

ОСОБЕННОСТИ ПРЕЖДЕВРЕМЕННОГО СТАРЕНИЯ ПРИ АТАКСИИ-ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ

© Е. А. Полуботко,¹ Н. В. Смирнова, Н. М. Плескач, В. М. Михельсон, И. М. Спивак

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹электронный адрес: janeana@mail.ru

Атаксия-телеангиэктазия (АТ) — аутосомно-рецессивное наследственное заболевание, обусловленное дефектами в гене *atm*, характеризуется рядом неврологических нарушений в сочетании с симметричными телеангиэктазиями, иммунодефицитом и повышенной частотой злокачественных новообразований. Клетки больных с АТ проявляют повышенную чувствительность к действию ионизирующей радиации и некоторые признаки преждевременного старения — ограниченную пролиферативную способность и наличие резко укороченных теломер хромосом уже при рождении. Нами было предпринято исследование чувствительности к рентгеновскому излучению (в дозе 2 Гр) и признаков преждевременного старения первичных фибробластов, полученных от больных АТ и их родителей — гетерозиготных носителей мутации гена *atm*. Было показано, что все исследованные маркеры старения — белок HP1-γ, фосфорилированный по серину-139 гистон H2AX (γ-H2AX) и фокусы белка 53BP1 — наблюдаются в клетках как самих больных, так и их кровных родственников — гетерозиготных носителей заболевания, причем в клетках последних эти проявления выражены слабее. Изучение особенностей репарации ДНК фибробластов после рентгеновского облучения (определение количества фосфорилированной формы гистона γ-H2AX и доли клеток, в ядрах которых присутствует повышенное количество белка 53BP1) показало, что восстановление поврежденной ДНК в клетках больных за 24 ч происходит лишь наполовину, в то время как в клетках здорового донора оно уже завершилось. В клетках гетерозиготных носителей мутантного гена *atm* процессы репарации ДНК были также замедлены. Только при определении белка p21^{Waf1/Cip1} — ингибитора циклинзависимых киназ — различия между гетерозиготными носителями дефектного гена *atm* и здоровым донором оказались недостоверными. Было отмечено, что мутация гена *atm* связана с подавлением систем репарации двухнитевых разрывов ДНК, что в свою очередь согласуется с повышенной радиочувствительностью и преждевременным старением на клеточном уровне в семьях больных АТ.

Ключевые слова: атаксия-телеангиэктазия, маркеры клеточного старения, АТМ, 53BP1, γ-H2AX, HP1-γ, p21^{Waf1/Cip1}.

Физиологическое старение клетки — это состояние необратимого прекращения роста. Большинство теорий старения предполагает, что старение организма в целом протекает на клеточном уровне. В основе же клеточного старения лежит реорганизация генома, происходящая в результате укорочения теломер, активации мобильных генетических элементов и дефектов систем репарации ДНК.

Атаксия-телеангиэктазия (АТ), или синдром Луи-Бар, — наследственное заболевание, проявляющееся мозжечковой атаксией, телеангиэктазиями, нарушением иммунитета, повышенной чувствительностью к рентгеновскому облучению, склонностью к злокачественным новообразованиям, а также ускоренным старением (Arlett, Priestley, 1985; Спивак, 1999; Shiloh, 2003; Lavin, 2008). Заболевание возникает при наличии мутаций в обоих аллелях гена *atm*, кодирующего протеинкиназу АТМ (*ataxia-telangiectasia mutant*), распознающую повреждение ДНК и активирующую репарацию. Это ключевой белок клеточного ответа, способный к автофосфорилированию и активированию своей киназной активностью в ответ на возникновение конформационных изменений хроматина после появления двухнитевых разрывов ДНК и быстрому

последующему фосфорилированию различных белков-мишеней (Shiloh, 2003; Lavin, 2008). При АТ нарушается адекватный ответ клетки на повреждения ДНК, что приводит к преждевременному клеточному старению. Со сниженным репаративным потенциалом связаны повышенная радиочувствительность клеток и неспособность к блокированию клеточного цикла после облучения (Lavin, 2008).

Симптомы преждевременного старения и повышенный риск развития опухолевых заболеваний обнаруживаются, однако, не только больные АТ, но и их родители — гетерозиготные носители мутантного гена *atm* (Спивак, 1999; Concannon, 2002), число которых в разных популяциях достигает 1—7%. В настоящее время молекулярно-генетические аспекты АТ достаточно глубоко исследованы, однако особенности клеточного функционирования при гетерозиготном носительстве гена данного заболевания остаются малоизученными.

Задача исследования состояла в определении степени радиочувствительности и выраженности признаков преждевременного старения на клеточном уровне как самих больных АТ, так и их кровных родственников — гетеро-

зиготных носителей мутантного гена *atm*. Сравнение различных семей, а следовательно, различных мутаций в гене *atm* позволяет выделить общие признаки повышенной радиочувствительности на клеточном уровне.

