

## ДНК ПРИЦЕНТРОМЕРНЫХ УЧАСТКОВ КОНСТИТУТИВНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА ДЕМЕТИЛИРОВАНА И ДЕКОНДЕНСИРОВАНА В КЛЕТКАХ MRC5 И A431

© И. С. Р. Вайсертрейгер, О. И. Подгорная, Н. И. Енукашвили<sup>1</sup>

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;*

<sup>1</sup> *электронный адрес: natella@mail.cytspb.rssi.ru*

Считается, что сателлитная ДНК (сатДНК) сильно конденсирована в интерфазе. Мы исследовали методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH), комбинированной с окраской антителами к метилированной ДНК, локализацию, степень конденсации и уровень метилирования центромерной и прицентромерной сатДНК. Исследования проводили на клетках тканей (клетки плаценты и лимфоциты), первичных (линия фибробластов MRC5) и малигнизированных (линия A431) клеточных культурах. Центромерная сатДНК во всех случаях была конденсирована и окрашена антителами к 5-метилцитозину. Прицентромерный сателлит 3 хромосомы 1 был конденсирован в лимфоцитах, в клетках плаценты и клетках молодой первичной культуры фибробластов. Разворачивание сателлита 3 хромосомы 1 наблюдали в стареющих фибробластах и малигнизированной клеточной линии A431. Конденсированные участки прицентромерных сателлитов окрашивались антителами к метилированной ДНК, декомпактизированные области этими антителами не окрашивались. Таким образом, мы наблюдали деконденсацию прицентромерного сателлита 3 в стареющей культуре фибробластов MRC5 и клетках A431. Деконденсация сопровождалась частичным деметилированием сатДНК, принадлежащей конститутивному гетерохроматину.

Ключевые слова: сателлитная ДНК сателлит 3 человека, метилирование, старение.

Принятые сокращения: сатДНК — сателлитная ДНК, п. н. — пары нуклеотидов, ПЦР — полимеразная цепная реакция, FISH — флуоресцентная гибридизация *in situ*, DAPI — 4,6-диамидино-2-фенилиндола, FITC — флуоресцеинизотиоцианат, DIG — дигоксигенин-11-dUTP, HS3 — сателлит 3 человека.

Сателлитные ДНК (сатДНК) — тандемно организованные высокоповторяющиеся последовательности — располагаются в области первичной хромосомной перетяжки (Беридзе, 1982; Craig, 2005). В некоторых случаях сатДНК выявляются в составе плеч хромосом — в так называемом интеркалярном, или интерстициальном, гетерохроматине (Lander et al., 2001).

СатДНК человека разделяют на две группы. К первой относят сатДНК, обнаруженные при обработке геномной ДНК эндонуклеазами рестрикции, например альфоидную ДНК (Manuelidis, 1976). Альфоидная ДНК является единственным семейством сатДНК в центромере человека и приматов. Вторая группа представлена сателлитами 1, 2 и 3, выявленными методами равновесного центрифугирования в градиенте хлористого цезия (Prosser et al., 1986; Lee et al., 1997). Сателлиты этой группы располагаются в прицентромерных районах хромосом. Сателлит 3 (HS3) на метафазных препаратах выявляется в перичентромерных районах большинства хромосом, за исключением хромосом 2, 6, 8, 11, 12, 18, 19 и X (Shiels et al., 1997; Therkelsen et al., 1997).

На основе сатДНК центромерных и прицентромерных участков хромосом формируется конститутивный гетерохроматин. Его традиционно определяют как хроматин, остающийся компактным в течение интерфазы, но за годы, прошедшие после его открытия (Heitz, 1928),

были выработаны новые критерии для определения конститутивного гетерохроматина.

Считается, что конститутивный гетерохроматин специфично окрашивается некоторыми ДНК-интеркалирующими красителями, например 4,6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI) (Schnedl et al., 1977). Вместе с тем показано, что DAPI не является точным маркером участков конститутивного гетерохроматина (Guenatri et al., 2004).

Критерием гетерохроматина также считается нетранскрибируемость ДНК данных участков хромосом. Но в некоторых случаях ДНК конститутивного гетерохроматина может транскрибироваться. Например, HS3 транскрибируется в клетках, находящихся в условиях стресса, например после теплового шока (Metz et al., 2004; Valgardsdottir et al., 2005). Транскрипция сатДНК также показана у шмеля, лисицы и мыши (Belyaeva et al., 1992; Rudert et al., 1995; Rouleux-Bonnin et al., 2004). Таким образом, образование транскриптов сатДНК — достаточно частое явление у животных.

Критерием конститутивного гетерохроматина является специфическое модифицирование гистонов. В конститутивном гетерохроматине гистоны H3 и H4 гипометилированы в отличие от эухроматина. Для клеток с сильно компактизованными геномами характерны замена линкерных гистонов H1 на H5 и общее повышение уровня линкерных гистонов. В конститутивном гетерохроматине, кроме того, наблюдается высокий уровень метили-

рования гистонов H3 по лизину 9. Для конститутивного гетерохроматина также характерно метилирование цитозина (Dillon, 2004; Craig, 2005).

Основной биохимический признак конститутивного гетерохроматина — это связывание с ним гетерохроматинового белка 1 (heterochromatin protein 1 — HP1) или его гомологов. Однако он отсутствует в гетерохроматизированной инактивированной X-хромосоме (Maison et al., 2002; Peters et al., 2003).

Таким образом, ни один из вышеперечисленных критериев не является абсолютным, и для определения конститутивного гетерохроматина их используют в совокупности. Но если все перечисленные критерии не универсальны, то возникает вопрос о том, насколько универсальным является классическое утверждение о компактном состоянии конститутивного гетерохроматина в течение всего клеточного цикла.

Целью нашей работы являлось исследование степени конденсированности конститутивного гетерохроматина в клетках тканей, первичных и малигнизированных клеточных культурах. Для этого был использован метод FISH с зондами на основе центромерного (альфоидной ДНК) и прицентромерного (HS3) сателлитов. Мы показали, что в отличие от центромерного гетерохроматина прицентромерный хроматин деконденсируется в стареющих первичных культурах фибробластов MRC5, а также в малигнизированной клеточной линии A431. Наблюдаемая деконденсация сопровождается снижением степени метилирования сатДНК прицентромерного гетерохроматина.

