# ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ *ВВС3*/РUMA и *РМАІР1*/Noxa ПРИ ИОНИЗИРУЮЩЕМ ИЗЛУЧЕНИИ: РОЛЬ р53

© 2021 г. О. А. Кучур<sup>1, \*</sup>, П. Д. Кучур<sup>1</sup>, Д. О. Кузьмина<sup>1</sup>, А. В. Завирский<sup>2</sup>, А. А. Штиль<sup>1, 3</sup>

<sup>1</sup>Химико-биологический кластер Санкт-Петербургского национального исследовательского университета информационных технологий, механики и оптики, Санкт-Петербург, 197101 Россия <sup>2</sup>Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург, 194044 Россия

<sup>3</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, 115478 Россия

\*E-mail: kuchur@scamt-itmo.ru Поступила в редакцию 02.04.2021 г. После доработки 14.04.2021 г. Принята к публикации 15.04.2021 г.

Транскрипционный фактор p53 – важнейший сенсор ионизирующего излучения. Среди многочисленных эффекторов p53 – гены *BBC3* и *PMAIP1*, кодирующие проапоптотические белки PUMA и Noxa соответственно, а также ингибитор клеточного цикла *CDKN1A*/p21. Эффективность лучевого воздействия – гибель клеток или выживание – определяется балансом механизмов, регулируемых этими белками. В настоящей работе на изогенных линиях опухолевых клеток человека (карцинома кишки HCT116 и сублиния HCT116p53KO с нефункционирующим p53) установлена преимущественная роль *BBC3*/PUMA и *CDKN1A*/p21 по сравнению с *PMAIP1*/Noxa в p53-опосредованных ответах на действие терапевтических доз γ-излучения. Биоинформатический анализ полногеномных нуклеотидных последовательностей выявил существенные различия предположительных мотивов связывания p53 в структуре генов *BBC3* и *PMAIP1*. Полученные результаты важны для разработки таргетных воздействий, позволяющих сохранить p53-зависимую активацию проапоптотических генов при ограничении блокирования клеточного цикла в облученных опухолевых клетока.

*Ключевые слова:* p53, PUMA, Noxa, p21, ионизирующее излучение, опухолевые клетки, радиочувствительность, гибель клеток

**DOI:** 10.31857/S0041377121040039

Более полувека лучевая терапия сохраняет важнейшее место в лечении больных злокачественными новообразованиями. Проблемой, ограничивающей эффективность ионизирующего излучения, остается радиоустойчивость опухолей — долговременное выживание клеток, переживших однократное воздействие. Требуется идентификация молекулярных механизмов, определяющих выживание и гибель облученных клеток.

Многочисленными исследованиями доказана ключевая роль повреждений ДНК и активации транскрипционного фактора p53 (кодируется геном *Tp53*) — одного из ранних событий, определяющих жизнеспособность облученных клеток (Gajjar et al, 2012; Maréchal, Zou, 2013; Speidel, 2015). Каскады молекулярных событий, опосредованные p53, могут индуцировать апоптоз. Среди эффекторов p53-зави-

симого апоптоза существенное значение имеют белки PUMA (p53 up-regulated modulator of apoptosis) и Noxa (от лат. "повреждение"). PUMA образует комплекс с анти-апоптотическими белками семейства Bcl-2: Bcl-xL, Bcl-2, Mcl-1, Bcl-w и Bfl-1/A1. В результате комплексообразования остаются свободными проапоптотические белки Вах и Bak, опосредующие гибель клеток в ответ на повреждающие воздействия (Nakano, Vousden, 2001). Noxa также образует комплексы с белками семейства Bcl-2, но партнеров у Noxa меньше: Mcl-1, Bfl-1/A1; к последнему белку аффинность Noxa мала (Chen et al., 2005; Ploner et al., 2008). Гены BBC3 (PUMA) и PMAIP1 (Noxa) – транскрипционные мишени p53 (Hemann, Lowe, 2006). Нокаут *Тр53*, *BBC3* или *PMAIP1* приводил к ограничению апоптоза и становлению радиоустойчивости в клетках различного видового и тканевого происхождения (Vavrova, Rezacova, 2014), а также в моделях in vivo (Leibowitz, 2011).

Наряду с индукцией гибели, активация p53 в облученных клетках может индуцировать белок p21 (кодируется геном *CDKN1A*) – ингибитор нескольких циклин-зависимых киназ. Это приводит к бло-

Принятые сокращения: *BBC3* — Bcl-2-связывающий компонент 3; *CDKN1A* — циклин-зависимая киназа 1A; *PMAIP1* — форбол-12-миристат-13-ацетат-индуцируемый белок 1; PUMA — р53-регулируемый (up-regulated) модулятор апоптоза.

кированию прохождения фазы  $G_1$  клеточного цикла, после чего клетки получают возможность репарировать повреждения в контрольной точке (Kreis, 2014). Зависимая от p53 регуляция баланса выживание-гибель в ответ на облучение оказывается двоякой: клетки с функционирующим p53 задерживаются в фазе  $G_1$  и могут избежать гибели, а p53-негативные клетки такой возможности не имеют, проходят контрольную границу фаз клеточного цикла  $G_1/S$  с невосстановленными повреждениями, продолжают продвигаться по циклу и погибают ("митотическая катастрофа") (Broude, 2008).

