

МАРКЕРЫ СТАРЕНИЯ В КЛЕТКАХ БОЛЬНЫХ СИНДРОМОМ КОККЕЙНА. ОБЩИЕ И ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ РАЗЛИЧИЯ

© П. А. Слижов,^{1,2,*} Т. И. Долинина,^{2,5} Н. М. Плескач,² С. В. Жеребцов,²
М. А. Булатникова,³ В. М. Михельсон,^{2,*} И. М. Спивак^{2,4,5}

¹ Российский государственный педагогический университет им. А. И. Герцена,
Санкт-Петербург, 191186,

² Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064,

³ Покровский банк стволовых клеток, Санкт-Петербург, 199106,

⁴ С.-Петербургский государственный университет, 199034,

и ⁵ С.-Петербургский политехнический университет Петра Великого, 195251;

* электронный адрес: maidel@bk.ru; mikhels@incras.ru

Синдром Коккейна — редкое аутосомно-рецессивное заболевание, описанное в 1930-х годах Э. А. Коккейном. Больные страдают кахексической карликовостью (когда вес по сравнению с нормой снижен еще сильнее, чем рост), фоточувствительностью, глухотой и различными нарушениями зрения (атрофией зрительного нерва, катарактой, дегенерацией эпителия роговицы и повреждениями сетчатки). Средняя продолжительность жизни больных синдромом Коккейна — 12 лет. В клетках больных нарушен процесс эксцизионной репарации нуклеотидов (nucleotide excision repair — NER), ее ветвь, спаренная с транскрипцией (transcription coupled repair — TCR) (TC-NER). При исследовании панели маркеров старения (SA-β-gal, γ-H2AX, 53BP1, HP1-γ, SIRT1, SIRT6, 3meH3K9 и 3meH3K27), а также нарушения строения ядерной ламины и укорочения теломера было показано, что клетки больных синдромом Коккейна обладают выраженными признаками ускоренного старения по всем исследованным маркерам. Это позволяет считать синдром Коккейна истинной прогерией и использовать клеточные линии, полученные от больных, как модельные объекты для изучения процессов старения и тестирования геропротекторов.

Ключевые слова: синдром Коккейна, преждевременное старение, сегментарная прогерия, маркеры старения, теломеры.

Принятые сокращения: п. н. — пара нуклеотидов, SA-β-gal — ассоциированная со старением β-галактозидаза, кПЦР — количественная полимеразная цепная реакция.

Существует группа редких заболеваний человека, в симптоматику которых входит ускоренное старение организма. По роли процессов ускоренного старения в описанной симптоматике эти болезни делят на истинные прогерии и сегментарные прогерии, или прогероидные синдромы. К истинным прогериям относят синдром Хатчинсона—Гилфорда (прогерия детей) и синдром Вернера (прогерия взрослых), а к сегментарным прогериям — синдром Луи—Барр (атаксия-телеангиэктазия), синдром Секкеля, пигментную ксеродерму, трихотиодистрофию, анемию Фанкони, синдром Коккейна и некоторые другие (признаки ускоренного старения, например, описаны при синдроме Дауна). Все эти болезни объединяют сниженный пролиферативный потенциал клеток, высокий процент клеток с выраженными признаками клеточного старения, а также повышенный риск раннего развития заболеваний, традиционно считающихся возрастными (кардиологические, нейродегенеративные, онкологические и т. п.). Клетки, полученные от больных с прогериями, могут служить моделью для исследования процессов старения. Для этого больные должны быть предварительно де-

тально изучены, в первую очередь с точки зрения их биологического возраста.

Синдром Коккейна традиционно рассматривается как одна из сегментарных прогерий, внешне наиболее схожая с истинной прогерией — синдромом Хатчинсона—Гилфорда, так как для обоих этих синдромов характерна кахексическая карликовость. При синдроме Коккейна нарушена система эксцизионной репарации ДНК, спаренной с транскрипцией (TC-NER), в результате мутаций в генах синдрома Коккейна группы А *CSA* и В (*CSB*), а также в генах группы комплементации пигментной ксеродермы *XPB*, *XPD* и *XPG*. Признаки ускоренного старения на клеточном уровне при синдроме Хатчинсона—Гилфорда были подробно описаны в 2006 г. (Scaffidi, Misteli, 2006), в то же время подробного описания маркеров старения при синдроме Коккейна до настоящего времени сделано не было.

Задача настоящей работы — изучить маркеры старения в клетках пациентов с синдромом Коккейна и сравнить их с аналогичными показателями при атаксии-телеангиэктазии и синдроме Хатчинсона—Гилфорда.

Материал и методика

Линии первичных фибробластов служили материалом для проведения работы. Использовали линии от трех здоровых доноров мужского пола — 8SP (19 лет), 9SP (32 года) и 10SP (75 лет), которые выступали в качестве контроля, и от двух мальчиков пробандов с клиническим диагнозом синдром Коккейна неустановленной группы комплементации — Cs3SP (7 лет) и Cs4SP (13 лет).

Получение первичной культуры фибробластов кожи проводили по стандартной методике. Биоптат кожи 5×5 мм из области предплечья донора механически диспергировали. Полученные фрагменты кожи помещали в чашку Петри под покровное стекло в полную ростовую питательную среду MEM (Sigma, США), содержащую 16 % сыворотки эмбрионов коров (Sigma, США), 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США), 25 мкг/мл фунгизона и 0.3 мг/мл L-глутамин. Материал культивировали, меняя питательную среду 1 раз в 4–7 сут, до достаточной конfluence фибробластов. При достижении необходимого монослоя клетки снимали с подложки с помощью 0.25%-ного раствора трипсин—ЭДТА (Gibco, США) и культивировали в пластиковых флаконах и на чашках Петри (Nunc, США) в среде MEM, содержащей 12 % фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Sigma, США), 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco, США), при 37 °С в атмосфере 5 % CO₂. В качестве маркеров старения использовали уже традиционную описанную панель (Спивак и др., 2015; Bernadotte et al., 2016.)

Активность SA-β-Gal выявляли с использованием фирменного набора Senescence-galactosidase staining kit (Cell Signalling Technology, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Об активности SA-β-Gal судили визуально по появлению синих гранул в цитоплазме клеток, после чего проводили подсчет доли клеток с высоким уровнем активности SA-β-Gal.

Непрямая иммунофлуоресценция. Клетки, выращенные в чашках Петри на покровных стеклах, промывали раствором PBS и фиксировали 4%-ным раствором параформальдегида в PBS 10 мин при 4 °С, после чего пермеабелизовывали 3%-ным раствором Тритона X-100 в PBS 5 мин при комнатной температуре. Затем клетки промывали PBS 3 раза по 5 мин и инкубировали в блокирующем растворе (5 % бычьего сывороточного альбумина (BSA) и 0.01% Tween-20 в PBS) 1 ч при комнатной температуре. После этого клетки последовательно инкубировали в растворе первых и вторых антител, разведенных в 0.1%-ном растворе BSA в PBS в течение 12 ч при 4 °С и 45 мин при 37 °С соответственно. В качестве первых антител использовали IgG мыши или кролика против белков γ-H2AX, p53-BP-1, SIRT1, SIRT6, Tri-Me-H3K9, Tri-Me-H3K27, HP1γ и ламина-A (Abcam, США). Вторые антитела — IgG козы, аффинные к Fc-фрагментам мыши или кролика, несущие флуоресцентную метку с Alexa 546 или Alexa 488 соответственно (Thermo Fisher Scientific, США). Полученные данные анализировали с помощью программы ImageJ (National Institutes of Health, 1997). Для количественной оценки интенсивности сигнала анализировали не менее 300 клеток каждой линии для каждого параметра в каждом эксперименте. Для этого получали цифровые изображения препаратов (8 бит, RGB, формат TIF) на инвертированном флуоресцентном микроскопе Leica DMI 6000 при помощи

программного пакета μManager (Micro-Manager Vale Lab, UCSF, США). Значения интенсивности флуоресценции меток измеряли при помощи программного пакета ImageJ (National Institutes of Health, США). Для подсчета aberrаций ядерной ламина ядра делили на три группы в зависимости от формы ядерной оболочки: с эллипсоидной формой (нормальные), с наличием инвагинаций и несущие блеб-структуры. Подсчитывали долю (в %) каждой группы в общем числе проанализированных клеток.

