

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
имени М.В. Ломоносова

---

ХИМИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

*На правах рукописи*



ХОРОНЕНКОВА Светлана Владимировна

**РОЛЬ КИНАЗЫ АТМ В КООРДИНАЦИИ КЛЕТОЧНОГО ОТВЕТА  
НА ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ РАЗРЫВЫ ДНК  
КАСКАДОМ ПОСТТРАНСЛЯЦИОННЫХ МОДИФИКАЦИЙ**

03.01.04 – Биохимия

Диссертация  
на соискание ученой степени  
доктора химических наук

**Научный консультант:**  
доктор химических наук,  
профессор В.И. Тишков

Москва - 2017

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ОГЛАВЛЕНИЕ .....	2
ВВЕДЕНИЕ .....	6
АКТУАЛЬНОСТЬ И СТЕПЕНЬ РАЗРАБОТАННОСТИ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	6
ЦЕЛИ И ЗАДАЧИ .....	9
НАУЧНАЯ НОВИЗНА ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	10
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ И ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	12
МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .....	13
ПОЛОЖЕНИЯ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ .....	15
ЛИЧНЫЙ ВКЛАД АВТОРА .....	16
СТЕПЕНЬ ДОСТОВЕРНОСТИ И АПРОБАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	16
СТРУКТУРА И ОБЪЕМ РАБОТЫ .....	17
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	18
1.1. НЕСТАБИЛЬНОСТЬ ДНК .....	18
1.1.1. Гидролиз ДНК.....	18
1.1.2. Окислительные повреждения ДНК.....	20
1.1.3. Алкилирование азотистых оснований ДНК.....	22
1.1.4. Фотохимические повреждения ДНК .....	24
1.1.5. Разрывы цепей ДНК .....	25
1.1.6. Сшивки нитей ДНК .....	27
1.1.7. Объемные аддукты ДНК.....	29
1.1.8. Ковалентные аддукты ДНК-белок .....	31
1.2. ЦЕЛОСТНОСТЬ ГЕНОМА .....	33
1.2.1. Экзизионная репарация оснований (ЭРО).....	36
1.2.2. Репарация одноцепочечных разрывов ДНК (ОР).....	40
1.2.3. Координация процессов ЭРО и ОР-репарации.....	47
1.2.4. Репарация двуцепочечных разрывов ДНК.....	49
1.3. КИНАЗА АТМ.....	59
1.3.1. Каноническая активация АТМ .....	61
1.3.2. Активация АТМ в ответ на окислительный стресс .....	67
1.3.3. Механизмы неканонической активации АТМ.....	68
1.3.4. Атаксия телеангиэктазия.....	72
1.4. РЕГУЛЯЦИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЭРО И ОР-РЕПАРАЦИИ.....	73
1.4.1. Система убиквитинилирования.....	74

1.4.2.	Е3-убиквитинлигаза MULE и p53-зависимый ответ на повреждения ДНК .....	76
1.4.3.	MULE-зависимая регуляция ЭРО и репарации ОР .....	78
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....</b>		<b>82</b>
2.1.	МАТЕРИАЛЫ .....	82
2.1.1.	Плазмиды .....	83
2.2.	КЛЕТОЧНЫЕ ЛИНИИ ЧЕЛОВЕКА .....	84
2.2.1.	Условия культивирования .....	84
2.2.2.	Трансфекция клеток человека .....	85
2.2.3.	Обработка повреждающими ДНК агентами и ингибиторами.....	86
2.3.	АНАЛИЗ БЕЛКОВ .....	87
2.3.1.	Приготовление цельных клеточных экстрактов .....	87
2.3.2.	Фракционирование клеточного содержимого .....	88
2.3.3.	Определение концентрации белков .....	88
2.3.4.	Белковый электрофорез в денатурирующих условиях .....	89
2.3.5.	Белковый электрофорез в нативных условиях .....	89
2.3.6.	Иммуноблоттинг .....	89
2.4.	ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ АНАЛИЗ .....	92
2.5.	ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИЯ.....	94
2.6.	СОРТИРОВКА КЛЕТОК С АКТИВИРОВАННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИЕЙ (FACS) .....	94
2.6.1.	Анализ клеточного цикла.....	94
2.6.2.	Анализ апоптоза.....	95
2.6.3.	Проточная цитометрия .....	95
2.7.	ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ.....	96
2.7.1.	Выделение общей РНК из клеточных культур .....	96
2.7.2.	Выделение плазмидной ДНК.....	97
2.7.3.	Выделение ДНК-фрагментов из агарозного геля .....	98
2.7.4.	Очистка продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР) .....	99
2.8.	АНАЛИЗ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ .....	99
2.8.1.	Электрофорез в агарозном геле .....	99
2.8.2.	Секвенирование ДНК .....	99
2.9.	МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ .....	100
2.9.1.	Приготовление компетентных клеток <i>E.coli</i> .....	100
2.9.2.	Трансформация клеток <i>E.coli</i> .....	101
2.9.3.	Рестрикция ДНК .....	101
2.9.4.	Направленный мутагенез гена <i>USP7</i> .....	101
2.9.5.	Переклонирование рекомбинантной ДНК .....	103
2.9.6.	Получение рекомбинантной бакмидной ДНК .....	106

2.10.	АНАЛИЗ МАТРИЧНОЙ РНК (мРНК) .....	107
2.10.1.	Обратная транскрипция РНК.....	107
2.10.2.	ПЦР в реальном времени .....	107
2.11.	ЭКСПРЕССИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ .....	109
2.11.1.	Экспрессия белков в клетках <i>E.coli</i> .....	109
2.11.2.	Экспрессия белков в клетках насекомых .....	110
2.12.	ОЧИСТКА БЕЛКОВ .....	111
2.12.1.	Очистка рекомбинантных белков с бх His-эпитопом .....	111
2.12.2.	Очистка рекомбинантных белков с GST-эпитопом .....	111
2.12.3.	Определение киназы и фосфатазы для USP7S.....	112
2.13.	IN VITRO РЕАКЦИИ .....	113
2.13.1.	Анализ активности киназ.....	113
2.13.2.	Анализ активности фосфатаз.....	113
2.13.3.	<i>In vitro</i> убиквитинилирование и деубиквитинилирование .....	114
2.14.	ТАНДЕМНАЯ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ.....	114
2.15.	МЕТОД ДНК-КОМЕТ.....	115
2.15.1.	Щелочной вариант.....	115
2.15.2.	Условия нейтрального лизиса .....	116
2.16.	СТАТИСТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ .....	117
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ .....</b>		<b>118</b>
3.1.	РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ E3-УБИКВИТИНЛИГАЗЫ MULE .....	118
3.1.1.	Негативная регуляция MULE в ответ на повреждения ДНК и ее значимость .....	119
3.1.2.	Убиквитин-зависимая регуляция стационарного уровня содержания MULE.....	124
3.2.	РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНОГО УРОВНЯ СОДЕРЖАНИЯ USP7S .....	130
3.2.1.	Специфическая изоформа USP7 (USP7S) фосфорилирована по остатку S18 .....	130
3.2.2.	USP7S является основным регулятором стабильности MULE и HDM2.....	135
3.2.3.	S18-Фосфорилирование USP7S регулирует стабильность и активность белка .....	136
3.2.4.	Казеин-киназа 2 фосфорилирует USP7S по остатку серина 18.....	140
3.2.5.	Дефосфорилирование USP7S в ответ на повреждения ДНК.....	148
3.2.6.	Фосфатаза PPM1G дефосфорилирует остаток S18 в USP7S .....	149
3.2.7.	Эффективность фосфорилирования USP7S и стабильность MULE в ответ на повреждения ДНК регулируются фосфатазой PPM1G.....	156
3.2.8.	Активность PPM1G и статус фосфорилирования USP7S регулируются протеинкиназой ATM в ответ на повреждения ДНК .....	159
3.2.9.	Биохимическая значимость PPM1G-зависимой регуляции USP7S в ответ на повреждения ДНК .....	163
3.3.	АКТИВАЦИЯ ATM ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫМИ РАЗРЫВАМИ ДНК.....	166

3.3.1. Дефекты репарации одноцепочечных разрывов ДНК индуцируют активность АТМ .....	167
3.3.2. Активация АТМ в ответ на накопление нерепарированных ОР не связана с образованием репликационных ДР.....	173
3.3.3. ОР-зависимая активация АТМ замедляет вход в S-фазу клеточного цикла.....	180
3.3.4. АТМ-зависимая сигнализация нерепарированных ОР в фазе G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub> предотвращает образование высокомутагенных репликационных ДР.....	188
3.4. ПРЕДВАРИТЕЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МЕХАНИЗМА АКТИВАЦИИ АТМ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫМИ РАЗРЫВАМИ ДНК .....	193
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ .....</b>	<b>199</b>
4.1. Дестабилизация MULE в ответ на повреждения ДНК.....	199
4.2. USP7S-зависимая регуляция стационарного уровня содержания MULE .....	204
4.3. Регуляция стабильности/активности USP7S S18-ФОСФОРИЛИРОВАНИЕМ .....	206
4.4. МЕХАНИЗМ ДЕФОСФОРИЛИРОВАНИЯ USP7S В ОТВЕТ НА ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК .....	211
4.5. ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫЕ РАЗРЫВЫ ДНК СТИМУЛИРУЮТ АКТИВНОСТЬ АТМ .....	216
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....</b>	<b>221</b>
<b>ВЫВОДЫ .....</b>	<b>224</b>
<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....</b>	<b>226</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....</b>	<b>229</b>
<b>БЛАГОДАРНОСТИ.....</b>	<b>268</b>

## ВВЕДЕНИЕ

### **Актуальность и степень разработанности темы исследования**

Установление молекулярной структуры дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), за которое Фрэнсис Крик, Джеймс Уотсон и Морис Уилкинс были удостоены Нобелевской премии 1962 г. по физиологии и медицине, без сомнения, явилось одним из основополагающих научных открытий XX века [Franklin, R.E. & Gosling, R.G., 1953; Watson, J.D. & Crick, F.H., 1953; Wilkins, M.H. *et al.*, 1953]. Впрочем, связанное с важнейшей ролью ДНК в качестве носителя генетической информации (во всех клеточных формах жизни и некоторых вирусах) первоначальное предположение о фундаментальной стабильности первичной структуры данной биологической макромолекулы оказалось неверным. Сегодня известно, что ДНК химически нестабильна (в том числе в физиологических условиях), и результатом подобного феномена является образование десятков и даже сотен тысяч повреждений ДНК на геном в сутки [Lindahl, T., 1993]. В дополнение к спонтанной нестабильности ДНК, источником которой являются широкий ряд внутриклеточных соединений и метаболитов (вода, активные формы кислорода, S-аденозилметионин) и непосредственно процесс репликации ДНК, действие многочисленных физических и химических факторов окружающей среды (ультрафиолетовое и ионизирующее излучение, мутагенные соединения) провоцирует образование дополнительного количества экзогенных повреждений ДНК. Несмотря на неотъемлемую роль динамической природы ДНК в процессе эволюционной изменчивости, повреждения ДНК препятствуют нормальному протеканию жизненно важных процессов репликации генетического материала и транскрипции, приводя к нарушениям экспрессии генов и в ряде случаев гибели клеток. Повреждения ДНК также являются источником мутаций и, как следствие, нестабильности генома и ассоциированных патологических состояний, включающих нейродегенеративные и онкологические заболевания, а также старение клеток и организма в целом.

Для поддержания целостности клеточного генома и предотвращения преждевременного старения и злокачественного перерождения клетки располагают целым набором защитных механизмов, включающих системы репарации ДНК. Функция последних заключается в устранении повреждений ДНК, а также коррекции мутаций, вызванных действием эндогенных

и экзогенных мутагенов. Однако выполнение подобной функции не ограничивается лишь репарацией ДНК: для поддержания целостности генома необходима совокупность действия систем распознавания повреждений ДНК, передачи сигнала от поврежденной ДНК к различным белкам, обеспечивающим комплексный клеточный ответ на генотоксический стресс, включая ферменты репарации, и, наконец, непосредственно репарации ДНК. Необходимой частью подобной схемы регуляции являются также и системы уничтожения целых клеток в случае невозможности своевременной и качественной репарации их генетического материала с целью предотвращения злокачественного перерождения. Координированное действие вышеупомянутых систем иначе называется клеточным ответом на повреждения ДНК и является обязательным свойством нормальной (непатологической) клетки.

Несмотря на низкую частоту возникновения спонтанных двуцепочечных разрывов ДНК (ДР, 10-20 ДР на геном человека в сутки, [Lindahl, T., 1993]), единственными относительно широко исследованными в последние годы являются системы клеточного ответа именно на данный тип повреждений ДНК [Jackson, S.P. & Bartek, J., 2009]. Это, в первую очередь, связано с высокой мутагенностью ДР среди других повреждений ДНК, а также существованием прямых экспериментальных доказательств взаимосвязи дефектов их репарации и сигнализации с развитием раковых заболеваний [Bartkova, J. *et al.*, 2005]. В отличие от ДР, число спонтанно возникающих одноцепочечных разрывов ДНК (ОР), также образующихся в качестве интермедиатов репарации повреждений оснований ДНК, феноменально и составляет порядка 15 000-20 000 повреждений ДНК на геном человека в сутки [Lindahl, T., 1993]. Нерепарированные ОР являются основным источником репликационных ДР, препятствуют эффективной транскрипции ДНК, и мутации/изменение уровня экспрессии генов ферментов эксцизионной репарации оснований (ЭРО) и ОР-репарации характерны, хотя и более редки по сравнению с белками ДР-репарации, для высокого процента опухолей различной природы [Maynard, S. *et al.*, 2009]. Более того, дефекты репарации ОР являются причиной ряда прогрессивных нейродегенеративных заболеваний и вносят значительный вклад в процесс старения клетки [Caldecott, K.W., 2008; Pan, M.-R. *et al.*, 2016]. Таким образом, исследование совокупности действия систем детекции, сигнализации, координации с другими клеточными процессами и репарации ОР является чрезвычайно актуальной задачей. Действительно, очевидная важность своевременной и эффективной репарации эндогенных ОР обеспечила

широкомасштабное исследование механизмов их детекции и репарации [Caldecott, K.W., 2008]. Несмотря на это, концепции существования внутриклеточной системы передачи сигнала от сенсоров ОР к системам их репарации и координации ОР-репарации с другими клеточными процессами, например, прогрессией клеточного цикла, или, другими словами, системы клеточного ответа на ОР до настоящей работы предложено не было. Следует также отметить, что в случае клеточного ответа на ДР значительная роль отводится посттрансляционным модификациям вовлеченных в процесс белков, механизмы регуляции которых только начинают проясняться. Соответственно, чрезвычайно актуальным является вопрос не только о собственно существовании системы клеточного ответа на ОР, но и о выявлении белков, вовлеченных в данный процесс, молекулярных механизмов их регуляции и возможной регуляторной роли посттрансляционных модификаций в клеточном ответе на ОР.

Ингибирование активности ферментов, вовлеченных в сигнализацию и/или репарацию повреждений оснований ДНК и ОР, в раковых клетках с дефектами репарации ДР всегда было одной из центральных идей концепции “синтетической летальности” [Kaelin, W.G., Jr., 2005]. Подобная концепция основана на индукции повреждений ДНК с целью стимуляции гибели преимущественно раковых клеток, обладающих нарушениями репарации ДНК. Наиболее ярким и классическим примером разработки нового класса препаратов для направленной терапии раковых заболеваний является синтетическая летальность генов сенсоров ОР поли(ADP-рибозо)полимераз (*PARP*) и вовлеченных в репарацию ДР методом гомологичной рекомбинации генов рака молочной железы *BRCA1* и *BRCA2* [Bryant, H.E. *et al.*, 2005; Farmer, H. *et al.*, 2005]. Ингибирование активности *PARP* с использованием олапариба (коммерческое название препарата Lynparza™) при терапии рака яичников с мутациями в *BRCA* одобрено к использованию в США и Европе [Kim, G. *et al.*, 2015] и прошло клинические исследования фазы II в случае *BRCA*-мутантных раков предстательной железы [Mateo, J. *et al.*, 2015]. Системы сигнализации нерепарированных повреждений ДНК и их репарации присутствуют и в опухолевых клетках, где они противодействуют терапевтическому эффекту средств, используемых при лечении раковых заболеваний, таких, например, как ионизирующее облучение и химиотерапия. В настоящее время одним из важнейших препятствий к успешной разработке принципиально новых подходов к терапии раковых заболеваний является фундаментальный пробел в знаниях о молекулярных каскадах, ответственных за передачу



сигнала от ОР к системам их репарации и координации репарации ДНК с другими клеточными процессами. Таким образом, идентификация и исследование системы клеточного ответа на одноцепочечные разрывы ДНК имеют высокую актуальность и значимость.

## Цели и задачи

Целью настоящей работы явились выявление и детальное исследование молекулярных механизмов клеточного ответа на нерепарированные ОР и белков, вовлеченных в их реализацию.

В ходе исследования были поставлены и успешно решены следующие задачи:

1. Проверить возможность существования негативной регуляции уровня экспрессии E3-убиквитинлигазы MULE, контролирующей содержание белков-эффекторов клеточного ответа на ОР опухолевого супрессора p53 и ДНК-полимеразы  $\beta$  (POL  $\beta$ ), в зависимости от эффективного уровня повреждений ДНК в клетках. Установить биохимическую значимость и механизм подобной регуляции.
2. Выяснить механизм регуляции стационарного содержания E3-убиквитинлигазы MULE, которая обеспечивает координацию репарации ОР с прогрессией клеточного цикла.
3. Выявить функциональную значимость неосновной изоформы убиквитин-специфической протеазы USP7 (USP7S) и изучить роль посттрансляционной модификации уникального для USP7S остатка серина 18 в регуляции стационарного уровня содержания фермента.
4. Провести биохимическую идентификацию белков, ответственных за фосфорилирование и дефосфорилирование остатка S18 в USP7S.
5. Исследовать возможность регуляции активности и/или стабильности, и/или комплексообразования с субстратом киназы и фосфатазы, ответственных за контроль статуса S18-фосфорилирования USP7S, в зависимости от количества нерепарированных ОР. Выяснить механизм подобной регуляции.
6. Идентифицировать белок-преобразователь, контролирующий клеточный сигнальный каскад в ответ на ОР, и выявить его биохимическую роль в координации прогрессии клеточного цикла и эффективности ОР-репарации. Выявить белок-сенсор, обеспечивающий детекцию нерепарированных ОР и передачу сигнала преобразователю. Исследовать

функциональную взаимозависимость каскада сигнализации нерепарированных ОР с клеточными системами, реализуемыми в ответ на генотоксический стресс других типов (ДР и окислительный стресс).

7. Обосновать биохимическую значимость существования системы клеточного ответа на нерепарированные ОР и продемонстрировать последствия нарушений регуляции подобной системы.

### **Научная новизна темы исследования**

В рамках настоящей работы была впервые предложена и подтверждена фундаментальная концепция существования внутриклеточной системы передачи сигнала от сенсоров ОР к системам их репарации и координации ОР-репарации с прогрессией клеточного цикла, также называемой системой клеточного ответа на нерепарированные одноцепочечные разрывы ДНК. Были проведены систематические исследования по биохимической идентификации белков, вовлеченных в клеточный ответ на нерепарированные ОР, и продемонстрировано, что подобная система является фундаментальным свойством нормальной клетки человека, обеспечивающим поддержание целостности генома.

В ходе исследования было впервые выявлено кратковременное снижение клеточного уровня содержания E3-убиквитинлигазы MULE в ответ на повреждения ДНК. Подобная регуляция клеточного уровня экспрессии MULE обеспечивает повышение эффективности ЭРО и ОР-репарации через стабилизацию ДНК-полимераз  $\beta$  и  $\lambda$ , а также запуск p53-зависимого ответа на повреждения ДНК. При исследовании предшествующего пути передачи сигнала от ОР к MULE был установлен механизм регуляции стабильности MULE балансом процессов самоубиквитинирования и деубиквитинирования специфической S18-содержащей изоформой USP7S убиквитин-специфической протеазы USP7. Было впервые показано, что USP7S не является основной по клеточному содержанию изоформой USP7 (3-5 % от общего содержания фермента), имеет высокий эндогенный уровень фосфорилирования аминокислотного остатка S18 (60-80 %) и является основным среди всех изоформ USP7 регулятором стабильности не только MULE, но и E3-убиквитинлигазы HDM2, субстратом которой также является p53. В рамках исследования было впервые установлено, что фосфорилирование остатка S18 в USP7S осуществляется конститутивно киназой 2 (CK2)

и что это фосфорилирование необходимо для поддержания стабильности и активности фермента, тогда как ответом на ОР является дефосфорилирование USP7S по остатку S18, которое и обеспечивает кратковременное снижение стабильности MULE (и HDM2). Биохимическая идентификация фосфатазы, ответственной за дефосфорилирование остатка S18 в USP7S, позволила впервые установить значимую роль PPM1G в координации клеточного ответа на ОР, вышестоящим положительным регулятором которой являлась киназа ATM. Наконец, в рамках настоящего исследования было впервые показано, что ответом на нерепарированные ОР является PARP1-зависимая индукция активности киназы ATM. Явление ОР-зависимой активации ATM является принципиально новой концепцией и значительно расширяет существующие представления о канонической роли ATM в качестве белка-преобразователя в клеточном ответе лишь на ДР, указывая на еще более значимую по сравнению с описанной ранее роль данного фермента в качестве стража целостности генома.

Таким образом, в рамках настоящей работы было впервые постулировано существование фундаментально важной системы клеточного ответа на нерепарированные ОР, представляющей собой регулируемый рядом последовательных посттрансляционных модификаций сигнальный каскад: PARP1—ATM—PPM1G—USP7S—MULE и HDM2—p53 и ДНК-полимераза  $\beta$ . Представлен ряд важнейших результатов по функции отдельных белков и роли описанного выше сигнального пути в обеспечении координации эффективной репарации ОР и p53-зависимой задержки клеток с нерепарированными ОР в фазе G<sub>1</sub> клеточного цикла. Биохимическая значимость открытой в рамках настоящей работы системы клеточного ответа на нерепарированные ОР заключается в обеспечении эффективной и своевременной репарации ОР в фазе клеточного цикла G<sub>1</sub> с целью предотвращения образования репликационных ДР и поддержания целостности генома клетки. Нарушения клеточного ответа на ОР вносят значительный вклад в развитие ряда патологических состояний, одним из примеров которых является фенотип нестабильности генома в ATM-дефицитных клетках пациентов с заболеванием атаксия телеангиэктазия.

## **Теоретическая и практическая значимость исследования**

В данном исследовании был получен ряд приоритетных научных результатов, свидетельствующих о ранее неизвестной фундаментальной роли ряда белков, включающих S18-содержащую изоформу убиквитин-специфической протеазы USP7S, фосфатазу PPM1G и киназу ATM, в координации регуляции эффективности системы ЭРО и ОР-репарации и прогрессии клеточного цикла, то есть временных рамок такой репарации ДНК. Полученные впервые экспериментальные данные о значимой функции PPM1G в поддержании целостности генома в ответ на изменения количества нерепарированных ОР указывают на возможную роль данной фосфатазы в качестве супрессора злокачественной трансформации клеток и предполагают обнаружение инактивирующих функцию PPM1G мутаций в клетках раковых опухолей с p53 дикого типа.

Раскрыта ключевая роль киназы ATM в координации своевременной и эффективной репарации одноцепочечных разрывов ДНК в соответствии с многоступенчатым сигнальным каскадом, регулируемым посттрансляционными модификациями. Совокупность результатов данной работы по активации ATM нерепарированными ОР, а также параллельных во времени выводов последних 3-4 лет об индукции активности ATM в ответ на инсулиновый и окислительный стресс и кислородное голодание, сделанных другими исследователями, указывают на значительно более широкую, чем представлялось до недавнего времени, роль этой киназы в поддержании клеточного гомеостаза.

Открытие многоступенчатого сигнального каскада, обеспечивающего ATM-зависимую передачу сигнала о присутствии в клетке нерепарированных ОР от сенсора данного типа повреждений ДНК PARP1 к эффекторам их своевременной репарации p53 и ДНК-полимеразе  $\beta$ , вносит фундаментальный вклад в наше понимание молекулярных механизмов клеточного ответа на ОР и важнейшей роли эффективной и своевременной репарации ОР в поддержании целостности генома человека и имеет высокую практическую ценность для информированной разработки новых высокоэффективных подходов к терапии раковых заболеваний.

