

doi 10.18699/vjgb-24-106

## Концепция природной реконструкции генома.

### Часть 2. Влияние фрагментов экстраклеточной двуцепочечной ДНК на гемопоэтические стволовые клетки

В.С. Рузанова <sup>1&</sup>, С.Г. Ошихмина <sup>1, 2&</sup>, А.С. Проскурина <sup>1</sup>, Г.С. Риттер <sup>1</sup>, С.С. Кирикович <sup>1</sup>,  
Е.В. Левитес <sup>1</sup>, Я.Р. Ефремов <sup>1</sup>, Т.В. Карамышева<sup>1</sup>, М.И. Мещанинова <sup>3</sup>, А.А. Мамаев<sup>4</sup>, О.С. Таранов <sup>5</sup>,  
А.С. Богачев<sup>2</sup>, С.В. Сидоров<sup>6</sup>, С.Д. Никонов<sup>7</sup>, О.Ю. Леплина <sup>8</sup>, А.А. Останин <sup>8</sup>, Е.Р. Черных <sup>8</sup>,  
Н.А. Колчанов <sup>1</sup>, Е.В. Долгова <sup>1#</sup>, С.С. Богачев <sup>1#</sup> 

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

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>4</sup> ООО «Лаборатория Ангиофарм», Новосибирск, Россия

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

<sup>6</sup> Городская клиническая больница № 1, Новосибирск, Россия

<sup>7</sup> Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза, Новосибирск, Россия

<sup>8</sup> Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, Новосибирск, Россия

 labmolbiol@mail.ru

**Аннотация.** В настоящей части исследования доказывается первая составляющая концепции «природной реконструкции генома». На модельных организмах мышь и человек показано, что CD34+ гемопоэтические предшественники костного мозга захватывают фрагменты экстраклеточной двуцепочечной ДНК естественным природным механизмом. Известно, что в процессе интернализации экстраклеточных фрагментов ДНК принимают участие структуры гликокаликса, в состав которых входят гликопротеины/протеогликаны, гликозилфосфатидинозитол-закоренные белки и сквенджер-рецепторы. Проведенный биоинформационный анализ свидетельствует, что основные поверхностные маркерные белки гемопоэтических стволовых клеток относятся к указанным группам факторов и содержат специфические сайты связывания ДНК, включающие гепарин-связывающий домен и кластеры положительно заряженных аминокислотных остатков. С использованием системы Electrophoretic mobility shift assay показано прямое взаимодействие CD34 и CD84 (SLAMF5) гликопротеинов, маркеров гемопоэтических стволовых клеток, с фрагментами двуцепочечной ДНК. В клетках, негативных по CD34, также интернализирующих фрагменты, происходит конкатемеризация доставленных внутрь клетки фрагментов. При этом в одну структуру сшивается до пяти мономеров олигонуклеотидов, содержащих девять теломерных повторов TTAGGG. Доставленные в гемопоэтические стволовые клетки экстраклеточные фрагменты инициируют деление исходной гемопоэтической стволовой клетки таким образом, что одна из дочерних клеток уходит в терминальную дифференцировку, а вторая сохраняет свой низкодифференцированный статус. В составе колоний после обработки клеток костного мозга препаратом hDNA<sup>9T</sup> количество CD34+ клеток возрастает до 3 % (модельный организм – человек). Одновременно обработка препаратом hDNA<sup>9T</sup> индуцирует пролиферацию стволовых клеток крови и их ближайших потомков и стимулирует колониобразование (модельные организмы – мышь, крыса, человек). Наиболее часто в результате обработки экстраклеточной двуцепочечной ДНК активируется гранулоцитарно-макрофагальный росток кроветворения. Процесс коммитирования манифестируется появлением и репарацией пангеномных одноцепочечных разрывов. Время перехода в направлении дифференцировки (время появления и репарации пангеномных одноцепочечных разрывов) составляет около 7 суток. Предполагается, что в момент инициации пангеномных одноцепочечных разрывов в клетке создается «рекомбиногенная ситуация» и активируются молекулярные репаративно-рекомбинационные механизмы. Во всех проведенных экспериментах по анализу индивидуальных молекул в качестве фактора сравнения использовался ангиогенин рекомбинантный человеческий. Во всех других экспериментах одной из сравниваемых групп являлись гемопоэтические стволовые клетки, обработанные ангиогенином.

**Ключевые слова:** гемопоэтические стволовые клетки; экстраклеточная ДНК; интернализация; терминальная дифференцировка; одноцепочечные разрывы.

**Для цитирования:** Рузанова В.С., Ошихмина С.Г., Проскурина А.С., Риттер Г.С., Кирикович С.С., Левитес Е.В., Ефремов Я.Р., Карамышева Т.В., Мещанинова М.И., Мамаев А.А., Таранов О.С., Богачев А.С., Сидоров С.В., Никонов С.Д., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Колчанов Н.А., Долгова Е.В., Богачев С.С. Концепция природной реконструкции генома. Часть 2. Влияние фрагментов экстраклеточной двуцепочечной ДНК на гемопоэтические стволовые клетки. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(8):993-1007. doi 10.18699/vjgb-24-106

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

## A concept of natural genome reconstruction.

### Part 2. Effect of extracellular double-stranded DNA fragments on hematopoietic stem cells

V.S. Ruzanova <sup>1&</sup>, S.G. Oshikhmina <sup>1, 2&</sup>, A.S. Proskurina <sup>1</sup>, G.S. Ritter <sup>1</sup>, S.S. Kirikovich <sup>1</sup>, E.V. Levites <sup>1</sup>,  
Y.R. Efremov <sup>1</sup>, T.V. Karamysheva<sup>1</sup>, M.I. Meschaninova <sup>3</sup>, A.L. Mamaev<sup>4</sup>, O.S. Taranov <sup>5</sup>, A.S. Bogachev<sup>2</sup>, S.V. Sidorov<sup>6</sup>,  
S.D. Nikonov<sup>7</sup>, O.Y. Leplina <sup>8</sup>, A.A. Ostanin <sup>8</sup>, E.R. Chernykh <sup>8</sup>, N.A. Kolchanov <sup>1</sup>, E.V. Dolgova <sup>1#</sup>, S.S. Bogachev <sup>1#</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

<sup>4</sup> Laboratory Angiopharm LLC, Novosibirsk, Russia

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

<sup>6</sup> City Clinical Hospital No. 1, Novosibirsk, Russia

<sup>7</sup> Novosibirsk Tuberculosis Research Institute, Novosibirsk, Russia

<sup>8</sup> Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russia

 labmolbiol@mail.ru

**Abstract.** In this part of the study, the first component of the concept of "natural genome reconstruction" is being proven. It was shown with mouse and human model organisms that CD34+ hematopoietic bone marrow progenitors take up fragments of extracellular double-stranded DNA through a natural mechanism. It is known that the process of internalization of extracellular DNA fragments involves glycocalyx structures, which include glycoproteins/protein glycans, glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins and scavenger receptors. The bioinformatic analysis conducted indicates that the main surface marker proteins of hematopoietic stem cells belong to the indicated groups of factors and contain specific DNA binding sites, including a heparin-binding domain and clusters of positively charged amino acid residues. A direct interaction of CD34 and CD84 (SLAMF5) glycoproteins, markers of hematopoietic stem cells, with double-stranded DNA fragments was demonstrated using an electrophoretic mobility shift assay system. In cells negative for CD34, which also internalize fragments, concatemerization of the fragments delivered into the cell occurs. In this case, up to five oligonucleotide monomers containing 9 telomeric TTAGGG repeats are stitched together into one structure. Extracellular fragments delivered to hematopoietic stem cells initiate division of the original hematopoietic stem cell in such a way that one of the daughter cells becomes committed to terminal differentiation, and the second retains its low-differentiated status. After treatment of bone marrow cells with hDNA<sup>9r</sup>, the number of CD34+ cells in the colonies increases to 3 % (humans as the model organism). At the same time, treatment with hDNA<sup>9r</sup> induces proliferation of blood stem cells and their immediate descendants and stimulates colony formation (mouse, rat and humans as the model organisms). Most often, the granulocyte-macrophage lineage of hematopoiesis is activated as a result of processing extracellular double-stranded DNA. The commitment process is manifested by the appearance and repair of pangenomic single-strand breaks. The transition time in the direction of differentiation (the time it takes for pangenomic single-strand breaks to appear and to be repaired) is about 7 days. It is assumed that at the moment of initiation of pangenomic single-strand breaks, a "recombinogenic situation" ensues in the cell and molecular repair and recombination mechanisms are activated. In all experiments with individual molecules, recombinant human angiogenin was used as a comparison factor. In all other experiments, one of the experimental groups consisted of hematopoietic stem cells treated with angiogenin.

**Key words:** hematopoietic stem cells; extracellular DNA; internalization; terminal differentiation; single-strand breaks.

**For citation:** Ruzanova V.S., Oshikhmina S.G., Proskurina A.S., Ritter G.S., Kirikovich S.S., Levites E.V., Efremov Y.R., Karamysheva T.V., Meschaninova M.I., Mamaev A.L., Taranov O.S., Bogachev A.S., Sidorov S.V., Nikonov S.D., Leplina O.Y., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Dolgova E.V., Bogachev S.S. A concept of natural genome reconstruction. Part 2. Effect of extracellular double-stranded DNA fragments on hematopoietic stem cells. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(8):993-1007. doi 10.18699/vjgb-24-106

#### Введение

Гемопоэтическая стволовая клетка (ГСК) и ее костномозговая стволовая ниша образуют уникальную клеточную систему, которая формирует и поддерживает на протяжении жизни организма баланс клеточных элементов крови и отвечает за репарацию тканей и органов. Понятие ГСК – сложно-составляющее, характеризует несколько клеточных состояний и несколько типов клеток различной анатомической локализации, развивающихся в различных клеточные ростки. Считается, что существует три класса ГСК: миелоидно-ориентированные, лимфоидно-ориентированные и «сбалансированные», которые имеют различ-

ный потенциал дифференцировки, закрепленный эпигенетически. Клональный анализ свидетельствует, что эти классы клеток состоят из двух популяций: короткоживущих ГСК и долгоживущих прогениторов. Первые уходят в дифференцировку и пролиферацию в течение нескольких недель, тогда как долгоживущие прогениторы находятся в покоящейся стадии G0 на протяжении длительного времени (Muller-Sieburg, Sieburg, 2008).

Общепринято, что долгоживущие покоящиеся ГСК мыши имеют фенотип Lin<sup>-</sup> Kit<sup>+</sup> Sca-1<sup>+</sup> CD150<sup>+</sup> CD34<sup>-</sup> Flk2<sup>-</sup> CD48<sup>-</sup>. На одну ГСК приходится около 30 тысяч мононуклеаров костного мозга, и около 80 % ГСК оста-

ются в состоянии покоя, сохраняя «стволовость», до конца жизни (Morita et al., 2010; Zhang, Sadek, 2014; Wilkinson et al., 2020).

