

МОЗАИЧНЫЕ ФОРМЫ АТАКСИИ-ТЕЛЕАНГИЭКТАЗИИ

© М. Л. Куранова,^{1, 2} Н. М. Плескач,² Т. А. Ледащева,⁴ В. М. Михельсон,² И. М. Спивак^{1–3}

¹ С.-Петербургский государственный политехнический университет,

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, ³ С.-Петербургский государственный университет

и ⁴ С.-Петербургский Диагностический центр (медико-генетический)

¹ электронный адрес: miryakuranova@gmail.com

Атаксия-телеангидракзия (АТ) — тяжелое наследственное аутосомно-рецессивное нейродегенеративное заболевание ускоренного старения, развивающееся при наличии мутаций в обоих аллелях гена *atm*, кодирующего ключевой белок клеточного ответа на повреждение ДНК — протеинкиназу ATM. В норме при возникновении двухнитевых разрывов ДНК протеинкиназа ATM автофосфорилируется, и в клетке появляется ее активная форма — фосфо-АТМ (Р-АТМ). Нами были обнаружены и описаны мозаичные формы АТ, клетки которых имеют две субпопуляции: с нормальным геном *atm* при котором выявляется Р-АТМ, и с мутантным вариантом гена *atm*, при котором Р-АТМ не выявляется. В ядрах первичных фибробластов пациентов с различными формами АТ были исследованы эпигенетические маркеры — гистоновые деацетилазы SIRT1 и SIRT6 — и триметилированные формы гистона H3 — H3K9me3 и H3K27me3, и выявлено увеличение количества SIRT6 при АТ.

Ключевые слова: атаксия-телеангидракзия, гистоновые деацетилазы SIRT1 и SIRT6, триметилированные формы гистона H3 — H3K9me3 и H3K27me3.

Атаксия-телеангидракзия (АТ) — тяжелое прогрессирующее мультисистемное нейродегенеративное заболевание, наследуемое по аутосомно-рецессивному типу (OMIM заболевания: 208900, OMIM гена *atm*: 607585). АТ входит в число болезней преждевременного старения наряду с синдромами Хатчинсона—Гилфорда и Вернера (Михельсон, Гамалей, 2013). Для пациентов характерны патология центральной нервной системы (ЦНС), кожно-конъюнктивальные телеангидракзии, ослабление иммунитета, высокая предрасположенность к неоплазиям, резко повышенная чувствительность к ионизирующему излучению и ограниченная пролиферативная способность клеток. Клиническая картина у разных пациентов АТ схожа, но в то же время характеризуется определенным клиническим полиморфизмом, сочетая в себе одновременно признаки ускоренного старения и повышенного риска клеточной трансформации (Lanzi et al., 1992; Спивак, 1999; Shiloh, 2003).

Причиной данного заболевания является мутация в обоих аллелях гена *atm* (ataxia-telangiectasia mutated), локализованного в 11-й хромосоме (11q23), имеющего размер 150 т. п. н. и мол. массу 350 кДа, содержащего 66 экзонов (Savitsky et al., 1995; Lavin, 1999; Pulverer, 2003). Повышенный риск развития злокачественных опухолей обнаруживается также у кровных родственников пробандов — гетерозиготных носителей мутаций в гене *atm* (Спивак, 1999; Cancannon, 2002). Частота заболевания варьирует в различных популяциях от 1 : 40 000 до 1 : 100 000—300 000 населения, но в связи с тем что мутация часто приводит к гибели плода до рождения, доля гетерозиготных носителей гена *atm* в популяции значительно выше, чем можно ожидать по распространенности

самого заболевания, и составляет от 1 до 7 %. На данный момент описано более 100 мутаций в гене *atm*, приводящих к АТ (Lanzi et al., 1992; Sandoval et al., 1996).

Ген *atm* кодирует ключевой белок клеточного ответа на повреждение ДНК — протеинкиназу ATM. Этот белок, неактивный или отсутствующий в клетках пациентов с АТ, является ключевым регулятором механизма клеточного ответа на повреждение ДНК и возникновение конформационных изменений хроматина (Shiloh, 2003; Lavin, 2008). При этом в норме ATM, обычно находящаяся в неактивной димерной форме, автофосфорилируется по серину в 1981-м положении и диссоциирует на две активные протеинкиназы — фосфо-АТМ (Р-АТМ), моментально начинаяющие фосфорилирование более чем 600 белков-мишней, как активируя, так и ингибируя их активность (Bakkenist et al., 2003; Lavin, 2008). При АТ функционирование белка ATM нарушено и, как следствие, становится невозможным адекватный ответ клетки на повреждение ДНК, что приводит к накоплению нерепарируемых повреждений ДНК. В этих условиях резко повышается риск клеточной трансформации или вероятность быстрого перехода к состоянию необратимого прекращения пролиферации, т. е. преждевременному клеточному старению (Lavin, 2008). На основании данных о функционировании белка ATM нами совместно с врачами-клиницистами был разработан и апробирован на клеточных линиях экспресс-тест для диагностики АТ (Куранова и др., 2013).

При таких серьезных нарушениях клеточного ответа на повреждение ДНК, как при АТ, происходит изменение конформации хроматина (Shiloh, 2003; Lavin, 2008). Структура хроматина и экспрессия генов зависят от эпи-

генетических изменений, проходящих в самой ДНК. Хроматин содержит как ДНК, так и гистоновые и негистоновые белки, формирующие нуклеосому (H2A, H2B, H3 и H4 и линкерный гистон H1). Экспрессия генов меняется при помощи различных эпигенетических механизмов, в том числе модификаций гистонов: ацетилированием, метилированием, фосфорилированием, изменяющих активность ДНК. Ацетилирование гистонов делает структуру хроматина более открытой для транскрипции, в то время как деацетилирование и последующее метилирование приводят к уплотнению хроматина, что ведет к подавлению транскрипции генов (Serravallo et al., 2009).

При изучении гистонового кода старения в культурах диплоидных фибробластов было обнаружено, что снижение количества клеток, содержащих триметилированные модификации гистона H3, прямо пропорционально связано с возрастом донора. Резко сниженное количество клеток, содержащих H3K9me3, показано при прогерии детей — синдроме Хатчинсона—Гилфорда (Scalfidi, Misteli, 2006; Shumaker et al., 2006).

Данные ряда работ свидетельствуют, что уровень H3K27me3 резко увеличивается или уменьшается в специфических сайтах в зависимости от вида опухоли (Kondo et al., 2008; Ke et al., 2009; McCabe et al., 2012). Показано, что триметилирование гистона H3 по лизину в 27-м положении ассоциировано с репрессией транскрипции и регулируется гистоновой метилтрансферазой, специфичной для H3K27, являющейся частью комплекса PRC2 (Polycomb repressive complex 2) (Cao et al., 2002). Существует мнение, что данная модификация гистона H3K27me3 и группа белков Polycomb являются промоутерами для образования закрытой структуры хроматина, репрессируя, таким образом, транскрипцию (Francis et al., 2004; Eskeland et al., 2010). В эмбриогенезе H3K27me3 контролирует молчание гена *Hox* и инактивацию X-хромосомы, что необходимо для нормального развития.

Нужно отметить, что метилирование H3K9 и H3K27 характерно для областей транскрипционно неактивного хроматина, причем модификация H3K9me3 ассоциирована со структурами конститutивного гетерохроматина (Peters et al., 2003; Rice et al., 2003), а H3K27me3 является маркером факультативного гетерохроматина (Bernstein et al., 2002; Chadwick, Willard, 2004).

