

ВЫЯВЛЕНИЕ ФОСФОРИЛИРОВАННОГО ГИСТОНА H2AX В ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ КЛЕТКАХ МОЗГА И ПЕЧЕНИ ПОСЛЕ РЕНТГЕНОВСКОГО ОБЛУЧЕНИЯ

Репарация ДНК является фундаментальным процессом, обеспечивающим стабильность наследственности и изменчивости генетического материала. Однонитевые или двунитевые разрывы ДНК хромосом могут происходить спонтанно (соматический мутагенез при образовании антител) или возникать после индукции, например, химическими мутагенами, ионизирующим излучением. Для клеток наиболее опасны двунитевые разрывы ДНК (ДР ДНК), так как они могут приводить к клеточной гибели, или к развитию канцерогенеза [1,2]. Одним из наиболее быстро обнаруживаемых событий каскада сигнальных реакций эукариотических клеток на внесение ДР ДНК является фосфорилирование варианта корового гистона H2AX АТМ-, ATR- или DNA-РК-киназами контрольных точек клеточного цикла по 139-серину. Подсчитано что 1 Гр ионизирующего облучения вызывает образование одного двунитевого разрыва на $0,2 \times 10^9$ п.н., то есть приводит к образованию примерно 35 разрывов на диплоидный геном соматической клетки эукариот ($6,0 \times 10^9$ п.н.). Фосфорилирование гистона H2AX специфично в отношении ДР ДНК [1, 2]. Время половинной элиминации γ -H2AX в линиях опухолевых клеток и тканях коррелирует с их радиочувствительностью [3]. Однако, на сегодняшний день мало данных о динамике γ -H2AX в дифференцированных тканях млекопитающих, которые представляют важные аспекты действия радиации. Недавно мы показали, что в дифференцированных клетках сердца линейных мышей наблюдается замедленная элиминация γ -H2AX, и ~50% γ -H2AX-положительных ядер от максимального значения наблюдается через 23 часа после рентгеновского облучения [4, 5].

Целью этой работы было сравнить динамику образования и исчезновения фосфорилированного гистона H2AX после рентгеновского облучения в ядрах клеток терминально дифференцированных популяций клеток мозга и печени Сирийских хомяков *in vivo*.

При проведении иммуногистохимического исследования использовали поликлональные антитела к синтетическому карбокситерминальному пептиду SKATQAS(PO₄)QEY гистона γ -H2AX. Иммунофлуоресценция детектировалась при помощи конфокального микроскопа («LSM 5 Pascal» фирмы Carl Zeiss). На препаратах подсчитывали долю ядер с меткой против фосфорилированной формы гистона H2AX по отношению к ядрам, меченым DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Необлученные ткани мозга содержали ~2%, а ткани печени ~5% γ -H2AX-положительных ядер, в то время как в тканях, фиксированных через 1 час после рентгеновского облучения в дозе 5 Гр количество γ -H2AX-положительных ядер составило ~34% в тканях мозга и ~25% в тканях печени. Исследуя ткани хомяков через разные временные интервалы после рентгеновского облучения в дозе 5 Гр, мы выяснили, что элиминация γ -H2AX в клетках мозга идет медленно и через 6 часов после облучения наблюдается ~30% γ -H2AX-положительных ядер. Через 24 часа после облучения число γ -H2AX-положительных ядер не достигает значения необлученных тканей мозга и составляет ~7% от общего числа ядер. В клетках же печени через 6 часов после облучения наблюдается половинная элиминация γ -H2AX-положительных ядер, а через сутки их число полностью восстанавливается.

Эти данные могут свидетельствовать о том, что в клетках мозга восстановление хроматина идет медленнее, чем в клетках печени. Полученные нами результаты отражают особенности посттрансляционного фосфорилирования гистона H2AX в клеточных популяциях *in vivo*, в то время как большинство экспериментальных данных относительно

динамики фосфорилирования гистона получены на клетках и популяциях *in vitro*, что, безусловно, не вполне адекватно отражает механизмы реакций, происходящих в ответ на повреждение генома в многоклеточном организме. Поскольку эффективное образование фосфорилированной формы гистона H2АХ указывает на радиоустойчивость клеточного генома в целом, наши данные представляют особую ценность для клинических исследований с прогностической целью перед проведением радиотерапии, для экспресс-скрининга клеточных популяций на радиорезистентность.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта программы Президиума РАН “Фундаментальные науки — медицине“ 101 04-243.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VX and Bonner W. The Journal of Biological Chemistry. 1998. V.273. N.10. P.5858-5868.
2. Rogakou EP, Boon C., Redon C. And Bonner W. The Journal of Biological Chemistry. 1999. V.146. N.5. P.905-915.
3. Olive PL, Banath JP. Int J Radiat Oncol Biol Phys. 2004. V.58. N.2. P.331-5.
4. Gavrilov B, Vezhenkova I, Firsanov D, Solovjeva L, Svetlova M, Mikhailov V, Tomilin N. Biochem Biophys Res Commun. 2006. V.347. N.4. P.1048-52.
5. Gavrilov BA, Firsanov DV, Vezhenkova IV, Solov'eva LV, Svetlova MP, Mikhailov VM, Tomilin NV. Dokl Biol Sci. 2007. V.414. P.239-41.