Признаки ускоренного клеточного старения выявляли *in vitro* в фибробластах больных АТ и их родителей до и после рентгеновского облучения клеток (индуцируемое стрессом старение) по признанным маркерам старения: наличию фосфорилированной формы гистона γ -H2AX и уменьшению количества белка HP1- γ . Отклонения от временной нормы репарационных процессов ДНК оценивали по появлению в ядрах фибробластов белка p21^{Waf1/Cip1} и образованию фокусов белка 53BP1 и их элиминации.

Материал и методика

Клеточные культуры. В работе были использованы штаммы диплоидных фибробластов, полученные от больных АТ, гетерозиготных носителей мутации в гене *atm* и здоровых доноров. Клетки выращивали в пластиковых флаконах, на чашках Петри (Nunclon, США) и на предметных стеклах, помещенных в чашку Петри, в среде F-10 или DMEM (Биолот, Россия, или Sigma, США) с добавлением 13 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Sigma, США) и антибиотиков (100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина) при 37 °С в атмосфере с содержанием 5 % CO₂.

Получение первичной культуры фибробластов кожи. Донорами фибробластов стали два пациента АТ и их родители, а также больная с атаксией, развившейся в результате опухоли мозжечка. Для выделения фибробластов полученные с соблюдением всех правил стерильности фрагменты кожи с области предплечья помещали в чашку Петри в питательную среду DMEM с добавлением антибиотиков и механически измельчали до получения как можно более дисперсных фрагментов. Затем кожные фрагменты помещали под покровное стекло в чашки Петри диаметром 3 см (Nunclon, США) и добавляли полную ростовую питательную среду DMEM (Gibco, США) с 16 % сыворотки эмбрионов коров (Nucclone, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 25 мкг/мл фунгицида и 0.3 мг/мл L-глутамина. Эксплантат кожи инкубировали, меняя питательную среду 1 раз в 4—7 сут до появления достаточного количества фибробластов. При получении монослоя клетки снимали с подложки стандартным способом с помощью раствора трипсин—ЭДТА и культивировали в чашках Петри в стандартных условиях.

Штаммы диплоидных фибробластов, полученные от членов первой семьи (АТ6) — девушки 16 лет с АТ и ее фенотипически здоровых матери (М) и отца (F) — были обозначены соответственно: АТ6SP, АТ(М)6SP и АТ(F)6SP. Штаммы диплоидных фибробластов, полученные от членов второй семьи (АТ8) — девочки 11 лет с АТ, ее фенотипически здоровых матери (М) и отца (F), — были обозначены соответственно АТ8SP, АТ(М)8SP и АТ(F)8SP. Диплоидные фибробласты, полученные от больной с атаксией, возникшей в результате опухоли мозжечка, были обозначены АТ7SP. В качестве контроля были использованы диплоидные фибробласты крайней плоти мальчика 11 лет — VH10 (Nygren et al., 1994; Kolman et al., 1997), любезно предоставленные проф. Адой Кольман (А. Kolman, Стокгольмский университет, Швеция).

Для выяснения степени радиочувствительности фибробласты облучали на рентгеновской установке РУМ—17 в дозе 2 Гр.

Непрямая иммунофлуоресценция. Клетки выращивали на предметных стеклах, помещенных в чашки Петри. После достижения клетками субконфлюэнтного состояния их подвергали рентгеновскому облучению и инкубировали в течение различных промежутков времени, в качестве контроля использовали интактные образцы. Отмытые от культуральной среды раствором PBS (Биолот, Россия) клетки фиксировали 10 мин в 3.7%-ном растворе формальдегида в PBS на льду, затем продолжали фиксацию в течение 24 ч в 70%-ном этаноле и промывали раствором PBS в течение 30 мин. Для перфорации цитоплазматической мембраны препараты инкубировали 5 мин в 3%-ном растворе Тритона X-100 (Helicon, Россия) на PBS. Для блокирования мест неспецифического связывания препараты инкубировали от 30 мин до 1 сут в 1%-ном растворе BSA (Sigma, США) на PBS, затем промывали.

В качестве первых антител использовали IgG кролика против белка HP1- γ (Abcam, Англия), фосфорилированного по серину в 139-м положении гистона H2AX (Cell Signaling, США), белка 53BP1 (Abcam, Англия) и белка p21 (Abcam, Англия) в разведении 1 : 150. В качестве вторых антител использовали козы антикроличьи IgG, конъюгированные с ФИТЦ, в разведении 1 : 150 (Sigma-Aldrich Co., США). Антитела разводили в PBS с 0.1%-ным BSA (Sigma, США). После инкубации с антителами стекла промывали по 30 мин в 0.1%-ном растворе Tween-20 (Хеликон, Россия) в PBS. В качестве контроля специфичности иммунной реакции использовали препараты клеток, инкубированные только со вторыми антителами. После окрашивания препараты помещали в раствор пропилгаллата в 90%-ном глицерине для предотвращения «выгорания» флуоресцентной метки. Для анализа воспроизводимости полученных результатов все тесты проводили в 2—3 повторах.

Микроскопию и анализ изображений проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 5 PASCAL. Для визуализации флуорофоров были использованы аргоновый (488 нм) и гелиево-неоновый (543 нм) лазеры. Для получения изображений использовали сканирующий модуль микроскопа, управляемый с помощью компьютера и соответствующего программного обеспечения LSM 5 PASCAL. Для анализа полученных изображений (определение уровня интенсивности флуоресценции) использовали программы LSM 5 PASCAL и WCIF ImageJ 1.37m (National Institute of Health, Maryland, США).