Описаны специфические для клеточного старения изменения хроматина — хромосомные перестройки (Shumaker et al., 2006) и увеличение стехиометрии гистонов (Medvedev, 1984), оказывающие влияние на статус транскрипции и эффективность репарации ДНК (Ramírez et al., 2007). В клетках каждой ткани функционируют только гены, кодирующие специфические для данной ткани бел-

ки. «Молчание» других генов обеспечивают специальные белки — сиртуины. Впервые эти белки были описаны у дрожжей и получили название SIR (Silent Information Regulators). Таких белков у *Saccharomyces cerevisiae* описано 4, у человека обнаружено 7 гомологов одного из них — SIR2, обозначаемых SIRT1-7, с мол. массой от 34 до 62 кДа. Сиртуины принадлежат к III классу гистондеацетилаз, имеющих NAD⁺-зависимый каталитический коровый домен. Они играют важную роль в контроле обмена веществ и процессов старения и принимают участие в процессах воспаления, злокачественного роста и многих других. SIRT1 и SIRT6 располагаются в ядре и проявляют свое действие через модуляцию гистонов и негистоновых мишней. Литературные данные указывают на зависимость экспрессии SIRT1 от возраста: например, в работе Рамирез и соавторов (Ramírez et al., 2007) показано, что в некоторых тканях с возрастом происходит снижение экспрессии данной деацетилазы. При синдроме Кауден (мутация в гене *PTEN*) SIRT1 вовлечен в эпигенетическую регуляцию совместно с ДНК метилтрансферазой 1.

SIRT6, деацетилируя лизин 9 гистона H3, ослабляет передачу сигнала NF-κB на хроматин, ингибируя апоптоз (Kawahara et al., 2009; Mahajan et al., 2011), и модулирует теломерный хроматин, предотвращая теломерную дисфункцию и клеточное старение (Michishita et al., 2008). Эти результаты дают основание полагать, что увеличение активности (количества) SIRT6 замедляет возрастные физиологические изменения, что предположительно может помочь найти подходы к увеличению продолжительности жизни. Работа Ким с соавторами (Kim et al., 2010) показала, что SIRT1 участвует в поддержании экспрессии SIRT6 при недостатке питательных веществ как в естественных условиях, так и *in vitro*.

Материал и методика

Клеточные линии. Исследование проводили на первичных фибробlastах, полученных от пациентов с АТ; в качестве контроля использовали клетки здорового донора 11 лет VH-10. Также в исследование были включены первичные фибробlastы пациента с синдромом Секкеля (Ss1SP), пациентки с мутацией 5382insC в гене *BRCA1* (BRCA1SP) и пациента с неустановленным радиочувствительным синдромом, ранее ошибочно диагностированным как АТ (AT2SP). Все эти линии, кроме здорового контроля VH-10, любезно предоставленного Адой Кольман (Стокгольм), были получены в нашей Лаборатории радиационной цитологии Института цитологии РАН. Данные о клеточных линиях представлены в табл. 1.

Таблица 1

Исследуемые линии пациентов

Линия	Заболевание, форма	Возраст (лет)	Пассаж
AT1SP	АТ, легкая форма	8	15
AT6SP	То же	26	8
AT8SP	АТ, тяжелая форма	12	10
AT9SP	АТ, легкая форма	3	6
BRCA1SP	Мутация 5382insC в гене <i>BRCA1</i>	30	2
Ss1SP	Синдром Секкеля	0.9	2
AT2SP	Радиочувствительный синдром	4	16
VH-10	Здоровый донор	11	22

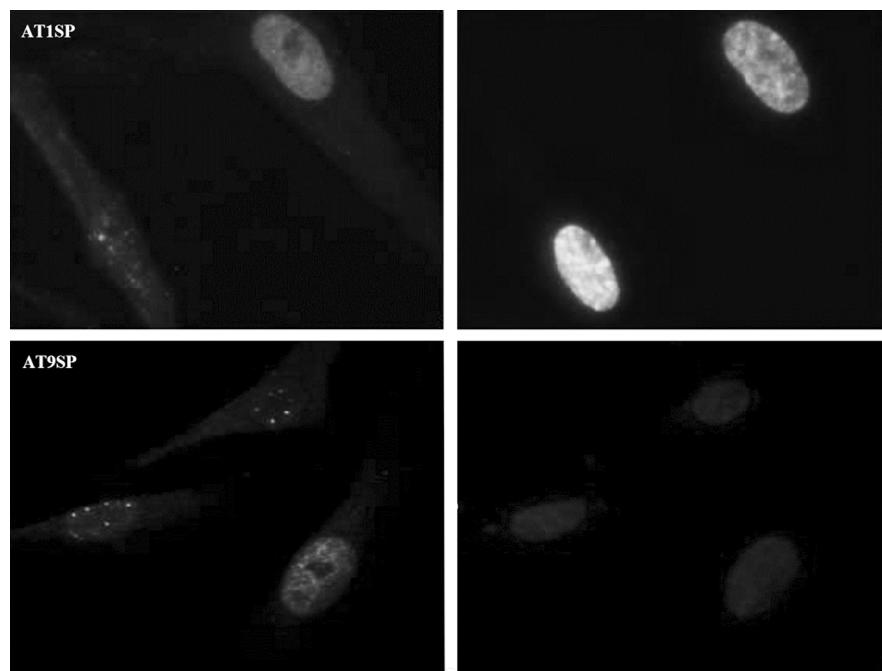


Рис. 1. Мозаичная культура линий AT1SP и AT9SP.

Справа — соответствующие клетки DAPI.

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

Методом непрямой иммунофлуоресценции в ядрах клеток выявляли активную форму протеинкиназы ATM (P-ATM, фосфорилированная по серину в 1981-м положении), гистоновые деацетилазы SIRT1, SIRT6 и trimетилированные формы гистона H3. В качестве первых антител использовали IgG мыши против белка P-ATM (Thermo Scientific, США) в разведении 1 : 100, SIRT1 и H3K9me3 (Cell Signaling, США) в разведении 1 : 100 и IgG кролика против белка SIRT6 и H3K27me3 (Cell Signaling, США) в разведении 1 : 100. В качестве вторых антител использовали козы IgG против IgG мыши и кролика, конъюгированные с FITC, в разведении 1 : 500 (Sigma-Aldrich Co., США). В качестве контроля специфичности иммунной реакции использовали клетки, инкубированные только со вторыми антителами. Для предотвращения быстрого «выгорания» флуоресцентной метки использовали антифейдинг с ДАПИ (Invitrogen, США). Все тесты проводили 3 раза и более. ДНК исследуемых клеток повреждали рентгеновским облучением на установке РУМ-17 в дозе 2 Гр или радиомиметиком (блеомицином в концентрации 50—100 мкг/мл).

Микроскопию и анализ изображений проводили с помощью лазерного сканирующего конфокального микроскопа Zeiss LSM 5 PASCAL. Для визуализации флуорофоров был использован аргоновый (488 нм) и гелиево-неоновые (543 нм) лазеры. Для получения изображений использовали сканирующий модуль микроскопа с помощью компьютера и соответствующего программного обеспечения LSM 5 PASCAL. Для анализа полу-

ченных изображений (определение уровня интенсивности флуоресценции) использовали программы LSM 5 PASCAL и WCIF ImageJ 1.37m.

