История вопроса воздействия экзогенной ДНК на соматическую клетку и организм в целом относится к середине прошлого века. До настоящего времени в научной литературе имелась крайне скудная информация о том, какие процессы в клетке вызывает проникновение фрагментов экзогенной ДНК во внутриклеточное пространство. В предлагаемой работе удалось решить два принципиальных вопроса, делающих понятной причину существования разноречивых данных о воздействии фрагментов экзогенной ДНК на соматическую клетку.

- 1. В работе четко очерчены типы воздействия экзогенной ДНК, которые авторы напрямую связали с появлением во внутриядерном пространстве клетки ДЦ концов и их происхождением или сбоем в системах, контролирующих прогрессию клеточного цикла.
- 2. В работе сформулирована концепция «рекомбиногенной ситуации», возникающей в клетке при появлении во внутриядерном пространстве ДЦ концов различного происхождения или сбоя в системах, контролирующих прогрессию клеточного цикла. Одновременное нахождение фрагментов экзогенной ДНК во внутриядерном пространстве в этот момент времени определяет интеграцию экзогенной ДНК в реципиентный геном. При этом типы интеграции зависят от количества интернализованных в ядре экзогенных фрагментов и имманентного выбора клетки.

Впервые проблема воздействия экзогенной ДНК рассмотрена в разрезе мониторинга прогрессии клеточного цикла системами клетки, контролирующими целостность генома.

Статья дискуссионная, она затрагивает одну из серьезнейших проблем биологии – возможность горизонтального переноса генетического материала.

Редколлегия

УЧАСТИЕ ЭКЗОГЕННОЙ ДНК В МОЛЕКУЛЯРНЫХ ПРОЦЕССАХ, ПРОТЕКАЮЩИХ В СОМАТИЧЕСКОЙ КЛЕТКЕ

Обзор состоит из трех сообщений: в первом сформулирована концепция рекомбиногенной ситуации; во втором проведен анализ молекулярных событий, индуцирующих рекомбиногенную ситуацию; и в третьем сообщении рассматриваются детали общеклеточной рекомбиногенной ситуации, возникающей при нарушении систем контроля клеточного цикла.

Сообщение 1

КОНЦЕПЦИЯ «РЕКОМБИНОГЕННОЙ СИТУАЦИИ»

А.С. Лихачева¹, В.А. Рогачев¹, В.П. Николин¹, Н.А. Попова¹, А.Г. Шилов¹ Т.Е. Себелева¹, Д.Н. Стрункин², Е.Р. Черных³, Е.Л. Гельфгат³, С.С. Богачев¹, М.А. Шурдов⁴

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru;
 ² Городская клиническая больница, отделение онкологии, Новосибирск, Россия;
 ³ Научно-исследовательский институт клинической иммунологии СО РАМН, Новосибирск, Россия;
 ⁴ ООО «Панаген», Горно-Алтайск, Россия

В сообщении сформулирована концепция «рекомбиногенной ситуации», возникающей в клетке при появлении в ядерном пространстве двуцепочечных концов хромосомного происхождения. Предполагается, что только в этот, строго определенный, момент времени фрагменты экзогенной ДНК

способны масштабно интегрироваться в геном соматической клетки, находящейся в культуре или принадлежащей организму. Двуцепочечные концы появляются при разрыве нити ДНК, вызванном у-радиацией или свободными радикалами, при перестройке генов иммуноглобулинов и Т-клеточных рецепторов $(TcR)^*$, при дифференцировке стволовых клеток крови (СКК), в результате аберрантной активности топоизомераз, при обработке кросслинкирующими цитостатиками или в связи с нарушениями, приводящими к остановке репликативной вилки. В ответ на такие изменения в геноме система трансдуцирующих иерархических киназ индуцирует арест клеточного цикла, что приводит к активации репаративных систем клетки. В определенных случаях завершающей стадией такой активации является гомологичная рекомбинация с использованием в качестве донорной последовательности гомологичных участков сестринской хроматиды или гомологичной хромосомы. В этот момент времени экзогенная ДНК может быть интегрирована в реципиентный геном. Интеграция, по-видимому, осуществляется любым из известных рекомбинационных механизмов, таких, как синтез-зависимое спаривание цепей, рекомбинацией по типу генной конверсии, кроссинговером или по механизму негомологичного объединения концов. В случае попадания фрагментов экзогенной ДНК в количестве, превышающем $\sim 30 \ (60 \ \text{двуцепочечных концов})$ на клетку, в здоровую клетку, где не активирована «рекомбиногенная ситуация», двуцепочечные концы фрагментов экзогенной ДНК индуцируют арест клеточного цикла, что, по-видимому, приводит к утилизации ДНК без интеграции фрагментов в геном хозяина. Предполагается, что в неотрансформированных клетках «рекомбиногенная ситуация» присутствует постоянно.

В рамках и понятиях, описываемых предлагаемой концепцией, выделены и разграничены по механизмам несколько феноменов плейотропного действия фрагментированной экзогенной ДНК. Показано лейко- и эритростимулирующее действие; радиопротекторное действие; спасение СКК и в конечном счете — мышей от смертельных доз γ-радиации. Продемонстрирована возможность реверсии ракового фенотипа к нераковому вследствие восстановления гена каспазы 3 клеток МСГ-7 аденокарциномы молочной железы человека. Установлено, что сочетание воздействия цитостатика ЦФ и фрагментов экзогенной ДНК позволяет провести масштабную интеграцию экзогенных фрагментов ДНК человека в реципиентный геном взрослой мыши.

Краткая история вопроса

В многочисленных работах середины ХХ столетия были опубликованы результаты, описывающие явления, связанные с воздействием чужеродной ДНК на реципиентный организм. Одной из самых главных особенностей всех описанных экспериментов, связанных с интеграцией чужеродной ДНК в геном и фенотипическим проявлением нового признака, оказалась их невоспроизводимость. Факты воздействия эДНК и связанные с ними многочисленные разнообразные эффекты были обобщены в ранних статьях (Ledoux, 1965; Bhargava, Shanmugam, 1971; Ledoux, Charles, 1972; Leon et al., 1977), B которых, к сожалению, не были установлены механизмы, объясняющие описанные феномены. Тем не менее основная идея была обозначена и заключалась в том, что эДНК может усваиваться чужеродным организмом как генетическая информация, которая при определенном стечении

обстоятельств проявляется в фенотипическом признаке. Седиментационным анализом в градиенте CsCl было достоверно установлено, что чужеродная ДНК (GC-богатая ДНК Escherichia coli) может интегрировать в реципиентный геном в форме фрагментов (Ledoux, Charles, 1972). В многочисленных экспериментах были показаны противораковый, радиопротекторный, лейкостимулирующий эффекты воздействия чужеродной ДНК (Ledoux, 1965; Bhargava, Shanmugam, 1971; Leon et al., 1977; Anker et al., 1980; Pulciani et al., 1982).

На рубеже XIX–XX веков было доказано, что в плазме крови человека и млекопитающих постоянно присутствует определенное физиологическое количество экстраклеточной ДНК, в норме составляющей 10–14 нг/мл (Giacona et al., 1998; Anker et al., 1999; Anker, 2000; Jahr et al., 2001; Тамкович и др., 2005). При этом размер и электрофоретические морфологические особенности этой ДНК свидетельствовали о том, что она является продуктом апоптотической деградации ядерного хроматина. Размер опреде-

 ^{*} Список используемых сокращений приведен в конце статьи.

ляемых фрагментов был кратен нуклеосомному периоду, охватывающему от 1 до 20 и более нуклеосомных мономеров. Материал ДНК, присутствующий в плазме крови, представлял собой либо апоптозные тельца разной степени процессинга, либо куски хроматина. В литературе появились новые данные, свидетельствуюшие о возможности горизонтального переноса генетического материала. Так, было показано, что за счет ДНК апоптозных телец онкоген, происходящий от погибших малигнизированных клеток, может горизонтально переноситься к живым при их совместном культивировании (Holmgren et al., 1999; Bergsmedh et al., 2001). Также было установлено, что экстрахромосомальная ДНК вносит вклад в репарацию разрывов ДНК хромосом и, таким образом, служит экстрахромосомальной матрицей в репаративном процессе (Willett-Brozick et al., 2001). Удивительным оказался тот факт, что раковая генетическая информация так же способна переноситься горизонтальным внеклеточным путем и закрепляться на генетическом уровне. В этой связи появился термин «генометастазирование», отражающий такую возможность (Garcia-Olmo et al., 1999, 2000).

В это же время были определены и охарактеризованы некоторые пути и факторы, определяющие интернализацию экстраклеточной ДНК. Согласно проведенным исследованиям было установлено, что существует несколько путей проникновения экстраклеточной ДНК во внутриклеточное пространство. Одним из них является поглощение клетками апоптозных телец, содержащих фрагментированную ДНК. Это фагоцитоз либо профессиональными фагоцитами, либо специализированными клетками тканей, локализованных в непосредственной близости от апоптозных телец (Savill et al., 1993; Lawen, 2003). Описан рецептор-опосредованный пиноцитоз экстраклеточного материала ДНК во внутренние компартменты эукариотической клетки. Были обнаружены два основных типа рецепторов, расположенных на цитоплазматической мембране, отвечающих за этот путь доставки молекул ДНК. Это факторы с молекулярной массой 33 (30) и 79 (80) кДа (Bennett et al., 1985; Loke et al., 1989; Zamecnik et al., 1994). Было показано, что существует множество других белков с различными молекулярными мас-

сами, участвующих в связывании и поглощении нуклеиновых кислот клеткой (Челобанов и др., 2006). В основном это различные мембранные белки, а также ядерные белки и белки плазмы крови. Кроме того, были обнаружены мембранные каналы, сформированные несколькими трансмембранными белками, через которые осуществляется непосредственный транспорт НК. Важно отметить, что ДНК, как указывается в ранних работах (Ledoux, 1965; Шестова и др., 1999), проникает внутрь клетки в течение очень короткого времени (от нескольких секунд до нескольких минут). Проведенные исследования подтверждают тот факт, что этот процесс не связан с деградацией ДНК и последующим ее ресинтезом внутри клетки.

Судьба эДНК, интернализованной в межхромосомном пространстве ядра, принципиально имеет два исхода: либо фрагменты деградируют до мономеров и используются клеткой для синтетических процессов, либо фрагменты интегрируют в геном хозяина. Известно, что эДНК экстрахромосомальной локализации может интегрироваться в геном двумя способами: гомологичной и незаконной рекомбинацией (Würtele *et al.*, 2003). Интеграция с использованием механизма ГР зависит от репаративных факторов и достаточной гомологии между эДНК и ДНК хромосомы (Takata et al., 1998; Smith, 2001; Würtele et al., 2003). Незаконная интеграция внедряет эДНК в негомологичные районы хромосом и встречается чаще, вероятно, из-за присутствия гораздо большего количества потенциально возможных сайтов для интеграции. Незаконная рекомбинация по своей сути напоминает репарацию по типу non homologous end joining (NHEJ), поскольку она не зависит от гомологии и использует объединение разорванных концов (Takata et al., 1998; Smith, 2001; Würtele et al., 2003; Lee et al., 2005).

В результате проведенного анализа метаболического пути хроматина ядра апоптотически погибшей клетки Л. Якубов высказал предположение о том, что экстраклеточная ДНК организма является общеорганизменным генетическим стандартом, отражающим его сиюмоментное состояние. Предполагалось, что ДНК плазмы крови является интегрирующим генетическим фактором организма, за счет которого организм постоянно как будто «ощупывает» изнутри свой

генетический аппарат. Посредством постоянно протекающей статистической ГР за счет концевых гомологий фрагментов с материалом хроматина геном клеток «настраивается, приводится в соответствие» относительно этого стандарта, которым и являются фрагменты эДНК (Якубов и др., 2002). Несмотря на изящность, у этой концепции имеется одно противоречие, не укладывающееся в современное экспериментально обоснованное представление о том, что любая здоровая клетка имеет мощный аппарат защиты от интеграции чужеродного генетического материала в свой геном. Это системы клетки, арестовывающие клеточный цикл при различных стрессовых ситуациях, в частности, при попадании внеклеточной ДНК внутрь реципиентной клетки до полного удаления такой ДНК из клеточных компартментов (Bergsmedh et al., 2001). Встал вопрос о том, как можно разрешить такое противоречие, при котором, с одной стороны, многочисленные факты свидетельствуют о возможности физиологической интеграции чужеродной ДНК в геном эукариотической клетки, тогда как с другой стороны, существуют многочисленные публикации, свидетельствующие о том, что такая интеграция блокируется механизмами контроля клеточного цикла, а даже если она и осуществляется при определенных экспериментальных процедурах, то частота таких событий крайне низка - одно событие на 106-109 трансфицированных клеток (стабильные трансформанты образуются с частотой 1 на 104 клеток, получивших ДНК). Хотя при микроинъекции линеаризованной плазмидной ДНК с селективным признаком непосредственно в ядро реципиентной клетки в количестве нескольких копий этот порядок величин повышается до 10³ клеток, получивших ДНК (Smith, Berg, 1984; Lin et al., 1985; Thomas et al., 1986).

1. Базовая концепция, характеризующая воздействие фрагментов эДНК на соматическую клетку

Единичная или массовая интеграция фрагмента(ов) эДНК в реципиентный геном соматической клетки возможна только тогда, когда в клетке активирована рекомбиногенная ситуация, вызванная появлением в простран-

стве ядра единичного или множественных разрывов нити ДНК хромосомы, сталлированием репликативной(ых) вилки(ок) или сбоем в системах, контролирующих клеточный цикл и целостность хромосом. Момент интеграции и выбор механизма интеграции зависят от происхождения повреждения, фазы контроля прогрессии клеточного цикла и связанной с ним фазы репаративного процесса, типа клетки или пребывания соматической клетки в патологическом состоянии.

Основой предлагаемой концепции является положение о том, что участие одного и того же активного начала (фрагментированная эДНК) в различных «по смыслу» и форме процессах, протекающих в клетке (организме), связано с имманентным свойством молекулы ДНК вступать в рекомбинацию с определенным участком хромосомы в том случае, если для этого имеются подходящие условия. Эти условия определены нами и обозначены как «общеклеточная рекомбиногенная ситуация». Описанное в наших работах (Yakubov et al., 2003, 2007; Хегай и др., 2004; Николин и др., 2006a, б; Rogachev et al., 2006; Likhacheva et al., 2007a, b; Yakubov et al., 2007) плейотропное действие молекул эДНК дает экспериментальное подтверждение такому положению.

Под рекомбиногенной ситуацией мы понимаем состояние биохимической машины клетки, позволяющее немедленно приступать к осуществлению или осуществлять акт рекомбинации любого характера. В этот момент времени становится возможной интеграция в хозяйский геном подходящего ДНК-субстрата, будь то гомологичный участок сестринской хроматиды или любая другая гомологичная или негомологичная последовательность экстрахромосомальной локализации.

Основным критерием возникновения «общеклеточной рекомбиногенной ситуации» является либо появление ДЦР, либо сбой в системах, контролирующих клеточный цикл и целостность хромосом.

ДЦР могут появиться вследствие случайных внутренних или внешних событий, не контролируемых физиологическими системами клетки. Такие ДЦР появляются в клетке при сталлировании репликативной вилки, которое может быть связано либо с нарушениями в ходе ре-

пликации при блокировании активности топоизомеразы I и II лекарственными препаратами, либо с возникновением межцепочечных сшивок при воздействии алкилирующих агентов, или же вследствие действия других химических агентов, приводящих к накоплению оцДНК и формированию ДЦР; при воздействии жестким у-облучением; при воздействии свободных радикалов, возникающих в результате метаболических процессов, протекающих в клетке.

Другой тип ДЦР является физиологической необходимостью клетки, связанной с изменением в ансамбле экспрессии генов. К этому типу относятся ДЦР, возникающие при перетасовке генов иммуноглобулинов и *TcR*-рецепторов, при реорганизации генома СК, вступающих на путь дифференцировки, при топологических изменениях хроматина, связанных с активностью топоизомеразы I и II.

Рекомбиногенная ситуация перманентно активирована в клетке при патологических состояниях, когда нарушены системы, определяющие целостность генома и контроля клеточного деления, которые описаны для неотрансформированных клеток. Выраженность рекомбиногенной ситуации в этих случаях может быть различна и зависит от типа патологии.

Мы выделили два основных типа «рекомбиногенной ситуации»:

- 1) общеклеточная рекомбиногенная ситуация в клетке, вызванная естественными причинами и определяемая либо типом клетки, либо ее патологическим состоянием (нарушением в механизмах контроля клеточного цикла);
- 2) общеклеточная рекомбиногенная ситуация в клетке, определяемая внешним воздействием.

Мы определили также (Rogachev et al., 2006), что фрагменты эДНК проникают в межхромосомное пространство ядра клетки и депонируются в нем в количестве от 0,05 до 2,0 % от гаплоидного генома в зависимости от типа клеток. При размере фрагментов 0,2–6,0 т.п.о. в межхромосомном пространстве может одновременно находиться 165–5,5 тысяч фрагментов, доставленных из окружающей культуральной среды.

В обоих типах рекомбиногенных ситуаций в клетке экстраклеточные фрагменты ДНК, локализованные в межхромосомном пространстве,

выступают в качестве субстрата для репаративного восстановления возникших двуцепочечных разрывов или для прямого гомологичного обмена с доступным участком хромосомы в клетках, дефектных по механизмам контроля клеточного цикла.

В первом типе общеклеточной рекомбиногенной ситуации фрагменты эДНК: а) становятся равноправными участниками событий перестройки хроматина в В- и Т-лимфоцитах во время реорганизации генов иммуноглобулинов и ТсR; б) участвуют в молекулярных событиях, связанных с терминальной дифференцировкой стволовых клеток; в) гомологично интегрируют в доступные участки генома в раковой клетке, где нарушены механизмы контроля пролиферации и идет практически бесконтрольная перетасовка хроматина.

Второй тип рекомбиногенной ситуации определяется воздействием на молекулу хромосомы таким образом, что формируется искусственно вызванный двуцепочечный разрыв, который приводит к активации систем клетки, приводящих к его репарации или в случае невозможности репарации - к апоптозу. Мы выделили три таких воздействия: а) индукция поперечных сшивок молекулы ДНК цитостатическим агентом, приводящая к остановке репликативной вилки и формированию одноцепочечного участка и двуцепочечного разрыва в непосредственной близости к возникшему повреждению; б) индукция двуцепочечных разрывов жестким ионизирующим излучением; в) индукция двуцепочечных разрывов при сталлировании репликативной вилки, вызванном формированием одноцепочечного разрыва, возникшего в результате блокирования активности топоизомеразы I или II.

В результате возникновения повреждения молекулы ДНК, появления аберрантных структур при репликации или нарушений в организации хроматина высших порядков происходит активация сигнальных и эффекторных факторов, арестующих клеточный цикл на время репарации возникших повреждений или изменений в клетке. В процессе ареста клеточного цикла активируются репаративные системы клетки, которые восстанавливают целостность структуры генома. Во время этого репаративного процесса эДНК экстрахромосомальной

локализации (эДНКэл) становится субстратом для активированных репаративных систем, которые могут его использовать и используют в качестве матрицы для репарации повреждений молекулы ДНК.

В дефектных по системам контроля клеточного цикла клетках рекомбинационная ферментативная машина перманентно активирована. ЭДНКэл может интегрировать в геном таких клеток в доступные участки хроматина. Акт интеграции может осуществляться или двойным реципрокным обменом концевых гомологий экзогенных фрагментов с соответствующими участками хромосом или вследствие инвазии одной из цепей экзогенного фрагмента между цепями дуплекса хромосомы с образованием D-петли и осуществлением генной конверсии.

2. Рекомбиногенная ситуация в соматической клетке. Основные характеристики

В клетке в динамическом равновесии находятся два процесса: интегрированная общеклеточная активность, поддерживающая обязательную целостность генома, и митотическая активность клетки, отражающаяся в прогрессии клеточного цикла. Раскоординация этих двух процессов приводит либо к гибели клетки в результате апоптоза или аберрантного митоза, либо к возникновению мутаций, приводящих к неотрансформации клетки, развитию злокачественных новообразований и в конечном итоге к гибели всего организма.

Для поддержания геномной стабильности клетка привлекает механизм, который гарантирует, что порядок и точность событий клеточного цикла, таких, как ДНК репликация и деление, сохранятся в неизменном виде (Hartwell, Weinert, 1989).

Суть механизма заключается в следующем. При повреждении ДНК или ингибировании репликации клетка отвечает на стресс активацией эволюционно консервативного трансдуцирующего сигнального пути, который задерживает прогрессию клеточного цикла и индуцирует репарацию поврежденной ДНК (Zhou, Elledge, 2000). Этот трансдуцирующий сигнальный путь включает: а) опознавание повреждения

нити ДНК или появления в ядре аберрантной структуры ДНК; б) активирование сигнальных киназ, индуцирующих каскад событий, ведущий к аресту клеточного цикла; в) арест клеточного цикла; г) репарацию повреждения нити ДНК (Zhou, Elledge, 2000; Syljuåsen *et al.*, 2005) (рис. 1).

Тем не менее первоначально возникает повреждение, которое имеет несколько вариантов происхождения и факт присутствия которого определяет возникновение общеклеточной рекомбиногенной ситуации.

- 1. ДЦР, вызванные факторами, физически разрывающими нить ДНК хромосомы, и возникающие в клетке вследствие случайных внутренних или внешних событий, неконтролируемых физиологическими системами клетки, являются индукторами общеклеточной рекомбиногенной ситуации в соматической клетке.
- 2. В определенных клетках организма, таких, как В- и Т-лимфоциты, СКК, в определенные фазы клеточного развития возникают одноцепочечные и следующие за ними двуцепочечные разрывы, являющиеся физиологической нормой, появление которых связано с изменением ансамбля экспрессирующихся генов.
- 3. Кроме того, к повреждениям, приводящим к индукции общеклеточной рекомбиногенной ситуации, относятся повреждения, связанные с аберрантной репликацией и, по-видимому, изменение структуры хроматина высших порядков, вызванное иными причинами.

Немедленно после возникновения повреждения любого характера клетка опознает повреждение, после чего активируется система передачи сигнала о повреждении, состоящая из нескольких трансдуцирующих киназ, при этом повреждение процессируется в направлении его репарации.

Сигнальные киназы в свою очередь активируют каскад молекулярных событий, определяющих арест клеточного цикла либо прямым фосфорилированием соответствующих мишеней (например, р53), либо посредством активирования второго эшелона эффекторных киназ (Chk1, Chk2), регулирующих как прогрессию клеточного цикла, так и репаративные клеточные пути.

Последний эшелон событий в передаче сигнала связан с активацией циклин-зависимых

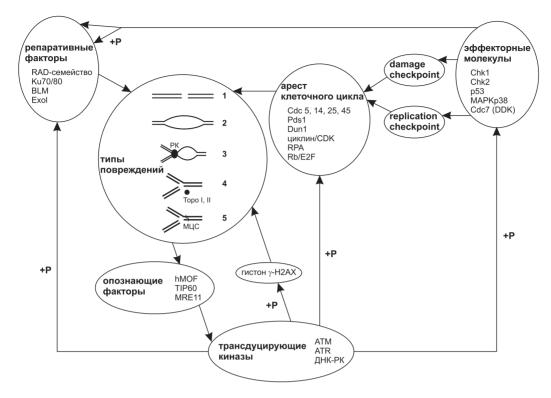


Рис. 1. Общая схема ответа клетки на стресс, вызванный: 1 — ДЦР; 2 — изменением структуры хроматина высших порядков; 3 — сталлированием репликативной вилки; 4 — ингибированием активности топоизомераз; 5 — генотоксическим воздействием химических реагентов. РК — репликативный комплекс, Торо I, II — топоизомераза I, II, +P — фосфорилирование.

