

УДК 577.213:612.419:576.3:569.323.4

ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК ВО ВНУТРЕННИЕ КОМПАРТМЕНТЫ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА МЫШЕЙ

© 2012 г. Е.В. Долгова¹, В.П. Николин¹, Н.А. Попова¹,
А.С. Проскурина¹, К.Е. Орищенко¹, Е.А. Алямкина¹, Я.Р. Ефремов¹,
Е.Р. Черных², А.А. Останин², Е.М. Малкова³, О.С. Таранов³,
В.А. Рогачев¹, С.В. Сидоров⁴, С.С. Богачев¹, М.А. Шурдов⁵

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, Россия, e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru;

² Институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия;

³ ГНЦ ВБ «Вектор», Новосибирск, Россия;

⁴ Муниципальное бюджетное учреждение здравоохранения
«Городская клиническая больница № 1», Новосибирск, Россия;

⁵ ООО «Панаген», Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 11 января 2012 г. Принята к публикации 21 февраля 2012 г.

Инъекции экзогенной ДНК в сочетании с обработкой кросслинквирующим цитостатиком циклофосфаном (ЦФ) приводят к болезни и гибели экспериментальных мышей – эффект «отсроченной смерти». Установлено, что фрагменты экзогенной ДНК в течение 1–5 минут после инъекции достигают костномозгового пространства и проникают в клетки костного мозга (ККМ). ККМ, сгенерированные экстракорпорально, также захватывают фрагменты экзогенной ДНК, присутствующие в культуральной среде. При совместной инкубации фрагментированной экзогенной ДНК с ККМ мышей фрагменты ДНК интернализируются во внутренних компартментах клеток, сохраняя исходный размер. Одновременно в каждой клетке культуры экстракорпорально сгенерированных ККМ, обработанной фрагментированной экзогенной ДНК, может присутствовать до 1800 т.п.н. экзогенного материала нуклеиновых кислот. Фрагменты ДНК, доставленные в культивируемые *ex vivo* ККМ как интактных мышей, так и мышей, находящихся под воздействием ЦФ, замыкаются в кольцо. В случае интактных мышей в экспериментах *in vivo* фрагменты экзогенной ДНК могут формировать высокомолекулярные структуры. Предполагается возможность интеграции экзогенных фрагментов, локализующихся в ядре, в тело хромосом(ы) реципиентного генома мышей, находящихся под воздействием ЦФ и экзогенной ДНК.

Ключевые слова: клетки костного мозга, фрагменты экзогенной ДНК, эписома, конкатамеризация.

Введение

Эффект «отсроченной смерти» проявлялся в результате инъекций экзогенной ДНК на фоне действия циклофосфана (ЦФ) (Долгова и др., 2011). Известно, что ЦФ в первую очередь оказывает действие на активно пролиферирующие клетки организма (Abrams *et al.*, 1981; Fleming, 1997; Mazur, Czyzewska, 2001; Salem *et al.*, 2010). Это предполагает, что гибель мышей связана с поражением активно пролиферирующих кле-

ток, формирующих физиологические системы организма, в результате попадания в эти клетки экзогенной ДНК на фоне действия ЦФ.

В пионерской работе А.С. Likhacheva с соавт. (2007) был проведен анализ радиопротекторного действия фрагментированной экзогенной ДНК на облученных летальной дозой γ -излучения мышей.

Общеизвестно, что препараты цитостатической группы губительно воздействуют на клетки костного мозга (ККМ), и в частности

на стволовые клетки крови (СКК), вызывая тяжелую эритро- и лейкопению. Также известно, что облучение γ -радиацией приводит к тяжелой лейко- и эритропении и связано с гибелью ККМ, и в частности СКК (Лихачева и др., 2008; Долгова и др., 2009).

При этом гибель СКК связана с апоптозом, индуцированным в этих клетках некорректной репарацией множественных двуцепочечных разрывов (ДЦР), возникших в результате облучения мышей жестким γ -излучением.

Экспериментально показано, что стволовые клетки, растущие в культуре, способны захватывать экзогенную ДНК, которая в конечном итоге локализуется в ядрах этих клеток (Likhacheva *et al.*, 2007). Исходя из этого было сделано следующее предположение: если стволовые клетки в принципе способны захватывать экзогенную ДНК, то ее инъекции в организм смертельно облученных мышей приводят к появлению экзогенных фрагментов в ядрах ККМ. В последующем эти фрагменты могут использоваться в качестве субстрата для репаративной рекомбинации в СКК, получивших многочисленные ДЦР, что спасет часть популяции СКК от апоптоза. Сохранившиеся СКК могут мигрировать и заселять лимфоидные органы, такие, как лимфатические узлы, селезенку, тимус. Дальнейшая дифференцировка СКК в периферических лимфоидных органах будет способствовать восстановлению кроветворения и сохранению жизни мышей. Предполагалось, что дифференцированные потомки СКК, сохранившие свою жизнеспособность после облучения и терапии экзогенной ДНК, сформируют селезеночные колонии, которые легко визуализировать и присутствие которых будет свидетельствовать о спасении части СКК.

Проведенные в этом направлении исследования показали, что при терапии сублетально облученных мышей экзогенной ДНК в селезенках экспериментальных животных формируются колонии, содержащие лимфоциты, представляющие собой потомков выживших СКК (Likhacheva *et al.*, 2007). Полученные результаты предполагали, что ККМ и составляющие их СКК могут являться одной из основных мишеней воздействия чужеродных фрагментов при введении экзогенной ДНК в организм экспериментального животного.

ККМ составляют одну из систем активно пролиферирующих клеток организма наряду с клетками эпителиев, волосных фолликулов, мезенхимальных стволовых клеток и аналогичных им активно делящихся клеток и могут представлять удобную модель для анализа происходящих в клетке молекулярных процессов. Выбор системы ККМ для оценки молекулярных процессов, индуцируемых сочетанием воздействия ЦФ и экзогенной ДНК, был обусловлен тремя обстоятельствами. Во-первых, как уже было отмечено, система ККМ является одной из основных клеточных систем организма млекопитающих, на которую в первую очередь воздействует цитостатик ЦФ, и является важным звеном в развитии иммунной и кроветворной систем организма. Разрушение этой системы клеток приводит к гибели животного. Во-вторых, полученные ранее экспериментальные данные свидетельствовали о том, что фрагменты экзогенной ДНК достигают ККМ при ее интраперитонеальных инъекциях. В-третьих, система ККМ мышей удобна в экспериментальных процедурах, легко переводится во временную культуру и в значительной мере изучена. Если в системе ККМ происходят изменения, ведущие к гибели этих клеток, то можно предположить, что все активно пролиферирующие клетки организма будут подвержены аналогичному воздействию. И, таким образом, систему ККМ можно использовать в качестве модельной отвечающей системы клеток организма для изучения описываемого эффекта «отсроченной смерти». При этом с большой долей уверенности можно ожидать, что одновременно с воздействием на систему ККМ аналогичное воздействие будет оказано на другие системы клеток, что может привести к гибели этих клеток и следующему за этим разрушению функциональных систем организма.

Было сделано предположение, что эффект гибели мышей при совместном воздействии ЦФ и экзогенной ДНК связан с гибелью или трансформацией ККМ, происходящими в результате индукции ДЦР, являющихся специфическими интермедиатами репарации межцепочечных сшивок (МЦС), и одновременным появлением в ядрах этих клеток фрагментов экзогенной ДНК (Долгова и др., 2011). Это означает, что попадание экзогенной ДНК в ядро

активно пролиферирующих ККМ и ее участие в репаративном процессе при репарации МЦС, вызванных действием кросслинкующего цитостатика, может составлять молекулярную основу описываемого эффекта «отсроченной смерти».

Материалы и методы

Приготовление меченых зондов

Для получения зонда *Alu*-повтора человека были подобраны два специфических праймера: Pr.9 и Pr.11. Далее матрицу геномной ДНК амплифицировали в присутствии одного Pr.11. После проведения первого раунда ПЦР полученный материал амплифицировали в новом раунде ПЦР в присутствии двух праймеров при указанном температурном режиме.

Используемые специфические для человеческого генома праймеры:

Pr.9 CGAGGCGGGAGGATCACTTGAGCCC;

Pr.11 GCGCGGCCACCACGCCCGGC.

Для амплификации специфических фрагментов генома использовали следующий температурный режим: 94 °С – 2 мин – 1 цикл, (94 °С – 30 с, 72 °С – 1,5 мин) – 35 циклов, 4 °С – хранение.

Биотинилированная ДНК *Alu*-повтора человека, используемого в качестве зонда при проведении FISH, была получена при амплификации матрицы ДНК *Alu*-повтора размером ~290 п.н. в присутствии биотинилированного предшественника.

Для приготовления меченого зонда и амплификации гена каспазы 3 человека были подобраны специфические для человеческого генома праймеры: **Pr.3** AGCACATTAAGCCTCA; **Pr.4** TTTTATAACTGTTGTCCAGGGA.