Гемопозитическая стволовая клетка окружена клетками, относящимися к нескольким типам, образующими нишу, в которой ГСК осуществляет свои функции. В составе стволовой ниши определяют эндотелиальные клетки, множественные мезенхимальные типы клеток (адипоциты, CXCL12+ адвентициальные ретикулярные [CAR] клетки, клетки остеоростка, лептинR+ и нестин+ клетки и NG2+ клетки оболочки артериол), а также немиелинизированные шванновские клетки и гемопозитические клетки (макрофаги и мегакариоциты) (Lévesque et al., 2010; Mendelson, Frenette, 2014; Kumar, Geiger, 2017; Szade et al., 2018; Lucas, 2019).

В настоящее время предполагают существование двух типов ниш кроветворных стволовых клеток в костном мозге взрослого человека. Остеобластическая ниша определяет покоящееся состояние ранних примитивных прогениторов, длительно сохраняющих «стволовость». При активации ГСК дифференцируются в предшественники крови, располагающиеся в пределах сосудистой ниши, прилегая к синусоидным эндотелиальным клеткам (Redondo et al., 2017).

Краеугольным, фундаментальным свойством примитивной ГСК является ее имманентный выбор: сохранить покоящееся состояние, поделиться симметрично с образованием двух одинаковых ГСК или поделиться несимметрично и дать коммитированную клетку и далее – развитие определенного клеточного роста.

Функциональность ГСК напрямую связана с балансом между покоем и активацией. Снижение способности ГСК выходить из состояния покоя редуцирует потенциал воспроизводства форменных элементов крови. С другой стороны, если неоправданно большое количество ГСК выходит из состояния покоя или не возвращается в состояние покоя после активации, то происходит истощение пула ГСК, что приводит к функциональной несостоятельности костного мозга (Scharf et al., 2020). Известно, что ГСК молодого организма чаще выходят в симметричное деление или пролиферируют, тогда как прогениторы взрослого и стареющего организма в основном находятся в состоянии покоя (Desterke et al., 2021).

В процессе выбора состояния ГСК принимают участие многие факторы. Первоочередными являются анатомическая локализация ГСК в составе стволовой ниши и связанный с этим уровень гипоксии в области нахождения указанной системы клеток. Гипоксия – один из ключевых факторов состояния ГСК, и большинство покоящихся и примитивных ГСК находятся в гипоксических областях костного мозга с пониженной перфузией крови (Forristal, Levesque, 2014; Zhang, Sadek, 2014). Секретируемые факторы стволовых ниш и самой ГСК, мембран-связанные факторы (Winkler et al., 2012; Forristal, Levesque, 2014; Goncalves et al., 2016; Silberstein et al., 2016; Redondo et al., 2017; Chen T.L. et al., 2018; Scharf et al., 2020; Desterke et al., 2021) являются важнейшими участниками процессов, формирующих биологическое состояние ГСК. При этом один и тот же фактор может выступать как индуктором покоя для одного типа ГСК, так и индуктором перехода в

цикл и коммитирование для другого типа, как это показано для ангиогенина (Goncalves et al., 2016). Мигрирующие периферические лейкоциты и секретируемые ими гистамин и ФНО- $\alpha$ , а также другие клетки костного мозга и периферической крови приводят к активации покоящихся прогениторов (Lucas, 2019; Pinho, Frenette, 2019). Фармакологические препараты различного происхождения, воспаление, голод, ксенобиотики окружающей среды, радиация также определяют судьбу ГСК (Chen T.L. et al., 2018; Scharf et al., 2020; Kiang et al., 2021; Wang et al., 2021).

Несимметричное деление и следующие за этим коммитирование и пролиферация составляют базовый механизм восполнения популяций клеток крови. Этот процесс представляет собой тонко регулируемую цепь событий с разнообразной и многочисленной палитрой возможных индукторов. Как уже было сказано, процесс терминальной дифференцировки, пролиферации и мобилизации ГСК может быть активирован факторами окружающей среды и физиологическими системами организма как системами интегральных раздражителей, формирующих общий вектор ответа ГСК и ее окружения (стволовой ниши). В результате такого воздействия происходит активация молекулярных сигнальных каскадов и генных платформ, определяющих судьбу ГСК и коммитированного потомка (Kulkarni, Kale, 2020). Один из инициирующих факторов этого процесса – воспаление. В результате воспалительной реакции в кровяное русло и лимфатическую систему выбрасывается огромное количество разнообразных активных молекул, включая палитру провоспалительных цитокинов, глюкокортикоидов (Pierce et al., 2017), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) и др., которые выполняют роль триггера выхода покоящейся ГСК в цикл. Также в процессе воспаления, независимо, стерильного или индуцированного патогеном, в кровяном русле появляется значительное количество молекул ДНК апоптотирующих клеток организма (селф-ДНК) или патоген-ассоциированной двуцепочечной ДНК (дцДНК) и РНК (Jiang, Pisetsky, 2005; Saitoh et al., 2010; Lauková et al., 2019; Korabecna et al., 2020; Kananen et al., 2023). Участие воспалительного процесса в терминальной дифференцировке ГСК означает, что все факторы, выделяемые в кровь при воспалении, включая фрагменты экстраклеточной селф/патоген-консумент-ассоциированной ДНК, транзитно, конкурентно или ограничено влияют на принятие решения примитивными предшественниками (Seita, Weissman, 2010). Считается, что воспаление смещает направление дифференцировки гемопозитических предшественников в миелоидном направлении (Kovtonyuk et al., 2016).

В наших недавних работах показано, что стволовые клетки различного генеза, стволовые опухолевые клетки (Ritter et al., 2022), ГСК (Potter et al., 2024) интернализуют фрагменты экстраклеточной дцДНК естественным природным механизмом. Мы полагаем, что это новое свойство низкодифференцированных клеток, в том числе ГСК, является переходным звеном в понимании процессов, протекающих в гемопозитических предшественниках, включая выход в терминальную дифференцировку и пролиферацию при их взаимодействии с фрагментами экстраклеточной дцДНК, циркулирующей в кровяном русле.

Существует еще одно событие, которое представляет собой основу концепции, предложенной в первой части работы. Это появление одноцепочечных разрывов (ников) в геноме стволовых клеток и связь этого процесса с терминальной дифференцировкой прогениторов.

Впервые одноцепочечные разрывы хроматина, возникающие при коммитировании, были описаны в работах конца прошлого века на нескольких эукариотических моделях. Для анализа событий, происходящих с хроматином ядра при коммитировании, использовались индукторы DMSO, бутират натрия, бутирилхолин, ретиноевая кислота. Детекцию одноцепочечных разрывов проводили методами седиментационного анализа (Jacobson et al., 1975; Scher, Friend, 1978), хроматографии на гидроксипатите (Pulito et al., 1983), щелочной фильтрации (McMahon et al., 1984; Voerrigter et al., 1989; Kaminskas, Li, 1989), *in situ* ник-трансляции (Iseki, 1986; Patkin et al., 1995), щелочного электрофореза (McMahon et al., 1984; Vatolin et al., 1997). Оказалось, что появление и репарация одноцепочечных разрывов – дозозависимый и времязависимый процесс, который не коррелирует с направлением дифференцировки (Scher, Friend, 1978; Farzaneh et al., 1982).

Установлено, что никирование хроматина связано с активностью кальций/магний-зависимых ДНКаз, т. е. является энзиматическим, а одноцепочечные разрывы случайны (McMahon et al., 1984; Kaminskas, Li, 1989). Репарация одноцепочечных разрывов сопряжена с активностью ADP-рибозил трансферазы, которая, как считается, через стимуляцию лигазной активности также вовлечена в контроль дифференцировки (Farzaneh et al., 1982; Johnstone, Williams, 1982). Интересные и сложно интерпретируемые результаты получены в работе (Patkin et al., 1995), где методом *in situ* ник-трансляции показано, что метафазные хромосомы стволовых клеток в переходном коммитированном состоянии содержат многочисленные ники.

Таким образом, установлено, что появление одноцепочечных разрывов тесно коррелирует с терминальной дифференцировкой стволовых клеток. Это событие считается наиболее ранней манифестацией начавшегося процесса коммитирования. Одноцепочечные разрывы не связаны с апоптозом, не заканчиваются гибелью клетки, и через определенное время целостность хроматина восстанавливается. Одним из объяснений феномена является предположение, что в момент релаксации генома, связанной с появлением ников, происходит активация генов, необходимых для коммитирования (Jacobson et al., 1975; Farzaneh et al., 1982). Мы полагаем, что обнаруженный феномен является краеугольным камнем всего процесса дифференцировки: биологическим, надмолекулярным, масштабным проявлением смены клеткой своего биологического статуса. Именно пангеномные одноцепочечные разрывы позволяют клетке, по-видимому, с минимальными энергетическими затратами реорганизовать топологию хроматина недифференцированного состояния в новую архитектуру, требующуюся для специализации клетки, что, естественно, связано с принципиальным изменением платформы экспрессирующихся генов, как следует из рассуждений в (Jacobson et al., 1975; Farzaneh et al., 1982). Именно это явление мы попытались охарактеризовать в настоящей части работы в новых экспериментальных ре-

лиях, причем обозначив индуктором процесса экстраклеточные фрагменты дцДНК.

К сожалению, в доступной литературе за последние двадцать лет нам не удалось обнаружить публикации, связанные с появлением и репарацией одноцепочечных разрывов в гемопоэтических стволовых клетках. И абсолютно непонятно, почему это направление, характеризующее терминальный переход низкодифференцированных стволовых клеток различного генеза, не получило дальнейшего развития.

Таким образом, во второй части цикла работ были проведены исследования, характеризующие интернализацию фрагментов дцДНК в ГСК, индукцию этими фрагментами терминальной дифференцировки прогениторов, манифестацией которой являются возникновение и репарация пангеномных одноцепочечных разрывов.

## Материалы и методы

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

**Клетки костного мозга человека.** В работе были использованы клетки криоконсервированного сепарата костного мозга больных лимфомой Ходжкина, предоставленного криобанком НИИФКИ.

**Препарат hDNA<sup>gr</sup>** (реконструктор ДНК генома человека) выделен из плацент здоровых женщин. Тотальная геномная ДНК была фрагментирована до 1–20 нуклеосомных мономеров (200–2000 п. н.) ультразвуковой дезинтеграцией, депротеинизирована с использованием протеиназы К и экстрагирована обработкой фенол-хлороформом.

**Ангиогенин** рекомбинантный человеческий предоставлен ООО «Лаборатория Ангиофарм» (Новосибирск, Россия). Мечение ангиогенина Cy5 проводили согласно протоколу производителя компании Lumiprobe (Германия).

