

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт
цитологии Российской академии наук

На правах рукописи

КУРАНОВА

Мирия Леонидовна

Клеточные и молекулярные особенности проявления атаксии-
телеангиэктазии

03.03.04- Клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Научный руководитель:

Кандидат биологических наук,

Спивак Ирина Михайловна

Санкт-Петербург

2014

Оглавление

Список основных сокращений	4
Введение	5
I. Обзор литературы	9
1 Атаксия-телеангиэктазия.....	9
2. Основные сигнальные пути в ответ на повреждения ДНК. Протеинкиназа АТМ.....	12
3. Эпигенетическая регуляция хроматина при ускоренном старении	
3.1 Структура хроматина.....	17
3.2 Структура хроматина при двунитевых разрывах ДНК.....	24
3.3 Эпигенетические модификации хроматина.....	25
3.4 Посттрансляционные модификации гистонов.....	28
4.Триметилированные формы гистона H3 – H3K9me3 и H3K27me3 при трансформации и старении клетки.....	33
5. Гистоновые деацетилазы SIRT1 и SIRT6 при старении клетки..	37
5.1 Деацетилаза SIRT1.....	43
5.2 Деацетилаза SIRT6.....	48
6. Ядерная ламина при старении клетки.....	51
II. Материалы и методы	60
1. Культивирование клеток.....	60
2. Получение первичных фибробластов.....	61
3. Иммунофлуоресценция.....	61
4. Микроскопия и анализ изображений.....	62
5. Статистическая обработка результатов.....	62

III. Результаты и обсуждение.....	63
i. Выявление фосфорилированной (активной) формы протеинкиназы ATM (фосфо-ATM)	63
ii. Выявление ферментативной активности протеинкиназ фосфо-ATM и ATR в клетках больной синдромом Секкеля.....	69
iii. Выявление ферментативной активности протеинкиназ ATM и ATR в исследуемых линиях	71
3.2. Интенсивность флуоресценции гистоновых деацетилаз SIRT1 и SIRT6 в исследуемых линиях.....	77
3.3. Интенсивность флуоресценции триметилированных форм гистона H3 H3K9me3 и H3K27me3.....	83
3.4. Выявление гетерохроматинового маркера HP1-γ.....	86
3.5. Накопление aberrаций ядерной ламины.....	89
3.6. Определение количества SA-β-галактозидазы в исследуемых линиях.....	94
3.7. Измерение длин теломер.....	97
Заключение.....	101
Выводы.....	107
Список литературы.....	108

Список основных сокращений

АТ – атаксия-телеангиэктазия

ATM - ataxia-telangiectasia mutated – мутантный ген атаксии-телеангиэктазии

ATR - ‘ataxia telangiectasia’ and ‘rad3-related’

BRCA1 - breast cancer type 1 susceptibility protein

DDR- The DNA Damage Response – ответ на повреждение ДНК

СХО – сестринские хроматидные обмены

Введение

Актуальность проблемы. Атаксия-телеангиэктазия (АТ) является тяжёлым прогрессирующим мультисистемным нейродегенеративным заболеванием с признаками преждевременного старения и резко повышенным риском образования опухолей, наследуемым по аутосомно-рецессивному типу. Причиной заболевания является мутация в гене *ATM*, который локализован в 11 хромосоме (11q23), имеет размер 150 т.п.н. и содержит 66 экзонов (Savitsky et al., 1995; Lavin, Khanna, 1999; Pulverer, 2003). На сегодняшний день описано более 100 мутаций, приводящих к АТ (Sandoval et al., 1999; Lee et al., 2013).

Частота заболевания в зависимости от популяции составляет от 1:40000 до 1: 100000-300000 населения, при этом доля гетерозиготных носителей составляет от 1 до 7%. Гетерозиготные носители также подвержены высокому риску развития опухолей (Спивак, 1999, Cancannon 2002).

Клиническая картина при АТ полиморфна, и при диагностике заболевания могут возникать трудности. Учитывая, что молекулярно-генетическая диагностика затруднена из-за большого количества мутаций, размера и высокой степени полиморфизма гена *ATM*, исследования клеточных особенностей пациентов с АТ крайне важны.

Ген *ATM* кодирует протеинкиназу ATM(ataxia-telangiectasia mutated), играющую ключевую роль в ответе клетки на повреждение ДНК – возникновение двунитевых разрывов при действии генотоксических агентов или конформационных изменений при действии хроматин-ремодулирующих агентов(Savitsky et al., 1995; Shiloh Y. 2003; Pospelova et al., 2011). Таким образом, клетки АТ-пациентов являются стандартной клеточной моделью для изучения процессов глобального клеточного ответа на повреждение ДНК и механизмов репарации двунитевых разрывов (Lavin, 2008).

В то же время, признаки ускоренного старения в сочетании с повышенным риском развития опухолей у больных АТ также делают эти клетки уникальной моделью для изучения, как процессов старения, так и клеточной трансформации, поскольку они одновременно используют эти две разнонаправленные программы клеточного развития. В клетках пациентов АТ было описано характерное изменение таких маркеров старения, как SA- β -Gal, SAHF, HP1- γ , γ -H2AX, 53BP1, резкое снижение эффективности процессов репарации ДНК и высокий уровень хромосомных перестроек (Хомасуридзе и др., 1999; Полуботко и др., 2009а,б). Учитывая то, что протеинкиназа АТМ вовлечена во многие важные сигнальные пути клетки, исследования клеточных особенностей АТ актуальны как для фундаментальной науки, так и для клинических разработок.

Цели и задачи. Целью данной работы являлось изучение клеточных особенностей пациентов с АТ. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Подбор подходящей группы клеточных линий, в которую входят как линии, полученные от пациентов с АТ, так и клетки от пациентов с другими нарушениями репарации ДНК и здоровых доноров.
2. Основываясь на способности протеинкиназы АТМ к автофосфорилированию в ответ на повреждение ДНК, разработать и апробировать клеточный метод, позволяющий уточнить диагноз АТ в сложных случаях. Детектировать наличие активной формы АТМ – фосфо-АТМ (P-АТМ) в исследуемых клетках для уточнения диагноза АТ в сложных случаях.
3. Изучить возможность ассоциации с АТ классического маркера старения SA- β -Gal.

4. Изучить возможность ассоциации с АТ эпигенетических маркеров старения: белка гетерохроматина HP1-γ, триметилированных форм гистона H3 H3K9me3 и H3K27me3 и гистоновых деацетилаз сиртуинов SIRT1 и SIRT6.
5. Изучить состояние ядерной ламины в исследуемых линиях с поиском возможных ассоциаций с АТ.
6. Изучить длины теломер в исследуемых линиях с поиском возможных ассоциаций с АТ.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Разработан и апробирован метод клеточной диагностики АТ, основанный на иммунофлуоресцентном выявлении в клетках активной формы АТМ (pАТМ) после действия генотоксических агентов – рентгеновского облучения в дозе 2 Гр, и радиомиметика блеомицина в концентрации 50 мкгр/мл.
2. Выявлены и описаны мозаичные формы АТ
3. При исследовании гистоновых деацетилаз SIRT1 и SIRT6 показано достоверное повышение количества SIRT6 во всех исследованных линиях АТ
4. При исследовании триметилированных форм гистона H3 H3K9me3 и H3K27me3 обнаружено достоверное повышение количества H3K27me3 в клетках больных АТ по сравнению с клетками здорового донора

Научная новизна работы.

Впервые предложен быстрый метод уточнения диагноза АТ на клеточном уровне.

Впервые описана мозаичность при АТ: выявлены пациенты, часть клеток которых не содержала Р-АТМ, что характерно для АТ, а часть – содержала, то есть соответствовала нормальному фенотипу.

Впервые было обнаружено повышение количества гистоновой деацетилазы SIRT6 в клетках пациентов АТ всех изученных форм по сравнению с клетками здорового донора и других пациентов с наследственными нарушениями репарации ДНК: неустановленный радиочувствительный синдром, синдромом Секкеля, при наличии мутации 5382insC в гене BRCA1 (семейная форма рака молочной железы).

Личный вклад автора. Все экспериментальные части работы были выполнены автором лично. Длины теломер измерялись совместно с Андреем Леонидовичем Руновым. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научными руководителями.

Финансовая поддержка работы. Работа проводилась при поддержке Российского Научного Фонда (РФФИ), гранты №12-06-00189а и № 14-15-00943, а также Программы Президиума РАН «Фундаментальные науки – медицине», гранты 2009-2014 гг.

Научно-практическое значение работы. Работа вносит значительный вклад в фундаментальные представления о причинах возникновения и развития наследственных синдромов с нарушением процессов репарации ДНК. Описанный при АТ мозаицизм, вероятнее всего возникающий путём гомологической рекомбинации гомологичных хромосом, демонстрирует недостаточность для развития нормального фенотипа наличия «здорового» аллеля хотя бы в половине клеток. В то же время разработанный и апробированный метод уточнения диагноза АТ и радиочувствительных синдромов на основе детекции в клетках пациентов Р-АТМ является крайне

важным для прикладной медицины уже используется врачами-клиницистами при постановке диагноза АТ в сложных случаях. Этот метод может быть использован для дальнейших разработок с целью его применения в пренатальной диагностике.

Учитывая то, что клетки от пациентов с АТ являются уникальной естественной моделью с нарушенным АТМ-зависимым сигнальным каскадом, полученные результаты наиболее близко подходят для понимания механизмов старения и трансформации в клетках человека, не страдающего АТ, по сравнению с искусственными моделями. Благодаря тому, что контрольная группа линий от пациентов с нарушениями репарации ДНК разнообразна, результаты исследования триметилированных форм гистона H3 - H3K9me3 и H3K27me3 и гистоновых деацетилаз SIRT1 и SIRT6 вносят значительный вклад в понимание эпигенетических процессов при ремоделировании хроматина в результате старения и трансформации клетки. Полученные данные о состоянии ядерной ламины и количества SA-β-Gal в исследуемых линиях также могут быть полезными при разработке клеточных методов оценки риска развития опухолей при старении, внося вклад в понимание механизмов «предтрансформационного» старения клетки.

I. Обзор литературы

1. Атаксия-телеангиэктазия

Синдром атаксия-телеангиэктазия (АТ), характеризующийся мозжечковой атаксией и кожно-конъюнктивной телеангиэктазией, в 1941 г. впервые описала французская исследовательница Луи-Бар, а в 1958 г. Бодер и Сэджвик предложили название АТ и выявили третий важный компонент этого синдрома - тяжелую рецидивирующую бронхо-легочную патологию. В дальнейшем Тейлор (Taylor, 1978 г.) предположил, что причиной чрезвычайно большого количества радиационно-индуцированных хромосомных аберраций

в клетках больных АТ, по сравнению с клетками здоровых доноров, является нарушение репарации ДНК при двунитевых разрывах, и именно это служит причиной повышенной радиочувствительности.

На сегодняшний день известно, что данный синдром (имеющий также названия: синдром Луи-Бар, синдром Бодера-Седжвика, ранняя прогрессирующая мозжечковая атаксия и цефало-окуло-кутанная телеангиэктазия) является тяжёлым прогрессирующим мультисистемным нейродегенеративным заболеванием из группы факоматозов, наследуемым по аутосомно-рецессивному типу (ОМIM заболевания: 208900, ОМIM гена *ATM*: 607585). Для больных характерны: патология центральной нервной системы (ЦНС), кожи, глаз, иммунологические нарушения, высокая предрасположенность к неоплазиям, преждевременное старение, а также резко повышенная чувствительность к ионизирующему излучению, ограниченная пролиферативная способность клеток и значительное укорочение теломер уже при рождении ребёнка.

Причиной заболевания является мутация в гене *ATM*. Ген локализован в 11 хромосоме (11q23), имеет размер 150 т.п.н. и содержит 66 экзонов (Savitsky et al., 1995; Lavin, Khanna, 1999; Pulverer, 2003).

Частота заболевания варьирует в различных популяциях от 1:40000 до 1: 100000-300000 населения, но доля гетерозиготных носителей гена *ATM* в популяции значительно выше, чем можно ожидать по распространенности самого заболевания, и составляет от 1 до 7%.

Слабо выраженные симптомы преждевременного старения и повышенный риск развития злокачественных опухолей обнаруживаются и у родителей больных – гетерозиготных носителей мутантного гена *ATM* (Спивак, 1999, Cancannon 2002).

Ранее в нашей лаборатории было экспериментально подтверждено, что в клетках больных АТ одновременно реализуются две противоположно

направленные клеточные программы: ускоренного старения – характерное изменение количества классических маркеров старения, таких как SA- β -gal, SAHF, HP1- γ , γ -H2AX, 53BP1; и трансформации – резкое снижение эффективности процессов репарации ДНК и высокий уровень хромосомных перестроек (Хомасуридзе и др., 1999; Полуботко и др., 2009а,б).

Опираясь на динамику процессов репарации ДНК после гамма-облучения, можно выявить не только наличие самого синдрома АТ, но и его гетерозиготное носительство (Спивак и др., 2005; 2007). Например, время, на которое достоверно различается появление детектируемых количеств белка Р53 после гамма-облучения в клетках здорового человека и больных АТ, равно 1 часу. Эта разница объясняется тем, что функцию АТМ по фосфорилированию Р53 через какое-то время способна взять на себя родственная протеинкиназа АТР, дефект которой, вызванный мутацией в гене АТР, приводит к развитию другого наследственного заболевания – синдрома Секея -го типа (ОМIM заболевания: 210600; МIM гена: 601215) (O'Driscoll et al., 2003). В клетках пациентов с АТ в ответ на повреждение ДНК появление p21Waf1/Cip1 – ингибитора циклинзависимых киназ – происходит со значительной задержкой (Полуботко и др., 2009а). На данный момент описано более 100 мутаций в гене АТМ, приводящих к АТ (Sandoval et al., 1999; Lee et al., 2013). Развитие болезни начинается обычно с двух лет и прогрессирует к 10 – 20 годам. Клиническая картина при разных формах АТ схожа, но в то же время характеризуется определенным полиморфизмом. Все больные АТ страдают ослабленным иммунитетом, кожно-конъюнктивной телеангиэктазией, имеют признаки ускоренного старения, но тяжесть неврологических и неоплазийных проявлений различна (Спивак, 1999, Shiloh, 2003, Lanzy et al., 1992).

2 Основные сигнальные пути в ответ на повреждения ДНК.

Протеинкиназа АТМ

Известно, что механизмы репарации ДНК специфичны для определенных типов повреждений. У высших организмов существует два основных сигнальных пути в ответ на повреждения ДНК. Один реализуется благодаря активности белка АТМ (ataxia-telangiectasia mutated), другой – через АТР ('ataxia telangiectasia' and 'rad3-related'). Киназы АТМ (350 кДа) и АТР (301 кДа) принадлежат к семейству фосфотидилинозитол-3-киназы (PI3Ks, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase) 4 класс PI3-киназ – суперсемейство фосфатидилинозитол-3 подобных серин-треониновых киназ, которые активируются непосредственно сразу же после активации сенсоров повреждений (Savitsky et al., 1995; Shiloh Y. 2003).

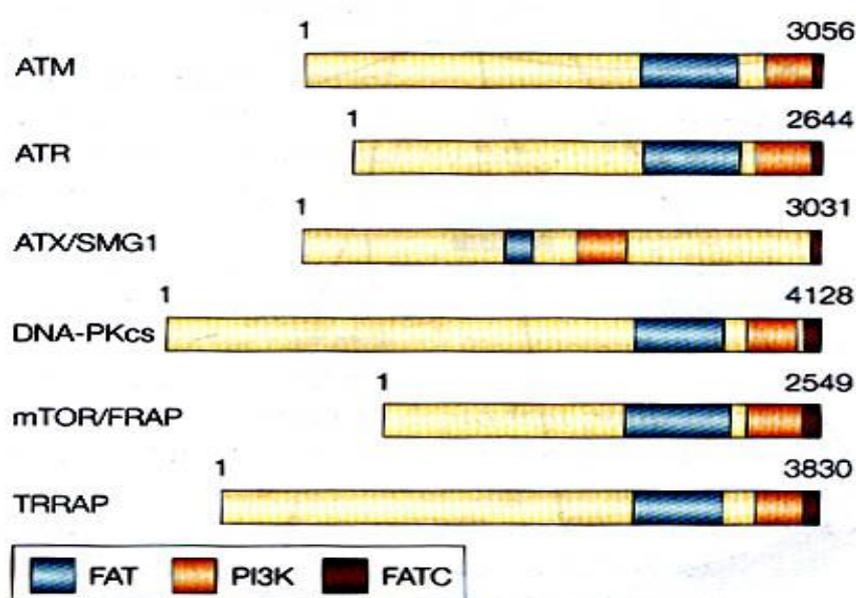


Рис.1 фосфатидилинозитол-3-киназы человека (Shiloh, 2003)

Сигнальный каскад, генерируемый в ответ на повреждение ДНК, включает в себя сенсорные, медиаторные и эффекторные белки и регулируется посттрансляционными модификациями белков: их фосфорилированием и ацетилованием. Клеточный ответ на двуцепочечные разрывы ДНК инициируется распознаванием поврежденного участка

молекулы сенсорными белками. Протеинкиназа ATM действует совместно с протеинкиназой NBS1 в качестве первичных сенсорных белков. В отличие от родственной протеинкиназы ATM, ATR важна в ответе на иные формы повреждения ДНК: ATR-зависимый сигнальный путь обеспечивает стабилизацию остановленных репликативных вилок и/или остановку на конкретном этапе клеточного цикла, а также по некоторым данным активируется наличием регионов одноцепочечной ДНК.

Белок ATM, неактивный или отсутствующий в клетках больных АТ, - протеинкиназа, являющаяся ключевым регулятором механизма клеточного ответа на повреждение ДНК. Функция ATM в процессе негомологичного воссоединения концов (NHEJ, non-homologous end joining) заключается в фосфорилировании нуклеазы Artemis. ATM активируется незамедлительно в ответ на двунитивые разрывы ДНК, вследствие чего происходят конформационные изменения в высокоупорядоченной структуре хроматина для эффективной репарации ДНК и прохождения ключевых точек клеточного цикла (Shiloh, 2003; Lavin, 2008). При этом протеинкиназа ATM, обычно находящаяся в неактивной димерной форме, автофосфорилируется по серину в 1981 положении и диссоциирует на две активные протеинкиназы – фосфо-ATM (P-ATM), моментально начинающие фосфорилирование более, чем 800 белков-мишеней как активируя, так и ингибируя их активность (Bakkenist et al., 2003, Lavin 2008). Одним из первых белков-мишеней P-ATM является протеинкиназа CHK2, фосфорилирующая в свою очередь фосфатазу Cdc25A (Falck et al., 2001), которая в фосфорилированной форме неспособна снять ингибирующее фосфорилирование циклин-зависимой киназы CDK2, что приводит к остановке клеточного цикла (Burdon et al., 2002). Другой механизм G₁-блока клеточного цикла опосредован реакцией фосфорилирования ATM белка P53, что приводит к стабилизации последнего и его накоплению в клетке после повреждения ДНК (Kruse, Gu, 2009; Mirzayans, 2012), а также проявлению его активности как фактора,

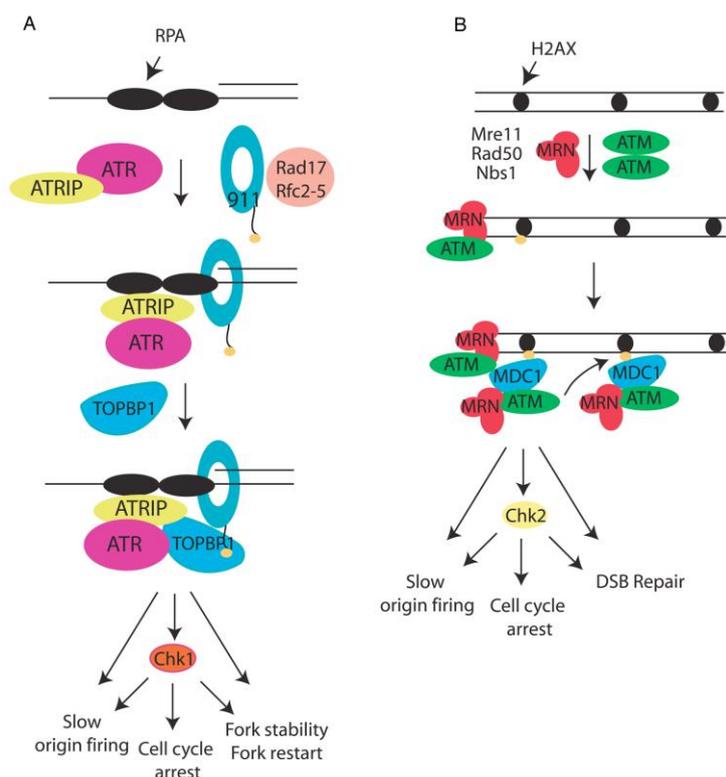
усиливающего транскрипцию ингибитора циклин-зависимых киназ P21Waf1/Cip1 (Westphal, 1997). Кроме того, такие мишени АТМ, как Nbs1, BRCA1, FANCD2, SMC1 принимают участие в процессах репарации ДНК и аресте S-фазы клеточного цикла (Kutagawa, Kastan, 2005; Taniguchi et al., 2002; Xu, O'Donnell et al., 2002; Zhan et al., 2010; Yazdi, 2002).

АТМ является одним из основных белков, вовлеченных в сохранение генетической стабильности, контроль длины теломеры и в активацию контрольных точек клеточного цикла. При АТ функционирование белка АТМ нарушено и, как следствие, становится невозможным адекватный ответ клетки на повреждение ДНК, что приводит к накоплению в ней нерепарируемых повреждений. В этих условиях резко повышается риск клеточной трансформации или вероятность быстрого перехода к состоянию необратимого прекращения пролиферации, т.е. преждевременному клеточному старению (Lavin, 2008).

До сих пор не совсем ясно, каким образом активируется сама АТМ, и какие белки являются для этой активации сенсорами. По современным представлениям это комплекс белков Mre11-RAD50-NBS1 и BRCA1, которые участвуют в распознавании именно двунитевых разрывов ДНК. Белки, называемые медиаторами, прототипом которых является дрожжевой RAD9, участвуют в передаче сигнала. Они содержат два повторяющихся домена, впервые обнаруженных в С-конце белка BRCA1 и названные поэтому BRCT-доменами. BRCT-содержащие белки найдены у млекопитающих, но имеют функции, сходные с дрожжевым RAD9. Среди подобных белков описаны сам BRCA1, TopBP1 (topoisomerase II binding protein I), 53BP1 (P53 binding protein I) и MDC1 (mediator of DNA damage checkpoint protein I). BRCA1 взаимодействует с большим числом белков, вовлеченных в процессы репарации ДНК, и собирает белковый комплекс, участвующий в инициации и передаче сигнала BASC (BRCA1 associated genom surveillance complex) и,

вероятно, одновременно является адаптором, предоставляющим дополнительные мишени для фосфорилирования киназам-переносчикам сигнала (Powell, Kachnic, 2003; Venkitaraman 2004). Некоторые исследователи полагают, что белок ATMIN (for ATM INerator) может играть ключевую роль в сигналинге ATM (Kanu, Behrens, 2008; Kanu et al., 2010; Rapali et al., 2011; Zhang et al., 2012).

Рис. 2 Схема активации протеинкиназ ATR и ATM (Cimprich, Cortez, 2008).



А) Комплекс ATR-ATRIP и комплекс 9-1-1 (Rad9-Rad1-Hus1 complex) связываются с ssDNA-5' праймера самостоятельно. RPA связывает ATRIP и направляет комплекс Rad17-RFC для запуска чек-пойнта в 5' конце. Запуск 9-1-1 приносит ATR активатор TopBP1 на сайт повреждения через взаимодействия с участием двух BRCT доменов TopBP1 и происходит фосфорилирование С-конца хвоста Rad9. TopBP1 связывает и активирует ATR ATRIP-зависимым способом, что

приводит к фосфорилированию последующей киназы CHK1 и других эффекторов ATR. В ответ на повреждение ДНК или репликативный стресс ATR и его эффекторы начинают медленно запускать и индуцировать арест клеточного цикла и также остановку вилок репликации.

В) Формирование концов двунитевого разрыва ДНК приводит к вовлечению комплекса MRN и к диссоциации димерной неактивной формы ATM к фосфорилированной мономерной форме ATM, которая связывает MRN комплекс с двунитевым разрывом и затем активирует ДНК и MRN комплекс. Активированная ATM фосфорилирует карбоксильный конец хвоста варианта гистона H2AX.

Фосфорилированный H2AX (γ -H2AX) связывается с MDC1 посредством его BRCT домена, что приводит к вовлечению дополнительных ATM/MRN комплексов и к последующему фосфорилированию H2AX. Активированная ATM также фосфорилирует мишени, среди которых CHK2. Фосфорилирование этих белков приводит к аресту клеточного цикла, ингибирование начала S фазы и инициирует репарацию двунитевых разрывов ДНК.

Эти два сигнальных пути после распознавания повреждений ДНК завязаны на фосфорилировании одних и тех же белков: H2AX, Rad 17, Rad1/Rad9/Hus1 комплекс, BRCA1, Chk1, 2-киназы, Nbs1/Rad50/Mre11 комплекса, p53.

Процесс репликации происходит в специализированных структурах – вилках репликации (рис 3). Остановившиеся вилки репликации активируют протеинкиназу ATR. Нуклеазы могут расщеплять остановившиеся вилки репликации, возникшие в результате двунитевых разрывов ДНК. Скорость, с которой ДР приводят к остановке вилок репликации, значительно увеличивается в клетках с нарушенным сигналингом ATR. ДР активируют ATM, а затем ATR, и этот процесс зависит от ATM и клеточного цикла таким образом, что активация протеинкиназы ATR происходит в основном в S и G₂. CHK1 и CHK2 – первые субстраты, которые фосфорилируют протеинкиназы ATR и ATM соответственно.

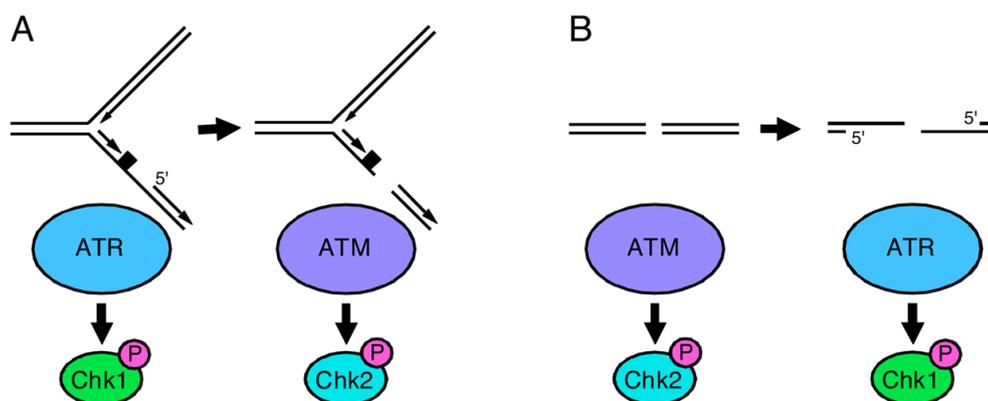


Рис.3. Взаимное преобразование ATR- и ATM- активации в ответ на повреждение ДНК (Cimprich, Cortez 2009)

2. Эпигенетическая регуляция хроматина при ускоренном старении

При таком серьёзном нарушении клеточного ответа на повреждение ДНК, как при АТ, происходит конформационное изменение хроматина (Shiloh, 2003; Lavin, 2008).

3.1 Структура хроматина

К началу XX в. было показано, что некоторые хромосомы или их фрагменты во время клеточного деления выглядят более конденсированно и интенсивно окрашенными. Это явление было выявлено Гютерцем в 1907 г. и названо гетеропикнозом (от греч. гетерос – иной, пикнозис – плотность), который может быть отрицательным при слабой окрашиваемости, и положительным – при сильной. В 1928 г. Хайц предложил термин «гетерохроматин» для обозначения районов хромосом, которые демонстрируют положительный гетеропикнозис для всех стадий клеточного цикла. Этот термин учёный предложил, исследовав поведение гетеропикнотических участков хромосом и интерфазных хромоцентров, когда он обнаружил, что плотные, сильно окрашенные районы хромосом не деконденсируются в телофазе, сохраняя свою плотность с последующим образованием хромоцентров в интерфазе. Позже Хайц предложил различать эухроматин и гетерохроматин. Их свойства различны. В первом случае термин обозначает основную часть митотических хромосом, претерпевающих обычный цикл компактизации – декомпактизации во время митоза, во втором – участки хромосом, постоянно находящиеся в компактном состоянии. У большинства видов эукариот хромосомы содержат оба вида хроматина. Как правило, значительную часть генома составляет гетерохроматин, который чаще всего располагается в прицентромерных и прителомерных областях. Также различают интеркалярный хроматин – гетерохроматиновые участки в эухроматиновых плечах хромосом.

В 1974 г. сразу четверо исследователей показали, что хроматин состоит из нуклеосом. Р.Д. Конберг обнаружил, что хроматин состоит из субъединиц, содержащих по 200 п.о. ДНК и по две молекулы четырёх типов гистонов. Н. Нолль изолировал эти структуры, а А. Олинс и Д. Олинс опубликовали первые электронно-микроскопические структуры нуклеосом. Сейчас известно, что нуклеосома содержит гистоновые и негистоновые белки, на которые намотана ДНК, состоящая из 147 п.о. (Campos, Reinberg, 2009). Существуют восемь основных гистоновых белков (составляющих октамер), на которые намотана ДНК (по два: H2A (28кДа), H2B (28 кДа), H3 (30 кДа) и H4 (22 кДа)) и линкерный гистон H1 (24 кДа), соединяющий коровые гистоны и ДНК.

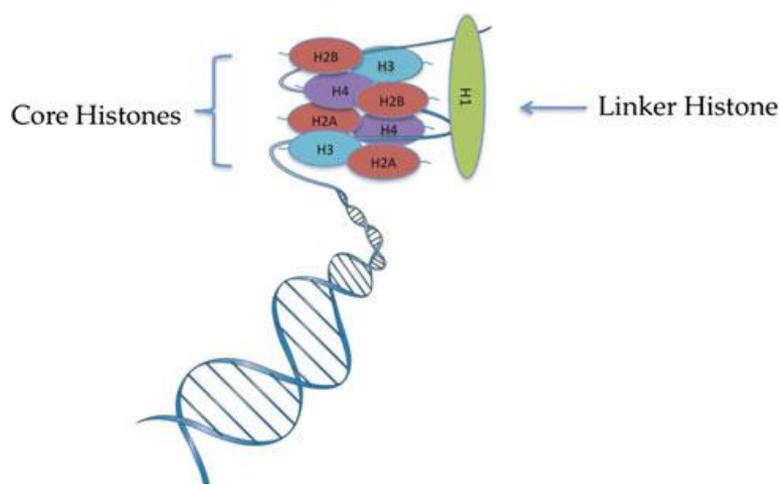


Рис.4. Строение нуклеосомы (Serravallo, et al., 2013)

В пределах нуклеосомы все гистоны занимают определенное положение и могут модифицироваться за счёт ковалентного связывания определенных молекул со свободными группами аминокислот. Один гистоновый октамер в нуклеосоме содержит примерно 220 положительно заряженных остатков лизина и аргинина и примерно 74 отрицательно заряженных остатков аспарагиновой и глутаминовой кислот. Также присутствуют 400 отрицательно заряженных фосфата, принадлежащих 200 парам оснований ДНК. Для «энергосберегающей» конденсации ДНК нуклеосомной структурой нейтрализовано только около половины

отрицательных зарядов ДНК, основные заряды нейтрализуются другими факторами: линкерным гистном H1, катионами и др.

ДНК является отрицательно заряженным полимером, в котором происходит электростатическое отталкивание между двумя соседними участками ДНК. По этой причине в клетках не бывает чистой ДНК – она упакована в нуклеопротеиновые структуры на всех этапах клеточного цикла (Olins and Olins 1974; Kornberg 1974; Woodcock et al. 1976). Митотические или мейотические хромосомы на стадии метафазы формируются каждый раз с очень большой точностью, сохраняя все соотношения длин плеч, размеров, особенности продольной дифференциации, подразделение на эу- и гетерохроматин. При этом на этой стадии ДНК наиболее конденсирована, упаковываясь и укорачиваясь в несколько тысяч раз для того, чтобы двухметровую растянутую молекулу сжать до размеров хромосомы (в среднем 15 мкм в диаметре), компактизовав её при этом более чем в 10000 раз. В основе этого процесса лежит механизм, удивительный по своей надёжности, которая достигается путём гиперфосфорилирования линкерного (H1) и корового гистона H3 и зависит от АТФ действия кондексиновых и когезиновых комплексов и топоизомеразы II. Точные механизмы модификации митотического хроматина посредством негистоновых комплексов до конца ещё не известны. Полагают, что в этом процессе играет роль хорошо известное митотическое фосфорилирование гистона H3 (т.е. серинов 10 и 28) и членов семейства H1, но полного понимания роли этих митотических меток пока нет. Существует теория, согласно которой, специфические метки, обусловленные метилированием, при сочетании с более динамичными и обратимыми метками, обусловленными фосфорилированием, могут действовать в гистоновых белках как «двоичный переключатель», управляя связыванием и высвобождением «эффекторов», затрагивающих хроматиновую матрицу (Fischle et al., 2003). Опираясь на связывание гетерохроматинового маркера HP1 с метилированным по лизину

9 гистоном H3 (H3K9me) и митотическое фосфорилирование серина 10 (H3S10ph), были получены данные в поддержку митотического «метил/фос-переключателя» (Daujat et al., 2005; Fischle et al., 2005; Hirota et al., 2005).

