

doi 10.18699/vjgb-26-18

Концепция природной реконструкции генома. Часть 4. Интеграция фрагментов экстраклеточной двуцепочечной ДНК в геном гемопоэтических стволовых клеток и формирование экстрахромосомальных интермедиатов

С.Г. Ошихмина ^{1,2*}, В.С. Рузанова ^{1*}, Г.С. Риттер ¹, Е.В. Долгова ¹, С.С. Кирикович ¹,
Е.В. Левитес ¹, Я.Р. Ефремов ¹, Т.В. Карамышева¹, А.С. Молодцева³, Я.В. Райцина^{1,2},
О.С. Таранов ⁴, С.В. Сидоров ^{2,5}, С.Д. Никонов⁶, О.Ю. Леплина ⁷, А.А. Останин ⁷,
Е.Р. Черных ⁷, Н.А. Колчанов ¹, А.С. Проскурина ^{1#}, С.С. Богачев ^{1#} 

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Новосибирский национальный государственный исследовательский университет, Новосибирск, Россия

³ Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

⁵ Городская клиническая больница № 1, Новосибирск, Россия

⁶ Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза, Новосибирск, Россия

⁷ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

 labmolbiol@mail.ru

Аннотация. Для оценки возможности интеграции в реципиентный геном гемопоэтических стволовых клеток экстраклеточных фрагментов двуцепочечной ДНК был сконструирован сложно составленный субстрат, состоящий из целого M13F-*AluI*-M13R фрагмента и двух его производных, появляющихся после гидролиза рестриктазами *EcoRI* и *HindIII*: M13F-*AluI*-*EcoRI* и M13R-*AluI*-*HindIII*. В субстрате была представлена последовательность полилинкера плазмиды pBlueScript+, отсутствующая в геноме человека, которая обрамляла клонированный по сайту *EcoRV* *AluI* фрагмент человека. Клетки костного мозга человека были обработаны ДНК сконструированного сложно составленного субстрата, и с учетом времени репарации пангеномных одноцепочечных разрывов из клеток выросших колоний получены препараты метафазных пластинок. Проведенная FISH выявила специфические сигналы свечения. Одновременно ДНК, выделенная из колоний, полученных из клеток костного мозга, обработанных сложно составленным субстратом, была секвенирована. Проведено два раунда секвенирования: полногеномное и селективное после таргетной гибридизации на металлических бусах. Полученные результаты свидетельствуют, что гомологичный обмен между экстрахромосомальной и хромосомной ДНК возможен. Также возможна интеграция в геном по механизму одностороннего отжига, с участием микрогомологий. Обнаружены интермедиаты с одним концом фрагмента, интегрированным в геном по участку микрогомологии, и другим концом фрагмента, свободно свисающим в межхромосомное пространство. Проведена прямая оценка возможности интеграции TAMRA-меченых фрагментов двуцепочечной ДНК человека и *E. coli* в реципиентный геном на модели клеток костного мозга человека. Обнаружено, что специфические сигналы гомологичной ДНК распределены по телу хромосом (модель клеток костного мозга человека). Сигналы негомологичной ДНК *E. coli* преимущественно сконцентрированы в центромерных районах хромосом. Соотношение количества полученных ридов с элементами интеграции и сигналов FISH предполагало существование прочного взаимодействия экстраклеточных фрагментов и ДНК хромосом. В экспериментах показано, что линейная плазмидная ДНК после интернализации в гемопоэтические стволовые клетки формирует кольцо мономера. Интернализованная во внутриклеточное пространство экстраклеточная плазмидная ДНК выделяется совместно с ДНК хромосом после жестких процедур очистки и фракционирования. Этот факт предполагает существование прочного кольцевого ассоциата ДНК плазмиды и ДНК хромосом, сформированного без участия белкового каркаса в форме закольцованной хромосомной нити.

Ключевые слова: FISH; полногеномное секвенирование; интеграция в геном; экстрахромосомальные кольцевые структуры

Для цитирования: Ошихмина С.Г., Рузанова В.С., Риттер Г.С., Долгова Е.В., Кирикович С.С., Левитес Е.В., Ефремов Я.Р., Карамышева Т.В., Молодцева А.С., Райцина Я.В., Таранов О.С., Сидоров С.В., Никонов С.Д., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Проскурина А.С., Богачев С.С. Концепция природной реконструкции генома. Часть 4. Интеграция фрагментов экстраклеточной двуцепочечной ДНК в геном гемопоэтических стволовых клеток и формирование экстрахромосомальных интермедиатов. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2026;30(2):163-180. doi 10.18699/vjgb-26-18

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в Институте цитологии и генетики СО РАН (государственный бюджетный проект № FWNR-2026-0025) и при поддержке И.Н. Зайцевой и А.А. Пуртова.

Concept of natural genome reconstruction.

Part 4. Integration of extracellular double-stranded DNA fragments into the genome of hematopoietic stem cells and the formation of extrachromosomal intermediates

S.G. Oshikhmina ^{1, 2*}, V.S. Ruzanova ^{1*}, G.S. Ritter ¹, E.V. Dolgova ¹, S.S. Kirikovich ¹, E.V. Levites ¹, Y.R. Efremov ¹, T.V. Karamysheva¹, A.S. Molodtseva³, Y.V. Raitsina^{1, 2}, O.S. Taranov ⁴, S.V. Sidorov ^{2, 5}, S.D. Nikonov⁶, O.Y. Leplina ⁷, A.A. Ostanin ⁷, E.R. Chernykh ⁷, N.A. Kolchanov ¹, A.S. Proskurina ^{1#}, S.S. Bogachev ^{1#} 

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

³ Institute of Molecular and Cellular Biology of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rosпотребнадзор, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

⁵ City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russia

⁶ Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Novosibirsk, Russia

⁷ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

 labmolbiol@mail.ru

Abstract. To assess the possibility of integrating extracellular double-stranded DNA fragments into the recipient genome of hematopoietic stem cells, a complex substrate was constructed consisting of the entire M13F-*Alu*-M13R fragment and its two restrictive derivatives, appearing after hydrolysis with restriction endonucleases EcoRI and HindIII: M13F-*Alu*-EcoRI and M13R-*Alu*-HindIII. The substrate contained a pBlueScript+ plasmid polylinker sequence, absent in the human genome, which framed the human *Alu* fragment cloned at the EcoRV site. Human bone marrow cells were treated with the DNA of the constructed complex substrate; taking into account the repair time of pangenomic single-strand breaks, preparations of metaphase plates were obtained. FISH revealed specific fluorescent signals. Simultaneously, DNA isolated from colonies obtained from bone marrow cells treated with a complex substrate was sequenced. Two rounds of sequencing were carried out: whole-genome and selective after targeted hybridization on metal beads. The results obtained indicate that homologous exchange between extrachromosomal and chromosomal DNA is possible. Integration into the genome via the single-strand annealing mechanism, involving microhomologies, is also possible. Intermediates were discovered that suggest the existence of an unusual integration into the genome at the nick of one end of the fragment and the other end of the fragment hanging freely into the interchromosomal space. A direct assessment of the possibility of integrating TAMRA-labeled fragments of fragmented human DNA and *E. coli* DNA into the genome of recipient cells was carried out using a human bone marrow cell model. The results obtained indicate that specific signals of homologous DNA are distributed throughout the chromosome body (human bone marrow cell model). Signals from nonhomologous *E. coli* DNA are predominantly concentrated in the centromeric regions of chromosomes. The ratio of the number of obtained reads with integration elements and FISH signals suggested the existence of a strong interaction between extracellular fragments and chromosomal DNA. Experiments have been conducted showing that linear plasmid DNA, after internalization into hematopoietic stem cells, forms a monomer ring. Internalized into the intracellular space, extracellular plasmid DNA is isolated together with chromosomal DNA after stringent purification and fractionation procedures. This fact suggests the existence of a strong ring associate of plasmid DNA and chromosome DNA formed without the participation of a protein framework in the form of a looped chromosomal strand.

Key words: FISH; whole genome sequencing; integration into the genome; extrachromosomal ring structures

For citation: Oshikhmina S.G., Ruzanova V.S., Ritter G.S., Dolgova E.V., Kirikovich S.S., Levites E.V., Efremov Y.R., Karamysheva T.V., Molodtseva A.S., Raitsina Y.V., Taranov O.S., Sidorov S.V., Nikonov S.D., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Proskurina A.S., Bogachev S.S. Concept of natural genome reconstruction. Part 4. Integration of extracellular double-stranded DNA fragments into the genome of hematopoietic stem cells and the formation of extrachromosomal intermediates. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed.* 2026;30(2):163-180. doi 10.18699/vjgb-26-18

Введение

В первых частях работы провозглашается и доказывается следующая концепция. Фрагменты экстраклеточной двуцепочечной ДНК (дцДНК) – молекулы линейной ДНК любого происхождения, размером от одного до нескольких нуклеосомных мономеров (200–2000 п. н. и более), доставляются в гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) естественным природным механизмом. Интернализация обеспечивается общим положительным зарядом ГСК, который определяется специфическими белкам гликокаликса ГСК (Dolgova et al., 2012; Petrova et al., 2022; Ritter et al., 2022). В процессе мобилизации и интернализации

участвуют белки, несущие в своей структуре гепарин-связывающий домен или кластеры положительно заряженных аминокислот. Доставленная в клетку дцДНК инициирует образование пангеномных одноцепочечных разрывов, которые, в свою очередь, служат триггером процесса терминальной дифференцировки ГСК (Рузанова и др., 2024).

Процесс терминальной дифференцировки связан с реорганизацией структуры хроматина высшего порядка (Рузанова и др., 2024). Он является причиной активации в клетке рекомбиногенной ситуации, ферментативная машина которой определяет возникновение и репарацию пангеномных одноцепочечных разрывов и становление

клетки на путь развития специфического гемопоэтического ростка (Jacobson et al., 1975; Farzaneh et al., 1982; Johnstone, Williams, 1982).

Рекомбиногенная ситуация представляет собой состояние клетки, в которой активированы механизмы метаболических превращений ДНК хроматина. К таким процессам относятся активация надзирающих киназ, модуляция клеточного цикла, репликативный стресс, активация репарационно-рекомбинационного механизма. В структуру последнего входит ферментативная машина механизма, а также ДНК субстраты, которые формируют метаболические интермедиаты ДНК ядра. В совокупности этот процесс для случая появления пангеномных одноцепочечных разрывов определяет восстановление непрерывности и корректность первичной последовательности ДНК хромосом на всем ее протяжении (Лихачева и др., 2008; Рузанова и др., 2024).

Фрагменты ДНК, попавшие в клетку, инициируют образование ников (Рузанова и др., 2024), индуцирующих рекомбиногенную ситуацию, и, таким образом, именно эти фрагменты служат триггером развития масштабных изменений в клетке. Молекулярная машина, инициирующая начало процесса, и причинно-следственные связи между факторами, запускающими механизм инициации, неизвестны.

История поведения внехромосомной, не вирусной ДНК в клетке начинается с работ 80-х годов прошлого века (Smith, Berg, 1984). В настоящее время эта тема не доминирует в исследованиях. Существует незначительное количество работ, характеризующих процессы, происходящие в клетке при попадании в нее фрагментов дцДНК, и описывающих, какие пути клеточного мониторинга при этом активируются.

В литературе приводятся сведения об активации систем контроля прогрессии клеточного цикла в ответ на появление в ядерном пространстве ДНК в форме синтетических олигонуклеотидов, ДНК SV40, апоптозных телец (Yakubov et al., 1989; Holmgren et al., 1999). Описываются молекулярные события, происходящие при интернализации плазмидных ДНК искусственными методами (Smith, Berg, 1984; Lin J. et al., 1985; Thomas et al., 1986). Известно несколько работ, свидетельствующих об активации контрольных точек клеточного цикла при интернализации в ядро синтетических олигонуклеотидов (dA/dT)₇₀. Наблюдаемая при этом активация молекулярной машины в отсутствие каких-либо повреждений геномной ДНК или aberrантной репликации свидетельствует о том, что структуры синтетических спаренных олигонуклеотидов, по-видимому, мимикрируют возникающие интермедиаты. Эти структуры могут быть представлены одноцепочечной ДНК, тупыми двуцепочечными концами, соединениями одноцепочечного участка и дуплекса и крестообразными формами. Предполагается, что при спаривании олигонуклеотидов образуются концы молекулы ДНК спаренных фрагментов, которые являются индукторами ATM/ATR-зависимого механизма контроля клеточного цикла, в котором участвуют такие регуляторы активности иерархических киназ, как RPA, RAD1, TopBP1, клапсин

(Yoo et al., 2004, 2006; MacDougall et al., 2007; Zou, 2007). В работах, анализирующих молекулярные события, происходящие при интернализации ДНК, указывается на тот факт, что одноцепочечные фрагменты ДНК не вызывают активации контролирующих систем клетки (Kumagai, Dunphy, 2000). Проведенный анализ минимального количества линейных молекул, способных индуцировать остановку клеточного цикла, показал, что более 30 молекул, содержащих структуры оцДНК/дуплекс, активируют достаточный ответ, необходимый для определения уровня фосфорилирования Chk1 (MacDougall et al., 2007). Если в экстрахромосомальном пространстве ядра находится менее 30 линейных фрагментов ДНК, система мониторинга стрессовых ситуаций клетки остается спокойной. Это значит, что такое количество линейных молекул ДНК может попадать в ядро, не активируя систему иерархических киназ, и, возможно, является нормой транзитного присутствия экстраклеточных фрагментов, циркулирующих в плазме крови.