## Материал и методика

ДНК-зонды. Центромерные участки хромосом выявляли с помощью коммерческого зонда, гибридирующегося со всеми центромерами (all CEN cocktail, Appligen-Oncor, Франция). Данная проба представляет собой смесь меченных дигоксигенином альфоидных ДНК, специфичных к центромерам разных хромосом. В качестве зонда для прицентромерного района хромосом использовали клонированный по сайту BamHI в векторе pUC19 фрагмент (336 пар нуклеотидов — п. н.) массива HS3 хромосомы 1 (HS3-1) (Cooke, Hindley, 1979; Полторацкий и др., 1991). HS3-1 является одним из самых крупных массивов сатДНК в геноме человека и считается хромосом-специфичным, поэтому в нем легче визуально наблюдать изменения морфологических характеристик — степени конденсации, размера и положения в ядре. Именно поэтому фрагмент HS3-1 использовали в качестве зонда. Меченый фрагмент HS3-1 использовали в качестве зонда. Меченый фрагмент HS3-1 получали с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в присутствии дигоксигенин-11-dUTP (DIG) (Roche, Швейцария), используя праймеры, комплементарные фрагментам фага M13, фланкирующим полилинкерный сайт вектора. Для получения меченого DIG зонда использовали следующую последовательность операций: денатурация перед первым циклом — 2 мин при 95 °С, 25 циклов матричного синтеза (30 с — денатурация при 90 °С, отжиг в течение 45 с при 55 °С и стадия элонгации — 1 мин при 65 °С), финальная элонгация — 5 мин при 65 °С. Хромосому 1 визуализировали с помощью «хромосомной краски» — набором меченных флуоресцеинсотиоцианатом (FITC) фрагментов ДНК, покрывающих территорию хромосомы 1 (Appligen-Oncor, Франция).

Клетки. Лимфоциты (нестимулированные) периферической крови человека были любезно предоставлены И. Корицкой (Институт цитологии РАН). Лимфоциты выделяли по общепринятой схеме (Woyum, 1968) из свежей донорской крови.

Для получения фракции ядер из клеток плаценты человека взятую после нормального родоразрешения плаценту гомогенизировали в буфере STM (0.32 М сахарозы, 50 мМ Tris-HCl, pH 7.4, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.01 % PMSF и 0.1 мМ ЭДТА). Гомогенат фильтровали через слой марли и центрифугировали 30 мин при 5000 g. Осадок ресуспендировали в буфере, содержащем 2.1 М сахарозы, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0.1 мМ ЭДТА, 50 мМ Tris-HCl, pH 7.4 и 0.01 % PMSF, настилали на подушку из этого же буфера и центрифугировали 2 ч при 0 °С (80 000 g). Осадок трижды отмывали буфером STM и ресуспендировали в этом же буфере. Качество ядер проверяли под световым микроскопом. Ядра иммобилизовывали на стеклах, покрытых полилизинном.

Первичные фибробласты MRC5 человека были получены из Банка клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки представляют собой первичные фибробласты человека с мужским кариотипом, которые перестают делиться примерно после 40-го пассажа культуры. Молодые клетки MRC5 получены из интенсивно растущей культуры на 11—14-м пассаже. Стареющие MRC5 получены из очень медленно растущей культуры на 32-м пассаже.

Клетки эпидермальной карциномы A431 представляют собой малигнизированную клеточную линию с неограниченным ростом. Линия имеет женский кариотип с многочисленными хромосомными перестройками.

Все клетки выращивали на покровных стеклах в среде Игла, содержащей 10 % сыворотки эмбрионов коров, при 37 °С в атмосфере, содержащей 5 % CO<sub>2</sub>.

Все препараты фиксировали смесью метанола с уксусной кислотой (3 : 1).

Для приготовления метафазных пластинок в среды культивирования клеток MRC5 и A431 добавляли колхицин (0.5 г/мл) на 3 ч, обрабатывали гипотоническим раствором 0.075 М KCl, распластывали на стеклах, фиксировали смесью метанол—уксусная кислота (3 : 1), распластывали на стеклах и высушивали.

Гибридизация на фильтрах по Саузерну. Геномную ДНК нестимулированных лимфоцитов периферической крови и клеток плаценты человека, из фибробластов MRC5 и клеток A431 выделяли с использованием стандартных методов (Чан, 1999). Далее геномную ДНК обрабатывали рестриктазой Bsp119I (Fermentas, Литва), которая не разрезает ДНК по сайту распознавания, если он метилирован. Фрагменты ДНК, образовавшиеся в результате рестрикции, разделяли при помощи электрофореза в 0.8%-ном агарозном геле и переносили на нейлоновую мембрану, как описано ранее (Sambrook et al., 1989). Саузерн-гибридизацию проводили в жестких условиях с использованием в качестве зонда HS3-1, меченого DIG. Для детекции использовали антитела против DIG, конъюгированные с щелочной фосфатазой (Roche, Швейцария). Для каждой дорожки определяли относительное метилирование последовательности HS3-1, которое рассчитывали как отношение (M-отношение) интенсивности окрашивания щелочной фосфатазой фрагментов длиной свыше 2 тыс. п. н. к интенсивности окрашивания по всей дорожке. Пороговое значение M-отношения (2 тыс. п. н.) определяли по данным из литературы (Vilain et al., 2000).

Флуоресцентная гибридизация *in situ* с зондами HS3-1 и all CEN (FISH). Зафиксированные препараты денатурировали в 70%-ном формамиде, приготовленном на 2-кратном SSC, при 74 °C в течение 7 мин. Денатурированную гибридизационную смесь наносили на препараты. Гибридизацию проводили в течение ночи при 37 °C. Далее препараты отмывали в 50%-ном формамиде, приготовленном на 2-кратном SSC, при 45 °C в течение 15 мин и в 2-кратном SSC при 37 °C в течение 8 мин. Сайты неспецифического связывания блокировали 5%-ным бычьим сывороточным альбумином. Сайты гибридизации проб HS3-1 или all CEN с мечеными DIG детектировали при помощи анти-DIG-антител, конъюгированных с FITC или родамином (1 : 40). После этого ядра окрашивали DAPI и заключали в среду, содержащую агент, предохраняющий от выгорания флуорохрома (Sigma, Германия).

При одновременном использовании зонд HS3-1 и «хромосомную краску» денатурировали отдельно из-за разных параметров предварительного отжига (*preannealing*) и далее совместно наносили на препараты. Гибридизацию и постгибридизационные отмывки проводили согласно протоколу фирмы-производителя хромосомной краски. При сочетании метода FISH и иммуноокрашивания после стадии нанесения антител против DIG наносили антитела мыши (1 : 250) против 5-метилцитозина. Далее препараты трижды отмывали от антител раствором PBST (3 мМ KCl, 1 мМ K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 140 мМ NaCl, 8 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> и 0.05 % Tween-20) по 5 мин в темноте и инкубировали с антителами лошади (1 : 50) против иммуноглобулинов мыши, конъюгированными с родамином. Затем препараты с ядрами клеток снова отмывали, окрашивали DAPI и заключали в среду, содержащую агент, предохраняющий от выгорания флуорохрома (Sigma, Германия).

Для анализа препаратов использовали конфокальный микроскоп Zeiss LSM 5. Флуоресценцию FITC и родамина возбуждали светом с длинами волн 488 и 543 нм соответственно. Сканирование производили с шагом 0.3 мкм вдоль Z-оси.

