

doi 10.18699/vjgb-25-52

Концепция природной реконструкции генома. Часть 3. Анализ изменения количества теломерной ДНК в клетках колоний как нового амплифицированного признака, возникшего при обработке гемопоэтических стволовых клеток костного мозга

В.С. Рузанова , С.Г. Ошихмина ^{1, 2#}, Г.С. Риттер , Е.В. Долгова , С.С. Кирикович , Е.В. Левитес ,
Я.Р. Ефремов , Т.В. Карамышева¹, А.Г. Богомолов , М.И. Мещанинова ³, А.А. Мамаев⁴, О.С. Таранов ⁵,
С.В. Сидоров^{2, 6}, С.Д. Никонов⁷, О.Ю. Леплина ⁸, А.А. Останин ⁸, Е.Р. Черных ⁸, Н.А. Колчанов ¹,
А.С. Проскурина ^{1#}, С.С. Богачев  

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

² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

⁴ ООО «Лаборатория Ангиофарм», Новосибирск, Россия

⁵ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, р. п. Кольцово, Новосибирская область, Россия

⁶ Городская клиническая больница № 1, Новосибирск, Россия

⁷ Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза, Новосибирск, Россия

⁸ Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

 labmolbiol@mail.ru

Аннотация. Индуцированная «рекомбиногенная ситуация» в гемопоэтических стволовых клетках и активация репаративных систем клетки создают основу для рекомбинационных событий между доставленными в клетку фрагментами экстраклеточной двуцепочечной ДНК и ДНК хромосом или иных форм репаративно-рекомбинационного процесса. На модельных организмах мыши и крысы, а также с использованием в качестве исходного материала клеток костного мозга человека было оценено изменение количества теломерной ДНК в гемопоэтических стволовых клетках как показатель произошедших репарационно-рекомбинационных событий. Во всех проведенных экспериментах в качестве фактора сравнения использовался ангиогенин рекомбинантного человеческого. Методом дот-блот гибридизации показано, что в клетках колоний, полученных из клеток костного мозга модельных организмов, а также из клеток образцов костного мозга человека, обработанных препаратом двуцепочечной ДНК, произошло достоверное увеличение количества теломерной ДНК. Амплификация теломерной ДНК в клетках колоний не связана с контаминацией препаратом исходной ДНК, которым обрабатывались клетки костного мозга. Обработка клеток костного мозга ДНК, не несущей теломерных последовательностей (*AluI* ПЦР-фрагмент), не приводит к увеличению количества теломерной ДНК в клетках выросших колоний. Это предполагает участие в амплификации теломерной ДНК экстрахромосомальной ДНК-матрицы, несущей ДНК теломер. Установлено, что обработка клеток костного мозга ангиогенином также сопровождается увеличением теломерной ДНК в клетках колоний. Сопоставление типа колоний с интенсивностью гибридизации (т.е. количества теломерной ДНК в образце) предполагало, что увеличение количества детектируемой теломерной ДНК при обработке ангиогенином и hDNA⁹⁷ имеет принципиально разное происхождение. Вестерн-блот анализом и методом ПЦР в реальном времени установлено, что увеличение количества теломерной ДНК при обработке клеток костного мозга препаратом двуцепочечной ДНК не коррелирует с активностью эндогенной/экзогенной теломеразы. Для ангиогенина показано, что увеличение количества теломерной ДНК может быть результатом активации эндогенной теломеразной активности. Разработан принцип амплификации нового генетического признака, пришедшего в гемопоэтические стволовые клетки с экстраклеточным двуцепочечным ДНК материалом и закрепившимся в реципиентном геноме или транзитно присутствующим в клетке в качестве новой генетической информации.

Ключевые слова: гемопоэтические стволовые клетки; дот-блот гибридизация; теломерная ДНК; ангиогенин; рекомбиногенная ситуация

Для цитирования: Рузанова В.С., Ошихмина С.Г., Риттер Г.С., Долгова Е.В., Кирикович С.С., Левитес Е.В., Ефремов Я.Р., Карамышева Т.В., Богомолов А.Г., Мещанинова М.И., Мамаев А.А., 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 3. Анализ изменения количества теломерной ДНК в клетках колоний как нового амплифицированного признака, возникшего при обработке гемопоэтических стволовых клеток костного мозга. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2025;29(4):479-495. doi 10.18699/vjgb-25-52

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в Институте цитологии и генетики СО РАН (государственный бюджетный проект № FWNR-2022-0016) и при поддержке А.А. Пуртова, И.Н. Зайцевой и ООО «ЭСЛАБ ДИАГНОСТИК».

© Рузанова В.С., Ошихмина С.Г., Риттер Г.С., Долгова Е.В., Кирикович С.С., Левитес Е.В., Ефремов Я.Р., Карамышева Т.В., Богомолов А.Г., Мещанинова М.И., Мамаев А.А., 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., 2025

Авторы внесли равный вклад.

Контент доступен под лицензией Creative Commons Attribution 4.0

Concept of natural genome reconstruction.

Part 3. Analysis of changes in the amount of telomeric DNA in colony cells as a new amplified feature that arose during the processing of hematopoietic bone marrow stem cells

V.S. Ruzanova ^{1#}, S.G. Oshikhmina ^{1, 2#}, G.S. Ritter ¹, E.V. Dolgova ¹, S.S. Kirikovich ¹, E.V. Levites ¹, Y.R. Efremov ¹, T.V. Karamysheva¹, A.G. Bogomolov ¹, M.I. Meschaninova ³, A.L. Mamaev⁴, O.S. Taranov ⁵, S.V. Sidorov^{2, 6}, S.D. Nikonov⁷, O.Y. Leplina ⁸, A.A. Ostanin ⁸, E.R. Chernykh ⁸, 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 Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

⁴ Laboratory Angiopharm LLC, Novosibirsk, Russia

⁵ State Scientific Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, Koltsovo, Novosibirsk region, Russia

⁶ City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russia

⁷ Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Novosibirsk, Russia

⁸ Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

 labmolbiol@mail.ru

Abstract. The induced "recombinogenic situation" in hematopoietic stem cells and the activation of the cell's reparative systems create the basis for recombination events between fragments of extracellular double-stranded DNA delivered into the cell and chromosomal DNA or other forms of the reparative-recombination process. In mouse and rat model organisms as well as in human bone marrow cells, changes in the amount of telomeric DNA in hematopoietic stem cells were assessed as an indicator of repair and recombination events that have occurred. In all experiments performed, recombinant human angiogenin was used as a comparison factor. Dot blot hybridization showed that in the colony cells obtained from the bone marrow cells of the model organisms as well as from human bone marrow cells treated with a double-stranded DNA preparation, there was a significant increase in the amount of telomeric DNA. Amplification of telomeric DNA in colony cells is not associated with contamination of the original DNA preparation with which the bone marrow cells were treated. Treatment of bone marrow cells with DNA that does not carry telomeric sequences (*AluI* PCR fragment) does not lead to an increase in the amount of telomeric DNA in the cells of grown colonies. This suggests the participation in the amplification of telomeric DNA of an extrachromosomal DNA template carrying telomeric DNA. It has been established that treatment of bone marrow cells with angiogenin also leads to an increase in telomeric DNA in colony cells. A comparison of the type of colonies with the intensity of hybridization (i.e. the amount of telomeric DNA in the sample) suggests that the increase in the amount of detectable telomeric DNA following treatment with angiogenin and hDNA^{gr} has a fundamentally different origin. Western blot analysis and real-time PCR revealed that the increase in the amount of telomeric DNA following treatment of bone marrow cells with a double-stranded DNA preparation does not correlate with the activity of endogenous/exogenous telomerase. For angiogenin, it has been shown that an increase in the amount of telomeric DNA may be the result of activation of endogenous telomerase activity. A principle has been developed for the amplification of a new genetic trait that came into hematopoietic stem cells with extracellular double-stranded DNA material and was fixed in the recipient genome or was transitively present in the cell as new genetic information.

Key words: hematopoietic stem cells; dot blot hybridization; telomeric DNA; angiogenin; recombinogenic situation

For citation: Ruzanova V.S., Oshikhmina S.G., Ritter G.S., Dolgova E.V., Kirikovich S.S., Levites E.V., Efremov Y.R., Karamysheva T.V., Bogomolov A.G., Meschaninova M.I., Mamaev A.L., 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 3. Analysis of changes in the amount of telomeric DNA in colony cells as a new amplified feature that arose during the processing of hematopoietic bone marrow stem cells. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii* = *Vavilov J Genet Breed.* 2025;29(4):479-495. doi 10.18699/vjgb-25-52

Введение

Основной идеей настоящей части исследования является доказательство участия интернализованных в гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) (Рузанова и др., 2024) экстраклеточных фрагментов двуцепочечной ДНК в репарационно-рекомбинационных процессах, активированных этими же фрагментами в недифференцированных прогениторах. В качестве модельной мишени была выбрана теломера, представляющая собой массу однородной ДНК, изменения количества которой легко обнаружить экспериментально. Повторы, образующие теломеру, имеют

одну и ту же нуклеотидную последовательность у всех млекопитающих. Это позволяет использовать человеческую ДНК в качестве субстрата для оценки изменения количества теломерной ДНК, произошедшего вследствие репарационно-рекомбинационных процессов на различных экспериментальных модельных системах. Методом оценки была выбрана количественная дот-блот гибридизация с ДНК теломерного повтора.

Индукция пангеномных одноцепочечных разрывов фрагментами двуцепочечной ДНК, интернализованными ГСК естественным природным механизмом, представля-

ет собой основополагающее явление в череде событий, определяемых нами как «рекомбиногенная ситуация» (Лихачева и др., 2008). Такое состояние клетки приводит в движение репарационно-рекомбинационную машину, в результате которого возникает множество взаимодействий между хроматином и фрагментами ДНК, находящимися в ядре.

По своей сути это та же самая ситуация, когда в клетке формируются двуцепочечные разрывы или индуцируется нарушение структуры хроматина высшего порядка. В рамках рекомбиногенной ситуации можно выделить две основные стороны процесса: молекулярную ферментативную машину, активированную в клетке, и рекомбинационные интермедиаты хроматина и фрагментов ДНК, участвующие в репарационной рекомбинации. Обе стороны процесса глубоко проанализированы для двуцепочечных разрывов и одноцепочечной ДНК, однако существует минимальное количество информации о факторах рекомбиногенной ситуации, индуцированной никами.

Следуя сказанному, в Приложениях 1 и 2¹ мы кратко описываем молекулярные события, которые характеризуют появление двуцепочечных разрывов, одноцепочечных нитей ДНК или нарушения структуры хроматина высшего порядка, предполагая, что многие из описанных деталей будут также характерны для рекомбиногенной ситуации, индуцированной никами. В Приложении 1 дана краткая информация о факторах, участвующих в описываемых процессах. Как следует из проведенного в Приложении 2 анализа, в клетке индуцируется комплексный ответ на повреждение и различные изменения структуры хроматина высшего порядка. Активируется система иерархических киназ (ATM, ATR, ДНК-РК, относящихся к семейству фосфатидилинозитол-3-киназависимых киназ) и приводятся в активное состояние молекулярные системы или восстановления целостности хроматина, или нормализации его пространственной организации.

Разрывы одной из нитей ДНК («ники») находятся в списке основных триггеров нарушения структуры хроматина высшего порядка. Показано, что этот тип нарушений структуры хроматина имеет свой путь репарации и активирует характерную для данного пути палитру репарационно-рекомбинационных факторов, отличающуюся от репаративной машины, восстанавливающей двуцепочечные разрывы. При рекомбиногенной ситуации, индуцированной никами, активируется процесс гомологичной рекомбинации, основной характеристикой которого является высокая точность коррекции генетической информации (Vriend, Krawczyk, 2017; Maizels, Davis, 2018). Известно, что при возникновении ников и их репарации по механизму гомологичной рекомбинации ATM и ATR киназы не являются абсолютно необходимыми факторами процесса восстановления повреждения. Это означает, что ник-опосредованная гомологичная рекомбинация может проходить без участия иерархических киназ и, как следствие, без активации «чек-поинт» механизма. Также есть основания считать, что опосредованная никами гомологичная рекомбинация не зависит от фазы клеточного

цикла. Репарация ников, как и репарация двуцепочечных разрывов, зависит от формирования филаментов репликативного фактора А. При этом если репарация двуцепочечных разрывов зависит от активности BRCA1, RAD51, BRCA2 комплексов, то репарация ников связана с активностью BRCA1, но не зависит от RAD51 (Vriend, Krawczyk, 2017; Maizels, Davis, 2018).