Результаты

Выявление активной формы протеинкиназы ATM (P-ATM) методом непрямой иммунофлуоресценции. Активную форму протеинкиназы ATM (p-ATM) выявляли при помощи экспресс-теста, основанного на методе непрямой иммунофлуоресценции (Куранова и др., 2013). При окрашивании препаратов клеток, полученных после индукции двухнитевых разрывов ДНК, антителами к активной форме протеинкиназы ATM (фосфо-ATM) она выявлялась в ядрах клеток здорового донора VH-10, ядрах клеток пациентки с мутацией 5382insC в гене BRCA1 (BRCA1SP) и пациента с синдромом Секкеля (Ss1SP), пациента с синдромом радиочувствительности неясной этиологии AT2SP. В ядрах клеток больных AT — AT6SP и AT8SP — фосфо-ATM после повреждения ДНК не выявлялась. В то же время клетки линий AT1SP и AT9SP окрашивались неоднородно, проявлялась их выраженная гетерогенность: в ядрах части клеток выявлялись фокусы P-ATM, а в ядрах других — нет (рис. 1). В основном фокусы в обеих линиях локализовались в ядре, но у небольшого процента клеток P-ATM обнаруживалась как в цитоплазме, так и в ядре одновременно. Данные о количественном соотношении различных

Таблица 2
Доля клеток с активной формой P-ATM, %

Линия	В цитоплазме	В ядре	Без фокусов
AT1SP	6.1	63.05	24.75
AT9SP	3.3	53.08	31.82

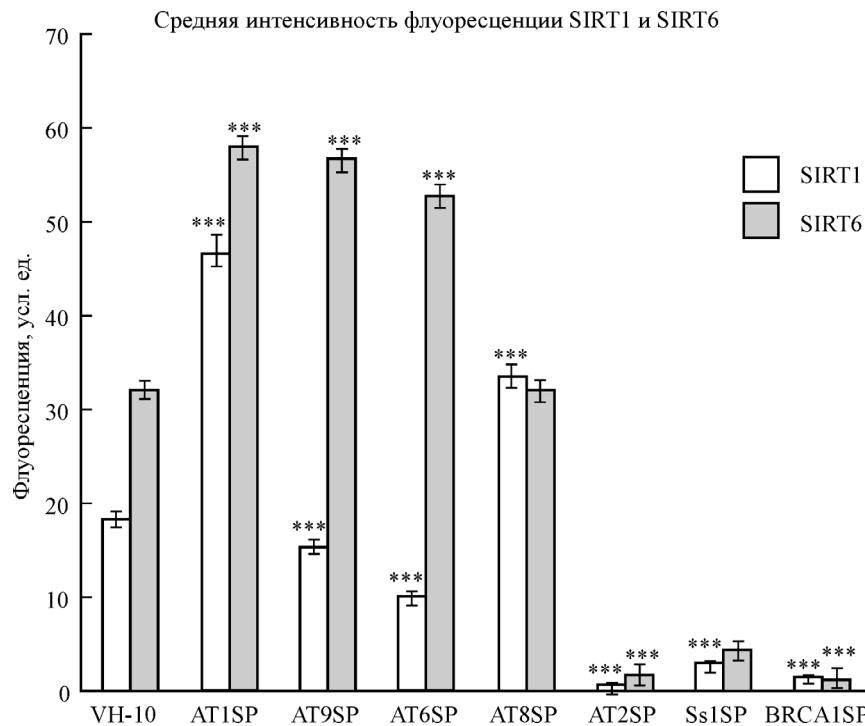


Рис. 2. Средняя интенсивность флуоресценции гистоновых деацетилаз SIRT1 и SIRT6 в исследуемых линиях.

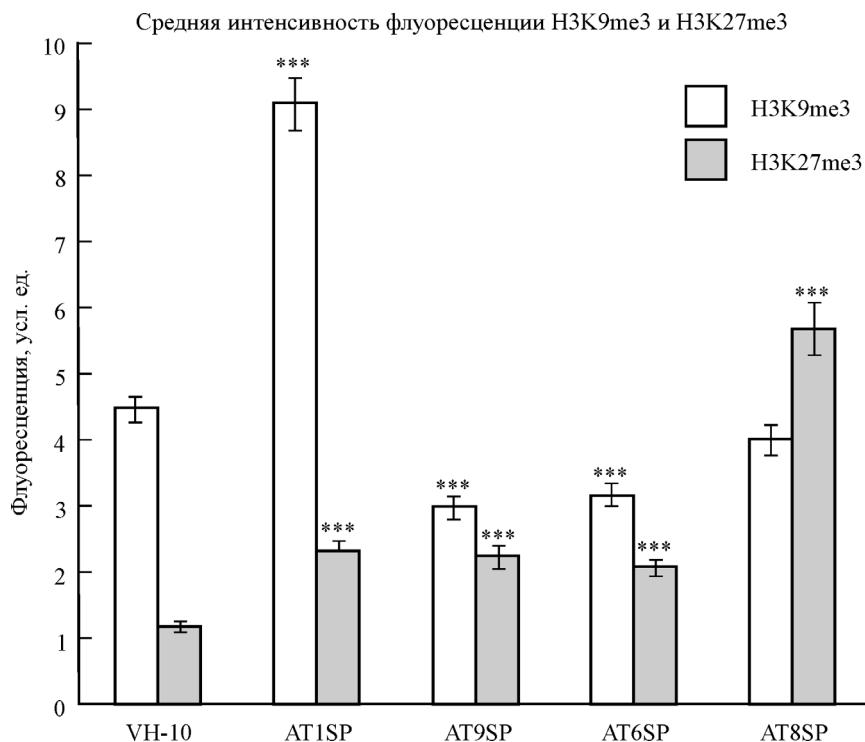


Рис. 3. Средняя интенсивность флуоресценции trimетилированных форм гистона H3 (H3K9me3 и H3K27me3) в исследуемых линиях (в усл. ед. флуоресценции).

