

ПРИЛОЖЕНИЯ

к статье В.С. Рузановой, С.Г. Ошихминой, А.С. Проскуриной, Г.С. Риттера, С.С. Кирикович, Е.В. Левитеса, Я.Р. Ефремова, Т.В. Карамышевой, М.И. Мещаниновой, А.Л. Мамаева, О.С. Таранова, А.С. Богачева, С.В. Сидорова, С.Д. Никонова, О.Ю. Леплиной, А.А. Останина, Е.Р. Черных, Н.А. Колчанова, Е.В. Долговой, С.С. Богачева «Концепция природной реконструкции генома. Часть 2. Влияние фрагментов экстраклеточной двуцепочечной ДНК на гемопоэтические стволовые клетки»

Приложение 1. Интернализации ангиогенина рекомбинантного человеческого и TAMRA+ двуцепочечного ДНК зонда в гемопоэтические низкодифференцированные предшественники мыши и человека

Ангиогенин, известный также как секретируемая рибонуклеаза 5 (РНКаза 5), является членом суперсемейства специфических рибонуклеаз позвоночных (Sheng, Xu, 2016; Yu et al., 2018). В условиях роста ангиогенин способствует пролиферации и повышению выживаемости клеток различных типов (Kishimoto et al., 2005; Yoshioka et al., 2006; Kieran et al., 2008). Стимулирующая рост функция ангиогенина опосредована транскрипцией rRNA (Tsuji et al., 2005) и требует ядерной транслокации ангиогенина (Xu et al., 2003). В условиях генерализованного клеточного стресса (Efremov et al., 2018) ангиогенин транслоцируется в стрессовые гранулы и опосредует продукцию tRNA, производной индуцированной стрессом малой РНК (tiRNA). Эти малые РНК улучшают выживаемость клеток, одновременно подавляя глобальную трансляцию белков, экономя анаболическую энергию и обеспечивая трансляцию белков антиапоптотических генов (Yamasaki et al., 2009; Emara et al., 2010; Ivanov et al., 2011). Установлено, что рекомбинантный ангиогенин ограничивает пролиферацию примитивных гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), поддерживая и сохраняя их стволовость, но стимулирует пролиферацию миелоидных клеток-предшественников. Ангиогенин опосредует продукцию tiRNA в ГСК, но способствует транскрипции rRNA в миелоидных клетках-предшественниках. Такое влияние ангиогенина, по-видимому, связано с метаболическим состоянием этих клеток. В примитивных ГСК, находящихся в гипоксии (элемент генерализованного клеточного стресса), ангиогенин перемещается в цитоплазму и активирует процессы подавления глобальной трансляции белков для экономии анаболической энергии и синтеза антиапоптотических генов. В миелоидных клетках-предшественниках, которые вышли из G0 и гипоксического стресса, ангиогенин сохраняется в ядре и стимулирует рРНК транскрипцию и рост клетки. Эти свойства ангиогенина отражаются в усилении регенерации кроветворения и выживаемости животных при лечении рекомбинантным белком ангиогенином после радиационно-индуцированной недостаточности костного мозга (Goncalves et al., 2016; Silberstein et al., 2016).

