

На правах рукописи

КУРАНОВА

Мирья Леонидовна

**КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ПРОЯВЛЕНИЯ
АТАКСИИ-ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2014

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт
цитологии Российской академии наук

Научные руководители:

кандидат биологических наук, доцент

Спивак Ирина Михайловна

Институт цитологии РАН

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,

заведующая лабораторией

Попович Ирина Григорьевна

Санкт-Петербургский институт

биорегуляции и геронтологии СЗО РАМН

доктор биологических наук, профессор,

заведующая лабораторией

Воробцова Ирина Евгеньевна

ФГБУ «Российский научный Центр Радиологии

и Хирургических Технологий» Минздрава РФ

Ведущая организация:

ФГБУ "НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова"

Минздрава РФ

Защита состоится «23» января 2015 года в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 002.230.01 на базе Института цитологии РАН по адресу: 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., д.4. Сайт института: <http://www.cytspb.rssi.ru>; адрес электронной почты института: cellbio@mail.cytspb.rssi.ru; факс института: (812) 297-35-41

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института цитологии РАН и на сайте Института: <http://www.cytspb.rssi.ru/>

Автореферат разослан «___» ноября 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Е.В. Каминская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 являются мутации 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 1:300000 до 1:40000 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 имеют большое значение для разработки более точных методов диагностики данного заболевания.

Ген *ATM* кодирует протеинкиназу АТМ (Ataxia Telangiectasia Mutated), играющую ключевую роль в ответе клетки на повреждение ДНК при образовании двунитевых разрывов в ответ на действие генотоксических агентов или конформационных изменений хроматина при действии хроматин-ремодулирующих агентов (Savitsky et al., 1995; Shiloh, 2003; Pospelova et al., 2011). В некоторых случаях функцию АТМ по фосфорилированию p53 может выполнять протеинкиназа АТР (Ataxia Telangiectasia and Rad3 related (Roobol et al., 2011), одной из главных функций которой, является стабилизация остановленных вилок репликации (Cimplich end Korte, 2008).

Клетки АТ-пациентов являются стандартной моделью для изучения процессов клеточного ответа на повреждение ДНК и механизмов репарации ДНК при двунитевых разрывах (Lavin, 2008). В то же время развитие признаков ускоренного старения в сочетании с повышенным риском развития опухолей у пациентов с АТ делают эти клетки интересной моделью для изучения как процессов старения, так и клеточной трансформации, поскольку у таких пациентов может реализоваться как программа клеточного старения, так и программа опухолевой трансформации.

В клетках пациентов с АТ было описано характерное изменение таких маркеров клеточного старения, как экспрессия ассоциированной со старением β -галактозидазы (SA- β -Gal), формирование ассоциированных со старением гетерохроматиновых фокусов (SAHF), фокусов ответа на повреждение ДНК, содержащих гистон H2AX, фосфорилированный по серину 139 (γ -H2AX), белок 53BP1, фосфорилированный по серину 1778, а также резкое уменьшение гетерохроматинового маркера HP1- γ . Стареющие клетки характеризуются резким снижением эффективности процессов репарации ДНК и высоким уровнем хромосомных перестроек (Хомасуридзе и др., 1999; Полуботко и др., 2009а,б). Учитывая, что протеинкиназа АТМ вовлечена в регуляцию многих сигнальных путей, 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 клеток, полученные от пациентов с АТ, так и клетки пациентов с другими нарушениями репарации ДНК и клетки 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 (Р-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 SIRT1 и SIRT6.
5. Изучить состояние ядерной ламины в группе исследуемых клеточных линий 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 (p-АТМ)

после действия генотоксических агентов – рентгеновского облучения в дозе 2 Гр или радиомиметика блеомицина в концентрации 50 мкг/мл.

2. Выявлены и описаны мозаичные формы АТ.
3. При исследовании гистоновых деацетилаз SIRT6 и SIRT1 показано достоверное повышение количества SIRT6 во всех исследованных линиях АТ.
4. При исследовании триметилированных форм гистона H3 H3K27me3 и H3K9me3 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 на клеточном уровне мозаичность при АТ: выявлены пациенты, часть клеток которых не содержала p-ATM^{Ser1981} (24,75% и 31,8%), что характерно для АТ, а часть – содержала (75,25% и 68,2%), то есть соответствовала нормальному клеточному фенотипу.

Впервые 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: синдромом повышенной радиочувствительности неясной этиологии, синдромом Секкеля, синдромом наследственного рака молочной железы (мутация 5382insC в гене BRCA1).

Личный вклад автора. Все эксперименты были выполнены лично автором. Материалы, вошедшие в представленную работу, обсуждались и публиковались совместно с соавторами и научным руководителем.

Финансовая поддержка работы. Работа проводилась при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (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 вклад в фундаментальные представления о клеточных особенностях наследственных синдромов с нарушением процессов репарации ДНК. Описанный при АТ клеточный мозаицизм, демонстрирует недостаточность наличия «здорового» аллеля более чем в половине клеток для развития нормального фенотипа пациента. Разработанный и апробированный метод уточнения диагноза АТ и радиочувствительных синдромов на основе детекции p-ATM^{Ser1981} в клетках пациентов является важным для прикладной медицины и используется врачами-

клиницистами при постановке диагноза АТ (Куранова и др., 2013, 2014). Данный метод может быть использован для дальнейших разработок с целью его применения в пренатальной диагностике АТ.

Клетки пациентов с АТ являются интересной естественной моделью с нарушенным АТМ-зависимым сигнальным каскадом и лучше подходят для изучения механизмов старения и трансформации, чем модели с искусственно ингибуемым сигнальным путём. Благодаря тому, что контрольная группа линий клеток от пациентов с нарушениями репарации ДНК разнообразна, результаты исследования экспрессии триметилированных форм гистона H3 – H3K9me3 и H3K27me3 и гистновых деацетилаз SIRT1 и SIRT6 вносят вклад в понимание эпигенетических процессов при ремоделировании хроматина в результате старения и трансформации клеток. Полученные данные о состоянии ядерной ламины и содержания SA- β -Gal в клетках исследуемых линий также могут быть использованы при разработке клеточных методов оценки риска развития опухолей при старении, внося вклад в понимание механизмов онкоген-индуцированного старения клетки.

Апробация работы. По теме диссертации опубликовано 3 статьи. Материалы диссертации были представлены на российских и международных конференциях: «Международный молодежный научный форум «ЛОМОНОСОВ-2014»» (Москва, Россия, 7-10 апреля, 2014 г., материалы форума); «IV Санкт-Петербургская конференция молодых учёных (Институт цитологии РАН)» (Санкт-Петербург, Россия, 18-20 марта, 2014 г., материалы конференции); «Редкие (орфанные) заболевания и врождённые пороки развития» (Санкт-Петербург, Россия, 2014 г., материалы конференции); Международная конференция «The 27th Annual Symposium of the Protein Society (Boston, USA, July 20-23, 2013, материалы конференции)»; IX Международный междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии» (Судак, Крым, Украина, 3-13 июня 2013 г., материалы конференции); Международная конференция «Фундаментальная наука и клиническая медицина – человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, Россия, 20 апреля 2013 г., устный доклад); Российский конгресс с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное» (Санкт-Петербург, Россия, 18-20 июня 2012 г., устный доклад); Международная научно-практическая конференция "Эпигенетические болезни" (Харьков, Украина, 2-3 июня 2011 г., устный доклад); IV Международный конгресс «Наследственные метаболические заболевания» (Харьков, Украина, 29 ноября – 1 декабря 2010 г., устный доклад).