## Результаты

Специфичность зондов, гибридизующихся со всеми центромерами (рис. 1, *а*) и с последовательностью HS3-1, проверяли на метафазных пластинках, полученных из клеток линий MRC5 и A431 (рис. 1, *б*, *в*). В клетках MRC5 каждая пластинка состояла из 46 хромосом. Клетки A431 обладали измененным кариотипом, число в метафазной пластинке варьировало от 40 до 70 (модальное число 55).

Центромерный зонд являлся специфичным для центромерных участков хромосом, так как при его использовании гибридизационный сигнал выявлялся на каждой хромосоме в области первичной перетяжки в обоих типах клеток. Зонд HS3-1 выявлялся только на двух хромосомах в пластинке в клетках MRC5 (рис. 1, *б*). Эта пара была классифицирована как хромосомы 1 по результатам гибридизации с «хромосомной краской» (рис. 1, *б*). В клетках A431 число участков, выявляемых зондом HS3-1, превышало 2 (рис. 1, *в*). Но все они располагались в прицентромерной области хромосомы 1 или прилежали к фрагментам хромосомы 1, располагавшимся на других хромосомах. Следовательно, зонд HS3-1 специ-

фичен по отношению к прицентромерной области хромосомы 1 (район 1q12). В линии MRC5 в отличие от A431 отсутствуют хромосомные транслокации в данной области.

Степень метилирования и конденсации центромерной сатДНК была оценена методом комбинирования FISH с окраской антителами к метилированной ДНК (рис. 2, *а*, *I*, *II*). Метилированная ДНК располагалась цепочками из небольших гранул диаметром 0.3 мкм, пронизывающих все пространство ядра. Центромерная сатДНК интенсивно окрашивалась антителами (рис. 2, *а*, *II*).

В лимфоцитах центромерная сатДНК была также сильно компактизована (рис. 2, *б*, *I*, *II*). Метилированная ДНК располагалась по всему ядру в виде немногочисленных достаточно крупных островков. Центромерная сатДНК полностью окрашивалась антителами против 5-метилцитозина (рис. 2, *б*, *II*).

В клетках A431 гибридизационный зонд также выявил компактные гибридизационные сигналы (рис. 2, *в*, *I*, *II*). Антитела окрашивали мелкие (0.2 мкм и менее) гранулы, хаотично разбросанные по всему ядру. Все гибридизационные сигналы от HS3-1 совпадали с окраской антителами против 5-метилцитозина (рис. 2, *в*, *II*).

В клетках культуры первичных фибробластов MRC5 центромерная сатДНК была также компактизована. Гибридизационный сигнал выявлялся в виде небольших гранул в ядре (рис. 2, *г*, *I*, *II*). В клетках MRC5 антитела окрашивали множество мелких гранул, которые иногда сливались в кластеры. Вся центромерная сатДНК интенсивно окрашивалась антителами (рис. 2, *г*, *II*).

В клетках плаценты сигнал HS3-1, выявляемый с помощью FISH, был конденсирован. Гибридизационный сигнал выявлялся в виде двух небольших и достаточно удаленных друг от друга гранул, округлых (0.6—0.7 мкм) или в форме полумесяца (0.7 × 0.3 мкм) (рис. 3, *а*, *I*, *II*). Большинство сигналов HS3-1 прилежало к ядерной оболочке. Гранулы HS3-1 обычно интенсивно окрашивались антителами к CpG-островкам (рис. 3, *а*, *II*).

В лимфоцитах зонд выявлял два сигнала в виде гранул со средним диаметром 0.6 мкм (рис. 3, *б*, *I*, *II*). HS3-1 тоже полностью окрашивался антителами против 5-метилцитозина (рис. 3, *б*, *II*).

В клетках A431 размер гранулы одного гибридизационного сигнала составлял примерно 1 мкм. В подавляющем большинстве клеток содержалось более двух гранул HS3-1, что связано с наличием перестроек, затрагивающих данный участок хромосомы. Два из этих сигналов сохраняли периферическое положение, в то время как остальные могли располагаться как во внутреннем пространстве ядра, так и на периферии (рис. 3, *в*, *I*, *II*). Характерной особенностью части клеток являлась частичная деконденсация HS3-1. В 14 % клеток A431 FISH-зонд выявил цепочки точечных гранул (диаметром менее 0.3 мкм), отходящие от основных компактных гранул размером 1 мкм. Длина цепочек и количество точек в них варьировали от клетки к клетке. Антитела полностью окрашивали компактные гранулы, однако цепочки деконденсированного сателлита практически не окрашивались антителами (рис. 3, *в*, *II*).

В молодых (до 20—25-го пассажа) фибробластах MRC5 результаты гибридизации были сходны с результатами, полученными на клетках тканей, и сателлит HS3-1 полностью окрашивался антителами (данные не представлены). Ситуация в стареющих клетках (после

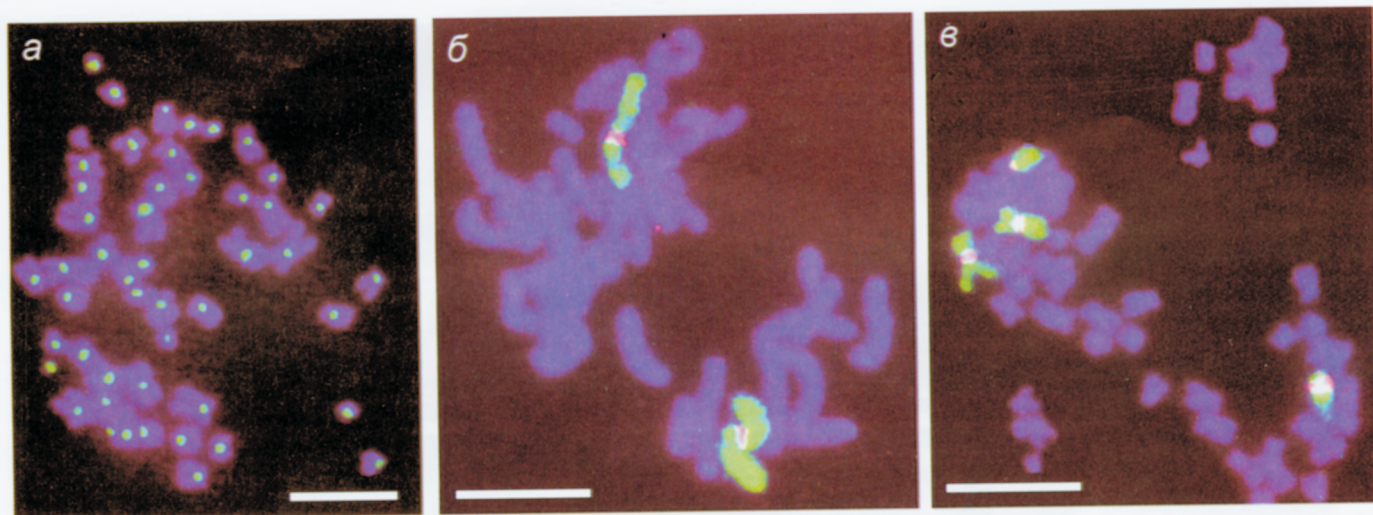


Рис. 1. FISH-гибридизация с зондами all CEN и HS3-1 метафазных пластин из клеток A431 (а, в) и MRC5 32-го пассажа (б). Все хромосомы визуализированы DAPI (а—в, синий псевдоцвет). Хромосома 1 окрашена хромосом-специфичной краской (б, в, бирюзовый псевдоцвет). All CEN (а) — бирюзовый псевдоцвет, HS3-1 (б, в) — красный псевдоцвет. Масштабные линейки — 10 мкм.