Окончание приложения 1

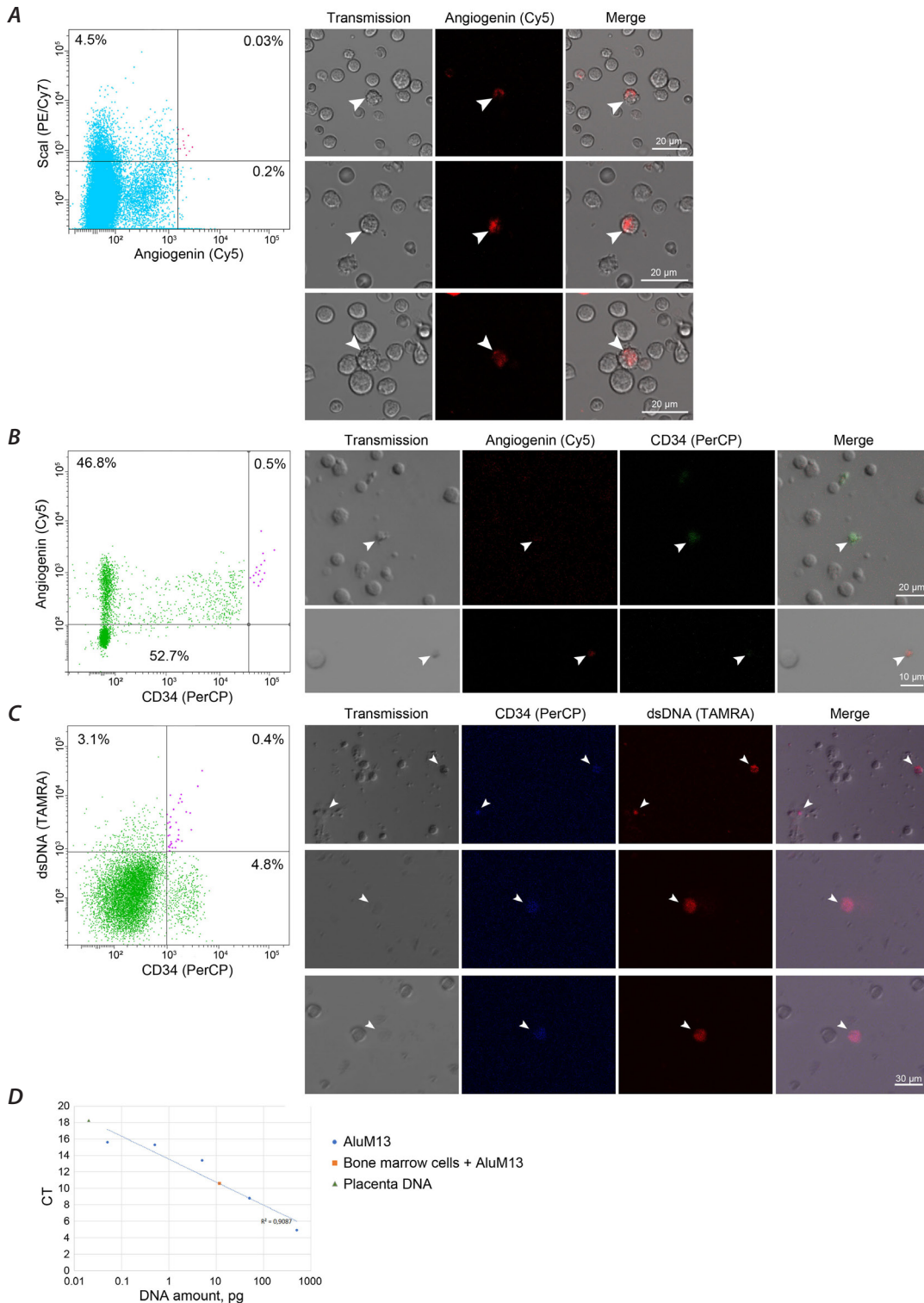


Рис. 1. А – FACS и конфокальный анализ интернализации ангиогенина, меченного Cy5, в гемопоэтические стволовые клетки мыши. 0.03 % Scal клеток интернализируют меченый ангиогенин естественным природным механизмом. **В** – FACS и конфокальный анализ интернализации ангиогенина, меченного Cy5, в гемопоэтические стволовые клетки человека. 0.5 % CD34+ клеток интернализируют меченый ангиогенин естественным природным механизмом. **С** – FACS и конфокальный анализ интернализации TAMRA+ ДНК зонда в гемопоэтические стволовые клетки человека. 0.4 % CD34+ клеток интернализируют меченный TAMRA+ ДНК зонд естественным природным механизмом. **Д** – определение количества интернализированной экстраклеточной ДНК в ГСК человека. В конкретном эксперименте 0.02 % TAMRA+ ДНК зонда (в пересчете на гаплоидный геном человека) интернализируется в ГСК естественным природным механизмом.

Приложение 2. Детали пробоподготовки образцов ДНК, процедуры обработки клеток костного мозга P^{32} -меченым ДНК зондом и краткая логика объяснения полученных результатов

Клетки костного мозга первично обрабатывались γP^{32} -меченым двуцепочечным зондом, содержащим 9 копий теломерных повторов, и далее – специфическими флуоресцентно мечеными антителами к указанным маркерам гемопоэтических стволовых клеток (ГСК). Отмытые от антител и двуцепочечного P^{32} ДНК зонда клетки исчерпывающе обрабатывались ДНКазой I до выхода на плато радиоактивного сигнала осадка клеток (см. таблицу), что свидетельствовало о гидролизе всех молекул ДНК, находившихся в контакте с белками гликокаликса ГСК, но еще не интернализированных клеткой (т. е. ДНК внутреннего пространства клетки). Клетки, несущие две метки, сортировались по специфическому поверхностному маркеру, заливались в блоки легкоплавкой агарозы. После соответствующих обработок была проведена электрофоретическая разгонка материала блоков. Гель или высушивали, или проводили перенос ДНК на мембрану, после чего матрицы радиоавтографировали. Было обнаружено, что меченый материал присутствует как в CD34+ клетках, так и в CD34– клетках. Известно, что только около 50 % клеток, способных интернализировать двуцепочечную ДНК (дцДНК), одновременно несут маркер низкодифференцированных ГСК, при этом более 95 % ГСК одновременно интернализируют дцДНК зонд (Dolgova et al., 2014). Это факт объясняет присутствие радиоактивно меченных фрагментов в обеих популяциях сортированных клеток. Большая интенсивность засветки бэндов в CD34– пробах связана с большим количеством клеток (и соответственно ДНК, ~10X), полученных при сортировке и не выравненных по количеству с CD34+ клетками. При этом количество CD34+, облигатно захватывающих фрагменты экстраклеточной дцДНК, ориентировочно одинаково с количеством CD34– клеток, также захватывающих дцДНК (Dolgova et al., 2014).

Изменение количества меченого материала в различных фракциях образцов клеток после соответствующих обработок

Организм	Клетки	Количество клеток, тыс. шт.	P^{32} , имп/с		
			Осадок клеток	Супернатант после ДНКазы	Осадок клеток после ДНКазы
Мышь	CD34–	1500	130	50	20
	CD34+	130			
Человек	CD34–	1500	620	200	250
	CD34+	55			

Приложение 3. Детальная характеристика колониестимуляции индукторами hDNA^{gr}, ангиогенином и ангиогенином и hDNA^{gr} совместно на трех выбранных модельных системах. Типирование клеток костного мозга человека и оценка пролиферативной активности клеток после обработки индукторами

Мышиная модель. Проанализировано несколько комбинаций и доз препаратов. Показано, что колониестимуляция имеет разную степень выраженности в разных экспериментах и не зависит от проанализированных доз (50, 100, 500 мкг). Ангиогенин и ангиогенин+hDNA^{gr} индуцируют образование колоний гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) костного мозга (рис. 1, А). Сочетание с препаратом hDNA^{gr} не отменяет эффективность колониобразования ангиогенином. Пролиферативная активность наиболее выражена в образцах, обработанных ангиогенином. Сочетание двух препаратов существенно редуцирует пролиферативную активность ГСК и их потомков на метилцеллюлозе по сравнению с ангиогенином в форме монопрепарата.

Крысиная модель. Обработка обоими индукторами и их сочетанием незначительно увеличивает количество колоний (рис. 1, В).

Криоконсервированный костный мозг человека. В работу брались образцы криоконсервированного костного мозга. После размораживания оценивалось влияние ангиогенина и hDNA^{gr} на пролиферацию (рис. 1, С) и апоптоз клеток (рис. 2, А), содержащихся в продукте сепарата периферических стволовых клеток. Относительное содержание клеток в фазе раннего апоптоза и общее количество апоптотических клеток в продукте сепарата непосредственно после размораживания варьировали соответственно от 12 до 16 % и от 13 до 19 %. После 24-часового культивирования в среде без добавок содержание клеток в фазе раннего апоптоза составляло 18.3 %, общее количество апоптотических клеток – 20.6 %. Добавление ангиогенина, hDNA^{gr} или их комбинации значимо не влияло на уровень апоптоза (см. рис. 2, А). После 24-часового культивирования размороженных клеток сепарата в присутствии индукторов относительное содержание CD34+ клеток в культурах значимо не менялось (см. рис. 2, А). Пролиферативная активность CD34+ клеток сепарата, определяемая по содержанию внутриклеточного маркера Ki-67, при спонтанном культивировании составила 2.8 %, в присутствии ангиогенина значимо не изменялась и составила 2.9 %. Культивирование клеток в присутствии hDNA^{gr} приводило к возрастанию пролиферации, что проявлялось в виде выраженной тенденции ($p = 0.068$). Сочетание hDNA^{gr} с ангиогенином приводило к достоверному увеличению пролиферирующих CD34+ клеток (см. рис. 2, А). Таким образом, добавление к клеткам сепарата после его размораживания hDNA^{gr} не влияет на апоптоз CD34+ клеток и усиливает их пролиферацию. Ангиогенин по маркеру Ki-67 не обладает стимулирующим эффектом на пролиферацию и не влияет на способность hDNA^{gr} усиливать пролиферацию CD34+ клеток.