В настоящей работе исследована роль p53 в регуляции генов *BBC3*, *PMAIP1* и *CDKN1A*. Для решения поставленной задачи использованы изогенные линии клеток человека, отличающиеся статусом p53: исходным или генетически инактивированным.

По результатам экспериментов и биоинформатического анализа нуклеотидных последовательностей установлены существенные различия молекулярных механизмов ответа клеток на облучение и неодинаковую роль p53 в регуляции отдельных генов. В облученных p53-положительных клетках преобладают p53-зависимая активация генов *BCC3* и *CDKN1A*, что сопровождается увеличением количества белков PUMA и p21. Напротив, активация гена *PMAIP1* и прирост белка Noxa не выявлены. Для усиления гибели клеток с интактным p53 требуется дополнительная активация *PMAIP1* и (или) ограничение индукции *CDKN1A*. В клетках с нефункционирующим p53 гены *BCC3*, *PMAIP1* и *CDKN1A* лучевыми воздействиями не регулируются.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Реагенты и клетки. Использовали реактивы фирмы Sigma-Aldrich, кроме особо оговоренных случаев. Линию клеток карциномы толстой кишки человека HCT116 с исходным p53 (American Type Culture Collection. США) И изогенную сублинию НСТ116р53КО (получена в лаборатории В. Vogelstein, университет Джонса Хопкинса, Балтимор, США (Bunz et al., 1998); предоставлена авторам дром Б. П. Копниным), в которой рамка считывания гена *p53* удалена в результате гомологической рекомбинации, культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла, содержащей 2 мМ L-глутамина (Биолот, Россия), 5% сыворотки эмбриона теленка (HyClone, США) и 50 мкг/мл гентамицина (Биолот, Россия) при 37°С, 5% СО<sub>2</sub>. В экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста, культивируемые не более 15 пассажей.

**Воздействие ионизирующим излучением.** Клетки рассевали во флаконы с площадью поверхности 25 см<sup>2</sup> (Eppendorf, Германия) за 24–48 ч до экспериментов и облучали γ-фотонами на аппарате РУМ-17 (Мосрентген, Россия). Разовые дозы 4 Гр и 10 Гр сопоставимы с используемыми в клинике. Параметры

облучения: напряжение на трубке 180 кВ, ток 10 мА, фокусное расстояние 50 см, фильтр 1 мм Al; 0.5 мм Cu, мощность дозы 0.32 Гр/мин. Для валидации значений использовали дозиметрический контроль (дозиметр ИД-11, Россия).

Анализ экспрессии генов p53, p21, BBC3 (PUMA) и **РМАІР1** (Noxa). После облучения клетки культивировали 3-24 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и лизировали реагентом Extract RNA (Евроген, Россия). Экстракцию тотальной РНК и обратную транскрипцию (ревертаза MMLV) проводили согласно инструкции производителя. Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили в реальном времени (qPCRmix-HS SYBR; Евроген). Нуклеотидные последовательности праймеров: для Тр53 прямой 5'-GAGCTGAATGAGGCCTTGGA-3' и обратный 5'-CTGAGTCAGGCCCTTCTGTCTT-3'; для p21 прямой 5'-AGTCAGTTCCTTGTGGAGCC-3' и обратный 5'-CATTAGCGCATCACAGTCGC-3'; для РИМА прямой 5'-ACAGTATCTTACAGGCTGGG-3' и обратный 5'-САGACTGTGAATCCTGTGCT-3': для Noxa прямой 5'-CCAGCCGCCCAGTCTAATCA-3' и обратный 5'-GTGCCCTTGGAAACGGAAGA-3'. Для соотнесения сигналов (нормализации) использовали кДНК GAPDH; праймеры для GAPDH: прямой 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAGCG-3' и обратный 5'-AGAGATGATGACCCTTTTGGC-3'.

Иммуноблотинг. Необлученные (контроль) и облученные клетки лизировали в буфере, содержащем 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 0.1% SDS, 50 мМ Tris pH 8.0 с добавлением фенилметилсульфонилфторида и смеси ингибиторов протеиназ. Концентрацию обшего белка в лизатах определяли методом Брэдфорда (Bradford, 1976). Электрофоретическое разделение белков проводили в 12%-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия при напряжении 120-140 мВ. Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (GE Healthcare Amersham, США; 250 мА, 1.5 ч). Использовали первичные антитела (Cell Signaling, США) к p53, p21, PUMA и Noxa (разведения 1: 1000). В качестве контроля использовались антитела к β-актину в разведении 1: 2000. Для хемилюминесцентной визуализации белков использовали вторичные антитела к IgG мыши или кролика (Amersham, США), конъюгированные с пероксидазой хрена (1 : 5000-1 : 10000). Визуализацию проводили в растворе ECL и документировали с помощью системы ChemiDoc Touch (BioRad, США). Денситометрию проводили в программе ImageJ, инструментом Grey Mean Value Calculation.