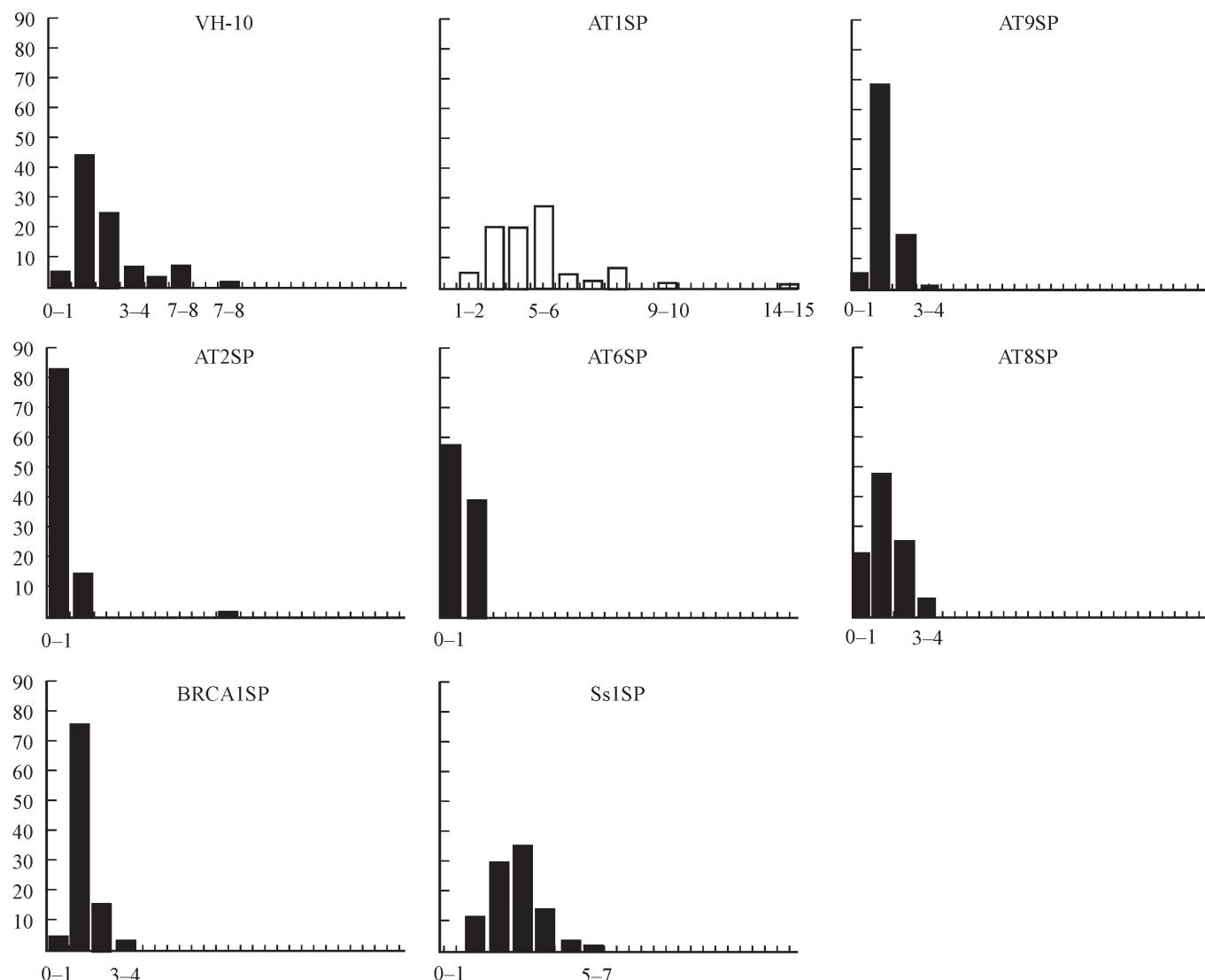


Рис. 4. Распределение клеток по диапазонам интенсивности флуоресценции (в усл. ед.) SIRT1 в ядрах интактных клеток исследуемых линий.

По вертикали — диапазоны интенсивности флуоресценции (в усл. ед. флуоресценции); по горизонтали — доля клеток в обозначенном диапазоне, %.

по содержанию Р-АТМ клеток в популяции представлены в табл. 2.

Клинически у пациентов AT1SP и AT9SP заболевание протекало в более легкой форме, чем у других. Исходя из полученных результатов можно говорить о мозаичной форме АТ, к которой относятся пробанды AT1SP и AT9SP, так как полученные от них линии первичных фибробластов содержат два разных типа клеток — с активной формой протеинкиназы АТМ и без нее. «Мозаичность» культур AT1SP и AT9SP достаточно хорошо видна на рис. 1 и 2. Вероятно, такой мозаицизм связан с тем, что ген *atm* имеет достаточно большой размер — 150 т. п. н. — и расположен дистально на длинном плече хромосомы 11 (Savitsky et al., 1995; Lavin, Khanna, 1999; Peters et al., 2003), а также с тем, что большинство больных являются копмутантами, т. е. несут на материнской и отцовской хромосомах различные мутации. В этом случае в некоторых клетках возможно восстановление нормального аллеля этого гена путем гомологической рекомбинации. Если это происходит на ранних стадиях дробления зиготы, то взрослый организм оказывается мо-

зайчным. Детектируемые в цитоплазме фокусы свидетельствуют о нарушениях транспортировки белка АТМ в ядро клетки, как это было описано в случае с линией пигментной ксеродермы XP2SP (Куранова и др., 2013).

Выявление гистоновых деацетилаз SIRT1 и SIRT6. При окрашивании клеток с использованием антител к гистоновым деацетилазам SIRT1 и SIRT6 с последующим измерением интенсивности флуоресценции были выявлены различия между исследуемыми клеточными линиями. Данные средней интенсивности флуоресценции представлены на рис. 2. Видны достоверные различия интенсивности флуоресценции в ядрах клеток здорового донора и пробандов. В клетках AT9SP и AT8SP интенсивность флуоресценции SIRT1 была достоверно снижена по сравнению с контролем в 1.5 раза, в клетках AT1SP и AT6SP достоверно повышена в 1.7 и 3.7 раза соответственно. В клетках других исследованных линий — Ss1SP, AT2SP и BRCA1SP — интенсивность флуоресценции SIRT1 существенно снижена по сравнению с контролем в 5 раз и более. Полученные нами результаты не позволяют сделать определенные выводы о наличии ассо-

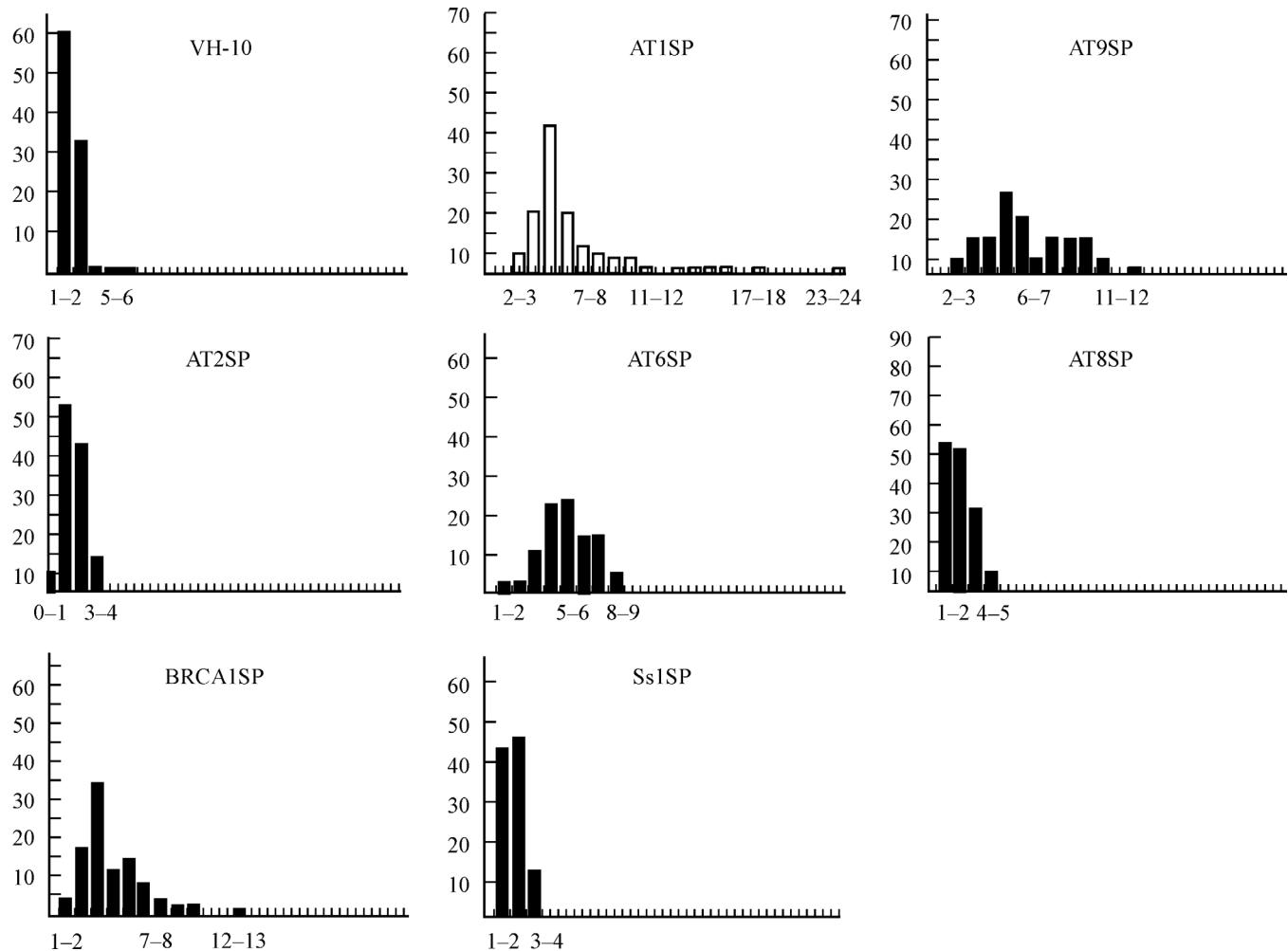


Рис. 5. Распределение клеток по диапазонам интенсивности флуоресценции (в усл. ед.) SIRT6 в ядрах интактных клеток исследуемых линий.

По вертикали — диапазоны интенсивности флуоресценции (в усл. ед. флуоресценции); по горизонтали — доля клеток в обозначенном диапазоне, %.