Для амплификации специфических фрагментов человеческого генома использовали следующий температурный режим: 95 °С – 2 мин – 1 цикл (95 °С – 30 с, 56 °С – 40 с, 72 °С – 1 мин) – 35 циклов; 72 °С – 5 мин – 1 цикл, хранение при 10 °С.

Для приготовления ³²P меченого умеренного рыбьего повтора *HpaI* матрицу геномной ДНК спермы лосося амплифицировали в присутствии двух специфических праймеров (Murata *et al.*, 1993):

Pr.HpaI for GCACTGTTACCACATAGTTAG;

Pr.Hpa rev АТАААСТАСТСААГСАГСАСТ.

Для амплификации специфических фрагментов рыбьего генома использовали следующий температурный режим: 94 °С – 2 мин – 1 цикл, (94 °С – 30 с, 52 °С – 40 с, 72 °С – 30 с) – 35 циклов, 10 °С – хранение.

Амплификацию проводили на приборе Mastercycler personal (Eppendorf, США).

Приготовление препаратов ядер ККМ для проведения гибридизации *in situ*

Из трубчатых костей мыши вымывали красный костный мозг фосфатно-солевым буфером (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 8 мМ Na₂HPO₄, 1,5 мМ KH₂PO₄). Клетки центрифугировали при 150 g в течение 5 мин при 4 °С. Супернатант сливали и к осадку добавляли десятикратный избыток (7–8 мл) предварительно нагретого до 37 °С 7,5 мМ KCl (0,56 г/л). Клетки аккуратно ресуспендировали, инкубировали 5–7 мин при 37 °С. Затем добавляли 1 мл холодного фиксатора метанол : ледяная уксусная кислота (3 : 1), инкубировали 10–15 мин при 4 °С и центрифугировали при 150 g в течение 5 мин также при 4 °С. Супернатант сливали, медленно по стенке добавляли 5–6 мл холодного (хранившегося при –20 °С) фиксатора. Инкубировали 30 мин при –20 °С и центрифугировали при 150 g в течение 5 мин при 4 °С. Супернатант сливали, добавляли холодный фиксатор в том объеме, в котором получается нужная концентрация ядер ККМ при последующем нанесении на препарат. В таком состоянии материал может храниться при –20 °С в течение 4 недель (Stanyon, Galleni, 1991). Каплю фиксированного материала (~10–15 мкл) наносили на влажное обезжиренное предметное стекло и высушивали на воздухе. На последней стадии препарат обрабатывали экзонуклеазой III *E. coli*.

Гибридизация и детекция сигналов *in situ* гибридизации ядер ККМ экспериментальных мышей

Гибридизацию и детекцию сигналов проводили согласно методике, описанной в статье D. Pinkel с соавт. (1986). Флюоресцентную микроскопию проводили на микроскопе Axioskop 2

Plus с использованием программы AxioVision. Время экспозиции составляло 2–3 с.

ПЦР на предметных стеклах

PRINS-анализ был выполнен как описано у J. Gosden, D. Lawson (1995). Материал ядер ККМ, используемый для проведения ПЦР на стекле, был получен по методике приготовления препаратов для гибридизации *in situ*. Выявление специфических сигналов PRINS проводилось аналогично протоколу детекции, используемому для гибридизации *in situ*.

Выделение ДНК из ядер ККМ экспериментальных мышей

ККМ мышей вымывали из трубчатых костей физиологическим раствором (0,9 % NaCl), ресуспендировали в 0,5 мл лизирующего буфера (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 50 mM NaCl, 10 mM ЭДТА, 0,15 mM спермин, 0,15 mM спермидин) с 0,5 % Тритона X-100 и инкубировали 10 мин на льду (Roberts, 1986). Смесь наслаивали на 1 мл раствора 10 %-й сахарозы в лизирующем буфере и центрифугировали при 600 g в течение 15 мин при 4 °С. Супернатант (цитоплазматическую фракцию) отбирали. Осадок ядер промывали буфером, повторно центрифугировали и ресуспендировали в соответствующем объеме воды. Ядра лизировали 0,5 % SDS и обрабатывали протеиназой К. Депротеинизация проводилась экстракцией фенол/хлороформ в соотношении 1 : 1. ДНК переосаждали 0,6 объемами изопропанола из 0,3 M NaAc pH = 5,2 и растворяли в соответствующем объеме воды.

Выделение ДНК клеточных компартментов

К суспензии ядер добавляли до 2 M NaCl, 50 mM ЭДТА и 1 % SDS и инкубировали при 65 °С в течение 1 ч без какого-либо встряхивания, после чего центрифугировали при 52 000 g в течение 30 мин при 30 °С. Из супернатанта, представляющего собой внехромосомную фракцию ядра («ядерный сок»), осаждали ДНК изопропанолом. Осадок является хроматиновой фракцией. Образцы (осадок хроматина, ДНК

внехромосомной фракции ядра и цитоплазматической фракции) фракционировали электрофорезом в 0,7 %-м агарозном геле. Агарозный гель высушивали под струей горячего воздуха и экспонировали с рентгеновской пленкой.

Количественная дот-блот-гибридизация

Продукты ПЦР фракционировали в 2 %-м агарозном геле. Гель денатурировали и переносили по Саузерну на мембрану Zeta-Probe Genomic Tested Blotting Membrane (Bio-Rad) (Murata *et al.*, 1993), или же ДНК, выделенную из ядер ККМ экспериментальных и контрольных мышей, в количестве от 0,1 до 5000 нг денатурировали кипячением в 0,4 N NaOH и непосредственно наносили на мембрану. Предварительно данная ДНК была обработана панкреатической РНК-азой 10 мкг/мл в течение 30 мин при 37 °С и депротеинизирована экстракцией фенол/хлороформ в соотношении 1 : 1. ДНК переосаждали из 0,3 M NaAc, pH 5,2 0,6 объемами изопропанола. Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре Nanodrop (Eppendorf, США). Мембранные фильтры гибридизовали с ³²P меченым в ПЦР *Alu*-фрагментом ДНК человека по методике, предложенной в инструкции к мембране. Мембранные фильтры экспонировали с рентгеновской пленкой или проводили засветку на Molecular Imager FX Pro+ (Bio-Rad). Количество меченого материала относительно контролей определяли при помощи программы Quantity One.

Заливка ядер в блоки легкоплавкой агарозы

Вымытые физиологическим раствором ККМ осаждали центрифугированием при 4 °С, 400 g в течение 5 мин. Затем промывали небольшим объемом физиологического раствора и осаждали таким же образом. Осажденные клетки заливали в блоки легкоплавкой агарозы (Low Melt Ultra-Pure DNA Grade Agarose, Bio-Rad) в 1 %-м TAE буфере объемом 80 мкл и обрабатывали лизирующим буфером (50 mM ЭДТА, 1 % N-Lauroylsarcosine (Serva) и 1 мг/мл протеиназы К) два раза по 12 ч при 50 °С (Sambrook *et al.*, 1989). Затем блоки переносили в 0,5 M ЭДТА и хранили при 4 °С. Перед электрофорезом

ядра, фиксированные в агарозе, отмывали в ТЕ буфере (10 mM Tris-HCl, pH 7,6; 1 mM ЭДТА) в течение 2 ч.

Инкубирование экстракорпорально сгенерированных ККМ с препаратом ДНК

Из трубчатых костей мышей вымывали ККМ средой MEM-Glasgow (GibcoBRL, Великобритания), содержащей раствор незаменимых аминокислот, глутамин, 0,1 mM β-меркаптоэтанол, 1000 ед/мл LIF. Клетки осаждали центрифугированием при 400 g в течение 5 мин, 4 °C. Затем считали клетки в камере Горяева и инкубировали в 500 мкл 20–30 млн клеток с предварительно подготовленной ДНК. Для этого использовали меченый в ПЦР продукт *Alu*-повтора человека размером 300 п.н., кольцевую форму плазмиды pEGFP-N1, а также линейную форму pEGFP-N1, гидролизованную рестриктазами *HindIII* или *SmaI*. В соответствующих экспериментах ДНК плазмиды EGFP-N1 метили ³²P-dATP достраиванием по липкому концу при помощи реакции с фрагментом Кленова. По окончании инкубации клетки собирали, промывали два раза этой же средой, заливали в блоки легкоплавкой агарозы и в случае добавления ³²P меченой ДНК блоки считали на счетчике 1209 Rackbeta (Wallac, Финляндия). Затем фракционировали материал электрофорезом и, в зависимости от эксперимента, либо высушивали гель и проводили засветку на Molecular Imager FX Pro+, либо переносили по Саузерну на мембрану Zeta-Probe Genomic Tested Blotting Membrane (Bio-Rad) и проводили гибридизацию с ³²P меченой ДНК.

Анализ количества материала, доставленного в ККМ

В программе Quantity One оценивали процент засветки, приходящийся на размер добавленного фрагмента по отношению ко всему меченому материалу, вошедшему в гель или оставшемуся на старте. При известных силах радиоактивного сигнала добавленной к клеткам меченой ДНК и блока, содержащего определенное количество этих клеток вычисляли количество чистых фрагментов, доставленных в клетку.