Известно, что локализованные в клетке линейные фрагменты экстраклеточной дцДНК сшиваются один с другим, формируя конкатемерные и кольцевые структуры размером до 10 т.п.н. (Perucho et al., 1980; Lin J. et al., 1985; Lin Y., Waldman, 2001; Rogachev et al., 2006; Potter et al., 2017, 2024). Также установлено, что находящиеся в ГСК линейные фрагменты плазмидной ДНК процессируются на глубину до 1 т.п.н. и лигируются в кольцо (Dolgova et al., 2013). Вместе это означает, что фрагменты экстраклеточной дцДНК, находящиеся в клетке, активируют репарационно-рекомбинационные процессы. Именно такой факт был экспериментально показан в работе (Pierandrei et al., 2016), где с использованием платформы RT2 Profiler PCR Array (SABioscience, Qiagen) был проведен анализ экспрессии 84 генов при трансфекции в клетку экстраклеточных фрагментов дцДНК. Оказалось, что доставленные в клетку фрагменты дцДНК активируют гены различных клеточных систем, включая как гены репарации и гомологичной рекомбинации ДНК, так и гены, регулирующие клеточный цикл и эпигенетические модификации. То есть в напряженное состояние приводятся основные молекулярные системы, регулирующие клеточный ДНК метаболизм.

Ники, так же как и двуцепочечные концы доставленных в ядро экстраклеточных фрагментов, являются триггером репарации и рекомбиногенной ситуации (Vriend, Krawczyk, 2017; Maizels, Davis, 2018). Механизмы и факторы, активируемые этими двумя триггерными структурами, различны, хотя и имеют пересекающиеся сигнальные пути (Рузанова и др., 2024). Таким образом, в клетке появляются два метаболита ДНК (ники в ДНК хромосом и двуцепочечные концы доставленных в ядро экстраклеточных фрагментов), запускающих однонаправленные репарационно-рекомбинационные процессы. Очевидно, что факторы обоих процессов будут вступать в определенные молекулярные взаимоотношения, о которых ничего не известно. Возможность такого сценария в рамках рассматриваемой концепции требует дальнейших глубоких исследований.

Интернализация фрагментов в клетку с использованием различных способов трансфекции представляет рутинную процедуру. Более того общеприят способ получения нокаутов, за который три независимых исследователя, Марио Капекки (Mario R. Capecchi), Оливер Смитис (Oliver Smithies), а также сэр Мартин Эванс (Martin J. Evans), в 2007 г. получили Нобелевскую премию. Подход основан на том, что фрагменты дцДНК в ядре будут находить своего гомолога и рекомбинировать с ним, внося нокаутную мутацию. То есть процесс естественного обмена генетической информацией между экстрахромосомальной ДНК и ДНК хроматина объективно существует и является имманентным свойством метаболической активности клетки, связанным со взаимодействием ДНК хроматина и внехромосомной ДНК (Perucho, Wigler, 1981; Kucherlapati et al., 1984; Smithies et al., 1985; Murnane et al., 1990; Hastings et al., 1993; Leung et al., 1997; Li et al., 2001; Lin Y., Waldman, 2001).

Фрагменты дцДНК, попавшие в ядро, становятся участниками событий, ими же и активированных. Появление в ядре рекомбиногенных ников и рекомбиногенных двуцепочечных концов с неизбежностью запускает рекомбинационные процессы, результатом которых, как мы предполагаем, будет фиксация в клетке новой генетической информации, содержащейся в интернализированных дцДНК фрагментах исходно внеклеточной локализации.

В настоящей части исследования была оценена возможность интеграции фрагментов экстраклеточной ДНК в геном ГСК и формирование кольцеобразных ассоциатов между ДНК фрагментов и ДНК хромосом.

Материалы и методы

Клетки костного мозга человека. В работе были использованы клетки криоконсервированного сепарата костного мозга больных лимфомой Ходжкина, предоставленного криобанком Научно-исследовательского института фундаментальной и клинической иммунологии (НИИФКИ). В Клинике иммунопатологии НИИФКИ в отделении гематологии с блоком трансплантации костного мозга проводится лечение больных гемобластомами высокодозной химиотерапией и трансплантацией аутологичных или аллогенных периферических ГСК. При заготовке периферических стволовых клеток наряду с основным продуктом «афереза» (который трансплантируется пациенту) заготавливается два-три образца (пробирки-спутники) сепарированных клеток для контроля качества продукта «афереза» и научных исследований. Такие образцы вместе с основным использовались в настоящей работе. Каждый образец сепарата костного мозга, включая образцы-спутники, сопровождается необходимым пакетом документов, включающим информированное согласие, протокол исследований материала костного мозга, протокол лечения, которые подписываются пациентом в соответствии с установленными нормами. После проведенного лечения образцы-спутники утилизируются согласно СанПиН или используются в научных целях. Документы, сопровождающие каждый забор материала костного мозга, хранятся в

архиве криобанка НИИФКИ и могут быть востребованы по официальному запросу.

AluI двуцепочечный ДНК зонд. Амплификацию *AluI* повтора человека (M13F-*AluI*-M13R фрагмент) проводили с помощью ПЦР. Матрица представляла собой ДНК *AluI* повтора, клонированного в плазмиде pUC19, включающего начало и конец tandemно повторяющихся последовательностей AluJ и AluY (NCBI: AC002400.1, 53494–53767) (Dolgova et al., 2012). Для амплификации использовали стандартные праймеры M13 (M13 for: 5' GTAAAACGACGGCCAGT 3', M13 rev: 5' CAGGAAA CAGCTATGAC 3') или специфические *AluI* праймеры (Dolgova et al., 2012). ПЦР фрагмент пересаждали 0.1 V NaAc 3 M, pH 5.2, и 1 V изопропанола в течение 10 мин при –20 °C с последующим центрифугированием. Осадок промывали в 70 % этаноле и растворяли в стерильной воде.

Препараты ДНК. Препарат hDNA^{gt} (реконструктор ДНК генома человека) представляет собой двуцепочечную ДНК человека в виде фрагментов размером 200–2000 п. н. hDNA^{gt} выделяли из плацент здоровых женщин, фрагментировали ультразвуковой дезинтеграцией до размеров 200–2000 п. н., депротеинизировали обработкой протеиназой K и подвергали фенол/хлороформной экстракции.

ДНК человека получали из плацент здоровых женщин аналогичным образом, без фрагментации.

ДНК *E. coli* выделяли стандартным способом с использованием лизоцима, ультразвукового разрушения клеток, депротеинизации протеиназой K и фенол/хлороформной экстракции.

Конструирование зонда для обработки клеток костного мозга. Для анализа возможной негомологичной интеграции и/или гомологичного обмена был сконструирован зонд, состоящий из *AluI* фрагмента, встроенного в полилинкер pBlueScript+ (pBS) по EcoRV сайту, и ограниченный последовательностями, простирающимися до сайтов посадки M13 праймеров и включающими эти сайты. В экспериментах по интернализации использовали смесь целого фрагмента M13F-*AluI*-M13R и двух его производных после гидролиза рестриктазами EcoRI и HindIII, M13F-*AluI*-EcoRI и M13R-*AluI*-HindIII.

Для анализа возможной прямой интеграции фрагментированная геномная ДНК человека и *E. coli* метилась нуклеотидом, содержащим флуорохром TAMRA, с добавлением праймера со случайной последовательностью (стат-праймера) в реакции амплификации с Taq-полимеразой (ООО «Медиген»).

Анализ интернализации TAMRA-меченого M13F-*AluI*-M13R ПЦР фрагмента в клетки карциномы Эрлиха производился как описано в статье (Ruzanova et al., 2022).

FISH проводили по стандартной процедуре с TAMRA-меченым зондом по методике, описанной в Приложении 1¹. Результаты FISH анализировали на микроскопе AXIOSKOP 2 Plus (Zeiss, Германия). Для регистрации и обработки микроизображений использовали CCD-камеру (CoolCube 1, MetaSystems, Германия), набор фильт-

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2026-30/appx11.pdf>

пов Set 49 (G 365, FT 395, BP 445/50) (Zeiss, Германия), ET-orange #1 (ET 546/22 x ET 590/33) (Chroma, США), программное обеспечение ISIS5 (MetaSystems, Германия). Количество проанализированных метафазных пластинок варьировало от 14 до 30 для разных групп.

Культивирование клеток костного мозга в метилцеллюлозной среде. Аспираты костного мозга получали из криобанка НИИФКИ. При стандартной процедуре заморозки до 90 % клеток костного мозга (включая CD34+ клетки, согласно FACS анализу) сохраняют свою жизнеспособность, что позволяет использовать этот материал без дополнительной верификации.

Клетки костного мозга человека, находящиеся в составе аспирата, отмывали средой RPMI и вводили в эксперимент. Контрольные клетки и образцы клеток, обработанные зондами, осаждали в течение 10 мин при 400g и ресуспендировали в среде IMDM+2 % FBS. Для количественного определения и анализа миелоидных предшественников обработанные клетки и клетки контрольного образца помещали в метилцеллюлозную среду MethoCult H4034 (Stem Cell Technologies). Культивирование клеток проводили в среднем 10–15 дней, в зависимости от целей эксперимента. Анализ и выделение клеток из метилцеллюлозной среды после культивации выполняли согласно инструкции производителя.

Таргетное секвенирование. Для секвенирования использовали ДНК, выделенную из клеток, обработанных сложно составленным зондом: M13F-*AluI*-M13R, M13F-*AluI*-EcoRI и M13R-*AluI*-HindIII. Обогащение библиотеки проводили путем гибридизации с биотинилированной ДНК полилинкера плазмиды pBS, иммобилизованной на Dynabeads® Streptavidin магнитных частицах (Life Technologies, США) по методу (Maricic et al., 2010). Секвенирование осуществляли на платформе Illumina MiSeq (TruSeq® DNA Sample Preparation Kit (Illumina)) с MiSeq Reagent Kit v2 (300 cycle).

Полногеномное секвенирование. Для секвенирования была взята ДНК, выделенная из клеток, обработанных сложно составленным зондом: M13F-*AluI*-M13R, M13F-*AluI*-EcoRI и M13R-*AluI*-HindIII. Секвенирование было произведено на приборе NovaSeq 6000 (Illumina) с длиной прочтения 2×150 п.н. Величина Q30 составила не менее 90 %. Для подготовки библиотек использовали набор “TruSeq Nano DNA Library Prep kit” (Illumina). Ультразвуковую фрагментацию ДНК выполняли на приборе ME220 Focused-ultrasonicator (Covaris). Качество ДНК-библиотеки определяли с помощью капиллярного электрофореза на приборе TapeStation 4200 (Agilent). Анализ полученных последовательностей проводился на платформах Ugene и Blastn. Первичные данные секвенирования хранятся в формате FASTQ и могут быть запрошены в индивидуальном порядке.

Формирование колец экстраклеточными фрагментами дцДНК, интернализированными ГСК и их ближайшими потомками. Схема эксперимента подробно представлена в разделе «Экспериментальное доказательство формирования колец длинными фрагментами дцДНК, интернализированными в ГСК, и закольцовывания ими нити

ДНК хромосомы». Все экспериментальные процедуры выполнены согласно протоколам, описанным в практических пособиях (Маниатис и др., 1984; Glover, 1988).