циации белка SIRT1 с AT, несмотря на имеющиеся в литературе такие данные (Serravallo et al., 2009).

Разброс по диапазонам интенсивности флуоресценции SIRT1 в исследуемых линиях оказался различным и представлен на рис. 4.

При анализе интенсивности флуоресценции SIRT6 обнаружены существенные отличия от SIRT1. Во всех изученных нами линиях AT — как классической формы, так и мозаичной — интенсивность флуоресценции SIRT6 достоверно выше, чем в контроле, а во всех других изученных линиях существенно ниже. Эти данные позволяют предположить, что SIRT6 в отличие от SIRT1 специфически связан с протеинкиназой ATM или ее белками-мишениями и может модулировать активность их транскрипции.

Интенсивность флуоресценции trimetилированных форм гистона H3 — H3K9me3 и H3K27me3. При окрашивании клеток с использованием антител к trimetилированным формам гистона H3 — H3K9me3 и H3K27me3 — с последующим измерением интенсивности флуоресценции были выявлены различия между исследуемыми клеточными линиями. Данные средней интенсивности флуоресценции представлены на рис. 3. На рисунке видны достоверные различия средней

интенсивности флуоресценции в ядрах клеток здорового донора и пробандов: наибольшая средняя интенсивность флуоресценции H3K9me3 — в 2 раза достоверно выше контроля — выявлена в ядрах клеток линии AT1SP (AT мозаичной формы); в ядрах клеток AT8SP (пациента с тяжелой формой AT) средняя интенсивность флуоресценции H3K9me3 достоверно не отличалась от контроля, в ядрах клеток AT6SP (легкая форма AT) и AT9SP (мозаик) уровень интенсивности оказался в 1.5 раза достоверно ниже контроля. Таким образом, никакой закономерности в интенсивности флуоресценции H3K9me3, связанной с AT, мы не наблюдали.

Средняя интенсивность флуоресценции H3K27me3 самой высокой оказалась в ядрах клеток AT8SP (пациента с тяжелой формой AT) — в 4.3 раза достоверно выше контроля. В ядрах клеток остальных линий AT1SP, AT6SP и AT9SP (более легкой формы AT и мозаик) средняя интенсивность флуоресценции H3K27me3 была примерно одинаковой и достоверно в 2 раза выше контроля. Таким образом, данный маркер во всех изученных случаях достоверно отличается от контроля, причем при тяжелой форме заболевания это отличие наиболее выражено. Можно сделать вывод, что высокий уровень H3K27me3 является одним из признаков AT, и, вероятно,

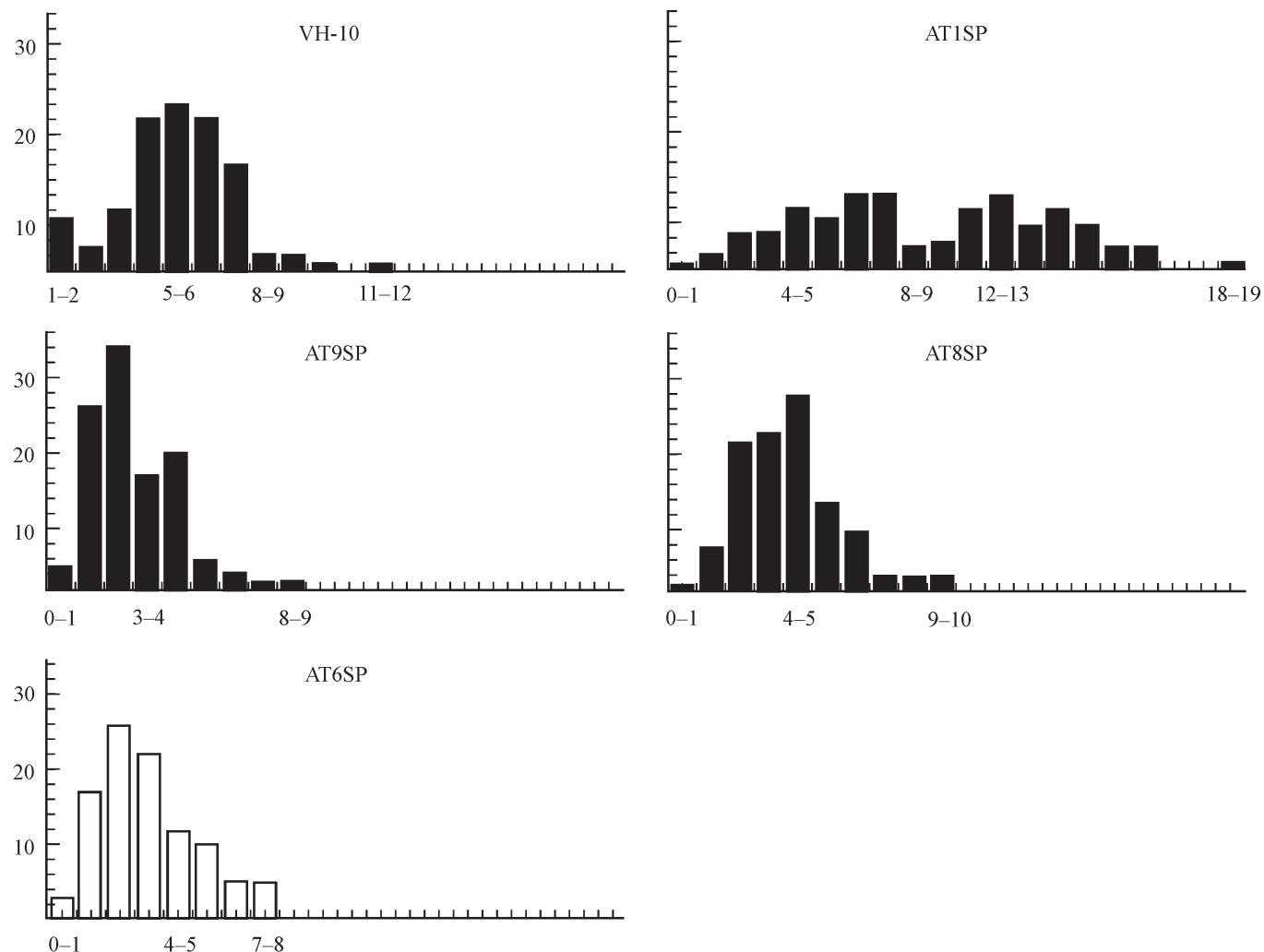


Рис. 6. Распределение клеток по диапазонам интенсивности флуоресценции (в усл. ед.) триметилированной формы гистона Н3 (H3K9me3) в ядрах интактных клеток исследуемых линий.

По вертикали — диапазоны интенсивности флуоресценции (в усл. ед. флуоресценции); по горизонтали — доля клеток в обозначенном диапазоне, %.

степень его выраженности может быть использована при прогнозе течения заболевания.

Особенности флуоресценции клеток при мозаичной форме АТ. Анализируя интенсивность флуоресценции клеток исследуемых линий по диапазонам интенсивности флуоресценции, мы обнаружили, что линии AT1SP и AT9SP отчетливо образуют 2 пика при окрашивании на SIRT6, т. е. можно говорить о двух клеточных субпопуляциях (рис. 4–7). Эти данные подтверждают наше предположение о формировании под влиянием мозаичизма двух субпопуляций клеток, в которых белки, связанные с ATM или ее белками-мишнями, ведут себя по-разному. При анализе диапазонов интенсивности флуоресценции SIRT1 было обнаружено, что только в линии AT1SP отчетливо выделяются два «пика». Это еще раз подтверждает наше предположение о том, что, несмотря на имеющиеся литературные данные о роли SIRT1 при старении (Serravallo et al., 2009), гистоновая деацетилаза SIRT1 не имеет явной ассоциации с АТ.