Таким образом, фрагменты ДНК, интернализированные в клетку, индуцируют ники. Развивается рекомбиногенная ситуация, и иницируется механизм гомологичной рекомбинации. При таком сценарии фрагменты ДНК, находящиеся внутри клетки, выступают в качестве внехромосомного субстрата для репаративно-рекомбинационных процессов, ими же активированных. В результате взаимодействия фрагментов и хроматина произойдут изменения ДНК хромосом. Мы предполагаем, что если эти изменения будут масштабными, то их можно детектировать современными методами анализа.

Очевидно, что наиболее вероятными локусами хромосом, в которых возможно обнаружить произошедшие с геномом изменения, окажутся локусы, содержащие повторяющиеся последовательности, к которым относятся районы интеркалярного гетерохроматина, центромеры и теломеры. Эти районы хромосом содержат большое количество ДНК, и в случае масштабных изменений можно будет различными экспериментальными подходами, включая ПЦР в реальном времени, флуоресцентную *in situ* гибридизацию (FISH), количественную дот-блот гибридизацию, определить изменение количества ДНК в выбранном локусе. Интеркалярный гетерохроматин и центромерные сателлиты видоспецифичны, и для анализа изменений, произошедших в геноме, необходимо брать аллогенную ДНК. Теломерные сателлиты у всех млекопитающих и человека представлены одним и тем же гексануклеотидным повтором TTAGGG, и для проведения экспериментов и анализа изменения в теломерных локусах на различных видах можно использовать любую двуцепочечную ДНК млекопитающих или человека (Giardini et al., 2014).

Теломеры – это специфические структуры хроматина на концах хромосом эукариотических клеток. ДНК теломер большинства эукариот, как было сказано выше, состоит из повторяющихся гексануклеотидов (для человека – TTAGGG). Размер теломеры для человеческих хромосом составляет около 10 т. п. н. Прямая и комплементарная цепи теломер называются G- и C-нитеями. 3'-конец G-нити является одноцепочечной ДНК, которая называется G-хвостом. Показано, что G-хвост проникает в проксимальный двуцепочечный повтор и взаимодействует с C-нитью, образуя особую структуру – t-петлю. Каждая теломера представляет собой окончание ДНК хромосомы, которое защищено от процессов деградации, вызывающих нестабильность хромосом, замкнутым кольцом t-петли и комплексом специфических белков – шелтерином и гетеротимером CST (CTC1-STN1-TEN1). CST гетеротимер связывается с интермедиатом t-петли в точке аннилинга одноцепочечной свисающей G-цепи и комплементарной последовательности 3'–5' цепи (C-цепь), формируя защитный комплекс экпирования (рис. 1, А) (Giardini et al., 2014; Soman et al., 2022; Alanazi et al., 2024).

¹ Приложения 1–5 см. по адресу:

<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2025-29/appx16.pdf>

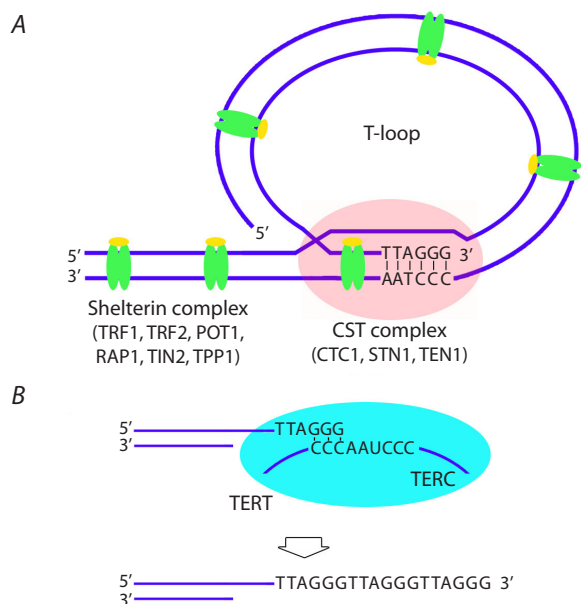


Рис. 1. Структура теломеры и механизм ее удлинения теломеразным комплексом.

А – белковые комплексы в теломерном районе. В – механизм удлинения теломеры теломеразным комплексом. Несколько нуклеотидов на 3' конце G-цепи теломеры комплементарно связываются с последовательностью шаблонного домена теломеразной РНК TERC. Хромосомный конец удлиняется обратной транскриптазой TERT.

Специфический белковый комплекс шелтерин служит функциональной основой хроматина теломер и в клетках млекопитающих состоит из одного (POT1) и двух (TRF1 и TRF2) теломерных ДНК-связывающих белков, а также специфических белков, соединяющих эти ДНК-связывающие белки (см. рис. 1, А) (Giraud-Panis et al., 2010; Lee et al., 2014; Soman et al., 2022). Вместе указанные структурные комплексы у млекопитающих формируют теломерный гетерохроматин (Lu W. et al., 2013).

ДНК теломер в делящихся клетках подвержена укорочению (так называемая проблема конечной репликации). Полуконсервативная репликация не может завершить синтез концов линейной ДНК. Таким образом, после нескольких раундов клеточного деления соматические клетки имеют укороченную ДНК теломер, что приводит к необратимой остановке роста клеток, или репликативному старению (Chan, Blackburn, 2003; Doksanı, 2019; Jones et al., 2023).

Описано два механизма, предотвращающих укорочение теломер и сохраняющих возможность бесконечного деления, которые активны в стволовых клетках, в том числе ГСК, и в immortalized клетках опухоли. Основной механизм связан с активностью теломеразы (см. рис. 1, В). Теломераза – это специфическая обратная транскриптаза, которая удлиняет G-нить теломерной ДНК. Стволовые клетки и раковые клетки около 90 % опухолей поддерживают длину теломер теломераз-зависимым образом (Chan, Blackburn, 2003; Nandakumar, Cech, 2013).

Второй механизм носит название «альтернативное удлинение теломер» и описан для незначительного количества опухолей. Этот путь характеризуется специфиче-

ским механизмом метаболизма ДНК теломер, в котором основным элементом являются рекомбинация и рекомбинация, ассоциированная с репликацией (Lundblad, 2002; Hande, 2004; Pickett et al., 2009; Nabetani, Ishikawa, 2011; Rovatsos et al., 2011; Doksanı, 2019; Loe et al., 2020; Lu R., Pickett, 2022; Jones et al., 2023).

В настоящем исследовании для оценки масштабных изменений в геноме был выбран анализ количества теломерной ДНК как мишени, состоящей из повторов, не имеющих видовой специфичности у млекопитающих, в клетках, обработанных терапевтической ДНК hDNA^{gr}. Анализ выполнен с использованием трех подходов: FISH, ПЦР в реальном времени, дот-блот гибридизация (Приложение 3). Как сказано выше, простым способом оценить изменение количества теломерной ДНК в ГСК будет анализ этого параметра в клетках-потомках после обработки ГСК в составе клеток костного мозга и после их амплификации в виде колоний на метилцеллюлозе (до 1000 клеток в колонии). ГСК с измененной генетикой на метилцеллюлозе дадут генетически однородное потомство, т.е. произойдет амплификация нового признака, который можно детектировать (технология является собственностью ООО «ЭС.ЛАБ ДИАГНОСТИК», патентная заявка № 2023124343 от 20.09.2023). Теломеры образованы повторами, которые идентичны для всех млекопитающих (TTAGGG повтор «позвоночных/человека»). Этот факт принципиально позволял использовать hDNA^{gr} в мышинной или крысиной моделях для оценки изменения количества теломерной ДНК.

Дополнительно было оценено изменение количества теломеразы в клетках колоний. Через 15 суток после первичной индукции в составе клеток костного мозга клетки колоний повторно обрабатывались теми же факторами. Образцы клеток отбирались во временные точки 0 (без обработки) и спустя 1, 2, 4, 8, 16, 32 ч после повторной обработки. Все оценки проводились в сравнении между клетками, обработанными тремя индукторами – ангиогенином, hDNA^{gr} и совместно двумя препаратами.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. В работе использованы молодые самцы мышей СВА/Лас в возрасте от 2 до 5 месяцев, старые самцы мышей СВА/Лас в возрасте от 9 до 12 месяцев; старые самцы крыс линии Wistar в возрасте от 18 до 22 месяцев, выведенные в ЦКП «Виварий конвенциональных животных» Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Животных содержали группами по 6–10 мышей и по 3–4 крысы в клетке со свободным доступом к пище и воде. Все эксперименты с животными были одобрены Комитетом по уходу и использованию животных Института цитологии и генетики СО РАН. Мышей выводили из эксперимента методом цервикальной дислокации шейных позвонков, крыс – методом CO₂ эвтаназии или декапитацией.

Клетки костного мозга человека. 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 ге-

матологии 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 исследовались 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.

Препарат ДНК. Реконструктор ДНК генома человека (hDNA^{gr}) и ДНК плаценты были выделены из плацент здоровых женщин. hDNA^{gr} фрагментировали до 1–10 нуклеосомных мономеров (200–2000 п. н.) путем обработки ультразвуком, депротеинизировали с помощью протеиназы К и выделяли фенол-хлороформной экстракцией. ДНК плаценты выделяли аналогичным образом, без фрагментации.

Ангиогенин предоставлен ООО «Лаборатория Ангиофарм» (Новосибирск, Россия).

pBSM13-*AluI*-pBSM13 ПЦР-фрагмент. Амплификацию *AluI* повтора человека (pBSM13-*AluI*-pBSM13 фрагмент) проводили с помощью ПЦР. Матрица представляла собой ДНК *AluI* повтора, клонированного в pUC19, включающего начало и конец tandemно повторяющихся последовательностей *AluI* и *AluY* (NCBI: AC002400.1, 53494–53767). Для амплификации использовали стандартные праймеры M13 (M13 for: 5' GTAAAACGACGGCC AGT 3', M13 rev: 5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'). ПЦР-фрагмент пересаждали 0.1 V NaAc 3 M, pH 5.2, и 1 V изопропанола в течение 10 мин при –20 °C. Осадок промывали в 70 % этаноле и растворяли в стерильной воде.

Выделение клеток костного мозга. После цервикальной дислокации шейных позвонков у мышей препарировали бедренные и большеберцовые кости, отсекали эпифизы и вымывали костный мозг средой IMDM+2 % FBS. Клеточную суспензию пропускали несколько раз через иглу 21-го калибра, чтобы избавиться от костномозговых розеток, и фильтровали через 40 мкм. Клетки осаждали центрифугированием 10 мин при 400g и ресуспендировали в буфере со 130 mM хлоридом аммония для лизиса эритроцитов на 3–5 мин. Затем буфер разбавляли в 10 раз PBS, клетки вновь осаждали, ресуспендировали в среде IMDM и подсчитывали в камере Горяева.

Обработка клеток костного мозга индукторами. Клетки костного мозга, выделенные из старых животных и сепаратов костного мозга больных лимфомой Ходжкина, инкубировали с индукторами в течение 1 ч в атмосфере 5 % CO₂, влажности 95 %, 37 °C из расчета: на 3 млн

клеток – 500 мкг hDNA^{gr}, либо 500 нг ангиогенина, либо 500 мкг hDNA^{gr} и 500 нг ангиогенина совместно в 1 мл среды IMDM без сыворотки. Контрольные клетки костного мозга (без обработок) инкубировали в среде IMDM без сыворотки с добавлением PBS в объеме, равном объему добавленного индуктора к активированным клеткам костного мозга.