**TAMRA-меченый ДНК зонд.** Флуоресцентное мечение красителем TAMRA ДНК *AluI* повтора человека проводили с использованием ПЦР на основе включения TAMRA-5'-dUTP (дезоксидиридинтрифосфата), как описано в работе (Dolgova et al., 2014).

**Оценка изменения подвижности в геле комплекса белков CD34 и SLAMF5 и ДНК зондов.** Для анализа взаимодействия белков CD34 и SLAMF5 и TAMRA-ДНК зонда и P<sup>32</sup>-меченого двуцепочечного (TTAGGG)<sub>9</sub> теломерного повтора образцы белков и ДНК инкубировали в различных соотношениях и различное время при 37 °C в 10 mM PBS (см. подпись к рис. 1). Включение γP<sup>32</sup>-АТФ

и нативный электрофорез в полиакриамидном геле проводили согласно стандартным процедурам (Маниатис и др., 1984; DNA Cloning..., 1985).

**Выделение клеток костного мозга.** Для выделения костного мозга животных выводили из эксперимента, выдвигали бедренные и большеберцовые кости, отсекали эпифизы и промывали костномозговую полость IMDM+2% FBS. Клеточную суспензию пропускали несколько раз через иглу 21-го калибра, чтобы избавиться от костномозговых розеток, фильтровали через 40 мкм. Клетки пересаживали 10 мин при 400g и ресуспендировали в буфере со 130 мМ хлоридом аммония для лизиса эритроцитов на 3–5 мин. Затем буфер разбавляли в 10 раз PBS, клетки вновь пересаживали, ресуспендировали в среде IMDM и подсчитывали в камере Горяева.

**Интернализация ДНК и ангиогенина в ГСК человека и мыши.** Для окрашивания колоний ГСК к клеткам в 100 мкл среды IMDM добавляли антитела против мышиных Sca-1 и c-Kit согласно протоколу производителя и 0.1 мкг TAMRA-меченой ДНК. Полученная смесь была внесена на чашки Петри (диаметр 35 мм) с колониями ГСК, не касаясь метилцеллюлозы и колоний, и рассредоточена по небольшой площади поверхности. Сбор данных и визуализация выполнялись с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 780 NLO (Zeiss) и программного обеспечения ZenLight.

Для количественного определения TAMRA-положительных клеток в клетках костного мозга или в суспензии клеток колоний 1 млн клеток инкубировали в 400 мкл IMDM с 0.1 мкг TAMRA-ДНК при комнатной температуре в течение 30 мин в темноте. После этого клетки осаждали при 400g в течение 5 мин при 25 °С, промывали небольшим объемом среды и ресуспендировали в конечном объеме среды. В случае клеток c-Kit+/Sca-1+/TAMRA+ оценку окрашивания проводили одновременно.

Для флуоресцентного микроскопического конфокального анализа 5 мкг ангиогенина, меченого Cy5, в форме монопрепарата или в смеси с антителами добавляли к 3 млн клеток костного мозга или колоний, ресуспендированных в 1 мл среды для культивирования клеток в 12-луночном планшете. Через 30–60 мин инкубации клетки анализировали микроскопически с использованием лазерного сканирующего конфокального микроскопа LSM 780 NLO (Zeiss) и программного обеспечения ZenLight. FACS-анализ клеток проводили на проточном цитометре BD FACSAria III в Центре коллективного пользования проточной цитометрии Института цитологии и генетики СО РАН.

**Оценка количества ДНК в ГСК.** Для инкубации клеток колоний ГСК с Alu повтором человека на 10-й день колонии, полученные после индукции клеток костного мозга препаратом hDNA<sup>gr</sup>, были собраны с двух чашек Петри (диаметр 35 мм) добавлением 8 мл среды IMDM, осаждены центрифугированием при 400g в течение 8 мин, после чего клетки снова были промыты 2 мл среды и осаждены. К полученным клеткам был добавлен фрагмент Alu повтора человека до концентрации 0.23 мкг на 1 млн клеток на 30 мин. Далее клетки были отмыты, осаждены центрифугированием при 400g 5 мин и ресуспендированы в 1 мл PBS.

ПЦР в реальном времени проводили с использованием набора BioMaster RT-qPCR (краситель SYBR Green) (#RM03-200, «Биолабмикс», Россия). Для создания калибровочной кривой были выбраны стандартные праймеры M13 (M13 for: 5'-GTAAG-ACGAC-GGCCA-G-3', M13 rev: 5'-CAGGA-AACAG-STATG-AC-3') и различное количество ДНК Alu-повтора (0–5000 пг). Каждую концентрацию испытывали в трех экземплярах. Линейную зависимость содержания Ct от содержания ДНК Alu строили с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager v3.1.

**Обработка клеток костного мозга выбранными индукторами.** Клетки костного мозга, выделенные из старых животных и сепаратов костного мозга больных лимфомой Ходжкина, инкубировали с индукторами (hDNA<sup>gr</sup>, ангиогенин или оба индуктора совместно) в течение 1 ч в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>, влажности 95%, 37 °С из расчета: на 3 млн клеток – 500 мкг hDNA<sup>gr</sup>, либо 500 нг ангиогенина, либо 500 мкг hDNA<sup>gr</sup> и 500 нг ангиогенина совместно в 1 мл среды IMDM без сыворотки. Контрольные клетки костного мозга (без обработок) инкубировали в среде IMDM без сыворотки с добавлением PBS в объеме, равном объему добавленного индуктора к активированным клеткам костного мозга. Термин «индукторы», которым обозначены в исследовании и ДНК, и ангиогенин, используется нами для характеристики любого предполагаемого или ожидаемого ответа ГСК, индуцируемого обработкой этими веществами.

**Культивирование клеток костного мозга в метилцеллюлозной среде.** Клетки костного мозга после/без активации индукторами пересаживали в течение 10 мин при 400g и ресуспендировали в среде IMDM+2% FBS. Для количественного определения и анализа миелоидных предшественников клетки костного мозга мыши помещали в метилцеллюлозную среду MethoCult M3434, а клетки костного мозга крысы и человека – в метилцеллюлозную среду MethoCult H4034 (Stem Cell Technologies). Метилцеллюлозный анализ, подсчет количества колоний и выделение клеток из метилцеллюлозной среды после культивации осуществляли согласно инструкции производителя. Анализ проводили в чашках Петри диаметром 35 мм, хранящихся в процессе развития колоний в чашке Петри большего диаметра с дополнительным увлажнением внутренней атмосферы.

**Анализ количества однопочечных и двуцепочечных разрывов методом «кометных хвостов».** Клетки костного мозга, выделенные из старых мышей и сепаратов костного мозга больных лимфомой Ходжкина, после инкубации с индукторами (ангиогенин, hDNA<sup>gr</sup>, ангиогенин+hDNA<sup>gr</sup>) и без нее культивировали в течение 10–12 дней в метилцеллюлозной среде. При выделении клеток из метилцеллюлозной среды образовавшиеся колонии объединяли и отмывали от среды согласно инструкции производителя. Затем клетки образовавшихся колоний считали в камере Горяева и вновь инкубировали с индукторами. Клетки пересаживали 10 мин при 400g, ресуспендировали в среде IMDM+2% FBS, помещали в метилцеллюлозную среду и рассаживали по лункам в 24-луночном планшете. Каждый день в одно и то же время (спустя 24, 48, 72, 96, 120, 144 ч после начала обработки

индукторами) отбирали образец клеток, отмывая их от метилцеллюлозной среды. Клетки колоний заливали в блоки 1 % легкоплавкой агарозы из расчета 5 тыс. клеток на один блок. До начала анализа блоки хранили в 0.5 М ЭДТА при 4 °С. Нулевая точка представляла собой клетки колоний до повторной обработки индукторами.

Перед электрофорезом блоки споласкивали в ТЕ-буфере, инкубировали с лизирующим буфером (50 мМ ЭДТА, 1 % саркозил (Serva, Гейдельберг, Германия), 1 мг/мл протеназы К (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, США)) в течение 20 мин при 50 °С.

Перед нативным электрофорезом блоки окрашивали в течение 10 мин в буфере ТАЕ, содержащем 0.5 мкг/мл бромистого этидия («Медиген», Новосибирск, Россия). Блоки фиксировали на агарозной подложке и фракционировали электрофоретически в 1хТАЕ буфере при 36 В, 299 мА (камера Model H4 Horizontal Gel Electrophoresis System (BRL, США)) в течение 30 мин.

Щелочной электрофорез проводили в буфере, содержащем 300 мМ NaOH и 1 мМ ЭДТА (pH > 13). Перед щелочным электрофорезом блоки споласкивали в буфере для электрофореза и фиксировали на агарозной подложке. Подложку с блоками помещали в буфер для электрофореза на 30 мин, затем образцы фракционировали при 36 В, 299 мА (камера Model H4 Horizontal Gel Electrophoresis System (BRL, США)) в течение 30 мин. После электрофореза подложку с блоками переносили в нейтральный буфер, содержащий 0.4 М Трис (pH 7.5), на 15 мин. Затем нейтральный буфер меняли на новый, добавляли 1 мкг/мл бромистого этидия и окрашивали подложку с блоками в течение 30 мин.

Подложку с блоками споласкивали дистиллированной водой, делали препараты и высушивали их при 37 °С в течение суток. После сушки препараты 0.5–1 ч отмывали в дистиллированной воде. Микроскопический анализ выполняли в ЦКП микроскопического анализа биологических объектов ИЦиГ СО РАН с использованием Zeiss Axio Imager M2 (Carl Zeiss Microscopy, Оберкохен, Германия). Параметры «кометных хвостов» оценивали в программе CASP (CASP, Вроцлав, Польша) и ImageJ.

**Статистический анализ** проводили с использованием программного обеспечения Statistica 8 (StatSoft, США). Достоверность различий оценивали с помощью U-критерия Манна–Уитни. Статистическая значимость ( $p < 0.05$  или  $p < 0.01$ ) указана в подписях к рисункам.

## Результаты

### Способность ГСК интернализировать фрагменты дцДНК

В наших недавних работах (Dolgova et al., 2014; Petrova et al., 2022; Ritter et al., 2022) открыто и описано новое общебиологическое свойство стволовых клеток различного генеза. Экспериментально показано, что ГСК мыши, а также все проанализированные низкодифференцированные клетки высших эукариот, включая стволовые опухолевые клетки, способны захватывать фрагменты дцДНК окружающей среды естественным природным механизмом. Взаимодействие экстраклеточных дцДНК с клеткой и их интернализация происходят за счет элементов гликокаликса гликопротеинов/протеогликанов, глико-

зилфосфатидилинозитол-заякоренных белков и системы сквенджер-рецепторов и осуществляются кавеоло/клатрин-зависимым механизмом. Важнейшей и характерной особенностью является уникальность паттерна гликопротеинов/протеогликанов, гликозилфосфатидилинозитол-заякоренных белков и сквенджер-рецепторов, расположенных на поверхности клетки одного типа. Эта уникальность ограничивается тремя функциональными доменами, составленными различными представителями указанных трех функциональных доменов, а именно молекулами, относящимися к гликопротеинам/протеогликанам, гликозилфосфатидилинозитол-заякоренным белкам и сквенджер-рецепторам. То есть каждая стволовая клетка может иметь как минимум три функциональных домена, которые определяют контакт экстраклеточных двуцепочечных нуклеиновых кислот с клеткой и их интернализацию. Для молекул дцДНК основным сайтом связывания является гепарин-связывающий домен, представленный на различных белках клеточной поверхности или С1q доменом, или гепарин-связывающим доменом, или доменом положительно заряженных аминокислот (Petrova et al., 2022; Ritter et al., 2022).