27—29-го пассажа) резко менялась. В этих клетках HS3-1 уже не имел вида компактных гранул. В 30 % клеток зонд HS3-1 выявил гибридационные сигналы, которые находились не в плотных небольших участках, как сигналы от HS3-1 в клетках плаценты и лимфоцитах, а в большом количестве мелких точек, которые занимали гораздо большую площадь, чем в других соматических клетках (рис. 3, з, I, II). Участки, сохранившие компактное состояние, интенсивно окрашивались антителами к CpG-островкам. Декомпатизованные участки, как и в случае с клетками A431, антителами не окрашивались (рис. 3, з, II).

Таким образом, иммуноцитохимическими методами показано, что деконденсированные участки HS3-1 сла-

бее окрашиваются антителами к метилцитозину. Однако это не являлось доказательством снижения уровня метилирования этого сателлита. Поэтому уровень метилирования HS3-1 был проверен с помощью гибридазации на фильтрах по Саузерну зонда HS3-1 с образцами ДНК, обработанными рестриктазой Bsp119I. Оказалось, что в лимфоцитах и клетках плаценты HS3-1 сильно метилирован: длина практически всех полученных фрагментов превышала 2 тыс. п. н. (рис. 4, I, 2). В стареющих фибробластах и в клетках A431 уровень метилирования заметно снижен (рис. 4, 3, 4). В клетках A431 наблюдался максимум деметилирования (рис. 4, 4), в то время как максимум деконденсации отмечен в стареющих фибробластах (рис. 3, з).

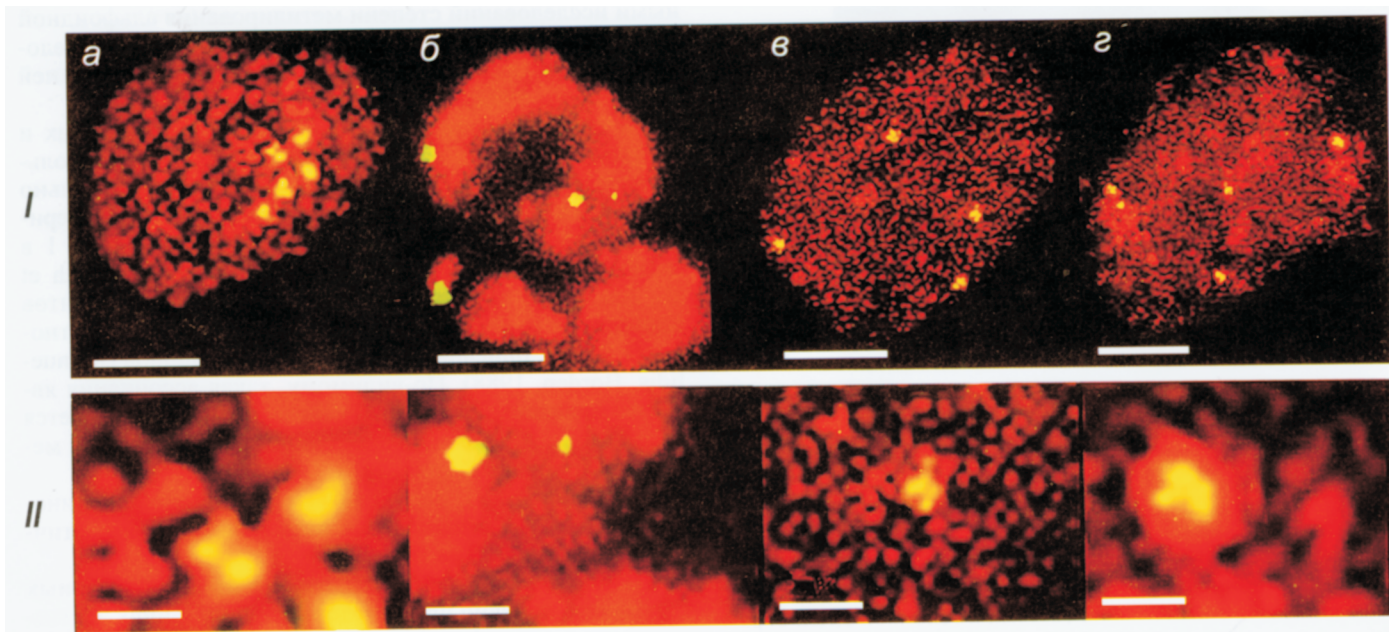


Рис. 2. FISH-гибридизация и иммуноокрашивание с зондом all CEN и антителами против CpG-островков интерфазных ядер из клеток плаценты (а), из лимфоцитов (б), из клеток A431 (в) и MRC5 32-го пассажа (з).

Зеленый псевдоцвет — зонд All CEN, красный псевдоцвет — антитела против CpG-островков. Масштабные линейки: а, I—в, I— 5 мкм; а, II— в, II— 1.5 мкм; з, I— 10 мкм; з, II— 3 мкм.