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, их обсуждения, заключения, выводов и списка цитированной литературы. Материалы диссертации изложены на 125 страницах машинописного текста и содержат 11 таблиц и 41 рисунок.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Работа выполнена на первичных фибробластах, полученных от пациентов с АТ: пациент 8 лет, лёгкая форма – AT1SP; пациент 26 лет, лёгкая форма – AT6SP; пациент 12 лет, тяжёлая форма – AT8SP; пациент 3 лет, лёгкая форма – AT9SP; пациент с молекулярно подтверждённой тяжёлой формой АТ – AT4BR, а также пациент 9 месяцев с синдромом Секкеля – Ss1SP; пациент 30 лет с синдромом наследственного рака молочной железы (мутация 5382insC в гене *BRCA1*) – BRCA1SP; пациент 4 лет с синдромом повышенной радиочувствительности неясной этиологии – AT2SP; здорового донора 30 лет, не страдающего АТ – 1SP; пациента 4 лет с атаксией, вызванной опухолью мозжечка – AT7SP; пациента 16 лет с пигментной ксеродермой – XP2SP; пациента 4 лет с симптомами, клинически сходными с АТ – P1SP; пациента 13 лет с симптомами, клинически сходными с АТ – P2SP. В качестве контроля использовали клетки здорового донора 11 лет VH-10. Все линии, кроме линий здорового донора VH-10 и пациента с АТ AT4BR, были получены в лаборатории радиационной цитологии ИИЦ РАН. Линия VH-10 любезно предоставлена А. Kolman (Стокгольм), AT4BR – А. Lenmann (Университет графства Сассекс, Великобритания).

Клетки подвергали рентгеновскому излучению в дозе 2 Гр, используя установку РУМ-17 или РАП-150/300-14, или обрабатывали радиомиметиком (блеомицин в концентрации 50–100 мкг/мл)

Получение первичных фибробластов. Получение первичной культуры фибробластов кожи проводилось посредством стандартной методики: биоптат кожи из области предплечья донора 5×5 мм механически диспергировался. Полученные фрагменты кожи помещали в чашку Петри под покровное стекло в полную ростовую питательную среду MEM (Gibco, США) с добавлением 16% сыворотки эмбрионов коров (Hyclone, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США), 25 мкг/мл фунгизона и 0,3 мг/мл L-глутамина. Материал инкубировали, меняя питательную среду 1 раз в 4–7 сут, до достаточной конфлюенции фибробластов. При достижении необходимого монослоя клетки снимали с подложки с помощью 0,25%-ного раствора трипсин-ЭДТА (Gibco, США) и культивировали в пластиковых флаконах и на чашках

Петри (Nunclon, США) в среде MEM (Sigma, США) с добавлением 12% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Sigma), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США) при +37 °C в атмосфере с содержанием 5% CO₂.

Иммунофлуоресценция. Клетки, выращенные на чашках Петри на покровных стеклах, промывали раствором PBS, фиксировали 4 %-ным раствором параформальдегида в PBS 10 мин при +4 °C после чего пермеабелизовали 3 %-ным раствором тритона X-100 в PBS 5 мин комнатной температуре. Затем клетки промывали PBS 3 раза по 5 мин и инкубировали в блокирующем растворе (5 % БСА – бычий сывороточный альбумин, 0.01 % Tween-20 в PBS) 1 ч при комнатной температуре. После чего клетки последовательно инкубировали в растворе первых и вторых антител, разведённых в 0.1 %-ном растворе БСА в PBS в течение 12 часов при +4 °C и 45 минут при +37 °C соответственно. В качестве первых антител использовали IgG мыши или кролика против белков p-ATM^{Ser1981}, (Thermo Scientific, США), phospho-(Ser/Thr) ATM/ATR (p53, p95/NBS1, MDM2, Chek2, BRCA1, CtlP, 4E-BP1 and Chek1 (1,2)), SIRT1, SIRT6, H3K9me3, H3K27me3 (Cell Signaling, США), Lamin A/C, HP1 γ (Abcam, Великобритания). В качестве вторых антител использовали IgG козы против IgG мыши и кролика, конъюгированные с FITC (488) и Alexa Fluor 546, (Invitrogen, США) в разведении 1:500. Клетки заключали с помощью реагента SlowFade®Gold Antifade с DAPI (Invitrogen, США). Эксперименты проводили в трех независимых повторях.

Микроскопия и анализ изображений. Микроскопия клеток проводилась с помощью лазерного микроскопа Zeiss LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss AG, Германия) и лазерного сканирующего конфокального микроскопа Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Германия). Анализ полученных изображений и определение уровня интенсивности флуоресценции проводили с помощью программ LSM 5 PASCAL (Carl Zeiss AG, Германия) и ImageJ (National Institute of Health, США).

Активность SA- β -Gal выявляли с использованием набора “Senescence-galactosidase staining kit” (Cell Signalling Technology, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Появление синих гранул в цитоплазме клеток позволяло судить об активности SA- β -Gal. Уровень содержания SA- β -Gal был измерен в программе VideoTestT версия 5.0 (Санкт-Петербург, Россия), относительная оптическая плотность условно приравнивалась к количеству фермента.

Измерение длин теломер. Измерение длины теломер проводилось, как описанно ранее (O’Callaghan et al., 2008).

Статистическая обработка результатов. Статистическую обработку проводили с помощью программы Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, США). Производили расчёт средней арифметической величины, среднего квадратичного отклонения, ошибки репрезентативности для каждого параметра в исследуемых группах клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Апробация клеточного метода диагностики АТ, основанного на выявлении р-АТМ^{Ser1981}. Выявление мозаичных форм АТ.

После воздействия агента, вызывающего двунитевые разрывы ДНК, образуются характерные фокусы, детектируемые при окрашивании антителами к р-АТМ^{Ser1981}. Данные фокусы не формируются в ядрах пациентов с АТ после аналогичного воздействия, что свидетельствует об отсутствии в клетках пациентов с АТ активной формы протеинкиназы АТМ. Методом иммунофлуоресцентной окраски было показано, что после индукции повреждений ДНК р-АТМ^{Ser1981} выявляется в ядрах клеток здорового донора VH-10, пациентки с мутацией 5382insC в гене *BRCA1* (BRCA1SP), пациентки с синдромом Секкея (Ss1SP) и пациента с синдромом повышенной радиочувствительности неясной этиологии AT2SP. Однако в ядрах клеток пациентов с АТ – AT6SP и AT8SP р-АТМ^{Ser1981} после повреждения ДНК отсутствовала. В то же время клетки линий AT1SP и AT9SP окрашивались неоднородно, проявлялась их выраженная гетерогенность. Так в ядрах части клеток выявлялись фокусы р-АТМ^{Ser1981}, а в ядрах других они отсутствовали (рис.1). В клетках обеих линий фокусы в основном локализовались в ядре, но у небольшой доли клеток р-АТМ^{Ser1981} обнаруживалась как в ядре, так и в цитоплазме.

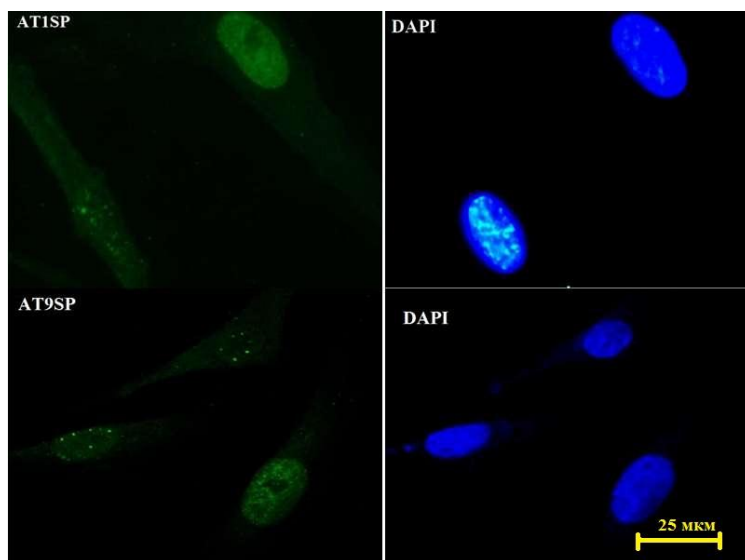


Рисунок 1. Мозаичная культура линий AT1SP и AT9SP: детекция фокусов р-АТМ^{Ser1981}. Справа – соответствующие клетки, окрашенные DAPI.

