

ПРИЛОЖЕНИЯ

к статье В.С. Рузановой, С.Г. Ошихминой, Г.С. Риттера, Е.В. Долговой, С.С. Кирикович, Е.В. Левитеса, Я.Р. Ефремова, Т.В. Карамышевой, А.Г. Богомолова, М.И. Мещаниновой, А.Л. Мамаева, О.С. Таранова, С.В. Сидорова, С.Д. Никонова, О.Ю. Леплиной, А.А. Останина, Е.Р. Черных, Н.А. Колчанова, А.С. Проскуриной, С.С. Богачева
«Концепция природной реконструкции генома. Часть 3. Анализ изменения количества теломерной ДНК в клетках колоний как нового амплифицированного признака, возникшего при обработке гемопоэтических стволовых клеток костного мозга»

Приложение 1. Краткая информация о факторах, участвующих в описываемых процессах

ATM (ataxia telangiectasia mutated, мутантный при атаксии-телеангиэктазии белок) – серин/треониновая протеинкиназа, которая рекрутируется и активируется двуниевыми разрывами ДНК; фосфорилирует несколько ключевых белков, которые инициируют остановку клеточного цикла, запускают репарацию ДНК или апоптоз.

ATR (ATM и Rad3-связанная киназа) – серин/треониновая протеинкиназа, которая отслеживает повреждения ДНК и в случае их обнаружения активирует остановку клеточного цикла в контрольной точке; активируется в присутствии одноцепочечной ДНК.

ATRIP – белок, который опознаёт одноцепочечную ДНК, покрытую репликативным белком А; работает в комплексе с ATR.

BFU-E (burst forming unit-erythroid, бурст-образующая единица эритроидная) – предшественник эритроцитарного ростка кроветворения.

BRCA1 (p220) (breast cancer 1) – белок, участвующий в репарации повреждений одноцепочечной ДНК в местах окончания R-петли.

BRCA2 (breast cancer 2) – белок, участвующий в восстановлении хромосомных повреждений и играющий важную роль в error-free репарации двуцепочечных разрывов ДНК.

c-Abl (abelson murine leukemia viral homolog 1) – тирозин киназа, участвующая в регуляции клеточного цикла и при определенных условиях индуцирующая остановку роста клеток и апоптоз.

CDC25 – фосфатаза, принимающая участие в регуляции клеточного цикла.

CDC45, MCM2-7 – компоненты CMG-комплекса (эукариотической хеликазы CMG).

CDK (cyclin-dependent kinases, циклин-зависимые киназы) – ключевые ферменты, участвующие в регуляции клеточного цикла эукариот.

CFU-GM (colony-forming unit-granulocyte-macrophage, колониеобразующая единица гранулоцитарно-макрофагальная) – предшественник клеток миелоидного ряда (миелобластов).

Chk1, Chk2 (checkpoint kinase 1, 2) – «чек-поинт»-киназы, участвующие в остановке клеточного цикла.

c-Kit, ScaI, CD34 – маркеры низкодифференцированных гемопоэтических предшественников.

CST – комплекс, связывающий одноцепочечную ДНК, состоящий из трех белков CTC1, STN1 и TEN1; участвует в регуляции репликации теломер и замыкания концов хромосом.

KAT5 – ацетилаза, участвующая в активации ATM.

MRN комплекс – комплекс, состоящий из белков MRE11, RAD50 и NBS1; распознает двуцепочечные разрывы, готовит концы ДНК к восстановлению, активирует ATM, участвует в негомологичном соединении концов и гомологичной рекомбинации.

NHEJ (non-homologous end joining) – негомологичное восстановление двуцепочечных разрывов.

p21 – ген, продукт которого регулирует переход от G1 к S-фазе.

p53 – транскрипционный фактор, регулирующий клеточный цикл; супрессор образования злокачественных опухолей.

POT1 – белок, распознающий 3' одиночную цепь и связывающийся с одно-/двуцепочечным соединением ДНК, предотвращающий нестабильность теломер.

RAD17, RAD9 – белки, играющие роль в регуляции S-фазы в ответ на повреждение ДНК.

RAD51 – белок, обеспечивающий обмен цепями во время гомологичной рекомбинации; участвует в формировании D-петли.

Rb/E2F – комплекс, участвующий в механизме ареста клеточного цикла в G1-фазе.

TERC (telomerase RNA) – теломеразный РНК компонент.

TERT (telomerase reverse transcriptase) – теломеразная обратная транскриптаза.

TOPBP1 – белок, напрямую стимулирующий киназную активность комплекса ATR-ATRIP.

Торо II – топоизомераза II, удерживающая основание транскрипционных петель.

TRF1 – белок, взаимодействующий с POT1 и TIN2; привлекает теломеразу к теломерам и находится в прямом контакте с теломеразой.

TRF1 (telomere repeat factor 1) – фактор связывания теломерного повтора; распознает последовательности TTAGGG.

TRF2 (telomere repeat factor 2) – фактор связывания теломерного повтора; способствует формированию t-петель.

ДНК-РК (ДНК-протеинкиназа) – протеинкиназа, участвующая в репарации двуцепочечных разрывов ДНК.

Шелтерин (shelterin) – белковый комплекс, который защищает и регулирует теломеры; состоит из шести белков: TRF1, POT1, TRF1, TRF2, TIN2 и RAP1.

Приложение 2. Анализ ответа клетки на изменение хроматина высшего порядка

В клетке существует несколько общеклеточных факторов, определяющих появление повреждения (такого как двуцепочечные разрывы или одноцепочечная ДНК) и сигнализирующих о нем клетке. Активация иерархических киназ ATM, ATR, ДНК-ПК, относящихся к семейству фосфатидилинозитол-3-киназависимых киназ, индуцирует каскад событий, являющихся ответом клетки на двуцепочечные разрывы, остановку репликативной вилки или общее изменение структуры хроматина высшего порядка, т. е. ответом на стрессы, связанные с грубыми нарушениями структуры хроматина, которые требуют обязательного внимания клетки и репарации. Три типа трансдуцирующих киназ ATM, ATR, ДНК-ПК взаимозаменяемы, но проявляют большую специфичность при различных типах повреждений.

В ответ на возникшие двуцепочечные разрывы в первую очередь активируется ATM, которая затем фосфорилирует свои субстраты – киназы, в том числе ДНК-ПК, участвующую в репарации двуцепочечных разрывов, а также факторы, ответственные за арест клеточного цикла – Chk1, Chk2, p53.