Клетки костного мозга обрабатывали препаратом ДНК, отмывали от ДНК и инкубировали в течение 2 ч в CO₂-инкубаторе в полной питательной среде RPMI. Клетки собирали и отмывали физиологическим раствором. Солюбилизировали цитоплазматическую мембрану 0.2 % тритоном X-100, наслаивали на 10 % сахарозный градиент и центрифугировали при 500g 20 мин. Ядра собирали и отмывали физиологическим раствором. Затем ядра лизировали 1 % SDS, 50 mM ЭДТА и депротенизировали обработкой 200 мкг/мл протеиназы К при 58 °C 60 мин, после чего проводили фенол-хлороформную экстракцию. Полученный лизат наносили на 15–30 % NaCl ступенчатый (5 %) градиент и центрифугировали при ~300000g (L-8 центрифуга, SW 50.1 ротор, 47000 об/мин) в течение 2 ч при комнатной температуре. На схеме возле последней пробирки справа приведены маркеры молекулярных весов ДНК, располагающиеся в указанных процентных зонах градиента (Glover, 1988; Dolgova et al., 2013). В 7-й области градиента находится ДНК с размером более 40 т. п. н., которая формирует осадок на дне пробирки. ДНК супернатанта осаждали равным объемом изопропанола из 0.3 М ацетата натрия, pH 4.8, в течение ночи при –20 °C. Фракции 1–6 после центрифугирования и промывки от соли растворяли в 36 мкл H₂O. Осадок ДНК фракции 7 после промывки 70 % этанолом также растворяли в 36 мкл H₂O. На агарозный гель наносили по 12 мкл материала (1/3 от общего объема).

Был проведен анализ образца 7 (осадок на дне градиента). Qubit концентрация ДНК в образце 7 составила 1 нг/мкл. Суммарно получено 36 нг. Треть образца (12 нг) использовали для анализа градиента. Треть образца (12 нг) использовали в real-time ПЦР для анализа количества ДНК плазмиды pEGFP-N1 в области гена устойчивости к канамицину. Треть образца (12 нг) трансформировали в электрокомпетентные клетки DH-5 с титром 10⁷–10⁸.

В результате трансформации 12 нг фракции 7 было получено более 50 крупных колоний и около 5000 мелких. Во всех крупных колониях, из которых была выделена ДНК (8 колоний), присутствовал мономер pEGFP-N1. В мелких колониях ДНК плазмиды не содержалось. ДНК, выделенная из крупных колоний, гидролизировалась рестриктазами HindIII, EcoRI и HaeIII.

Результаты

Детекция синтетического ДНК субстрата методом FISH на метафазных пластинках, полученных из образцов клеток колоний

Как отмечено выше, колонии формируются в результате деления одной ГСК костного мозга. Следовательно, клетки одной колонии имеют одну и ту же генетику, соответствующую генетике исходной CD34+ ГСК (рис. 1). Если в результате обработки индуктором в исходной ГСК произойдут изменения в геноме, то эти изменения будут амплифицированы в индивидуальной колонии до состояния

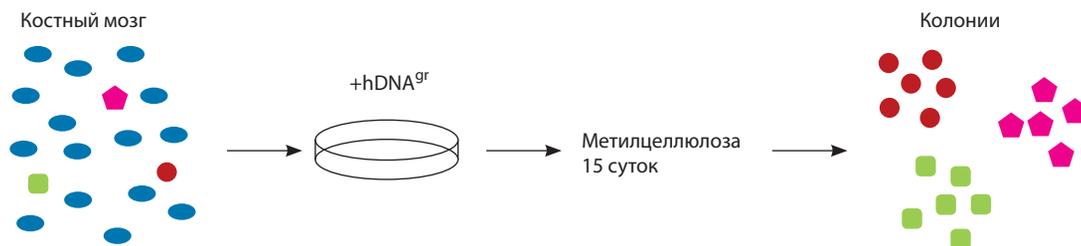


Рис. 1. Общая схема экспериментов.

возможности детекции такого события, что практически невозможно для индивидуальной CD34+ ГСК костного мозга (собственность ООО «ЭС ЛАБ ДИАГНОСТИК»).

Для выполнения таких экспериментов необходимо было сконструировать искусственный субстрат для обработки ГСК и меченый флуорохромом зонд для детекции возможной интеграции фрагментов искусственного субстрата. Были выбраны следующие варианты. Амплифицированный полилинкер плазмиды pBS был взят в качестве чужеродной ДНК, которая отсутствует в геноме человека. Этот фрагмент был мечен TAMRA флуорохромом и использовался в качестве зонда для гибридизации (pBSM13-TAMRA+). Одновременно для анализа были взяты сложно составленный субстрат, включающий *AluI* повтор, клонированный по сайту EcoRV, обрамленный полилинкером pBS, и два фрагмента, содержащих часть полилинкера pBS с прилегающим к нему *AluI* повтором и ограниченных EcoRI или HindIII сайтами рестрикции (M13F-*AluI*-M13R, M13F-*AluI*-EcoRI и M13R-*AluI*-HindIII). Включение TAMRA было проанализировано спектрофотометрически, электрофоретически и визуализировано в эксперименте по интернализации в клетки асцита карциномы Эрлиха (стандартная процедура оценки факта интернализации). Этот способ оценки мечения ДНК материала постоянно применяется в лаборатории. Результаты подготовительной работы приведены в Приложении 1.

Полученной конструкцией были обработаны клетки костного мозга человека. На 15-е сутки культивирования на метилцеллюлозе колонии были отмыты от среды, клетки обработаны колхицином и приготовлены препараты метафаз. Далее проведена FISH с TAMRA-меченым зондом pBSM13 (pBSM13-TAMRA+). Результаты гибридизации приведены на рис. 2, А. На препаратах детектируются множественные сигналы. Результаты свидетельствовали о возможной интеграции искусственного зонда в реципиентный геном. Также не исключался вариант прочной ассоциации экстраклеточных ДНК с телом хромосом. При анализе имиджей метафазных пластинок (до 40) мы не ставили задачи картирования TAMRA сигналов. В этой связи мы не добивались полной представленности кариотипа на изображениях. Основная цель экспериментов состояла в определении специфичности сигналов гибридизации, что подтверждалось анализом изображений.

Часть материала клеток, из которого были получены проанализированные метафазные пластины, параллельно использовалась для таргетного и полногеномного секвенирования (выделенная из клеток суммарная ДНК).

Дополнительно были проведены эксперименты с меченым флуорохромом ДНК-зондом, позволяющие прямо детектировать присутствие меченого материала в ассоциации с хромосомами. Клетки костного мозга человека обрабатывались TAMRA-меченой ДНК человека и *E. coli* и высевались на метилцеллюлозу. Через 15 сут клетки отмывали, обрабатывали колхицином и анализировали метафазные пластины (см. рис. 2, В). Было обнаружено несколько метафазных пластинок, несущих специфические сигналы. Оказалось, что в случае ДНК человека меченый материал детектируется во множестве сайтов на теле хромосом. В случае с бактериальной ДНК специфическая метка в большей степени сосредоточена в центромерных районах.

Во всех экспериментах с метафазными пластинками в качестве контрольных образцов использовались препараты метафаз, полученные из клеток колоний, выросших из образца клеток костного мозга, не обработанного ДНК субстратом.

Доказательство рекомбинационного взаимодействия искусственного зонда с геномом ГСК с использованием современных технологий секвенирования

Для доказательства рекомбинационного взаимодействия ДНК субстрата M13F-*AluI*-M13R, M13F-*AluI*-EcoRI и M13R-*AluI*-HindIII с геномом человеческих ГСК был взят тот же материал клеток, что и для приготовления метафаз и FISH. Была сконструирована библиотека и проведено два варианта секвенирования: полногеномное и секвенирование, где для увеличения числа целевых фрагментов выполнено обогащение библиотеки путем гибридизации с биотинилированной ДНК полилинкера плазмиды pBS, входящей в состав ДНК субстрата, иммобилизованной на Dynabeads® Streptavidin магнитных частицах (Life Technologies, США) по методу (Maricic et al., 2010). Полученные результаты были объединены в один раздел.

Схематическое изображение субстратов, взятых для обработки клеток, и субстратов, представленных в смеси, приведено на рис. 3, А. Таким образом, в смеси присутствовали следующие производные исходного субстрата: M13F-*AluI*-M13R, M13F-*AluI*-EcoRI, EcoRI-M13R, M13R-*AluI*-HindIII, HindIII-M13F. Нуклеотидные последовательности субстратов приведены в Приложении 2. Риды анализировались в прямой и обратной ориентации по обоим цепям.

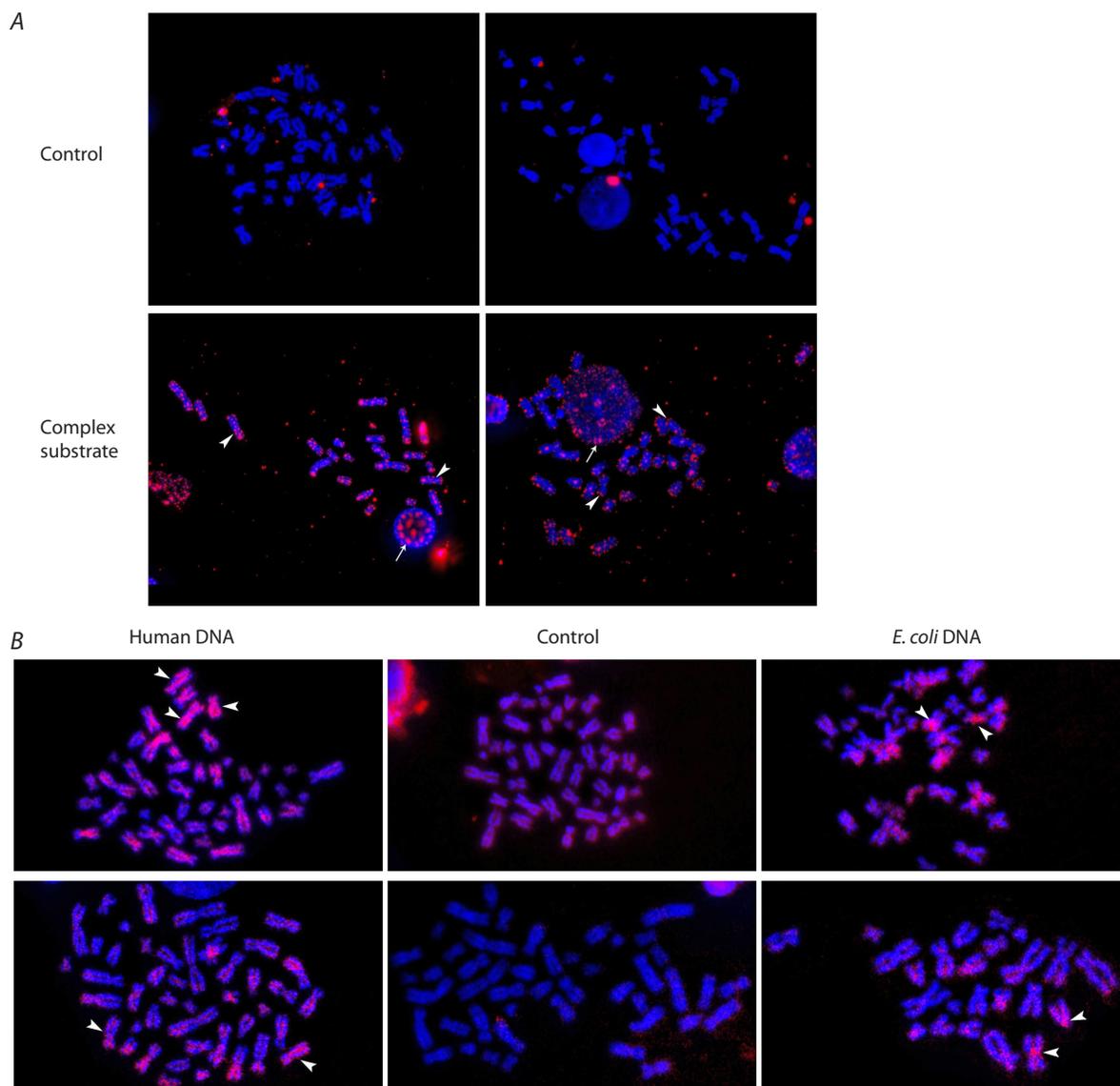


Рис. 2. Анализ присутствия специфических сигналов FISH после обработки клеток костного мозга выбранным зондом и специфических сигналов, детектируемых после прямого взаимодействия меченых флуорохромом дцДНК зондов и клеток костного мозга, на метафазных хромосомах.

A – FISH с зондом pBSM13-TAMRA+ метафазных хромосом, полученных после обработки колхицином клеток колоний, выросших из ГСК без обработки (Control) и обработанных в составе клеток костного мозга комплексным субстратом (M13F-*AluI*-M13R, M13F-*AluI*-EcoRI и M13R-*AluI*-HindIII). Стрелками указаны несколько сайтов гибридации. B – распределение TAMRA-меченого материала на метафазных хромосомах, полученных из клеток колоний человека после обработки этих клеток TAMRA-мечеными ДНК человека и *E. coli*. Стрелками указаны множественные места локализации метки в образце, обработанном ДНК человека, и центромерные районы в образце, обработанном ДНК *E. coli*.