В настоящей работе дополнительно была проведена FACS и иммунофлуоресцентная оценка способности ГСК человека в сравнении с ГСК мыши интернализировать фрагменты экстраклеточной дцДНК. В качестве фактора сравнения был выбран ангиогенин рекомбинантный человеческий, для которого известны многие молекулярные подробности его влияния на клетку. Также было оценено количество экстраклеточной дцДНК, доставляемое в CD34+ ГСК человека.

Как сказано выше, в процессе интернализации в стволовые клетки основное участие принимают факторы гликокаликса: гликопротеины/протеогликаны, гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки и система сквенджер-рецепторов. Мы проанализировали последние результаты, содержащие атлас поверхностных маркеров ГСК человека, на предмет присутствия указанных типов белковых молекул (Rix et al., 2022). Показано, что в последовательностях выбранных белков локализованы специфические домены, определяющие интернализацию экстраклеточных фрагментов дцДНК (кластеры позитивно заряженных аминокислотных остатков, гепарин-связывающий домен). Результаты проведенного анализа представлены в таблице. Установлено, что несколько специфических для ГСК поверхностных гликопротеинов, и в первую очередь CD34, содержат требуемые для интернализации домены.

**Характеристика прямого молекулярного взаимодействия дцДНК *Alu*-TAMRA/теломерный повтор ( $n = 9$ ) и белков маркеров ГСК CD34 и CD84 (SLAMF5).** В наших работах (Petrova et al., 2022; Ritter et al., 2022) провозглашается и доказывается идея, что интернализация дцДНК в стволовые клетки различного генеза связана с развитием на мембранах этих клеток структурой гликокаликса, в состав которого входят протеингликаны-гликопротеины, гликозилфосфатидилинозитол-заякоренные белки и белки системы сквенджер-рецепторов. Предполагается, что взаимодействие с этими белками имеет сложную физическую и молекулярную иерархию и что

Специфические поверхностные белки ГСК человека,  
содержащие домены позитивно заряженных аминокислот и гепарин-связывающий домен

Поверхностные маркеры ГСК	Наименование	Положительно заряженные аминокислоты	Гепарин/ДНК связывающие сайты
CD90	Thy-1 membrane glycoprotein	-FSLTRETKKHVLFGTVG-	-
CD34	CD34 molecule	-LVRRGARAGPRMPRGW- -ISSKLQLMKKHQSD-	-EVRPQCLLLVLANRTE-
KIT	KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase	-FLRRKRDS- -ADKRRSVRIG-	-
VNN2 (GPI-80)	Vanin 2	-EGKLVARYHKVC-	-
SPN (CD43)	Sialophorin	-LLLWRRRQKRRTGA- -FGRRKSRQGS-	-RQKRRTGALVLSRGGKRN-
CD44	CD44 molecule	-ILAVCIAVNSRRRCGQKKLV-	-
CD9	CD9 molecule	-AIRRNREM-	-
CD48	CD48 molecule	-FESKFGRVRLD- -GDKRPLPKEL-	-
CD84	CD84 molecule	-TTKRYNLQIYRRLGPKITQ-	-LFKRRQGRIF- (a-helix)
ITGA6 (CD49f)	Integrin subunit alpha 6	-ESHNSRKKREI-	-TLKRQKQK- -FFKRSRYD-
GPRC5C	G-protein coupled receptor class C group 5 member C	-CGRYKRWRKHGV-	-
PROCR (EPCR)	Protein C receptor	-	-
RET	Ret proto-oncogene	-VSRRRRFA-	-ALRRPKCA-
PROM1 (CD133)	Prominin 1	-QVTRIKRSRCLA-	-DCKKNRGT
CD59	CD59 molecule	-	-
PTPRC	Protein tyrosine phosphatase receptor type C	-DLHKKRSC- -ELRHSKRKDS-	-LRRQRCL- (a-helix)

Примечание. Зеленым цветом обозначены кластеры положительно заряженных аминокислот, красным – ДНК связывающие сайты, синим – гепарин-связывающие сайты.

именно физический контакт дцДНК и указанных факторов является основой «протаскивания» дцДНК внутрь клетки.

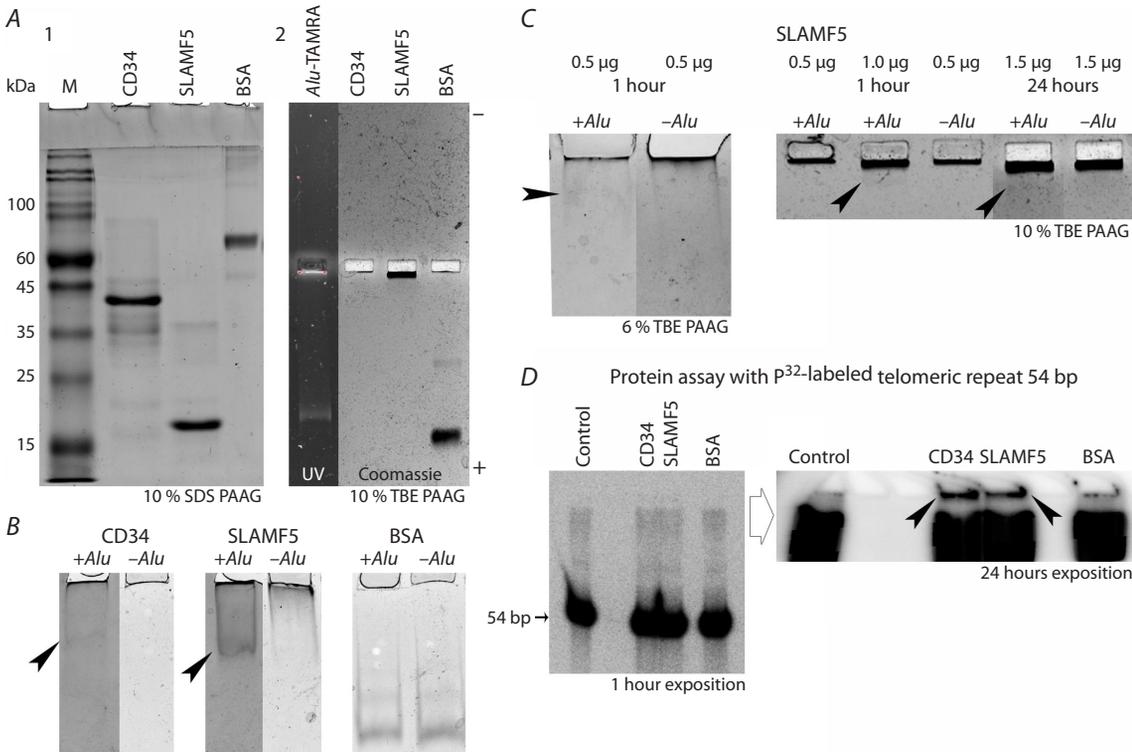
В настоящей серии экспериментов мы попытались оценить возможность прямого физического взаимодействия двух типов молекул: дцДНК и белков-маркеров ГСК. В качестве дцДНК субстрата были выбраны: меченный TAMRA *AluI* зонд, постоянно используемый в лаборатории, и теломерный повтор ( $n = 9$ ) в форме двуцепочечного олигонуклеотида суммарной длиной 54 п.н., меченный P<sup>32</sup>. В качестве отвечающих белковых факторов были выбраны CD34 и CD84 (SLAMF5). Основные характеристики, имеющие отношение к контакту этих белков и дцДНК, указаны в таблице. Результаты проведенных экспериментов представлены на рис. 1 и подробно описаны в подрисуночной подписи. В данной части исследования впервые в прямом эксперименте показана возможность химического/молекулярного/физического взаимодействия молекулы дцДНК и специфических поверхностных маркеров ГСК CD34 и SLAMF5.

**Демонстрация интернализации экстраклеточных дцДНК фрагментов в ГСК (Sca1+ для мыши и CD34+ для человека).** Используя флуоресцентный микроскопический и FACS анализ, мы показали присутствие меченого дцДНК зонда в CD34+ клетках костного мозга человека и Sca1 клетках костного мозга мыши. Фактор сравнения – ангиогенин рекомбинантный человеческий – также

интернализуют примитивные Sca1 гемопоэтические клетки мыши и CD34+ стволовые клетки человека (Приложение 1)<sup>1</sup>. Проведенная оценка количества доставляемой в CD34+ ГСК человека дцДНК зонда свидетельствует, что ~0.02 % экстраклеточных фрагментов (в пересчете на гаплоидный геном) присутствуют во внутреннем пространстве клеток этого типа в данном эксперименте. Полученные расчеты находятся в согласии с нашими многочисленными количественными оценками, в которых показано, что стволовые клетки различного генеза в зависимости от происхождения и состояния захватывают от 0.01 до 3.0 % фрагментов экстраклеточной дцДНК (в пересчете на гаплоидный геном) (Dolgova et al., 2013, 2016, 2019; Potter et al., 2018, 2024).

Была проведена серия экспериментов, прямо демонстрирующих интернализацию экстраклеточных ДНК фрагментов в ГСК (Sca1+ для мыши и CD34+ для человека), полученных из клеток костного мозга (рис. 2, А, В). Известно, что процесс интернализации молекул в клетку состоит из фазы мобилизации на цитоплазматической мембране, фазы интернализации и фазы присутствия и процессинга. В этой связи, чтобы избежать спекуляций по поводу детекции в эксперименте не интернализированных, а мобилизованных на цитоплазматической мембране

<sup>1</sup> Приложения 1–6 см. по адресу:  
<https://vavilovj-icg.ru/download/pict-2024-28/appx35.pdf>



**Рис. 1.** Анализ прямого молекулярного взаимодействия дцДНК *Alu*-TAMRA/теломерный повтор ( $n = 9$ ) и белков маркеров ГСК CD34 и CD84 (SLAMF5).