При разбиении на диапазоны интенсивности флуоресценции H3K9me3 два «пика» интенсивности флуоресценции наблюдались, так же как и при окрашивании на SIRT1, в клетках линии одного из пробандов с мозаичной

формой заболевания — AT1SP (рис. 6). При анализе диапазонов интенсивности флуоресценции H3K27me3 «пиков интенсивности флуоресценции» не наблюдалось ни в одной из исследованных линий. Но в клетках пробандов наблюдается сдвиг в зону больших средних значений по сравнению с контролем (рис. 7).

Обсуждение

В настоящее время эпигенетические механизмы старения относят к области молекулярной геронтологии, активно изучаемой во многих лабораториях, и количество публикаций, посвященных им, постоянно растет. Наш интерес к сиртуинам при АТ был основан в первую очередь на том, что при этом заболевании отмечается уменьшение количества деацетилазы SIRT1, что описано ранее при старении клеток (Sommer et al., 2006; Pallas et al., 2008; Herranz et al., 2010; Satoh et al., 2010). Существуют также данные о роли SIRT1 в деацетилировании TIP60 с последующим ингибированием TIP60/ATM/p53-опосредованного апоптоза (Serravallo et al., 2009). То, что нами не было обнаружено уменьшения количества гистоновой деацетилазы SIRT1, подтверждает наше представление о

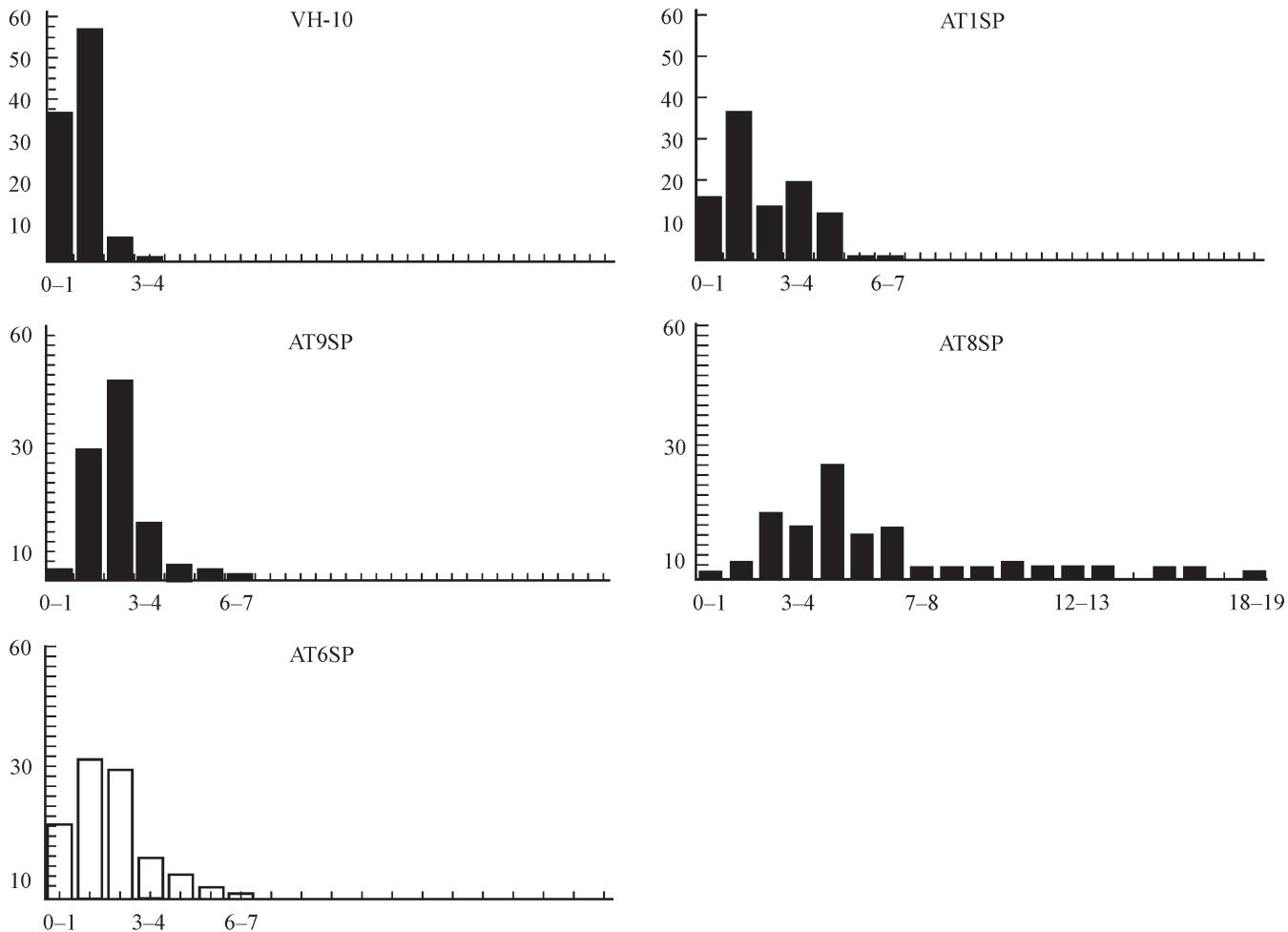


Рис. 7. Распределение клеток по диапазонам интенсивности флуоресценции (в усл. ед.) триметилированной формы гистона Н3 (H3K27me3) в ядрах интактных клеток исследуемых линий.

По вертикали — диапазоны интенсивности флуоресценции (в усл. ед. флуоресценции); по горизонтали — доля клеток в обозначенном диапазоне, %.

том, что в клетках больных АТ как бы борются между собой программа ускоренного старения и программа малигнизации, что соответствует сочетанию в клинической картине данного заболевания признаков ускоренного старения и резко повышенного риска онкологических заболеваний. Вероятно, роль SIRT1 в частичном ускорении старения при АТ не столь значима, как при естественном старении. Возможно также, это связано как с тем, что сама по себе деацетилаза SIRT1 многофункциональна и участвует во многих процессах (Serravallo et al., 2009), так и с тем, что данный белок мы изучали в первичных фибробластах кожи, а не в описанных в литературе тканях — печени, почках, мышцах и т. д. (Rahman, Islam, 2011; Hwang et al., 2013). В то же время выявленное снижение количества деацетилазы SIRT1 в клетках BRCA1SP соответствует литературным данным о том, что такое снижение, наблюдаемое при BRCA1-абляции, приводит к повышению уровня антиапоптотического белка сурвивина через снижение SIRT1-зависимого деацетилирования H3K9 в зоне его промоутора и как следствие — усилению роста опухоли (Wang et al., 2008).

Повышение количества SIRT6, обнаруженное во всех исследованных клетках больных АТ вне зависимости от формы и степени тяжести заболевания, может быть объяснено компенсаторной ролью данного сиртуина, ранее описанной для других наследственных синдромов, харак-

теризующихся, как и АТ, теломерной дисфункцией. При врожденном дискератозе (мутация в гене *DCK1*), при котором отмечено резкое укорочение теломер, SIRT6 включен в их поддержание. В норме он также стабилизирует связь теломер с белком WRN (нуклеаза-геликаза синдрома Вернера — WS) (Serravallo et al., 2009), а SIRT6-нонкаутные мыши проявляют WS-фенотип (Roth et al., 2013).

Средняя интенсивность флуоресценции H3K9me3 в ядрах клеток больных АТ легкой, тяжелой и одной из мозаичных форм (AT6SP, AT8SP и AT9SP) оказалась ниже, чем в контроле. Это хорошо согласуется с работами, в которых показано, что при детской прогерии (синдром Хатчинсона — Гилфорда) и у пожилых доноров в дермальных фибробластах наблюдается сильное снижение уровня интенсивности флуоресценции (Scaffidi, Misteli, 2006; Shumaker et al., 2006). В то же время тот факт, что во втором случае мозаичной формы заболевания АТ (AT1SP) средняя интенсивность флуоресценции H3K9me3 оказалась достоверно выше контроля в 2 раза, не позволяет воспринимать снижение количества H3K9me3 в качестве одного из признаков АТ на клеточном уровне.