Говоря о динамике хромосом, нужно отметить такие специализированные хромосомные домены, как теломеры и центромеры, играющие фундаментальную роль в надёжном расхождении хромосом. Теломеры – концы линейных эукариотических хромосом, состоящие из простых коротких повторов (TAS – telomere-associated repeats), укорачиваются при каждом митозе и в определённых условиях восстанавливаются ферментом теломеразой. Они обеспечивают включение самых дистальных концов хромосом в репликацию ДНК, обеспечивают защиту концов хромосом от деградации, подавляют слияние хромосом у некоторых организмов облегчают спаривание хромосом в мейозе. Теломерные функции регулируются как механизмами на основе нуклеотидных последовательностей, так и эпигенетически. Барбара МакКлинтон первой описала явление «разрыв-слияние-мостик», при котором слияние между разорванными хромосомами или слияние концов хромосом приводят к образованию дицентрических хромосом и анафазных мостов, генерирующих дальнейшие разрывы. В работе на *Drosophila* было показано, что утрата конца теломеры у *Drosophila* может приводить к DSB в одном поколении, но в последующих укороченная теломера действует как полностью функциональная без какого-либо добавления ретротранспозонов или каких-либо изменений в последовательности (Ahmad and Golic, 1998).

В 1880 г. Флеммингом были впервые описаны центромеры как «первичные» перетяжки в хромосоме. В настоящее время центромеру (CEN) определяют как ДНК и белки хроматина, ответственные за формирование белковой структуры, облегчающей прикрепление микротрубочек и движение вдоль них – кинетохора. Кинетохор обращён к пластинке во время прометафазы и к полюсам во время анафазы митоза и мейоза и служит также

местом действия ключевой для клеточного цикла «контрольной точки», известной как «контрольная точка сборки веретена» (SAC, spindle assemble checkpoint), или «митотическая контрольная точка».

Теломерный и центромерный гетерохроматин отличается от эухроматина и от других гетерохроматиновых районов присутствием уникальных хроматиновых структур, которые в основном оказывают репрессивное действие на активность генов и рекомбинацию. Перемещение экспрессируемых генов из нормального положения в эухроматине в новое положение в центромерном гетерохроматине или поблизости от него может заставить гены «замолчать», создавая возможность скрининга для поиска и идентификации супрессоров или энхансеров эффекта положения мозаичного типа (PEV), либо эффектов прителомерного положения (TPE, telomere-position effects) (Gottschling et al., 1990; Aparicio et al., 1991). Центромеры и теломеры имеют молекулярные сигнатуры, такие как гипoaцетилированные гистоны. Центромеры вдобавок имеют гистоновый вариант CENP-A, играющий активную роль в сегрегации хромосом. Т.о., правильная сборка и поддержание различающихся центромерного и перицентромерного гетерохроматина являются критичными для завершения митоза или мейоза и, отсюда, для жизнеспособности клеток.

Помимо теломерной и центромерной форм конститутивного гетерохроматина исследуются механизмы эпигенетического контроля центромерной (и теломерной) «идентичности». Было показано, что вместо нормальных центромер могут функционировать «неоцентромеры», демонстрируя тем самым, что идентичность центромер не диктуется нуклеотидными последовательностями ДНК, т.е. данный специализированный хромосомный домен маркируется эпигенетическими особенностями. Это относится и к паттернам специфических для центромер модификаций и вариантов гистонов.

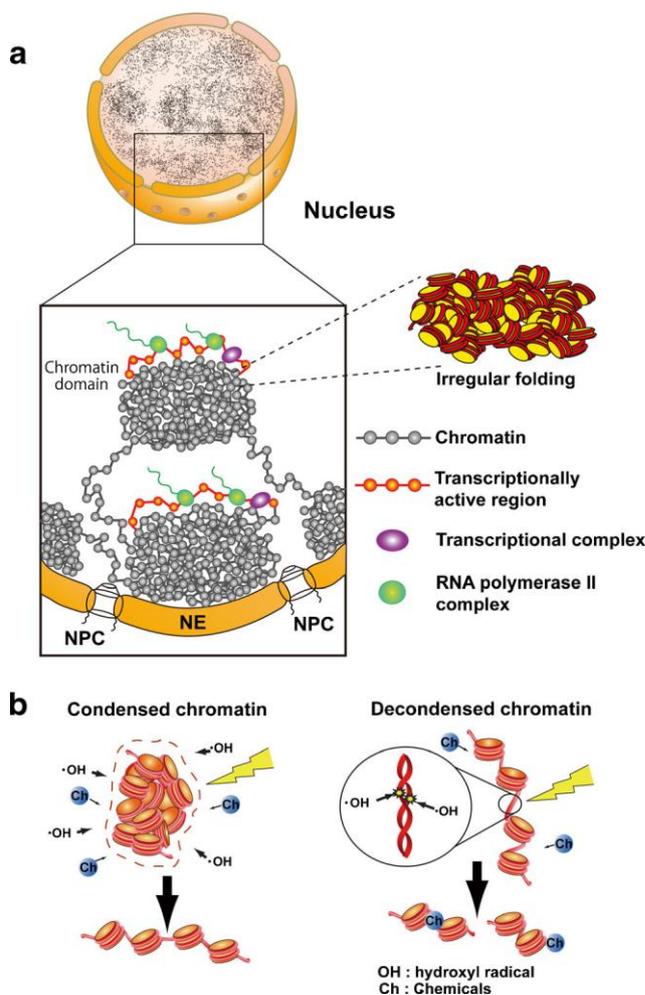


Рис.5. Высокоупорядоченная структура интерфазного хроматина (Maeshima et al., 2014).

а) Конденсированный домен хроматина. Активные регионы хроматина транскрибируются на поверхностях хроматинового домена с транскрипционным комплексом (фиолетовые кружки) и РНА полимеразе II (зелёные кружки). б) Строение ядерного порового комплекса и ядерной оболочки. Конденсированный хроматин более устойчив к радиации и химическому воздействию (слева). Активные радикалы, возникающие в результате радиолитического распада воды при облучении сильнее повреждают деконденсированный хроматин (справа). Деконденсированный хроматин также более подвержен химическому воздействию (с надписью “Ch”).

Споры о том, каким образом организована 30-нанометровая фибрилла хроматина, велись долгое время. На данный момент остановились на двух моделях: «соленоидная» (одностартовая спираль) модель, в которой нуклеосомы постепенно сворачиваются вокруг центральной оси (6-8 нуклеосом на один оборот), и более открытая модель типа «зигзаг», предполагающая самосборку более высокого порядка (двухстартовая спираль). Данные рентгеноструктурного анализа с использованием модельной системы, содержащей четыре нуклеосомы, позволяют отдать предпочтение двустартовой, зигзагообразной модели организации фибрилл, в которой линкерная ДНК соединяет две стопки нуклеосомных частиц (Khorasanizadeh, 2004; Schalch et al., 2005; Maeshima et al., 2014). При этом линкерный гистон H1 не присутствует в данных структурах.

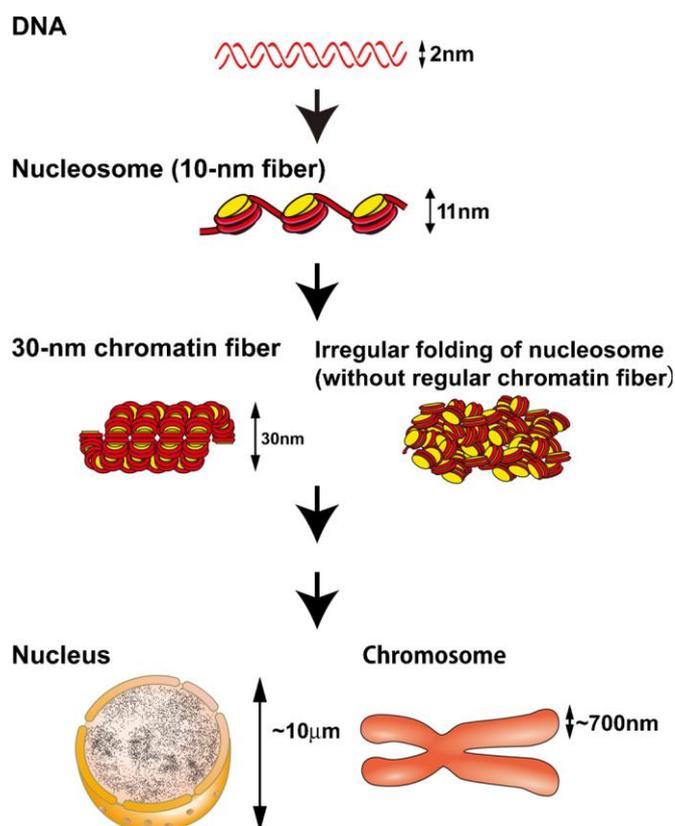


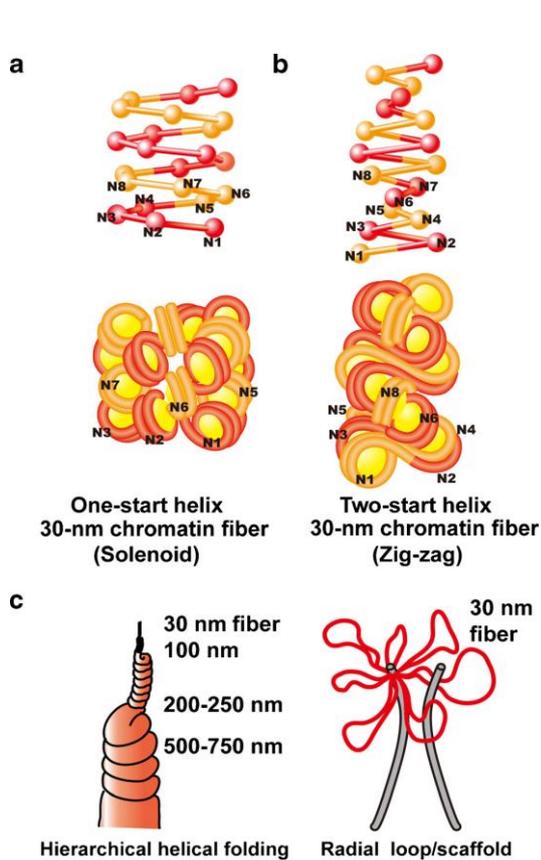
Рис.6. Структура хроматина (Maeshima et al., 2014)

Длинная молекула ДНК с диаметром 2 нм намотана на октамер корового гистона, формируя нуклеосому диаметром 10 нм. Долгое время считалось, что нуклеосома складывается в хроматиновые волокна 30 нм длиной и затем более высоко организуется в интерфазных ядрах или митотических хромосомах. Справа изображена история гипотезы нерегулярно сложенных хроматиновых волокон.

Благодаря методам, позволяющим метить специфические нуклеотидные последовательности ДНК в живых клетках, была изучена динамика «открытия» и «закрытия» хроматина *in vivo* в реальном времени, что позволило выявить динамическое взаимодействие позитивных и негативных факторов ремоделирования хроматина, ассоциированного с экспрессией генов (Fisher, Merkschlager, 2002; Felsenfeld, Groudin, 2003; Misteli, 2004). Результаты этих исследований также позволили выявить в интерфазных хромосомах множество уровней сворачивания хроматина (выше, чем 30-нм фибрилла). Например, модель радиальной петли (Laemmli et al. 1978), в которой многие петельные структуры 30- нм волокон хроматина обернуты вокруг несущей структуры, состоящей из конденсина и топоизомеразы IIα (Maeshima, Laemmli, 2003), образуя, т.о., петлевидные хроматиновые домены (300-700 нм). Некоторые исследователи полагают, что организация таких доменов происходит путём заякоревания хроматиновой фибриллы на периферии ядра или на других ядерных скаффолдах (остовах) с

помощью таких ассоциированных с хроматином белков, как ядерные ламины.

Рис. 7. Две классические модели 30 нм хроматиновых волокон высшего порядка (Maeshima et al., 2014).



а) один виток спирали (соленоид) б) два витка спирали (зигзаг). Схема двух различных вариантов строения волокон хроматина. Помечены позиции с 1-ой по 8-ую нуклеосомы. в) две классические модели структуры хроматина более высокого порядка: иерархическая винтовая модель фолдинга и модель радиальной петли. В модели радиальной петли многие петельные структуры 30- нм волокон хроматина (красный цвет) обернуты вокруг несущей структуры (серый цвет), состоящей из конденсина и топоизомеразы IIa.

Таким образом, в организации хроматина существует значительно больше уровней более высокого порядка, обуславливающих либо интерфазное, либо митотическое состояние, которые ещё предстоит различить.

3.2 Структура хроматина при двунитевых разрывах ДНК

При двунитевых разрывах ДНК структура хроматина претерпевает изменения: на месте разрыва ДНК происходит быстрая потеря нуклеосом, создавая короткие участки ДНК, свободные от нуклеосом вокруг разрывов. Высвобождение нуклеосом – ключевой этап репарации ДНК – является активным процессом, для которого необходим MRN комплекс (MRE11, RAD50 и NBS1) и ремодулятор хроматина Ino80 (Shroff et al., 2004; Tsukuda

et al., 2005; Berkovich et al., 2007). Пока до конца не известно, действует ли MRN комплекс на местах ДР напрямую при удалении нуклеосом, или он привлекает отдельный ремодулирующий комплекс, но известно, что он имеет как нуклеазную (Mre11), так и АТФазную (rad50) активность и быстро привлекается к концам ДНК в местах ДР (Lavin, 2007). Важную роль в репарации ДНК играет АТМ–зависимое фосфорилирование гетерохроматинового белка kap1, происходящее в местах ДР (Ziv et al., 2006; Goodarzi et al., 2008). До конца не ясно, каким образом фосфорилирование kap1 с помощью АТМ влияет на структуру гетерохроматина, т.к. фосфорилированный kap1 остаётся связанным с хроматином (Goodarzi et al., 2008). Известно, что kap1 является репрессором транскрипции, образуя комплексы с гистоновыми деацетилазами (HDACs), гистоновой метилтрансферазой и HP1, таким образом способствуя образованию репрессированных гетерохроматиновых доменов, возможно, из-за изменения взаимодействия kap1 с этими белками (Li et al., 2010). Другими словами, фосфорилирование kap1 и изменения в распределении HP1 необходимы для эффективной репарации ДНК, что делает структуру гетерохроматина компактной.

3.3 Эпигенетические модификации хроматина

Структура хроматина и экспрессия генов зависят и от эпигенетических изменений, проходящих без изменений в нуклеотидной последовательности ДНК. Типы эпигенетических модификаций представлены в табл.2.

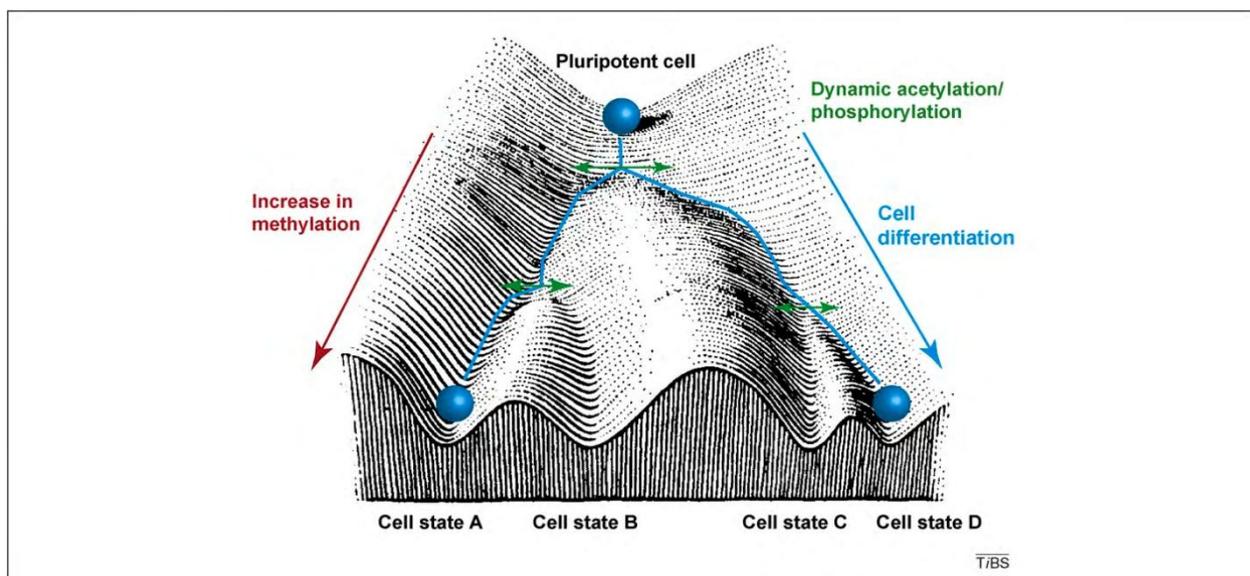
Табл 1. Типы эпигенетических модификаций

Тип модификации	Краткая характеристика
ДНК-метилирование	- химическая модификация, добавляющая метильные группы (CH ₃) на специфические сайты ДНК. Реакция ДНК-метилирования катализируется ферментом ДНК-метилтрансферазой, который осуществляет перенос метильной группы с S-аденозилметионина на цитозин, стоящий перед

вариантные формы гистонов	<p>гуанином.</p> <p>- коровые гистоны (за исключением H4) существуют в разных формах (вариантах). Пул гистона H3 в клетке состоит из вариантов H3.3 (требуются в течение всего клеточного цикла), CENP-A и H3.1, H3.2 (синтезируются в S-фазе). H3.3 ассоциирован с транскрипционно активными областями генов и богат посттрансляционными модификациями. H3.2 несет репрессирующие модификации, а H3.1 - и активирующие, и репрессирующие,</p>
ремоделлинг нуклеосомы	- изменение позиции нуклеосомы АТФ-зависимым путем
РНК-интерференция	- способ посттранскрипционного подавления экспрессии генов (сайленсинга, silencing), при котором двухцепочечная РНК (dsRNA) индуцирует деградацию гомологичной мРНК. Двухцепочечная РНК при этом распадается на короткие двухцепочечные фрагменты (21-25 п.о.), обозначаемые как малые интерферирующие РНК (small interfering RNA, siRNA).
модификации гистонов	- модификации гистонов (ацетилирование, фосфорилирование, метилирование, АТФ-рибозилирование, сумоилирование, убиквитинирование). Модификации могут быть активирующими и репрессирующими

Как именно клетка становится всё более детерминированной, а также как происходит увеличение дифференциации в процессе её развития, наглядно демонстрирует модель, представленная Конрадом Уэддингтоном (рису 8). Он сравнил развитие клетки с шаром, катящимся по долинам и возвышенностям к различным точкам назначения. На рисунке отражены различные типы модификаций гистонов, влияющие на развитие клетки. Динамические модификации гистонов (ацетилирование и фосфорилирование) меняют судьбу клетки в меньшей степени (зеленые стрелки), чем стабильные статические (метилирование), которые накапливаются в процессе развития и могут иметь большое влияние на окончательный вариант развития клетки (красная стрелка).

Рис 8. Различные типы модификаций гистонов на эпигенетическом ландшафте Уэддингтона



Под воздействием различных факторов (внутренних и внешних, генетических и негенетических) возможен переход с одной траектории на другую, в связи с чем, на основании одной и той же генетической программы возможно формирование множества траекторий онтогенеза (поливариантность онтогенеза). Траектории, получающие преимущество, Уоддингтон называл креодами. «Хребты», разделяющие траектории – репеллерами (от англ. to repel– отталкивать).

Хроматин претерпевает изменения в своей структуре за счёт двух процессов, тесно связанных между собой: изменение структуры хроматина большими моторными АТФазами и динамичная регуляция пост-трансляционных модификаций гистонов (Cairns, 2005; Campos, Reinberg, 2009).

Экспрессия генов может меняться при помощи различных эпигенетических механизмов, в том числе метилированием свободных аминогрупп лизина и модификацией гистонов. При метилировании ДНК метильные группы добавляются к определённым основаниям ДНК, удаляя положительный заряд NH^{+3} и, как следствие, подавляя генную активность.

Метилироваться могут аргинин и гистидин. Ферментативная модификация коровых гистонов происходит на гистновых, достаточно подвижных, терминальных N-хвостах, располагающихся вне нуклеосомы и имеющих сайты для регуляторных модификаций. При этом изменяется связь между гистонами и окружающей ДНК. В результате деацетилирования гистонов происходит уплотнение хроматина, которое приводит к предотвращению транскрипции генов, в то время как ацетилирование гистонов делает структуру хроматина более открытой, что позволяет происходить транскрипции генов. Фосфорилирование происходит по гидроксильной группе серина, а также по гистидину, внося фосфатную группу с дополнительным отрицательным зарядом. Изменение заряда белковой молекулы может повлиять на функциональные свойства всего октамера (Serravallo et. all 2013).

3.4 Посттрансляционные модификации гистонов

Хроматин не является однородной структурой, и в последнее время интерес к изучению вариаций в структуре хроматина резко возрос, что позволило углубить понимание механизмов, регулирующих геномные матричные процессы, в частности, посттрансляционных модификаций гистоновых белков (HPTMs, histone posttranslation modifications), являющихся центральной характеристикой этого геномного регулирования.

В 1960-е годы Винсент Олфри идентифицировал ацетилирование, метилирование и фосфорилирование гистонов, которые были также первыми распознанными убиквитинированными белковыми субстратами. В 2000 году Strahl и Allis предложили гипотезу, предполагающую, что существуют модификации гистонов, которые могут приводить к активации, либо репрессии транскрипции, и назвали её гистновым кодом. Гистоновый код представляет из себя паттерн N-концевой посттрансляционной модификации определённых аминокислотных остатков гистонов. Энзиматическая модификация гистонов – trans-эффекты ковалентных модификаций гистонов:

ацетилирование, метилирование, фосфорилирование и убиквитинирование, которые вовлекаются в сборку, поддержание структуры и модификацию эухроматина и гетерохроматина. Другими словами, множественные модификации, имеющие место в определенных местах гистонов, представляют собой код, который влияет на то, какие белки способны взаимодействовать с комплексами гистонов с ДНК и, следовательно, какие гены регулируются этими белками. Полного понимания механизмов действия гистонового кода пока нет, но считается, что гистоновый код потенциально может быть центральной эпигенетической функцией. Типы ковалентных посттрансляционных модификаций гистонов представлены в таблице 2.

Табл 2. Типы ковалентных посттрансляционных модификаций гистонов и ответственные ферменты. Группа 1 – модификации малыми химическими группами, группа 2 – более крупные химические модификации (Zhang, Pralhan, 2014).

модификация	ответственные ферменты	де-модифицирующие ферменты	роль
Группа 1			
Метилирование			
H2AR11, H2AR29	PRMT1, PRMT6		Репрессия транскрипции
H3R2	PRMT6		Репрессия транскрипции
H3K4	MLL1, MLL2, MLL3, MLL4, MLL5, SET1, SET7/9	LSD1, Swm1, Su(var)3–9, JHDM1b, KDM1A, KDM1B, KDM1C, KDM1D	Активация или репрессия транскрипции, взаимозаменяемые с H3R2 метилированием
H3R8	PRMT5		Негативная регуляция гена опухолевого супрессора NM23
H3K9	SUV39H1, SUV39H2, G9a, EHMT1	LSD1, JHDM2a, JHDM2b, JMJD2A, JMJD2B, JMJD2C, JMJD2D	Барьер для соматического перепрограммирования, вызванного дефицитом плюрипатентных стволовых клеток (iPSCs, deficient-induced pluripotent stem cells), гетрохроматиновый якорь для

			ядерной оболочки
H3R17, H3R26	PRMT4		Содействие транскрипции путём высвобождения корепрессоров из хроматина
H3K27	EZH1, EZH2	UTX, JMJD3	Молчание генов
H3K36	SET2, NSD1, NSD2, SMYD2	JHDM1a, JHDM1b, JMJD2A, JMJD2B, JMJD2C	Активация транскрипции
H3K56	G9a		Содействие репликации посредством стыковки с ядерным антигеном пролиферирующих клеток (PCNA, proliferating cell nuclear antigen)
H3K79	DOT1L		
H4R3	PRMT1, PRMT5		Молчание генов
H4K20	PR-SET7, SUV420H1, SUV420H2, NSD1	PHF2	Регуляция транскрипции, инактивации X-хромосомы, ответ на повреждения ДНК, митотический конденсат и репликация ДНК

Ацетилирование

H2AK5	Tip60	HDAC1, HDAC2	Активация транскрипции
H3K4, H3K9, H3K36	KAT2A, KAT2B	HDAC1, HDAC2	Активация транскрипции
H3K14, H3K18,	KAT2A, KAT2B, KAT3A, KAT3B	HDAC1, HDAC2	Активация транскрипции
H3K23	KAT3A, Tip60	HDAC1, HDAC2	Активация транскрипции
H3K56	KAT2A	HDAC1, HDAC2	Активация транскрипции
H4K5, H4K8, H4K12, H4K16	Tip60	HDAC1, HDAC2	Активация транскрипции

Фосфорилирование

H1.2S173, H1.2S172, H1.4S187	CDK2	PP2A1	Транскрипция в митозе
H2AS1	MSK1		Митоз, сборка хроматина, репрессия транскрипции

H2AS139	ATR, ATM, DNA-PK		Репарация ДНК
H2AXY142	Mst1 WSTF	EYA1, EYA3	Апоптоз и репарация ДНК
H2BS14	Mst1		Апоптоз и мейоз
H2BS32	RSK2		Сигналинг эпидермального фактора роста (EGF, epidermal growth factor)
H2BS36	AMPK		Транскрипция
H3T3	Haspin/Gsg2		Митоз
H3S10	Aurora-B, MSK1, MSK2, IKK-a	PP1	Митоз, мейоз и активация транскрипции
H3T11	Dlk/Zip	PPγ	Митоз
H3S28	Aurora-B, MSK1, MSK2	PP1	Митоз и быстрая ранняя активация
H4S1	CK2		Митоз, сборка хроматина, репрессия транскрипции
Группа 2			
Убиквитинирование			
H2B (K123)			Активация транскрипции
H2A (K119)			Репрессия транскрипции
Сумоилирование			
H3 (?), H4K5, H4K8, H4K12, H4K16, H2AK126, H2BK6, H2BK7, H2BK16, H2BK17			Репрессия транскрипции

Благодаря мощному методу иммунопреципитации (ChIP, chromatin immunoprecipitation), который с начала 1990-х годов начали активно использовать, было обнаружено, что гистоны и, в частности, сайты обратимого ацетилирования играют роль в регуляции генов и коррелируют с транскрипцией. Первая ядерная ацетилтрансфераза (НАТ) была выделена из так называемого макронуклеуса (очень крупного транскрипционно активного ядра в отличие от мейотического микронуклеуса) инфузории *Tetrahymena*

(Brownell at al., 1996), а первая деацетилаза гистонов (HDAC, отсутствие ацетилирования), была выделена посредством биохимической чистки их клеточных экстрактов (Taunton at al., 1996).

Ацетилтрансферазы гистонов НАТ рекрутируются активаторами, которые связываются обратимыми активирующими нуклеотидными последовательностями (UAS, upstream activating sequences). Этот фермент катализирует ацетилирование локальных гистонов, которые вносят вклад в транскрипцию. Деацетилазы гистонов (HDAC) рекрутируются репрессорами транскрипции, которые связываются с репрессивными нуклеотидными «обратными последовательностями течения» и деацетилируют локальные гистоны, внося вклад в репрессию транскрипции.

Белки НАТ могут ацетилировать остатки лизина на всех четырёх коровых гистонах, но разные энзимы обладают разной специфичностью в отношении предпочтительного субстрата, хотя каждый энзим редко «нацелен» только на один сайт. Ферментов HDAC, удаляющих ацетильные группы, существует множество (Kurdistani, Grunstein, 2003; Yang, Seto, 2003). Они распадаются на три каталитические группы, консервативные в эволюции от *S. cerevisiae* до млекопитающих, и которые обозначаются как энзимы типа I, типа II и типа III.

Более сложной модификацией гистонов является метилирование, поскольку оно может происходить как по лизинам, так и по аргининам. Кроме того, его последствия могут быть как позитивными, так и негативными по отношению к транскрипционной экспрессии в зависимости от положения остатка в гистоне. К тому же, по каждому остатку могут быть множественные метилированные состояния. Лизины могут быть моно- (me1), ди- (me2) или три- (me3) метилированными, тогда как аргинины могут быть моно- (me1) или ди- (me2) метилированными. В виду того, что на H3, H4, H2A и H2B имеется по меньшей мере 24 идентифицированных сайта метилирования лизинов и аргининов, число различающихся метилированных

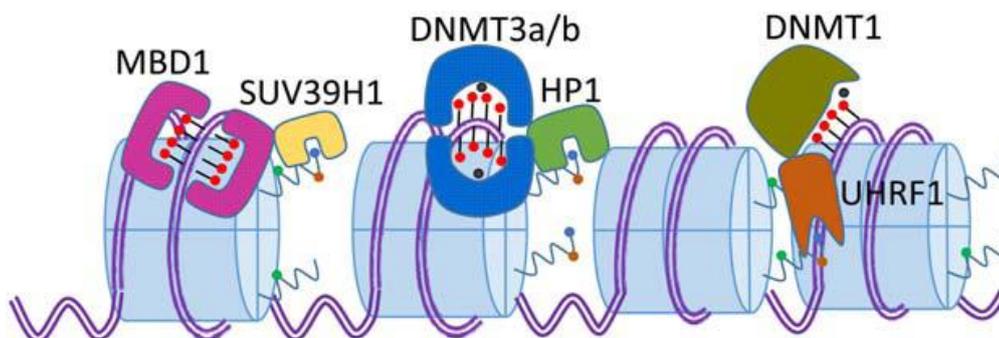
состояний нуклеосом невообразимо велико (Jenuwei, Allis, 2001; Martin, Zhang, 2005; Wysoka et al., 2006).

4. Триметилированные формы гистона H3 – H3K9me3 и H3K27me3 при трансформации и старении клетки

Тот факт, что лизиновые остатки в гистонах метилированы, был известен уже достаточно давно, однако биологическое значение этого факта стало понятно относительно недавно – после идентификации первой метилтрансферазы лизинов, использующей гистоны в качестве субстрата (Rea et al., 2000). На сегодняшний день идентифицировано большое количество лизиновых метилтрансфераз (HKMTs), и определены сайты, модифицируемые ими в гистонах (Martin, Zhang, 2005). Также известно, что все эти ферменты, за исключением Dot1, имеют общий домен SET, который содержит каталитически активный сайт и делает возможным связывание с S-аденозил-L-метиониновым кофактором. К настоящему времени хорошо охарактеризовано шесть сайтов метилирования: пять на H3 (K4, K9, K27, K36, K79) и один на H4 (K20). Каждый из шести этих белков распознают специфические белки-связки, имеющие домен узнавания лизина, относящийся к одному из трёх разных типов: хромо, тюдор и PHD-повтор.

Наиболее изученной модификацией гистонов является метилирование H3K9 (Рис 9). К тому же, метилтрансфераза HKMTs была идентифицирована первой (Rea et al., 2000).

Рис. 9. H3K9 метилирование и метилирование ДНК связи (Zhang and Pralhan, 2014).



Белок MBD1 может распознавать метилированную ДНК и привлекать SUV39H1, который является метилтрансферазой для H3K9; белок HP1 связывается с метилированным K9 гистона H3 и вовлекает DNMT3 к месту зарождающегося метилирования на ДНК; UHRF1 также может распознавать H3K9 метилирование и направлять DNMT1-метилирование, опосредованное метилированием ДНК. Усики с красными кружочками представляют метилированные динуклеотиды CpG; Синие кружочки – метилированные H3K9; чёрные точки представляют S-аденозин метиониновые субстраты для DNMTs.

Важной функцией метилирования H3K9 является участие в формировании перицентромерного гетерохроматина посредством кооперации двух белков: SUV39H (или Clr4 у дрожанковых дрожжей) и его паттерна по связыванию (или Swi6 у дрожанковых дрожжей [Nakayama et al., 2001; Noma et al., 2001]). Ряд исследователей предложили модель, в которой SUV39H метилирует H3K9, создавая платформу для связывания HP1 через его хромодомен (Bannister et al., 2001; Lachner et al., 2001), для последующего распространения HP1 на соседние нуклеосомы за счёт его ассоциации с SUV39H, который затем катализирует метилирование соседних гистонов (Nakayama et al., 2001). Помимо этого, HP1 ассоциируется сам с собой через домен «chromoshadow», значительно облегчая распространение гетерохроматина. Известно, что потеря H3S10 киназы Jil-1 у *Drosophila* приводит к увеличению метилирования H3K9 вдоль плеч хромосом и увеличению распространения гетерохроматина (Zhang et al. 2006). Тем не менее, остаётся неясным, каким образом распространение HP1 диктует формирование плотно упакованных гетерохроматиновых структур.

Исследования на растениях показали, что метилирование H3K9 необходимо для метилирования ДНК, по-видимому, действует и реципрокная связь, когда метилирование H3K9 зависит от метилирования ДНК. Работы на раковых клетках млекопитающих, у которых нет ДНК-метилтрансферазных ферментов (Dnmts), демонстрируют сниженные уровни метилирования H3K9. Возможно, это связано с тем, что связывающийся с метил-CpG белок 1

MBD1 (methyl-CpG-binding protein 1) ассоциируется с H3K9 НКМТ SETDB1 (Zhang, Reinberg, 2001; Martin, Zhang, 2005). Методом ChIP было выявлено, что в промоуторе генов млекопитающих метилирование по H3K9 также участвует в репрессии эухроматиновых генов. Однако механизм данного метилирования отличен от метилирования, встречающегося в гетерохроматиновых районах. Нужно отметить, что метилирование H3K9 и H3K27 характерно для областей транскрипционно неактивного хроматина (Peters et al., 2003), причем модификация H3K9me3 ассоциирована со структурами конститутивного гетерохроматина (Peters et al., 2003; Rice et al., 2003), а H3K27me3 является маркером факультативного гетерохроматина (Bernstein et al., 2002; Chandwick, Willard, 2004).