## **Методология и методы исследования**

### **Материалы**

В настоящей работе был использован широкий набор культивируемых клеточных линий человека нормального и ракового происхождения (нормальные фибробласты TIG-1, GM03489, GM02052, GM03487 и ATLD-2; аденокарцинома шейки матки HeLa; карцинома кишечника HCT116 p53<sup>+/+</sup>; остеосаркома U-2 OS). Основным объектом исследования служили культуры нормальных (нетрансформированных) фибробластов из здоровых индивидуумов, а также пациентов с атаксией телеангиэктазией (А-Т) и заболеванием, похожим на атаксию телеангиэктазию (ATLD), полученные из Coriell Institute Cell Repository, США. Все основные экспериментальные результаты были получены в клетках фибробластов нормального происхождения и воспроизведены в одной и более клеточных линиях ракового происхождения с целью исключения специфичности наблюдаемого эффекта в зависимости от типа клеток. Выбор фибробластов нормального происхождения в качестве первичного объекта исследования был обусловлен их функциональным ответом на повреждения ДНК, экспрессией p53 дикого типа и стабильным в течение нескольких пассажей кариотипом, что нехарактерно для раковых клеточных линий.

### **Методы исследования**

В ходе исследования использовали широкий спектр современных методов биохимии, биофизики, молекулярной и клеточной биологии, включающих:

1. Культивирование клеточных линий человека.
2. Модуляцию уровня экспрессии генов с использованием временной трансфекции клеток человека короткими интерферирующими РНК (киРНК) и плазмидной ДНК и активности ферментов с использованием специфических ингибиторов.
3. Регуляцию эффективного уровня повреждений ДНК при обработке клеток человека повреждающими ДНК химическими соединениями и ионизирующей радиацией.
4. Анализ клеточного уровня содержания и локализации белков в цельных клеточных экстрактах или при фракционировании клеточного содержимого с их последующим

разделением методами электрофореза белков в нативных или денатурирующих условиях в полиакриламидных гелях и иммуноблоттингом.

5. Исследование локализации и образования фокусов белков, а также синтеза ДНК с использованием метода иммунофлуоресцентного анализа и конфокальной микроскопии.
6. Исследование взаимодействий белков и обогащение образцов трудно детектируемыми белковыми продуктами с использованием метода иммунопреципитации из клеточных экстрактов или смеси очищенных рекомбинантных белков.
7. Анализ клеточного цикла и апоптоза методом проточной цитометрии.
8. Исследование уровня повреждений ДНК методами гель-электрофореза единичных клеток в условиях щелочного и нейтрального pH.
9. Выделение и анализ нуклеиновых кислот методами полимеразной цепной реакции (ПЦР), обратной транскрипции рибонуклеиновых кислот, ПЦР в реальном времени и секвенирования ДНК.
10. Молекулярное клонирование рекомбинантных и бакмидных ДНК с использованием методов трансформации бактериальных клеток, рестрикции ДНК, безлигазного клонирования, направленного мутагенеза генов и сайт-специфической рекомбинации.
11. Получение рекомбинантных белков с использованием систем экспрессии в клетках бактерий *E.coli* и бакуловирус-инфицированных клеток насекомых *S.frugiperda* с последующей хроматографической очисткой.
12. Идентификация ферментов, ответственных за посттрансляционные модификации специфических аминокислотных остатков субстратов, методом многоступенчатого хроматографического фракционирования клеточного содержимого с последующим анализом фракций тандемной масс-спектрометрией.
13. Анализ активности ферментов с использованием реакций *in vitro*.
14. Статистический анализ экспериментальных данных с использованием критерия Шапиро-Уилка, парного t-критерия Стьюдента и непараметрического U-критерия Манна-Уитни.

## Положения, выносимые на защиту

1. Кратковременное снижение клеточного содержания E3-убиквитинлигазы MULE в ответ на повреждение ДНК обеспечивает стабилизацию вовлеченной в репарацию ДНК-полимеразы  $\beta$  (POL  $\beta$ ) и супрессора опухолевого роста p53, контролирующего регуляцию прогрессии клеточного цикла.
2. Стационарный уровень содержания MULE регулируется балансом процессов самоубиквитинирования и деубиквитинирования специфической S18-содержащей изоформой USP7S убиквитин-специфической протеазы USP7. Пониженная стабильность MULE в ответ на ОР обеспечивается кратковременным снижением экспрессии USP7S.
3. USP7S составляет незначительную долю общего содержания всех изоформ фермента (3-5 %), являясь основным регулятором E3-убиквитинлигаз MULE и HDM2. Большая часть (60-80 %) убиквитин-специфической протеазы USP7S конститутивно фосфорилирована по остатку серина 18 в неповрежденных клетках. Данная посттрансляционная модификация обеспечивает высокий уровень стабильности и активности фермента.
4. Казеин-киназа 2 и фосфатаза PPM1G обеспечивают фосфорилирование и дефосфорилирование остатка S18 в USP7S, соответственно. Фосфорилирование S18 в USP7S казеин-киназой 2 является конститутивным.
5. Киназа ATM фосфорилирует PPM1G в ответ на нерепарированные ОР, что индуцирует фосфатазную активность PPM1G. Активация PPM1G приводит к дестабилизации и снижению активности USP7S и соответствующему снижению уровня экспрессии MULE.
6. Активность киназы ATM стимулируется нерепарированными ОР эндогенной и экзогенной природы и зависит от PARP1-зависимого синтеза поли(ADP-рибозы). ОР-зависимая активация ATM происходит в отсутствие ДР и не зависит от компонентов MRE11-RAD50-NBS1 комплекса или образования дисульфидных связей при окислении остатков цистеина, характерных для известных механизмов индукции активности ATM.
7. ATM играет ключевую роль в координации своевременной и эффективной репарации ОР в рамках многоступенчатого сигнального каскада, регулируемого посттрансляционными модификациями: PARP1—ATM—PPM1G—USP7S—MULE и HDM2—p53 и POL  $\beta$ . Активация ATM нерепарированными ОР обеспечивает p53-зависимую задержку входа клеток с поврежденной ДНК в фазу S клеточного цикла и POL  $\beta$ -зависимую стимуляцию

эффективности ОР-репарации, предотвращая образование мутагенных репликационных ДР и поддерживая целостность генома.

### **Личный вклад автора**

Все описанные в настоящей работе экспериментальные данные, за исключением результатов масс-спектрометрического анализа, были получены лично автором. Пробоподготовку образцов и масс-спектрометрический анализ проводили в сотрудничестве с Мариолой Эдельманн и Бенедиктом Кесслер в лаборатории последнего (Оксфордский университет, Великобритания).

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность экспериментальных данных обеспечена использованием обширного комплекса современных методов исследования, ряда независимых экспериментальных моделей и подходящих положительных и отрицательных контролей. Все эксперименты проводили в трех и более независимых повторах и для анализа данных использовали адекватные и современные методы статистической обработки. В ряде случаев полученные в настоящей работе результаты были хронологически позже подтверждены данными отечественных и зарубежных исследований (смотри главу 4 “Обсуждение результатов”).

Основные результаты работы опубликованы в ведущих биохимических журналах, включающих высокоимпактные *Molecular Cell*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *Nucleic Acids Research*, *EMBO Journal* и другие. Всего по теме настоящего исследования опубликовано 15 оригинальных научных статей (все в журналах, входящих в перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий ВАК РФ) и 10 тезисов докладов международных конференций. Результаты работы были представлены к обсуждению мировым научным сообществом в виде 5 устных и 5 постерных докладов на международных конференциях и симпозиумах: “5<sup>th</sup> Annual Meeting of the Radiation Research Society” (США, 2010; постерная презентация), “Charles Rodolphe Brupbacher Symposium on Cancer Genome and DNA Repair” (Швейцария, 2011; постерная презентация), “6<sup>th</sup> International Workshop on Mdm2” (США, 2011; постерная презентация), “6<sup>th</sup> DNA repair workshop” (Словакия, 2012; пленарный доклад), “3<sup>rd</sup> Erling Seeberg Symposium on DNA Repair” (Норвегия, 2012; короткий доклад), международная конференция “Биокатализ-2013: Фундаментальные основы и применение” (Россия, 2013;



пленарный доклад), “Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society” (Великобритания, 2014; пленарный доклад), “5<sup>th</sup> US-EU International Conference on Repair of Endogenous DNA Damage” (США, 2014; короткий доклад), “Tomas Lindahl Conference on DNA Repair” (Норвегия, 2015; постерная презентация), “Benzon Symposium on Genome Instability and Neurodegeneration (no. 62)” (Копенгаген, 2016; постерная презентация).

Апробация диссертационной работы прошла 24 марта 2017 г. на заседании кафедры химической энзимологии Химического факультета Московского Государственного Университета имени М. В. Ломоносова и запланирована в качестве пленарного доклада на международной конференция “Биокатализ-2017: Фундаментальные основы и применение” (Москва, 2017).

### **Структура и объем работы**

Диссертационная работа включает введение, четыре главы (“Обзор литературы”, “Материалы и методы”, “Результаты” и “Обсуждение результатов”), заключение, выводы, список сокращений и список цитируемой литературы. Работа изложена на 268 страницах, содержит 83 рисунка, 10 таблиц и 633 источника литературы.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Нестабильность ДНК

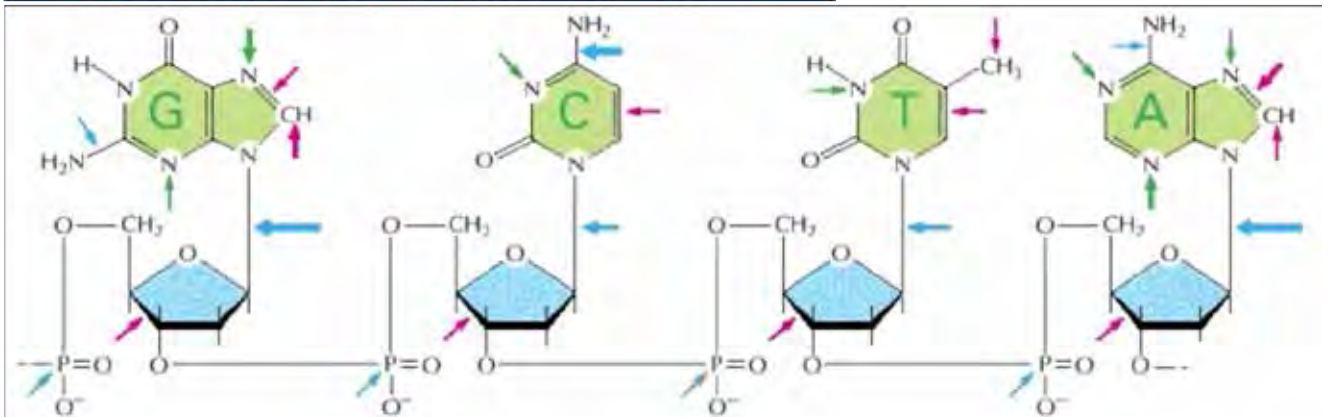
Эффект спонтанной химической нестабильности характерен для всех биологических макромолекул, включая белки и нуклеиновые кислоты. В случае белков, например, спонтанная изомеризация аминокислотных остатков аспарагиновой кислоты или деаминирование аспарагина и глутамина часто приводят к структурным и/или функциональным изменениям полипептидов [Johnson, B.A. *et al.*, 1989; Robinson, A.B. & Rudd, C.J., 1974]. Химическая нестабильность РНК в наибольшей степени связана с присутствием 2'-гидроксильной группы рибозы, которая обеспечивает повышенную чувствительность фосфодиэфирной связи биомолекулы к гидролизу [Singer, B. & Fraenkel-Conrat, H., 1963]. Структура ДНК значительно более устойчива к гидролизу фосфодиэфирной связи, но подвергается целому ряду альтернативных эндогенных модификаций (повреждений) с участием воды, активных форм кислорода, алкилирующих соединений и других продуктов внутриклеточного метаболизма [Lindahl, T., 1993]. В дополнение значительное количество повреждений ДНК возникает под действием целого ряда факторов окружающей среды (экзогенных факторов), например, ультрафиолетового (УФ) и рентгеновского излучения, температуры, природных изотопов и химически активных соединений. Основные типы повреждений ДНК подробно рассмотрены ниже.

#### 1.1.1. Гидролиз ДНК

В отличие от РНК ценой за повышенную стабильность фосфодиэфирной связи ДНК за счет отсутствия 2'-ОН группы в остатке дезоксирибозы (dR) является значительная дестабилизация *N*-гликозидной связи (Рисунок 1.1). Результатом спонтанного гидролиза этой связи является либо потеря пуринового основания (апуринизация), что происходит с частотой 2 000-10 000 событий на клетку в день, либо апириминицирование (потеря тимина или цитозина) при частоте в 20 раз ниже по сравнению с апуринизацией ДНК [Lindahl, T. & Karlstrom, O., 1973; Lindahl, T. & Nyberg, B., 1972]. В обоих случаях происходит образование так называемого апуринового/апириминицированного (АП) сайта с сохранением сахарофосфатного остова ДНК. В

дополнение к спонтанному гидролизу ДНК АП-сайты могут образовываться при дестабилизации *N*-гликозидной связи в результате модификаций азотистых оснований ДНК, которые их превращают в лучшую уходящую группу, или в результате ферментативного гидролиза той же связи монофункциональными ДНК-гликозилазами в процессе эксцизионной репарации оснований [Lindahl, T., 1976; Loeb, L.A. & Preston, B.D., 1986]. АП-сайты мешают процессам нормальной репликации ДНК и транскрипции и представляют собой мутагенные и цитотоксичные повреждения ДНК [Gentil, A. *et al.*, 2000; Guillet, M. & Boiteux, S., 2002; Schaaper, R.M. *et al.*, 1983; Yu, S.L. *et al.*, 2003].

**ГИДРОЛИЗ**  
**ОКИСЛЕНИЕ**  
**НЕФЕРМЕНТАТИВНОЕ МЕТИЛИРОВАНИЕ**



**Рисунок 1.1.** Сайты-мишени спонтанной деградации ДНК. Цветными стрелками обозначены химические связи и атомы, подвергающиеся реакциям гидролиза, окисления и неферментативного метилирования под действием *S*-аденозилметионина. Толщина стрелок указывает на относительную частоту реакций. Адаптировано из [Lindahl, T., 1993].

В дополнение к нестабильности *N*-гликозидной связи частым повреждением ДНК является гидролитическое дезаминирование цитозина и его производных 5-метилцитозина и 5-гидроксиметилцитозина, а также пуриновых оснований (Рисунок 1.1). Двухцепочечная спираль ДНК обеспечивает высокий уровень защиты цитозина от процесса дезаминирования, частота которого составляет порядка 100-500 повреждений на клетку в день [Lindahl, T. & Nyberg, B., 1974]. Реакция дезаминирования цитозина происходит с образованием урацила, который эффективно распознается урацил-ДНК-гликозилазой с устранением повреждения. В противном случае урацил образует парный комплекс с аденином, приводя к репликационной замене С:Т. Гидролитическое дезаминирование 5-метилцитозина случается в 3-4 раза чаще такового в случае немодифицированного цитозина, и происходит с образованием тимина и относительно

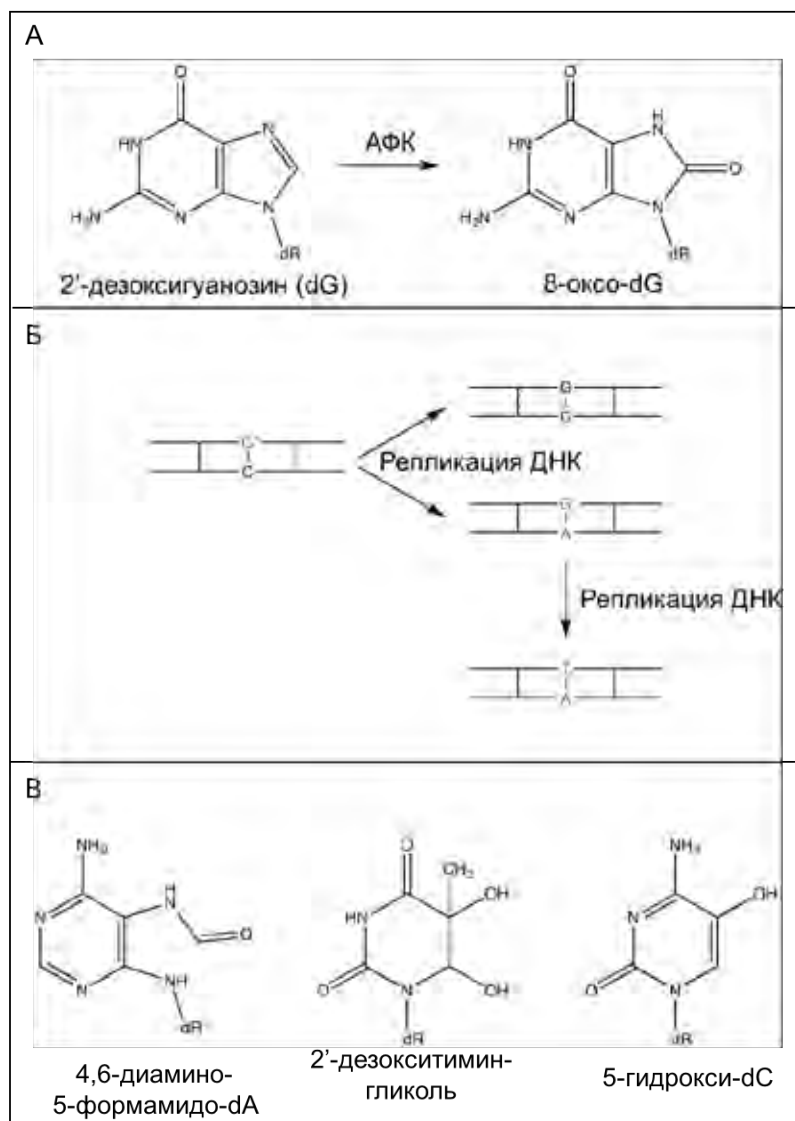
высокой вероятностью закрепления T:G мутации из-за медленной кинетики распознавания повреждения системой репарации ошибочно спаренных нуклеотидов [Lindahl, T. & Nyberg, B., 1974].

Гидролитическое дезаминирование пуриновых оснований ДНК происходит значительно реже (в 30 и более раз), чем в случае цитозина, и приводит к образованию неприродных оснований ксантина или гипоксантина из гуанина или аденина, соответственно [Karran, P. & Lindahl, T., 1980]. Оба ксантин и гипоксантин образуют парные комплексы с цитозином, потому процесс дезаминирования аденина может быть потенциально мутагенным, особенно с учетом того, что содержание и активность гипоксантин-ДНК-гликозилазы в клетках человека невысоки [Dianov, G. & Lindahl, T., 1991; Hill-Perkins, M. *et al.*, 1986]. Следует также отметить, что *N*-гликозидная связь ксантина неустойчива и подвергается спонтанному гидролизу с образованием АП-сайтов [Schuster, H., 1960; Shapiro, R. & Pohl, S.H., 1968].

### 1.1.2. Окислительные повреждения ДНК

Аэробные метаболические процессы приводят к образованию значительных количеств активных форм кислорода (АФК), которые включают синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ), пероксид водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и свободные радикалы кислорода, например, супероксид-анион ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) и гидроксильный радикал ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) [Halliwell, B., 2006]. К таковым относятся, например, процессы митохондриального респираторного дыхания и иммунного ответа [Boveris, A. & Chance, B., 1973; Clark, R.A., 1990]. К экзогенным источникам АФК относятся радиация, лекарственные препараты, факторы роста, вирусные и бактериальные инфекции, сопровождающиеся воспалительными реакциями [Irani, K. *et al.*, 1997; Ohba, M. *et al.*, 1994; Shen, Z. *et al.*, 2000]. Окислительные повреждения азотистых оснований под действием АФК составляют значительную долю эндогенных повреждений ДНК [Lindahl, T., 1993]. Одним из наиболее часто встречающихся и мутагенных окислительных повреждений оснований ДНК является 7,8-дигидро-8-оксогуанин (иначе таутомерный 8-гидроксигуанин или просто 8-оксогуанин), который образует комплементарную пару Хугстеновского типа с аденином (вместо цитозина), приводя к закреплению G:T мутации в процессе репликации ДНК (Рисунок 1.2 А-Б) [Kasai, H. & Nishimura, S., 1984; Shibutani, S. *et al.*, 1991]. Количество эндогенных оснований 8-гидроксигуанина в зависимости от типа клеток человека и метода измерения составляет

0,06-145,25 повреждений на  $10^6$  п.н. [Fraga, C.G. *et al.*, 1990; Higuchi, Y. & Linn, S., 1995; Ravanat, J.L. *et al.*, 2002; Spencer, J.P. *et al.*, 1996]. При действии супероксид-аниона и гидроксильного радикала в дополнение к 8-гидроксигуанину в клетках образуется приблизительно ему равное количество формамидопиримидиновых производных гуанина (2,4-диамино-6-оксо-1,6-дигидропиримидин-5-илформамид) и аденина (4,6-диамино-5-формамидопиримидин) (Рисунок 1.2 В) [Dizdaroglu, M., 1986]. Оба типа поврежденных оснований могут устраняться действием 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы OGG1 [Tchou, J. *et al.*, 1991]. Другие модификации аденина, мутагенность которых невысока (менее 1 %), включают 7,8-дигидро-8-оксоаденин и 2-гидроксиаденин [Kalam, M.A. *et al.*, 2006].



**Рисунок 1.2.** Окислительные повреждения азотистых оснований ДНК. **А.** Образование 7,8-дигидро-8-оксогуанина при окислении гуанина. **Б.** Закрепление G:T мутации при репликации ДНК, содержащей 7,8-дигидро-8-оксогуанин (G\*). **В.** Структурные формулы ряда окисленных оснований ДНК.

Окисление пиримидиновых оснований ДНК приводит к образованию целого ряда повреждений. Основными продуктами окисления тимина являются тимингликоль (Рисунок 1.2 В) и 5-гидроксиметилурацил, оба обладают относительно невысоким уровнем мутагенности [Basu, A.K. *et al.*, 1989; Chaung, W. & Boorstein, R.J., 1997]. Ряд продуктов окисления цитозина, таких как цитозингликоль, 5-гидроксицитозин (Рисунок 1.2 В), 5-гидроксиурацил и урацилгликоль, могут вызывать С:Т мутации, причем два последних типа повреждений являются высокомуtagenными и образуются в сравнимых с 8-гидроксигуанином количествах [Kreutzer, D.A. & Essigmann, J.M., 1998; Wagner, J.R. *et al.*, 1992].

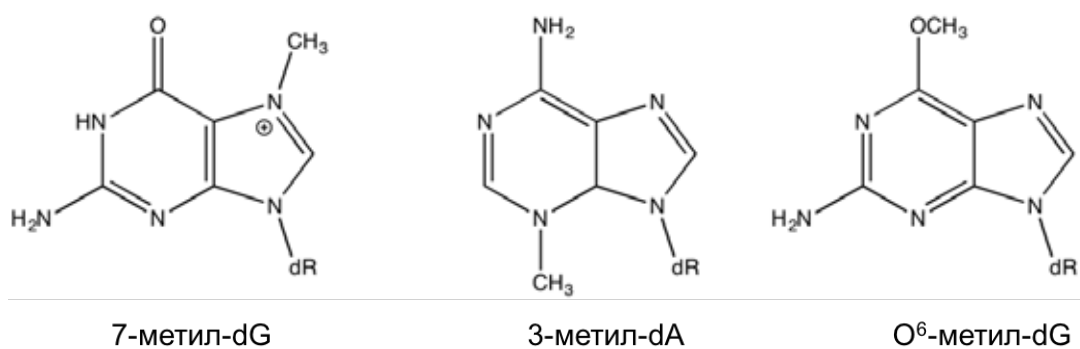
Отдельно следует упомянуть циклические ДНК-аддукты, которые образуются при образовании дополнительной ковалентной связи между азотистым основанием и сахарофосфатным остовом, 8,5'-цикло-dA и 8,5'-цикло-dG, а также ковалентно-связанные пуриновые димеры [Carmichael, P.L. *et al.*, 1992; Dirksen, M.L. *et al.*, 1988]. Окисленные основания ДНК распознаются системой эксцизионной репарации оснований [Lindahl, T., 1993], тогда как объемные циклические ДНК-аддукты вызывают локальные нарушения пространственной структуры ДНК и удаляются системой эксцизионной репарации нуклеотидов.