Индукция остановки клеточного цикла определяется фосфорилированием Chk1 и Chk2, которые в свою очередь гиперфосфорилируют CDC25 фосфатазу и таким образом инактивируют ее. В норме CDC25 дефосфорилирует циклин/циклинзависимый протеинкиназный комплекс (CDK), поддерживая его рабочее состояние. При гиперфосфорилировании CDK ингибируется перенос CDC45 к Ori ДНК репликации (Sørensen et al., 2003). Таким образом, CDC25 регулирует прогрессию клеточного цикла через активирование CDK, которая, помимо активации Rb/E2F комплекса, принимает участие в активации гексамера MCM2-7 (ДНК геликазы), входящего в пререпликативный комплекс и катализирующего плавление цепей в процессе репликации.

p53-метаболический путь ареста клеточного цикла связан с транскрипцией гена *p21*, которая запускается активированным онкосупрессором и белковый продукт которого связывает и ингибирует комплексы циклин/CDK. В результате нефосфорилированный Rb удерживает E2F и цикл деления останавливается (Bakkenist, Kastan, 2015).

Таким образом, ответом на повреждение ДНК в виде двуцепочечных разрывов являются активация ATM и следующий за этим событием каскад фосфорилирования, в итоге приводящий к аресту клеточного цикла.

Наименее понятный этап – момент инициации репаративного процесса, приводящего к активации ATM. Анализ литературы свидетельствует, что ATM может активироваться сразу с нескольких иницирующих векторов различных клеточных функциональных систем. Однако, как предполагается, основным иницирующим фактором является изменение структуры хроматина высшего порядка. Это или двуцепочечные разрывы, или деконденсация хроматина, вызванная любым из описанных в литературе факторов. В результате нарушения структуры хроматина высшего порядка (конденсированного) происходит активация ATM. ATM может автофосфорилироваться, может ацетилироваться KAT5 с последующим автофосфорилированием. ATM может фосфорилироваться ATR при первичной активации ATR в результате остановки репликативной вилки и формирования одноцепочечных участков.

Анализ кинетики фосфорилирования ATM свидетельствует, что ATM может быть активирована нарушением структуры хроматина высшего порядка. Экспозиция клеток с различными, не нарушающим целостность молекулы ДНК агентами, такими как гипотония, хлороквин, ингибитор гистоновой ацетилазы тихостатин, инсулиновый шок, ингибирование цепи передачи электрона в митохондриях и другие метаболические стрессы, приводит к пертурбации хроматина без появления двуцепочечных разрывов (Olcina et al., 2014). При этом происходит кинирование серина-1981 ATM, что сопровождается активацией киназы. При таких обработках не детектируется H2AX фосфорилирование. Кроме того, активация ATM в этом случае не требует присутствия MRN комплекса. Иммуоокрашивание фосфорилированного белка свидетельствует о диффузном распределении ATM в ядерном пространстве. Предполагается, что деконденсация хроматина является «разрешительным событием» для KAT5 связывания с H3K9me3 и H3K36me3, с-Abl зависимым KAT5 фосфорилированием по тирозину-44 и следующим за этим каскадом активирующих событий (Bakkenist, Kastan, 2015).

KAT5 является одним из известных агентов, иницирующих репаративный процесс двуцепочечных разрывов. Известно, что после возникновения разрывов ДНК происходит KAT5-зависимое ацетилирование ATM. Немедленно после возникновения разрыва в сайте повреждения происходят пертурбация и разрыхление хроматина, вытеснение гистонов. Изменение компактизации хроматина позволяет KAT5

связаться с гистонами H3K9me3 и/или H3K36me3, которые функционируют как аллостерические активаторы, индуцирующие KAT5 ацетилирование ATM по лизину-3016. Связывание KAT5 с H3K9me3 происходит в комплексе с ATM. Это событие приводит к фосфорилированию KAT5 по тирозину-44 с-Abl тирозин киназой и активации его ацетилирующего домена. KAT5 ацетирует ATM. Происходит распад неактивного димера фермента на мономеры и автофосфорилирование ATM. Далее ATM, активированная в ответ на возникшее повреждение (двухцепочечные разрывы), активирует Chk1, Chk2, p53, что приводит к аресту клеточного цикла, опосредованному вышеописанным каскадным фосфорилированием разных эффекторных молекул. с-Abl тирозин киназа представляет собой убиквитилированно экспрессирующуюся киназу, присутствующую как в цитоплазме, так и в ядре. По-видимому, физическое взаимодействие комплекса KAT5-ATM с H3K9me3 инициирует рекрутирование в сайт связывания с-Abl тирозин киназы, которая распространена повсеместно в ядерном пространстве, что приводит к фосфорилированию и активации ацетилазы. Ассоциация KAT5 с H3K9me3, который находится в инактивированном хроматине, с H3K36me3, который находится в активном хроматине, и деконденсация хроматина во фланкирующем двухцепочечные разрывы районе являются центральными молекулярными механизмами активации ATM (Meltzer et al., 2011; Bakkenist, Kastan, 2015; Mahajan K., Mahajan N.P., 2015).

Важным моментом активации ATM являются ее молекулярные взаимоотношения с другой иерархической киназой – ATR. ATM-зависимая протеинкиназа ATR активируется при возникновении одноцепочечных участков ДНК, возникающих при формировании двухцепочечных разрывов, остановке репликативной вилки и при других нарушениях в структуре хроматина, приводящих к появлению неспаренных участков ДНК. При возникновении одноцепочечных участков последние немедленно покрываются репликативным фактором А. При участии нескольких кофакторов (RAD17-RFC2-5, RAD9-RAD1-HUS1 (9-1-1), ATR-ATRIP, TOPBP1) происходят активации ATR и развитие репаративного ответа. ATM и ATR имеют различную субстратную специфичность и могут взаимодействовать друг с другом. Обе киназы влияют на рекрутирование друг друга в сайт повреждения. При этом ATM создает условия для активации ATR в результате процессинга двухцепочечных концов. С другой стороны, ATR может фосфорилировать H2AX в ответ на остановку репликативной вилки, что привлекает в сайт остановки ATM. Обе киназы также могут напрямую фосфорилировать друг друга в ответ на репликативный стресс. И ATM, и ATR могут влиять на локализацию и функционирование своих регуляторов. Такие отношения двух иерархических киназ предполагают, что при любом изменении структуры хроматина высшего порядка и возникновении специфических интермедиатов, появление которых в обязательном порядке должно активировать одну из киназ, будет активирован арест клеточного цикла и индуцированы механизмы репарации нарушенной структуры хроматина высшего порядка (Maréchal, Zou, 2013).

Приложение 3. Выбор подхода для корректного измерения количества теломерной ДНК в клетках, обработанных индукторами hDNA^{gr} и ангиогенином, на мышинной модели

Была проведена серия аналитических экспериментов на мышинной модели. Отработаны три принципиальных методических подхода определения количества теломерной ДНК. На основании полученных результатов предполагалось выбрать адекватную, однозначно трактуемую методику для определения количества теломерной ДНК на крысах и на модели криоконсервированного костного мозга человека.