A – электрофоретический анализ миграции анализируемых факторов в 10 % SDS (1) и 10 % нативном трис-боратном горизонтальном (2) полиакриламидном геле. Маркеры ГСК в нативных условиях не имеют электрофоретической подвижности и не входят в гель. На правой панели часть геля с темным полем демонстрирует миграцию дцДНК *Alu* ДНК зонда. B – оценка изменения электрофоретической подвижности в геле образцов факторов после формирования комплексов с TAMRA *Alu* ДНК зондом. Детектируется мигрирующая фракция белков (CD34, SLAMF5), что свидетельствует о появлении заряда у белковых молекул, который, по-видимому, определяется молекулой ДНК, с которой молекулы белка образовали физическую связь (отмечено стрелками). С BSA изменение миграции белка не детектируется. C – оценка некоторых параметров формирования комплекса между TAMRA *Alu* ДНК зондом и SLAMF5. На левой панели приведена электрофореграмма комплекса ДНК зонда и SLAMF5 в нативном 6 % полиакриламидном геле. Количество белка, нанесенного на гель, идентично в контрольном и экспериментальном образцах. Отчетливо видно формирование мигрирующей фракции белка и одновременное снижение его количества на старте. На правой панели (10 % нативный трис-боратный гель) приведены результаты нескольких режимов формирования комплекса между ДНК зондом и SLAMF5 (отмечено стрелками). Оказалось, что связь белка и ДНК не определяется временем и соотношением молярного количества факторов. Этот факт свидетельствует об отсутствии стехиометрии между TAMRA *Alu* ДНК зондом и SLAMF5. D – оценка ДНК-белкового взаимодействия между CD34, SLAMF5 и BSA с использованием  $P^{32}$ -меченого двуцепочечного олигонуклеотида, содержащего 9 теломерных повторов (54 п.н.). Специфическое взаимодействие между ДНК и белками четко детектируется в образцах CD34 и SLAMF5 (отмечено стрелками).

молекул ДНК, была разработана и применена процедура подготовки образцов клеток, описанная в Приложении 2.

Можно видеть, что исходные молекулы дцДНК зонда сформировали конкатемерные формы (возможно, циклизованные), содержащие до 6–7 повторов (300–350 п.н.) исходного фрагмента (54 п.н.) (см. рис. 2, C, указаны черными стрелками) в клетках, негативных по маркерам ГСК, как для мыши, так и для человека. Этот факт хорошо согласуется с нашими ранними результатами (Dolgova et al., 2013; Potter et al., 2018, 2024). Также четко видно присутствие меченого материала в геномной фракции ДНК мышинной модели.

Настоящее исследование не претендовало на глубокий анализ популяций клеток, обладающих способностью захватывать экстраклеточную ДНК. В исследовании акцент был сделан исключительно на факт интернализации, где показано, аналогично с предыдущими результатами, что CD34+ клетки захватывают внеклеточную ДНК и что в

костном мозге присутствует популяция CD34– клеток, также обладающая способностью интернализировать экстраклеточные дцДНК фрагменты, которая может включать любые варианты как мультипотентных прогениторов, так и коммитированных потомков.

### Терминальная дифференцировка, пролиферация ГСК и колониобразование, индуцированные ангиогенином, hDNA<sup>gr</sup> и совместно обоими индукторами

В работе использовалась геномная фрагментированная до 1–10 нуклеосомных мономеров (физиологический размер ДНК апоптотирующих клеток организма – селф-ДНК, всегда присутствующей в кровяном периферическом русле) депротеинизированная дцДНК человека, носящая название hDNA<sup>gr</sup>, или геномный реконструктор. В качестве индуктора для сравнения использовался ангиогенин рекомбинантный человеческий.



### Оценка возможности интернализации TAMRA-меченого ПЦР фрагмента 500 п. н. клетками колоний, отобранных на 7-е, 15-е сутки культивирования на метилцеллюлозе

Во всех наших работах лейтмотивом является идея, что экстраклеточные фрагменты ДНК поглощают примитивные стволовые предшественники. Для человека такими клетками являются CD34+ прогениторы. В нашей работе (Potter et al., 2024) на мышинной модели было показано, что в сформированных колониях после индукции терминальной дифференцировки фрагментами экстраклеточной дцДНК количество примитивных прогениторов гемопоэза существенно возрастает. Это позволяет использовать их для анализа различных событий, происходящих с ГСК, что невозможно сделать с ГСК костного мозга.

Аналогичная работа была проведена на модели клеток криоконсервированного костного мозга человека. Оценено процентное содержание CD34+ стволовых клеток в колониях, образованных ГСК после их индукции в составе клеток костного мозга индукторами hDNA<sup>gt</sup>, ангиогенином и совместно. Оказалось, что при обработке ГСК в составе клеток костного мозга hDNA<sup>gt</sup> на 15-е сутки культивирования количество таких клеток в колониях увеличивается до 2.7 % vs 1.56 % в конкретном эксперименте (клетки костного мозга после стимуляции GM-CSF). То есть в колониях есть достаточное количество клеток, потенциальных к интернализации экстраклеточного генетического материала, требующихся для уверенной детекции присутствия в клетке экстраклеточного материала ДНК. Ни ангиогенин, ни совместное применение препаратов не увеличивало количество гемопоэтических предшественников в колониях (Приложение 4).

### Анализ формирования пангеномных одноцепочечных разрывов в клетках колоний потомков примитивных прогениторов, обработанных индуктором hDNA<sup>gt</sup> в составе клеток костного мозга

В ранних работах, проанализированных в разделе Введение, было показано, что в процессе коммитирования при индукции терминальной дифференцировки геном эмбриональных стволовых клеток вскрывается пангеномными одноцепочечными разрывами, которые репарируются, не приводя к гибели клетки. Мы полагаем, что этот процесс необходим для смены архитектуры хроматина, характеризующей недифференцированные стволовые клетки крови, на пространственную организацию экспрессирующихся генов, характерную уже для коммитированного потомка (Jacobson et al., 1975; Scher, Friend, 1978; Farzaneh et al., 1982; McMahon et al., 1984; Boerigter et al., 1989; Kaminshkas, Li, 1989; Vatolin et al., 1997).

Было сделано предположение, что это общий процесс для любого типа примитивных прогениторов, в том числе для ГСК. Анализ, проведенный в первой части исследования и в работе (Potter et al., 2024), свидетельствовал, что выбранные индукторы индуцируют колониюобразование и терминальную дифференцировку активированных ими ГСК костного мозга мышей, крыс, человека. Значит, ситуация появления пангеномных одноцепочечных разрывов может тоже быть неотъемлемой частью биологии ГСК. Для мыши доля ГСК колоний составляла 12–15 % (Potter

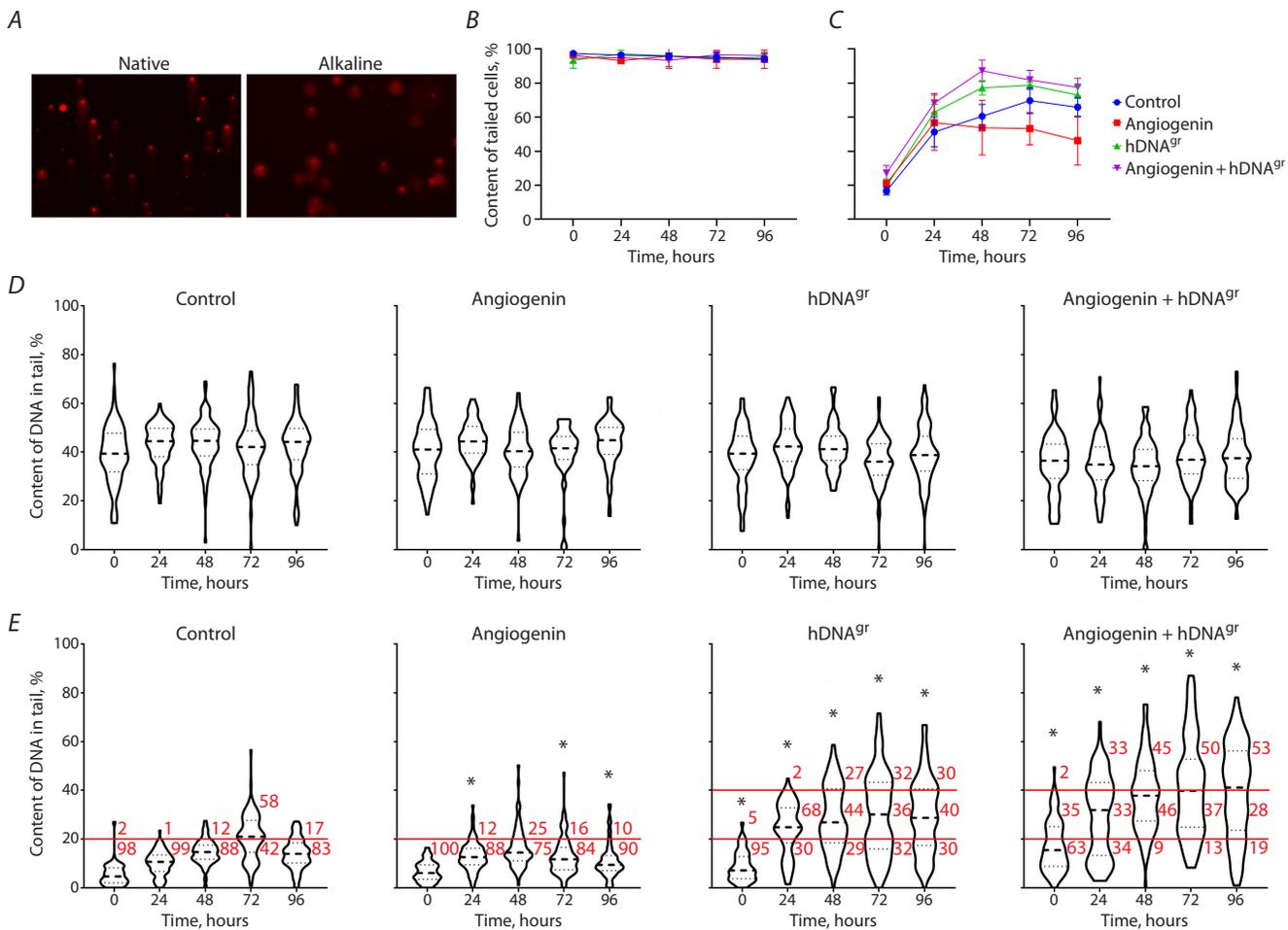
et al., 2024), для человека в колониях количество ГСК увеличивается до ~3 % (см. Приложение 4). Следовательно, при анализе клеток колонии, образованной ГСК костного мозга после ее однократной индукции в составе костного мозга, и после повторной индукции клеток этой колонии на 15-е сутки будет достаточно клеток, сохранивших недифференцированное состояние и претерпевающих терминальную дифференцировку, в которых можно будет определить появление одноцепочечных разрывов.