Биоинформатический анализ. Исследовали предполагаемые нуклеотидные последовательности, содержащие мотивы связывания транскрипционного фактора p53 с промоторными областями генов *BBC3*/PUMA и *PMAIP1*/Noxa. В качестве входных данных программы принимали нуклеотидные последовательности генов: *BBC3* (ENSG00000105327) и *PMAIP1* (уникальный идентификатор EN-SG00000141682) из раздела Sequence сайта ensembl.

Размер промоторов (600 нуклеотидов) соответствовал стандарту. Достоверность нуклеотидных последовательностей промоторных областей подтверждали проверкой соответствующих областей в базе GenomeBrowser (https://www.ensembl.org/index.html).

Поиск мотивов осуществляли с помошью программы FIMO (find individual motif occurrences) из набора инструментов MEME (Grant et al., 2011) с опорой на базу данных HOCOMOCOv11 full HU-MAN mono meme format. На начальном этапе в качестве исходных были заданы последовательности только промоторных областей генов *BBC3* и *PMAIP1*. Затем поиск мотивов осуществляли по всему гену, включая экзоны и интроны. Полученные мотивы дополнительно проанализированы инструментами MATCH (Kel et al., 2003) и PROMO (Farré et al., 2003). У мотивов, предсказанных PROMO, вероятность несовпадения 5%. Мотивы, идентифицированные программой МАТСН, обнаружены при следующих параметрах анализа: поиск по базам данных мотивов, обладающих специфичностью для клеточного цикла позвоночных. Из предсказанных последовательностей отобраны мотивы, имеющие сходство не менее 0.95 с мотивами из баз. Далее использовали программы FIMO MEME для идентификации мотивов потенциальных транскрипционных факторов, связывающихся с промоторными областями генов. Дополнительно предсказаны мотивы связывания р53 с полноразмерными генами BBC3 и PMAIP1.

Статистическая обработка. Данные ПЦР (3 повтора экспериментов) обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel 2016. Результаты представлены в виде средних значений и стандартных отклонений. Достоверность различий определялась однофакторным тестом ANOVA при  $p \le 0.05$ .

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия генов *Тр53*, *CDK1NA*, *BBC3* и *PMAIP1* в зависимости от дозы облучения и статуса *p53*. Анализ мРНК с помощью ПЦР в реальном времени показал, что активация *Тр53* в клетках HCT116 происходит в первые часы после облучения и достигает максимума через 12 ч (усиление приблизительно в 9 раз при облучении 4 Гр и в 13 раз в ответ на 10 Гр по сравнению с необлученными клетками). Через 24 ч после облучения экспрессия *Тр53* несколько снижалась: приблизительно в 7 (4 Гр) и 9 раз (10 Гр) (рис. 1*а*). В сублинии HCT116p53KO (с нокаутированным *p53*) незначительный специфический сигнал определялся на 32–34 циклах (данные не представлены).

Ген *CDK1NA*, кодирующий белок p21, играет важнейшую роль в ответе клеток на повреждения ДНК, в том числе при ионизирующем излучении (Huerta et al., 2013). Этот ген — транскрипционная мишень p53. Характер активации *CDK1NA* в облученных клетках схож с таковым для *Tp53*: максимум достигается к

ЦИТОЛОГИЯ том 63 № 4 2021

12 ч (рис. 1*a*). В это время увеличение мРНК *CDK1NA* достигает 4–6 раз. К 24 ч мРНК *CDK1NA* снижалась на ~20% от контрольных значений. Напротив, в сублиниии с нефункционирующим p53 *CDKN1A* слабо отвечал на облучение (рис. 1*б*).

Регуляция экспрессии генов семейства Bcl-2 - BBC3 (PUMA) и *PMAIP1* (Noxa) – опосредована фактором p53 (Kim et al., 2019). В ответ на облучение клеток HCT116 относительное количество мPHK *BBC3* увеличивалось одновременно с повышением мPHK *Tp53*, достигая 3–4-кратного подъема к 12 ч. К 24 ч мPHK *BBC3* снижалась, однако превышала контрольные значения в ~2–3 раза (рис. 1*a*). Ген *BBC3* практически не экспрессируется в сублинии HCT116p53KO; в облученных клетках уровень мPHK *BBC3* превышал контрольный не более, чем в 1.5 раза (рис. 1*b*). Низкий базальный уровень экспрессии *BBC3* в сублинии HCT116p53KO можно объяснить p53-независимыми механизмами (Fernandez-Zapico et al., 2011; Valentino, 2013).

Индукция гена *PMAIP1* в клетках выражена слабее, чем индукция *BBC3*. В линии HCT116 *PMAIP1* практически не отвечает на облучение в дозе 4 Гр; даже при действии дозы 10 Гр активация этого гена не превышает 2-кратный уровень. В сублинии HCT116p53KO зависимости относительного содержания мPHK *PMAIP1* от времени и дозы не наблюдается (рис. 1*a*, *б*). Таким образом, гены *Tp53*, *CDK1NA* и *BBC3* следует считать p53-зависимыми сенсорами ответа клеток на ионизирующее излучение, тогда как ген *PMAIP1* рефрактерен даже для "сверхсильного" (10 Гр) стимула.