Культивирование клеток костного мозга в метилцеллюлозной среде. Клетки костного мозга после/без активации индукторами переосаждали в течение 10 мин при 400g и ресуспендировали в среде IMDM+2 % FBS. Для количественного определения и анализа миелоидных предшественников клетки костного мозга мыши помещали в метилцеллюлозную среду MethoCult M3434, а клетки костного мозга крысы и человека – в метилцеллюлозную среду MethoCult H4034 (Stem Cell Technologies). Подсчет количества колоний и выделение клеток из метилцеллюлозной среды после культивации осуществляли согласно инструкции производителя. Культивирование клеток проводили 9–15 дней, в зависимости от целей эксперимента.

Выделение ДНК из клеток колоний и печени молодых мышей. Клетки колоний осаждали при 400g в течение 5–7 мин. Осадок ресуспендировали в 50 mM ЭДТА.

После цервикальной дислокации шейных позвонков у мышей отсекали фрагмент печени и гомогенизировали его в буфере со 100 mM ЭДТА, pH 8.0, и 20 mM Трис-HCl, pH 7.5. Затем в обоих случаях к клеткам добавляли SDS до 1 % и инкубировали гомогенат со 100 мкг/мл протеиназы К при 58 °C в течение 60 мин. Для выделения ДНК проводили фенол-хлороформную экстракцию и переосаждение 1 V изопропанола из 0.3 M NaAc. Осадок ДНК промывали 70 % этанолом и растворяли в стерильной воде. Количество ДНК измеряли на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США).

Выделение суммарной РНК. Клетки колоний осаждали при 400g в течение 5–7 мин. Осадок ресуспендировали в TRIzol Reagent (Thermo Fisher Scientific, США). Суммарную РНК выделяли в соответствии с инструкциями производителя. Количество РНК измеряли на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США).

Получение кДНК. ПЦР с обратной транскрипцией проводили на матрице поли-А мРНК с использованием амплификатора T100 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, США) и набора MMLV RT («Евроген», Россия) по протоколу производителя.

Дот-блот гибридизация. Для количественной оценки теломерной ДНК использовали образцы ДНК, выделенные из клеток колоний мыши и человека. ДНК образцов была озвучена до размеров 100–500 п. н. Образцы ДНК денатурировали в 0.2 M NaOH при 100 °C в течение 10 мин и равное количество ДНК наносили на мембрану Hybond N, используя специальное оборудование для нанесения – дот-камеру. Образцы прижигали к мембране 10 мин под ультрафиолетовой лампой и хранили до гибридизации.

Мембрану с пришитой к ней ДНК переносили в 50 мл предгибризационного буфера, содержащего 0.1 % SDS, 5×SSC, 5× раствор Денхарда, 100 мкг/мл суммарной РНК дрожжей, и инкубировали при 37 °C в течение 1–3 ч. Меченый образец ДНК 54 п. н. (P³² олигонуклеотид G-зонд – (TTAGGG)₉, C-зонд – (CCCTAA)₉) денатуриро-

вали кипячением в течение 10 мин и вносили в 50 мл гибридационного буфера, содержащего 0.1 % SDS, 5×SSC, 5 % декстран сульфат 500000, 100 мкг/мл суммарной РНК дрожжей. Предгибридационный раствор сливали и к мембране после перемешивания приливали гибридационный буфер, содержащий меченый материал. Гибридацию вели при 37 °С на протяжении ночи при постоянном перемешивании. После гибридизации мембрану отмывали раствором, содержащим 0.1 % SDS и 0.1×SSC, три раза по 15 мин при 37 °С. Режим гибридизации (буферная система, температура и количество отмывок) коротких олигонуклеотидов выбран эмпирически при проведении многочисленных экспериментов с радиоактивным фосфором и находится в пределах 37–42 °С (Dolgova et al., 2012).

Мембрану с перенесенными на нее образцами экспонировали на экран К-типа. Сканирование радиоизотопных образцов выполняли при помощи системы PharosFX. Полученные изображения анализировали в программе Quantity One по параметру плотности пятен (интенсивность/мм²).

Пульс-форез. Для оценки теломерной ДНК методом пульс-фореза использовали клетки крысиных колоний. Их объединяли, отмывали от метилцеллюлозной среды и считали в камере Горяева. Клетки колоний заливали в блоки 1 % легкоплавкой агарозы из расчета 500 тыс. клеток на один блок. До проведения анализа блоки хранили в 0.5 М ЭДТА при 4 °С. Перед пульс-электрофорезом блоки споласкивали в ТЕ-буфере и инкубировали с лизирующим буфером (50 мМ ЭДТА, 1 % саркозил (Serva, Германия), 1 мг/мл протеиназы К (Thermo Fisher Scientific, США)) в течение 20 мин при 50 °С. Затем блоки легкоплавкой агарозы фиксировали в карманах агарозного блока и подвергали электрофоретической разгонке в системе пульс-фореза в режиме: forward – 3 с, reverse – 1 с, RAM-фактор – 0.9.

После этого ДНК переносили на мембрану Hybond N с использованием капиллярного способа в 20×SSC (Маниатис и др., 1984). Образцы ДНК прижигали к мембране в течение 10 мин под ультрафиолетовой лампой и хранили до гибридизации. Далее гибридизацию с P³² олигонуклеотидом и сканирование радиоизотопных образцов проводили таким же образом, как и при дот-блот гибридизации.

Анализ экспрессии TERT. Клетки костного мозга, выделенные из сепаратов костного мозга больных лимфомой Ходжкина, инкубировали с индукторами (hDNA^{gr}, ангиогенин, ангиогенин+hDNA^{gr}) и без индукторов (клетки костного мозга без обработок, контроль) в среде IMDM в течение 1 ч в атмосфере 5 % CO₂, влажности 95 %, 37 °С. Затем на протяжении 15 дней клетки костного мозга культивировали в метилцеллюлозной среде. При выделении клеток из метилцеллюлозной среды образовавшиеся колонии объединяли и отмывали от среды согласно инструкции производителя. Далее клетки образовавшихся колоний считали в камере Горяева и вновь инкубировали с индукторами. После/без активации индукторами клетки переосаждали в течение 10 мин при 400g, ресуспендировали в DMEM/F-12 (1:1) среде («БиолоТ», Россия) с добавлением 10 % эмбриональной бычьей сыворотки (Capricorn Scientific, Германия), гентамицина 100 мкг/мл

Последовательности используемых праймеров

Праймер	Структура
Rplp0-for	5' CGTCCTCGTGGGAATGACAT 3'
Rplp0-rev	5' GCATCATGGTGTCTTGGCC 3'
TERT-for	5' GGCACGGCTTTTGTTCAGAT 3'
TERT-rev	5' ACATGCGTGAACCTGTACG 3'

(«Дальхимфарм», Россия) и амфотерицина Б 1 мкг/мл («Синтез», Россия) и рассаживали по лункам в 24-луночной планшете. Через 1, 2, 4, 8, 16, 32 ч после повторной индукции отбирали образец клеток и делили его на две равные по количеству клеток части. Нулевая точка представляла собой клетки колоний до повторной обработки индукторами.

Одну часть клеток осаждали, осадок лизировали в TRIzol Reagent и выделяли суммарную РНК. Образцы РНК были пултированы в две группы: 0–4 и 8–32 ч. RT-qPCR проводили на матрице мРНК поли-А на амплификаторе T100 Thermal Cycler с набором MMLV RT согласно протоколу производителя. qPCR проводили в 96-луночных планшетах с использованием BioMaster HS-qPCR SYBR (2×) в соответствии с протоколом производителя на приборе QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Последовательности праймеров приведены в таблице. Анализ qPCR каждого образца выполняли в трех повторностях. Относительный уровень экспрессии определяли методом 2^{–ΔΔC_t}. Временная группа образцов 0–4 ч была выбрана в качестве контрольной группы; уровень экспрессии целевого гена в них принимали равным 1, референсный ген – Rplp0. Протокол для ПЦР был следующим: 95 °С в течение 5 мин, 40 циклов по 95 °С в течение 20 с, 57 °С – 30 с, 72 °С – 30 с, с заключительным этапом плавления с медленным нагревом от 60 до 95 °С.

Другую часть клеток осаждали и ресуспендировали в физиологическом растворе. К суспензии клеток добавляли ингибиторы протеаз: PMSF, N-этилмалеимид, TPCK до 1 мМ и аprotинин до конечной концентрации 2 мкг/мл. Затем добавляли Sample buffer (66 мМ Трис-НСl, рН = 6.8, 26.3 % глицерина, 2.1 % SDS, 0.011 % бромфенолового синего), кипятили лизаты при 96 °С в течение 10 мин и центрифугировали 5 мин при 12 тыс. оборотов. Лизаты использовали для электрофореза, образцы не объединяли по времени. Перед нанесением на электрофорез образцы выравнивались по количеству клеток, подвергшихся лизису. В качестве контроля был взят коммерчески доступный рекомбинантный белок TERT человеческий (Cloud-Clone-Corp, США) (2 мкг на дорожку). Вестерн-блот с антителами проводился после электрофореза и переноса на нитроцеллюлозную мембрану. Неспецифическое связывание блокировалось инкубацией в 0.01 М фосфатно-солевом буфере (PBS), содержащем 0.02 % Tween 20, в течение ночи при 4 °С. Затем мембраны инкубировали с поликлональными антителами к человеческому TERT (Cloud-Clone-Corp, США) или с моноклональными пер-

вичными антителами к человеческому TERT (Antibody System, Франция) и вторичными антителами к мышиному IgG (H+L) (Affinity Biosciences, США). Сигнал визуализировали с помощью ECL Western blotting detection system (Abcam, Великобритания) и детектировали на устройстве iBright (Thermo Fisher Scientific, США).

Статистический анализ был выполнен с использованием программного обеспечения Statistica 8 (StatSoft, США). Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни, выявленные различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

Результаты

Выбор адекватного метода оценки количества теломерной ДНК

Проведена серия аналитических экспериментов. На первом этапе на мышинной модели были отработаны три принципиальных методических подхода определения количества теломерной ДНК.

Для выбора адекватного метода клетки костного мозга мышей были обработаны активаторами hDNA^{gr} и ангиогенином и высеяны на метилцеллюлозу. Через 9 суток клетки были собраны. Из части клеток выделили ДНК и провели ПЦР в реальном времени и дот-блот гибридизацию. Часть клеток того же образца обработали колхицином и провели FISH. Таким образом, эксперименты были выполнены в один момент времени, «здесь и сейчас», с использованием одного и того же материала клеток, что позволило оценить адекватность каждого подхода для количественной оценки содержания теломерной ДНК в анализируемых образцах (см. Приложение 3).

Полученные данные свидетельствовали, что анализ длины теломер методами ПЦР в реальном времени и FISH в выбранных экспериментальных условиях дает противоречивые результаты, которые можно интерпретировать различными механизмическими вариантами. Только дот-блот гибридизация позволяет выявить существующую высокую достоверную разницу в изменении количества теломерной ДНК. В этой связи мы выбрали метод оценки количества теломерной ДНК с использованием количественной дот-блот гибридизации. Этот подход позволяет прямо оценить количество гомологичной используемому зонду ДНК в экспериментальном образце независимо от перечисленных в Приложении 3 обстоятельств.