Метилирование H3K27 является репрессивной модификацией, обнаруживаемой в клетке в трёх разных местах: в эухроматиновых генных локусах, преимущественно в местах реагирующих элементов Polycomb (PREs, Polycomb Response Elements); в перицентромерном гетерохроматине и в неактивной X-хромосоме у млекопитающих. Ферментом, опосредующим метилирование H3K27 в клетках человека является EZH2, обнаруживаемый в ряде отдельных репрессивных комплексах Polycomb (PRCs). Важной функцией триметилирования H3K27 является репрессия транскрипции. Эта модификация является взаимозаменяемой с триметилированием H3K4, возможно, из-за пониженного родства H3K27me3 к SET1-like H3K4 метилтрансферазному комплексу (Kim et al., 2013). В двухвалентных доменах хроматина большие хроматиновые регионы H3K27 метилирования обычно являются платформой для небольших суб-регионов H3K4 метилирования, которые подавляют гены раннего развития (Ezhkova et al., 2011). Фосфорилированные субъединицы CBX2, которые участвуют в поддержании баланса между самообновлением и дифференцировкой стволовых клеток, демонстрируют повышенное предпочтение к связыванию с H3K27me3 и H3K9me3 модификациями гистона H3 (Natano et al. 2010).

Онкогенные сигнальные пути регулируют генную экспрессию частично через модификацию хроматина, в том числе метилированием ДНК и посредством модификации гистонов. Всё больше исследователей считают, что глобальные изменения в эпигеноме следует рассматривать как ключевые события в прогрессировании рака. Одним из таких примеров может служить недавно описанная патогенная роль усилителя *zeste* гомолога 2 (EZH2): его метилтрансферазная активность по лизину в 27 положении гистона H3 (H3K27) ассоциирована с генной репрессией. Результаты работы группы Jane-Sanz позволили при помощи анализа экспрессии геномных областей H3K27me3 и EZH2 связывания позволили считать триметилированную форму H3K27 (H3K27me3) прогностическим маркером, позволяющим выделить группы больных раком молочной железы с тяжёлым прогнозом заболевания, и благоприятным (Jane-Sanz et al., 2013).

Ряд работ свидетельствует, что уровень H3K27me3 резко повышается или снижается в специфических сайтах в зависимости от вида опухоли (Kondo Y. et al., 2008; Ke X. et al., 2009; McCabe M. et al., 2012). Показано, что триметилирование гистона H3 по лизину в 27 положении ассоциировано с репрессией транскрипции и регулируется PRC2 (Polycomb repressive complex 2), гистоновой метилтрансферазой, специфичной для H3K27 (Cao et al., 2002). Существует мнение, что данная модификация гистона H3K27me3 и группа белков комплекса Polycomb являются промоутерами для образования закрытой структуры хроматина, таким образом репрессируя транскрипцию (Francis et al., 2004; Eskeland et al., 2010). H3K27me3 контролирует молчание гена *HoX* и молчание X хромосомы, что является необходимым для нормального развития. Также существуют данные о том, что триметилирование гистона H3 по лизину K27 (H3K27me3) регулируется онкогенными формами в виде небольшого накопления ГТФаз Ras. Хотя точно известно, что H3K27me3 вовлечён в регуляции транскрипции, до сих пор остаётся неясным, являются ли изменения Ras, обусловленные

триметилированием H3K27, пусковым механизмом, или следствием изменения в транскрипционной активности (Hosogane et al., 2013). Было показано, что мутация Y641F в сайте связывания лизина в остатке тирозина, ассоциированная с повышенным трансформационным статусом, эффективно изменяет субстратную специфичность фермента, отменяя свою способность производить моно - и диметилированные продукты, таким образом, позволяя EZH2 производить триметилированный H3K27, резко увеличивая уровень модификации гистона (Kipp et al., 2013).

Найдена высокая корреляция между трансформационными процессами в организме и особенностями организации хроматина в соматических клетках: самая высокая корреляция обнаружена при репрессивной модификации гистонов H3K9me3, а затем H3K9me2 и H4K20me3. Считается, что более 55% различных видов рака связано с изменением уровня H3K9me3. Существуют данные о том, что кормление крыс с метильно-дефицитной диетой вызывает глобальное снижение гистонов H3K9me3 и H4K20me3 и способствует канцерогенезу (Pogribny et al. 2007). Интересны также работы, в которых было показано, что условия гипоксии вызывает ингибирование деметилаз семейства JARID и JmjD, а это в свою очередь приводит к возрастанию уровня метилирования гистонов H3K4me3, H3K9me3 в H3K36me3 в клетках разных тканей (Zhou et al. 2010; Tausendschon et al., 2011). Эти интересные наблюдения показывают, что некоторые деметилазы чувствительны к уровню кислорода в клетках и потенциально могут изменять каталитическое поведение в условиях гипоксии, которые присущи раневым участкам тканей и опухолям (Kolybaba, Classen, 2014).

При изучении гистонового кода старения в культурах диплоидных фибробластов было обнаружено, что интенсивность снижения количества клеток, содержащих триметилированные модификации гистона H3, прямо

пропорционально зависит от возраста донора. Резко сниженный уровень интенсивности флуоресценции H3K9me3 показан при прогерии детей – синдроме Хатчинсона-Гилфорда (Scaffidi, Misteli, 2006; Shumaker et al., 2006). Описаны специфические для клеточного старения изменения хроматина, влияющие на статус транскрипции и эффективность репарации ДНК (Ramírez et al., 2007). В тоже время с клеточным старением ассоциировано снижение эффективности репарации ДНК, в ходе которого также изменяется экспрессия генов.

Многочисленные работы позволили сделать вывод, что хроматин-опосредуемое старение возникает в связи с изменением в эффективной упаковке хроматина. Тесная упаковка молчащего хроматина играет важную роль в поддержании целостности генома. С возрастом это уплотнение ослабевает, что приводит к разрегулированию важных для выживания клетки локусов. В результате этого многие гены, активность которых должна быть подавлена, запускают транскрипцию, что приводит к эрозии хроматина и, в конечном счёте, потере целостности генома (Matharu, Mishra, 2011).

5. Гистоновые деацетилазы SIRT1 и SIRT6 при старении клетки

В клетках каждой ткани функционируют только те гены, которые экспрессируют белки, нужные для работы этой ткани. Остальные гены молчат. Их молчание обеспечивают специальные белки – сиртуины, или SIRT-белки (Silent Information Regulators), принадлежащие к III классу гистондеацетилаз. С момента открытия сиртуинов, которое произошло чуть более чем десять лет назад, интерес к ним моментально возрос из-за их функции эволюционно консервативных регуляторов продолжительности жизни. Было установлено, что у млекопитающих сиртуины регулируют два ключевых фактора, влияющие на процесс старения, - физиологические реакции на стресс и обмен веществ. Также они активно участвуют во многих клеточных процессах, таких как регуляция клеточного цикла, репарация и

пролиферация ДНК, контроль экспрессии генов, эпигенетические изменения, играют существенную роль в контроле обмена веществ и принимают участие в процессах воспаления и злокачественного роста.

Все сиртуины имеют НАД⁺ зависимый высоко консервативный каталитический коровый домен, представленный 250 - 270 аминокислотными остатками, который, в свою очередь, содержит большой домен - укладку Росманна, и малый – цинковую ленту с гибким спиральным субдоменом. Щель между этими двумя доменами образует туннель, облицованный гидрофобными аминокислотными остатками, в котором происходит катализ. Укладка Росманна содержит важную для связывания фосфата НАД последовательность Gly-X-Gly, а также небольшой карман и заряженные остатки, чтобы связать две группы рибозы НАД.

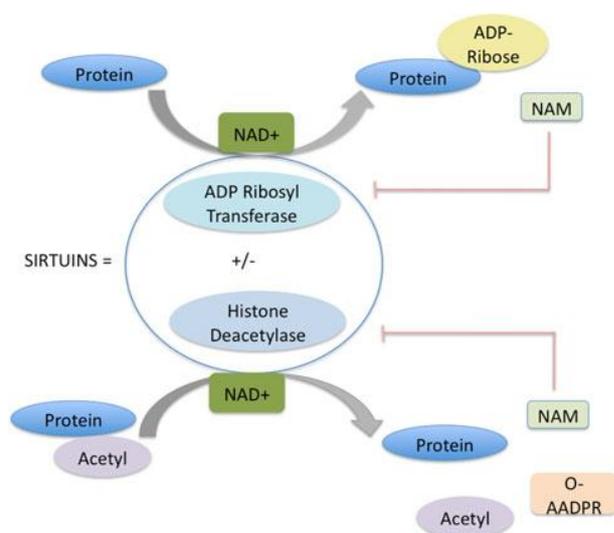


Рис 10. Сиртуины являются НАД⁺-зависимыми ферментами с гистнодеацетилазной (HDAC, Histone deacetylase) и/или АДФ-рибозил трансферразной активностью (ADPRT, ADP-ribosyl transferase) (Serravallo , et. all 2013).

В реакции деацетилирования сиртуины освобождают никотинамид (NAM, Nicotinamide) и *O*- ацетил-АДФ-рибозу (*O*-AADPR, *O*-acetyl-ADP-ribose). Никотинамид ингибирует активность сиртуинов через отрицательную обратную связь и, предполагается, что *O*-AADPR функционирует в качестве сигнальной молекулы. ADPRT активность является посттрансляционной модификацией белка, в результате чего добавляются одна или несколько АДФ рибозных групп.

Цинковая лента состоит из трех спиральных антипараллельных β -пластин, спирали и атома цинка, связанных и стабилизированных двумя парами цистеиновых остатков. Для инициации катализа сиртуину необходимы два ацетилированных субстрата - лизин и НАД, чтобы связать щель и укладку Росманна, образует при этом тройной комплекс. Субстратное связывание вызывает конформационное изменение, которое погружает ацетил-лизин субстрат в гидрофобный туннель. Эти конформационные изменения также образуют фермент-субстрат β -пластины и генерируют определенный заряд дестабилизации, способствующий продуктивному связыванию НАД.

В ходе этих процессов сиртуины расщепляют гликозидную связь, отделяя никотинамид от рибозных фрагментов с образованием никотиамида и промежуточного фермента АДФ-рибозы (Landry et al., 2000). После этого сиртуины передают ацетильную группу от ацетилированного субстрата к АДФ-рибозе, являющейся частью НАД, образуя 20-*O*-ацетил-АДФ-рибозу (Vorra et al. 2005; Zhao et al. 2004). Далее НАД освобождается с последующим образованием 20-*O*-ацетил-АДФ-рибозы и деацетилированного лизина. В отличие от в высокой степени сохранённой структуры в этом каталитическом домене всех членов данного семейства (Finnin et al. 2001; Min et al. 2001), N- и C- концевые участки, прилегающие к нему, сильно расходятся (Zhao et al., 2003) .

При старении, а также при повреждении ДНК, может изменяться экспрессия генов. В результате этих эпигенетических изменений сиртуины могут отсоединяться от локусов молчащих генов и перемещаться к поврежденным участкам ДНК, где способствуют их репарации (в этом – вторая функция сиртуинов, наряду с обеспечением молчания ненужных в данной ткани генов). Освободившиеся от сиртуинов молчащие гены перестают быть молчащими, и экспрессируемые ими, не нужные в данной

ткани белки нарушают нормальную работу её клеток и тем способствуют ускорению старения, изменяя экспрессию генов, чем способствуя освобождению от сиртуинов новых, ранее молчавших, генов (порочный круг).

Сиртуины модулируют активность многих белков, регулирующих клеточный цикл, например, белок Rb, действующий как опухолевый супрессор в гипофосфорилированном состоянии. Когда Rb фосфорилируется, циклин-CDK4, E2F-DP1 может отделяться от Rb и становится активным, активируя другие циклины и позволяя проходить фазам клеточного цикла. Деацетилирование белка Rb киназой SIRT1 приводит к фосфорилированию белка Rb, отделению Rb от транскрипционного фактора 2 (E2F, transcriptional factor 2) и, следовательно, завершению цикла.

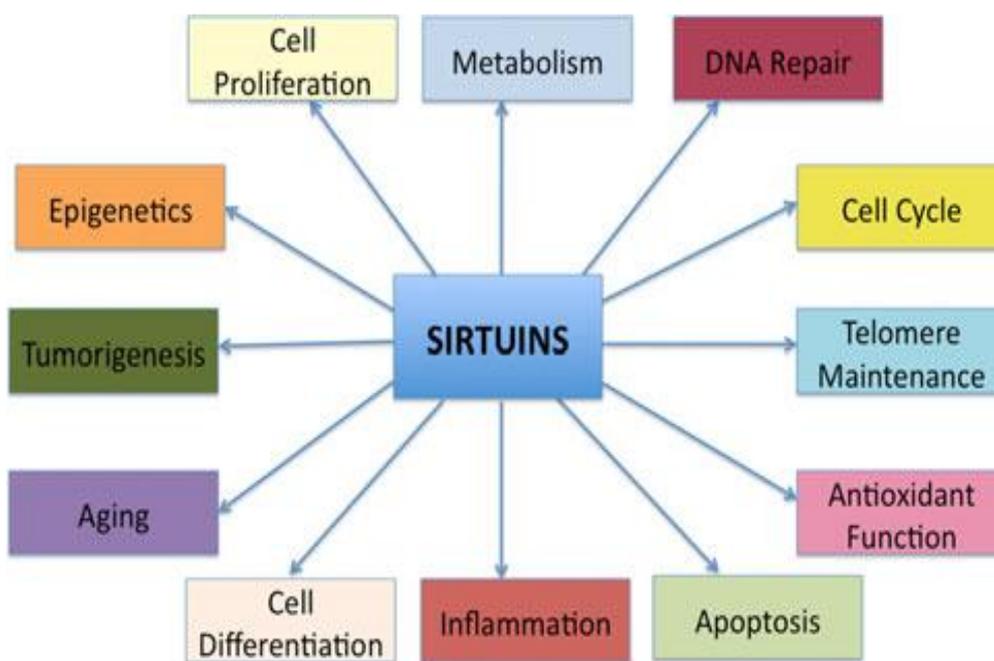
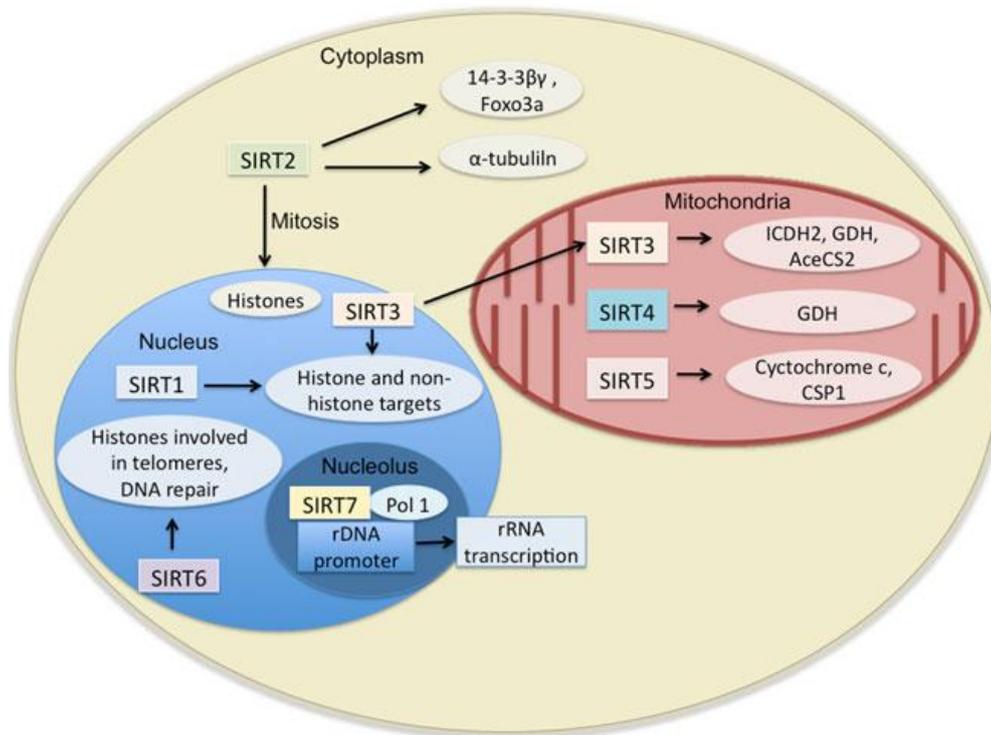


Рис. 11. Функции сиртуинов (Serravallo, et. all 2013)

Все белки этого класса являются регуляторными генами и обнаружены у всех живых организмов от бактерий до человека. Число членов семьи Sirtuin имеет тенденцию увеличиваться в зависимости от сложности организма. Прокариоты имеют от 1 до 2 видов сиртуинов, делящиеся дрожжи

мишени сиртуинов	конкретные примеры
Гистоны	H4-K16Ac, H3-K9Ac, H1-K26, H3K9
Регуляторы транскрипции	NF-κB, FoxO, PPARγ, PGC-1α, p300, LXR, UCP2 promoter, TIP60, E2F, c-Jun
Опухолевые супрессоры	p53, p73, Rb
Ферменты	AceCS, GDH, ICDH2, PARP1, MMP, Pol I
Структурные белки	α-тубулин
Белки репарации ДНК	Ku-70, NBS1, XPA, XPC
Клеточные сигнальные молекулы	SMAD7, 14-3-3β/γ
Транспортные белки	Цитохром-с

Рис. 13. Основное расположение и функции сиртуинов в клетке (Serravallo, et. all 2013).



5.1 Деацетилаза SIRT1

Деацетилаза SIRT1 является наиболее изученным белком данного класса и считается ядерным ферментом, хотя может появляться и в цитоплазме. Спектр его действия широк: он участвует в регуляции возрастных физиологических изменений, ассоциированных с возрастом заболеваний, включая диабет 2 типа, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, возникновении опухолей и многое другое. Некоторые учёные полагают, что увеличение активности SIRT1 положительно влияет на метаболизм млекопитающих, приводя к торможению старения и долголетию (Sato et al., 2010). SIRT1 проявляет свое действие через модуляцию гистоновых и негистоновых мишеней, перемещаясь между двумя клеточными компартментами в ответ на клеточный стресс, а также в процессе дифференцировки нейронных клеток-предшественников. Эти ядерно-цитоплазматические перемещения белка SIRT1 в том и другом направлении регулируются сигналами ядерной локализации SIRT1 и локализации выводимых из ядра аминокислотных последовательностей этого белка. Т.о. эти сигналы работают как в ядре, так и за его пределами в виде аминокислотных последовательностей белка SIRT1. Ядерная трансформация SIRT1 индуцирует его PI3K/Akt- и JNK1-опосредованное фосфорилирование (Nasrin et al., 2009) и представляется необходимой для проявления его защитных функций в клетке, тогда как биологическое значение цитоплазматического SIRT1 пока не выяснено.

Как было выше сказано, SIRT1 активируется повышением уровня НАД⁺ или косвенно различными малыми молекулами-активаторами, такими как ресвератрол, SIRT1720, активаторы АМПК) или ингибиторы PARP. Активация SIRT1 приводит к деацетилированию и активации многочисленных транскрипционных факторов, таких как PPAR gamma coactivator (PGC)-1 α , FOXOs, и p53. Их активация, в свою очередь, приводит

к повышению митохондриального биогенеза и способствует окислительному метаболизму путём повышения уровня ключевых митохондриальных ферментов, участвующих в конечном окислении, деградации жирных кислот и митохондриальном разобщении в некоторых тканях-мишенях.

На настоящий момент идентифицировано два белка, которые регулируют активность SIRT1 через прямое взаимодействие: AROS (active regulator of SIRT1) и DBC1 (deleted in breast cancer). Связывание ядерного белка AROS и SIRT1 усиливается SIRT1-опосредованным деацетилированием p53, ингибируя, таким образом, транскрипционную активность p53 и предотвращая p53-индуцированную остановку клеточного цикла и апоптоз в ответ на повреждение ДНК. В отличие от AROS, связывание DBC1 с каталитическим доменом SIRT1 ингибирует его активность, предохраняя SIRT1 от деацетилирования белками p53 и FOXOs, что приводит к клеточному стрессу и увеличению (активации) p53- и Foxo-опосредованного апоптоза.

SIRT1 может поддерживать стабильность генома, а может, наоборот, быть причиной дефектной репарации ДНК (рис. 14), что приводит к нестабильности генома (Oberdoerffer et al., 2008). Изменение SIRT1, индуцированное повреждением ДНК, происходит после сигнала через PI3 киназу ATM и одну из её мишеней – гистон H2AX. Показано, что SIRT1 работает на сайтах повреждения ДНК, чтобы реконструировать структуры хроматина для облегчения репарации в раковых клетках (O'Hagan et al., 2008; 2011).

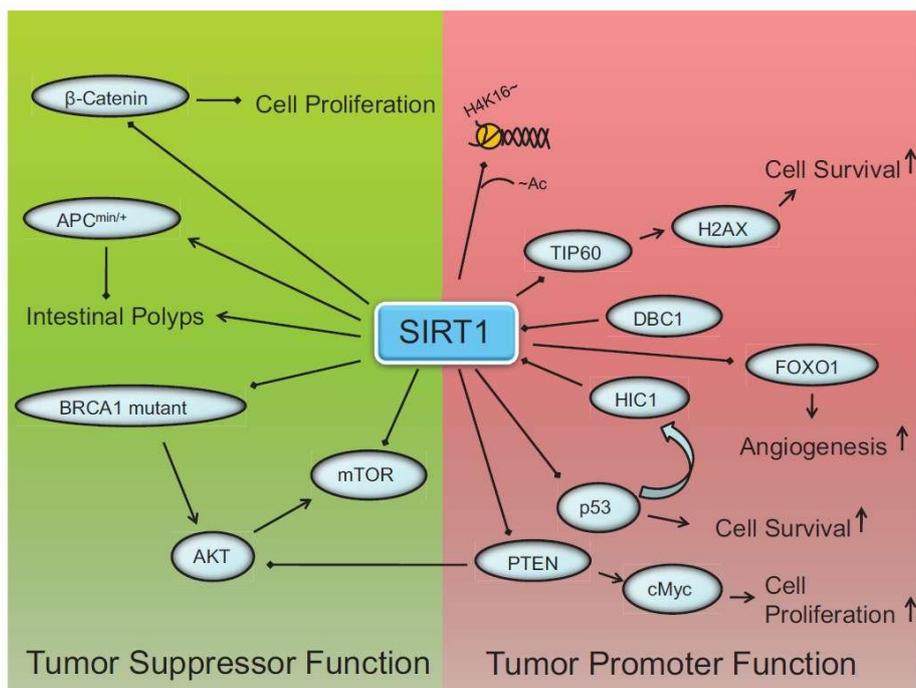


Рис.14. Влияние SIRT1 на трансформацию.

С одной стороны, активация SIRT1 может обеспечить выживание раковых клеток и пролиферацию, избегая пагубного воздействия повреждений ДНК на ключевые онкогены, при этом превращение сопровождается увеличением продукции активных форм кислорода (АФК) и окислительного повреждения ДНК. С другой стороны, интенсификация репарации ДНК под действием SIRT1 может привести к большему числу мутаций в раковых клетках, и в дальнейшем к нестабильности генома и развитию рака. Это подтверждается данными (Wang et al., 2013), показывающими, что SIRT1 способствует появлению генетических мутаций *de novo* и устойчивости к лекарственным средствам в клетках CML (хронической миелоидной лейкемии) и рака простаты. Способность SIRT1 усиливать мутации связана с его способностью увеличивать ошибки репарации ДНК в раковых клетках, в частности, через деацетилирующий ключевой фактор репарации NHEJ Ku70 (Wang et al., Oberdoffer et al., 2008).

Из-за пониженной генетической стабильности при потере SIRT1, SIRT1 гетерозиготные делеции ускоряют образование опухолей у p53^{+/-}

нокаутных мышей. Использование условных аллелей с оверэкспрессией SIRT1, который специфически экспрессируется в клетках, выстилающих кишечник, уменьшает избыточную экспрессию SIRT1 и вследствие этого, уменьшая кишечные опухоли у мышей с аденоматозным кишечным полипозом (APC)^{+/-min} (Roth,Chen, 2013).

Было показано, что SIRT1 ингибирует NF-κB путь, который способствует воспалению, выживанию клеток и образованию метастазов при раке. Кроме того, в соответствии функцией супрессора опухолей, SIRT1 действует на BRCA1, негативно регулируя антиапоптотический ген, тем самым подавляя его транскрипцию. Таким образом, BRCA1 абляция, благодаря снижению активности SIRT1, приводит к повышенным уровням сурвивина и усиливает рост опухоли (Wang et al., 2008).

В своей работе (Herranz et al., 2011) представили результаты 3-летнего исследования на трансгенных мышях с избыточной экспрессией SIRT1. Оказалось, что повышенная экспрессия SIRT1 в три раза улучшает состояние старых мышей и снижает количество спонтанных карцином и сарком, а также заболевания раком печени. Хотя исследования на мышях показали, что SIRT1 может иметь функцию подавления роста опухоли, до сих пор не найдены какие-либо мутации или делеции в SIRT1, или активатор гиперметилирования SIRT1, приводящие к раку у человека.

Активность и экспрессия SIRT1 снижается с возрастом в некоторых тканях. Например, в почках и в клетках поджелудочной железы, что связано с уменьшением биосинтеза НАД. Взаимодействие между SIRT1 и FOXO3B, чья транскрипционная активность регулируется SIRT1, также снижается с возрастом мышей. (Satoh et al., 2011) и при ускоренном старении (Sommer et al., 2006; Pallas et al., 2008), как и во время репликативного старения в нормальных человеческих фибробластах (Michishita et al., 2005). Эти данные убедительно свидетельствуют о том, что экспрессия и/или активность SIRT1

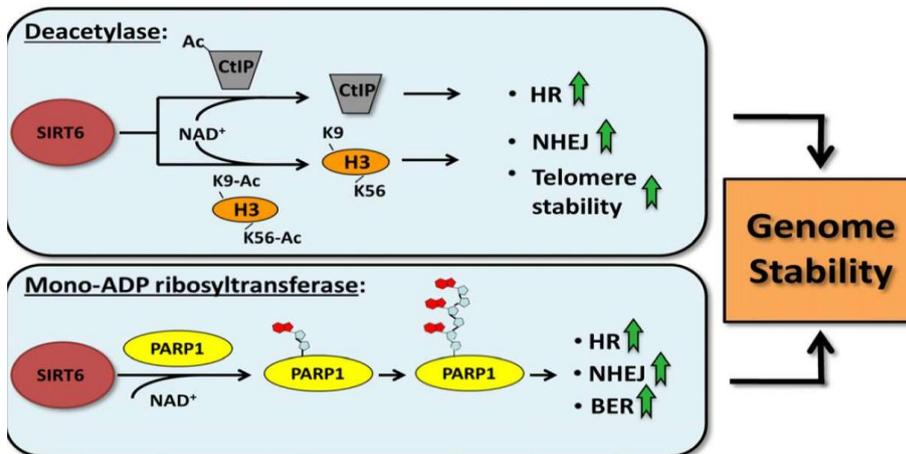
может предотвращать старение и возрастные заболевания. Интересно, что при старении действие генов-мишеней, связанных с SIRT1, подавляется окислительным стрессом в мышечных эмбриональных клетках, и их активность также уменьшается в мозге мыши. Гиперэкспрессия SIRT1 может подавлять эти возрастные изменения.

Многие исследователи полагают, что SIRT1 может быть потенциальной терапевтической мишенью для борьбы с нарушением обмена веществ; он также играет важную роль в циркадных ритмах, регулируя CLOCK/BMAL1.

5.2. Деацетилаза SIRT6

В отличие от SIRT1, SIRT6 описан не так подробно. Известно, что он также играет важную роль в регуляции старения и долголетия. У нокаутных по SIRT6 мышей наблюдался фенотип преждевременного старения, тяжелая лимфопения, потеря подкожного жира, остеопения и нарушения обмена веществ. Погибают такие мыши в возрасте 4 недель (Mostoslavsky et al., 2006). SIRT6 модулирует теломерный хроматин, деацетилируя лизин 9 гистона H3 (рис 15) и предотвращая тем самым теломерную дисфункцию и раннее клеточное старение (Michishita et al., 2008).

Рис.15. Регуляция SIRT6 стабильности генома (Michishita et al., 2008).



Кроме того, SIRT6 ослабляет передачу на хроматин сигнала NF- κ B по деацетилирующему лизину 9 гистона H3, ингибируя апоптоз и клеточное старение (Kawahara et al., 2009; Mahajan et al., 2011). Эти результаты дают основание полагать, что увеличение SIRT6 может замедлить возрастные физиологические изменения, таким образом, возможно, увеличить продолжительность жизни. Было показано, что SIRT1 участвует в поддержании экспрессии SIRT6 при недостатке питательных веществ как *in vivo*, так *in vitro* (Kim et al., 2010).

Помимо этих функций деацетилазы SIRT6, было показано, что она участвует в процессах воспаления, деацетелируя определённые промоторы субъединицы RelA/p65. Гиперэкспрессия SIRT6 приводит к увеличению TNF- α продукции при помощи пост-транскрипционных механизмов (Seravallo et al., 2009).

Таблица 4. Участие SIRT1 и SIRT6 в некоторых наследственных болезнях нарушения репарации и ускоренного старения

Участие SIRT1 в других наследственных болезнях			
Заболевание (тип наследования)	Этиология	Клинические особенности	Сиртуин и соответствующая ему роль

Атаксия-телангиэктазия (аутосомно рецессивный т.н.)	Мутация в гене ATM, вовлечённом в контроль клеточного цикла и ответ на повреждение ДНК	Прогрессирующая мозжечковая атаксия, окулокутантные телеангиэктазии, преждевременное поседение волос, сухость кожи, атрофия кожи, нарушение иммунитета, рецидивирующие бактериальные и/или вирусные синопульмонарные инфекции, задержка роста и эндокринные нарушения, злокачественные образования (особенно лимфомы и лейкомии)	SIRT1 деацетилюет TIP60 с последующим ингибированием TIP60/ATM/p53 опосредованного апоптоза
Кауден синдром (аутосомно доминантный т.н.)	Мутация в гене PTEN, фукцинатдегидрогеназа мутация, или гиперметилирование протооторных генов ДНК	Увеличение частоты злокачественных образований, особенно молочной и щитовидной желёз, гамартомы, макроцефалия и особенности слизисно-кожного кандидоза, такие как трихимомы и папилломатозные узелки	SIRT1 вовлечён в эпигенетическую регуляцию через его взаимодействие с ДНК метилтрансферазой 1
Дискератоз врождённый (X-хромосомно рецессивный, аутосомно-доминантный и аутосомно – рецессивный т.н.)	Мутация в гене DCK1, кодирующий дискерин, компонент РНК, мутация в теломеразе приводит к резкому укорочению теломер (X-хромосомный рецессивный т.н.). Несколько других фажных генов, участвующих в функции теломер: TINF2 (аутосомно - доминантный), TERT (аутосомно-доминантный и аутосомно-рецессивный), NOLA2/NHP2, NOLA3/NOP10 и TCAB1 (аутосомно - рецессивный).	Ретикулярная коричневая гипер и гипопигментация с телангиэктазиями и атрофией, дистрофия ногтей с продольными рубцами (часто с ранним проявлением синдрома), предраковые дейкоплакии полости рта, увеличение случаев рака (включая острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), плоскоклеточный рак головы и шеи, кожи и аноректальной карциномы)	SIRT6 вовлечён в поддержание теломер

6. Ядерная ламина при старении клетки

Ядерная ламина (Takahashi et al. 1996; Orth et al., 1996) является жёсткой структурой, подстилающей ядерную мембрану и причастной к организации хроматина. Она сформирована последовательностью одинаково ориентированных полимеров белков – промежуточных филаментов, называемых ламинами, и представляет собой фиброзный слой ядерной оболочки с поровыми комплексами, расположенный на границе между хроматиновыми филаментами и ядерной мембраной (Hutchison, Worman, 2004; Mounkes, Stewart 2004; Zastrow et al. 2004; Smith et al. 2005). Все ядерные ламины имеют α -спиральные гептаповторы ламинов и образуют би-спиральные димеры, которые объединяются по типу «голова в хвост» в нити от поры к поре (Рис. 16).

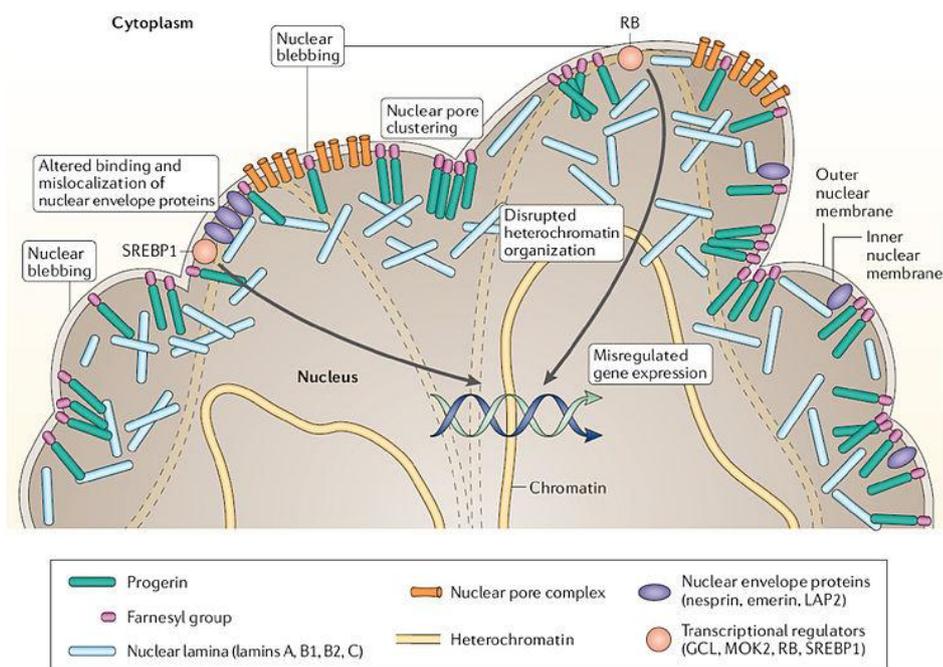


Рис.16. Строение ядерной ламины.