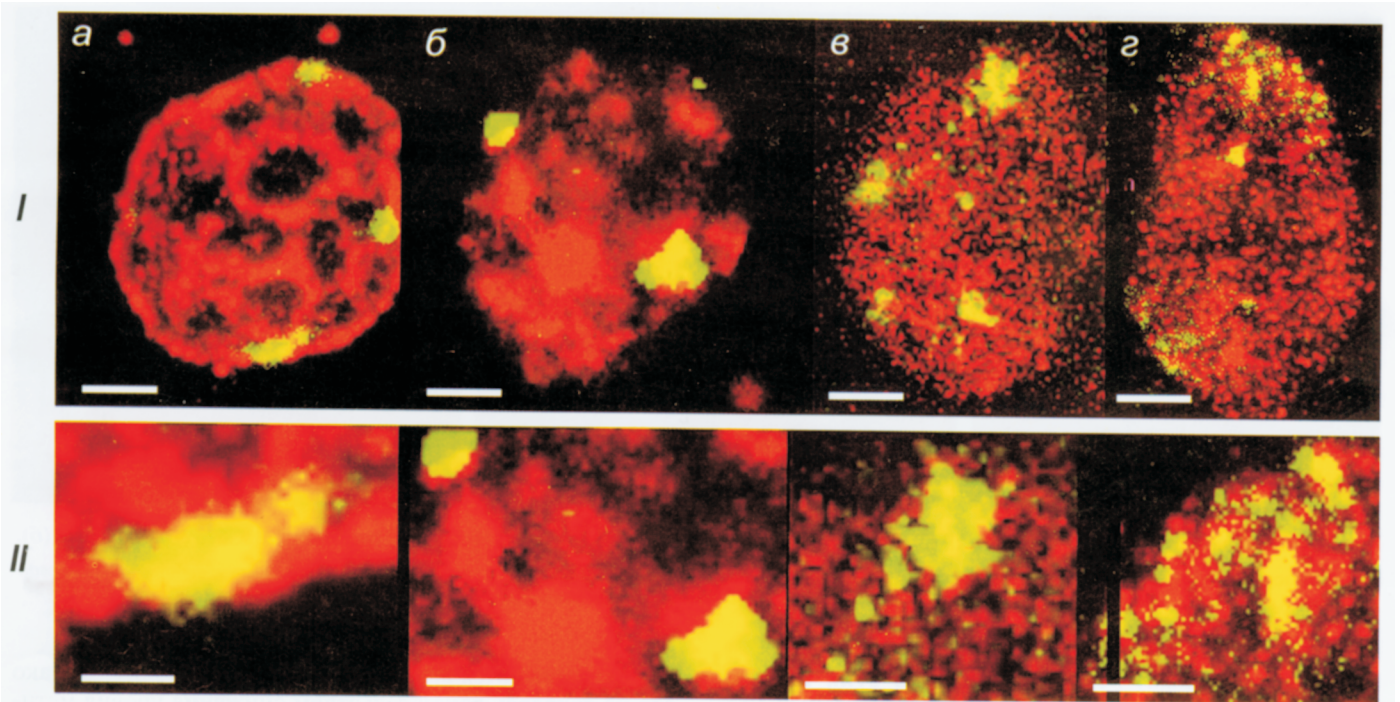


Рис. 3. FISH-гибридизация и иммуноокрашивание с зондом HS3-1 и антителами против CpG-островков интерфазных ядер из клеток плаценты (а), из лимфоцитов (б), из клеток A431 (в) и MRC5 32-го пассажа (г).

Зеленый псевдоцвет — зонд HS3-1, красный псевдоцвет — антитела против CpG-островков. Масштабные линейки: а, I—в, I— 5 мкм; а, II— в, II— 1.5 мкм; г, I— 10 мкм; г, II— 3 мкм.

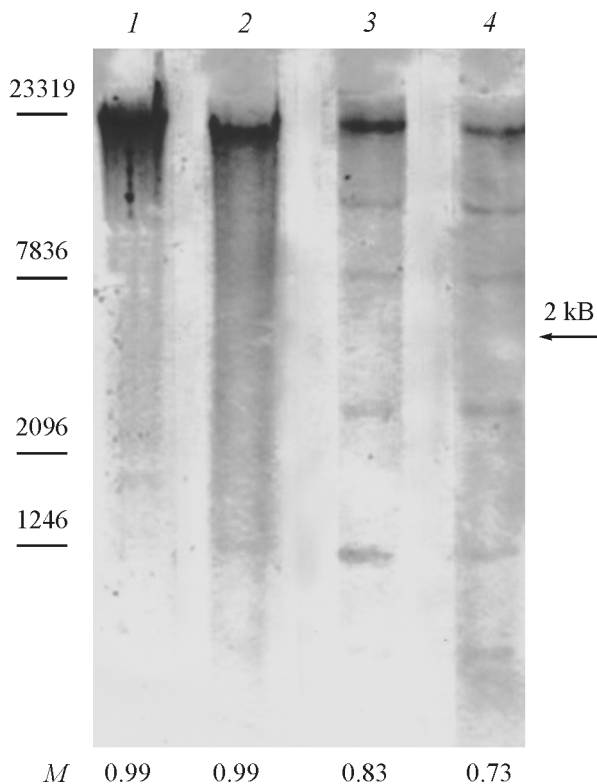


Рис. 4. Саузерн-гибридизация тотальной геномной ДНК, обработанной рестриктазой *Bsp* 1191, из лимфоцитов (1), клеток плаценты (2), клеток MRC5 32-го пассажа (3) и A431 (4).

Зонд — HS3-1, меченный DIG. Стрелка показывает пограничную молекулярную массу (2 тыс. п. н.) при расчете М-отношения (объяснения см. в тексте). М — величина М-отношения.

## Обсуждение

Итак, в клетках, выделенных из тканей (в лимфоцитах и клетках плаценты), в культуре малигнизированных клеток A431 и в первичной культуре фибробластов MRC5 центромерная сатДНК компактизована и сильно метилирована (рис. 2). Эти результаты совпадают с данными исследований степени метилирования альфойдной ДНК, проведенных на лимфобластоидных линиях человека и биоптатах, выделенных из опухолевых тканей (Dante et al., 1992).

В клетках, выделенных из тканей (в лимфоцитах и клетках плаценты), сателлит HS3 хромосомы 1 в большинстве случаев располагается по периферии, сильно компактизован и сильно метилирован (рис. 3, 4). Периферическое расположение сателлита 3 хромосомы 1 в лимфоцитах человека было описано ранее (Weierich et al., 2003). Мы не наблюдали на препаратах лимфоцитов ассоциации гомологов в районе 1q12, к которому относится HS3-1, описанной для культуры нейронов (Manuelidis, Borden, 1988). По-видимому, такая ассоциация является тканеспецифичной. Тканеспецифичным является также и распределение в пространстве ядра участков метилированной ДНК (рис. 2, 3).

В клетках A431, полученных из вульварной карциномы (рис. 3, 4), мы наблюдали разворачивание и частичное деметилирование HS3-1.

Избирательное деметилирование прицентромерных сателлитов описано при некоторых заболеваниях. Сателлит 2 хромосом 1 и 16 и HS3-9 гипометилированы в клетках крови пациентов с синдромом ICF (Immunodeficiency-Centromeric instability-Facial anomalies) (Luciani et al., 2004). Сателлит 2 хромосомы 1 гипометилирован в нефробластомах (опухолях Вилмса) и в гепатоцеллюляр-

ных карциномах (Ehrlich et al., 2003). Для случаев рака молочной железы, особенно в опухолях начальной стадии, показано избирательное деметилирование сателлитов 1 и 2 хромосомы 1 (Maraschio et al., 1988; Narayan et al., 1997; Qu et al., 1999; Jackson et al., 2004). Предполагается, что гипометилирование прицентромерной ДНК хромосомы 1 является одним из элементов канцерогенеза в молочной железе, а также гистологическим признаком его начальных стадий (Jackson et al., 2004). Из наших результатов следует, что в клетках A431 также наблюдается деметилирование HS3-1. Сателлиты 2 и HS3 очень близки друг к другу. Иногда разные исследователи относят одну и ту же последовательность то к одной, то к другой группе. Поэтому, суммируя наши данные с данными других авторов, можно сказать, что при канцерогенезе избирательное деметилирование прицентромерных участков некоторых хромосом является широко распространенным. Предполагается (Ehrlich et al., 2003), что деметилирование прицентромеров может быть как основой для дальнейшего распространения деметилирования на эухроматиновые районы, так и одним из способов трансрегуляции экспрессии генов, лежащих в ядре (а не на хромосоме), вблизи этих участков хромосом. Деконденсация HS3-1 в опухолевых интерфазных клетках ранее описана не была. Известно, что в клетках линии HeLa (карцинома шейки матки) HS3-1 сохраняет конденсированное состояние (Erukashvily et al., 2005).