Клетки костного мозга мышей были обработаны активаторами hDNA^{gr} и ангиогенином и высеяны на метилцеллюлозу. Через 9 суток клетки были собраны. Из части клеток была выделена ДНК, и проведены ПЦР в реальном времени и дот-блот гибридизация. Часть клеток того же образца обработали колхицином и провели FISH.

ПЦР в реальном времени

В литературе существуют описания способа определения количества теломерной ДНК с использованием технологии ПЦР в реальном времени. Подход продемонстрирован на мышинной модели и, как предполагается, достоверен (Cawthon, 2002; Stefler et al., 2018). Мы полностью воспроизвели методику ПЦР в реальном времени для определения количества теломерной ДНК на выбранной мышинной модельной системе. ПЦР в реальном времени проводили на приборе QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США) с праймерами на теломерные повторы и однокопийный ген *36B4* для оценки количества теломерной ДНК (табл. 1).

Таблица 1. Последовательности используемых праймеров

Праймер	Структура
Tel-for	5' CGG TTT GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT TGG GTT 3'
Tel-rev	5' GGC TTG CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT TAC CCT 3'
36B4-for	5' ACT GGT CTA GGA CCC GAG AAG 3'
36B4-rev	5' TCA ATG GTG CCT CTG GAG ATT 3'

Проводили ПЦР с праймерами на теломерные повторы (рис. 1, A) и однокопийный ген *36B4* (см. рис. 1, B). В нескольких повторных экспериментах использовалась фрагментированная до 100–500 п. н. ДНК. В случае такой ДНК был получен противоположный ожидаемому результат. При использовании активатора hDNA^{gr} количество детектируемой таким подходом теломерной ДНК было достоверно ниже, чем в контроле (см. рис. 1, C). При замене гидролизованной матрицы на неозвученную был получен достаточно адекватный результат (см. рис. 1, D).

Тем не менее количество определяемой теломерной ДНК в образцах «с активатором» достоверно не превышало контроль. Полученное несоответствие мы объясняем следующим обстоятельством. Фрагменты теломерной ДНК, гидролизованные озвучиванием до «размеров праймера», 100–500 п. н., сами являются квазипраймерами и аннигируют друг с другом, закрывая посадочные места для рабочих праймеров. Чем больше конкурентной ДНК теломер, тем больше аннигирования теломерных фрагментов самих на себя (отсутствие 3' конца, необходимого для связывания полимеразы, вызванное аннилингом с образованием тупых или свисающих 3' концов, неспецифическим разрывом фосфорно-диэфирной связи) и тем меньше шансов рабочему праймеру найти матрицу и дать ПЦР-продукт. То есть полученный результат, как и предполагалось, зеркально отразил реально существующую ситуацию с ожидаемым увеличением длины теломер (увеличение количества теломерной ДНК).

При активации ангиогенином в эксперименте с неозвученной геномной ДНК количество теломерной ДНК было достоверно увеличено (см. рис. 1, D).

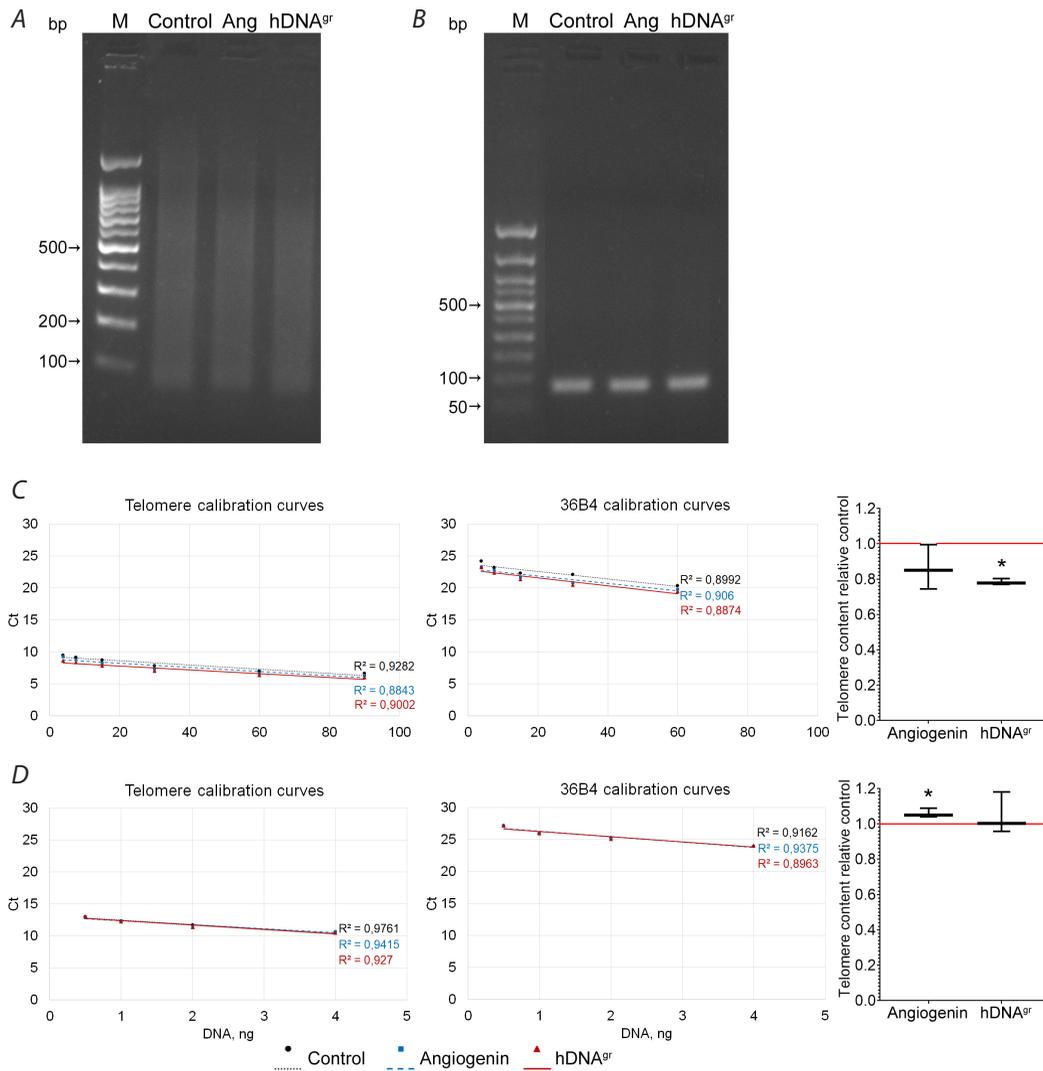


Рис. 1. А – электрофорез продуктов ПЦР с праймерами на теломерные повторы. В – электрофорез продуктов ПЦР с праймерами на ген *36B4*. С, D – результаты ПЦР в реальном времени с озвученной (С) и неозвученной (D) матрицей. Приведены калибровочные кривые с праймерами на теломерные повторы и на ген *36B4* и диаграмма, отражающая содержание теломерных повторов относительно контрольной группы, в которой содержание теломерных повторов принято за единицу (красная линия). * Отличия достоверны по сравнению с контрольной группой, $p < 0.05$, критерий Манна–Уитни.

