

АТИПИЧЕСКИЙ СЛУЧАЙ СИНДРОМА ВЕРНЕРА: НАРУШЕНИЯ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ И ОТВЕТА НА ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК

© Н. В. Смирнова, И. М. Спивак, Н. М. Плескач, С. В. Жеребцов, Н. Л. Аксенов, В. М. Михельсон

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: nvsmirnoff@yandex.ru

Исследовали клетки больного с атипичным течением прогерии взрослых. Обосновывается предположение, согласно которому данный больной страдает особой формой синдрома Вернера, в основе которой в отличие от типичной формы этого синдрома лежит мутация в гене *LMNA*, а не *WRN*. Выявлены снижение эпигенетического контроля в клетках больного и отличный от клеток здорового донора характер ответа на повреждение ДНК генотоксическими агентами.

Ключевые слова: прогерия, хроматин, эпигенетика старения.

Были проведены исследования клеток больного с атипичным течением прогерии взрослых. Высказано предположение о диагностировании у данного больного атипичного синдрома Вернера, в основе которого — мутация в гене *LMNA*. Были выявлены снижение эпигенетического контроля и отличный от клеток здорового донора характер ответа на повреждение ДНК генотоксическими агентами.

В течение долгого времени считалось, что клеточные функции ядерной ламина, располагающейся непосредственно под внутренней ядерной мембраной, сводятся к сугубо каркасным, связанным с поддержанием формы ядерной оболочки. Исследования последних лет существенно расширили представления о спектре функции ламина. Было показано, что ламина А/С ламина В и ассоциированные с ними белки играют важную роль в организации хроматина (Sullivan et al., 1999; Liu et al., 2000; Guillemin et al., 2001), задействованы в репликации ДНК (Spann et al., 1997) и зависимой от РНК полимеразы II транскрипции (Spann et al., 2002). Также было установлено, что прогерия детей (синдром Хатчинсона—Гилфорда) и редкие атипичные формы прогерии взрослых — синдрома Вернера — развиваются в результате мутаций в гене *LMNA*, приводящих к дефектам ядерной ламина и нарушениям эпигенетического контроля хроматина (Shaklai et al., 2007).

Эпигенетическими называют наследуемые изменения в регуляции генов без изменений в самой последовательности ДНК. За последние годы показана роль эпигенетических механизмов в процессах канцерогенеза (Jones, Baylín, 2002), а также в старении на клеточном и организменном уровнях (Wilson, Jones, 1983; Issa, 2003; Fraga et al., 2005). В то время как эпигенетика опухолевых клеток изучена достаточно хорошо, картина эпигенетических процессов при старении только начинает складываться. Кроме того, малоизученной областью остается влияние факторов среды на молекулярные механизмы регуляции экспрессии генов (Petronis, 2006).

К основным эпигенетическим модификациям генов относятся метилирование ДНК и посттранскрипционные модификации коровых гистонов (Jenuwein, Allis, 2001).

Показано, что уровень метилирования ДНК в стареющих клетках существенно снижается. Возможными причинами этого могут быть пассивное деметилирование гетерохроматина, а также потеря эффективности ДНК-метилтрансферазы DNMT1 (Casillas et al., 2003). Ответом на снижение общего метилирования становится экспрессия *de novo* ДНК-метиلاзы — DNMT3b, которая в стареющих клетках aberrантно гиперметилюет CpG-островки в промоторе таких генов опухолевых супрессоров, как ген лизил-оксидазы LOX, p16INK4a, транскрипционного фактора RUNX3 и др. (So et al., 2006). Кроме того, гиперметилюются промоторы генов, кодирующих кадгерин E (Bornman et al., 2001), c-fos (Choi et al., 1996) и коллаген $\alpha 1(I)$ (Takatsu et al., 1999). Интерес представляет и характерная для некоторых типов опухолей репрессия путем CpG-гиперметилюрования промоторов генов, ассоциированных с прогериями. Такой тип репрессии описан для уже упоминавшегося гена *LMNA* (Agrelo et al., 2005) и гена *WRN*, мутация в котором ответственна за возникновение классического синдрома Вернера (Agrelo et al., 2006).

Различные модификации коровых гистонов H2A, H2B, H3 и H4 также являются механизмом эпигенетической регуляции структуры и функций хроматина. Гистоны не только обеспечивают укладку нити ДНК в ядре, но и активно участвуют в регуляции транскрипции. Это свойство связано с ковалентными модификациями аминокислотных остатков их N-концевых фрагментов, которые могут быть ацетилованы, метилированы, фосфорилированы, АДФ-рибозилированы и убиквитинилированы. Многие из модификаций гистонов обратимы и обеспечивают динамическую регуляцию активности генов. Однако такие модификации, как метилирование H3- и H4-гистона по остаткам аргинина (R) или лизина (K), достаточно стабильны и могут лежать в основе эпигенетического конт-

роля и поддержания сложных высокоорганизованных структур хроматина на протяжении клеточных поколений.

Разнообразие вариантов ковалентных модификаций и их способность к динамическим преобразованиям позволили говорить о наличии уникального гистонового кода, определяющего потенциальную возможность и уровень экспрессии генов (Lachner et al., 2003).

Метилирование лизинов H3-гистона может происходить в 4, 9, 27, 36 и 79-м положениях (соответственно H3-K4, H3-K9, H3-K27, H3-K36 и H3-K79), а H4-гистона — в положении 20 (H4-K20), причем в разных случаях может осуществляться моно-, ди- и триметилирование (Me1, Me2 и Me3). В настоящее время во всем мире проводится большое количество исследований влияния каждого из этих вариантов метилирования на конденсацию хроматина и транскрипционную активность (Lachner et al., 2003; Vaquero et al., 2003; Cao, Zhang, 2004; Grewal, Rice, 2004). Было показано, что метилирование H3-K9 и H3-K27 характерно для областей транскрипционно неактивного хроматина (Peters et al., 2003), причем модификация Me3-H3-K9 ассоциирована со структурами конститутивного гетерохроматина (Lachner et al., 2003; Peters et al., 2003; Rice et al., 2003), а Me3-H3-K27 является свойством факультативного гетерохроматина (Bernstein et al., 2002; Lachner et al., 2003; Chadwick, Willard, 2004). При изучении гистонового кода старения было установлено, что в клеточных культурах, полученных от престарелых доноров, интенсивность, с которой снижается количество клеток, содержащих данные триметилированные модификации H3-гистона, прямо пропорционально зависит от возраста (Scaffidi, Misteli, 2006). Сходные данные об уменьшении пула клеток, содержащих модификации Me3-H3-K9 и Me3-H3-K27, получены и при анализе клеточных культур больных синдромом Хатчинсона—Гилфорда (Scaffidi, Misteli, 2006; Shumaker et al., 2006).