Результаты

Интернализация экзогенной ДНК в ККМ экспериментальных мышей

Первоначально была проведена серия *in vivo* экспериментов, демонстрирующих тот факт, что в указанный промежуток времени (введение ДНК через 18 ч после инъекции ЦФ) синтетические процессы в анализируемых ККМ полностью остановлены. Мышам внутрибрюшинно вводили ЦФ и препарат фрагментированной экзогенной ДНК (суммарно 2–5 мкг) в промежуток времени 18–30 ч после инъекции ЦФ. ККМ экспериментальных животных выделяли согласно процедуре, описанной в разделе «Материалы и методы», и заливали в блоки легкоплавкой агарозы. Материал ядер, фиксированный в блоках легкоплавкой агарозы, лизировали в присутствии детергента и подвергали депротеинизации протеиназой К в течение 2 суток. ДНК ядерного хроматина фракционировали пульс-электрофорезом. Общая картина электрофоретической разгонки свидетельствует о присутствии двух высокомолекулярных фракций в образцах хроматина ядер экспериментальных животных. Одна из фракций не входит в агарозный блок и, по видимому, представляет ДНК хромосом ККМ. Вторая фракция с молекулярной массой более 1 млн п.о. постоянно присутствует в экспериментах и не является продуктом деградации, связанным с процедурой выделения материала ядерной фракции ККМ (рис. 1).

Не обнаружено включения меченого материала (*Alu*-повтор человека, *HpaI*-повтор лосося, dATP) в состав хроматина ККМ в экспериментальных группах мышей после введения ЦФ (рис. 1, дорожки 1, 3, и 7). При этом в контрольной группе (введение только меченого субстрата) явно прослеживается появление меченого материала в составе хроматина (рис. 1, дорожки 2, 4, 6 и 8). Такая картина поведения меченого материала предполагает полную остановку репликации в любой форме и отсутствие инкорпорации в хроматин продуктов деградации интродуцированной в организм мышей экзогенной меченой ДНК. В этой связи наличие незначительного количества меченого материала на старте 5-й дорожки может сви-

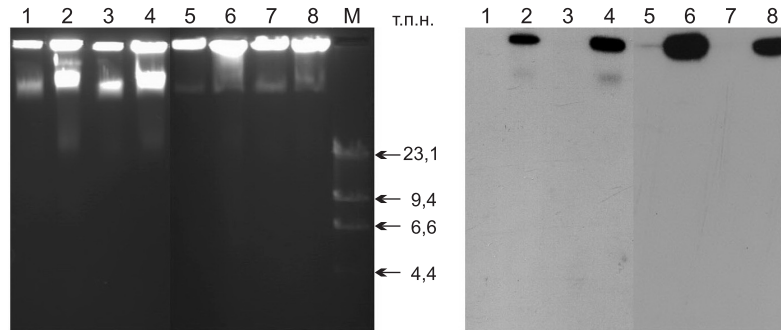


Рис. 1. Электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) геномной ДНК ККМ мышей после внутрибрюшинного (в/б) введения меченых фрагментов ДНК на фоне инъекции ЦФ (нечетные дорожки) и в виде монопрепарата (четные дорожки).

Alu-повтор человека (1,2), *HpaI*-повтор лосося (3,4), плазмиды pEGFP-N1 (5,6), меченый dATP (7,8). М – маркер молекулярного веса λ HindIII.

детельствовать в большей мере об ассоциации экзогенных фрагментов с хроматином ядра, нежели о ресинтезе с использованием меченых мономеров, образовавшихся в результате деградации экзогенной ДНК. Это заключение подтверждают эксперименты, описанные в следующих разделах настоящей работы. Также в описываемых далее экспериментах показано, что меченый материал, обнаруживаемый на старте образцов ДНК, выделенных из ККМ нативных мышей, представляет собой хроматин реципиентного ядра после инкорпорации меченых предшественников, образованных в процессе деградации в организме животного.

Далее были проведены эксперименты, характеризующие распределение материала экзогенной ДНК, доставленного во внутриклеточные компартменты. Экспериментальным мышам в хвостовую вену вводили 3–5 мкг меченой ^{32}P суммарной ДНК человека, фрагментированной до размеров 200–6000 п.н. Через полчаса животных забивали, выделяли ККМ, которые впоследствии разделяли на ядерную и цитоплазматическую фракции. Ядерную фракцию в свою очередь разделяли на хроматин и внехромосомную фракцию (см. раздел «Материалы и методы»). С полученными образцами проводили электрофорез в агарозном геле. Гель высушивали и экспонировали с рентгеновской пленкой (рис. 2).

При анализе распределения экзогенной ДНК в различных фракциях ККМ экспериментальных мышей было обнаружено, что экзогенная ДНК на момент выделения ККМ (через полчаса

после инъекции) присутствует во внутриядерном пространстве ККМ. В цитоплазматической фракции ККМ меченый материал полностью отсутствует. Размер меченых фрагментов, обнаруживаемых в ядерной фракции, свидетельствует об объединении в высокомолекулярную структуру материала ДНК, доставленного в ядерный компартмент.

Для подтверждения того факта, что экзогенная ДНК доставляется *in vivo* в ядра ККМ мышей в виде фрагментов определенного размера, была проведена серия экспериментов с использованием Cycling PRINS и ПЦР амплификации материала, принадлежащего ядру. Мышам после инъекции ЦФ (200 мг/кг) в/б вводили ДНК человека (6 мг в течение 12 ч) и через 8 ч после последней инъекции выделяли ККМ. Выделенные ядра ККМ фиксировались на стеклах. Анализ проводился с использованием в качестве праймеров человеческой ДНК в виде фрагментов размером от 20 до 500 п.н. Предполагалось, что если во внехромосомном пространстве ядра присутствуют фрагменты человеческой ДНК, то существует возможность обнаружить продукты PRINS амплификации. На рис. 3 представлены результаты такого анализа, в котором выявляются четкие сигналы, свидетельствующие о специфичности PRINS. Результаты проведенного PRINS анализа демонстрируют тот факт, что в ядрах ККМ присутствуют фрагменты ДНК человеческого происхождения.

Для конечного решения вопроса о проникновении экзогенной ДНК человека в ядра ККМ

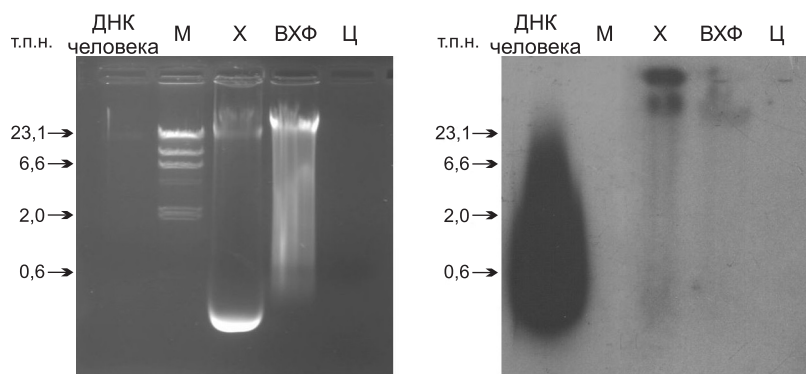


Рис. 2. Распределение экзогенной ДНК по фракциям ККМ экспериментальных мышей.

Электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) агарозного геля с нанесенными образцами: ДНК человека – экзогенная ДНК, которую внутривенно вводили экспериментальным животным; М – маркер молекулярного веса λ HindIII; X – хроматин ККМ; ВХФ – внехромосомная фракция; Ц – цитоплазматическая фракция. Ярko светящаяся полоса в нижней части геля во фракции «хроматин (X)» представляет собой остаточное количество SDS.

мышей *in vivo* мы провели ПЦР анализ с праймерами на уникальный ген каспазы 3 человека (рис. 4).

Анализ полученных результатов демонстрирует присутствие фрагментов человеческой ДНК в ядерной фракции ККМ мышей. Как следует из рис. 4, размер этих фрагментов составляет не менее 260 п.н. Появление специфического сигнала гибридизации свидетельствует о присутствии в образце видоспецифической матрицы человеческого происхождения, используемой в ПЦР и представляющей собой фракцию ядерной ДНК ККМ мыши после инъекции ЦФ и человеческой ДНК.

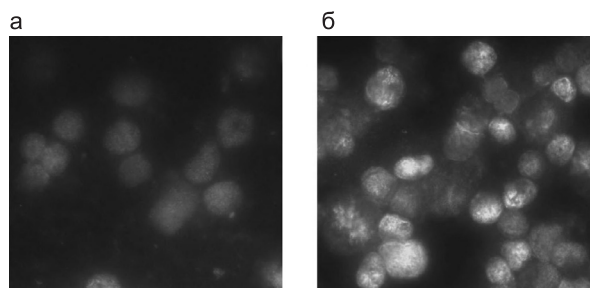


Рис. 3. ПЦР на предметном стекле с биотин-мечеными нуклеотидами и с использованием ДНК человека, фрагментированной до размеров 20–500 п.н., в качестве праймера.