FISH

С тем же самым клеточным материалом была проведена *in situ* гибридизация.

FISH проводили по стандартной процедуре с использованием в качестве зонда теломерного гексану-клеотида (CCCTAA)₃ – TelpNA-Cy3 зонда. Сигналы флуоресценции регистрировали на флуоресцентном микроскопе Axioskop 2 Plus (Zeiss) с использованием программного обеспечения ZEN.

Для приготовления препаратов метафазных хромосом клетки культуры инкубировали в ростовой среде, содержащей 0.1 мкг/мл колцемида (Biological Industries), в течение 2 ч. Клетки осаждали центрифугированием (200g, 5 мин) и обрабатывали гипотоническим раствором 0.075M KCl (Sigma-Aldrich, США) в течение 20 мин при 37 °С. Затем клетки снова осаждали центрифугированием и фиксировали в трех сменах фиксатора 3:1 (метанол : уксусная кислота) при –20 °С. Фиксированную суспензию клеток хранили в фиксаторе при –20 °С. Препараты метафазных хромосом получали раскапыванием суспензии клеток на охлажденные предметные стекла с высоты 40 см, как описано в (Henegariu et al., 2001). Препараты хранили при –20 °С.

Гибридизацию *in situ* клонированных последовательностей проводили без супрессии повторных последовательностей (Lichter et al., 1988; Pinkel et al., 1988). Кратко: цитологические препараты метафазных хромосом обрабатывали раствором пепсина в 10 mM HCl в течение 20 мин при 37 °С, ополаскивали в фосфатном буфере (0.13 M NaCl, 0.27 mM KCl, 7 mM Na₂HPO₄, 3 mM NaH₂PO₄), pH 7.4, и один раз в фосфатном буфере, содержащем 50 mM MgCl₂. Фиксацию цитологического материала проводили в 1 % формальдегиде в фосфатном буфере, содержащем 50 mM MgCl₂, в течение 10 мин при комнатной температуре. После фиксации препараты отмывали первоначально в фосфатном буфере, а затем в фосфатном буфере, содержащем 50 mM MgCl₂, и обезвоживали стандартным способом в серии спиртов возрастающей концентрации.

Под покровное стекло на распластанные на предметном стекле хромосомы аккуратно наносили 15 мкл предварительно растворенного в гибридизационном буфере ДНК-зонда (200 нг/мкл), меченного TAMRA – dUTP (5-Tetramethylrhodamine-dUTP, Roche, Швейцария). Совместную денатурацию ДНК-зонда и матрицы проводили на приборе ThermoBrite (StatSpin, США) при 75 °С в течение 5 мин. После денатурации препараты быстро переносили во влажную камеру и оставляли на ночь в суховоздушном термостате (Incucell 55, BMT, Чехия) при 42 °С. По окончании гибридизации смывали покровные стекла с препаратов 2×SSC (saline-sodium citrate buffer). Не связавшийся избыток ДНК-зонда отмывали 5 мин в 1×SSC при 60 °С. Затем препараты переносили в 4×SSC/0.1 % NP-40 и инкубировали при 42 °С в течение 10 мин при покачивании. После этого препараты инкубировали 5 мин в фосфатном буфере при комнатной температуре. По окончании инкубации в PBS препараты переносили в стакан с дистиллированной водой, быстро окунали и переносили в стакан с 70 % этанолом. Дегидратацию препаратов проводили в серии спиртов возрастающей концентрации (70, 80, 96 %) по 3 мин при комнатной температуре. Высушивали. После гибридизации *in situ* хромосомы окрашивали флуоресцентным красителем DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole), растворенным в среде, предохраняющей флуоресцентные красители от выцветания (Vectashield antifade, 200 нг/мл, Vector Laboratories Inc., США).

В результате Q-FISH с TelpNA-Cy3 зондом были получены микроскопические изображения в трех клеточных образцах (табл. 2).

Таблица 2. Количество метафазных пластинок и интерфазных ядер, проанализированных в трех клеточных линиях

Параметр	Контроль	Ангиогенин	hDNA ^{9f}
Всего проанализировано	133	110	213
Кол-во интерфазных ядер	45	33	73
Кол-во метафазных пластинок	77	62	121
Кол-во метафазных пластинок, прилежащих к ядру	11	15	19
Всего метафазных пластинок	88	77	140
Наличие сигнала TelpNA-Cy3 на метафазных пластинках	4	8	10

Анализировали наличие сигнала TelPNA-Cy3 на метафазных пластинках и отдельно лежащих интерфазных ядрах. Определяли значения IFI (integrated fluorescence intensity). FISH сигнал TelPNA-Cy3 наблюдали во всех центромерных и теломерных районах акроцентрических хромосом. Дополнительный сигнал на длинном плече одной из хромосом наблюдали в интерстициальных сайтах длинного плеча одной из хромосом или гомологов во всех трех клеточных образцах (рис. 2, А). В контрольной линии количество интерстициальных сигналов было наименьшим – 4.5 % (см. табл. 2). Они были выявлены на пяти хромосомах из трех метафазных пластинок, причем в четырех случаях на отдельных плечах индивидуальных хромосом и в одном – на сестринских хроматидах в прицентромерном районе одной из хромосом (см. рис. 2, А). В образце клеток, обработанных ангиогенином, теломерные повторы в интерстициальных сайтах хромосом были обнаружены в 10 % проанализированных метафазных пластинок (см. табл. 2, рис. 2, А). В результате микроскопического анализа образца клеток, обработанных hDNA^{gr}, интерстициальные сегменты были выявлены в 7 % метафазных пластинок (см. табл. 2). Интерстициальные сигналы наблюдали на отдельных плечах индивидуальных хромосом (см. рис. 2, А).

Для биоинформатического анализа интенсивности сигнала (см. рис. 2, В, С), полученного в результате Q-FISH с TelPNA-Cy3 зондом и локализованного в центромерных и теломерных районах хромосом, были отобраны изображения метафазных пластинок с одинаковым количеством хромосом, соответствующих стандартному кариотипу мыши, который состоит из 40 акроцентрических хромосом. Как предполагалось, сила флуоресценции будет прямо отражать количество теломерной ДНК. Оказалось, что в контроле интенсивность флуоресцентной метки была выше, чем в случае активатора hDNA^{gr} и ангиогенина (см. рис. 2, В, С).