Еще одним важным компонентом регуляции гетерохроматина является белок HP1, уровень экспрессии и локализацию которого также можно рассматривать в качестве эпигенетического маркера (Li et al., 2002). HP1 достаточно консервативен у позвоночных, важными компонентами его структуры являются хромодомен (CD) и шадоухромодомен (CSD). У человека описаны три изоформы белка — HP1 α , HP1 β и HP1 γ (Eissenberg et al., 2000).

HP1 принимает участие в одном из важнейших механизмов эпигенетической инактивации генов — упаковке замалчиваемых генов в репрессивные гетерохроматиновые домены. Метилированный по Lys-9 гистон H3 является характерным маркером гетерохроматина и обеспечивает сайт связывания для хромодомена HP1 (Wang et al., 2000). Связываясь с метилированным «хвостом» гистона H3 в одной нуклеосоме, белок HP1 в свою очередь метилирует соседние нуклеосомы, что вызывает распространение области метилирования хроматина (Berger, Felsenfeld, 2001). Таким образом достигается эффект высококонденсированного состояния на протяженных участках хроматина. Гены, попадающие в эту область, перестают работать, что называют «эффектом положения».

Показано, что уменьшение уровня HP1 в клетке вызывает дефекты кинетохора, снижение взаимосвязи и конденсации хромосом или, наоборот, aberrантную хромосомную сегрегацию (Ekwall et al., 1995; Ainsztein et al., 1998; Bernard et al., 2001; Vagnarelli, Earnshaw, 2001; Nonaka et al., 2002; Obuse et al., 2004). У млекопитающих гиперэкспрессия HP1 α и HP1 β , но не HP1 γ ведет к слиянию

теломер и их укорочению посредством уменьшения взаимодействия с hTERT, каталитической субъединицей теломеразы (Song et al., 2001; Sharma et al., 2003; Cenci et al., 2005).

Получены данные о том, что HP1 γ динамически коррелирует с транскрипционной активностью, и так как блок транскрипционной элонгации сопровождается потерей хроматином РНК пол II и HP1 γ , можно предположить возможность физического взаимодействия РНК пол II и HP1 γ (Vakoc et al., 2005).

HP1 принимает участие в формировании ассоциированных со старением гетерохроматиновых фокусов (SAHF), специализированных гетерохроматиновых структур, которые формируются при старении и стрессе. SAHF включают в себя участки транскрипционно молчащего гетерохроматина, в которых ограничиваются пролиферативные гены, такие как ген транскрипционного фактора E2F (Zhang et al., 2005). В SAHF-комплексы включается макроH2A-гистон, а в качестве платформы для образования фокусов задействована фосфорилированная форма HP1 γ (Zhang et al., 2007). Предполагается, что именно механизм старения формирования SAHF регламентирует необратимость ареста клеточного цикла при старении.

В ходе недавних исследований была показана взаимосвязь процессов эпигенетической регуляции с репарационными механизмами. Снижение эпигенетического контроля хроматина в клеточных культурах, в которых накапливаются aberrации ламина А/С вследствие мутаций или процессов старения, ассоциируется с различными нарушениями клеточного ответа на повреждения ДНК. Причем дело не в снижении активности фермента репарации ДНК, а в степени доступности для ферментов этих повреждений ДНК в составе хроматина клеток (Анисимов, 2003). Клетки с aberrациями ламина А/С более чувствительны к воздействию генотоксических агентов и имеют пониженную динамику и эффективность репарационных процессов (Liu et al., 2005). Кроме того, как это показано для культур клеток, полученных от больных синдромом Хатчинсона—Гилфорда, происходит накопление повреждений ДНК, о чем свидетельствуют индукция ядерных фокусов ATM и установление репаративных чекпойнтов в интактных клетках больных (Liu et al., 2006).

При изучении раннего ответа на повреждения ДНК и в качестве маркера репаративного статуса клетки одной из наиболее активно изучаемых сейчас модификаций гистонов является фосфорилированная форма гистона H2AX, повсеместно распространенного в геноме. Особый интерес к его изучению был вызван тем, что формирование двойных разрывов ДНК индуцирует его фосфорилирование по серину 139 с образованием модификации γ -H2AX (Rogakou et al., 1998). Анализ индукции и элиминации γ -H2AX является в настоящее время общепринятым тестом для исследования клеточного ответа на действие генотоксических агентов. Индукция фокусов γ -H2AX может возникать и при эндогенном образовании двухнитевых разрывов при мейотической рекомбинации (Mahadevaiah et al., 2001), V(D)J-рекомбинации (Klein et al., 1996), апоптотической фрагментации ДНК (Rogakou et al., 2000), дисфункции теломер (Hao et al., 2004) и других клеточных событиях, связанных с ДНК-транспозицией. К событиям, приводящим к появлению фосфорилированных фокусов H2AX, можно отнести и старение (Sedelnikova et al., 2004).

Фосфорилирование гистона H2AX осуществляется киназами ATM, ATR, DNA-ПК (Stiff et al., 2004) и охваты-

вает 2 Мб хроматина и тысячи нуклеосом (Rogakou et al., 1998) в окрестностях двойного разрыва. При отсутствии АТМ фосфорилирование H2AX-гистона может осуществляться DNA-PC (Falck et al., 2005). Данная схема регуляции характерна, например, для клеток больных атаксией-телеангиэктазией.

Кроме того, что γ -H2AX маркирует двойные разрывы ДНК, он принимает участие в привлечении в район повреждения репарационных факторов Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN-комплекс), BRCA1, 53BP1 и др. (Paull et al., 2000; Fernandez-Capetillo et al., 2002, 2003; Furuta et al., 2003; Ward et al., 2003).

Применение антител, распознающих γ -H2AX, позволило визуализировать эти плотные структуры, получившие название «фокусы γ -H2AX» (Rogakou et al., 1999). Как было показано, количество фокусов γ -H2AX жестко коррелирует с количеством двойных разрывов ДНК (Rogakou et al., 1999). Таким образом, иммуноцитохимические исследования образования фокусов γ -H2AX являются чувствительным и точным методом детекции количества и локализации двойных разрывов ДНК (Fernandez-Capetillo et al., 2004).