киназ, регулирующих транскрипцию генов S-фазы, и факторов репликации, регулирующих формирование Ori репликации, старт репликации, элонгацию цепи и движение репликативной вилки.

ДЦР, аберрантная репликация и изменение структуры хроматина высших порядков относятся к таким повреждениям хроматина или изменениям структуры хромосом, которые в случае отсутствия механизмов их восстановления приводят к полной раскоординации двух сбалансированных процессов, определяющих жизнеспособность клетки.

Как уже было сказано, ответ клетки на повреждение складывается из нескольких переплетенных в пространстве и времени процессов. Системы клетки, генерирующие и распространяющие сигнал о повреждении, накладываются одна на другую в активации одних и тех же метаболических путей. Это гарантирует безусловность выполнения выбранного пути клеточного ответа, а именно: ареста клеточного цикла и активации систем репарации.

В клетке существует несколько общеклеточных факторов, определяющих появление повреждения (такого, как ДЦР или оцДНК) и сигнализирующих о нем. Активация иерархических киназ АТМ, АТР, ДНК-РК, относящихся к семейству фосфатидилинозитол-3-киназазависимых киназ (РІКК), индуцирует каскад событий, являющихся ответом клетки на ДЦР, сталлирование репликативной вилки и общее изменение структуры хроматина высшего порядка, т. е. на стрессы, связанные с грубыми нарушениями структуры хроматина, которые требуют обязательного внимания клетки и репарации. Три типа трансдуцирующих киназ взаимозаменяемы, но проявляют большую специфичность при различных типах повреждений. Так, АТМ, активированная в ответ на возникшее повреждение (ДЦР), активирует р53, Chk1, Chk2, которые, со своей стороны, независимо активируют комплекс циклин/циклинзависимая протеинкиназа (CDK), что приводит к аресту клеточного цикла, опосредованному разными эффекторными молекулами. Chk1 и Chk2

независимо контролируют старт Огі репликации и движение репликативной вилки. При сталлировании репликативной вилки формируются участки оцДНК, которые через RPA активируют ATR, которая в свою очередь фосфорилирует p53, Chk1, Chk2, MAPKp38. При этом в местах оцДНК, ассоциированной с репаративным комплексом и вызванной одноцепочечным разрывом (индуцированным, например, камптотецином) или репарацией МЦС (и остановкой репликативной вилки), образуется ДЦ конец молекулы ДНК, который сам по себе активирует АТМ и, следовательно, весь каскад событий, связанный с этим. Опять же при процессинге этого повреждения формируется RAD51 филамент, ассоциированный с RPA, который направляет в точку процессированного повреждения АТР, и снова цикл активации клеточного ответа замыкается.

Все указанные события активируют репаративные системы клетки, состоящие из эксцизионной репаративной системы и репаративной рекомбинационной машины.

Будучи активированным, сигнальный механизм вместе с молекулярной машиной, арестующей клеточный цикл, находятся в активированной форме до тех пор, пока повреждение не будет репарировано и система специфических фосфатаз не восстановит молекулярное спокойствие в клетке. Если в этот момент в ядре появляются фрагменты эДНК, то они могут стать субстратом в репаративных процессах, индуцируемых первоначальным повреждением. Именно в этот момент времени появляется возможность масштабной интеграции экзогенного генетического материала в реципиентный геном.

Отметим, что для разных типов повреждений или для разных типов клеток эти временные параметры в значительной степени различаются.

Известно, что экзогенные фрагменты, интернализованные в клеточное ядро недефектных соматических клеток, также в полной мере активируют трансдуцирующий сигнальный путь, сопровождающийся арестом клеточного цикла. Однако, если в клетке нет одного из указанных выше типов повреждения нити ДНК хромосомы, то эДНК, по-видимому, утилизируется клеткой без активации рекомбинационных процессов, что предотвращает попадание чужеродного генетического материала в геном хозяина (см. Сообщение 2).

Интернализация экзогенных фрагментов ДНК в клеточное ядро после активации трансдуцирующего сигнального пути и ареста клеточного цикла не может индуцировать уже запущенный каскад событий, так как эти события уже произошли и до окончания репаративного процесса повторно запущеными быть не могут. Мы полагаем, что именно это обстоятельство позволяет экзогенным фрагментам ускользнуть от атаки наблюдательной системы клетки и принять участие только в репаративном процессе в качестве субстрата для разных типов рекомбинации.

4. Общеклеточная рекомбиногенная ситуация может возникать и при нарушении систем контроля клеточного цикла и не быть связанной с повреждениями нити ДНК или аберрантной репликацией. Повышенной частотой рекомбинационных событий, не подконтрольных системам, определяющим прогрессию клеточного цикла, обладают раковые клетки, дефектные по различным контролирующим процесс ГР генам. В этих клетках с определенным постоянством происходит замещение фрагментами эДНК гомологичных локусов хромосом на доступных для такого обмена транскрипционно активных участках хроматина (см. Сообщение 3).

Пройдя путь от определения повреждения до ареста клеточного цикла, клетка запускает репаративные механизмы, восстанавливающие целостность генома и запускающие заново прогрессию клеточного цикла. Основным репаративным механизмом, восстанавливающим целостность нити ДНК, являются гомологичная рекомбинация или негомологичное объединение разорванных концов. В ходе репарации, по-видимому, клетка может использовать любой из описанных в литературе механизмов восстановления разорванной нити ДНК. Тем не менее обстоятельства выбора клеткой того или иного репаративного механизма остаются неизвестными. Кроме этого, в раковых клетках, по-видимому, на доступных участках активно транскрибируемого хроматина возможна прямая ГР протяженных фрагментов ДНК с гомологичными участками хромосомы. Интеграция может проходить или по типу генной конверсии, или за счет реципрокного обмена концевых гомологичных последовательностей фрагмента и последовательностей хромосомы.

3. Репаративная рекомбинация способствует интеграции фрагментов эДНК в реципиентный геном

Для объяснения обнаруженных и описанных далее феноменов воздействия фрагментированной эДНК на соматическую клетку при стрессе, вызванном нарушением целостности нити ДНК хромосомы, необходимо рассмотреть возможные типы репаративной рекомбинации, описанные для эукариотической клетки.

3.1. Репарация по механизму ГР. Интеграция фрагментов эДНК с использованием механизма ГР

В клетке, находящейся не в стадии G1, одним из путей репарации ДЦР является ГР, реализующаяся по механизму спаривания одноцепочечного участка, сопряженного с синтезом ДНК (SDSA) (рис. 2, а).

Репаративная ГР любого типа начинается с обнаружения концов разорванного дуплекса специфическим комплексом MRE11, который удерживает вместе оба конца разорванной молекулы и процессирует концы, делая их доступными для ассоциации с RPA и белками RAD семейства. Сформированные в результате действия MRE11 комплекса и Exo1 экзонуклеазы одноцепочечные хвосты на концах поврежденного дуплекса покрываются RPA, который удаляет вторичные структуры на этих участках. RAD52 направляет RAD51 к покрытым RPA одноцепочечным участкам, что приводит к замещению RPA на RAD51 и формированию RAD51 нуклеопротеиновых филаментов, которые стабилизируются другими членами RAD семейства. RAD54 осуществляет поиск гомологичных RAD51 филаментам последовательностей по всему геному, опосредует инвазию, спаривание цепей и формирование D петли. После этого происходит синтез ДНК на неповрежденной матрице. Гомология нуклеотидов, требующаяся для такого спаривания, не превышает 100 п.о. Привлеченная цепь с вновь синтезированным участком освобождается из интермедиата при помощи Sgs1/BLM геликаз и миграции цепи и спаривается с участком ДНК противоположного конца разорванного дуплекса за счет

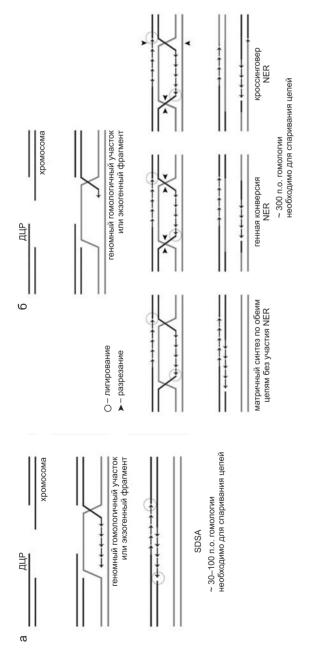
вновь синтезированного участка. После достройки цепи в месте одноцепочечного участка и лигирования репарация завершается, при этом донорская матрица остается интактной. Показано, что в клетке существует RAD51 независимый путь рекомбинации (Ira, Haber, 2002). Предполагается, что в этом процессе основными факторами, осуществляющими рекомбинацию, являются белки RAD-семейства RAD50/59, и такой процесс представляет собой репликацию, индуцированную разрывом и объединенную с одноцепочечным спариванием гомологий. Удивительным является тот факт, что для RAD51 зависимого пути для спаривания цепей требуется 100 п.о., тогда как при осуществлении RAD50/59 рекомбинации требуется гомологичная последовательность протяженностью не более 30 п.о.

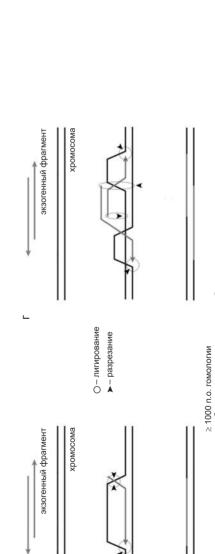
Существует другой вариант событий, когда происходят захват второго конца разорванного дуплекса и формирование на матрице структуры Холидея. Эта структура может разрешаться с обменом цепей и без таковой (Bärtsch *et al.*, 2000; Helleday, 2003; Symington, 2005) (рис. 2, б).

Для осуществления генной конверсии или формирования кроссоверного продукта по такому типу требуется гомологичное спаривание участка порядка 100–300 п.о. (Rubnitz, Subramani, 1984; Ayares *et al.*, 1986; Leung *et al.*, 1997; Symington, 2005). Предполагается, что в разрешении двойной структуры Холидея участвуют RecQ-геликаза BLM и топоизомераза 3 α .

Рекомбинационным событиям предшествует активация ДНК damage checkpoint системы, что приводит к замедлению репликации и аресту клеточного цикла перед делением клетки (G2), до того как повреждение будет репарировано. Система контроля клеточного цикла требует активации трансдуцирующих киназ АТМ и АТК и фосфорилирования их эффекторных мишеней Chk1, Chk2, RAD9, p53.

В результате активации систем checkpoint репаративные белки концентрируются на участке в несколько мегабаз по разные стороны от разрыва поврежденного дуплекса, где произошло фосфорилирование гистона γ -H2AX, и формируют фокусы репаративной рекомбинации (Lisby *et al.*, 2004). Можно полагать,





Δ

— 1000 п.с.: ромологии необходимо для спаривания цепей

Рис. 2. Возможные варианты ГР между фрагментами эДНК экстраклеточной локализации и ядерным хроматином при репарации ДЦР.

ванного 5'-конца разорванного дуплекса матрице новая цепь высвобождается из ность дуплекса восстанавливается (по: Bärtsch спаривается с гомологичной областью экзоханизме гомологичного обмена, составляет 30-100 п.о. После синтеза по экзогенной D-петли и находит свою гомологию на протикомплекса. После достраивания второй цепи а — гомологичное спаривание с последующим синтезом ДНК (SDSA). Филамент процессирогенного фрагмента. Минимальный участок, необходимый для спаривания при этом меживаются вместе при помощи MRE11/Nbs1 эдноцепочечные ники лигируются и целоствоположном конце разрыва. Предполагается, что концы разорванной молекулы ДНК удерet al., 2000).

6 — восстановление ДЦР консервативным механизмом, состоящим из гомологичного спаривания с последующим синтезом по обеим цепям, лигированием сформированных ников и вытеснением интермедиата миграцие ей D-петли. При участии NER возможны два варианта гомологичного обмена, включающие генную конверсию и кроссинговер. При реализации данного механизма гомологичного обмена ~ 300 п.о. общей гомологии необходимы для захвата и участия в репарации вгорого конца разорванного дуплекса (по: Bärtsch et al., 2000; Symington, 2005).

al., 2000; Symington, 2005).

в, г – генная конверсия (в) и двойной реципрокный обмен концевых гомологий (г) между экзогенным фрагментом экстраклеточной локализации и соответствующим участком хромосомы. Для осуществления интеграции по приведенному механизму необходимо не менее 1000 п.о. общей гомологии между участками гомологичного обмена (по: Leung et al., 1997; Li et al., 2001).

что при реализации этих механизмов эДНКэл может использоваться в качестве донорной матрицы (Rodrigue *et al.*, 2006; Kohzaki *et al.*, 2007).

Следующий вариант возможной ГР – это гомологичное спаривание участков концевой гомологии фрагментов (в оригинальных статьях – концов вектора перемешения или замешения) и интеграции обрамленной гомологичными краевыми сегментами внутренней части фрагмента в хромосому (может осуществляться по типу ends in или ends out), для осуществления которой не требуется присутствие ДЦР. При реализации интермедиата, происходящей по типу «концов, расположенных внутри» (ends in), происходит сайт-специфическая интеграция фрагмента в геном (перемещение). При втором типе гомологичного обмена «концов, расположенных наружу» (ends out), происходят спаривание концевых гомологий и интеграция внутренней части структуры фрагмента. При этом участок хромосомы, расположенный между найденными концевыми гомологиями, замещается без спаривания цепей внутренней части фрагмента и хромосомы за счет разрешения двух структур Холидея концевых гомологий эксцизионной клеточной системой. Для обоих отмеченных способов ГР (ends in и ends out), согласно отмеченным работам, требуется более 1000 п.о. концевых гомологий для безошибочного гомологичного замещения (Orr-Weaver et al., 1981; Kucherlapati et al., 1984; Deng, Capecchi, 1992; Thomas et al., 1992; Hastings et al., 1993; Li et al., 2001; Langston, Symington, 2004). Описан механизм интеграции экзогенного фрагмента ДНК в хромосому, осуществляемый при захвате и спаривании одной цепи экзогенного дуплекса. При этом происходит генная конверсия между эДНК и гомологичным участком хромосомы (Leung et al., 1997; Helleday, 2003; Rodrigue et al., 2006) (рис. 2, в, г). Такой тип рекомбинации также требует достаточно протяженной гомологии между спаривающимся участком хромосомы и экзогенным фрагментом, составляющей не менее 1000 п.о. Оба варианта гомологичного обмена могут использоваться раковой клеткой на доступных участках транскрибируемого хроматина при захвате и интернализации в ядерное пространство фрагментов эДНК.

3.2. Негомологичное объединение концов молекулы ДНК. Захват фрагментов ДНК

В литературе существуют факты, свидетельствующие о том, что в ходе негомологичного объединения разорванных концов в место разрыва могут интегрировать экстрахромосомальные фрагменты ДНК. Предполагается, что при захвате экзогенных фрагментов в места ДЦР в клетке используется тот же самый механизм, что и при объединении концов дуплекса по механизму NHEJ. Для этого механизма описан следующий ход событий. Ки70/80 гетеродимер связывает вместе концы разорванного дуплекса. При этом Ku80 расположен дальше от места разрыва, а Ки70 ближе к повреждению. Две молекулы ДНК-РК взаимодействуют с комплексом Ки, ассоциированным с ДЦР по разным сторонам от разрыва, и удерживают вместе концы повреждения. При этом активируется ее киназная активность. Фактор Artemis связывается с ДНК-РК на этой стадии репарации. На следующей стадии репарации происходит процессинг концов повреждения, необходимый для лигирования. В этом процессе задействованы факторы Artemis, полинуклеотидкиназа, WRN, MRN, hTDP1 и некоторые другие белки. Комплекс XRCC4 и ДНК лигаза IV связывается с ДНК-РК комплексом и лигирует процессированные концы разорванного дуплекса. Возможно, что автофосфорилирование ДНК-РК и фосфорилирование ее мишеней играют роль в освобождении дуплекса от аддуктов и объединении концов (Pâques, Haber, 1999; Johnson, Jasin, 2000; Lees-Miller, Meek, 2003; Kohzaki et al., 2007).

Как было показано, за этот путь интеграции экзогенной ДНК отвечает специфическая рекомбиназа Mentas. Для нее не имеет значения последовательность интегрируемого фрагмента. Меntas способствует интеграции эДНК за счет изменения структуры хроматина метилированием коровых гистонов на открытых участках транскрипционно активного хроматина (Lee et al., 2005). Можно полагать, что захват и интеграция экзогенных фрагментов ДНК в место ДЦР дуплекса ДНК хромосомы происходят при репарации ДЦР. И такая ситуация возможна в G1- и G2-фазах клеточного цикла (Pâques, Haber, 1999; Johnson, Jasin, 2000; Rodrigue et al., 2006; Kohzaki et al., 2007).

4. Основные феномены плейотропного действия эДНК

В подтверждение рассматриваемой в данной работе концепции мы приводим совокупность экспериментальных данных, свидетельствующих о том, что рекомбиногенная ситуация в клетке, возникающая в результате повреждения двойной нити ДНК, является основой возможности как единичной, так и масштабной интеграции фрагментов эДНК в геном клетки хозяина.

В соответствии с анализом событий, связанных с активацией систем контроля при ДНК повреждениях, можно предположить, что в определенных временных точках, когда клеточный цикл арестован и активированы системы репаративной рекомбинации, эДНКэл будет вступать в рекомбинационные процессы, интегрируя в геном хозяина. Кроме этого, можно предположить, что в клетках определенного типа, таких, как СКК, В- и Т-лимфоциты, где индуцируются физиологические разрывы, эДНКэл также будет субстратом для рекомбинационных событий. Последняя из рассматриваемых нами возможностей использования клеткой эДНКэл связана с дефектами в системах контроля прогрессии клеточного цикла, которую мы наблюдаем в некоторых неотрансформированных клетках. В этом случае при постоянно активированном механизме рекомбинации фрагменты ДНК могут интегрировать в доступные участки генома клетки хозяина без индуцирующего действия ДНК повреждения за счет двойного реципрокного обмена своих концевых гомологий или по механизму генной конверсии с инвазией донорной цепи.

Репаративная рекомбинация осуществляется различными механизмами, протекает в различных вариантах и индивидуально в зависимости от выбора клетки. Нами были проведены эксперименты, позволившие экспериментально показать возможность участия эДНКэл в рекомбинационных событиях на участках поврежденной ДНК или в связи с дефектами в системах контроля прогрессии клеточного цикла. Также нам удалось показать воздействие эДНК на клетки, в которых возникают физиологические разрывы хроматина, связанные с процессом их созревания.

Кроме этого, на основании данных опубликованных работ и результатов экспериментов, проведенных нами (Yakubov *et al.*, 2003, 2007; Хегай и др., 2004; Николин и др., 2006а, б; Rogachev *et al.*, 2006; Likhacheva *et al.*, 2007а, b), были оценены некоторые параметры, связанные с интернализацией эДНК в ядерное пространство соматической клетки.

4.1. Поведение эДНК и происходящие с ней изменения при интернализации в клеточных компартментах

Собраны вместе экспериментальные данные, характеризующие некоторые качественные и количественные параметры при интернализации в клетку и ядро экзогенных фрагментов ДНК:

- фрагментированная ДНК проникает в клетки культуры клеток человека и млекопитающих с использованием естественного механизма доставки (Holmgren *et al.*, 1999; Bergsmedh *et al.*, 2001; Rogachev *et al.*, 2006; Likhacheva *et al.*, 2007a, b).
- фрагментированная ДНК проникает в клетки культуры эмбриональных стволовых клеток человека (hSSMO) и млекопитающих (мыши) (Likhacheva *et al.*, 2007a, b).
- в низких концентрациях в кровяном русле млекопитающих (мыши) и в культуральной среде фрагменты ДНК размером 6000 п.о. быстро деградируют до фрагментов размером, кратным 1–2 нуклеосомным мономерам (150–300 п.о.) (Rogachev *et al.*, 2006; Likhacheva *et al.*, 2007a, b).
- высокая концентрация эДНК в культуральной среде клеток МСF-7 (100–200 мкг/мл) или в кровяном русле (1 мг на мышь каждые 2 часа в течение 12 часов) ингибирует действие нуклеаз, и часть экзогенных фрагментов поступает в клеточное пространство в недеградированном виде (Rogachev *et al.*, 2006; Likhacheva *et al.*, 2007a, b).
- при высокой концентрации эДНК при добавлении ее в культуральную среду клеток МСF-7 только в нулевой точке (1–2 минуты экспозиции) в ядерном пространстве выявляются нативные фрагменты исходного материала. Далее при анализе эДНК нативные фрагменты с исходным размером в ядерном

пространстве не обнаруживаются (Rogachev et al., 2006).

- в ядерном пространстве клеток культур клеток МСГ-7, hSSMO, фрагменты ДНК сшиваются, формируя конкатомеры размером до 10 т.п.о. (Perucho *et al.*, 1980; Lin *et al.*, 1985; Rogachev *et al.*, 2006).
- в ядерном пространстве дендритных клеток человека (CD14-/CD84+) фрагменты ДНК, по-видимому, не формируют конкатомерные структуры в течение 3 часов экспозиции с культурой клеток (Неопубл. данные).
- в межхромосомном пространстве ядер дендритных клеток (ДК) человека может скапливаться фрагментированная ДНК до 0,35 % от гаплоидного генома (Неопубл. данные).
- поступление ДНК в экстрахромосомальное пространство ядер ДК человека на контролируемом промежутке времени, равном 3 часам, имеет два ярко выраженных пика. Этот факт может отражать время оборота цитоплазматических рецепторов, отвечающих за связывание и интернализацию фрагментов эДНК (Неопубл. данные).
- в межхромосомном пространстве ядер клеток аденокарциномы человека МСГ-7 может скапливаться фрагментированная ДНК до 2 % от гаплоидного генома (Rogachev *et al.*, 2006).
- скорость обновления фрагментов в ядерном пространстве клеток аденокарциномы молочной железы человека МСГ-7 составляет ~1 % (от гаплоидного генома) в час на протяжении контролируемого отрезка времени (3 часа). Процесс поступления непрерывен, достигает насыщения при количестве интернализированной в ядерном пространстве ДНК около 2 % (от гаплоидного генома). То есть, если размер гаплоидного генома 3,3 × 10⁶ т.п.о., то 1 % от гаплоидного генома составляет $3,3 \times 10^4 = 33000$ т.п.о. При размере фрагментов 6,0 т.п.о. в межхромосомном пространстве клеток аденокарциномы молочной железы человека может одновременно находиться порядка 11 тыс. экзогенных фрагментов (2 %) (Rogachev et al., 2006).
- скорость замещения хромосомных последовательностей на последовательности эДНК при постоянном росте клеточной культуры МСГ-7 на доступных участках хроматина (10 %

- генома) (Албертс и др., 1994), составляет 1–2 % в сутки (Rogachev *et al.*, 2006; Yakubov *et al.*, 2007).
- в межхромосомном пространстве ядер эмбриональных стволовых клеток человека hSSMO может скапливаться фрагментированная эДНК до 0,05 % от гаплоидного генома, или 1700 т.п.о. То есть одновременно в межхромосомном пространстве указанного типа клеток может находиться 8000–800 фрагментов размером 200–2000 п.о. (Likhacheva *et al.*, 2007a, b).
- минимальное количество молекул, способных индуцировать checkpoint ответ, составляет порядка 30 молекул, содержащих структуры опДНК/дуплекс (Lin, Waldman, 2001; MacDougall *et al.*, 2007).
- арест клеточного цикла может продолжаться несколько дней без видимой гибели клеток (Montagnoli *et al.*, 2004).