Анализ нуклеотидной последовательности выбранных клонов

Были выявлены ряды с четко отсеченными концами, заканчивающимися на HindIII сайте, и последовательности праймера для M13for, что свидетельствует о присутствии в «свободном состоянии» фрагментов, входящих в исходный субстрат. Следует отметить, что короткие фрагменты субстрата содержали только часть полилинкера и последовательность праймера для M13 for. Этот факт может означать, что фрагменты сохранились в клетках в течение 15 сут культивирования (либо в одной покоящейся ГСК,

либо разошлись по дочерним клеткам) и что фрагменты короче 100 п. н. не видимы для надзирающей ферментативной машины и не подверглись процессингу (сшивание в кольцо или конкатемеры, нуклеазная деградация любого типа) (см. Приложение 2).

Выделено 56 последовательностей с продолжением участка полилинкера плазмиды pBS за сайт рестрикции EcoRV. В большинстве из них присутствуют последовательности, фланкированные одними и теми же инвертированными повторами (TIR), примыкающими к обеим половинкам сайта клонирования *AluI* фрагмента EcoRV

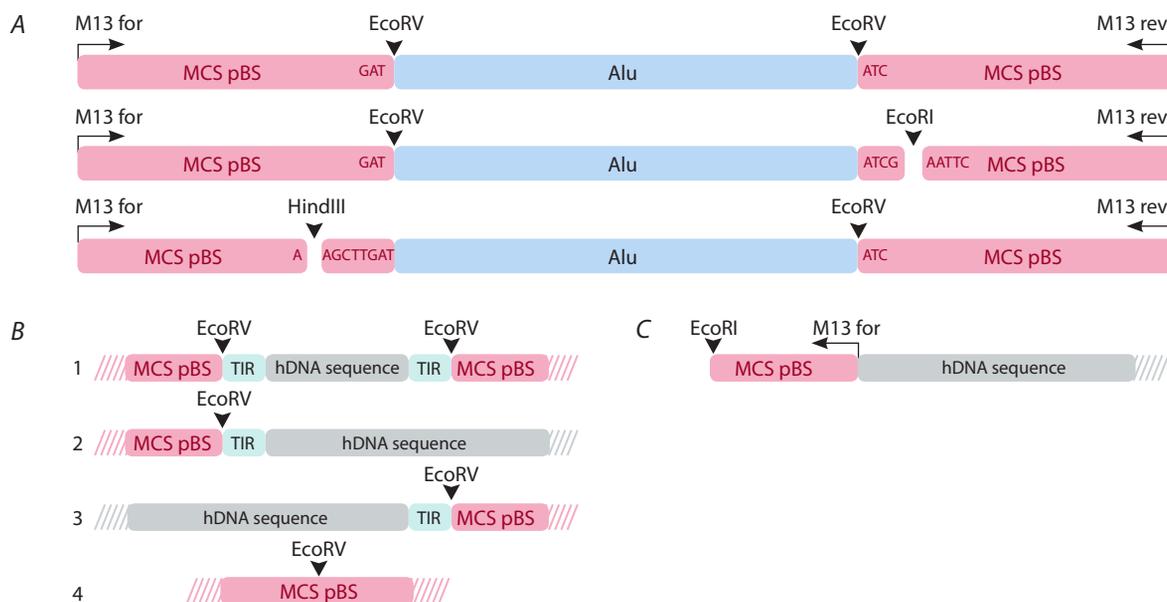


Рис. 3. Схематическое изображение используемого сложно составленного субстрата и нескольких его интермедиатов, возникших в результате индуцированных рекомбинационных процессов:

A – субстрат (смесь M13F-AluI-M13R, M13F-AluI-EcoRI и M13R-AluI-HindIII фрагментов), используемый для обработки клеток; B, C – последовательности, полученные при секвенировании.

(см. рис. 3, B1). В четырех рядах *AluI* повтор заменился на последовательность ДНК, состоящую из 84 нуклеотидов, ограниченную с двух сторон терминальными инвертированными повторами длиной 10 п. н. (TIR), примыкающими к половинкам сайта клонирования *EcoRV* (см. рис. 3, B2). Еще в 21 ряде последовательность обрывается в направлении от левой половинки сохранившегося сайта клонирования *AluI* *EcoRV*, не достигает противоположной половинки сайта *EcoRV* и ограничена тем же инвертированным повтором TIR, прилегающим к сохранившемуся левому сайту *EcoRV* (см. рис. 3, B3). Этот 21 ряд представлен тремя различными последовательностями, одна из которых составляет 37 п. н. Две другие имеют длину около 100 п. н. и содержат небольшие участки (5–7 п. н.) гомологии с *AluI* повтором из субстрата.

Одиннадцать рядов содержат интактный полноценный сайт *EcoRV*, без встройки. Это говорит о рекомбинации последовательности *AluI*, который клонирован по указанному сайту, и о восстановлении исходного *EcoRV* (см. рис. 3, B4).

Пятнадцать рядов совпадают с исходным субстратом, содержащим часть *AluI* повтора.

Обнаружены два ряда с продолжительными (54 и 57 п. н.) участками геномной ДНК, объединенными с концом M13 for последовательности. В них полностью входит M13 for праймер и участок полилинкера, обрывающийся на остаточном сайте рестрикции *HindIII* (см. рис. 3, C).

Кроме того, выделены ряды с внутренней рекомбинацией по сайту клонирования *AluI* *EcoRV*, ряды с хаотично перетасованными участками полилинкера, в одном из которых выявляются сегменты ДНК несубстратного происхождения.

Экспериментальное доказательство формирования колец длинными фрагментами дцДНК, интернализированными в ГСК, и закольцовывания ими нити ДНК хромосомы

Видимое несоответствие количества флуоресцентных сигналов в экспериментах по FISH гибридизации, экспериментах по прямому анализу интеграции экстрахромосомных фрагментов в геном и результатов полногеномного секвенирования предполагало возможность существования механизма образования стабильных ассоциатов между фрагментами ДНК, локализованными в ядре, и нитями ДНК хромосомы. Поскольку масштабной (единичной) негомологичной интеграции не обнаружено, то было высказано предположение, что в данном случае задействован иной механизм образования стабильных комплексов. Одной их форм таких ассоциатов, которые не нуждаются в белковом креплении, являются закольцованные на нить хромосомы формы ДНК, которые могли быть сформированы доставленными в ядерное пространство фрагментами экстраклеточной дцДНК. Для проверки такой возможности было проведено исследование, в целом повторяющее наше исследование (Dolgoва et al., 2013).

В экспериментах были проанализированы события и изменения на уровне молекулы, происходящие с субстратом – плазмидой pEGFP-N1, используемым для обработки ГСК (рис. 4, A). В образце нативной плазмиды присутствовала димерная форма и не детектировалась мономерная форма. При трансформации 100 пг линеаризованной pEGFP-N1 (количество, соответствующее трансформации ДНК экспериментального образца со дна солевого градиента, – см. далее) электрокомпетентных клеток DH-5 не обнаружено трансформантов, что говорит об отсутствии кольцевой формы плазмиды.

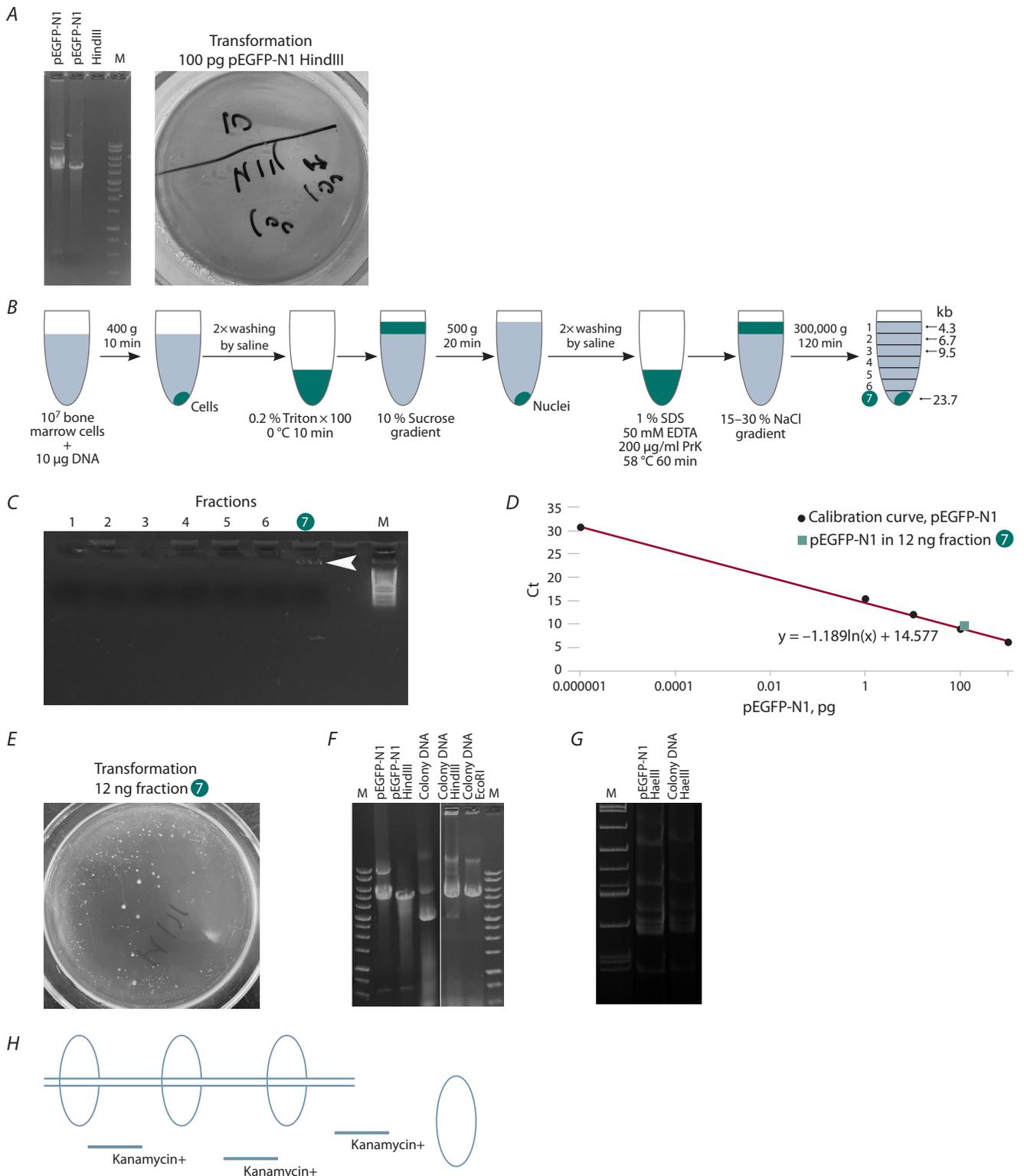


Рис. 4. Экспериментальное доказательство формирования колец длинными фрагментами дцДНК, интернализированными в ГСК, и закольцовывания ими нити ДНК хромосомы.

A – субстрат плазмиды pEGFP-N1, используемый для обработки ГСК. Электрофорез в агарозном геле нативной плазмиды pEGFP-N1, гидролизованной HindIII. Трансформация плазмиды pEGFP-N1, гидролизованной HindIII в *E. coli*, штамм DH-5. **B** – общая схема эксперимента; **C** – электрофорез образцов в 0.7 % агарозе; **D** – анализ количества ДНК плазмиды pEGFP-N1 в области гена устойчивости к канамицину; **E** – полученные в результате трансформации 12 нг фракции 7 более 50 крупных колоний и около 5000 мелких; **F, G** – агарозный и акриламидный гели с различными вариантами гидролизованной и негидролизованной ДНК плазмид: исходной pEGFP-N1 и выделенной из одного из трансформантов (крупная колония). **F** – ДНК, выделенная из крупных колоний, гидролизовалась по HindIII и EcoRI. Рестрикционный анализ свидетельствует о неповрежденном HindIII и EcoRI сайтах полилинкера. **G** – рестрикционный анализ свидетельствует о неповрежденном HaellI паттерне мономера, а значит, об отсутствии внутриплазмидной рекомбинации. **H** – предполагаемое схематическое изображение закольцованной формы плазмиды, сформированной вокруг хромосомы, после ее попадания в клетку.

На рис. 4, В приведена общая схема эксперимента, ее подробное поэтапное описание дано в разделе «Материалы и методы» (Формирование колец экстраклеточными фрагментами дцДНК, интернализованными ГСК и их ближайшими потомками).