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

Результаты

Определение гетерохроматинового маркера HP1- γ . Окраска непрямой иммунофлуоресцентным методом с использованием антител к маркеру старе-

Таблица 1
Интенсивность флуоресценции белка HP1- γ
в диплоидных фибробластах человека

Название штамма клеток	Интенсивность флуоресценции, $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$
VH10	170.71 \pm 1.91
AT8SP	103.72 \pm 5.27 ^a
AT(F)8SP	142.44 \pm 3.22 ^a
AT(M)8SP	149.54 \pm 1.78 ^a
AT6SP	93.01 \pm 3.55 ^a
AT(F)6SP	134.45 \pm 4.95 ^a
AT(M)6SP	142.52 \pm 2.64 ^a
AT7SP	124.13 \pm 2.09 ^a

Примечание. Суммированы данные по флуоресценции 100 клеток каждого штамма. ^aСтатистически достоверные отличия от контроля при $P < 0.001$.

ния белку HP1- γ выявила существенные различия между интактными клетками всех исследованных штаммов. В табл. 1 приведены значения интенсивности флуоресценции ядер фибробластов кожи членов двух изученных семей. Интенсивность флуоресценции почти в 2 раза снижена в ядрах клеток больных АТ (АТ6SP и АТ8SP) по сравнению с ядрами клеток здорового донора, а в клетках их кровных родственников — гетерозиготных носителей заболевания — это снижение менее выражено. Следует отметить тот факт, что фибробласты больной с атаксией,

возникшей в результате опухоли мозжечка (клетки АТ7SP), обнаруживают более низкую интенсивность флуоресценции по сравнению с клетками гетерозиготных носителей *atm*. Вероятно, данная больная имеет повышенную наследственную радиочувствительность на клеточном уровне, обусловленную носительством мутации какого-либо другого гена, не *atm*.

Количество фосфорилированной формы гистона H2AX определяли иммунофлуоресцентным методом как в интактных клетках, так и после рентгеновского облучения в клетках всех исследованных штаммов. Интенсивность флуоресценции была измерена так же, как и в случае с белком HP1- γ . Показано, что количество фосфорилированной формы гистона γ -H2AX в ядрах интактных клеток больных АТ превышает таковое в ядрах клеток здорового донора, а для гетерозиготных носителей мутантного *atm* характерно промежуточное состояние. Обнаружены различия в клетках в отношении активности репарационных процессов. Через 24 ч после облучения в клетках больных АТ происходит восстановление лишь половины повреждений ДНК (рис. 1, а, кривая 4; б, кривая 4), в то время как в клетках здорового донора этот процесс практически завершается (рис. 1, а, кривая 1; б, кривая 1). В клетках гетерозиготных носителей мутантного гена *atm* репарация проходит быстрее, чем у больных, но динамика этого процесса существенно отличается от таковой в клетках здорового донора (рис. 1, а, кривые 2, 3; рис. 2, б, кривые 2, 3). Количественные изменения фосфорилированной формы гистона γ -H2AX в ядрах клеток больных с атаксией после облучения представлены на рис. 3, а.

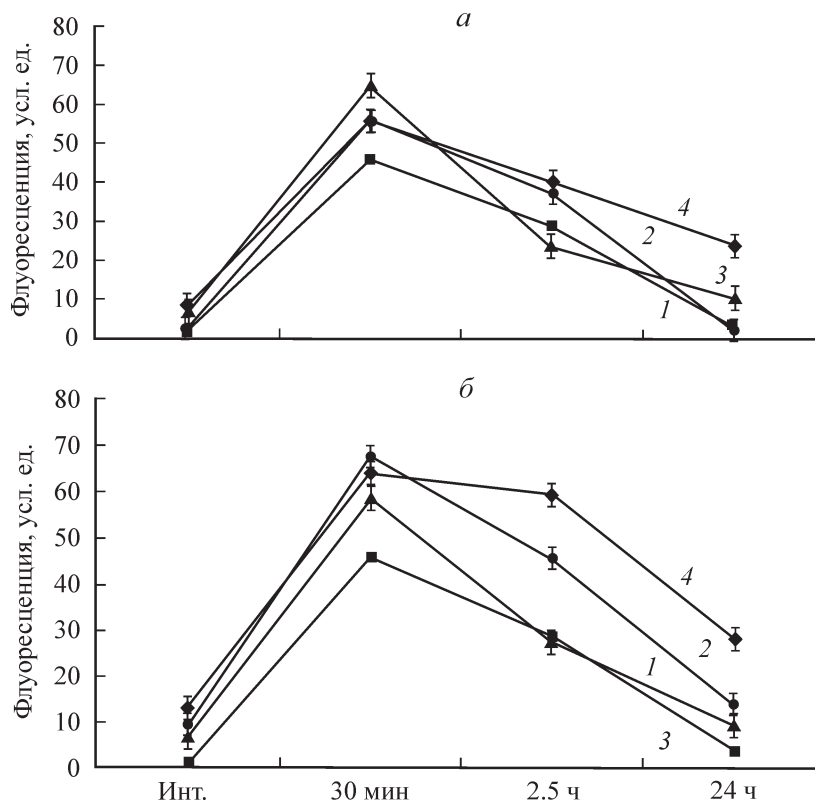


Рис. 1. Интенсивность (Инт.) флуоресценции фосфорилированной формы гистона γ -H2AX в ядрах фибробластов до и после рентгеновского облучения.