Ядра ККМ интактных мышей (а) и после 12-кратного (через 18 ч после введения ЦФ) ежедневного в/б введения 0,5 мг ДНК человека (б).

Для определения времени нахождения экзогенной ДНК в ядерном пространстве ККМ мышей была проведена серия дополнительных экспериментов. Через определенные промежутки времени (3 мин, 1, 3, 5, 7, 9, и 13 сут после последней инъекции ДНК человека) ядра ККМ

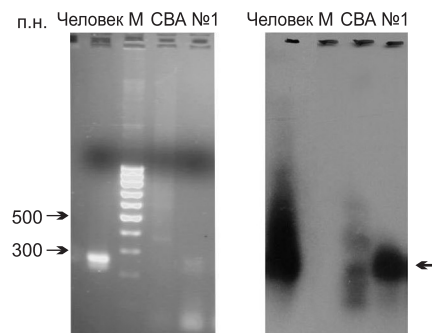


Рис. 4. Электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) продуктов ПЦР с праймерами на уникальный ген каспазы 3 человека с использованием в качестве матрицы ДНК человека, ДНК клеток костного мозга мышей СВА и ДНК ядерной фракции клеток костного мозга мышей, выделенных через 8 ч после 12-кратного (через 18 ч после введения ЦФ) ежедневного в/б введения 0,5 мг ДНК человека (№ 1). В качестве зонда для гибридизации использовали фрагмент ~260 п.н., меченный в ПЦР с праймерами на ген каспазы 3 человека и матрицей ДНК человека; 2 %-й агарозный гель.

М – маркер молекулярного веса (100 п.н.). Стрелка обозначает гибридизующийся фрагмент, соответствующий продукту ПЦР с праймерами на ген каспазы 3.

мышей, которым вводили ЦФ 200 мг/кг и ДНК человека по 0,5 мг (каждый час в промежутки времени 18–30 ч после ЦФ), выделяли и дополнительно очищали в сахарозном градиенте. ДНК, выделенную из этих ядер, использовали в качестве матрицы в ПЦР с праймерами на уникальный ген каспазы 3 человека (рис. 5).

Несмотря на то что продукт ПЦР-амплификации виден только в начальных точках (3 мин–5 сут), результаты гибридизации, которая является более чувствительным методом детекции, чем окраска бромистым этидием, свидетельствуют о том, что специфический фрагмент присутствует в ядерном пространстве ККМ мышей во всех анализируемых точках вплоть до 13 сут.

В другой серии экспериментов для выявления факта присутствия экзогенной ДНК в ККМ мышей после инъекции ЦФ (200 мг/кг веса) и многократного введения ДНК человека (ДНК человека вводили в промежутки времени 18–30 ч с момента инъекции ЦФ, каждый час по 0,5 мг), была проведена серия гибридизаций *in situ*

ККМ экспериментальных мышей с меченой биотином ДНК *Alu*-повтора человека. Препараты из ядер ККМ приготавливали спустя 38 ч после инъекции ЦФ. Проведенный анализ свидетельствует о том, что гибридизация встречается в небольшом количестве клеток, при этом обнаруживаются 1–2 зоны гибридизации. В среднем встречаемость клеток, содержащих сигнал гибридизации с *Alu*-повтором, составила 2 % (рис. 6).

Полученные в данном разделе результаты с использованием различных экспериментальных подходов подтверждают факт доставки экзогенной ДНК в форме фрагментов размером не менее 260 п.н. в ядерное пространство ККМ мышей. Доставленный материал удерживается в ядерном пространстве в виде стабильно присутствующих структур вплоть до 13 сут с момента последней инъекции экзогенной ДНК. На цитологических препаратах выявляются 1–2 зоны гибридизации при использовании в качестве зонда ДНК *Alu*-повтора человека.

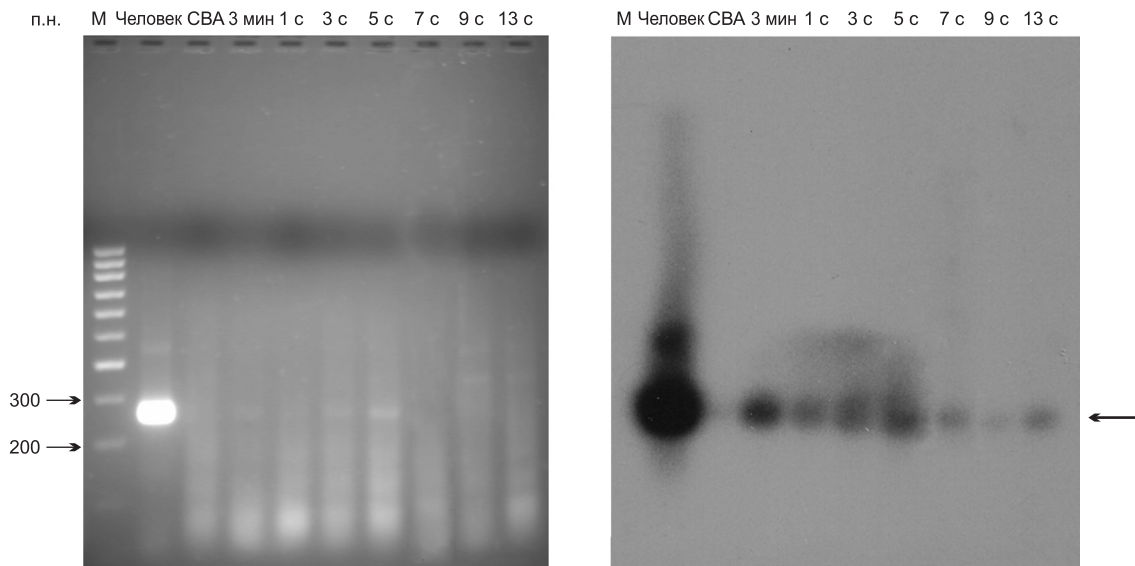


Рис. 5. Электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) продуктов ПЦР с праймерами на уникальный ген каспазы 3 человека с использованием в качестве матрицы ДНК человека, ДНК клеток костного мозга мышей СВА и ДНК ядерной фракции ККМ экспериментальных мышей, выделенных через определенные промежутки времени после последней инъекции препарата ДНК. В качестве зонда для гибридизации использовали фрагмент ~260 п.н., меченный в ПЦР с праймерами на ген каспазы 3 человека и матрицей ДНК человека; 2 %-й агарозный гель.

М – маркер молекулярного веса (100 п.н.). Стрелка обозначает гибридизующийся фрагмент, соответствующий продукту ПЦР с праймерами на ген каспазы 3.

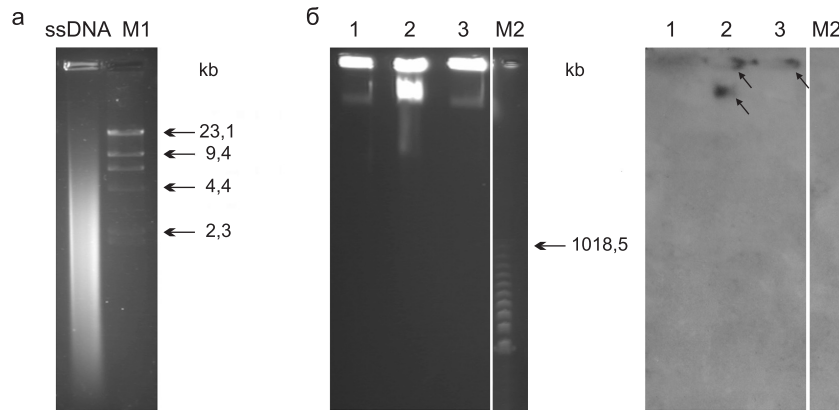


Рис. 7. Препарат ДНК лосося, использованный для инъекций мышам в ходе эксперимента (а); б – электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) материала ДНК ядер ККМ мыши после введения: 1 – ЦФ (200 мг/кг); 2 – ДНК лосося в виде монопрепарата; 3 – ДНК лосося на фоне инъекции ЦФ.

M1 – маркер молекулярного веса λ HindIII, M2 – маркер молекулярного веса 50–1000 т.п.о. В качестве зонда для гибридизации использовали ДНК ^{32}P меченого *HpaI*-повтора рыбы. Стрелками указаны сигналы гибридизации.

монопрепарата ДНК ядерной фракции ККМ экспериментальных животных достоверно по сравнению с контролем (с вероятностью $> 0,99$) содержит больше последовательностей, гомологичных *HpaI*-повтору лосося (рис. 8).

Для того чтобы охарактеризовать материал ядер ККМ, имеющий гомологию с экзогенной ДНК и нефракционирующийся в агарозе, была предпринята серия попыток рестрикционного

анализа ядерной ДНК ККМ экспериментальных мышей. Результаты проводимых далее гибридизаций со специфическими зондами различного происхождения не выявили четких сигналов гибридизации. Это могло свидетельствовать о гетерологичности доставляемых в ядра экзогенных фрагментов.