Средняя интенсивность флуоресценции триметилированной формы гистона Н3 в H3K27me3 в ядрах клеток всех пациентов с АТ оказалась достоверно выше, чем в клетках здорового донора, причем при тяжелой форме АТ (AT8SP) — в 4 раза выше контроля. Этот результат

дает право полагать, что изменения факультативного хроматина могут быть связаны с мутацией в гене *ATM*. К тому же данные trimетилированные формы H3 могут использоваться в качестве онкомаркеров (Hosogane et al., 2010), что еще раз подтверждает наше представление о наличии в клетках AT двух разнонаправленных программ.

Мозаицизм, подобный тому, что мы обнаружили при AT, был ранее описан при синдроме Блюма. У больных, чьи родители не были близкими родственниками и у которых можно было предположить наличие различных мутаций в аллелях гена *BLM*, полученных от отца и матери, наблюдается небольшая группа лимфоцитов с нормальным, а не повышенным уровнем сестринских хроматидных обменов (СХО) — высокий уровень СХО является надежным цитогенетическим маркером синдрома Блюма. На основе лимфоцитов таких пациентов были получены лимфобластоидные клеточные линии, в части которых действительно не было повышенного уровня СХО. Авторы работы предположили, что такое явление может быть результатом внутригенной рекомбинации (Ellis et al., 1995). Действительно, гомологичная рекомбинация часто бывает задействована при восстановлении нормального аллеля гена из двух мутантных с мутациями в разных точках (Moynahan et al., 2001).

Несмотря на то что метод обнаружения мозаичных форм AT требует предварительного повреждения ДНК и достаточно сложно показать одновременное наличие в одной и той же клетке активной формы ATM (P-ATM) и эпигенетических маркеров (ибо последние принято описывать в интактных клетках), даже при таком ограничении мы наблюдаем появление двух субпопуляций, характеризующихся разной интенсивностью флуоресценции SIRT6. Это позволяет с большой уверенностью утверждать, что обнаруженная связь SIRT6 с AT имеет достоверную молекулярную основу. Для trimетилированной формы гистона H3 — H3K27me3, повышенная интенсивность флуоресценции которой выявлена во всех изученных линиях AT вне зависимости от формы заболевания, не было обнаружено двух клеточных субпопуляций, различающихся по интенсивности флуоресценции, что не позволяет нам быть уверенными в наличии ассоциации этого маркера с AT.

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

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 12-06-00189а и 14—15-00943).

Список литературы

- Куранова М. Л., Ледащева Т. А., Тулу Е. К., Беляев Д. Л., Жеребцов С. В., Плескач Н. М., Прокофьев В. В., Михельсон В. М., Спивак И. М. 2013. Диагностика атаксии-телеангиэктазии с помощью экспресс-теста, основанного на методе непрямой иммунофлуоресценции. Цитология. 55 (8) : 560—565.
- Михельсон В. М., Гамалей И. А. 2013. Теломерный механизм старения. Обзор. Palmarium Academic Publishing. 90 с.
- Спивак И. М. 1999. Наследственные заболевания с первичными и вторичными дефектами репарации ДНК. Цитология. 41 (5) : 338—739.
- Bakkenist C. J., Kastan M. B. 2003. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. Natra. 421 : 499—506.
- Bernstein B. E., Schreiber S. L. 2002. Global approaches to chromatin. Chem. Biol. 9(11) : 1167—1173.
- Cancannon P. 2002. ATM heterozygosity and cancer risk. Nat. Genet. 32 (1) : 89—90.
- Cao R., Wang L., Wang H., Xia L., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Jones R. S., Zhang Y. 2002. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. Science. 298 : 1039—1043.
- 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 (50) : 17 450—17 455.
- Ellis N., Lennon D., Proytcheva M., Alhadeff B., Henderson E., German J. 1995. Somatic intragenic recombination within the mutated locus BLM can correct the high sister-chromatid exchange phenotype of Bloom syndrome cells. Amer. J. Hum. Genet. 57 : 1019—1027.
- Eskeland R., Leeb M., Grimes G. R., Kress C., Boyle S., Sproul D., Gilbert N., Fan Y., Skoultschi A. I., Wutz A., Bickmore W. A. 2010. Ring1B compacts chromatin structure and represses gene expression independent of histone ubiquitination. Mol. Cell. 38 : 452—464.
- Francis N. J., Kingston R. E., Woodcock C. L. 2004. Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. Science. 306 : 1574—1577.
- Herranz D., Muñoz-Martin M., Cañamero M., Mulero F., Martínez-Pastor B., Fernandez-Capetillo O., Serrano M. 2010. Sirt1 improves healthy ageing and protects from metabolic syndrome-associated cancer. Nat. Com. 1—3.
- Hosogane M., Funayama R., Nishida Y., Nagashima T., Nakayama K. 2013. Ras-induced changes in H3K27me3 occur after those in transcriptional activity. PLoS Genet. 9 (8) : e1003698.
- Hwang J., Yao H., Caijo S., Sundar I., Rahman I. 2013. Redox-regulation of SIRT1 in inflammation and cellular senescence. Free Rad. Biol. Med. 95 : 110.
- Kawahara T. L., Michishita E., Adler A. S., Damian M., Berger E., Lin M., McCord R. A., Ongagui K. C., Boxer L. D., Chang H. Y., Chua K. F. 2009. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NFκB-dependent gene expression and organismal life span. Cell. 136 : 62—174.
- Ke X. S., Qu Y., Rostad K., Li W. C., Lin B., Halvorsen O. J., Haukaas S. A., Jonassen I., Petersen K., Goldfinger N., Rotter V., Akslen L. A., Oyan A. M., Kalland K. H. 2009. Genome-wide profiling of histone h3 lysine 4 and lysine 27 trimethylation reveals an epigenetic signature in prostate carcinogenesis. PLoS ONE. 4 : e4687.
- Kim H. S., Xiao C., Wang R. H., Lahusen T., Xu X., Vassilopoulos A., Vazquez-Ortiz G., Jeong W. I., Park O., Ki S. H., Gao B., Deng C. X. 2010. Hepatic-specific disruption of SIRT6 in mice results in fatty liver formation due to enhanced glycolysis and triglyceride synthesis. Cell. Metab. 12 : 224—236.
- Kondo Y., Shen L., Cheng A. S., Ahmed S., Boumber Y., Charo C., Yamochi T., Urano T., Furukawa K., Kwabi-Addo B., Gold D. L., Sekido Y., Huang T. H., Issa J. P. 2008. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. Nat. Genet. 40 : 741—750.