Также ядерная ламина служит каркасом для крепления ДНК-белковых комплексов, которые регулируют как эу-, так и гетерохроматиновую модификацию гистонов. Помимо этого, ламина контактирует с ядерными

РНК. Ядерная ламина вовлечена в регуляцию многих важных биологических процессов, включая репликацию ДНК, транскрипцию, регуляцию клеточного цикла и организацию хроматина.

Учитывая центральную роль ядерной ламины в таком широком диапазоне важных клеточных процессов, не удивительно, что изменения в структуре ядерной ламины могут иметь значительное влияние на нормальную клеточную функцию, а в некоторых случаях приводят к болезням или даже летальным последствиям. В клетках позвоночных она формируется в основном из ламина А (646 аминокислотных остатков), ламина В и ламина С (572 аминокислотных остатка). Ламин В имеет две формы: ламин В1 (586 аминокислот) и ламин В2 (600 аминокислот). Молекулярная масса трех главных полипептидов матрикса - примерно 60-75 кДа (Heald, McKeon, 1990; Luderus et al., 1992).

У человека ламин А кодируется только одним геном - *LMNA* (Entrez Gene ID: 4000), локализованным на 1q21.2 хромосоме, ламин В кодируется двумя генами – *LMNB1* и *LMNB2* (Entrez Gene ID: 4001 и 84823), локализованными на 5q23.2 и 19p13.3 хромосомах соответственно. В результате ассоциации трех главных полипептидов, путем димер-димерного взаимодействия происходит их укладка в 10-нм структуры, присоединяющиеся к специфическим белкам ядерной мембраны через С-ламин. Ламин А осуществляет связь между С и В ламинами (Surdej et al., 1991). Важной функцией полипептидов ядерного матрикса является дезинтеграция ядерной оболочки в процессе митоза (Halikowski, Leiw, 1987; Bailer et al., 1991).

В то время, как ламин С синтезируется сразу в виде зрелого белка, ламин А продуцируется сначала из предшественника – преламина А (664 аминокислотных остатков) 74 кДа, который претерпевает 4 шага посттрансляционных модификаций, включая фарнезелирование, двойное

эндопротеазное расщепление и карбоксиметилирование (Maraldi, Lattanzi, 2007).

В случае LMNA важным шагом в биосинтезе белка и созревании белка является процесс фарнезилирования на С-конце с помощью фермента фарнезилтрансферазы. Эта посттрансляционная модификация играет роль в ориентации преламина А к внутренней ядерной мембране. Фарнезилирование включает в себе несколько этапов, включающих эндопротеолитическое расщепление последних трёх аминокислот при помощи цинковой металлопротеазы ZMPSTE24, карбоксиметилирование С-концевого цистеина метилтрансферазой ICMT и протеолитическое удаление последних 18 аминокислот протеазой ZMPSTE24. В результате удаляется фарнезилиновый хвост на С-конце и происходит высвобождение зрелого ламина из его мембранного якоря, что приводит к его правильному расположению в ядерной мембране. Факторы, нарушающие эти шаги и влияющие на созревания ламина, могут иметь негативные последствия для ядерной ламины и, в конечном счёте, могут привести к нежелательным эффектам, влияющих на здоровье и долголетие.

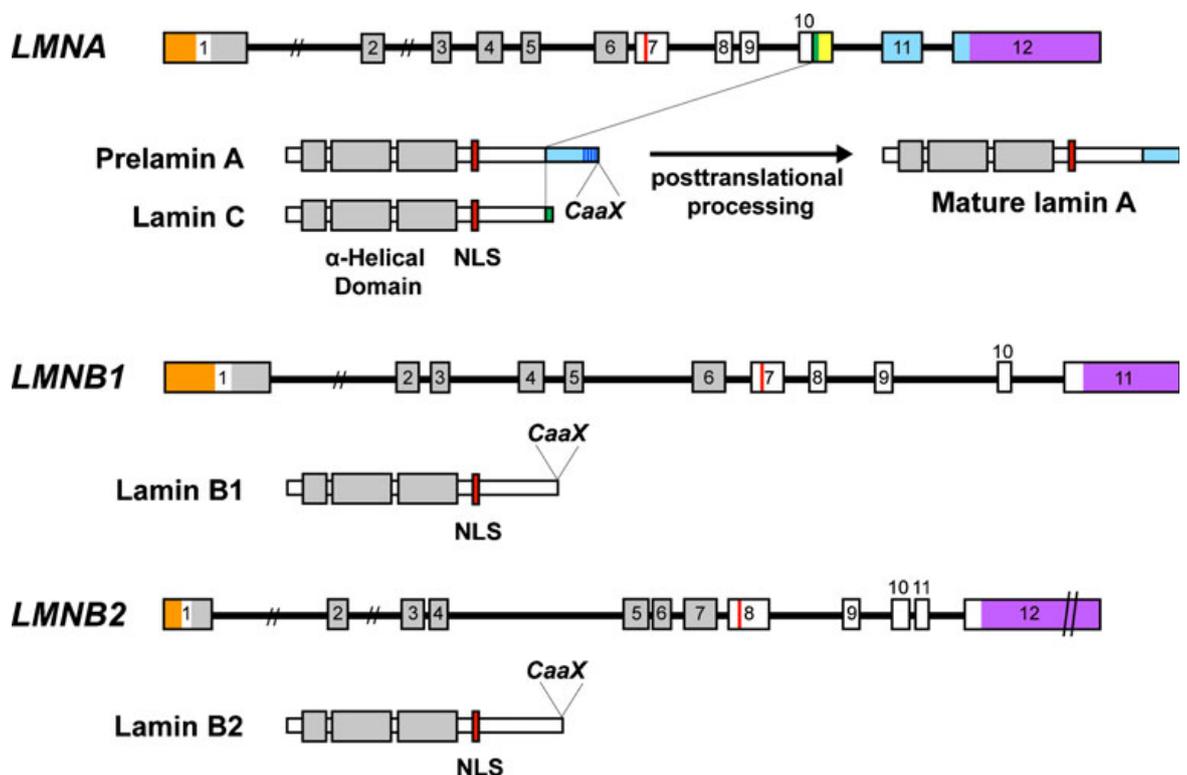


Рис 17. Схематическая диаграмма генов и структуры ядерной ламины (Jung et al., 2012).

Все ядерные ламины имеют α -спиральный центральный стержневой домен (серый цвет), окружённый глобулярными головками и хвостовыми доменами. Хвостовые домены содержат сигнал ядерной локализации (красный цвет). Преламин А и ламин С являются альтернативными продуктами сплайсинга одного гена *LMNA*. Ламин С заканчивается на 10-м экзоне последовательности гена *LMNA* и содержит 6 уникальных аминокислот в карбоксильном конце (зелёный цвет). Преламин А содержит последовательность из 11-го и 12-го экзонов, включающих 98 уникальных аминокислот в его карбоксильном конце (синий цвет). 3' UTR для ламина С обозначен жёлтым цветом, для других ядерных ламинов – красным. 5' UTRs обозначен оранжевым цветом. Ламин А формируется из преламина А в ходе серии из 4 посттрансляционных изменений, включающих удаление 18 аминокислот преламина А. Ламин В1 и ламин В2 продуцируются независимыми генами *LMNB1* и *LMNB2*. Все ламины (за исключением

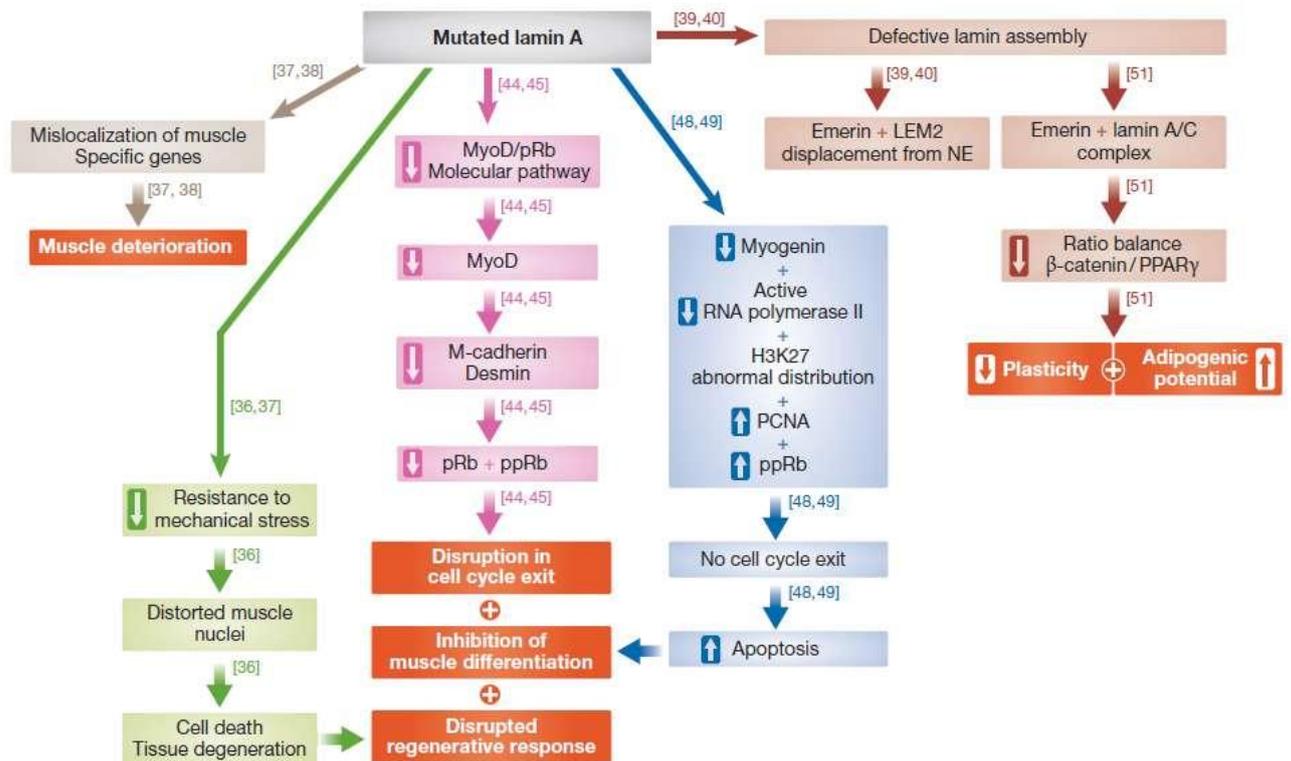
ламина С) содержат карбокситерминальные СaaX мотивы, которые запускают фарнезелирование. Фарнезелированные сегменты преламина А (голубые полосы) удаляются во время биогенеза зрелого ламина А.

Мутации в гене *LMNA* и последующие изменения в структуре и функциях белков могут привести к широкому спектру заболеваний, известных как ламинопатии. Такие заболевания характеризуются тяжёлым спектром клинических симптомов и осложнений, в некоторых случаях могут приводить к гибели. В последнее время описывается всё больше мутаций как в локусах самого гена, так и в генах, кодирующих ламин-связывающие белки.

В гене *LMNA* описано более 400 точечных мутаций, многие из которых являются основными причинами ламинопатий. При мелких минорных мутациях в ламине А наблюдаются дефекты в гетерохроматине и H3K9me3 (Goldman et al., 2004; Scaffidi et al., 2005; Shamaker et al., 2006).

Как известно, в эукариотических клетках ядерный компартмент отделён от цитоплазмы внутренней и наружной двуслойной ядерной мембраной, пронизанной ядерными порами, представленными большими мультибелковыми комплексами примерно из 30 белков. В ядрах многоклеточных ядерная оболочка выстлана непрерывной сетью ламинов и ламин-ассоциированных белков (LAPs), которые преимущественно ассоциированы с неактивными хроматиновыми регионами (Pickersgill et al., 2006). Было обнаружено, что примерно 500 генов ламин-ассоциированы и при этом наблюдалась гистоновая модификация и транскрипционная неактивность (Pickersgill, et al, 2006).

Рис. 18. Возможные нарушения в клетке при мутации в гене *LMNA* (Zuela et al., 2012).



Показано, что при прогерии происходят характерные изменения, ассоциированные с синтезом прогерина в зрелом ламине А, и нарушения балансов в уровнях этих белков влияют на ключевые биологические процессы, происходящие на клеточном и молекулярном уровнях. Прогерин накапливается во всех тканях пациентов с HGPS, действуя в качестве доминантно-негативного белка, который в значительной степени изменяет структуру ядерной оболочки. Клеточный фенотип таких пациентов включает в себя ядерный блеббинг, истончение ядерной оболочки, потерю периферического гетерохроматина и кластеризацию ядерной поры.

Накопление прогерина в нуклеоплазме приводит к ухудшению транспортировки некоторых факторов, играющих ключевую роль в функционировании ядра и, в конечном итоге, – к ускоренному старению или увеличению апоптоза (Bridger, Kill, 2004): при HGPS наблюдается нарушение в модификации гистонов, изменение в экспрессии генов, задержка в ответе на повреждение ДНК, нарушение митоза и цитокинеза, нарушение в сегрегации хромосом и увеличение количества двуядерных клеток. Хотя

вышеперечисленные изменения в клеточном фенотипе имеют место при HGPS, их нельзя трактовать как характерные только для ускоренного старения, как и само заболевание.

Известно, что на процессы старения и долголетия влияют несколько генов, идентифицированных за последнее время. Вклад гена *LMNA* в здоровье человека и восприимчивость ко многим заболеваниям оценивается достаточно высоко. В частности, группа Скаффиди (Scaffidi, Misteli, 2008) показали, что молекулярный механизм, лежащий в основе HGPS, также характерен для клеток пожилого здорового человека, включая изменения в модификации гистонов и процессах репарации ДНК, хотя значительно слабее выражены.

Возрастные изменения в ядрах клеток здоровых людей, могут быть вызваны недостаточным функционированием того же скрытого сайта сплайсинга ламина А, чья конститутивная активация генерирует транскрипт прогерина. Сверхэкспрессия преламина А может привести к дефектам роста гладких мышц сосудов в человеческих клетках (Ragnauth et al., 2010), аналогичные изменения наблюдаются в клетках, продуцирующих прогерин (Candelario et al., 2011). Цитотоксичность может быть также вызвана незначительным повышением уровня одного из промежуточных продуктов синтеза преламина А (Lopez-Mejia et al., 2011; Candelario et al., 2011).

Обширные исследования последних лет показали потенциальный вклад мутаций в гене *LMNA* в развитие целого ряда болезней. При исследовании факторов, ассоциированных с такими заболеваниями, было показано, что однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs, Single-nucleotide polymorphism) в локусах ламина участвуют в развитии метаболических синдромов, дислипидемии, диабета II типа, ожирения, синдрома поликистоза яичников, артериальной ригидности и сосудистых заболеваний. Кроме того, существуют данные о потенциальном влиянии генетической изменчивости в

гене *LMNA* на продолжительность жизни (Conneely et al., 2012). В большинстве случаев отмечена роль мутации 1908C > T и rs4641 *LMNA* SNP. Rs4641 SNP – замена молчащего C > T, происходящая в 10-м экзоне гена *LMNA*. В данном экзоне альтернативный сплайсинг приводит к mRNAs, который кодирует либо преламин А, либо ламин С (Lin, Norma, 1993). В результате этого SNP происходит изменение генного продукта *LMNA*, но пока точно не известно, как именно это приводит к заболеваниям. Тем не менее, последние данные свидетельствуют о том, что С и Т аллели связаны по-разному с фенотипом генной экспрессии: с С аллелем более ассоциирован повышенный уровень транскриптов ламина А и ламина С, чем с Т аллелем (Rodriguez, Eriksson, 2011).

Сигналинг инсулинового фактора роста (IGF-1) участвует в процессах старения и долголетия у многих животных: от нематод до млекопитающих (Kenyon, 2010). На мышинной модели с прогерией (*Zmpste24* (-/-) mice) было показано, что у таких прогероидных мышей происходит нарушение регуляции соматотропного баланса, характеризующееся высоким уровнем гормона роста (GH, growth hormone) и уменьшением инсулиноподобного фактора-1 (IGF-1) (Ugolde et al., 2010). Применение рекомбинантного IGF-1 восстанавливает равновесие между IGF-1 и GH, что задерживает развитие некоторых прогероидных симптомов и позволяет продлить жизнь животным (Ugolde et al., 2010; Marino et al., 2010).

Также причиной активации синтеза прогерина в нормальных человеческих фибробластах служит интенсивное укорочение теломер (Cao et al., 2011). Известно, что активность теломеразы удлиняет *in vitro* продолжительность жизни клеток, полученных от пациентов HGPS за счёт уменьшения сигналинга прогерин-индуцированного повреждения ДНК и активации p53 и Rb сигнальных путей, опосредующих начало преждевременного старения (Benson et al., 2010).

Накопление прогерина приводит к преждевременному репликативному клеточному старению (Mehta et al., 2010). Некоторые учёные предполагают, что дефекты в Rb сигнальном пути могут играть ключевую роль не только при ускоренном старении HGPS, но и в нормальном старении (Marji et al., 2010). Активность Rb снижается в фибробластах как при HGPS, так и при нормальном старении с соответствующим снижением фосфорилирования (Dechat et al., 2007; Marli et al., 2010), а также может быть подавлена такими реагентами, как росковитин и PD-0332991 – ингибиторами Cdk2–циклина E и Cdk4/циклина D1 комплексов, соответственно (Heijink et al., 2011).

Ряд работ показали, что антидепрессант рапамицин может задерживать клеточное и организменное старение, снижая блеббинг ядерной оболочки и стимулируя деградацию прогерина в клетках HGPS (Cao et al.; Vlagosklonny, 2011) посредством механизма аутофагической деградации (Cenni et al., 2012). Доксорубин (известный также как адриамицин) представляет собой ингибитор топоизомеразы II и используется в противораковой терапии в качестве активатора каспаз, что приводит к расщеплению ламина A/C (Stravopodis et al., 2009). Также ламин A/C в клетках человека расщипляется сангивамицином – аналогом нуклеозида, который действует через активацию c-Jun N-концевых киназ (JNK c-Jun N-terminal kinases) и протеинкиназы C дельта. В клетках мыши увеличение расщепления белка LMNA посредством активации каспаз вызывают стресс - индукторы туниамицин и тапсигаргин (Siman et al., 2001).

На экспрессию, функцию и фосфорилирование ламина A влияют также некоторые гормоны. Например, гормоны, увеличивающие уровни цАМФ - глюкагон, кальцитонин, вазопрессин и паратгормон (ППГ) - уменьшают фосфорилирование белка ламина A у крыс в клетках мозгового вещества почки (Gunaratne et al., 2010). Таким образом, цАМФ-зависимое фосфорилирование может приводить к реконструированию ядерной ламины.

При гипотиреозе у мышей гормон щитовидной железы уменьшает экспрессию ламина А в mRNA в клетках печени (Feng et al., 2000). Также при аутосомно-рецессивном синдроме Де-Барше, характеризующемся прогероидными чертами, наблюдается низкий уровень тирозина (ТЗ) (Ioan et al., 1988; Kivuva et al., 2008), что не случайно, так как показано влияние эндокринной системы на процессы старения. ТЗ связан с долголетием, изменения его уровня наблюдаются в пожилом возрасте, особенно у женщин (Faggiano et al., 2011; Suzuki et al., 2012).

Некоторые работы показали, что *LMNA* может регулироваться через фосфотидилинозитол-3-киназные (PI3K) пути (Tullai et. al, 2004).

II. Материалы и методы

1. Культивирование клеток.

Исследование проводились на первичных фибробластах, полученных от пациентов АТ: пациент 8 лет лёгкая форма АТ1SP, пациент 26 лет лёгкая форма АТ6SP, пациент 12 лет тяжёлая форма АТ8SP, пациент 3 года лёгкая форма АТ9SP, клетки больного АТ с молекулярно подтверждённым диагнозом АТ4BR; а также на линиях больного синдромом Секкеля (Ss1SP) 0,9 лет, пациентки с мутацией 5382insC в гене *BRCA1* (BRCA1SP) 30 лет, радиочувствительный неустановленный синдром АТ2SP 4 года, донора 30 лет, имеющего инвалидность 2 группы, не страдающего АТ - 1SP, больной атаксией, вызванной опухолью мозжечка 4 лет - АТ7SP, больной пигментной ксеродермой 16 лет ХР2SP, пациента 4 лет с симптомами, клинически сходными с АТ - Р1SP, пациента 13 лет с симптомами, клинически сходными с АТ – Р2SP. В качестве контроля использовали клетки здорового донора 11 лет VН-10. Все линии, кроме линий здорового донора VН-10 и пациента с АТ АТ4BR, были получены в нашей лаборатории радиационной цитологии ИИЦ РАН. Линия VН-10 любезно предоставлена Адой Кольман (Стокгольм), АТ4BR с генетически подтвержденным диагнозом АТ – получена в

лаборатории А. Лемана в Граффорд-Центре (Университет графства Сассекс, Великобритания).

2. Получение первичных фибробластов.

Получение первичной культуры фибробластов кожи проводилось при помощи стандартной методики получали биоптат кожи из области предплечья доноров. Полученные фрагменты кожи помещали в чашку Петри в питательную среду DMEM с добавлением антибиотиков и механически диспергировали. Затем измельченные фрагменты помещали под покрывное стекло в чашки Петри диаметром 3 см (Nunc, США) и добавляли полную ростовую питательную среду DMEM (Gibco, США) с 16% сыворотки эмбрионов коров (Hyclone, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 25 мкг/мл фунгизона и 0.3 мг/мл L-глутамина. Эксплантат кожи инкубировали, меняя питательную среду 1 раз в 4-7 сут до появления достаточной конфлюенции фибробластов. При достижении необходимого монослоя клетки снимали с подложки с помощью раствора трипсин-ЭДТА и культивировали в чашках Петри в стандартных условиях.

Клетки выращивали в пластиковых флаконах, на чашках Петри (Nunc, США), на среде DMEM (Sigma, США) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Sigma) и антибиотиков (100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США); клетки культивировали в инкубаторе при 37° С в атмосфере с содержанием 5% CO₂.

3. Иммунофлуоресценция.

В ядрах клеток выявлялись активная форма протеинкиназы АТМ (Р-АТМ, фосфорилированная по серину в 1981 положении), гистоновые деацетилазы сиртуины SIRT1, SIRT6 и триметилированные формы гистона H3. Клетки, выращенные в чашках Петри на покрывных стёклах, промывали раствором PBS, фиксировали 4 %-ным параформальдегидом 10 мин на льду в холодильнике и пермеабелизовали 3 %-ным тритоном X-100 в PBS 20 мин

при комнатной температуре. Затем клетки промывали 3 раза по 5 мин в PBS и инкубировали в блокирующем растворе (PBS, 5 % БСА, 0.01 % Tween-20) 1 ч при комнатной температуре. Первые и вторые антитела разводили в блокирующем растворе. В качестве первых антител использовали IgG мыши против белка P-ATM (Thermo Scientific, США) в разведении 1:100, IgG мыши против SIRT1 и H3K9me3 (Cell Signaling, США) в разведении 1:100, IgG мыши против LaminaA/C (Abcam, США) в разведении 1:200 и IgG кролика против белка SIRT6 и H3K27me3 (Cell Signaling, США) в разведении 1:100, IgG кролика против HP1 γ (Abcam, США) в разведении 1:200. В качестве вторых антител использовали IgG козы против IgG мыши и кролика, конъюгированные с FITC и родамином, в разведении 1:500 (Sigma-Aldrich Co., США). В качестве контроля специфичности иммунной реакции использовали клетки, инкубированные только со вторыми антителами. Для предотвращения быстрого «выгорания» флуоресцентной метки использовали антифейдинг с ДАПИ (DAPI) (Invitrogen, США). Все тесты повторяли 3 и более раз. ДНК исследуемых клеток повреждали рентгеновским облучением на установке РУМ-17 в дозе 2 Гр или радиомиметиком (блеомицином в концентрации 50-100 мкг/мл).

5. Микроскопия и анализ изображений.

Микроскопия и анализ изображений проводились с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 5 PASCAL. Для визуализации флуорофоров был использован аргоновый (488 нм) и гелиево-неоновые (543 нм) лазеры. Для получения изображений использовали сканирующий модуль микроскопа с помощью компьютера и соответствующего программного обеспечения LSM 5 PASCAL. Для анализа полученных изображений (определение уровня интенсивности флуоресценции) использовали программы LSM 5 PASCAL и WCIF ImageJ 1,37m.

Активность SA- β -Gal выявляли с использованием фирменного набора “Senescence-galactosidase staining kit” (Cell Signalling Technology, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Клетки на чашках промывали PBS, фиксировали в течение 10 мин. при комнатной температуре 1-кратным фиксирующим раствором, после чего дважды промывали PBS и окрашивали в *β -галактозидазном растворе* при 37 °C в течение ночи. Об активности SA- β -Gal судили по появлению синих гранул в цитоплазме клеток. Уровень относительной активности SA- β -галактозидазы измерялся в программе ТТЕСТ приравнивая оптическую относительную плотность количеству фермента.

5. Статистическая обработка результатов.

Статистическую обработку проводили с помощью программы MS Excel 2007 обще принятыми для медико-биологических исследований методами: расчёт средней арифметической величины, среднего квадратичного отклонения, ошибки репрезентативности для каждого параметра в исследуемых группах клеток, сравнение средних значений по критерию Стьюдента с определением достоверности различий.

III. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1.1 Выявление фосфорилированной (активной) формы протеинкиназы ATM (фосфо-ATM).

Протеинкиназа ATM является основной протеинкиназой клеточного ответа на повреждение ДНК (DDR, DNA damage response), а её фосфорилированная (активная) форма (фосфо-ATM, далее P-ATM) появляется в клетках практически сразу после возникновения двунитевых разрывов ДНК. Так как при синдроме атаксии-телеангиэктазии ген *ATM* из-за мутации в нём не функционирует нормально, протеинкиназа ATM неактивна, т.е. в клетках больных АТ нет её активной формы P-ATM. В работе было исследовано наличие активной формы P-ATM в дермальных фибробластах

больных АТ, больных с клиническими признаками, сходными с АТ, в дермальных фибробластах здорового донора, а также у пациентов с синдромом Секкеля, пигментной ксеродермой и у носителя мутации в гене *BRCA1* (*BRCA1 5382insC*).

При окрашивании полученных препаратов антителами к протеинкиназе АТМ, фосфорилированной по серину в 1981 положении (Р-АТМ), наблюдались закономерные различия между клетками больных АТ и лиц, не страдающих этим заболеванием. Как видно на рисунке 19, фокусы, соответствующие активной форме протеинкиназы АТМ (Р-АТМ) образуются в ядрах клеток здорового донора, предварительно облучённых в дозе 2 Гр или обработанных радиомиметиком (блеомицином) в концентрации 50 мкг/мл. После воздействия повреждающего ДНК агента образуются характерные фокусы, детектируемые при окраске антителами к фосфо-АТМ которые не образуются в ядрах больных АТ после аналогичного воздействия на них. Данный факт свидетельствует об отсутствии в клетках больных АТ активной формы протеинкиназы АТМ (Р-АТМ). В ответ на повреждение ДНК фокусы Р-АТМ выявлялись также в клетках больных с другими синдромами с нарушениями репарации ДНК: больной пигментной ксеродермой XP2SP, больной синдромом Секкеля Ss1SP и больной атаксией, вызванной опухолью мозжечка AT7SP

АТ является хорошо изученным синдромом повышенной радиочувствительности. Повышенная чувствительность к ионизирующей радиации на клеточном уровне описана также у пациентов с Ниймегенским синдромом ломкости хромосом (мутация в гене *NBS1*), RS-SCID - синдромом внезапной детской смертности (ген специфической расщепляющей ДНК-шпильки нуклеазы *DCLRE1C/Artemis*), синдромом LIGIV (ген лигазы IV, *lig IV*), ATLD (AT-like disease, ген *RAD50*), синдромом Вернера (ген нуклеазы-геликазы *WRN*), синдромом Ли-Фромени (гетерозиготное носительство мутаций в гене *P53*). Некоторые из этих генов, такие как *P53* и *NBS1*,

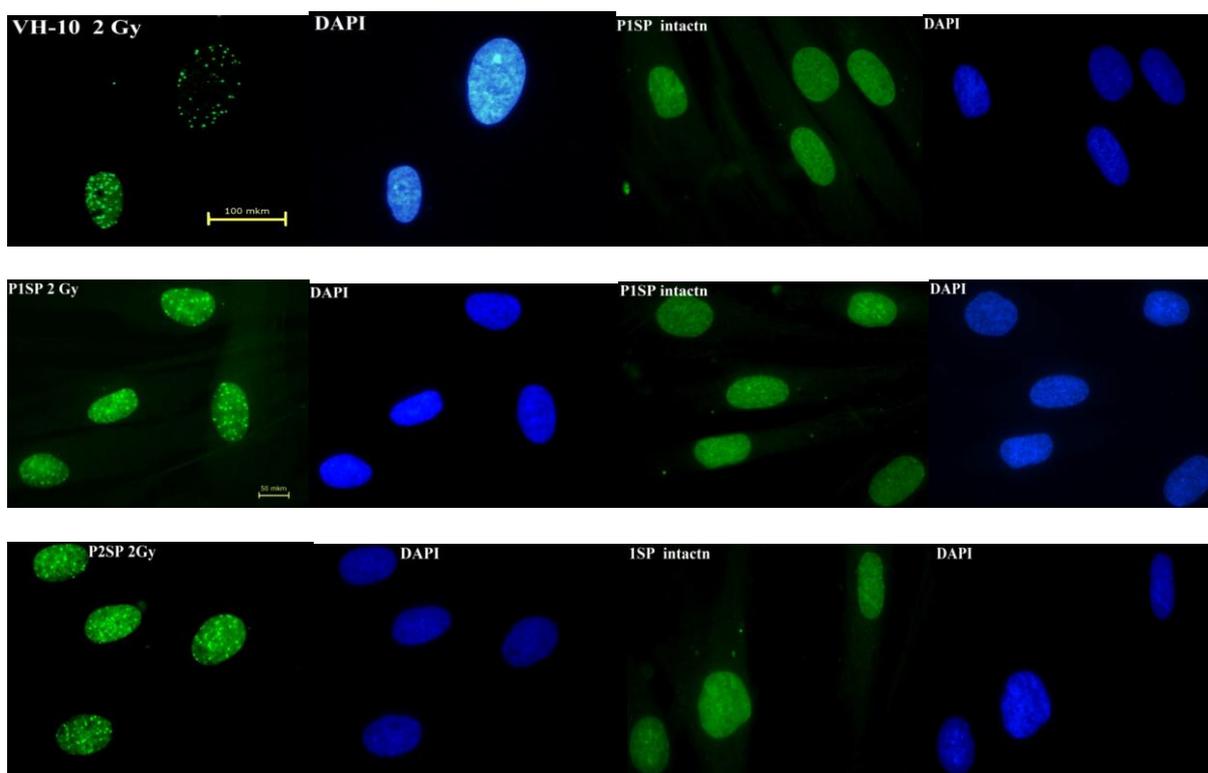
являются прямыми мишенями протеинкиназы АТМ, другие же принимают участие в процессе репарации ДНК при двунитевых разрывах и зависят от активности АТМ опосредованно. Интересно, что есть данные о случаях повышенной радиочувствительности клеток больных с синдромами, возникающими при мутациях в генах эксцизионной репарации нуклеотидов – таких как синдром Коккейна и пигментная ксеродерма (Михельсон и др., 1975; 1995; Arlett et al., 1978; 1992; 2008; Спивак и др., 1997). Причина повышенной клеточной радиочувствительности в этих случаях менее очевидна. Для выяснения этой причины крайне интересными представляются полученные нами различия в клеточных паттернах фосфорилирования белка АТМ: у здоровых доноров фосфорилированная форма АТМ после повреждения ДНК выявляется в ядрах клеток, а у больной пигментной ксеродермой XP2SP - преимущественно в цитоплазме, как это видно на рисунке. Эти различия в локализации Р-АТМ свидетельствуют о замедлении или нарушении переноса активной молекулы из цитоплазмы в ядро клетки, так как в норме автофосфорилирование происходит в ядре (Lavin M.F., Kozlov S. 2007).