а — нормальные фибробласты и фибробласты, полученные от членов семьи АТ6: 1 — VH10, 2 — АТ6(F)SP, 3 — АТ6(M)SP, 4 — АТ6SP; б — нормальные фибробласты и фибробласты, полученные от членов семьи АТ8: 1 — VH10, 2 — АТ8(F)SP, 3 — АТ8(M)SP, 4 — АТ8SP.

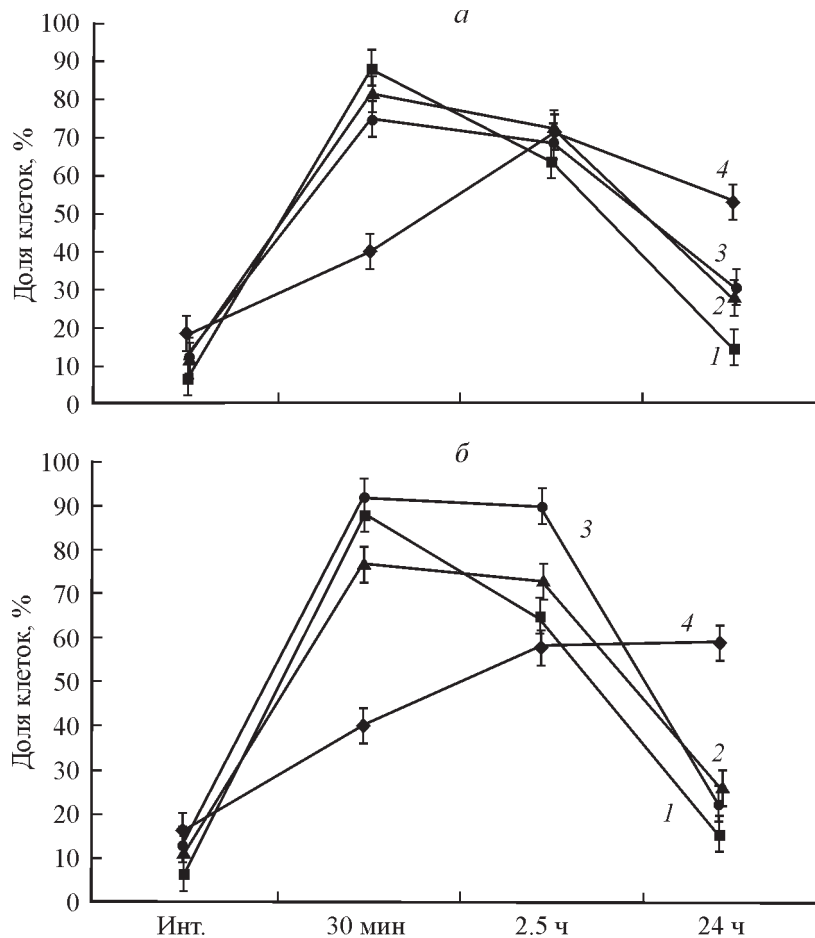


Рис. 2. Формирование фокусов 53BP1 в ядрах фибробластов до и после рентгеновского облучения.

а — нормальные фибробласты и фибробласты, полученные от членов семьи AT6: 1 — VH10, 2 — AT6(F)SP, 3 — AT6(M)SP, 4 — AT6SP; *б* — нормальные фибробласты и фибробласты, полученные от членов семьи AT8: 1 — VH10, 2 — AT8(F)SP, 3 — AT8(M)SP, 4 — AT8SP. Инт. — интенсивность облучения.

Определение количества белка 53BP1. Еще одним традиционным маркером репарационных процессов является белок 53BP1 (Iwabuchi et al., 2008; Lee et al., 2008). Обычно при окрашивании антителами к белку 53BP1 в интактных клетках наблюдается его диффузное расположение, а при повреждении ДНК белок концентрируется в зоне репарации, образуя фокусы. Фокусы белка 53BP1 в ответ на повреждение ДНК обычно совпадают с фокусами фосфорилированного гистона γ -H2AX, так как они часто колокализуются в зоне двухнитевого разрыва ДНК. В интактных клетках, полученных от больных АТ (штаммы AT6SP и AT8SP), подобное концентрирование белка 53BP1 наблюдается в 16 и 18 % клеток соответственно, в то время как в контрольной линии VH10 таких клеток всего 6 %. На рис. 2, *а*, *б* приведены графики, описывающие динамику формирования и элиминации фокусов белка 53BP1 в штаммах фибробластов, полученных от членов обеих семей больных, а на рис. 3, *б* — от больных атаксией.