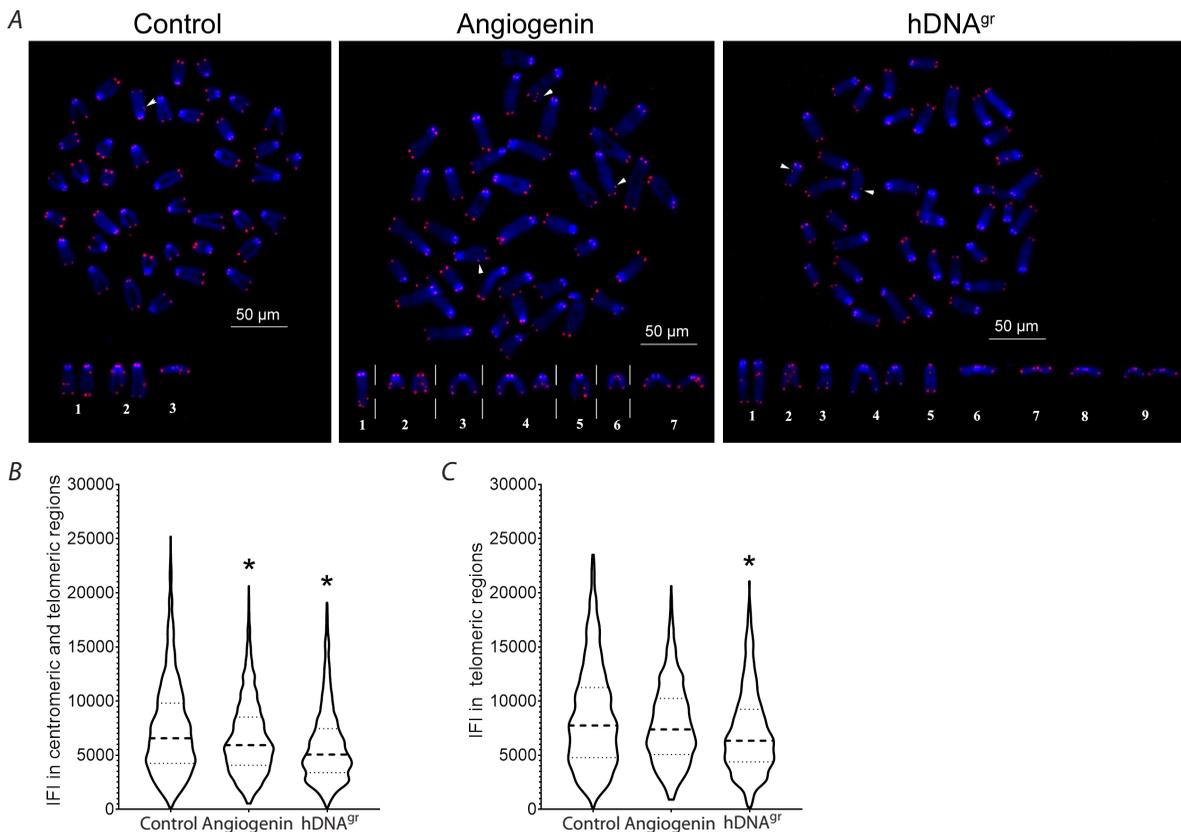


Рис. 2. Результаты Q-FISH с TelPNA-Cy3 трех образцов клеток – контрольного образца, после обработки ангиогенином и hDNA^{gr}.

А – приведены метафазные пластинки с интерстициальными сигналами (указаны стрелкой). Внизу приведены хромосомы, содержащие интерстициальные сегменты, номерами обозначены номера метафазных пластинок. Общее окрашивание хромосом DAPI (синий), окрашивание TelPNA-Cy3 (красный). В, С – значения IFI в центромерных и теломерных районах (В) или только в теломерных районах (С) метафазных хромосом трех клеточных образцов. Приведена совокупность индивидуальных значений (violin plots), жирной штриховой линией обозначена медиана значений, пунктиром – межквартильный диапазон. * Отличия достоверны по сравнению с контрольной группой, $p < 0.0001$, критерий Манна-Уитни.

Для оценки достоверности результатов, полученных с помощью Q-FISH, мы сравнили относительную длину теломер в сестринских хроматидах. В большинстве сестринских хроматид длина теломер и IFI должны быть идентичны. Наблюдалась сильная положительная корреляция для значений IFI теломер, принадлежащих сестринским хроматидам (коэффициент корреляции Спирмена 0.93–0.96). Эти результаты свидетельствуют о пропорциональном связывании ДНК-проб с теломерными повторами.

Таким образом, результат биоинформационного анализа интенсивности сигнала опять не соответствовал ожидаемому (увеличение количества теломерной ДНК).

Первым вероятным объяснением такого результата могли быть процедура гибридизации, техника анализа и биологические свойства теломерного гетерохроматина. Можно предположить, что произошло существенное увеличение количества теломерной ДНК, вследствие чего произошла суперкомпактизация теломерных районов. Процедура гибридизации предполагает простую обработку трипсином и гипотонию без раскрытия компактизованных локусов хроматина. В гибридизацию вступают доступные участки ДНК. В таких условиях зонд будет гибридизоваться с меньшим количеством поверхностной ДНК теломеры, поскольку основная масса ДНК будет располагаться в сверхупакованной форме в теломере и будет недоступна для зонда.

Вторым объяснением результата может быть следующий факт. К 9-м суткам роста на метилцеллюлозе клетки, в которых были индуцированы пангеномные одноцепочечные разрывы, еще не вышли из ареста клеточного цикла, связанного с функциональной перестройкой моды клетки, о чем никто не имел представления в момент проведения эксперимента; при этом изменение количества теломерной ДНК уже произошло. А анализируемые метафазные пластинки являются фазой клеточного цикла гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), которые в момент обработки индуктором hDNA^{gr} были не способны интернализировать экстраклеточные фрагменты ДНК (например, находились в фазе G2/M (Dolgova et al., 2016)). То есть анализировались клетки, прародители которых не захватили экстраклеточные фрагменты, и полученный результат относится к клеткам, не подвергшимся анализируемому воздействию.

Все вместе это свидетельствовало, что указанные выше способы анализа длины теломер в выбранных экспериментальных условиях будут давать результаты, которые всегда можно будет интерпретировать различными механистическими вариантами. Поэтому был выбран метод оценки количества теломерной ДНК с использованием количественной дот-блот гибридизации. Данный подход позволял прямо оценить количество гомологичной используемому зонду ДНК в экспериментальном образце независимо от перечисленных выше обстоятельств.

Оценка изменения количества теломерной ДНК с использованием количественной дот-блот гибридизации

На последнем этапе анализа была проведена дот-блот гибридизация. ДНК образцов была озвучена до размеров 100–500 п. н. Это было связано с тем, что необработанная ультразвуком ДНК при гибридизации давала конгломераты, что существенно затрудняло анализ сигналов гибридизации. Оказалось, что в образцах ДНК, выделенной из клеток колоний, полученных из ГСК, обработанных в составе клеток костного мозга hDNA^{gr}, количество теломерной ДНК значительно и достоверно превышает количество теломерной ДНК в контрольных образцах (С-зонд). То есть дот-блот гибридизация является единственным адекватным методом количественной оценки теломерной ДНК в структуре наших экспериментов.