При электрофоретическом анализе фракций, полученных после высокоскоростного центрифугирования в солевом градиенте, только в последней фракции (7, дно пробирки) обнаруживается материал ДНК по свечению бромистого этидия (см. рис. 4, С).

Анализ количества ДНК плазмиды pEGFP-N1 в области гена устойчивости к канамицину свидетельствовал, что в 12 нг фракции 7 содержится ~100 пг ДНК, гомологичной указанному району плазмиды (см. рис. 4, D).

В результате трансформации 12 нг фракции 7 было получено более 50 крупных колоний и около 5000 мелких (см. рис. 4, E). Крупные колонии росли в жидкой среде на 50 мкг/мл канамицина и перевивались. Мелкие колонии давали импульс к росту в жидкой среде, и далее культура не развивалась. В мелких колониях ДНК плазмиды в форме мономера или димера не содержалось. Во всех крупных колониях, из которых была выделена ДНК (восемь колоний), присутствовал мономер pEGFP-N1. ДНК, выделенная из крупных колоний, обрабатывалась HindIII, EcoRI (см. рис. 4, F) и HaeIII (см. рис. 4, G) рестриктазами.

Совокупность полученных в этой серии экспериментов результатов свидетельствует о следующем:

- Клетки костного мозга обрабатывались плазмидной ДНК, линейризованной по сайту HindIII. Поскольку исходная плазида присутствует в форме димера, а в полученных трансформантах – в форме мономера, то можно считать, что в клетках костного мозга (ГСК) произошло восстановление кольцевой формы, линейризованной по HindIII плазмиды.
- Рестрикционный анализ по HaeIII, HindIII и EcoRI подтверждает отсутствие внутриплазмидной рекомбинации (см. рис. 4, F, G).
- Выделение ДНК плазмид совместно с ДНК хромосом в жестких условиях фракционирования в градиенте NaCl после исчерпывающей обработки протеиназой К и фенол-хлороформной экстракции указывает на существование прочного комплекса/ассоциата между геномной и плазмидной ДНК.

Наиболее правдоподобным вариантом может быть закольцевание геномной ДНК кольцом плазмиды, образовавшимся в момент циклизации линейной формы pEGFP-N1 при ее попадании в клетку (см. рис. 4, H).

Полученное резкое несоответствие количества копий участка гена устойчивости к канамицину pEGFP-N1, количества трансформантов и количества выделенной ДНК можно объяснить следующим образом. Многочисленные деградированные плазмидные ДНК с участком гена устойчивости к канамицину могли после трансформации дать однократный синтез белка устойчивости к канамицину, что детектировалось как мелкие колонии. Именно эти фрагменты были оценены в количественной real-time ПЦР. При учете только крупных трансформантов на одну клетку, способную захватывать ДНК, приходится менее одной

плазмидной ДНК. Возможно, в случае жизнеспособных трансформантов часть плазмидных колец, освободившихся от ДНК хромосом в процессе выделения, дала колонии. Другая часть осталась в ассоциации с ДНК хромосом и не дала трансформантов, что повлияло на точность количественной оценки.

Таким образом, полученные результаты совпадают с данными работы (Dolgova et al., 2013) и свидетельствуют, что в обоих исследованиях фрагменты дцДНК, интернализованные в ГСК, замыкаются в кольцо. По-видимому, часть колец в момент замыкания стохастически охватывает нить ДНК хромосомы, формируя комплекс, который существует длительное время.

Обсуждение

В рассматриваемой ситуации два типа ДНК структур, а именно ДНК хроматина и двуцепочечные экстрахромосомальные фрагменты, попали в зону активности рекомбиногенной ситуации в качестве рекомбинационных/рекомбиногенных партнеров. Существует серия публикаций, характеризующая экспериментально доказанные и гипотетические интермедиаты, возникающие при рекомбинации ДНК хроматина, ДНК хроматина в области одноцепочечного разрыва и ДНК экстрахромосомальных двуцепочечных фрагментов (Hastings et al., 1993; Leung et al., 1997; Cromie et al., 2001; Li et al., 2001). На рис. 5 приводятся схематические изображения таких интермедиатов. Рассматриваются два варианта взаимоотношений. В первом случае активная рекомбиногенная ситуация создает ферментную платформу рекомбинационного процесса, который возможен в любой точке генома при участии открытых концов двуцепочечных фрагментов (двойной реципрокный обмен между фрагментами и гомологичными им последовательностями хромосом) (см. рис. 5, А). Во втором случае рекомбиногенными являются концы нити ДНК с образованным ником (см. рис. 5, В).

В настоящей работе предпринята попытка оценить возможность интеграции экстраклеточного материала ДНК в геном с использованием двух подходов – FISH и пол-

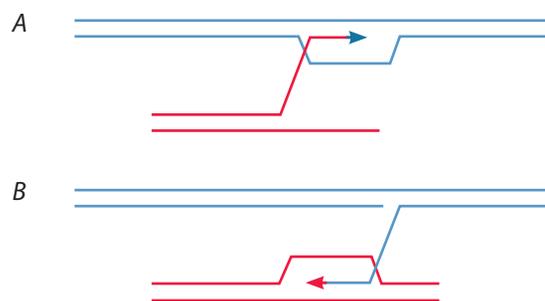


Рис. 5. Схематическое изображение рекомбинационных процессов (однонитевой отжиг, генная конверсия, спаривание микрогомологий), происходящих в клетке с участием геномной ДНК и доставленных в клетку фрагментов дцДНК.

А – рекомбинация за счет открытых двуцепочечных концов доставленных фрагментов; В – рекомбинация за счет одноцепочечного разрыва в геномной ДНК.

ногеномного секвенирования. Для этих целей был сконструирован сложно составленный зонд, состоящий из целого фрагмента, представленного центральным *AluI* фрагментом, обрамленным левой и правой частью полилинкера pBS, и нескольких его производных. Производные представляли собой части полного фрагмента субстрата после гидролиза *EcoRI* и *HindIII* рестриктазами. В смеси присутствовали пять различных элементов (см. рис. 3, А). Предполагалось, что если произойдет объединение ДНК зонда и ДНК хромосом, то с помощью FISH можно будет увидеть специфические сигналы на метафазных хромосомах.

Полученные структурированные в ядре сигналы гибридизации, как следовало из анализов имиджей, могли быть специфическими. Появление FISH сигнала предполагало возможность как гомологичного, так и негомологичного встраивания в геном молекул субстрата. Также было высказано еще одно предположение о возможном происхождении специфических сигналов. Оно было связано с попаданием внехромосомных структур в области активного хроматина, где формируются некие прочные хроматинизированные комплексы между внехромосомной ДНК и ДНК хромосом, сохраняющиеся до формирования метафаз (Møller et al., 2018; Wu et al., 2019; Zhu et al., 2021; Pecorino et al., 2022). Этот вопрос рассмотрен в последней части раздела «Обсуждение».

Для проверки гипотезы было проведено полногеномное и селективное секвенирование. Анализ полученных ридов выявил два варианта интермедиатов, свидетельствующих о рекомбинационных взаимоотношениях доставленных в ядро экстраклеточных фрагментов дцДНК и ДНК хромосом.

1. Обнаружено более 20 последовательностей, содержащих в себе участки геномной ДНК, замесившие собой *AluI* фрагмент четко по сайту клонирования *EcoRV*. Геномный сегмент ДНК распространяется вглубь от сайта клонирования *AluI* фрагмента *EcoRV* как с левой, так и с правой стороны ориентированного полилинкера или находится между двумя половинками сайта клонирования *EcoRV*. Во всех случаях этот геномный фрагмент примыкает к половинкам сайта клонирования *EcoRV* специфическими последовательностями, определяемыми как терминальный инвертированный повтор (TIR) длиной 10 п. н. В некоторых ридях фрагмент имеет гомологию с клонированным *AluI*, другие содержат небольшие участки (5–7 п. н.) гомологии с *AluI* повтором субстрата (рис. 6).

Известно, что TIR фланкирует последовательность мобильного генетического элемента hAT-5_RIr. hAT представляет собой суперсемейство ДНК-транспозонов, которые перемещаются в геноме за счет фермента транспозазы. Они присутствуют в геномах растений, грибов и животных. В геноме млекопитающих и человека они неактивны.

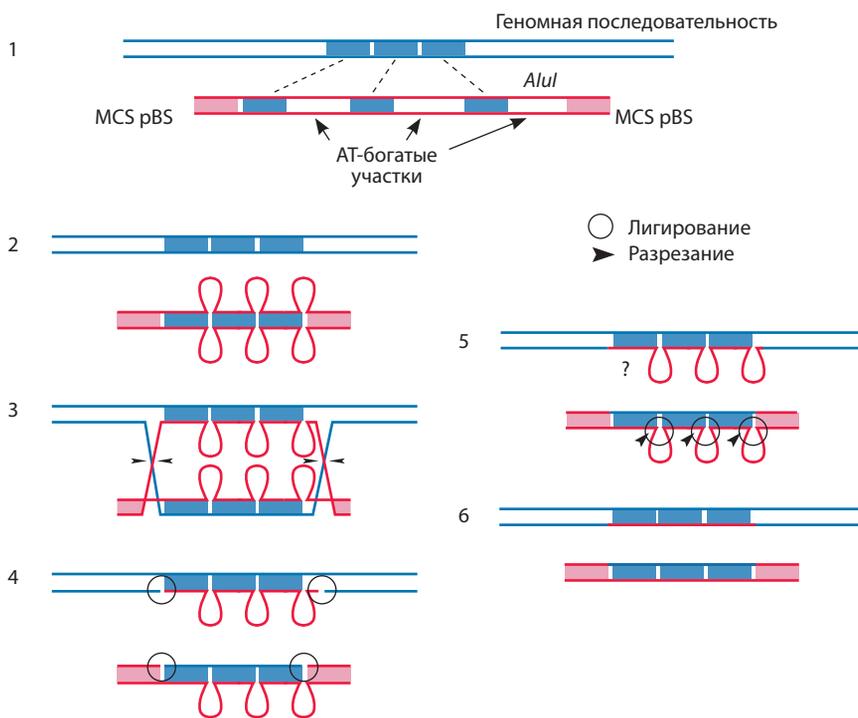


Рис. 6. Схематическое изображение возможных событий в процессе формирования одного из интермедиатов, выявленных при анализе ридов полногеномного секвенирования.

1 – геномная ДНК и доставленный в клетку субстрат (синим цветом выделены гомологичные участки); 2–4 – последовательные этапы рекомбинационных событий с учетом выпетливания AT-богатых негомологичных участков; 5, 6 – полученные в результате рекомбинации предполагаемые продукты, включая прочитанную при секвенировании последовательность.

Имеют размер около 2.5–5 т. п. н. и содержат терминальные инвертированные повторы. Согласно структурам конечных интермедиатов, полное замещение *AluI* повтора исходного субстрата на последовательность ДНК, ограниченную терминальными инвертированными повторами, происходило точно по флангам *AluI* повтора, который также является мобильным генетическим элементом генома человека (Hagan et al., 2003). Для одного из интермедиатов, в котором произошло замещение с сохранением обеих половинок сайта клонирования *AluI* *EcoRV*, четко прослеживается гомология с *AluI* субстратом.

Для рассматриваемой ситуации важен тот факт, что во всех проанализированных ридов центрально расположенная *AluI* нуклеотидная последовательность ДНК заместились на некие последовательности из генома строго по сайту клонирования *EcoRV*. То есть произошла реципрокная гомологичная рекомбинация соответствующего района генома и *AluI* субстрата, при этом районы негомологичной ДНК плазмиды остались вне активности механизма рекомбинации. Не обнаружено ридов, в которых последовательности плазмидной ДНК были бы обрамлены последовательностями геномной ДНК, предполагающими негомологичное встраивание. Один из наиболее логичных вариантов объяснения возможных рекомбинационных событий для ридов с сохранением полной структуры субстрата и полного замещения *AluI* последовательности ДНК на геномную последовательность приведен на рис. 6.

2. Выявлены два рида, где правая часть гидролизата (*HindIII*-праймер M13 for) исходного фрагмента находится в одной непрерывной последовательности с сегментом генома человека (54 и 57 п. н.), объединенных через участок микрогомологии M13 for и генома (рис. 7). При этом вторая часть обоих ридов заканчивается обрывом строго по *HindIII* сайту рестрикции, который является «конечной точкой» субстрата. Следует отметить, что участок геномной ДНК обоих ридов гомологичен на 95 %. Это означает, что интеграция произошла или в разных местах генома, или в одном и том же месте генома, но в разных клетках, где акцепторные последовательности гомологичны не на 100 %.

