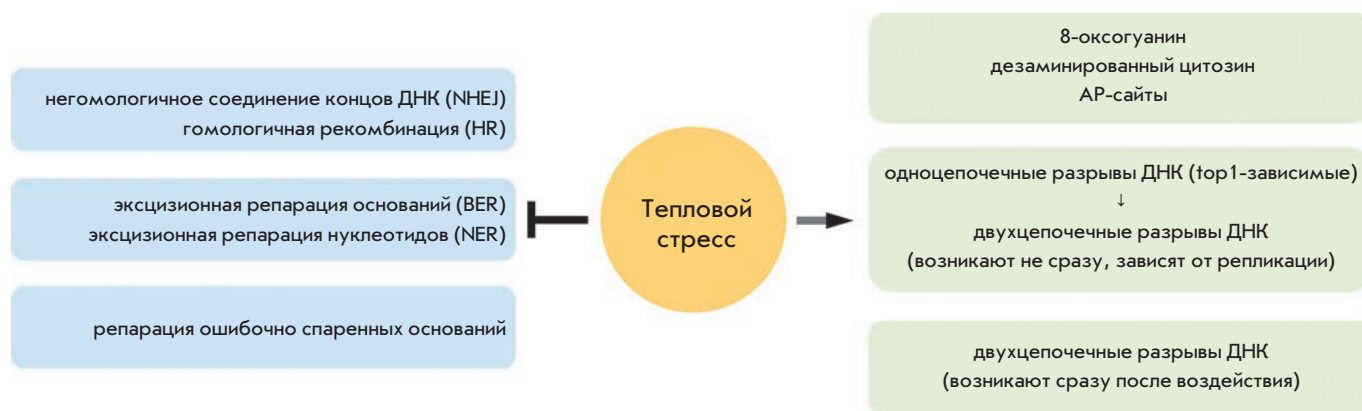
ВВЕДЕНИЕ

Тепловой стресс (тепловой шок, гипертермия) – один из наиболее хорошо изученных комплексных стресс-факторов. В реакции клетки на тепловой стресс участвует большинство субклеточных компартментов и метаболических процессов [1–3]. Давно известно, что клетки, подвергнутые тепловому стрессу, обладают повышенной чувствительностью к агентам, индуцирующим двухцепочечные разрывы ДНК (ДЦР), в частности к ионизирующей радиации [4, 5]. Это явление получило название «температурная радиочувствительность». Предполагалось, что причина этого эффекта заключается в способности теплового стресса ингибировать системы репарации ДНК [5]. Действительно, за несколько десятилетий обнаружено, что тепловой стресс способен ингибировать ключевые компоненты практически всех систем репарации (*рисунк*). Тепловой стресс подавляет активность систем эксцизионной репарации оснований (BER, base excision repair) [6–9] и нуклеотидов (NER, nucleotide excision repair) [10, 11]. Наиболее изучено действие теплового стресса на эксцизионную репарацию оснований: тепловой стресс может непосредственно инактивировать ДНК-полимеразу β и некоторые ДНК-гликозилазы [6, 9]. Недавно получили свидетельства того, что тепловой стресс может также ингибировать систему репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (mismatch repair) [12].

Наибольший вклад в температурную радиочувствительность вносит подавление систем репарации ДЦР, которое происходит при тепловом стрессе. Известно, что тепловой стресс подавляет работу систем как не-гомологичного соединения концов ДНК (NHEJ, non-homologous end joining), так и гомологичной рекомбинации (HR, homologous recombination). В случае NHEJ влияние теплового стресса ограничивается комплексом ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PK): показано, что гипертермия может приводить к агрегации гетеродимера Ku70/80 (и соответственно к уменьшению его ДНК-связывающей активности), подавлению экспрессии Ku80 и/или к ингибированию каталитической субъединицы DNA-PK [13–15]. Иначе обстоит дело с HR – тепловой стресс способен ингибировать эту систему репарации на нескольких ключевых этапах [16]. Вопросам влияния гипертермии на системы репарации высших эукариот посвящен недавно опубликованный обзор П.М. Кравчик и соавт. [17], к которому мы и адресуем читателей. Основным же предметом нашего мини-обзора будет вопрос о прямых повреждениях ДНК, которые способен индуцировать тепловой стресс (*рисунк*).

ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ РАЗРЫВЫ ДНК ПРИ ТЕПЛОМ СТРЕССЕ

Тепловой стресс может не только ингибировать систему репарации ДНК, но и выступать в качестве по-



Влияние теплового стресса на целостность ДНК и системы репарации (подробнее см. текст)

вреждающего ДНК агента. Так, известно, что тепловой стресс может приводить к накоплению в клетке 8-оксогуанина, дезаминированного цитозина и апуриновых участков ДНК (AP-сайтов) [18–20]. Можно представить, что подобные повреждения ДНК, как и одноцепочечные разрывы ДНК (ОЦР), пассивно накапливаются в клетке в результате ингибирования тепловым стрессом систем эксцизионной репарации. Более интересным и дискуссионным является вопрос о природе индуцированных тепловым стрессом ДЦР в ДНК, а также о возможности активной индукции тепловым стрессом ОЦР. Долгое время считалось, что тепловой стресс не индуцирует ДЦР, а приводит только к возникновению ОЦР, которые образуются в результате ингибирования гипертермией процесса репликации ДНК [21–23]. С помощью нескольких комплементарных подходов (метод ДНК-комет, флуоресцентное мечение разрывов с помощью ДНК-полимеразы I) мы показали, что тепловой стресс действительно индуцирует ОЦР в клетках, находящихся в S-фазе клеточного цикла [24]. В той же работе показано, что гипертермия способна ингибировать репликацию ДНК: в зависимости от температуры и клеточной линии тепловой стресс приводит либо к замедлению, либо к аресту репликативных вилок [24]. Стоит, однако, отметить, что возникновение ОЦР в S-фазных клетках не связано с ингибированием тепловым стрессом репликации ДНК [25]. Недавно мы идентифицировали механизм возникновения ОЦР при тепловом стрессе. Оказалось, что тепловой стресс индуцирует ОЦР путем ингибирования ДНК-топоизомеразы I (top1), фермента, релаксирующего супервитки в молекуле ДНК, внося временный ОЦР [25]. В ходе каталитического цикла top1 происходит разрезание одной цепи ДНК и образование промежуточного ковалентно связанного комплекса фермента

с ДНК. Стабилизация такого комплекса является основным механизмом генотоксического действия ядов top1 (например, камптотецина и его производных) [26, 27]. Тепловой стресс (45°C) не только способен подавлять каталитическую активность фермента, он приводит к накоплению в клетке ковалентно связанных комплексов top1 и ДНК. Можно заключить, что действие гипертермии на top1 схоже с действием ядов, с той лишь разницей, что тепловой стресс, вероятно, подавляет активность top1 на всех стадиях каталитического цикла. Хотя известно, что top1 может связываться с уже существующими в клетке ОЦР [28, 29], в случае теплового стресса именно она является причиной их возникновения. Наиболее убедительные доказательства этого получены в опытах по подавлению экспрессии фермента с помощью РНК-интерференции [25]. Показано, что в условиях сниженной экспрессии top1 не активируется программа клеточного старения, зависящего от индукции ОЦР и их конвертации в персистирующие ДЦР [25]. Это свидетельствует о том, что в клетках, не экспрессирующих top1, не происходит образования ОЦР при тепловом стрессе. Таким образом, роль top1 в образовании индуцированных тепловым стрессом ОЦР кажется нам вполне очевидной. Интересно также и то, что в клетках HeLa ковалентно связанные комплексы top1 с ДНК эффективно образуются только при температурах выше 44°C. Таким образом, при клинически релевантных температурах – 41–43°C – не должно происходить образования ОЦР. Тот факт, что возникновение ОЦР при тепловом стрессе в основном наблюдается в клетках, находящихся в S-фазе клеточного цикла, обусловлен тем, что основная функция top1 – разрешение топологических проблем, возникающих в ходе репликации ДНК. Можно утверждать, что чувствительность неделя-

щихся клеток (терминально дифференцированных, арестованных на стадии G0 и т.д.) в смысле возникновения ОЦР должна быть существенно снижена. Она не может полностью отсутствовать, так как функции top1 в клетке не ограничены процессом репликации ДНК. В связи с этим стоит отметить, что индукция тепловым стрессом ОЦР, вероятно, происходит не только в S-фазе клеточного цикла – ОЦР возникают и в G1- и G2-фазах, однако с крайне малой частотой. Согласно нашим неопубликованным данным, количество возникающих ОЦР при тепловом стрессе в разных клеточных линиях напрямую коррелирует с уровнем экспрессии top1. Суммируя полученные данные, можно утверждать, что тепловой стресс ингибирует активность top1 *in vivo* и приводит к формированию ковалентно связанных комплексов между ферментом и ДНК и, как следствие, к образованию ОЦР.