Для определения средней длины теломер в геноме применяли описанный метод (Cawthon, 2002), который основан на количественной полимеразной цепной реакции в реальном времени (кПЦР). Для измерения абсолютной длины теломер в исследуемых образцах, приходящейся на 1 геном, для каждого образца определяли отношение количества копий теломерных повторов к количеству копий участка ДНК, представленного в геноме 1 раз (T/S). Для этого одновременно проводили кПЦР для теломерной последовательности и фрагмента однокопийного гена рибосомного фосфопотеина PO-36B4, локализованного на 12-й хромосоме (Boulay, 1999). В качестве калибровочных растворов ДНК использовали растворы с известным количеством синтезированных олигонуклеотидов — фрагмента гена 36B4 (73 п. н.), а также олигонуклеотида (84 п. н.), состоящего из теломерной последовательности TTAGGG, повторенной 14 раз (O'Callaghan et al., 2008). Для каждого образца кПЦР проводили дважды. Для проведения кПЦР использовали прибор ABI Prism 7900 (Life Technologies, США) и коммерческий набор для ПЦР — ПЦР Буфер Б (ЗАО Синтол, Россия).

Использовали следующие праймеры к теломерной последовательности:

Tel1: 5'-CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT-3' и

Tel2: 5'-GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT-3';

последовательность праймеров к единичному гену 36B4:

прямой 5'-CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC-3'

и обратный 5'-CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A-3'.

Реакционные смеси для амплификации теломерной последовательности и гена 36B4 различались только праймерами. Состав смеси (20 мкл): 6.7 мкл деионизированной воды, 2 мкл 10-кратного ПЦР-буфера Б, 2 мкл дНТФ (2.5 мМ), 2 мкл MgCl₂ (25 мМ), по 1 мкл праймеров 1 и 2 (2 мМ), 0.1 мкл красителя SYBR GreenI, 0.2 мкл Taq ДНК-полимеразы (5 ед./мкл) и 5 мкл ДНК-матрицы (10 нг/мкл). После добавления всех компонентов реакционную смесь перемешивали на вортексе, капли собирали коротким центрифугированием и переносили в пробирки объемом 0.2 мл. Температурные режимы для кПЦР теломерной последовательности и гена 36B4 также не различались: 95 °С, 10 мин — 1 цикл, 95 °С, 15 с и 60 °С, 1 мин — 40 циклов.

После проведения кПЦР строили калибровочные прямые для теломерной последовательности и для гена,

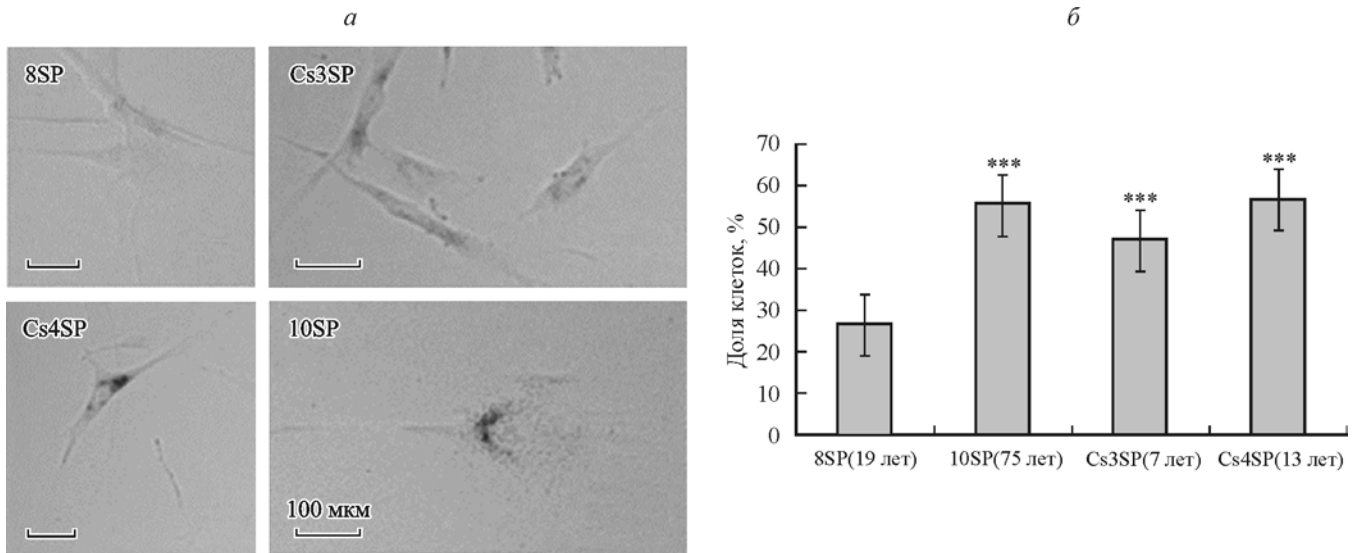


Рис. 1. Окраска клеток на β -галактозидазу, ассоциированную со старением (а), и доля окрашенных клеток (б) линий, полученных от здоровых доноров-мужчин в возрасте 19 (8SP) и 75 (10SP) лет, а также от двух мальчиков пробандов с клиническим диагнозом синдром Коккейна (СК) в возрасте 7 (Cs3SP) и 13 (Cs4SP) лет.

Контрольными считали линии клеток от здоровых доноров (8SP и 10SP). Здесь и на других гистограммах (рис. 2—6): звездочки показывают достоверные отличия от контроля при $P < 0.01$, вертикальные отрезки — ошибка среднего.

по которым определяли число копий теломерных повторов (Т) и единичного гена (S). Отношение Т/S, умноженное на 84 (длина фрагмента гена 36B4), отражает то, во сколько раз число нуклеотидов, входящих в теломерную последовательность, больше последовательности, представленной в геноме 1 раз, т. е. длину всей теломерной последовательности в геноме. Чтобы узнать длину теломер на одном конце хромосомы, полученное число делили на 46, так как в гаплоидном геноме ген представлен 1 раз, а теломеры — по две на каждой из 23 хромосом.

Статистическую обработку проводили в программном пакете Microsoft Excel 2010. Рассчитывали среднюю арифметическую величину и среднее квадратичное отклонение. Статистическую значимость различий между отдельными клеточными линиями оценивали при помощи t -критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $P = 0.01$.

Результаты

Для клеток в исследуемых линиях определили уровень относительной активности лизосомной β -галактозидазы (SA- β -gal), ассоциированной со старением, — традиционного маркера старения, описанного одним из первых. SA- β -gal имеет свойство накапливаться в стареющих клетках (Dimri et al., 1995; Lee et al., 2006). Визуализация накопления SA- β -gal показана на рис. 1. Максимальное число клеток с ярко выраженным накоплением SA- β -gal наблюдается в линии Cs4SP — пациента с клинически диагностированным синдромом Коккейна неустановленной группы комплементации. Доля клеток с высокой активностью SA- β -gal в этой линии в 2.1 раза выше, чем в контрольной линии 8SP ($P = 0.01$). В клетках линии Cs3SP доля клеток с высоким уровнем SA- β -gal выше, чем в клетках линии 8SP, в 1.6 раза, но ниже, чем в клетках линии 10SP, в 1.1 раза ($P = 0.01$) (рис. 1, б).

Весьма значимыми маркерами старения клетки принято считать фосфорилированную форму гистона H2AX (γ -H2AX) и p53-связывающий белок 1 (p53BP1). Эти белки образуют фокусы, легко детектируемые иммунофлуоресцентным окрашиванием, которые локализуются в районе двухнитевых разрывов ДНК, и, как правило, динамика белков p53BP1 и γ -H2AX совпадают. Наблюдаемые фокусы могут служить маркерами двухнитевых разрывов (Karlsson, Stenerlow, 2004; Tanaka et al., 2006) и наблюдаются в ядрах стареющих клеток в культуре, клеток пожилых людей и людей, страдающих синдромами ускоренного старения (Sedelnikova et al., 2004). Данные по накоплению фокусов γ -H2AX и p53BP1 приведены на рис. 2. Доля клеток, содержащих фокусы γ -H2AX и p53BP1, выше в клетках, полученных от больных синдромом Коккейна.

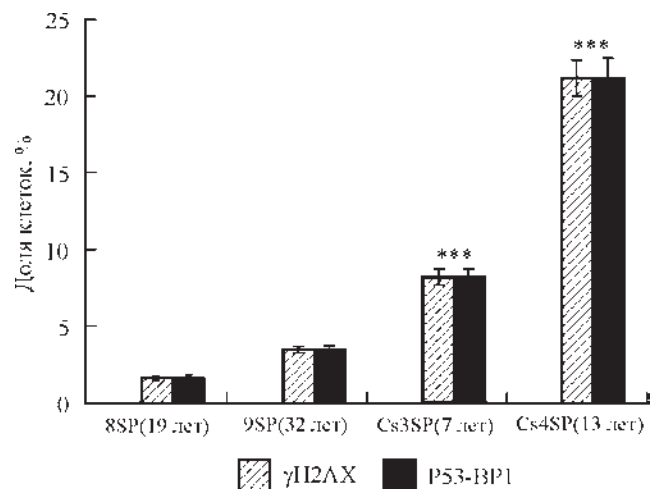


Рис. 2. Доля клеток, содержащих фокусы фосфорилированной формы гистона γ -H2AX и белка p53BP1, в клетках линий, полученных от здоровых доноров (8SP и 9SP) и больных синдромом Коккейна (Cs3SP и Cs4SP).