### 1.1.3. Алкилирование азотистых оснований ДНК

Помимо АФК клетки содержат целый ряд высокоактивных соединений, которые могут вызывать повреждения ДНК. Одним из таких соединений является донор метильных групп S-аденозилметионин (SAM), который необходим для синтеза целого ряда биологически активных веществ (например, фосфатидилхолина), а также контролируемого ферментативного метилирования ДНК для регуляции экспрессии генов [Holliday, R. & Ho, T., 1991]. Тем не менее азотистые основания ДНК также подвергаются неферментативному метилированию под действием SAM с образованием целого ряда модифицированных оснований, многие из которых мутагенны [Barrows, L.R. & Magee, P.N., 1982; Naslund, M. *et al.*, 1983; Rydberg, B. & Lindahl, T., 1982]. Другими донорами метильной группы являются метионин, фолиевая кислота, бетаин и холин, которые как образуются в процессах клеточного метаболизма, так и поступают в организм с питательными веществами, табачным дымом и загрязняющими окружающую среду веществами [Obeid, R., 2013]. Сильными алкилирующими агентами также являются

*N*-нитрозосоединения, например, *N*-метил-*N*-нитрозомочевина и *N*-метил-*N'*-нитро-*N*-нитрозогуанидин [Montesano, R. & Bartsch, H., 1976]. *N*-нитрозоамины и их метаболические предшественники встречаются в разнообразных пищевых продуктах и искусственных и натуральных продуктах, включая детергенты, лекарственные препараты, растворители и пластмассы, косметические средства и табак [Preussmann, R., 1984]. *N*-нитрозоамины сами по себе инертны, но метаболическое окисление  $\alpha$ -атома углерода ( $\alpha$ -гидроксилирование) приводит к образованию реактивных алкилдиазогидроксидов, являющихся алкилирующими ДНК соединениями [Brookes, P. & Lawley, P.D., 1964].

К алкилированным основаниям ДНК относятся 7-метилгуанин, 3-метиладенин и *O*<sup>6</sup>-метилгуанин, которые образуются в количестве порядка 4 000, 600 и 10-30 повреждений в день на клетку, соответственно (Рисунок 1.3) [Rydberg, B. & Lindahl, T., 1982]. В значительно меньших количествах происходит образование 3-метилтимина, 3-метилцитозина, *O*<sup>4</sup>-метилтимина и *O*<sup>4</sup>-этилтимина. Мутагенность 7-метилгуанина относительно невысока, поскольку модификация не приводит к изменению образования комплементарной пары с цитозином, хотя вызывает дестабилизацию *N*-гликозидной связи, повышая вероятность образования мутагенных АП-сайтов, и раскрытие имидазольного кольца, что препятствует репликации ДНК [Barbarella, G. *et al.*, 1991; Tudek, B. *et al.*, 1992]. Остальные вышеперечисленные повреждения оснований ДНК высокомутагенны: 3-метиладенин, 3-метилтимин и 3-метилцитозин блокируют репликацию ДНК [Boiteux, S. & Laval, J., 1982; Huff, A.C. & Topal, M.D., 1987; Lindahl, T. *et al.*, 1988], тогда как *O*<sup>6</sup>-метилгуанин, *O*<sup>4</sup>-метилтимин и *O*<sup>4</sup>-этилтимин имеют другие комплементарные свойства по сравнению с немодифицированными основаниями, вызывая G:A и T:C мутации в процессе репликации ДНК [Gerchman, L.L. & Ludlum, D.B., 1973; Singer, B. *et al.*, 1986].



**Рисунок 1.3.** Повреждения ДНК под действием алкилирующих соединений.

В дополнение к вышеописанным монофункциональным алкилирующим соединениям существует значительное количество бифункциональных алкилирующих агентов, которые содержат две реактивные группы-донора. К таковым относятся азотные горчицы (хлорамбуцил, хлометин и другие) и митомицин С, которые активно используются в качестве противораковых препаратов. В случае бифункциональных алкилирующих соединений возможно образование внутри- и межнитевых сшивок ДНК при реакции двух реактивных групп донора с различными основаниями [Hopkins, P.V. *et al.*, 1991].

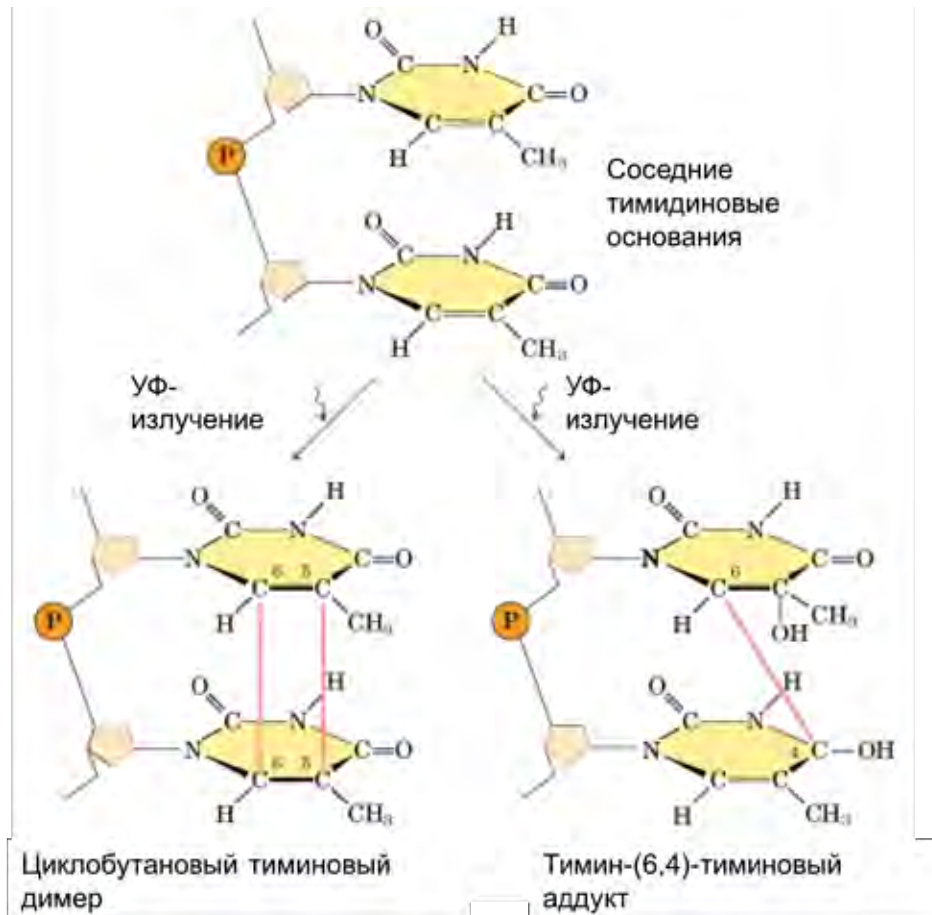
#### 1.1.4. Фотохимические повреждения ДНК

УФ-излучение представляет собой один из наиболее опасных экзогенных источников повреждений ДНК; под действием солнечных лучей происходит образование порядка 100 000 УФ-повреждений на клетку в день [Hoeijmakers, J.H., 2009]. К таким повреждениям относятся, например, димеры пиримидиновых оснований, из которых важнейшими являются циклобутановые пиримидиновые димеры и приблизительно в 3 раза реже образующиеся пиримидин-(6-4)-пиримидиновые фотопродукты (Рисунок 1.4) [Franklin, W.A. *et al.*, 1985; Setlow, R.V. & Carrier, W.L., 1966].

Циклобутановые пиримидиновые димеры образуются между соседними основаниями ДНК и могут существовать в виде различных стереоизомеров, но наиболее часто наблюдается образование циклобутановых тиминового димеров в конформации *цис-син* [Rochette, P.J. *et al.*, 2003]. Каждый из (6-4)-фотопродуктов может существовать в виде изомера Дьюара [Kan, L.S. *et al.*, 1992]. В дополнение к пиримидиновым димерам под действием УФ-излучения образуются и другие повреждения, например, 5,6-дигидро-6-гидроксицитозин и его производные [Boorstein, R.J. *et al.*, 1990] или 8,8-дигидродимер аденина [Gasparro, F.P. & Fresco, J.R., 1986]. При УФ-облучении бактериальных эндоспор образуется уникальный нециклобутановый димер тиминового оснований, 5-тиминил-5,6-дигидротимин, иначе называемый “споровым” фотопродуктом [Varghese, A.J., 1970]. Фотохимические повреждения ДНК мутагенны, поскольку препятствуют процессам репликации и транскрипции ДНК.

УФ-излучение также вызывает образование АФК путем фотоокисления, что может приводить к образованию окислительных повреждений ДНК (раздел “1.1.2. Окислительные повреждения ДНК”, [Kvam, E. & Tyrrell, R.M., 1997]).





**Рисунок 1.4.** Фотохимические повреждения ДНК. А. Циклобутановый тиминный димер. Б. Цитозин-(6-4)-тиминный фотопродукт. Модифицировано из [Cox, M.M. & Nelson, D.L., 2008].

### 1.1.5. Разрывы цепей ДНК

Разрывы фосфодиэфирной связи в одной из цепей ДНК, которые в большинстве случаев сопровождаются либо потерей нуклеотида по сайту разрыва, либо повреждениями 5'- и/или 3'-концов, называются одноцепочечными (ОР). ОР представляют собой наиболее распространенные эндогенные повреждения, которые возникают благодаря нестабильности ДНК и действию внутриклеточных метаболитов (в основном АФК) в количестве 15 000-20 000 разрывов на клетку в день [Lindahl, T., 1993]. Напрямую ОР могут образовываться при расщеплении окисленных остатков дезоксирибозы, а также в качестве интермедиатов в процессе эксцизионной репарации поврежденных оснований ДНК и при ошибочном действии некоторых клеточных ферментов, изменяющих топологию ДНК, например, ДНК-топоизомеразы I (раздел “1.1.8. Ковалентные аддукты ДНК-белок”, [Dianov, G. *et al.*, 1992; Wang, J.C., 2002]. К экзогенным факторам, вызывающим ОР, относятся УФ- и ионизирующее

излучение и различные химические соединения; образование повреждений происходит при действии свободных радикалов, например, АФК, прямой ионизации ДНК или стабилизации аддуктов белок-ОР под действием специфических ингибиторов [Riley, P.A., 1994]. Нерепарированные ОР вызывают остановку либо коллапс репликационной вилки с последующим образованием высокотоксичных двуцепочечных разрывов ДНК и препятствуют эффективной транскрипции ДНК [Kathe, S.D. *et al.*, 2004; Kuzminov, A., 2001; Zhou, W. & Doetsch, P.W., 1993]. В ряде случаев цитотоксичность ОР может быть связана с чрезмерной и длительной активацией сенсора одноцепочечных разрывов ДНК PARP1, что приводит к истощению энергетических ресурсов клетки и/или апоптозу [Berger, N.A. *et al.*, 1983; Yu, S.W. *et al.*, 2002].

Двуцепочечные разрывы ДНК (ДР) возникают в случае проксимального разрыва обеих цепей одного и того же витка спирали ДНК, в том числе, в случае близкорасположенных ОР. Эндогенные ДР, количество которых незначительно по сравнению с числом спонтанных ОР (10-20 ДР против 15,000-20,000 ОР/геном/сутки), образуются при действии АФК, а также в процессах репликации и, возможно, транскрипции ДНК [Haffner, M.C. *et al.*, 2011; Lindahl, T., 1993; Michel, V. *et al.*, 1997]. Источником экзогенных ДР принято считать ионизирующую радиацию и генотоксические химические соединения, среди которых ионы тяжелых металлов, лекарственные препараты-радиомиметики и ингибиторы-яды ДНК-топоизомеразы II [Ayene, I.S. *et al.*, 2007; Olive, P.L. & Vanath, J.P., 1993]. ДР обладают наиболее высокой токсичностью среди известных повреждений ДНК и, в отсутствие своевременной репарации, могут вызывать мутации, хромосомные разрывы и перестройки и программируемую клеточную смерть, иначе называемую апоптозом [Natarajan, A.T. & Zwanenburg, T.S., 1982; Obe, G. *et al.*, 1992]. Последствиями таких дефектов для организма могут быть проблемы развития, дефицит иммунной системы, повышенная чувствительность к действию повреждающих ДНК агентов, стерильность и онкотрансформация [Jackson, S.P. & Bartek, J., 2009]. С другой стороны, как и в случае метилирования оснований ДНК для регуляции экспрессии генов, контролируемое образование ДР играет важную роль в различных физиологических процессах в клетках животных. К таковым относятся, например, соматическая рекомбинация V(D)J в В- и Т-клетках, необходимая для обеспечения приобретенного иммунитета, и обмен участками ДНК между несестринскими хроматидами гомологичных хромосом (кроссинговер) в процессе

мейотической рекомбинации [Keeney, S. *et al.*, 1997; Lewis, S.M., 1994; Sun, H. *et al.*, 1989]. Наконец, эндогенные ДР на концах хромосом напрямую связаны с процессом теломер-зависимого репликативного старения клеток человека [d'Adda di Fagagna, F. *et al.*, 2003].

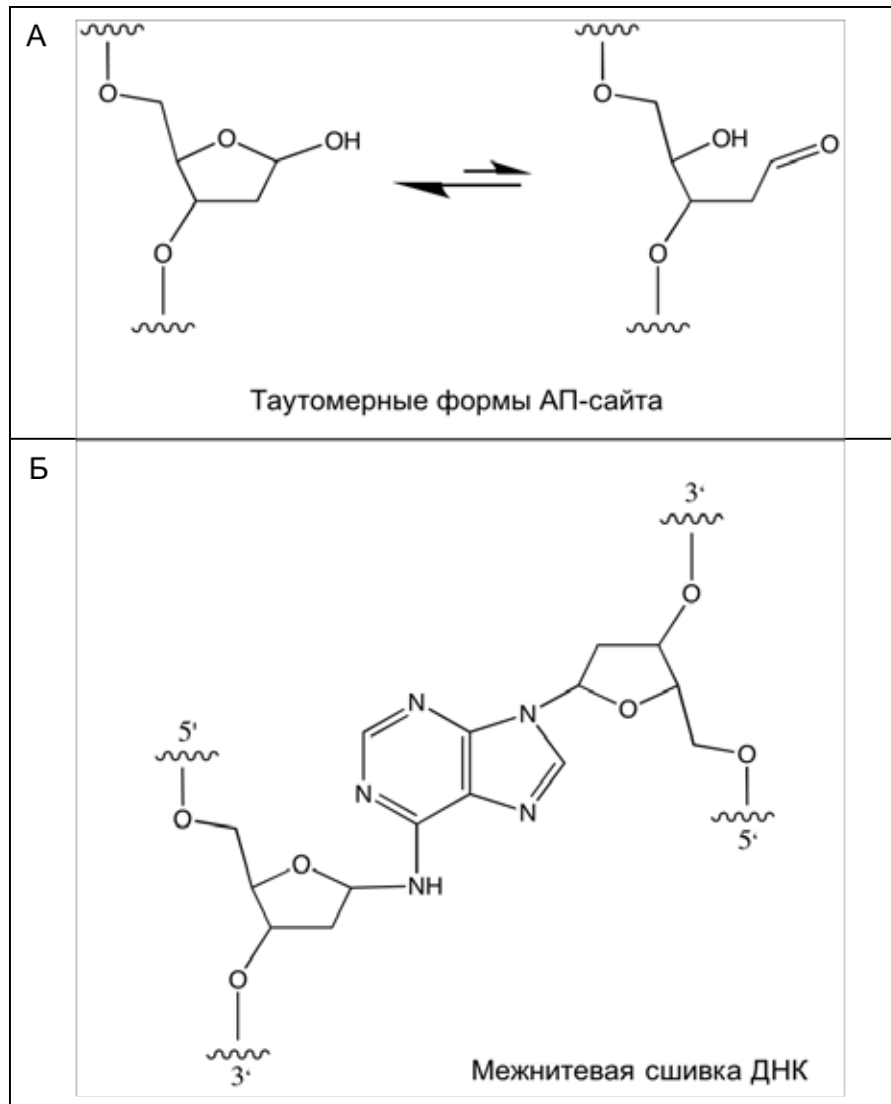
### 1.1.6. Сшивки нитей ДНК

Ковалентные сшивки между основаниями одной и той же нити ДНК называются внутринитевыми (ВНС). Токсичность ВНС сравнительно невысока, поскольку многие ДНК-полимеразы могут осуществлять репликацию ДНК, содержащей ВНС.

Межнитевыми сшивками (МНС) называют повреждения ДНК, возникающие при образовании ковалентной связи между азотистыми основаниями комплементарных нитей ДНК. Эндогенными источниками МНС являются: 1) насыщенные и ненасыщенные альдегиды, которые образуются в процессе перекисного окисления липидов и метаболизма алкоголь-содержащих продуктов, а также поступают в организм с табачным дымом и выхлопными газами [Burcham, P.C., 1998; Langevin, F. *et al.*, 2011; Nath, R.G. *et al.*, 1998], 2) оксид азота (II) и азотистая кислота, первый из которых является важной сигнальной молекулой в организмах позвоночных в процессах вазодилатации, нейротрансмиссии, иммунного ответа, апоптоза и др., тогда как азотистая кислота образуется при метаболизме нитратов, содержащихся в растительных продуктах и используемых для консервации мясных продуктов [Shapiro, R. *et al.*, 1977]; 3) АП-сайты, существующие в виде таутомерных циклического ацетала (циклическая или фуранозная форма остатка 2'-дезоксирибозы, 99 %) и альдегида с разомкнутым кольцом 2'-дезоксирибозы (ациклическая или альдегидная форма остатка 2'-дезоксирибозы, 1 %), последний из которых может реагировать с экзоциклической амино-группой аденина или гуанина противоположной цепи ДНК с образованием МНС (Рисунок 1.5) [Dutta, S. *et al.*, 2007], и 4) окисленные формы АП-сайтов, например, 5'-(2-фосфорил-1,4-диоксобутан), который образуется при окислении C5'-атома 2'-дезоксирибозы в условиях пониженной концентрации кислорода, и C4'-окисленный АП-сайт, образующийся при действии АФК и окислительных антираковых препаратов [Guan, L. & Greenberg, M.M., 2009; Sczepanski, J.T. *et al.*, 2008]. Экзогенными источниками МНС и ВНС являются ранее упомянутые бифункциональные алкилирующие агенты (раздел "1.1.3. Алкилирование азотистых оснований ДНК"), псорален и соединения платины. Обработка клеток вышеупомянутыми соединениями вызывает

образование широкого спектра повреждений ДНК в дополнение к МНС и ВНС: например, митомицин С и азотные горчицы индуцируют образование порядка 5-10 % МНС [Gargiulo, D. *et al.*, 1995], тогда как в ответ на цисплатин происходит формирование порядка 90 % внутринитевых сшивок ДНК между соседними пуриновыми основаниями и около 5 % МНС [Eastman, A., 1986].

МНС предотвращают расплетание двойной спирали ДНК и потому блокируют процессы репликации и транскрипции, представляя собой кластогенные и высокоцитотоксичные повреждения ДНК [Bodell, W.J. *et al.*, 1985; Magana-Schwencke, N. *et al.*, 1982]. Следует отметить, что существование эндогенных межнитевых сшивок на сегодня экспериментально не доказано, что может быть связано с их цитотоксичностью, низкой встречаемостью и нестабильностью в процессе выделения (смотри [Clauson, C. *et al.*, 2013] для обзора).



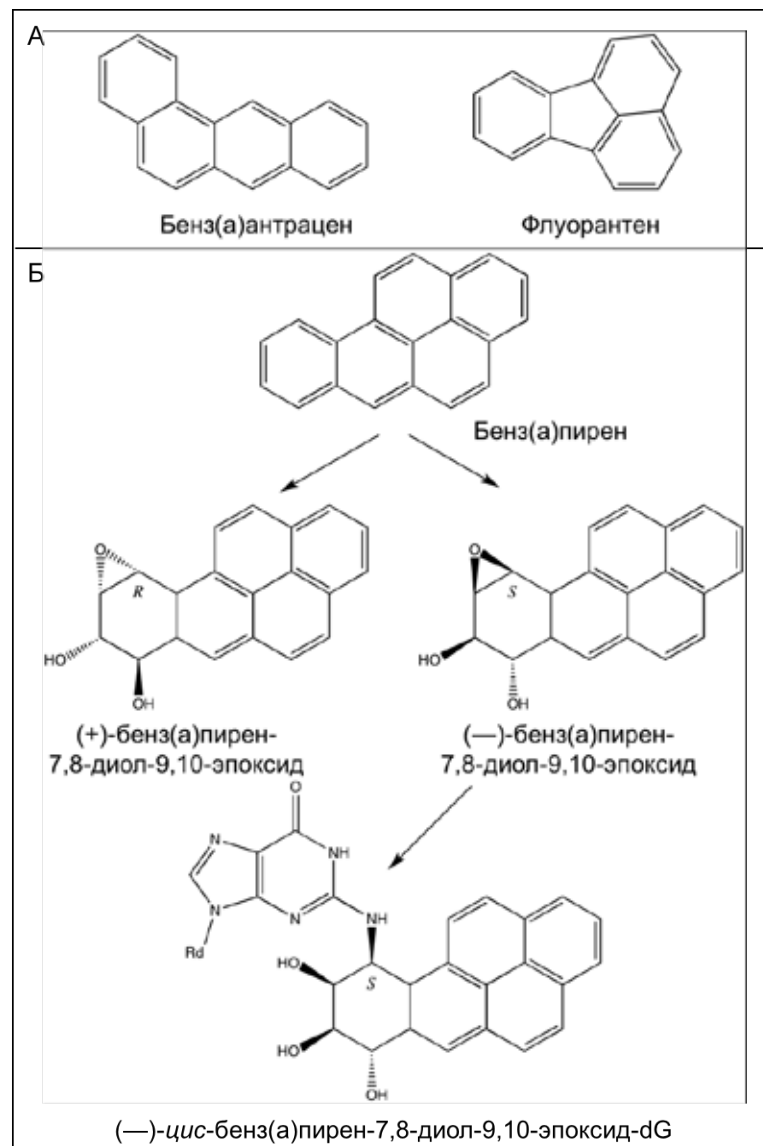
**Рисунок 1.5.** Образование межнитевых сшивок ДНК из АП-сайтов. **А.** Таутомерные формы АП-сайта. **Б.** Межнитевая сшивка ДНК, образованная АП-сайтом и экзоциклической амино-группой аденина комплементарной цепи.

### 1.1.7. Объемные аддукты ДНК

Объемные аддукты ДНК в большинстве случаев образуются под действием химических карциногенов окружающей среды. К таковым, например, относятся полициклические ароматические углеводороды (ПАУ), которые образуются в значительных количествах при высокотемпературной переработке органического сырья, содержатся в выхлопных газах и табачном дыме [Dipple, A. *et al.*, 1985]. Примерами ПАУ являются бензопирен, бензоантрацен, флуорантен и многие другие соединения, образующие стереоизомерные формы ковалентных аддуктов ДНК при раскрытии эпоксидного кольца (Рисунок 1.6 А-Б) [Agarwal, S.K. *et al.*, 1987; Cheng, S.C. *et al.*, 1988; Gorelick, N.J. & Wogan, G.N., 1989]. Поскольку ПАУ в большинстве своем ассиметричны, в процессе их активации образуются геометрические изомеры, например, 7,8-диол-9,10-эпоксид и 9,10-диол-7,8-эпоксид в случае бензопирена. Следует отметить, что геометрические и стереоизомеры ПАУ обладают различными мутагенными и карциногенными свойствами: например, *анти*-бензо[с]фенантрен-3,4-диол-1,2-эпоксид представляет собой наиболее мутагенный в клетках животных и обладающий наиболее высокой опухолеобразующей способностью диол-эпоксидный стереоизомер бензо[с]фенантрена [Bigger, C.A. *et al.*, 1989; Levin, W. *et al.*, 1986]. Другим примером является (+)-*анти*-бенз(а)пирен-7,8-диол-9,10-эпоксид, который демонстрирует значительно более высокую мутагенность *in vivo* по сравнению с (—)-*анти* и (±)-*син* изомерами [Buening, M.K. *et al.*, 1978; Slaga, T.J. *et al.*, 1979]. Наиболее распространены модификации гуанина, хотя встречается незначительное количество ПАУ-аддуктов аденина и цитозина; конечный продукт в значительной степени зависит от участвующего в реакции стереоизомера ПАУ [Chadha, A. *et al.*, 1989; Dipple, A. *et al.*, 1987; Hemminki, K. *et al.*, 1980]. Например, аддукты ДНК с (±)-*анти*-бенз(а)пирен-7,8-диол-9,10-эпоксидом и (±)-*анти*-бензо[с]фенантрен-3,4-диол-1,2-эпоксидом в отсутствие своевременной репарации приводят к закреплению G:T и A:T (или G:C) мутаций, соответственно [Bigger, C.A. *et al.*, 1989; Mazur, M. & Glickman, B.W., 1988].