Влияние облучения и статуса гена Тр53 на индукцию белков р53, р21, РUMA и Noxa. Как соотносятся уровни мРНК исследуемых генов с количествами соответствующих белков в ответ на облучение клеток с различным статусом р53? Результаты иммуноблотинга через 3-24 ч после облучения клеток НСТ116 и НСТ116р53КО (4 Гр и 10 Гр) показаны на рис. 2. Белок р53 активируется дозозависимым образом в первые 3-6 ч, достигает максимума, превышающего контроль в ~3 и ~6 раз для дозы 4 и 10 Гр соответственно, после чего снижается до 3-часовых значений (по результатам денситометрии полос иммуноблота). Изменения p21 схожи с таковыми для р53; выраженность прироста р21 значительно ниже  $(B \sim 2-3$ раза даже для дозы 10 Гр), однако и через 24 ч количество p21 остается повышенным. В сублинии НСТ116р53КО р53 не определяется; уровень р21 в ответ на облучение практически не изменяется.

Количество белка PUMA в облученных клетках HCT116 изменяется в соответствии с нарастанием p53; важно, что PUMA нарастает уже в первые часы после облучения. В сублинии HCT116p53KO выявлены лишь следовые количества PUMA. Наконец, количество Noxa не зависело от доз облучения и статуса p53 (рис. 2). 15 12 9

> 6 3 0

> 6





**Рис. 1.** Изменения во времени экспрессии генов *Tp53*, *CDKN1A*, *BBC3* и *PMAIP1* в ответ на облучение в дозе 4 Гр (белые столбцы) и 10 Гр (черные столбцы) в клетках исходной линии HCT116 (*a*) и сублинии HCT116p53KO с инактивированным p53 (*b*). По горизонтали – время, ч. Контроль – необлученные клетки (экспрессия принята за 1). Представлены средние значения из 3-х экспериментов и доверительные интервалы (вертикальные отрезки). Для нормализации использовали транскрипты гена *GAPDH*. Во всех группах отличия от контроля достоверны при  $p \le 0.05$  (однофакторный ANOVA).

Время после облучения, ч

Биоинформатический анализ регуляции *BBC3* и *PMAIP1*. В начале поиска нуклеотидных последовательностей, несущих мотивы узнавания p53, мы предположили, что этот транскрипционный фактор связывается с промоторными областями генов *PUMA* и *Noxa*. Поэтому на первом этапе анализа рассмотрены только последовательности этих промоторов. Оценка вхождений мотивов связывания p53. Поиск вхождений мотивов связывания p53 с *PMAIP1* и *BBC3* (с помощью FIMO) предсказал пять последовательностей P53\_HUMAN.H11MO.1.А в промоторной области *PMAIP1* (табл. 1) и отсутствие таковых в промоторе *BBC3*. Согласно принятым стандартам, достоверными можно считать мотивы с *p*-value ≤ 0.05



**Рис. 2.** Количество белков p53, p21, PUMA и Noxa в клетках HCT116 и HCT116p53KO после облучения в дозе 4 и 10 Гр. Иммуноблотинг. *Вверху* указано время после облучения, ч. В качестве контроля нанесения белков на гель использовали β-актин.

и *q*-value  $\leq 0.05$ , т.е. вероятность ложноположительного вхождение мотива справедлива для 5% случаев. Чем меньше величины *p*-value и *q*-value, тем выше достоверность предсказанного мотива. Обнаружено 3 мотива, удовлетворяющих статистическим оценкам вероятности (обозначены символами A, Б, В; табл. 1). Анализ МАТСН выявил один мотив узнавания p53 в промоторе *PMAIP1* и отсутствие мотивов в промоторе *BBC3*. Обнаруженный мотив ggGCAG-Gtcg гена *PMAIP1* совпадает с мотивом CGACCTG-CCCGGACACGCTC, предсказанным программой FIMO, с учетом направления цепи ДНК.

Поскольку мотивы связывания p53 с промотором *BBC3* не выявлены, на следующем этапе нами учтены полноразмерные последовательности генов: промоторные области, все интроны и экзоны. В табл. 2

приведены мотивы, статистические показатели вхождения которых удовлетворяют диапазонам q-value  $\leq 0.05$  и p-value  $\leq 0.05$ . Из табл. 1 и 2 видно, что некоторые мотивы, предсказанные для промоторной области *PMAIP1*, оказались ложноположительными и повысили значение q-value на более длинном протяжении гена. Таким образом, достоверно предсказано наличие только одного мотива (A) связывания p53 в гене *PMAIP1*, и этот мотив A локализуется в промоторе (табл. 2).

Для гена *BBC3* связывание p53 с промотором не предсказано, но найдены два мотива в экзоне 1 (табл. 2, мотивы Б и В) и по одному в интронах 1 (табл. 2, мотив Г) и 2 (табл. 2, мотив Д). Результаты анализа МАТСН выявили мотив узнавания p53 agg-САТGTсс в области экзона 1 гена *BBC3* и совпадение

**Таблица 1.** Статистические показатели мотивов *p53* (А–Д), предсказанных программой FIMO для промоторной области гена *PMAIP1* 

Мотив (символ)	Последовательность предсказанного мотива	Направление цепи	p-Value	q-Value
А	CGACCTGCCCGGACACGCTC	3'-5'	2.4e-06	0.0026
Б	GAGCGTGTCCGGGCAGGTCG	5'-3'	2.7e-05	0.0147
В	AGACTTGGGTAAACAAGCCC	3'-5'	6.19e-05	0.0225
Γ	AAACAAGCCCAGA	3'-5'	6.51e-05	0.0504
Д	GAGCGTGTCCGGG	5'-3'	9.17e-05	0.0504

Примечание. А, Б, В – статистически значимые области.