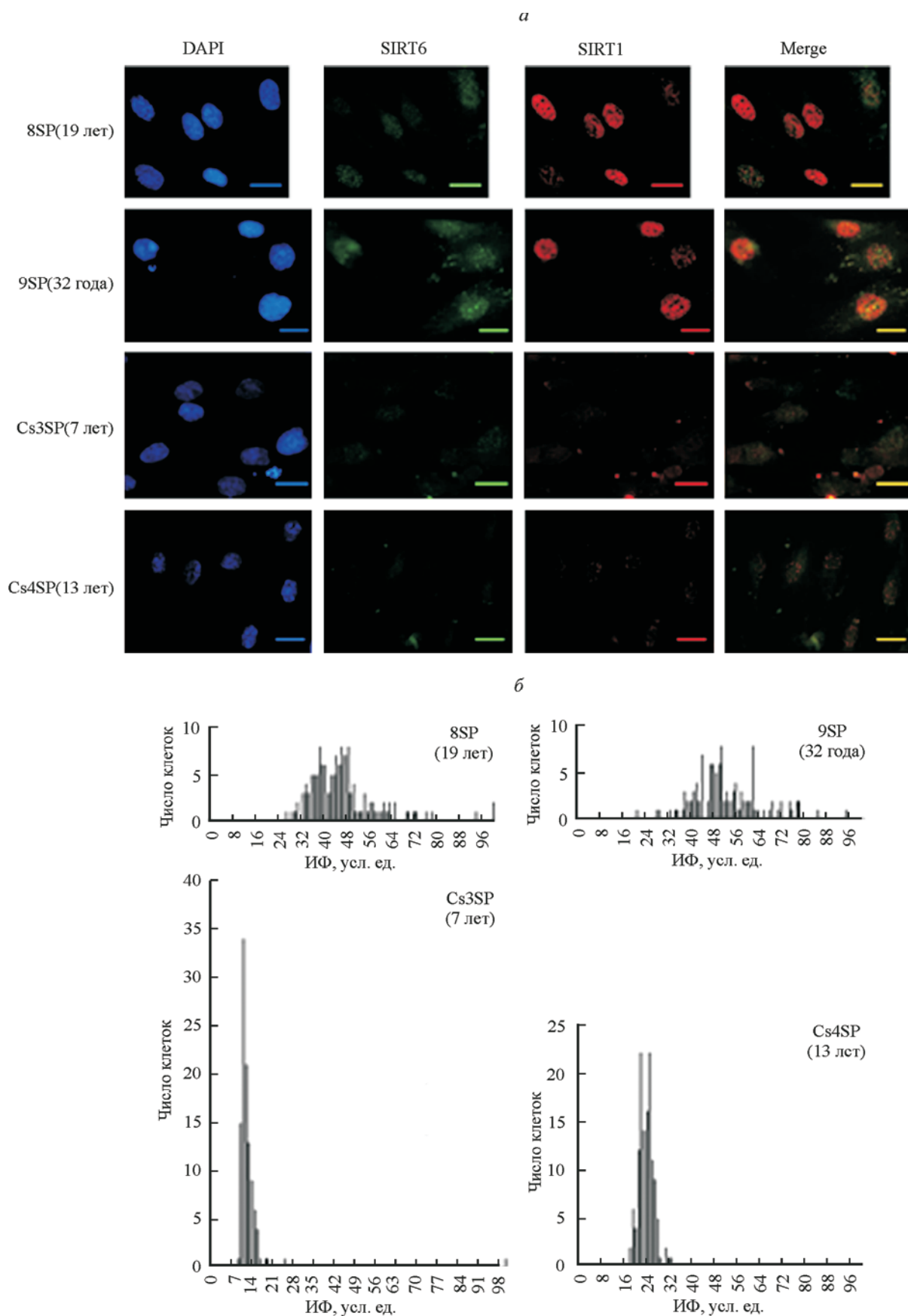


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции (ИФ) гистоновых деацетилаз SIRT1 и SIRT6 (a), распределение ИФ SIRT1 (б) и SIRT6 (в) в интактных ядрах клеток, а также средняя ИФ SIRT1 и SIRT6 (г) в клетках, полученных от здоровых доноров и больных СК.

Здесь и на рис. 4: масштабные отрезки (a) — 20 мкм, звездочки (г) указывают достоверность отличия от контроля при $P < 0.01$.

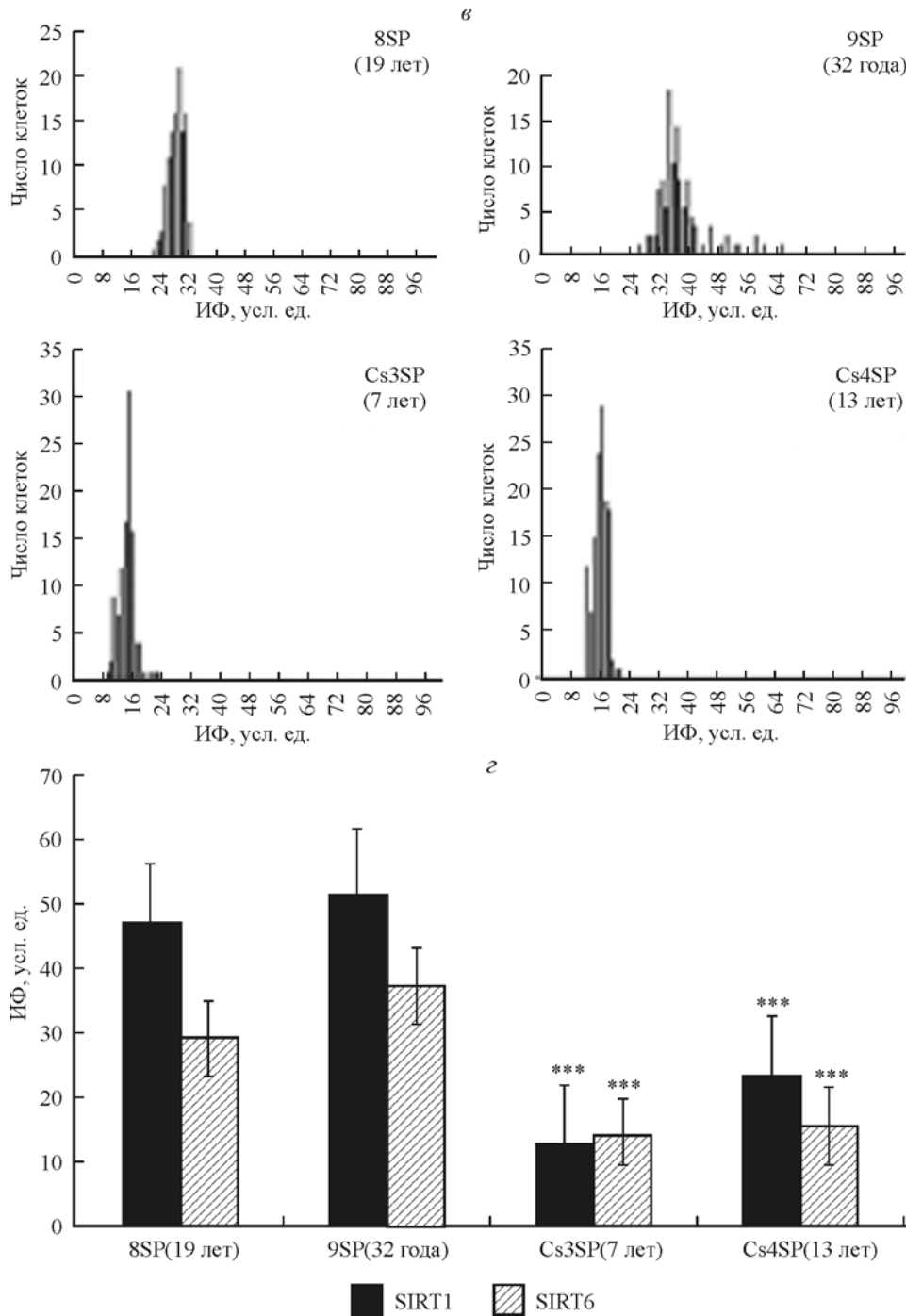


Рис. 3 (продолжение).