Таблица 2. Количество клеток с активной формой Р-АТМ

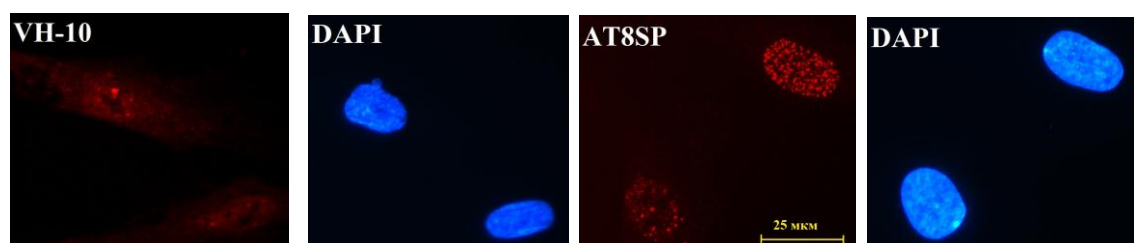
Линии	Доля клеток с активной формой Р-АТМ (в %)			
	в цитоплазме	в ядре	в цитоплазме и ядре	без фокусов
AT1SP	6,1	63,05	6,1	24,75
AT9SP	3,3	53,08	11,8	31,8

Клинически у пациентов AT1SP и AT9SP заболевание протекало в более лёгкой форме, чем у других. Полученные данные позволяют говорить о существовании мозаичной формы АТ, к которой относятся пробанды AT1SP и AT9SP, так как линии первичных фибробластов, полученные из клеток этих пациентов, содержат два разных типа клеток: с активной формой протеинкиназы АТМ и без неё. Скорее всего, такой мозаицизм связан с тем, что ген *ATM* имеет достаточно большой размер – 150 т.п.н. и расположен дистально на длинном плече хромосомы 11 (Savitsky et al., 1995; Lavin, Khanna, 1999; Peters et al., 2003), а также с тем, что большинство пациентов являются копмаундами, т.е. несут различные мутации на материнской и отцовской хромосомах.

2. Ферментативная активность протеинкиназы ATR при АТ

В клетках с нарушенными процессами репарации наблюдается повышенное количество маркеров клеточного ответа на повреждение ДНК (Scaffidi and Mistelli 2006; Полуботко и др., 2009). При окрашивании клеток исследуемых линий антителами к сайтам фосфорилирования протеиназами АТМ/АТР их белков-мишеней p53, p95/NBS1, MDM2, Chek2, BRCA1, CtlP, 4E-BP1 и Chek1 по Ser и Thr было обнаружено, наибольшее среднее количество фокусов образовалось в ядрах клеток линии пациента с тяжёлой формой АТ – AT8SP: VH-10 – $1,4 \pm 0,05$; AT1SP – $1,6 \pm 0,03$; AT2SP – $2,5 \pm 0,05$; AT6SP – $1,9 \pm 0,045$; AT8SP – $19,7 \pm 0,08$; AT9SP – $3 \pm 0,03$; BRCA1SP – $2,6 \pm 0,03$; Ss1SP – $1,6 \pm 0,04$. В некоторых ядрах линии AT8SP образовывалось более 100 фокусов (рис. 2), что свидетельствует о серьёзных нарушениях процессов репарации ДНК и остановке вилки репликации.

Рисунок 2. Фокусы сайтов фосфорилирования белков p53, p95/NBS1, MDM2, Chek2, BRCA1, CtlP, 4E-BP1 и Chek1 по Ser и Thr протеинкиназами АТМ/АТР.



3. Изменения экспрессии триметилированных форм гистона H3 H3K27me3 и H3K9me3 при АТ.

Плотная упаковка молчащего хроматина играет важную роль в поддержании целостности генома. Ранее было показано, что содержание в клетке триметилированных форм гистона H3, прямо пропорционально зависит от возраста донора (Scaffidi and Misteli, 2006; Shumaker et al., 2006). При окрашивании клеток с использованием антител к триметилированным формам гистона H3 H3K9me3 и H3K27me3 (рис. 4) и последующим измерением интенсивности флуоресценции были выявлены достоверные различия средней интенсивности флуоресценции в ядрах клеток здорового донора и пробандов. Наибольшая средняя интенсивность флуоресценции H3K9me3 выявлена в ядрах клеток линии AT1SP; тогда как в ядрах клеток AT8SP средняя интенсивность флуоресценции H3K9me3 достоверно не отличалась от контроля, а в ядрах клеток AT6SP и AT9SP уровень интенсивности оказался в 1,5 раза ниже контроля (рис. 3). Таким образом, нами не обнаружено закономерности между экспрессией гистона H3K9me3 и нарушениями функционирования протеинкиназы АТМ.

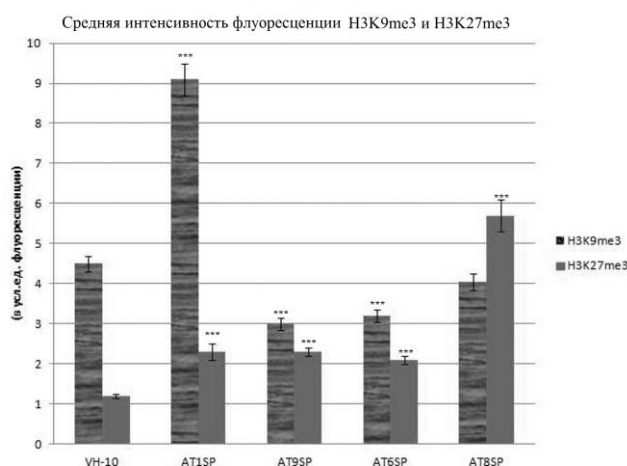
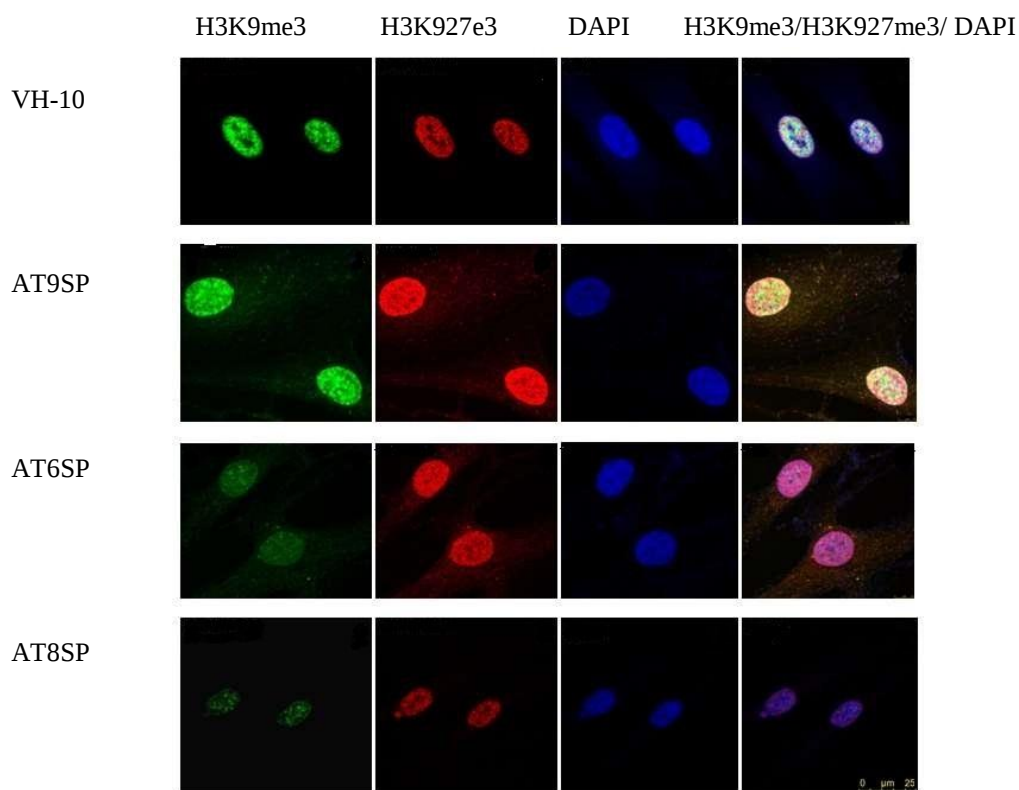


Рисунок 3. Средняя интенсивность флуоресценции H3K9me3 и H3K27me3 в исследуемых линиях (в усл. ед. флуоресценции).