Ген <i>РМАІР1</i>										
Мотив (символ)	Последовательность предсказанного мотива	Направление цепи	<i>p</i> -Value	q-Value						
A	CGACCTGCCCGGACACGCTC	3'-5'	-5' 2.4e-06							
Ген ВВС3										
Б	GGACATGCCTGGG	3'-5'	8.55e-09	0.000214						
В	GGGTCTGCCCAGGCATGTCC	5'-3'	3.09e-08	0.000772						
Г	CTGCAAGTCCTGACTTGTCC	5'-3'	6.42e-07	0.00801						
Д	GGGCATGTTTGGG	5'-3'	2.91e-06	0.0364						

**Таблица 2.** Статистические показатели мотивов *p53* (А–Д), предсказанных FIMO для полноразмерных генов *PMAIP1* и *BBC3* 

этого мотива с последовательностью GGGTCTGC-CCAGGCATGTCC, указанной FIMO. Также MATCH выявил мотив tgaCTTGTcc, совпадающий с CTGCAAGTCCTGACTTGTCC в интроне 1 и мотив gggCGTGTct в интроне 2, не совпадающий с результатами FIMO.

Таким образом, программы FIMO и МАТСН подтвердили вхождение двух мотивов p53 в экзоне 1 и одного мотива в интроне 1 гена *BBC3*. Поскольку эти мотивы найдены в противоположных цепях ДНК, при конвертировании GGACATGCCTGGG в (+)-направление обнаруживается полное совпадение со 2-м найденным мотивом GGGTCTGC-CCAGGCATGTCC в экзоне 1. Следовательно, интрон 1 – место предпочтительного связывания p53 с геном *BBC3*.

Итак, в гене *BBC3* (PUMA) сайт связывания p53 находится в экзоне 1. Напротив, p53 предположительно связывается с промотором *PMAIP1* (Noxa). Различия в предсказанных сайтах связывания p53 не объясняют различий ответа каждого гена: при облучении в дозе 4 Гр активируется только ген *BBC3* и накапливается белок PUMA (рис. 1, 2), а ген *PMAIP1* индуцируется слабо и лишь при интенсивном воздействии (10 Гр). Требуется расширить анализ структуры обоих генов для выявления мотивов связывания других транскрипционных факторов.

Для предсказания мотивов связывания транскрипционных факторов с исследуемыми генами взяты последовательности их промоторов и экзона 1. Причина выбора таких районов — предсказанные мотивы связывания p53 в промоторе гена *PMAIP1* и в экзоне 1 гена *BBC3* (см. выше). Учитывались мотивы всех факторов с достоверностью предсказания (*p*-value и *q*-value) выше, чем для p53. При обнаружении нескольких мотивов одного фактора в таблицу вносили мотив с наименьшими значениями *p*-value и *q*-value. (табл. 3).

Предыдущие исследования (Ploner et al., 2008; Kuribayashi et al., 2011) и наши результаты указывают на второстепенную (в отличие от PUMA) роль Noxa в ответе клеток на ионизирующее излучение. Дей-

ствительно, ген *PMAIP1* активируется только при сильном (10 Гр) р53-активирующем воздействии; уровень активации невелик по сравнению с таковым у гена ВВСЗ. Биоинформатический анализ указал на особенности, важные для интерпретации экспериментальных данных о дифференциальной роли р53 в регуляции BBC3 и PMAIP1. Требуется иммунопреципитация хроматина для суждения о функциональной значимости того или иного предсказанного мотива для транскрипционных ответов при облучении. Отметим, что возможных сайтов связывания р53 в гене BBC3 в 4 раза больше, чем в гене PMAIP1 (табл.2); можно предположить более высокую значимость р53-опосредованной регуляции ВВСЗ. Выявлены различия в локализации сайтов связывания р53: у *BBC3* экзоны, у *PMAIP1* – промотор.

Исходя из предсказанных мотивов (табл. 3), количество транскрипционных факторов, связывающихся с промотором гена *PMAIP1*, намного превышает число таковых для промотора и экзона 1 гена *BBC3*. Это может означать, что регуляция экспрессии *PMAIP1* и, следовательно, содержание белка Noxa осуществляются многочисленными механизмами, зависимыми и независимыми от p53. На рис. 3 представлены предсказанные мотивы связывания транскрипционных факторов в области промотора и экзона 1 гена *PMAIP1*.