К другим классам карциногенов, образующих объемные аддукты ДНК, относятся афлатоксины, которые продуцируются плесневыми грибами рода *Aspergillus* и содержатся в различных пищевых продуктах (например, зерне), накапливаясь при нарушении правил их хранения и гигиены. Афлатоксин В1 (АВ1) наиболее распространен в природе и обладает наибольшей токсичностью [Vesselinovich, S.D. *et al.*, 1972; Wogan, G.N. & Newberne, P.M.,

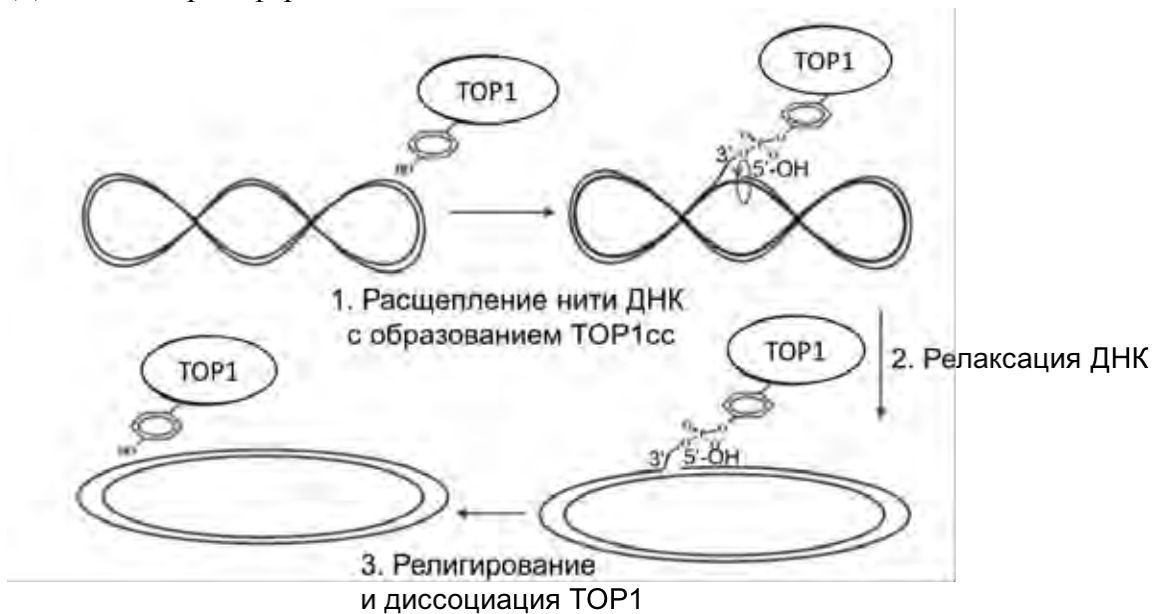
1967]. Как и в случае ПАУ, взаимодействию афлатоксинов с ДНК предшествует стадия их метаболической активации: в случае АВ1 сначала происходит окисление с участием цитохромов Р450, липооксигеназ и других ферментов с образованием реактивного АВ1-экзо-8,9-эпоксида в качестве основного продукта [Baertschi, S.W. *et al.*, 1988], последующее *транс*-раскрытие эпоксидного кольца с одновременной атакой  $N^7$ -атома гуанина в реакции нуклеофильного замещения, продуктом которой является нестабильный *транс*-8,9-дигидро-8-(7-dG-ил)-9-гидрокси-АВ1 [Essigmann, J.M. *et al.*, 1977], и, наконец, спонтанное образование стабильных и высокотоксичных формамидопиримидиновых производных гуанина [Hertzog, P.J. *et al.*, 1982].



**Рисунок 1.6.** Полициклические ароматические углеводороды и ДНК-аддукты. А. Структурные формулы бензоантрацена и флуорантена. Б. Аддукт бенз(а)пирена с ДНК. Показана одна из изомерных форм.

### 1.1.8. Ковалентные аддукты ДНК-белок

Высокодинамичные взаимодействия ДНК и белков играют важную роль в большинстве физиологических процессов с участием ДНК, например, репликации, репарации и рекомбинации. Ковалентные комплексы ДНК и белков обычно являются промежуточными, но могут быть стабилизированы с образованием высокотоксичных ДНК-белковых сшивок (ДБС). На сегодня к участвующим в образовании ДБС классам ферментов относятся ДНК-топоизомеразы, -полимеразы и -гликозилазы, ферменты с АП-лиазной активностью, а также ДНК-метилтрансферазы [Kiiianitsa, K. & Maizels, N., 2013].



**Рисунок 1.7.** Общая схема релаксации сверхспирализованной ДНК эукариотической ДНК-топоизомеразой I. Адаптировано из [Бугреев, Д.В. & Невинский, Г.А., 2009].

В качестве примера ДБС-образующего фермента рассмотрим ДНК-топоизомеразу I (TOP1). TOP1 катализирует реакцию релаксации сверхспирализованной ДНК, которая образуется в различных физиологических процессах, в том числе репликации и транскрипции. Вкратце механизм действия TOP1 заключается в 1) образовании нековалентного ДНК-TOP1 комплекса, 2) расщеплении одной цепи ДНК с образованием ОР и ковалентной связи между 3'-фосфатом разрыва и остатком тирозина активного сайта TOP1 (промежуточный ДНК-TOP1 комплекс; TOP1cc), 2) релаксации ДНК за счет свободного вращения части дуплекса, содержащей 5'-ОН конец, вокруг удаленной фосфодиэфирной связи нерасщепленной цепи и 3) религировании цепи ДНК с последующей диссоциацией фермента из ковалентного ДНК-белкового комплекса (Рисунок 1.7) [Chamroux, J.J. & Dulbecco, R., 1972]. Для успешного

религирования 3'- и 5'-концы ОР должны быть определенным образом ориентированы относительно друг друга в ДНК-TOP1 комплексе, поэтому локальные изменения пространственной структуры ДНК, нарушающие подобную ориентацию, приводят к необратимой стабилизации TOP1cc аддуктов и образованию ДБС на 3'-конце ОР. Такие пространственные изменения могут быть вызваны присутствием близкорасположенных повреждений ДНК, например, ошибочно спаренных оснований, урацила и АП-сайтов, столкновением с комплексами ДНК- или РНК-полимераз или обработкой ингибиторами-ядами TOP1, такими как камптотецин и его производные [Hsiang, Y.H. *et al.*, 1985; Pommier, Y. *et al.*, 2003; Pourquier, P. *et al.*, 1997].

В дополнение к специфическим ДНК-белковым комплексам ДБС могут образовываться в результате сшивки ДНК с любым из расположенных поблизости белков. Данное свойство активно используется при анализе ДНК-белковых взаимодействий методом иммунопреципитации хроматина с использованием формальдегида в качестве “сшивающего” агента [Solomon, M.J. *et al.*, 1988]. Другими агентами, индуцирующими неспецифическое образование ДБС, являются ионы ряда металлов (например, никель, хром (III)) и мышьяка, свободные радикалы и АФК, альдегиды и некоторые антираковые препараты (цисплатин, митомицин С) [Fornace, A.J., Jr. & Little, J.B., 1977; Zhitkovich, A. *et al.*, 1996]. Следует отметить, что количество ДБС, образуемых в ответ на облучение клеток животных ионизирующей радиацией (порядка 150 сшивок на клетку на Гр), значительно выше количества сшивок ДНК и даже ДР (30 и 20-40 повреждений на клетку на Гр) [Woudstra, E.C. *et al.*, 1999].

ДБС в большинстве случаев представляют собой объемные аддукты ДНК, нарушающие нормальные процессы репликации и транскрипции: ДБС препятствуют процессу расплетания нитей ДНК-хеликазами при нахождении на лидирующей нити ДНК (данное утверждение неверно в случае небольших ДБС, < 10 кДа) и ингибируют синтез ДНК на запаздывающей нити [Kuo, H.K. *et al.*, 2007; Yeo, J.E. *et al.*, 2014], ДБС матричной нити ДНК блокируют транскрипцию РНК-полимеразами [Nakano, T. *et al.*, 2009]. Как следствие ДБС являются мутагенными, кластогенными и цитотоксичными повреждениями ДНК. В случае ДНК-топоизомеразы I, например, нерепарированные TOP1cc приводят к образованию ДР в процессе репликации и цитотоксичны в S-фазных клетках [Holm, C. *et al.*, 1989; Hsiang, Y.H. *et al.*, 1985]. Обработка клеток эукариот формальдегидом приводит к мутагенезу, образованию



микроядер и значительных хромосомным перестройкам [Grogan, D. & Jinks-Robertson, S., 2012; Titenko-Holland, N. *et al.*, 1996]. Следует отметить, что, как и в случае многих других повреждений ДНК, химические соединения, индуцирующие ДБС, также вызывают образование целого ряда других типов повреждений ДНК, что усложняет изучение их биологических последствий.

## 1.2. Целостность генома

Предотвращение нежелательных мутаций, предшественниками которых часто являются повреждения ДНК, чрезвычайно важно, поскольку в зависимости от типа клетки (соматической или половой) и их местоположения в геноме мутации могут иметь прямые молекулярные (например, изменение структуры РНК, экспрессии гена или функции белка) и/или биологические (гибель клеток, преждевременное старение и заболевания) отрицательные последствия. С другой стороны, в небольшой пропорции случаев мутации являются источником положительных последствий, одним из которых является эволюционная изменчивость.

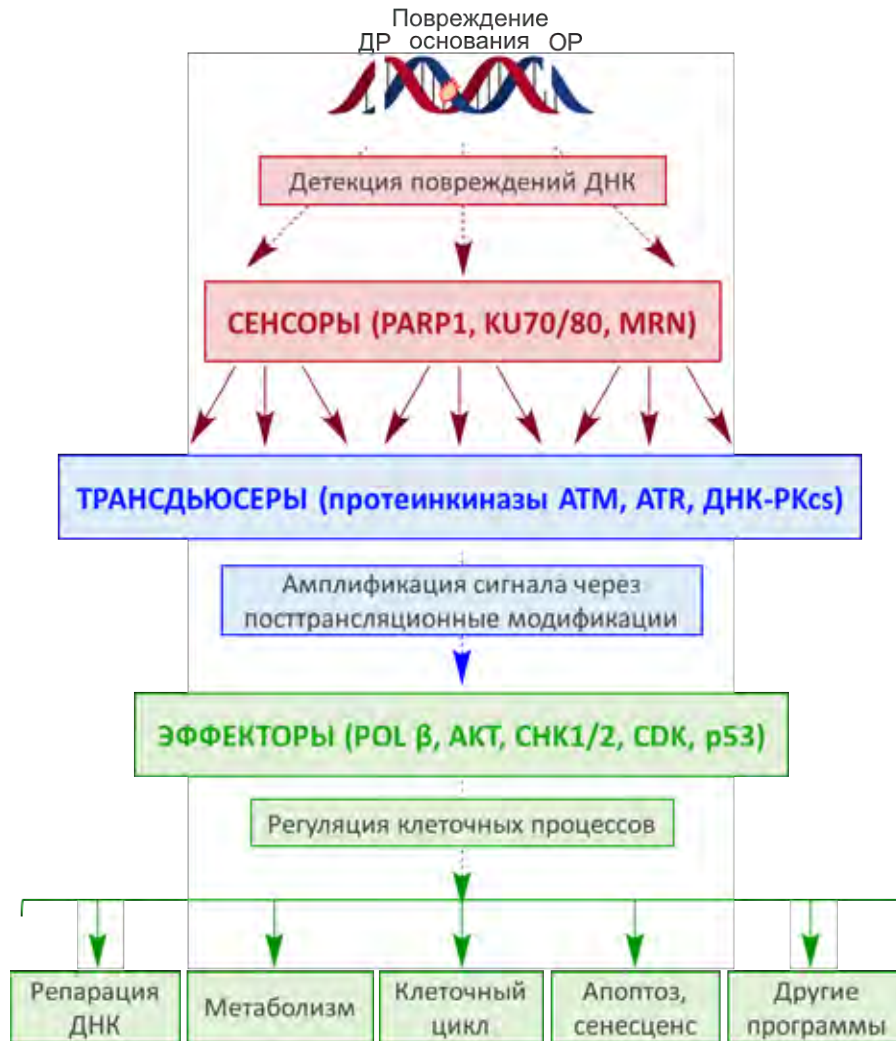
Несмотря на тысячи спонтанных и индуцированных экзогенными факторами повреждений, ежедневно образующихся в ДНК под действием физических и химических факторов, в каждой клетке за определенный отрезок времени накапливается лишь незначительное число стабильных изменений последовательности ДНК. Так называемая целостность (стабильность) генома характерна для всех живых существ и обеспечивается координированным действием целого ряда систем распознавания повреждений ДНК, передачи сигнала от поврежденной ДНК к ферментам, ответственным за ее репарацию, и, наконец, репарации ДНК. Совокупное и координированное действие вышеупомянутых систем иначе называется клеточным ответом на повреждения ДНК.

В самом общем случае клеточный ответ на образование/присутствие нерепарированных повреждений ДНК включает их последовательную 1) детекцию специализированными белками-сенсорами, взаимодействующими с поврежденной ДНК (PARP1, Ku70/80, MRN-комплекс), 2) амплификацию и диверсификацию сигнала белками-преобразователями иначе называемыми трансдюсерами, которые чаще всего являются протеинкиназами (например, ATM, ATR и ДНК-ПКcs), через серии последовательных посттрансляционных

модификаций белков (сигнальные каскады) и, наконец, 3) регуляцию различных аспектов клеточного ответа на повреждения ДНК так называемыми белками-эффекторами (Рисунок 1.8). Координация клеточного ответа на повреждения ДНК эффекторами осуществляется через: индукцию клеточных уровней содержания белков репарации и/или их ферментативной активности, стабильности, а также регуляцию белковых взаимодействий с последующей сборкой на сайте повреждения; инициацию специализированных программ транскрипции, трансляции и альтернативного сплайсинга, обеспечивающих производство белков, вовлеченных в репарацию ДНК; положительную регуляцию клеточного содержания дезоксирибонуклеотидов, необходимых для репарационного синтеза ДНК; модуляцию метаболизма с целью перераспределения энергетических ресурсов клетки; реорганизацию структуры хроматина поблизости от повреждения ДНК, что необходимо для эффективной сборки репарационных комплексов на сайте повреждения; задержку клеточного цикла в делящихся клетках с целью репарации ДНК перед, например, репликацией (на границе фаз  $G_1/S$ ) для предотвращения коллапса репликационной вилки или образования репликационных ДР или митозом (на границе фаз  $G_2/M$ ) для того, чтобы избежать некорректной сегрегации хромосом в процессе деления клетки (так называемый “чекпойнт-контроль”); инициацию программируемых клеточной смерти (апоптоза) или ареста клеточного цикла (сенесценс), в случае, когда уровень повреждений ДНК превышает способность клетки к их репарации [Harper, J.W. & Elledge, S.J., 2007].

Системы репарации ДНК в простейшем случае могут быть классифицированы на “прямую” и эксцизионную, транслезионный синтез и репарацию ДР. При “прямой” репарации происходит одностадийная реакция, обратная той, что приводит к образованию повреждения ДНК. Данный тип репарации включает процессы: 1) ферментативной фотореактивации циклобутановых тиминовых димеров в конформации *цис-син* под действием ДНК-фотолиазы, которая обладает значительно более низкой аффинностью к *транс-син*-димеру [Kelner, A., 1949; Kim, S.T. & Sancar, A., 1993], 2) специфической для бактерий “прямой” репарации “споровых” фотопродуктов специализированной лиазой [Fajardo-Cavazos, P. *et al.*, 1993], 3) “прямой” репарации O-алкилированных оснований ( $O^6$ -метилгуанин,  $O^4$ -алкилтимин) и алкилированных повреждений сахарофосфатного остова ДНК (алкилфосфотриэфиров) ДНК-алкилтрансферазами [Foote, R.S. *et al.*, 1980; McCarthy, J.G. *et al.*, 1983; Olsson, M. &

Lindahl, T., 1980] и 4) “прямого” лигирования канонических ОР с концевыми 3'-ОН и 5'-фосфатом ДНК-лигазами (эта стадия является заключительной в процессах эксцизионной репарации оснований ДНК и репарации ОР) [Lehman, I.R., 1974].



**Рисунок 1.8.** Общая схема клеточного ответа на повреждения ДНК.

В процессах эксцизионной репарации происходит специфическое вырезание поврежденного основания в случае независимых систем репарации оснований и ошибочно спаренных оснований или участка цепи ДНК, содержащего повреждение, в случае репарации нуклеотидов; образовавшиеся одноцепочечные бреши заполняются правильными нуклеотидами с последующим лигированием цепи ДНК. Субстратами последней являются фотохимические повреждения и другие объемные аддукты ДНК, а также ВНС и в некоторых случаях МНС, а сам процесс репарации зависит от транскрипционного статуса поврежденного участка ДНК (системы глобальной и сопряженной с транскрипцией эксцизионной репарации нуклеотидов). Система эксцизионной репарации оснований ДНК значительно перекрывается с процессом

репарации ОР, тогда как система ошибочно спаренных оснований репарирует не только ошибки спаривания, но и однонуклеотидные вставки или делеции [Friedberg, E.C. *et al.*, 2005].

Транслезионный синтез является механизмом толерантности к повреждениям ДНК, используемым клеткой для предотвращения коллапса репликационной вилки при ее столкновении с нерепарированными повреждениями. К полимеразам транслезионного синтеза у человека относятся ДНК-полимеразы  $\eta$ ,  $\zeta$ ,  $\iota$ ,  $\kappa$ , а также концевая дезоксинуклеотидил-трансфераза Rev1, большинство которых характеризуются низкими точностью и процессивностью (иначе говоря являются мутагенными), но способны осуществлять репликацию поврежденной ДНК [Sale, J.E., 2012]. Например, ДНК-полимераза  $\eta$  может безошибочно проводить синтез ДНК напротив *цис-син*-циклобутановых тимин-тиминных димеров, тогда как ДНК-полимераза  $\iota$  с высокой частотой вставляет некорректные нуклеотиды напротив, например, АП-сайтов [Johnson, R.E. *et al.*, 2000; Masutani, C. *et al.*, 2000].

Репарация двуцепочечных разрывов в подавляющем большинстве случаев осуществляется двумя независимыми и принципиально различными механизмами: негомологичным соединением концов и гомологичной рекомбинацией [Hartlerode, A.J. & Scully, R., 2009]. Описаны также механизмы альтернативного негомологичного соединения концов [DiBiase, S.J. *et al.*, 2000; Piakis, G. *et al.*, 2004], одноцепочечного отжига по прямым повторам [Lin, F.L. *et al.*, 1984], синтез-зависимого отжига цепей [Nassif, N. *et al.*, 1994] и индуцированной ДНК-разрывом репликации [Malkova, A. *et al.*, 1996].

В данном разделе подробно рассмотрены системы клеточного ответа на повреждения азотистых оснований и разрывы ДНК, а также системы их репарации, которые имеют значение для данного исследования.

### **1.2.1. Эксцизионная репарация оснований (ЭРО)**

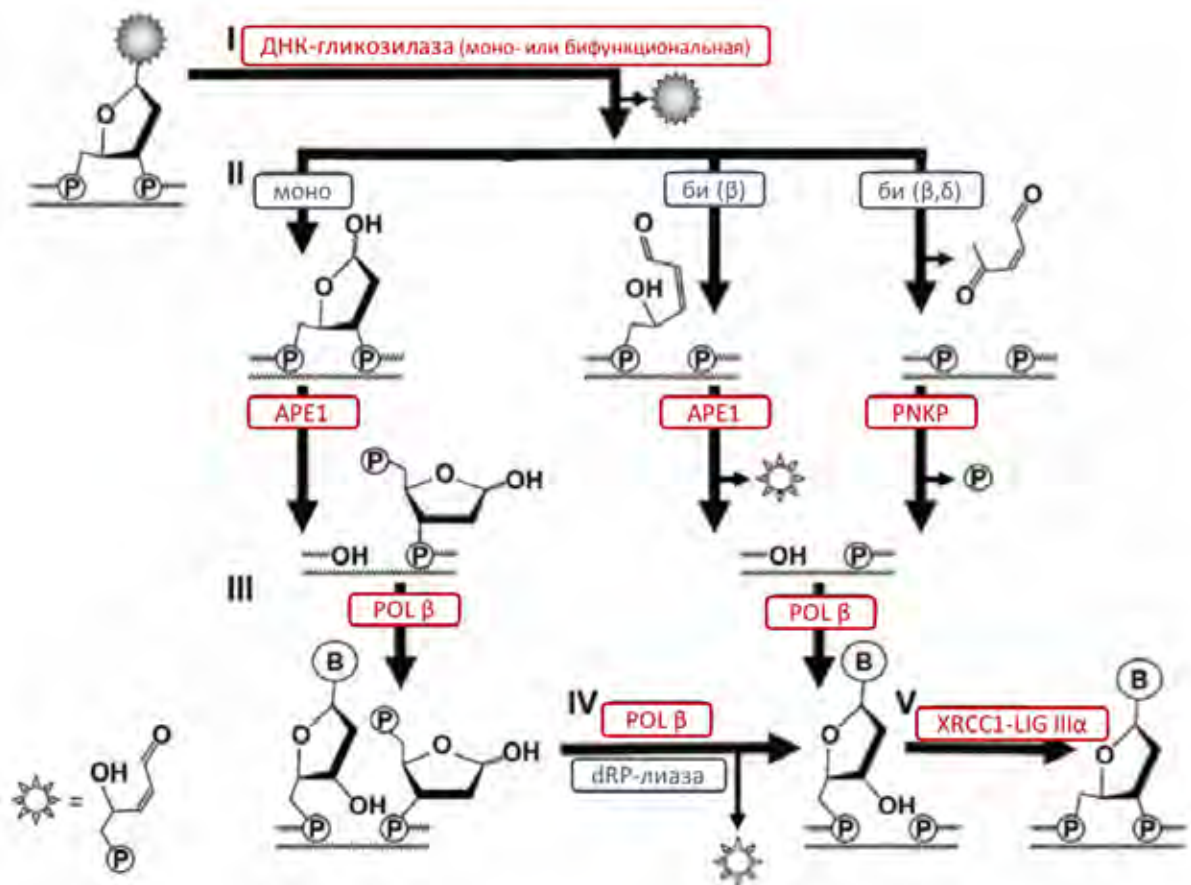
Система эксцизионной репарации оснований (ЭРО) отвечает за исправление наибольшего количества повреждений ДНК, включая поврежденные основания, АП-сайты и ОР. ЭРО является многостадийным последовательным процессом, который в общем виде включает стадии распознавания повреждения, расщепления фосфодиэфирной связи с удалением поврежденного основания ДНК, процессирования 3'- и 5'-концов разрыва, синтеза

нового нуклеотида на месте поврежденного и лигирования ДНК [Wilson, S.H. & Kunkel, T.A., 2000].