4.2. Радиопротекторное действие фрагментов эДНК

Классические эксперименты по инъекции смертельно облученным мышам (утратившим собственные кроветворные клетки) взвеси клеток красного мозга или фракции, обогащенной СКК, показали, что в селезенке подопытных животных появляются колонии, каждая из которых является клоном одной стволовой клетки, доставленной в организм при инъекции (Гистология..., 2004). Мы предположили, что если стволовые клетки в принципе способны захватывать эДНК, то инъекция ее в организм смертельно облученным мышам и последующее использование в качестве субстрата для гомологичной рекомбинации в СКК, получивших многочисленные двуцепочечные разрывы, может спасти часть популяции СКК от апоптоза. Спасенные СКК сформируют селезеночные колонии и дадут начало дифференцированным потомкам. При этом восстановленная иммунная система позитивно повлияет на жизнеспособность экспериментальных животных.

В своих экспериментах мы показали, что при правильно выбранном времени доставки экзогенных фрагментов ДНК удается спасти до 80 % экспериментальных животных. Воздействие на СКК осуществляется таким образом, что происходит их спасение, которое наблюдается

по развитию колоний в селезенке, которые представляют собой потомков индивидуальных спасенных СКК.

Мы предполагаем, что радиопротекторное действие фрагментов эДНК основано на участии этих фрагментов в репарационном механизме в качестве субстрата для протекания генной конверсии, при которой двуцепочечные концы, возникшие при индукции двуцепочечных разрывов хроматина ионизирующим излучением, находят гомологичные участки на интернализованных в ядре фрагментах эДНК и восстанавливаются не простым лигированием любых доступных для физического контакта концов, а за счет либо гомологичного спаривания одноцепочечного участка, сопряженного с синтезом ДНК (SDSA), либо за счет гомологичного спаривания двух разорванных концов в одном экзогенном фрагменте (оба механизма описаны в соответствующем разделе). Процесс репарации двойных разрывов, вызванных ионизирующим излучением, протекает крайне быстро. 90 % разрывов репарируется в течение 15 минут от момента нанесения ионизирующего удара. Именно в этот момент существуют реальные условия для помощи клетке в стабилизации генома при помощи доставленных в ядерное пространство фрагментов эДНК. Оба варианта гомологичного обмена характерны для активно пролиферирующих клеток в S-, G2-, M-фазах клеточного цикла.

В покоящихся клетках на стадии G1 репарация происходит вследствие активности гетеродимерного комплекса Ku70/80 и ДНК-РК, осуществляющих сшивку двуцепочечных разрывов простым соединением непосредственно без учета гомологии. Механизм репарации таких разрывов активируется фактором немедленного реагирования иерархической киназой ATM и в последующем ATR и ДНК-РК. Можно полагать, что вариант интеграции экзогенных фрагментов в образовавшуюся брешь, вызванную ДЦР, также имеет место при нахождении эДНК в достаточном количестве в межхромосомном пространстве. Как было сказано выше, такую интеграцию осуществляет фактор Mentas.

Мы полагаем, что нахождение фрагментов эДНК в экстрахромосомальном пространстве дает преимущество для выживания клетки при радиоактивном облучении, а проведенные нами

эксперименты свидетельствуют об участии фрагментов эДНК в спасении СКК при воздействии летальных доз γ-радиации (Yakubov *et al.*, 2003; Likhacheva *et al.*, 2007b) (рис. 3).

Нахождение фрагментов эДНК в экстрахромосомальном пространстве позволяет: а) избежать хаотичного, неконтролируемого, хиазмического сшивания разорванных участков хроматина; б) восстановить функционально корректную последовательность хроматина; в) спасти клетки от аварийного апоптоза.







Рис. 3. Влияние фрагментированной эДНК на выживаемость мышей при воздействии смертельной дозы у-радиации (по: Likhacheva *et al.*, 2007b).

Инъекция смертельно облученным мышам экзогенной фрагментированной ДНК вызывает ярко выраженное радиопротекторное действие. До 90 % опытных животных остаются жизнеспособными на протяжении длительного времени после облучения. Показано, что высокая выживаемость экспериментальных животных после летальной дозы γ -облучения связана со спасением СКК, потомки которых формируют селезеночные колонии, участвующие в восстановлении поврежденной иммунной системы. Предполагается, что радиопротекторное действие обусловлено участием эДНК в качестве субстрата для ГР при репарации двуцепочечных разрывов, вызванных жестким γ -облучением.

а — после летальной дозы ү-облучения и одновременной терапии эДНК выжившие мыши полностью седели (2 мышки слева), теряли фертильность и сохраняли жизнеспособность на протяжении 1,5 лет после воздействия; б — селезенки мышей, подвергшихся сублетальной дозе ү-облучения, при терапии эДНК (1) и без нее (2). Стрелками обозначены селезеночные колонии, появившиеся в результате обработки облученных мышей экстраклеточной ДНК, выделенной из человеческих плацент.

4.3. Лейко- и эритростимулирующее действие фрагментов эДНК. Спасение СКК при воздействии жесткой химиотерапии цитостатиками, образующими межцепочечные сшивки

Эксперименты выполнены на мышах *in vivo* и на человеческих СКК в системе *ex vivo*. Механизм спасения СКК после воздействия кросслинкирующих цитостатиков описан в разделе 4.5. Кросслинкирующие алкилирующие агенты вызывают самые нежелательные для клетки повреждения — межцепочечные сшивки. В случае, если репаративной системе клетки не удается репарировать все такие повреждения, клетка с неизбежностью вступает на путь апоптотического самоуничтожения.

Два фактора воздействия фрагментов эДНК на клетку важны для организма в целом.

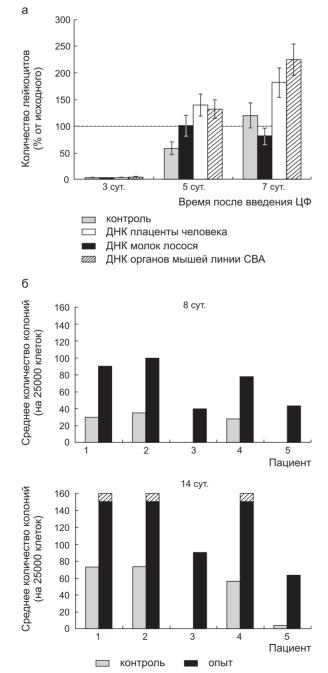
Во-первых, фрагменты экзогенной экстраклеточной ДНК действуют на все стадии созревания предшественников терминально диффренцированных клеток крови во всех зонах костного мозга, тимуса и периферических органов, где идет их созревание. Как известно, существует 3 зоны формирования клонов для Т-лимфоцитов и 4 зоны для В-лимфоцитов. В сумме все зоны созревания единомоментно содержат популяцию клеток в соответствующей фазе зрелости в количестве свыше 106. После воздействия цитостатика клетки либо гибнут, либо им требуется время для завершения репаративных процессов и продолжения созревания до выхода терминально дифференцированных клеток в кровь. Одновременное спасение такого количества клеток-предшественников в результате доставки в ядерное пространство эДНК позволяет быстро восстановить количество периферических форменных элементов крови. Мы полагаем, что именно этим фактом объясняется сильный и быстро развивающийся лейкостимулирующий эффект при воздействии кросслинкирующего цитостатика и терапии эДНК. В том случае, когда репарация МЦС проходила без участия эДНК, основная масса предшественников на всех стадиях созревания погибает. И восстановление количества форменных элементов крови начинается с выжившей СКК. При этом требуются время и силы организма для прохождения всех стадий

созревания всех групп предшественников форменных элементов крови.

Во-вторых, в результате попадания в СКК экзогенных фрагментов ДНК происходит активация систем checkpoint, контролирующих прогрессию клеточного цикла. А будучи активированной, эта система запускает механизм ареста клеточного шикла в покоящейся СКК, что определяет невозможность возврата к покоящемуся состоянию. По-видимому, будучи активированной в продвижении по циклу, клетка уже не в состоянии блокировать каскад событий, связанных с активацией, и покоящаяся до этого СКК начинает делиться. При этом, если фрагменты эДНК каждый раз попадают во внутренние компартменты СКК, то клетка будет без отдыха делиться до того времени, пока стрессовый фактор не будет удален из ее окружения.

На указанные выше процессы, по-видимому, накладывается феномен «вскрытия генома», описанный для СК и предшественников форменных элементов крови на стадии их созревания. Для терминальной дифференцировки стволовых клеток и предшественников на разной стадии зрелости требуются реорганизация хроматина и активация ансамбля генов, контролирующих настоящую стадию созревания (Farzaneh et al., 1982; Johnstone, Williams, 1982; Vatolin et al., 1997). При возникновении межцепочечных сшивок, в общем количестве превышающих возможности репаративной системы клетки или создающих стерические затруднения при репарации, клетка репарирует повреждения, но при этом формируются аберрантные структуры, возникающие в результате несостоятельности клетки корректно репарировать всю совокупность повреждений. И таким образом сохранившая свою жизнеспособность и пролиферативный потенциал СК приступает к реорганизации генома и делению. В результате возникают аберрантные структуры хромосом и смертельные для клетки хиазмы. Экспериментальные данные свидетельствуют о том, что нахождение в это время в межхромосомном пространстве экзогенных фрагментов ДНК позволяет СК восстановить жизнеспособную структуру хромосом и исправить дефекты некорректной репарации ДЦР, вызванных МЦС. Мы полагаем, что два объединенных и скоординированных во времени и пространстве процесса, а именно: репаративная рекомбинация, связанная с репарацией функциональных разрывов, и репликация при участии эДНКэл – являются факторами, позволяющими выжившей клетке восстановить функциональную целостность генома.

Во всех репаративных процессах, где рекомбинация между эДНКэл и участками хромосом происходит по механизму гомологичного обмена в разных ее вариантах, возможно исправление имеющихся мутаций нуклеотидов или иных ДНК дефектов (делеций, инверсий) (рис. 4).



Следовательно, если клетка была повреждена жестким у-облучением, или высокодозовой химиотерапией, или находится в состоянии функциональной рекомбиногенной ситуации вследствие индукции разрывов нити ДНК, и мутация, приведшая к изменению фенотипа клетки, находится в определенной близости к такому разрыву, который индуцирует ГР и репарируется с привлечением внешней гомологии, то использование фрагментов эДНК-субстрата в отличие от последовательностей сестринской

Рис. 4. Стимуляция лейко- и эритропоэза.

а – мышам-самцам линии СВА в течение 6 дней ежедневно внутрибрющинно вводили по 50 мкг ДНК различного происхождения, выделенной из молок лосося, плаценты человека и органов мышей линии СВА, в 0,2 мл физиологического раствора. Циклофосфан в дозе 200 мг/кг веса вводили однократно в брюшную полость на второй день после первой инъекции ДНК. Количество лейкоцитов в крови индивидуально подсчитывали у каждой мыши на 3-й, 5-й и 7-й день после введения ДНК. Кровь брали из кончика хвоста. Видно, что на 3-й день после инъекции циклофосфана количество лейкоцитов в крови составляло 5-6 % от исходного. На 5-й день в группе мышей, получавших один циклофосфан, количество лейкоцитов еще не достигало исходного уровня, тогда как у мышей, получавших ДНК, наблюдалось их восстановление до нормы. На 7-й день, когда в группах мышей, получавших ДНК человека и мыши, уровень лейкоцитов превышал исходный более, чем в 1,5-2 раза, в группе, получавшей ДНК лосося, их уровень не изменился по сравнению с предыдущим измерением. Таким образом, экзогенная гомологичная ДНК стимулирует восстановление количества лейкоцитов в крови мышей СВА после однократного введения ЦФ, угнетающего кроветворение.

б - мононуклеарные клетки (МНК) костного мозга человека в течение 1 часа инкубировали при 37 °C с эДНК человека в концентрации 100 мкг/мг. В контроле вместо ДНК в соответствующем количестве добавляли среду для культивирования клеток. На 8-е и 14-е сутки после инкубации проводили оценку числа эритроидных колоний, образовавшихся в культуре клеток. После преинкубации МНК с эДНК регистрируется значительное статистически достоверное увеличение числа генерируемых эритроидных колоний (p < 0.001). Наиболее демонстративное повышение числа эритроидных колоний после обработки эДНК человека наблюдается на ранних сроках: на 8-е сутки культивирования, когда число формирующихся эритроидных колоний в опыте превышает количество таковых в контроле в 3-4 и более раз. При использовании модели эритроидного колониеобразования действие препарата эДНК человека на поврежденные гемопоэтические предшественники в 40 % случаев носит не количественный, а качественный характер. Этот факт можно объяснить только тем, что нарушения целостности генома, вызванные химиотерапией, которые привели к нежизнеспособности клетки, были репарированы. При этом эДНК явилась тем активным началом, которое позволило предшественникам сохранить (восстановить) жизнеспособность. (Механизм, объясняющий спасение предшественников в результате воздействия фрагментов эДНК, описан в тексте).

хроматиды может способствовать исправлению имеющейся мутации.

Мы полагаем, что привлечение в качестве субстрата для репаративной рекомбинации эДНКэл будет иметь ряд преимуществ для репаративного процесса и для выживания клетки в целом, связанных с молекулярными особенностями предлагаемого субстрата:

- а) фрагменты не несут повреждений, связанных с применением внешнего воздействия;
- б) использование фрагментов эДНК, которые являются достаточно мобильными во внутриядерном пространстве, позволяет избежать стерических препятствий при нахождении гомологичных участков между фрагментами и хроматином. В результате этого может восстановиться достаточное количество поврежденных локусов, необходимое для спасения СК от гибели в результате несостоятельности клетки репарировать все поперечные сшивки при МЦС или все ДЦР при у-облучении. Как следствие восстанавливаются исходные способности стволовой клетки осуществлять цепь последовательных митозов и определять направление терминальной дифференцировки;
- г) в тот же самый момент доставленные в ядерное пространство фрагменты эДНК своими двуцепочечными концами активируют СК к постоянному делению, что влияет на скорость восстановления количества форменных элементов крови.

4.4. Замещение мутантных геномных последовательностей за счет естественного механизма гомологичной рекомбинации, осуществляемой по механизму двойного реципрокного обмена найденных концевых гомологий в клетках, дефектных по системам контроля прогрессии клеточного цикла (на примере мутации в гене каспазы 3 клеток МСГ-7)

Мутация в гене каспазы 3 клеток МСГ-7 приводит к выключению механизмов апоптоза и сбою пролиферативной стабильности клеток, что делает их раковыми. Используя в качестве терапевтического препарата фрагментированную ДНК, выделенную из плацент здоровых рожениц с нормальным геном каспазы 3, мы изменили генотип неотрансформированных

клеток МСГ-7 и восстановили нормально протекающий апоптоз. Для реверсивного исправления мутации был использован имманентный клеточный механизм доставки, интернализации в ядро и интеграции в хромосому фрагментов эДНК (рис. 5).

Количество вылечившихся клеток оценивается в целых процентах (3–5 %). Восстановление дефектного локуса произошло вследствие гомологичного обмена между экзогенным фрагментом ДНК и соответствующим хромосомным локусом за счет естественного механизма гомологичной рекомбинации, осуществляемой, по-видимому, по механизму двойного реципрокного обмена найденных концевых гомологий (рис. 2, г).

Мы полагаем, что такой механизм может работать только в клетках с постоянно активированной рекомбиногенной ситуацией и отсутствием checkpoint контроля. Кроме этого, результат анализа литературы и наши данные предполагают, что такое гомологичное замещение возможно только на доступных и, вероятно, транскрибирующихся участках эухроматина.

4.5. Возможность интеграции в реципиентный геном экзогенных фрагментов ДНК в ходе репарации межцепочечных сшивок, вызванных воздействием кросслинкирующих питостатиков

Действие определенных цитостатических препаратов, используемых при терапии различных типов раков, основано на их свойстве образовывать межцепочечные сшивки в произвольных местах генома. Известно, что одного такого повреждения на клетку при отсутствии системы репарации достаточно, чтобы клетка погибла, вступив на путь апоптотического самоуничтожения. Для клетки гибельным оказывается цитостатический удар, при котором образуется 122 кросслинка на клетку. При терапевтической дозе цитостатика в геноме клеток организма образуются до 2000 межцепочечных сшивок (Мадаña-Schwencke et al., 1982; Warren et al., 2001; Palom et al., 2002; Niedernhofer et al., 2004).

Репарация кросслинков – жизненно необходимый для клетки процесс. Ключевую роль в выживании клетки играют белки RAD семей-

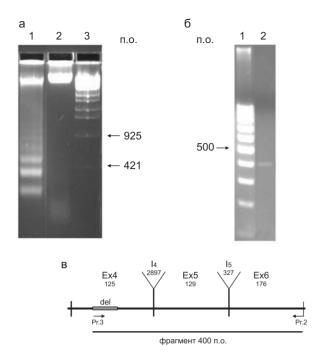


Рис. 5. Исправление дефекта в гене каспазы 3 человека и восстановление фенотипического признака (апоптоза), определяемого этим геном (по: Yakubov *et al.*, 2007).

Клетки аденокарциномы молочной железы человека МСF-7 несут делецию 47 п.н. в 4-м экзоне гена прокаспазы 3, что приводит к пропуску 4-го экзона при сплайсинге и сдвигу рамки считывания с появлением «преждевременного» стоп-

ства, описанные для дрожжей, и их гомологи у высших эукариот, активирующиеся посредством checkpoint-зависимого ответа клетки на повреждение. При индукции межцепочечных сшивок ответ клетки на стресс может формироваться двумя путями. В одном случае, когда повреждение обнаружено клеткой в ходе репликации, репликативная вилка сталлируется и активируется replication checkpoint ответ. В другом случае при возникновении повреждения в поздней S- или G1-, G2-фазах активируется ДНК damage checkpoint ответ, арестовывающий клеточный цикл и запускающий репаративный процесс. Оба активированных пути предотвращают транзицию клетки в митоз до репарации возникших повреждений (Enoch et al., 1992; Rhind, Russell, 1998; Caspari, Carr, 1999; Lambert et al., 2003). RAD семейство белков требуется для обоих типов checkpoint ответа. При ответе на остановку репликативной вилки RAD3 (ATR) фосфорилирует и активирует Cds1 (Chk2) (Lindsay et

кодона в мРНК. Поэтому в клетках МСF-7 практически полностью отсутствует ключевой фермент апоптотического каскада — каспаза 3. Фенотипически делеция в гене прокаспазы 3 проявляется в том, что при рецептор-опосредованном апоптозе наблюдается конденсация ядерного материала, но не происходит специфической нуклеосомной фрагментации ДНК. Делеция в гене каспазы 3 клеток МСF-7 была использована в качестве маркерного признака.

Было показано, что после культивирования клеток МСF-7 в среде, содержащей фрагментированную ДНК человека, происходит изменение фенотипа клеток и наблюдается появление олигонуклеосомной фрагментации ядерной ДНК при индукции апоптоза ФНОα. а — анализ индукции апоптоза ФНОα клеток МСF-7, инкубированных в присутствии фрагментированной ДНК плаценты человека (1) и без нее (2), (3) — маркер молекулярного веса BssT1I гидролизат ДНК фага λ.

Восстановление функциональной активности фермента связано с исправлением мутации в 4 экзоне гена каспазы 3 клеток МСF-7. Из культуры клеток МСF-7, инкубированной с человеческой ДНК 15 суток, была выделена суммарная РНК. Далее при использовании ОТ ПЦР был амплифицирован участок мРНК, содержащий экзоны 4, 5 и 6, с помощью праймеров 3 и 2 (Рг.3 — непосредственно на район делеции). В результате амплификации был получен искомый фрагмент размером 400 п.н.. Выявление этого фрагмента во фракции суммарной РНК означало, что суммарная РНК содержит мРНК гена каспазы 3 с репарированной делецией; б—(1) — маркер молекулярного веса 100 п.н., (2) — продукт ОТ ПЦР; в — схема части гена каспазы 3 с делецией 47 п.н., с указанием положения использованных праймеров.

Полученные в предлагаемом исследовании результаты свидетельствуют о том, что существует путь утилизации экстраклеточной фрагментированной ДНК, включающий естественные механизмы доставки фрагментов в ядро и их ГР с соответствующими локусами хромосом ядра.

al., 1998), тогда как в ходе ответа на повреждение другая иерархическая киназа damage checkpoint RAD9 (ATM) фосфорили-рует Chk1 (Walworth, Bernards, 1996; Rhind, Russell, 2000). Показано, что при отсутствии Cds1 (Chk2) блокирование репликативной вилки активирует Chk1.

Обязательным следствием репарации МЦС является индукция ДЦР. Механизм формирования ДЦР при репарации МЦС точно не определен. В работах (Wang et al., 2001; Barber et al., 2005) показано, что в покоящихся клетках (G1- и G2-фазы клеточного цикла) начальный этап репарации возникших межцепочечных сшивок идет за счет активности полимеразы (Rev3), которая способна проходить такое повреждение. На следующем этапе NER может вырезать нуклеотиды второй цепи, формируя при этом ДЦР (Jachymczyk et al., 1981; Miller et al., 1982). Отмечается, что такой же путь репарации характерен и для неделящихся клеток высших эукариот, который, однако, занимает

незначительный удельный вес в общей системе репарации межцепочечных сшивок. Использование клеткой этого пути репарации приводит к появлению нуклеотидных замен («мутаций») в последовательности ДНК в непосредственной близости от точки кросс-линка (сшивки), которые затем закрепляются в ходе репликативного цикла (McHugh *et al.*, 2000).

В активно пролиферирующих клетках, к которым относятся раковые клетки, стволовые клетки разного генеза, клетки волосяных фолликул, клетки различных эпителиев, при индукции поперечных сшивок в молекуле ДНК возникает смертельная для клетки ситуация. Репликативная вилка, которая формируется с частотой порядка одна на 50 т.п.о., наталкивается на стерическое препятствие, которое репликативный ферментативный комплекс не в состоянии преодолеть. Репликативная вилка останавливается. Именно остановка репликативной вилки запускает каскад репаративных событий. Первоначально в непосредственной близости к повреждению на уже реплицированной цепи ДНК возникает ДЦР (Bredberg et al., 1982; Magaña-Schwencke et al., 1982; Dardalhon, Averbeck, 1995; De Silva et al., 2000; McHugh et al., 2001; Niedernhofer et al., 2004). Сразу после этого события активируется эксцизионный репаративный комплекс. Специфические эндонуклеазы делают одноцепочечные надрезы в непосредственной близости от сшивки. Гетеродимер XPF/ERCC1 в присутствии репликативного белка А своей 3'-5' экзонуклеазной активностью гидролизует одну цепь ДНК, продвигаясь на большое расстояние от места сшивки (до 700 п.о.), проходя повреждение насквозь (Bessho et al., 1997; Mu et al., 2000). После завершения этих двух стадий репарации, а именно: индукции ДЦР и эксцизионных действий специфических эндонуклеаз, в месте кросс-линка формируется продолжительный одноцепочечный участок и одиночный ДЦ конец (De Silva et al., 2000; Niedernhofer et al., 2004; Barber et al., 2005), структура в высшей степени рекомбиногенная. Одноцепочечная брешь может репарироваться или в процессе матричного синтеза по гомологичной цепи, или с привлечением аппарата ГР. В последнем случае для репарации такого интермедиата клетка использует в качестве субстрата

для ГР последовательность, расположенную на сестринской хроматиде (Капо, Fujiwara, 1981; Bodell, 1990; Dronkert *et al.*, 2000; Niedernhofer *et al.*, 2004). Репарация свободного ДЦ конца, как предполагается, связана с репаративной рекомбинацией, при которой формируется крестовидный интермедиат «куриная лапка» (рис. 6). При этом происходит восстановление репликативной вилки, которое сопряжено со сменой лидирующей цепи.