Известно, что белок 53BP1, накапливаясь в местах повреждения ДНК, связывается с фосфорилированным белком p53. Так как фосфорилирование белка p53 в ответ на повреждение ДНК в клетке осуществляет протеинкиназа АТМ, повышение количества белка 53BP1 в клетках, полученных от больных АТ, задерживается по сравнению с клетками здорового донора (рис. 2, *а*, кривая 4; *б*, кривая 4).

Через 2.5 ч после облучения (в то время как в клетках здорового донора уже начинается процесс элиминации фокусов белка 53BP1) их количество несколько возрастает, но не достигает уровня репарационного ответа, как в клетках здорового донора, и сохраняется на стабильно высоком уровне через 24 ч после облучения. В это время в клетках здорового донора подавляющее число фокусов уже элиминируется (рис. 2, *а*, кривая 1; *б*, кривая 1). В клетках гетерозиготных носителей мутантного гена данного заболевания уровень репарационного ответа почти совпадает с контрольным уровнем здорового донора, но количество фокусов, сохраняющихся через 24 ч, существенно выше, чем в контроле (рис. 2, *а*, кривые 2, 3; *б*, кривые 2, 3). Неспособность полностью элиминировать накопления белка 53BP1 свидетельствует о персистировании в этих клетках повреждений ДНК и сопряженных с ними изменениях конформации хроматина. Изменения количества белка в штамме клеток AT7SP, полученных от больной с атаксией, возникшей в результате опухоли мозжечка, носят промежуточный характер, сходный с таковым в штаммах, полученных от гетерозиготных носителей мутантного *atm* (рис. 3, *б*, кривая 2).

Определение p21^{Waf1/Cip1}-ингибитора циклинзависимых киназ иммунофлуоресцентным методом в штаммах фибробластов, полученных от членов семьи AT8 после рентгеновского облучения, показало,

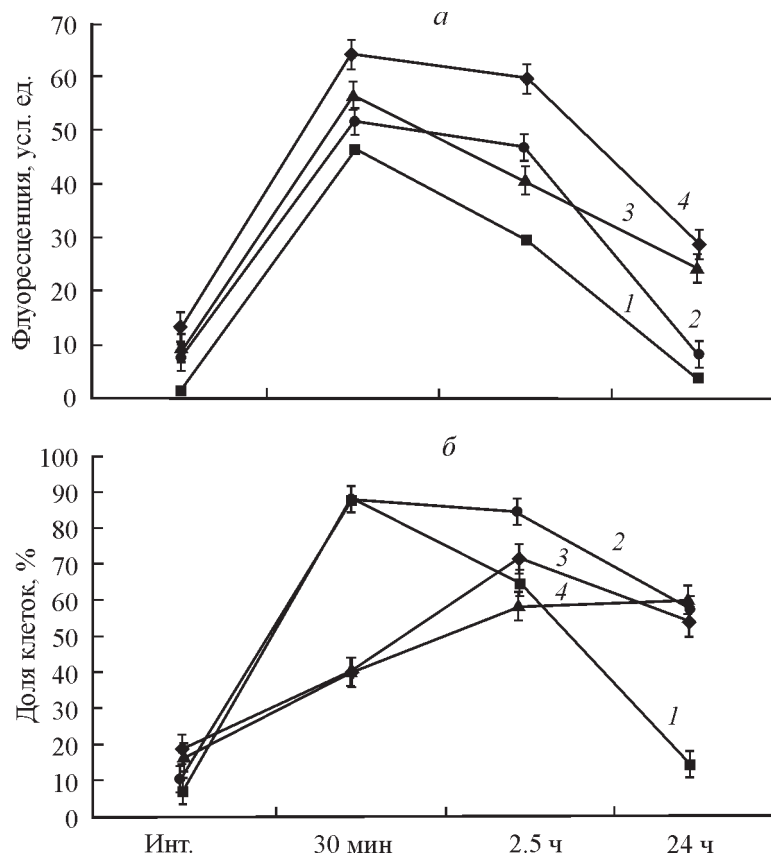


Рис. 3. Интенсивность (Инт.) флуоресценции фосфорилированной формы гистона γ -H2AX (а) и формирование фокусов 53BP1 (б) в ядрах фибробластов больных с атаксией до и после рентгеновского облучения.

1 — штамм VH10, 2 — штамм AT7SP, 3 — штамм AT6SP, 4 — штамм AT8SP.

что данный белок появляется в клетках больных АТ в ответ на повреждение ДНК с существенной задержкой. В клетках гетерозиготных носителей мутантного гена *atm* образование белка p21^{Waf1/Cip1} также запаздывает, в отличие от контроля (табл. 2).

Обсуждение

Уменьшение количества гамма-изоформы белка гетерохроматина HP1 является одним из надежных маркеров старения, пригодных для выявления возрастных изменений как в фибробластах, полученных от пожилых доноров, так и в клетках больных прогерией (Scaffidi, Misteli,

2006; Смирнова и др., 2008а, 2008б). По этому маркеру АТ является, безусловно, болезнью преждевременного старения, а гетерозиготное носительство гена данного заболевания ведет к появлению признаков преждевременного старения на клеточном уровне.