Оценка количества теломерной ДНК

в клетках колоний методом дот-блот гибридизации

Увеличение количества теломерной ДНК в потомках ГСК, обработанных в составе клеток костного мозга и давших колонии с увеличенным количеством теломерной ДНК, может иметь несколько принципиальных вариантов происхождения:

- 1) интеграция теломерной ДНК, исходно присутствующей в образце hDNA^{gr}, в геном ГСК и ее амплификация в составе генетически однородных клеток колоний;
- 2) амплификация циклизированных теломерных повторов, присутствующих в препарате hDNA^{gr}, по типу «катящегося кольца» или альтернативного удлинения теломер;

- 3) индукция эндогенной теломеразы ГСК или индукция транзитного гена теломеразы, пришедшего вместе с интернализированной в ГСК экстраклеточной hDNA^{gr}, стохастически содержащей ДНК гена теломеразы;
- 4) активация покоящихся ГСК, ранее никогда не активированных жизненными событиями, содержащих исходное максимально возможное количество теломерных повторов (а значит, теломерной ДНК);
- 5) увеличение количества теломерной ДНК является следствием присутствия в клетках колоний остаточной исходной hDNA^{gr};
- 6) возможны также смешанные варианты.

Клетки костного мозга мыши и человека

Оценено количество теломерной ДНК в клетках-потомках ГСК, обработанных в составе клеток костного мозга активаторами hDNA^{gr}, ангиогенином и совместно, на мышинной модели и в клетках костного мозга человека методом количественной дот-блот гибридизации (рис. 2). Эксперименты были повторены многократно (см. пояснения к рис. 2) с ДНК из различных выделений и использованием прямого и обратного праймера-зонда для гибридизации. Было выбрано два подхода к нормированию количества ДНК в образцах обработанных клеток. Первый – количество ДНК выравнивалось по интеркалятору (Qubit) и проводилась количественная дот-блот гибридизация (мышинная модель, клетки костного мозга человека). Второй – нормирование осуществлялось по количеству взятых в обработку клеток колоний (крысинная модель).

На рис. 2, *H* сопоставляются сигналы гибридизации с теломерным зондом ДНК, выделенной из клеток, обработанных ангиогенином, hDNA^{gr} и совместно индукторами. Можно видеть, что в различных экспериментах в образцах ангиогенина интенсивность гибридизации разнонаправленно меняется. Для hDNA^{gr} она всегда выше, чем в контроле, количество теломерной ДНК для индуктора hDNA^{gr} превосходило количество теломерной ДНК в контроле в 1.1–2.5 раза. При совместном применении двух индукторов сигнал гибридизации незначительно выше контроля. Полученные результаты означали, что рассматриваемый признак для ангиогенина как монопрепарата нестабилен.

Сопоставление типа колоний с интенсивностью гибридизации. Проведено сопоставление зависимости силы гибридизационного сигнала (т. е. количества теломерной ДНК в образце) от типа колоний в четырех независимых экспериментах, где учитывались указанные параметры. Анализировались два ростка, BFU-E и CFU-GM (Приложение 4).

Можно полагать, что увеличение количества детектируемой теломерной ДНК при обработке ангиогенином и hDNA^{gr} имеет принципиально разное происхождение. Для ангиогенина возможен вариант увеличения количества теломерной ДНК, связанный с индукцией активности G0 CFU-GM колоний, ранее в костном мозге неактивных, содержащих эмбрионально заложенное количество теломерной ДНК. Для hDNA^{gr} при сопоставлении всех полученных данных на обеих модельных системах не обнаруживается корреляции между силой гибридизации и превалированием колоний одного из типов.

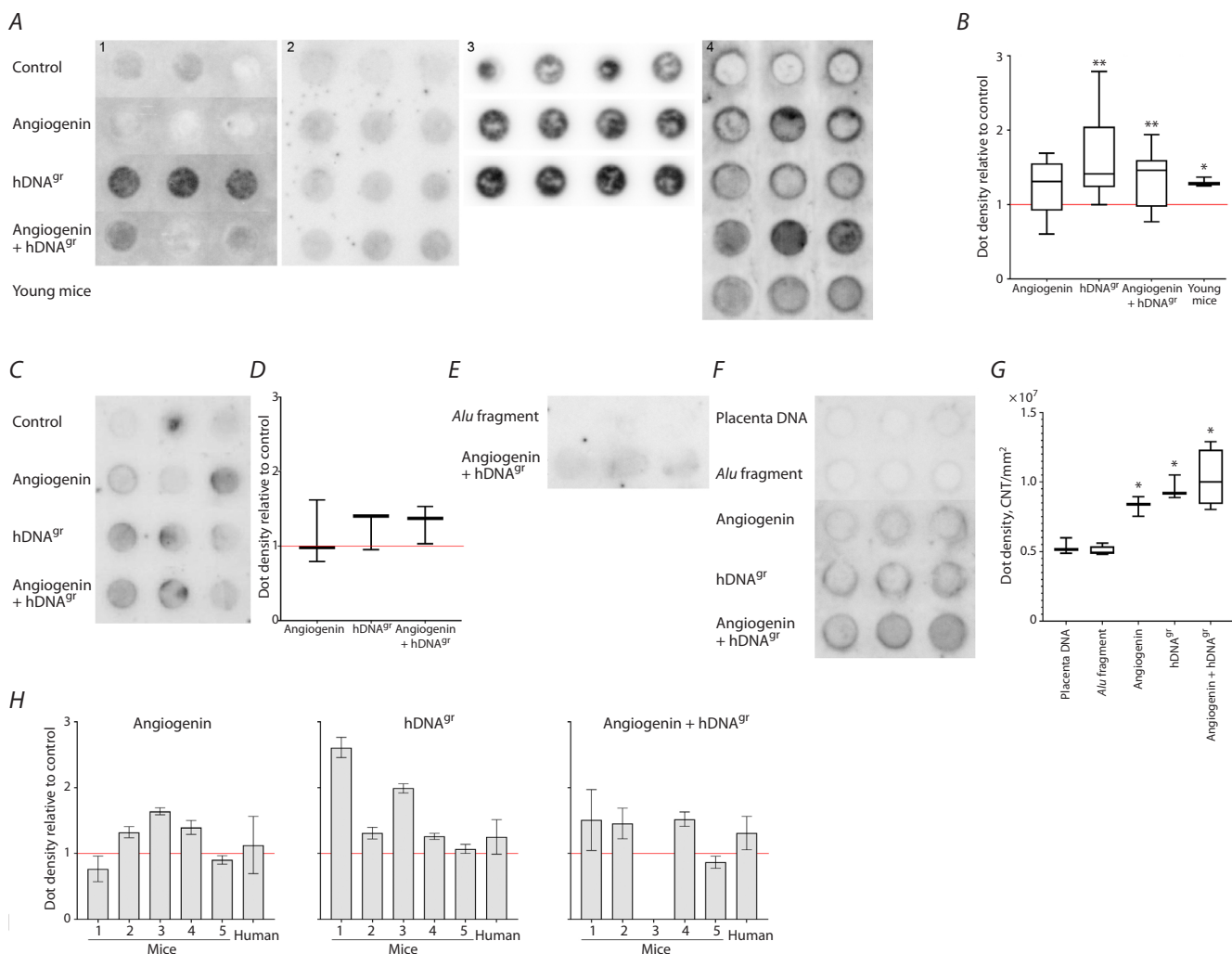


Рис. 2. Количественная дот-блот гибридизация ДНК, выделенной из колоний стволовых гемопоэтических клеток костного мозга мышей (A, B) и человека (C–G) без индукции (Control) и после индукции ангиогенином, препаратом hDNA^{9f} или совместно ангиогенином и препаратом hDNA^{9f}, с использованием в качестве зонда теломерного повтора (54 п.н., $n = 9$). A1, A3, C, F – C-зонд; A2, A4 – G-зонд. Также в качестве контрольных образцов использовали ДНК молодых мышей (A4), ДНК плаценты человека (F) и ДНК, выделенную из колоний, полученных из ГСК в составе клеток костного мозга, обработанных pBSM13-AluI-pBSM13 ПЦР-фрагментом (E, F). Мембрану анализировали с помощью фосфоимиджера. Интенсивность сигнала анализировали в программе Quantity1. A, C, E, F – фотографии мембран после гибридизации. B, D, G – диаграммы, отражающие плотность пятен (интенсивность/мм²) относительно контрольной группы, плотность пятен в которой принята за единицу (красная линия). Достоверные различия определены с помощью критерия Манна–Уитни: B – по сравнению с контрольной группой, G – по сравнению с группой, обработанной AluI фрагментом, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. H – сравнительный анализ интенсивности гибридизации (т.е. количества теломерной ДНК) по индивидуальным экспериментам между образцами ДНК колоний после обработки ангиогенином, hDNA^{9f} или совместно ангиогенином и препаратом hDNA^{9f}.

Оценка интенсивности гибридизации с P³² теломерным зондом при использовании в качестве индуктора ПЦР-фрагмента pBSM13-AluI-pBSM13. Отдельно следует остановиться на результатах сравнительной гибридизации с ДНК, выделенной из колоний, полученных из ГСК в составе клеток костного мозга, которые были обработаны pBSM13-AluI-pBSM13 ПЦР-фрагментом, с ДНК плаценты и с ДНК, выделенной из колоний на 15-е сутки после обработки индукторами. Оказалось, что ДНК ПЦР-фрагмента не стимулирует увеличение количества теломерной ДНК в клетках колоний (см. рис. 2, E–G). Этот факт означает, что фрагменты экстраклеточной ДНК (в данном конкретном эксперименте) не индуцируют активность эндогенной теломеразы.

Обоснование возможности изменения силы гибридизации в зависимости от количества и состава интернализированных ДНК фрагментов, а также от варианта P³²-меченого теломерного (C/G) зонда. Необходимо отметить, что изменения силы гибридизации в образцах с участием hDNA^{9f} в различных экспериментах могут быть связаны с количеством доставленных в клетку теломерных ДНК. Поскольку в клетке может присутствовать около 0.2 % (для мыши) – 0.02 % (для человека) (Рузанова и др., 2024; Potter et al., 2024) экстраклеточных фрагментов, то результатом конкурентной интернализации всегда будет неопределенность в качественном составе доставленных фрагментов. Это означает, что количество теломерных повторов может существенно изменяться от эксперимента к

эксперименту. Кроме того, изменение силы гибридизационного сигнала могло быть связано с использованием или прямого, или обратного праймера. Анализ интенсивности гибридизации при применении двух различных зондов свидетельствует, что максимальной амплификации подверглась ДНК, гомологичная G-хвосту (С-зонд). ДНК, гомологичная С-хвосту (G-зонд), тоже амплифицирована, но незначительно.

Сопоставление силы гибридизационного ответа на R^{32} -меченый теломерный ДНК зонд между ДНК, выделенной из колоний контрольного образца, и ДНК, выделенной из печени молодых животных. Проведено сопоставление силы гибридизационного ответа на теломерный ДНК зонд, меченный фосфором, между ДНК, выделенной из колоний контрольного образца, и ДНК, выделенной из печени молодых животных (см. рис. 2, А4). Можно видеть однозначно трактуемое увеличение силы гибридизационного ответа в образце молодых животных, что подкрепляет известный факт о более низком количестве теломерной ДНК в ГСК у старых организмов по сравнению с молодыми особями. Также полученные данные свидетельствуют, что если в результате действия индукторов произошла активация пролиферации спящих ГСК эмбрионального происхождения, то картина гибридизации для образцов, полученных от молодых животных и экспериментальных мышей, не будет существенно различаться.

Оценка возможности сохранения в ГСК остаточного материала $hDNA^{gr}$ после обработки этой ДНК ГСК в составе клеток костного мозга, которая может давать артефакт увеличения количества теломерной ДНК. Если доставленная в клетку ДНК не интегрирует в геном, то существует вероятность ее длительного присутствия в качестве экстрахромосомального материала, который и может давать артефакт увеличения количества теломерной ДНК (Dolgova et al., 2012).

Мы оценили количество чужеродной ДНК в клетках-потомках клеток костного мозга человека на 15-е сутки культивирования на метилцеллюлозе после обработки ГСК в составе клеток костного мозга TAMRA-меченой ДНК *AluI* повтора, обрамленного последовательностями pBS с праймерами M13 (Приложение 5). Полученные результаты свидетельствуют, что в клетках колоний не детектируются молекулы ДНК *AluI* повтора, исходно попавшие в ГСК при первичной обработке клеток костного мозга. То есть обнаруженное в экспериментах по дот-блот гибридизации увеличение количества теломерной ДНК не может быть следствием присутствия в клетках колоний остаточной исходной ДНК. Кроме того, по-видимому, фрагменты *AluI* вместе с неомологичными концами pBSM13 не попадают в состав генома и не амплифицируются в ПЦР.