кейна, и возрастает, коррелируя с возрастом пациентов (Cs3SP — 7, Cs4SP — 13 лет). Также установлено, что фокусы γ -H2AX и p53BP1 в клетках исследованных линий колокализированы во всех случаях, и это позволяет утверждать, что сигнальный путь киназы ATM сохраняет функциональную активность в этих клетках. Доля клеток, содержащих фокусы γ -H2AX и p53BP1 в линиях Cs3SP и Cs4SP, превышает аналогичные показатели в линиях 8SP и 9SP.

При окрашивании клеток непрямой иммунофлуоресцентным методом с использованием антител к гистоновым деацетилазам SIRT1 и SIRT6 средняя интенсивность

флуоресценции в ядрах исследуемых линий различна. Для линий здоровых доноров она существенно выше, чем в клетках больных синдромом Коккейна (рис. 3, а). В то же время картина распределения уровней интенсивности флуоресценции в клетках разных линий довольно любопытна: в случае SIRT1 интенсивность флуоресценции в клетках здоровых доноров распределяется широким спектром, в то время как в клетках больных синдромом Коккейна выявляется ярко выраженный пик в диапазоне значений, соответствующих низкому уровню флуоресценции (рис. 3, б). В случае SIRT6 в клетках здоровых доноров наблюдаются похожий, но менее выражен-

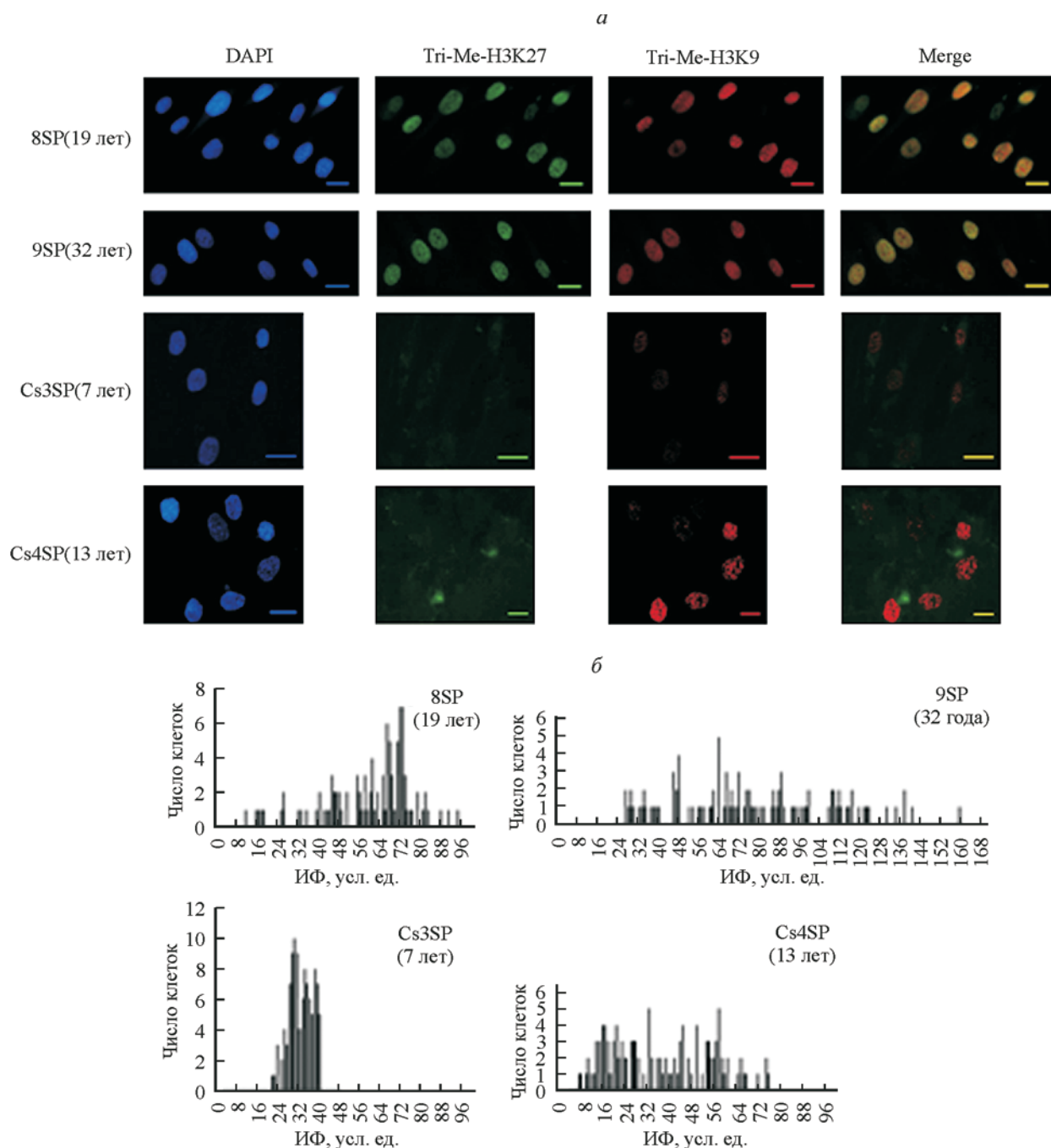


Рис. 4. Интенсивность флуоресценции (ИФ) триметилированных форм гистона H3 — Tri-Me-H3K9 и Tri-Me-H3K27 — в исследуемых линиях (*a*), распределение ИФ Tri-Me-H3K9 (*б*) и Tri-Me-H3K27 (*в*) в интактных ядрах клеток, а также средняя ИФ Tri-Me-H3K9 и Tri-Me-H3K27 (*г*) в клетках, полученных от здоровых доноров и больных СК.

ный пик значений и неширокий спектр распределения, в то время как клетки больных синдромом Коккейна демонстрируют точно такой же ярко выраженный пик, как и в случае с SIRT1 (рис. 3, *в*). Можно предположить, что данный пик может указывать на многочисленную популяцию стареющих клеток в исследуемых линиях (рис. 3, *в*).

При окрашивании клеток с использованием антител к триметилированным формам гистона H3 по лизину в 9-м (Tri-Me-H3K9) и 27-м (Tri-Me-H3K27) положениях с последующим измерением интенсивности флуоресценции были выявлены различия между исследуемыми клеточ-

ными линиями (рис. 4, *a*). Средний уровень флуоресценции выше в линиях 8SP и 9SP как для Tri-Me-H3K9, так и для Tri-Me-H3K27. Распределение уровней интенсивности флуоресценции в линиях 8SP и 9SP представляет собой широкий спектр, в то время как в линиях клеток больных синдромом Коккейна наблюдаются ярко выраженные пики в диапазоне низких значений интенсивности флуоресценции. Так, при распределении интенсивностей флуоресценции Tri-Me-H3K9 обнаружен широкий диапазон ее уровней, хотя более узкий, чем в контрольных линиях, и его пиковые значения расположены в области меньшей интенсивности, чем в контрольных лини-