Распознавание повреждения ДНК осуществляется специфичными ДНК-*N*-гликозилазами с последующим расщеплением *N*-гликозидной связи между поврежденным основанием и сахарофосфатным остовом ДНК и образованием АП-сайта в случае монофункциональных ДНК-гликозилаз (Рисунок 1.9) [Lindahl, T. & Nyberg, B., 1974]. К монофункциональным ДНК-гликозилазам относятся, например, человеческие урацил-ДНК-*N*-гликозилаза (UNG) и *N*-метилпурин-ДНК-гликозилаза (MPG), субстратами которых являются урацил-содержащая ДНК и алкилированные пуриновые основания, 1,*N*<sup>6</sup>-этенoadенин и гипоксантин, соответственно [Chakravarti, D. *et al.*, 1991; Lindahl, T., 1974; Sagarbaev, M. *et al.*, 1995; Sagarbaev, M. & Laval, J., 1994]. На следующем этапе происходит расщепление фосфодиэфирной связи с 5'-стороны от АП-сайта под действием АП-эндонуклеазы 1 (APE1) с образованием ОР с 3'-ОН концом и 2'-дезоксирибо-5'-фосфатной группой (5'-dRP) [Verly, W.G. & Raquette, Y., 1972]. Такой разрыв затем репарируется с помощью комплекса, состоящего из ДНК-полимеразы β (POL β), белка группы комплементации 1, обеспечивающей чувствительность клеток к рентгеновскому излучению, кодируемого геном *XRCC1* (X-ray repair cross-complementing group 1), и ДНК-лигазы IIIα (LIG IIIα) [Kubota, Y. *et al.*, 1996]. Заполняя однонуклеотидную брешь, POL β добавляет новый комплементарный нуклеотид на 3'-конец ОР за счет ДНК-полимеразной активности [Dianov, G. *et al.*, 1992], тогда как удаление нависающего 5'-dRP фрагмента ОР осуществляется за счет АП-лиазной активности [Matsumoto, Y. & Kim, K., 1995]. На заключительной стадии процесса репарации комплекс XRCC1-LIG IIIα обеспечивает лигирование цепи ДНК [Wei, Y.F. *et al.*, 1995].

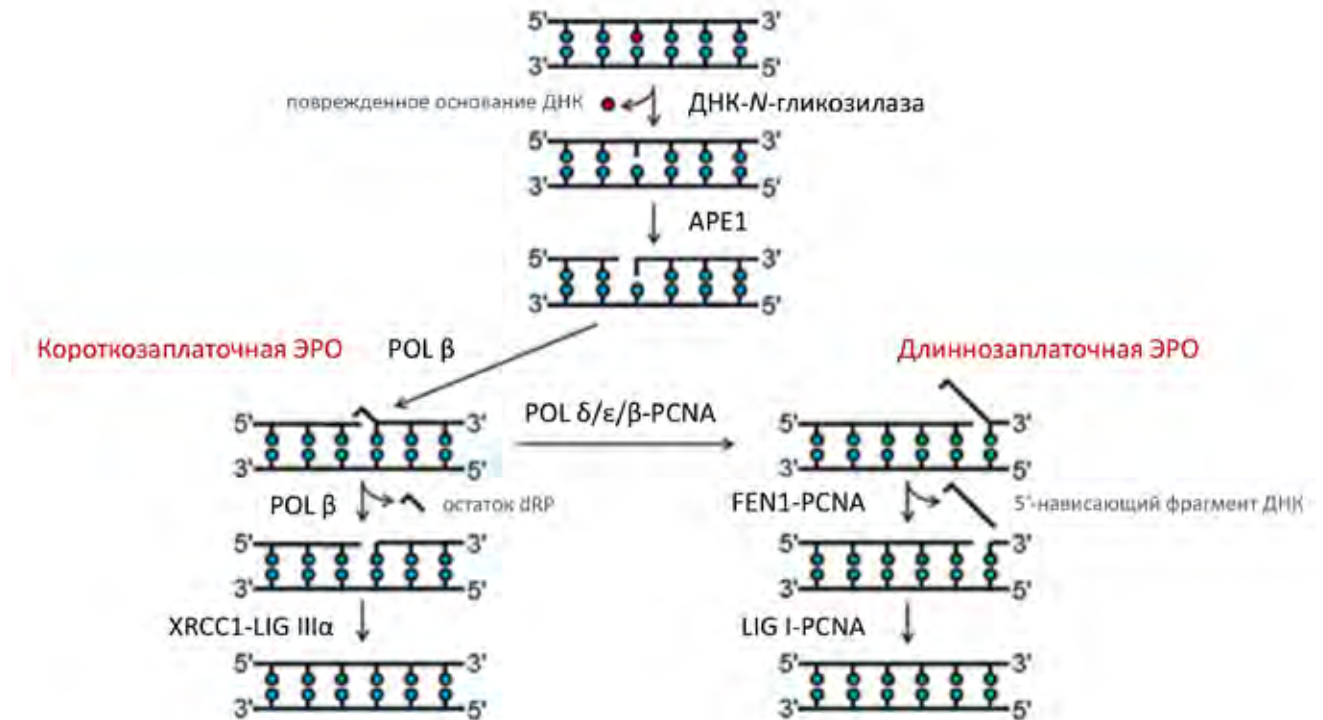
Инициация ЭРО может также осуществляться при действии бифункциональных ДНК-гликозилаз, которые обладают дополнительной β-лиазной активностью, обеспечивая расщепление не только *N*-гликозидной связи, но и фосфодиэфирной связи с 3'-стороны от АП-сайта по механизму β-элиминирования, в результате чего образуются ОР с различными модификациями 5'- и 3'-концов. Например, при действии 8-оксогуанин-ДНК-*N*-гликозилазы OGG1 или ДНК-*N*-гликозилазы NTHL1 (человеческий гомолог эндонуклеазы III *E.coli*) образуется однонуклеотидная брешь с 3'-α,β-ненасыщенной альдегидной и 5'-фосфатной группами на концах разрыва [Aspinwall, R. *et al.*, 1997; Boiteux, S. & Radicella, J.P., 2000]. Такие

промежуточные соединения не являются субстратами ЭРО и требуют дополнительного процессирования 3'-конца, которое осуществляется посредством 3'-фосфодиэстеразной активности APE1 с последующей застройкой бреши POL  $\beta$  и лигированием ДНК (Рисунок 1.9) [Doetsch, P.W. & Cunningham, R.P., 1990]. Некоторые бифункциональные ДНК-*N*-гликозилазы, например, NEIL1, 2 и 3 (человеческие гомологи формамидопиримидин-ДНК-*N*-гликозилазы/эндонуклеазы VIII *E.coli*) могут катализировать две последовательных реакции  $\beta,\delta$ -элиминирования: вышеописанную реакцию  $\beta$ -элиминирования с образованием 3'- $\alpha,\beta$ -ненасыщенного альдегида и последующую реакцию  $\delta$ -элиминирования, в которой образуется моонуклеозидная брешь с фосфатными группами на 5'- и 3'-концах разрыва и пент-2-ен-1,4-дион [Hazra, T.K. *et al.*, 2002a; Hazra, T.K. *et al.*, 2002b; Такао, М. *et al.*, 2002]. Обработка 3'-конца промежуточных соединений осуществляется под действием 3'-фосфатазной активности полинуклеотидкиназы/3'-фосфатазы человека (PNKP) (Рисунок 1.9) [Wiederhold, L. *et al.*, 2004].



**Рисунок 1.9.** Короткозаплаточный механизм ЭРО. **I.** Удаление поврежденного основания моно- или бифункциональной ДНК-*N*-гликозилазой ( $\beta$ - или  $\beta,\delta$ -элиминирование) путем гидролиза *N*-гликозидной связи. **II.** Процессирование 3'-конца ОП с образованием 3'-гидроксильной группы. **III.** Застройка одонуклеотидной брешы POL  $\beta$ . **IV.** Процессирование 5'-конца ОП с образованием 5'-фосфатной группы. **V.** Лигирование ДНК комплексом XRCC1-LIG III $\alpha$ . Адаптировано из [Грин, И.Р. & Жарков, Д.О., 2011].

Вышеописанный вариант ЭРО с участием моно- или бифункциональных ДНК-*N*-гликозилаз называется короткозаплаточным, поскольку репарация происходит при включении одного нуклеотида, и используется клетками для репарации большинства (порядка 80 %) поврежденных оснований ДНК (Рисунок 1.9 и 1.10) [Akbari, M. *et al.*, 2004; Fortini, P. *et al.*, 1999].



**Рисунок 1.10.** Общая схема основных вариантов ЭРО: короткозаплаточный и длиннозаплаточный механизмы. Адаптировано из [Parsons, J.L. & Dianov, G.L., 2013].

В случае, когда 5'-dRP конец оказывается устойчивым к гидролизу посредством АП-лиазной активности POL  $\beta$  после встраивания нового нуклеотида той же POL  $\beta$  (например, в присутствии АП-сайтов с окисленными или восстановленными 5'-dRP группами, которые образуются при действии ионизирующего облучения), репликативные ДНК-полимеразы  $\delta$  или  $\epsilon$ , или POL  $\beta$  синтезируют дополнительный фрагмент ДНК длиной 2-12 нуклеотидов [Dempfle, B. & DeMott, M.S., 2002]. В результате подобного синтеза происходит вытеснение цепи ДНК с 3'-стороны от разрыва с образованием 5'-нависающего фрагмента (“флэпа”), содержащего dRP-группу, который затем распознается и удаляется флэп-эндонуклеазой 1 (FEN 1) в комплексе с ядерным антигеном пролиферирующих клеток (PCNA), играющего роль фактора процессивности; посадке PCNA на ДНК способствует репликативный белок С или RFC. На заключительной стадии ДНК-лигаза I (LIG I) обеспечивает лигирование цепи ДНК. Подобный

процесс называют длиннозаплаточным (включение нескольких нуклеотидных звеньев) механизмом ЭРО (Рисунок 1.10) [Klungland, A. & Lindahl, T., 1997; Matsumoto, Y. *et al.*, 1994].

Помимо вышеописанных основных вариантов ЭРО существует ряд модификаций данной системы репарации ДНК, которые в значительной степени связаны с участием дополнительных белковых факторов, обеспечивающих детекцию и сигнализацию нерепарированных повреждений, эффективную сборку репарационных комплексов в месте повреждений ДНК и сопряжение ЭРО с другими клеточными процессами (например, репликацией ДНК). В качестве примера таких факторов можно привести поли(ADP-рибозо)полимеразу 1 (PARP1), репликативную ДНК-полимеразу POL  $\alpha$ , Ku антиген, каталитическую субъединицу ДНК-зависимой протеинкиназы ДНК-ПКcs и конденсин I [Allinson, S.L. *et al.*, 2003; Heale, J.T. *et al.*, 2006; Parlanti, E. *et al.*, 2007]. Следует также упомянуть некоторые ДНК-полимеразы, например, POL  $\iota$ ,  $\lambda$  и  $\theta$ , обладающие АП-лиазной активностью, что предполагает их участие в ЭРО [Hubscher, U. *et al.*, 2010]. Действительно, было показано, что ДНК-полимераза  $\lambda$  играет роль в пострепликативной ЭРО вместе с ДНК-N-гликозилазой MUTYH [Maga, G. *et al.*, 2007]. Наконец, существует ряд модификаций 5'- и 3'-концов разрыва ДНК, которые образуются при действии эндо- и экзогенных факторов и не были упомянуты выше. Такие модификации концов разрыва (5'-аденилатные производные и TOP1cc аддукты) и ферменты, участвующие в их процессировании (апратаксин и TDP1), более подробно рассматриваются в разделе “1.2.2. Репарация одноцепочечных разрывов ДНК” [Lakshmiathy, U. & Campbell, C., 1999; Yakubovskaya, E. *et al.*, 2006].

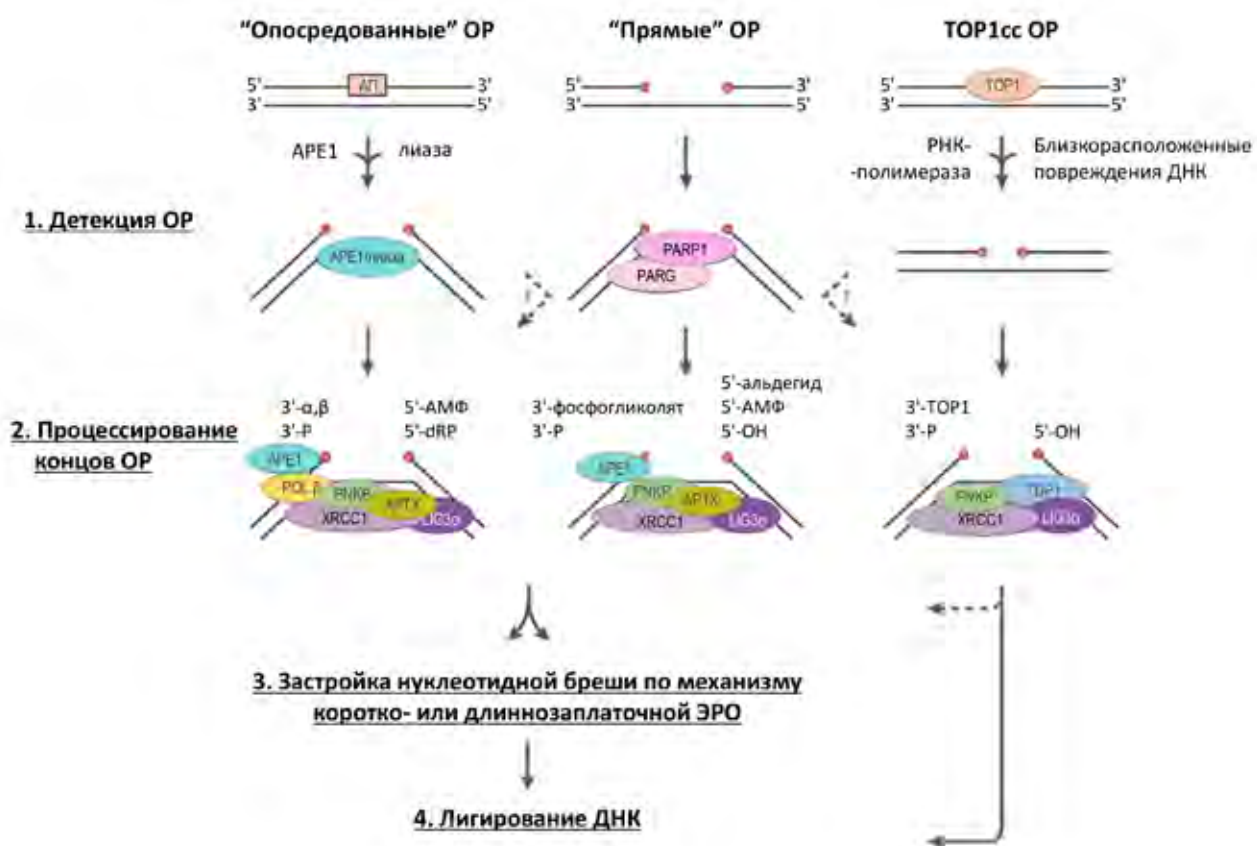
Вышеописанные механизмы применимы для ЭРО не только ядерной, но и митохондриальной ДНК. Большинство ферментов ЭРО кодируются ядерными генами, многие из которых содержат сигнальные последовательности, обеспечивающие транспорт соответствующих белков в митохондрии [Такао, М. *et al.*, 1998]. Функцию POL  $\beta$  в митохондриальной ЭРО выполняет ДНК-полимераза  $\gamma$ , а единственной ДНК-лигазой органеллы является LIG III $\alpha$  [Lakshmiathy, U. & Campbell, C., 1999; Yakubovskaya, E. *et al.*, 2006].

### 1.2.2. Репарация одноцепочечных разрывов ДНК (ОР)

Репарация ОР, которые могут образовываться при действии целого ряда принципиально различных факторов (раздел “1.1.5. Разрывы цепей ДНК”), включает стадии детекции ОР,



процессирования 5'- и 3'-концов разрыва, застройки нуклеотидной брешы и лигирования ДНК. Несмотря на то, что белки, участвующие в репарации различных типов ОР (многие из них также являются участниками ЭРО), в большей степени одинаковы, выделяют варианты глобального механизма репарации ОР в зависимости от источника образования повреждений (Рисунок 1.11).



**Рисунок 1.11.** Глобальный механизм репарации ОР. Модификации концов ОР, требующие процессирования, включают: 5'-аденозинмонофосфат (5'-АМФ), 2'-дезоксирибо-5'-фосфатная группа (5'-dRP), 5'-альдегидная группа, 5'-гидроксил (5'-ОН), 3'-α,β-ненасыщенный альдегид (3'-α,β), 3'-фосфатная группа (3'-P), 3'-фосфогликолят, ковалентная сшивка TOP1 с 3'-концом ОР (3'-TOP1). Адаптировано из [Caldecott, K.W., 2008].

Так называемые “прямые” ОР, возникающие при расщеплении окисленных остатков дезоксирибозы, распознаются сенсором ДНК-разрывов PARP1 и предположительно в меньшей степени другими членами семейства поли(ADP-рибозо)полимераз PARP2 и PARP3 [Grundy, G.J. *et al.*, 2016; Langelier, M.F. *et al.*, 2014; Shieh, W.M. *et al.*, 1998; Sukhanova, M.V. *et al.*, 2016]. PARP1 взаимодействует с разрывами ДНК с сопутствующей стимуляцией активности фермента, что запускает процесс ковалентной модификации самого PARP1 и других белков-акцепторов разветвленными цепями отрицательно заряженного полимера

поли(ADP-рибозы) (PAR) с использованием  $\text{NAD}^+$  в качестве субстрата [Althaus, F.R. & Richter, C., 1987]. Взаимодействие PARP1 с поврежденной ДНК и стимуляция его ферментативной активности являются кратковременными событиями, поскольку накопление отрицательного заряда на PAR в конце концов приводит к разрушению взаимодействия с ДНК и ингибированию активности фермента [Ferro, A.M. & Olivera, B.M., 1982]. После диссоциации PARP1 с ДНК поли(ADP-рибозо)гликогидролаза (PARG), а также терминальная (ADP-рибозо)гликогидролаза TARG1/Cborf130 катализируют деградацию PAR-полимера, таким образом обеспечивая регенерацию пула немодифицированных PARP1 и других белков с целью их многократного использования в последовательных раундах детекции и сигнализации ОР [Lin, W. *et al.*, 1997; Sharifi, R. *et al.*, 2013].

В случае “опосредованных” ОР, которые возникают в процессе ЭРО в качестве интермедиатов репарации, также наблюдается активация PARP1 [Durkacz, B.W. *et al.*, 1980]. В настоящий момент не существует единого мнения о преимуществах детекции “опосредованных” ОР, поскольку такие повреждения ДНК часто возникают в процессе координированной ЭРО, которая в ряде случаев происходит по механизму передачи субстрата ДНК от одного фермента к другому (механизм “передачи эстафетной палочки”, раздел “1.2.3. Координация стадий ЭРО и репарации ОР”) [Rice, P.A., 1999]. Одна из предложенных гипотез заключается в том, что в некоторых ситуациях происходит случайное разъединение ОР-интермедиатов и ферментов, участвующих в механизме последовательной передачи субстрата. Логично предположить, что в таких случаях PARP1 необходим для восстановления ДНК-белковых взаимодействий [Caldecott, K.W., 2008]. Другим возможным объяснением является то, что оптимальная кинетика репарации ОР, в числе прочих факторов, определяется ферментативной активностью PARP1 [Ding, R. *et al.*, 1992; Durkacz, B.W. *et al.*, 1980; Durkacz, B.W. *et al.*, 1981]. Например, взаимодействие PARP1 с белками, содержащими PAR-связывающий домен, может играть роль в привлечении к или стабилизации репарационных комплексов и/или их белковых компонент в месте повреждений ДНК [El-Khamisy, S.F. *et al.*, 2003; Leppard, J.B. *et al.*, 2003; Masson, M. *et al.*, 1998; Pleschke, J.M. *et al.*, 2000], регуляции структуры хроматина через поли(ADP-рибозил)ирование гистонов и перемещение нуклеосом [Mathis, G. & Althaus, F.R., 1987; Poirier, G.G. *et al.*, 1982; Realini, C.A. & Althaus, F.R., 1992; Tulin, A. *et al.*, 2002] и транскрипции генов [Simbulan-Rosenthal, C.M. *et*

*al.*, 2000; Vispe, S. *et al.*, 2000]. Несколько более спорными, или скорее зависящими от конкретной ситуации (эффективные концентрации ферментов репарации, АТФ и количество нерепарированных ОР), функциями PARP1 и его активации в ответ на повреждения ДНК являются стимуляция активности активности POL  $\beta$  в процессе длиннозаплаточной ЭРО [Prasad, R. *et al.*, 2001], производство необходимого для стадии лигирования ДНК АТФ [Oei, S.L. & Ziegler, M., 2000] и защита разрывов ДНК от нуклеолиза в случае неэффективной репарации ОР [Parsons, J.L. *et al.*, 2005b].



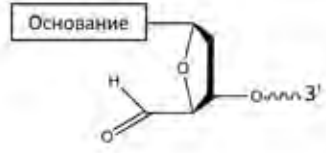
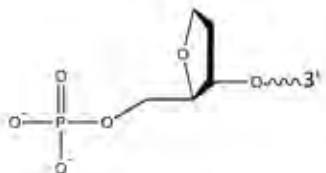

Вопрос об участии PARP1 в детекции третьего типа ОР - стабилизированных TOP1cc разрывов - на данный момент остается нерешенным.

Стадия процессирования 5'- и 3'-концов разрыва является принципиальной важной в репарации ОР. Это связано с тем, что концы большинства образующихся ОР не являются каноническими и требуют процессирования с образованием 5'-фосфатной группы и 3'-ОН конца, необходимых для последующих стадий заполнения нуклеотидной брешы и лигирования ДНК. Более того, именно ОР с неканоническими 5'- и 3'-концами обладают наибольшей цитотоксичностью, что предположительно связано с их способностью эффективно блокировать процессы ДНК-репликации и транскрипции [Sobol, R.W. *et al.*, 2003; Sobol, R.W. *et al.*, 2000].

Существование значительного количества разнообразных повреждений концов ОР напрямую связано с наличием в клетке специализированных ферментов, обеспечивающих их процессирование (Рисунки 1.12 и 1.13). Большинство “прямых” ОР, индуцируемых действием АФК, содержат 3'-фосфатную и 3'-фосфогликолятную группы, процессирование которых в 3'-гидроксил осуществляется PNKP за счет 3'-фосфатазной и APE1 за счет 3'-фосфодиэстеразной активностей, соответственно [Chen, D.S. *et al.*, 1991; Jilani, A. *et al.*, 1999; Karimi-Busheri, F. *et al.*, 1999; Winters, T.A. *et al.*, 1992]. Процессирование концов “опосредованных” ОР, которые образуются в процессе ЭРО (5'-dRP, 3'-фосфат и 3'- $\alpha,\beta$ -ненасыщенный альдегид), подробно рассматривается выше в разделе “1.2.1. Эксцизионная репарация оснований (ЭРО)”.