Суммируя все полученные данные, можно сделать определенные выводы. Для $hDNA^{gr}$ увеличение интенсивности гибридизации не связано с превалированием одного из типов колоний, а значит, не связано с ГСК, ранее неактивными на протяжении всей жизни организма. Возможны варианты активации гена теломеразы экзогенного происхождения, прямой интеграции теломерной ДНК в геном ГСК или появления дополнительной теломерной ДНК,

связанного с репликацией, при обработке клеток костного мозга индуктором. Исключается вариант сохранения в клетке в неинтегрированном состоянии на протяжении всего времени культивирования на метилцеллюлозе ДНК фрагментов, исходно доставленных в ГСК в количестве, достаточном для изменения силы гибридизационного ответа.

Тем не менее совокупность результатов предполагает в большей степени истинную интеграцию в геном доставленной в клетку теломерной ДНК или появление дополнительной ДНК теломер, связанное с репликацией.

Для ангиогенина увеличение интенсивности гибридизации может быть связано с индукцией колониеобразования клеток CFU-GM ростка, ранее неактивных на протяжении всей жизни организма. Возможна активация гена эндогенной теломеразы. На оба варианта указывают результаты экспериментов по интернализации белка ангиогенина в примитивные гемопоэтические клетки мыши и человека. Показано, что ангиогенин интернализуют примитивные Sca1 гемопоэтические клетки мыши и CD34+ стволовые клетки крови человека (Рузанова и др., 2024). В этом случае активируется ген теломеразы. Вариант интеграции исключается, поскольку отсутствует необходимый субстрат.

Таким образом, в проведенном анализе достоверно установлено, что при индукции клеток костного мозга препаратом ДНК, ангиогенином и совместно в клетках происходят изменения, влияющие на длину теломерных повторов (т. е. количества теломерной ДНК) в таком количестве клеток, которое дает возможность визуализировать обнаруженный феномен.

Клетки костного мозга крысы

Для крысиной модели в экспериментах в качестве нормировочного критерия было выбрано количество клеток колоний. Клетки колоний после отмывки от метилцеллюлозы заливались в блоки легкоплавкой агарозы в количестве 500000 на блок, что соответствует около 3 мкг ДНК. Блоки лизировали и проводили электрофорез с использованием пульс-контроллера, как описано в разделе Материалы и методы. Был проанализирован электрофорез и проведен саузерн-блот анализ. Полученные результаты представлены на рис. 3. Фотографии электрофореза были обработаны в программе GelPro 3.0 (см. рис. 3, А). По свечению интеркалярного красителя оценено относительное соотношение количества ДНК в дорожках. Оказалось, что в образце с клетками, обработанными ДНК, количество ДНК в бэндах, которые впоследствии были оценены в ходе гибридизации, возросло в сумме на 10 %. При этом увеличение в трех бэндах происходило неравномерно: в двух верхних почти не изменилось, тогда как в третьем количестве ДНК выросло в два раза (см. рис. 3, В).

По результатам гибридизации в образце клеток, обработанных ДНК, на 17–30 % возросло количество теломерных повторов (см. рис. 3, С, D). Следует отметить, что увеличение количества теломерных повторов, в отличие от общего количества ДНК, наблюдалось во всех бэндах. В образце клеток, обработанных ангиогенином, количество ДНК уменьшилось относительно контрольной группы. Это может быть связано с тем, что из ГСК, об-

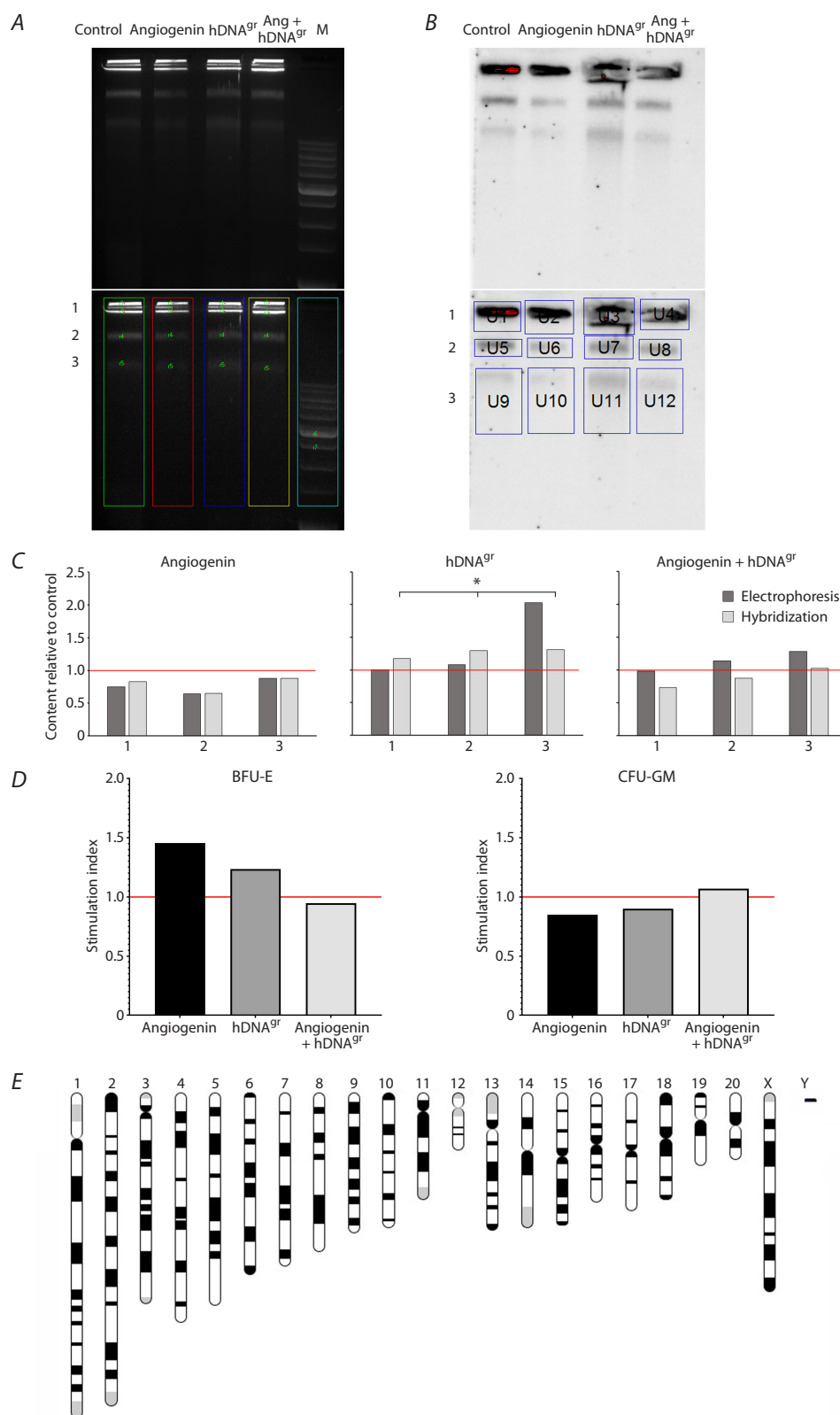


Рис. 3. Результаты обработки клеток костного мозга крысы ангиогенином, препаратом hDNA^{gr} и ангиогенином совместно с hDNA^{gr}.

A – электрофорез с ДНК, выделенной из колоний, фиксированных в блоках легкоплавкой агарозы. На нижнем блоке цифрами 1–3 обозначены фрагменты, использованные для количественного анализа. **B** – гибридизация с теломерными повторами (С-зонд) ДНК, выделенной из колоний. На нижнем блоке цифрами 1–3 обозначены области, использованные для количественного анализа. **C** – содержание ДНК по свечению красителя и интенсивность гибридизации для трех различных фрагментов относительно контрольной группы (значения приняты за единицу, обозначены красной линией). * Отличия достоверны по сравнению с контрольной группой, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни. **D** – содержание BFU-E и CFU-GM колоний на метилцеллюлозе после обработки клеток костного мозга крысы различными индукторами, выраженное в индексе относительно контрольной группы (значения приняты за единицу, обозначены красной линией). **E** – хромосомы крысы (<https://rgd.mcv.edu/rgdweb/report/genomeInformation/genomeInformation.html?species=Rat&mapKey=372&details=true>).

работанных ангиогенином, выросло большое количество эритроидных колоний (см. рис. 3, *E*), которые могут содержать безъядерные зрелые эритроциты, посчитанные при отборе клеток.

Анализ возможных механизмов увеличения количества теломерной ДНК

Гемопоэтические стволовые клетки мыши интернализуют фрагменты экстраклеточной ДНК (Potter et al., 2024). В дальнейших исследованиях в основных экспериментах использовалась модельная система «криоконсервированный костный мозг человека». Установлено, что CD34+ ГСК человека также захватывают экстраклеточные фрагменты ДНК. В клетку доставляется 0.02 % от гаплоидного генома экстраклеточного ДНК материала (в конкретном эксперименте) (Рузанова и др., 2024).

Для анализа механизма увеличения количества теломерной ДНК были выбраны два индуктора, один из которых, hDNA^{gr}, имеет в своем составе теломерную ДНК, которая является потенциальным субстратом для детекции в ГСК, а второй, ангиогенин, не несет в своем составе какой-либо ДНК, включая теломерную.

Это означает, что увеличение количества детектируемой теломерной ДНК при обработке ангиогенином связано или с индукцией эндогенной теломеразы, или с активацией покоящихся, ранее никогда не активированных исходных ГСК, сформированных и занявших костномозговые ниши во время эмбриогенеза. Невозможен вариант активации гена экзогенной теломеразы и интеграции, поскольку отсутствует необходимый субстрат.

Для препарата hDNA^{gr} рассматриваются следующие опции. Опция, связанная с возможностью встраивания в геном теломерной ДНК самого препарата hDNA^{gr} или увеличения количества G-теломерных повторов в результате репаративной репликации G-цепи (хвоста), что будет наблюдаться как увеличение количества теломерной ДНК в потомках исходной ГСК костного мозга. Также для hDNA^{gr} возможна активация транзитного гена теломеразы, находящегося в составе доставленных во внутренние компартменты ГСК экстраклеточных фрагментов. Результаты дот-блот гибридизации не подтверждают опцию активации эндогенного гена теломеразы в клетках-акцепторах фрагментов ДНК (см. рис. 2, *E–G*). Не подтверждается вариант, аналогичный описанному для ангиогенина, с активацией покоящихся, ранее никогда не активированных исходных ГСК, сформированных и занявших костномозговые ниши во время эмбриогенеза. Также не подтверждается вариант сохранения остаточного количества hDNA^{gr} в клетках колоний после исходного поглощения экстраклеточных фрагментов ГСК в составе клеток костного мозга и последующей контаминации образцов ДНК колоний остаточным количеством теломерной ДНК, исходно присутствующей в образце hDNA^{gr} и достаточной для выявления методом дот-блот гибридизации.

Проведенный анализ предполагал, что по крайней мере для ангиогенина наиболее вероятным объяснением увеличения количества теломерной ДНК будет индукция этим фактором теломеразной активности. Для hDNA^{gr} сохранялась возможность активации транзитного гена теломеразы.