Продолжение приложения 3

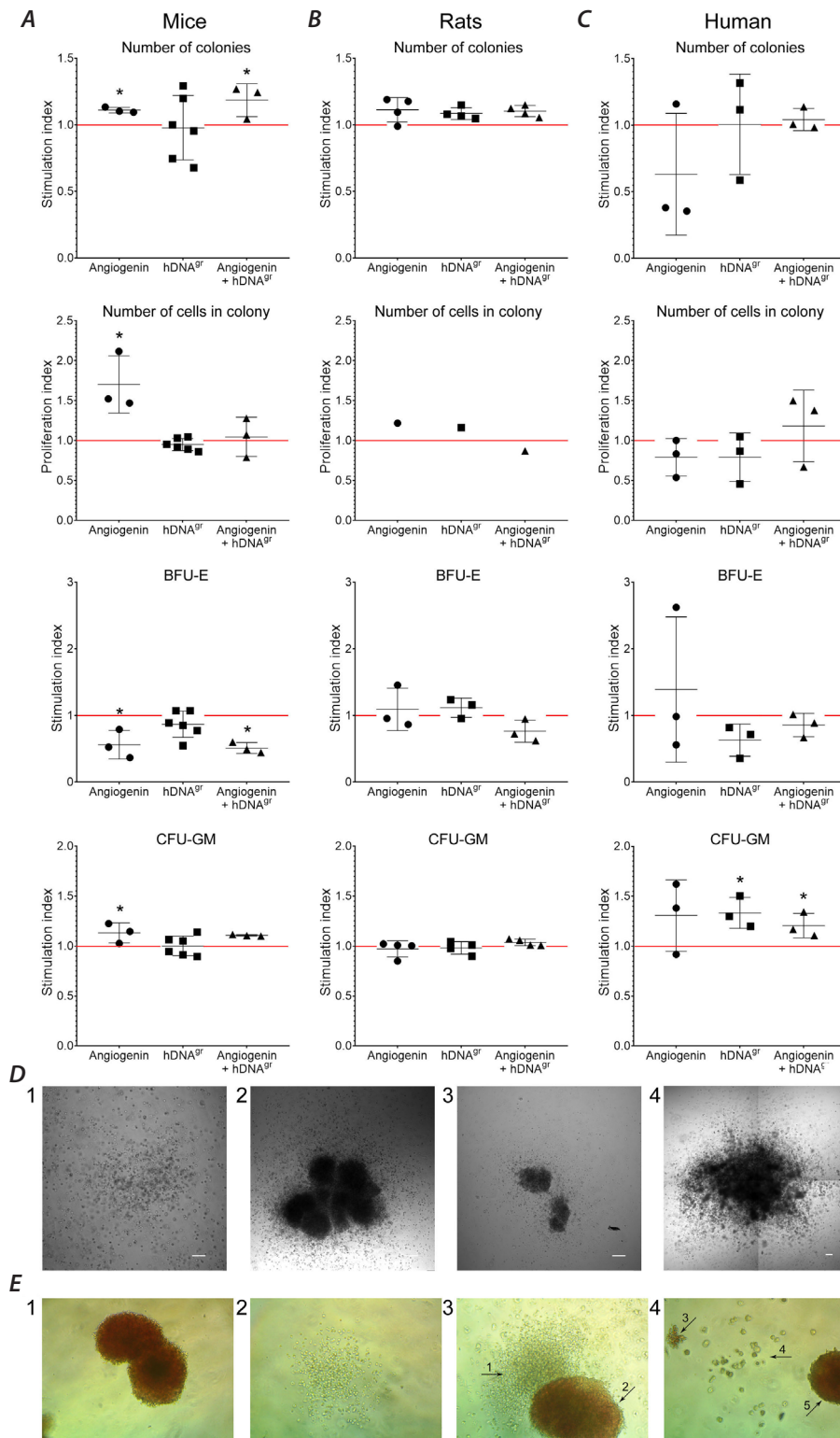


Рис. 1. Общее количество колоний (индекс стимуляции), количество клеток на колонию (индекс пролиферации), процентное содержание колоний BFU-E и CFU-GM, выраженное в индексе относительно контрольной группы для мышиной модели (A), крысиной модели (B) и криоконсервированного костного мозга человека (C). Приведены значения относительно контрольной группы. Красной линией обозначены соответствующие значения в контрольной группе, принятые за «1». * Отличия достоверны по сравнению с контрольной группой, $p < 0.05$, критерий Манна-Уитни. D – морфология колоний мыши, выросших на метилцеллюлозе, 1 – BFU-E, 2 – CFU-GM, 3 – CFU-GM, 4 – CFU-GEMM. Бар соответствует 100 мкм. E – морфология колоний, выросших на метилцеллюлозе из образцов криоконсервированных клеток костного мозга человека, 1 – BFU-E, 2 – CFU-GM, 3 – CFU-GEMM, 4 – Mk, 5 – BFU-E.