Другими важными модификациями концов ОР являются ковалентные сшивки 3'-конца с ДНК-топоизомеразой I (TOP1cc, раздел “1.1.8. Ковалентные аддукты ДНК-белок”) и 5'-конца с аденозинмонофосфатом (АМФ). TOP1cc процессируются тирозил-ДНК-фосфодиэстеразой 1 (TDP1) после частичной протеолитической деградации TOP1 [Pouliot, J.J. *et al.*, 1999; Yang,

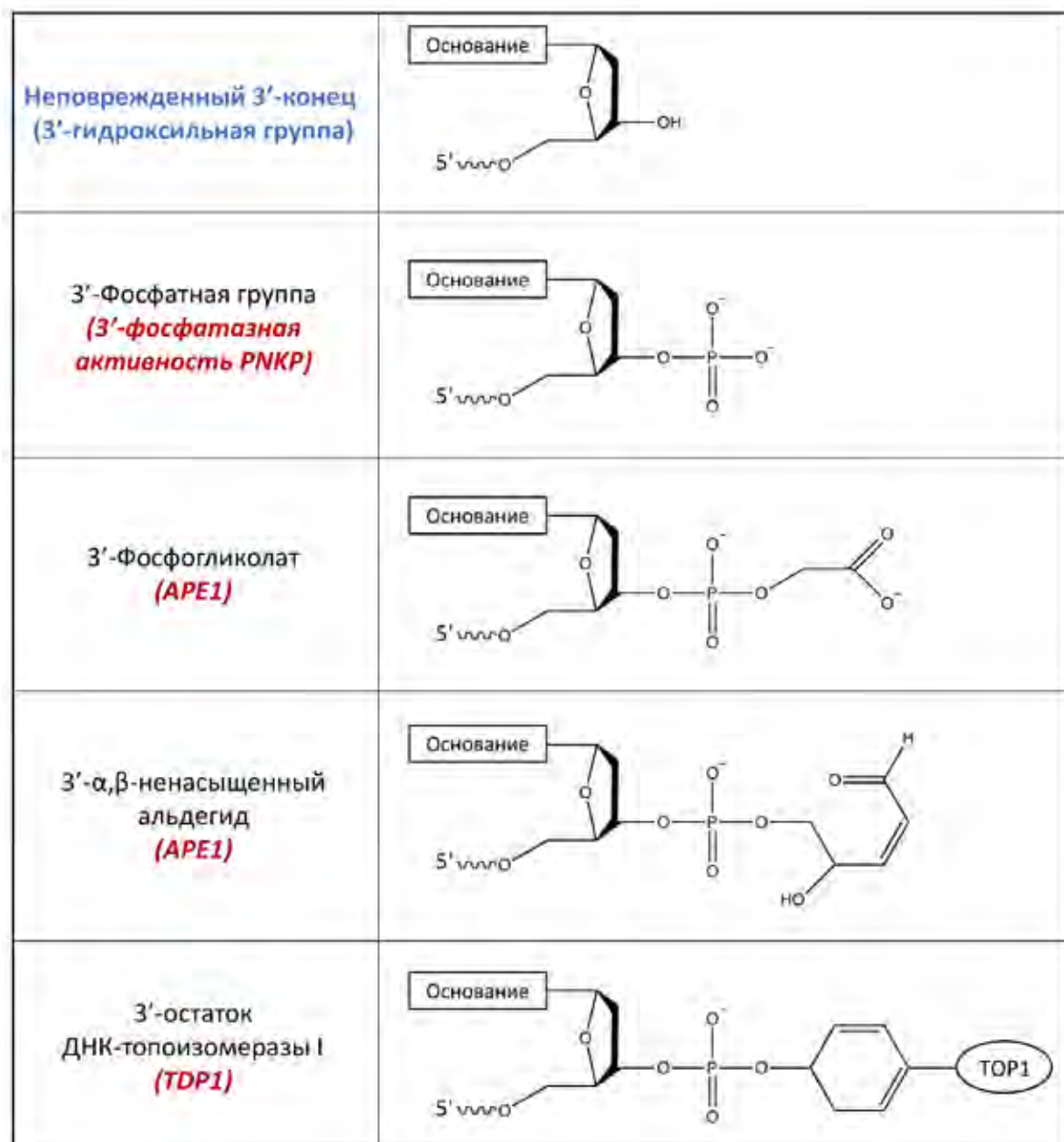
S.W. *et al.*, 1996]. Апатаксин (APTX) процессирует 5'-аденилатные производные, которые представляют собой ковалентные сшивки АМФ с 5'-концом ДНК через пирофосфатную связь [Ahel, I. *et al.*, 2006; Reynolds, J.J. *et al.*, 2009]. Такие производные являются промежуточными в процессе нормального лигирования разрыва ДНК, но требуют репарации с целью совершения очередной попытки лигирования в случае, когда процесс лигирования ингибирован, например, в присутствии неканонических концевых модификаций или в отсутствие готового к лигированию 3'-ОН конца ДНК [Rass, U. *et al.*, 2007].

Неповрежденный 5'-конец (5'-фосфатная группа)	
5'-гидроксильная группа (5'-киназная активность РНКР)	
5'-альдегидная группа (FEN1 в составе 5'-нависающего фрагмента)	
2'-дезоксирибо-5'-фосфат (АП-сайт) (POL β)	
5'-аденозинмонофосфат (APTX)	

**Рисунок 1.12.** Модификации 5'-конца ОР и процессирующие их ферменты.

Значительная роль в стадии процессирования 5'- и 3'-концевых модификаций ДНК отводится XRCC1, который взаимодействует с PNKP [Loizou, J.I. *et al.*, 2004; Whitehouse, C.J. *et al.*, 2001], POL  $\beta$  [Caldecott, K.W. *et al.*, 1996; Kubota, Y. *et al.*, 1996], APTX [Clements, P.M. *et al.*, 2004] и в составе комплекса XRCC1-LIG III $\alpha$  с TDP1 [El-Khamisy, S.F. *et al.*, 2005; Plo, I. *et al.*, 2003]. Взаимодействие XRCC1 со всеми вышеперечисленными ферментами обеспечивает их эффективную сборку в месте повреждений ДНК *in vivo* [El-Khamisy, S.F. *et al.*, 2005; Hirano, M. *et al.*, 2007; Lan, L. *et al.*, 2004; Loizou, J.I. *et al.*, 2004]. В дополнение было показано, что XRCC1 стимулирует 5'-киназную и 3'-фосфатазную активности PNKP *in vitro* [Mani, R.S. *et al.*, 2007; Whitehouse, C.J. *et al.*, 2001].

Многие ферменты, удаляющие 3'- и 5'-концевые модификации ДНК, имеют довольно широкий спектр субстратной специфичности, что может являться важным для включения запасных механизмов репарации ДНК в отсутствие основных ферментативных активностей, необходимых для репарации того или иного типа повреждений. Например, TDP1, помимо расщепления фосфотирозильной связи TOP1 $\alpha$  аддуктов, может удалять, хотя и значительно менее эффективно, различные модификации 3'-конца ДНК, включающие 3'-фосфогликолят, 3'-концевые дезоксирибо- и рибонуклеозиды и возникающие при действии АФК и используемых в антираковой терапии синтетические аналоги нуклеозидов [Dexheimer, T.S. *et al.*, 2010; Inamdar, K.V. *et al.*, 2002]. TDP1 также может гидролизовать АП-сайты в одноцепочечной ДНК с образованием 3'- и 5'-концевых фосфатных групп *in vitro* [Лебедева, Н.А. *et al.*, 2014; Lebedeva, N.A. *et al.*, 2011]. Другим примером является APTX, который в дополнение к 5'-АМФ также может процессировать 3'-фосфогликолят и 3'-фосфат *in vitro*, обеспечивая возможную альтернативу APE1-зависимому процессированию таких 3'-модификаций, которое в  $\sim 70$  раз менее эффективно по сравнению с АП-эндонуклеазной активностью [Takahashi, T. *et al.*, 2007]. Следует отметить, что значительное количество работ по исследованию субстратной специфичности ферментов, процессирующих модификации концов разрывов ДНК, по объективным причинам проводятся *in vitro* с использованием синтетических ДНК-субстратов и клеточных экстрактов или очищенных белков, потому значимость таких модификаций *in vivo* остается неустановленной.



**Рисунок 1.13.** Модификации 3'-конца одноцепочечных разрывов ДНК и ферменты, вовлеченные в их процессирование.

После стадии процессирования неканонических концов ОР происходит застройка нуклеотидной брешы по механизмам коротко- или длиннозаплаточной ЭРО с возможным участием альтернативных ДНК-полимераз  $\lambda$  и  $\iota$  в репарации окислительных ОР и последующим лигированием ДНК (раздел “1.2.1. Эксцизионная репарация оснований (ЭРО)”) [Bebenek, K. *et al.*, 2001; Garcia-Diaz, M. *et al.*, 2001].

### 1.2.3. Координация процессов ЭРО и ОР-репарации

Координация ЭРО до сих пор является предметом активного обсуждения. В настоящий момент предложена модель “передачи эстафетной палочки” с образованием короткоживущих белковых комплексов, также рассматривается вариант существования стабильных репарационных комплексов. В отличие от комплексообразования белков ЭРО с промежуточными интермедиатами репарации механизм “передачи эстафетной палочки” подразумевает координированную передачу поврежденной ДНК от одного белка к другому путем образования комплексов между двумя белками, действующими на последовательных стадиях ЭРО, и репарационным интермедиатом [Wilson, S.H. & Kunkel, T.A., 2000]. В пользу подобного механизма говорит существование многочисленных взаимодействий между белками ЭРО, которые были продемонстрированы с использованием преципитации рекомбинантных белков, несущих GST-эпитоп, иммунопреципитации эндогенных белков, дрожжевой двугибридной системы, а также путем структурных и прямых биохимических исследований *in vitro* с использованием очищенных белков, демонстрирующих последовательное образование ЭРО-комплексов с репарируемой ДНК [Bennett, R.A. *et al.*, 1997; Kubota, Y. *et al.*, 1996; Mol, C.D. *et al.*, 2000; Prasad, R. *et al.*, 2010; Waters, T.R. *et al.*, 1999]. Существует мнение, что, хотя данная модель и описывает координацию классического короткозаплаточного механизма ЭРО (например, репарация урацила), протекание репарации целого ряда других повреждений ДНК, требующих процессирования концов разрыва (например, окисленных азотистых оснований), по механизму “передачи эстафетной палочки” представляется маловероятным [Dianov, G.L. & Hubscher, U., 2013].

Модель существования стабильных репарационных комплексов, в рамках которой ЭРО является непрерывным процессом, изначально была также основана на данных о существовании многочисленных взаимодействий между белками ЭРО [Akbari, M. *et al.*, 2004; Prasad, R. *et al.*, 1996]. Тем не менее попытки очистки репарационных комплексов, стабильных в физиологических условиях и содержащих все типы ферментов ЭРО (ДНК-*N*-гликозилазу, АП-лиазу, ДНК-полимеразу и ДНК-лигазу), успехом не увенчались [Parsons, J.L. *et al.*, 2005a]. Данный результат представляется логичным, поскольку клетки используют один и тот же набор ферментов ЭРО для репарации различных типов повреждений ДНК (повреждения оснований, АП-сайты и разные типы ОР). Сложно представить как репарация такого широкого спектра

повреждений ДНК может осуществляться ограниченным количеством стабильных репарационных комплексов, тогда как существование специализированных белковых комплексов на каждый тип репарируемого повреждения не представляется выгодным с точки зрения распределения клеточных ресурсов.

Действительно, последние данные о механизме распознавания и удаления поврежденных оснований ДНК-*N*-гликозилазами доказывают, что первая стадия ЭРО происходит независимо от остальных белков этой системы репарации. ДНК-*N*-гликозилазы осуществляют постоянное высокоскоростное сканирование ДНК с выщеплением поврежденных оснований и образованием АП-сайтов, причем нуклеации репарационного комплекса на данной стадии не происходит [Buechner, C.N. *et al.*, 2015; Mullins, E.A. *et al.*, 2015; Qi, Y. *et al.*, 2012]. АП-сайты образуются не только в процессе ЭРО, но и в результате спонтанного гидролиза *N*-гликозидной связи, потому существует мнение, что APE1-зависимое расщепление фосфодиэфирной связи АП-сайта происходит независимо от действия остальных участников ЭРО. Такая гипотеза хорошо согласуется с необходимостью процессирования 5'- и 3'-концов ОР специализированными белками (PNKP, TDP1 и другие), которые образуют стабильные комплексы либо с POL  $\beta$ , либо с XRCC1-LIG III $\alpha$ , таким образом обеспечивая репарацию определенных типов ОР в зависимости от повреждений их концов [Caldecott, K.W., 2003]. Существование подобных комплексов было экспериментально доказано, как и то, что эффективность связывания XRCC1-LIG III $\alpha$  с сайтом ОР напрямую зависит от клеточного уровня содержания POL  $\beta$  [Parsons, J.L. *et al.*, 2005c; Whitehouse, C.J. *et al.*, 2001]. Более того, было показано, что взаимодействия между XRCC1 и белками, процессирующими модификации концов ОР (PNKP, апратаксин и APLF), являются в большей степени стабильными, поскольку они осуществляются через фосфорилированные аминокислотные остатки треонина и/или серина домена FHA (forkhead associated), являющиеся субстратами постоянно активной протеинкиназы CK2 [Bekker-Jensen, S. *et al.*, 2007; Clements, P.M. *et al.*, 2004; Pes, N. *et al.*, 2007; Loizou, J.I. *et al.*, 2004]. Другим примером является LIG III $\alpha$ , стабильность которой поддерживается за счет образования стабильного комплекса с XRCC1, в котором участвует порядка 80 % клеточной LIG III $\alpha$  [Caldecott, K.W. *et al.*, 1995].

С другой стороны, в ряде исследований *in vitro* было показано, что APE1 стимулирует активность многих ферментов ЭРО, а также способствует связыванию POL  $\beta$  с



нерасщепленным АП-сайтом, что соответствует принципу механизма “передачи эстафетной палочки” [Дырхеева, Н.С. *et al.*, 2008; Bennett, R.A. *et al.*, 1997; Ranalli, T.A. *et al.*, 2002; Vidal, A.E. *et al.*, 2001].

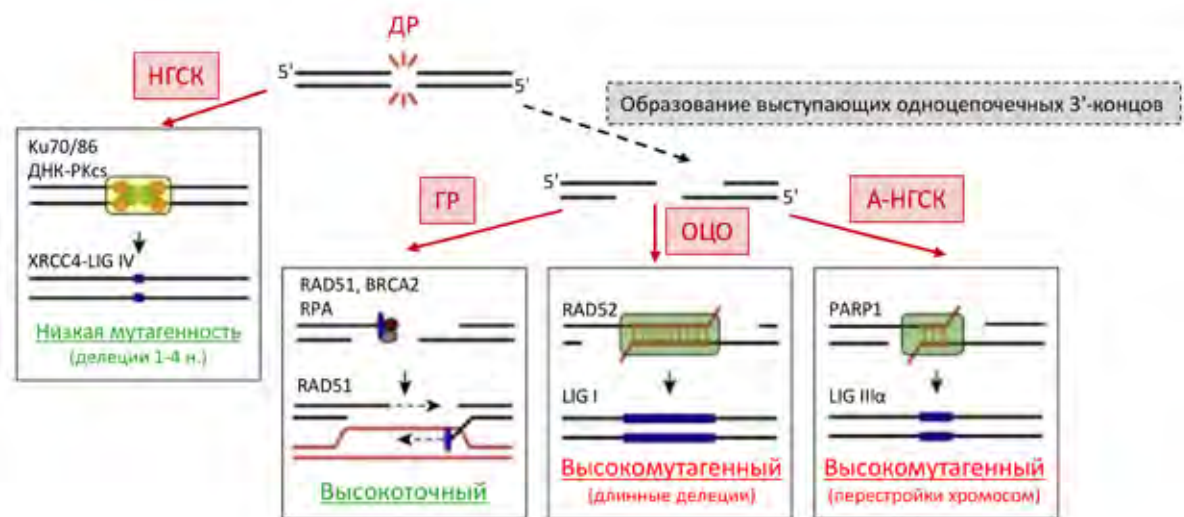
Таким образом, дискуссии об эксклюзивности существования одного или нескольких стабильных репарационных комплексов или же серии последовательных и короткоживущих белковых комплексов на поврежденной ДНК (механизм “передачи эстафетной палочки”) в координации ЭРО и репарации ОР продолжаются. Экспериментальные доказательства, существующие на сегодня, поддерживают возможность использования клеткой обеих моделей для репарации повреждений ДНК в зависимости от контекста (типа повреждения и варианта ЭРО или ОР репарации).

#### 1.2.4. Репарация двуцепочечных разрывов ДНК

Основными механизмами репарации ДР в клетках высших эукариот являются гомологичная рекомбинация (ГР) и негомологичное соединение концов (НГСК). Несмотря на то, что данные репарационные системы принципиально отличаются друг от друга с точки зрения механизма и участвующих в репарации ферментов, их координация обеспечивает репарацию большинства клеточных ДР. В процессе ГР происходит генерация выступающего одноцепочечного 3'-конца (так называемая резекция концов), который вторгается в неповрежденный гомологичный участок двуцепочечной ДНК (например, сестринской или гомологичной хроматиды) с участием рекомбиназы RAD51 и использует его для репарации; такой процесс в подавляющем большинстве случаев является безошибочным, несмотря на частое участие низкоточных ДНК-полимераз (Рисунок 1.14) [Heyer, W.D. *et al.*, 2010]. НГСК использует механизм прямого лигирования разъединенных концов ДНК независимо от степени гомологии между нуклеотидными последовательностями и является мутагенным (Рисунок 1.14) [Chiruvella, K.K. *et al.*, 2013]. Оба механизма являются эволюционно консервативными, но их вклад в репарацию ДР отличается в зависимости от организма. Например, дрожжи типа *Saccharomyces* в основном используют ГР для репарации ДР, индуцируемых действием ионизирующей радиации [Paques, F. & Haber, J.E., 1997], тогда как у высших животных вклад ГР и НГСК в значительной степени зависят от стадии клеточного цикла: ГР действует в средних S- и G<sub>2</sub>-фазах клеточного цикла, когда гомологичная хроматида доступна для рекомбинации и

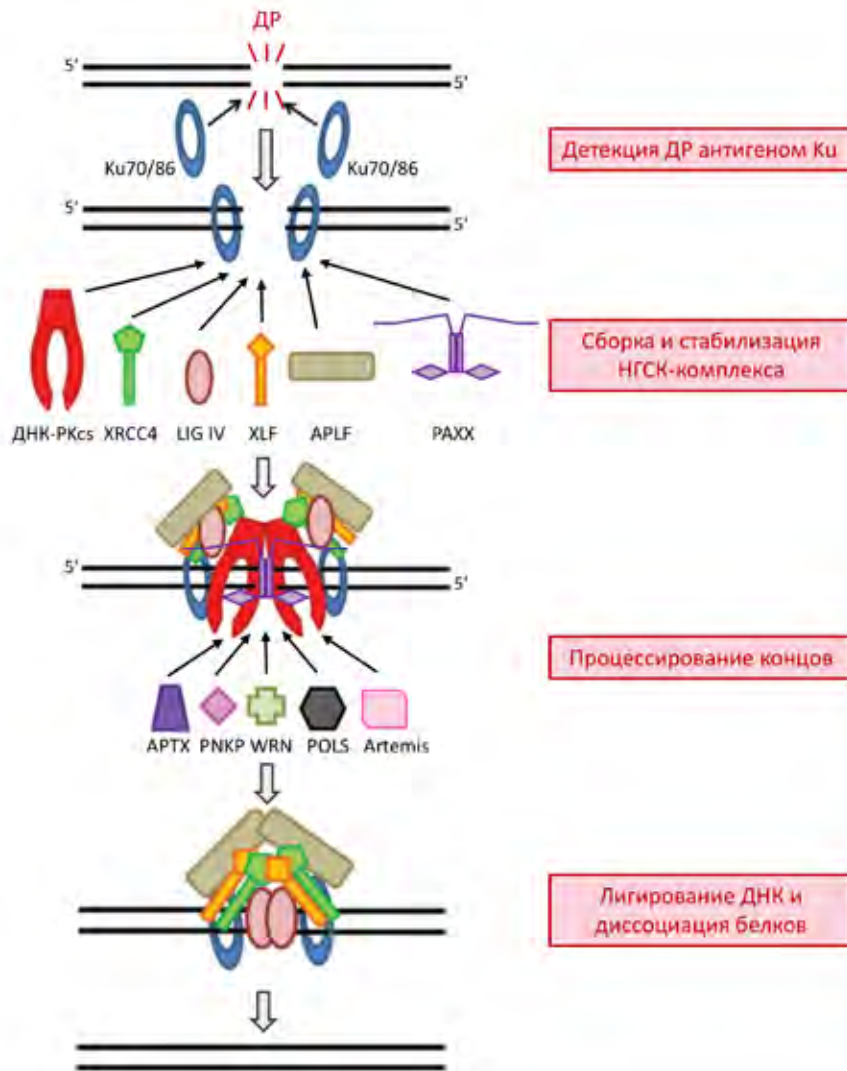
репликация ДНК происходит наиболее активно, а НГСК действует независимо от фазы клеточного цикла, хотя и превалирует в  $G_0/G_1$ - и  $G_2$ -фазах [Karanam, K. *et al.*, 2012]. Репарация ДР с выступающим одноцепочечным 3'-концом может также происходить по механизмам одноцепочечного отжига по прямым повторам (ОЦО) и альтернативного негомологичного соединения концов (А-НГСК), оба из которых являются мутагенными (Рисунок 1.14). В процессе ОЦО происходит соединение концов между нуклеотидными повторами, разделенными спейсерами (например, рибосомной ДНК), при отжиге одноцепочечных последовательностей ДНК, ассоциированных с репликационным белком А (RPA), с участием RAD52, что сопровождается потерей одного повтора и спейсера [Lin, F.L. *et al.*, 1984]. Мутагенность А-НГСК, который часто использует короткие гомологичные последовательности, связана с предрасположенностью данного механизма к соединению концов ДР, расположенных на разных хромосомах, что часто приводит к хромосомным перестройкам (Рисунок 1.14) [Wang, H. *et al.*, 2005; Zhang, Y. & Jasin, M., 2011].

Наибольшая часть клеточных ДР репарируется по механизму НГСК, который включает стадии детекции ДР с последующей сборкой и стабилизацией репарационного комплекса на сайте разрыва, ориентирования концов разрыва относительно друг друга и их стабилизации, процессирования 5'- и 3'-концов разрыва, лигирования ДНК и диссоциации репарационного комплекса [Burma, S. *et al.*, 2006].



**Рисунок 1.14.** Упрощенная схема механизмов репарации ДР с указанием основных ферментов репарации и степени мутагенности негомологичного соединения концов (НГСК), гомологичной рекомбинации (ГР), одноцепочечного отжига по прямым повторам (ОЦО) и альтернативного негомологичного соединения концов (А-НГСК). Адаптировано из [Ceccaldi, R. *et al.*, 2016].

На первой стадии НГСК происходит независимая от последовательности ДНК детекция ДР гетеродимером KU, состоящим из субъединиц KU70 и KU86 и имеющим кольцевую структуру, которая “опоясывает” двуцепочечную ДНК по обе стороны от разрыва (Рисунок 1.15) [Walker, J.R. *et al.*, 2001]. Связанный с ДР антиген KU обеспечивает инициацию процесса независимой сборки целого ряда факторов НГСК на сайте повреждения ДНК, включая каталитическую субъединицу ДНК-зависимой протеинкиназы ДНК-РКcs, комплекс XRCC4 и ДНК-лигазы IV (LIG IV), XRCC4-подобный фактор XLF, апратаксин- и PNKP-подобный фактор APLF и белок PAXX, который является паралогом XRCC4 и XLF, и некоторых других белков, стабилизирующих друга друга и весь репарационный комплекс на ДНК [Nick McElhinny, S.A. *et al.*, 2000]; [Kanno, S. *et al.*, 2007; Macrae, C.J. *et al.*, 2008; Ochi, T. *et al.*, 2015; Uematsu, N. *et al.*, 2007; Yano, K. *et al.*, 2008]. Взаимодействие между ДНК-РКcs со связанным с ДНК антигеном KU обеспечивает смещение последнего по двуцепочечной ДНК вглубь от разрыва с последующей индукцией киназной активности ДНК-РКcs, которая играет роль трансдьюсера, а также защищает концы ДР от деградации и обеспечивает их корректное пространственное расположение друг относительно друга [Ding, Q. *et al.*, 2003; Gottlieb, T.M. & Jackson, S.P., 1993; Weterings, E. *et al.*, 2003]. Следует отметить, что по аналогии с XRCC1 и в дополнение к KU70/86, XRCC4 также может играть важную роль в сборке ряда белков репарационного комплекса, особенно тех, что обеспечивают процессирование неканонических концов ДР, на сайте повреждения ДНК. Например, XRCC4 обеспечивает стабилизацию LIG IV [Bryans, M. *et al.*, 1999], а также образует белковый комплекс с PNKP и APTX [Clements, P.M. *et al.*, 2004; Koch, C.A. *et al.*, 2004; Mani, R.S. *et al.*, 2010]. Более того, были продемонстрированы взаимодействия ДНК-полимераз  $\mu$  и  $\lambda$ , которые обеспечивают синтез цепи ДНК, комплементарной нависающим одноцепочечным участкам с образованием тупых концов двуцепочечной ДНК, с KU антигеном и комплексом XRCC4-LIG IV [Mahajan, K.N. *et al.*, 2002; Nick McElhinny, S.A. *et al.*, 2005]. Роль XLF заключается в прямой стимуляции лигазной активности комплекса XRCC4-LIG IV, а также в пространственной организации концов ДР [Mahaney, B.L. *et al.*, 2013], тогда как PAXX обеспечивает стабилизацию репарационного НГСК-комплекса на сайте повреждения ДНК [Ochi, T. *et al.*, 2015]. APLF является дополнительным хотя и необязательным фактором, стимулирующим сборку XLF и XRCC4-LIG IV в процессе НГСК [Grundy, G.J. *et al.*, 2013; Iles, N. *et al.*, 2007].