Оценка влияния индукторов на теломеразную активность

Была проанализирована возможность активации теломеразной активности в прямых экспериментах. Эксперименты выполнялись на модели ГСК в составе клеток костного мозга человека после обработки hDNA^{gr}, ангиогенином и совместно. Ранее было показано, что в колониях, выросших после активации ГСК индуктором hDNA^{gr}, до ~15 % клеток для мыши (c-Kit/Sca-1) и до 3 % для человека (CD34) сохраняют маркеры примитивных клеток (Potter et al., 2024). Это означает, что при повторной активации клеток, выросших в колониях, будет оказано аналогичное воздействие на примитивные предшественники и в них будут индуцированы аналогичные события, в частности может быть активирован ген теломеразы в предположенных выше вариантах. В такой аранжировке будет достаточно материала, чтобы охарактеризовать клеточные лизаты на присутствие теломеразы в ПЦР в реальном времени и/или вестерн-блот анализом.

Клетки колоний на 18-е сутки инкубации (полное закрытие пангенотипных однопочечных разрывов) после индукции ГСК в составе клеток костного мозга тремя индукторами повторно обрабатывали теми же веществами. Образцы отбирали и лизировали в нулевой точке, через 1, 2, 4, 8, 16, 32 ч после повторной индукции. Были приготовлены образцы для ПЦР в реальном времени и вестерн-блот анализа. Для ПЦР в реальном времени образцы РНК были пуллированы в две группы, 0–4 и 8–32 ч. Для вестерн-блот анализа использовались повременные образцы (рис. 4).

Результаты ПЦР в реальном времени (три независимых повтора) свидетельствовали о следующем. При развитии ответа в интервале 8–32 ч после второй индукции мРНК теломеразы синтезируется в образцах, обработанных ангиогенином и ангиогенином совместно с hDNA^{gr}. В контрольном образце синтез мРНК теломеразы блокируется. В образце, обработанном hDNA^{gr}, мРНК теломеразы не детектируется в выбранных условиях (см. рис. 4, *A*).

Вестерн-блот анализ был проведен с образцами всех временных точек в трех независимых экспериментах. В первом использовались поликлональные антитела, во втором и третьем – моноклональные антитела против теломеразы. В первом эксперименте с поликлональными антителами в образцах, обработанных ангиогенином и ангиогенином совместно с hDNA^{gr}, в точке 16 ч после индукции детектируется бэнд 63 кДа, соответствующий клонированному фрагменту (EcoRI-NotI клон 712562) теломеразы человека (Cech et al., 1998), что коррелирует с общей картиной синтеза мРНК теломеразы (см. рис. 4, *B*). В случае моноклональных антител на теломеразу человека в двух последовательных экспериментах выявляется бэнд ~35 кДа, который не детектируется при окрашивании Ку-масси (см. рис. 4, *C, D*). В третьем эксперименте вместе с бэндом 35 кДа выявляется бэнд ~63 кДа (см. рис. 4, *D*). Специфический бэнд ~35 кДа обнаруживается в группах, обработанных ангиогенином совместно с hDNA^{gr} (второй эксперимент, см. рис. 4, *C*) и ангиогенином (третий эксперимент, см. рис. 4, *D*). Мода появления этого специфического бэнда для двух экспериментов различна. Во втором эксперименте бэнд ~35 кДа четко детектируется

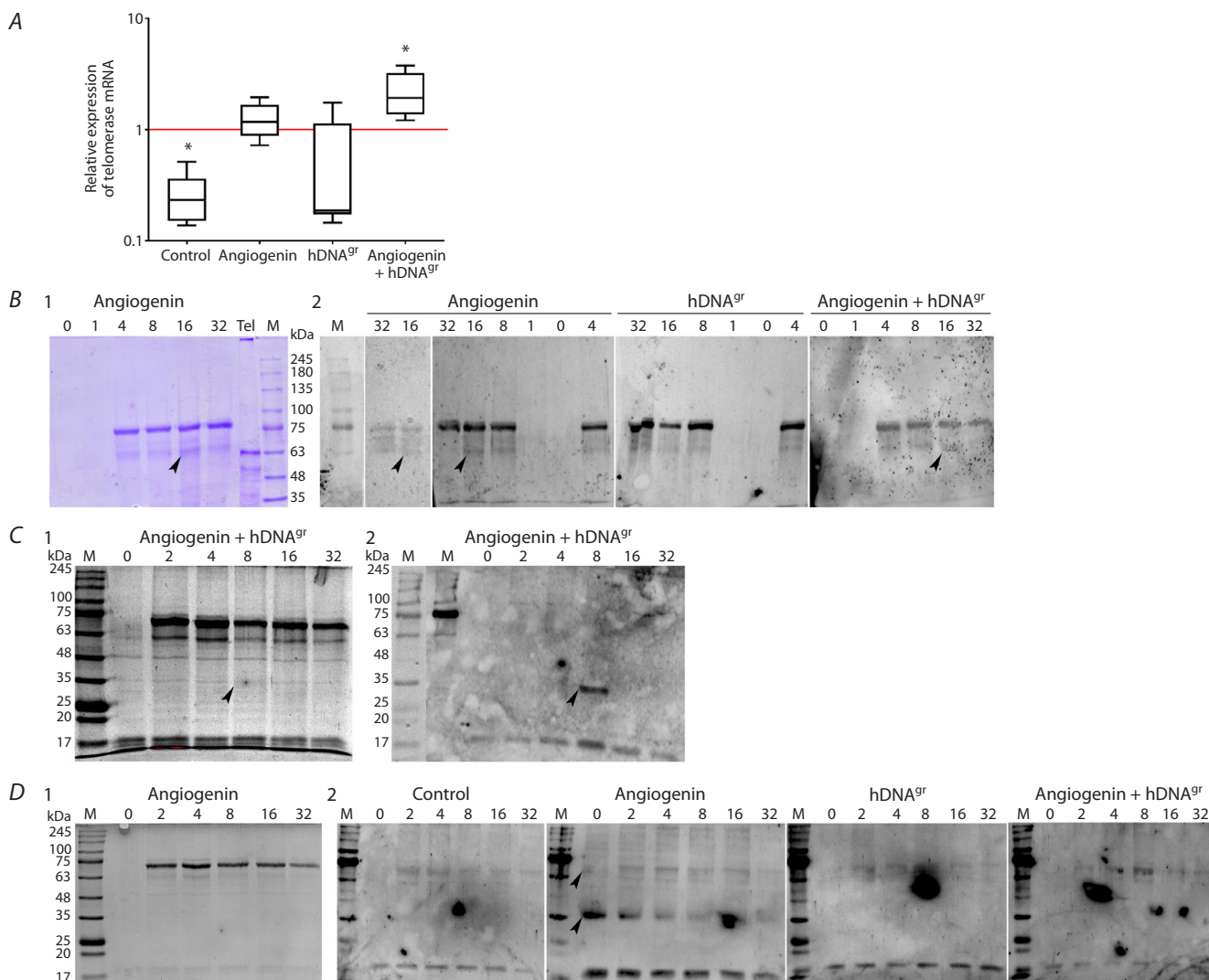


Рис. 4. ПЦР в реальном времени и вестерн-блот анализ РНК и белковых лизатов на присутствие мРНК теломеразы и белка теломеразы.

А – ПЦР в реальном времени пуллованных образцов в интервале 8–32 ч. Приведены значения относительно соответствующих групп 0–4 ч (значения приняты за единицу, отмечено красной линией). * Отличия достоверны по сравнению с группой 0–4 ч, $p < 0.005$, критерий Манна-Уитни. В–Д – вестерн-блот анализ на присутствие теломеразы в поврежденных лизатах обработанных активаторами клеток; 1 – акриламидные гели с окрашиванием Кумасси, 2 – блоты с антителами на теломеразу. Над дорожками подписано время инкубации (ч) с соответствующими индукторами. Стрелками отмечены специфические бэнды 63 и 35 кДа. Приведены результаты трех независимых экспериментов.

во временной точке 8 ч после начала второй индукции для образца ангиогенин+hDNA^{gr}. В других образцах второго эксперимента бэнд не выявляется. Для третьего эксперимента интенсивный бэнд ~35 кДа вместе с бэндом 63 кДа обнаруживается в точке «0», т.е. до начала индукции в клетках колоний образца, обработанного ангиогенином, после отмывки от метилцеллюлозы. По мере инкубации к 32 ч эксперимента интенсивность бэнды 35 кДа падает практически до фоновой отметки. Бэнд 63 кДа исчезает в первый час после второй индукции. В других образцах бэнды не выявляются. Мы обнаружили упоминание о белке 35 кДа, имеющем отношение к теломеразной активности, только в одной работе. Используя аффинную хроматографию при выделении теломеразы, дополнительно к белкам с молекулярной массой 120 и 43 кДа был детектирован белок с молекулярной массой 35 кДа. В работе этот бе-

лок не анализировался, поскольку он не детектировался в препаратах конечно очищенной теломеразы (Lingner, Cech, 1996).

Полученные результаты двух независимых подходов свидетельствуют, что ангиогенин активирует в ГСК молекулярные механизмы, которые индуцируют теломеразную активность. При этом присутствие препарата hDNA^{gr} не отменяет активность данного механизма.

Можно сделать следующие выводы: 1) hDNA^{gr} не индуцирует экспрессию гена теломеразы, а значит, увеличение количества теломерной ДНК не может быть связано с теломеразной активностью; 2) ангиогенин индуцирует экспрессию гена теломеразы, и увеличение количества теломерной ДНК при дот-блот гибридизации может быть связано именно с этой активностью ангиогенина. Совместное использование ангиогенина и hDNA^{gr} тоже приводит

к увеличению синтеза мРНК теломеразы. В проведенных гибридизациях было показано, что в некоторых случаях количество теломерной ДНК в образце, обработанном совместно двумя препаратами, превышает аналогичный показатель, полученный для образцов, обработанных отдельно активаторами. Этот факт может означать, что друг на друга накладываются три механизма увеличения количества теломерной ДНК. Первый – активация теломеразы. Второй – прямая интеграция добавочной теломерной ДНК в геном реципиентной клетки. Третий механизм – репликация квази t-колец, образованных экзогенными теломерными повторами в результате конкатамеризации и замыкания в кольцо.

Обсуждение

Проведенный анализ свидетельствует, что для двух индукторов происходит увеличение теломерной ДНК в клетках колоний двумя независимыми механизмами. Это классический теломераза-зависимый дополнительный синтез в случае ангиогенина и альтернативный механизм удлинения теломеры или истинная интеграция в область теломерного гетерохроматина теломерной ДНК в случае hDNA^{gr}.

Теломераза представляет собой гетеродимер, образованный некодирующей РНК-матрицей (теломеразный РНК-компонент длиной свыше 400 п. н., содержащий базовую теломерную последовательность, комплементарную G-цепи), необходимой для синтеза *de novo* теломерных последовательностей ДНК, и ферментативной субъединицы (теломеразная обратная транскриптаза, TERT). Теломеразный комплекс регулирует поддержание длины теломер, добавляя теломерные повторы к 3' концу хромосомы с использованием РНК-матрицы (см. рис. 1, В). За некоторыми исключениями (например, лимфоциты и эндотелиальные клетки) большинство соматических клеток человека не проявляет теломеразной активности, главным образом из-за подавления экспрессии гена TERT. С другой стороны, стволовые клетки, клетки зародышевой линии и большинство опухолей проявляют теломеразную активность (Chan, Blackburn, 2003; Giraud-Panis et al., 2010; Nandakumar, Cech, 2013; Soman et al., 2022).

Согласно более ранним данным, ангиогенин интернализуют Scf1 (мышь) и CD34 (человек) гемопоэтические стволовые клетки (Рузанова и др., 2024). Также на человеческих клетках костного мозга показано, что обработка ангиогенином стимулирует GM росток кроветворения и индуцирует активность теломеразы. В работе (Goncalves et al., 2016) установлено, что ангиогенин рекомбинантный стимулирует пролиферацию миелоидных предшественников (как и в наших экспериментах), но при этом усиливает покоевые свойства стволовых клеток. Эти характеристики связывают с генерацией стресс-индуцированных tРНК, снижением синтетической активности стволовой клетки крови, усилением синтеза рибосомальных РНК и стимуляцией белкового синтеза в миелоидных клетках предшественников. Возможно, именно следствием первого процесса (стимуляция пролиферации миелоидных предшественников) является обнаружение теломеразы в клетках колоний GM роста, показанное в настоящем исследовании.