При множественных межцепочечных сшивках, индуцируемых противораковыми препаратами, немедленно активируется репаративная система клетки. Однако, по-видимому, в этом случае клетка не в состоянии привлечь сестринские хроматиды в качестве субстрата для ГР для всех репарируемых участков кросс-линков. Это связано или с недостаточным количеством репаративных комплексов, или с возникновением стерических препятствий к одновременному синапсису нескольких поврежденных участков с несколькими гомологичными участками. Это препятствует полной репарации всех МЦС и с неизбежностью приводит к апоптозу и гибели клетки. Наиболее важное обстоятельство, демонстрирующее необходимость недефектного субстрата для репаративной рекомбинации, состоит в том, что при использовании в этом случае последовательности сестринской хроматиды генетическая мода клетки остается точно такой же, как и до появления сшивки. То есть, если цитостатический диадукт возник в области гена, мутация в котором привела к неотрансформации клетки, то репарация с использованием эндогенного клеточного субстрата не приведет к генетическому изменению мутировавшего гена. Это означает, что если в геноме были раковые мутации, то при такой репарации они сохраняются. То же относится и к проблеме огомозигочивания раковой клетки, при которой использование эндогенного субстрата для репаративной ГР не приводит к изменению гомозиготного статуса клетки.

Мы полагаем, что при использовании эДНК, несущей немутантные последовательности в качестве субстрата для репаративной ГР, происходящей при репарации межцепочечных сшивок, возможно исправление мутаций, находящихся в зоне активной репарации одноцепочечной бреши и ДЦ конца, являющихся

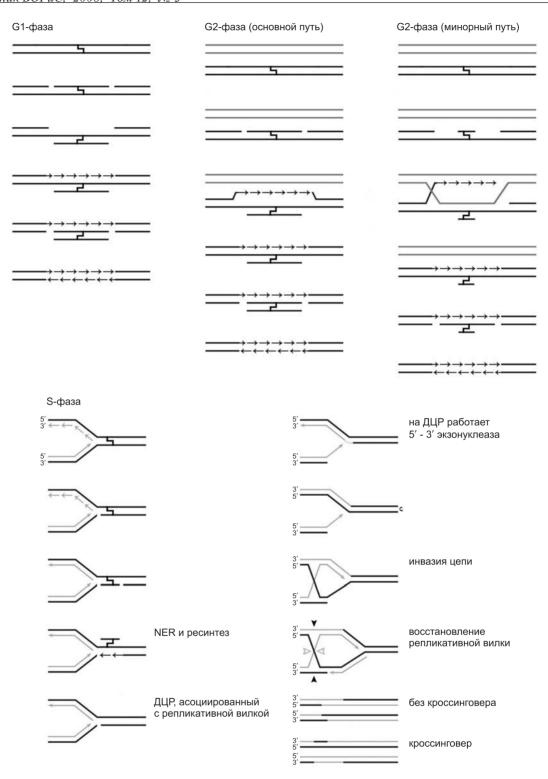


Рис. 6. Пути репарации МЦС в зависимости от фазы клеточного цикла и при участии фрагментов экзогенной ДНК (по: Helleday, 2003; Barber $et\ al.$, 2005).

G1-фаза репарации МЦС происходит с участим NER без гомологичного обмена. В G2-фазе репарация может проходить с использованием механизма синтеза через повреждения или с участием ГР. В S-фазе клеточного цикла репарация МЦС связана с восстановлением активности репликативной вилки. На завершающей стадии репаративного процесса для освобождения интермедиата, возникшего при репарации единственного ДЦ конца, происходит гомологичный обмен по механизму генной конверсии или в форме кроссинговера.

основными рекомбиногенными аберрантными структурами, формирующимися при репарации повреждения. Одновременно при такой репарации происходит замещение аллелей, что приводит к гетерозиготности клетки. По-видимому, аналогичным образом эДНК воздействует и на здоровые клетки организма, подвергшиеся воздействию цитостатика. В этом случае фрагменты экзогенной терапевтической ДНК, участвуя в репарационных событиях в здоровых клетках, спасают эти клетки от апоптоза, чем способствуют сохранению клеточных популяций различных тканей.

Возможность интеграции эДНК в реципиентный геном при репаративной рекомбинации

Рис. 7. Интеграция человеческой ДНК в геном взрослых мышей при совместном введении в организм мышей циклофосфана и фрагментов экзогенной ДНК человека (по: Likhacheva *et al.*, 2007a).

В организм экспериментальных мышей парентерально были введены препарат фрагментированной ДНК человека и алкилирующий цитостатик циклофосфамид, индуцирующий поперечные сшивки в молекуле ДНК. Был про-

в процессе репарации МЦС была изучена на модели мышь/человеческая фрагментированная ДНК. В результате проведенных экспериментов удалось масштабно интегрировать в геном экспериментальных мышей ДНК человека. В качестве мишени для анализа были выбраны *Alu* повторы человека, которые по своей структуре близки к *B1* повторам мыши, однако в определенной своей части не имеют с ними общей значимой гомологии. При использовании этих участков в качестве ПЦР анализируемой ДНК в геноме экспериментальных мышей были обнаружены последовательности человеческой ДНК. Интеграция в геном мыши, по-видимому, могла произойти двумя путями.

веден молекулярно-генетический анализ геномной ДНК экспериментальных животных на основе структуры Alu повторов человека и гомологичных B1-повторов мыши. В результате анализа было обнаружено, что фрагменты человеческой ДНК достигают ядерного пространства клеток трех изученных органов – печени, тимуса, селезенки — и интегрируют в геном мыши. Интеграция экзогенной ксеногенной ДНК приводит к изменению формулы крови и гибели животных. Предполагается, что механизм интеграции связан с репаративными событиями, индуцированными образованием ковалентных межцепочечных сшивок, и, как следствие, с образованием ДЦР при блокировании репликативной вилки.

а — саузерн-блот анализ геномной ДНК экспериментальных мышей № 1 и № 8 на присутствие в ней последовательностей человеческой ДНК. М — маркер молекулярного веса (HindIII гидролизат фага λ); 1–4 — BamHI + HindIII гидролизаты геномной ДНК: m № 1 и m № 8 — экспериментальных животных № 1 и № 8, СВА — реципиентной линии мышей, human — человека. Левый блок — электрофоретически фракционированная ДНК, гидролизованная BamHI + HindIII. Правый блок — геномный блот этого же геля после гибридизации с 32 Р меченым фрагментом Alu повтора человека. Стрелками для левого блока указаны маркерные фрагменты. Стрелками для правого блока указаны гибридизующиеся фрагменты геномов экспериментальных животных

б - ПЦР анализ геномной ДНК экспериментальных животных на присутствие в ней последовательностей человеческой ДНК. 1-6 - продукты ПЦР, в которой в качестве матрицы использовалась ДНК: т № 1 и т № 8 – экспериментальных мышей, СВА – реципиентной линии мышей, human – человека; М – маркер молекулярного веса (100 п.о. лестница). Левый блок – электрофоретически фракционированные ПЦР фрагменты, полученные с ДНК экспериментальных и контрольных животных. Правый блок – Саузерн-блот гибридизация этого же геля с ДНК ³²Р ПЦР меченого фрагмента Alu повтора человека. Цифры слева от блоков (280 и 310 п.о.) указывают на фрагменты, соответствующие двум мажорным ПЦР продуктам, выявляемым в геноме человека. Определение нуклеотидной последовательности показало, что гибридизующиеся фрагменты, полученные в результате ПЦР с ДНК экспериментальных мышей, идентичны соответствующим ПЦР-фрагментам с ДНК человека.

В первом случае интеграция произошла в области, содержащей гомологичные последовательности, относящиеся к классу умеренных повторов мыши *В1*. Было показано, что интеграция в геном мыши возможна только в тот момент, когда происходит репарация аберрантных структур ДНК активированным механизмом рекомбинации. Мы полагаем, что

экзогенные фрагменты ДНК становятся субстратом для ГР при попадании в зону действия рекомбинационной машины, осуществляющей эту репаративную ГР (рис. 7, 8).

Второй вариант возможных событий — это негомологичная интеграция в геном между двумя ДЦ концами, сформированными двумя встречными репликативными вилками, барь-

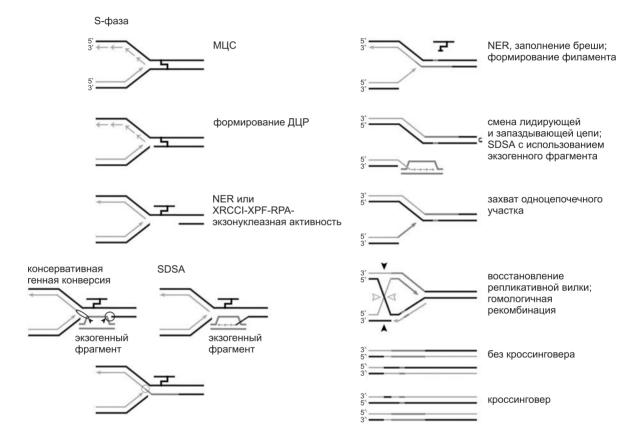


Рис. 8. Репарация МЦС в S-фазе клеточного цикла при участии фрагментов эДНК (гипотетические варианты гомологичного обмена и возможные интермедиаты, формирующиеся при интеграции экзогенного фрагмента ДНК в ДНК хромосомы в сайт репарации межцепочечной сшивки).

В S-фазе клеточного цикла репарация МЦС связана с восстановлением активности репликативной вилки. На завершающей стадии репаративного процесса для освобождения интермедиата, возникшего при репарации единственного ДЦ конца, происходит гомологичный обмен или по механизму генной конверсии, или в форме кроссинговера. Нами было показано, что интеграция эДНК человека в геном мыши при репарации МЦС осуществляется двумя не-

зависимыми событиями, разбитыми во времени. Первое событие происходит в промежуток времени между 18 и 24 часами от момента введения метаболизирующего цитостатика ЦФ, второе событие – между 24 и 48 часами. Обязательным условием интеграции является раздельное введение терапевтической эДНК в первый и последовательно во второй промежутки времени, когда она становится участником первого и второго событий, приводящих к интеграции. Исходя из имеющихся в литературе схем репарации МЦС в S-фазе, мы определили промежуточные продукты репарации, где гипотетически экзогенная гомологичная последовательность может интегрировать в реципиентный геном. Первое событие представляется как гомологичный обмен, происходящий или неконсервативным SDSA механизмом или консервативным реципрокным обменом между гомологичными участками экзогенного фрагмента и интермедиата, образованного в результате первого раунда NER. Второе событие может быть связано с неконсервативным удлинением филамента единственного ДЦ конца на экзогенной человеческой матрице и спариванием синтезированной цепи с гомологичным, уже находящимся в составе второй цепи ДНК хромосомы участком человеческой ДНК. После осуществления реципрокного обмена и завершения репарации эДНК сохраняется в составе реципиентного генома и существует как единое целое с ним.

ером для которых служил или один и тот же кросс-линк, или два близко расположенных кросс-линка. Понять, как в этом случае происходит полная репарация всего интермедиата, без дополнительных экспериментальных данных не

представляется возможным. Мы полагаем, что оба механизма имеют право на существование, и, по-видимому, концентрация в ядерном пространстве фрагментов эДНК определяет выбор клетки

Сообшение 2

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОБЩЕКЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА И ИНДУКЦИИ РЕКОМБИНОГЕННОЙ СИТУАЦИИ ПРИ ПОЯВЛЕНИИ В ЯДРЕ ДЦ КОНЦОВ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

С.С. Богачев¹, А.С. Лихачева¹, М.А. Шурдов²

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru; ² OOO «Панаген», Горно-Алтайск, Россия

Рассматриваются детали молекулярных событий, происходящих при появлении в клетке двуцепочечных разрывов хромосом или двуцепочечных концов иного происхождения, определяющих индукцию рекомбиногенной ситуации. Систематизируются различные типы воздействий, формирующих ДЦР. Дается детальная характеристика причинных и эффекторных факторов, регулирующих прогрессию клеточного цикла и активирующихся при появлении в ядерном пространстве ДЦ концов различного происхождения.

Введение

Двуцепочечные разрывы хромосомы(ом) или двуцепочечные концы молекулы ДНК, возникшие имманентно или появившиеся в ядерном пространстве вследствие интернализации экзогенных фрагментов ДНК, активируют каскад молекулярных событий, приводящих к тому, что «раздражители (ДК концы)» удаляются из ядерного пространства. В этом принимают участие системы ДНК репарации или происходит нуклеолитическая деградация, если рассматриваются фрагменты ДНК, находящиеся в ядерном пространстве здоровых клеток. Ответ клетки на «раздражитель» зависит от типа воздействия, в результате которого сформировался(ись) ДЦ конец(ы). Он складывается из опознавания возникшего или появившегося «раздражителя», активации сигнального пути, арестующего клеточный цикл до полного удаления «раздражителя» тем или иным выбранным клеткой путем, и восстановления продвижения по клеточному циклу. Рассматривается судьба фрагментов экзогенной ДНК, находящихся в ядерном пространстве как здоровой клетки, так и клетки при репарации повреждений хроматина.

1. Типы воздействий, формирующих ДЦР или изменяющих структуру хроматина, приводящие к активации сигнальных и репаративных путей клетки

I. ДЦР, возникающие при у-радиации или вследствие воздействия свободных радикалов.

Если такое повреждение случилось в G1фазе клеточного цикла, то репарация такого повреждения происходит по пути негомологичного объединения концов (NHEJ). В случае возникновения такого повреждения в S/G2/M фазах активно делящихся клеток репарация проходит по пути ГР с использованием системы репарации NER или с привлечением механизма NHEJ для клеток в фазах G2 и M.

- II. Повреждения, связанные с аберрантной репликацией.
- Остановка репликативной вилки и накопление оцДНК.

При остановке репликативной вилки, связанной с инактивацией факторов Огі репликации или элонгации в связи с ответом клетки на стресс, формируются множественные одноцепочечные участки, которые в своей совокупности могут изменять структуру хроматина высших порядков.

 – ДЦР, связанные с остановкой репликативной вилки при МЦС.

При столкновении репликативной вилки с межцепочечной сшивкой происходят ее остановка и активация NER системы, приводящие к формированию ДЦР и активации системы ГР.

 ДЦР, связанные с остановкой репликативной вилки в месте одноцепочечных разрывов, возникающих при ингибировании топоизомеразы I, II.

В этом случае репликативная вилка, натолкнувшись на одноцепочечный разрыв, вызванный ингибированием топоизомеразы, формирует один ДЦ конец молекулы ДНК. Такой тип повреждения возможен только в присутствии репликации. Указанное повреждение приводит к коллапсу (разрушению) репликативной вилки и запускает ГР по механизму сестринского хроматидного обмена. Отмечено, что одно рекомбинантное событие запускает следующее событие или последовательную цепь рекомбинационных событий в том же самом хромосомном локусе (Saleh-Gohari et al., 2005).

III. Изменение структуры хроматина высших порядков, вызванное иными причинами. (Понятие «изменение структуры хроматина высшего порядка» трудно поддается анализу в свете имеющихся экспериментальных данных. В этой связи мы будем считать, что одним из проявлений этого состояния является накопление множественных оцДНК при аберрантной репликации, и будем рассматривать только этот вариант событий, приводящий к активации трансдуцирующей сигнальной системы клетки.)

Имеются экспериментальные данные, демонстрирующие, что обработка клеток агентами, индуцирующими изменения хроматина (ингибитор гистоновых метилаз, гипотония, обработка хлороквином), приводит к активации трансдуцирующих сигнальных киназ. Возможно, что при таких обработках формируются участки оцДНК так же, как и при аберрантной репликации. Возможно, что как сформированные участки оцДНК могут приводить к изменению структуры хроматина высших порядков, так и наоборот изменение структуры хроматина высших порядков может индуцировать формирование оцДНК.

По-видимому, недавно обнаруженные в структуре хроматина эукариот постоянно присутствующие в геноме покоящихся и пролиферирующих клеток неоднородно распределенные одноцепочечные разрывы могут определять структуру хроматина высших порядков (Székvölgyi et al., 2007). Ники расположены в среднем 1 на 50 т.п.о. и могут являться индукторами рекомбиногенной ситуации в клетке, например в том случае, если активность формирующих их факторов (например топоизомеразы I, II) ингибирована лекарственными препаратами, и ник встречается на пути движения репликативной вилки.

2. ДЦР, являющиеся физиологической нормой и связанные с изменением ансамбля экспрессирующихся генов. Активация систем контроля прогрессии клеточного цикла при индукции физиологических ДЦР

В клетке может существовать рекомбиногенная ситуация, являющаяся физиологической нормой специализированной клетки. Можно выделить как минимум два типа клеток, где показано существование активной системы репаративной рекомбинации, связанной с появлением в клетке функциональных разрывов хроматина.

1. Перетасовка генов иммуноглобулинов и генов TcR.

При созревании Т-клеток потомки СКК лимфоидного ряда, предшественники Т-лимфоцитов, покидают костный мозг и локализуются в тимусе, где дифференцируются в незрелые CD4-/CD8- двойные негативные (DN) тимоциты. При созревании DN-клеток экспрессия обоих поверхностных маркеров активируется,

и клетки становятся CD8+/CD4+ двойными позитивными тимоцитами (DP). DN тимоциты могут созревать в 4 независимые популяции, которые представляют прогрессивные степени созревания и дифференцировки, основанные на экспрессии двух поверхностных маркеров CD25 и CD44. CD25-CD44+ (DN1) тимоциты представляют собой наиболее незрелые клетки. Далее, созревание тимоцитов проходит стадию CD25+/CD44- и на стадии созревания CD25+/CD44- (DN3) в клетках происходит реорганизация V, D, J-сегментов β -цепи TcR – V(D)J-рекомбинация, в результате чего формируется разнообразие функционального TcR (Rodewald, Fehling, 1998; Pedraza-Alva et al., 2006). Реорганизация V(D)J-сегментов – также необходимый шаг в созревании В-лимфоцитов при формировании функциональных генов иммуноглобулинов.

Процесс рекомбинации, определяющий этап реорганизации V, D, J-сегментов, осуществляется двумя рекомбиназами RAG1 и RAG2 и связан с формированием ДЦР между сегментами, кодирующими ген TcR и фланкирующими эти сегменты так называемыми сигнальными рекомбинационными последовательностями (Blunt et al., 1995; Bassing et al., 2002). Репарация ДЦР приводит к окончательной дифференцировке тимоцитов и экспрессии функциональных β-цепей ТсR, в результате чего образуются CD25-/CD44- DN4 тимоциты. Как и любые другие, индуцируемые внешними факторами или сталлированием репликативной вилки ДЦР, индуцированные V(D)J-рекомбинацией, активируют систему контроля прогрессии клеточного цикла, необходимую для завершения репаративного процесса и перехода клеток в митоз. Как оказалось, процесс мониторинга процесса рекомбинации осуществляет р38 МАР киназа. Фермент гиперактивен в DN3 тимоцитах, хотя в DN4 тимоцитах его активность практически отсутствует. Такая высокая активность МАРКр38 ведет к аресту клеточного цикла на стадии DN3 созревания тимоцитов. Как оказалось, активация МАРКр38 ведет к фосфорилированию и накоплению белка р53 и аресту клеточного цикла на стадии G2/M в результате блокирования Rb/E2F комплекса. Инактивация киназы и выход из checkpoint необходимы для дальнейшей дифференцировки тимоцитов (Pedraza-Alva et al., 2006). p38 MAP киназа может определять контроль клеточного цикла другим, p53-независимым путем. Ее активность арестует клеточный цикл в стадии G2/M, как было показано в *in vitro* экспериментах инактивацией Cdc25 фосфатазы, приводящей к накоплению инактивированного Cdc2 и аресту клеточного цикла.

Рекомбинационный процесс, завершающий реорганизацию генов иммуноглобулинов и TcR, осуществляется при помощи NHEJ процесса, при котором экстрахромосомальные фрагменты *V*, *D*, *J*-сегментов β-цепи TcR интродуцируют в определенные хромосомные районы по механизму незаконной рекомбинации. Основные участники незаконной рекомбинации – это комплекс Ku70/80, ДНК-PK, XRCC4, ДНК лигаза IV, фактор Artemis (Bulavin *et al.*, 2001; Lees-Miller, Meek, 2003; Pedraza-Alva *et al.*, 2006).

В работе (Weinstock, Jasin, 2006) приводятся факты, свидетельствующие о том, что при RAGгенерированных ДЦР в ЭСК мышиных эмбрионов репарация таких ДЦР может проходить двумя путями. Основной путь осуществляется по механизму незаконной рекомбинации с использованием NHEJ-молекулярной машины. При дефектах в этой системе репарации интеграция V, D, J-сегментов β -цепи TcR идет по пути HDR (homology directed repair). Этот факт необходимо принимать во внимание, рассматривая механизмы интеграции эДН-Кэл в геном клеток, находящихся на стадии индуцированной RAG1 и RAG2 репарации ДЦР, вызвавшей рекомбиногенную ситуацию в клетке. О том, что в момент реорганизации генов иммуноглобулинов или TcR возможна интеграция фрагмента ДНК, оказавшегося в свободном пространстве ядра, свидетельствуют факты, полученные в работе (Reddy et al., 2006). Так, показано, что в результате активности RAG рекомбиназы независимый транспозабельный элемент интегрировал в геном клетки-хозяина. Этот факт свидетельствует о принципиальной возможности репарационной системы, участвующей в созревании генов иммуноголобулинов и TcR, осуществлять интеграцию фрагментов эДНК в геном.

2. Реорганизация генома СК, вступающих на путь дифференцировки.

Существует небольшое количество работ, свидетельствующих о том, что при дифферен-

цировке некоторых типов стволовых клеток и незрелых предшественников форменных элементов крови происходит появление физиологических функциональных одно- или двуцепочечных разрывов, возникновение которых, по-видимому, связано с реорганизацией хроматина и включением нового ансамбля генов, требующихся для дальнейшего созревания клетки.

В работах (Farzaneh et al., 1982; Johnstone, Williams, 1982) была показана связь рибозилтрансферазной активности, обнаруживаемой в дифференцирующейся клетке-предшественнице, с появлением функциональных разрывов в хроматине. Авторы первой работы (Farzaneh et al., 1982) показали обязательное участие ADP рибозилтрансферазы (ADPRT) в дифференцировке мышечных клеток. Одновременно они показали появление в ходе цитодифференцировки одноцепочечных разрывов в ядерном хроматине. Было оценено время и количество разрывов на ядро. Через 20, 30 часов инкубации, после индукции дифференцировки ADPRT, можно было детектировать только единичные разрывы. В точке 42 часа выявлялось 50-100 разрывов, а в точке 56 часов – 100–300 разрывов на геном.

Интродуцированные γ-облучением (300 рад) дополнительные 600 разрывов (что в два раза больше, чем физиологических разрывов) через 92 часа после индукции репарируются такое же время, как и аналогичные, внесенные в культуру через 24 часа после индукции. Однако уменьшение репарируемого количества разрывов прекращается, когда их остается около 300, т. е. столько, сколько определяется физиологических разрывов на это время индукции. Этот факт свидетельствует о том, что в репарации разрывов, индуцированных γ-лучами и функциональных, индуцированных дифференцировкой миобластов, задействованы различные репаративные механизмы.

В другой работе (Johnstone, Williams, 1982) был проведен аналогичный анализ на культуре периферических лимфоцитов крови. Было установлено, что ADPRT активность является наиболее ранней детектируемой активностью при митоген-индуцированной активации человеческих периферических лимфоцитов крови. Ее появление совпадает с быстрым (1–8 часов) восстановлением одноцепочечных разрывов,

присутствующих в незрелых лимфоцитах. Незрелые лимфоциты могут быть стимулированы к дифференцировке различными активаторами. или «митогенами», которые мимикрируют эффект присутствия специфического антигена на индивидуальной клетке. При дифференцировке меняется морфология, инициируется пролиферация и активируются многие эффекторные функции. В экспериментах по седиментационному анализу показано, что при активации дифференцировки происходит быстрое лигирование одноцепочечных разрывов, что приводит к индукции экспрессии новых генов, ответственных за программированную активацию лимфоцитов. Существование ДНК разрывов в незрелых лимфоцитах - неожиданное, интригующее и многообещающее свойство в рамках предлагаемой концепции. В этой работе также установлено, что энзиматический контроль восстановления разрывов ДНК является одним из ранних событий дифференцировки. Изменения в профиле седиментации начинаются через 1 час после добавления индуктора в культуру и достигают пика к 8 часам дифференцировки. То есть через 8 часов индукции периферических лимфоцитов все разрывы ДНК восстановлены, и клетка, по-видимому, претерпела коммитирование.