Было установлено, что индуктором формирования фокусов γ -H2AX может служить не только γ -облучение, но и довольно широкий спектр других агентов. В первую очередь это классические химические индукторы двойных разрывов ДНК, такие как блеомицин, тирапазамин, этопозид (Banath, Olive, 2003) и доксирубицин (Hammond et al., 2003).

Индукция образования фокусов γ -H2AX была обнаружена и при воздействии алкилирующих агентов N-метил-N'-нитро-N-нитрозогуанидина (MNNG) (Stojic et al., 2004) и адоцелизина (Liu et al., 2003), которые тоже могут вызывать образование двойных разрывов ДНК (Percy et al., 1991).

Некоторые затруднения возникли при анализе механизма формирования фокусов γ -H2AX под воздействием таких агентов, как 4-нитрохинолин-N-оксид (4NQO) и пероксид водорода, было известно, что они индуцируют одонитевые разрывы ДНК (Banath, Olive, 2003). Было высказано предположение о том, что образование двойных разрывов происходит в ходе процесса ликвидации одонитевых разрывов путем эксцизионной репарации оснований (Pascucci et al., 2005). Как и в случае γ -облучения, при воздействии перекиси был показан зависимый от времени и дозы эффект образования фокусов γ -H2AX (Li et al., 2006).

До последнего времени малоизученным оставался вопрос о путях дефосфорилирования γ -H2AX и элиминации его фокусов. В ходе недавних исследований было показано, что в клетках человека этот процесс, вероятнее всего, осуществляется фосфатазами PP4 и PP2A. Причем для действия PP4 нужно, чтобы γ -H2AX покинул сайт репарации, а PP2A может осуществлять его дефосфорилирование непосредственно в области хроматина (Chowdhury et al., 2005; Keogh et al., 2006). Представляется вероятным, что по характеру элиминации фокусов γ -H2AX можно судить о динамике и эффективности процессов репарации ДНК.

Материал и методика

Клеточные культуры. Для проведения исследований был использован штамм диплоидных фибробластов 1609, полученный от больного А. Г. с симптомами прогерии взрослых. Штамм 1609 был получен из эксплантата кожи донора в возрасте 26 лет (Ковина и др., 2002).

В качестве контроля был задействован штамм VH-10 первичных фибробластов здорового донора, предоставленный д-ром А. Кольман (Стокгольмский университет, Швеция) (Kolman et al., 1997).

Клеточные штаммы культивировали в питательной среде DMEM (Gibco, США) с добавлением 12 % фетальной сыворотки телят (Nucclone, США) и антибиотиков (100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина; Sigma, США) в пластиковых флаконах, на чашках Петри (Nunclon, США), а также на предметных стеклах, помещенных в чашку Петри в CO₂-инкубаторе при 37 °С и 5—7 % CO₂ в атмосфере повышенной влажности.

Генотоксические воздействия. Исследуемые штаммы 45 мин инкубировали в ростовой среде с добавлением H₂O₂ в концентрации 100—500 мкМ. Далее проводили отмывку и последующее культивирование в ростовой среде. γ -облучение в дозе 2 Гр проводили на рентгеновской установке РУМ-17.

Имунофлуоресцентный анализ. Клетки выращивали на поверхности предметных стекол, помещенных в чашки Петри. После достижения клетками субконфлюэнтного состояния отмывали ростовую питательную среду раствором PBS (Биолот, Россия). Клетки фиксировали 10 мин в 3.7%-ном растворе формальдегида (Sigma, США) в PBS на льду, продолжали фиксацию PN в 70%-ном этаноле при 4 °С. Отмывали от фиксатора раствором PBS 3X быстро и в течение 30 мин на качалке. Далее для перфорации плазматической мембраны инкубировали в течение 5 мин с 3%-ным раствором Triton X-100 (Helicon, Россия) в PBS. Проводили отмывку, аналогичную предыдущим. Для предотвращения неспецифического окрашивания препараты инкубировали от 30 мин до 18 ч в 1%-ном растворе BSA (Sigma, США) в PBS, который также отмывали. Далее в течение 1 ч проводили инкубацию с первыми антителами и 30-минутную инкубацию со вторыми антителами. Отмывку от антител проводили с использованием 0.1%-ного раствора TWEEN-20 (Sigma, США) в PBS.

Список использованных антител; α -trimethyl-Histone H3 (Lys9) (07-442 Upstate); α -trimethyl-Histone H3 (Lys27) (07-449 Upstate); α -HP1 gamma (ab10480 Abcam); α -gamma-H2A.X (phospho S139) (ab11174 Abcam); Rhodamine Red™-X goat anti-rabbit IgG (H + L) (R6394 Invitrogen); Goat anti-Rabbit IgG — FITC (65-6111 Invitrogen).

Препараты заключали в Mounting Medium (sc-24941, Santa Cruz) для замедления выгорания флуорофоров.

Микроскопия. Препараты анализировали с помощью лазерного сканирующего флуоресцентного микроскопа Zeiss LSM 5 PASCAL. Для визуализации флуорофоров были использованы аргоновый (488 нм) и гелий-неоновый (543 нм) лазеры. Для получения изображений использовали сканирующий модуль микроскопа, который управляется с помощью компьютера и соответствующего программного обеспечения LSM 5 PASCAL.

Изображения также были получены с использованием комплекта оборудования, включающего в себя окулярный адаптер (Аконд, РФ), цифровую фотокамеру Canon Power Shot A640 и персональный компьютер. В качестве программы для управления съемкой использовали inPhoto Capture (Аконд, РФ).

Обработка результатов. Проанализировано не менее 200 клеток каждого штамма с определением процентной доли сигнал-позитивных. Для статистической

обработки результатов и построения диаграмм использовали программу Microsoft Office Excel 2007. Достоверность определяли по критерию χ^2 .

Результаты

При иммуноцитохимическом анализе маркеров конститутивного (Me3-H3-K9) и факультативного (Me3-H3-K27) гетерохроматина было показано, что фибробласты 1609 демонстрируют достоверное снижение доли клеток, позитивных по данным маркерам. На уровне 29-го пассажа модификация Me3-K9 гистона H3 была детектирована в 27.04 % клеток штамма 1609, в то время как для контрольного штамма VH-10 на аналогичном пассаже этот показатель составил 94.11 %. Модификация Me3-K27 гистона H3 была выявлена в 34.93 % клеток штамма 1609 и 89.04 % клеток в контроле (табл. 1).