- Lanz G., Ballotin U., Franciotta D., Maserati E., Pasquali F., Veggiani P. 1992. Clinical, cytogenetic and immunological aspects in 4 cases resembling ataxia telangiectasia. *Eur. Neurol.* 23 : 121—125.
- Lavin M. F. 2008. Ataxia-telangiectasia: from a rare disorder to a paradigm for cell signalling and cancer. *Mol. Cell. Biol.* 9 : 759—769.
- Lavin M. F., Khanna K. K. 1999. ATM: the protein encoded by the gene mutated in the radiosensitive syndrome ataxia-telangiectasia. *Int. J. Rad. Biol.* 75 (10) : 1201—1214.
- Lee J. H., Mand M. R., Deshpande R. A., Kinoshita E., Yang S. H., Wyman C., Paull T. T. 2013. Ataxia telangiectasia-mutated (ATM) kinase activity is regulated by ATP-driven conformational changes in the Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) complex. *J. Biol. Chem.* 288 (18) : 12 840—12 851.
- Mahajan S., Leko V., Simon Ju., Bedalov A. 2011. Sirtuin modulators. *Handbook of Experimental Pharmacology*.
- McCabe M. T., Graves A. P., Ganji G., Diaz E., Halsey W. S., Jiang Y., Smitheman K. N., Ott H. M., Pappalardi M. B., Allen K. E., Chen S. B., Pietra A., Dul E., Hughes A. M., Gilbert S. A., Thrall S. H., Tummino P. J., Kruger R. G., Brandt M., Schwartz B., Creasy C. L. 2012. Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 109 : 2989—2994.
- Medvedev Z. A. 1984. Age changes of chromatin. A review. *Mech. Ageing. Dev.* 28 (2—3) : 139—154.
- Michishita E., McCord R. A., Berber E., Kioi M., Padilla-Nash H., Damian M., Cheung P., Kusumoto R., Kawahara T. L., Barrett J. C., Chang H. Y., Bohr V. A., Ried T., Gozani O., Chua K. F. 2008. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin. *Nature.* 452 (7186) : 492—496.
- Mostoslavsky R., Chua K. F., Lombard D. B., Pang W. W., Fischer M. R., Gellon L., Liu P., Mostoslavsky G., Franco S., Murphy M. M., Mills K. D., Patel P., Hsu J. T., Hong A. L., Ford E., Cheng H. L., Kennedy C., Nunez N., Bronson R., Frendewey D., Auerbach W., Valenzuela D., Karow M., Hottiger M. O., Hursting S., Barrett J. C., Guarente L., Mulligan R., Demple B., Yancopoulos G. D., Alt F. W. 2006. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cel.* 2006; 124 : 315—329.
- Moynahan M. E., Cui T. Y., Jasin M. 2001. Homology-directed DNA repair, mitomycin-C resistance, and chromosome stability is restored with correction of a Brca1 mutation. *Can. Res.* 1 : 4842—4850.
- Pallas M., Verdaguer E., Tajes M., Gutierrez-Cuesta J., Camins A. 2008. Modulation of sirtuins: new targets for antiaging. *Rec. Pat. CNS Drug. Discov.* 3 (1) : 61—69.
- Peters A. H., Kubicek S., Mechta K., O'Sullivan R. J., Derijck A. A., Perez-Burgos L., Kohlmaier A., Opravil S., Tachibana M., Shinkai Y., Martens J. H., Jenuwein T. 2003. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell.* 12 (6) : 1577—1589.
- Pulverer B. 2003. ATM machine. *Nat. Cell. Biol.* 5 (2) : 96.
- Rahman S., Islam R. 2011. Mammalian Sirt1: insights on its biological functions. *Cell. Commun. Signal.* 9 : 11.
- Ramírez C. L., Cadiñanos J., Varela I., Freije J. M. P., López-Otín C. 2007. Human progeroid syndromes, aging and cancer: new genetic and epigenetic insights into old questions. *Cell. Mol. Life Sci.* 64 (2007) : 155—170.
- Rice J. C., Briggs S. D., Ueberheide B., Barber C. M., Shabnowitz J., Hunt D. F., Shinkai Y., Allis C. D. 2003. Histone methyltransferases direct different degrees of methylation to define distinct chromatin domains. *Mol. Cell.* 12 (6) : 1591—1598.
- Roth M., Wang Z., Chen W. Y. 2013. Sirtuins in hematological aging and malignancy. *Crit. Rev. Oncog.* 18 (6) : 531—547.
- Sandoval N., Platzer M., Rosenthal A., Dork Th., Bendix R., Skawran B., Stuhrmann M., Wegner R. D., Sperling K., Banin Sh., Shiloh Yo., Baumer A., Bernthal U., Sennefelder H., Brohm M., Weber B. H. F., Schindler D. 1996. Characterization of ATM gene mutations in 66 ataxia telangiectasia families. *Hum. Mol. Gen.* 8 (1) : 69—79.
- Satoh A., Brace C. S., Ben-Josef G. 2010. SIRT1 promotes the centra adaptive response to diet restriction through activation of the dorsomedial and lateral nuclei of the hypothalamus. *J. Neurosci.* 30 : 10 220—10 232.
- Savitsky K., Bar-Shira A., Gilad Sh., Rotman G., Ziv Ya., Vanaagte L., Tagle D. A., Smith S., Uziel T., Sfez Sh., Ashkenazi M., Pecker I., Frydman M., Harnik R., Patanjali S. R., Simmons A., Clines G. A., Sartiel A., Gatti R. A., Chessa L., Sanal O., Lavin M. F., Jaspers N. G. J., Taylor A. M. R., Arlett C. F., Miki T., Weissman Sh. M., Lovett M., Collins F. S., Shiloht Yo. A. 1995. Single ataxia telangiectasia gene with a product similar to P1-3 kinase. *Science.* 268 : 1749—1753.
- Scaffidi P., Misteli T. 2006. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science.* 320 : 1059—1063.
- Serravallo M., Jagdeo J., Glick S., Siegel D., Brody N. 2009. Sirtuins in dermatology: applications for future research and therapeutics. *Arch. Derm. Res.* 305 : 269—282.
- Shiloh Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature.* 3 : 155—168.
- Shumaker D. K., Dechat T., Kohlmaier A., Adam S. A., Bozovsky M. R., Erdos M. R., Eriksson M., Goldman A. E., Khuon S., Collins F. S., Jenuwein T., Goldman R. D. 2006. Mutant nuclear lamin A leads to progressive alterations of epigenetic control in premature aging. *PNAS.* 130 : 8703—8708.
- Sommer M., Poliak N., Upadhyay S., Ratovitski E., Nejkin B. D., Donehower L. A., Sidransky D. 2006. DeltaNp63alpha overexpression induces downregulation of Sirt 1 and an accelerated aging phenotype in the mouse. *Cell. Cycl.* 5 : 2005—2011.
- Vijg J. 1990. Searching for the molecular basis of aging: the need for life extension models. *Aging.* 2 (3) : 227—229.
- Wang R. H., Zheng Y., Kim H. S., Xu X., Cao L., Luhesen T., Lee M. H., Xiao C., Vassilopoulos A., Chen W. 2008. Interplay among BRCA1, SIRT1, and Survivin during BRCA1-associated tumorigenesis. *Mol. Cell.* 32 : 11—20.

Поступила 2 VI 2014

MOSAIC FORMS OF ATAXIA-TELANGIECTASIA

M. L. Kuranova,^{1, 2} N. M. Pleskach,² T. A. Ledacheva,⁴ V. M. Mikhelson,² I. M. Spivak^{1—3}¹ National Research University of St. Petersburg State Polytechnical University,² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, ³ St. Petersburg State Universityand ⁴ St. Petersburg Diagnostic (Medico-Genetical) Center;

e-mail: miryakuranova@gmail.com

Ataxia-telangiectasia (AT) is a severe hereditary autosomal recessive neurodegenerative disease associated with accelerated aging and caused by mutation in both alleles of *atm* gene. This gene encodes a key protein of cell response to DNA damage — an ATM protein kinase. Normally, upon formation of DNA double strand bre-

aks ATM is autophosphorylated and its active form phospho-ATM (P-ATM) appears. Here we describe a mosa-ic form of AT in which cells of the same patient with normal *atm* gene demonstrated the accumulation of P-ATM in response to DNA double-strand breaks-inducing factors whereas in cells bearing a mutant form of *atm* P-ATM was not detected. The epigenetic markers such as histone deacetylases SIRT1 and SIRT6, and tri-methylated forms of histone H3 — H3K9me3 and H3K27me3 — were studied in the nuclei of primary fibro-blasts derived from patients with different forms of AT and the increase of SIRT6 level was revealed.

K e y w o r d s: ataxia-telangiectasia, histone deacetylases SIRT1 and SIRT6, trimethylated forms of histo-ne H3 — H3K9me3 and H3K27me3.