В цитируемых работах отмечается, что ADPRT участвует в активации ядерных лигаз, которые и ответственны за восстановление разорванных концов хроматина. Однако существуют работы, свидетельствующие о том, что в процессе возникновения и восстановления разрывов может принимать участие другой фермент клеточного метаболизма – ДНК топоизомераза II. Предполагается, что ассоциированная с ядерным матриксом ADPRT участвует в регуляции активности топоизомеразы II (Darby et al., 1985; Заалишвили и др., 2005; Уманская и др., 2005).

Наличие разрывов также изучалось на ЭСК. Было показано, что индукция дифференцировки ЭСК ретиноевой кислотой приводит к драматическому увеличению разрывов ДНК в течение первых трех митозов с последующим восстановлением базового уровня (среднее время клеточного цикла для используемых в экспериментах культуры клеток ОТF9-63 составляет 12–14 часов и для культуры НМ-1 – 24–26

часов) и сохранением его на протяжении 10 и более делений без видимых дефектов в клеточной культуре. Важно отметить, что со временем появления функциональных разрывов в геноме совпадает время появления максимального количества сестринских хроматидных обменов, что является свидетельством активации рекомбиногенной ситуации в клетке вследствие появления функциональных разрывов ДНК, связанных с программной реорганизацией генов при дифференцировке (Vatolin et al., 1997).

3. Опознание повреждения (ДЦР, опДНК), активация систем трансдуцирующих киназ и процессинг концов поврежденной молекулы ДНК

В клетке существует несколько общеклеточных факторов, определяющих появление повреждения (такого, как ДЦР или оцДНК) и сигнализирующих о нем.

Активация иерархических киназ ATM, ATR, ДНК-РК, относящихся к семейству фосфатидилинозитол-3-киназа зависимых киназ (РІКК), индуцирует каскад событий, являющихся ответом клетки на ДЦР, сталлирование репликативной вилки и общее изменение структуры хроматина высшего порядка, т. е. на стрессы, связанные с грубыми нарушениями структуры хроматина, которые требуют обязательного внимания клетки и репарации. Три типа трансдуцирующих киназ взаимозаменяемы, но проявляют большую специфичность при различных типах повреждений.

Главным событием, манифестирующим появление ДЦР и свидетельствующим об активации репаративной системы клетки, является фосфорилирование АТМ протеинкиназой серина 139 С-конца гистона Н2АХ (у-Н2АХ) на участке в несколько мегабаз по разные стороны от ДЦР. Далее в результате каскада фосфорилирования последовательной цепи субстратов этой киназой происходит активация комплекса метаболических путей, контролирующих клеточный цикл. В результате активации этих путей происходит арест клеточного цикла в контрольных точках G1-S, S intra, G2-M. В течение времени ареста повреждение репарируется или клетка входит в апоптоз. Если причиной остановки клеточного цикла явились ДЦР, то они репарируются с использованием

механизма либо гомологичной рекомбинации, либо негомологичной сшивки ДЦ.

К наиболее важным событиям при возникновении ДЦР относится автофосфорилирование, активация АТМ киназы, которое происходит в течение нескольких минут после появления ДЦР (Peterson, Cote, 2004; Scott, Pandita, 2006). АТМ активируется путем автофосфорилирования в большом количестве стрессовых для клетки ситуаций. К таковым относятся различные повреждения ДНК и глобальная реорганизация хроматина, вызванные как физиологическими причинами, так и внешним воздействием. Активации АТМ предшествует ряд сенсорных событий, определяющих факт появления ДЦР. Определены несколько факторов, как предполагается, являющихся сенсорными молекулами возникшего ДЦР.

МRE11S комплекс (Nbs1 для млекопитающих) (Grenon et al., 2001) в форме тримера, сформированного MRE11S и Xrs2, объединенных через цинковый якорь с N- и C-концом RAD50, немедленно связывается и удерживает вместе два конца разрушенного дуплекса (Rattray et al., 2001). Нуклеазная активность MRE11S очищает возникшие концы разорванного дуплекса от аддуктов различного происхождения, появившихся в процессе формирования повреждения. 3'—5' экзонуклеазная активность фактора гидролизует одну цепь ДНК, формируя одноцепочечный участок, являющийся субстратом для RPA и RAD51, образующих филамент.

Активность фактора hMOF также предшествует активации ATM. Этот фактор является гистоновой ацетилтрансферазой, которая ацетилирует лизин 16 гистона H4 в месте возникшего ДЦР. Он физически взаимодействует с ATM, ацетилируя субъединицы фермента, что приводит к автофосфорилированию и активации ATM (Gupta et al., 2005).

Фактор ТІР60 также является гистоновой ацетилтрансферазой. Он ацетилирует коровые гистоны Н2А, Н3, Н4 в месте возникшего ДЦР. Показано, что ТІР60 формирует стабильный комплекс с АТМ и в ответ на повреждение активирует АТМ ее прямым ацетилированием (Yamamoto, Horikoshi, 1997; Kimura, Horikoshi, 1998; Ikura et al., 2000; Sun et al., 2005).

Указанные комплексы являются первыми сенсорами возникшего ДЦР. По-видимому,

под их воздействием (ацетилирование коровых гистонов в месте разрыва) происходит формирование структуры хроматина, которая опознается АТМ. Одновременно происходит ацетилирование АТМ, приводящее к разрушению неактивного димера фермента и автофосфорилированию АТМ.

Помимо такого пути в клетке может существовать параллельный независимый путь активации АТМ и всех следующих за этим событием процессов. Предполагается, что возникшие ДЦР или образовавшаяся оцДНК запускают изменения в архитектуре хроматина высших порядков, что приводит к глобальной общеклеточной активации всех молекул АТМ киназы (Bakkenist, Kastan, 2003; Peterson, Côté, 2004). Было обнаружено, что формирование даже нескольких ДЦР на одно ядро приводит к ацетилированию и автофосфорилированию практически всего набора клеточных АТМ. Маловероятно, что одно или несколько повреждений приводят к мгновенному опознаванию и активации тысяч клеточных молекул АТМ. Было высказано предположение, что ДЦР разрушает топологию организации хроматина высших порядков, и такие изменения в структуре хроматина сигналят АТМ, что приводит к ее активации. В подтверждение этой гипотезы было показано, что обработка клеток агентами, индуцирующими изменения хроматина, приводит к активации АТМ даже в отсутствие ДЦР. Эти факты говорят о возможном существовании в клетке интегрального механизма, который позволяет клетке выжить в ответ на повреждение и представляет собой молекулярную машину, осуществляющую мониторинг структуры хроматина высших порядков и активирующую первые сенсорные молекулы, определяющие ДЦР (Peterson, Côté, 2004).

Как уже было сказано, АТМ протеинкиназа при возникновении ДЦР автофосфорилируется, в чем ей помогают две ацетилтрансферазы, hMOF и TIP60, которые непосредственно взаимодействуют с киназой, активируя ее прямым ацетилированием. В результате этого события димерная неактивная форма фермента диссоциирует, и киназа активируется (Scott, Pandita, 2006). Немедленно, в интервале нескольких минут после активации, АТМ фосфорилирует С-концевой серин 139 гистона Н2АХ на участке

до 2 млн п.о. (Rogakou et al., 1999). Позднее происходит активация эффекторных молекул checkpoint. Для активации систем checkpoint необходимо взаимодействие АТМ с комплексом-застежкой (clamp) RAD17-9-1-1 (Cortez, 2005; Jiang, Sancar, 2006). Репарация ДЦР связана с концентрацией в месте разрыва репаративных факторов. Считается, что две группы факторов локализуются в месте повреждения. Первая группа не зависит от модификации гистона на огромных промежутках от точки разрыва и является сенсорной, формирующей сигнал о появлении ДЦР. К ней относятся Nbs, BRCA1, 563bp1, MRE11. Вторая группа факторов локально концентрируется в месте разрыва и формирует фокусы, различимые в световом микроскопе. К этой группе относятся многочисленные репаративные белки, являющиеся мишенью для трансдуцирующих киназ. Известно, что 90 аминокислот BRCT являются мишенью для ATM/ATR фосфорилирования, и что этот модуль широко представлен у ДНК репарирующих факторов. Предполагается, что взаимодействие у-Н2АХ фосфосерина через BRCT-домен может способствовать стабилизации связывания факторов репарации в участках, примыкающих к разрыву (Peterson, Côté, 2004). Отмечено, что в области формирования репаративных фокусов концентрируются факторы ремоделирования хроматина, один их них, Іпо80, концентрируется в области повреждения. Показано, что локализация Ino80 не затрагивает участок ДНК непосредственно в месте разрыва, где формируется RAD51 филамент. Локализация комплекса Ino80 зависит от фосфорилирования гистона γ-H2AX и свидетельствует о его необходимости для репаративного процесса (Symington, 2005).

Одновременно ATM фосфорилирует несколько клеточных субстратов, определяющих арест клеточного цикла и направление репарации ДЦР. Основными мишенями ATM являются: p53, ATR, c-Alb, Chk1, Chk2, RPA, BRCA1, BRCA2, NF-rB/IkB α , β -адаптин.

ATR протеинкиназа активируется при нарушениях, связанных с остановкой репликативной вилки и появлением одноцепочечных участков. Этот фермент в комплексе с ATR interaction protein (ATRIP) направляется к одноцепочечному участку, покрытому RPA белком,

и аккумулируется в этом районе (Cortez et al., 2001, 2004; Zou, Elledge, 2003). ATR киназа играет центральную роль в клеточном ответе на несколько типов повреждения ДНК, обнаруживаемых в S- и G2-фазах клеточного цикла, включая аберрантные интермедиаты репликации, формирующие оцДНК и ДЦР, связанные с действием эксцизионных комплексов или возникающие при сталлировании репликативной вилки. ATR активируется при формировании оцДНК в ответ на возникшее повреждение или блокирование репликации. оцДНК опознается и покрывается связывающим белком репликации A – RPA. Среди мишеней ATR можно выделить такие эффекторные белки, как p53 и Chk1. ATR напрямую фосфорилирует RecQ геликазу BLM, которая требуется для привлечения р53, который в свою очередь регулирует экспрессию RAD51 и, следовательно, ГР. Фосфорилирование гистона H2AX ATR приводит к разрушению комплекса оцДНК/RPA и диссоциации полимеразы и RPA, что необратимо изменяет организацию хроматина в сайте сталлированной репликативной вилки и приводит к ее коллапсу (Tibbetts et al., 1999; Guo et al., 2000; Liu et al., 2000; Ward, Chen, 2001; Cobb et al., 2005; Syljuåsen et al., 2005).

ДНК-РК в комплексе с Ки70/80 участвует в восстановлении двуцепочечных разрывов в непролиферирующих клетках. В делящихся клетках ДНК-РК участвует в передаче сигнала при сталлировании репликативной вилки и формировании одного ДЦ конца, вызванных, например, обработкой камптотецином. При обработке камптотецином активируются две трансдуцирующие киназы: АТR и ДНК-РК. ДНК-РК гиперфосфорилирует RPA2, который является членом гетеротримерного комплекса RPA.

Фосфорилирование RPA2 ДНК-РК зависит от ДЦ конца, сформированного при остановке репликативной вилки в месте, где камптотецин блокировал топоизомеразу I, и вследствие этого возник одноцепочечный разрыв (Sakasai et al., 2006). В норме RPA2 фосфорилируется комплексом циклин/CDK в двух сайтах, и такая форма связывается с Огі репликации. При гиперфосфорилировании происходит присоединение фосфата в 5 дополнительных сайтах RPA2, и эта форма не ассоциируется с Огі. После гиперфосфорилирования RPA2

формирует ATR-зависимые фокусы, связываясь с процессированными концами ДЦР (Vassin *et al.*, 2004).

4. Эффекторные факторы, определяющие прогрессию клеточного цикла

После активации и накопления в клетке большого количества молекул сигнальных киназ происходят фосфорилирование и активация пула эффекторных молекул, которые и определяют арест клеточного цикла и активацию репаративных систем клетки. К этим молекулам относятся эффекторные киназы Chk1, Chk2, МАРКр38 и общеклеточный транскрипционный фактор, онкосупрессор р53. Блокирование продвижения по клеточному циклу проходит разными метаболическими путями в зависимости от индуцирующего фактора и последующей активации клеточного ответа. Наиболее важным следствием активации checkpoint клеточного ответа в свете предлагаемой концепции являются индукция общеклеточной рекомбиногенной ситуации и активация нескольких систем клетки, определяющих ГР в различных ее вариантах и негомологичное объединение разорванных концов молекулы ДНК.

Белок р53. Клеточный цикл управляется комплексами циклинов и циклин-зависимых протеинкиназ (СДК), где циклин – регуляторная субъединица, а циклин-зависимая киназа – каталитическая. В фазе G1 работают комплексы циклин D / CDK4/6 и циклин E / CDK2, главным субстратом которых является белок Rb. В нефосфорилированном состоянии Rb связывает и выводит из оборота транскрипционный фактор E2F, необходимый для включения генов S-фазы. Когда CDK фосфорилирует Rb, E2F освобождается и клетка продвигается по циклу. В фазе G1 решается дальнейшая судьба клетки: если в ней есть повреждения ДНК, она арестовывается. Остановить или пропустить клетку в следующее деление решают несколько факторов: Chk1, Chk2 и белок p53. p53-метаболический путь ареста клеточного цикла связан с транскрипцией гена p21 Walf1/Cip1, который запускается активированным онкосупрессором и белковый продукт которого связывает и ингибирует комплексы циклин/CDK. В результате нефосфорилированный Rb удерживает E2F, и

цикл останавливается. Аналогичный контроль р53 осуществляет в фазах S и G2/M. Гены GADD45, PA26, 14-3-3- σ и ген циклина G также активируются белком р53 для ареста, но p21 превосходит их по силе.

Белок p53 работает как фактор транскрипции, способный включать или выключать разветвленную сеть генов-мишеней в ответ на генотоксический стресс или включать программу апоптоза.

Механизм активации р53 выглядит следующим образом. Работа р53 регулируется преимущественно на уровне белка. Хотя транскрипция гена идет постоянно во всех клетках тела, белок живет только 5-20 минут и не достигает в здоровой клетке высоких концентраций. Время жизни р53 контролируется по принципу отрицательной обратной связи геном *mdm2*. p53 включает mdm2, белковый продукт которого связывается с трансактивационным доменом р53, блокируя его функцию и способствуя разрушению. При стрессе, вызванном в том числе и возникшими ДЦР, участки p53 и mdm2, ответственные за олигомеризацию, фосфорилируются активированными трансдукционными протеинкиназами ATM и ATR. В результате комплекс p53/mdm2 разрушается, р53 ускользает от деградации и накапливается в клетках в количествах, необходимых для остановки клеточного цикла и включения программ апоптоза. При активации онкогенов стабилизация р53 наступает вследствие его взаимодействия с белком ARF, который защищает p53 от mdm2.

Помимо этого при стрессе работают гистоновые ацетилтрансферазы (р300/СРВ, рСАГ), которые также модифицируют С-конец р53. Ацетилирование гистонов облегчает переход хроматина гена-мишени в состояние, допускающее его контакт с аппаратом транскрипции, т. е. облегчает активацию р53-зависимых генов. Ацетилирование помогает р53 сосредоточиться в ядре клетки, подавляя его выход в цитоплазму. р53 распознает свои транскрипционные мишени по специфической последовательности нуклеотидов - респонсивному элементу, который влияет на активность промотора. Он состоит из двух фрагментов пентамерных инвертированных повторов, разделенных небольшим интервалом. Связь между повтором и р53 происходит через ДНК-связывающий домен белка. Этот домен в наибольшей степени подвержен мутациям, которые часто обнаруживаются в опухолях. Степень сродства респонсивных элементов разных генов к ДНК-связывающему домену р53 сильно варьирует, и это сказывается на эффективности включения.

Одновременно p53 участвует в регуляции синтеза белков репарации как транскрипционный фактор (Моргункова, 2005).

Сhk1 — эффекторная протеинкиназа, останавливающая прогрессию клеточного цикла воздействием на молекулы, физически регулирующие синтетические процессы в клетке. Фосфорилируется ATR/ATM в сайтах S317 и S345. Фосфорилирование эффекторной протеинкиназы ATR требует участия белка клапсина, который направляет Chk1 к месту повреждения, где уже находится трансдуцирующая киназа, привлеченная комплексом оцДНК/RPA. Арест клеточного цикла Chk1 может активироваться несколькими метаболическими путями и может быть классифицирован как damage checkpoint и replication checkpoint.

Остановка клеточного цикла в ответ на ДНК повреждение осуществляется путем ингибирования способности комплекса циклин/CDK к фосфорилированию Rb, что регулируется Chk1, которая гиперфосфорилирует CDK, разрушая активный комплекс циклин/CDK.

Сdc25 фосфатаза является прямой мишенью для фосфорилирования Chk1. Сdc25 регулирует прогрессию клеточного цикла активацией CDK, которая фосфорилирует Rb, что приводит к освобождению E2F и запуску клеточного цикла. Chk1 фосфорилирует Cdc25 фосфатазу, ингибируя этим ее активность. Отсутствие этого регулятора активности CDK останавливает клеточный цикл в фазах G1-S, S и G2-M (Furnari et al., 1997; Sanchez et al., 1997; Mailand et al., 2000, 2002; Zhao et al., 2002; Sørensen et al., 2003; Syljuåsen et al., 2005).

Существует другой путь активирования точки контроля при выходе из митоза, при котором Chk1 контролирует количество анафазного ингибитора Pds1. Этот фактор запускает сегрегацию хромосом за счет своей деградации, и требуется в большом количестве для ареста клеточного цикла в G2 в результате возникшего ДНК повреждения. Фосфорилирование Pds1 предотвращает его деградацию, приводит к

накоплению и остановке клеточного цикла, предотвращая выход делящейся клетки в анафазу митоза. Принципиальный регулятор клеточного цикла (Sanchez et al., 1999) Chk1 влияет на Огі репликации через Cdc25 фосфатазу. Как уже было сказано, Cdc25 регулирует прогрессию клеточного цикла через активирование CDK (циклин-зависимой киназы), которая, помимо активации Rb/E2F комплекса, принимает участие в активации гексамера МСМ2-7 (ДНК геликазы), который входит в пререпликативный комплекс и катализирует плавление цепей в процессе репликации.

Пререпликативный комплекс ORC, включающий Cdc6, Cdt1 и 6 MCM белков, связывается с ДНК в Ori до начала репликации. ATR, Cdc7 (DDK) и CDK2 протеинкиназы фосфорилируют эти факторы пререпликативного комплекса, что приводит к изменению их аллостерической конформации и присоединению Cdc45 в точку начала репликации (Cortez et al., 2004; Forsburg, 2004). Cdc45 присоединяет к Ori ДНК полимеразу и другие факторы репликации и поддерживает комплекс при элонгации (Zou, Stillman, 1998; Aparicio et al., 1999; Tercero et al., 2000; Walter, Newport, 2000; Masuda et al., 2003; Andreassen et al., 2006; Dohrmann, Sclafani, 2006).

Показано, что при возникновении ДЦР, вызванного γ-радиацией, активируются трансдуцирующая киназа АТМ, которая фосфорилирует Chk1 и Chk2 протеинкиназы, которые в свою очередь фосфорилируют Cdc25 фосфатазу в многочисленных сайтах, что приводит к Cdc25 деградации (Falck *et al.*, 2001, 2002; Andreassen *et al.*, 2006). В результате поддерживается ингибирующее фосфорилирование CDK2 киназы, что супрессирует связывание Cdc45 с Огі репликации, арестовывая клеточный цикл.

Репликативный checkpoint ответ возникает при появлении и накоплении в клетке оцДНК. Участки оцДНК являются промежуточными продуктами, которые, как предполагается, накапливаются при сталлировании репликативной вилки в большинстве ДНК репарационных процессов. Другая возможность возникновения оцДНК связана с остановкой репликативной вилки, при которой геликаза продолжает работать, что приводит к расхождению цепей, связыванию с RPA и активированию ATR, Chk1 и Chk2 (Byun et al., 2005).

При инактивации Огі репликации элонгация цепей прекращается, и накапливаются аберрантные структуры оцДНК. Существуют несколько метаболических путей, связанных с активностью трансдуцирующих киназ, приводящих к инактивации Ori репликации, накоплению оцДНК и аресту клеточного цикла. Так, АТМ фосфорилирует МСМЗ в ответ на ионизирующее облучение. ATR фосфорилирует MCM2 в ответ на многочисленные повреждения ДНК, включая сталлирование репликативной вилки. DDK (Cdc7) фосфорилирует MCM2, a CDK фосфорилирует MCM4. ATRIP взаимодействует с МСМ7. Для двух факторов, составляющих МСМ комплекс, а именно: МСМ7 и МСМ2, при их инактивации и связанном с этим блокировании активности комплекса показано отсутствие индукции checkpoint сигнала (MCM2 инактивировался при блокировании активности Cdc7, MCM7 удалялся из экстракта прямым истощением на подходящий субстрат). При этом возникает неконтролируемое поведение молекулярных систем S-фазы, связанных с репликацией, что приводит к неполноценной S-фазе и гибели клетки вследствие аберрантного митоза. Дефектные по Cdc7 или истощенные на MCM2 клетки не останавливаются в G1-S прогрессии, но прекращают полимеризацию ДНК в процессе транзиции S-фазы. По-видимому, вследствие дефектного по указанным факторам МСМ комплекса активируется незначительное число точек начала репликации и формируется незначительное количество репликативных вилок. Количество возникших при этом оцДНК не позволяет активировать пул ATR молекул, необходимый для индукции checkpoint ответа (Chahwan et al., 2003; Cortez et al., 2004; Montagnoli et al., 2004).

Существует другой вектор супрессии синтеза ДНК с привлечением ATM/ATR-зависимого фосфорилирования нескольких факторов, вовлеченных в поддержание стабильности генома. К ним относятся Nbs1, BRCA1, BRCA2, FANCD2, когезин, SMC1. Фосфорилирование Nbs1 и BRCA1 взаимосвязано и приводит к последовательному фосфорилированию SMC1. Механизм такой супрессии неизвестен, однако известно, что он не определяется ингибированием связывания Cdc45 с Огі репликации (Andreassen *et al.*, 2006). Фосфорилирование когезина и SMC1, вовлеченных в соединение сестринских хроматид, требуется для супрессии синтеза ДНК после у-радиации.

Когезия сестринских хроматид устанавливается так, что совпадает с репликацией и требуется для последующей репарации ДНК, осуществляемой за счет ГР. Иными словами, при репликации генерируется соединение сестринских хроматид когезином, что требуется для последующей ГР. Когезины могут перемещаться в сайт повреждения, и когезия сестринских хроматид является важным событием, необходимым для ГР (Andreassen *et al.*, 2006; Potts *et al.*, 2006).

Комплекс MRE11 действует в S-фазе в связи с активацией факторов точки контроля клеточного цикла, индуцируемой повреждением ДНК (Chahwan et al., 2003). Одна из ролей MRE11 комплекса, как уже было сказано выше, – это определение повреждения и удерживание вместе разделенных концов молекулы ДНК. Кроме того, комплекс вовлечен в процессинг ДНК концов, необходимый для формирования продуктивного рекомбинационного субстрата.