Предлагается следующее объяснение появления найденной структуры. В месте начала геномной последовательности интермедиата или в четырех буквах слева от начала геномной последовательности гибридного ридов произошел одноцепочечный разрыв в геноме. В указанном сайте четыре нуклеотида геномной последовательности комплементарны (гомологичны) четырем нуклеотидам конца праймера M13 for. По механизму однонитевого отжига за счет комплементарного спаривания микрогомологии и формирования D-loop произошло достраивание по матрице полилинкера, т. е. слияние внехромосомной ДНК и ДНК генома (McVey, Lee, 2008; Hastings et al., 2009). Характерно, что оба ридов заканчиваются строго по *HindIII* сайту рестрикции. Существует минимальная вероятность, что столь прецизионно, четко по *HindIII*, образовался разрыв исходной ДНК в результате озвучивания ультразвуком сразу для двух фрагментов. Этот факт в большей степени

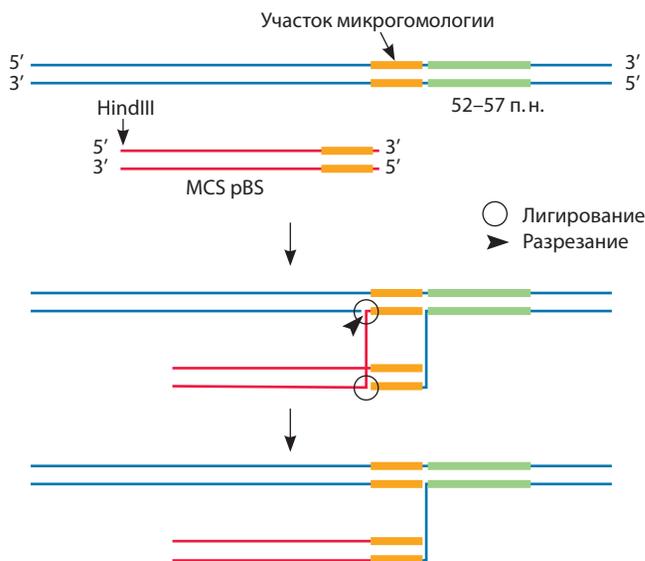


Рис. 7. Схематическое изображение возможных событий в процессе формирования интермедиатов, обнаруженных при анализе результатов полногеномного секвенирования, в которых участок геномной ДНК объединен с полилинкером плазмиды.

Предполагается, что происходит рекомбинация в месте одноцепочечного разрыва геномной ДНК по механизму однонитевого отжига за счет комплементарного спаривания микрогомологии. Синим цветом обозначена последовательность геномной ДНК, зеленым – участок геномной ДНК, детектируемый в двух полученных ридов, желтым – участок микрогомологии, красным – полилинкер рBS (MCS рBS).

означает, что хвосты с концевым *HindIII* не интегрированы в геном, а свободно свисают в пространстве ядра в течение 15 сут. Возможные интермедиаты указанного процесса приведены на рис. 7.

Таким образом, найдены интермедиаты, доказывающие возможность гомологичного обмена между экстраклеточными ДНК и ДНК хроматина.

Также найдены необычные структуры, которые с одного края ковалентно объединены с последовательностью реципиентного генома, тогда как второй край обрывался на сайте рестрикции, ограничивающем фрагмент субстрата (см. рис. 3, С). Вероятно, эта часть последовательности никак не объединена со второй нитью ДНК и «свисает» в пространстве ядра или связана с ней белковым каркасом, что необходимо для компактизации хроматина в хромосому и дальнейших процессов клеточного цикла. Предполагается, что в указанных случаях объединение с геномной ДНК произошло по элементам микрогомологии между геномной ДНК и ДНК M13 праймера в сайте одноцепочечного разрыва.

Кроме того, выявлено несколько интермедиатов, свидетельствующих о произошедшей рекомбинации ДНК внутри субстрата. Обнаружены ридов со множественными хаотичными перестановками субстратных последовательностей и последовательностей, не относящихся к субстрату, что также подтверждает активные рекомбинационные процессы, идущие в клетке.

Схематическое представление последовательности событий и варианты интермедиатов, возникающих при акте гомологичной рекомбинации

Интермедиат, возникший в результате рекомбинации с геномной ДНК внутреннего *AluI* повтора, клонированного по *EcoRV* сайту и обрамленного участками полилинкера, ограниченного праймерами к M13. Последовательность геномной ДНК, расположенная после первого терминального инвертированного повтора (TIR), гомологична сегментам *AluI* повтора, которые разделены АТ-богатыми участками (спейсерами) (см. рис. 6). Предположительно, *AluI* последовательность субстрата, содержащая спейсеры, могла сблизиться с гомологичным участком геномной ДНК за счет выпетливания АТ-богатых спейсерных последовательностей и линейного сближения участков *AluI* субстрата, гомологичных геномной ДНК. В предполагаемом варианте могла произойти гомологичная рекомбинация между геномной последовательностью и субстратом, которым обрабатывали клетки. При этом участок *AluI* повтора в экстрахромосомальной ДНК полностью заменился на фрагмент геномной ДНК. Такие события возможны как в месте вскрытой ДНК хроматина, так и в произвольно выбранном участке генома в результате реципрокного гомологичного обмена. Полученный результат свидетельствует об активном процессе гомологичной прецизионной рекомбинации между экстраклеточной ДНК и ДНК хроматина.

Часть полилинкера, обрывающаяся одним концом на сайте рестрикции *HindIII* и объединенная вторым концом с ДНК геномного происхождения за счет микрогомологии. Геном клетки, вступившей на путь дифференцировки, вскрывается пангеномными одноцепочечными разрывами, которые закрываются после 7 суток. По-видимому, появление найденных интермедиатов связано с существованием одноцепочечных разрывов именно в момент, когда в ядре присутствуют фрагменты экстраклеточного ДНК-зонда (см. рис. 7).

Возможны два варианта объяснения ситуации. Событие интеграции произошло на начальном этапе коммитирования, и интермедиаты возникли и существуют до формирования метафаз. Интермедиаты могли возникнуть во время или незадолго до выделения ДНК из клеток, на 15-е сутки культивирования. Данный вариант предполагает длительное сохранение в пространстве ядра коротких фрагментов субстрата. Как возникшие интермедиаты сохраняются в процессе дупликации и сохраняются ли вообще, непонятно. Если рассматривать вариант интеграции, то, вероятно, встраивание произошло после удвоения хромом на этих участках. Для конденсации хроматина и формирования метафазной хромосомы такие нарушения после прошедшей репликации, по-видимому, значения не имеют. Маловероятно, что полимеразы проходят такие интермедиаты в ходе репликации, в таком случае они должны быть фиксированы специфическими комплексами.

Как было сказано выше, участок геномной ДНК обоих ридов гомологичен на 95 %. Это означает, что интеграция произошла или в разных местах генома, или в одном и том

же месте генома, но в разных клетках, где акцепторные последовательности гомологичны не на 100 %.

Риды с множественными хаотичными перестановками субстратных последовательностей и последовательностей, не относящихся к субстрату. Схематическое изображение последовательностей со множественными хаотичными перестановками, полученных при секвенировании, приведено на рис. 8.

В последней серии экспериментов была проведена оценка возможности интеграции экстраклеточных фрагментов в геном прямой детекцией интегрированного фрагмента. Использовались два типа TAMRA-меченой ДНК, гомологичная ДНК человека и ДНК *E. coli*. Главным выводом экспериментов является тот факт, что в случае ДНК человека специфические сигналы детектируются по всему телу хромосом. В случае ДНК *E. coli* эти сигналы в большей степени локализованы в центромерном гетерохроматине. Если предположить, что произошла интеграция в геном, то мода этой интеграции для гомологичных и гетерологичных ДНК будет различной, а именно гомологичное встраивание человеческого субстрата и негомологичная интеграция ДНК *E. coli*. Центромерный гетерохроматин представляет собой балк (конгломерат) повторов, по массе соответствующих 1/3 массы хромосомы, создающих известную ее трехмерную архитектуру. Если произошла реальная интеграция в центромерный гетерохроматин, то в силу несопоставимости размеров и специфической организации α -сателлитов, попадание дополнительных ДНК в эту огромную массу ДНК, по-видимому, не отражается на функциональном состоянии центромерного локуса. Такая точка зрения может объяснить реальную интеграцию гетерологичной ДНК.

Противоречия между результатами FISH, прямой детекцией флуоресцентно-меченого зонда на метафазах и данными полногеномного секвенирования

При анализе результатов FISH, прямой детекции возможной интеграции флуоресцентно-меченого зонда в геном и данных полногеномного секвенирования в проведенных экспериментах с использованием зонда, состоящего из смеси фрагментов M13F-*AluI*-M13R, M13F-*AluI*-*EcoRI* и M13R-*AluI*-*HindIII*, обращает на себя внимание выраженное несоответствие количества сигналов гибридизации, или просто специфических флуоресцентных сигналов, и количества ридов, демонстрирующих реальное ковалентное объединение последовательности субстрата и последовательности хромосомы. Первое наиболее очевидное предположение состояло в том, что наблюдается артефакт метода. Тем не менее различные экспериментальные варианты, и в первую очередь структурированность сигналов в ядре, свидетельствовали о необычности и специфичности сигналов. В этой связи было принято решение провести дополнительные эксперименты, которые, как предполагалось, могут раскрыть суть механизма появления сигналов на метафазах.

Полученные результаты перевели наше внимание на явление, характеризующее присутствие в ядре большого

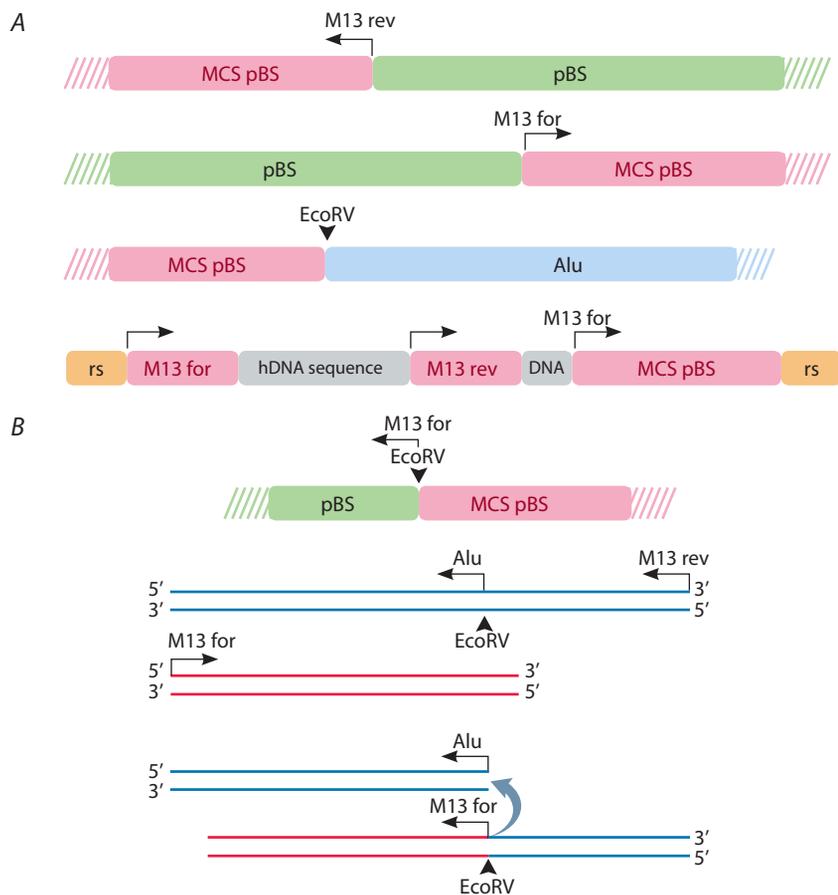


Рис. 8. Схематическое изображение последовательностей, полученных при секвенировании (A), и возможный вариант репаративного процесса (B).

количества кольцеобразной внеклеточной ДНК, которое активно дискутируется (Pecorino et al., 2022).