Приложение 4. Сопоставление типа колоний с интенсивностью гибридизации

Было проведено сопоставление типа колоний с интенсивностью гибридизации (рис. 1).

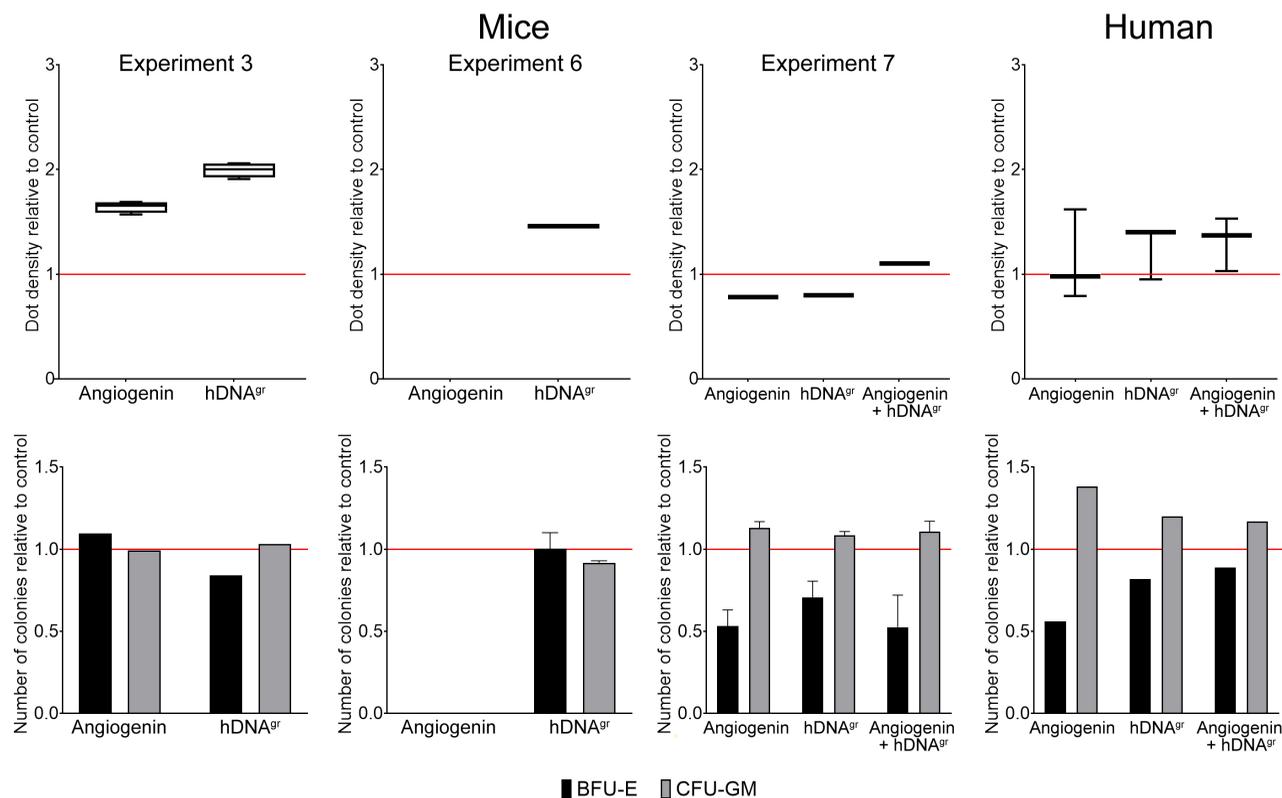


Рис. 1. Сопоставление интенсивности гибридизационного сигнала с количеством и типом колоний в различных экспериментах на клетках мыши и человека после обработки ангиогенином, препаратом hDNA^{gr} и ангиогенином совместно с препаратом hDNA^{gr}.

Эксперимент 3, мыши. В образце hDNA^{gr} количество колоний по BFU-E росту ниже, чем в контроле, а по CFU-GM росту практически не отличается от контроля. При этом сила гибридизации максимально высокая. В образце ангиогенина количество колоний BFU-E превышает контрольные значения примерно на 10 %. Количество CFU-GM приблизительно равно контролю. Сила гибридизации выше, чем в контроле, но ниже, чем в hDNA^{gr}. Вывод: в данном эксперименте для ангиогенина возможен вариант увеличения количества теломерной ДНК, связанный с индукцией активности G0 колоний BFU-E роста кроветворения, ранее в костном мозге неактивных, содержащих эмбрионально заложенное количество теломерной ДНК. Для hDNA^{gr} увеличение количества теломерной ДНК, скорее всего, не зависит от увеличения количества однотипных CFU-GM колоний. Наблюдается минимальное превышение колоний GM роста кроветворения. Такое увеличение может быть вызвано: 1) активностью эндо- или экзогена теломеразы; 2) прямой интеграцией теломерных повторов в геном ГСК при обработке индуктором hDNA^{gr} клеток костного мозга; 3) амплификацией теломерных повторов в результате репликации квази t-петли, сформированной теломерными повторами экстраклеточной ДНК; 4) сохранением в клетке в неинтегрированном состоянии на протяжении всего времени культивирования на метилцеллюлозе фрагментов теломерной ДНК, исходно доставленных в ГСК; 5) возможны смешанные варианты.

Эксперимент 6, мыши. Проведено сравнение силы гибридизации ДНК, выделенной из колоний, полученных из ГСК, обработанных в составе клеток костного мозга двумя дозами hDNA^{gr} (50 и 500 мкг на образец), и типа колоний, из которых выделялась ДНК для гибридизации. В конкретном эксперименте показано, что сила гибридизационного ответа не коррелирует с типом колоний. На рисунке в части силы гибридизационного ответа приведены значения hDNA^{gr} в дозе 500 мкг на образец. Проявившиеся различия могут свидетельствовать или об активации обоих вариантов теломеразы, или об интеграции

теломерной экстраклеточной ДНК в геном ГСК в момент обработки клеток костного мозга, или об амплификации теломерных повторов в результате репликации t-петли, сформированной теломерными повторами экстраклеточной ДНК; или о сохранении в клетке в неинтегрированном состоянии на протяжении всего времени культивирования на метилцеллюлозе фрагментов теломерной ДНК, исходно доставленных в ГСК.

Эксперимент 7, мыши. В образце ангиогенина, hDNA^{gr} и совместно количество колоний по BFU-E росткам ниже, чем в контроле. Количество CFU-GM колоний незначительно (~10 %) превышает контроль. Сила гибридизации для ангиогенина и hDNA^{gr} ниже, чем в контроле. Сила гибридизации для обоих индукторов незначительно выше контроля.