Различия были продемонстрированы и в характере локализации данных гетерохроматиновых маркеров. В клетках штамма 1609, позитивных по Me3-H3-K9, сигнал был смещен с периферии к центру ядра (рис. 1, б), в то же время

Т а б л и ц а 1

Доля клеток (%), позитивных по маркерам гетерохроматина, в штаммах VH-10 и 1609

Штамм	Me3-H3-K9	Me3-H3-K27	HP1 γ
VH-10	94.11 \pm 2.45	89.04 \pm 11.45	95.55 \pm 0.30
1609	27.04 \pm 1.01	34.93 \pm 0.28	45.99 \pm 1.46

как для клеток здорового донора характерно наличие многочисленных дисперсных фокусов сигнала в периферической части нуклеоплазмы (рис. 1, а). Отличный от контроля характер локализации выявлен и при анализе Me3-H3-K27-позитивных клеток штамма 1609. В клетках контрольного штамма VH-10 сигнал был смещен к центральной части ядра (рис. 2, а), а в клетках штамма 1609 он детектировался главным образом на периферии (рис. 2, б).

Также мы обнаружили, что достоверно снижена по сравнению с контролем доля клеток 1609, в которых выявляется HP1 γ . Если в штамме VH-10 95.55 % проанализи-

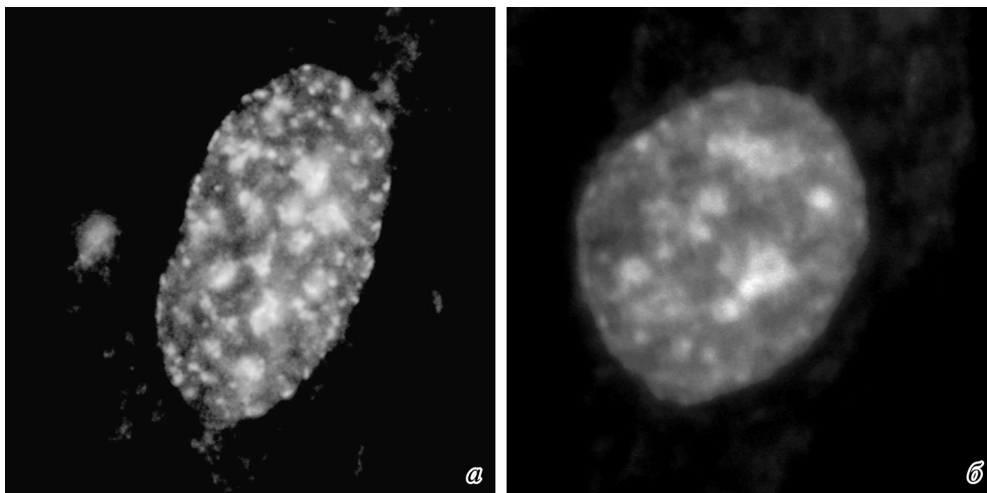


Рис. 1. Локализация Me3-K9 гистона H3 в клетках штаммов VH-10 (а) и 1609 (б).

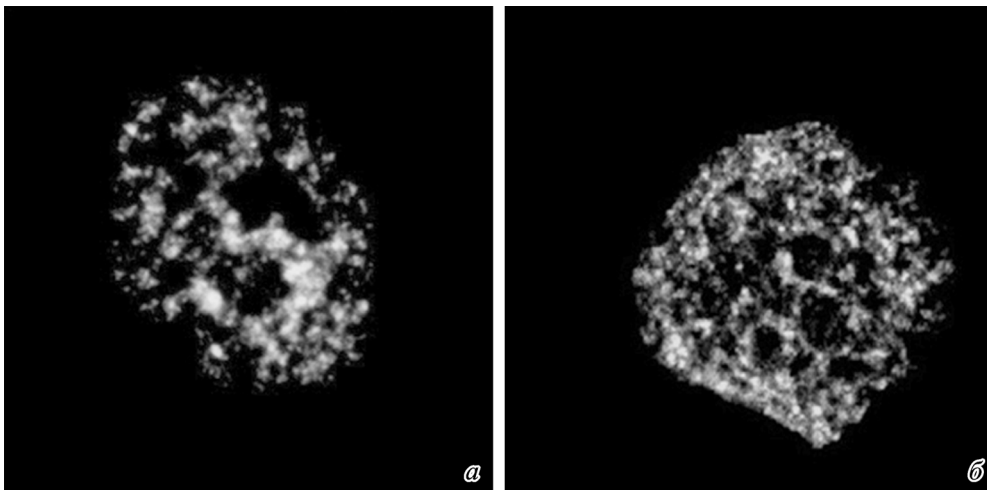


Рис. 2. Локализация Me3-K гистона H3 в клетках штаммов VH-10 (а) и 1609 (б).

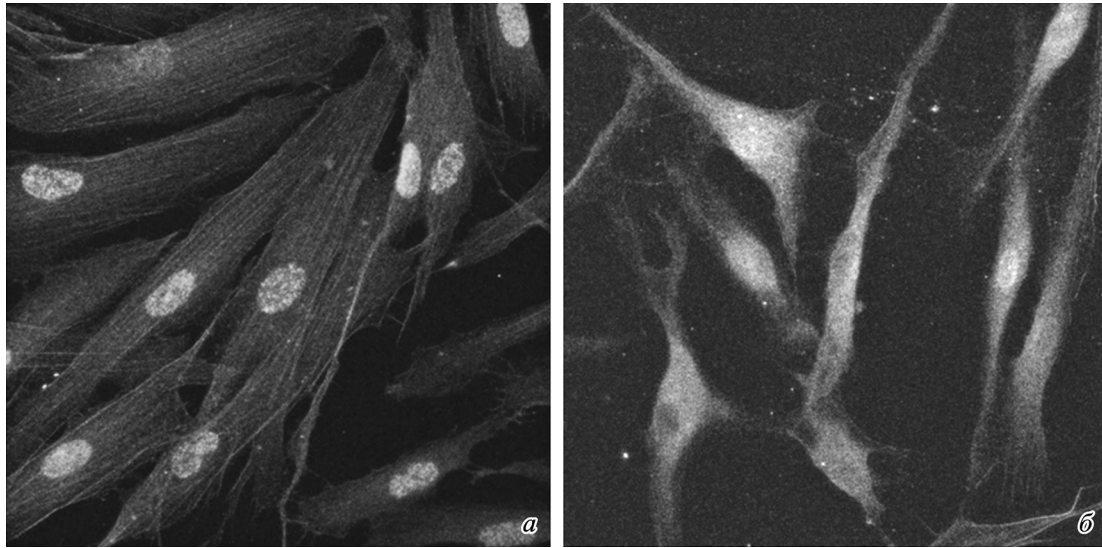


Рис. 4. Визуализация фокусов γ -H2AX гистона в клетках штаммов VH-10 (а) и 1609 (б) после воздействия пероксида водорода [100 μ M].