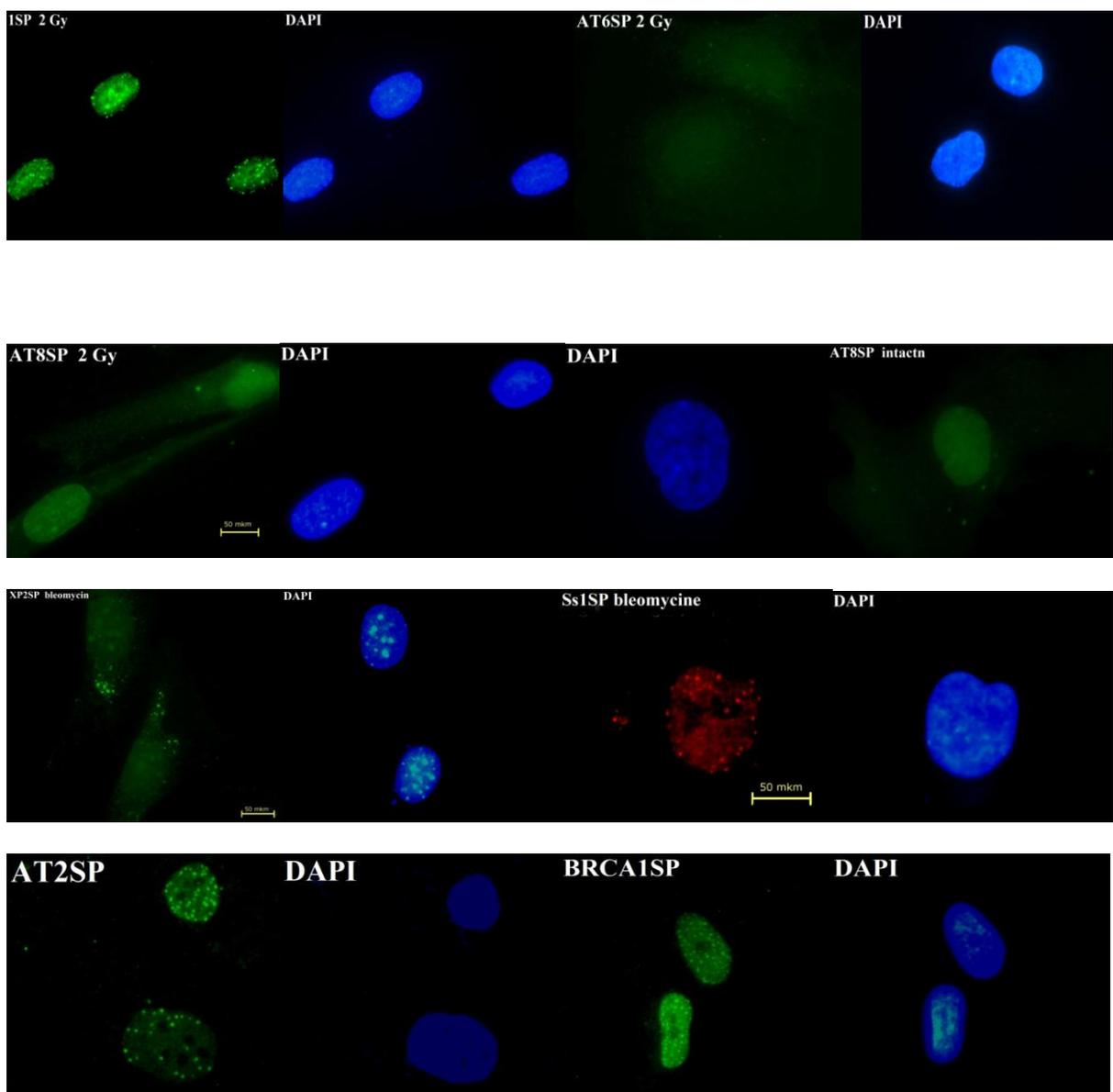
В случае атаксии вызванной опухолью мозжечка (АТ7SP) процесс автофосфорилирования АТМ идет так же, как у здорового донора, и фосфо-АТМ локализуется в ядре, хотя процесс репарации ДНК после действия ионизирующей радиации у этого больного замедлен, а количество маркеров старения в клетках – повышено (Полуботко и др., 2009а,б). Т.е. в обоих этих случаях, несмотря на повышенную клеточную радиочувствительность и даже сопутствующую ей (в случае АТ7SP) атаксию, ген АТМ остается функционально активным, тогда как в случае АТ6SP (АТ-вариант, стертая форма течения заболевания) этот ген неактивен, и Р-АТМ после действия повреждающих агентов ни в ядре, ни в цитоплазме не выявляется. Также можно сделать вывод, что пациенты P1SP и P2SP, не страдающие АТ, но с клинической картиной, сходной с АТ, имеют функционально активный ген

ATM (Рис.19), т.к. их клеточная реакция в ответ на повреждение схожа с таковой для здоровых лиц. Можно также заключить, что для выявления фокусов в качестве повреждающего агента можно использовать как ионизирующее излучение, так и радиомиметик (блеомицин): фокусы образуются и достаточно отчётливо визуализируются при использовании обоих способов.

Предложенный нами метод детекции активной формы протеинкиназы *ATM* (P-*ATM*) может быть полезен врачам-клиницистам при подтверждении или опровержении диагноза АТ в трудных случаях, а также для выявления мозаичной формы синдрома АТ.

Рис.19. Наличие фосфорилированной формы белка *ATM*, меченной соответствующими антителами, в исследуемых клеточных линиях после облучения в дозе 2Гр и воздействия 50 мкг/мл блеомицина. Вторые антитела конъюгированы с FITS (зелёный цвет) или родамином (красный цвет). Синий цвет –окраска ядер DAPI.





Таким образом, нами было показано, что радиочувствительная линия AT2SP неустановленного синдрома, описанная ранее нами как АТ – вариант (Игушева и др., 1999), маловероятно является линией с синдромом Луи-Бар (АТ), т.к. при воздействии на неё блеомицином наблюдалась активация протеинкиназы АТМ. Мы полагаем, что она может относиться к другому радиочувствительному синдрому.

В линиях AT1SP и AT9SP фокусы протеинкиназы фосфо-АТМ детектировались в 69,15% и 56,4% клеток, соответственно.

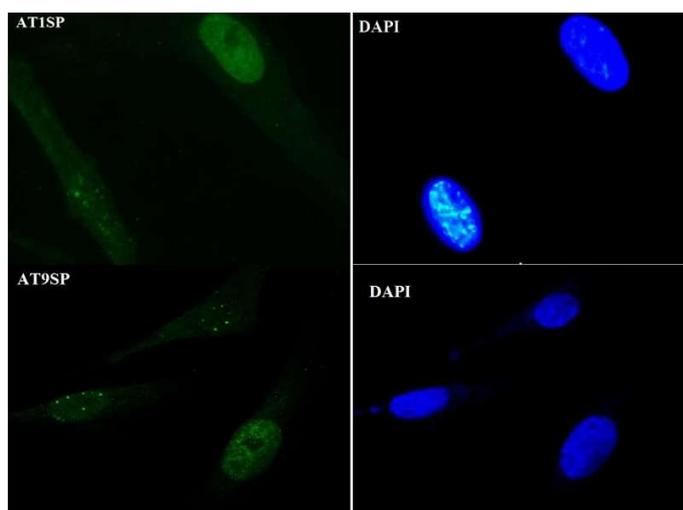


Рис. 20. Мозаичная культура линий AT1SP и AT9SP: детекция фокусов P-ATM. Справа – соответствующие клетки DAPI.

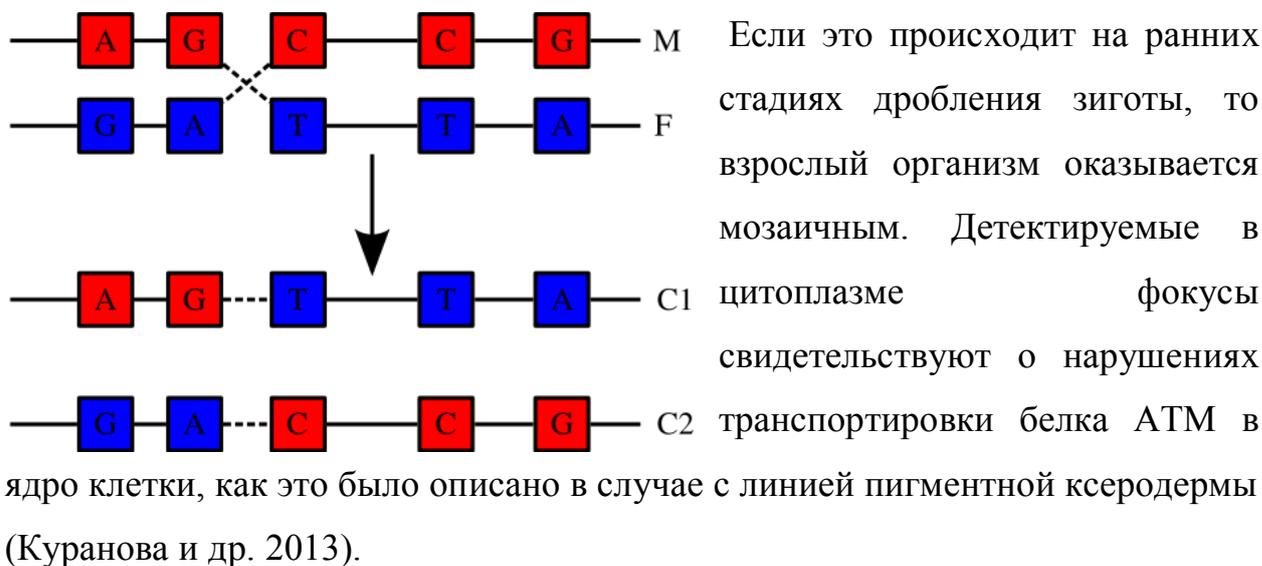
В основном фокусы в обеих линиях локализовались в ядре, но у небольшого процента клеток P-ATM обнаруживалась как в цитоплазме, так и в ядре одновременно. Исходя из этих результатов, можно предположить, что линии AT1SP и AT9SP относятся к «мозаичной» форме АТ, а сами пробанды – «мозаики», т.к. содержат два разных вида клеток: с активной формой протеинкиназы АТМ и без неё. «Мозаичность» культур AT1SP и AT9SP достаточно хорошо видна на рис. 20.

Таблица 5. Доля клеток с активной формой P-ATM (в %)

Линии	В цитоплазме	в ядре	без фокусов
AT1SP	6,1	63,05	24,75
AT9SP	3,3	53,08	31,82

Такой мозаицизм может быть связан с тем, что ген *ATM* имеет достаточно большой размер – 150 т.п.н. и содержит 66 экзонов (Savitsky et al., 1995; Lavin, Khanna, 1999; Pulverer, 2003), так что большинство больных являются копмаундами, т.е. несут на материнской и отцовской хромосомах различные мутации. В этом случае в некоторых клетках возможно восстановление нормального аллеля этого гена путём гомологической

рекомбинации – перераспределения генетического материала (ДНК), приводящего к возникновению новых комбинаций генов (Глазер, 2008).



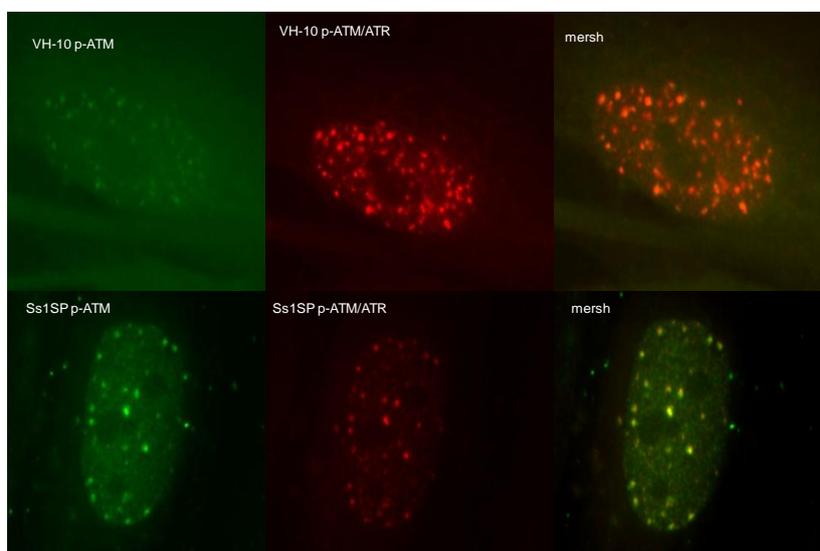
Таким образом, детектирование активной формы протеинкиназы ATM позволяет отличить похожие по проявлениям на организменном и клеточном уровнях синдромы друг от друга.

3.1.2 Выявление ферментативной активности протеинкиназ фосфо-ATM и ATR в клетках больной синдромом Секкеля.

Генетической основой одной из форм синдрома Секкеля является отсутствие активной формы протеинкиназы ATR (O' Driscoll et al., 2003). Протеинкиназы ATR и ATM являются родственными, и их активные центры структурно близки. Поэтому для выявления активной формы протеинкиназы ATR после индукции двунитевых разрывов ДНК нами были использованы два типа первых антител: моноклональные антитела к фосфо-ATM, фосфорилированные по Серину в 1981 положении и поликлональные антитела фосфо-(Ser/Thr) ATM/ATR, которые связываются с белками, фосфорилированными протеинкиназами ATM и ATR: (c-Abl (S465), BRCA1 (S1524), Chk1 (S345), Chk1 (S317), Chk2 (T68), MDM2 (T419), p53 (S15), p95/NBS1 (Ser343), MAPKAPK-2 (T222)).

Последующее окрашивание клеток двумя различными типами вторых антител, несущих разные флуорохромы, позволяло путём наложения дискриминировать фокусы. Так как известно, что при синдроме Секкеля протеинкиназа ATR может быть не активной, то мы полагали вычислить фокусы, принадлежащие к фосфо-ATM и фокусы, принадлежащие к сайтам фосфорилирования протеинкиназы.

Рис.20. Ядра клеток здорового донора (VH-10) и пациента с синдромом Секкеля (Ss1SP), окрашенные антителами к сайтам фосфорилирования фосфо-ATM/ATR (красным) и фосфо-ATM (зелёное свечение) конъюгированные с FITS (зелёное свечение) или родамином (красное свечение).



Как видно из рисунка 6, в клетках здорового донора оказывается заметно больше фокусов, принадлежащих сайтам фосфорилирования протеинкиназ ATM ATR (красное свечение) заметно больше, чем P-ATM (зелёное свечение). Это свидетельствует о наличии в клетках здорового донора нормально работающих белков ATR и ATM. Также можно сделать вывод, что в клетках пациента Ss1SP все фокусы колокализированы. Т.е. при окрашивании антителами к сайтам фосфорилирования ATM и ATR и фосфо-ATM видны фокусы, которые принадлежат только P - ATM. Следовательно, можно сделать вывод, что протеинкиназа ATR не активна, что, в свою

очередь, хорошо согласуется с поставленным по клиническим признакам диагнозом синдром Секкеля.

3.1.3 Выявление ферментативной активности протеинкиназ АТМ и АТР в исследуемых линиях.

В интактных клетках, обладающих повышенной чувствительностью к ДНК - повреждающим агентам, в которых нарушены процессы репарации ДНК, а также в клетках пожилых доноров, наблюдается повышенное количество маркеров DDR-ответа (Scaffidi, Mistelli 2006, Полуботко и др., 2009). Так как активация протеинкиназ АТМ и АТР также является одним из маркеров DDR-ответа, было важно оценить количество клеток, несущих активные формы этих протеинкиназ при отсутствии внешних воздействий в линиях здорового донора и больных с различными генетическими нарушениями процессов репарации ДНК. Нами было показано, что в ответ на инкубацию клеток в течение 1 часа в среде с добавлением блеомицина в концентрации ~50 мкг/1 мл и окрашивании полученных препаратов поликлональными антителами к сайтам фосфорилирования обеих протеинкиназ АТМ и АТР, в клетках появляются фокусы ~ 60-80 на клетку, что связано с появлением двунитевых разрывов ДНК и показывает активацию этих протеинкиназ в ответ на повреждение ДНК. Фокусы в интактных клетках соответствуют нерепарированной поврежденной ДНК или остановившимся вилкам репликации. Количество фокусов и их размер в таких клетках значительно меньше, чем после воздействия блеомицина.

Из рисунка 21 видно, что примерно в половине ядер клеток здорового донора (45%) фокусы, принадлежащие сайтам фосфорилирования протеинкиназ АТМ и АТР не детектируется, а в остальных клетках наблюдается по 1-2, и иногда более 5 этих фокусов на клетку в среднем. Наличие таких фокусов свидетельствует, скорее всего, об остановившихся вилках репликации, что достаточно часто происходит в норме в ответ на

действие эндогенных активных форм кислорода. Известно, что в фазе синтеза ДНК при культивировании первичных фибробластов находится примерно 40% клеток, что примерно соответствует полученным нами цифрам. В то же время в клетках, полученных от больных АТ, картина совершенно иная. Доля клеток, в которых фокусы не детектируются, не превышает 10%, и только в линии АТ2SP доходит до 12%. Впрочем, как было показано нами, в клетках линии АТ2SP выявляется Р-АТМ в ответ на повреждение ДНК, что даёт нам право заявить о функциональной активности гена *ATM*. Практически отсутствуют клетки без фокусов в линии АТ8SP (2%), которая получена от пробанда с наиболее выраженным тяжёлым течением заболевания. Количество клеток без фокусов также не превышает 10% в линиях ВRCA1SP (2%) и Ss1SP (7%). При этом наибольшее количество клеток во всех исследованных линиях, полученных от пациентов с дефектами репарации ДНК, несет от 1 до 5 фокусов, соответствующих сайтам фосфорилирования протеинкиназ АТМ и АТР. Реже встречаются клетки с 6-10 фокусами. Данные о количестве фокусов сайтов фосфорилирования протеинкиназ АТМ и АТР в интактных клетках представлены на рисунках 5-8 и табл. 2-3.

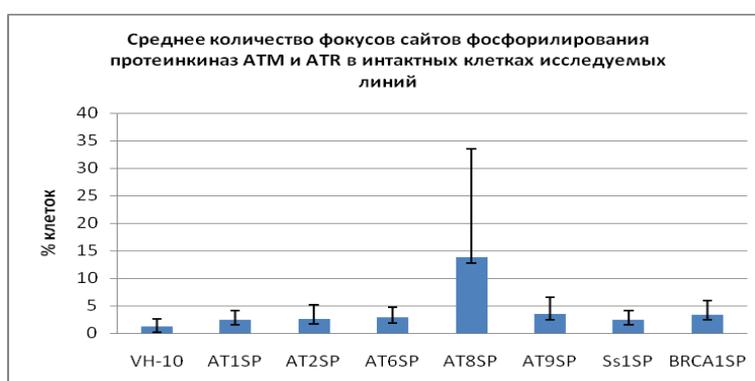
Таблица 6. Среднее количество фокусов сайтов фосфорилирования протеинкиназ АТР и АТМ в интактных клетках исследуемых линий

Среднее количество фокусов сайтов фосфорилирования протеинкиназ АТМ и АТР в интактных клетках исследуемых линий	
Исследуемая линия	Количество фокусов в клетке
VH-10	1,2
АТ1SP	2,5 ^{***}
АТ2SP	2,7 ^{***}
АТ6SP	2,9 ^{***}
АТ8SP	13,8 ^{***}

AT9SP	3 ^{***}
BRCA1SP	2,5 ^{***}
Ss1SP	3,4 ^{***}

***Статистически достоверные отличия от контроля при $p < 0,001$

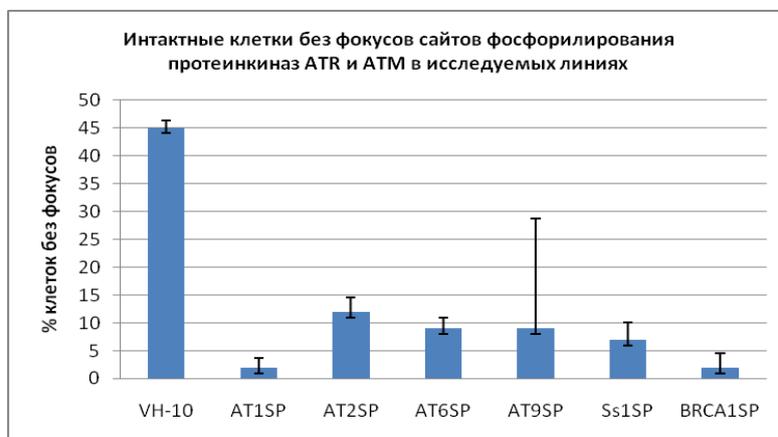
Рис.21. Среднее количество фокусов сайтов фосфорилирования протеинкиназ АТМ и АТР в интактных клетках исследуемых линий



Как видно из рис. 7 и табл.2, наименьшее среднее количество фокусов сайтов фосфорилирования протеинкиназ АТМ и АТР демонстрируют клетки здорового донора (VH-10), наибольшее – клетки больной тяжёлой формой АТ (AT8SP), в 11,5 раз выше наблюдаемого уровня в клетках здорового донора (VH-10). Интактные клетки пациентки с более лёгкой формой АТ (AT6SP) содержат в среднем в 2,4 раза больше фокусов сайтов фосфорелирования протеинкиназ АТМ и АТР. Интактные клетки пациентов с мозаичной формой АТ (AT1SP и AT9SP) содержат в среднем в 2 и 2,5 раза больше фокусов сайтов фосфорилирования протеинкиназ АТМ и АТР, чем клетки здорового донора (VH-10). Также в 2 раза превышали этот уровень и интактные клетки пациентки с мутацией 5382insC в гене *BRCA1* (BRCA1SP).

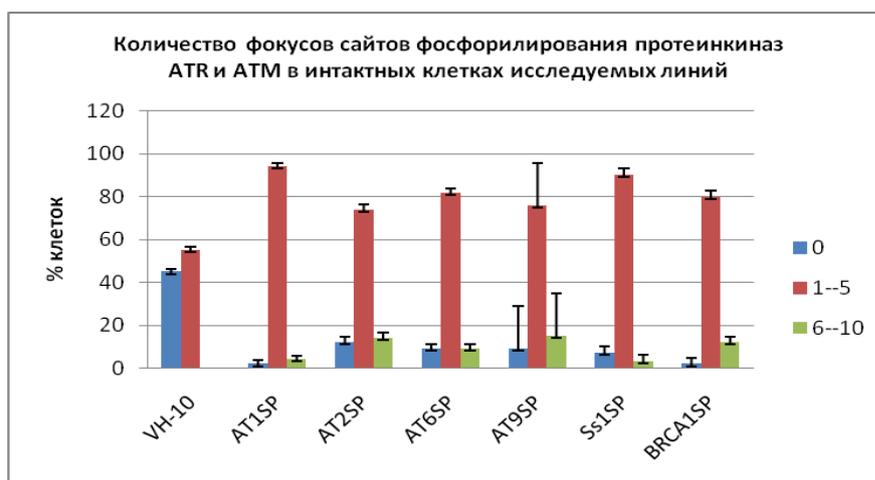
Интактные клетки пациентки с синдромом Секкеля (Ss1SP) содержали в среднем в 2,8 раза больше фокусов сайтов фосфорилирования, чем контроль.

Рис. 22. Интактные клетки без фокусов сайтов фосфорилирования протеинкиназ ATR и ATM в исследуемых линиях



Наиболее значимым нам представляется результат, показывающий, что только при наиболее тяжелой форме атаксии-телеангиэктазии AT8SP наблюдаются клетки, число фокусов сайтов фосфорилирования в которых превышает 10. Встречаются даже ядра, в которых обнаруживается более 100 фокусов. Ранее в нашей лаборатории было показано (Полуботко и др., 2009), что в этой линии (AT8SP) существуют выраженные нарушения процесса закрытия двунитевых разрывов, скорее всего путем негомологичного воссоединения концов, что приводит к активному накоплению повреждений ДНК.

Рис. 23. Количество фокусов сайтов фосфорилирования протеинкиназ ATR и ATM в интактных клетках исследуемых линий



Таким образом, при сравнении количества фокусов сайтов фосфорилирования протеинкиназ ATR и ATM в интактных клетках, полученных от разных больных АТ, можно сделать вывод, что наличие большого числа фокусов (превышающего 10 на ядро), может свидетельствовать о более тяжелом состоянии клетки и, соответственно, более тяжелой форме заболевания. Вероятно, чем больше таких клеток в клеточной популяции, тем сильнее выражены дефекты процессов репарации ДНК. Соответственно, тем тяжелее течение заболевания и выраженнее его симптомы.

Рис. 24. Количество фокусов сайтов фосфорилирования протеинкиназ ATR и ATM в интактных клетках AT8SP

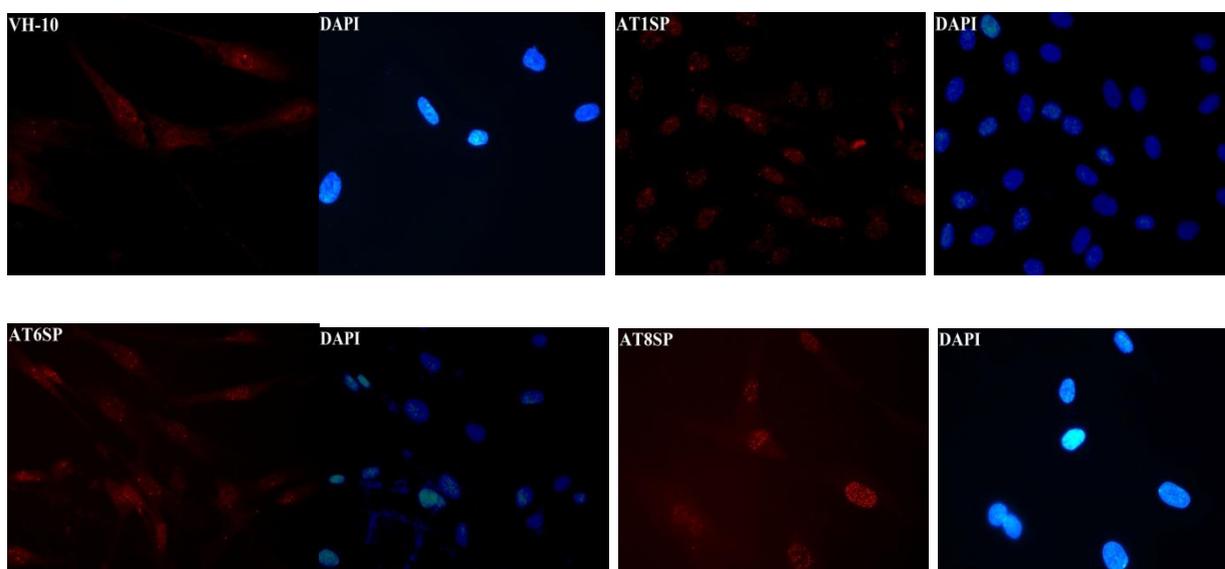


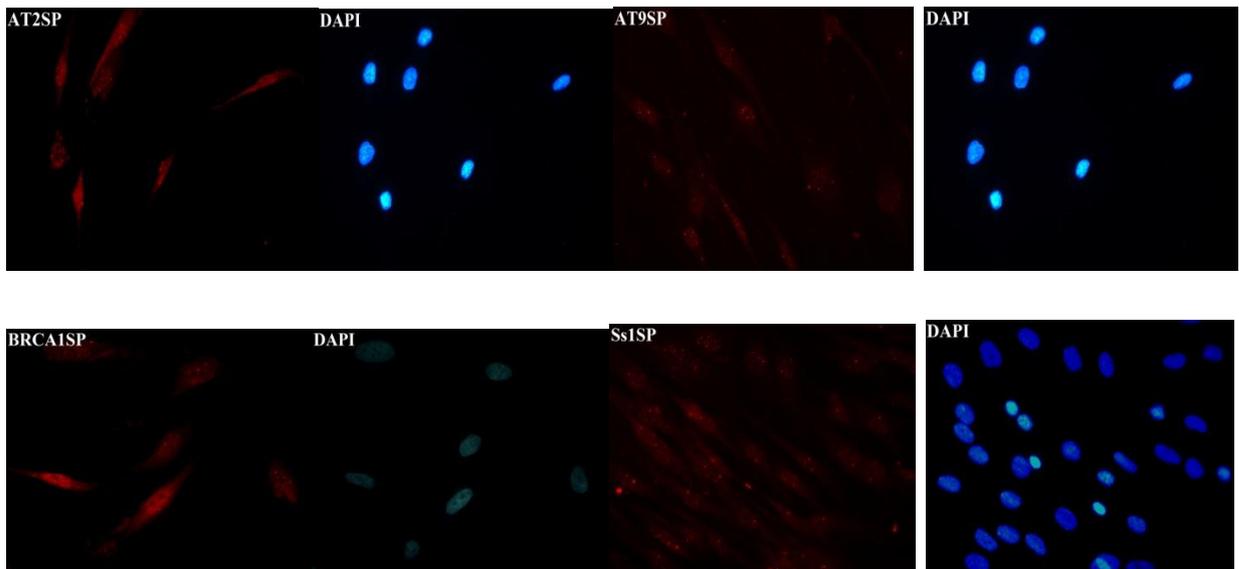
Таблица 7. Количество фокусов сайтов фосфорилирования протеинкиназ ATM и ATR интактных клеток исследуемых линий

Доля фокусов, соответствующих сайтам фосфорилирования протеинкиназ ATM и ATR в интактных клетках исследуемых линий (в% от общего числа клеток)

Исследуемые линии	0	1-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-40	41-45	46-50	51-55...	95-100...
VH-10	45	55											
AT1SP	2	94	4										
AT2SP	12	74	14										
AT6SP	9	82	9										
AT8SP	2	32	34	12	6	1	2		3	1	2	2	3
AT9SP	9	76	15										
BRCA1SP	2	80	18										
Ss1SP	7	90	3										

Рис. 25. Ядра исследуемых линий, окрашенные антителами к сайтам фосфорилирования фосфо-ATM/ATR





3.2. Интенсивность флуоресценции гистоновых деацетилаз SIRT1 и SIRT6 в исследуемых линиях.

В настоящее время большое внимание уделяется семейству белков – сиртуинам. Как известно, эти белки принадлежат к гистоновым деацетилазам, обладая одновременно АДФ-рибозилазной активностью. По крайней мере, для двух из них – SIRT1 и SIRT6 было показано изменение их количества и активности при старении (Kawahara et al., 2008). Опираясь на эти данные, мы решили оценить их количество и локализацию в исследуемых линиях.

При окрашивании клеток непрямой иммунофлуоресцентным методом с использованием антител к гистоновым деацетилазам SIRT1 и SIRT6 в ядрах клеток больных АТ их средняя интенсивность флуоресценции оказалась различной. Данные средней интенсивности флуоресценции представлены в табл. 3 и на рис. 3-5. Как видно из Рис.3, количество SIRT1 было снижено по сравнению с ядрами клеток здорового донора в линиях AT9SP и AT8SP в 1,5 раза. В линиях мозаичной и более лёгкой форм АТ (AT1SP и AT6SP) – достоверно выше уровня в клетках здорового донора в 1,7 и 3,7 раз

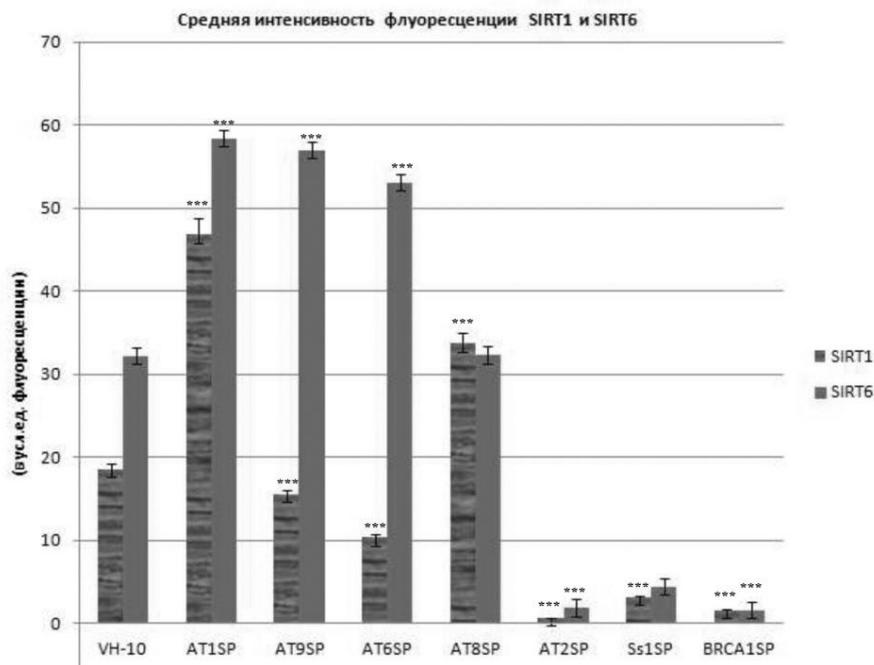
соответственно. Также больше в 1,2 раза данного белка по сравнению со здоровым донором оказалось в ядрах клеток пациента с синдромом Секкеля (Ss1SP). Меньше всего сиртуина1 оказалось в линиях AT2SP (в 1,5 раза меньше, чем в ядрах здорового донора) и в клетках пациентки с мутацией 5382insC в гене *BRCA1* (BRCA1SP), что хорошо согласуется с описанными в литературе данными о снижении количества деацетилазы SIRT1 при BRCA1 абляции, приводящем к повышению уровня белка опухолей сурвивина – ингибитора апоптозных белков. Это в свою очередь приводит к повышенному опухолевому росту (Wang et al., 2008).

Таблица 8. Средняя интенсивность флюоресценции деацетилаз SIRT1 и SIRT6.

линии	SIRT1	SIRT6	H3K9me3	H3K27me3
AT1SP	46,8 ±1,9***	58,4±1***	9,1 (±0,4)***	2,3 (±0,2) ***
AT9SP	15,6 ±0,4***	57±2***	3 (±0,15) ***	2,3 (±0,1) ***
AT6SP	10,4 ±0,3***	53,1±1,6***	3,2 (±0,15) ***	2,1 (±0,1) ***
AT8SP	33,7 ±1,2***	32,3±1,8	4,04 (±0,2)	5,7 (±0,4)***
AT2SP	0,7 ±0,03***	1,9±0,1***		
Ss1SP	3,2 ±0,1***	4,4±0,2		
BRCA1SP	1,6 ±0,07***	1,6 ±0,1***		
VH-10	18,6 ±0,6	32,2 ±0,6	4,5 (±0,2)	1,2 (±0,05)

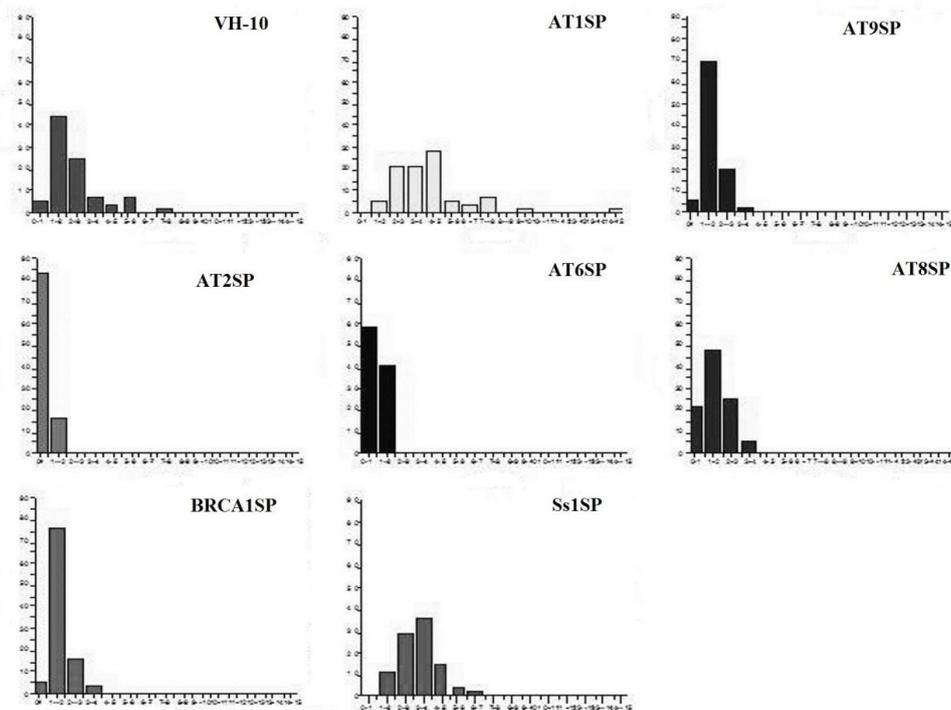
***Статистически достоверные отличия от контроля при $p < 0,001$

Рис. 26. Средняя интенсивность флуоресценции SIRT1 и SIRT6



Также различным оказался разброс по диапазонам интенсивности флуоресценции SIRT1 в исследуемых линиях. Данные представлены на Рис. 10.