Работа проводилась на мышинной и человеческой моделях с использованием индукторов hDNA<sup>gt</sup>, ангиогенина и совместно обоих препаратов. Также было оценено количество одноцепочечных разрывов в ДНК клеток в колониях на 15-е сутки после всех манипуляций, описанных выше.

Проведенный анализ выявил существенные и достоверные отличия в анализируемых параметрах для разных точек образцов и контроля (рис. 3). Идет увеличение количества клеток с максимальным количеством ДНК в хвосте для человеческой модели в 72–96 ч инкубации и для мышинной модели в 96 ч инкубации для клеток, обработанных препаратом hDNA<sup>gt</sup>. Ангиогенин, как монопрепарат, практически не влияет на индукцию одноцепочечных разрывов и увеличение массы ДНК в хвосте. Повидимому, полное «залечивание» одноцепочечных разрывов для человеческой модели происходит на 7–9-е сутки инкубации (Приложение 5).

Полученные результаты по анализу динамики изменения длины хвостов комет в указанные временные точки позволили оценить ориентировочное количество индуцированных пангеномных одноцепочечных разрывов (рис. 4).

Для оценки количества одноцепочечных разрывов было сделано несколько допущений. Принято, что одна нить ДНК одной хромосомы рвется ником, образуя две равные части. Любые другие варианты предполагали привлечение мощного математического аппарата, что не соответствовало поставленным в работе задачам. Наименьший размер хромосомы составляет приблизительно 50 млн п. н., в этой связи расчет количества разрывов велся на длину наименьшей хромосомы размером ~50 млн п. н. В этом наиболее простом варианте предполагалось, что если нить ДНК рвется на две равные части одним ником (щелочные условия), то длина хвоста, образуемого одной нитью, уменьшается в два раза. Если двумя никами, то каждая из предыдущих частей уменьшается еще в два раза, и т. д. То есть если в первой точке длина хвоста оценивалась как 10 в единицах шкалы, что, как предполагалось, означает отсутствие разрывов или их нативное количество, то длина хвоста, в два раза превышающая длину хвоста первого деления (20), будет соответствовать появлению одного разрыва на исходную длину молекулы (хромосомы). Такой расчет предполагает, что для перехода в следующий интервал необходимо, чтобы все фрагменты ДНК, полученные на предыдущем этапе, получили еще один разрыв. Таким образом, количество разрывов оценивалось по формуле  $2n + 1$ , где  $n$  – количество разрывов предыдущего интервала. На графике толщина кубышки отражает количество клеток в интервале. Количество разрывов, посчитанное для интервала, умножалось на долю клеток в этом интервале, и для указанных моментов времени считалось



**Рис. 3.** Человеческая модель. А – клетки и кометные хвосты при нативном и щелочном электрофорезе. В, С – содержание клеток с хвостом при нативном (В) и щелочном (С) электрофорезе. D, E – диаграммы, отражающие количество клеток с различным содержанием ДНК в хвосте при нативном (D) и щелочном (E) электрофорезе.

Жирной штриховой линией обозначена медиана значений, тонким пунктиром – межквартильный диапазон. Красным цветом указано процентное содержание клеток, в которых содержание ДНК в хвосте составляет от 0 до 20 %, от 20 до 40 % и выше 40 % (соответствующие диапазоны выделены красными линиями). \* Отличия достоверны по сравнению с контрольной группой,  $p < 0.01$ , критерий Манна–Уитни.

среднее количество разрывов на клетку, на основе чего был построен график изменения количества разрывов в зависимости от времени.

В результате проведенной оценки установлено, что при указанном варианте подсчета максимальное количество одноцепочечных разрывов приходится на 72–96 ч (для двух независимых экспериментов) и составляет ~2.5–3.5 ника на 50 млн п. н. хроматина. В контрольном образце количество ников находится в интервале 1.0–1.5 на 50 млн п. н. хроматина (см. рис. 4).

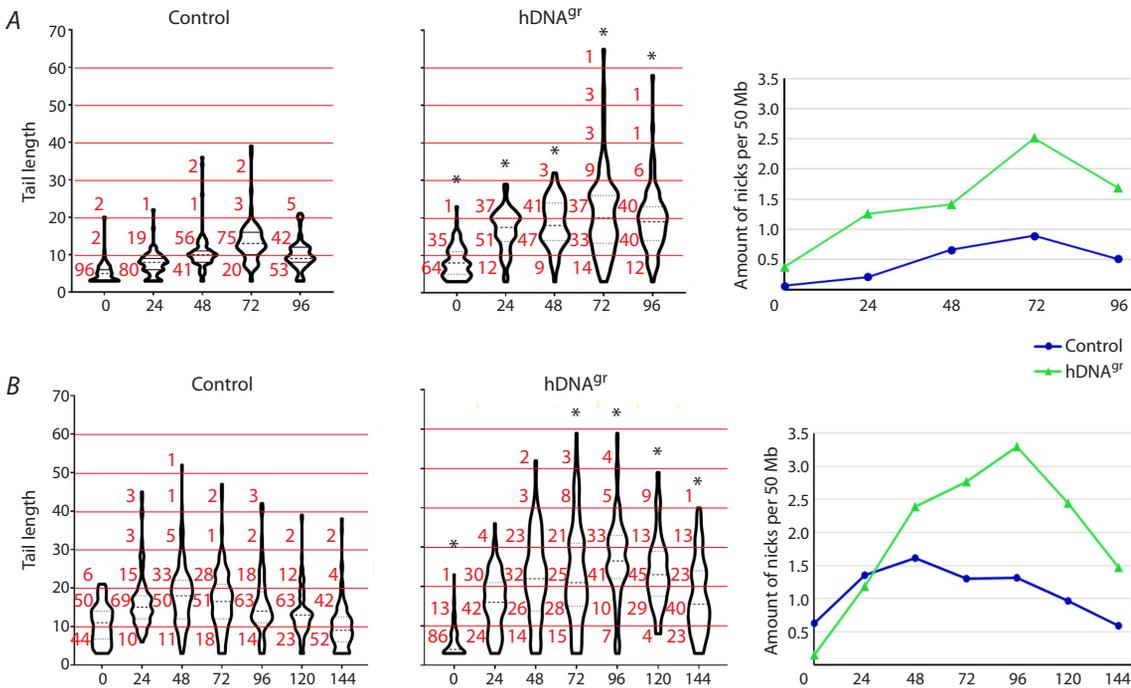
Для образца, обработанного ангиогенином, в точке максимальных пертурбаций хроматина, в клетке, может индуцироваться количество ников, незначительно превышающее контрольные значения, что не противоречит результатам по колониестимуляции, где установлено положительное влияние ангиогенина на развитие нескольких типов колоний.

### Обсуждение

Обнаруженный факт интернализации фрагментов дцДНК в ГСК и индукции ими терминальной дифференцировки

и колониобразования предполагал, что по аналогии с эмбриональными стволовыми клетками (Vatolin et al., 1997) в гемопоэтических стволовых клетках в состоянии терминальной дифференцировки также будут индуцированы одноцепочечные разрывы. Проведенный на двух выбранных моделях анализ свидетельствовал об аналогичном биологическом явлении, происходящем в ГСК. В состоянии терминальной дифференцировки в ГСК появляются, развиваются и репарируются пангеномные одноцепочечные разрывы. Полученный результат вместе с совокупностью экспериментальных данных, представленных в литературных источниках, означал, что мы имеем дело с процессом общебиологического уровня. Пангеномные одноцепочечные разрывы являются необходимым условием переориентации активности генных платформ, определяющих недифференцированное состояние на генные платформы, характерные для коммитированного состояния клетки.

На протяжении последних двух десятилетий основное внимание исследователей уделялось двуцепочечным разрывам и множеству процессов, связанных с их появлением



**Рис. 4.** Результаты двух независимых экспериментов на человеческой модели (A, B).

Приведены диаграммы для контрольной группы клеток и для клеток, обработанных hDNA<sup>gr</sup>, отображающие длину кометных хвостов в условных единицах (ось Y), временные интервалы с шагом 24 ч (ось X). Красным цветом обозначено количество клеток в процентах, длина хвоста которых находится в соответствующем интервале. \* Отличия достоверны по сравнению с контрольной группой,  $p < 0.01$ , критерий Манна–Уитни. Справа приведены графики зависимости рассчитанного количества ников на 50 млн п. н. (ось Y) от временного интервала (ось X).

и индукцией ими репарационно-рекомбинационных событий в клетке (So et al., 2017). Тем не менее за последние несколько лет в научном сообществе вновь возник интерес к никам или одноцепочечным разрывам хромосом, что отражено в том числе в нескольких обзорных работах (Xu, 2015; Vriend, Krawczyk, 2017; Maizels, Davis, 2018; Zilio, Ulrich, 2021). Лейтмотивом нового внимания к никированной ДНК хроматина стала забытая идея ник-иницированной гомологичной рекомбинации. Проведенный анализ говорит о том, что ники представляют собой не менее значимые, чем двуцепочечные разрывы, интермедиаты метаболизма молекулы ДНК хроматина, индуцирующие репарационно-рекомбинационные процессы в клетке. Однако в отличие от двуцепочечных разрывов репарация одноцепочечных разрывов (ников) значительно реже приводит к фатальным изменениям структуры генома. Основной механизм репарации одноцепочечных разрывов – гомологичная рекомбинация.

Сказанное означает, что одноцепочечные разрывы индуцируют развитие в клетке рекомбиогенной ситуации. Идея рекомбиогенной ситуации максимально полно изложена в нашем пионерном обзоре (Лихачева и др., 2008). Термин «рекомбиогенная ситуация» характеризует активность молекулярной машины клетки, запущенной изменением архитектуры хроматина высшего порядка, одним из индукторов которого являются одноцепочечные разрывы.

Основной посыл высказанных в упомянутом обзоре мыслей заключается в том, что если в клетке активирована «рекомбиогенная ситуация» и если в клетке в этот

момент времени присутствуют интернализированные из внеклеточного пространства фрагменты экстраклеточной дцДНК, то указанные фрагменты становятся естественными участниками репарационно-рекомбинационного процесса, запущенного активированными молекулярными механизмами. Это означает, что экстраклеточные фрагменты могут участвовать в рекомбинационном процессе в качестве естественного субстрата для рекомбинации. Таким образом, можно полагать, что найден общебиологический механизм, объясняющий возможность появления в реципиентном геноме внехромосомной генетической информации в результате или прямой гомологичной интеграции экстраклеточных фрагментов дцДНК в реципиентный геном, или формирования стабильных, «генетически» активных экстрахромосомных ассоциатов.