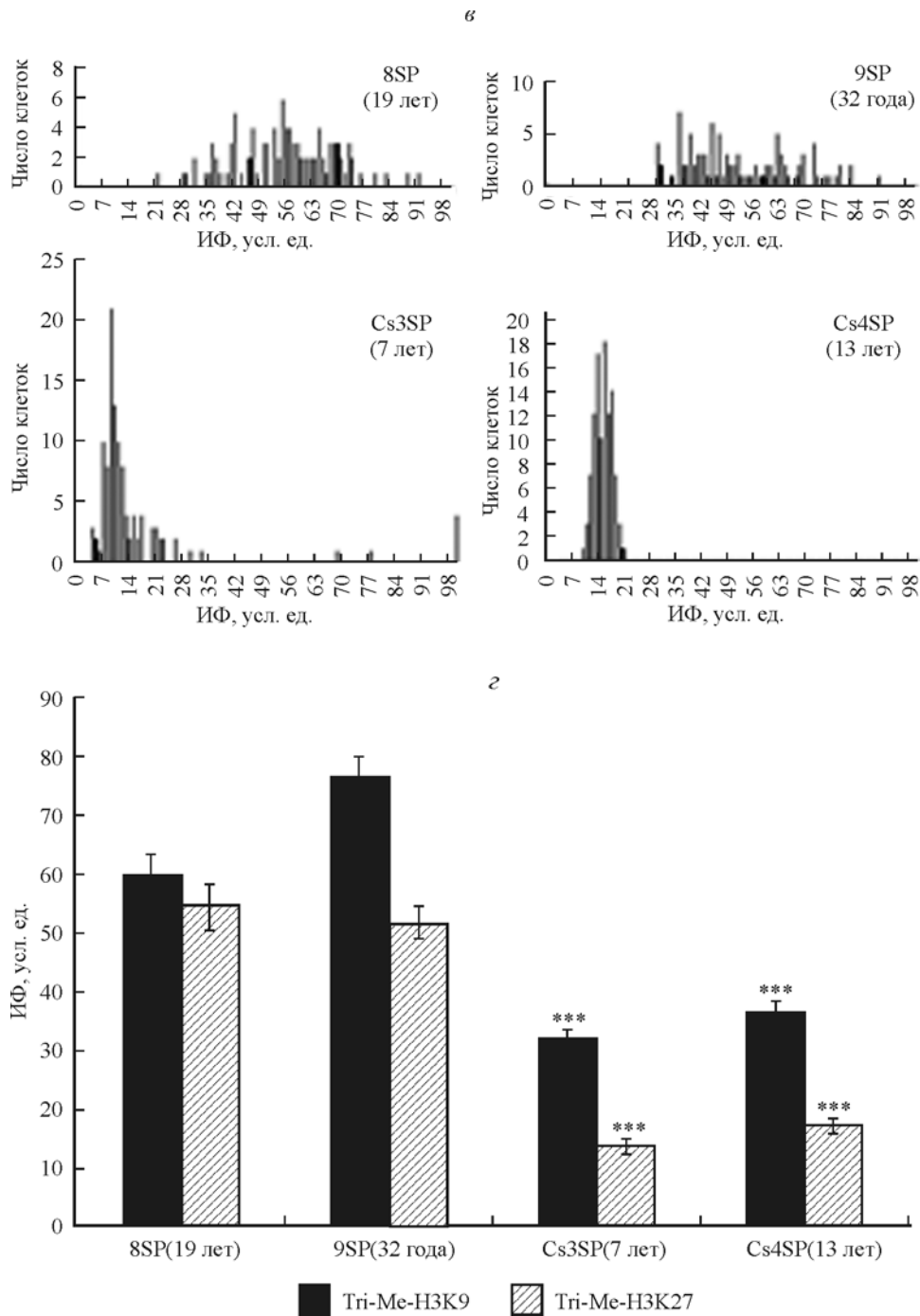


Рис. 4 (продолжение).

ях (рис. 4, б). Но распределение уровней интенсивности Tri-Me-H3K27 в линии Cs4SP также имеет выраженный пик (рис. 4, в). Данная картина распределений интенсивности флуоресценции очень похожа на таковую для SIRT1 и SIRT6. Разнообразие уровней флуоресценции в клетках здоровых доноров и ярко выраженные пики в клетках больных синдромом Коккейна наводят на мысль о существенной популяции активно стареющих клеток в линиях, полученных от больных синдромом Коккейна (рис. 4, з).

Окраска непрямым иммунофлуоресцентным методом с использованием антител к маркеру старения γ -изоформе белка HP1 (HP1- γ) выявила закономерные различия

между клетками здоровых доноров и клетками больных синдромом Коккейна (рис. 5). В клетках больных синдромом Коккейна средний уровень флуоресценции заметно ниже, чем в клетках здоровых доноров. На распределении уровней интенсивности флуоресценции видно, что в клетках здоровых доноров наблюдается относительно широкое распределение, близкое к нормальному, в то время как в клетках больных синдромом Коккейна распределение образует ярко выраженный пик в диапазоне низких уровней флуоресценции (рис. 5, а). В распределении уровней флуоресценции линии Cs4SP можно выделить отдельный пик в области низких значений флуоресценции. Поскольку механизм действия HP1 — генный

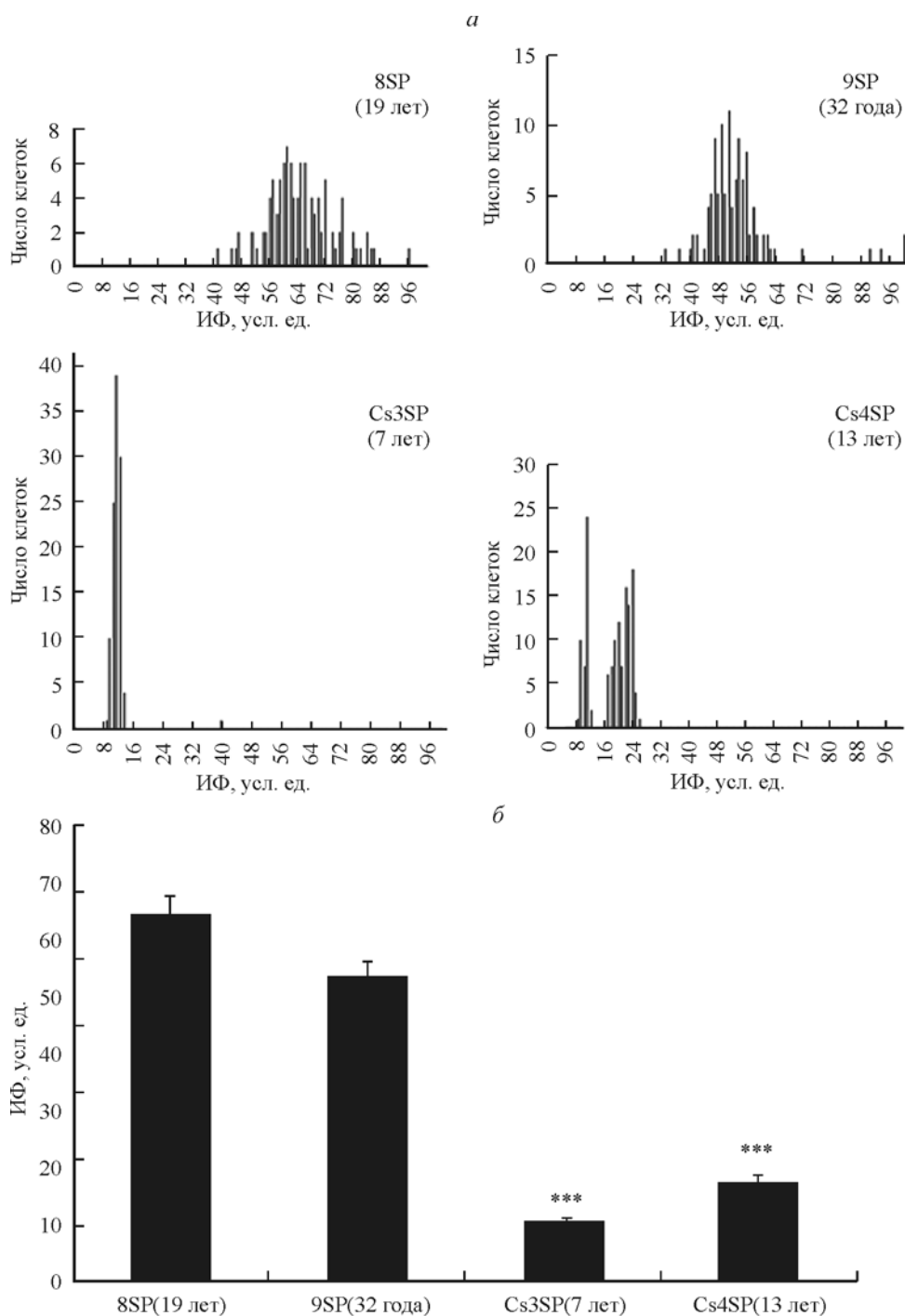


Рис. 5. Распределение интенсивности флуоресценции (ИФ) γ -изоформы белка HP1 (HP1 γ) в интактных ядрах клеток (а), а также средняя ИФ HP1 γ (б) в клетках, полученных от здоровых доноров и больных СК.

Звездочки — достоверность отличия от контроля при $P < 0.01$.

сайленсинг путем упаковки генов, активность которых не требуется, в неактивные гетерохроматиновые домены (Wang et al., 2000), приводит к падению уровня флуоресценции этого белка в клетках исследуемых линий, можно смело утверждать, что данный пик соответствует популяции активно стареющих клеток.

В 2006 г. в ходе исследования клеток больных синдромом Хатчинсона—Гилфорда, а также клеточных культур, полученных от престарелых доноров, были показаны структурные изменения ядерной ламины, наступив-

шие в результате аккумуляции прогерина — абберантного продукта гена *LMNA* (Scaffidi, Misteli 2006). Результаты, полученные этими авторами, позволяют считать структурные изменения ядерной ламины базовым процессом для индукции маркеров старения, ассоциированных с различными уровнями регуляции клеточных процессов.