Рис. 27. Диапазоны интенсивности флуоресценции (в усл. ед. инт.) SIRT1 в интактных ядрах исследуемых линий. По вертикали обозначены диапазоны интенсивности флуоресценции (в условных единицах флуоресценции), а по горизонтали – доля клеток в обозначенном диапазоне.



Как видно из Рис. 27, разброс интенсивности диапазонов флуоресценции во всех линиях различен, но точки максимума во всех диапазонах соответствуют среднему значению интенсивности флуоресценции.

Разброс по диапазонам интенсивности флуоресценции SIRT6 исследуемых линий оказался иным, чем SIRT1 - в большинстве случаев более широким. Данные представлены на рисунке 11, где по вертикали обозначены диапазоны интенсивности флуоресценции (в условных единицах флуоресценции), а по горизонтали – доля клеток в обозначенном диапазоне.

Рис.28. Диапазоны интенсивности флуоресценции (в усл. ед. инт.) SIRT6 в интактных ядрах исследуемых линий. По вертикали обозначены диапазоны интенсивности флуоресценции (в условных единицах флуоресценции), а по горизонтали – доля клеток в обозначенном диапазоне

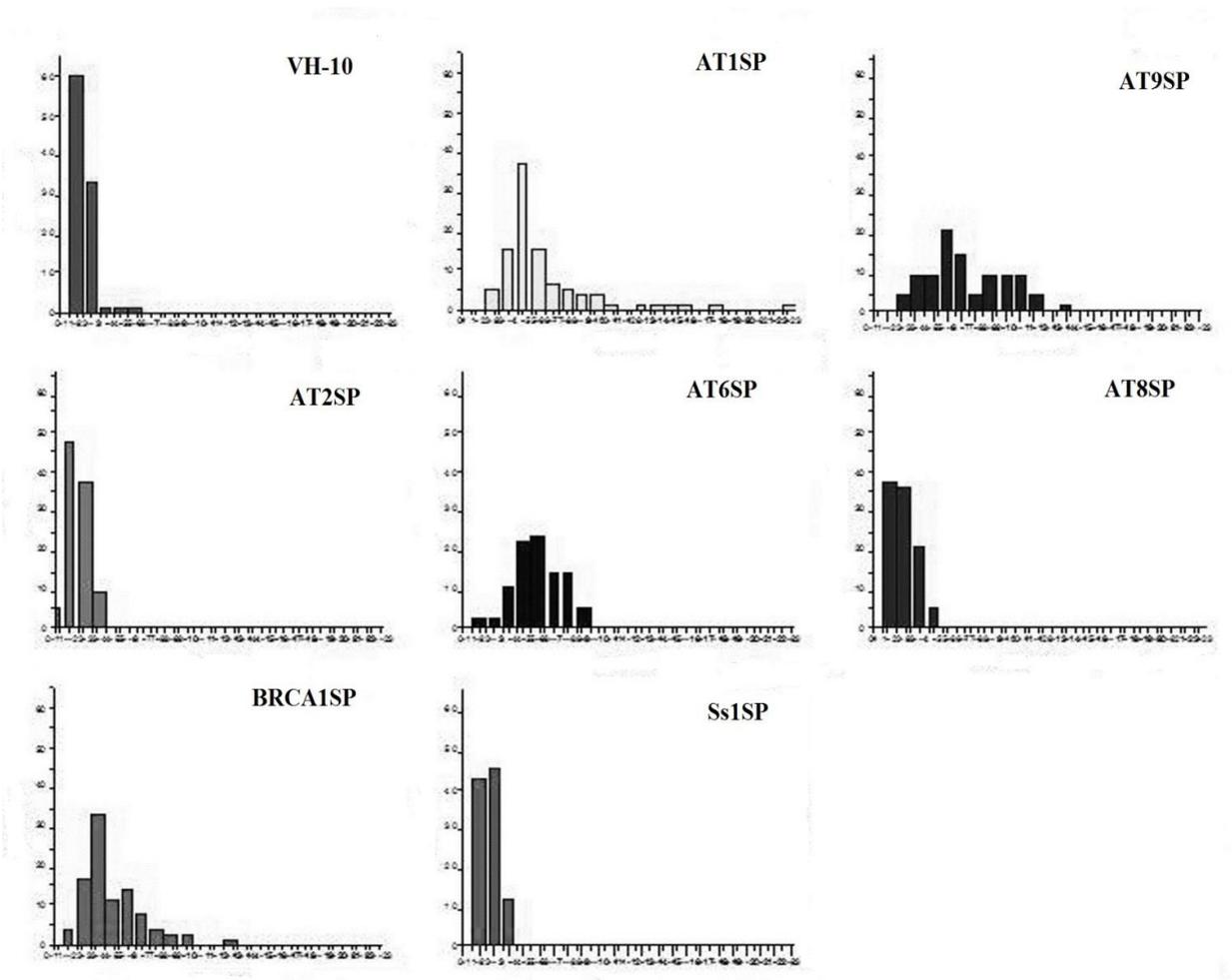
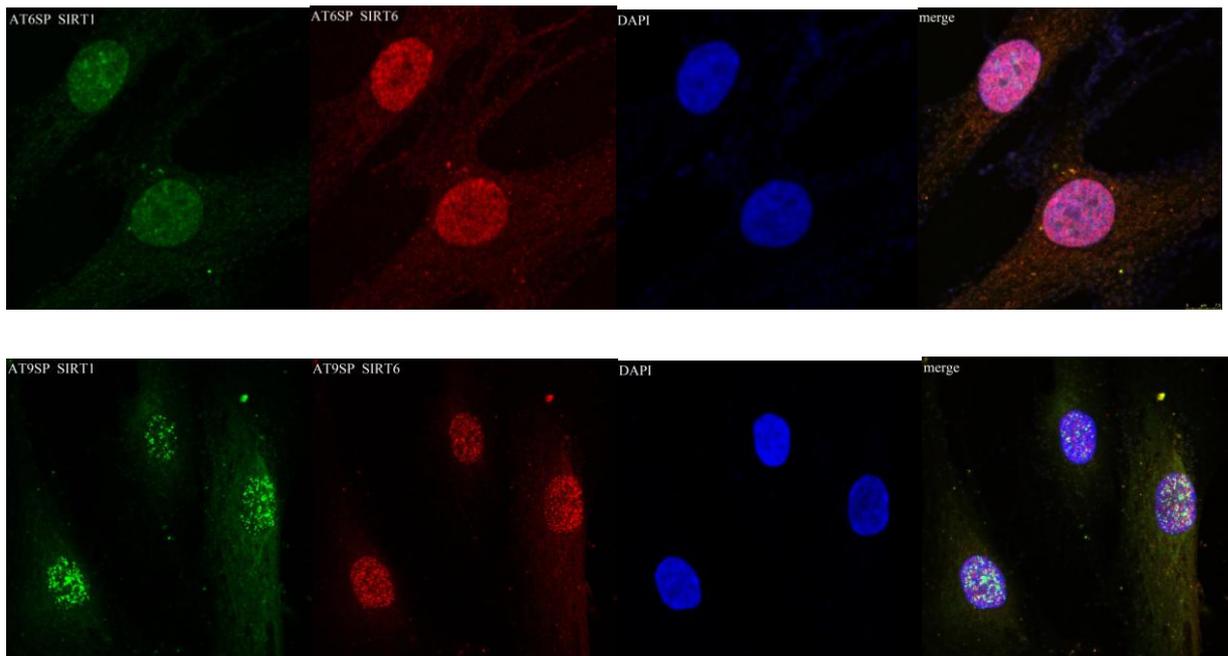
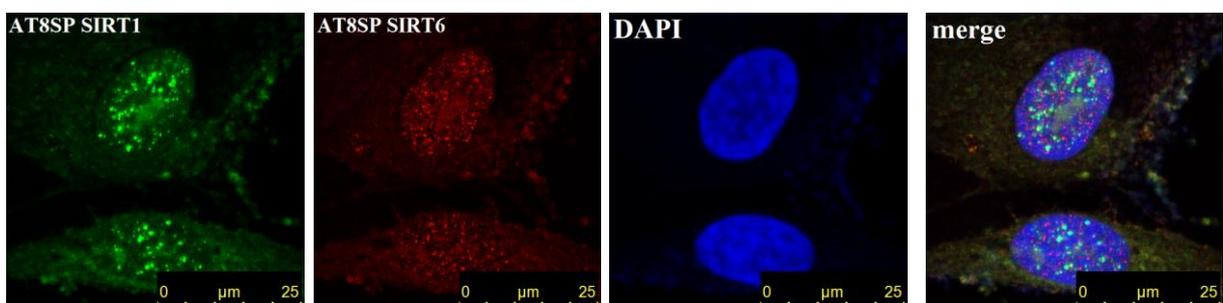
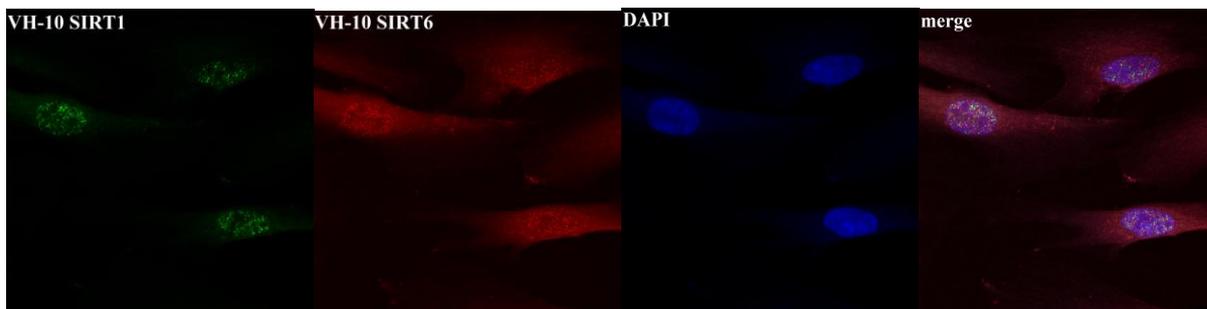
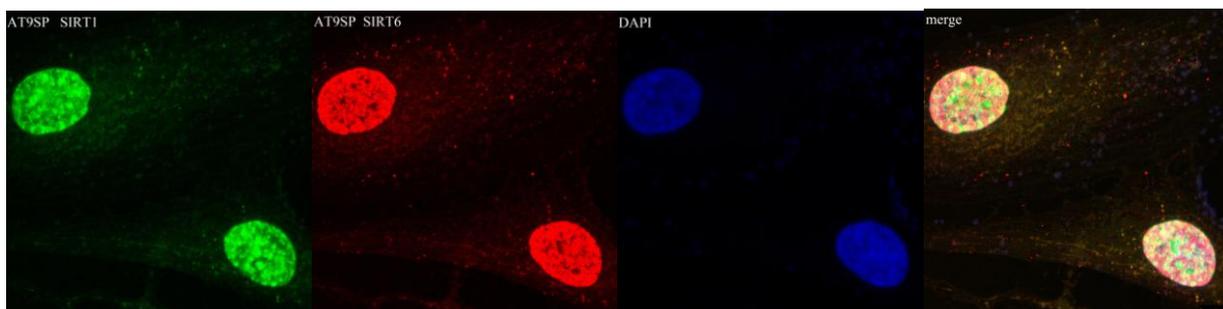


Рис. 29. Интенсивность флуоресценции гистоновых деацетилаз SIRT1 и SIRT6 в исследуемых линиях





Анализируя интенсивность флуоресценции клеток исследуемых линий по диапазонам интенсивности флуоресценции, мы обнаружили, что линии AT1SP и AT9SP отчетливо образуют 2 пика при окрашивании на SIRT6, т.е. можно говорить о двух клеточных субпопуляциях (рис. 27-28). Эти данные подтверждают наше предположение о формировании под влиянием мозаицизма двух субпопуляций клеток, в которых белки, связанные с АТМ, или её белками-мишенями, ведут себя по-разному. При анализе диапазонов интенсивности флуоресценции SIRT1 было обнаружено, что только в линии AT1SP отчетливо выделяются два «пика». Это ещё раз подтверждает наше предположение о том, что, несмотря на имеющиеся литературные данные о роли SIRT1 при старении (Serravallo et al., 2009), гистоновая деацетилаза SIRT1 не имеет явной ассоциации с АТ.

3.3. Интенсивность флуоресценции триметилированных форм гистона H3 H3K9me3 и H3K27me3

При окрашивании клеток с использованием антител к триметилированным формам гистона H3 H3K9me3 и H3K27me3 с последующим измерением интенсивности флуоресценции были выявлены различия между исследуемыми клеточными линиями. Данные средней интенсивности флуоресценции представлены на рис. 3. На рисунке видны достоверные различия средней интенсивности флуоресценции в ядрах клеток здорового донора и пробандов: наибольшая средняя интенсивность флуоресценции H3K9me3 – в 2 раза достоверно выше контроля - выявлена в ядрах клеток линии AT1SP (АТ мозаичной формы); в ядрах клеток AT8SP (пациента с тяжёлой формой АТ) средняя интенсивность флуоресценции H3K9me3 достоверно не отличалась от контроля, в ядрах клеток AT6SP (лёгкая форма АТ) и AT9SP (мозаик) уровень интенсивности оказался в 1,5 раза достоверно ниже контроля. Т.о., никакой закономерности в интенсивности флуоресценции H3K9me3, связанной с АТ, мы не наблюдали.

Средняя интенсивность флуоресценции H3K27me3 самой высокой оказалась в ядрах клеток AT8SP (пациента с тяжёлой формой АТ) – в 4,3 раза достоверно выше контроля. В ядрах клеток остальных линий AT1SP, AT6SP и AT9SP (более лёгкой формы АТ и мозаиков) средняя интенсивность флуоресценции H3K27me3 была примерно одинаковой и достоверно в 2 раза выше контроля. Таким образом, данный маркер во всех изученных случаях достоверно отличается от контроля, причем при тяжелой форме заболевания это отличие наиболее выражено. Можно сделать вывод, что высокий уровень H3K27me3 является одним из признаков АТ и, вероятно, степень его выраженности может быть использована при прогнозе течения заболевания.

Рис. 30. Средняя интенсивность флуоресценции H3K29me3 и H3K27me3

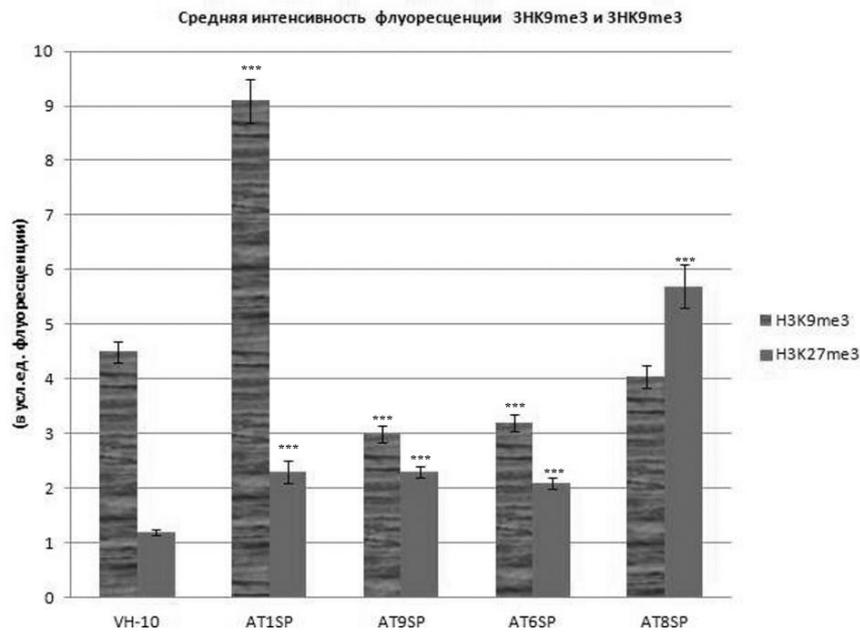


Рис.31. Распределение клеток по диапазонам интенсивности флуоресценции (в усл. ед.) триметилированной формы гистона H3 (H3K9me3) в ядрах интактных клеток исследуемых линий. По вертикали - диапазоны интенсивности флуоресценции (в условных единицах флуоресценции), по горизонтали – доля клеток в обозначенном диапазоне.

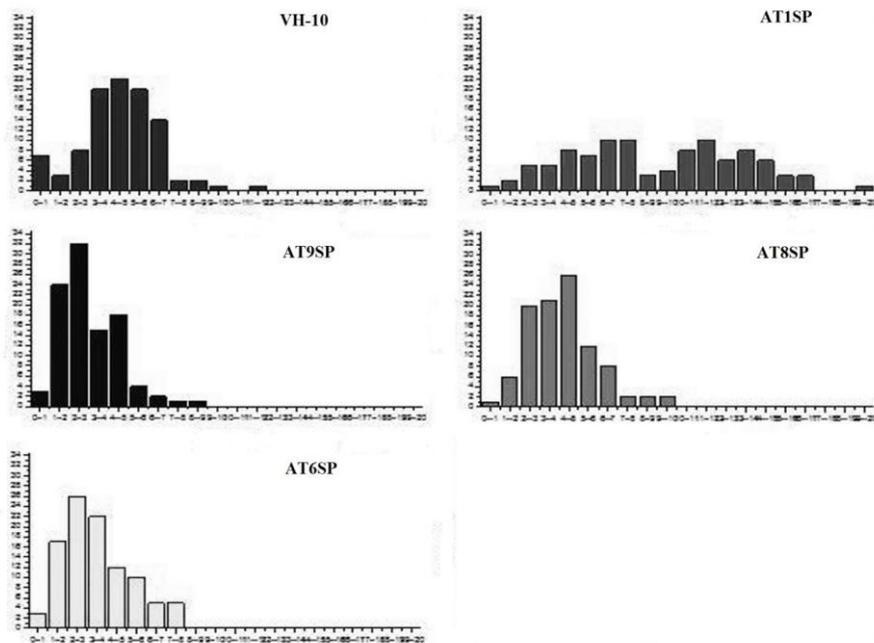
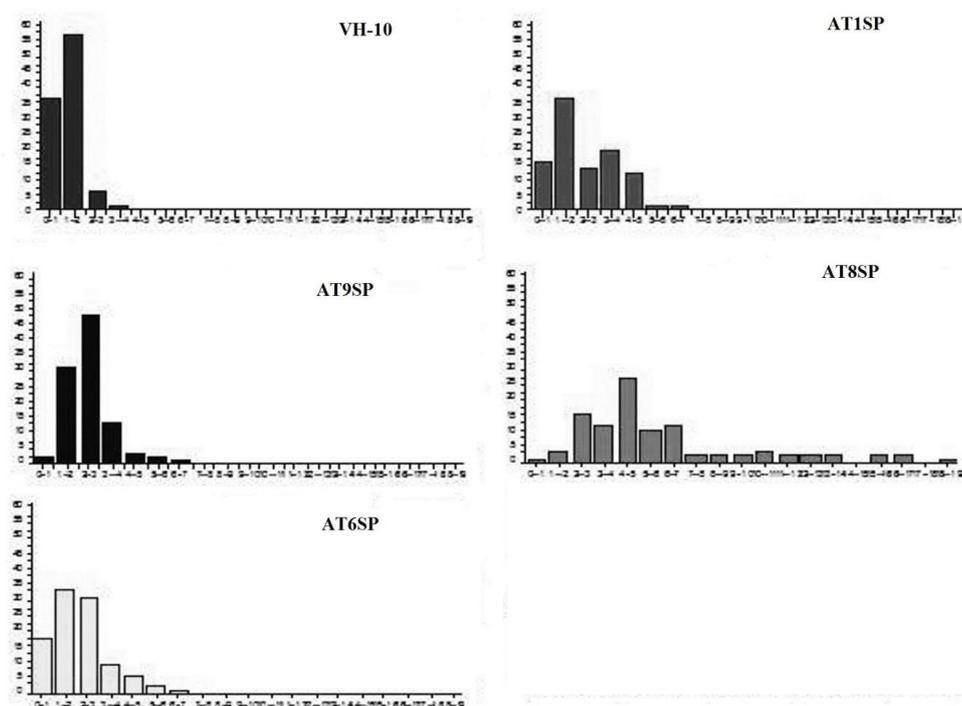
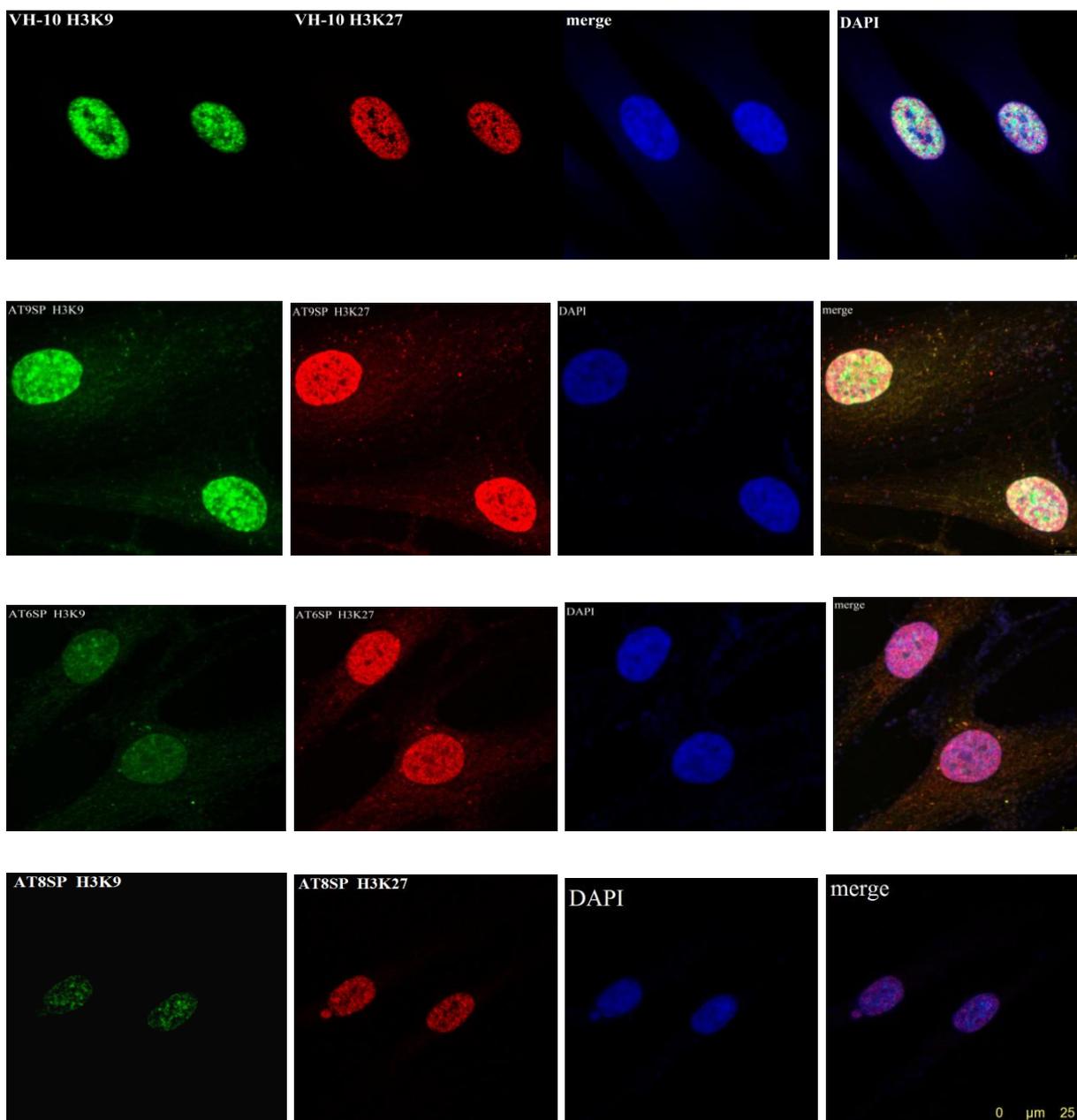


Рис.32. Распределение клеток по диапазонам интенсивности флуоресценции (в усл. ед.) триметилированной формы гистона H3 (H3K27me3) в ядрах интактных клеток исследуемых линий. По вертикали - диапазоны интенсивности флуоресценции (в условных единицах флуоресценции), по горизонтали – доля клеток в обозначенном диапазоне.



При разбиении на диапазоны интенсивности флуоресценции H3K9me3 «два пика» интенсивности флуоресценции наблюдались так же, как и при окрашивании на SIRT1, в клетках линии одного из пробандов с мозаичной формой заболевания - AT1SP (рис. 31). При анализе диапазонов интенсивности флуоресценции H3K27me3 «пиков интенсивности флуоресценции» не наблюдалось ни в одной из исследованных линий. Но в клетках пробандов наблюдается сдвиг в зону бóльших средних значений по сравнению с контролем (рис. 32).

Рис. 33. Интенсивность флуоресценции H3K29me3 и H3K27me3 в ядрах исследуемых линий



3.4. Выявление гетерохроматинового маркера HP1-γ.

Важным компонентом регуляции гетерохроматина является белок HP1, уровень и локализацию которого также можно рассматривать в качестве эпигенетического маркера старения (Li et al., 2002). HP1 принимает участие в одном из важнейших механизмов эпигенетической инактивации генов – упаковке «молчащих» генов в неактивные гетерохроматиновые домены. Сайт связывания гетерохроматина для хромодомена HP1 обеспечивает Me3H3-K27 (Wang et al., 2000). При этом изоформа HP1-γ динамически коррелирует

с транскрипционной активностью (Vakoe et al., 2005). Количество HP1-γ может служить надёжным маркером стареющих клеток, резко уменьшаясь в клетках пожилых доноров и больных прогериями (Scafidi, Misteli, 2006).

Окраска непрямой иммунофлуоресцентным методом с использованием антител к маркеру старения - изоформе белка HP1-γ выявила закономерные различия между клетками здорового донора и исследуемыми пробандами.

Данные об интенсивности флуоресценции белка HP1-γ в диплоидных фибробластах исследуемых линий представлены в табл.5 и на рисунке 13.

Таблица 9. Интенсивность флуоресценции HP1-γ в клетках исследуемых линий

Интенсивность флуоресценции HP1-γ исследуемых линий (в усл. ед. флуоресценции)	
Исследуемая линия	Интенсивность флуоресценции
VH-10	$5,4 \pm 0,2$
AT1SP	$3,3 \pm 0,25^{***}$
AT2SP	$5,5 \pm 0,25$
AT6SP	$1,01 \pm 0,02^{***}$
AT8SP	$2,9 \pm 0,1^{***}$
AT9SP	$3,2 \pm 0,1^{***}$
Ss1SP	$3,8 \pm 0,15^{***}$
BRCA1	$13,1 \pm 0,42^{***}$

***Статистически достоверные отличия от контроля при $p < 0,001$

Рис.34. Средняя интенсивность флуоресценции HP1-γ в клетках исследуемых линий

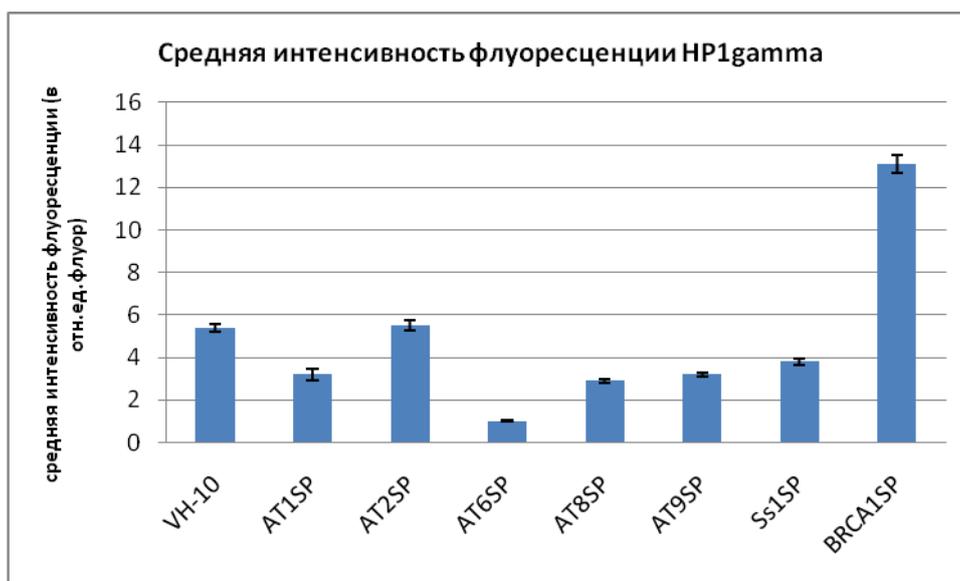
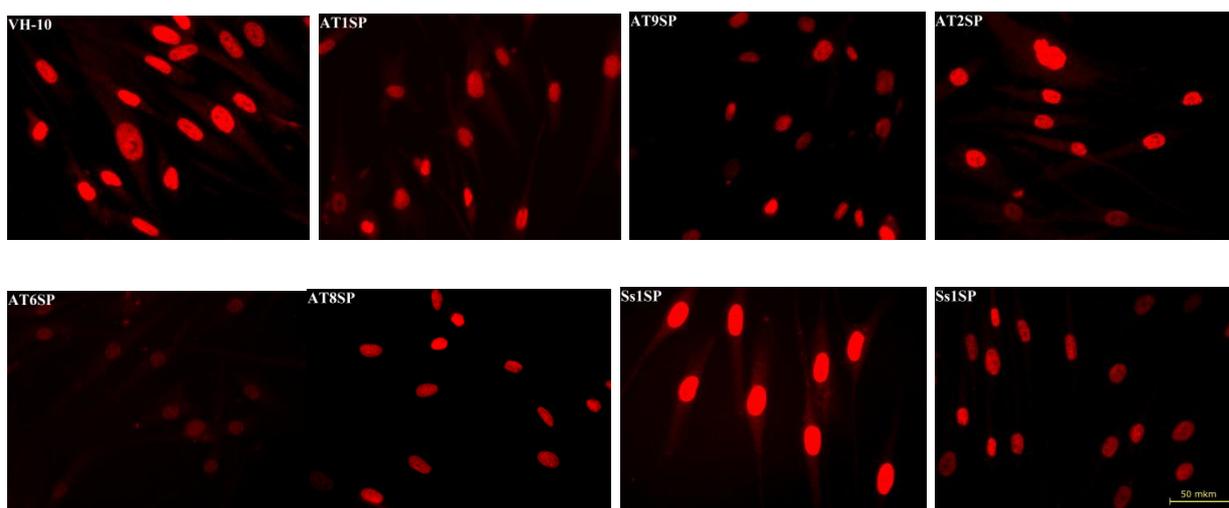


Рис.35. Средняя интенсивность флуоресценции HP1- γ в клетках исследуемых линий



На рис. 34 видно, что наименьшее количество гетерохроматинового белка (в 5 раз достоверно меньше, чем в клетках здорового донора) оказалось у пациентки с более лёгкой формой синдрома Луи-Бар (AT6SP), в клетках которой, вероятно, доминирует программа ускоренного старения, а не трансформации. Наибольшее количество HP1- γ – в клетках пациентки с мутацией 5382insC в гене *BRCA1* (BRCA1SP), имеющей высокий риск заболевания раком молочной железы (в 2,4 раз достоверно выше, чем в клетках здорового донора). Эти данные хорошо согласуются с работой группы Михаэля Колладо (Collado et al., 2005), которая показала высокий

уровень гетерохроматинового маркера старения HP1- γ в предраковых опухолевых клетках. В случае синдрома Луи-Бар более тяжёлой формы (AT8SP) количество HP1- γ в 1,9 раз достоверно ниже чем у здорового донора, но существенно выше, чем у AT6SP. Таким образом, разница между двумя формами синдромами Луи-Бар (AT8SP и AT6SP) составляет почти 3 раза, но уровень белка в обеих линиях закономерно ниже, чем в клетках здорового донора. Это хорошо согласуется с данными, полученными ранее нашей лабораторией (Полуботко и др. 2009). Линия клеток больного неустановленным радиочувствительным синдромом AT2SP по количеству гетерохроматинового белка не отличалась от здорового донора. В тоже время мозаичные формы AT AT1SP и AT9SP не отличались друг от друга по количеству данного белка и содержали его в 1,6 раз меньше, чем клетки здорового донора. Другими словами, в клетках мозаиков количество гетерохроматинового маркера HP1- γ меньше, чем у здорового донора, но больше, чем у больного лёгкой формой AT AT6SP. Возможно, это объясняется разнородностью клеток внутри одной клеточной популяции.