Для того чтобы оценить состояние экзогенной ДНК в ядре ККМ мышей, обработанных

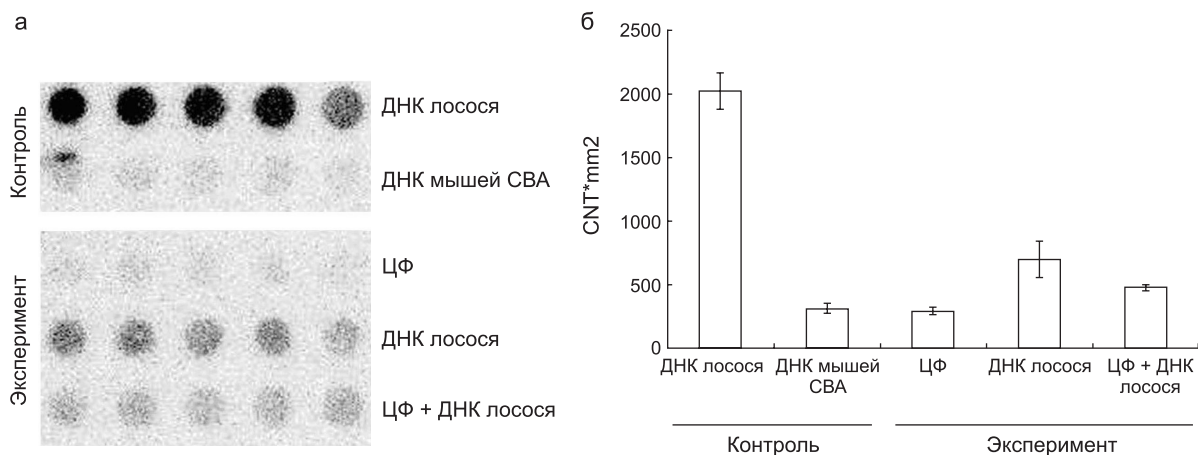


Рис. 8. Рентгенограмма мембраны, гибридизованной с ДНК ^{32}P меченого *HpaI*-повтора (а). В каждой точке нанесено по 0,5 мкг ДНК: контроль – ДНК лосося и ДНК мышей СВА, эксперимент – ДНК ядер ККМ мышей после инъекций ЦФ и экзогенной ДНК лосося. Количественная оценка интенсивности гибридизационного сигнала после сканирования на Molecular Imager FX Pro+ (б).

CNT*mm² – относительные единицы, характеризующие силу радиоактивного сигнала мембраны на единицу площади, подсчитанные в программе Quantity One.

как ЦФ, так и экзогенной ДНК, не фракционирующейся в агарозном геле, была выделена частично деградированная в результате протекающего апоптоза ядерная фракция, в которой целые ядра не детектировались. При окраске по Гимза в таких препаратах выявлялись блоки свободно лежащего хроматина. Полученный таким образом препарат хроматина также заливали в блоки легкоплавкой агарозы и после обработок фракционировали в агарозном геле в системе пульс-электрофореза. Результаты проведенной гибридизации с *Alu*-повтором человека представлены на рис. 9.

Результаты проведенного анализа фракции хроматина ядер ККМ после инъекций экзогенной ДНК дают основание предполагать, что фрагменты экзогенной ДНК достигают внутренних компартментов клеток, выделенных как из необработанных ЦФ мышей, так и мышей, обработанных двумя препаратами. Гомологичные экзогенной ДНК структуры, определяемые в ядерной фракции ККМ, представлены четкими индивидуальными бэндами, которые более медленно мигрируют в агарозном блоке по сравнению с исходной ДНК. Такой эффект как правило связан с увеличением линейных размеров фрагментов. Наблюдаемое увеличение размера по сравнению с исходной ДНК может свидетельствовать о сшивании между собой экзогенных фрагментов, свободно присутствующих в ядерном пространстве (рис. 9, дорожка 1, 2).

Нуклеазы крови в течение 5 минут полностью деградируют любую незащищенную ДНК, введенную в организм экспериментальных мышей (Алямкина и др., 2009, Долгова и др., 2009). Это создает трудности в интерпретации полученных данных по интернализации радиоактивно меченых фрагментов экзогенной ДНК в ядра ККМ. При использовании радиоактивных ДНК зондов главной трудностью является невозможность отличить экзогенную ДНК, доставленную в ядро, от ДНК хозяина как интактной, так и деградированной после ресинтеза с радиоактивными мономерами, возникшими в результате деградации в крови или непосредственно в клетке экзогенной меченой ДНК. Для решения данного вопроса мы разработали процедуру экстракорпоральной генерации ККМ, их совместной инкубации с индивидуальными

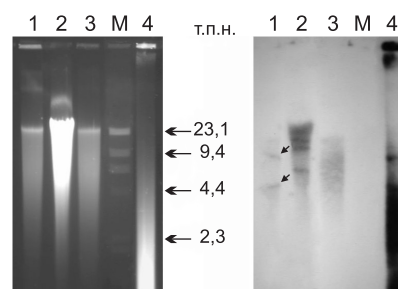


Рис. 9. Электрофореграмма (слева) после проведения пульс-электрофореза и рентгенограмма (справа) материала ДНК из ядер ККМ мыши после введения: 1 – экзогенной ДНК человека на фоне инъекции ЦФ; 2 – экзогенной ДНК человека в виде монопрепарата; 3 – ЦФ в дозе 200 мг/кг. М – маркер молекулярного веса λ *Hind*III; 4 – препарат ДНК человека, используемый для инъекций в эксперименте. В качестве зонда для гибридизации использовали меченый в ПЦР *Alu*-повтор человека.

радиоактивно мечеными фрагментами ДНК и анализа материала этих клеток после заливки в блоки легкоплавкой агарозы.

Были выполнены две серии экспериментов с фрагментом ДНК, синтезированным в ПЦР, и фрагментом ДНК, меченным по липкому концу (гидролизованная рестриктазой *Hind*III плазида рEGFP-N1). Также были проведены блот-гибридизации геномной ДНК ККМ после инкубации с ДНК немеченой плазмиды, где в качестве гибридизационного зонда использовали ПЦР-продукт гена GFP той же плазмиды. Результаты экспериментов представлены на рис. 10, 11 и 13.

Оказалось, что оба типа фрагментов в недеградированном состоянии доставляются как в нативные ККМ, так и в находящиеся под действием ЦФ. Фрагмент, полученный в ПЦР, присутствует в клеточном пространстве после 2 часов инкубации все еще в исходном виде (не образует конкатамеров). Второй фрагмент (меченая плазида) начинает замыкаться в кольцо к 7 часам инкубации в ККМ, выделенных из мышей обеих групп. В обоих экспериментах наблюдаются быстрое конечное насыщение меченым материалом клеток, находящихся под воздействием ЦФ, и непрерывное увеличение количества меченого материала в клетках, выделенных из необработанных ЦФ мышей (рис. 12).

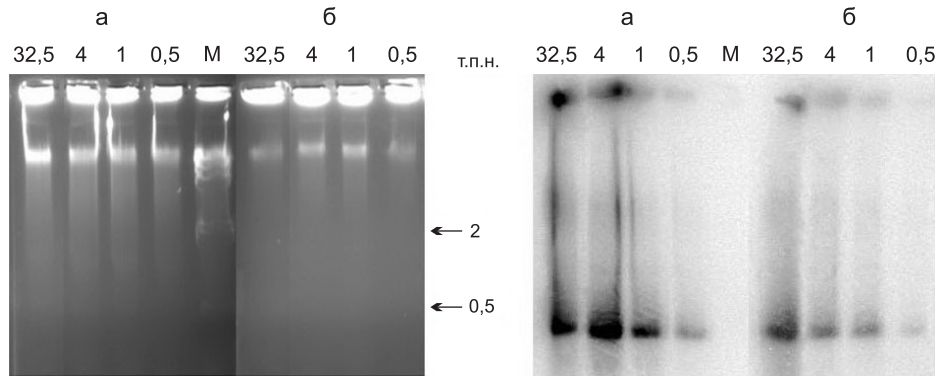


Рис. 10. Электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) после заливки в блоки легкоплавкой агарозы и электрофореза ядер ККМ мыши, выделенных через 18 ч после воздействия ЦФ (а), и интактной мыши (б). ККМ инкубировали с фрагментом ДНК – *Alu*-повтором 300 п.н., синтезированным и меченым в ПЦР в количестве от 0,5 до 32,5 мкг.

М – маркер молекулярного веса λ HindIII.

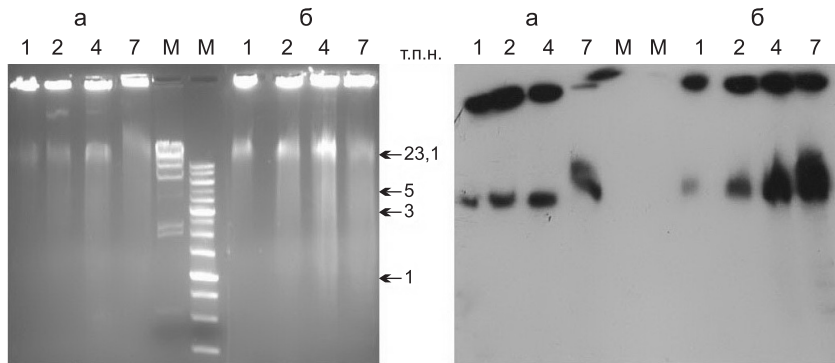


Рис. 11. Электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) после заливки в блоки легкоплавкой агарозы и электрофореза ядер ККМ мыши, выделенных через 18 ч после воздействия ЦФ (а), и интактной мыши (б). ККМ инкубировали с плазмидой rEGFP-N1, гидролизованной рестриктазой *Hind*III и меченой по липкому концу, в течение различного времени – 1, 2, 4 и 7 ч.