При исследовании структуры ламины клеток больных синдромом Коккейна и здоровых доноров путем непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания антите-

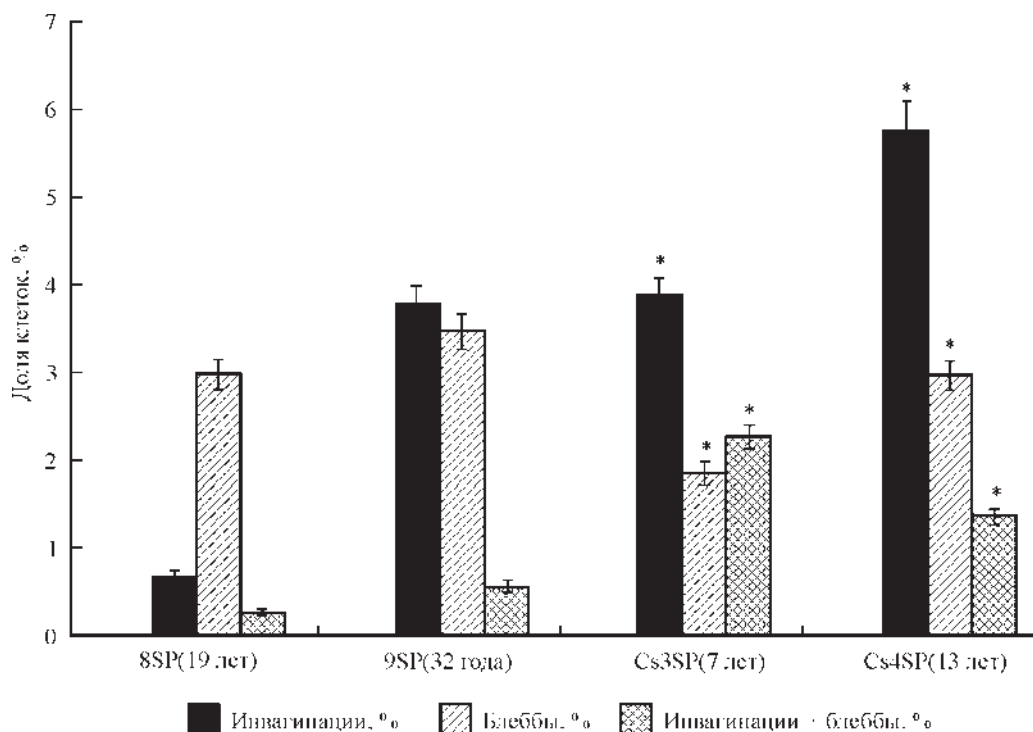


Рис. 6. Доля клеток с различными типами aberrаций ядерной ламины в исследуемых линиях.

Звездочка — достоверность отличия от контроля при $P < 0.05$.

лами к ламину А/С были получены следующие данные. Клетки здоровых доноров имеют наименьший уровень aberrаций ядерной ламины. В клетках больных синдромом Коккейна соотношение различных типов aberrаций варьирует, но суммарная доля клеток, подверженных aberrациям ядерной ламины, увеличивается с возрастом пациента (рис. 6).

Длина теломер в клетках больных, определенная по описанному (Cawthon, 2002) и позже усовершенствованному (O'Callaghan et al., 2008) методу, оказалась различной. Во-первых, в данном эксперименте помимо клеток молодых здоровых доноров участвовала линия, полученная от пожилого донора. Как и ожидалось, теломеры последнего оказались весьма короткими. Сложно судить о том, с чем связано подобное распределение, но скорее всего — с индивидуальной тяжестью протекания заболевания. Наблюдения проиллюстрированы в таблице.

Длина теломер, выделенных из клеток исследуемых линий

| Линия и возраст донора | Длина теломер, п. н. |
|------------------------------|-------------------------|
| 8SP, 19 лет (К) ^a | 8597 ± 12 |
| 9SP, 32 года (К) | 7775 ± 389 |
| 10SP, 75 лет (К) | 2967 ± 276 ^a |
| Cs3SP, 7 лет | 4781 ± 79 ^a |
| Cs4SP, 13 лет | 4927 ± 178 ^a |

Примечание. ^aДостоверность отличия от контрольной линии (К) и различия между двумя контрольными линиями при $P < 0.01$.

Обсуждение

Интерес к особенностям маркеров старения в клетках больных синдромом Коккейна возник в первую очередь из-за того, что в отличие от других заболеваний с нарушениями в процессах репарации ДНК пациенты при синдроме Коккейна реже страдают онкологическими осложнениями, чем при схожей по симптоматике и имеющей общие группы комплементации пигментной ксеродерме (Cleaver, Revet, 2008). Причина — в более низком уровне мутагенеза, вызванном повышенной гибелью клеток, подверженных повреждению ДНК, чем при пигментной ксеродерме, и как следствие — в уменьшении числа клеток с потенциальными мутациями (Reid-Bayliss et al., 2016). Связано это с особенностями работы спаренной с транскрипцией ветви эксцизионной репарацией нуклеотидов, нарушенной при данном синдроме. При нарушении работы белков CSA и CSB, приводящем к развитию синдрома Коккейна, невозможно удалить РНК-полимеразу II, «наткнувшуюся» на поврежденный участок ДНК в кодирующей нити, в результате чего физически невозможен сам процесс репарации при этом повреждении (Saijo, 2013). Данный факт вкупе с симптомами ускоренного старения позволяет предположить, что клетки больных синдромом Коккейна можно использовать в качестве модельных при изучении старения со сниженным риском получить искаженные данные из-за переродившихся клеток. К тому же часто высказывается предположение о том, что основным источником повреждений ДНК при синдроме Коккейна является утечка побочных продуктов окислительного фосфорилирования из митохондрий (Hoeijmakers, 2001; Barnes, Lindahl, 2004; Wallace, 2005; Koren, Kimchi, 2012; Scheibye-Knudsen et al., 2012). Это делает клетки больных синдромом Коккейна привлекательными в качестве моделей для тестирования некото-

рых геропротекторов, в частности митохондриально-адрированных антиоксидантов.

Сами маркеры старения при синдроме проявляют себя как при естественном здоровом старении. Длина теломер ниже, чем в контроле (молодой донор), и сравнима с длиной у пожилого донора. В клетках больных синдромами Хатчинсона—Гилфорда и атаксией-телеангиэктазией теломеры тоже значительно короче нормы (Allsopp et al., 1992; Wyllie et al., 2000). Мы можем утверждать, что длина теломер в клетках больных синдромом Коккейна свидетельствует об ускоренном старении данных клеток.

Исследованный уровень активности, ассоциированной со старением лизосомной SA- β -gal в клетках больных синдромом Коккейна, выше, чем в молодом контроле, и соизмерим с таковым в клетках пожилого донора. Поскольку ассоциированная со старением лизосомная β -галактозидаза (SA- β -gal) имеет свойство накапливаться в стареющих клетках (Dimri et al., 1995; Lee et al., 2006), это позволяет подтвердить, что клетки больных синдрома Коккейна действительно являются стареющими.

Накопление фокусов γ -H2AX и 53BP1 в клетках больных синдромом Коккейна выше, чем в клетках контроля. γ -H2AX, возможно, необходим для ремоделирования хроматина в области повреждения ДНК (Rogakou et al., 1998; Ward, Chen, 2001), и накопление фокусов γ -H2AX наблюдается в ядрах стареющих клеток в культуре клеток пожилых людей и людей, страдающих синдромами ускоренного старения (Sedelnikova et al., 2004). Белок 53BP1 играет важную роль в так называемом чекпойнт-ответе клетки на повреждение (Iwabuchi et al., 2008), и накопление его фокусов аналогично накоплению фокусов γ -H2AX является надежным маркером стареющих клеток. Белки в норме колокализуются, динамика появления и элиминации фокусов совпадает. В клетках больных синдромом Хатчинсона—Гилфорда также отмечено значительное накопление фокусов γ -H2AX, превышающее уровень данных фокусов в молодом контроле и соответствующее уровню накопления в клетках пожилых доноров (Scaffidi, Misteli, 2006). С учетом того, что синдром Хатчинсона—Гилфорда — классическая прогерия, можно утверждать, что синдром Коккейна также является прогерией.

В рамках настоящего исследования мы изучили количество триметилированных форм гистона H3 — как Me3-H3-K9, так и Me3-H3-K27 (маркеры конститутивного и факультативного гетерохроматина соответственно) (Peters et al., 2003; Martin, Zhang, 2005; Sarma, Reinberg, 2005). Уровень как Me3-H3-K9, так и Me3-H3-K27 заметно снижен в клетках больных синдромом Хатчинсона—Гилфорда (Scaffidi, Misteli, 2006). В клетках больных синдромом Коккейна так же достоверно снижены относительно контроля оба маркера, в то время как в клетках больных атаксией-телеангиэктазией уровень Me3-H3-K27 достоверно превышает уровень Me3-H3-K27 в контрольных линиях (Куранова и др., 2014). Высокий уровень Me3-H3-K27 наиболее характерен для опухолевых клеток (Varambally et al., 2002; Kleer et al., 2003; Abbosh et al., 2006), что согласуется с клинической картиной при атаксии-телеангиэктазии, сочетающейся признаками ускоренного старения и опухолевой трансформации (Lanzy et al., 1992; Спивак, 1999; Shiloh, 2003). Это в очередной раз приводит к выводу о том, что в случае синдрома Коккейна мы имеем ускоренное клеточное старение и сниженный риск опухолевой трансформации, по крайней мере по сравнению с клетками больных атаксией-телеангиэктазией, ис-

пользуемых в нашей лаборатории в качестве модельного объекта для изучения процессов старения и тестирования геропротекторов.