3.5. Накопление aberrаций ядерной ламины

Ещё в 2006 г. итальянскими учёными в ходе исследования клеток больных синдромом Хатчинсона-Гилфорда, а также клеточных культур, полученных от престарелых доноров, были показаны структурные трансформации ядерной ламины, наступающие в результате аккумуляции aberrантного продукта гена *LMNA*, прогерина (Scaffidi, Misteli 2006). В комплексе с современными данными об участии компонентов ядерной ламины и, в частности, ламина А в очень широком спектре клеточных процессов, к которым относится регуляция организации хроматина (Goldman et al., 2002), результаты, полученные Скаффиди и Мистелли, позволяют считать структурные изменения ядерной ламины базовым процессом для индукции маркеров старения, ассоциированных с различными уровнями

клеточной регуляции. Данные о структуре ядерной ламины представлены в таблице 10 и на рисунках 37,38. Сама структура ядерной ламины представлена на рисунке 36.

Рис. 36. Структура ядерной ламины а) в клетках здорового донора (VH-10) и б) пациентки с мутацией 5382insC в гене *BRCA1* (BRCA1SP).

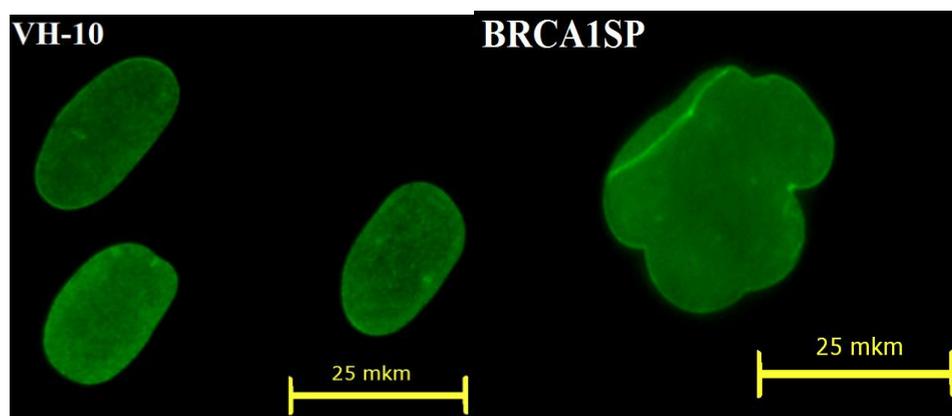


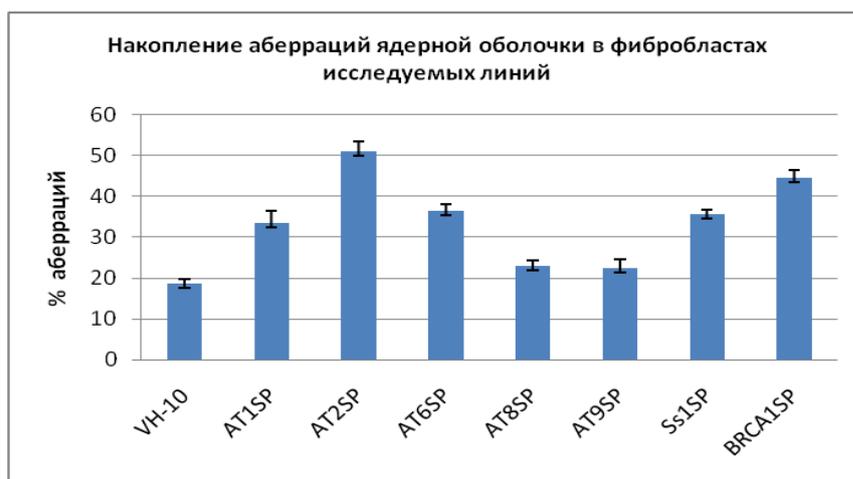
Таблица 10. Структура ядерной ламины исследуемых линий

Аберрации ядерной оболочки в фибробластах исследуемых линий (в % от общего числа клеток)

линии	норма	с изменениям и (всего)	инвагинации.	блеббы	нвагинации и+ блеббы
VH-10	84,6±6,7	18,7±1,1	10,1±0,6	6,6±0,95	2±0,5
AT1SP	66,5±2,9	33,5±2,9	16,6±0,9	11,1±1,2	5,8±2,3
AT2SP	49±2,9	51±2,5	33,2±0,5	16,5±1,5	2,7±0,7
AT6SP	63,6±1,7	36,4±1,7	30,5±1,1	3,8±1,1	2,1±0,8
AT8SP	77,1±1,4	22,9±1,4	18±0,4	4,3±2,2	0,6±0,2
AT9SP	77,6±2,2	22,4±2,2	12,5±0,3	5,1±1	4,8±1,4
Ss1SP	64,3±0,8	35,7±1	12,2±0,6	16,3±1,1	6,8±0,2
BRCA1SP	55,5±1,9	44,5±2	17,2±0,4	9,5±1	17,6±0,96

При исследовании структуры ламины путём непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания антителами к ламину А/С было обнаружено, что наименьший процент клеток с изменениями характера организации ядерной ламины наблюдался в линии здорового донора VH-10 (18,7%), и достоверно от него отличался в линиях AT9SP (22,4%) и AT8SP (22,9%). В линиях AT1SP, AT6SP и Ss1SP количество таких клеток было примерно в 1,5 раза выше – соответственно в 33,5%, 36,4% и 35,7%. Существенное – более чем в 2 раза – увеличение количества клеток с нарушениями ядерной ламины наблюдалось в линиях AT2SP (51%) и BRCA1SP (44,5%).

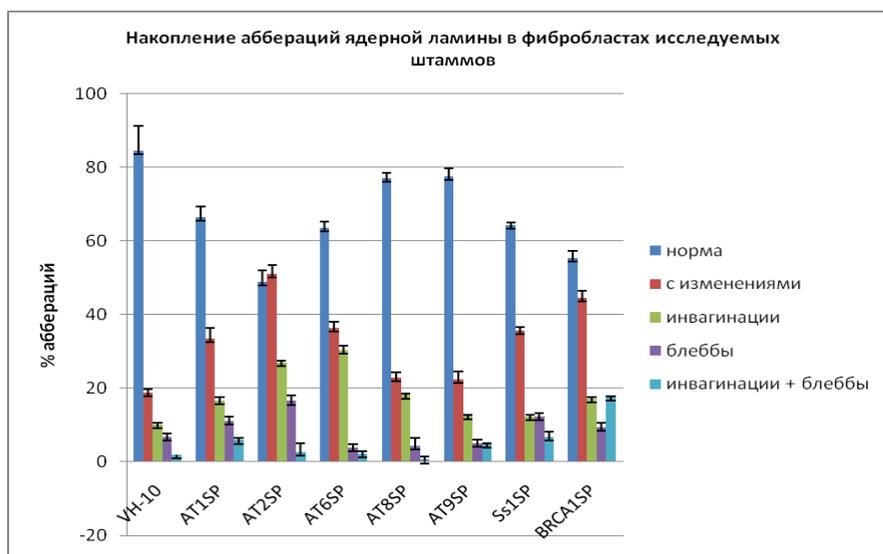
Рис. 37. Накопление aberrаций ядерной оболочки в фибробластах исследуемых линий



При этом более подробное исследование типов aberrаций выявило интересную закономерность. Если в клетках больных АТ, как истинных, так и мозаиков, неясного радиочувствительного синдрома AT2SP, Скаффиди и Мистели в своих работах справедливо рассматривали инвагинацию и блеббы ядерной ламины, как признак старения клетки (Scaffidi, Misteli 2006), то закономерно, что в клетках здорового донора (VH-10) этот процент практически самый низкий (2%). Удивителен и в то же время логичен тот факт, что самый небольшой процент таких клеток принадлежит линии от пациента с наиболее тяжёлой формой АТ - AT8SP (0,6%). Скорее всего, это

связано с тем, что в клетках этого больного меньше всего проявляется программа клеточного старения. В то же время при АТ более лёгкой формы и мозаичных форм - АТ6SP, АТ1SP и АТ9SP - процент инвагинаций и блеббов ядерной ламины выше, чем у здорового донора (соответственно 2,1%, 5,8% и 4,8%), что может подчеркнуть роль изменений ядерной ламины в клетках с усиленной программой клеточного старения. Мы могли бы предположить, что описанные нами изменения ядерной ламины соответствуют противодействию программы клеточной трансформации, но самый высокий процент клеток с инвагинациями и блеббами одновременно в одной клетке (17,6%) в линии пациентки с мутацией 5382insC в гене *BRCA1* (*BRCA1SP*) заставляет нас усомниться в справедливости этого предположения. Возможно, наблюдаемые изменения клеточной ламины связаны с тем, что клетка с повышенным риском трансформации пытается «спасти себя», уйдя в старение. Эта теория хорошо согласуется с данными работы команды Мануила Колладо, которая показала повышенный уровень бета-галактазидазы в предраковых опухолевых клетках (Collado et al., 2006). А так, как уже было сказано ранее, инвагинации и блеббы одновременно в клетке являются признаком её старения, мы предположили, что и уровень бета-галактазидазы в таких клетках должен быть также высок. Характеристика аберрации ядерной ламины показана на рис. 17.

Рис. 38. Характеристика аберраций ядерной ламины фибробластов исследуемых линий



Изменения нуклеоскелета происходят не только при преждевременном старении, но и при естественном (Scaffidi, Misteli, 2006, McClintock 2013): в ядрах клеток престарелых доноров, не страдающих прогериями, была обнаружена стабилизация укороченной и перманентно фарнезилированной формы преламина А – прогерина. Кроме ядерных изменений, aberrации ламина А/С могут сказываться и на организации цитоскелетных элементов клетки.

Эти данные о частоте aberrаций ядерной ламины в фибробластах линии VH-10 хорошо согласуются с данными, полученными ранее нашей лабораторией (Смирнова и др. 2008). Интересно, что в линиях AT2SP, от пациентки с мутацией 5382insC в гене *BRCA1* (BRCA1SP) и пациентки с синдромом Секкеля (Ss1SP) количество aberrаций на 35,4/ 44,9 и 51.5% ниже, чем в клетках пациента с атипичным синдромом Вернера 26 лет (87%) (Смирнова и др. 2008). Это может свидетельствовать о том, что мутации в этих генах приводят к структурным изменениям ядерной ламины. Существенно и то, что процент клеток, содержащих одновременно инвагинации и блеббы в клетке также наиболее высок в линиях BRCA1SP и Ss1SP.

3.6 Определение количества SA-β-галактозидазы в исследуемых линиях

Традиционным и одним из первых описанных маркеров старения считается SA-β-галактозидаза, или лизосомно-ассоциированная β-галактозидаза (SA-β-gal) (Sikora et al., 2011). Этот фермент, который часто называют лактазой, катализирует реакцию гидролитического отщепления нередуцирующих остатков β-D-галактозы в β-галактозидах, в частности, в молочном сахаре — дисахариде лактозы: β-галактозидаза, отщепляет остаток галактозы от нередуцирующего конца галактозидов: олигосахаридов, полисахаридов, гликолипидов, гликопептидов, мукополисахаридов. При этом расщепляется связь между C1-атомом остатка галактозы и гликозидным атомом кислорода. Лизосомно-ассоциированная β-галактозидаза (SA-β-gal) накапливается при старении в лизосомах – органеллах клетки, которые ответственны за расщепление дефектных биомолекул. Её активность резко повышена в старых клетках.

Для подтверждения факта старения клетки в исследуемых линиях нами был исследован уровень относительной активности SA-β-галактозидазы (SA-β-gal). Данные по содержанию SA-β-галактозидазы отображены в таблице 7 и рисунках 39-41.

Таблица 11. Содержание SA-β-галактозидазы в исследуемых линиях

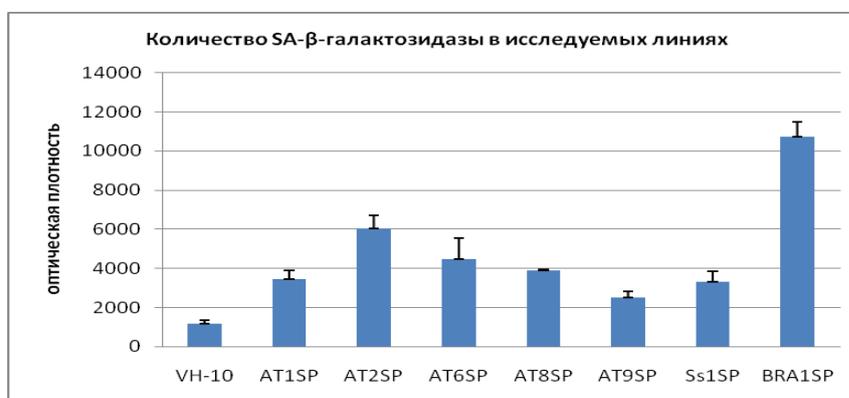
Содержание SA-β-галактозидазы в исследуемых линиях (в относительных ед.)	
линия	Содержание SA-β-галактозидазы
VH-10	1163,1 (±183,4)
AT1SP	3462,3 (±443,6)***
AT2SP	6052,1 (± 651,8)***
AT6SP	4470,8 (± 1074)**
AT8SP	3878,1 (± 42,6)***

AT9SP	2513,1 (\pm 331)***
Ss1SP	3337,3 (\pm 519,5)***
BRCA1SP	10714,6 (\pm 750)***

Статистически достоверные отличия от контроля при $p < 0,01$, *Статистически достоверные отличия от контроля при $p < 0,001$

Как и предполагалось, самый минимальный уровень традиционного маркера старения оказался в клетках здорового донора (VH-10).

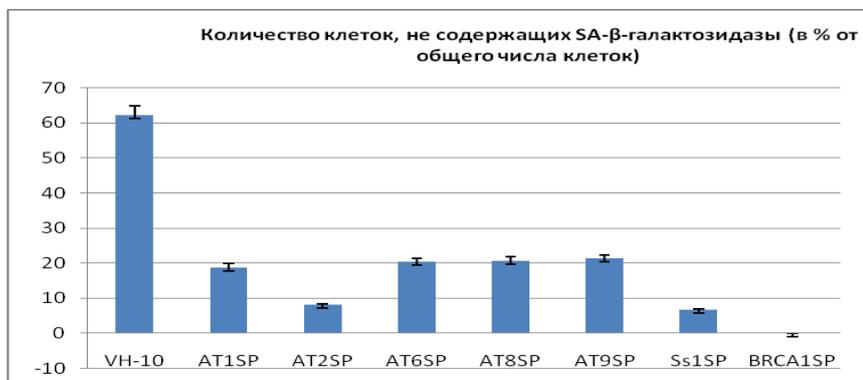
Рис. 39. Количество SA- β -галактозидазы в исследуемых линиях (в отн. опт. плот.)



Максимальный — в клетках пациента с невыясненным радиочувствительным синдромом (AT2SP) и в линии BRCA1SP, в которой наблюдался самый высокий процент aberrаций ядерной ламинаы (блеббов и инвагинаций одновременно): соответственно, в 5,2 и в 9,2 раза достоверно выше, чем у здорового донора (VH-10). Интересно, что у пациентки с мутацией 5382insC в гене *BRCA1* (BRCA1SP) не было клеток без SA- β -галактозидазы (Рис. 39), и это хорошо согласуется с работой группы М. Колладо (Collado et al. 2005), которая показала повышенный уровень маркеров старения - SA- β -галактозидазы и HP1- γ в клетках предраковых опухолей. Исследователи подчёркивают, что в раковых клетках маркера старения - SA- β -галактозидазы не было обнаружено. Авторы работы считают, что такое клеточное старение является предопределяющей чертой

предраковых опухолей, которая может иметь ценность в диагностике и прогнозе рака.

Рис.40. Количество клеток, не содержащих SA-β-галактозидазы



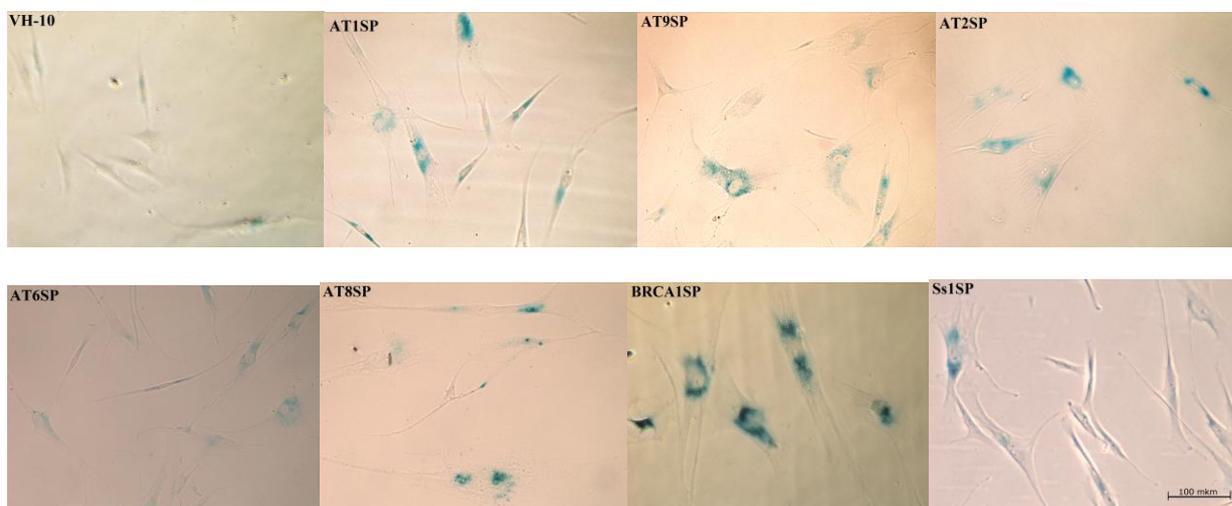
Учитывая специфику клеточного роста линии BRCA1SP, можно заметить, что данные клетки не образуют монослой, который образовывали все остальные исследуемые линии. Тип их роста сходен с ростом клеток при ламинопатии атипичного случая синдрома Вернера (Смирнова и др., 2009).

Уровень SA-β-галактозидазы в клетках пациентки с синдромом Секкеля практически в три раза достоверно превышает уровень в клетках здорового донора (VH-10).

Содержание SA-β-галактозидазы в клетках линии, принадлежащей более лёгкой форме АТ (AT6SP), не намного выше такового количества при более тяжёлой форме АТ (AT8SP). Соответственно в 3,8 и в 3,3 раза (достоверно) оно выше, чем в клетках здорового донора. Другими словами, из всех линий больных АТ, как явных больных, так и мозаиков, наибольший уровень маркера старения SA-β-галактозидазы оказался у пациентки с более лёгкой формой АТ (AT6SP), что хорошо сочетается с данными по количеству гетерохроматинового маркера HP1- γ в этих линиях. Из всех линий с АТ наименьшее количество этого белка оказалось в линии AT6SP, что ещё раз подтверждает наши предположения о том, что в этой линии реализовалась программа клеточного старения. Однако, она имеет другую природу, нежели

старение в предраковых опухолях, когда в клетке повышается содержание геторохроминового белка HP1- γ .

Рис. 41. SA- β -галактозидаза в исследуемых линиях



3.7. Измерение длин теломер

На сегодняшний день существует несколько способов измерения длин теломер, каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки. Основные минусы современных методов измерения длин теломерных последовательностей заключаются либо в том, что продукты анализа содержат, помимо теломерной ДНК, пограничные районы неизвестной длины, не содержащие теломерных последовательностей, либо опыт занимает много времени и требует большого количества стартового материала, либо размер теломерной ДНК не может быть определен достаточно точно, т.к. метод не позволяет измерить длину теломер отдельной клетки или хромосомы. К сожалению, метод, который исключал бы все эти недостатки, еще не описан, но и имеющиеся в настоящее время методы анализа длин теломер успешно используются, причем практически равнозначно, и выбираются в зависимости от целей, преследуемых исследователем.

Таблица 11. Длины теломер исследуемых линий

Клеточная линия	Пассаж	Возраст	Длина теломер (т. п. н)
AT9SP	4	1,5	3.2
AT8SP	11	12	4.3
AT6SP	12	26	3.3
VH-10	22	8	4.6
VH-10	15	8	4.8
BRCA1	3	30	3.95
Ss1SP	4	1	3,85
AT2SP	неизв.	2	3,1
AT1SP	17	4	4,2

Важным, и в то же самое время индивидуальным, параметром, характеризующим процесс старения, является укорочение теломер - концевых участков эукариотических хромосом (Allsopp et al., 1992; Михельсон, Гамалей, 2010), хотя прямую связь возраста обследованных с длинами теломер не всегда удается обнаружить (Bischoff, et al., 2006). Последнее объясняется тем, что в настоящее время имеется возможность наблюдать изменение длины теломер лишь в организме в целом (по длине теломер в лимфоцитах периферической крови, в клетках кожи), так что четко зарегистрировать укорочение теломер с возрастом удается обычно лишь в самом пожилом возрасте (Смирнова и др., 2012). Между тем, старение в разных тканях и в разных участках одной и той же ткани организма происходит неравномерно, и в обычных условиях приводит к снижению продолжительности жизни не в результате общего укорочения теломер во всех клетках организма, а в результате исчерпания лимита Хейфлика в каких-то определенных участках тканей, что и вызывает характерные старческие болезни, обычно являющиеся причинами смерти – рак, сердечную недостаточность, инсульты, инфаркты (Mikhelson, Gamaley, 2012). Очевидно,

что для старения и смерти от старости вовсе не обязательно, чтобы лимит Хейфлика был исчерпан во всех клетках и тканях организма, чего в реальности никогда не бывает. Достаточно истощения пролиферативного потенциала клеток в каком-то отдельном участке одной из тканей какого-либо органа, что повышает вероятность развития той или иной из перечисленных характерных возрастных болезней. Эти болезни, разумеется, могут возникать и в более молодом возрасте, и не обязательно в результате истощения лимита Хейфлика, однако в участке ткани, где лимит пролиферации клеток исчерпан и группа клеток поставлена перед необходимостью либо преодолеть лимит Хейфлика (рак), либо погибнуть (инсульт, инфаркт), возникновение этих заболеваний более вероятно. Для рака это показано достаточно четко (Maser, DePinho, 2004). Механизм развития рака в результате истощения клетками пролиферативного потенциала представляется следующим: более активная пролиферация эпителиальных клеток в некоем участке ткани приводит к критическому укорочению теломер. В сочетании с инактивацией определенных генов соматическими мутациями, также накапливающимися с возрастом, это может приводить к тому, что клетки преодолевают (by-pass) лимит Хейфлика. Продолжающаяся пролиферация за пределы лимита Хейфлика ведет к дальнейшему прогрессивному истощению теломер и запуску в этих клетках хромосомных разрывов, слияний и мостов с последующей анеуплоидией и транслокациями, что и приводит к раннему канцерогенезу *in situ*, а включающаяся экспрессия теломеразы – к активному злокачественному росту. Роль местного укорочения теломер показана на карциномах легких (Freitag et al., 2000; Frias et al., 2008), грудной железы (Li et al., 2002); печени (Dumble et al., 2002); кишечника (Canamaru et al., 2002); нейробластоме (Ohali et al., 2006); глиоме (Walcott et al., 2013), саркоме Эвинга (Avigad et al., 2007). Подобные же механизмы предложены для объяснения развития инсульта (Martin-Ruiz et al., 2006; Zhang et al., 2007) и

сердечной недостаточности (Aviv, 2002; Njajou et al., 2007). Что касается постмитотических клеток (кардиоциты, нейроны), то на их состоянии, сопряженном с функционированием снабжающих их сосудов, может неблагоприятно сказываться состояние тех групп клеток, которые исчерпали свой пролиферативный потенциал и тем самым снизили гомеостатические возможности всего организма.

С возрастом число участков в тканях организма, где клетки исчерпали свой пролиферативный потенциал, постепенно увеличивается, и тем быстрее, чем интенсивнее делятся клетки в организме в целом и в том или ином участке ткани в частности. Соответственно, с возрастом увеличивается и вероятность развития вышеперечисленных заболеваний. В конце концов даже самая передовая медицина не может справиться с нарастающим валом старческих болезней: человека вылечивают от рака, но он умирает от инсульта или от сердечной недостаточности, либо от иной характерной болезни пожилого возраста.

Изучение длины теломер в ДНК различных тканей у людей в возрасте от новорожденных до столетних показало, что она уменьшается на 29-60 пар оснований (п.о.) в год в печени, коре почек и селезенке, но не в коре мозжечка или миокарде (Takubo, 2002). На момент рождения длина теломер в лимфоцитах пуповинной крови человека варьирует от 6 до 15 т.п.н. (Смирнова и др., 2012).

Известно, что длины теломер в разных тканях одного и того же организма и даже в разных клетках одной и той же ткани и органа, могут различаться. Как правило, при разных формах преждевременного старения (прогериях) теломеры значительно укорочены в связи с нарушениями нормального функционирования генов ATM и WRN (Smilenov et al., 1007; Machwe et al., 2004). Бесспорна ассоциация укорочения теломер с клеточным

старением (Allsopp et al., 1997) и старением организма (Tomas-Loba et al., 2005).

Наше исследование показало, что длины теломер здорового донора, как и предполагалось, достоверно выше, чем в клетках больных АТ, но эта разница обычно невелика. Не удалось выявить каких-либо закономерностей в распределении длин теломер в зависимости от формы заболевания АТ.

Заключение

Первичные нетрансформированные фибробласты способны пройти в культуре определённое видоспецифичное количество делений, получившее название лимита Хейфлика по имени Леонарда Хейфлика, впервые описавшего это явление в 1961 г (Hayflick, Moorhead, 1961). Молекулярной основой лимита Хейфлика является недорепликация – укорочение теломер при каждом акте репликации репликации ДНК. Постепенное укорочение теломер ведёт к такому же постепенному изменению активности целого спектра генов, и физиологическое состояние клеток с каждым пройденным делением меняется. Появляющиеся при этом биохимические изменения в клетке получили названия маркеров старения. Укорочение теломер до определённой длины приводит к нарушению третичной структуры телосомы, в результате чего сигнальные системы клетки начинают воспринимать концы хромосом как нерепарированные двунитевые разрывы, запуская DDR-ответ, приводящий к необратимой остановке клеточного цикла, т.е. клеточному старению. В то же время, при наличии мутаций в генах, вовлечённых в регуляцию клеточного цикла или репарацию ДНК, процесс естественного клеточного старения нарушается – он может ускоряться, или, напротив, сглаживаться, приводя в определённых случаях к преодолению остановки клеточной пролиферации при укорочении теломер и развитию трансформационного (опухолевого) фенотипа. В таких случаях программа

клеточного старения сосуществует одновременно с программой клеточной трансформацией, и их взаимодействие приводит к развитию определённого фенотипа, сопутствующего многим наследственным синдромам. Сочетание признаков ускоренного старения с резко повышенным риском возникновения опухолей характерно для ряда синдромов, синдром Коккейна, синдром Вернера, синдром Блюма, синдром Ли-Фромени, анемия Фанкони и др. К таким синдромам относится и атаксия-телеангиэктазия, в клинической картине которой взаимодействие программ клеточного старения и трансформации наблюдается наиболее явно. Поэтому данный синдром активно изучается во многих лабораториях мира, и количество публикаций, посвященных ему, постоянно растет.

Клеточное старение представляет собой систематический процесс воздействия на целостность структуры и функции клеток, которому сопутствуют серьёзные изменения в экспрессии генов, в первую очередь – регуляторов транскрипции. Senescing – сигналы, сигналы приводящие к старению клетки, как правило, возникают через повреждения ДНК в результате как окислительного стресса, так и дефектов процессов репарации ДНК, нарушения активности таких белков как p53, Rb, p13K, или укорочения теломер (Matuoka, Chen, 2002). При изучении всей совокупности таких сигналов некоторые исследователи не считают старение само по себе клеточной программой, а только «отражением» других программ (Blagosklonny, 2013).

В то же время другие учёные рассматривают клеточное старение как важнейший признак млекопитающих и главный фактор, подавляющий туморогенез (Kuilman et al., 2013). Основываясь на этих представлениях корректно совместно рассматривать маркеры, характерные для процессов туморогенеза, как результат одновременного действия двух разнонаправленных клеточных программ - старения и трансформации.

Атаксия-телеангиэктазия, характеризующаяся высоким клиническим разнообразием, достаточно хорошо подходит в качестве естественной модели для изучения данных процессов.

Использование первичных фибробластов – клеток, способных к ограниченному числу делений в культуре, т.е. стареющих в процессе культивирования, позволяет изучить процесс старения *in vitro*, выявляя динамику маркеров старения как в интактных клетках, так и при действии ДНК-повреждающих агентов. Исследование линий клеток, полученных от больных с различными наследственными синдромами позволяет выявить биохимические особенности при конкретном синдроме, что может быть использовано в разработке клеточных диагностических методов. Изучение реакции клеток на повреждение ДНК позволило разработать клеточный метод, помогающий в сложных клинических случаях уточнить диагноз АТ и выявить раннее не описанный мозаицизм при данном заболевании. Подобный мозаицизм был описан Эллисом и соавторами при синдроме Блума (Allis et al., 21995): у больных, чьи родители не были близкими родственниками и у которых можно было предположить наличие разных мутаций в аллелях гена *BLM*, полученных от отца и матери, наблюдалась небольшая доля лимфоцитов с нормальным, а не с повышенным уровнем сестринских хроматидных обменов (СХО) – при том, что повышенный уровень СХО является надёжным цитогенетическим маркером синдрома Блума. Авторы работы предположили, что такое явление может быть результатом рекомбинации между двумя гомологичными локусами, содержащими ген *BLM* с разными мутациями. Действительно, гомологичная рекомбинация может быть задействована при восстановлении нормального аллеля гена из двух мутантных с мутациями в разных Мозаицизм, подобный тому, что мы обнаружили при АТ, был ранее описан при синдроме Блюма. У больных, чьи родители не были близкими родственниками, и у которых можно было предположить наличие различных мутаций в аллелях гена *BLM*,

полученных от отца и матери, наблюдается небольшая доля лимфоцитов с нормальным, а не повышенным уровнем сестринских хроматидных обменов (СХО) – при том, что высокий уровень СХО является надежным цитогенетическим маркером синдрома Блюма. Как было показано ранее (Ellis et al., 1995) на основе лимфоцитов таких пациентов были получены лимфобластоидные клеточные линии, в части которых действительно не было повышенного уровня СХО. Авторы работы предположили, что такое явление может быть результатом рекомбинации между двумя гомологичными локусами, содержащими ген *BLM* с разными мутациями. Действительно, гомологичная рекомбинация может быть задействована при восстановлении нормального аллеля гена из двух мутантных с мутациями в разных точках (Moynahan et al., 2001).

При изучении как механизмов старения, так и механизмов трансформации, в настоящее время большое внимание уделяется эпигенетическим изменениям, таких как модификации гистонов, приводящие к изменениям транскрипционной активности генов, а также ферментов, участвующих в процессе таких модификаций. Показано, что при синдроме Хатчинсона-Гилфорда (прогерия детей) и у пожилых доноров в первичных фибробластах наблюдается значительное снижение уровня интенсивности флуоресценции триметилированных форм гистона H3 - H3K9me3 и H3K27me3 (Scaffidi, Misteli, 2006; Shumaker et al., 2006). При изучении этих модификаций гистона H3 нами было показано, что в клетках больных АТ интенсивность флуоресценции H3K9me3 в ядрах клеток больных АТ в некоторых случаях была ниже контрольной, а в некоторых – выше. Эти данные не позволяют считать изменение количества H3K9me3 одним из признаков АТ, демонстрируя разнообразие на клеточном уровне при АТ.

В то же время средняя интенсивность флуоресценции H3K27me3 в ядрах клеток всех пациентов с АТ оказалась достоверно выше, чем в клетках

здорового донора, причем при тяжёлой форме АТ (АТ8SP) – в 4 раза выше контроля. Ранее было показано, что увеличение H3K27me3 может использоваться в качестве онкомаркера (Hosogane et al., 2010). Поэтому наши данные не только позволяют утверждать, что имеются АТ-специфические изменения факультативного хроматина, но и подтверждают представление о наличии в клетках АТ двух активных разнонаправленных клеточных процессов.

Метилирование гистонов связано с их предварительным деацетилированием, и гистоновые деацетилазы – сиртуины - сейчас рассматриваются как активные участники процесса старения. Несмотря на множество работ, описывающих корреляцию снижения количества/активности SIRT1 со старением (Sommer et al., 2006; Pallas et al., 2008; Herranz et al., 2010; Satoh et al., 2010), нами не было выявлено снижение активности флуоресценции SIRT1 в клетках больных АТ, то есть мы не можем сделать вывод, что ускоренное старение при АТ не зависит от активности этого белка. Возможно, это связано как с тем, что деацетилаза SIRT1 вовлечена не только в старение, но и во многие другие клеточные процессы (Serravallo et al., 2009), так и с тем, что данный белок исследовался нами в первичных фибробластах кожи, а не в описанных в литературе тканях – печени, почках, мышцах и т.д. (Rahman, Islam, 2011; Hwang et al., 2013). В то же время, выявленное нами снижение количества SIRT1 в первичных фибробластах BRCA1SP, соответствует литературным данным, полученным на клетках опухоли молочной железы. Такое снижение SIRT1-зависимого деацетилирования H3K9 в зоне промотора гена анти-апоптотического белка сурвивина, наблюдаемое при BRCA1 абляции, приводит к повышению его уровня, и как следствие – усилению роста опухоли (Wang et al., 2008).

Повышение количества SIRT6, обнаруженное во всех исследованных клетках больных АТ, вне зависимости от формы и степени тяжести заболевания, также противоречащее литературным данным о его возможном

снижении при старении (Kawahara et al., 2008), мы склонны рассматривать как отличительный признак АТ, еще раз подтверждающий высказанное выше предположение о наличии в клетках АТ двух разнонаправленных клеточных процессов – старения и трансформации. Повышение интенсивности флуоресценции SIRT6 можно объяснить компенсаторной ролью данного сиртуина, ранее описанной для других наследственных синдромов, характеризующихся, как и АТ, теломерной дисфункцией. При врожденном дискератозе (мутация в гене *DCK1*), при котором отмечено резкое укорочение теломер, SIRT6 вовлечён в их поддержание. В норме он также стабилизирует связь теломер с белком WRN (нуклеаза-геликаза синдрома Вернера - WS) (Seravallo et al., 2009), а SIRT6-нокаутные мыши проявляют WS-фенотип (Roth et al., 2013).