***— статистически достоверные отличия от контроля при $p < 0,001$. Показано $\pm$ стандартное отклонение.

Средняя интенсивность флуоресценции H3K27me3 оказалась самой высокой в ядрах клеток AT8SP, тогда как в клетках остальных линий с АТ – AT1SP, AT6SP и AT9SP она была практически одинаковой и в два раза выше контроля. Таким образом, данный маркер во всех изученных случаях достоверно отличается от контроля, причем при тяжелой форме заболевания (AT8SP) это отличие проявилось наиболее выражено. Согласно полученным данным, высокий уровень H3K27me3 может рассматриваться в качестве одного из признаков АТ.

Рисунок 4. Интенсивность флуоресценции H3K9me3 и H3K27me3 в исследуемых линиях Масштабная линейка 25 мкм.



Исследование гетерогенности популяции проводили, разбивая значения интенсивности флуоресценции на условно выбранные диапазоны. При анализе интенсивности флуоресценции клеток исследуемых линий по диапазонам интенсивности флуоресценции было детектировано два пика интенсивности флуоресценции H3K9me3 в клетках линии одного из пробандов с мозаичной формой заболевания – AT1SP (рис. 5).

При анализе диапазонов интенсивности флуоресценции H3K27me3 пиков интенсивности флуоресценции не наблюдалось ни в одной из исследованных линий, но в клетках пробандов был обнаружен сдвиг в зону бóльших средних значений по сравнению с контролем (рис. 6).

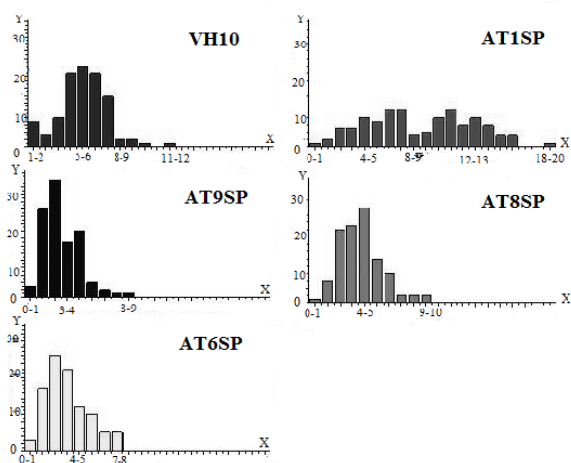


Рисунок 5. Распределение клеток по диапазонам интенсивности флуоресценции (в усл. ед.) триметилированной формы гистона H3 (H3K9me3) в ядрах клеток исследуемых линий. По оси абсцисс – диапазоны интенсивности флуоресценции (в условных единицах флуоресценции), по оси ординат – доля клеток в обозначенном диапазоне

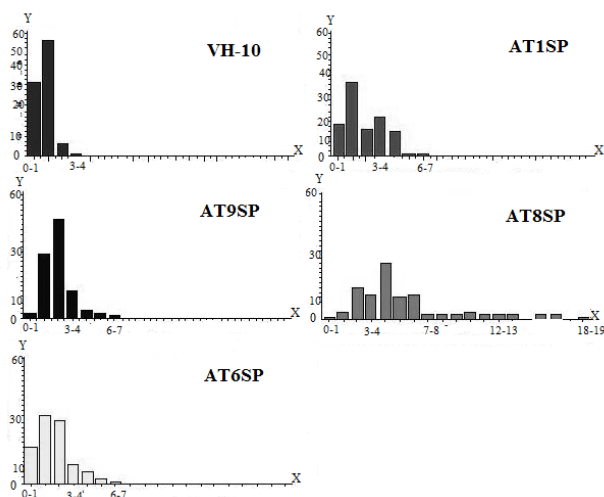


Рисунок 6. Распределение клеток по диапазонам интенсивности флуоресценции (в усл. ед.) триметилированной формы гистона H3 (H3K27me3) в ядрах клеток исследуемых линий. По оси абсцисс – диапазоны интенсивности флуоресценции (в условных единицах флуоресценции), по оси ординат – доля клеток в обозначенном диапазоне

Сигнальные пути, участвующие в регуляции онкогенной трансформации и клеточного старения могут регулировать экспрессию генов частично через модификацию хроматина, включая метилирование гистонов (Natano et al., 2010). При АТ происходят серьёзные нарушения регуляции ключевых сигнальных путей клетки, и как следствие, изменение экспрессии триметилированной формы гистона H3 H3K27me3, позволяющее считать его специфически связанным с АТ (Куранова и др., 2014).

4. Изменение экспрессии гистоновых деацетилаз SIRT6 и SIRT1 при АТ.

Ранее было показано, что активность и экспрессия SIRT1 и SIRT6 играют важную роль в канцерогенезе, регуляции клеточного цикла, апоптоза, репарации ДНК, пролиферации клетки, и клеточного старения. Изменение экспрессии SIRT1, индуцированное повреждением ДНК, опосредованно активацией киназы ATM и её мишени – гистона H2AX. Показано, что SIRT1 ремодулирует структуру хроматина в местах разрывов ДНК, способствуя репарации ДНК в клетках (O'Hagan et al., 2008; 2011). SIRT6 модулирует теломерный хроматин, деацетилируя лизин 9 гистона H3, тем самым предотвращая дисфункцию теломер и раннее клеточное старение (Michishita et al., 2008). При старении, а также повреждении ДНК в результате эпигенетических модификаций может изменяться экспрессия генов, так как сиртуины способны диссоциировать от локусов молчащих генов и перемещаться к поврежденным участкам ДНК, где способствуют их репарации (Serravallo, et. all 2013). При окрашивании клеток с использованием антител к SIRT1и SIRT6 (рис. 10) с последующим измерением интенсивности флуоресценции были выявлены различия между исследуемыми

клеточными линиями (рис. 7). Данные средней интенсивности флуоресценции представлены на рис. 10. Видны достоверные различия интенсивности флуоресценции в ядрах клеток здорового донора и пробандов. В клетках AT9SP и AT8SP интенсивность флуоресценции SIRT1 была ниже в 1,5 раза по сравнению с контролем, а в клетках AT1SP и AT6SP – выше в 1,7 и 3,7 раз соответственно. В клетках других исследованных линий (Ss1SP, AT2SP, BRCA1SP) интенсивность флуоресценции SIRT1 оказалась в 5 и более раз ниже, чем в контроле. Таким образом, полученные нами результаты не позволяют сделать определенных выводов о наличии ассоциации экспрессии белка SIRT1 с заболеванием АТ, несмотря на данные о том, что активность SIRT1 в клетках некоторых тканей с возрастом снижается (Serravallo et al., 2009).



Рисунок 7. Средняя интенсивность флуоресценции SIRT1 и SIRT6 в исследуемых линиях (в усл. ед. флуоресценции).

*** – статистически достоверные отличия от контроля при $p < 0,001$. Показано $\pm$ стандартное отклонение.

При анализе интенсивности флуоресценции SIRT6 обнаружены существенные отличия от SIRT1 (рис. 7). Во всех изученных нами линиях АТ как классической формы, так и мозаичной, интенсивность флуоресценции SIRT6 достоверно выше, чем в контроле, а во всех других изученных линиях – существенно ниже. Эти данные позволяют предположить, что SIRT6, в отличие от SIRT1, может модулировать активность транскрипции протеинкиназы АТМ или её белков-мишеней.

Анализируя интенсивность флуоресценции SIRT6 в клетках исследуемых линий по диапазонам интенсивности флуоресценции (рис. 8), мы обнаружили, что у клеток линий AT1SP и AT9SP образуются два отчётливых пика, то есть можно говорить о двух клеточных субпопуляциях (рис. 7). Эти данные подтверждают наше предположение о формировании под влиянием мозаицизма двух субпопуляций клеток, в которых белки, ассоциированные с АТМ или её белками-мишенями, ведут себя по-разному. При анализе диапазонов интенсивности флуоресценции SIRT1 (рис. 8) было обнаружено, что только в

клетках линии AT1SP отчетливо выделяются два пика. Это ещё раз подтверждает наше предположение о том, что данная гистоновая деацетилаза не имеет явной ассоциации с АТ несмотря на имеющиеся литературные данные о роли SIRT1 при старении (Serravallo et al., 2009).