Еще одна группа маркеров старения, заинтересовавшая нас, — это сиртуины — семейство НАД-зависимых протеин-деацетилаз и АДФ-рибозил-трансфераз. Два белка этого семейства — SIRT1 и SIRT6 — считаются ассоциированными со старением: их количество в клетке достоверно падает как с увеличением пассажа первичных фибробластов, так и с возрастом донора. Оба белка оказывают сильное влияние на стабильность генома, помимо этого, SIRT1 регулирует эффективность метаболизма (Oberdoerffer et al., 2008; Wang et al., 2008; Nogueiras et al., 2012), а SIRT6 — NF- κ B-сигналинг и гомеостаз глюкозы, а также деацетилирование H3K9 (Kawahara et al., 2009; Kanfi et al., 2010; Zhong et al., 2010). В клетках больных синдромом Коккейна уровень как SIRT1, так и SIRT6 достоверно снижен относительно контроля и соответствует более «старому» фенотипу, т. е. снижение уровня SIRT1 и SIRT6 в клетках при синдроме Коккейна позволяет считать их ускоренно стареющими. Для сравнения — в клетках больных атаксией-телеангиэктазией уровень SIRT6 достоверно выше, чем в контроле (Куранова и др., 2014). Причина, по которой существует такое отличие, не до конца понятна, однако есть предположение о том, что SIRT6 специфически связан с протеинкиназой ATM или ее белками-мишенями (Куранова и др., 2014).

Очень важным маркером является белок гетерохроматина HP1 γ . Он консервативен, важнейшими его структурными элементами являются хромодомен (CD) и шадоухромодомен (CSD). Механизм действия HP1 γ — генный сайленсинг путем упаковки генов, чья активность не требуется, в неактивные гетерохроматиновые домены, а также образование SAHF (senescence associated heterochromatin focus) — особых доменов факультативного гетерохроматина, формирующихся при старении и стрессе, появление которых связывают с необратимым блоком клеточного цикла (Narita et al., 2003). Сайт связывания гетерохроматина для хромодомена HP1 γ обеспечивает Me3-H3-K27 (Wang et al., 2000). Благодаря исследованиям клеток больных синдромом Хатчинсона—Гилфорда HP1 γ признан одним из надежнейших маркеров стареющих клеток, так как снижается в клетках пожилых доноров и пациентов с синдромом Хатчинсона—Гилфорда (Scaffidi, Misteli, 2006). В клетках больных синдромом Коккейна уровень HP1 γ достоверно снижен по сравнению с контролем, а на графиках распределения множества клеток, несущих низкий уровень HP1 γ , образуются характерные пики.

Последним хотелось бы рассмотреть состояние ядерной ламины. Ядерная ламина — это оболочка ядра, состоящая из особых промежуточных филаментов — ламин. Мутация в гене, кодирующем один из ламин, приводит к таким заболеваниям, как синдром Хатчинсона—Гилфорда и синдром Нестора—Гильермо (De Sandre-Giovannoli et al., 2003; Eriksson et al., 2003; Cabanillas et al., 2011). Нарушения формы ядерной ламины и продукция прогерина — абберантной изоформы преламина А — наблюдаются и при нормальном старении человека (Scaffidi, Misteli, 2006; Ragnauth et al., 2010), поскольку укорочение теломер также приводит к усилению продукции прогерина (Cao et al., 2011). В клетках больных синдромом Коккейна уровень различных аббераций ядерной ламины достоверно выше, чем в контроле, толь-

ко в двух исследованных линиях из трех. В сравнении с состоянием ядерной ламины в клетках больных синдромом Хатчинсона—Гилфорда, при котором мутация в гене LMNA служит причиной, собственно, всей симптоматики ускоренного старения, накопление aberrаций ядерной ламины в клетках больных синдромом Коккейна выглядит незначительным и является скорее следствием старения клеток, чем причиной. Соотношение различных типов aberrаций ядерной ламины в клетках больных синдромом Коккейна не демонстрирует никакой закономерности и, скорее, отражает индивидуальные особенности течения заболевания.

Все изложенные данные показывают высокую степень ускоренного старения первичных фибробластов, полученных от пациентов с синдромом Коккейна. Это позволяет считать синдром Коккейна полноценной прогерией детей наравне с синдромом Хатчинсона—Гилфорда. При этом эти клетки растут в культуре лучше, чем первичные фибробласты пациентов с синдромом Хатчинсона—Гилфорда и, безусловно, могут быть использованы как надежная модель для изучения процессов нормально-го и ускоренного старения.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект 14-15-00943).

Список литературы

- Куранова М. Л., Плескач Н. М., Ледащева Т. А., Михельсон В. М. 2014. Мозаичные формы атаксии-телеангиэктазии. Цитология. 56(8) : 619—629. (Kuranova M. L., Pleskach N. M., Ledasheva T. A., Mikhelson V. M., Spivak I. M. 2015. Mosaic forms of ataxia telangiectasia. Cell Tissue Biol. (Tsitologiya). 9 : 53—63.)
- Спивак И. М. 1999. Наследственные заболевания с первичными и вторичными дефектами репарации ДНК. Цитология. 41(2) : 338—739. (Spivak I. M. 1999. Hereditary diseases with primary and secondary defects of DNA repair. Tsitologiya. 41 (2) : 338—739.)
- Спивак И. М., Хесина А. А., Спивак Д. Л. 2015. Старение и долголетие на клеточном и организменном уровнях. Saarbrücken: LAP Lambert Academic Publishing. 190 с. (Spivak I. M., Hesina A. A., Spivak D. L. 2015. Aging and longevity at the cellular and organic levels. Saarbrücken: LAP Lambert Acad. Publ. 190 p.)
- Abbosh P. H., Montgomery J. S., Starkey J. A., Novotny M., Zuhowski E. G., Egorin M. J., Moseman A. P., Golas A., Brannon K. M., Balch C., Huang T. H., Nephew K. P. 2006. Dominant-negative histone H3 lysine 27 mutant derepresses silenced tumor suppressor genes and reverses the drug-resistant phenotype in cancer cells. Cancer Res. 66 : 5582—5591.
- Allsopp R. C., Vaziri H., Patterson C., Goldstein S., Younglai E. V., Futcher A. B., Greider C. W., Harley C. B. 1992. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 89 : 114—118.
- Barnes D. E., Lindahl T. 2004. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells. Ann. Rev. Genet. 38 : 445—476.
- Bernadotte A., Mikhelson V. M., Spivak I. M. 2016. Markers of senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. Ageing (Albany NY). 8 : 3—11.
- Cabanillas R., Cadiñanos J., Villameytide J. A., Pérez M., Longo L., Richard J. M., Alvarez R., Durán N. S., Illán R. González D. J., López-Otín C. 2011. Néstor-Guillermo progeria syndrome: a novel premature aging condition with early onset and chronic development caused by BANF1 mutations. Amer. J. Med. Genet. 155A: 2617—2625.
- Cao K., Blair C. D., Faddah D. A., Kieckhafer J. E., Olive M., Erdos M. R., Nabel E. G., Collins F. S. 2011. Progerin and telomere dysfunction collaborate to trigger cellular senescence in normal human fibroblasts. J. Clin. Invest. 121 : 2833—2844.
- Cawthon R. M. 2002. Telomere measurement by quantitative PCR. Nucleic Acids Res. 30(10) : e47.
- Cleaver J. E., Revet I. 2008. Clinical implications of the basic defects in Cockayne syndrome and xeroderma pigmentosum and the DNA lesions responsible for cancer, neurodegeneration and aging. Mech. Ageing Develop. 129 : 492—497.
- De Sandre-Giovannoli A., Bernard R., Cau P., Navarro C., Amiel J., Boccaccio I., Lyonnet S., Stewart C. L., Munnich A., Le Merrer M., Lévy N. 2003. Lamin a truncation in Hutchinson—Gilford progeria. Science. 300 : 2055.
- Dimri G. P., Lee X., Basile G., Acosta M., Scott G., Roskelley C., Medrano E. E., Linskens M., Rubeljii I., Pereira-Smith O., Peacocke M., Campisi J. 1995. A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin *in vivo*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 92 : 9363—9367.
- Eriksson M., Brown W. T., Gordon L. B., Glynn M. W., Singer J., Scott L., Erdos M. R., Robbins C. M., Moses T. Y., Berglund P., Dutra A., Pak E., Durkin S., Csoka A. B., Boehnke M., Glover T. W., Collins F. S. 2003. Recurrent *de novo* point mutations in lamin A cause Hutchinson—Gilford progeria syndrome. Nature. 423 : 293—298.
- Hoeijmakers J. H. 2001. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. Nature. 411 : 366—374.
- Iwabuchi K., Matsui T., Hashimoto M., 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.
- Kanfi Y., Naiman S., Amir G., Peshti V., Zinman G., Nahum L., Bar-Joseph Z., Cohen H. Y. 2012. The sirtuin SIRT6 regulates lifespan in male mice. Nature. 483 : 218—221.
- 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.
- Kawahara T. L., Michishita E., Adler A. S., Damian M., Berber E., Lin M., McCord R. A., Ongaiqui K. C., Boxer L. D., Chang H. Y., Chua K. F. 2009. SIRT6 links histone H3 lysine 9 deacetylation to NF-kappaB-dependent gene expression and organismal life span. Cell. 136 : 62—74.
- Kleer C. G., Cao Q., Varambally S., Shen R., Ota I., Tomlins S. A., Ghosh D., Sewalt R. G., Otte A. P., Hayes D. F., Sabel M. S., Livant D., Weiss S. J., Rubin M. A., Chinnaiyan A. M. 2003. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 100 : 11 606—11 611.
- Koren I., Kimchi A. 2012. Promoting tumorigenesis by suppressing autophagy. Science. 338 : 889—890.
- Lanzky G., Ballotin U., Franciotta D., Maserati E., Pasquali F., Veggiotti P. 1992. Clinical, cytogenetic and immunological aspects in 4 cases resembling ataxia telangiectasia. Eur. Neurol. 23 : 121—125.
- Lee B. Y., Han J. A., Im J. S., Morrone A., Johung K., Goodwin E. C., Kleijer W. J., DiMaio D., Hwang E. S. 2006. Senescence-associated β -galactosidase is lysosomal β -galactosidase. Aging Cell. 5 : 187—195.
- Martin C., Zhang Y. 2005. The diverse functions of histone lysine methylation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 6 : 838—849.
- Narita M., Nunez S., Heard E., Narita M., Lin A. W., Hearn S. A., Spector D. L., Hannon G. J., Lowe S. W. 2003. Rb-mediated heterochromatin formation and silencing of E2F target genes during cellular senescence. Cell. 113(6) : 703—716.
- Nogueiras R., Habegger K. M., Chaudhary N., Finan B., Banks A. S., Dietrich M. O., Horvath T. L., Sinclair D. A., Pfluger P. T., Tschoep M. H. 2012. Sirtuin 1 and sirtuin 3 : physiological modulators of metabolism. Physiol. Rev. 92 : 1479—1514.
- Oberdoerffer P., Michan S., McVay M., Mostoslavsky R., Vann J., Park S. K., Hartlerode A., Stegmuller J., Hafner A., Loerch P., Wright S. M., Mills K. D., Bonni A., Yankner B. A., Scully R., Prolla T. A., Alt F. W., Sinclair D. A. 2008. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. Cell. 135 : 907—918.