**Рисунок 1.15.** Общая схема репарации ДР по механизму НГСК, включающей стадии детекции ДР антигеном Ку и сборки репарационного комплекса НГСК на сайте повреждения ДНК, процессирования 5'- и 3'-концов разрыва, лигирования ДНК и диссоциации репарационного комплекса. Адаптировано из [Davis, A.J. & Chen, D.J., 2013].

После сборки репарационного комплекса происходит процессирование 5'- и 3'-концов разрыва с участием, например, АРТХ и РНКР, которые действуют также и в репарации ОР и ЭРО (раздел “1.2.2. Репарация одноцепочечных разрывов ДНК (ОР)”), а также антигена КУ, который обладает АП-лиазной активностью (Рисунок 1.15) [Roberts, S.A. *et al.*, 2010]. В НГСК-репарации ДР в числе прочих также возможно участие белка Artemis и хеликазы RecQ5-семейства Werner (WRN), которые, по-видимому, обеспечивают удаление нависающих концов одноцепочечной ДНК с образованием потенциально лигируемых тупых концов благодаря их 5'-эндо- и 3'-эндонуклеазной активностям, соответственно [Cooper, M.P. *et al.*, 2000; Ma, Y. *et al.*, 2002]. Artemis также может удалять 3'-фосфогликоляты *in vitro* и

фосфорилируется ДНК-РКс и/или АТМ [Povirk, L.F. *et al.*, 2007]. Следует отметить, что в случае, когда концы разрыва ДНК не требуют процессирования перед лигированием, репарация ДР происходит чрезвычайно быстро и в отсутствие ДНК-РКс с участием лишь антигена KU, XRCC4-LIG IV и XLF [Yano, K. & Chen, D.J., 2008].

LIG IV-Зависимое лигирование ДНК происходит в присутствии XRCC4, который стабилизирует и стимулирует ферментативную активность LIG IV, XLF, необходимого для ориентации концов разрыва в пространстве, и стимулирующего лигазную активность APLF [Ahnesorg, P. *et al.*, 2006; Grawunder, U. *et al.*, 1997; Grundy, G.J. *et al.*, 2013]. Важным является то, LIG IV может осуществлять лигирование несовместимых концов ДНК, что, например, обеспечивает сохранение генетической информации короткого нависающего 3'-конца путем его прямого лигирования с 5'-фосфатной группой другого конца; подобная ферментативная активность стимулируется в присутствии XLF [Gu, J. *et al.*, 2007; Tsai, C.J. *et al.*, 2007].

Заключительной стадией НГСК-репарации является RNF8-зависимая диссоциация репарационного комплекса [Feng, L. & Chen, J., 2012], которая также зависит от регулируемой фосфорилированием конформации ДНК-РКс [Hammel, M. *et al.*, 2010].

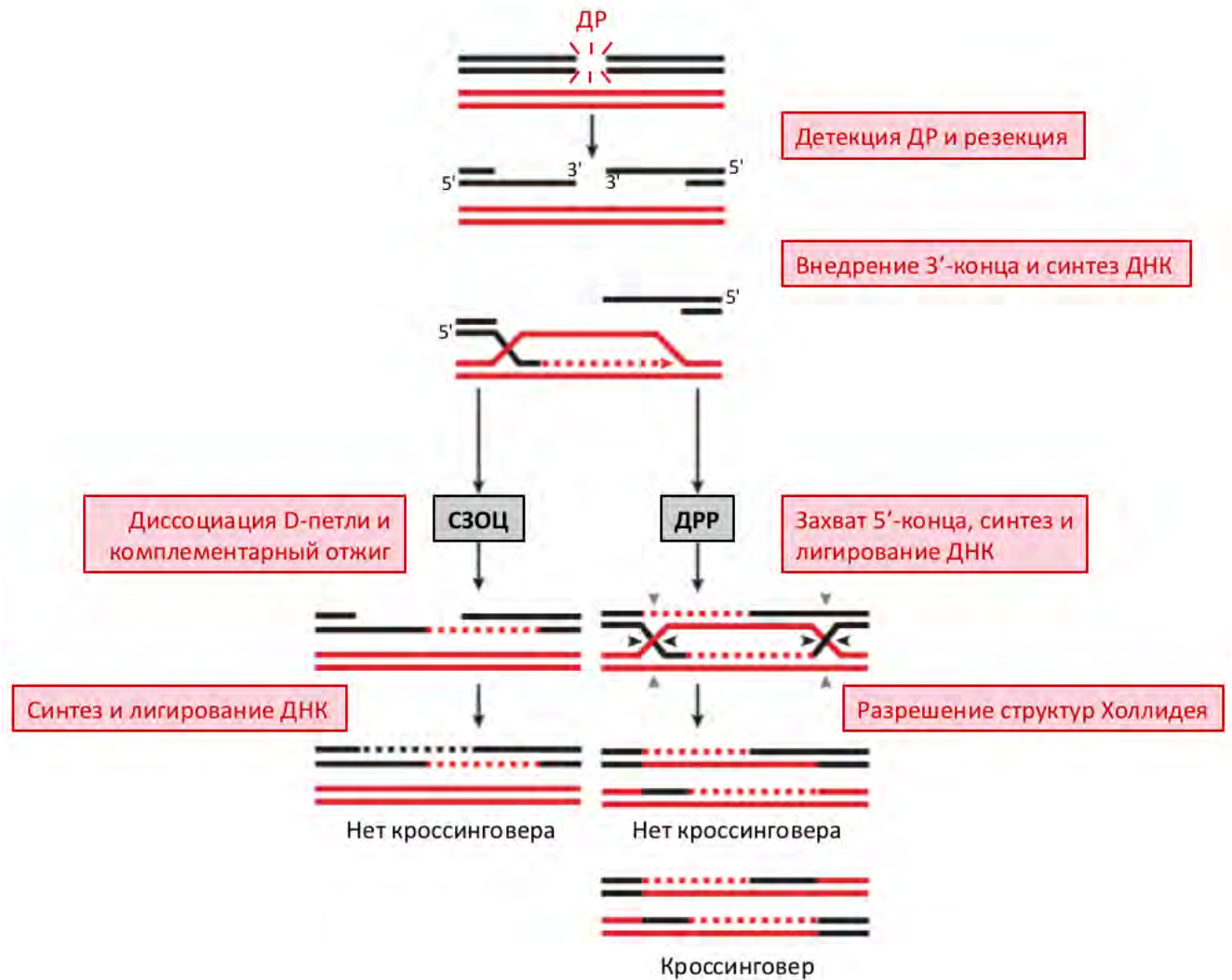
Выбор между различными механизмами репарации ДР в значительной степени определяется длиной 5'—3' резекции концов ДР, которая в ограниченном виде (до 20 и 100-300 нуклеотидов у млекопитающих и в дрожжах, соответственно) осуществляется при действии экзонуклеазы Mre11 в составе MRN-комплекса и CtBP-взаимодействующего белка CtIP [Huertas, P. & Jackson, S.P., 2009; Truong, L.N. *et al.*, 2013]. Подобная частичная резекция обеспечивает образование коротких выступающих одноцепочечных 3'-концов ДНК, которые могут репарироваться методом А-НГСК. Существует также возможность последовательной значительной резекции концов, в процессе которой в клетках млекопитающих участвует ряд дополнительных хеликаз (RecQ-хеликаза BLM и WRN) и экзонуклеаз (DNA2 и EXO1), с образованием длинных выступающих одноцепочечных 3'-концов, которые репарируются механизмами ГР или ОЦО [Sturzenegger, A. *et al.*, 2014]. Длина резекции концов ДР в наибольшей степени определяется стадией клеточного цикла и регулируется через посттрансляционные модификации белков резекции, например, фосфорилирование циклин-зависимыми киназами [Chen, X. *et al.*, 2011; Yun, M.H. & Hiom, K., 2009] и АТМ [Li, S. *et al.*, 2000; Wang, H. *et al.*, 2013], PARилирование PARP1 [Hu, Y. *et al.*, 2014] и неддирование

[Jimeno, S. *et al.*, 2015], а также участием дополнительных факторов, включая BRCA1 и 53BP1 [Escribano-Diaz, C. *et al.*, 2013]. После резекции концов происходит ингибирование НГСК и репарация ДР может осуществляться с участием любого из механизмов, основанных на отжиге гомологичных последовательностей: ГР, ОЦО и А-НГСК.

Наиболее аккуратным механизмом репарации ДР является ГР, основным требованием к реализации которой является наличие сестринской хроматиды или гомологичной хромосомы в качестве источника корректной последовательности ДНК. В общем случае стадии ГР включают 1) инициацию ГР в присутствии ДР, 2) резекцию концов ДР с участием Mre11, CtIP и других ферментов с образованием 3'-ОН нависающих одноцепочечных фрагментов, 3) связывание рекомбиназы RAD51 в присутствии белков-медиаторов на одноцепочечных фрагментах ДНК с образованием пресинаптических рекомбинационных нуклеобелковых филаментов, 4) RAD51-зависимое внедрение 3'-нависающего филамента в неповрежденный гомологичный участок ДНК с образованием D-петли, 5) синтез ДНК на внедренной нити, 6) захват 5'-конца разрыва при отжиге с новосинтезированной ДНК D-петли, 7) перекрещивание цепей ДНК с образованием структуры Холлидея и 8) разрешение структуры Холлидея действием специализированных эндонуклеаз (резолваз) с образованием кроссинговера или продукта репарации без кроссинговера (Рисунок 1.16).

После резекции с образованием длинных выступающих одноцепочечных 3'-концов в начальный момент наблюдается конкуренция между RPA и RAD51 за их связывание. Роль RPA в данном процессе двояка: с одной стороны, ассоциирование RPA с ДНК способствует ГР путем предотвращения образования вторичных структур и спонтанного отжига микрогомологичных последовательностей, а также защиты концов ДНК от деградации [Chen, H. *et al.*, 2013; Deng, S.K. *et al.*, 2014]; с другой стороны, образование RPA-ассоциированной одноцепочечной ДНК может стимулировать RAD51-независимый механизм ОЦО [Yan, H. *et al.*, 2011]. Вытеснение RPA, образование рекомбинационных нуклеобелковых филаментов RAD51 на одноцепочечной ДНК и внедрение такой цепи ДНК в гомологичную ДНК-донор с образованием так называемой D-петли в наибольшей степени стимулируется белком BRCA2, кодируемым геном рака молочной железы 2 [Esashi, F. *et al.*, 2007]. Синтез ДНК на 3'-конце внедренной цепи ДНК, иначе называемый достройкой D-петли, осуществляется

ДНК-полимеразами  $\delta$  и  $\eta$  с использованием комплементарной цепи донорной ДНК в качестве подложки [McIlwraith, M.J. *et al.*, 2005; Sneed, J.L. *et al.*, 2013].



**Рисунок 1.16.** Упрощенная схема репарации ДР по механизму ГР, включающему варианты синтез-зависимого отжига цепей (СЗОЦ, левая часть) и репарации двухцепочечных разрывов (ДРР, правая часть). Адаптировано из [San Filippo, J. *et al.*, 2008].

Последующее процессирование такого промежуточного продукта ГР приводит к образованию либо кроссинговера, либо продукта репарации без кроссинговера (Рисунок 1.16). В мейотических клетках минимум один ДР на пару хромосом должен быть процессирован с образованием кроссинговера для обеспечения сегрегации гомологичных хромосом [Baker, B.S. *et al.*, 1976]. С другой стороны, образование кроссинговеров гомологичных хромосом в митотических клетках может приводить к потере гетерозиготности или изменению копийности в случае кроссинговеров между повторами, являясь мутагенным процессом [LaRocque, J.R. *et al.*, 2011]. Именно поэтому оба типа продуктов могут образовываться в процессе ГР, но их количественное соотношение находится под строгим клеточным контролем. Основным

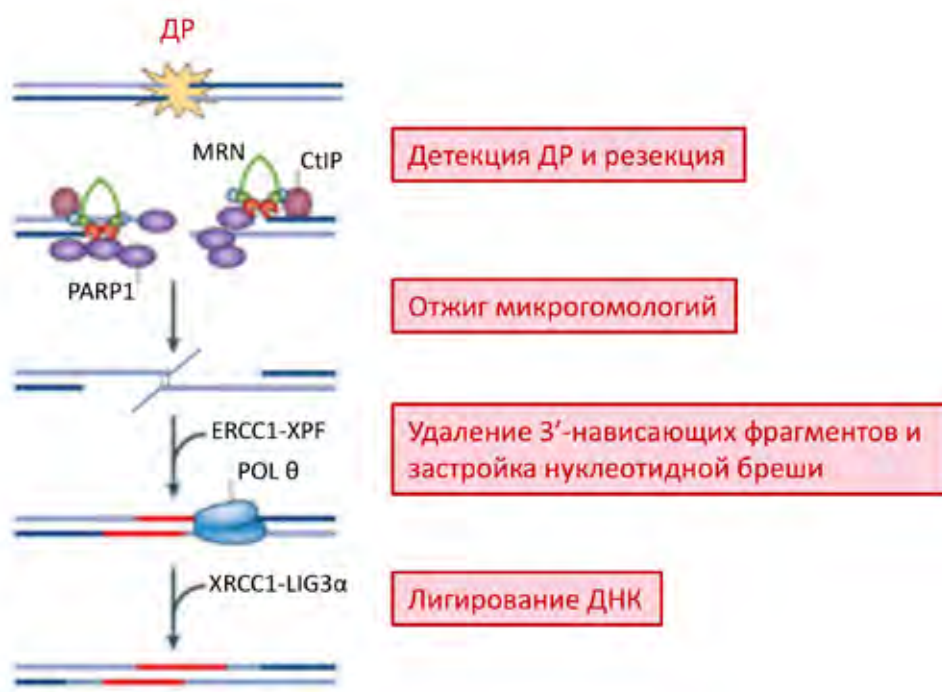
механизмом репарации ДР в митотических клетках в отсутствие кроссинговера является вариант синтез-зависимого отжига цепей (СЗОЦ), в процессе которого происходит диссоциация D-петли с последующим заполнением одноцепочечной нуклеотидной брешы и лигированием ДНК [Ferguson, D.O. & Holloman, W.K., 1996]. В случае варианта репарации двухцепочечных разрывов (ДРР) происходит соединение внедрившейся достроенной 3'-цепи ДНК с 5'-концом разрыва, сопровождающееся перекрещиванием цепей ДНК с образованием структуры Холлидея. Разрешение такой структуры осуществляется двумя возможными путями; первый вариант включает “диссоциацию” структуры Холлидея при миграции цепей и действии топоизомеразной активности комплекса BLM-TOP III $\alpha$ -RMI1-RMI2 с образованием продуктов в отсутствие кроссинговера [Wu, L. & Hickson, I.D., 2003], тогда как второй вариант включает “разрезание” структуры Холлидея с участием нуклеазы MUS81-EME1 либо резолвазы GEN1 с образованием равных количеств продуктов кроссинговера и некроссинговера [Matos, J. *et al.*, 2011; Wechsler, T. *et al.*, 2011].

Механизмы альтернативного негомологичного соединения концов представляют собой высокомутатогенный запасной путь репарации ДР, по мнению ряда исследователей, реализуемый в отсутствие НГСК и возможно ГР [Frit, P. *et al.*, 2014; Lin, W.Y. *et al.*, 2013; Simsek, D. & Jasin, M., 2010]. Одним из важнейших механизмов А-НГСК является метод соединения концов с микрогомологичными последовательностями, который наиболее активен в S- и G<sub>2</sub>-фазах клеточного цикла и ингибирован в G<sub>1</sub>-фазе в соответствии с необходимостью осуществления резекции концов ДР (Рисунок 1.17) [Audebert, M. *et al.*, 2004; Truong, L.N. *et al.*, 2013].

Поскольку резекция концов в общем случае является признаком ГР, данный механизм, несмотря на название, часто рассматривают в качестве одного из вариантов ГР. В рамках данного механизма на стадии детекции ДР наблюдается конкуренция между PARP1 и антигеном KU за связывание концов разрыва, что предполагает действие А-НГСК в клетках нормального происхождения наряду с НГСК [Wang, M. *et al.*, 2006]. В случае PARP1-зависимой детекции и сигнализации разрывов ДНК происходит частичная резекция концов ДР (1-16 нуклеотидов) при действии MRE11 в составе MRN-комплекса и CtIP [Haince, J.F. *et al.*, 2008]. Комплементарное спаривание микрогомологичных последовательностей выступающих одноцепочечных 3'-концов обеспечивает их правильную пространственную ориентацию, так называемый синапсис, за которым следует удаление 3'-нависающих одноцепочечных



фрагментов при действии экзонуклеазы ERCC1-XPF, необходимое для последующего синтеза ДНК [Ahmad, A. *et al.*, 2008]. Заполнение нуклеотидной бреши в большинстве случаев осуществляется ДНК-полимеразой  $\theta$  (POL  $\theta$ ) [Kent, T. *et al.*, 2015], хотя POL  $\beta$  или POL  $\lambda$  также могут участвовать в процессе в зависимости от контекста [Crespan, E. *et al.*, 2012]. Дополнительная роль POL  $\theta$  заключается в обеспечении высокоэффективного отжига микрогомولوجичных последовательностей путем стабилизации спаренных форм ДНК и предотвращения связывания с ДНК факторов, противостоящих процессу комплементарного спаривания. Связывание POL  $\theta$  с ДР обеспечивается через образование белкового взаимодействия с PARP1 [Mateos-Gomez, P.A. *et al.*, 2015]. Лигирование ДНК осуществляется LIG III или LIG I в отсутствие основной лигазной активности [Simsek, D. *et al.*, 2011; Wang, H. *et al.*, 2005]. Как упоминалось выше (Рисунок 1.14), А-НГСК является высокомутатогенным процессом: POL  $\theta$  является низкоточной ДНК-полимеразой, приводя к закреплению вставок, тогда как излишнее процессирование концов ДР и использование микрогомولوجичных последовательностей различных хромосом приводит к возникновению делеций и частым хромосомным перестройкам [Gostissa, M. *et al.*, 2011].



**Рисунок 1.17.** Репарация ДР путем А-НГСК. Адаптировано из [Lazzerini-Denchi, E. & Sfeir, A., 2016].

Физиологическая роль А-НГСК с микрогомологичными последовательностями в настоящий момент остается неясной, хотя и активно изучаемой. Из-за высокой мутагенности данного механизма его использование для репарации ДР должно быть ограничено специфическими генетическими ситуациями, например, в случае отсутствия обоих ГР и канонического НГСК или при необходимости введения мутаций как источника разнообразия антител. С механистической точки зрения репарация ДР по методу НГСК превалирует в случае детекции ДР PARP1, частичной резекции концов разрыва и наличия микрогомологичных последовательностей определенной длины в районе сайта разрыва (5-22 нуклеотида). Факторы, осуществляющие резекцию концов ДР являются общими для А-НГСК с микрогомологичными последовательностями и ГР; более того, их инактивация в дрожжах или человеческих клетках приводит к повышенной репарации ДР методом А-НГСК, потому существует точка зрения, что упомянутые методы могут репарировать одну и ту же совокупность ДР в S- и G<sub>2</sub>-фазах клеточного цикла [Deng, S.K. *et al.*, 2014]. Более вероятным сценарием является то, что А-НГСК может происходить в зависимости от контекста в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-фазе клеточного цикла, когда резекция концов ДР ингибирована [Xiong, X. *et al.*, 2015]. Следует также отметить, что существует другие механизмы А-НГСК, которые не опираются на существование микрогомологий, поскольку таковые могут быть генерированы действием ДНК-полимераз, или не требуют резекции концов в случае, когда микрогомологичные последовательности находятся в непосредственной близости от ДР [Simsek, D. *et al.*, 2011]. Исследования последних лет показывают, что механизмы НГСК, А-НГСК и ГР могут сосуществовать в контексте специфических генетических ситуаций [Sharma, S. *et al.*, 2015]. Например, у млекопитающих А-НГСК является основным механизмом репарации ДР репликационных вилок после их коллапса в митохондриях [Tadi, S.K. *et al.*, 2016; Truong, L.N. *et al.*, 2013], в *Caenorhabditis elegans* А-НГСК репарировывает ДР в зародышевых клетках [van Schendel, R. *et al.*, 2015], а также в процессе раннего развития позвоночных [Thyme, S.B. & Schier, A.F., 2016]. Более того, активность и субстратная специфичность НГСК и А-НГСК с микрогомологичными последовательностями в процессе рекомбинации ДНК при переключении изотипов иммуноглобулинов не перекрываются [Cortizas, E.M. *et al.*, 2013; Yan, C.T. *et al.*, 2007].

Репарация ДР методом ОЦО с механистической точки зрения имеет высокую степень сходства с А-НГСК с микрогомологичными последовательностями, хотя относится к вариантам

ГР (Рисунок 1.14). Как и А-НГСК и ГР, субстратом ОЦО является ДР с выступающими одноцепочечными 3'-концами, длина которых, впрочем, значительно выше, чем в случае А-НГСК [Zhou, Y. *et al.*, 2014]. Последующие стадии данного механизма включают комплементарное спаривание аналогично ориентированных длинных гомологичных последовательностей (не менее 15 нуклеотидов) RPA-ассоциированных выступающих 3'-концов в присутствии RAD52 [Ivanov, E.L. *et al.*, 1996; Rothenberg, E. *et al.*, 2008], удаление 3'-нависающих одноцепочечных фрагментов комплексом ERCC1-XPF, экзонуклеазная активность которого стимулируется в присутствии RAD52 [Motycka, T.A. *et al.*, 2004], заполнение нуклеотидной брешы ДНК-полимеразами, которые на данный момент неизвестны, и LIG I-зависимое лигирование ДНК. Следует отметить, что в отличие от А-НГСК ингибирование активности PARP1 не влияет на эффективность ОЦО [Howard, S.M. *et al.*, 2015]. Ключевым отличием процесса ОЦО от ГР является его независимость от RAD51 и BRCA2 [Tutt, A. *et al.*, 2001]. Как и в случае А-НГСК, ОЦО представляет собой высокомуtagenный механизм, вызывающий делеции длинных участков ДНК, разделяющих гомологичные последовательности: например, в дрожжах *S.cerevisiae* описаны ОЦО-зависимые делеции длиной порядка 25 т.н. [Vaze, M.V. *et al.*, 2002]. Исследование механизмов репарации ДР, особенно отличных от классических ГР и НГСК, представляет собой бурно развивающуюся область, что бесспорно приведет к лучшему пониманию данных процессов в короткой перспективе.