Вовлечение MRE11 комплекса в рекомбинацию в S-фазе при активации checkpoint, связанной с повреждением ДНК, предполагает связь механизма рекомбинации и damage checkpoint. Согласно общепринятой концепции, активация систем checkpoint apectyet репликацию до репарации повреждения ДНК. Тем не менее существует другая точка зрения, которая предполагает, что механизмы checkpoint активируют рекомбинацию в том случае, когда репликативная вилка встречается с повреждением. То есть Chk1 и Chk2 не арестуют клеточный цикл при аберрантной репликации, но активируют рекомбинацию. Предполагается, что рекомбинация, происходящая в момент репликации, позволяет репликативной вилке пройти повреждение. Игнорирующий ошибки синтез позволяет репликации ДНК происходить при существовании повреждения, при этом повреждения остаются незамеченными мониторингом Chk1 и Chk2 вследствие скоординированной с репликативным синтезом ГР, которая устраняет повреждение [способностью проходить ошибки и повреждения ДНК обладают трансошибочные полимеразы η (эта), ι (йота), к (каппа), Rev1, є (эпсилон)]. Синтез через повреждения и ГР

скоординированы во времени и пространстве и предотвращают коллапс репликативной вилки (Andreassen *et al.*, 2006). Предполагаемая модель говорит о том, что вместо ареста репликации и активации репарации как следующего за арестом процесса в точке контроля клеточного цикла активируется рекомбинация и задерживается репликация как следствие активированной рекомбинации. Такая модель объясняет, почему в точке контроля клеточного цикла репликация замедляется, а не останавливается совсем и почему степень замедления увеличивается с дозой повреждающего ДНК агента (Chahwan *et al.*, 2003).

При клеточном ответе на повреждение ДНК в S-фазе клеточного цикла требуются многие компоненты, необходимые для стабилизации репликативной вилки или для возобновления ее движения после сталлирования. Механизм стабилизации репликативной вилки связан с последовательной ассоциацией ДНК полимеразного комплекса с рождающейся цепью ДНК. Восстановление репликативной вилки требует ГР. Chk1, MEC1 (ATR) и RecQ семейство геликаз (ВLМ) – основные участники стабилизации и восстановления репликативной вилки. RecQ геликаза регулирует формирование структуры Холидея, *Mus*1-*Eme*1 эндонуклеазы реорганизуют этот интермедиат. В области сталлирования репликативной вилки формируется одноцепочечный участок, который связывается с RPA. Сформированный комплекс притягивает ATR и, по-видимому, регулирует активность RAD51 рекомбиназы – основного фактора ГР. Кроме того, известно, что ATR непосредственно фосфорилирует BLM. А BLM в свою очередь требуется для привлечения р53, который регулирует экспрессию RAD51 и, следовательно, динамику рекомбинационного процесса (Andreassen et al., 2006).

При продвижении в S-фазе в физиологических условиях в отсутствие каких-либо внешних воздействий, приводящих к экзогенному повреждению ДНК или воздействию на репликацию, Chk1 может восстанавливать сбитый ритм репликационного синтеза активированием регуляторных белков, таких, как, например, Cdc25. Так, было показано, что ATR и ATM контролируют старт репликации через свои мишени Chk1, Chk2, Cdc25 в отсутствие каких-

либо повреждений ДНК и внешнего влияния на репликацию (Marheineke, Hyrien, 2004; Shechter et al., 2004). Физиологическая регуляция Chk1 находится под контролем клапсина и RAD1/ RAD9/Hus1 комплекса, которые направляют фактор к участку оцДНК, покрытому RPA, что предполагает, что репликация сама по себе генерирует ошибки, которые сигналят checkpoint машине. Возможно, что Chk1 требуется для ограничения активности СDК или других факторов репликации, сверхактивность которых приводит к формированию аберрантных ДНК структур. Так, инактивация Chk1 в физиологически здоровых клетках истощением на гомологичный субстрат приводит к быстрой (в течение 1 часа) активации ATR и быстрому и сильному фосфорилированию ATR мишеней в S-фазе, что ассоциировано с усилением ДНК репликации, массовой индукцией оцДНК и формированием разрывов цепи. Следствием инактивации Chk1 является стабилизация Cdc25 фосфатазной активности и гиперактивация СDK, что приводит к повышенному присоединению к хроматину ключевого репликативного фактора Cdc45. Следствием этого являются появление большого числа несанкционированных активированных Ori репликации и формирование большого количества оцДНК. Такая аберрантная структура связывается с RPA, и такой комплекс привлекает ATR, молекулы которой в свою очередь активируют другие системы подавления избытка репликации. Вероятно, что Chk1 требуется в процессе нормальной S-фазы для исключения аберрантного увеличения инициации ДНК репликации, что предотвращает появление потенциально опасных ошибок (Syljuåsen et al., 2005).

Сhk2 (RAD53, Cds1) – вторая эффекторная киназа, регулирующая прогрессию клеточного цикла. Chk2 фосфорилируется комплексом МЕС1 (ATR) / RAD9 (ATM) в ответ на повреждение молекулы ДНК и при активации индуцирует арест клеточного цикла. Chk2 (RAD53) отслеживает стабильность репликативной вилки. Так, активированная в митозе Chk2 арестует цикл гиперфосфорилированием CDK1 киназы. CDK1 принимает участие в ДНК репликации, связываясь с факторами Огі через киназный домен. Активность эффекторной киназы важна для старта репликации и элонгации ДНК в та-

кой же степени, как и MCM2-7 и Cdc7 (DDK). Предполагается, что фермент контролирует начало репликации тем, что регулирует количество ненуклеосомных растворимых гистонов, деградируя их избыток, тем самым поддерживая функциональную структуру хроматина в Ori репликации (Dohrmann, Sclafani, 2006).

Сhk2 также арестовывает клеточный цикл в ответ на повреждение в митозе, фосфорилируя протеиникиназу Dun1, фосфатазу Cdc14, которая блокирует выход из митоза. Основной контроль клеточного цикла осуществляется за счет регулирования активности Cdc5 киназы. Фосфорилирование Chk2 Cdc5 приводит к деградации митотического циклина и выходу клетки из митоза (Sanchez et al., 1999).

В ответ на возникшее повреждение ДНК в митозе две эффекторные киназы, Chk1 и Chk2, действуют параллельно через Pds1 и Cdc5, предотвращая вход в анафазу и выход из митоза (Sanchez *et al.*, 1999).

Активность checkpoint киназ требуется для поддержания активности CDK1 (Cdc28).

Обе киназы, Chk2 и Chk1, предотвращают активацию Cdc2/Cdc13 комплекса, поддерживая фосфорилирование tyr15 Cdc2.

Отдельно хочется отметить активацию систем клеточного ответа на МЦС. При возникновении межцепочечных сшивок клетка отвечает активацией двух механизмов контроля прогрессии клеточного цикла в зависимости от фазы цикла, в которой появилось повреждение. При нахождении клетки в S-фазе в ходе репликации checkpoint ответ активируется при остановке репликативной вилки, что предотвращает транзицию клетки в митоз. При возникновении повреждения в G1-, поздней S-, G2-, М-фазах активируется ДНК damage checkpoint, арестовывающий клеточный цикл в этих фазах клеточного цикла (Enoch et al., 1992; Rhind, Russell, 1998; Caspari, Carr, 2002).

G1 остановка представляет собой контрольную точку в ходе клеточного цикла, которая дает время для репарации сшивки NER. В отсутствие этого checkpoint клетки начинают репликацию с нерепарированным повреждением, что приводит к активации репликационой точки контроля прогрессии клеточного цикла, индуцируемой Cds1 (Chk2). В этом случае репарация осуществляется комбинацией NER и ГР.

При возникновении повреждения в поздней S-, G2-, M-фазах также активируется damage checkpoint ответ и также происходит арест клеточного цикла. В этом случае активированные системы NER и ГР осуществляют репарацию повреждения. При индукции обоих типов checkpoint ответа происходят фосфорилирование и активация белков RAD семейства.

При остановке репликативной вилки активируется RAD3 (ATR) киназа, которая фосфорилирует и активирует эффекторную киназу Cds1 (Chk2) (Lindsay et al., 1998). При возникновении повреждения в фазе покоя активируется иерархическая киназа damage checkpoint RAD 9 (ATM), которая фосфорилирует Chk1 (Walworth, Bernards, 1996; Rhind, Russell, 2000). В ходе индукции checkpoint ответа активируются факторы, определяющие основные пути репарации, к которым относятся белки RAD семейства для дрожжей и их аналоги у высших млекопитающих (RAD1, RAD3, RAD9, RAD17, RAD26, и RAD1) (Lambert et al., 2003). RAD3 и RAD26 существуют как комплекс, который является аналогом ATR высших эукариот и передает сигнал по иерархической лестнице в ответ на возникшее повреждение за счет липидного киназного мотива (Martinho et al., 1998). RAD1/RAD9/Hus1 белковый комплекс, аналог АТМ высших эукариот, генерируется как checkpoint сигнал на возникновение аберрантной (ДЦР) ДНК (Caspari et al., 2000). RAD17 принадлежит к следующему комплексу, который так же, как и у высших эукариот, состоит из 4 небольших субъединиц репликативного фактора С и требуется для ассоциации RAD1/RAD9/Hus1 комплекса с повреждением (Caspari, Carr, 2002). В целом checkpoint ответ на МЦС выглядит следующим образом. В растущей популяции клеток, которые находятся главным образом в G1- (аналогично для G2/M) фазе клеточного цикла, появление МЦС запускает ДНК damage checkpoint ответ, требующий весь набор checkpoint факторов RAD семейства. Активируется иерархическая киназа RAD9 (ATM), которая фосфорилирует Chk1. Арест клеточного цикла в этой фазе цикла дает время для репарации МЦС механизмом NER (для G1) и NER и ГР (для G2/M). После полной репарации клетки возобновляют нормальный цикл и входят в митоз. При отсутствии оперативной точки контроля в фазе G1 клетки проходят в следующую, S-фазу, где МЦС определяется как блокирование движения репликационной вилки. В результате остановки репликативного комплекса формируются одноцепочечные участки, которые, связывая RPA, активируют RAD3 (ATR). Это запускает Cds1 (Chk2)-зависимую репликативную точку контроля клеточного цикла и весь комплекс репаративных факторов. Репарация в S-фазе требует активности NER системы и привлечения гомологичной последовательности ДНК сестринской хроматиды, необходимой для восстановления репликативной вилки и повторного запуска репликации.

Таким образом, общая схема клеточного ответа, приводящая к аресту клеточного цикла, состоит из следующих основных событий. Возникшее повреждение молекулы ДНК хромосомы клетки опознается сенсорными комплексами, и происходит активация трансдуцирующих киназ. После активации АТМ, АТR, ДНК-РК сигнал о повреждении молекулы ДНК передается по цепи, в первую очередь активируя эффекторные молекулы, которые затем активируют метаболические пути, что приводит к аресту клеточного цикла в контрольных точках.

Арест клеточного цикла при ДНК повреждении происходит через активацию эффекторных молекул p53, Chk1, Chk2, MAPKp38. В G1- и G2-фазах арест происходит вследствие ингибирования трансляции генов регулированием активности циклин/СDК комплекса. Арест в М-фазе регулируется другими мишенями checkpoint киназ Pds1, Cdc5, Dun1. В S-фазе клеточного цикла происходит ингибирование репликации в различных фазах ее состояния, что также арестует прогрессию клеточного цикла. При этом формируются участки оцДНК, которые, связываясь с RPA и RAD51, направляют в область аберрантной структуры молекулы ATR, активируя как саму киназу, так и комплекс ферментов, осуществляющих репаративную рекомбинацию. Также при возникновении оцДНК или вследствие репарации одноцепочечного разрыва, или МЦС, или вследствие инактивации Огі репликации, или сталлирования репликативной вилки, вызванной активацией checkpoint киназ, формируются ДЦ концы молекулы ДНК. Такие повреждения опять приводят к активации трансдуцирующей киназы АТМ, и новый цикл,

связанный с появлением повреждения в клетке, накладывается на предыдущий, поддерживая непрекращающийся совокупный ответ клетки до того момента, когда все повреждения не будут репарированы и специфические фосфатазы не восстановят метаболическое спокойствие в клетке. Следовательно, многочисленные переплетенные взаимозаменяемые и накладывающиеся друг на друга метаболические пути, активирующиеся вследствие появления повреждения ДНК, гарантируют возможность их репарации и дальнейшей прогрессии клеточного цикла.

5. Активация систем контроля клеточного цикла эДНК

Существует незначительное количество работ, характеризующих события, происходящие в клетке при попадании в нее фрагментов эДНК, и описывающих, какие пути мониторинга такого события активируются в клетке. В литературе приводятся сведения об активации систем мониторинга прогрессии клеточного цикла в ответ на появление в ядерном пространстве ДНК в форме синтетических олигонуклеотидов, ДНК SV40, апоптозных телец, доставленных в клеточные компартменты (Yakubov et al., 1989; Шестова и др., 1999; Holmgren et al., 1999). Также описываются молекулярные события, происходящие при интернализации плазмидных ДНК искусственными методами (Smith, Berg, 1984; Lin et al., 1985; Thomas et al., 1986).

Предполагается, что три структуры, образующие конец молекулы ДНК, являются индукторами клеточного ответа. К ним относятся оцДНК, тупые ДЦ и соединение одноцепочечного участка и дуплекса. Так, недавняя работа (MacDougall et al., 2007) свидетельствует о том, что интродуцированная в клетку кольцевая молекула ДНК с отожженным в специфическом месте праймером активирует ATR зависимый checkpoint ответ. Показано, что фосфорилирование Chk1, индуцируемое М13 оцДНК, требует присутствия оголенного соединения оцДНК и дуплекса. Подобно повреждению хроматина, ассоциированная с праймером ДНК фага М13 индуцирует Chk1 фосфорилирование посредством механизма, зависящего от ATRIP и других регуляторов активности ATR, таких, как RPA, RAD1, ТорВР1, клапсин.

Существует несколько работ, свидетельствующих об активации checkpoint ответа клетками при интернализации в ядро синтетических олигонуклеотидов (dA)70 – (dT)70. Происходящая при этом индукция систем контроля клеточного цикла в отсутствие каких-либо повреждений геномной ДНК или аберрантной репликации свидетельствует о том, что структура синтетических спаренных олигонуклеотидов, по-видимому, мимикрирует интермедиаты, возникающие при аберрантной репликации или при репарации повреждения геномной ДНК. Гибридизованная ДНК синтетических праймеров может находиться в нескольких формах, представленных как тупые ДЦ концы, оцДНК, переходящие в дуплекс, и крестообразные формы. По-видимому, с образованием различных структур, особенно важными из которых являются ДЦ концы и участки соединения оцДНК и дуплекса, связана активация двух трансдуцирующих киназ, а именно АТМ и ATR. Предполагается, что активацию ATM запускают ДЦ концы, присутствующие в смеси, тогда как ATR активируется под влиянием участка соединений оцДНК и дуплекса (Yoo et al., 2004, 2006; Zou, 2007).

Во всех работах, анализирующих молекулярные события, происходящие при интернализации ДНК, указывается на тот факт, что оцДНК не вызывают активации контролирующих систем клетки (Kumagai, Dunphy, 2000).

Проведенный анализ минимального количества молекул, способных индуцировать checkpoint ответ, показал, что порядка 30 молекул, содержащих структуры оцДНК/дуплекс соединения, активируют достаточный checkpoint ответ, необходимый для определения уровня фосфорилирования Chk1 (MacDougall *et al.*, 2007).

Другая работа, анализирующая молекулярные события, происходящие при интернализации экзогенной ДНК в клетку, выполненная на культуре клеток, демонстрирует то, что чужеродная ДНК, доставленная в ядро, не может быть проведена в ряду поколений при сохранении активности р53 — эффекторного онкосупрессора, запускающего арест клеточного цикла. Показано, что интеграция чужеродной ДНК при поглощении клетками апоптозных телец возможна только тогда, когда в клетке дефектна

система контроля прогрессии клеточного цикла, определяемая p53. Так, клетки, дефектные по гену p21 (Cip1/Waf1) – ингибитору циклинзависимых киназ, способны к переносу экзогенной генетической информации в ряду поколений. Этот факт свидетельствует о том, что интеграция чужеродного материала и сохранение ее в ряду поколений возможны при нарушении контроля прогрессии клетки в митотическом цикле (Bergsmedh et al., 2002).

Из вышесказанного следует, что экстраклеточная ДНК при попадании в ядерное пространство становится естественным индуктором активации иерархических киназ и ареста клеточного цикла. При этом происходит активация репаративной молекулярной машины и ферментативной системы, осуществляющей репаративную рекомбинацию.

В клетке с недефектными системами контроля прогрессии клеточного цикла интеграция эДНК происходить не может. ДНК интегрирует в геном только при нарушениях в молекулярной машине, арестовывающей клеточный цикл (например при неотрансформации клетки) (Holmgren *et al.*, 1999; Bergsmedh *et al.*, 2002).

Остается непонятным, что же происходит с эДНК в ядре здоровой клетки при индуцированной рекомбиногенной ситуации, когда активированы ATR, ATM, Chk1, Chk2 и все их молекулярные мишени, определяющие активацию репаративных процессов.

Из приведенных данных следует, что при количестве молекул эДНК, равном 30, находящемся в экстрахромосомальном пространстве ядра, система мониторинга стрессовых ситуаций клетки остается спокойной. Это значит, что такое количество молекул может составлять то постоянное количество экстрахромосомального материала в ядре, которое является физиологической

нормой. Что происходит с фрагментами экзогенной ДНК при возрастании их количества — остается загадкой. Известно, что они сшиваются один с другим, формируя конкатомерные структуры размером до 10 т.п.о. (Perucho *et al.*, 1980; Lin *et al.*, 1985; Rogachev *et al.*, 2006). Остальные события не изучены, и в литературе отсутствует какая-либо информация об этом.

Мы полагаем, что ДЦР, возникающие в ядре в результате различных событий, являются реперами, определяющими время и саму возможность интеграции в реципиентный геном чужеродной экстраклеточной ДНК. Это связано с механизмами репарации ДЦР, которые привлекают для завершения процесса ГР в разных ее вариантах или негомологичную сшивку концов возникшего повреждения ДНК.

Материалы, рассмотренные в настоящем сообщении, свидетельствуют о том, что в ядерное пространство эукариотической клетки попадает эДНК. Что происходит с этой ДНК - до сих пор остается предметом больших споров. ДЦР различного происхождения активируют репаративные системы клетки, которые используют рекомбинацию для конечной стадии репаративного процесса. Мы предположили, что на этих временных участках экзогенные фрагменты ДНК экстрахромосомальной локализации могут использоваться этими системами в качестве субстрата для гомологичной или незаконной рекомбинации. С другой стороны, если эДНК попадает в ядро клетки, в которой перманентно активирована рекомбиногенная ситуация (клетки, претерпевшие раковую трансформацию), то она также способна интегрировать в реципиентный геном клетки хозяина. Тем не менее механизмы интеграции эДНКэл различны и зависят от типа повреждения и физиологического состояния клетки.

Сообшение 3

ОБЩЕКЛЕТОЧНАЯ РЕКОМБИНОГЕННАЯ СИТУАЦИЯ, ВОЗНИКАЮЩАЯ ПРИ НАРУШЕНИИ СИСТЕМ КОНТРОЛЯ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА. ВЛИЯНИЕ ДОСТУПНОСТИ ХРОМАТИНА НА ИНТЕГРАЦИЮ ФРАГМЕНТОВ ДНК

С.С. Богачев¹, А.С. Лихачева¹, М.А. Шурдов²

¹ Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, Россия, e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru; ² OOO «Панаген», Горно-Алтайск, Россия

В сообщении приводится краткий анализ некоторых молекулярных событий, определяющих существование постоянно активированной рекомбиногенной ситуации в нетрансформированных клетках. Анализируются возможные варианты интеграции экзогенных фрагментов ДНК в клетках, дефектных по системам контроля прогрессии клеточного цикла.

Введение

Экзогенные фрагменты, доставленные в клетки, дефектные по системам контроля деления, к которым относятся неотрансформированные клетки, могут интегрировать в хозяйский геном без дополнительных воздействий на него. Эта возможность определяется тем фактом, что на фоне дефектных наблюдательных систем, контролирующих арест клеточного цикла, в клетках такого типа постоянно активирована рекомбинационная молекулярная машина. Степень активности, по-видимому, различна для различных ситуаций и связана с тем, какие из молекулярных путей и составляющих их факторов нарушены.

Нарушения в механизме ГР, приводящие к ее неконтролируемой или повышенной активности, негативно влияют на стабильность генома (Tutt et al., 2001; Richardson et al., 2004; Arias-Lopez et al., 2006), что проявляется в повышенной частоте рекомбинационных событий, не подконтрольных системам, определяющим прогрессию клеточного цикла. Таким свойством обладают раковые клетки, дефектные по различным контролирующим процесс ГР генам.

Одним из основных факторов, контролирующих прогрессию клеточного цикла и акти-

вацию репаративных систем клетки, является р53 онкосупрессор. р53 является модулятором ГР, регулирующим транскрипцию *Rad51* гена. Белок RAD51 играет центральную роль в репарации ДЦР механизмом ГР (Baumann, West, 1998; Arias-Lopez et al., 2006). При его участии формируются фокусы в месте ДЦР, в дальнейшем аккумулирующие множественные факторы репарации. Показано, что в раковых клетках, мутантных по гену р53, происходит гиперактивация гомологичной рекомбинации, которая связана с гиперэкспрессией Rad51 (Vispe et al., 1998; Saintigny, Lopez, 2002; Arias-Lopez et al., 2006). Белок р53 физически взаимодействует с Rad51, связываясь с респонсивным элементом гена, расположенного в промоторной области, и также регулирует активность гена на уровне транскрипта и белка. р53 в клетках дикого типа ингибирует формирование RAD51 фокусов в ответ на появление ДЦР, тогда как клетки с дефектным р53 теряют способность к репрессии *Rad51* как на уровне гена, так и на уровне мРНК и белка, что приводит к формированию несанкционированных фокусов рекомбинации, не связанных с ДЦР.

Спонтанная гиперрекомбинация показана для раковых клеток, мутантных по BRCA1, BRCA2, ATM, FANC. Спонтанная гиперреком-

бинация, протекающая в продвижении клетки по циклу без контроля checkpoint системами, потенциально запускает нестабильность генома. При этом конверсия генов ведет к потере гетерозиготности аллелей, если происходит между аллелями или приводит к инактивации гена, если происходит между геном и псевдогеном. Показано, что при конверсии генов могут инактивироваться гены контроля клеточного цикла, например, *rb* (Cavenee *et al.*, 1983) и *p53* (Slebos *et al.*, 1998; Tanooka *et al.*, 1998; Abaji *et al.*, 2005).

Отсутствие контроля со стороны checkpoint систем клетки за протекающей рекомбинацией и гиперэкспрессией рекомбиногенных факторов, связанное с дефектами в системах клетки, контролирующих активность репаративной машины, наблюдаемое в раковой клетке, может являться тем условием, которое определяет интеграцию фрагментов эДНК, интернализованной во внутриядерном пространстве в доступные участки хромосом. При этом интеграция может осуществляться двумя независимыми механизмами, или за счет двойного реципрокного обмена концевых гомологий (Li et al., 2001; Yakubov et al., 2007), или вследствие генной конверсии за счет ассимиляции одной из цепей экзогенного дуплекса с гомологичным участком хромосомы (Leung et al., 1997).

ГР, не связанная с ДЦР, может происходить с повышенной частотой в клетках, индуцированных тимидином. Тимидин выводит из оборота пул клеточного dCTP и индуцирует ATM-зависимое фосфорилирование Chk2 и Nbs1 и ATM независимое фосфорилирование Chk1 и SMC1. При этом активируется ГР в отсутствие детектируемых ДЦР (Bolderson *et al.*, 2004). Такая ситуация может являться еще одним вариантом состояния клетки, когда возможна интеграция в реципиентный геном экзогенных фрагментов, находящихся в ядре, двумя указанными в предыдущем абзаце способами.