- O'Callaghan N., Dhillon V., Thomas P., Fenech M. 2008. A quantitative real-time PCR method for absolute telomere length. *BioTechniques*. 44 : 807—809.
- Peters A. H., Kubichek S., Mechtler K., O'Sullivan R. J., Derrijck A. A., Perez-Burgos L., Kohlmaier A., Opravil S., Tachirana M., Shikai Y., Martens J. H., Jenuwein T. 2003. Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell*. 12 : 1577—1589.
- Ragnauth C. D., Warren D. T., Liu Y., McNair R., Tajsic T., Figg N., Shroff R., Skepper J., Shanahan C. M. 2010. Prelamin A acts to accelerate smooth muscle cell senescence and is a novel biomarker of human vascular aging. *Circulation*. 121 : 2200—2210.
- Reid-Bayliss K. S., Arron S. T., Loeb L. A., Bezrookove V., Cleaver J. E. 2016. Why Cockayne syndrome patients do not get cancer despite their DNA repair deficiency. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 113 : 10 151—10 156. Doi: 10.1073/pnas.1610020113.
- Rogakou E., Pilch D., Orr A., Ivanova V., Bonner W. 1998. DNA Double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem*. 273 : 5858—5868.
- Saijo M. 2013. The role of Cockayne syndrome group A (CSA) protein in transcription-coupled nucleotide excision repair. *Mech. Aging Develop.* 134 : 196—201. Doi: 10.1016/j.mad.2013.03.008
- Sarma K., Reinberg D. 2005. Histone variants meet their match. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6 : 139—149.
- Scaffidi P., Misteli T. 2006. Lamin A-dependent nuclear defects in human aging. *Science*. 312 : 1059—1063.
- Scheibye-Knudsen M., Ramamoorthy M., Sykora P., Maynard S., Lin P. C., Minor R. K., Wilson D. M. R., Cooper M., Spencer R., de Cabo R., Croteau D. L., Bohr V. A. 2012. Cockayne syndrome group B protein prevents the accumulation of damaged mitochondria by promoting mitochondrial autophagy. *J. Exp. Med.* 209 : 855—869.
- 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 unrepairable double-strand breaks. *Nat. Cell Biol.* 6 : 168—170.
- Shiloh Y. 2003. ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity. *Nature*. 3 : 155—168.
- 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.
- Varambally S., Dhanasekaran S. M., Zhou M., Barrette T. R., Kumar-Sinha C., Sanda M. G., Ghosh D., Pienta K. J., Sewalt R. G., Otte A. P., Rubin M. A., Chinnaiyan A. M. 2002. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*. 419 : 624—649.
- Wallace D. C. 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Ann. Rev. Gen.* 39 : 359—407.
- Wang G., Ma A., Chow Ch., 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.
- Wang R. H., Sengupta K., Li C., Kim H. S., Cao L., Xiao C., Kim S., Xu X., Zheng Y., Chilton B., Jia R., Zheng Z. M., Appella E., Wang X. W., Ried T., Deng C. X. 2008. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell*. 14 : 312—323.
- Ward I. M., Chen J. 2001. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J. Biol. Chem.* 276 : 47759—47762.
- Wyllie F. S., Jones C. J., Skinner J. W., Haughton M. F., Wallis C., Wynford-Thomas D., Faragher R. G., Kipling D. 2000. Telomerase prevents the accelerated cell ageing of Werner syndrome fibroblasts. *Nat. Genet.* 24 : 16—17.
- Zhong L., D'Urso A., Toiber D., Sebastian C., Henry R. E., Vadysirisack D. D., Guimaraes A., Marinelli B., Wikstrom J. D., Nir T., Clish C. B., Vaitheesvaran B., Iliopoulos O., Kurland I., Dor Y., Weissleder R., Shihai O. S., Ellisen L. W., Espinosa J. M., Mostoslavsky R. 2010. The histone deacetylase Sirt6 regulates glucose homeostasis via Hif1alpha. *Cell*. 140 : 280—293.

Поступила 17 XI 2017

AGING MARKERS IN THE CELLS OF PATIENTS WITH COCKAYNE SYNDROME. GENERAL AND INDIVIDUAL DIFFERENCIES

P. A. Slizhov,^{1,2,*} T. I. Dolinina,^{2,5} N. M. Pleskach,² S. V. Zhrebtsov,²
M. A. Bulatnikova,³ V. M. Mikhelson,^{2,**} I. M. Spivak^{2,4,5}

¹ A. I. Herzen State Pedagogical University of Russia, 191186,

² Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064,

³ Pokrovsky Bank of Stem Cells, St. Petersburg, 199106,

⁴ St. Petersburg State University, 199034, and

⁵ Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251;

* e-mail: maidel@bk.ru,

** mikhels@incras.ru

Cockayne syndrome is a rare autosomal recessive disease, described in the 1930s by Edward Alfred Cockayne. Patients suffer from cachexia dwarfism (when the weight is lowered compared to the norm even more than the growth), photosensitivity, deafness, various visual impairments: optic atrophy, cataracts, degeneration of the corneal epithelium, retinal injuries. The average life expectancy of patients with Cockayne syndrome is 12 years. In cells of patients with Cockayne syndrome, the process of nucleotide excision repair (NER), namely its branch coupled with transcription (transcription coupled repair, TCR, TC-NER) is disrupted. We have established that all the aging markers studied are strongly expressed in the cells of patients with Cockayne syndrome. Thus, the idea concerning Cockayne syndrome as a syndrome with expressed cellular signs of accelerated aging is confirmed. This allows us to consider Cockayne syndrome as a segmental progeria and use cell lines obtained from these patients as model objects for studying the processes of aging and testing geroprotectors.

Key words: Cockayne syndrome, pre-aging aging, segmental progeria, aging markers, telomeres.