ДВУХЦЕПОЧНЫЕ РАЗРЫВЫ ДНК ПРИ ТЕПЛОМ СТРЕССЕ

Возникающие при тепловом стрессе ОЦР служат источником образования ДЦР. Такие ДЦР обладают несколькими интересными характеристиками – они специфичны для S-фазы клеточного цикла и возникают в клетке не сразу после воздействия теплового стресса, а спустя 3–6 ч [25]. Эти отсроченные ДЦР возникают вследствие столкновения репликативных вилок, возобновивших движение после индуцированного тепловым стрессом ареста, с ОЦР, которые образуются в результате ингибирования top1 [25]. Замедленная кинетика образования таких ДЦР, с одной стороны, связана с ингибированием при тепловом стрессе репликации ДНК, а с другой, с подавлением процесса транскрипции [25]. Процесс активной транскрипции необходим для детекции и последующего снятия комплекса top1, ковалентно связанного с ДНК, что приводит к демаскированию ОЦР и создает возможность для столкновения с ними репликативных вилок [30, 31]. Судя по всему, отсроченные ДЦР эффективно распознаются клеточными системами, о чем свидетельствуют АТМ/АТР-зависимое фосфорилирование H2AX (маркер ДЦР) и последующее привлечение других факторов репарации к сайту разрыва (53BP1, Rad51 и др.). Тем не менее репарация таких повреждений не происходит, что приводит к существованию в клетке постоянного сигнала о повреждении ДНК и, как следствие, к запуску программы преждевременного клеточного старения [25, 32].

Таким образом, нами впервые установлен механизм формирования отсроченных ДЦР в результате действия теплового стресса. Однако вопрос о том, может ли тепловой стресс немедленно индуциро-

вать ДЦР, долгое время оставался дискуссионным. В течение последних лет в разных лабораториях показано, что тепловой стресс может индуцировать фосфорилирование гистона H2AX [33–37], являющееся одним из первых событий в процессах узнавания и репарации ДЦР [38, 39]. Тем не менее интерпретация этих результатов достаточно противоречива: некоторые утверждают, что фокусы γ H2AX маркируют ДЦР, индуцированные температурой [34, 37]; другие 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 [33, 35, 36]. Недавно нами доказана способность гипертермии провоцировать образование ДЦР [24, 40]. Это подтверждено с использованием двух независимых подходов: метода ДНК-комет и техники мечения концов ДНК терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой. Однако эффект температурной индукции ДЦР характерен только для клеток, находящихся в G1- и G2-фазах клеточного цикла. Эти ДЦР маркируются АТМ-зависимым фосфорилированием H2AX [24]. Интересно, что сразу после воздействия гипертермии не наблюдается привлечения к фокусам γ H2AX других факторов репарации, в частности белка 53BP1 [24, 41]. В то же время такие ДЦР достаточно эффективно репарируются в течение первых 3–6 ч после теплового стресса. Вероятно, это означает, что активная репарация индуцированных тепловым стрессом ДЦР начинается не сразу после воздействия, а спустя некоторое время после функционального восстановления ингибированных тепловым стрессом систем репарации. До сих пор, однако, не ясно, каков механизм (медиатор) немедленного формирования ДЦР в условиях теплового стресса. В качестве возможных кандидатов на эту роль можно рассматривать такие процессы, как активация ретроэлементов [42, 43], генерация активных форм кислорода [18], остановка транскрипции [44, 45]. Выше перечислены процессы, которые, как известно, могут приводить к образованию ДЦР и, при определенных условиях, происходить при тепловом стрессе. Тем не менее ни одна из этих гипотез не может убедительно объяснить индукцию тепловым стрессом ДЦР в не-S-фазных клетках. На наш взгляд, наиболее вероятный механизм формирования индуцированных тепловым стрессом ДЦР состоит в подавлении активности ДНК-топоизомеразы II (top2), фермента, изменяющего топологию ДНК путем внесения временных ДЦР [46]. Такие разрывы сопровождаются образованием ковалентной связи между молекулой белка и одним из концов цепи ДНК. Ингибирование top2 на стадии ковалентно связанного комплекса приводит к обра-