Окончание приложения 3

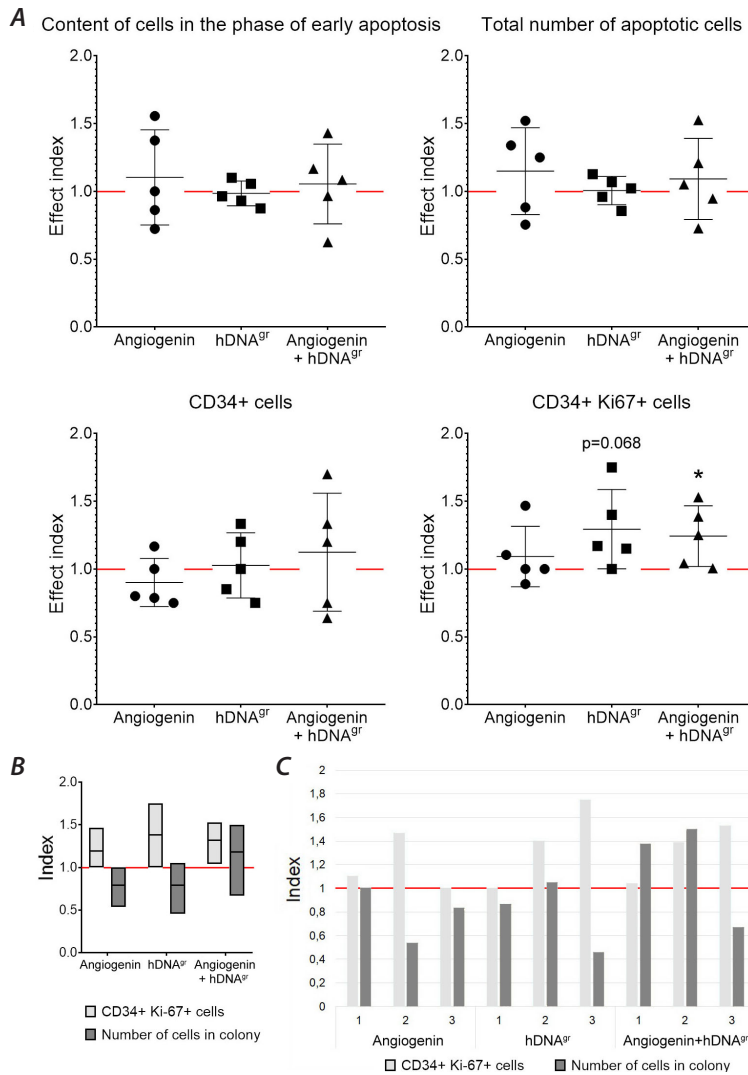


Рис. 2. А – типирование размороженных клеток костного мозга больных гемобластозами после криоконсервации до и после обработки активаторами. Приведены значения относительно контрольной группы. Красной линией обозначены соответствующие значения в контрольной группе, принятые за «1». * Отличия достоверны по сравнению с контрольной группой, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни. **В** – соотношение индекса пролиферативной активности ГСК, оцененной по уровню синтеза Ki-67, и индекса пролиферации ГСК, оцененного по количеству клеток в колонии (модель – криоконсервированный костный мозг больных гемобластозом) относительно неактивированного контроля. **С** – индивидуальные значения индекса пролиферативной активности ГСК образцов трех пациентов, оцененной по уровню синтеза Ki-67, и индекса пролиферации ГСК, оцененного по количеству клеток в колонии (модель – криоконсервированный костный мозг больных гемобластозом) относительно неактивированного контроля.

Приложение 4. Оценка количества гемопоэтических стволовых клеток в сформированных колониях после обработки образцов клеток костного мозга человека тремя индукторами hDNA^{gr}, ангиогенином и ангиогенином и hDNA^{gr} совместно. Интернализация экстраклеточного TAMRA+ двуцепочечного ДНК зонда в клетки колоний

При обработке гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в составе клеток костного мозга hDNA^{gr} на 15-е сутки культивирования процентное содержание CD34⁺ клеток в колониях увеличивается до 2.7 % vs 1.56 % в конкретном эксперименте (клетки костного мозга после стимуляции GM-CSF). Ни ангиогенин, ни совместное применение препаратов не увеличивали количество гемопоэтических предшественников в колониях. Полученный результат может иметь следующее объяснение. Во всех случаях, кроме двуцепочечной ДНК (дцДНК), развитие колоний дали мультипотентные CD34⁻ предшественники, но не CD34⁺ ГСК, где

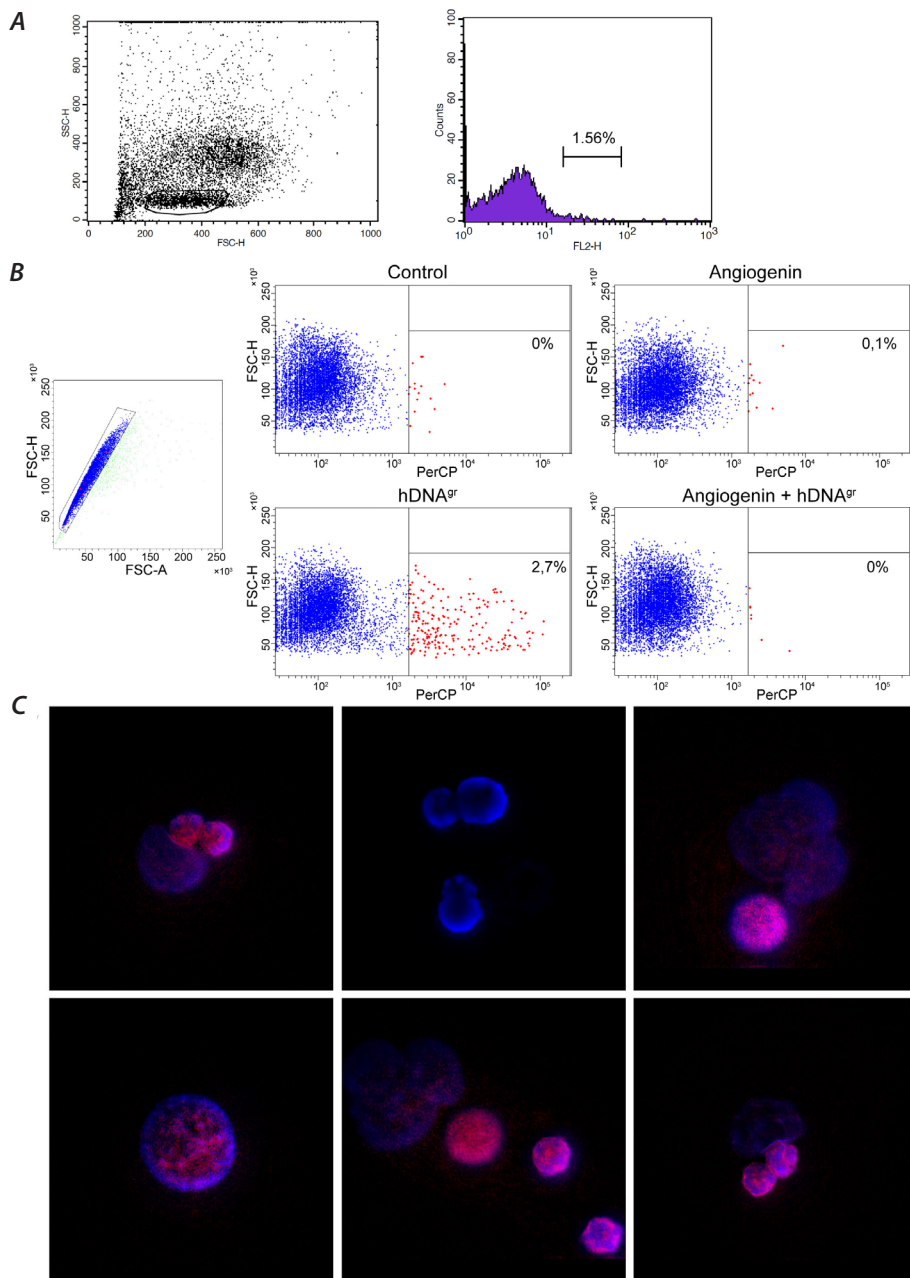


Рис. 1. **A** – FACS анализ содержания CD34⁺ клеток в исходном костном мозге (клетки костного мозга после стимуляции GM-CSF) и **B** – в клетках колоний, полученных после обработки клеток костного мозга индукторами, ангиогенином, hDNA^{gr} и совместно, на 15-й день культивирования. **C** – интернализация TAMRA+ ДНК зонда в клетки колоний, полученных из клеток костного мозга, обработанных не меченым ПЦР фрагментом 500 п. н., на 7-е сутки развития колоний.

Окончание приложения 4

ангиогенин стимулировал деление мультипотентных клеток. В случае дцДНК существует два объяснения. Первое – произошла индукция покоящихся CD34⁺ ГСК костного мозга, которые после первого деления сформировали два типа клеток: снова недифференцированную стволовую и уже коммитированную, что привело к появлению двух популяций клеток в колониях. Второе – дцДНК, попавшая в коммитированного CD34[–] мультипотентного потомка, инициировала генетическую конверсию (дифференцировку) дифференцированных клеток-предшественников ростков кроветворения, что также привело к появлению двух популяций клеток в колониях.