В наших работах охарактеризовано два механизма с участием фрагментов дцДНК в репаративно-рекомбинационных событиях. Так, в статье (Likhacheva et al., 2007) показано участие экзогенной ДНК человека в спасении костномозговых прогениторов мыши от летальной дозы гамма-радиации, что сопровождалось выживанием экспериментальных животных. Сохранение жизнеспособности ГСК связано с интернализацией фрагментов дцДНК в стволовую клетку крови и репаративно-рекомбинационной коррекцией двуцепочечных разрывов хроматина, индуцированных жестким облучением. В серии других наших исследований продемонстрировано участие экстраклеточной дцДНК в процессах блокирования репарации межцепочечных швов в стволовых опухолевых клетках. В результате такого участия стволовая опухолевая клет-

ка не в состоянии завершить репарацию повреждений хроматина, индуцированных цитостатиком, и уходит в апоптотическую гибель (Ruzanova et al., 2022). Другие многочисленные исследования свидетельствуют, что одноцепочечные разрывы индуцируют гомологичную рекомбинацию генетического материала ядра клетки (Vriend, Kawczyk, 2017; Maizels, Davis, 2018).

### Заключение

Таким образом, экстраклеточные дцДНК фрагменты интернализуются в ГСК естественным природным механизмом, индуцируют терминальную дифференцировку стволовых клеток крови и стимулируют колониеобразование. Молекулярной манифестацией этих процессов являются пангеномные одноцепочечные разрывы. Возникновение пангеномных одноцепочечных разрывов индуцирует в стволовой клетке крови рекомбиногенную ситуацию. В ходе этого процесса возможна интеграция фрагментов экстраклеточной дцДНК в реципиентный геном ГСК. Теоретически вероятны несколько вариантов интеграции, а именно: по механизму ends in/ends out, гомологичного реципрокного обмена, в результате геной конверсии или одностороннего отжига, негомологичной интеграции (Rubnitz, Subramani, 1984; Hastings et al., 1993; Li et al., 2001; Langston, Symington, 2004; Chen J.M. et al., 2007; Rass et al., 2012).

В следующих частях цикла исследования мы приводим экспериментальные доказательства как интеграции экстраклеточных фрагментов дцДНК в геном ГСК, так и формирования кольцевых структур, которые образуют комплексы с ДНК хромосом, сохраняющиеся при жестких условиях фракционирования. В Приложении 6 высказываются соображения по поводу событий, связанных с терминальной дифференцировкой ГСК после интернализации экстраклеточной дцДНК, и очевидного противоречия с данными проточной цитометрии, где в колониях CD34+ ГСК не только не исчезают, но их количество увеличивается по сравнению с исходным образцом клеток костного мозга (см. Приложение 4).

### Список литературы / References

Лихачева А.С., Рогачев В.А., Николин В.П., Попова Н.А., Шилов А.Г., Себелева Т.Е., Стрункин Д.Н., Черных Е.Р., Гельфгат Е.Л., Богачев С.С., Шурдов М.А. Участие экзогенной ДНК в молекулярных процессах, протекающих в соматической клетке. *Информ. вестн. ВОГиС*. 2008;12(3):426-473 [Likhacheva A.S., Rogachev V.A., Nikolin V.P., Popova N.A., Shilov A.G., Sebeleva T.E., Strunkin D.N., Chernykh E.R., Gel'fat E.L., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Involvement of exogenous DNA in the molecular processes in somatic cell. *Informatsionny Vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders*. 2008;12(3):426-473 (in Russian)]  
Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Д. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. М.: Мир, 1984 [Maniatis T., Fritch E., Sambrook D. *Methods of Genetic Engineering. Molecular Cloning*. Moscow: Mir Publ., 1984 (in Russian)]  
Boerrigter M.E.T.I., Mullaart E., Van Der Schans G.P., Vijg J. Quiescent human peripheral blood lymphocytes do not contain a sizable amount of preexistent DNA single-strand breaks. *Exp. Cell Res.* 1989;180(2):569-573. doi 10.1016/0014-4827(89)90085-2  
Chen J.M., Cooper D.N., Chuzhanova N., Férec C., Patrinos G.P. Gene conversion: mechanisms, evolution and human disease. *Nat. Rev. Genet.* 2007;8(10):762-775. doi 10.1038/NRG2193

Chen T.L., Chiang Y.W., Lin G.L., Chang H.H., Lien T.S., Sheh M.H., Sun D.S. Different effects of granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin on erythropoiesis. *Stem. Cell Res. Ther.* 2018; 9(1):119. doi 10.1186/S13287-018-0877-2  
Desterke C., Bennaceur-Griscelli A., Turhan A.G. EGR1 dysregulation defines an inflammatory and leukemic program in cell trajectory of human-aged hematopoietic stem cells (HSC). *Stem. Cell Res. Ther.* 2021;12(1):419. doi 10.1186/S13287-021-02498-0  
DNA Cloning. A practical approach. Ed. D.M. Glover. IRL Press, 1985  
Dolgova E.V., Efremov Y.R., Orishchenko K.E., Andrushkevich O.M., Alyamkina E.A., Proskurina A.S., Bayborodin S.I., Nikolin V.P., Popova N.A., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Taranov O.S., Omigov V.V., Minkevich A.M., Rogachev V.A., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Delivery and processing of exogenous double-stranded DNA in mouse CD34+ hematopoietic progenitor cells and their cell cycle changes upon combined treatment with cyclophosphamide and double-stranded DNA. *Gene*. 2013;528(2):74-83. doi 10.1016/j.gene.2013.06.058  
Dolgova E.V., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Tyrinova T.V., Kozev A.V., Minkevich A.M., Andrushkevich O.M., Zavyalov E.L., Romaschenko A.V., Bayborodin S.I., Taranov O.S., Omigov V.V., Shevela E.Y., Stupak V.V., Mishinov S.V., Rogachev V.A., Proskurina A.S., Mayorov V.I., Shurdov M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Identification of cancer stem cells and a strategy for their elimination. *Cancer Biol. Ther.* 2014;15(10):1378-1394. doi 10.4161/cbt.29854  
Dolgova E.V., Potter E.A., Proskurina A.S., Minkevich A.M., Chernykh E.R., Ostanin A.A., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Nikolin V.P., Popova N.A., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Properties of internalization factors contributing to the uptake of extracellular DNA into tumor-initiating stem cells of mouse Krebs-2 cell line. *Stem. Cell Res. Ther.* 2016;7(1):76. doi 10.1186/s13287-016-0338-8  
Dolgova E.V., Petrova D.D., Proskurina A.S., Ritter G.S., Kisaretova P.E., Potter E.A., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Karamysheva T.V., Romanenko M.V., Netesov S.V., Taranov O.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Identification of the xenograft and its ascendant sphere-forming cell line as belonging to EBV-induced lymphoma, and characterization of the status of sphere-forming cells. *Cancer Cell Int.* 2019;19:120. doi 10.1186/S12935-019-0842-X  
Farzaneh F., Zalin R., Brill D., Shall S. DNA strand breaks and ADP-ribosyl transferase activation during cell differentiation. *Nature*. 1982;300(5890):362-366. doi 10.1038/300362A0  
Forristal C.E., Levesque J.-P. Targeting the hypoxia-sensing pathway in clinical hematology. *Stem Cells Transl. Med.* 2014;3(2):135-140. doi 10.5966/SCTM.2013-0134  
Goncalves K.A., Silberstein L., Li S., Severe N., Hu M.G., Yang H., Scadden D.T., Hu G.F. Angiogenin promotes hematopoietic regeneration by dichotomously regulating quiescence of stem and progenitor cells. *Cell*. 2016;166(4):894-906. doi 10.1016/J.CELL.2016.06.042  
Hastings P.J., McGill C., Shafer B., Strathern J.N. Ends-in vs. ends-out recombination in yeast. *Genetics*. 1993;135(4):973-980. doi 10.1093/GENETICS/135.4.973  
Iseki S. DNA strand breaks in rat tissues as detected by in situ nick translation. *Exp. Cell Res.* 1986;167(2):311-326. doi 10.1016/0014-4827(86)90172-2  
Jacobson G.K., Pinon R., Esposito R.E., Esposito M.S. Single-strand scissions of chromosomal DNA during commitment to recombination at meiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1975;72(5):1887-1891. doi 10.1073/PNAS.72.5.1887  
Jiang N., Pisetsky D.S. The effect of inflammation on the generation of plasma DNA from dead and dying cells in the peritoneum. *J. Leukoc. Biol.* 2005;77(3):296-302. doi 10.1189/JLB.0704411  
Johnstone A.P., Williams G.T. Role of DNA breaks and ADP-ribosyl transferase activity in eukaryotic differentiation demonstrated in human lymphocytes. *Nature*. 1982;300(5890):368-370. doi 10.1038/300368A0