Мы наблюдали разные виды распределения метилированной ДНК в ядрах из клеток тканей и в ядрах из стареющих клеток, растущих в культуре. В ряду исследованных клеток исчезали крупные кластеры и появлялись вместо них очень мелкие гранулы, разбросанные по всему ядру. Кроме того, снижался уровень метилирования HS3-1.

Известно, что уровень метилирования геномной ДНК падает в стареющих тканях (Singhal et al., 1987), а также с ростом числа пассажей в первичных культурах нормальных клеток млекопитающих (Fairweather et al., 1987; Tsien et al., 2002). Одним из механизмов, ограничивающих число делений и ведущих к старению, считается постепенное деметилирование 5-метилцитозиновых оснований ДНК (Hoal-van Helden, van Helden, 1989). Обработка клеток ингибиторами ДНК-метилтрансферазы 5-азацитидином (aza-C) и 5-азадезоксцитидином (aza-dC) приводит к уменьшению срока жизни клеток *in vitro* (Fairweather et al., 1987). Преждевременное старение вызывается падением уровня метилирования ДНК в нормальных фибробластах человека (Young, Smith, 2001).

Малые дозы aza-C или aza-dC сильно подавляют конденсацию конститутивного гетерохроматина в клетках человека, особенно в прицентромерных районах 1, 9, 16 и q-плеча Y-хромосом в лимфоцитах человека (Haaf, Schmid, 2000). Эти районы избобилуют последовательностями классических сателлитов 2 и 3 (Tagarro et al., 1994) и на метафазных пластинках заметно окрашиваются антителами против 5-метилцитозина (Lubit et al., 1976). Таким образом, при ключевом старении одной из специфических мишеней для деметилирования могут быть классические сателлиты ДНК.

К настоящему времени селективное понижение уровня метилирования прицентромерной сателлитной ДНК *in vivo* и *in vitro* во время старения показано у человека, мышей и коров (Howlett et al., 1989; Hornsby et al., 1992; Suzuki et al., 2002).

Сузуки и соавторы (Suzuki et al., 2002) в своем исследовании первичной культуры нормальных фибробластов человека на протяжении большого количества пассажей проверяли степень метилирования классических сателлитов 2 и 3, а также геномной ДНК. Уровни деметилирования были очень сходны в тотальной ДНК и сателлите 2, в то время как уровень деметилирования в HS3 падал вдвое быстрее, чем во всех остальных образцах. Более 70 % 5-метилцитозина HS3, метилированного в молодых клетках, были деметилированы в стареющих клетках. Найдено, что деметилирование сателлитных последовательностей коррелирует с присутствием микроядер, содержащих сателлитные последовательности, в стареющих фибробластах TIG-7 (Suzuki et al., 2002). Мы не наблюдали микроядер в стареющей культуре фибробластов MRC5, а степень деконденсации HS3-1 в наших исследованиях была выше, чем в фибробластах TIG-7 (Suzuki et al., 2002). Линии TIG-7 и MRC5 различаются по своему происхождению — это фибробласты кожи и легких соответственно. Однако для обеих линий показана деконденсация определенного участка конститутивного гетерохроматина. Следовательно, разворачивание конститутивного гетерохроматина при определенных условиях не является уникальным явлением, присущим одной конкретной линии.

Итак, мы обнаружили частичную деконденсацию и деметилирование прицентромерной сатДНК, входящей в состав конститутивного гетерохроматина в малигнизированных клетках A431 и в стареющих клетках первичной культуры фибробластов. По всей видимости, механизмы деконденсации в стареющих фибробластах и в клетках A431 различны, что вполне естественно, так как старение и малигнизация — два разнонаправленных процесса. Результаты гибридизации по Саузерну (рис. 4) свидетельствуют о том, что в деконденсации HS3-1 в фибробластах кроме деметилирования принимают участие другие факторы. Дальнейшие исследования помогут выяснить, какие еще изменения сопровождают деконденсацию HS3-1 в этих клетках.

Мы благодарим д-ра Д. Шир (Dr. D. Sheer, Human Cytogenetics Laboratory, Cancer Research UK, London Research Institute) и д-ра Р. Донева (Dr. R. Donev, University of Wales, College of Medicine, Cardiff, UK) за плодотворное сотрудничество в течение всего времени работы над проектом. Мы также благодарны Банку клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург) за огромную помощь в работе с клетками линии MRC5.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 04-04-48734-а), гранта Президента РФ для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук — и их научных руководителей (МК-2497.2005.4), гранта для молодых кандидатов наук Санкт-Петербурга (PD06-1.4-130), гранта на краткосрочную научную поездку Королевского общества Великобритании (Royal Society). Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП «Материаловедение и диагностика в передовых технологиях».