Вопрос о внехромосомной кольцевой ДНК естественного происхождения в опухолевых клетках различных типов опухолей начинается с обнаружения более 60 лет назад double minutes кольцевых экстрахромосомальных структур, не имеющих центромер и теломер (Spriggs et al., 1962). Отсутствие центромер приводит к случайному распределению внеклеточной ДНК при делении клеток, и закодированная в них информация передается немедельским образом. Эти структуры формируются из хромосомного материала. Выделяют как минимум два типа таких структур. Один тип состоит из простых одиночных фрагментов ДНК, другой может быть химерным и содержать множество фрагментов из различных частей хромосом. Данный факт говорит о том, что выпавшие из хромосом в результате неопределенных событий фрагменты ДНК бессистемно лигируются в кольцо. Часть ДНК представляют собой структуры размером до 1 млн п. н., которые содержат множество генов и регуляторных областей. Другие, так называемые микро-внехромосомные кольцевые ДНК, находятся в пределе 100–2000 п. н. и характерны преимущественно для клеток здоровых тканей. В этих ДНК обнаруживают рибосомальные гены,

ДНК мобильных элементов, кольцевые теломерные ДНК. В опухолевых клетках такие внехромосомные структуры могут реинтегрировать в геном, причем в «неродные» хромосомные области с гомогенным окрашиванием, содержащие амплифицированные гены (Pecorino et al., 2022). Было установлено, что внехромосомная кольцевая ДНК тесно связана с полимеразным комплексом (RNAPII) и, как предполагается, ассоциирована с активно транскрибируемыми доменами хромосом, с которыми образует фокусы концентрации хроматина (Wu et al., 2019; Zhu et al., 2021). Вероятно, ассоциаты внехромосомной кольцевой ДНК и ДНК хромосом стабильны и могут существовать в различные фазы клеточного цикла.

Аналогичные ДНК присутствуют в миоцитах и лейкоцитах человека как регулярно встречающиеся внехромосомные объекты и представляют собой общебиологическое явление (Møller et al., 2018).

В свете сказанного можно было бы предположить, что в нашем исследовании зонд, содержащий плазмидный таг, сформировал фокусы концентрации хроматина с хромосомами, не интегрировав в молекулу ДНК хромосомы. Эти ассоциаты сохранились до метафазы и дали множественные специфические сигналы гибридизации. Находится ли в соответствии с полученными данными

такое предположение? Возможна ли такая форма интермедиатов?

Было проведено полногеномное секвенирование. Результаты свидетельствуют, что гомологичная интеграция зонда возможна вследствие спаривания микрогомологий или гомологичной рекомбинации. Однако количество проанализированных ридов-интеграторов не соответствует картине гибридизации, где детектируется множество специфических сигналов (как предполагалось первоначально, сайтов гибридизации) на метафазах, и, особенно, их структурированность в интерфазных ядрах. Также остались необъясненными результаты анализа прямой интеграции, где обнаружены множественные специфические сигналы при использовании флуоресцентно-меченого как гомологичного, так и гетерологичного зондов (см. рис. 2).

Количественная оценка данных секвенирования тоже не согласуется с картиной гибридизации. В секвенирование берется 40 нг ДНК, что соответствует ~4000 ядер. Суммарно при двух повторах полногеномного прочтения было обнаружено приблизительно по 50 ридов, несущих таг, для каждого сиквенса, т. е. на 80 клеток приходится одна молекула субстрата. Это также не соответствует картине гибридизации, где детектируется множество специфических сигналов (сигналов гибридизации) на метафазах и интерфазных ядрах (см. рис. 2).

Факты и их анализ предполагают формирование большого количества прочных ассоциатов, которые вместе с реальной интеграцией дают общую картину FISH. Почему многочисленные ассоциаты не детектируются при полногеномном секвенировании? Одно из предположений сводится к технической проблеме.

В эксперименте по прямому доказательству интернализации фрагментов дцДНК (9 теломерных повторов, 54 п. н.) в CD34 клетки человека и мышцы было установлено, что дцДНК зонд доставляется как в CD34+, так и в CD34- клетки (Рузанова и др., 2024).

Оказалось, что в CD34+ клетках дцДНК субстрат, которым обрабатывали клетки, сохраняется в исходной форме в виде интактного фрагмента. При этом в небольшом количестве CD34- клеток доставленные фрагменты конкатемерируются, и когда количество мономеров (54 п. н.) достигает 7 единиц (~350 п. н.), возможно, происходит их циклизация (Dolgova et al., 2013). По-видимому, CD34+ клетки, которые захватили фрагменты, не способны их процессировать до момента перехода в коммитированное состояние. Можно предположить два варианта событий. В первом случае CD34- клетки первого эшелона коммитирования, которые сохранили способность захватывать экстраклеточные ДНК, процессируют и циклизуют интернализированные мономеры. Во втором случае CD34+ клетки быстро, в процессе инкубации с экстраклеточным ДНК субстратом, переходят в терминальную дифференцировку в результате появления в клетке экстраклеточных фрагментов ДНК, теряют маркер CD34 и становятся способными процессировать депонированные внутри клетки фрагменты и формировать кольцеобразные структуры, что детектируется как свойство CD34+ клеток. Такие формы ДНК ассоциатов доходят до метафаз.

Техника полногеномного секвенирования на платформе Illumina предполагает фрагментацию геномной ДНК до фрагментов 100–200 п. н. Кольцо размером 100–300 п. н. с большой долей вероятности количественно не будет разрушено ультразвуком, и последовательности плазмидного тага (~200 п. н. в анализируемом эксперименте) не будут прочитаны, хотя на хромосомах они будут присутствовать в полном объеме. На наш взгляд, в этом предположении кроется причина противоречия результатов FISH и полногеномного секвенирования, а также прямой детекции возможной интеграции флуоресцентно-меченого зонда.

Сопоставление размера кольца, сформированного олигонуклеотидом (около 350 п. н., см. (Рузанова и др., 2024)), т. е. диаметра его охвата линейной молекулы интерфазной хромосомы, и размера полимеразного комплекса предполагает возможность свободного перемещения репликативной ферментативной машины сквозь кольцо в ходе репликации (толщина нити дцДНК ~2 нм, один виток дцДНК 10.5 п. н. ~ 3.4 нм, фрагмент 300 п. н. ~ 100 нм, диаметр кольца дцДНК 300 п. н. ~ 32 нм, полимеразный комплекс ~300 кДа ~ 20 нм) (<https://www.dynamic-biosensors.com/project/list-of-protein-hydrodynamic-diameters/>). Кольцо сохраняется до метафазы, где детектируется FISH.

Прямое доказательство формирования длинными фрагментами экстраклеточной дцДНК (pEGFP-N1 линейаризованная HindIII) кольца, охватывающего нить хромосомы

Высказанные сомнения и объективные противоречия подняли вопрос о природе сигналов на метафазных хромосомах, на который было необходимо ответить.

В нашей работе (Dolgova et al., 2013) на примере линейаризованной плазмиды pEGFP-N1 (4.7 т. п. н.) установлено, что если в ГСК (мышинная модель) индуцирована рекомбинантная ситуация, спровоцированная появлением двуцепочечных разрывов при воздействии кросслинкирующего цитостатика циклофосамида (феномен «окно смерти»), то линейные фрагменты плазмиды, интернализированные в эти клетки, претерпевают метаболические изменения. Они формируют конкатемеры, которые «зашиваются» в кольцо (до 4 мономеров в одном кольце). Часть фрагментов претерпевает концевой гидролиз глубиной до 1 т. п. н. и в такой форме присутствует в объеме ядра. Важным из результатов цитируемой работы является тот факт, что кольцевые формы плазмиды выделяются вместе с ДНК хромосом, находящейся на дне 15–30 % NaCl градиента (~300000g) после исчерпывающей обработки протеиназой K и фенольной экстракции. То есть плазмидная ДНК находится в контакте с ДНК хромосом, который сохраняется в условиях жесткого фракционирования без крепления к ней белковым каркасом. С позиции здравого смысла такое возможно или при интеграции плазмиды в состав хромосомы, или при формировании кольца вокруг нити хромосомы, что «заставляет» кольцо плазмиды седиментировать на дно солевого градиента вместе с геномной ДНК. В момент осмысления полученных результатов мы не придали значения этому факту.

В настоящем исследовании показано, что, аналогично данным цитируемой работы, в ГСК человека при попадании в нее экстраклеточных дцДНК фрагментов индуцируется рекомбиногенная ситуация, спровоцированная никами, которые эти фрагменты и инициировали. Сравнение работ (Рузанова и др., 2024) и (Dolgova et al., 2013) свидетельствует, что при разворачивании двух рекомбиногенных ситуаций, имеющих различное происхождение (индуцированные двуцепочечными разрывами и никами), попавшие в клетку экстраклеточные фрагменты на первом этапе метаболических превращений претерпевают схожие изменения. Происходит их конкатемеризация (сшивка/лигирование по концам). Это могло означать, что все остальные превращения фрагментов в ядре аналогичны показанным в работе (Dolgova et al., 2013). То есть фрагменты так же конкатемеризуются и/или зашиваются в кольцо, и в процессе циклизации в стохастическом режиме нить ДНК хромосом может закольцовываться циклизованной плазмидой. Следовательно, можно предположить, что именно такие структуры детектируются во всех экспериментах, где проводили анализ флуоресцентных сигналов на метафазных хромосомах.

Для доказательства высказанного предположения была выполнена серия экспериментов, практически полностью повторяющих эксперименты из (Dolgova et al., 2013) (см. рис. 4). Единственным и принципиальным отличием (за исключением модели «мышь vs клетки костного мозга человека») было то, что в цитируемой работе мы опирались на развернутую «рекомбиногенную ситуацию», индуцированную двуцепочечными разрывами (межцепочечными сшивками), а в настоящем случае – на рекомбиногенную ситуацию, индуцированную никами. Были получены практически идентичные результаты. Плазида в линейной форме попадает в ГСК, происходит ее циклизация по липкому концу (HindIII) и формируется кольцо. В процессе циклизации нить ДНК хромосомы закольцовывается плазмидой (при жестком фракционировании выделяется вместе с фракцией ДНК хромосом, находящейся на дне 15–30 % NaCl градиента). Такая структура длительно присутствует в ядре и вполне может детектироваться в составе метафазной хромосомы (см. рис. 4). Такое видение событий согласуется с данными полногеномного секвенирования, свидетельствующими об отсутствии негомологичной масштабной интеграции, которая давала бы множественные детектируемые специфические сигналы на метафазных хромосомах.

Что происходит с такими интермедиатами в процессе упаковки линейной хромосомы в метафазу и в процессе метафазного деления, неизвестно. Можно предположить, что или кольца рвутся физически, или существует ферментативная машина, осуществляющая линеаризацию кольца. В любом случае сохраненная таким образом генетическая информация может составлять некий информационный «резервуар», назначение которого неизвестно. Свободно расположенные кольца, сформированные фрагментами экстраклеточной дцДНК, могут являться аналогами колец, которые участвуют в механизме альтернативного удлинения теломер.

Заключение

Таким образом, во время появления пангеномных одноцепочечных разрывов (ников) в клетке активируются репарационно-рекомбинационные механизмы, индуцирующие рекомбинационные процессы между ДНК хроматина и экзогенной дцДНК. Важен тот факт, что не обнаружено ридов, демонстрирующих негомологичное (NHEJ) объединение экстраклеточного/экстрахромосомного ДНК субстрата и ДНК хромосом. Это свидетельствует о том, что во время данного общебиологического процесса возможно гомологичное изменение генома с минимальным риском негомологичных случайных, неконтролируемых, нарушающих функцию интеграций. По-видимому, экстраклеточные фрагменты ДНК, попавшие в ГСК, могут конкатемеризоваться, образовывать кольца как мономерной, так и конкатемерной формы, формировать кольцеобразные или иные пространственные ассоциаты с хромосомной ДНК, которые длительно присутствуют в клетке. Экстрахромосомальные кольца являются ДНК-матрицей, используемой клеткой в механизме альтернативного удлинения теломер. И наконец, экстраклеточные фрагменты дцДНК, находящиеся в клетке под давлением рекомбинационной ситуации, индуцированной как двуцепочечными разрывами, так и никами, претерпевают близкие метаболические превращения, что подразумевает общность и непротиворечивость двух процессов, которые «не конфликтуют» и могут дополнять один другой.