На клетках линии эмбриональных фибробластов мыши MEF и в модели *in vivo* показано, что белок PATZ1, имеющий сайт связывания с *PMAIP1*, способен конкурировать с p53 за связывание с ДНК и ингибировать функции p53 при повреждении ДНК (Fedele et al., 2005). Представители семейства транскрипционных белков SP/KLF, в частности KLF4, ингибируют p53-зависимую регуляцию гена *p53* (Rowland et al., 2014). KLF5 связывается с p53, отменяя p53-зависимое подавление гена сурвивина; это способствует выживанию клеток острого лимфобластного лейкоза (Zhu et al., 2006). Таким образом, неэффективность p53-активирующего стимула может быть обусловлена взаимодействием p53 с белком (белками) семейства KLF. Рефрактерность гена

Ген <i>РМАІР1</i>								
Факторы/семейства	Паттерн	Мотив 5'—3'	<i>p</i> -Value	q-Value				
Sp/KLF	SP1	GCGGGGCGGGGACAGGGGGGGG	8.3e-10	3.82e-07				
	SP4	GGGACAGGGGGGGGGACAGG	4.39e-09	5.73e-06				
	KLF15	GGGGCGGGGACAGGGGCGG	5.11e-09	3.17e-06				
	SP2	GGGACAGGGGGGGGGACAGGGG	6.18e-09	4.26e-06				
	SP3	GGACAGGGGCGGGCCGGGCG	3.32e-08	1.7e-05				
	KLF16	CTGGGAGTGGCGGGAGGGG	1.08e-07	0.000123				
	KLF3	GGACAGGGGGGGGGACAGG	2.85e-07	0.000352				
	KLF6	ACAGGGGCGGGGACAGGGG	3.18e-07	0.000237				
	KLF12	CGGGGCGGGGA	1.15e-06	0.000857				
	KLF1	GGGGCGGGGACAGG	1.77e-06	0.00125				
PATZ1	PATZ1	GGGGCGGGGACAGGGGGGGGGA	4.81e-09	5.2e-06				
Белки "цинковых	ZN467	GGGGCGGGGACAGGGGGGGGGA	8.23e-08	9.87e-05				
пальцев"	ZN143	GGGATGCTGGGATCGGGTGTCC	6.52e-07	0.000923				
	ZN341	CGGGGACAGGGGGGGGGGACAGG	7.21e-07	0.000767				
	ZF64A	AGAGCCCGGGAACCTC	7.62e-07	0.00067				
	ZN770	TGGAGGCTGAG	7.94e-07	0.00105				
	ZN263	GGGAGGAGAAGGGGGTCGGC	8.95e-07	0.00113				
TBX	TBX1	GCGGGGACAGGGGCGGGCCG	1.47e-07	0.000164				
	TBX15	TGGGAGTGGCGGGAGGGGA	6.77e-07	0.000692				
MAZ	MAZ	GGAGCTGGGAGTGGCGGGAGGG	1.66e-07	0.000116				
Z324A	Z324A	GATCCCAGCATCCCTGCCTGCAG	3.3e-07	0.000398				
EGR	EGR2	GCTGAGTGGGCGGCGG	4.19e-07	0.000542				
	EGR1	AGCTGAGTGGGCGGCGG	8.81e-07	0.00124				
E2F	E2F7	GGGGCGGGGACAG	5.08e-07	0.000349				
	E2F6	GTGGCGGGAGGGG	6.47e-07	0.000784				
	E2F1	GAGTGGCGGGAGGG	1.34e-06	0.00148				
SRBP2	SRBP2	GGGTGGGGAGAGA	1.24e-06	0.00145				
p53	P53	CGACCTGCCCGGACACGCTC	2.4e-06	0.00362				
	I	Ген ВВС3	I	I				
ZN770	ZN770	GGGAGGCTGAGGCAGAAGACTT	1.3e-09	1.86e-06				
p53	P53	GGACATGCCTGGG	8.55e-09	1.39e-05				

Таблица 3. Статистические показатели мотивов узнавания транскрипционных факторов, предсказанных FIMO

РМАІР1 к р53-активирующим стимулам (например, ионизирующему излучению) может быть обусловлена тем, что среди белков семейства KLF немало репрессоров транскрипции, а промотор *PMAIP1* богат сайтами связывания KLF/SP (табл. 3). Предположение о механизме трансрепрессии в регуляции р53зависимых ответов согласуется со следующими данными: в линии эпителия молочной железы MCF10A Мус-ассоциированный белок MAZ (из семейства "цинковых пальцев") связывался с регуляторной областью *p53* и ингибировал этот ген (Lee et al., 2016). Протеинкиназа Akt отменяла ингибирующий эффект MAZ, что указывает на возможности эпигенетической реактивации *p53*.

Можно ли активировать экспрессию *PMAIP1* для усиления гибели p53-положительных клеток в ответ на стресс, в частности при комбинации с терапевтическими дозами ионизирующего излучения? В экспериментах с тепловым шоком в клетках меланомы (Davis et al., 2015) производное хинона – аурин – ингибировало белок теплового шока Hsp90α. Это сопровождалось падением мембранного потенциала митохондрий, индукцией массивного окислительного стресса, истощением глутатиона и активацией Noxa с последующей апоптотической гибелью. Такой подход не представляется перспективным для практического использования из-за отсутствия специфичности к *PMAIP1*/Noxa как внутриклеточной мишени.