М – маркеры молекулярного веса.

В экспериментах по гибридизации (рис. 13) было обнаружено, что, как и в предыдущей серии экспериментов, в ККМ мышей происходит замыкание молекул плазмиды в мономерное или мультимерное кольцо после 7 ч инкубации. В кольцо замыкаются молекулы как с тупыми, так и липкими концами. В случае мышей, обработанных одним ЦФ, эффект лигирования более выражен, при этом удивительным оказался факт увеличения линейных размеров циклической формы плазмиды, также используемой в эксперименте. Не менее интригующим оказался факт обнаружения гибридизующегося материала, находящегося на старте образцов ДНК,

полученных из ККМ мышей, обработанных ЦФ и экзогенной ДНК. Причем в аналогичных образцах ДНК, полученных из ККМ мышей, не обработанных ЦФ, такой гибридизации обнаружено не было. Этот факт, в совокупности с результатами, полученными в других сериях экспериментов настоящего исследования, может свидетельствовать о ковалентном объединении экзогенных молекул и ДНК хромосом реципиентного ядра (см. раздел «Обсуждение») в ККМ, находящихся под воздействием цитостатика.

В серии экспериментов, в которых использовалась плазида, для полной уверенности в том, что выявляемый меченый материал образован

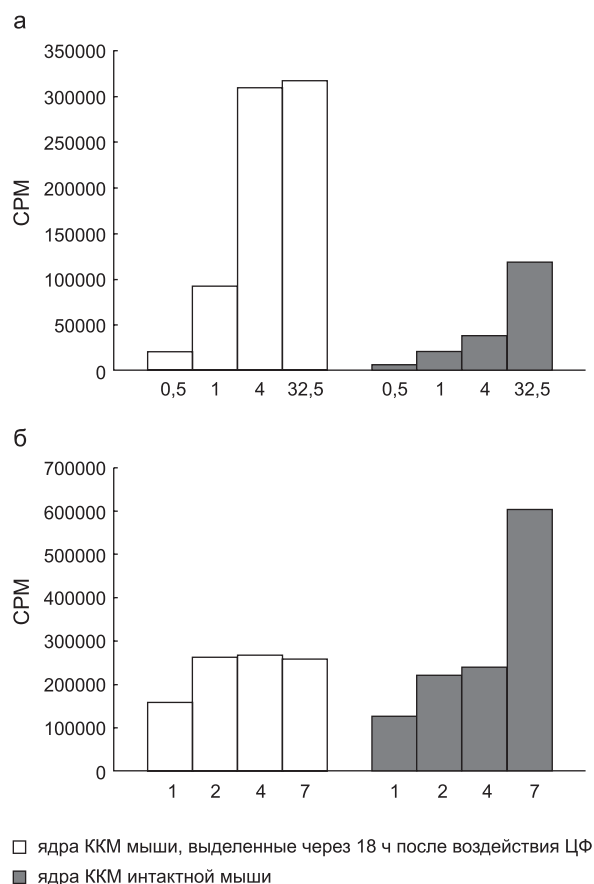


Рис. 12. Количество меченого материала, определенное по рентгенограмме ядер ККМ мыши, выделенных через 18 ч после воздействия ЦФ, и ядер ККМ интактной мыши, инкубированных в присутствии меченого материала: а – *Alu*-повтора 300 п.н., синтезированного и меченого в ПЦР, в количестве от 0,5 до 32,5 мкг; б – плазмиды rEGFP-N1, гидролизованной рестриктазой *Hind*III и меченой по липкому концу, в течение различного времени – 1, 2, 4 и 7 ч.

плазмидной ДНК, доставленной из внеклеточного пространства, была осуществлена трансформация компетентных клеток *Escherichia coli* материалом хроматина клеток, выделенных как из обработанных, так и необработанных ЦФ мышей, полученного в результате центрифугирования в градиенте концентрации хлорида натрия. Полученный результат свидетельствовал о том, что в ядерной фракции анализируемых клеток присутствует исходная форма плазмиды.

Было оценено количество доставляемой в ККМ ДНК и рассчитано количество фрагментов, присутствующих в клетке. Оценку проводили по количеству меченого материала, однозначно

трактуемого как доставленный из околоклеточного пространства (исходный фрагмент, выявляемый при электрофоретическом анализе с учетом уровня его радиоактивности). Оказалось, что в ядросодержащих ККМ мыши одновременно может находиться до 1800 т.п.н. экзогенной ДНК в форме фрагментов. Причем количество фрагментов, находящихся во внутриклеточном пространстве, коррелирует с их размером.

Для оценки возможности мультимеризации линейаризованной плазмиды во внутриклеточном пространстве были проведены эксперименты по трансфекции клеток культуры фибробластов человека плазмидой rEGFP-N1 с использованием липофектамина. Плазмидная ДНК была линейаризована по сайту рестрикции *Sal*GI и в такой форме трансфецировалась в культуру фибробластов человека. Гибридизация фракционированного пульс-электрофорезом материала ДНК клеток культуры фибробластов с ³²P меченой ДНК исходной плазмиды продемонстрировала появление в клетках высокомолекулярных структур, гомологичных плазмидной ДНК размером около 45, 80 и 200 т.п.н. (рис. 14). Полученные факты предполагают, что плазмидная ДНК организуется в клетке в форму сшитых между собой линейных молекул исходной плазмиды. Такая конкатамеризация предполагает возможность формирования эписомоподобной структуры, которая может находиться в клетке длительное время.

ПЦР анализ с использованием стандартного набора праймеров показал, что материал ДНК хроматина ядерной фракции фибробластов, обработанных экзогенной ДНК, в своем составе содержит ДНК плазмиды, используемой для трансфекции. Такой же результат был получен при трансформации компетентных клеток *E. coli* материалом осадка хроматина ядерной фракции после градиентного центрифугирования в градиенте NaCl, последующих рестрикции *Sal*GI и лигирования. Были получены колонии, трансформированные плазмидной ДНК rEGFP-N1, по своей структуре не отличающейся от используемой для трансфекции. Следует отметить, что при трансформации материалом хроматина ядерной фракции без рестрикции и лигирования колоний, устойчивых к канамицину, а, значит, содержащих функциональную плазмиду rEGFP-N1, получено не было.

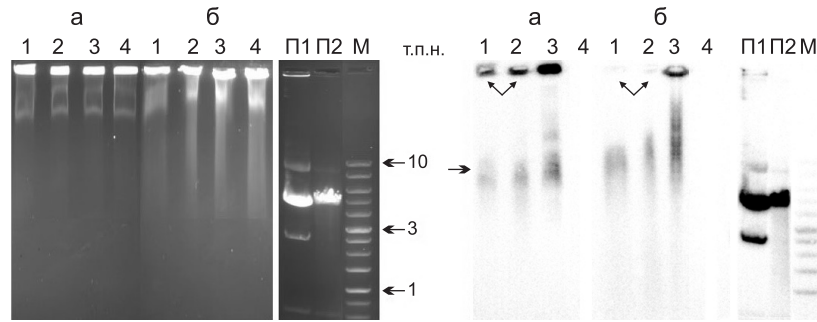


Рис. 13. Электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) после заливки в блоки легкоплавкой агарозы и электрофореза ядер ККМ мыши, выделенных через 18 ч после воздействия ЦФ (а), и интактной мыши СВА (б). ККМ инкубировали с ДНК плазмиды рEGFP-N1, гидролизованной рестриктазой *Sma*I (1), рестриктазой *Hind*III (2), суперскрученной формой плазмиды рEGFP-N1 (3) и в отсутствие экзогенной ДНК (4) в течение 7 ч.

П1 и П2 – ДНК плазмиды рEGFP-N1 суперскрученной и линейной формы, М – маркер молекулярного веса.

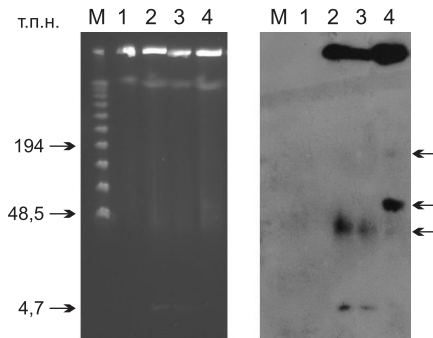


Рис. 14. Электрофореграмма (слева) и рентгенограмма (справа) ядер культуры клеток hT³, залитых в блоки легкоплавкой агарозы, фракционированных пульс-электрофорезом.