Дополнительно была оценена возможность интернализации экстраклеточных фрагментов дцДНК в клетки колоний. Использовались клетки 7-суточных колоний мыши после обработки клеток костного мозга меченым ПЦР фрагментом 500 п. н. для индукции и последующей оценки интернализации в них TAMRA-меченого зонда. На 7-е сутки клетки колоний отмывались, обрабатывались TAMRA-меченым ДНК зондом и высевались на метилцеллюлозу. Через 48 ч анализировали общую интернализацию меченой ДНК в клетки и наличие метафаз. В клетках детектировался TAMRA-меченый материал (рис. 1, С), что свидетельствовало о возможности использования повторной обработки клеток колоний после первичной обработки клеток костного мозга для анализа событий, индуцируемых захваченными фрагментами ДНК.

Приложение 5. Детальная характеристика индукции пангеномных одноцепочечных разрывов фрагментами двуцепочечной ДНК на мышинной и человеческой модельных системах. Оценка количества ников

На 15-е сутки инкубации на метилцеллюлозе клетки колоний отмывались от метилцеллюлозы, пултировались без разделения на типы колоний, обрабатывались теми же самыми индукторами, что и при первичной обработке костного мозга, и повторно высаживались на метилцеллюлозу. Через 0, 24, 48, 72, 96, 120, 144 ч образцы отмывались от метилцеллюлозы, заливались в блоки легкоплавкой агарозы, и проводился нативный и щелочной электрофорез (comet assay). Анализ проведен на выборке из ~100 клеток. Были получены следующие результаты на человеческой и мышинной моделях (рис. 1 и 2). Анализ появления и репарации одноцепочечных и двуцепочечных разрывов оценивался по кометным хвостам. Оценивали содержание клеток с хвостами (рис. 1, *A, B*, рис. 2, *A, B*) и содержание ДНК в кометном хвосте (рис. 1, *C, D*, рис. 2, *C, D*). Масса ДНК в хвосте и количество клеток с различным количеством ДНК в хвосте как раз и отражают глубину разрушения хроматина ядра в клеточной популяции.

В нейтральных условиях детектируются двуцепочечные разрывы. Это функциональные разрывы, всегда присутствующие в геноме в местах нахождения ТороII в узлах транскрипционно активных генов или генных локусов. Как и ожидалось, для нейтральных условий распределение содержания ДНК и количества клеток с различным содержанием ДНК в хвосте практически одинаковое на протяжении всего времени наблюдения (0–144 ч) для всех индукторов и контроля (рис. 1, *C*, рис. 2, *C*). При этом практически все клетки имели хвосты, что подтверждает равномерную транскрипционную активность клеток во всех образцах (рис. 1, *A*, рис. 2, *A*). В щелочных условиях детектируются одноцепочечные разрывы.

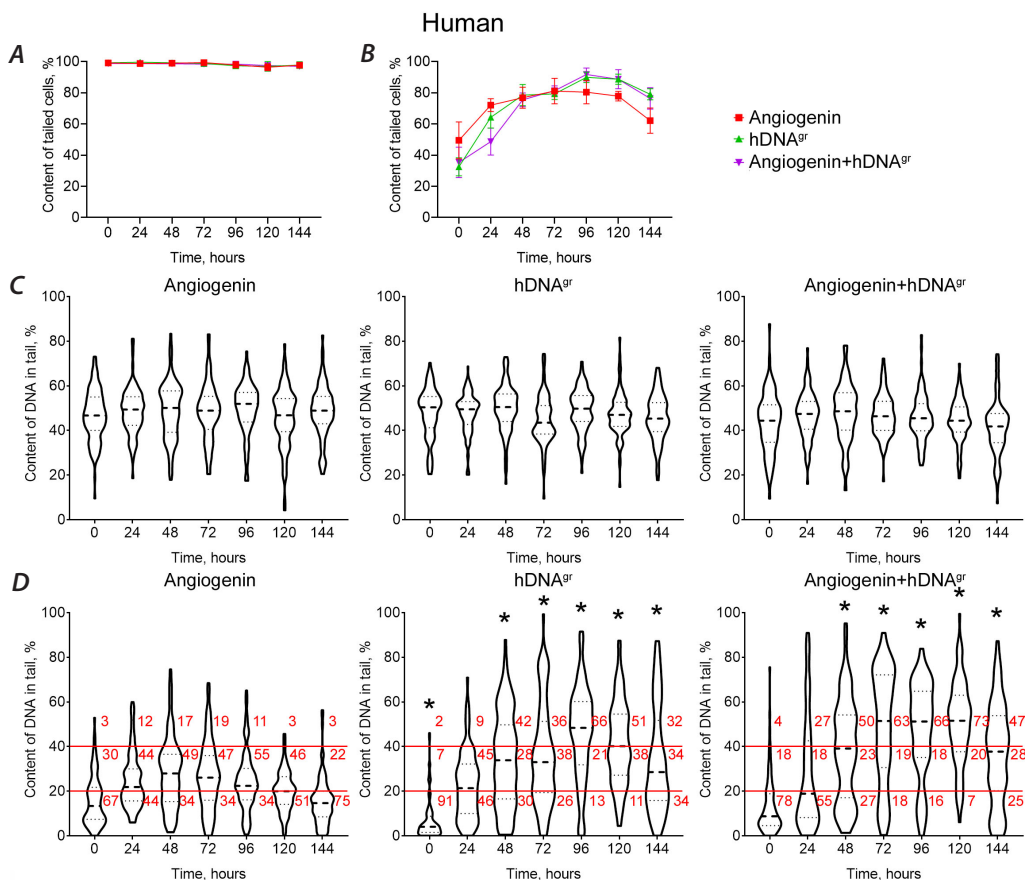


Рис. 1. Человеческая модель. *A, B* – содержание клеток с хвостом при нативном (*A*) и щелочном (*B*) электрофорезе. *C, D* – диаграммы, отражающие количество клеток с различным содержанием ДНК в хвосте при нативном (*C*) и щелочном (*D*) электрофорезе. Жирной штриховой линией обозначена медиана значений, 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 группой клеток после обработки ангиогенином, $p < 0.01$, критерий Манна–Уитни.

Окончание приложения 5

Проведенный анализ выявил существенные и достоверные отличия в анализируемых параметрах для различных точек образцов и контроля (рис. 1, D, рис. 2, D). Идет увеличение количества клеток с максимальным количеством ДНК в хвосте для человеческой модели в 72–96 ч инкубации и для мышиной модели в 96 ч инкубации для клеток, обработанных препаратом hDNA^{gr}. Ангиогенин, как монопрепарат, практически не влияет на индукцию одноцепочечных разрывов и увеличения массы ДНК в хвосте. Таким образом, для препарата hDNA^{gr} для обеих модельных систем наблюдается максимальная масса ДНК в хвосте в 72–96 ч, что говорит о максимальной деградации хроматина ядра в указанное время. По-видимому, полное залечивание одноцепочечных разрывов для человеческой модели происходит на 7–9-е сутки инкубации.