Эярестатин I (Eeyarestatin I; EerI) блокирует деградацию белков при стрессе эндоплазматического ретикулума. В ответ на действие EerI в клетках накапливаются транскрипционные факторы семейства CREB/ATF, связывающиеся с промотором



**Рис. 3.** Сайты связывания транскрипционных регуляторов с промоторной областью и экзоном 1 гена *PMAIP1* (Noxa). Указаны индивидуальные белки или семейства, а также положения предсказанных мотивов их связывания с ДНК. Стрелка – сайт инициации транскрипции. Размеры последовательностей взяты из раздела Sequence базы данных Ensembl.

*РМАІР1*. Наряду с этим блокируется убиквитинирование гистона H2A – репрессора *РМАІР1*. В результате дерепрессия *РМАІР1* и накопление Noxa обусловливают апоптоз (Wang et al., 2009). Однако для гибели клеток при стрессе эндоплазматического ретикулума p53 не обязателен (Nikiforov et al., 2007). Комбинирование такого вида стресса с облучением предусматривает вовлечение p53-независимых механизмов, что терапевтически оправдано. Вместе с тем, для гибели p53-позитивных клеток целесообразно использовать активацию этого важнейшего проапоптотического механизма (а при лучевом воз-

действии такая активация — одно из главных событий) и уменьшение p53-зависимых ответов, позволяющих клеткам пережить воздействие. К таким ограничивающим механизмам относится p53/p21зависимая задержка клеточного цикла. Правомерно предположить, что селективная инактивация p21 (препятствие транскрипции гена *CDKN1A* или прицельная деградация белка с применением технологии PROTAC (Paiva, Crews, 2019)) позволят сохранять проапоптотические эффекты p53 и предотвращать блокирование клеточного цикла, что повысит



**Рис. 4.** Р53-зависимые ответы на лучевое воздействие: возможности усиления гибели клеток. Слева: активация p53 в ответ на облучение индуцирует разнонаправленные p53-зависимые механизмы (примеры: PUMA и p21). Гибель клеток лимитирована невысокой активацией других проапоптотических механизмов (пример: Noxa) и задержкой клеточного цикла. Справа: стратегия интенсификации апоптоза облученных клеток: реактивация проапоптотических генов (Noxa) и (или) предотвращение активации ингибитора клеточного цикла p21.

чувствительность р53-положительных клеток к лучевым воздействиям.

На рис. 4 представлены возможности использования p53-зависимой регуляции для повышения эффективности облучения опухолевых клеток.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-34-90046).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Работа не содержит каких-либо исследований с использованием животных или людей в качестве объектов.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- *Bradford M.M.* 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. V. 72. P. 248.
- Broude E.V., Loncarek J., Wada I., Cole K., Hanko C., Roninson I.B., Swift M. 2008. Mitotic catastrophe in cancer therapy. Beyond Apoptosis: Cellular outcomes of cancer therapy. N.Y.: Informa Healthcare. P. 307.
- Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C., Waldman T., Zhou S., Brown J.P., Vogelstein B. 1998. Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. Science. V. 282. P. 1497.
- Chen L., Willis S.N., Wei A., Smith B.J., Fletcher J.I., Hinds M.G., Huang D.C. 2005. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. Mol. Cell. V. 17. P. 393.
- Davis A.L., Qiao S., Lesson J.L., De La Vega M.R., Park S.L., Seanez C.M., Wondrak G.T. 2015. The quinone methide aurin is a heat shock response inducer that causes proteotoxic stress and Noxa-dependent apoptosis in malignant melanoma cells. J. Biol. Chem. V. 290. P. 1623.
- Farré D., Roset R., Huerta M., Adsuara J.E., Roselló L., Albà M.M., Messeguer X. 2003. Identification of patterns in biological sequences at the ALGGEN server: PROMO and MAL-GEN. Nucleic Acids Res. V. 31. P. 3651.
- *Fedele M., Crescenzi E., Cerchia L.* 2017. The POZ/BTB and AT-hook containing zinc finger 1 (PATZ1) transcription regulator: physiological functions and disease involvement. Int. J. Mol. Sci. V. 18. P. 2524.
- Fernandez-Zapico M.E., Lomberk G.A., Tsuji S., DeMars C.J., Bardsley M.R., Lin Y.H., Urrutia R. 2011. A functional family-wide screening of SP/KLF proteins identifies a subset of suppressors of KRAS-mediated cell growth. Biochem. J. V. 435. P. 529.

Gajjar M., Candeias M.M., Malbert-Colas L., Mazars A., Fujita J., Olivares-Illana V., Fahraeus R. 2012. The p53 mRNA-Mdm2 interaction controls Mdm2 nuclear trafficking and is required for p53 activation following DNA damage. Cancer Cell. V. 21. P. 25.