## Список литературы

- Беридзе Т. Г. 1982. Сателлитная ДНК. М.: Наука. 121 с.
- Полторацкий В. П., Деу Р., Белрейдер Ф., Березней Р., Подгорная О. И. 1991. Белок, связанный с сателлитной ДНК, присутствует в препаратах ядерного матрикса клеток человека. Молекуляр. биол. 25 (1) : 83—90.
- Чан В. Т.-В. 1999. Выделение нуклеиновых кислот из клинических образцов и культур. Молекулярная клиническая диагностика. Методы. М.: Мир. 558 с.
- Belyaeva T. A., Vishnivetsky P. N., Potapov V. A., Zhelezova A. I., Romashchenko A. G. 1992. Species- and tissue-specific transcription of complex, highly repeated satellite-like Bsp elements in the fox genome. Mamm. Genome. 3 : 233—236.
- Boyum A. 1968. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction. Scand. J. Clin. Invest. 97 (Suppl.) : 1—9.
- Cooke H. J., Hindley J. 1979. Cloning of human satellite III DNA: different components are on different chromosomes. Nucl. Acids Res. 6 : 3177—3197.
- Craig J. M. 2005. Heterochromatin — many flavours, common themes. Bioessays. 27 : 17—28.
- Dante R., Dante-Paire J., Rigal D., Roizes G. 1992. Methylation patterns of long interspersed repeated DNA and alphoid repetitive DNA from human cell lines and tumors. Anticancer Res. 12 : 559—563.
- Dillon N. 2004. Heterochromatin structure and function. Biol. Cell. 96 : 631—637.
- Ehrlich M., Hopkins N. E., Jiang G. 2003. Satellite DNA hypomethylation in karyotyped Wilms tumors. Cancer Genet. Cytogenet. 141 : 97—105.
- Enukashvily N., Donev R., Sheer D., Podgornaya O. 2005. Satellite DNA binding and cellular localization of RNA helicase P68. J. Cell Sci. 118 : 611—622.
- Fairweather D. S., Fox M., Margison G. P. 1987. The *in vitro* lifespan of MRC-5 cells is shortened by 5-azacytidine-induced demethylation. Exp. Cell Res. 168 : 153—159.
- Guenatri M., Bailly D., Maison C., Almouzni G. 2004. Mouse centric and pericentric satellite repeats form distinct functional heterochromatin. J. Cell Biol. 166 : 493—505.
- Haaf T., Schmid T. 2000. Experimental condensation inhibition in constitutive and facultative heterochromatin of mammalian chromosomes. Cytogenet. Cell Genet. 91 : 113—123.
- Heitz E. 1928. Das heterochromatin der moose. Jahrb. Wiss. Botanik. 69 : 762—818.
- Hoal-van Helden E. G., van Helden P. D. 1989. Age-related methylation changes in DNA may reflect the proliferative potential of organs. Mutat. Res. 219 : 263—266.
- Hornsby P. J., Yang L., Raju S. G., Maghsoudlou S. S., Lala D. S., Nallaseth F. S. 1992. Demethylation of specific sites in the 5'-flanking region of the CYP17 genes when bovine adrenocortical cells are placed in culture. DNA Cell Biol. 11 : 385—393.
- Howlett D., Dalrymple S., Mays-Hoopers L. L. 1989. Age-related demethylation of mouse satellite DNA is easily detectable by HPLC but not by restriction endonucleases. Mutat. Res. 219 : 101—106.
- Jackson K., Yu M. C., Arakawa K., Fiala E., Youn B., Fiegl H., Muller-Holzner E., Widschwendter M., Ehrlich M. 2004. DNA hypomethylation is prevalent even in low-grade breast cancers. Cancer Biol. Ther. 3 : 1225—1231.
- Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., Funke R., Gage D., Harris K., Heaford A., Howland J., Kann L., Lehoczyk J., LeVine R., McEwan P., McKernan K., Meldrum J., Mesirov J. P., Miranda C., Morris W., Naylor J., Raymond C., Rossetti M., Santos R., Sheridan A., Sougnez C., Stange-Thomann N., Stojanovic N., Subramanian A., Wyman D., Rogers J., Sulson J., Ainscough R., Beck S., Bentley D., Burton J., Clee C., Carter N., Coulson A., Deadman R., Deloukas P., Dunham A., Dunham I., Durbin R., French L., Grafham D., Gregory S., Hubbard T., Humphray S., Hunt A., Jones M., Lloyd C., McMurray A., Matthews L., Mercer S., Milne S., Mullikin J. C., Mungall A., Plumb R., Ross M., Showkeen R., Sims S., Waterston R. H., Wilson R. K., Hillier L. W., McPherson J. D., Marra M. A., Mardis E. R., Fulton L. A., Chinwalla A. T., Pepin K. H., Gish W. R., Chissoe S. L., Wendl M. C., Delehaunty K. D., Miner T. L., Delehaunty A., Kramer J. B., Cook L. L., Fulton R. S., Johnson D. L., Minx P. J., Clifton S. W., Hawkins T., Branscomb E., Predki P., Richardson P., Wenning S., Slezak T., Doggett N., Cheng J. F., Olsen A., Lucas S., Elkin C., Uberbacher E., Frazier M., Gibbs R. A., Muzny D. M., Scherer S. E., Bouck J. B., Sodergren E. J., Worley K. C., Rives C. M., Gorrell J. H., Metzger M. L., Naylor S. L., Kucherlapati R. S., Nelson D. L., Weinstock G. M., Sakaki Y., Fujiyama A., Hattori M., Yada T., Toyoda A., Itoh T., Kawagoe C., Watanabe H., Totoki Y., Taylor T., Weissenbach J., Heilig R., Saurin W., Artiguenave F., Brottier P., Bruls T., Pelletier E., Robert C., Wincker P., Smith D. R., Doucette-Stamm L., Rubenfield M., Weinstock K., Lee H. M., Dubois J., Rosenthal A., Platzer M., Nyakatura G., Taudien S., Rump A., Yang H., Yu J., Wang J., Huang G., Gu J., Hood L., Rowen L., Madan A., Qin S., Davis R. W., Federspiel N. A., Abola A. P., Proctor M. J., Myers R. M., Schmutz J., Dickson M., Grimwood J., Cox D. R., Olson M. V., Kaul R., Raymond C., Shimizu N., Kawasaki K., Minoshima S., Evans G. A., Athanasiou M., Schultz R., Roe B. A., Chen F., Pan H., Ramser J., Lehrach H., Reinhardt R., McCombie W. R., de la Bastide M., Dedhia N., Blocker H., Hornischer K., Nordsiek G., Agarwala R., Aravind L., Bailey J. A., Bateman A., Batzoglou S., Birney E., Bork P., Brown D. G., Burge C. B., Cerutti L., Chen H. C., Church J., Clamp M., Copley R. R., Doerks T., Eddy S. R., Eichler E. E., Furey T. S., Galagan J., Gilbert J. G., Harmon C., Hayashizaki Y., Haussler D., Hermjakob H., Hokamp K., Jang W., Johnson L. S., Jones T. A., Kasif S., Kasprzyk A., Kennedy S., Kent W. J., Kitts P., Koonin E. V., Korfi I., Kulp I., Lancet D., Lowe T. M., McLysaght A., Mikkelsen T., Moran J. V., Mulder N., Pollara V. J., Ponting C. P., Schuler G., Schultz J., Slater G., Smit A. F., Stupka E., Szustakowski J., Thierry-Mieg D., Thierry-Mieg J., Wagner L., Wallis J., Wheeler R., Williams A., Wolf Y. I., Wolfe K. H., Yang S. P., Yeh R. F., Collins F., Guyer M. S., Peterson J., Felsenfeld A., Wetterstrand K. A., Patrino A., Morgan M. J., de Jong P., Catanese J. J., Osoegawa K., Shizuya H., Choi S., Chen Y. J. 2001. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. Nature. 409 : 860—921.
- Lee C., Wevrick R., Fisher R. B., Ferguson-Smith M. A., Lin C. C. 1997. Human centromeric DNAs. Hum. Genet. 100 : 281—304.
- Lubit B. W., Pham T. D., Miller O. J. 1976. Localization of 5-methylcytosine in human metaphase chromosomes by immunoelectron microscopy. Cell. 9 : 503—509.
- Luciani J. J., Depetris D., Missirian C., Mignon-Ravix C., Metzler-Guillemain C., Megarbane A., Moncla A., Mattei M. G. 2004. Subcellular distribution of HP1 proteins is altered in ICF syndrome. Eur. J. Hum. Genet. 13 : 41—51.
- Maison C., Bailly D., Peters A. H., Quivy J. P., Roche D., Taddei A., Lachner M., Jenuwein T., Almouzni G. 2002. Higher-order structure in pericentric heterochromatin involves a distinct pattern of histone modification and an RNA component. Nat. Genet. 30 : 329—334.
- Manuelidis L. 1976. Repeating restriction fragments of human DNA. Nucl. Acids Res. 3 : 3063—3076.
- Manuelidis L., Borden J. 1988. Reproducible compartmentalization of individual chromosome domains in human CNS cells revealed by *in situ* hybridization and three-dimensional reconstruction. Chromosoma. 96 : 397—410.
- Maraschio P., Zuffardi O., Dalla Fior T., Tiepolo L. 1988. Immunodeficiency, centromeric heterochromatin instability of chromosomes 1, 9, and 16, and facial anomalies: the ICF syndrome. J. Med. Genet. 25 : 173—180.
- Metz A., Soret J., Vourc'h C., Tazi J., Jolly C. 2004. A key role for stress-induced satellite III transcripts in the relocalization of splicing factors into nuclear stress granules. J. Cell Sci. 117 : 4551—4558.
- Narayan A., Ji W., Zhang X. Y., Marrogi A., Graff J. R., Baylin S. B., Ehrlich M. 1997. Hypomethylation of pericentromeric DNA in breast adenocarcinomas. Int. J. Cancer. 77 : 833—838.