Интернализованные фрагменты ДНК инициируют формирование ников, необходимых для перестройки хроматина в направлении выбранного пути терминальной дифференцировки прогениторов, которые и запускают механизм этой дифференцировки (Рузанова и др., 2024). Аналогичная концепция обсуждается в работе (Sjakste, Riekstina, 2021), авторы которой предполагают, что триггером дифференцировки могут быть повреждения ДНК хромосом в стволовых клетках. Следствием появления ников и релаксации хроматина будет индуцированная рекомбинационная ситуация и активация репаративно-рекомбинационной машины, состоящей из многочисленных активных и структурных белков (Nabetani, Ishikawa, 2011). Этот факт означает, что находящиеся во внутриядерном пространстве ГСК исходно экстраклеточные фрагменты ДНК могут принимать участие в рекомбинационных событиях, которые сами и инициировали. Результаты нашего исследования предполагают, что увеличение количества теломерной ДНК при использовании в качестве индуктора hDNA^{gr} подразумевает и/или интеграцию экстраклеточных фрагментов, содержащих теломерные повторы в гомологичные районы теломер, и/или активацию механизма альтернативного удлинения теломер с использованием конкатамеризованных циклизированных теломерных повторов.

Анализ силы гибридизационного ответа свидетельствовал о значительном приросте количества теломерной ДНК в анализируемых образцах, что в большей степени предполагало участие в этом процессе механизма альтернативного удлинения теломер. Одна из наиболее характерных особенностей клеток с активным механизмом альтернативного удлинения теломер – наличие внехромосомных теломерных колец, которые представлены либо двуцепочечными (t-кольца), либо частично одноцепочечными (C- или G-кольца) (Cesare, Griffith, 2004; Wang et al., 2004; Henson et al., 2009). t-кольца являются замкнутой двуцепочечной ДНК. C-кольца – это экстрахромосомальная ДНК теломер с замкнутой в кольцо C-цепью и разорванной аннилированной с ней G-цепью. G-кольца – это экстрахромосомальная ДНК теломер с замкнутой в кольцо G-цепью и разорванной аннилированной с ней C-цепью. Происхождение этих экстрахромосомальных структур обычно связывают с индуцированной разрывом репликацией теломерной ДНК (рис. 5). Известно, что репарация, связанная с разрывами, стимулируется индукцией теломерных двуцепочечных разрывов (McEachern, Haber, 2006; Dilley et al., 2016) и, как свидетельствуют данные настоящего исследования, одноцепочечными разрывами (никами). Репликация, вызванная разрывом, может инициироваться в результате внедрения конца нити разорванного теломерного агрегата между цепями неповрежденной теломеры и идти по типу миграции цепи. Мигрирующая d-петля копирует теломерные повторы от точки проникновения нити к концу донорской теломеры (Saini et al., 2013; Wilson et al., 2013), что сопровождается восстановлением длины и структуры теломеры.

Другой путь восстановления длины теломеры связан с внедрением 3' конца G-цепи теломеры между цепями экстрахромосомальных t- или C-колец. В этом случае индуцируется репликация по типу катящегося кольца,

что приводит к накоплению одноцепочечной G-богатой цепи теломеры (рис. 6, A) (Nabetani, Ishikawa, 2011; Lu W. et al., 2013; Doksani, 2019).

Описано два механизма образования t-, C- и G-колец. t-кольца могут формироваться в результате интрахромосомной рекомбинации и высвобождения t-петли вследствие Холлидеевской рекомбинации 3' конца t-петли, аннилированного с комплементарной последовательностью 3'–5' цепи (см. рис. 5, A) (Wang et al., 2004; Nabetani, Ishikawa, 2011; Claussin, Chang, 2015; Doksani, 2019; Jones et al., 2023). Во втором случае возникают оба варианта C- и G-кольца (см. рис. 5, B).

Показано, что репликативный стресс, связанный с остановкой репликативной вилки в трудно реплицируемом теломерном гетерохроматине или с повреждением ДНК хромосом (например, двуцепочечные разрывы или ники), выпетливает оба варианта колец, содержащих теломерные повторы. При этом G-кольцо способно инициировать репликацию по типу катящегося кольца с ника и синтеза C-богатого хвоста, содержащего теломерные повторы 3'–5' цепи размером до 100 т. п. н., который детектируется как в тестовой системе с phi29 полимеразой, так и *in vivo* (Zhang et al., 2017). Предполагается, что амплифицированный C-одноцепочечный хвост может аннилировать с укороченной G-теломерной цепью (например, после отделения от теломеры t-петли в результате репликативного стресса) и в качестве гомологичной матрицы стимулировать синтез укороченной G-цепи (Zhang et al., 2017). В формировании колец в данном случае задействованы Торо II, механизм NHEJ, активность ДНК-РК (см. рис. 6, B).

Именно за счет амплификации теломерных повторов по предполагаемому механизму катящегося кольца с использованием в качестве матрицы кольцеобразных структур и индуцированной никами репликации можно объяснить увеличение более чем в два раза количества теломерной ДНК в некоторых экспериментах. Известно, что при таком варианте амплификации длина одноцепочечного участка G-цепи может простираться до 70–100 т. п. н. (Doksani, 2019; Jones et al., 2023) (см. рис. 6, A, B).

Присутствие в клетке большого количества C-колец является главным условием механизма альтернативного удлинения теломер. По-видимому, 3' одноцепочечный конец 5'–3' G-цепи может спариться как с t-, так и с C-кольцом, образуя D-петлю

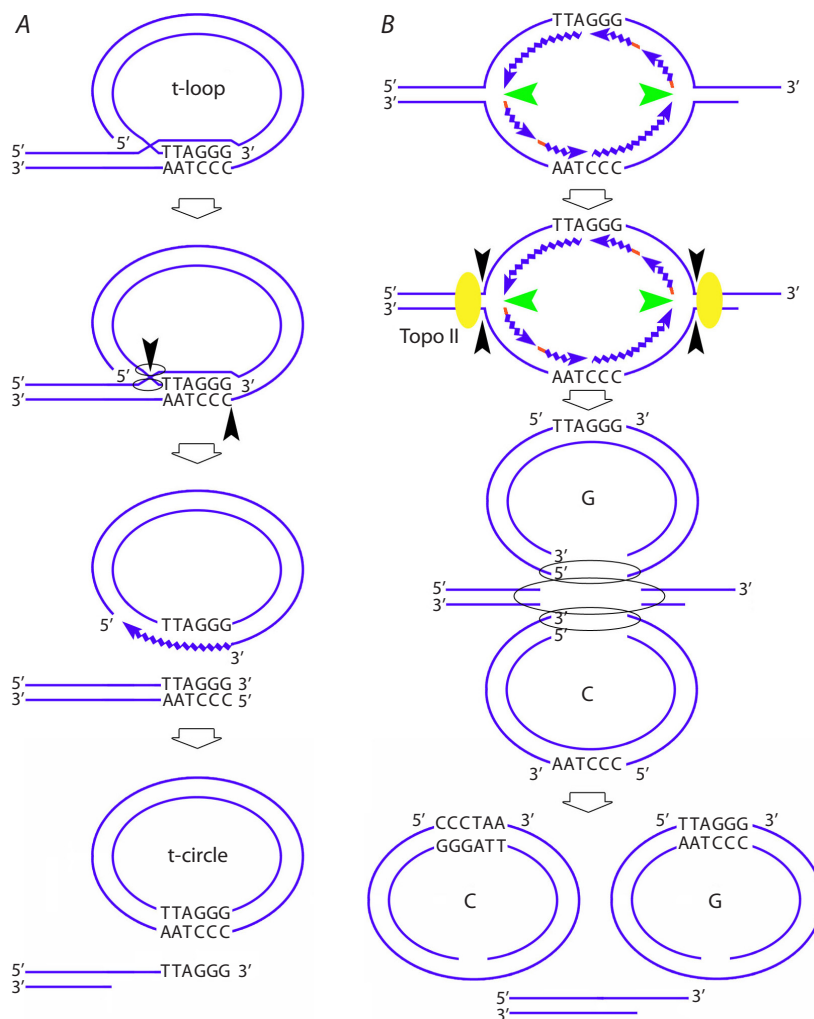


Рис. 5. Механизмы формирования экстрахромосомальных колец.

A – формирование t-кольца в результате отсоединения концевой структуры теломеры t-петли; B – формирование G- и C-колец в результате остановки репликативной вилки, индукции репарации, связанной с разрывами, и выпетливания G- и C-цепей при участии Торо II, механизма NHEJ, активности ДНК-РК (Zhang et al., 2017).

(см. рис. 6, A). Следующие затем многочисленные раунды репликации по типу катящегося кольца амплифицируют теломерные повторы. Количество синтезированных таким образом повторов теломер может быть вырожденным и будет различным для разных теломер разных хромосом (Lee et al., 2014; Jones et al., 2023).

При попадании в ядро экстраклеточных фрагментов, содержащих теломерные повторы, будут происходить следующие события. Иницируется рекомбиногенная ситуация, спровоцированная появлением одноцепочечных разрывов. Если факторы, активированные рекомбиногенной ситуацией, инициированной никами, аналогичны факторам, активированным рекомбиногенной ситуацией, инициированной двуцепочечными разрывами (Dolgova et al., 2013), то интернализованные двуцепочечные фрагменты в течение короткого времени замкнутся в кольцо (Dolgova et al., 2013; Potter et al., 2018, 2024). За время существования в линейной форме они могут интегрировать в геном по механизму *ends in/ends out*. После лигирования в кольцо указанные структуры практически не будут отличаться от t- и C-колец, образующихся при альтернативном удлинении теломер. Это означает, что амплификация теломерной ДНК при интернализации экстраклеточных ДНК в ГСК связана в большей степени

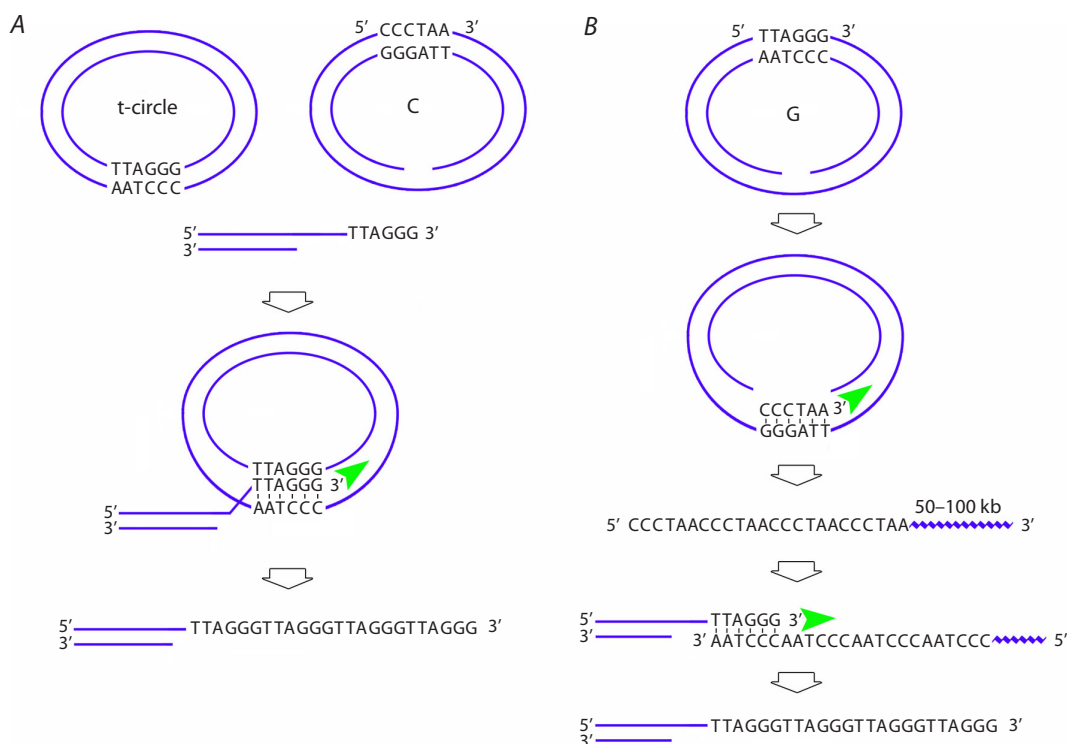


Рис. 6. Механизмы удлинения теломер.