Фосфорилированная форма гистона H2AX (γ -H2AX) традиционно используется в качестве маркера двухнитевых разрывов ДНК. В последнее время накоплены многочисленные экспериментальные данные, указывающие на то, что для репарации двухнитевых разрывов ДНК (DSBs) необходимо ремоделирование хроматина, которое происходит при специфическом фосфорилировании вариантного гистона H2AX по серину в 139-м положении (Karlsson, Stenerlow, 2004; Goodarzi et al., 2008; Kuo, Yang, 2008).

Таблица 2

Интенсивность флуоресценции белка p21^{Waf1/Cip1} в диплоидных фибробластах человека

Название штамма клеток	Необлученные клетки, $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	30 мин после облучения, $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	2.5 ч после облучения, $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$	24 ч после облучения, $\bar{X} \pm S_{\bar{x}}$
VH10	2.09 ± 1.09	55.08 ± 1.37	27.26 ± 2.09	3.00 ± 1.98
AT8SP	2.62 ± 2.40	68.32 ± 2.87 ^a	33.84 ± 1.90 ^b	17.92 ± 1.99 ^a
AT(M)8SP	7.46 ± 2.56 ^b	52.62 ± 2.45	15.08 ± 2.89 ^a	4.46 ± 2.34
AT(F)8SP	3.90 ± 2.89	84.64 ± 2.13 ^a	29.78 ± 0.76	2.00 ± 2.98

Примечание. Суммированы данные по флуоресценции 100 клеток каждого штамма в каждой временной точке. ^aСтатистически достоверные отличия от контроля при $P < 0.001$. ^bСтатистически достоверные отличия от контроля при $P < 0.05$.

Гистон H2AX (replacement histone) является одним из известных вариантов корового гистона H2A, который в отличие от основного H2A и других коровых гистонов может быть встроен в хроматин в течение всех фаз клеточного цикла, а не только во время S-фазы. Мегабазные участки хроматина, покрывающие DSBs, можно легко визуализировать в ядрах облученных клеток в виде большого количества фосфорилированного H2AX (названного γ -H2AX) с помощью специфических антител к фосфорилированному короткому пептиду, соответствующему C-концу H2AX. Накопление этой формы гистона в области DSBs может служить их маркером и способствовать изучению индукции и процессинга повреждений ДНК (Karlsson, Stenerlow, 2004; Tanaka et al., 2006). В то же время наблюдается накопление фосфорилированной формы гистона γ -H2AX в ядрах стареющих клеток в культуре, клетках пожилых доноров или больных прогерией (Sedelnikova et al., 2004; Scaffidi, Misteli, 2006). Это явление может быть связано как с накоплением нерепарированных DSBs или модификаций хроматина, воспринимаемых как DSBs стресс-киназами ATM и ДНК-зависимой протеинкиназой при повреждении ДНК (Stiff et al., 2004), или протеинкиназой ATR при остановке репликации (Takahashi, Ohnishi, 2005), так и с появлением незащищенных коротких теломер (Hao et al., 2004). Таким образом, накопление фосфорилированной формы гистона γ -H2AX в культуре клеток, в ядрах которых они появляются без действия повреждающих агентов, может быть одним из объективных критериев старения на клеточном уровне (Ayoub et al., 2008).

Сопоставляя все полученные нами данные с данными литературы, можно сделать вывод о том, что в соответствии с динамикой выявления фосфорилированной формы гистона γ -H2AX как в интактных клетках, так и после повреждения ДНК все штаммы больных АТ демонстрируют признаки ускоренного старения и снижения активности репарационных процессов. В клетках гетерозиготных носителей гена АТ выявляется промежуточный между нормальной и патологией фенотип.

Белок 53BP1 является традиционным маркером репарационных процессов (Wilson, Stern, 2008). Его динамика в ответ на повреждение ДНК обычно совпадает с динамикой γ -H2AX, так как они часто колокализуются в зоне конформационных изменений хроматина (двухнитевых разрывов ДНК). Белок 53BP1 фосфорилируется в домене S1219 после ионизирующего облучения (Lee et al., 2008). Этот белок играет также важную роль в остановке клеточного цикла в контрольной точке в ответ на повреждающие воздействия (Eliezer et al., 2008; Iwabuchi et al., 2008). При сравнении рис. 2, а и б видно, что в разных семьях мы, вероятно, имеем дело с различными мутациями в гене *atm*. В фибробластах АТ6SP, полученных от больной АТ через 24 ч после облучения, сохраняется достоверно большее количество фокусов белка 53BP1, хотя через 2.5 ч его количество почти не отличалось от такового в контроле (рис. 2, а, кривая 4). В штамме АТ8SP основные различия, напротив, отмечаются через 2.5 ч после облучения, а к 24 ч различия практически нивелируются (рис. 2, б, кривая 4). Эти данные говорят о нарушении процессов репарации двухнитевых разрывов ДНК, но в случае штамма АТ6SP, скорее всего, эти нарушения затрагивают репарацию с участием гомологической рекомбинации, в случае штамма АТ8SP — негомологичное воссоединение концов ДНК.