Сравнивая данные эксперимента 3 и 7 для ангиогенина, можно предположить вариант увеличения количества теломерной ДНК, связанный с индукцией активности G0 BFU-E колоний, ранее в костном мозге неактивных, содержащих эмбрионально заложенное количество теломерной ДНК. Согласно данным трех экспериментов, для обработки hDNA^{gr} не обнаружено корреляции между силой гибридизации и превалированием колоний одного из типов.

Эксперименты на модели криоконсервированных клеток костного мозга человека. Для образца, обработанного ангиогенином, нет достоверной разницы по силе гибридизации с контрольной ДНК. Количество CFU-GM существенно превышает контрольные значения. Количество BFU-E существенно ниже контроля. Такая картина коррелирует с данными, полученными на мышинной модели.

Для образца hDNA^{gr} и hDNA^{gr} совместно с ангиогенином сила гибридизации достоверно выше контроля. Для этой модельной системы возможен вариант увеличения количества теломерной ДНК, связанный с индукцией активности G0 колоний GM ростка, ранее в костном мозге неактивных, содержащих эмбрионально заложенное количество теломерной ДНК. Однако при сопоставлении всех полученных данных на обеих модельных системах не обнаруживается корреляции между силой гибридизации и превалированием колоний одного из типов.

Приложение 5. Оценка возможности сохранения в ГСК остаточного материала hDNA^{9r} после обработки этой ДНК ГСК в составе клеток костного мозга, которая может давать артефакт увеличения количества теломерной ДНК

Первоначально были проведены расчеты возможного количества остаточной ДНК. Идея эксперимента состояла в том, чтобы показать, что количество исходно попавшей в ГСК в составе клеток костного мозга экстраклеточной дцДНК к 15-м суткам культивирования колоний ничтожно мало и не будет детектироваться имеющимися экспериментальными процедурами. Количество остаточной ДНК в клетках колоний было оценено на 15-е сутки.

Размер одной теломеры у человека составляет ~10 т. п. н. Суммарный размер теломерной ДНК для всех хромосом составит ~1000 т. п. н. (10^6 п. н., или 0.001 % от гаплоидного генома). ГСК в составе клеток костного мозга человека захватывают 0.02 % от гаплоидного генома экстраклеточной дцДНК, в которой при нормальном распределении фрагментов будет присутствовать 0.00002 % теломерной ДНК, или 20000 п. н., или 100–10 фрагментов ДНК указанного размера (200–2000 п. н.). Эти фрагменты будут равномерно или по другому принципу расходиться по дочерним клеткам. К 15-м суткам будут сформированы колонии с количеством клеток до ~1000. То есть 10–100 фрагментов ДНК указанного размера (200–2000 п. н.) должны быть распределены между ~1000 клеток потомков, или ~0.2–2.0 п. н. теломерных повторов на клетку. При известной суммарной длине теломер человека, равной ~1 000 000 п. н., добавленное указанное количество теломерной ДНК будет находиться в диапазоне шума или ниже. Полученное в экспериментах увеличение количества теломерной ДНК на 20–100 % по сравнению с контролем полностью исключает возможность влияния на результат количества остаточной теломерной ДНК.

Для экспериментального подтверждения проведенных расчетов была проведена следующая серия экспериментов. Клетки сепарата костного мозга больных лимфомой Ходжкина инкубировали с ДНК-зондом, представляющим собой *AluI* повтор человека, фланкированный последовательностями плазмиды pBS с сайтами посадки M13 праймеров (pBSM13-*AluI*-pBSM13) в течение 1 ч в атмосфере 5 % CO₂, влажности 95 %, 37 °C из расчета: 1 мкг на 1 млн клеток в 1 мл среды IMDM без сыворотки. При указанном соотношении и времени экспозиции клетки полностью насыщаются фрагментами экстраклеточной дцДНК (0.02 % – настоящее исследование). После инкубации клетки костного мозга культивировали в метилцеллюлозной среде. На 15-е сутки культивирования клетки колоний отмывали от метилцеллюлозной среды и выделяли из клеток ДНК. В качестве отрицательного контроля использовали ДНК плаценты человека. Количественный анализ молекул ДНК проводили методом ПЦР в реальном времени с набором BioMaster RT-qPCR (краситель SYBR Green) («Биолабмикс», Россия) на аппарате QuantStudio 5 Real-Time PCR System. Для построения калибровочной кривой количественной ПЦР были взяты стандартные праймеры M13 и в качестве матрицы ДНК *AluI* повтора в количестве 0, 0.005, 0.05, 0.5, 5, 50 и 500 пг на реакцию. Каждую концентрацию образца анализировали в трех повторах. Для количественной ПЦР использовали 10 и 100 нг ДНК из клеток колоний, инкубированных с экзогенными фрагментами ДНК *AluI* повтора и ДНК плаценты человека. Количество *AluI* повтора в образце оценивали с помощью Microsoft Excel. Образовавшиеся ПЦР-продукты детектировали электрофорезом в агарозном геле.

Были поставлены реакции с двумя образцами ДНК, выделенной из клеток колоний, развившихся из ГСК, обработанных первично в составе клеток костного мозга препаратом ДНК *AluI* повтора человека, фланкированного последовательностями плазмиды pBS с сайтами посадки M13 праймеров и ДНК плаценты человека. Именно такой подход был выбран с целью полностью исключить возможность контаминации в ходе эксперимента по колониестимулированию (выделение ДНК из плаценты проводилось другим сотрудником лаборатории и территориально в другом месте). Одновременно оценивали количество ДНК в последнем супернатанте осадка клеток перед их лизированием.

Оказалось, что количество остаточной ДНК в супернатанте осадка клеток перед их лизированием для выделения ДНК находится ниже или на пороге чувствительности нижнего стандарта набора для детекции ДНК High Sensitive (Qubit), т. е. отсутствует субстрат, используемый для интернализации. Проведенная далее ПЦР в реальном времени полностью подтвердила расчеты. В клетках на 15-е сутки культивирования на метилцеллюлозе не сохраняется детектируемое количество исходной ДНК *AluI* повтора, обрамленного последовательностями pBS с праймерами M13 (рис. 1). То есть в клетках колоний

не детектируются молекулы ДНК *AluI* повтора, исходно попавшие в ГСК, обработанные этой ДНК, в составе клеток костного мозга. Это означает, что обнаруженное в экспериментах по дот-блот гибридизации увеличение количества теломерной ДНК не может быть следствием присутствия в клетках колоний остаточной исходной ДНК. Кроме того, фрагменты *AluI* вместе с негомологичными концами рBSM13 не попадают в состав генома, с которым произойдет их амплификация.