- Kaminskas E., Li J.C. DNA fragmentation in permeabilized cells and nuclei. The role of ( $\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$ )-dependent endodeoxyribonuclease. *Biochem. J.* 1989;261(1):17-21. doi 10.1042/BJ2610017
- Kananen L., Hurme M., Bürkle A., Moreno-Villanueva M., Bernhardt J., Debacq-Chainiaux F., Grubeck-Loebenstein B., Malavolta M., Basso A., Piacenza F., Collino S., Gonos E.S., Sikora E., Gradinaru D., Jansen E.H.J.M., Dollé M.E.T., Salmon M., Stuetz W., Weber D., Grune T., Breusing N., Simm A., Capri M., Franceschi C., Slagboom E., Talbot D., Libert C., Raitanen J., Koskinen S., Härkönen T., Stenholm S., Ala-Korpela M., Lehtimäki T., Raitakari O.T., Ukkola O., Kähönen M., Jylhä M., Jylhävä J. Circulating cell-free DNA in health and disease – the relationship to health behaviours, ageing phenotypes and metabolomics. *GeroScience.* 2023;45(1): 85-103. doi 10.1007/S11357-022-00590-8
- Kiang J.G., Zhai M., Lin B., Smith J.T., Anderson M.N., Jiang S. Co-therapy of pegylated G-CSF and ghrelin for enhancing survival after exposure to lethal radiation. *Front. Pharmacol.* 2021;12: 628018. doi 10.3389/FPHAR.2021.628018
- Korabecna M., Zinkova A., Brynychova I., Chylikova B., Prikryl P., Sedova L., Neuzil P., Seda O. Cell-free DNA in plasma as an essential immune system regulator. *Sci. Rep.* 2020;10(1):17478. doi 10.1038/S41598-020-74288-2
- Kovtonyuk L.V., Fritsch K., Feng X., Manz M.G., Takizawa H. Inflamm-aging of hematopoiesis, hematopoietic stem cells, and the bone marrow microenvironment. *Front. Immunol.* 2016;7:502. doi 10.3389/FIMMU.2016.00502
- Kulkarni R., Kale V. Physiological cues involved in the regulation of adhesion mechanisms in hematopoietic stem cell fate decision. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020;8:611. doi 10.3389/FCELL.2020.00611
- Kumar S., Geiger H. HSC niche biology and HSC expansion *ex vivo*. *Trends Mol. Med.* 2017;23(9):799. doi 10.1016/J.MOLMED.2017.07.003
- Langston L.D., Symington L.S. Gene targeting in yeast is initiated by two independent strand invasions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004; 101(43):15392-15397. doi 10.1073/PNAS.0403748101
- Lauková L., Bertolo E.M.J., Zelinková M., Borbélyová V., Čonka J., Gaál Kovalčíková A., Domonkos E., Vlková B., Celec P. Early dynamics of plasma DNA in a mouse model of sepsis. *Shock.* 2019; 52(2):257-263. doi 10.1097/SHK.0000000000001215
- Lévesque J.P., Helwani F.M., Winkler I.G. The endosteal 'osteoblastic' niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia.* 2010;24(12):1979-1992. doi 10.1038/leu.2010.214
- Li J., Read L.R., Baker M.D. The mechanism of mammalian gene replacement is consistent with the formation of long regions of heteroduplex DNA associated with two crossing-over events. *Mol. Cell Biol.* 2001;21(2):501-510. doi 10.1128/MCB.21.2.501-510.2001
- Likhacheva A.S., Nikolin V.P., Popova N.A., Rogachev V.A., Prokhorovich M.A., Sebeleva T.E., Bogachev S.S., Shurdov M.A. Exogenous DNA can be captured by stem cells and be involved in their rescue from death after lethal-dose  $\gamma$ -radiation. *Gene Therapy Mol. Biol.* 2007;11:305-314
- Lucas D. Leukocyte trafficking and regulation of murine hematopoietic stem cells and their niches. *Front. Immunol.* 2019;10:387. doi 10.3389/FIMMU.2019.00387/BIBTEX
- Maizels N., Davis L. Initiation of homologous recombination at DNA nicks. *Nucleic Acids Res.* 2018;46:6962-6973. doi 10.1093/NAR/GKY588
- McMahon G., Alsina J.L., Levy S.B. Induction of a  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease activity during the early stages of murine erythroleukemic cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984; 81(23):7461-7465. doi 10.1073/PNAS.81.23.7461
- Mendelson A., Frenette P.S. Hematopoietic stem cell niche maintenance during homeostasis and regeneration. *Nat. Med.* 2014;20(8): 833-846. doi 10.1038/NM.3647
- Morita Y., Ema H., Nakauchi H. Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J. Exp. Med.* 2010;207(6):1173-1182. doi 10.1084/JEM.20091318
- Muller-Sieburg C., Sieburg H.B. Stem cell aging: survival of the laziest? *Cell Cycle.* 2008;7(24):3798-3804. doi 10.4161/CC.7.24.7214
- Patkin E.L., Kustova M.E., Noniashvili E.M. DNA-strand breaks in chromosomes of early mouse embryos as detected by *in situ* nick translation and gap filling. *Genome.* 1995;38:381-384. doi 10.1139/G95-049
- Petrova D.D., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Ritter G.S., Ruzanova V.S., Efremov Y.R., Potter E.A., Kirikovich S.S., Levites E.V., Taranov O.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. The new general biological property of stem-like tumor cells (Part II: Surface molecules, which belongs to distinctive groups with particular functions, form a unique pattern characteristic of a certain type of tumor stem-like cells). *Int. J. Mol. Sci.* 2022; 23(24):15800. doi 10.3390/ijms232415800
- Pierce H., Zhang D., Magnon C., Lucas D., Christin J.R., Huggins M., Schwart G.J., Frenette P.S. Cholinergic signals from the CNS regulate G-CSF-mediated HSC mobilization from bone marrow via a glucocorticoid signaling relay. *Cell Stem. Cell.* 2017;20:648-658.e4. doi 10.1016/J.STEM.2017.01.002
- Pinho S., Frenette P.S. Haematopoietic stem cell activity and interactions with the niche. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2019;20(5):303-320. doi 10.1038/S41580-019-0103-9
- Potter E.A., Proskurina A.S., Ritter G.S., Dolgova E.V., Nikolin V.P., Popova N.A., Taranov O.S., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Efficacy of a new cancer treatment strategy based on eradication of tumor-initiating stem cells in a mouse model of Krebs-2 solid adenocarcinoma. *Oncotarget.* 2018;9(47):28486-28499. doi 10.18632/oncotarget.25503
- Potter E.A., Dolgova E.V., Proskurina A.S., Ruzanova V.S., Efremov Y.R., Kirikovich S.S., Oshikhmina S.G., Mamaev A.L., Taranov O.S., Bryukhovetskiy A.S., Grivtsova L.U., Kolchanov N.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Bogachev S.S. Stimulation of mouse hematopoietic stem cells by angiogenin and DNA preparations. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2024;57:e13072. doi 10.1590/1414-431X 2024E13072
- Pulito V.L., Miller D.L., Sassa S., Yamane T. DNA fragments in Friend erythroleukemia cells induced by dimethyl sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1983;80(19):5912-5915. doi 10.1073/PNAS.80.19.5912
- Rass E., Grabarz A., Bertrand P., Lopez B.S. Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining. *Cancer Radiother.* 2012;16:1-10. doi 10.1016/J.CANRAD.2011.05.004
- Redondo P.A., Pavlou M., Loizidou M., Cheema U. Elements of the niche for adult stem cell expansion. *J. Tissue Eng.* 2017;8: 2041731417725464. doi 10.1177/2041731417725464
- Ritter G.S., Dolgova E.V., Petrova D.D., Efremov Y.R., Proskurina A.S., Potter E.A., Ruzanova V.S., Kirikovich S.S., Levites E.V., Taranov O.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. The new general biological property of stem-like tumor cells. Part I. Peculiarities of the process of the double-stranded DNA fragments internalization into stem-like tumor cells. *Front. Genetics.* 2022;13:954395. doi 10.3389/fgene.2022.954395
- Rix B., Maduro A.H., Bridge K.S., Grey W. Markers for human haematopoietic stem cells: the disconnect between an identification marker and its function. *Front. Physiol.* 2022;13. doi 10.3389/FPHYS.2022.1009160
- Rubnitz J., Subramani S. The minimum amount of homology required for homologous recombination in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 1984;4(11):2253-2258. doi 10.1128/MCB.4.11.2253-2258.1984
- Ruzanova V., Proskurina A., Efremov Y., Kirikovich S., Ritter G., Levites E., Dolgova E., Potter E., Babaeva O., Sidorov S., Taranov O., Ostanin A., Chernykh E., Bogachev S. Chronometric administration of cyclophosphamide and a double-stranded DNA-Mix at interstrand crosslinks repair timing, called "Karanahan" therapy, is

- highly efficient in a weakly immunogenic Lewis carcinoma model. *Pathol. Oncol. Res.* 2022;28. doi 10.3389/PORE.2022.1610180
- Saitoh T., Fujita N., Yoshimori T., Akira S. Regulation of dsDNA-induced innate immune responses by membrane trafficking. *Autophagy.* 2010;6:430-432. doi 10.4161/AUTO.6.3.11611
- Scharf P., Broering M.F., da Rocha G.H.O., Farsky S.H.P. Cellular and molecular mechanisms of environmental pollutants on hematopoiesis. *Int. J. Mol. Sci.* 2020;21(19):6996. doi 10.3390/IJMS21196996
- Scher W., Friend C. Breakage of DNA and alterations in folded genomes by inducers of differentiation in Friend erythroleukemic cells. *Cancer Res.* 1978;38:841-849
- Seita J., Weissman I.L. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2010;2(6):640-653. doi 10.1002/WSBM.86
- Silberstein L., Goncalves K.A., Kharchenko P.V., Turcotte R., Kfoury Y., Mercier F., Baryawno N., Severe N., Bachand J., Spencer J.A., Papazian A., Lee D., Chitteti B.R., Srour E.F., Hoggatt J., Tate T., Lo Celso C., Ono N., Nutt S., Heino J., Sipilä K., Shioda T., Osawa M., Lin C.P., Hu G.-fu, Scadden D.T. Proximity-based differential single-cell analysis of the niche to identify stem/progenitor cell regulators. *Cell Stem Cell.* 2016;19(4):530-543. doi 10.1016/J.STEM.2016.07.004
- So A., Le Guen T., Lopez B.S., Guirouilh-Barbat J. Genomic rearrangements induced by unscheduled DNA double strand breaks in somatic mammalian cells. *FEBS J.* 2017;284(15):2324-2344. doi 10.1111/FEBS.14053
- Szade K., Gulati G.S., Chan C.K.F., Kao K.S., Miyanishi M., Marjon K.D., Sinha R., George B.M., Chen J.Y., Weissman I.L. Where hematopoietic stem cells live: the bone marrow niche. *Antioxid. Redox Signal.* 2018;29:191. doi 10.1089/ARS.2017.7419
- Vatolin S.Y., Okhapkina E.V., Matveeva N.M., Shilov A.G., Baiborodin S.I., Philimonenko V.V., Zhdanova N.S., Serov O.L. Scheduled perturbation in DNA during in vitro differentiation of mouse embryo-derived cells. *Mol. Reprod. Dev.* 1997;47(1):1-10. doi 10.1002/(SICI)1098-2795(199705)47:1<1::AID-MRD1>3.0.CO;2-R
- Vriend L.E.M., Krawczyk P.M. Nick-initiated homologous recombination: protecting the genome, one strand at a time. *DNA Repair.* 2017;50:1-13. doi 10.1016/J.DNAREP.2016.12.005
- Wang S., Zhang Y., Meng W., Dong Y., Zhang S., Teng L., Liu Y., Li L., Wang D. The involvement of macrophage colony stimulating factor on protein hydrolysate injection mediated hematopoietic function improvement. *Cells.* 2021;10(10):2776. doi 10.3390/CELLS10102776
- Wilkinson A.C., Igarashi K.J., Nakauchi H. Haematopoietic stem cell self-renewal in vivo and ex vivo. *Nat. Rev. Genet.* 2020;21(9):541-554. doi 10.1038/s41576-020-0241-0
- Winkler I.G., Barbier V., Nowlan B., Jacobsen R.N., Forristal C.E., Patton J.T., Magnani J.L., Lévesque J.P. Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat. Med.* 2012;18(11):1651-1657. doi 10.1038/NM.2969
- Xu S.Y. Sequence-specific DNA nicking endonucleases. *Biomol. Concepts.* 2015;6(4):253-267. doi 10.1515/BMC-2015-0016
- Zhang C.C., Sadek H.A. Hypoxia and metabolic properties of hematopoietic stem cells. *Antioxid. Redox. Signal.* 2014;20(12):1891-1901. doi 10.1089/ARS.2012.5019
- Zilio N., Ulrich H.D. Exploring the SSBreakome: genome-wide mapping of DNA single-strand breaks by next-generation sequencing. *FEBS J.* 2021;288(13):3948-3961. doi 10.1111/FEBS.15568

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 26.06.2024. После доработки 19.09.2024. Принята к публикации 26.09.2024.