- Grant C.E., Bailey T.L., Noble W.S. 2011. FIMO: Scanning for occurrences of a given motif. Bioinformatics. V. 27. P. 1017.
- Hemann M.T., Lowe S.W. 2006. The p53-BCL-2 connection. Cell Death Differ. V. 13. P. 1256.
- Huerta S., Gao X., Dineen S., Kapur P., Saha D., Meyer J. 2013. Role of p53, Bax, p21, and DNA-PKcs in radiation sensitivity of HCT-116 cells and xenografts. Surgery. V. 154. P. 143.
- Kel A.E., Gossling E., Reuter I., Cheremushkin E., Kel-Margoulis O.V., Wingender E. 2003. MATCHTM: a tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. Nucleic Acids Res. V. 31. P. 3576.
- Kim W., Lee S., Seo D., Kim D., Kim K., Kim E., Youn B. 2019. Cellular stress responses in radiotherapy. Cells. V. 8. P. 1105.
- Kreis N.N., Sanhaji M., Rieger M.A., Louwen F., Yuan J. 2014. p21Waf1/Cip1 deficiency causes multiple mitotic defects in tumor cells. Oncogene. V. 33. P. 5716.
- Kuribayashi K., Finnberg N.K., Jeffers J.R., Zambetti G.P., El-Deiry W.S. 2011. The relative contribution of pro-apoptotic p53-target genes in the triggering of apoptosis following DNA damage in vitro and in vivo. Cell Cycle. V. 10. P. 2380.
- Lee W.P., Lan K.H., Li C.P., Chao Y., Lin H.C., Lee S.D. 2016. Akt phosphorylates myc-associated zinc finger protein (MAZ), releases P-MAZ from the p53 promoter, and activates p53 transcription. Cancer Lett. V. 375. P. 9.
- Leibowitz B.J., Qiu W., Liu H., Cheng T., Zhang L., Yu J. 2011. Uncoupling p53 functions in radiation-induced intestinal damage via PUMA and p21. Mol. Cancer Res. V. 9. P. 616.
- *Maréchal A., Zou L.* 2013. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. V. 5. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012716
- *Nakano K., Vousden K.H.* 2001. PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. Mol. Cell. V. 7. P. 683.
- Nikiforov M.A., Riblett M., Tang W.H., Gratchouck V., Zhuang D., Fernandez Y., Soengas M.S. 2007. Tumor cell-selective regulation of NOXA by c-MYC in response to proteasome inhibition. PNAS. V. 104. P. 19488.
- Paiva S.L., Crews C.M. 2019. Targeted protein degradation: Elements of PROTAC design. Curr. Opin. Chem. Biol. V. 50. P. 111.
- *Ploner C., Kofler R., Villunger A.* 2008. Noxa: At the tip of the balance between life and death. Oncogene. V. 27. P. 84.
- *Rowland B.D., Bernards R., Peeper D.S.* 2005. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. Nat. Cell. Biol. V. 7. P. 1074.
- Speidel D. 2015. The role of DNA damage responses in p53 biology. Arch. Toxicol. V. 89. P. 501.
- Valentino T., Palmieri D., Vitiello M., Pierantoni G.M., Fusco A., Fedele M. 2013. PATZ1 interacts with p53 and regulates expression of p53-target genes enhancing apoptosis or cell

survival based on the cellular context. Cell Death Dis. V. 4. https://doi.org/10.1038/cddis.2013.500

*Vavrova J., Rezacova M.* 2014. Importance of proapoptotic protein PUMA in cell radioresistance. Folia Biol. V. 60. P. 53.

Wang Q., Mora-Jensen H., Weniger M.A., Perez-Galan P., Wolford C., Hai T., Ye Y. 2009. ERAD inhibitors integrate ER stress with an epigenetic mechanism to activate BH3-only protein NOXA in cancer cells. PNAS. V. 106. P. 2200.

Zhu N., Gu L., Findley H. W., Chen C., Dong J. T., Yang L., Zhou M. 2006. KLF5 Interacts with p53 in regulating survivin expression in acute lymphoblastic leukemia. J. Biol. Chem. V. 281. P. 14711.

# Differential Regulation of *BBC3*/PUMA and *PMAIP1*/Noxa by Ionizing Radiation: A Role for p53

O. A. Kuchur<sup>a</sup>, \*, P. D. Kuchur<sup>a</sup>, D. O. Kuzmina<sup>a</sup>, A. V. Zavirsky<sup>b</sup>, and A. A. Shtila<sup>a, c</sup>

<sup>a</sup>Chemistry and Biology Cluster, ITMO University, Saint-Petersburg, 197101 Russia <sup>b</sup>Kirov Military Medical Academy, Saint-Petersburg, 194044 Russia <sup>c</sup>Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow, 115478 Russia \*e-mail: kuchur@scamt-itmo.ru

The transcriptional factor p53 is a key sensor of ionizing radiation. A plethora of p53 regulated genes include *BBC3* and *PMAIP1* that encode the pro-apoptotic proteins PUMA and Noxa, respectively, as well as the cell cycle inhibitor *CDKN1A*/p21. The balance of these mechanisms is decisive for the fate of irradiated cells. Using the human colon carcinoma cell line HCT116 (wild type p53) and its isogenic subline HCT116p53KO (non-functional p53) we here demonstrate that therapeutic doses of  $\gamma$ -irradiation predominantly induced *BBC3*/PUMA and *CDKN1A*/p21 but not *PMAIP1*/Noxa in a p53-dependent manner. A bioinformatics analysis of the full-length genome sequences identified a striking difference between the predicted p53 binding motifs in the *BBC3* and *PMAIP1* genes. Our results are applicable for the design of targeted tools aimed at p53-dependent activation of pro-apoptotic genes along with the limitation of the cell cycle arrest in irradiated tumor cells.

Keywords: p53, PUMA, Noxa, p21, ionizing radiation, tumor cells, radiosensitivity, cell death