зованию ДЦР [46]. Достаточно давно получены данные о том, что тепловой стресс может ингибировать активность *top2 in vitro* [47]. Тот факт, что тепловой стресс может снижать генотоксический потенциал ядов *top2*, также свидетельствует о влиянии гипертермии на этот фермент [48]. Существуют две изоформы *top2*, причем экспрессия одной из них зависит от стадии клеточного цикла [49, 50]. Такая динамика экспрессии могла бы легко объяснить зависимость индукции ДЦР от фазы клеточного цикла.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, можно утверждать, что, помимо комплексного подавления почти всех систем репарации в клетках высших эукариот, тепловой стресс напрямую приводит к образованию различных поврежденных ДНК. Интересно, что тип и судьба индуцируемых тепловым стрессом повреждений зависят от стадии

клеточного цикла, на которой клетка подверглась действию высоких температур. Так, в S-фазе клеточного цикла гипертермия приводит к *top1*-зависимому образованию ОЦР, часть из которых спустя несколько часов может конвертироваться в сложно репарируемые ДЦР. В то же время тепловой стресс немедленно индуцирует ДЦР в клетках, находящихся на стадии G1 или G2 клеточного цикла. Несмотря на то что в общем виде описываемая схема действия теплового стресса характерна для всех проанализированных нами клеточных линий, стоит все же иметь в виду, что количество разрывов и степень репарационного ответа клетки могут очень сильно варьировать в зависимости от силы теплового стресса и типа (линии) клеток. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 14-24-00022).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Richter K., Haslbeck M., Buchner J. // *Mol. Cell*. 2010. V. 40. P. 253–266.
- Velichko A.K., Markova E.N., Petrova N.V., Razin S.V., Kantidze O.L. // *Cell Mol. Life Sci*. 2013. V. 70. P. 4229–4241.
- Кантидзе О.Л., Величко А.К., Разин С.В. // *Биохимия*. 2015. V. 80. P. 1181–1185.
- Dewey W.C., Sapareto S.A., Betten D.A. // *Radiat. Res*. 1978. V. 76. P. 48–59.
- Iliakis G., Wu W., Wang M. // *Int. J. Hyperthermia*. 2008. V. 24. P. 17–29.
- Dikomey E., Becker W., Wielckens K. // *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med*. 1987. V. 52. P. 775–785.
- Raaphorst G.P., Feeley M.M., Chu G.L., Dewey W.C. // *Radiat. Res*. 1993. V. 134. P. 331–336.
- Batuello C.N., Kelley M.R., Dynlacht J.R. // *Anticancer Res*. 2009. V. 29. P. 1319–1325.
- Fantini D., Moritz E., Auvre F., Amouroux R., Campalans A., Epe B., Bravard A., Radicella J.P. // *DNA Repair (Amst.)*. 2013. V. 12. P. 227–237.
- Hettinga J.V., Konings A.W., Kampinga H.H. // *Int. J. Hyperthermia*. 1997. V. 13. P. 439–457.
- Muenyi C.S., States V.A., Masters J.H., Fan T.W., Helm C.W., States J.C. // *J. Ovarian Res*. 2011. V. 4. P. 9.
- Nadin S.B., Cuello-Carrion F.D., Sottile M.L., Ciocca D.R., Vargas-Roig L.M. // *Int. J. Hyperthermia*. 2012. V. 28. P. 191–201.
- Burgman P., Ouyang H., Peterson S., Chen D.J., Li G.C. // *Cancer Res*. 1997. V. 57. P. 2847–2850.
- Qi D., Hu Y., Li J., Peng T., Su J., He Y., Ji W. // *PLoS One*. 2015. V. 10. P. e0122977.
- Ihara M., Takeshita S., Okaichi K., Okumura Y., Ohnishi T. // *Int. J. Hyperthermia*. 2014. V. 30. P. 102–109.
- Eppink B., Krawczyk P.M., Stap J., Kanaar R. // *Int. J. Hyperthermia*. 2012. V. 28. P. 509–517.
- Oei A.L., Vriend L.E., Crezee J., Franken N.A., Krawczyk P.M. // *Radiat. Oncol*. 2015. V. 10. P. 165.
- Bruskov V.I., Malakhova L.V., Masalimov Z.K., Chernikov A.V. // *Nucleic Acids Res*. 2002. V. 30. P. 1354–1363.
- Lindahl T., Nyberg B. // *Biochemistry*. 1974. V. 13. P. 3405–3410.
- Warters R.L., Brizgys L.M. // *J. Cell Physiol*. 1987. V. 133. P. 144–150.
- Corry P.M., Robinson S., Getz S. // *Radiology*. 1977. V. 123. P. 475–482.
- Jorritsma J.B., Konings A.W. // *Radiat. Res*. 1984. V. 98. P. 198–208.
- Warters R.L., Brizgys L.M., Axtell-Bartlett J. // *J. Cell Physiol*. 1985. V. 124. P. 481–486.
- Velichko A.K., Petrova N.V., Kantidze O.L., Razin S.V. // *Mol. Biol. Cell*. 2012. V. 23. P. 3450–3460.
- Velichko A.K., Petrova N.V., Razin S.V., Kantidze O.L. // *Nucleic Acids Res*. 2015. V. 43. P. 6309–6320.
- Pommier Y. // *Nat. Rev. Cancer*. 2006. V. 6. P. 789–802.
- Ashour M.E., Atteya R., El-Khamisy S.F. // *Nat. Rev. Cancer*. 2015. V. 15. P. 137–151.
- Lebedeva N., Rechkunova N., Boiteux S., Lavrik O. // *IUBMB Life*. 2008. V. 60. P. 130–134.
- Lebedeva N., Auffret Vander Kemp P., Bjornsti M.A., Lavrik O., Boiteux S. // *DNA Repair (Amst.)*. 2006. V. 5. P. 799–809.
- Lin C.P., Ban Y., Lyu Y.L., Desai S.D., Liu L.F. // *J. Biol. Chem*. 2008. V. 283. P. 21074–21083.
- Lin C.P., Ban Y., Lyu Y.L., Liu L.F. // *J. Biol. Chem*. 2009. V. 284. P. 28084–28092.
- Petrova N.V., Velichko A.K., Razin S.V., Kantidze O.L. // *Cell Cycle*. 2016. V. 15. P. 337–344.
- Hunt C.R., Pandita R.K., Laszlo A., Higashikubo R., Agarwal M., Kitamura T., Gupta A., Rief N., Horikoshi N., Baskaran R., et al. // *Cancer Res*. 2007. V. 67. P. 3010–3017.
- Kaneko H., Igarashi K., Kataoka K., Miura M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2005. V. 328. P. 1101–1106.
- Laszlo A., Fleischer I. // *Int. J. Hyperthermia*. 2009. V. 25. P. 199–209.
- Laszlo A., Fleischer I. // *Cancer Res*. 2009. V. 69. P. 2042–2049.
- Takahashi A., Mori E., Somakos G.I., Ohnishi K., Ohnishi T. // *Mutat. Res*. 2008. V. 656. P. 88–92.
- Rogakou E.P., Boon C., Redon C., Bonner W.M. // *J. Cell. Biol*. 1999. V. 146. P. 905–916.

39. Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 5858–5868.
40. Величко А.К., Разин С.В., Кантидзе О.Л. // *ДАН.* 2013. V. 450. P. 224–227.
41. Petrova N.V., Velichko A.K., Kantidze O.L., Razin S.V. // *Cell Biol. Int.* 2014. V. 38. P. 675–681.
42. Belgnaoui S.M., Gosden R.G., Semmes O.J., Haoudi A. // *Cancer Cell Int.* 2006. V. 6. P. 13.
43. Gasior S.L., Wakeman T.P., Xu B., Deininger P.L. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 357. P. 1383–1393.
44. Sordet O., Nakamura A.J., Redon C.E., Pommier Y. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. P. 274–278.
45. Sordet O., Redon C.E., Guirouilh-Barbat J., Smith S., Solier S., Douarre C., Conti C., Nakamura A.J., Das B.B., Nicolas E., et al. // *EMBO Rep.* 2009. V. 10. P. 887–893.
46. Nitiss J.L. // *Nat. Rev. Cancer.* 2009. V. 9. P. 338–350.
47. Osheroff N., Shelton E.R., Brutlag D.L. // *J. Biol. Chem.* 1983. V. 258. P. 9536–9543.
48. Kampinga H.H. // *Br. J. Cancer.* 1995. V. 72. P. 333–338.
49. Goswami P.C., Roti Roti J.L., Hunt C.R. // *Mol. Cell. Biol.* 1996. V. 16. P. 1500–1508.
50. Kimura K., Saijo M., Ui M., Enomoto T. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. P. 1173–1176.