При воздействии H_2O_2 в концентрации от 100 до 500 мкМ мы обнаружили, что в клетках штамма 1609 низкие дозы агента не вызывали индукции фокусов γ -H2AX гистона (рис. 4, б). Если в клетках штамма VH-10 фокусы γ -H2AX гистона детектировались через 30 мин после воздействия пероксида водорода в концентрации 100 мкМ (рис. 4, а), то для получения аналогичного эффекта штамм 1609 должен был быть обработан H_2O_2 в концентрации не менее 500 мкМ.

Различия наблюдались и в характере элиминации фокусов γ -H2AX гистона через 24 ч после воздействия 500 мкМ H_2O_2 . Полная элиминация наступала только в 11 % клеток штамма 1609 и в 58 % клеток здорового донора. Большая часть клеток штамма 1609 с сохраняющимися фокусами содержала более 20 фокусов на клетку, в то время как в контроле клетки с фокусами γ -H2AX гистона распределялись более равномерно между группами, содержащими от 1 до 10, от 10 до 20 и более 20 фокусов на клетку (табл. 2).

Обсуждение

В предыдущей работе (Смирнова и др., 2008) нами была показана роль ламинопатии в формировании прогероидного фенотипа больного А. Г., культура первичных фибробластов которого (штамм 1609) была задействована в исследовании. В штамме 1609 были выявлены нуклеоскелетные аномалии, которые были ассоциированы с патологическими особенностями пролиферации клеток донора. Было высказано предположение в пользу диагностирования у пациента А. Г. атипичского синдрома Вернера. Молекулярная природа данного синдрома преждевременного старения базируется на мутациях в гене *LMNA*, кодирующем ламин А/С. Это сближает его по цитогенетическим особенностям с прогерией детей (синдром Хатчинсона—Гилфорда), а не с классическим синдромом Вернера, в основе которого лежит дефект гена геликазы-нуклеазы WRN. Аномалии ядерной ламины, связанные со стабилизацией укороченной и перманентно фарнезилированной форм преламина А, прогерина, описаны и при нормальном старении. В этой связи исследо-

вания клинических и цитологических особенностей больного А. Г. могут расширить представления о роли ламина А/С в развитии процессов естественного старения на клеточном и организменном уровнях.

Полученные нами результаты свидетельствуют о нарушениях регуляции гетерохроматина в клетках штамма 1609. Значительное уменьшение клеточного пула, экспрессирующего маркеры конститутивного и факультативного гетерохроматина, изменения в локализации данных маркеров, а также уменьшение доли клеток, позитивных по HP1 γ , продемонстрированные для штамма 1609, сравнимы с данными, полученными при анализе по этим критериям культур клеток больных синдромом Хатчинсона—Гилфорда и престарелых здоровых доноров (Scaffidi, Misteli, 2006; Shumaker et al., 2006). Вероятными последствиями нарушения гетерохроматинизации может быть снижение репрессии транскрипции генов, вызывающих целый спектр прогероидных изменений как на клеточном, так и на организменном уровнях (Shaklai et al., 2007).

Кроме значительных нарушений эпигенетической регуляции хроматина в клетках штамма 1609 выявлены также отличный от контроля уровень спонтанных поврежденных ДНК и характер ответа на действие различных генотоксических агентов.

Для штамма 1609 показана повышенная по сравнению с контролем доля интактных клеток, аккумулирующих большое количество фокусов P53BP1 (больше 10). Одним из возможных объяснений подобной ситуации является образование фокусов P53BP1 в ответ на цитотоксическое действие aberrantных форм ламин А/С. Аналогичный эффект образования репарационных фокусов был показан при исследовании клеток с различными мутациями гена *LMNA* (Manju et al., 2006). Увеличение количества клеток, стабилизирующих фокусы P53BP1, было продемонстрировано при исследовании клеток больных синдромом Хатчинсона—Гилфорда, а также в клетках мышей с нокаутной мутацией гена *Zmpste24*, кодирующего металлопротеазу, принимающую участие в процессинге ламин А/С (Liu et al., 2005).

Большая доля контрольных клеток, аккумулирующих от 1 до 5 фокусов P53BP1, может свидетельствовать о на-

коплении повреждений в процессе клеточного старения, так как клетки были использованы на сравнительно высоком (29-м) пассаже.

В то же время в интактных клетках штамма 1609, как и в клетках здорового донора, практически не выявляются маркеры двухнитевых разрывов ДНК — ядерные фокусы γ -H2AX. Это явное отличие клеток больного А. Г. от клеток пациента с синдромом Хатчинсона—Гилфорда, в которых в отсутствие всякого повреждающего воздействия детектируется значительное количество фокусов γ -H2AX (Scaffidi, Misteli, 2006).

При воздействии γ -облучения в клетках штамма 1609 динамика образования и элиминации фокусов γ -H2AX гистона сравнима с контролем, наблюдается даже некоторое опережение по критерию увеличения доли клеток с элиминированными фокусами. В клетках штамма 1609 зарегистрированы отличия от контрольных в распределении клеток по количеству фокусов гистона через 24 ч после воздействия — преобладает доля клеток с низким количеством фокусов. Возможным объяснением данной ситуации может послужить преимущественное использование клетками штамма 1609 более быстрого и менее точного способа негомологичного воссоединения концов ДНК, который задействуется в условиях задержки перехода из G₁- в S-фазу клеточного цикла (Sonoda et al., 2006). Преимущественное использование негомологического воссоединения концов ДНК было выявлено при исследовании особенностей репарации ДНК клеток больных синдромом Хатчинсона—Гилфорда (Liu et al., 2005). Кроме того, было показано, что в клетках престарелых доноров использование негомологического воссоединения концов сопряжено с высоким темпом накопления хромосомных aberrаций (Seluanov et al., 2004). Повышенный уровень хромосомных aberrаций был продемонстрирован в клетках штамма 1609 в более ранних исследованиях (Ковина и др., 2002).