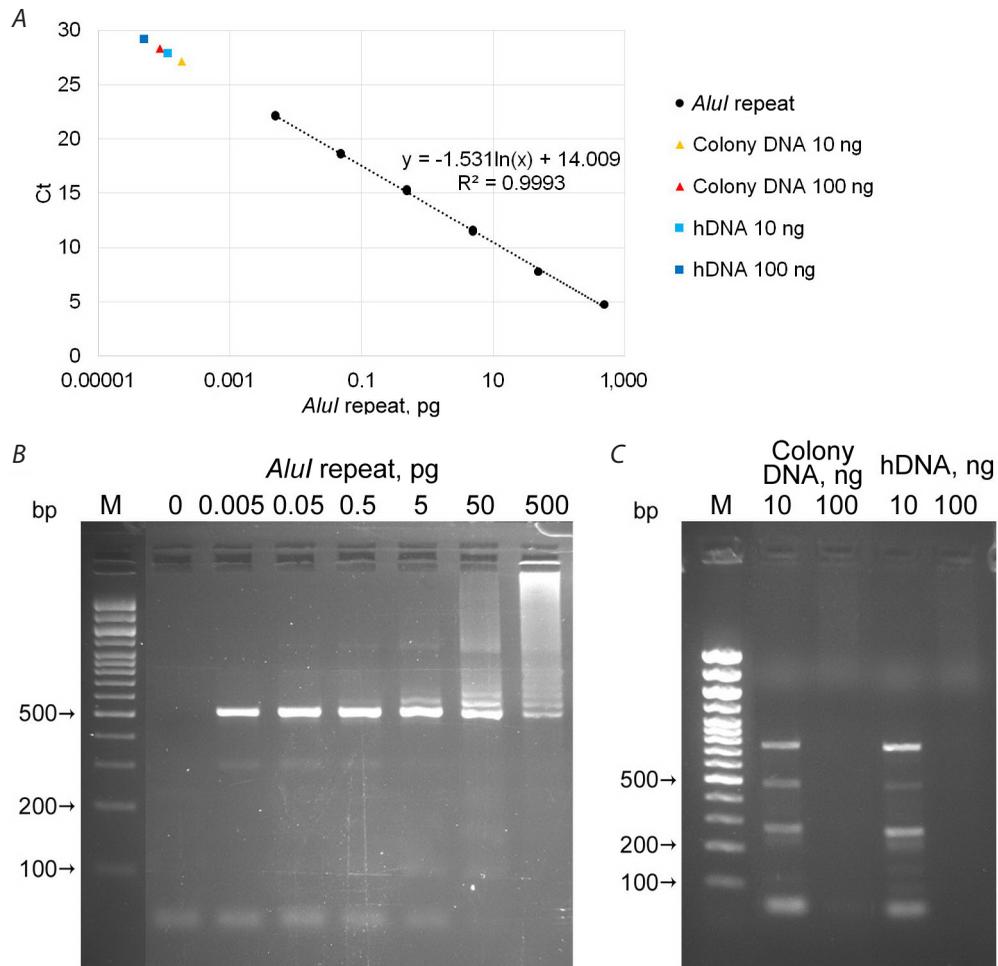


Рис. 1. Анализ возможности сохранения (контаминации) остаточного количества hDNA^{9F} в клетках колоний после исходного поглощения экстраклеточных фрагментов ГСК в составе клеток костного мозга. Оценка возможности интеграции в геном ГСК в составе клеток костного мозга рBSM13-*AluI*-рBSM13 ПЦР-фрагмента. Калибровочная кривая (A) и гель-электрофорез (B, C) образцов, взятых для построения калибровочной кривой, рBSM13-*AluI*-рBSM13 ПЦР-фрагмента, состоящего из *AluI* повтора человека, обрамленного последовательностями плазмиды между M13F/R праймерами. На калибровочной кривой цветными значками отмечено количество целевого продукта в образцах ДНК, выделенной из колоний образца, полученного после исходной обработки клеток костного мозга рBSM13-*AluI*-рBSM13 субстратом, и из ДНК, выделенной из плаценты человека. Цифрами указано количество ДНК матрицы, взятой в ПЦР.

Список литературы

- Bakkenist C.J., Kastan M.B. Chromatin perturbations during the DNA damage response in higher eukaryotes. *DNA Rep.* 2015;36:8-12. doi 10.1016/j.dnarep.2015.09.002
- Cawthon R.M. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30:e47. doi 10.1093/nar/30.10.e47
- Dolgova E.V., Potter E.A., Proskurina A.S., Minkevich A.M., Chernych 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
- Henegariu O., Heerema N.A., Lowe Wright L., Bray-Ward P., Ward D.C., Vance G.H. Improvements in cytogenetic slide preparation: controlled chromosome spreading, chemical aging and gradual denaturing. *Cytometry.* 2001;43(2):101-109. doi 10.1002/1097-0320(20010201)43:2<101::AID-CYTO1024>3.0.CO;2-8
- Lichter P., Cremer T., Borden J., Manuelidis L., Ward D.C. Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by in situ suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum Genet.* 1988;80(3):224-234. doi 10.1007/BF01790090
- Mahajan K., Mahajan N.P. Cross talk of tyrosine kinases with the DNA damage signaling pathways. *Nucleic Acids Res.* 2015;43:10588-10601. doi 10.1093/nar/gkv1166
- Maréchal A., Zou L. DNA damage sensing by the ATM and ATR kinases. *Cold Spring Harbor Perspect Biol.* 2013;5(9):a012716. doi 10.1101/cshperspect.a012716
- Meltser V., Ben-Yehoyada M., Shaul Y. c-Abl tyrosine kinase in the DNA damage response: cell death and more. *Cell Death Differ.* 2011;18(1):2-4. doi 10.1038/cdd.2010.132
- Olcina M.M., Grand R.J.A., Hammond E.M. ATM activation in hypoxia – causes and consequences. *Mol Cell Oncol.* 2014;1(1):e29903. doi 10.4161/mco.29903
- Pinkel D., Landegent J., Collins C., Fuscoe J., Segraves R., Lucas J., Gray J. Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85(23):9138-9142. doi 10.1073/pnas.85.23.9138
- Sørensen C.S., Syljuåsen R.G., Falck J., Schroeder T., Rönnstrand L., Khanna K.K., Zhou B.B., Bartek J., Lukas J. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell.* 2003;3:247-258. doi 10.1016/S1535-6108(03)00048-5
- Stefler D., Malyutina S., Maximov V., Orlov P., Ivanoschuk D., Nikitin Y., Gafarov V., Ryabikov A., Voevoda M., Bobak M., Holmes M.V. Leukocyte telomere length and risk of coronary heart disease and stroke mortality: prospective evidence from a Russian cohort. *Sci Rep.* 2018;8(1):16627. doi 10.1038/S41598-018-35122-y