- 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 : 1577—1589.
- Prosser J., Frommer M., Paul C., Vincent P. C. 1986. Sequence relationships of three human satellite DNAs. *J. Mol. Biol.* 187 : 145—155.
- Qu G., Grundy P. E., Narayan A., Ehrlich M. 1999. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genet. Cytogenet.* 109 : 34—39.
- Rouleux-Bonnin F., Bigot S., Bigot Y. 2004. Structural and transcriptional features of *Bombus terrestris* satellite DNA and their potential involvement in the differentiation process. *Genome.* 47 : 877—888.
- Rudert F., Bronner S., Garnier J. M., Dolle P. 1995. Transcripts from opposite strands of gamma satellite DNA are differentially expressed during mouse development. *Mamm. Genome.* 6 : 76—83.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor; New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 2100 p.
- Schnedl W., Mikelsaar A. V., Breitenbach M., Dann O. 1977. DIPI and DAPI: fluorescence banding with only negligible fading. *Hum. Genet.* 36 : 167—172.
- Shiels C., Coutelle C., Huxley C. 1997. Continuous arrays of satellites 1, 3, and beta form a 1.5-Mb domain on chromosome 22p. *Genomics.* 44 : 35—44.
- Singhal R. P., Mays-Hoopers L. L., Eichhorn G. L. 1987. DNA methylation in aging of mice. *Mech. Ageing Develop.* 41 : 199—210.
- Suzuki T., Fujii M., Ayusawa D. 2002. Demethylation of classical satellite 2 and 3 DNA with chromosomal instability in senescent human fibroblasts. *Exp. Gerontol.* 37 : 1005—1014.
- Tagarro I., Fernandez-Peralta A. M., Gonzalez-Aguilera J. J. 1994. Chromosomal localization of human satellites 2 and 3 by a FISH method using oligonucleotides as probes. *Hum. Genet.* 93 : 383—388.
- Therkelsen A. J., Nielsen A., Kolvraa S. 1997. Localization of the classical DNA satellites on human chromosomes as determined by primed *in situ* labelling (PRINS). *Hum. Genet.* 100 : 322—326.
- Tsien F., Fiala E. S., Youn B., Long T. I., Laird P. W., Weissbecker K., Ehrlich M. 2002. Prolonged culture of normal chorionic villus cells yields ICF syndrome-like chromatin decondensation and rearrangements. *Cytogenet. Genome Res.* 98 : 13—21.
- Valgardsdottir R., Chiodi I., Giordano M., Cobianchi F., Riva S., Biamonti G. 2005. Structural and functional characterization of noncoding repetitive RNAs transcribed in stressed human cells. *Mol. Biol. Cell.* 16 : 2597—2604.
- Vilain A., Bernardino J., Gerbault-Seureau M., Vogt N., Niveleau A., Lefrancois D., Malfroy B., Dutrillaux B. 2000. DNA methylation and chromosome instability in lymphoblastoid cell lines. *Cytogenet. Cell Genet.* 90 : 93—101.
- Weierich C., Brero A., Stein S., von Hase J., Cremer C., Cremer T., Solovei I. 2003. Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes. *Chromosome Res.* 11 : 485—502.
- Young J. I., Smith J. R. 2001. DNA methyltransferase inhibition in normal human fibroblasts induces a p21-dependent cell cycle with drawal. *J. Biol. Chem.* 276 : 19 610—19 616.

Поступила 6 VII 2006

#### DNA OF SOME REGIONS OF CONSTITUTIVE HETEROCHROMATIN IS DEMETHYLATED AND DECONDENSED IN MRC5 AND A431 CELLS

I. S. R. Vaisertreiger, O. I. Podgornaya, N. I. Erukashvily<sup>1</sup>

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;  
<sup>1</sup>e-mail: natella@mail.cytspb.rssi.ru

It is believed that satellite DNA is compact and transcriptionally inert during interphase. We determined localization, range of compactization and methylation state of the centromeric and pericentromeric satellite DNA using the method of fluorescence hybridization *in situ* (FISH) combined with the antibody immunostaining against the methylated DNA. We investigated the tissue cells (the cells of placenta and lymphocytes), primary (MRC5 fibroblasts) and malignant (A431) cell cultures. Centromeric satellite DNA was condensed and stained with antibodies against 5-methylcytosine in all the cases. Pericentromeric satellite 3 of the chromosome 1 was condensed in lymphocytes, placenta cells and young culture of fibroblasts. The unwrapping of satellite 3 of the chromosome 1 has been observed in the senescent MRC5 fibroblasts and in the malignant cell line A431. The compact areas of pericentromeric satellites were stained with antibodies against the methylated DNA, while the decondensed areas were not stained. Thus, we observed pericentromeric satellite 3 decondensation in senescent fibroblasts culture MRC5 and in cell line A431. The decondensation was accompanied by the partial demethylation of the satellite DNA, which is believed to belong to constitutive heterochromatin.

Key words: satellite DNA, human satellite 3, methylation, senescence.