Характер ответа фибробластов штамма 1609 на воздействие γ -облучения является еще одним косвенным подтверждением диагноза атипичного синдрома Вернера, так как при классическом синдроме Вернера продемонстрированы нарушения механизмов репарации двухнитевых разрывов ДНК. Можно предположить, что скорость элиминации фокусов γ -H2AX после γ -облучения будет существенно ниже, чем в контроле.

Выявленная нами устойчивость клеток 1609 к действию низких концентраций пероксида водорода может соответствовать данным, полученным ранее Банат и Оливе о большей интенсивности образования фокусов γ -H2AX гистона при воздействии пероксида водорода на клетки, находящиеся в S-фазе клеточного цикла (Banath, Olive, 2003), так как исходя из пролиферативных особенностей штамма 1609 (Ковина и др., 2002; Смирнова и др., 2008) есть основания предполагать, что в клетках этого штамма имеет место задержка перехода из G₁- в S-фазу клеточного цикла.

Список литературы

Анисимов В. Н. 2003. Молекулярные и физиологические механизмы старения. СПб.: Наука. 466 с.
Ковина М. В., Хавинсон В. Х., Стрекалов Д. Л., Соловьева Д. В., Воробцова И. У., Терехов С. М., Плескач Н. М., Прокофьева В. В., Спивак И. М., Тимонина Г. А., Михельсон В. М. 2002. Цитологические и молекулярные изменения при нетипичном случае ускоренного старения человека. Цитология. 44 (10) : 930—935.

Смирнова Н. В., Спивак И. М., Плескач Н. М., Михельсон В. М. 2008. Атипичный случай синдрома Вернера: эффект ламинопатии. Цитология. 50 (9) : 780—787.

Agrelo R., Cheng W. H., Setien F., Ropero S., Espada J., Fraga M. F., Herranz M., Paz M. F., Sanchez-Céspedes M., Artiga M. J., Guerrero I., Castells A., von Kobbe C., Bohr V. A., Esteller M. 2006. Epigenetic inactivation of the premature aging Werner syndrome gene in human cancer. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 103 : 8822—8827.

Agrelo R., Setien F., Espada J., Artiga M. J., Rodriguez M., Pérez-Rosado A., Sanchez-Aguilera A., Fraga M. F., Piris M. A., Esteller M. 2005. Inactivation of the lamin A/C gene by CpG island promoter hypermethylation in hematologic malignancies, and its association with poor survival in nodal diffuse large B-cell lymphoma. J. Clin. Oncol. 23 : 3940—3947.

Ainsztein A. M., Kandels-Lewis S. E., Mackay A. M., Earnshaw W. C. 1998. INCENP centromere and spindle targeting: identification of essential conserved motifs and involvement of heterochromatin protein HP1. J. Cell Biol. 143 : 1763—1774.

Banath J. P., Olive P. L. 2003. Expression of phosphorylated histone H2AX as a surrogate of cell killing by drugs that create DNA double-strand breaks. Cancer Res. 63 : 4347—4350.

Berger S. L., Felsenfeld G. 2001. Chromatin goes global. Mol. Cell. 8 : 263—268.

Bernard P., Maure J. F., Partridge J. F., Genier S., Javerzat J. P., Allshire R. C. 2001. Requirement of heterochromatin for cohesion at centromeres. Science. 294 : 2539—2542.

Bernstein B. E., Humphrey E. L., Erlich R. L., Schneider R., Bouman P., Liu J. S., Kouzarides T., Schreiber S. L. 2002. Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 99 : 8695—8700.

Bornman D. M., Mathew S., Alsrufe J., Herman J. G., Gabrielson E. 2001. Methylation of the E-cadherin gene in bladder neoplasia and in normal urothelial epithelium from elderly individuals. Amer. J. Pathol. 159 : 831—835.

Caio R., Zhang Y. 2004. The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. Curr. Opin. Genet. Develop. 14 : 155—164.

Casillas M. A., jr., Lopatina N., Andrews L. G., Tollesbol T. O. 2003. Transcriptional control of the DNA methyltransferases is altered in aging and neoplastically-transformed human fibroblasts. Mol. Cell. Biochem. 252 : 33—43.

Cenci G., Ciapponi L., Gatti M. 2005. The mechanism of telomere protection: a comparison between *Drosophila* and humans. Chromosoma. 114 : 135—145.

Chadwick B. P., Willard H. F. 2004. Multiple spatially distinct types of facultative heterochromatin on the human inactive X chromosome. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 101 : 17450—17455.

Choi E. K., Uyeno S., Nishida N., Okumoto T., Fujimura S., Aoki Y., Nata M., Sagisaka K., Fukuda Y., Nakao K., Yoshimoto T., Kim Y. S., Ono T. 1996. Alterations of *c-fos* gene methylation in the processes of aging and tumorigenesis in human liver. Mutat. Res. 354 : 123—128.

Chowdhury D., Keogh M., Ishii H., Peterson C., Buratowski S., Lieberman J. 2005. γ -H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitated DNA double-strand break repair. Mol. Cell. 20 : 801—809.

Eissenberg J. C., Elgin S. C. 2000. The PH1 protein family: getting a grip on chromatin. Curr. Opin. Genet. Develop. 10 : 204—210.

Ekwall K., Javerzat J. P., Lorentz A., Schmidt H., Cranston G., Allshire R. 1995. The chromodomain protein Swi6: a key component at fission yeast centromeres. Science. 269 : 1429—1431.

Falek J., Coates J., Jackson S. P. 2005. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. Nature. 434 : 605—611.

Fernandez-Capetillo O., Celeste A., Nussenzweig A. 2003. Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. Cell Cycle. 2 : 426—427.