Исследование белка p21^{Waf1/Cip1} в клеточных линиях АТ и гетерозиготных носителей мутации в гене *atm* явля-

ется еще одним важным этапом в понимании механизма радиочувствительности клеток и решении вопроса о том, является ли данный белок маркером преждевременного старения. Идентифицировано более 100 генов, являющихся мишенями транскрипционной активности p53. Среди них гены, продукты которых регулируют клеточный цикл. Важнейшим из них является белок p21^{Waf1/Cip1} — ингибитор циклинзависимых киназ из семейства Cip/Kip (Shi et al., 2008). Повышение его экспрессии вызывает остановку клеточного цикла в поздней G₁-фазе, что обуславливается связыванием им комплексов циклин E/Cdk2, подавлением их способности фосфорилировать белки семейства pRb и высвобождают транскрипционные факторы E2F (Копнин, 2000; Radhakrishnan et al., 2006; Hill et al., 2008). Показано, что в клетках пожилых доноров легче индуцируется апоптоз (Плетюшкина и др., 2006; Zhou et al., 2008).

Таким образом, пониженная устойчивость этого белка к действию рентгеновских лучей, выражающаяся в нашем исследовании в существенной задержке его появления в ядрах облученных клеток, может служить не только маркером повышенной радиочувствительности, но и маркером преждевременного старения.

В клетках больных АТ многие процессы, наблюдаемые в клетках здорового донора после рентгеновского облучения, либо происходят с существенной временной задержкой, например стабилизация белка p53, либо вовсе полностью подавлены, например остановка клеточного цикла (Спивак и др., 2005). Хотя при АТ и фосфорилированная форма p53¹⁰ и белок p21^{Waf1/Cip1} появляются в клетках в ответ на повреждение ДНК, это не приводит к блокированию клеточного цикла (Спивак и др., 2005). Тот факт, что у гетерозиготных носителей гена данного заболевания также выявляются достоверные отличия от клеток здорового донора, блокирование клеточного цикла представляется крайне важным диагностическим признаком, не только позволяющим выявлять гетерозиготное носительство мутантного гена *atm*, но и дающим возможность анализировать процессы повышенной радиочувствительности и преждевременного старения на клеточном уровне.

Список литературы

- Копнин Б. П. 2000. Мишени действия онкогенов и опухолевых супрессоров — ключ к пониманию базовых механизмов канцерогенеза. Биохимия. 65 (1) : 5—33.
- Плетюшкина О. Ю., Фетисова Е. К., Лямзаев К. Г., Иванова О. Ю., Домнина Л. В., Высоких М. Ю., Пустовидко А. В., Алексеевский А. В., Алексеевский Д. А., Васильев Ю. М., Мерфи М. П., Черняк Б. В., Скулачев В. П. 2006. Пероксид водорода, образуемый внутри митохондрий, участвует в передаче апоптозного сигнала от клетки к клетке. Биохимия. 71 (1) : 75—84.
- Смирнова Н. В., Спивак И. М., Плескач Н. М., Жеребцов С. В., Аксенов Н. Л., Михельсон В. М. 2008а. Атипичский синдром Вернера: нарушения эпигенетической регуляции и ответа на повреждения РНК. Цитология. 50 (10) : 868—877.
- Смирнова Н. В., Спивак И. М., Плескач Н. М., Михельсон В. М. 2008б. Атипичский случай синдрома Вернера: эффект ламинопатии. Цитология. 50 (9) : 780—788.
- Спивак И. М. 1999. Наследственные болезни с первичными и вторичными дефектами репарации ДНК. Цитология. 41 (5) : 338—380.
- Спивак И. М., Смирнова Н. В., Плескач Н. М., Ледацева Т. А., Михельсон В. М. 2005. Особенности стабилизации белка p53 в клетках больных атаксией-телеангиэктазией. Цитология. 47 (10) : 898—906.