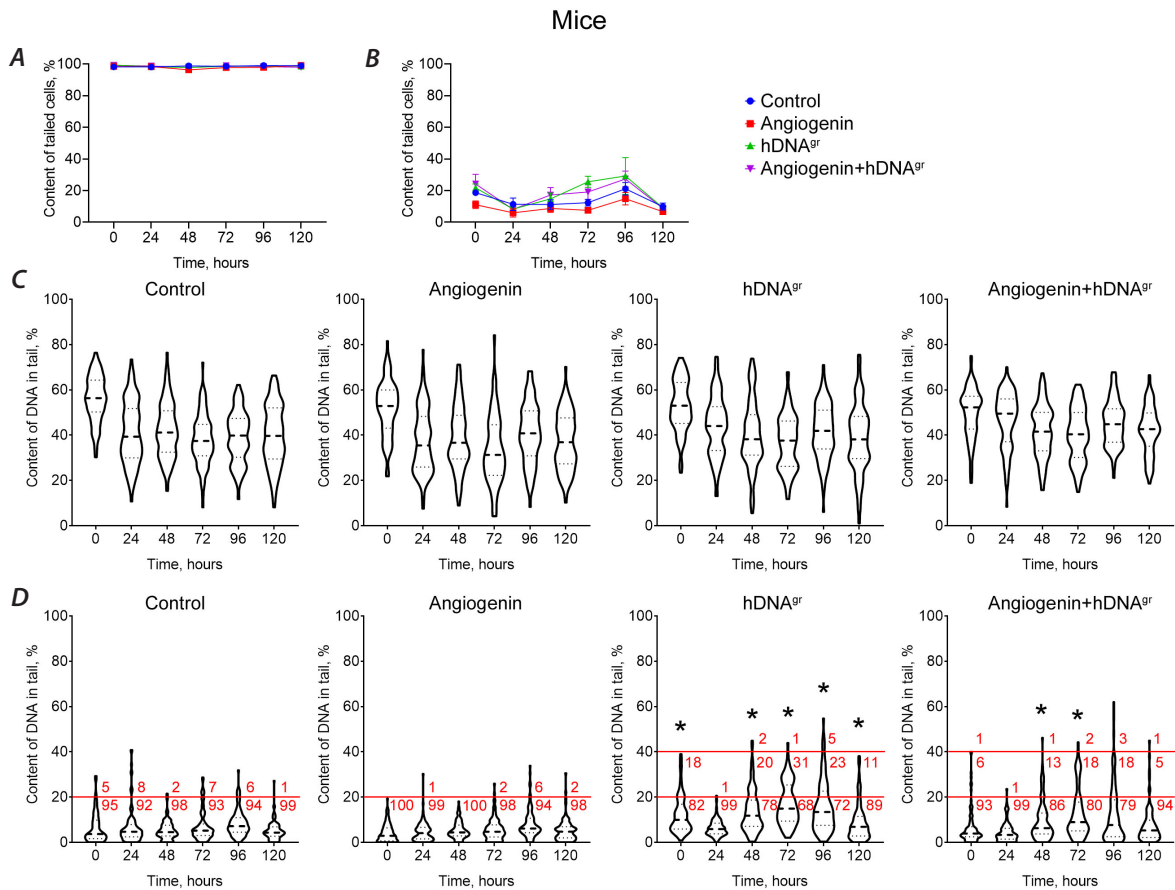


Рис. 2. Мышиная модель. **A, B** – содержание клеток с хвостом при нативном (**A**) и щелочном (**B**) электрофорезе. **C, D** – диаграммы, отражающие количество клеток с различным содержанием ДНК в хвосте при нативном (**C**) и щелочном (**D**) электрофорезе. Жирной штриховой линией обозначена медиана 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.

Приложение 6. Необходимая ремарка

Одним из предположений, на которое не дано прямого экспериментального ответа, было предположение, что пангеномные одноцепочечные разрывы инициированы именно или преимущественно в стволовых клетках крови или в их ближайших потомках, сохранивших способность интернализировать фрагменты экстраклеточной двуцепочечной ДНК (признак примитивных, низкодифференцированных клеток). Чтобы оценить правдоподобность такого предположения, было проведено сопоставление количества CD34+/- клеток в колониях, количества клеток колоний, в которых инициированы пангеномные одноцепочечные разрывы, количества CD34+/- клеток, интернализирующих TAMRA+ ДНК зонд. Показано, что в колониях (модель – человек) по данным двух экспериментов количество CD34+ клеток составляет ~3–5 %. В конкретном эксперименте в колониях (модель – человек) количество TAMRA+ клеток составляет 3.1 %. В конкретном эксперименте в колониях (модель – человек) количество CD34+/TAMRA+ клеток составляет 0.4 %. По данным трех экспериментов количество клеток в точке максимального разрушения хроматина (максимальное количество ников) составляет 5–10 % (в контроле детектируемые одноцепочечные разрывы связаны с идущей транскрипцией, и их количество является базовым уровнем сравнения).

Учитывая ошибку экспериментов и возможные приемлемые допуски, связанные с оценочной формой анализа результатов (без целенаправленных повторов), с большой долей уверенности можно полагать, что ники инициированы в клетках, в которые попали фрагменты экстраклеточной ДНК.

Присутствие достаточно высокого (~3 %) количества CD34+ гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) в колониях, выросших на метилцеллюлозе из клеток костного мозга, обработанных hDNA^{gr}, и результаты, свидетельствующие, что ники возникают сразу после взаимодействия с индуктором (в первые 24 ч после индукции большая часть хроматина деградирована), предполагают, что колонии выросли из CD34+ стволовых клеток костного мозга, которые после индукции и высева на метилцеллюлозу начали сразу делиться, причем таким образом, что первое деление такой клетки было асимметричным и одна дочерняя клетка осталась стволовой, а вторая дочерняя клетка стала коммитированной. На наш взгляд, это наиболее приемлемое объяснение присутствия в колониях CD34+ ГСК, которые появились в результате деления исходной ГСК на две дочерние клетки, одна из которых сохранила CD34+ недифференцированный статус, а вторая ушла в терминальную дифференцировку.

Отсутствие CD34+ клеток в колониях (человеческая модель) в контроле может отражать тот факт, что в контроле на метилцеллюлозе выросли колонии из клеток костного мозга, уже прошедших стадию дифференцировки, т. е. мультипотентных прогениторов, и максимально, что они могли сделать, это поделиться несколько раз симметрично для создания клеточной массы, необходимой для развития колонии. Это соображение подтверждается также тем фактом, что в клетках колоний контрольного образца мы не увидели масштабного появления пангеномных одноцепочечных разрывов после отмывки от метилцеллюлозы и репопуляции клеток выросших колоний.