Fernandez-Capetillo O., Chen H. T., Celeste A., Ward I., Romanienko P. J., Morales J. C., Naka K., Xia Z., Camerini-Otero R. D., Motoeama N., Carpenter P. B., Bonner W. M., Chen J.,

- Nussenzwei A. 2002. DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat. Cell Biol.* 4 : 993—997.
- Fernandez-Capetillo O., Lee A., Nussenzweig M., Nussenzweig A. 2004. H2AX: the histone guardian of the genome. *DNA Repair*. 3 : 959—967.
- Fraga M. F., Ballestar E., Paz M. F., Ropero S., Setien F., Ballestar M. L., Heine-Suñer D., Cigudosa J. C., Urioste M., Benitez J., Boix-Chornet M., Sanchez-Aguilera A., Ling C., Carlsson E., Poulsen P., Vaag A., Stephan Z., Spector T. D., Wu Y. Z., Plass C., Esteller M. 2005. Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 102 : 10 413—10 414.
- Furuta T., Takemura H., Liao Z. Y., Aune G. J., Redon C., Sedelnikova O. A., Pilch D. R., Rogakou E. P., Celeste A., Chen H. T., Nussenzweig A., Aladjem M. I., Bonner W. M., Pommier Y. 2003. Phosphorylation of histone H2AX and activation of Mre11, Rad50, and Nbs1 in response to replication-dependent DNA double-strand breaks induced by mammalian DNA topoisomerase I cleavage complexes. *J. Biol. Chem.* 278 : 20 303—20 312.
- Grewal S. I., Rice J. C. 2004. Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* 16 : 230—238.
- Guillemin K., Williams T., Krasnow M. A. 2001. A nuclear lamin is required for cytoplasmic organization and egg polarity in *Drosophila*. *Nat. Cell Biol.* 3 : 848—851.
- Hammond E. M., Green S. L., Giaccia A. J. 2003. Comparison of hypoxia-induced replication arrest with hydroxyurea and aphidicolin-induced arrest. *Mutat. Res.* 532 : 205—213.
- Hao L. Y., Strong M. A., Greider C. W. 2004. Phosphorylation of H2AX at short telomeres in T cells and fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 279 : 45 148—45 154.
- Issa J. P. 2003. Age-related epigenetic changes and the immune system. *Clin. Immunol.* 109 : 103—108.
- Jenuwein T., Allis C. D. 2001. Translating the histone code. *Science.* 293 : 1074—1080.
- Jones P. A., Baylin S. B. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Rev. Genet.* 3 : 415—428.
- Keogh M. C., Kim J.-A., Downey M., Fillingham J., Chowdhury D., Harrison J. C., Onishi M., Datta N., Galicia S., Emili A., Lieberman J., Shen X., Buratowski S., Haber J. E., Durocher D., Greenblatt J. F., Krogan N. J. 2006. A phosphatase complex that dephosphorylates γ -H2AX regulates DNA damage checkpoint recovery. *Nature.* 439 : 497—501.
- Klein S., Zenvirth D., Dror V., Barton A. B., Kaback D. B., Simchen G. 1996. Patterns of meiotic double-strand breakage on native and artificial yeast chromosomes. *Chromosoma.* 105 : 276—284.
- Kolman A., Spivak I., Naslund M., Dusinska M., Cedervall B. 1997. Propylene oxide and epichlorohydrin induce DNA strand breaks in human diploid fibroblasts. *Environ. Mol. Mutagen.* 30 : 40—46.
- Lachner M., O'Sullivan R. J., Jenuwein T. 2003. An epigenetic road map for histone lysine methylation. *J. Cell Sci.* 116 : 2117—2124.
- Li Y., Kirschmann D. A., Wallrath L. L. 2002. Does heterochromatin protein 1 always follow code? *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 99 : 16 462—16 469.
- Li Z., Yang J., Huang H. 2006. Oxidative stress induces H2AX phosphorylation in human spermatozoa. *FEBS Lett.* 580 : 6161—6168.
- Liu B., Wang J., Chan K. M., Tjia W. M., Deng W., Guan X., Huang J. D., Li K. M., Chau P. Y., Chen D. J., Pei D., Pendas A. M., Cadiñanos J., López-Otin C., Tse H. F., Huchison C., Chen J., Cao Y., Cheah K. S., Tryggvason K., Zhou Z. 2005. Genomic instability in laminopathy-based premature aging. *Nat. Med.* 11 : 780—785.
- Liu J., Ben-Shahar T. R., Riemer D., Treinin M., Spann P., Weber K., Fire A., Gruenbaum Y. 2000. Essential roles for *Caenorhabditis elegans* lamin gene in nuclear organization, cell cycle progression, and spatial organization of nuclear pore complexes. *Mol. Biol. Cell.* 11 : 3937—3947.
- Liu J. S., Kuo S. R., Beerman T. A., Melendy T. 2003. Induction of DNA damage responses by adozolesin is S phase-specific and dependent on active replication forks. *Mol. Cancer Ther.* 2 : 41—47.
- Liu Y., Rusinol A., Sinensky M., Wang Y., Zou Y. 2006. DNA damage responses in progeroid syndromes arise from defective maturation of prelamin A. *J. Cell Sci.* 119 : 4644—4649.
- Mahadevaiah S. K., Turner J. M., Baudat F., Rogakou E. P., de Boer P., Blanco-Rodriguez J., Jasin M., Keeney S., Bonner W. M., Burgoyne P. S. 2001. Recombinational DNA double-strand breaks in mice precede synapsis. *Nat. Genet.* 27 : 271—276.
- Manju K., Muralikrishna B., Parnaik V. K. 2006. Expression of disease-causing lamin A mutants impairs the formation of DNA repair foci. *J. Cell Sci.* 119 : 2704—2714.
- Nonaka N., Kitajima T., Yokobayashi S., Xiao G., Yamamoto M., Grewal S. I., Waranabe Y. 2002. Recruitment of cohesin to heterochromatic regions by Swi6/HP1 in fission yeast. *Nat. Cell Biol.* 4 : 89—93.
- Obuse C., Iwasaki O., Kiyomitsu T., Goshima G., Toyoda Y., Yanagida M. 2004. A conserved Mis12 centromere complex is linked to heterochromatic HP1 and outer kinetochore protein Zwint-1. *Nat. Cell Biol.* 6 : 1135—1141.
- Pascucci B., Russo M. T., Crescenzi M., Bignami M., Dogliotti E. 2005. The accumulation of MMS-induced single strand breaks in G₁ phase is recombinogenic in DNA polymerase beta defective mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* 33 : 280—288.
- Paull T. T., Rogakou E. P., Yamazaki V., Kirchgessner C. U., Gellert M., Bonner W. M. 2000. A critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr. Biol.* 10 : 886—895.
- Percy A. J., Chipman J. K. 1991. The measurement of DNA strand breaks in rat colonic mucosa by fluorometric analysis of DNA unwinding. *Toxicol. Lett.* 56 : 69—77.
- 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.
- Petronis A. 2006. Epigenetics and twins: three variations on the theme. *Trends Genet.* 22 : 347—350.
- 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 : 1591—1598.
- Rogakou E. P., Boon C., Redon C., Bonner W. M. 1999. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo*. *J. Cell Biol.* 146 : 905—916.
- Rogakou E. P., Nieves-Neira W., Boon C., Pommier Y., Bonner W. M. 2000. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J. Biol. Chem.* 275 : 9390—9395.
- Rogakou E. P., Pilch D. R., Orr A. H., Ivanova V. S., Bonner W. M. 1998. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273 : 5858—5868.
- Scaffidi P., Misteli T. 2006. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science.* 312 : 1059—1063.
- Sedelnikova O. A., Horikawa I., Zimonjic D. B., Popescu N. C., Bonner W. M., Barrett J. C. 2004. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 6 : 168—170.
- Seluanov A., Mittelman D., Pereira-Smith O. M., Wilson J. H., Gorbunova V. 2004. DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 101 : 7624—7629.
- Shaklai S., Amariglio N., Rechavi G., Simon A. J. 2007. Gene silencing at the nuclear periphery. *FEBS J.* 274 : 1383—1392.
- Sharma G. G., Hwang K. K., Pandita R. K., Gupta A., Dhar S., Parenteau J., Agarwal M., Worman H. J., Wellinger R. J., Pandita T. K. 2003. Human heterochromatin protein 1 isoforms HP1 (Hsalpha) and HP1 (Hsbeta) interfere with hTERT-telomere interactions and correlate with changes in cell growth and response to ionizing radiation. *Mol. Cell. Biol.* 23 : 8363—8376.