1 – исходная культура, 2 – обработанная липофектамином и трансфицированная линейной формой плазмиды рEGFP-N1, 3 – обработанная митомицином С и липофектамином и трансфицированная линейной формой плазмиды рEGFP-N1, 4 – обработанная липофектамином и трансфицированная плазмидой рEGFP-N1 (циклическая форма). М – маркер молекулярного веса. В качестве зонда для гибридизации использовали ³²P меченую в ПЦР плазмиду рEGFP-N1.

Обсуждение

Проведенный анализ свидетельствует о том, что при внутрибрюшинном и внутривенном введении препаратов экзогенной ДНК различного происхождения *in vivo* так же, как и при совместном культивировании в условиях *ex vivo*, в ККМ доставляется и присутствует

в форме фрагментов материал ДНК, исходно находящийся в околоклеточном пространстве. Фрагменты экзогенной ДНК обнаруживаются в ядерном пространстве ККМ вплоть до последней экспериментально подтвержденной точки – 13 сут после введения циклофосфана. Таким образом, получены достоверные свидетельства того, что экзогенная ДНК без помощи трансфицирующих факторов достигает внутренних компартментов ККМ. Количественный анализ интернализированной ДНК в форме неизменных фрагментов исходно экстраклеточной локализации показал, что до 1800 т.п.н. экзогенной ДНК может одновременно находиться во внехромосомном пространстве в форме фрагментов. Как следует из полученных результатов, фрагменты экзогенной ДНК подвергаются процессингу (замыкание в кольцо, мультимеризация) во внутренних клеточных компартментах ККМ, выделенных из костного мозга интактных мышей и мышей, обработанных препаратом ДНК через 18 ч после инъекции ЦФ.

Результаты гибридизации, выполненной с использованием плазмидного материала (рис. 13), а также результаты экспериментов по интернализации плазмидной ДНК, меченной ³²P (рис. 11, 12, б), свидетельствуют о том, что в ККМ, находящихся под воздействием ЦФ, и в необработанных клетках активированные молекулярные механизмы имеют общие свойства. Прослеживается, что линейные молекулы плазмиды замыкаются в кольцо в обоих типах

клеток. Однако в образцах ККМ, выделенных из не обработанных ЦФ мышей, не происходит какой-либо ассоциации плазмидной ДНК и реципиентного хроматина (рис. 13, дорожки 1, 2 старт). Наоборот, в ККМ, выделенных из обработанных ЦФ мышей, плазмидная ДНК ассоциируется с реципиентным хроматином ядра и колокализуется вместе с ним на старте агарозного геля. Сравнительный анализ двух типов событий предполагает активацию в ККМ, обработанных различным образом, аварийной лигирующей системы. По-видимому, эта система является более специфичной для ДЦР хромосом клетки, только в отсутствие которых происходит удаление из пространства ядра двуцепочечных концов, пришедших с экзогенными фрагментами ДНК. Этот эффект хорошо виден при анализе результатов, приведенных на рис. 11 и 13. Если в ядре присутствуют двуцепочечные разрывы хромосом, то система лигирования в первую очередь стремится удалить из пространства ядра именно эти повреждения. По-видимому, в этот процесс случайным образом попадают и экзогенные фрагменты, которые выявляются как ассоциированные с хроматином на старте агарозных блоков. В результате таких событий, протекающих в ядре, наблюдаются появление экзогенного материала, вероятно, ковалентно объединенного с ДНК хроматина, и одновременное снижение эффективности лигирования молекул плазмиды, свободно присутствующих в ядерном пространстве.

В дополнение к этому показано, что в исследуемой системе клеток меченый материал быстро (ко второму часу инкубации) насыщает фракцию хроматина и количество радиоактивного материала сохраняется на одинаковом уровне вплоть до 7 ч инкубации с экзогенной ДНК (рис. 11, 12, б). Такое поведение меченого материала также может свидетельствовать о возможности ковалентного объединения экзогенных меченых фрагментов с хроматином ККМ. Быстрое и конечное насыщение хроматина меченым материалом в таких клетках предполагает некое завершение определенных репаративных процессов, стабилизирующих доставку и ассоциацию с хроматином экзогенной ДНК. Как следует из работы (Долгова и др., 2011), в течение 10 мин после появления в организме мышей экзогенной фрагменти-

рованной ДНК происходит исчезновение из пространства клеток свидетеля ДЦР – гистона γ H2AX, что говорит о завершении репарации интермедиатов репарации МЦС ДЦР.

Если сопоставить следующие факты: присутствие меченого материала в ассоциации с хроматином ядра в момент времени, когда полностью остановлены синтетические клеточные процессы (рис. 1, дорожка 5); гибридизация плазмидной ДНК с фракцией хроматина в образцах ККМ, выделенных из мышей, обработанных ЦФ (рис. 13); быстрое и конечное насыщение фракции хроматина экзогенной ДНК (рис. 11, 12); немедленное удаление ДЦР, определяемых в клетке антителами к гистону γ H2AX (Долгова и др., 2011), то можно предположить следующую картину развития событий.

Когда в ККМ происходит репарация ДЦР, сформированных к 12 ч после воздействия ЦФ (Niedernhofer *et al.*, 2004; Долгова и др., 2010), идет подготовка к репаративной гомологичной рекомбинации образованных двуцепочечных концов с гомологичными последовательностями сестринских хроматид. После гомологичного спаривания и завершения кроссинговера должны произойти восстановление репликативной вилки и возобновление движения клетки по клеточному циклу (De Silva *et al.*, 2000; Helleday, 2003; Niedernhofer *et al.*, 2004; Saleh-Gohari *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007; Raynard *et al.*, 2008; Bhagwat *et al.*, 2009). В этот момент времени в ядерном пространстве таких клеток появляются фрагменты экзогенной ДНК. Известно, что свободные двуцепочечные концы активируют систему иерархических киназ, которые индуцируют остановку клеточного цикла (Zou, 2007; Лихачева и др., 2008). Одновременно с этим происходит активация специфической системы аварийного лигирования (Derbyshire *et al.*, 1994; Lees-Miller, Meek, 2003; Lee *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2005). Предположительно повторная активация иерархических киназ (если она действительно присутствует) и специфическое аварийное лигирование, индуцированное появлением свободных двуцепочечных концов интрадуцированных в ядро экзогенных фрагментов (как это наблюдается при разрывах, вызванных жестким γ -облучением (Lees-Miller, Meek, 2003)), встречаются с молекулярным механизмом деликатного репаративного процесса МЦС и, в частности,

конечной его фазы восстановления ДЦР путем прецизионной гомологичной рекомбинации (Niedernhofer *et al.*, 2004). Возникает молекулярный хаос, результатом которого могут быть следующие последствия.

1. Происходит стохастическое лигирование двуцепочечных концов, принадлежащих экзогенным фрагментам и ожидающих гомологичной рекомбинации двуцепочечных концов, сформированных вокруг МЦС. Полученные результаты дают основание предполагать, что репаративные факторы, появление которых индуцировано фрагментами экзогенной ДНК (Ku70/80, лигаза IV, лигаза III), в первую очередь и предпочтительно ассоциируются с двуцепочечными разрывами хромосом, лигируя разрывы. Поскольку обработка ЦФ индуцирует конечное количество МЦС (2000–2500) и, как следствие, появление конечного количества двуцепочечных концов, то факт быстрого конечного насыщения меченым материалом указанным образом обработанных ККМ может свидетельствовать о наличии такого рода лигирования. При этом должны возникнуть многочисленные химерные молекулы хромосом. Частным случаем таких событий будет интеграция экзогенных фрагментов в структуру хромосом реципиентного ядра. Результатом такого процесса являются непрекращающийся апоптоз ККМ и элиминация из организма лимфоцитарного ростка крови (Долгова и др., в печати).

2. Возможно, что одновременно происходит формирование эписомоподобных структур (Lin *et al.*, 1985; Thomas *et al.*, 1986; Hashizume, Shimizu, 2007), которые объединены с хромосомами ядра связями, не разрушающимися при обработке протеиназой К. Эписомы, образованные фрагментами экзогенной ДНК, могут вносить свой вклад в токсическое воздействие, оказываемое на клетку. Предполагается, что в этих структурах могут находиться эукариотические последовательности, функционально активированные формированием эписомы. Продукты синтеза с этих последовательностей (Filaci *et al.*, 2004), а также сами последовательности, если они относятся к структурным участкам генома (MAR/SAR), могут вносить дисбаланс в функционирование молекулярных механизмов клетки, что также может приводить к активации механиз-

мов запрограммированной гибели клеток (Wang *et al.*, 2005; Hashizume, Shimizu, 2007).

Таким образом, экзогенная ДНК при ее взаимодействии с ККМ интернализуется во внутренние компартменты клетки и, в частности в ядро. Присутствие экзогенных фрагментов в ядре ККМ в момент, когда в клетках этого типа индуцированы функциональные ДЦР, связанные или с процессом репликации или со специфическими репаративными процессами, может негативно влиять на функциональную целостность клеток, вызывая их гибель.