Список литературы / References

- Лихачева А.С., Рогачев В.А., Николин В.П., Попова Н.А., Шилов А.Г., Себелева Т.Е., Стрункин Д.Н., Черных Е.Р., Гельфгат Е.Л., Богачев С.С., Шурдов М.А. Участие экзогенной ДНК в молекулярных процессах, протекающих в соматической клетке. *Информационный вестник ВОГиС*. 2008;12(3):426-447 [Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Shilov A.G., Sebeleva T.E., Strunkin D.N., Chernykh E.R., Gel'fgat E.L., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Involvement of exogenous DNA in the molecular processes in somatic cell. *Informatsionny Vestnik VOGiS = Herald Vavilov Soc Genet Breed Sci*. 2008;12(3):426-447 (in Russian)]
- Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984 [Maniatis T., Fritch E., Sambrook D. *Methods of Genetic Engineering. Molecular Cloning*. Moscow: Mir Publ., 1984 (in Russian)]
- Рузанова В.С., Ошихмина С.Г., Прокуркина А.С., Риттер Г.С., Кирикович С.С., Левитес Е.В., Ефремов Я.Р., Карамышева Т.В., Мещанинова М.И., Мамаев А.Л., Таранов О.С., Богачев А.С., Сидоров С.В., Никонов С.Д., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Долгова Е.В., Богачев С.С. Концепция природной реконструкции генома. Часть 2. Влияние фрагментов экстраклеточной двуцепочечной ДНК на гемопоэтические стволовые клетки. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(8):993-1007. doi 10.18699/vjgb-24-106 [Ruzanova V.S., Oshikhmina S.G., Proskurina A.S., Ritter G.S., Kirikovich S.S., Levites E.V., Efremov Y.R., Karamysheva T.V., Meschaninova M.I., Mamaev A.L., Taranov O.S., Bogachev A.S., Sidorov S.V., Nikonov S.D., Lepkina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Dolgova E.V., Bogachev S.S. A concept of natural genome reconstruction. Part 2. Effect of extracellular double-stranded DNA fragments on hematopoietic stem cells. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov J Genet Breed*. 2024;28(8):993-1007. doi 10.18699/vjgb-24-106]

- Cromie G.A., Connelly J.C., Leach D.R.F. Recombination at double-strand breaks and DNA ends: conserved mechanisms from phage to humans. *Mol Cell*. 2001;8(6):1163-1174. doi 10.1016/S1097-2765(01)00419-1
- Dolgova E.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Orishchenko K.E., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., ... Taranov O.S., Rogachev V.A., Sidorov S.V., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Internalization of exogenous DNA into internal compartments of murine bone marrow cells. *Russ J Genet Appl Res*. 2012;2(6):440-452. doi 10.1134/S2079059712060056
- Dolgova E.V., Efremov Y.R., Orishchenko K.E., Andrushkevich O.M., Alyamkina E.A., Proskurina A.S., Bayborodin S.I., ... Omigov V.V., Minkevich A.M., Rogachev V.A., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Delivery and processing of exogenous double-stranded DNA in mouse CD34+ hematopoietic progenitor cells and their cell cycle changes upon combined treatment with cyclophosphamide and double-stranded DNA. *Gene*. 2013;528(2):74-83. doi 10.1016/j.gene.2013.06.058
- Farzaneh F., Zalin R., Brill D., Shall S. DNA strand breaks and ADP-ribosyl transferase activation during cell differentiation. *Nature*. 1982; 300(5890):362-366. doi 10.1038/300362A0
- Glover D.M. (Ed.) DNA Cloning. A Practical Approach. IRL Press, 1988
- Hagan C.R., Sheffield R.F., Rudin C.M. Human Alu element retrotransposition induced by genotoxic stress. *Nat Genet*. 2003;35(3): 219-220. doi 10.1038/ng1259
- Hastings P.J., McGill C., Shafer B., Strathern J.N. Ends-in vs. ends-out recombination in yeast. *Genetics*. 1993;135(4):973-980. doi 10.1093/genetics/135.4.973
- Hastings P.J., Ira G., Lupski J.R. A microhomology-mediated break-induced replication model for the origin of human copy number variation. *PLoS Genet*. 2009;5(1):e1000327. doi 10.1371/journal.pgen.1000327
- Holmgren L., Szeles A., Rajnavölgyi E., Folkman J., Klein G., Ernberg I., Falk K.I. Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies. *Blood*. 1999;93(11):3956-3963. doi 10.1182/blood.V93.11.3956
- Jacobson G.K., Pinon R., Esposito R.E., Esposito M.S. Single-strand scissions of chromosomal DNA during commitment to recombination at meiosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1975;72(5):1887-1891. doi 10.1073/pnas.72.5.1887
- Johnstone A.P., Williams G.T. Role of DNA breaks and ADP-ribosyl transferase activity in eukaryotic differentiation demonstrated in human lymphocytes. *Nature*. 1982;300(5890):368-370. doi 10.1038/300368A0
- Kucherlapati R.S., Eves E.M., Song K.Y., Morse B.S., Smithies O. Homologous recombination between plasmids in mammalian cells can be enhanced by treatment of input DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1984;81(10):3153-3157. doi 10.1073/pnas.81.10.3153
- Kumagai A., Dunphy W.G. Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in *Xenopus* egg extracts. *Mol Cell*. 2000;6(4):839-849. doi 10.1016/S1097-2765(05)00092-4
- Leung W., Malkova A., Haber J.E. Gene targeting by linear duplex DNA frequently occurs by assimilation of a single strand that is subject to preferential mismatch correction. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94(13):6851-6856. doi 10.1073/pnas.94.13.6851
- Li J., Read L.R., Baker M.D. The mechanism of mammalian gene replacement is consistent with the formation of long regions of heteroduplex DNA associated with two crossing-over events. *Mol Cell Biol*. 2001;21(2):501-510. doi 10.1128/mcb.21.2.501-510.2001
- Lin J., Krishnaraj R., Kemp R.G. Exogenous ATP enhances calcium influx in intact thymocytes. *J Immunol*. 1985;135(5):3403-3410
- Lin Y., Waldman A.S. Capture of DNA sequences at double-strand breaks in mammalian chromosomes. *Genetics*. 2001;158(4):1665-1674. doi 10.1093/genetics/158.4.1665
- MacDougall C.A., Byun T.S., Van C., Yee M.C., Cimprich K.A. The structural determinants of checkpoint activation. *Genes Dev*. 2007; 21(8):898-903. doi 10.1101/gad.1522607
- Maizels N., Davis L. Initiation of homologous recombination at DNA nicks. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(14):6962-6973. doi 10.1093/nar/gky588
- Maricic T., Whitten M., Pääbo S. Multiplexed DNA sequence capture of mitochondrial genomes using PCR products. *PLoS One*. 2010;5(11):e14004. doi 10.1371/journal.pone.0014004
- McVey M., Lee S.E. MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet*. 2008; 24(11):529-538. doi 10.1016/j.tig.2008.08.007
- Møller H.D., Mohiyuddin M., Prada-Luengo I., Sailani M.R., Halting J.F., Plomgaard P., Maretty L., Hansen A.J., Snyder M.P., Pilegaard H., Lam H.Y.K., Regenbreg B. Circular DNA elements of chromosomal origin are common in healthy human somatic tissue. *Nat Commun*. 2018;9(1):1069. doi 10.1038/S41467-018-03369-8
- Murnane J.P., Yezzi M.J., Young B.R. Recombination events during integration of transfected DNA into normal human cells. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(9):2733-2738. doi 10.1093/nar/18.9.2733
- Pecorino L.T., Verhaak R.G.W., Henssen A., Mischel P.S. Extrachromosomal DNA (ecDNA): an origin of tumor heterogeneity, genomic remodeling, and drug resistance. *Biochem Soc Trans*. 2022;50(6): 1911-1920. doi 10.1042/BST20221045
- Perucho M., Hanahan D., Wigler M. Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells. *Cell*. 1980;22(1):309-317. doi 10.1016/0092-8674(80)90178-6
- Perucho M., Wigler M. Linkage and expression of foreign DNA in cultured animal cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1981; 45(Pt.2):829-838. doi 10.1101/sqb.1981.045.01.101
- Petrova D.D., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Ritter G.S., Ruzanova V.S., Efremov Y.R., Potter E.A., Kirikovich S.S., Levites E.V., Taranov O.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. The new general biological property of stem-like tumor cells (Part II: surface molecules, which belongs to distinctive groups with particular functions, form a unique pattern characteristic of a certain type of tumor stem-like cells). *Int J Mol Sci*. 2022; 23(24):15800. doi 10.3390/ijms232415800
- Pierandrei S., Luchetti A., Sanchez M., Novelli G., Sangiuolo F., Lucarelli M. The gene targeting approach of small fragment homologous replacement (SFHR) alters the expression patterns of DNA repair and cell cycle control genes. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2016; 5(4):e304. doi 10.1038/mtna.2016.2
- Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Efremov Y.R., Minkevich A.M., Rozanov A.S., Peltek S.E., ... Baiborodin S.I., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Gene expression profiling of tumor-initiating stem cells from mouse Krebs-2 carcinoma using a novel marker of poorly differentiated cells. *Oncotarget*. 2017;8(6):9425-9441. doi 10.18632/oncotarget.14116
- Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Ruzanova V.S., Efremov Y.R., Kirikovich S.S., Oshikhmina S.G., ... Grivtsova L.U., Kolchanov N.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Stimulation of mouse hematopoietic stem cells by angiogenin and DNA preparations. *Braz J Med Biol Res*. 2024;57:e13072. doi 10.1590/1414-431X2024e13072
- Ritter G.S., Dolgova E.V., Petrova D.D., Efremov Y.R., Proskurina A.S., Potter E.A., Ruzanova V.S., Kirikovich S.S., Levites E.V., Taranov O.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. The new general biological property of stem-like tumor cells. Part I. Peculiarities of the process of the double-stranded DNA fragments internalization into stem-like tumor cells. *Front Genet*. 2022;13:954395. doi 10.3389/fgene.2022.954395
- Rogachev V.A., Likhacheva A., Vratskikh O., Mechetina L.V., Sebeleva T.E., Bogachev S.S., Yakubov L.A., Shurdov M.A. Qualitative and quantitative characteristics of the extracellular DNA delivered to the nucleus of a living cell. *Cancer Cell Int*. 2006;6:23. doi 10.1186/1475-2867-6-23

- Ruzanova V., Proskurina A., Efremov Y., Kirikovich S., Ritter G., Levites E., Dolgova E., Potter E., Babaeva O., Sidorov S., Taranov O., Ostanin A., Chernykh E., Bogachev S. Chronometric administration of cyclophosphamide and a double-stranded DNA-mix at interstrand crosslinks repair timing, called “Karanahan” therapy, is highly efficient in a weakly immunogenic Lewis carcinoma model. *Pathol Oncol Res.* 2022;28:1610180. doi 10.3389/pore.2022.1610180
- Smith A.J.H., Berg P. Homologous recombination between defective neo genes in mouse 3T6 cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1984;49:171-181. doi 10.1101/sqb.1984.049.01.020
- Smithies O., Gregg R.G., Boggs S.S., Koralewski M.A., Kucherlapati R.S. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination. *Nature.* 1985; 317(6034):230-234. doi 10.1038/317230A0
- Spriggs A.I., Boddington M.M., Clarke C.M. Chromosomes of human cancer cells. *Br Med J.* 1962;2(5317):1431-1435. doi 10.1136/bmj.2.5317.1431
- Thomas K.R., Folger K.R., Capecchi M.R. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome. *Cell.* 1986;44(3): 419-428. doi 10.1016/0092-8674(86)90463-0
- Vriend L.E.M., Krawczyk P.M. Nick-initiated homologous recombination: protecting the genome, one strand at a time. *DNA Repair.* 2017; 50:1-13. doi 10.1016/j.dnarep.2016.12.005
- Wu S., Turner K.M., Nguyen N., Raviram R., Erb M., Santini J., Luebeck J., ... Furnari F.B., Chang H.Y., Ren B., Bafna V., Mischel P.S. Circular ecDNA promotes accessible chromatin and high oncogene expression. *Nature.* 2019;575(7784):699-703. doi 10.1038/S41586-019-1763-5
- Yakubov L.A., Deeva E.A., Zarytova V.F., Ivanova E.M., Ryte A.S., Yurchenko L.V., Vlassov V.V. Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors? *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86(17):6454-6458. doi 10.1073/pnas.86.17.6454
- Yoo H.Y., Shevchenko A., Shevchenko A., Dunphy W.G. Mcm2 is a direct substrate of ATM and ATR during DNA damage and DNA replication checkpoint responses. *J Biol Chem.* 2004;279(51):53353-53364. doi 10.1074/jbc.M408026200
- Yoo H.Y., Jeong S.Y., Dunphy W.G. Site-specific phosphorylation of a checkpoint mediator protein controls its responses to different DNA structures. *Genes Dev.* 2006;20(7):772-783. doi 10.1101/GAD.1398806
- Zhu Y., Gujar A.D., Wong C.H., Tjong H., Ngan C.Y., Gong L., Chen Y.A., ... Yi E., deCarvalho A.C., Ruan Y., Verhaak R.G.W., Wei C.L. Oncogenic extrachromosomal DNA functions as mobile enhancers to globally amplify chromosomal transcription. *Cancer Cell.* 2021;39(5):694-707.e7. doi 10.1016/j.ccell.2021.03.006
- Zou L. Single- and double-stranded DNA: building a trigger of ATR-mediated DNA damage response. *Genes Dev.* 2007;21(8):879-885. doi 10.1101/gad.1550307

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.07.2024. После доработки 09.04.2025. Принята к публикации 12.05.2025.