Другим важным фактором интеграции экзогенных фрагментов в геном клетки-хозяина при общеклеточной рекомбиногенной ситуации, возникающей при нарушении систем контроля клеточного цикла, является структура хроматина, имеющая гомологию с экстрахромосомальными фрагментами ДНК. В ранней работе (Linet al., 1985) было показано, что эффективность

трансформации методом, используемым в работе, при котором задействован механизм ГР, составляет 10⁻⁶ на клетку. Удивительным оказался тот факт, что только 1 из 10 линий клеток, подвергшихся трансформации, приобрела селективный признак в результате ГР. Авторы сделали предположение, что только определенные районы хромосом могут принимать участие в ГР с интернализованной эДНК, которые предположительно расположены в эухроматине. Более поздние эксперименты демонстрировали тот факт, что checkpoint белки и белки репарации, такие, как RPA, ATM, ATR, более эффективно концентрируются в поврежденных участках хроматина, которые активно транскрибируются и, следовательно, относятся к области эухроматина генома (Jiang, Sancar, 2006).

Транскрипция потенциальных рекомбинационных сайтов хромосомы является важным условием для интеграции эДНКэл при репаративной рекомбинации, проходящей по механизму генной конверсии (Schildkraut *et al.*, 2006).

При интеграции с использованием механизма незаконной рекомбинации места интеграции эДНК также не являются случайными, а напрямую связаны с доступностью хроматина в транскрипционно активных районах хромосом или в сайтах репарациии ДЦР (Takata et al., 1998; Smith, 2001; Würtele et al., 2003; Lee et al., 2005). При этом для осуществления процесса незаконной интеграции требуется активность ревертазы Mentas. При отсутствии специфических фрагментов экзогенной ДНК, доставленных в ядро клетки, при индукции незаконной рекомбинации в искусственно индуцированный разрыв дуплекса в эукариотическом геноме, в место разрыва могут интегрировать различные последовательности, такие, как сегменты плазмиды, экспрессирующей специфическую эндонуклеазу *I-Sc*eI в экспериментах по получению уникальных ДЦР, LTR эндогенных ретровирусподобных частиц, последовательности U2, последовательности микросателлитов. Эти факты означают, что, во-первых, в межхромосомном пространстве одновременно находятся различные свободно расположенные сегменты хроматина, относящиеся к различным определенным классам последовательностей. Во-вторых, они готовы интегрировать в геном по механизму незаконной рекомбинации, и что такой механизм работает. И в-третьих, наличие ДЦ концов таких свободно расположенных фрагментов ДНК в количестве, соответствующем физиологической норме, не активирует систем ареста клеточного цикла (Lin, Waldman, 2001).

Отмечается, что при выборе партнера для ГР в клетке существует преимущество для участков, расположенных где угодно в геноме, кроме тех, которые расположены вдоль хромосомы в непосредственной близости от ДЦР (D'Anjou et al., 2004). Такое наблюдение предполагает возможность привлечения для ГР партнеров, расположенных во фрагментах экзогенной эДНК.

Таким образом, если в экстрахромосомальном пространстве клетки, в которой нарушены механизмы контроля клеточного цикла и перманентно активирован рекомбинационный механизм, присутствуют экзогенные фрагменты ДНК, то они могут быть интегрированы в геном посредством любого из механизмов, описанных в настоящем сообщении.

Заключение

Если в клетке активирована рекомбиногенная ситуация, вызванная описанными выше событиями, то находящиеся в этот момент времени в экстрахромосомальном пространстве ядра клетки фрагменты экзогенной ДНК становятся субстратом для репаративной рекомбинации. В этот момент времени возможна

массовая интеграция фрагментов экзогенной ДНК в геном клетки хозяина.

В практическом смысле для осуществления процедуры масштабной интеграции эДНКэл в реципиентный геном требуется либо искусственно создать, либо использовать уже существующую в клетке рекомбиногенную ситуацию. При этом наиважнейшим фактором интеграции будет правильно выбранный момент времени, в который эДНКэл должна быть доставлена в ядерное пространство реципиентной клетки. Абсолютная важность временного фактора связана с тем, что различные типы повреждений по-разному индуцируют ответ клетки на стресс. Время активации репаративной молекулярной машины индивидуально и зависит от типа повреждения и момента его возникновения.

Взятые вместе результаты экспериментальных подходов, описанных в литературе, и результаты независимых подходов, выполненных в нашей лаборатории, позволили сформулировать указанную выше концепцию воздействия экзогенной ДНК на соматические клетки высших эукариот.

Мы благодарим Л.А. Якубова за его теорию, которая стала индуктором проделанной работы и формирования приведенной концепции. Работа финансировалась в полном объеме ООО «Панаген».

Список сокращений

ГР – гомологичная рекомбинация ДНК-РК – ДНК-протеинкиназа ДЦ конец – двуцепочечный конец ДЦР – двуцепочечный разрыв МНК – мононуклеарные клетки мРНК – матричная РНК МЦС – межцепочечная сшивка НК – нуклеиновые кислоты ОТ ПЦР – обратная транскрипция и ПЦР оцДНК – одноцепочечная ДНК СК – стволовая клетка СКК – стволовая клетка крови ФНО-α – фактор некроза опухоли α ЦФ – циклофосфан

эДНК – экзогенная ДНК

эДНКэл – экзогенная ДНК экстрахромосомальной локализации

ЭСК – эмбриональная стволовая клетка

ADPRT – ADP рибозилтрансфераза

NER (nucleotide excision repair) – эксцизионная репарация нуклеотидов

NHEJ (non homologous end joining) – негомологичное объединение концов

RPA (replication protein A) – репликативный белок А

SDSA (synthesis dependent strand annealing) – синтез-зависимое спаривание цепей

TcR – Т-клеточный рецептор

Список и краткая характеристика основных факторов клетки, описанных в обзоре

ДНК-РК – иерархическая протеинкиназа; участвует в восстановлении ДЦР в непролиферирующих клетках; гиперфосфорелирует RPA2, препятствуя его связыванию с Ori репликации.

ATM (у дрожжей RAD9) – иерархическая протеинкиназа семейства фосфатидилинозитол-3-киназозависимых киназ (PIKK) у высших эукариот; индуцирует каскад событий в ответ на ДЦР, сталлирование репликативной вилки, общее изменение структуры хроматина высших порядков.

ATR (у дрожжей RAD3 и MEC1) – иерархическая протеинкиназа высших эукариот; активируется при нарушениях, связанных с остановкой репликативной вилки.

ATRIP – ATR interaction protein – комплекс, необходимый для связывания с одноцепочечным участком, покрытым RPA.

BLM (Sgs1) – RecQ геликаза; требуется для привлечения p53, который регулирует экспрессию RAD51 и, следовательно, динамику рекомбинационного процесса; регулирует формирование структуры Холлидея.

BRCA1 и BRCA2 – сенсор ДЦР.

BRCT-домен – мишень для ATM/ATR фосфорилирования; широко представлен у ДНК, репарирующих белков

Cdc5 — протеинкиназа; в нефосфорилированной форме способствует деградации митотического циклина и препятствует выходу из митоза; фосфорилируется активированным RAD53 (Chk2).

Cdc7 (DDK) – протеинкиназа; участвует в формировании активного Ori репликации.

Cdc14 – фосфатаза; блокирует выход из митоза дефосфорилированием Cdc5.

Cdc25 — фосфатаза; регулирует прогрессию клеточного цикла через активацию CDK и ДНК-геликазы MCM2-7; гиперфосфорилирование Cdc25 фосфатазы приводит к ее деградации, в результате чего CDK киназа остается фосфорилированной и инактивированной, что приводит к 1) супрессии связывания Cdc45 с Ori репликации, 2) Rb не фосфорилируется, сохраняется Rb/E2F комплекс и клеточный цикл арестовывается.

Cdc45 – присоединяет ДНК-полимеразу и другие репликативные белки на Ori репликации, защищает Ori репликации; в S-фазе находится в активной форме; субстрат для фосфорилирования Cdc 7 (DDK) протеинкиназой; взаимодействует с комплексом МСМ.

CDK – циклинзависимая протеинкиназа; в активной форме фосфорилирует Rb, тем самым разрушая комплекс Rb/E2F, вследствие чего фактор транскрипции E2F освобождается и запускает транскрипцию генов S-фазы.

Chk1 – эффекторная протеинкиназа; останавливает прогрессию клеточного цикла

Chk2 (у дрожжей RAD53 и Cds1) – эффекторная протеинкиназа; регулирует прогрессию клеточного цикла.

Dun1 – протеинкиназа; участвует в метафазном аресте в ответ на повреждение ДНК хромосомы.

hMOF – гистоновая ацетилтрансфераза, сенсор ДЦР; физически взаимодействует с ATM, ацетилируя субъединицы фермента, что приводит к автофосфорилированию и активации ATM.

Ки70/80 – гетеродимер; связывает разорванные концы ДНК, удерживая их вместе.

МАРКр38, р38 МАР киназа – активирует арест клеточного при ДЦР, возникших при V(D)J рекомбинации.

- MCM2-7 ДНК-геликазы; входят в пререпликативный комплекс и катализируют плавление цепей в процессе репликации.
- MRE11, RAD32 (у высших эукариот Nbs1) сенсор ДЦР, возникающих при физическом повреждении молекулы ДНК; в форме тримера MRE11 / Xrs2 / RAD50 удерживает вместе разорванные концы молекулы ДНК.
- Ori, Ori репликации участок ДНК, где происходит формирование репликативной вилки и старт движения комплекса белков репликации.
- p53 фактор транскрипции, способный включать или выключать разветвленную сеть генов-мишеней в ответ на генотоксический стресс или включать программу апоптоза.
- Pds1 анафазный ингибитор; фосфорилирует Chk1 в ответ на повреждение через MEC1 (ATR), но не RAD53 (Chk2), вследствие чего накапливается в клетке; фосфорилирование Pds1 предотвращает его деградацию; накопление Pds1 препятствует выходу клетки из митоза; деградация Pds1 запускает сегрегацию хромосом.

RAD1/RAD9/Hus1комплекс – аналог ATM у высших эукариот.

RAD3/RAD26 комплекс – аналог ATR у высших эукариот.

RAD17-9-1-1 – комплекс-застежка, взаимодействует с комплексом RAD1/RAD9/Hus1, необходим для активации систем checkpoint.

RAD32 – аналог MRE11у высших эукариот.

RAD50 и RAD59 – факторы RAD51 независимой рекомбинации.

RAD51 – рекомбиназа, основной фактор ГР, формирует одноцепочечные филаменты в местах ДЦР.

RAD53 – аналог Chk2 у высших эукариот.

RAD54 – осуществляет поиск гомологичных RAD51 филаменту последовательностей по всему геному.

RAG1 и RAG2 – рекомбиназы, осуществляющие этап реорганизации V, D, J сегментов.

Rb – ретинобластомный фактор; образует стабильный комплекс с E2F фактором транскрипции.

SMC1 – требуется для кохессии сестринских хроматид и рекомбинации.

TIP60 – гистоновая ацетилрансфераза, сенсор ДЦР; фосфорилирует стабильный комплекс с ATM и в ответ на повреждения активирует ATM прямым ацетилированием.

у-Н2АХ – гистон Н2АХ, фосфорилированный АТМ протеинкиназой по серину 139.

Литература

- Албертс Б., Брей Д., Льюис Дж. *et al*. Молекулярная биология клетки: В 3-х т. 2-е изд., перераб. и доп. Т. 2. Пер. с англ. М.: Мир, 1994. 130 с.
- Гистология, цитология и эмбриология / Под ред. Ю.И. Афанасьева, С.Л. Кузнецова, Н.А. Юриной. М.: Медицина, 2004. 768 с.
- Заалишвили Г.Т., Цецхладзе З.Р., Маргиани Д.О. и др. ADP-рибозилирование усиливает расщепление петель ДНК в ядерном матриксе // Молекуляр. биология. 2005. Т. 39. № 2. С. 317–320.
- Моргункова А.А. Семейство генов р53: контроль клеточной пролиферации и программ развития организма // Биохимия. 2005. Т. 70. Вып. 9. С. 1157–1176.
- Николин В.П., Попова Н.А., Себелева Т.Е. и др. Влияние экзогенной ДНК на рост экспериментальных опухолей // Вопросы онкологии. 2006а. Т. 52. № 1. С. 66–69.

- Николин В.П., Попова Н.А., Себелева Т.Е. и др. Влияние экзогенной ДНК на восстановление лейкопоэза и противоопухолевый эффект циклофосфана // Вопросы онкологии. 2006б. Т. 52. № 3. С. 336–340.
- Тамкович С.Н., Брызгунова О.Е., Рыкова Е.Ю. и др. Циркулирующие нуклеиновые кислоты в крови больных раком желудка и толстой кишки // Биомедицинская химия. 2005. Т. 51. С. 321–328.
- Уманская О.Н., Юдинкова Е.С., Разин С.В., Быстрицкий А.А. Ингибирование ДНК-топоизомеразы II в живых клетках стимулирует процесс незаконной рекомбинации // Докл. РАН. 2005. Т. 405. № 3. С. 419–421.
- Хегай И.И., Богачев С.С., Оськина И.Н. и др. Изменение симптоматики гипоталамического несахарного диабета после воздействия гомологической экзогенной ДНК // Докл. РАН. 2004. Т. 396. № 4. С. 571–573.
- Челобанов Б.П., Лактионов П.П., Власов В.В. Бел-

- ки, участвующие в связывании и поглощении клетками нуклеиновых кислот // Биохимия. 2006. Т. 71. № 6. С. 725–741.
- Шестова О.Е., Андреева А.Ю., Власов В.В., Якубов Л.А. Транспорт комплексов олигонуклеотидов с белками клеточной поверхности в клеточное ядро // Докл. РАН. 1999. Т. 368. С. 264–267.
- Якубов Л.А., Петрова Н.А., Попова Н.А. и др. Роль экстраклеточной ДНК в поддержании постоянства и изменчивости клеточных геномов // Докл. РАН. 2002. Т. 382. № 3. С. 406–410.
- Abaji C., Cousineau I., Belmaaza A. BRCA2 regulates homologous recombination in response to DNA damage: implications for genome stability and carcinogenesis // Cancer Res. 2005. V. 65. № 10. P. 4117–4125.
- Andreassen P.R., Ho G.P., D'Andrea A.D. DNA damage responses and their many interactions with the replication fork // Carcinogenesis. 2006. V. 27. № 5. P. 883–892.
- Anker P. Quantitative aspects of plasma/serum DNA in cancer patients // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2000. V. 906. P. 5–7.
- Anker P., Jachertz D., Stroun M. *et al*. The role of extracellular DNA in the transfer of information from T to B human lymphocytes in the course of an immune response // J. Immunogenet. 1980. V. 7. № 6. P. 475–481.
- Anker P., Mulcahy H., Chen X.Q., Stroun M. Detection of circulating tumour DNA in the blood (plasma/serum) of cancer patients // Cancer Metastasis Rev. 1999. V. 18. № 1. P. 65–73.
- Aparicio O.M., Stout A.M., Bell S.P. Differential assembly of Cdc45p and DNA polymerases at early and late origins of DNA replication // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1999. V. 96. № 16. P. 9130–9135.
- Arias-Lopez C., Lazaro-Trueba I., Kerr P. *et al.* p53 modulates homologous recombination by transcriptional regulation of the RAD51 gene // The EMBO Rep. 2006. V. 7. № 2. P. 219–224.
- Ayares D., Chekuri L., Song K.Y., Kucherlapati R. Sequence homology requirements for intermolecular recombination in mammalian cells // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1986. V. 83. № 14. P. 5199–5203.
- Bakkenist C.J., Kastan M.B. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation // Nature. 2003. V. 421. № 6922. P. 499–506.
- Barber L.J., Ward T.A., Hartley J.A., McHugh P.J. DNA interstrand cross-link repair in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle: overlapping roles for PSO2 (SNM1) with MutS factors and EXO1 during S phase // Mol. Cell Biol. 2005. V. 25. № 6. P. 2297–2309.
- Bärtsch S., Kang L.E., Symington L.S. RAD51 is required for the repair of plasmid double-stranded

- DNA gaps from either plasmid or chromosomal templates // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. № 4. P. 1194–1205.
- Bassing C.H., Swat W., Alt F.W. The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination // Cell. 2002. V. 109. Suppl. P. 45–55.
- Baumann P., West S.C. Role of the human RAD51 protein in homologous recombination and double-stranded-break repair // Trends Biochem. Sci. 1998. V. 23. № 7. P. 247–251.
- Bennett R.M., Gabor G.T., Merritt M.M. DNA binding to human leukocytes. Evidence for a receptor-mediated association, internalization, and degradation of DNA // J. Clin. Invest. 1985. V. 76. № 6. P. 2182–2190.
- Bergsmedh A., Szeles A., Henriksson M. *et al*. Horizontal transfer of oncogenes by uptake of apoptotic bodies // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. № 11. P. 6407–6411.
- Bergsmedh A., Szeles A., Spetz A.L., Holmgren L. Loss of the p21(Cip1/Waf1) cyclin kinase inhibitor results in propagation of horizontally transferred DNA // Cancer Res. 2002. V. 62. № 2. P. 575–579.
- Bessho T., Mu D., Sancar A. Initiation of DNA interstrand cross-link repair in humans: the nucleotide excision repair system makes dual incisions 5' to the cross-linked base and removes a 22- to 28-nucleotide-long damage-free strand // Mol. Cell Biol. 1997. V. 17. № 12. P. 6822–6830.
- Bhargava P.M., Shanmugam G. Uptake of nonviral nucleic acids by mammalian cells // Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 1971. V. 11. P. 103–192.
- Blunt T., Finnie N.J., Taccioli G.E. *et al.* Defective DNA-dependent protein kinase activity is linked to V(D)J recombination and DNA repair defects associated with the murine scid mutation // Cell. 1995. V. 80. № 5. P. 813–823.
- Bodell W.J. Molecular dosimetry for sister-chromatid exchange induction and cytotoxicity by monofunctional and bifunctional alkylating agents // Mutat. Res. 1990. V. 233. № 1/2. P. 203–210.
- Bolderson E., Scorah J., Helleday T. *et al.* ATM is required for the cellular response to thymidine induced replication fork stress // Hum. Mol. Genet. 2004. V. 13. № 23. P. 2937–2945.
- Bredberg A., Lambert B., Söderhäll S. Induction and repair of psoralen cross-links in DNA of normal human and xeroderma pigmentosum fibroblasts // Mutat. Res. 1982. V. 93. № 1. P. 221–234.
- Bulavin D.V., Higashimoto Y., Popoff I.J. *et al.* Initiation of a G2/M checkpoint after ultraviolet radiation requires p38 kinase // Nature. 2001. V. 411. № 6833. P. 102–107.
- Byun T.S., Pacek M., Yee M.C. *et al.* Functional uncoupling of MCM helicase and DNA polymerase activities activates the ATR-dependent checkpoint //

- Genes Dev. 2005. V. 19. № 9. P. 1040–1052.
- Caspari T., Carr A.M. DNA structure checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe* // Biochimie. 1999. V. 81. № 1/2. P. 173–181.
- Caspari T., Carr A.M. Checkpoints: how to flag up double-strand breaks // Curr Biol. 2002. V. 12. № 3. P. 105–107.
- Caspari T., Dahlen M., Kanter-Smoler G. *et al.* Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Hus1: a PCNA-related protein that associates with Rad1 and Rad9 // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. № 4. P. 1254–1262.
- Cavenee W.K., Dryja T.P., Phillips R.A. *et al.* Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma // Nature. 1983. V. 305. № 5937. P. 779–784.
- Chahwan C., Nakamura T.M., Sivakumar S. *et al*. The fission yeast Rad32 (Mre11)-Rad50-Nbs1 complex is required for the S-phase DNA damage checkpoint // Mol. Cell Biol. 2003. V. 23. № 18. P. 6564–6573.
- Cobb J.A., Schleker T., Rojas V. *et al.* Replisome instability, fork collapse, and gross chromosomal rearrangements arise synergistically from Mec1 kinase and RecQ helicase mutations // Genes Dev. 2005. V. 19. № 24. P. 3055–3069.
- Cortez D. Unwind and slow down: checkpoint activation by helicase and polymerase uncoupling // Genes Dev. 2005. V. 19. № 9. P. 1007–1012.
- Cortez D., Glick G., Elledge S.J. Minichromosome maintenance proteins are direct targets of the ATM and ATR checkpoint kinases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. № 27. P. 10078–10083.
- Cortez D., Guntuku S., Qin J., Elledge S.J. ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling // Science. 2001. V. 294. № 5547. P. 1713–1716.
- D'Anjou H., Chabot C., Chartrand P. Preferential accessibility to specific genomic loci for the repair of double-strand breaks in human cells // Nucl. Acids Res. 2004. V. 32. № 20. P. 6136–6143.
- Darby M.K., Schmitt B., Jongstra-Bilen J., Vosberg H.P. Inhibition of calf thymus type II DNA topoisomerase by poly(ADP-ribosylation) // The EMBO J. 1985. V. 4. № 8. P. 2129–2134.
- Dardalhon M., Averbeck D. Pulsed-field gel electrophoresis analysis of the repair of psoralen plus UVA induced DNA photoadducts in *Saccharomyces cerevisiae* // Mutat. Res. 1995. V. 336. № 1. P. 49–60.
- 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 crosslinks in mammalian cells // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. № 21. P. 7980–7990.
- Deng C., Capecchi M.R. Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology

- between the targeting vector and the target locus // Mol. Cell Biol. 1992. V. 12. № 8. P. 3365–3371.
- Dohrmann P.R., Sclafani R.A. Novel role for checkpoint Rad53 protein kinase in the initiation of chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae* // Genetics. 2006. V. 174. № 1. P. 87–99.
- Dronkert M.L., Beverloo H.B., Johnson R.D. *et al.* Mouse RAD54 affects DNA double-strand break repair and sister chromatid exchange // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. № 9. P. 3147–3156.
- Enoch T., Carr A.M., Nurse P. Fission yeast genes involved in coupling mitosis to completion of DNA replication // Genes Dev. 1992. V. 6. № 11. P. 2035–2046.
- Falck J., Mailand N., Syljuåsen R.G. *et al.* The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis // Nature. 2001. V. 410. № 6830. P. 842–847.
- Falck J., Petrini J.H., Williams B.R. *et al.* The DNA damage-dependent intra-S phase checkpoint is regulated by parallel pathways // Nat. Genet. 2002. V. 30. № 3. P. 290–294.
- Farzaneh F., Zalin R., Brill D., Shall S. DNA strand breaks and ADP-ribosyl transferase activation during cell differentiation // Nature. 1982. V. 300. № 5890. P. 362–366.
- Forsburg S.L. Eukaryotic MCM proteins: beyond replication initiation // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2004. V. 68. № 1. P. 109–131.
- Furnari B., Rhind N., Russell P. Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase // Science. 1997. V. 277. № 5331. P. 1495–1497.
- García-Olmo D., García-Olmo D.C., Ontañón J., Martinez E. Horizontal transfer of DNA and the «genometastasis hypothesis» // Blood. 2000. V. 95. No 2. P. 724–725.
- García-Olmo D., Ontañón J., García-Olmo D.C. *et al.*Detection of genomically-tagged cancer cells in different tissues at different stages of tumor development: lack of correlation with the formation of metastasis // Cancer Lett. 1999. V. 140. № 1/2. P. 11–20.
- Giacona M.B., Ruben G.C., Iczkowski K.A. *et al.* Cell-free DNA in human blood plasma: length measurements in patients with pancreatic cancer and healthy controls // Pancreas. 1998. V. 17. № 1. P. 89–97.
- Grenon M., Gilbert C., Lowndes N.F. Checkpoint activation in response to double-strand breaks requires the Mre11/Rad50/Xrs2 complex // Nat. Cell Biol. 2001. V. 3. № 9. P. 844–847.
- Guo Z., Kumagai A., Wang S.X., Dunphy W.G. Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in Xenopus egg extracts // Genes Dev. 2000. V. 14. № 21. P. 2745–2756.