- Arlett C. F., Priestley A. 1985. An assessment of the radiosensitivity of ataxia-telangiectasia heterozygotes. *Kroc. Found. Ser.* 19 : 101—109.
- Ayoub N., Jeyasekharan A. D., Bernal J. A., Venkitaraman A. R. 2008. HP1-beta mobilization promotes chromatin changes that initiate the DNA damage response. *Nature.* 453 : 682—686.
- Concannon P. 2002. ATM heterozygosity and cancer risk. *Nat. Genet.* 32 : 89—90.
- Eliezer Y., Argaman L., Rhie A., Doherty A. J., Goldberg M. 2009. The direct interaction between 53BP1 and MDC1 is required for the recruitment of 53BP1 to sites of damage. *J. Biol. Chem.* 284 : 426—435.
- Goodarzi A. A., Noon A. T., Deckbar D., Ziv Y., Shiloh Y., Löbrich M., Jeggo P. A. 2008. ATM signaling facilitates repair of DNA double-strand breaks associated with heterochromatin. *Mol. Cell.* 31 : 167—177.
- 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.
- Hill R., Bodzak E., Blough M. D., Lee P. W. 2008. P53 binding to the p21 promoter is dependent on the nature of DNA damage. *Cell Cycle.* 7 : 2535—2543.
- Iwabuchi K., Matsui T., Hashimoto M., Matsumoto Y., Kurihara T., Date T. 2008. Characterization of a cancer cell line that expresses a splicing variant form of 53BP1: separation of checkpoint and repair functions in 53BP1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 376 : 509—513.
- Karlsson K. H., Stenerlow B. 2004. Focus formation of DNA repair proteins in normal and repair-deficient cells irradiated with high-LET ions. *Radiat. Res.* 161 : 517—527.
- Kolman A., Spivak I., Naslund M., Dusinska M., Cedervall B. 1997. Propylene oxide and epichlorohydrin induce DNA strand breaks in human diploid fibroblasts. *Envir. Mol. Mutagen.* 30 : 40—46.
- Kuo L. J., Yang L. X. 2008. Gamma-H2AX — a novel biomarker for DNA double-strand breaks. *In Vivo.* 22 : 305—309.
- Lavin M. F. 2008. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9 : 759—769.
- Lee H., Kwak H., Cho I. T., Park S. H., Lee C. H. 2008. S1219 residue of 53BP1 is phosphorylated by ATM kinase upon DNA damage and required for proper execution of DNA damage response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 378 : 32—36.
- Nygren J., Cedervall B., Ericksson M., Dusinska M., Kolman A. 1994. Induction of DNA strand breaks by ethylene oxide in human diploid fibroblasts. *Envir. Mol. Mutagen.* 24 : 161—167.
- Radhakrishnan S. K., Gierut J., Gartel A. L. 2006. Multiple alternate p21 transcripts are regulated by p53 in human cells. *Oncogene.* 25 : 1812—1815.
- 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., Boner W. M., Barrett J. C. 2004. Senescing human cells and aging mice accumulate DNA lesions with unreparable double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 6 : 168—170.
- Shi Q., Wang X., Ren J. 2008. Biophysical characterization of the interaction of p21 with calmodulin: a mechanistic study. *Biophys. Chem.* 138 : 138—143.
- Shiloh Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature Rev.* 3 : 155—168.
- Stiff T., O'Driscoll M., Rief N., Iwabuchi K., Löbrich M., Jeggo P. A. 2004. ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res.* 64 : 2390—2396.
- Takahashi A., Ohnishi T. 2005. Does gammaH2AX foci formation depend on the presence of DNA double strand breaks? *Cancer Lett.* 229 : 171—179.
- Tanaka T., Halicka H. D., Huang X., Traganos F., Darzynkiewicz Z. 2006. Constitutive histone H2AX phosphorylation and ATM activation, the reporters of DNA damage by endogenous oxidants. *Cell Cycle.* 5 : 1940—1945.
- Wilson K. A., Stern D. F. 2008. NFB1/MDC1, 53BP1 and BRCA1 have both redundant and unique roles in the ATM pathway. *Cell Cycle.* 7 : 3584—3594.
- Zhou S., Greenberger J. S., Epperly M. W., Goff J. P., Adler C., Leboff M. S., Glowacki J. 2008. Age-related intrinsic changes in human bone-marrow-derived mesenchymal stem cells and their differentiation to osteoblasts. *Aging Cell.* 7 : 335—343.

Поступила 23 III 2009

PECULIARITIES OF THE SYNDROME OF PREMATURE AGEING IN ATAXIA-TELANGIECTASIA PATIENTS

E. A. Polubotko,¹ N. V. Smirnova, N. M. Pleskach, V. M. Mikhelson, I. M. Spivak

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: janeana@mail.ru

Ataxia-telangiectasia (AT), a genetic disorder due to mutation of gene *atm* characterized by progressive neurological abnormalities in combination with oculocutaneous telangiectasias, immunodeficiency, and increased frequency of malignant formations, is inherited according to autosome recessive mechanism. Cells of the patients with AT show increased radio sensitivity and some markers of premature ageing. The telomere lengths are sharply shortened in these cells already from the birth. We studied radio sensitivity (at the dose 2 Gy) and manifestations of premature ageing markers in cultured skin fibroblasts obtained from two unrelated AT patients and their heterozygous parents. We have shown that all the markers studied, that is HP1- γ , phosphorylation of the histone variant H2AX (γ -H2AX), and foci 53BP1, indicate premature ageing of both the patients' and their blood relatives' cells. However, cells of the heterozygous carriers express premature ageing to a less extent. Investigation of the repair process characteristics (the amount of γ -H2AX and the deal of cells with foci 53BP1 in their nuclei) after X-ray irradiation has given following results: the patients' cells complete repair only half even in 24 after irradiation, while the healthy donor's cells complete repair in 24 h. Heterozygous cells also reliably differ from healthy donor's cells. Only in the case of apoptosis marker, p21, heterozygous cells do not differ from normal cells, whereas the patients' cells differ significantly. It has been noted that the mutation of gene *atm* is related to suppression of DNA double-strand breaks (DSBs) repair systems, which, in its turn, is in accordance with the increased radio sensitivity and premature ageing at the cell level in the AT families.

Key words: ataxia-telangiectasia, cell aging markers, ATM, 53BP1, γ -H2AX, HP1- γ , p21^{Waf1/Cip1}.