Безусловно, процессы, происходящие в клетке при нарушении ответа на повреждение ДНК, протекают в каждом случае индивидуально и зависят от многих факторов. Полученные нами данные лишь приоткрывают завесу в этом вопросе, который нуждается в дальнейшем изучении с привлечением большего количества клеточных линий, как от больных АТ и другими синдромами, характеризующимися нарушением процесса репарации ДНК и признаками ускоренного старения, так и здоровых доноров, в первую очередь – пожилого возраста. Но, тем не менее, зафиксированные эпигенетические особенности при различных формах АТ и обнаружение мозаичных форм этого заболевания позволяют предположить, что изучение изменений в клетках при нарушении функций гена *ATM* может помочь как выявить более чёткие маркеры для данного сложного заболевания, так и подробнее описать эпигенетические механизмы, влияющие на клеточное и организменное старение.

Выводы

1. Метод иммунофлуоресцентного анализа позволяет детектировать активную форму протеинкиназы АТМ, возникающую в ответ на повреждение ДНК, что позволяет на клеточном уровне подтвердить или отвергнуть диагноз АТ, а также выявить мозаичную форму заболевания.

2. В ядрах интактных клеток линии от пациентки с выраженной тяжёлой формой АТ детектируется значительное количество фокусов сайтов фосфорилирования протеинкиназ АТМ и АТР, что свидетельствует о серьёзных нарушениях клеточных процессов и остановок вилок репликации.

3. В ядрах клеток АТ количество деацетилазы SIRT6 достоверно выше, чем в клетках здорового донора. Не выявлено каких-либо особенностей по количеству деацетилазы SIRT1 в ядрах клеток и активности протеинкиназы АТМ.

4. В клетках АТ уровень гетерохроматинового маркера HP1- γ достоверно ниже, чем в ядрах клеток здорового донора. Наименьшее его количество наблюдается при более легкой форме АТ (АТ6SP), при которой доминирует программа клеточного старения.

5. Количество aberrаций ядерной ламины при АТ достоверно выше, чем в клетках здорового донора, но каких-либо зависимостей количества и качества aberrаций от тяжести и формы АТ не выявлено.

6. Содержание SA- β -галактозидазы при АТ достоверно выше, чем в клетках здорового донора. Из всех линий АТ самые высокие показатели SA- β -галактозидазы демонстрировали клетки линии стертой формы АТ (АТ6SP), где было детектировано наименьшее количество гетерохроматинового маркера HP1- γ .

Список цитируемой литературы

1. Куранова М.Л., Спивак И.М. 2011. Эпигенетические изменения при атаксии-телеангиэктазии. НТВ СПбГПУ. 3(130): 252-56.
2. Михельсон В.М., Смирнов В.И. 1975. О генетической неоднородности пигментной ксеродермы. Вестник дерматологии и венерологии. 3:75-70.
3. Полуботко Е.А., Смирнова Н.В., Плескач Н.М., Михельсон Н.М., Спивак И.М. 2009. Особенности преждевременного старения при атаксии-телеангиэктазии. Цитология. 51(8):712-718.
4. Полуботко Е.А., Шатрова А.Н., Плескач Н.М., Михельсон В.М., Спивак И.М. 2009. Клеточный репаративный потенциал в семьях больных атаксией-телеангиэктазией. Цитология. 52(12):978-85.
5. Смирнова Н. В., Спивак И.М., Плескач Н.М., Михельсон В.М. 2008. Атипичский случай синдрома вернера: эффект ламинопатии. 50(9): 780-787.
6. Спивак И.М., Смирнова Н.В., Плескач Н.М., Ледащева Т.А., Михельсон В.М. 1995. Особенности стабилизации белка Р53 в клетках больных атаксией-телеангиэктазией после гамма-облучения. Цитология. 47(10): 898-906.
7. Спивак И.М., Смирнова Н.В., Плескач Н.М., Ледащева Т.А., Михельсон В.М. 1997. Дискриминация гетерозитного носительства атаксии-телеангиэктазии методом непрямого иммунофлуоресцентного анализа. Цитология. 49(1): 55-61.
8. Спивак И.М. 1999. Наследственные заболевания с первичными и вторичными дефектами репарации ДНК. Цитология. 41(5): 338-79.
9. Спивак И.М., Смирнова Н.В., Плескач Н.М., Ледащева Т.А., Михельсон В.М. 2005. Особенности стабилизации белка р53 в клетках больных атаксией-телеангиэктазией после гамма-облучения. Цитология. 10:898-906.

10. Спивак И.М., Смирнова Н.В., Плескач Н.М., Ледащева Т.А., Михельсон В.М. 2007. Дискриминация гетерозиготного носительства атаксии-телеангиэктазии методом непрямого иммунофлуоресцентного анализа. 1:55-61.
11. Хомасуридзе М.М., Спивак И.М., Плескач Н.М., Михельсон В.М. 1999. Особенности радиочувствительности клеток больных атаксией-телеангиэктазией. Цитология. 41(5): 412-19.
12. Ahmad K., Golic K.G. 1998. The transmission of fragmented chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *Genetics*. 148(2):775-92.
13. Aparicio O.M., Billington B.L., Gottschling D.E. 1991. Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell*. 66(6):1279-87.
14. Arlett C.F., Harcourt S.A. 1978. Cell killing and mutagenesis in repair-defective human cells. Academic Press. 663-36.
15. Arlett C.F., Harcourt S.A., Cole J., Green M. H.L. Anstey A.V. 1992. A comparison of the response of unstimulated and stimulated T-lymphocytes and fibroblasts from normal, xeroderma pigmentosum and trichothiodystrophy donors to the lethal action of UV-C. *Mutation Research, DNA Repair*, 273: 127-35
16. Arlett C.F., Green M.N.L., Rogers P.B., Lehmann A.R., Plowman P.N. 2008. Minimal ionizing sensitivity in a large cohort of xeroderma pigmentosum fibroblasts. *The British Journal of Radiology*. 81:51-58.
17. Bailer S.M., Eppenberger H.M., Griffiths G., Nigg E.A. 1991. Characterization of A 54-kD protein of the inner nuclear membrane: evidence for cell cycle-dependent interaction with the nuclear lamina. *J. Cell. Biol.* 114(3):389-400.
18. Bakkenist C.J., Kastan M.B. 2003. DNA damage activates ATM through

intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*. 421:499-506.

19. Bannister A.J., Zegerman P., Partridge J.F., Miska E.A., Thomas J.O., Allshire R.C., Kouzarides T. 2001. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature*. 410(6824):120-4.
20. Benson E.K., Lee S.W., Aaronson S.A. 2010. Role of progerin-induced telomere dysfunction in HGPS premature cellular senescence. *J. Cell. Sci.* 123:2605–2612.
21. Berkovich E., Monnat R.J. Jr., Kastan M.B. 2007. Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair. *Nat Cell Biol.* 9(6):683-90.
22. Bernstein B.E., Schreiber S.L. 2002. Global approaches to chromatin. *Chem. Biol.* 9(11): 1167-1173.
23. Blagosklonny M.V. 2011. Progeria, rapamycin and normal aging: recent breakthrough. *Aging*. 3:685–691.
24. Blander G., Guarente L. 2004. The Sir2 family of protein deacetylases. *Biochem.* 73:417-35.
25. Bridger J.M., Kill I.R. 2004. Aging of Hutchinson–Gilford progeria syndrome fibroblasts is characterised by hyperproliferation and increased apoptosis. *Exp. Gerontol.* 39:717–724.
26. Brownell J.E., Zhou J., Ranalli T., Kobayashi R., Edmondson D.G., Roth S.Y., Allis C.D. 1996. Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell.* 84(6):843-51.
27. Burdon D., Patel R., Charliss R. A. J., Blank J.L. 2002. Growth inhibition by the muscarinic M3 acetylcholine receptor: evidence for p21Cip1/Waf1 involvement in G1arrest. *Biochem.* 367: 549-55.

28. Cairns B.R. Chromatin remodeling complexes: strength in diversity, precision through specialization. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 15(2):185-90.
29. Campos E.I., Reinberg D. 2009. Histones: annotating chromatin. *Annu Rev. Genet.* 43:559-99.
30. Candelario J., Borrego S., Reddy S., Comai L. 2011. Accumulation of distinct prelamin A variants in human diploid fibroblasts differentially affects cell homeostasis. *Exp. Cell. Res.* 317:319–329.
31. Cao K., Graziotto J.J., Blair C.D., Mazzulli J.R., Erdos M.R., Krainc D., Collins F.S. 2011. Rapamycin reverses cellular phenotypes and enhances mutant protein clearance in Hutchinson–Gilford progeria syndrome cells. *Sci. Transl. Med.* 3:89ra58.
32. Cenni V., Capanni C., Columbaro M., Ortolani M., D’Apice M.R., Novelli G., Fini M., Marmioli S., Scarano E., Maraldi N.M. 2011. Autophagic degradation of farnesylated prelamin A as a therapeutic approach to lamin-linked progeria. 2011. *Eur. J. Histochem. J. Mol. Med.* 90:1361–1389.
33. Chadwick B.P., Willard H.F. 2004. Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101(50):17450-5.
34. Collado M., Gil J., Efeyan A., Guerra C., Schuhmacher A.J., Barradas M., Benguría A., Zaballos A., Flores J.M., Barbacid M., Beach D., Serrano M. 2005. Tumour biology: senescence in premalignant tumours. *Nature.* 436(7051):642.
35. Concannon P. 2002. ATM heterozygosity and cancer risk. *Nat Genet.* 32(1):89-90.
36. Conneely K.N., Capell B.C., Erdos M.R., Sebastiani P., Solovieff N., Swift A.J., Baldwin C.T., Budagov T., Barzilai N., Atzmon G. 2012.

- Human longevity and common variations in the LMNA gene: a meta-analysis. *Aging Cell*. 11(3): 475–481.
37. Dechat T., Shimi T., Adam S.A., Rusinol A.E., Andres D.A., Spielmann H.P., Sinensky M.S., Goldman R.D. 2007. Alterations in mitosis and cell cycle progression caused by a mutant lamin A known to accelerate human aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104:4955–4960.
38. Eskeland R., Freyer E., Leeb M., Wutz A., Bickmore W.A. 2010. Histone acetylation and the maintenance of chromatin compaction by Polycomb repressive complexes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 75:71-8.
39. Ezhkova E., Lien W.H., Stokes N., Pasolli H.A., Silva J.M., Fuchs E. 2011. EZH1 and EZH2 cogovern histone H3K27 trimethylation and are essential for hair follicle homeostasis and wound repair. *Genes. Dev.* 25(5):485-98.
40. Faggiano A., Del Prete M., Marciello F., Marotta V., Ramundo V., Colao A. 2011. Thyroid diseases in elderly. *Minerva Endocrinol.* 36:211–231.
41. Falck J., Mailand N., Syljuasen R.G., Bartek J., Jiri Luk J. 2001. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. *Nature*. 40:842-47.
42. Felsenfeld G., Groudine M. 2003. Controlling the double helix. *Nature*. 421(6921):448-53.
43. Feng X., Jiang Y., Meltzer P., Yen P.M. 2000. Thyroid hormone regulation of hepatic genes in vivo detected by complementary DNA microarray. *Mol. Endocrinol.* 14:947–955.
44. Finnin M.S., Donigian J.R., Pavletich N.P. 2001. Structure of the histone deacetylase SIRT2. *Nat. Struct. Biol.* 8(7):621-5.
45. Fisher A.G., Merckenschlager M. 2002. Gene silencing, cell fate and nuclear organisation. *Curr Opin Genet Dev.* 12(2):193-7.

46. Francis N.J., Kingston R.E., Woodcock C.L. 2004. Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science*. 306(5701):1574-7.
47. Goldman R.D., Shumaker D.K., Erdos M.R., Eriksson M., Goldman A.E., Gordon L.B., Gruenbaum Y., Khuon S., Mendez M., Varga R., Collins F.S. 2004. Accumulation of mutant lamin A causes progressive changes in nuclear architecture in Hutchinson-Gilford progeria syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101(24):8963-8.
48. Goodarzi A.A., Noon A.T., Deckbar D., Ziv Y., Shiloh Y., Löbrich M., Jeggo P.A. 2008. ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol Cell*. 31(2):167-77.
49. Gottschling D.E., Aparicio O.M., Billington B.L., Zakian V.A. 1990. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. *Cell*. 63(4):751-62.
50. Gunaratne R., Braucht D.W., Rinschen M.M., Chou C.L., Hoffert J.D., Pisitkun T., Knepper M.A. 2010. Quantitative phosphoproteomic analysis reveals cAMP/vasopressin-dependent signaling pathways in native renal thick ascending limb cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107:15653–15658.
51. Halikowski M.J., Liew C.C. 1987. Identification of a phosphoprotein in the nuclear matrix by monoclonal antibodies. *Biochem. J*. 41(3):693-7.
52. Hatano A., Matsumoto M., Higashinakagawa T., Nakayama K.I. 2010. Phosphorylation of the chromodomain changes the binding specificity of Cbx2 for methylated histone H3. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 397(1):93-9.
53. Heald R., McKeon F. 1990. Mutations of phosphorylation sites in lamin A that prevent nuclear lamina disassembly in mitosis. *Cell*. 61(4):579-89.

54. Heijink D.M., Fehrmann R.S., de Vries E.G., Koornstra J.J., Oosterhuis D., van der Zee A.G., Kleibeuker J.H., de Jong S. 2011. A bioinformatical and functional approach to identify novel strategies for chemoprevention of colorectal cancer. *Oncogene*. 30(17):2026-36.
55. Herranz D., Muñoz-Martin M., Cañamero M., Mulero F., Martinez-Pastor B., Fernandez-Capetillo O., Serrano M. 2010. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. *Nat Com*. 1-3.
56. Hosogane M., Funayama R., Nishida Y., Nagashima T., Nakayama K. 2013. Ras-induced changes in H3K27me3 occur after those in transcriptional activity. *PLoS Genet*. 9(8):e1003698.
57. Hutchison C.J., Worman H.J. 2004. A-type lamins: Guardians of the soma? *Nat. Cell Biol*. 6: 1062–1067.
58. Ioan D., Dumitriu L., Belengeanu V., Bistriceanu M., Maximilian C. 1988. Leprechaunism: report of two cases and review. *Endocrinologie*. 26:205–209.
59. Jene-Sanz A., Váraljai R., Vilkova A.V., Khrantsova G.F., Khrantsov A.I., Olopade O.I., Lopez-Bigas N., Benevolenskaya E.V. 2013. Expression of polycomb targets predicts breast cancer prognosis. *Mol. Cell. Biol*. 33(19):3951-61.
60. Jenuwein T., Allis C.D. 2001. Translating the histone code. *Science*. 293(5532):1074-80.
61. Jung H.J., Lee J.M., Yang S.H., Young S.G., Fong L.G. 2012. Nuclear lamins in the brain - new insights into function and regulation. *Mol. Neurobiol*. 47(1):290-301.
62. Ke X.S., Qu Y., Rostad K., Li W.C., Lin B., Halvorsen O.J., Haukaas S.A., Jonassen I., Petersen K., Goldfinger N., Rotter V., Akslen L.A., Oyan A.M., Kalland K.H. 2009. Genome-wide profiling of histone h3

- lysine 4 and lysine 27 trimethylation reveals an epigenetic signature in prostate carcinogenesis. *PLoS One*. 4(3):e4687.
63. Khorasanizadeh S. 2004. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell*. 116(2):259-72.
64. Kim H.S., Xiao C., Wang R.H., Lahusen T., Xu X., Vassilopoulos A., Vazquez-Ortiz G., Jeong W.I., Park O., Ki S.H., Gao B., Deng C.X. 2010. Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis. *Cell. Metab.* 12:224–236.
65. Kim D.H., Tang Z., Shimada M., Fierz B., Houck-Loomis B., Bar-Dagen M., Lee S., Lee S.K., Muir T.W., Roeder R.G., Lee J.W. 2013. Histone H3K27 trimethylation inhibits H3 binding and function of SET1-like H3K4 methyltransferase complexes. *Mol Cell Biol.* 33(24):4936-46.
66. Kipp D.R., Quinn C.M., Fortin P.D. 2013. Enzyme-dependent lysine deprotonation in EZH2 catalysis. *Biochemistry*. 52(39):6866-78.
67. Kolybaba A., Classen A.K. 2014. Sensing cellular states-signaling to chromatin pathways targeting Polycomb and Trithorax group function. *Cell Tissue Res.* 356(3):477-93.
68. Kondo Y., Shen L., Ahmed S., Bumber Y., Sekido Y., Haddad B.R., Issa J.P. 2008. Downregulation of histone H3 lysine 9 methyltransferase G9a induces centrosome disruption and chromosome instability in cancer cells. *PLoS One*. 3(4):e2037.
69. Kruse J.P., Gu W. 2009. Modes of p53 regulation. *Cell*. 137(4):609-22.
70. Kurdistani S.K., Grunstein M. 2003. Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(4):276-84.
71. Kutagawa R., Kastan M.B. 2005. The ATM-dependent DNA damage signaling pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 70:99-109.

- 72.Lachner M., O'Carroll D., Rea S., Mechtler K., Jenuwein T. 2001. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature*.410(6824):116-20.
- 73.Ladomery M., Lyons S., Sommerville J. 1997. Xenopus HDm, a maternally expressed histone deacetylase, belongs to an ancient family of acetyl-metabolizing enzymes. *Gene*. 198(1-2):275-80.
- 75.Laemmli U.K. 1978. Levels of organization of the DNA in eucaryotic chromosomes. *Pharmacol Rev*. 30(4):469-76.
- 76.Landry J., Slama J.T., Sternglanz R. 2000. Role of NAD(+) in the deacetylase activity of the SIR2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 278(3):685-90.
77. Lanzy G., Ballotin U., Franciotta D., Maserati E., Pasquali F., Veggiotti P. 1992. Clinical, Cytogenetic and Immunological Aspects in 4 Cases Resembling Ataxia Telangiectasia. *Eur Neurol*. 23:121-125.
- 78.Lavin M.F. 2008. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Molecular cell biology*. 9: 759-69.
- 79.Lavin M.F., Khanna K.K. 1999. ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. *Int J Radiat Biol*. 75(10):1201-14.
- 80.Lavin M.F., Kozlov S. 2007. ATM activation and DNA damage response. *Cell Cycle* 6(8):931-42.
81. Lee J.H., Mand M.R., Deshpande R.A., Kinoshita E., Yang S.H., Wyman C., Paull T.T. 2013. Ataxia telangiectasia-mutated (ATM) kinase activity is regulated by ATP-driven conformational changes in the Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) complex. *J.Biol.Chem*. 288(18):12840-12851.

- 82.Li X., Lin H.H., Chen H., Xu X., Shih H.M., Ann D.K. 2010. SUMOylation of the transcriptional co-repressor KAP1 is regulated by the serine and threonine phosphatase PP1. *Sci Signal.* 27;3(119): ra32.
- 83.Lin F., Worman H.J. 1993. Structural organization of the human gene encoding nuclear lamin A and nuclear lamin C. *J. Biol. Chem.* 268:16321–16326.
- 84.Lopez-Mejia I.C., Vautrot V., De Toledo M., Behm-Ansmant I., Bourgeois C.F., Navarro C.L., Osorio F.G., Freije J.M., Stevenin J., De Sandre-Giovannoli A. 2011. A conserved splicing mechanism of the LMNA gene controls premature aging. *Hum. Mol. Genet.* 20:4540–4555.
- 85.Maeshima K., Laemmli U.K. 2003. A two-step scaffolding model for mitotic chromosome assembly. *Dev Cell.* 4(4):467-80.
- 86.Maeshima K., Imai R., Tamura S. 2014. Chromatin as dynamic 10-nm fiber. *Chromosoma.* Springerlink.com.
- 87.Mahajan S., Leko V., Simon Ju., Bedalov A. 2011. Sirtuin Modulators. *Handbook of Experimental Pharmacology.*
- 88.Maraldi N.M., Lattanzi G. 2007. Involvement of prelamin A in laminopathies. *Crit. Rev. Eukaryotic Gene Expression.* 17: 317–334.
- 89.Marji J., O'Donoghue S.I., McClintock D., Satagopam V.P., Schneider R., Ratner D., Worman H.J., Gordon L.B., Djabali K. 2010. Defective lamin A-Rb signaling in Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome and reversal by farnesyltransferase inhibition. *PLoS. One.* 5(6):e11132.
- 90.Marino G., Ugalde A.P., Fernandez A.F., Osorio F.G., Fueyo A., Freije J.M., Lopez-Otin C. 2010. Insulin-like growth factor 1 treatment extends longevity in a mouse model of human premature aging by restoring somatotroph axis function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107:16268–16273.
- 91.Martin C., Zhang Y. 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6(11):838-49.

92. Matharu N.K., Mishra R.K. 2011. Tone up your chromatin and stay young. *J. Biosci.* 36(1):5-11.
93. McCabe M.T., Graves A.P., Ganji G., Diaz E., Halsey W.S., Jiang Y., Smitheman K.N., Ott H.M., Pappalardi M.B., Allen K.E., Chen S.B., Della Pietra A 3rd, Dul E, Hughes AM, Gilbert SA, Thrall SH, Tummino PJ, Kruger RG, Brandt M, Schwartz B, Creasy CL. 2012. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 109(8):2989-94.
94. Mehta I.S., Bridger J.M., Kill I.R. 2010. Progeria, the nucleolus and farnesyltransferase inhibitors. *Biochem Soc. Trans.* 38:287–291.
95. Michishita E., McCord R.A., Berber E., Kioi M., Padilla-Nash H., Damian M., Cheung P., Kusumoto R., Kawahara T.L., Barrett J.C., Chang H.Y., Bohr V.A., Ried T., Gozani O., Chua K.F. 2008. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature.* 452(7186):492-496
96. Mikhelson V.M., Barenfeld L.S., Mergadze S.G. 1995. Slower synthesis of individual replicons and adjacent replicon clusters in a radiosensitive xeroderma pigmentosum strain. *68(2):169-176.*
97. Mirzayans R., Andrais B., Scott A., Murray D. 2012, New insights into p53 signaling and cancer cell response to DNA damage: implications for cancer therapy. *J Biomed Biotechnol.* 2012:170325.
98. Misteli T. 2004. Spatial positioning; a new dimension in genome function. *Cell.* 119(2):153-6.
99. Mounkes L.C., Stewart C.L. 2004. Aging and nuclear organization: Lamins and progeria. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16:322–327.

100. Nakayama J., Rice J.C., Strahl B.D., Allis C.D., Grewal S.I. 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science*. 292(5514):110-3.
101. Nasrin N., Kaushik V.K., Fortier E., Wall D., Pearson K.J., de Cabo R., Bordone L. 2009. JNK1 phosphorylates SIRT1 and promotes its enzymatic activity. *PLoS One*. 4(12):e8414.
102. Noma K., Allis C.D., Grewal S.I. 2001. Transitions in distinct histone H3 methylation patterns at the heterochromatin domain boundaries. *Science*. 293(5532):1150-5.
103. Oberdoerffer P., Michan S., McVay M., Mostoslavsky R., Vann J., Park S.K., Hartlerode A., Stegmüller J., Hafner A., Loerch P., Wright S.M., Mills K.D., Bonni A., Yankner B.A., Scully R., Prolla T.A., Alt F.W., Sinclair D.A. 2008. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell*. 135(5):907-18.
104. O'Driscoll M., Ruiz-Perez V.L., Woods C.G., Jeggo P.A., Goodship J.A. 2003. A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nature Genetics*. 33:497-501.
105. O'Driscoll M., Jeggo P.A. 2003. Clinical Impact of ATR Checkpoint Signalling Failure in Humans. *Cell Cycle*. 2(3):194-195.
106. O'Hagan H.M., Mohammad H.P., Baylin S.B. 2008. Double strand breaks can initiate gene silencing and SIRT1-dependent onset of DNA methylation in an exogenous promoter CpG island. *PLoS Genet*. 2008 Aug 15;4(8):e1000155.

- 107.O'Hagan H.M., Wang W., Sen S., Destefano Shields C., Lee S.S., Zhang Y.W., Clements E.G., Cai Y., Van Neste L., Easwaran H., Casero R.A., Sears C.L., Baylin S.B. 2011. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1, and polycomb members to promoter CpG Islands. *Cancer Cell*. 20(5):606-19.
- 108.Orth K., Chinnaiyan A.M., Garg M., Froelich C.J., Dixit V.M. 1996. The CED-3/ICE-like protease Mch2 is activated during apoptosis and cleaves the death substrate lamin A. *J. Biol. Chem*. 271(28):16443-6.
- 109.Peters A.H., Kubicek S., Mechtler K., O'Sullivan R.J., Derijck A.A., Perez-Burgos L., Kohlmaier A., Opravil S., Tachibana M., Shinkai Y., Martens J.H., Jenuwein T. 2003. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell*. 12(6):1577-1589.
- 110.Pickersgill H., Kalverda B., Wit E., Talhout W., Fornerod M., Steensel B. 2006.Characterization of the *Drosophila melanogaster* genome at the nuclear lamina. *Nature Genet*. 38, 1005–1014.
- 111.Pogribny I.P., Tryndyak V.P., Muskhelishvili L., Rusyn I., Ross S.A. 2007. Methyl deficiency, alterations in global histone modifications, and carcinogenesis. *J. Nutr*. 137(1 Suppl):216S-222S.
- 112.Pulverer B. 2003. ATM Machine. *Nat Cell Biol*. 5(2):96.
- 113.Ragnauth C.D., Warren D.T., Liu Y., McNair R., Tajsic T., Figg N., Shroff R., Skepper J., Shanahan C.M. 2010. Prelamin A acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging. *Circulation*. 121:2200–2210.
- 114.Ramirez T, Brocher J, Stopper H, Hock R. 2007. Sodium arsenite modulates histone acetylation, histone deacetylase activity and HMGN protein dynamics in human cells. *Chromosoma*. 117(2):147-57.

- 115.Rea S., Eisenhaber F., O'Carroll D., Strahl B.D., Sun Z.W., Schmid M., Opravil S., Mechtler K., Ponting C.P., Allis C.D., Jenuwein T. 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*. 406(6796):593-9.
- 116.Rice J.C., Briggs S.D., Ueberheide B., Barber C.M., Shabanowitz J., Hunt D.F., Shinkai Y., Allis C.D. 2003. Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol Cell*.12(6):1591-8.
- 117.Rodriguez S., Eriksson M. 2011. Low and high expressing alleles of the LMNA gene: implications for laminopathy disease development. *PLoS. One* 6:e25472.
- 118.Sandoval N., Platzer M., Rosenthal A., Dörk Th., Bendix R., Skawran B., Stuhrmann M., Wegner R.D., Sperling K., Banin Sh., Shiloh Yo., Baumer A., Bernthaler U., Sennefelder H., Brohm M., Weber B. H.F., Schindler D.1999. Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia telangiectasia families. *Human Molecular Genetics*. 8(1): 69-79.
- 119.Satoh A., Brace C.S., Ben-Josef G. 2010. SIRT1 promotes the central adaptive response to diet restriction through activation of the dorsomedial and lateral nuclei of the hypothalamus. *J. Neur.* 30:10220–10232.
- 120.Savitsky K., Bar-Shira A., Gilad Sh., Rotman G., Ziv Ya., Vanagaite L., Tagle D.A., Smith S., Uziel T., Sfez Sh., Ashkenazi M., Pecker I., Frydman M., Harnik R., Patanjali S.R., Simmons A., Clines G.A., Sartiel A., Gatti R.A., Chessa L., Sanal O., Lavin M.F., Jaspers N. G. J., Taylor A.M.R., Arlett C.F., Miki T., Weissman Sh.M., Lovett M., Collins F.S., Shiloh Yo. 1995. A Single Ataxia Telangiectasia Gene with a Product Similar to P1-3 Kinase. *Science*. 268:1749-53.

- 121.Schalch T., Duda S., Sargent D.F., Richmond T.J. 2005. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature*. 436(7047):138-41.
- 122.Serravallo M., Jagdeo J., Glick S., Siegel D., Brody N. 2009. Sirtuins in dermatology: applications for future research and therapeutics. *Arch. Derm. Res.* 305:269–282.
- 123.Shiloh Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature*. 3:155-168.
- 124.Shroff R., Arbel-Eden A., Pilch D., Ira G., Bonner W.M., Petrini J.H., Haber J.E., Lichten M. 2004. Distribution and dynamics of chromatin modification induced by a defined DNA double-strand break. *Curr Biol*. 14(19):1703-11.
- 125.Siman R., Flood D.G., Thinakaran G., Neumar R.W.2001. Endoplasmic reticulum stress-induced cysteine protease activation in cortical neurons: effect of an Alzheimer's disease-linked presenilin-1 knock-in mutation. *J. Biol. Chem.* 276:44736–44743.
- 126.Scaffidi P., Gordon L., Misteli T. 2005. The cell nucleus and aging: tantalizing clues and hopeful promises. *PLoS. Biol.* 3(11):e395.
- 127.Shumaker D.K., Dechat T., Kohlmaier A., Adam S.A., Bozovsky M.R., Erdos M.R., Eriksson M., Goldman A.E., Khuon S., Collins F.S., Jenuwein T., Goldman R.D. 2006. Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103(23):8703-8.
- 128.Smith E.D., Kudlow B.A., Frock R.L., Kennedy B.K. 2005. A-type nuclear lamins, progerias and other degenerative disorders. *Mech. Ageing Dev.* 126: 447–460.

129. Stravopodis D.J., Karkoulis P.K., Konstantakou E.G., Melachroinou S., Lampidonis A.D., Anastasiou D., Kachrilas S., Messini-Nikolaki N., Papassideri I.S., Aravantinos G.. 2009. Grade-dependent effects on cell cycle progression and apoptosis in response to doxorubicin in human bladder cancer cell lines. *Int. J. Oncol.* 34:137–160.
130. Surdej P., Brandli D., Miassod R. 1991. Scaffold-associated regions and repeated or cross-hybridizing sequences on an 800 kilobase DNA stretch of the *Drosophila* X chromosome. *Biol. Cell.* 73(2-3):111-20.
131. Suzuki S., Nishio S., Takeda T., Komatsu M. 2012. Genderspecific regulation of response to thyroid hormone in aging. *Thyroid. Res.* 5:1.
132. Takahashi A., Musy P.Y., Martins L.M., Poirier G.G., Moyer R.W., Earnshaw W.C. 1996. CrmA/SPI-2 inhibition of an endogenous ICE-related protease fragmentation responsible for lamin A cleavage and apoptotic nuclear. *J. Biol. Chem.* 271(51):32487-90.
133. Taniguchi T., Garcia-Higuera I., Xu B., Andreassen P.R., Gregory R.C., Kim S.T., Lane W.S., Katsan M.B., D'Andrea A.D. 2002. Convergence of the Fanconi Anemia and Ataxia Telangiectasia Signaling Pathways. *Cell.* 109: 459-472.
134. Taunton J., Hassig C.A., Schreiber S.L. 1996. A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science.* 272(5260):408-11.
135. Tausendschön M., Dehne N., Brüne B. 2011. Hypoxia causes epigenetic gene regulation in macrophages by attenuating Jumonji histone demethylase activity. *Cytokine.* 53(2):256-62.

136. Taylor A. M. 1978. Unrepaired DNA strand breaks in irradiated ataxia telangiectasia lymphocytes suggested from cytogenetic observations. *Mutat Res.* 50: 407–18.
137. Tsukuda T., Fleming A.B., Nickoloff J.A., Osley M.A. 2005. Chromatin remodelling at a DNA double-strand break site in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature.* 438(7066):379-83.
138. Tullai J.W., Schaffer M.E., Mullenbrock S., Kasif S., Cooper G.M. 2004. Identification of transcription factor binding sites upstream of human genes regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase and MEK/ERK signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 279:20167–20177.
139. Westphal C.H. 1997. Cell-cycle signaling: Atm displays its many talents. *Curr. Biol.* 7(12):R789-792.
140. Xu B., O'Donnell A.M., Kim S.T., Kastan M.B. 2002. Phosphorylation of serine 1387 in Brca1 is specifically required for the Atm-mediated S-phase checkpoint after ionizing irradiation. *Cancer Res.* 62:4588–91.
141. Yazdi P.T., Wang Y., Zhao S., Patel N., Lee E.Y., Qin J. 2002. SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint. *Genes Dev.* 16:571–82.
142. Zastrow M.S., Vlcek S., Wilson, K.L. 2004. Proteins that bind A-type lamins: Integrating isolated clues. *J. Cell Sci.* 117: 979–987.
143. Zhang G., Pradhan S. 2014. Mammalian Epigenetic Mechanisms. wileyonlinelibrary.com
144. Zhan H., Suzuki T., Aizawa K., Miyagawa K., Nagai R. 2010. Ataxia telangiectasia mutated (ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. *J Biol Chem.* 285(38):29662-70.
145. Zhang W., Deng H., Bao X., Lerach S., Girton J., Johansen J., Johansen K.M. 2006. The JIL-1 histone H3S10 kinase regulates dimethyl H3K9

modifications and heterochromatic spreading in *Drosophila*. *Development*. 133(2):229-35.

146.Zhang Y., Reinberg D. 2001. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*.15(18):2343-60.

147.Ziv Y., Bielopolski D., Galanty Y., Lukas C., Taya Y., Schultz D.C., Lukas J., Bekker-Jensen S., Bartek J., Shiloh Y. 2006. Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat Cell Biol*. 8(8):870-6.

148.Zuela N., Bar D.Z., Gruenbaum Y. 2012. Lamins in development, tissue maintenance and stress. *EMBO Rep*.12:1070-8.

149.Ugalde A.P., Mariño G., López-Otín C. 2010. Rejuvenating somatotrophic signaling: a therapeutical opportunity for premature aging? *Aging*. 2(12):1017-22.

150.Wysocka J., Allis C.D., Coonrod S. 2006. Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Front Biosci*. 11:344-55.

151.Yang X.J., Seto E. 2003. Collaborative spirit of histone deacetylases in regulating chromatin structure and gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev*. 13(2):143-53.