В связи с высказанными соображениями и предположением, что одним из причинных событий, определяющих коммитирование, является изменение топологии хроматина стволовой клетки после релаксации, вызванной появлением ников, возникает следующий вопрос. Как ГСК, будучи проникнутой, чтобы изменить топологию хроматина к коммитированному состоянию, сохраняет топологию хроматина исходного недифференцированного состояния в процессе первого деления (именно такое видение событий следует из того факта, что в колониях детектируется смешанная популяция клеток, состоящая из основной массы коммитированных потомков и включающая до ~3 % CD34+ стволовых клеток крови)? При этом считается общепринятым, что все клетки колонии происходят от одной клетки костного мозга, активированной к пролиферации.

Принципиально возможны три варианта. 1. Практически невероятный. Хроматин никируется и претерпевает топологическую реорганизацию только у тех хромосом, которые в метафазе отойдут в коммитированную клетку. То есть происходит асимметричное никирование в ядре исходной ГСК. Молекулярный механизм такого избирательного асимметричного процесса неизвестен. 2. В ГСК ники релаксируют один из уровней компактизации хроматина (например, петельный), но при этом уровни компактизации высших порядков (формирование метафазных хромом) сохраняются без изменения. Ники лигируются без реорганизации хроматина и стволовая клетка делится на две дочерние, при этом до определенного момента хроматин сохраняет структурную неопределенность. В дочерней клетке, где присутствуют «стволовые факторы», хроматин восстанавливает топологию недифференцированного состояния. Во второй дочерней клетке «факторы стволовости» отсутствуют и хроматин приобретает топологию коммитированного состояния. 3. Принципиально

Продолжение приложения 6

рассматривается та же идеология, что и для второго варианта. Отличие состоит в том, что хроматин с никами проходит сквозь митоз, и ники определяются в дочерних клетках. В той клетке, где присутствуют «факторы стволовости», хроматин после закрытия ников приобретает топологию недифференцированного состояния. Во второй клетке хроматин приобретает топологию коммитированного состояния. Именно такое явление было обнаружено в работе (Patkin et al., 1995), где были показаны пагеномные одноцепочечные разрывы в метафазных хромосомах.

Ники закрываются к 144 часам (7–9-е сутки) после появления. Это достаточно длительный промежуток времени. Общепринято, что релаксированный хроматин запускает арест клеточного цикла до восстановления структуры хроматина высшего порядка. Это означает, что клетки с никами будут находиться в аресте в течение всего времени перехода. Это также означает, что колонии, развивающиеся из клеток, в которых произошла реорганизация хроматина, будут к 15-м сутками культивирования содержать меньше клеток, поскольку основное время они не делились, а находились в стадии перехода, и таких колоний будет меньшинство. Тем не менее мы не увидели разницы в состоянии экспериментального материала. Развитие колоний в контрольных образцах и в индуцированных hDNA^{gr} происходит достаточно равномерно, а количество мелких колоний достаточно и в контроле, и в экспериментальном образце. Мы полагаем, что отсутствие выраженной разницы в развитии колоний в контроле и в образце, индуцированном hDNA^{gr}, определяется тем, что в экспериментальном образце основная масса колоний происходит из мультипотентных клеток и только незначительная часть – из CD34+ ГСК, которые представлены мелкими колониями и которые не отличаются от мелких колоний контрольного образца, размер которых обусловлен другими причинами.

Есть еще одно объяснение отсутствия очевидной разницы в развитии колоний в контрольном и экспериментальном образце. Показано, что ник-опосредованная гомологичная рекомбинация может проходить без участия ATR/ATM иерархических киназ и, как следствие, без активации «чек-поинт» механизма. Также есть основания считать, что опосредованная никами гомологичная рекомбинация не зависит от фазы клеточного цикла. То есть никированный хроматин не определяется клеткой как сигнал опасности.

Вместе с этим, если правомерно, что хромосомы с никами могут преодолевать один митоз, то не выглядит абсолютно абсурдным, что клетки с никами проходят несколько последовательных митозов и формируют полноценные колонии без временной задержки (Patkin et al., 1995; Vriend, Krawczyk, 2017; Maizels, Davis, 2018). Это также будет выглядеть как отсутствие разницы в развитии колоний в контрольном и экспериментальном образцах. В это время весь молекулярный аппарат клетки направлен исключительно на процесс деления. Как при этом может осуществляться репликация, непонятно. В конечном итоге коммитированное состояние приобретает или недифференцированный статус сохраняет сразу группа клеток (рис. 1).