А – удлинение теломерного хвоста по t-кольцу и C-кольцу; В – удлинение теломерного хвоста по G-кольцу (разъяснения см. в тексте).

с удлинением G-цепи теломеры в результате активации репликативного синтеза по механизму катящегося кольца, как предполагается, индуцированного никами. Именно так можно объяснить значительное (более чем в два раза) увеличение количества теломерной ДНК в некоторых экспериментах.

Интеграция внехромосомных фрагментов, содержащих теломерные повторы (приводящая к увеличению теломерной ДНК), также может осуществляться по механизму гомологичной рекомбинации в вариантах *ends in/ends out* (рис. 7) (Rubnitz, Subramani, 1984; Hastings et al., 1993; Cromie et al., 2001; Li et al., 2001; Langston, Symington, 2004). Другие механизмы гомологичного обмена (однонитевой отжиг, генная конверсия) не будут приводить к увеличению количества ДНК в теломере.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования свидетельствуют, что фрагменты экстраклеточной ДНК, доставленные в ГСК и содержащие теломерные повторы, или прямо интегрируют в теломерный гетерохроматин, или становятся матрицей для альтернативного удлинения теломер, что сопровождается увеличением количества теломерной ДНК и, как предполагается, увеличением длины теломер.

Список литературы / References

Лихачева А.С., Рогачев В.А., Николин В.П., Попова Н.А., Шилов А.Г., Себелева Т.Е., Струнkin Д.Н., Черных Е.Р., Гельфгат Е.Л., Богачев С.С., Шурдов М.А. Участие экзогенной ДНК в

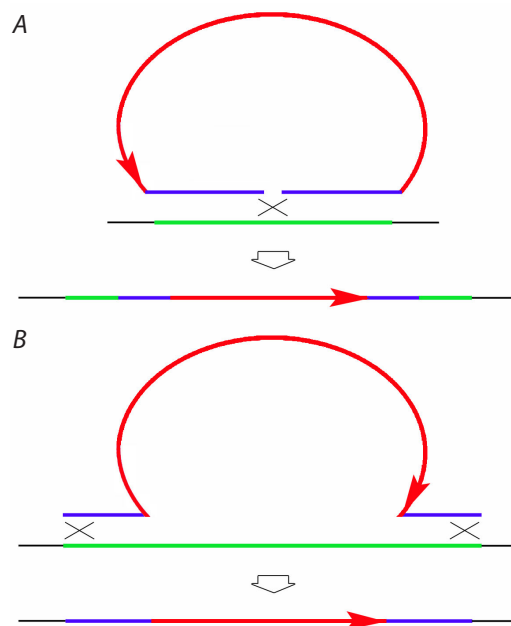


Рис. 7. Механизмы *ends in/ends out* интеграции экстраклеточных фрагментов ДНК в реципиентный геном.

А – интеграция *ends in*; В – *ends out*.

молекулярных процессах, протекающих в соматической клетке. *Информационный вестник ВОГиС*. 2008;12(3):426-473 [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'f-

- gat E.L., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Involvement of exogenous DNA in the molecular processes in somatic cell. *Informatsionnyy Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders*. 2008;12(3):426-473 (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)]
- Ружанова 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., Leplina 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 Selekcii = Vavilov J Genet Breed*. 2024;28(8):993-1007. doi 10.18699/vjgb-24-106]
- Alanazi A.F.R., Parkinson G.N., Haider S. Structural motifs at the telomeres and their role in regulatory pathways. *Biochemistry*. 2024; 63(7):827-842. doi 10.1021/acs.biochem.4C00023
- Cech T.R., Lingner J., Nakamura T., Chapman K.B., Morin G.B., Harley C.B., Andrews W.H. Telomerase reverse transcriptase. *Patent WO1998/14592*. 1998.
- Cesare A.J., Griffith J.D. Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. *Mol Cell Biol*. 2004;24(22):9948-9957. doi 10.1128/MCB.24.22.9948-9957.2004
- Chan S.W.L., Blackburn E.H. Telomerase and ATM/Tel1p protect telomeres from nonhomologous end joining. *Mol Cell*. 2003;11(5): 1379-1387. doi 10.1016/S1097-2765(03)00174-6
- Claussin C., Chang M. The many facets of homologous recombination at telomeres. *Microb Cell*. 2015;2(9):308-321. doi 10.15698/MIC 2015.09.224
- 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
- Dilley R.L., Verma P., Cho N.W., Winters H.D., Wondisford A.R., Greenberg R.A. Break-induced telomere synthesis underlies alternative telomere maintenance. *Nature*. 2016;539(7627):54-58. doi 10.1038/nature20099
- Doksani Y. The response to DNA damage at telomeric repeats and its consequences for telomere function. *Genes*. 2019;10(4):318. doi 10.3390/genes10040318
- Dolgova E.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Proskurina A.S., Orishenko 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;2:440-452. 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
- Giardini M.A., Segatto M., da Silva M.S., Nunes V.S., Cano M.I.N. Telomere and telomerase biology. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2014; 125:1-40. doi 10.1016/B978-0-12-397898-1.00001-3
- Giraud-Panis M.J., Pisano S., Poulet A., Le Du M.H., Gilson E. Structural identity of telomeric complexes. *FEBS Lett*. 2010;584(17): 3785-3799. doi 10.1016/j.febslet.2010.08.004
- Goncalves K.A., Silberstein L., Li S., Severe N., Hu M.G., Yang H., Scadden D.T., Hu G.F. Angiogenin promotes hematopoietic regeneration by dichotomously regulating quiescence of stem and progenitor cells. *Cell*. 2016;166(4):894-906. doi 10.1016/j.cell.2016.06.042
- Hande M.P. DNA repair factors and telomere-chromosome integrity in mammalian cells. *Cytogenet Genome Res*. 2004;104:116-122. doi 10.1159/000077475
- 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
- Henson J.D., Cao Y., Huschtscha L.I., Chang A.C., Au A.Y.M., Pickett H.A., Reddel R.R. DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Nat Biotechnol*. 2009;27(12):1181-1185. doi 10.1038/nbt.1587
- Jones C.Y., Williams C.L., Moreno S.P., Morris D.K., Mondello C., Karlseder J., Bertuch A.A. Hyperextended telomeres promote formation of C-circle DNA in telomerase positive human cells. *J Biol Chem*. 2023;299(5):104665. doi 10.1016/j.jbc.2023.104665
- Langston L.D., Symington L.S. Gene targeting in yeast is initiated by two independent strand invasions. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(43):15392-15397. doi 10.1073/pnas.0403748101
- Lee M., Hills M., Conomos D., Stutz M.D., Dagg R.A., Lau L.M.S., Reddel R.R., Pickett H.A. Telomere extension by telomerase and ALT generates variant repeats by mechanistically distinct processes. *Nucleic Acids Res*. 2014;42(3):1733-1746. doi 10.1093/nar/gkt1117
- 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):501510. doi 10.1128/MCB.21.2.501-510.2001
- Lingner J., Cech T.R. Purification of telomerase from *Euplotes aediculatus*: requirement of a primer 3' overhang. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93(20):10712-10717. doi 10.1073/PNAS.93.20.10712
- Loe T.K., Zhou Li J.S., Zhang Y., Azeroglu B., Boddy M.N., Denchi E.L. Telomere length heterogeneity in ALT cells is maintained by PML-dependent localization of the BTR complex to telomeres. *Genes Dev*. 2020;34(9-10):650-662. doi 10.1101/gad.333963.119
- Lu R., Pickett H.A. Telomeric replication stress: the beginning and the end for alternative lengthening of telomeres cancers. *Open Biol*. 2022;12(3):220011. doi 10.1098/rsob.220011
- Lu W., Zhang Y., Liu D., Songyang Z., Wan M. Telomeres-structure, function, and regulation. *Exp Cell Res*. 2013;319(2):133-141. doi 10.1016/j.yexcr.2012.09.005
- Lundblad V. Telomere maintenance without telomerase. *Oncogene*. 2002;21(4):522-531. doi 10.1038/sj.onc.1205079
- Maizels N., Davis L. Initiation of homologous recombination at DNA nicks. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(14):6962-6973. doi 10.1093/nar/gky588
- McEachern M.J., Haber J.E. Break-induced replication and recombinational telomere elongation in yeast. *Annu Rev Biochem*. 2006;75: 111-135. doi 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133234
- Nabetani A., Ishikawa F. Alternative lengthening of telomeres pathway: recombination-mediated telomere maintenance mechanism in human cells. *J Biochem*. 2011;149(1):5-14. doi 10.1093/jb/mvq119
- Nandakumar J., Cech T.R. Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(2):69-82. doi 10.1038/nrm3505
- Pickett H.A., Cesare A.J., Johnston R.L., Neumann A.A., Reddel R.R. Control of telomere length by a trimming mechanism that involves generation of t-circles. *EMBO J*. 2009;28(7):799-809. doi 10.1038/emboj.2009.42

- Potter E.A., Proskurina A.S., Ritter G.S., Dolgova E.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Taranov O.S., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Efficacy of a new cancer treatment strategy based on eradication of tumor-initiating stem cells in a mouse model of Krebs-2 solid adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2018;9(47):28486-28499. doi 10.18632/oncotarget.25503
- 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
- Rovatsos M.T., Marchal J.A., Romero-Fernández I., Fernández F.J., Giagia-Athanosopoulou E.B., Sánchez A. Rapid, independent, and extensive amplification of telomeric repeats in pericentromeric regions in karyotypes of arvicoline rodents. *Chromosome Res*. 2011; 19(7):869-882. doi 10.1007/S10577-011-9242-3
- Rubnitz J., Subramani S. The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells. *Mol Cell Biol*. 1984;4(11):2253-2258. doi 10.1128/mcb.4.11.2253-2258.1984
- Saini N., Ramakrishnan S., Elango R., Ayyar S., Zhang Y., Deem A., Ira G., Haber J.E., Lobachev K.S., Malkova A. Migrating bubble during break-induced replication drives conservative DNA synthesis. *Nature*. 2013;502(7471):389-392. doi 10.1038/nature12584
- Sjakste N., Riekstina U. DNA damage and repair in differentiation of stem cells and cells of connective cell lineages: a trigger or a complication? *Eur J Histochem*. 2021;65(2):3236. doi 10.4081/ejh.2021.3236
- Soman A., Korolev N., Nordenskiöld L. Telomeric chromatin structure. *Curr Opin Struct Biol*. 2022;77:102492. doi 10.1016/J.SBI.2022.102492
- 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
- Wang R.C., Smogorzewska A., De Lange T. Homologous recombination generates t-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell*. 2004; 119(3):355-368. doi 10.1016/j.cell.2004.10.011
- Wilson M.A., Kwon Y., Xu Y., Chung W.H., Chi P., Niu H., Mayle R., Chen X., Malkova A., Sung P., Ira G. Pif1 helicase and Polδ promote recombination-coupled DNA synthesis via bubble migration. *Nature*. 2013;502(7471):393-396. doi 10.1038/nature12585
- Zhang T., Zhang Z., Li F., Hu Q., Liu H., Tang M., Ma W., Huang J., Songyang Z., Rong Y., Zhang S., Chen B.P., Zhao Y. Looping-out mechanism for resolution of replicative stress at telomeres. *EMBO Rep*. 2017;18(8):1412-1428. doi 10.15252/embr.201643866

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 04.07.2024. После доработки 10.02.2025. Принята к публикации 10.02.2025.