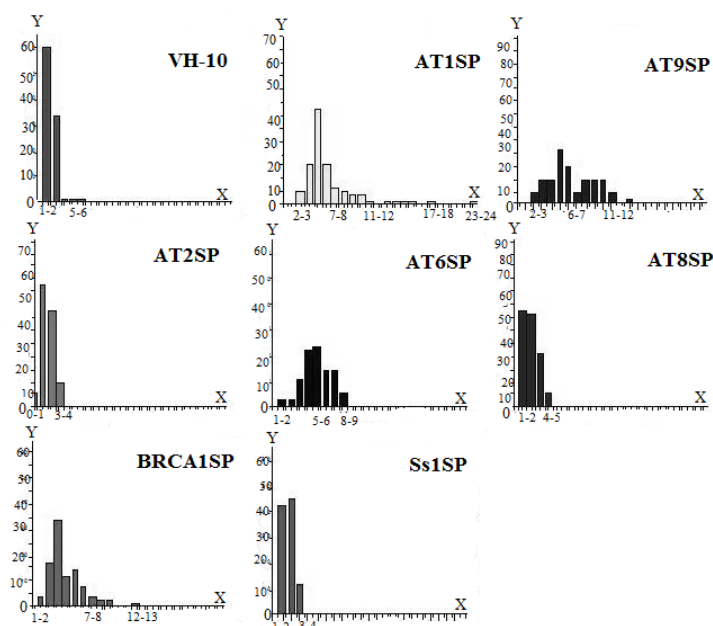


Рисунок 8. Распределение клеток по диапазонам интенсивности флуоресценции (в усл. ед.) SIRT6 в ядрах клеток исследуемых линий. По оси абсцисс – диапазоны интенсивности флуоресценции (в условных единицах флуоресценции), по оси ординат – доля клеток в обозначенном диапазоне.

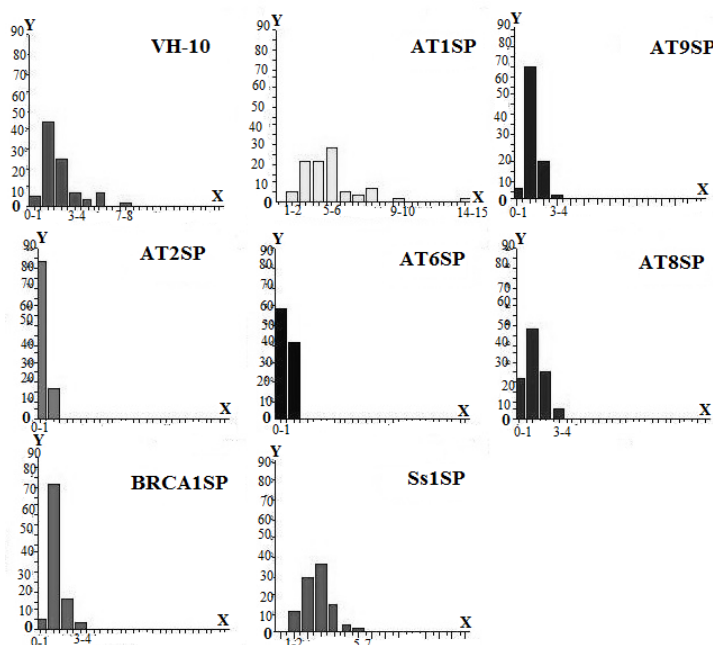
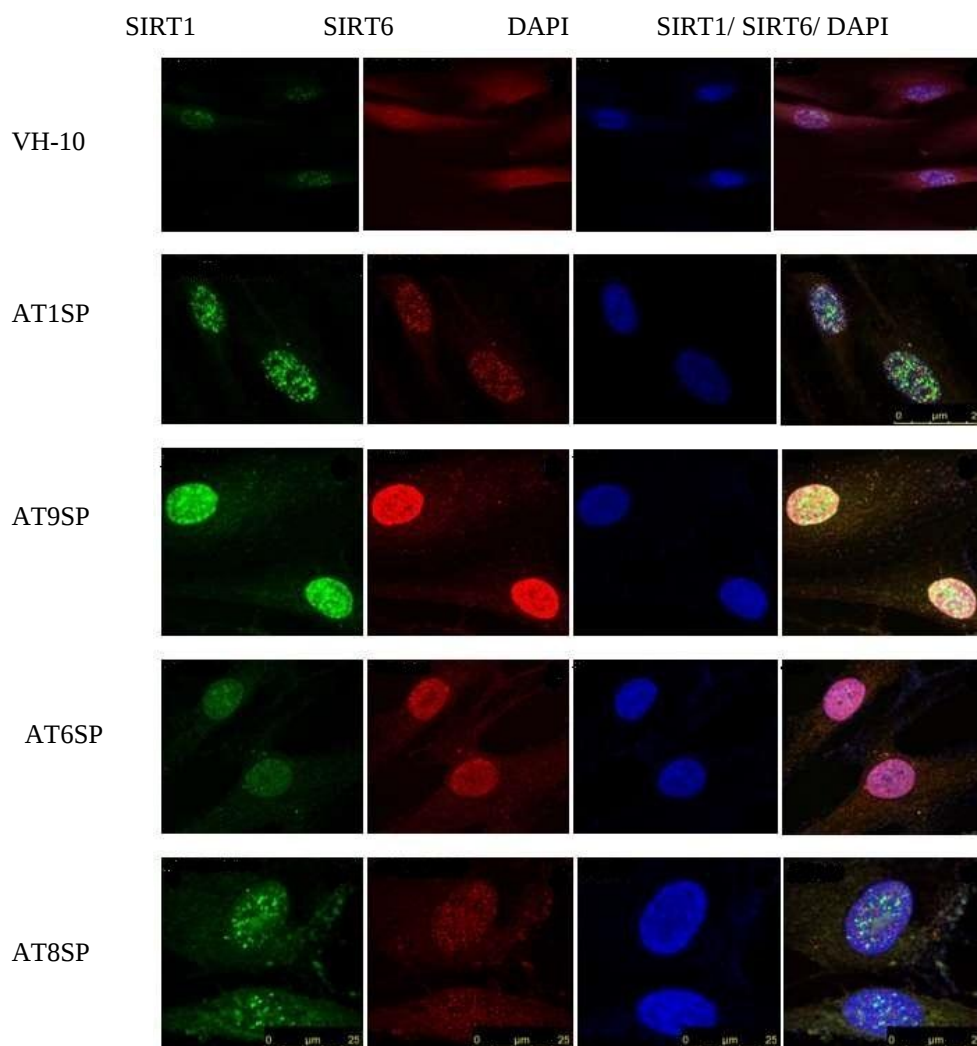


Рисунок 9. Распределение клеток по диапазонам интенсивности флуоресценции (в усл. ед.) SIRT1 в ядрах клеток исследуемых линий. По оси абсцисс (X) – диапазоны интенсивности флуоресценции (в условных единицах флуоресценции), по оси ординат (Y) – доля клеток в обозначенном диапазоне.

Полученные нами данные позволяют заключить, что при нарушении нормального функционирования протеинкиназы ATM, описанного при АТ, повышается уровень экспрессии SIRT6.

Рисунок 10. Интенсивность флуоресценции гистоновых деацетилаз SIRT1 и SIRT6 в исследуемых линиях.
Масштабная линейка 25 мкм.



5. Уровень экспрессии гетерохроматинового маркера HP1-γ при АТ

Важным компонентом регуляции гетерохроматина является белок HP1, уровень и локализацию которого также можно рассматривать в качестве эпигенетического маркера старения. Гетерохроматиновый белок 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 метилирование гистона H3 по лизину в 27 положении (H3K27me3). Изменение уровня экспрессии белка HP1-γ может служить надёжным маркером стареющих клеток, так как уровень экспрессии значительно уменьшается в клетках пожилых доноров и пациентов с прогериями (Scafidi and Misteli, 2006). Иммунофлуоресцентная окраска с использованием антител к маркеру старения HP1-γ выявила закономерные различия между клетками здорового донора и исследуемыми

пробандами. Данные об интенсивности флуоресценции белка HP1- γ в фибробластах исследуемых линий представлены на рисунках 11 и 12.

Рисунок 11. Интенсивность флуоресценции HP1- γ в диплоидных фибробластах исследуемых линий.

Масштабная линейка 50 мкм.