- Shumaker D. K., Dechat T., Kohlmaier A., Adam S. A., Bozovsky M. R., Erdos M. R., Eriksson M., Goldman A. E., Khun 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. Nat. Acad. Sci. USA.* 103 : 8703—8708.
- So K., Tamura G., Honda T., Homma N., Waki T., Togawa N., Nishizuka S., Motoyama T. 2006. Multiple tumor suppressor genes are increasingly methylated with age in non-neoplastic gastric epithelia. *Cancer Sci.* 97 : 1155—1158.
- Song K., Jung Y., Jung D., Lee I. 2001. Human Ku70 interacts with heterochromatin protein 1alpha. *J. Biol. Chem.* 276 : 8321—8327.
- Sonoda E., Hohegger H., Saberi A., Taniguchi Y., Takeda S. 2006. Differential usage of non-homologous end-joining and homologous recombination in double strand break repair. *DNA Repair. (Amst.)* 5 : 1021—1029.
- Spann T. P., Goldman A. E., Wang C., Huang S., Goldman R. D. 2002. Alteration of nuclear lamin organization inhibits RNA polymerase II dependent transcription. *J. Cell Biol.* 156 : 603—608.
- Spann T. P., Moir R. D., Goldman A. E., Stick R., Goldman R. D. 1997. Disruption of nuclear lamin organization alters the distribution of replication factors and inhibits DNA synthesis. *J. Cell Biol.* 136 : 1201—1212.
- Stiff T., O'Driscoll M., Rief N., Iwabuchi K., Lohrich M., Jeggo P. A. 2004. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 64 : 2390—2396.
- Stojic L., Mojas N., Cejka P., Di Pietro M., Ferrari S., Marra G., Jiricny J. 2004. Mismatch repair-dependent G2 checkpoint induced by low doses of SN1 type methylating agents requires the ATR kinase. *Genes Develop.* 18 : 1331—1344.
- Sullivan T., Escalante-Alcalde D., Bhat H., Anver M., Bhat N., Nagashima K., Stewart C. L., Burke B. 1999. Loss of A-type lamin expression compromises nuclear envelope integrity leading to muscular dystrophy. *J. Cell Biol.* 147 : 913—920.
- Takatsu M., Uyeno S., Komura J., Watanabe M., Ono T. 1999. Age-dependent alterations in mRNA level and promoter methylation of collagen alpha1(I) gene in human periodontal ligament. *Mech. Ageing Develop.* 110 : 37—48.
- Vagnarelli P. B., Earnshaw W. C. 2001. INCENP loss from an inactive centromere correlates with the loss of sister chromatid cohesion. *Chromosoma.* 110 : 393—401.
- Vakoc C. R., Mandat S. A., Olenchock B. A., Blobel G. A. 2005. Histone H3 lysine 9 methylation and HP1 gamma are associated with transcription elongation through mammalian chromatin. *Mol. Cell.* 19 : 381—391.
- Vaquero A., Loyola A., Reinberg D. 2003. The constantly changing face of chromatin. *Sci. Aging Knowledge Environ.* 14 : 1—16.
- Von Kobbe C., May A., Grandori C., Bohr V. A. 2004. Werner syndrome cells escape hydrogen peroxide-induced cell proliferation arrest. *FASEB J.* 18 : 1970—1972.
- Wang G., Ma A., Chow C. M., Horsley D., Brown N. R., Co-well I. G., Singh P. B. 2000. Conservation of heterochromatin protein 1 function. *Mol. Cell. Biol.* 20 : 6970—6983.
- Ward I. M., Minn K., Jorda K. G., Chen J. 2003. Accumulation of checkpoint protein 53BP1 at DNA breaks involves its binding to phosphorylated histone H2AX. *J. Biol. Chem.* 278 : 19 579—19 582.
- Wilson V. L., Jones P. A. 1983. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science.* 220 : 1055—1057.
- Zhang R., Chen W., Adams P. D. 2007. Molecular dissection of formation of senescent associated heterochromatin foci. *Mol. Cell. Biol.* 27 : 2343—2358.
- Zhang R., Poustovoitov M. V., Ye X., Santos H. A., Chen W., Daganzo S. M., Erzberger J. P., Serebriiskii I. G., Canutescu A. A., Dunbrack R. L., Pehrson J. R., Berger J. M., Kaufman P. D., Adams P. D. 2005. Formation of MacroH2A-containing senescence-associated heterochromatin foci and senescence driven by ASF1a and HIRA. *Develop. Cell.* 8 : 19—30.

Поступила 4 VI 2008

AN ATYPICAL CASE OF WERNER SYNDROME: EPIGENETIC CONTROL AND DNA DAMAGE RESPONSE ALTERATIONS

N. V. Smirnova, I. M. Spivak, N. M. Pleskach, S. V. Zhrebtsov, N. L. Aksenov, V. M. Mikhelson

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; e-mail: nvsmirnoff@yandex.ru

A case of adult progeria has been described. It has been suggested that this case is an atypical form of Werner syndrome with laminopathy — not WRN helicase-nuclease defect. During detailed studies of the patient's cells, epigenetic control and DNA damage response alterations were detected.