Окончание приложения 6

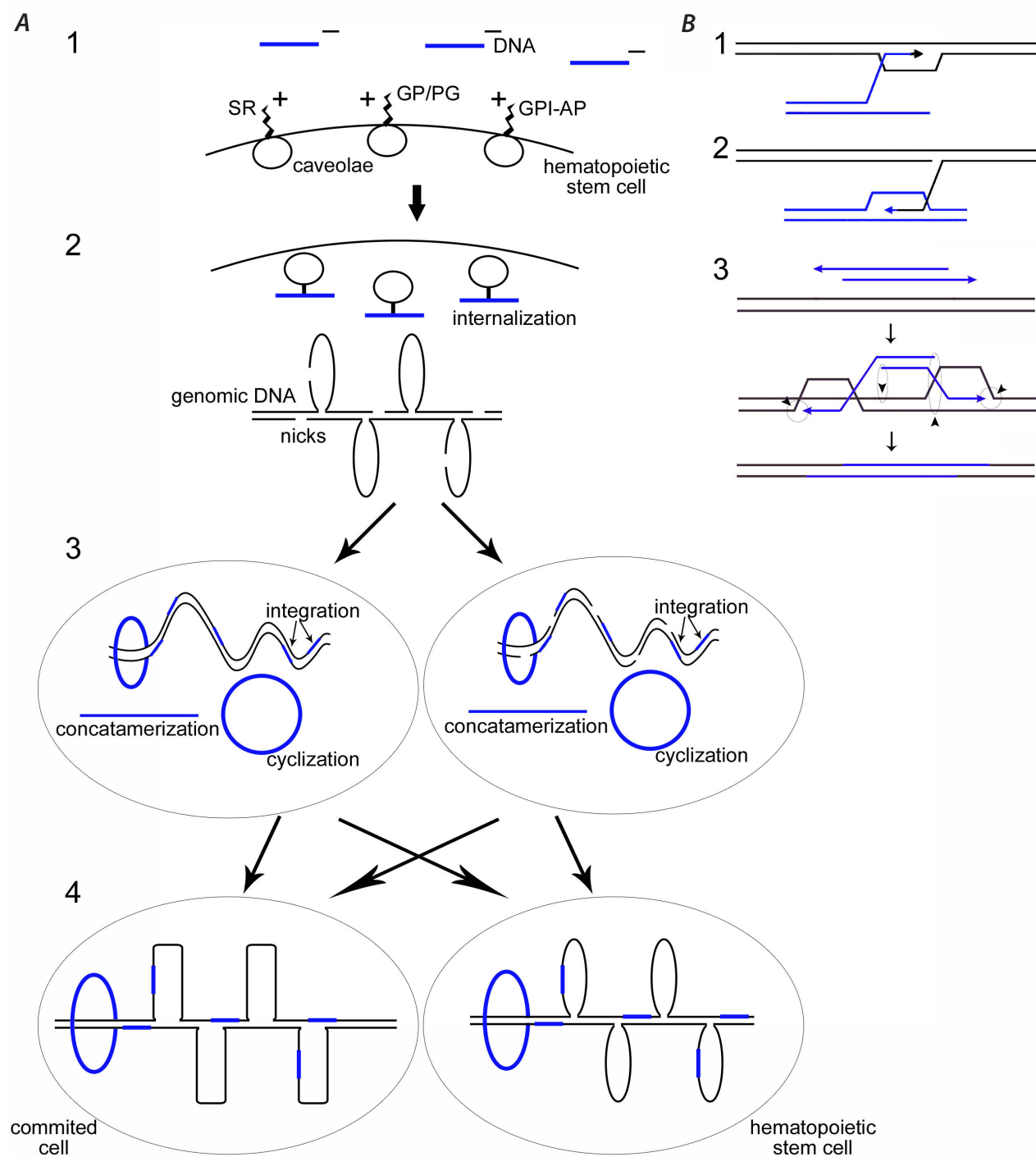


Рис. 1. Интегральная схема событий в рамках концепции природной реконструкции генома. **А** – общая механистическая схема молекулярных событий при взаимодействии фрагментов экстраклеточной ДНК и гемопоэтической стволовой клетки. 1, 2 – встреча и интернализация экстраклеточных фрагментов в клетку. SR – сквенджер-рецепторы; GP/PG – гликопротеины/протеогликаны; GPI-AP – гликозилфосфатидинозитол ассоциированные белки. Инициация ников в ядерной ДНК ГСК. 3 – два варианта выхода в митоз: слева – хроматин в состоянии неопределенности после закрытия ников, справа – хроматин в состоянии неопределенности в никированном состоянии. В обоих случаях в таком состоянии хроматин проходит митоз. В двух дочерних клетках происходит либо восстановление недифференцированного состояния хроматина, либо формируется новая архитектура, характерная для коммитированной клетки (4). В ходе указанных событий фрагменты экстраклеточной ДНК формируют интермедиаты рекомбинационно-репарационного процесса, индуцированного никами: прямая интеграция по механизму гомологичного обмена, конкатемеризация, циклизация фрагментов экстраклеточной ДНК, депонированных в ядерном пространстве (выделены синим). **В** – возможные предполагаемые варианты гомологичного обмена между фрагментами экстраклеточной ДНК и ДНК хромосом.

Список литературы

- Dolgova E.V., Alyamkina E.A., Efremov Y.R., Nikolin V.P., Popova N.A., Tyrinova T.V., Kozel 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
- Efremov Y.R., Proskurina A.S., Potter E.A., Dolgova E.V., Efremova O.V., Taranov O.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kolchanov N.A., Bogachev S.S. Cancer stem cells: emergent nature of tumor emergency. *Front. Genet.* 2018;9:544. doi 10.3389/FGENE.2018.00544
- Emara M.M., Ivanov P., Hickman T., Dawra N., Tisdale S., Kedersha N., Hu G.F., Anderson P. Angiogenin-induced tRNA-derived stress-induced RNAs promote stress-induced stress granule assembly. *J. Biol. Chem.* 2010;285:10959-10968. doi 10.1074/JBC.M109.077560
- Goncalves K.A., Silberstein L., Li S., Severe N., Hu M.G., Yang H., Scadden D.T., Hu G.-fu. Angiogenin promotes hematopoietic regeneration by dichotomously regulating quiescence of stem and progenitor cells. *Cell.* 2016;166:894-906. doi 10.1016/J.CELL.2016.06.042
- Ivanov P., Emara M.M., Villen J., Gygi S.P., Anderson P. Angiogenin-induced tRNA fragments inhibit translation initiation. *Mol. Cell.* 2011;43:613-623. doi 10.1016/J.MOLCEL.2011.06.022
- Kieran D., Sebastia J., Greenway M.J., King M.A., Connaughton D., Concannon C.G., Fenner B., Hardiman O., Prehn J.H.M. Control of motoneuron survival by angiogenin. *J. Neurosci.* 2008;28:14056-14061. doi 10.1523/JNEUROSCI.3399-08.2008
- Kishimoto K., Liu S., Tsuji T., Olson K.A., Hu G.F. Endogenous angiogenin in endothelial cells is a general requirement for cell proliferation and angiogenesis. *Oncogene.* 2005;24:445-456. doi 10.1038/SJ.ONC.1208223
- Maizels N., Davis L. Initiation of homologous recombination at DNA nicks. *Nucleic Acids Res.* 2018;46:6962-6973. doi 10.1093/NAR/GKY588
- 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
- Sheng J., Xu Z. Three decades of research on angiogenin: a review and perspective. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica.* 2016;48:399-410. doi 10.1093/ABBS/GMV131
- Silberstein L., Goncalves K.A., Kharchenko P. V., Turcotte R., Kfoury Y., Mercier F., Baryawno N., Severe N., Bachand J., Spencer J.A., Pappazian 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;19:530-543. doi 10.1016/J.STEM.2016.07.004
- Tsuji T., Sun Y., Kishimoto K., Olson K.A., Liu S., Hirukawa S., Hu G.F. Angiogenin is translocated to the nucleus of HeLa cells and is involved in ribosomal RNA transcription and cell proliferation. *Cancer Res.* 2005;65(4):1352-1360. doi 10.1158/0008-5472.CAN-04-2058
- 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
- Xu Z.P., Tsuji T., Riordan J.F., Hu G.F. Identification and characterization of an angiogenin-binding DNA sequence that stimulates luciferase reporter gene expression. *Biochemistry.* 2003;42(1):121-128. doi 10.1021/BI020465X
- Yamasaki S., Ivanov P., Hu G.F., Anderson P. Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *J. Cell Biol.* 2009;185(1):35-42. doi 10.1083/JCB.200811106
- Yoshioka N., Wang L., Kishimoto K., Tsuji T., Hu G.F. A therapeutic target for prostate cancer based on angiogenin-stimulated angiogenesis and cancer cell proliferation. *PNAS.* 2006;103(39):14519. doi 10.1073/PNAS.0606708103
- Yu D., Cai Y., Zhou W., Sheng J., Xu Z. The potential of angiogenin as a serum biomarker for diseases: systematic review and meta-analysis. *Dis. Markers.* 2018;2018:1984718. doi 10.1155/2018/1984718