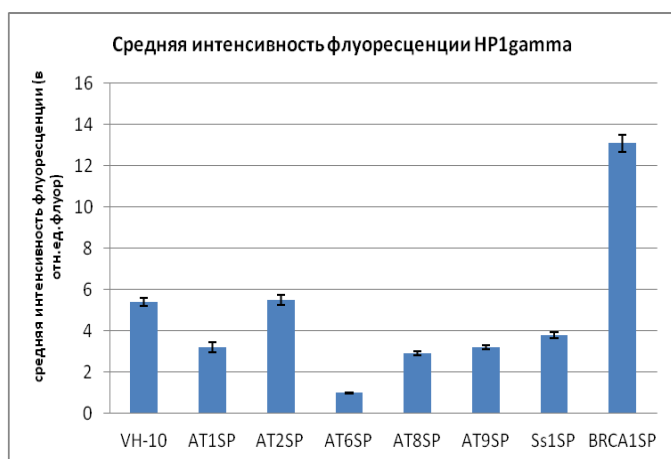
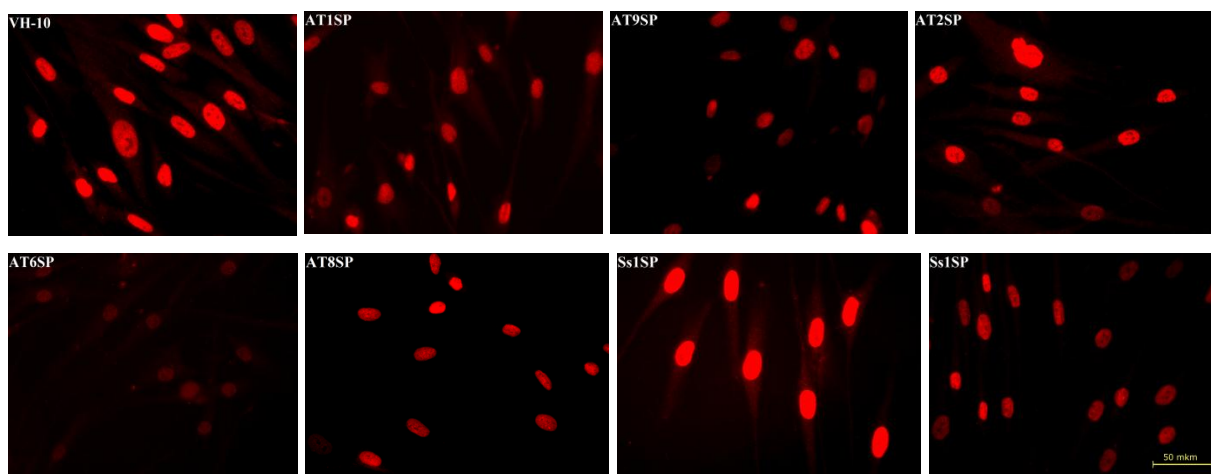


Рисунок 12. Средняя интенсивность флуоресценции HP1- γ в клетках исследуемых линий.

Результаты исследования показали, что наименьшее количество гетерохроматинового белка HP1- γ оказалось у пациентки с более лёгкой формой АТ (AT6SP), в клетках которой, вероятно, доминирует программа ускоренного старения, а не опухолевой трансформации. Наибольшее количество HP1- γ в клетках пациентки с мутацией 5382insC в гене *BRCA1* (BRCA1SP), имеющей высокий риск заболевания раком молочной железы. Эти результаты хорошо согласуются с данными М. Collado (Collado et al., 2005), показавшим высокий уровень гетерохроматинового маркера старения HP1- γ в опухолевых клетках мышей. В случае АТ более тяжёлой формы (AT8SP) количество HP1- γ было в 2 раза ниже, чем у здорового донора, но существенно выше, чем при AT6SP. Таким образом, клетки линий AT8SP и AT6SP отличались между собой по средней интенсивности флуоресценции HP1- γ почти в 3 раза. Однако уровень белка в клетках

обеих линий оказался закономерно ниже, чем в клетках здорового донора, что хорошо согласуется с данными, полученными ранее (Полуботко и др. 2009). Средняя интенсивность флуоресценции HP1-γ в клетках линии AT2SP не отличалась от здорового донора. В клетках линий мозаичной формы АТ – AT1SP и AT9SP количество гетерохроматинового маркера HP1-γ оказалось ниже, чем у здорового донора, но выше, чем у пациентки с лёгкой формой АТ AT6SP. Возможно, это объясняется разнородностью клеток внутри одной популяции.

6. Содержание фермента SA-β-Gal в клетках пациентов с АТ.

Для подтверждения активации программы старения в клетках исследуемых линий было определено относительное содержание SA-β-Gal (рис. 13). Данные о содержании SA-β-Gal отображены на рисунке 14.

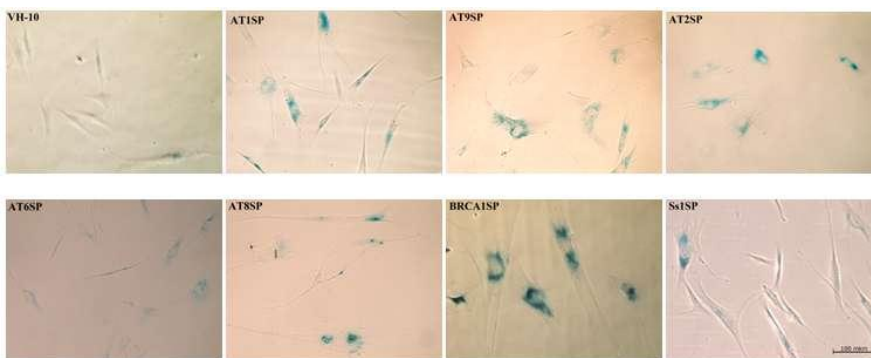


Рисунок 13. SA-β-Gal (голубой) в исследуемых линиях. Масштабная линейка 100 мкм.

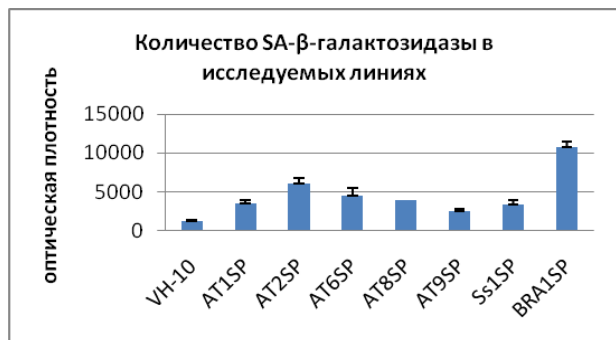


Рисунок 14. Содержание SA-β-Gal в исследуемых линиях (в отн. ед. опт. плот.).

Максимальный уровень активности фермента был обнаружен в клетках пациента с синдромом повышенной радиочувствительности неясной этиологии AT2SP и в линии клеток BRCA1SP. Клетки линии BRCA1SP демонстрировали самый высокий процент aberrаций ядерной ламинаы (блеббов и инвагинаций одновременно (рис. 15)), кроме того в них оказалось больше клеток без SA-β-Gal, что хорошо согласуется с ранее опубликованными данными (Collado et al. 2005), показавшим повышенный уровень маркеров старения – SA-β-Gal и HP1-γ в клетках, находящихся на ранних этапах

опухолевой трансформации. Уровень содержания SA- β -Gal в клетках пациентки с синдромом Секкея практически втрое достоверно превышает уровня фермента в клетках здорового донора (VH-10).

Из всех линий клеток пациентов с АТ наибольший уровень SA- β -Gal оказался у пациентки с более лёгкой формой АТ (AT6SP), что хорошо согласуется с данными об экспрессии гетерохроматинового маркера HP1- γ в этих линиях. Наименьшее количество HP1- γ оказалось в клетках линии AT6SP, что ещё раз подтверждает наши предположения о том, что в этом случае реализовалась программа клеточного старения. Однако мы можем заключить, что она имеет другую природу, нежели старение в клетках на ранних этапах опухолевой трансформации, для которого характерно увеличение экспрессии гетерохроматинового белка HP1- γ .

7. Накопление аббераций ядерной ламинаы при АТ.