Благодарности

Авторы выражают благодарность О.В. Воробьевой и Н.А. Сердюковой за помощь в постановке FISH.

Работа финансировалась при участии федеральной целевой программы «Научные и научно-технические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (государственный контракт № 14.740.11.0922) и ООО «Панаген».

Литература

- Алямкина Е.А., Лихачева А.С., Николин В.П. и др. Действие экзогенной ДНК, ассоциированной с протамином, на рост экспериментальных опухолей мыши // Вопросы онкологии. 2009. Т. 55. № 6. С. 765–768.
- Долгова Е.В., Лихачева А.С., Орищенко К.Е. и др. Репарация межцепочечных сшивок молекулы ДНК // Информ. вестник ВОГиС. 2010. Т. 14. № 2. С. 332–356.
- Долгова Е.В., Николин В.П., Попова Н.А. и др. Патологические изменения, возникающие в организме мышей, обработанных сочетанием циклофосфана и экзогенной ДНК // В печати.
- Долгова Е.В., Проскурина А.С., Николин В.П. и др. Характеристика временных параметров проявления эффекта токсического действия инъекций экзогенной ДНК на фоне предобработки цитостатиком циклофосфаном // Информ. вестник ВОГиС. 2011. Т. 15. № 4. С. 485–492.
- Долгова Е.В., Рогачев В.А., Николин В.П. и др. Лейкостимулирующее действие фрагментов экзогенной ДНК, защищенных протамином, при вызванной циклофосфаном миелосупрессии мышей // Вопросы онкологии. 2009. Т. 55. № 6. С. 761–764.
- Лихачева А.С., Рогачев В.А., Николин В.П. и др. Участие экзогенной ДНК в молекулярных процессах, протекающих в соматической клетке // Информ. вестник ВОГиС. 2008. Т. 12. № 3. С. 426–473.
- Abrams R.A., McCormack K., Bowles C., Deisseroth A.B. Cyclophosphamide treatment expands the circulating hematopoietic stem cell pool in dogs // J. Clin. Invest. 1981. V. 67. No. 5. P. 1392–1399.

- Bhagwat N., Olsen A.L., Wang A.T. *et al.* XPF-ERCC1 participates in the Fanconi anemia pathway of cross-link repair // *Mol. Cell Biol.* 2009. V. 29. No. 24. P. 6427–6437.
- De Silva I.U., McHugh P.J., Clingen P.H., Hartley J.A. Defining the roles of nucleotide excision repair and recombination in the repair of DNA interstrand cross-links in mammalian cells // *Mol. Cell Biol.* 2000. V. 20. No. 21. P. 7980–7990.
- Derbyshire M.K., Epstein L.H., Young C.S.H. *et al.* Nonhomologous recombination in human cells // *Mol. Cell Biol.* 1994. V. 14. No. 1. P. 156–169.
- Filaci G., Gerloni M., Rizzi M. *et al.* Spontaneous transgenesis of human B lymphocytes // *Gene Ther.* 2004. V. 11. No. 1. P. 42–51.
- Fleming R.A. An overview of cyclophosphamide and ifosfamide pharmacology // *Pharmacotherapy.* 1997. V. 17. P. 146–154.
- Gosden J., Lawson D. In situ cyclic amplification of oligonucleotide primed synthesis (cycling PRINS) // *PCR Application Manual* (Boehringer Mannheim Corp., ed.), *Boehringer Mannheim Corp.*, Mannheim, Germany. 1995. P. 115–118.
- Hashizume T., Shimizu N. Dissection of mammalian replicators by a novel plasmid stability assay // *J. Cell Biochem.* 2007. V. 101. No. 3. P. 552–565.
- Helleday T. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells // *Mutat. Res.* 2003. V. 532. No. 1/2. P. 103–115.
- Lee S., Oshige M., Durant S.T. *et al.* The SET domain protein Metnase mediates foreign DNA integration and links integration to nonhomologous end-joining repair // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. No. 50. P. 18075–18080.
- Lees-Miller S.P., Meek K. Repair of DNA double strand breaks by non-homologous end joining // *Biochimie.* 2003. V. 85. No. 11. P. 1161–1173.
- Likhacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A. *et al.* Exogenous DNA can be captured by stem cells and be involved in their rescue from death after lethal-dose γ -radiation // *Gene Ther. Mol. Biol.* 2007. V. 11. P. 305–314.
- Lin F.L., Sperle K., Sternberg N. Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. No. 5. P. 1391–1395.
- Mazur L., Czyzewska A. Immunocytochemical analysis of apoptotic bone marrow cells after treatment of mice with WR-2721 and chemotherapeutic drugs // *Folia Histochem. Cytobiol.* 2001. V. 39. No. 2. P. 63–66.
- Murata S., Takasaki N., Saiton M., Okada N. Determination of the phylogenetic relationships among Pacific salmonids by using short interspersed elements (SINEs) as temporal landmarks of evolution // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 6995–6999.
- Niedernhofer L.J., Odijk H., Budzowska M. *et al.* The structure-specific endonuclease Ercc1-Xpf is required to resolve DNA interstrand cross-link-induced double-strand breaks // *Mol. Cell Biol.* 2004. V. 24. No. 13. P. 5776–5787.
- Pinkel D., Straume T., Gray J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1986. V. 83. No. 9. P. 2934–2938.
- Raynard S., Niu H., Sung P. DNA double-strand break processing: the beginning of the end // *Genes Dev.* 2008. V. 22. No. 21. P. 2903–2907.
- Roberts D.B. *Drosophila: a Practical Approach* / Ed. D.B. Roberts. Oxford-Washington, DC: IRL Press, 1986. 295 p.
- Saleh-Gohari N., Bryant H.E., Schultz N. *et al.* Spontaneous homologous recombination is induced by collapsed replication forks that are caused by endogenous DNA single-strand breaks // *Mol. Cell Biol.* 2005. V. 25. No. 16. P. 7158–7169.
- Salem M.L., El-Naggar S.A., Cole D.J. Cyclophosphamide induces bone marrow to yield higher numbers of precursor dendritic cells in vitro capable of functional antigen presentation to T cells *in vivo* // *Cell Immunol.* 2010. V. 261. No. 2. P. 134–143.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, 1989.
- Stanyon R., Galleni R. A rapid fibroblast culture technique for high resolution karyotypes // *Ital. J. Zool.* 1991. V. 58. No. 1. P. 81–83.
- Thomas K.R., Folger K.R., Capecchi M.R. High frequency targeting of genes to specific sites in the mammalian genome // *Cell.* 1986. V. 44. No. 3. P. 419–428.
- Wang H., Rosidi B., Perrault R. *et al.* DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining // *Cancer Res.* 2005. V. 65. No. 10. P. 4020–4030.
- Zhang N., Liu X., Li L., Legerski R. Double-strand breaks induce homologous recombinational repair of interstrand cross-links via cooperation of MSH2, ERCC1-XPF, REV3, and the Fanconi anemia pathway // *DNA Repair.* 2007. V. 6. No. 11. P. 1670–1678.
- Zou L. Single- and double-stranded DNA: building a trigger of ATR-mediated DNA damage response // *Genes Dev.* 2007. V. 21. No. 8. P. 879–885.

INTERNALIZATION OF EXOGENOUS DNA INTO INTERIOR COMPARTMENTS OF MURINE BONE MARROW CELLS

E.V. Dolgova¹, V.P. Nicolin¹, N.A. Popova¹, A.S. Proskurina¹,
K.E. Orishchenko¹, E.A. Alyamkina¹, Y.R. Efremov¹, E.R. Chernykh², A.A. Ostanin²,
E.M. Malkova³, O.S. Taranov³, V.A. Rogachev¹, S.V. Sidorov⁴,
S.S. Bogachev¹, M.A. Shurdov⁵

¹ Institute of Cytology and Genetics, SB RAS, Novosibirsk, Russia,
e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru;

² Institute of Clinical Immunology, Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences,
Novosibirsk, Russia;

⁴ State Research Center of Virology and Biotechnology Vector, Novosibirsk, Russia;

⁴ City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russia;

⁵ OOO Panagen, Novosibirsk, Russia

Summary

Injections of exogenous DNA in combination with a cytostatic agent cyclophosphamide (CP) cause illness and death of experimental mice. This phenomenon is referred to this as delayed death. It has been found that upon intraperitoneal injections fragments of exogenous DNA reach the bone marrow niche and enter the nuclei of bone marrow cells (BMCs). Also, fragments of exogenous DNA are captured from culture medium by BMCs generated *ex vivo*. Upon such treatment, the fragments are incorporated into cells in a non-degraded form. We estimate that under such conditions up to 1800 kb of exogenous DNA can be present in BMCs as fragments. After *ex vivo* incubation with BMCs, fragments of exogenous DNA internalized in cells of both intact and CP pre-treated mice become circularized. It has been shown that fragments of exogenous DNA can form high-molecular weight structures *in vivo*. Moreover, fragments localized in BMC nuclei are suggested to integrate into chromosome(s) of recipient mouse genomes when treated with CP and exogenous DNA.

Key words: bone marrow cells, fragments of exogenous DNA, episome, concatemerization.