- Gupta A., Sharma G.G., Young C.S. *et al.* Involvement of human MOF in ATM function // Mol. Cell Biol. 2005. V. 25. № 12. P. 5292–5305.
- Hartwell L.H., Weinert T.A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events // Science. 1989. V. 246. № 4930. P. 629–634.
- Hastings P.J., McGill C., Shafer B., Strathern J.N. Endsin vs. ends-out recombination in yeast // Genetics. 1993. V. 135. № 4. P. 973–980.
- Helleday T. Pathways for mitotic homologous recombination in mammalian cells // Mutat. Res. 2003. V. 532. № 1/2. P. 103–115.
- Holmgren L., Szeles A., Rajnavölgyi E. *et al.* Horizontal transfer of DNA by the uptake of apoptotic bodies // Blood. 1999. V. 93. № 11. P. 3956–3963.
- Ikura T., Ogryzko V.V., Grigoriev M. *et al.* Involvement of the TIP60 histone acetylase complex in DNA repair and apoptosis // Cell. 2000. V. 102. № 4. P. 463–473.
- Ira G., Haber J.E. Characterization of RAD51-in-dependent break-induced replication that acts preferentially with short homologous sequences // Mol. Cell Biol. 2002. V. 22. № 18. P. 6384–6392.
- Jachymczyk W.J., von Borstel R.C., Mowat M.R., Hastings P.J. Repair of interstrand cross-links in DNA of *Saccharomyces cerevisiae* requires two systems for DNA repair: the RAD3 system and the RAD51 system // Mol. Gen. Genet. 1981. V. 182. № 2. P. 196–205.
- Jahr S., Hentze H., Englisch S. *et al.* DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells // Cancer Res. 2001. V. 61. № 4. P. 1659–1665.
- Jiang G., Sancar A. Recruitment of DNA damage checkpoint proteins to damage in transcribed and nontranscribed sequences // Mol. Cell Biol. 2006. V. 26. № 1. P. 39–49.
- Johnson R.D., Jasin M. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells // The EMBO J. 2000. V. 19. № 13. P. 3398–3407.
- Johnstone A.P., Williams G.T. Role of DNA breaks and ADP-ribosyl transferase activity in eukaryotic differentiation demonstrated in human lymphocytes // Nature. 1982. V. 300. № 5890. P. 368–370.
- Kano Y., Fujiwara Y. Roles of DNA interstrand crosslinking and its repair in the induction of sister-chromatid exchange and a higher induction in Fanconi's anemia cells // Mutat. Res. 1981. V. 81. № 3. P. 365–375.
- Kimura A., Horikoshi M. Tip60 acetylates six lysines of a specific class in core histones *in vitro* // Genes Cells. 1998. V. 3. № 12. P. 789–800.
- Kohzaki M., Hatanaka A., Sonoda E. et al. Cooperative

- roles of vertebrate Fbh1 and Blm DNA helicases in avoidance of crossovers during recombination initiated by replication fork collapse // Mol. Cell Biol. 2007. V. 27. № 8. P. 2812–2820.
- Kucherlapati R.S., Eves E.M., Song K.Y. *et al.* Homologous recombination between plasmids in mammalian cells can be enhanced by treatment of input DNA // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 10. P. 3153–3157.
- Kumagai A., Dunphy W.G. Claspin, a novel protein required for the activation of Chk1 during a DNA replication checkpoint response in Xenopus egg extracts // Mol. Cell. 2000. V. 6. № 4. P. 839–849.
- Lambert S., Mason S.J., Barber L.J. *et al. Schizosac-charomyces pombe* checkpoint response to DNA interstrand cross-links // Mol. Cell Biol. 2003. V. 23. № 13. P. 4728–4737.
- Langston L.D., Symington L.S. Gene targeting in yeast is initiated by two independent strand invasions // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2004. V. 101. № 43. P. 15392–15397.
- Lawen A. Apoptosis-an introduction // Bioessays. 2003. V. 25. № 9. P. 888–896.
- Ledoux L. Uptake of DNA by living cells // Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 1965. V. 4. P. 231–267.
- Ledoux L., Charles P. Fate of exogenous DNA in mammals // In Uptake of Informative Molecules by Living Cells / Ed. L. Ledoux. Amsterdam: North-Holland Publishing Company, 1972. P. 397–413.
- Lee S.H., Oshige M., Durant S.T. *et al*. The SET domain protein Metnase mediates foreign DNA integration and links integration to nonhomologous endjoining repair // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 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. № 11. P. 1161–1173.
- Leon S.A., Shapiro B., Sklaroff D.M., Yaros M.J. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy // Cancer Res. 1977. V. 37. № 3. P. 646–650.
- Leung W., Malkova A., Haber J.E. Gene targeting by linear duplex DNA frequently occurs by assimilation of a single strand that is subject to preferential mismatch correction // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. № 13. P. 6851–6856.
- 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. V. 21. № 2. P. 501–510.
- Likhacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A. *et al.* Integration of human DNA fragments into the cell genomes of certain tissues from adult mice treated with cytostatic cyclophosphamide in combination

- with human DNA // Gene Ther. Mol. Biol. 2007a. V. 11. P. 185–202.
- 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. 2007b. V. 11. P. 305–314.
- Lin J., Krishnaraj R., Kemp R.G. Exogenous ATP enhances calcium influx in intact thymocytes // J. Immunol. 1985. V. 135. № 5. P. 3403–3410.
- Lin Y., Waldman A.S. Capture of DNA sequences at double-strand breaks in mammalian chromosomes // Genetics. 2001. V. 158. № 4. P. 1665–1674.
- Lindsay H.D., Griffiths D.J., Edwards R.J. *et al.* Sphase-specific activation of Cds1 kinase defines a subpathway of the checkpoint response in *Schizosaccharomyces pombe* // Genes Dev. 1998. V. 12. № 3. P. 382–395.
- Lisby M., Barlow J.H., Burgess R.C., Rothstein R. Choreography of the DNA damage response: spatio-temporal relationships among checkpoint and repair proteins // Cell. 2004. V. 118. № 6. P. 699–713.
- Liu Q., Guntuku S., Cui X.S. *et al.* Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint // Genes Dev. 2000. V. 14. № 12. P. 1448–1459.
- Loke S.L., Stein C.A., Zhang X.H. *et al.* Characterization of oligonucleotide transport into living cells // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. № 10. P. 3474–3478.
- MacDougall C.A., Byun T.S., Van C. *et al*. The structural determinants of checkpoint activation // Genes Dev. 2007. V. 21. № 8. P. 898–903.
- Magaña-Schwencke N., Henriques J.A., Chanet R., Moustacchi E. The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced crosslinks in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair-deficient strains // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 6. P. 1722–1726.
- Mailand N., Falck J., Lukas C. *et al.* Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage // Science. 2000. V. 288. № 5470. P. 1425–1429.
- Mailand N., Podtelejnikov A.V., Groth A. *et al.* Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phospho-rylation-dependent modulation of its stability // The EMBO J. 2002. V. 21. № 21. P. 5911–5920.
- Marheineke K., Hyrien O. Control of replication origin density and firing time in Xenopus egg extracts: role of a caffeine-sensitive, ATR-dependent checkpoint // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 27. P. 28071–28081.
- Martinho R.G., Lindsay H.D., Flaggs G. *et al.* Analysis of Rad3 and Chk1 protein kinases defines different

- checkpoint responses // The EMBO J. 1998. V. 17. $\[Mathbb{N}\]$ 24. P. 7239–7249.
- Masuda T., Mimura S., Takisawa H. CDK- and Cdc45-dependent priming of the MCM complex on chromatin during S-phase in Xenopus egg extracts: possible activation of MCM helicase by association with Cdc45 // Genes Cells. 2003. V. 8. № 2. P. 145–161.
- McHugh P.J., Sones W.R., Hartley J.A. Repair of intermediate structures produced at DNA inter-strand cross-links in Saccharomyces cerevisiae // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. № 10. P. 3425–3433.
- McHugh P.J., Spanswick V.J., Hartley J.A. Repair of DNA interstrand crosslinks: molecular mechanisms and clinical relevance // Lancet Oncol. 2001. V. 2. № 8. P. 483–490.
- Miller R.D., Prakash L., Prakash S. Genetic control of excision of *Saccharomyces cerevisiae* interstrand DNA cross-links induced by psoralen plus near-UV light // Mol. Cell Biol. 1982. V. 2. № 8. P. 939–948.
- Montagnoli A., Tenca P., Sola F. *et al.* Cdc7 inhibition reveals a p53-dependent replication checkpoint that is defective in cancer cells // Cancer Res. 2004. V. 64. № 19. P. 7110–7116.
- Mu D., Bessho T., Nechev L.V. *et al.* DNA interstrand cross-links induce futile repair synthesis in mammalian cell extracts // Mol. Cell Biol. 2000. V. 20. № 7. P. 2446–2454.
- 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. № 13. P. 5776–5787.
- Orr-Weaver T.L., Szostak J.W., Rothstein R.J. Yeast transformation: a model system for the study of recombination // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 10. P. 6354–6358.
- Palom Y., Suresh Kumar G., Tang L.Q. *et al.* Relative toxicities of DNA cross-links and monoadducts: new insights from studies of decarbamoyl mitomycin C and mitomycin C // Chem. Res. Toxicol. 2002. V. 15. № 11. P. 1398–1406.
- Pâques F., Haber J.E. Multiple pathways of recombination induced by double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae* // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 1999. V. 63. № 2. P. 349–404.
- Pedraza-Alva G., Koulnis M., Charland C. *et al.* Activation of p38 MAP kinase by DNA double-strand breaks in V(D)J recombination induces a G2/M cell cycle checkpoint // The EMBO J. 2006. V. 25. № 4. P. 763–773.
- Perucho M., Hanahan D., Wigler M. Genetic and physical linkage of exogenous sequences in transformed cells // Cell. 1980. V. 22. P. 309–317. Peterson C.L., Côté J. Cellular machineries for

- chromosomal DNA repair // Genes Dev. 2004. V. 18. № 6. P. 602–616.
- Potts P.R., Porteus M.H., Yu H. Human SMC5/6 complex promotes sister chromatid homologous recombination by recruiting the SMC1/3 cohesin complex to double-strand breaks // The EMBO J. 2006. V. 25. № 14. P. 3377–3388.
- Pulciani S., Santos E., Lauver A.V. *et al.* Oncogenes in solid human tumours // Nature. 1982. V. 300. № 5892. P. 539–542.
- Rattray A.J., McGill C.B., Shafer B.K., Strathern J.N. Fidelity of mitotic double-strand-break repair in *Saccharomyces cerevisiae*: a role for SAE2/COM1 // Genetics. 2001. V. 158. № 1. P. 109–122.
- Reddy Y.V., Perkins E.J., Ramsden D.A. Genomic instability due to V(D)J recombination-associated transposition // Genes Dev. 2006. V. 20. № 12. P. 1575–1582.
- Rhind N., Russell P. Chk1 and Cds1: linchpins of the DNA damage and replication checkpoint pathways // J. Cell Sci. 2000. V. 113. P. 3889–3896.
- Rhind N., Russell P. The *Schizosaccharomyces pombe* S-phase checkpoint differentiates between different types of DNA damage // Genetics. 1998. V. 149. № 4. P. 1729–1737.
- Richardson C., Stark J.M., Ommundsen M., Jasin M. Rad51 overexpression promotes alternative double-strand break repair pathways and genome instability // Oncogene. 2004. V. 23. № 2. P. 546–553.
- Rodewald H.R., Fehling H.J. Molecular and cellular events in early thymocyte development // Adv. Immunol. 1998. V. 69. P. 1–112.
- Rodrigue A., Lafrance M., Gauthier M.C. *et al.* Interplay between human DNA repair proteins at a unique double-strand break *in vivo* // The EMBO J. 2006. V. 25. № 1. P. 222–231.
- Rogachev V.A., Likhacheva A., Vratskikh O. *et al.* Qualitative and quantitative characteristics of the extracellular DNA delivered to the nucleus of a living cell // Cancer Cell Int. 2006. V. 6. http://www.cancerci.com/content/6/1/23.
- Rogakou E.P., Boon C., Redon C., Bonner W.M. Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks *in vivo* // J. Cell Biol. 1999. V. 146. № 5. P. 905–916.
- Rubnitz J., Subramani S. The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells // Mol. Cell Biol. 1984. V. 4. № 11. P. 2253–2258.
- Saintigny Y., Lopez B.S. Homologous recombination induced by replication inhibition, is stimulated by expression of mutant p53 // Oncogene. 2002. V. 21. № 3. P. 488–492.
- Sakasai R., Shinohe K., Ichijima Y. *et al.* Differential involvement of phosphatidylinositol 3-kinase-

- related protein kinases in hyperphosphorylation of replication protein A2 in response to replication-mediated DNA double-strand breaks // Genes Cells. 2006. V. 11. № 3. P. 237–246.
- 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. № 16. P. 7158–7169.
- Sanchez Y., Bachant J., Wang H. *et al.* Control of the DNA damage checkpoint by chk1 and rad53 protein kinases through distinct mechanisms // Science. 1999. V. 286. № 5442. P. 1166–1171.
- Sanches R., D'Incan C., Kuiper M. *et al.* Autologous fibroblasts as potential vehicle for regional ovarian cancer gene therapy // Adv. Exp. Med. Biol. 1998. V. 451. P. 331–334.
- Sanchez Y., Wong C., Thoma R.S. *et al.* Conservation of the Chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to Cdk regulation through Cdc25 // Science. 1997. V. 277. № 5331. P. 1497–1501.
- Savill J., Fadok V., Henson P., Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis // Immunol. Today. 1993. V. 14. № 3. P. 131–136.
- Schildkraut E., Miller C.A., Nickoloff J.A. Transcription of a donor enhances its use during double-strand break-induced gene conversion in human cells // Mol. Cell Biol. 2006. V. 26. № 8. P. 3098–3105.
- Scott S.P., Pandita T.K. The cellular control of DNA double-strand breaks // J. Cell Biochem. 2006. V. 99. № 6. P. 1463–1475.
- Shechter D., Costanzo V., Gautier J. ATR and ATM regulate the timing of DNA replication origin firing // Nat. Cell Biol. 2004. V. 6. № 7. P. 648–655.
- Slebos R.J., Resnick M.A., Taylor J.A. Inactivation of the p53 tumor suppressor gene via a novel *Alu* rearrangement // Cancer Res. 1998. V. 58. № 23. P. 5333–5336.
- Smith K. Theoretical mechanisms in targeted and random integration of transgene DNA // Reprod. Nutr. Dev. 2001. V. 41. № 6. P. 465–485.
- Smith A.J., Berg P. Homologous recombination between defective neo genes in mouse 3T6 cells // Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 1984. V. 49. P. 171–181.
- Sørensen C.S., Syljuåsen R.G., Falck J. *et al.* Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A// Cancer Cell. 2003. V. 3. № 3. P. 247–258.
- Sun Y., Jiang X., Chen S. *et al.* A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 37. P. 13182–13187.
- Syljuåsen R.G., Sørensen C.S., Hansen L.T. et al.

- Inhibition of human Chk1 causes increased initiation of DNA replication, phosphorylation of ATR targets, and DNA breakage // Mol. Cell Biol. 2005. V. 25. № 9. P. 3553–3562.
- Symington L.S. Focus on recombinational DNA repair // The EMBO Rep. 2005. V. 6. № 6. P. 512–517.
- Székvölgyi L., Rákosy Z., Bálint B.L. *et al.* Ribonucleoprotein-masked nicks at 50-kbp intervals in the eukaryotic genomic DNA// Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. № 38. P. 14964–14969.
- Takata M., Sasaki M.S., Sonoda E. *et al.* Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells // The EMBO J. 1998. V. 17. № 18. P. 5497–5508.
- Tanooka H., Ootsuyama A., Sasaki H. Homologous recombination between p53 and its pseudogene in a radiation-induced mouse tumor // Cancer Res. 1998. V. 58. № 24. P. 5649–5651.
- Tercero J.A., Labib K., Diffley J.F. DNA synthesis at individual replication forks requires the essential initiation factor Cdc45p // The EMBO J. 2000. V. 19. № 9. P. 2082–2093.
- Thomas K.R., Deng C., Capecchi M.R. High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors // Mol. Cell Biol. 1992. V. 12. № 7. P. 2919–2923.
- 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. № 3. P. 419–428.
- Tibbetts R.S., Brumbaugh K.M., Williams J.M. *et al.* A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53 // Genes Dev. 1999. V. 13. № 2. P. 152–157.
- Tutt A., Bertwistle D., Valentine J. *et al.* Mutation in *Brca2* stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences // The EMBO J. 2001. V. 20. № 17. P. 4704–4716.
- Vassin V.M., Wold M.S., Borowiec J.A. Replication protein A (RPA) phosphorylation prevents RPA association with replication centers // Mol. Cell Biol. 2004. V. 24. № 5. P. 1930–1943.
- Vatolin S.Y., Okhapkina E.V., Matveeva N.M. *et al.* Scheduled perturbation in DNA during *in vitro* differentiation of mouse embryo-derived cells // Mol. Reprod. Dev. 1997. V. 47. № 1. P. 1–10.
- Vispé S., Cazaux C., Lesca C., Defais M. Overexpression of Rad51 protein stimulates homologous recombination and increases resistance of mammalian cells to ionizing radiation // Nucl. Acids Res. 1998. V. 26. № 12. P. 2859–2864.
- Walter J., Newport J. Initiation of eukaryotic DNA repli-

- cation: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase alpha // Mol. Cell. 2000. V. 5. № 4. P. 617–627.
- Walworth N.C., Bernards R. rad-dependent response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint // Science. 1996. V. 271. № 5247. P. 353–356.
- Wang X., Peterson C.A., Zheng H. *et al.* Involvement of nucleotide excision repair in a recombination-independent and error-prone pathway of DNA interstrand cross-link repair // Mol. Cell Biol. 2001. V. 21. № 3. P. 713–720.
- Ward I.M., Chen J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress // J. Biol. Chem. 2001. V. 276. № 51. P. 47759–47762.
- Warren A.J., Mustra D.J., Hamilton J.W. Detection of mitomycin C-DNA adducts in human breast cancer cells grown in culture, as xenografted tumors in nude mice, and in biopsies of human breast cancer patient tumors as determined by (32)P-postlabeling // Clin. Cancer Res. 2001. V. 7. № 4. P. 1033–1042.
- Weinstock D.M., Jasin M. Alternative pathways for the repair of RAG-induced DNA breaks // Mol. Cell Biol. 2006. V. 26. № 1. P. 131–139.
- Willett-Brozick J.E., Savul S.A., Richey L.E., Baysal B.E. Germ line insertion of mtDNA at the breakpoint junction of a reciprocal constitutional translocation // Hum. Genet. 2001. V. 109. № 2. P. 216–223.
- Würtele H., Little K.C., Chartrand P. Illegitimate DNA integration in mammalian cells // Gene Ther. 2003. V. 10. № 21. P. 1791–1799.
- Yakubov L.A., Deeva E.A., Zarytova V.F. *et al.* Mechanism of oligonucleotide uptake by cells: involvement of specific receptors // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1989. V. 86. № 17. P. 6454–6458.
- Yakubov L.A., Popova N.A., Nikolin V.P. *et al.* Extracellular genomic DNA protects mice against radiation and chemical mutagens // Genome Biol. 2003. V. 5. P. 3.
- Yakubov L.A., Rogachev V.A., Likhacheva A.C. *et al.*Natural human gene correction by small extracellular genomic DNA fragments // Cell Cycle. 2007. V. 6.
 № 18. P. 2293–2301.
- Yamamoto T., Horikoshi M. Novel substrate specificity of the histone acetyltransferase activity of HIV-1-Tat interactive protein Tip60 // J. Biol. Chem. 1997. V. 272. № 49. P. 30595–30598.
- Yoo H.Y., Jeong S.Y., Dunphy W.G. Site-specific phosphorylation of a checkpoint mediator protein controls its responses to different DNA structures // Genes Dev. 2006. V. 20. № 7. P. 772–783.
- Yoo H.Y., Shevchenko A., Shevchenko A., Dunphy W.G. Mcm2 is a direct substrate of ATM and ATR during

- DNA damage and DNA replication checkpoint responses // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. № 51. P. 53353–53364.
- Zamecnik P., Aghajanian J., Zamecnik M. *et al.* Electron micrographic studies of transport of oligodeo-xynucleotides across eukaryotic cell membranes // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. № 8. P. 3156–3160.
- Zhao H., Watkins J.L., Piwnica-Worms H. Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. № 23. P. 14795–14800.
- Zhou B.B., Elledge S.J. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective // Nature. 2000. V. 408. № 6811. P. 433–439.
- Zou L. Single- and double-stranded DNA: building a trigger of ATR-mediated DNA damage response // Genes Dev. 2007. V. 21. № 8. P. 879–885.
- Zou L., Elledge S.J. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes // Science. 2003. V. 300. № 5625. P. 1542–1548.
- Zou L., Stillman B. Formation of a preinitiation complex by S-phase cyclin CDK-dependent loading of Cdc45p onto chromatin // Science. 1998. V. 280. № 5363. P. 593–596.

INVOLVEMENT OF EXOGENOUS DNA IN THE MOLECULAR PROCESSES IN SOMATIC CELL

A.S. Likhacheva¹, V.A. Rogachev¹, V.P. Nikolin¹, N.A. Popova¹, A.G. Shilov¹, T.E. Sebeleva¹, D.N. Strunkin², E.R. Chernykh³, E.L. Gel'fgat³, S.S. Bogachev¹, M.A. Shurdov⁴

¹ Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia; e-mail: gorbi@bionet.nsc.ru; ² Municipal Hospital, Oncology Department, Novosibirsk, Russia; ³ Institute of Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russia; ⁴ LLC Panagen, Gorno-Altaisk, Russia

Summary

This review formulates the concept of a recombinogenic situation that emerges in the cell upon appearance of the double-stranded ends of chromosomal origin in the nuclear space. It is assumed that this is the particular moment when exogenous DNA fragments are able to integrate in a large-scale fashion into the genome of somatic cell either in a culture or in an organism. The double-stranded ends appear as a result of a DNA strand break caused by γ-radiation, free radicals, rearrangement of the immunoglobulin and T-cell receptor genes, differentiation of blood stem cells, aberrant activity of topoisomerases, abnormalities resulting in the arrest of the replication fork, or crosslinking cytostatic treatment. The system of hierarchical transducing kinases responds to these changes in the genome by the cell cycle arrest, which leads to activation of the cell repair system. In certain cases, the final phase of such activation is the homologous recombination involving the homologous segments of sister chromatids or homologous chromosomes as donor sequences. At this particular moment, the exogenous DNA can be integrated into the recipient genome. Presumably, the integration follows one of the known mechanisms: synthesis-dependent strand annealing (SDSA), gene-conversion recombination, crossing over, or nonhomologous end-joining (NHRJ) of the broken ends. If over ~30 exogenous DNA fragments (60 double-stranded ends) are present per a healthy cell with a nonactivated recombinogenic situation, the double stranded ends of the exogenous DNA induce the cell cycle arrest, which is likely to lead to DNA utilization without its integration into the host genome. It is assumed that the recombingenic situation is permanently characteristic of the neotransformed cells.

In the context and terms of the proposed concept, several phenomena of a pleiotropic action of the fragmented exogenous DNA are considered and grouped according to their mechanisms. A leukocyte- and erythrocyte-stimulating action, radioprotective effect, and the rescue of blood stem cells (and eventually, mice) from the lethal doses of γ -radiation have been demonstrated as well as the feasibility of cancer phenotype reversion to the wild type due to the restoration of caspase-3 gene in the MCF-7 human mammary carcinoma cells. It has been shown that the combination of cytostatic factor and exogenous DNA fragments allows for integrating human exogenous DNA fragments into the recipient genome of adult mouse in a large-scale fashion.