Ранее было показано, что в результате аккумуляции aberrантного продукта гена *LMNA* – прогерина происходит структурная трансформация ядерной ламинаы (Scaffidi and Misteli, 2006). Совместно с данными об участии компонентов ядерной ламинаы и, в частности ламина А, в широком спектре клеточных процессов, в том числе регуляции организации хроматина (Goldman et al., 2002), результаты нескольких работ, описанные в обзоре Р. Scaffidi и Т. Misteli, позволяют считать структурные изменения ядерной ламинаы важным процессом в индукции маркеров старения. Наличие одновременно инвагинаций и блеббов ядерной ламинаы (рис. 15) рассматривается как признак старения клетки (Scaffidi, Misteli, 2006), поэтому закономерно, что в линии здорового донора (VH-10) доля клеток с инвагинациями и блеббами практически самая низкая (2%).

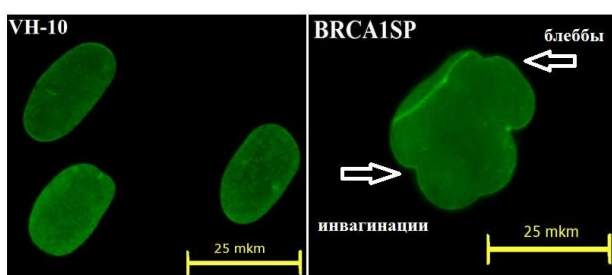


Рисунок 15. Структура ядерной ламинаы в клетках здорового донора (VH-10) и пациентки с мутацией 5382insC в гене BRCA1 (BRCA1SP). Масштабная линейка 25 мкм.

Характер изменений организации ядерной ламинаы в исследуемых линиях представлен на рисунке 16. Наименьший процент клеток с изменениями организации ядерной ламинаы наблюдался в линии здорового донора VH-10 и был достоверно ниже контроля в линиях AT9SP и AT8SP. В линиях AT1SP, AT6SP и Ss1SP количество таких клеток оказалось примерно в 1,5 раза выше контроля. В линиях AT2SP и BRCA1SP

наблюдалось более чем двукратное увеличение количества клеток с нарушениями ядерной ламины. Наименьшая доля клеток с блеббами и инвагинациями ядерной ламины была обнаружена в линии, полученной от пациента с наиболее тяжёлой формой АТ – АТ8SP. При АТ более лёгкой формы и мозаичных формах (АТ6SP, АТ1SP и АТ9SP) доля клеток с инвагинациями и блеббами ядерной ламины выше, чем у здорового донора, что позволяет говорить об изменении ядерной ламины в клетках с активированной программой клеточного старения. Однако, в клетках линии от пациентки с повышенным риском развития опухоли (BRCA1SP) доля клеток с инвагинациями и блеббами оказалась самой высокой. Возможно, наблюдаемые изменения ядерной ламины связаны с тем, что клетка с повышенным риском трансформации активирует тумор-супрессорную программу клеточного старения. Так как наличие одновременно инвагинаций и блеббов в клетке является признаком её старения, полученные результаты коррелируют с уровнем SA-β-Gal, который также должен быть высок в стареющих клетках.

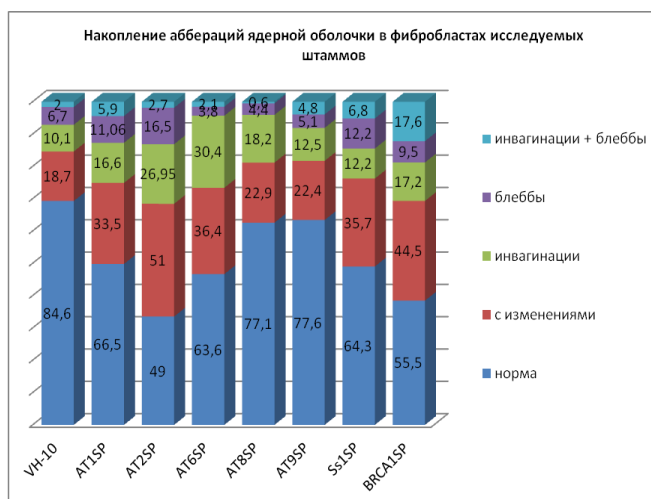


Рисунок 16. Характеристика aberrаций ядерной ламины фибробластов исследуемых линий

8. Длина теломер при АТ.

Важным параметром, характеризующим, репликативное (теломер-зависимое) старение, является укорочение теломер (Михельсон и Гамалей, 2010), хотя связь возраста обследованных пациентов с длиной теломер не всегда удаётся обнаружить напрямую (Bischoff et al., 2006). Результаты измерений показали, что длина теломер в дермальных фибробластах при АТ достоверно ниже, чем длина теломер здорового донора, но эта разница невелика: VH-10 – $4,8 \pm 0,03$ т.п.н.; AT1SP – $4,2 \pm 0,05$ т.п.н.; AT9SP – $3,2 \pm 0,1$ т.п.н.; AT6SP – $3,3 \pm 0,08$ т.п.н.; AT8SP – $4,3 \pm 0,04$ т.п.н.; BRCA1SP – $3,95 \pm 0,06$ т.п.н.; Ss1SP – $3,85 \pm 0,07$ т.п.н.; AT2SP – $3,1 \pm 0,04$ т.п.н. Нам не удалось выявить какие-либо

закономерности между длиной теломер и формы заболевания АТ, несмотря на то, что при разных формах преждевременного старения теломеры могут быть значительно укорочены в связи с нарушениями нормального функционирования генов *ATM* и *WRN* (Smilenov et al., 1997; Machwe et al., 2004).

Заключение

Первичные фибробласты способны пройти в культуре определённое количество делений, получившее название лимита Хейфлика (Hayflick, Moorhead, 1961), молекулярной основой которого является недорепликация теломер, и как следствие их укорочение при каждом цикле клеточного деления. 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 специфический сигнальный каскад реакций клеточного ответа на повреждение ДНК, приводящий к необратимой остановке клеточного цикла, клеточному старению. В то же время при наличии мутаций в генах, вовлечённых в регуляцию клеточного цикла или репарацию ДНК, процесс клеточного старения нарушается, он может ускоряться или замедляться, приводя к преодолению теломер-зависимого старения и опухолевой трансформации клетки. Сочетание признаков ускоренного старения и значительно повышенного риска возникновения опухолей характерно для ряда заболеваний, таких как синдромы Коккейна, Вернера, Блюма, 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.

При клеточном старении происходят значительные изменения в экспрессии генов, в первую очередь регуляторов транскрипции. Клеточное старение запускается в результате активации клеточного ответа на повреждение ДНК в следствии окислительного стресса, дефектов процессов репарации ДНК, а так же нарушения активности белков p53, Rb, PI3K, или укорочении теломер (Matuoka, Chen, 2002). Принимая во внимание всю многокомпонентность сигналов, некоторые исследователи считают, что старение само по себе не является клеточной программой, а только «отражением» других программ (Blagosklonny, 2013). В то же время другие учёные рассматривают клеточное старение как важнейший фактор, подавляющий канцерогенез (Kuilman et al., 2013). Основываясь на этих представлениях корректно рассматривать совместно маркеры, характерные для процессов канцерогенеза и старения как результат

одновременного действия двух разнонаправленных клеточных программ – старения и трансформации. Первичные фибробласты, полученные от пациентов с атаксией-телеангиэктазией, характеризующейся широким клиническим разнообразием, достаточно хорошо подходят для изучения данных процессов в качестве естественной модели.

Изучение реакции клеток на повреждение ДНК позволило разработать клеточный метод, помогающий уточнить диагноз АТ в сложных клинических случаях и выявить ранее не описанный мозаицизм при данном заболевании, а также обнаружить повышение экспрессии SIRT6 во всех исследованных клетках пациентов с АТ, вне зависимости от формы и степени тяжести заболевания.

Безусловно, процессы, происходящие в клетке при нарушении ответа на повреждение ДНК, протекают в каждом случае индивидуально и зависят от многих факторов. Полученные данные лишь приоткрывают завесу в этом вопросе, который нуждается в дальнейшем изучении с привлечением большего количества клеточных линий, как от пациентов с АТ и другими синдромами, характеризующимися нарушением процесса репарации ДНК и признаками ускоренного старения, так и от здоровых доноров, в первую очередь пожилого возраста. 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 не только выявить более чёткие маркеры для данного сложного заболевания, но и подробнее описать эпигенетические механизмы, определяющие старение клеток и организма.

ВЫВОДЫ

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

2. В ядрах интактных клеток линий 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 SIRT6 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 (AT6SP), 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 (AT6SP), где было детектировано наименьшее количество гетерохроматинового маркера HP1-γ

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **Куранова, М.Л.** Диагностика атаксии-телеангиэктазии с помощью экспресс-теста, основанного на методе непрямой иммунофлуоресценции / Куранова М.Л., Ледащева Т.А., Тулуш Е.К., Беляев Д.Л., Жеребцов С.В., Плескач Н.М., Прокофьева В.В., Михельсон В.М., Спивак И.М. // Цитология. – 2013. – Т. 8. - №55. – С. 560 – 565.
2. **Куранова, М.Л.** Протеинкиназа фофо-АТМ и длина теломер при атаксии-телеангиэктазии / Куранова М.Л., Ледащева Т.А., Тулуш Е.К., Рунов А.Л., Молодан Л.А., Гречанина Е.Я., Плескач Н.М., Спивак И.М., Михельсон В.М. // Сборник материалов I международного форума "Молекулярная медицина – новая модель здравоохранения XXI века: технологии, экономика, образование". – 2013. – С. 255 – 265.
3. **Куранова, М.Л.** Мозаичные формы атаксии-телеангиэктазии / Куранова М.Л., Плескач Н.М., Ледащева Т.А., Михельсон В.М., Спивак И.М. // Цитология. – 2014. – Т. 8. – № 56. – С. 619 – 629.

Тезисы:

4. **Куранова, М.Л.** Эпигенетические изменения в клетках больных атаксией-телеангиэктазией / Куранова М.Л., Плескач Н.М., Михельсон В.М., Спивак И.М. // Материалы I Российского конгресса с международным участием «Молекулярные основы медицины «Возможное и реальное»». – 2010. С. 154.
5. **Куранова, М.Л.** Эпигенетические изменения в семьях больных атаксией-телеангиэктазией / Куранова М.Л., Плескач Н.М., Михельсон В.М., Спивак И.М. // Материалы IV Международного конгресса «Наследственные метаболические заболевания». – 2010. – С. 145.
6. **Куранова, М.Л.** Эпигенетические аспекты при заболеваниях, связанных с ускоренным старением и дефектами репарации ДНК / Куранова М.Л., Плескач Н.М., Жеребцов С.В., Михельсон И.М., Спивак И.М. // Материалы Международной научно-практической конференции "Эпигенетические болезни". – 2011. – С. 211.
7. **Куранова, М.Л.** Эпигенетические особенности при преждевременном старении / Куранова М.Л., Михельсон В.М., Спивак И.М. // Материалы XL Недели науки СПбГПУ. – 2011. – С. 21.
8. **Куранова, М.Л.** Клинико-молекулярно-иммунологические аспекты атаксии-телеангиэктазии / Ледащева Т.А., Тулуш Е.К., Куранова М.Л., Спивак И.М. // Материалы Российского конгресса с международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное. – 2012. – С. 56.
9. **Куранова, М.Л.** Клеточные методы в диагностике синдрома Луи-Бар (атаксия-телеангиэктазия) / Куранова М.Л., Спивак И.М., Михельсон В.М. // Материалы Российского конгресса с

- международным участием «Молекулярные основы клинической медицины – возможное и реальное». – 2012. – С. 201.
10. **Куранова, М.** The proteinkinase ATM in ataxia-telangiectasia / Kuranova M. // Materials of The 27th Annual Symposium of The Protein Society. – 2012. – P. 533.
 11. **Куранова, М.Л.** Диагностика атаксии-телеангиэктазии (синдром Луи-Бар) с помощью экспресс-теста при использовании метода непрямой иммунофлуоресценции / Куранова М.Л., Тулуш Е.К. // Материалы конференции «Фундаментальная наука и клиническая медицина — человек и его здоровье». – 2013. – С.233.
 12. **Куранова, М.Л.** Эпигенетические и молекулярные особенности при синдроме Луи-Бар (атаксия-телеангиэктазия) / Куранова М.Л., Спивак И.М., Ледашева Т.А., Михельсон В.М. // Материалы IX международного междисциплинарного конгресса «Нейронаука для медицины и психологии». – 2013. – С. 196.
 13. **Куранова, М.Л.** Клинический случай синдрома Секкеля / Ледашева Т.А., Измайлова Е.А., Куранова М.Л., Спивак И.М. // Сборник научных трудов "Редкие (орфанные) заболевания и врождённые пороки развития. Современные возможности диагностики, профилактики, лечения и реабилитации" к 45-летию Медико-генетического центра. – 2014. – С. 268 – 271.
 14. **Куранова, М.Л.** SA-β-галактозидаза и гетерохроматиновый маркер HP1-γ при ускоренном старении и высоком риске новообразований в дермальных фибробластах человека / Куранова М.Л. // Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2014». – 2014. – С. 124.
 15. **Куранова, М.Л.** Гистоновые деацетилазы SIRT1 и SIRT6 при одном из синдромов преждевременного старения - атаксия-телеангиэктазия / Куранова М.Л. // Тезисы докладов и сообщений, представленных на IV Санкт-Петербургской конференции молодых учёных (Институт цитологии РАН). – 2014. – С. 370.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

Куранова М.Л. и др., 2013. Цитология. 8(55): 560–565. – *Куранова М.Л. и др.*, 2014. 8(56): 519-529. – *Михельсон В.М., Гамалей И.А.* 2010. Радиозэкология. 50: 269–275. – *Полуботко Е.А. и др.*, 2009. Цитология. 51(8): 712–718. – *Полуботко Е.А. и др.*, 2009. Цитология. 52(12): 978–985. – *Спивак И.М.*, 1999. Цитология. 41(5): 338–379. – *Хомасуридзе М.М. и др.*, 1999. Цитология. 41(5): 412–419. – *Bischoff et al.*, 2006. Epidemiology. 17(2):190-194. – *Cimplich end Kortez*, 2008. Nature Reviews Molecular Cell Biology. 9(8): 616–627. – *Collado M. Et al.*, 2005. Nature. 436(4): 642. – *Goldman R.D. et al.*, 2002. Genes Development. 16: 533–547. – *Hatano A. et al.*, 2010. Biochemical and Biophysical Research Communications. 397(1):93–99. – *Hayflick L. et al.*, 1961. Experimental Cell Research. 253: 585–621. – *Kuilman T. et al.*, 2010. Genes Development. 24: 2463–2479. – *Lavin M.F.*, 2008. Molecular cell biology. 9: 759–769. – *Lavin M.F. et al.*, 1999. International Journal of Radiation Biology. 1999. 75(10): 1201–1214. – *Lee J.H. et al.*, 2013. Journal of Biological Chemistry. 288(18): 12840–12845. – *Michishita E. et al.*, 2008. Nature. 452(7186):492–496. – *Machwe A. et al.*, 2004. Oncogene. 23(1):149–156. – *Matuoka K., Chen Yu.* 2002. Ageing Research. 639–651. – *O’Callaghan N. et al.*, 2008. Biotechniques. 44(6):807–809. – *Pulverer B. et al.*, 2003. Natural Cell Biology. 5(2): 96. – *Roobol et al.*, 2011. Biochem. 435: 499–508. – *Sandoval N. et al.*, 1999. Human Molecular Genetics. 8(P): 69–79. – *Savitsky K. et al.*, 1995. Science. 1995. 268: 1749–1753. – *Scaffidi P, Misteli T.*, 2006. Science. 320: 1059–1063. – *Serravallo M. et al.*, 2009. Archives of Dermatological Research. 305: 269–282. – *Shiloh Y.*, 2003. 3: 155–168. – *Shumaker D.K. et al.*, 2006. Proceedings of the National Academy of Sciences. 103(23):8703–8708. – *Smilenov L.B. et al.*, 1997. Oncogene. 15(22): 2659–2665. – *Wang R. H. et al.*, 2008. Molecular Cell. 32: 11–20.