### 1.3. Киназа АТМ

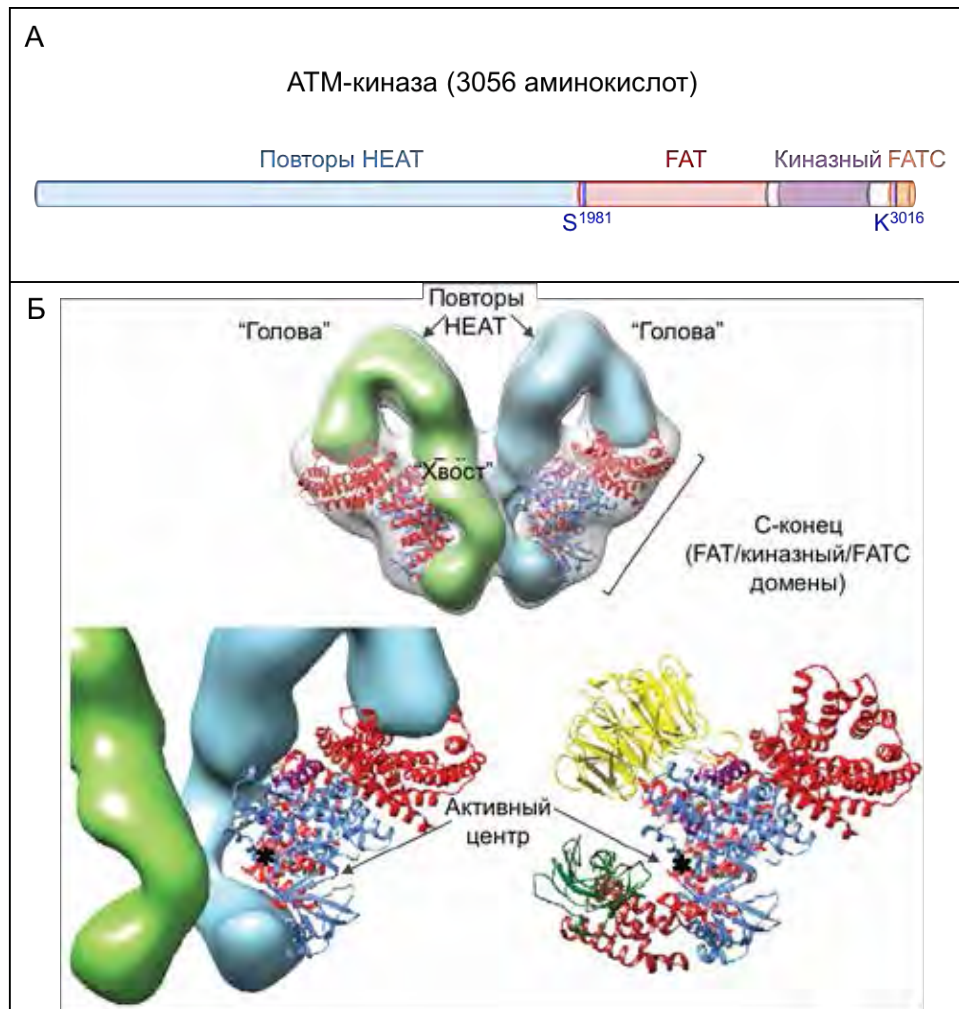
Как упоминалось в разделе “1.2. Целостность генома”, АТМ является одним из основных белков, обеспечивающих координацию клеточного ответа на повреждения ДНК. АТМ (Ataxia Telangiectasia mutated, КФ 2.7.11.1) является серин/треониновой протеинкиназой и относится к семейству киназ, родственных по отношению к фосфатидилинозитол-3-киназе (PI3K). Другими важными киназами семейства PI3K, аминокислотные последовательности которых имеют значительную гомологию с последовательностью АТМ, являются ATR (АТМ- и Rad3-родственная киназа) и ДНК-РКс. По аналогии с ДНК-РКс, роль которой в координации НГСК подробно рассматривается в разделе “1.2.4. Репарация двуцепочечных разрывов ДНК”), АТМ и ATR функционируют в качестве белков-преобразователей в рамках клеточного ответа

на повреждения ДНК, хотя специфические функции этих киназ существенно различаются: ATM отвечает за регуляцию клеточного ответа на ДР, тогда как ATR-зависимый ответ индуцируется широким спектром повреждений, мешающих репликации ДНК, и ДР [Falck, J. *et al.*, 2005]. Функция ATM регулируется путем индукции киназной активности фермента с последующим фосфорилированием ряда белков-эффекторов.

Последовательность ATM состоит из 3056 аминокислот с молекулярной массой белка порядка 350 кДа, доменная организация которой включает повторы HEAT, FAT (FRAP/ATM/TRRAP), С-концевой FAT (FATC) и киназные домены (Рисунок 1.18 А) [Lavin, M.F. *et al.*, 2004]. Доменная организация PIKK киназ высококонсервативна. Повторы HEAT играют важную роль в регуляции функции ATM, модулируя белок-белковые взаимодействия с компонентом MRN-комплекса NBS1 [You, Z. *et al.*, 2005] и комплексом TEL2–TTI1–TTI2, который существует в комплексе с HSP90 и, вероятно, является PIKK-специфическим кошапероном [Hurov, K.E. *et al.*, 2010; Takai, H. *et al.*, 2007]. Существует также точка зрения, подкрепляемая данными электронной микроскопии, что повторы HEAT могут образовывать небольшой глобулярный домен типа “руки”, который напрямую взаимодействует с ДНК [Llogsa, O. *et al.*, 2003]. Следует отметить, что электромикроскопическая структура мономера ATM значительно отличается от нативной структуры димера фермента, обсуждаемой ниже. Домены FAT и FATC являются регуляторными: биохимические данные показывают, что в клетках эукариот взаимодействие этих доменов обеспечивает ингибирование киназной активности ATM в нативном состоянии [Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B., 2003; Sawicka, M. *et al.*, 2016]. Взаимодействие FATC-домена ATM с ацетилтрансферазой TIP60 обеспечивает ацетилирование остатка K3016, необходимое для эффективной индукции активности киназы [Sun, Y. *et al.*, 2005].

С точки зрения пространственной структуры, методом крио-электронной микроскопии было показано, что ATM человека и ее дрожжевой аналог Tel1 в нативном состоянии являются нековалентно связанными гомодимерами с ориентацией субъединиц по типу “голова к голове” (Рисунок 1.18 Б) [Lau, W.C. *et al.*, 2016; Sawicka, M. *et al.*, 2016; Wang, X. *et al.*, 2016]. Такой гомодимер является каталитически неактивным благодаря стерическим ограничениям к доступу субстратов к активному центру. Вполне возможно, что при связывании повторов HEAT области “головы” димерной ATM с комплексом MRN происходит диссоциация олигомера на

субъединицы с последующей индукцией активности фермента, необходимой для регуляции клеточного ответа на повреждения ДНК [Lau, W.C. *et al.*, 2016].



**Рисунок 1.18.** Структура АТМ. А. Доменная организация последовательности фермента. Показаны важные для активации ферментативной активности АТМ аминокислотные остатки: ацетилируемый T1P60 остаток K3016 и самофосфорилируемый S1981. Б. Пространственная структура киназы. Адаптировано из [Lau, W.C. *et al.*, 2016].

### 1.3.1. Каноническая активация АТМ

Одной из основных канонических функций АТМ является координация клеточного ответа после облучения ионизирующей радиацией. Каноническим индуктором активности АТМ в ответ на облучение считаются ДР, тогда как сама активация происходит в присутствии MRN (MRE11-RAD50-NBS1) комплекса, который обеспечивает первоначальную локализацию АТМ в комплексе с T1P60 на ДР [Carson, C.T. *et al.*, 2003; Deshpande, R.A. *et al.*, 2014; Sun, Y. *et al.*, 2009; Uziel, T. *et al.*, 2003]. Последующее АТМ-зависимое фосфорилирование более тысячи субстратов координируют процессы реорганизации структуры хроматина, транскрипции и

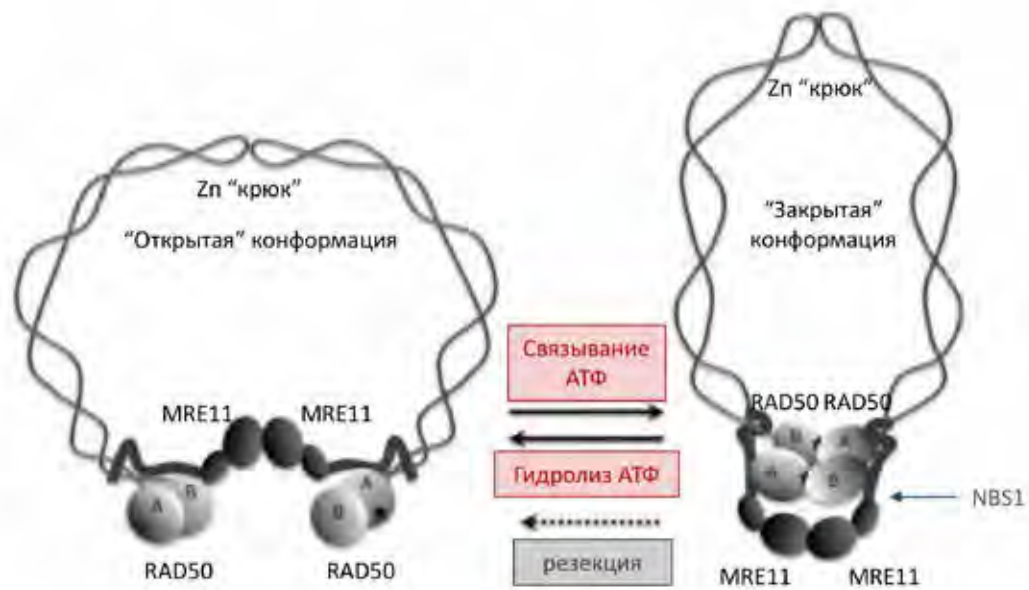
сплайсинга, прогрессии клеточного цикла, репарации ДНК, апоптоза и многие другие [Bhatti, S. *et al.*, 2011; Paull, T.T., 2015; Shiloh, Y. & Ziv, Y., 2013].

Механизм активации ATM в ответ на облучение, предложенный лабораторией M. Kastan, включает внутримолекулярное самофосфорилирование белка по остатку серина 1981 FAT-домена с последующей мономеризацией и индукцией киназной активности [Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B., 2003]. Самофосфорилирование серина 1981 препятствует существованию ATM в форме неактивного димера, поскольку при его замене на остаток аспарагиновой кислоты, имитирующей фосфорилирование (ATM<sup>S1981D</sup>), образования димера киназы не наблюдалось. Замена S1981 на аланин с образованием нефосфорилируемой мутантной формы ATM<sup>S1981A</sup> препятствует локализации киназы на сайте разрыва ДНК и ATM-зависимой регуляции задержки клеточного цикла в S-фазе, что подтверждает важность самофосфорилирования данного остатка, инициирующего мономеризацию фермента, в функционировании ATM в ответ на повреждения ДНК [Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B., 2003; Berkovich, E. *et al.*, 2007]. Позже было показано, что в дополнение к серину 1981 другие аминокислотные остатки ATM подвергаются посттрансляционным модификациям: было продемонстрировано самофосфорилирование остатков серина 367, 1893, 2996 и тирозина 1885 [Kozlov, S. *et al.*, 2003; Kozlov, S.V. *et al.*, 2011; Kozlov, S.V. *et al.*, 2006]. Функциональная значимость всех вышеупомянутых модификаций ATM экспериментально доказана в человеческих клетках и спорна в мышцах и экстрактах *Xenopus* [Daniel, J.A. *et al.*, 2008; Pellegrini, M. *et al.*, 2006]. В одной из более поздних работ было показано, что мутация S1981A в ATM в основном влияет не на первоначальную локализацию киназы на ДР, а на длительность ее нахождения на сайте повреждения ДНК, что, в свою очередь, влияет на эффективность ATM-зависимого фосфорилирования субстратов [So, S. *et al.*, 2009]. Несмотря на значительные разногласия относительно функциональной роли модификации S1981, статус фосфорилирования данного остатка повсеместно используется в качестве удобного и чувствительного маркера киназной активности ATM.

В дополнение, для индукции киназной активности, последующего самофосфорилирования ATM и ATM-зависимого ответа на ДР необходимо ацетилирование лизина 3016 гистон-ацетилтрансферазой TIP60/KAT5 (Рисунок 1.18) [Sun, Y. *et al.*, 2005; Sun, Y. *et al.*, 2007]. В отсутствие такого ацетилирования при мутагенезе остатка K3016 или

киРНК-нокдауне TTP60 самофосфорилирования S1981 и АТМ-зависимого фосфорилирования субстратов p53 и CHK2 не наблюдалось [Sun, Y. *et al.*, 2007]. Функция гистон-ацетилтрансферазы, в свою очередь, регулируется фосфорилированием остатка тирозина 44 киназой c-Abl при связывании TTP60 с гистоновыми метками H3K8<sup>me3</sup> и возможно H3K36<sup>me3</sup> в ответ на изменения структуры хроматина [Kaidi, A. & Jackson, S.P., 2013]. Таким образом, самофосфорилированию АТМ предшествует стадия детекции повреждений ДНК, за которой следует локализация ацетилированных самофосфорилированных мономеров киназы на сайтах ДР.

В настоящий момент общепризнанным сенсором ДР в контексте активации АТМ считается MRN-комплекс, который в присутствии аденозинтрифосфата (АТФ) или его аналогов (за исключением N<sup>6</sup>-модифицированного АТФ) образует стабильный комплекс с концевой двуцепочечной ДНК *in vitro* [Deshpande, R.A. *et al.*, 2014; Lee, J.H. *et al.*, 2003; Liu, Y. *et al.*, 2016]. Следует отметить, что предпочтительным конформационным состоянием MRN-комплекса, которое обеспечивает локализацию АТМ на сайте повреждения ДНК и последующую индукцию киназной активности, является так называемая “закрытая” конформация (Рисунок 1.19) [Lee, J.H. *et al.*, 2013]. Такая конформация обеспечивает высокую аффинность взаимодействия MRE11-RAD50-комплекса (MR) с концами ДР и их корректное пространственное расположение друг относительно друга, тогда как в случае “открытой” конформации такое связывание белков с ДНК не является специфичным. Более того, именно в “закрытой” конформации происходит взаимодействие MR-комплекса с нибрином NBS1, С-конец которого обеспечивает связывание MRN с N-концевыми HEAT-повторами АТМ [You, Z. *et al.*, 2005]. Взаимодействие NBS1 с АТМ необходимо для последующей активации киназы, тогда как локализация АТМ на ДНК наблюдается при взаимодействии с MR-комплексом в отсутствие NBS1 [Lee, J.H. & Paull, T.T., 2005]. Поскольку гидролиз АТФ при переходе к “открытой” конформации инициирует резекцию концов ДР, таковая не должна играть роль в активации АТМ [Lee, J.H. *et al.*, 2013]. Действительно, анализ мутантной формы MRE11<sup>H129N</sup> в мышцах, не обладающей нуклеазной активностью, указывает на независимость активации АТМ от резекции концов ДР [Buis, J. *et al.*, 2008].



**Рисунок 1.19.** Модель конформационных состояний MR-комплекса. **А.** “Открытая” конформация в отсутствие АТФ, гидролиз которого необходим для нуклеазной активности MRE11, обеспечивающей резекцию концов ДР. **Б.** “Закрытая” конформация при связывании АТФ характеризуется высокой аффинностью к концевой ДНК и NBS1. Глобулярные домены А и В белка RAD50 соединены антипараллельными витками, которые взаимодействуют через последовательности цинк-связывающих доменов (цинковых “крюков”). Позиции аминокислотных остатков RAD50, взаимодействующих с АТФ, показаны звездочками. Адаптировано из [Lee, J.H. *et al.*, 2013].

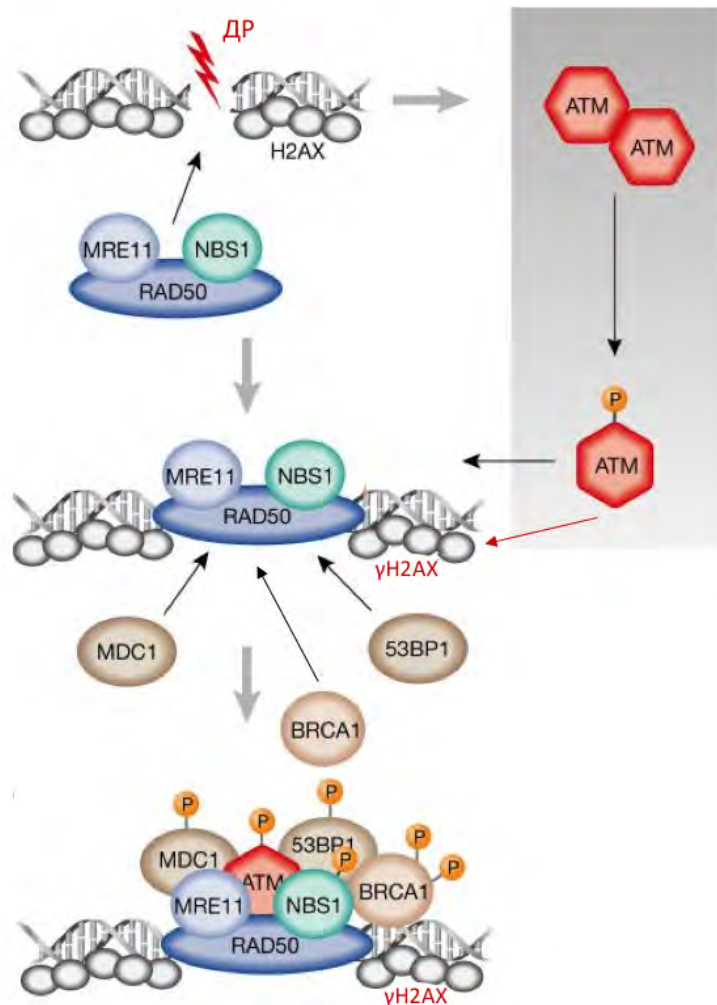
В дополнение к конформации MRN-комплекса, важными параметрами, играющими роль в активации ATM на ДР, являются структура и длина ДНК. Активация ATM происходит на “тупых” концах или коротких выступающих одноцепочечных концах ДР ДНК [Lee, J.H. & Paull, T.T., 2005]. В случае образования длинных выступающих одноцепочечных 3'-концов (более 25 нуклеотидов) наблюдается их ассоциация с RPA и последующая индукция активности ATR-киназы, при этом активность ATM ингибирована [Shiotani, B. & Zou, L., 2009]. Несмотря на то, что активность ATM индуцируется специфически ДР, существуют экспериментальные доказательства того, что для активации киназы необходима ограниченная релаксация (до 15 нуклеотидов) двуцепочечной спирали ДНК [Cannon, B. *et al.*, 2013]. Такое расплетание концов ДНК осуществляется за счет активности АТФазы RAD50, поскольку в присутствии мутантной формы RAD50<sup>S1202R</sup>, не обладающей ДНК-расплетающей активностью, активации ATM не наблюдается [Lee, J.H. & Paull, T.T., 2005]. Следует также упомянуть, что RAD50 может взаимодействовать с ATM напрямую в составе MR-комплекса [Lee, J.H. & Paull, T.T., 2004].



Таким образом, для индукции киназной активности ATM необходимо существование как минимум трех типов взаимодействий между MRN-комплексом и ATM: 1) через С-конец NBS1, 2) через RAD50 в составе MR-комплекса, а также 3) взаимодействие MRN с нерасплетенными концами ДР ДНК, совместное действие которых обеспечивает ограничение самоингибирования димерного фермента, локализацию ATM на ДНК и индукцию киназной активности.

Являясь индукторами активности ATM, компоненты MRN-комплекса также являются субстратами киназ семейства PIKK, в том числе и ATM. Например, ATM- (и ATR)-зависимое гиперфосфорилирование С-концевых SQ/TQ-сайтов MRE11 в ответ на повреждения ДНК снижает аффинность MRN-комплекса к ДНК, что потенциально играет важную роль в “выключении” систем клеточного ответа на стресс [Di Virgilio, M. *et al.*, 2009]. ATM-зависимое фосфорилирование аминокислотного остатка S635 в Rad50 регулирует активность ATM по отношению к SMC1, который важен для репарации ДНК и регуляции клеточного цикла в ответ на ее повреждения [Gatei, M. *et al.*, 2011]. Аналогичным образом, ATM-зависимое фосфорилирование NBS1 по сайтам S278 и S343 необходимо для поддержания гомеостаза теломер [Bai, Y. & Murnane, J.P., 2003] и регуляции клеточного цикла и деления через фосфорилирование CHK2 и SMC1 [Buscemi, G. *et al.*, 2001; Yazdi, P.T. *et al.*, 2002].

После первоначальной индукции киназной активности ATM в присутствии ДР происходит запуск каскада сигнальных событий клеточного ответа на повреждения ДНК, которые обеспечивают амплификацию сигнала и реализацию многочисленных клеточных функций. Такие сигнальные события следует рассматривать в контексте структуры хроматина, окружающей ДР, важнейшим из которых является ATM-зависимое фосфорилирование варианта гистона H2AX. Фосфорилирование остатка S139 H2AX ATM-киназой с образованием  $\gamma$ H2AX происходит в течение первых минут после образования ДР и быстро распространяется вдоль доменов хроматина длиной более 500 т.п.о., обрамляющих разрыв ДНК (Рисунок 1.20 А) [Rogakou, E.P. *et al.*, 1998; Savic, V. *et al.*, 2009]. ATM-зависимое фосфорилирование H2AX не влияет на фосфорилирование других субстратов ATM, таких как p53 или CHK2 [Fernandez-Capetillo, O. *et al.*, 2002], но совершенно необходимо для сборки целого ряда ферментов репарации и комплексов ремоделирования хроматина в районе повреждения ДНК [Lukas, J. *et al.*, 2011].



**Рисунок 1.20.** Схема детекции и сигнализации ДР в рамках АТМ-зависимого клеточного ответа на повреждения ДНК. В ответ на образование ДР происходит детекция повреждения МРН-комплексом и параллельная активация АТМ. Фосфорилированный АТМ-киназой H2AX ( $\gamma$ H2AX) служит платформой для сборки ферментов репарации и ремоделирования хроматина на сайте ДР. Адаптировано из [McKinnon, P.J., 2004].

Следует отметить, что первоначальная активация АТМ в присутствии ДР обеспечивает фосфорилирование H2AX в непосредственной близости от ДР. Распространение АТМ-зависимого фосфорилирования H2AX вдоль хроматина осуществляется с участием белка MDC1, который взаимодействует с обоими  $\gamma$ H2AX и АТМ, таким образом, направляя АТМ к нуклеосомам, содержащим H2AX и расположенным на удалении от ДР [Lou, Z. *et al.*, 2006; Stewart, G.S. *et al.*, 2003]. MDC1 также является субстратом АТМ: фосфорилирование MDC1 АТМ-киназой индуцирует его олигомеризацию, которая положительно регулирует распространение обоих белков вдоль хроматина [Matsuoka, S. *et al.*, 2007]. Фосфорилирование H2AX киназой АТМ в районе ДР запускает каскады последовательных реакций убиквитинилирования и сумоилирования, которые обеспечивают локализацию опухолевых

супрессоров BRCA1 и 53BP1 на сайте ДР (Рисунок 1.20 Б) [Huen, M.S. *et al.*, 2007; Kim, H. *et al.*, 2007; Mailand, N. *et al.*, 2007]. Оба белка BRCA1 и 53BP1 играют важную роль в репарации ДР путем ГР, необходимы для эффективного фосфорилирования ряда субстратов ATM и участвуют в регуляции клеточного цикла в ответ на повреждения ДНК [DiTullio, R.A., Jr. *et al.*, 2002; Fabbro, M. *et al.*, 2004; Wang, B. *et al.*, 2002]. В соответствии с вышесказанным, было показано, что ATM-зависимая сигнализация ДР особенно важна для репарации данного типа повреждений ДНК в гетерохроматине [Goodarzi, A.A. & Jeggo, P.A., 2013]. В заключение, следует отметить, что образование фокальных локусов  $\gamma$ H2AX и 53BP1 на сайтах ДР ДНК активно используется исследователями для визуализации ДР.

### 1.3.2. Активация ATM в ответ на окислительный стресс

В дополнение к активации ATM в ответ на облучение лабораторией T. Paull был предложен принципиально другой механизм активации этой киназы в условиях окислительного стресса [Guo, Z. *et al.*, 2010a; Guo, Z. *et al.*, 2010b]. В соответствии с таким механизмом активный димер ATM образуется при окислении остатков цистеина 2991 с образованием дисульфидной связи, и данный процесс не зависит от присутствия MRN-комплекса и происходит в отсутствие детектируемых ДР. Окислительная активация ATM не наблюдается в присутствии антиоксидантов, например, *N*-ацетилцистеина и восстанавливающих агентов, которые предотвращают образование дисульфидных связей (дитиотеитол и  $\beta$ -меркаптоэтанол).

Контрастируя с ДР-зависимой активацией ATM в ядре, в случае которой наблюдается локализация ATM на сайтах ДР в виде фокальных локусов (фокусов), активированная окислительным стрессом ATM равномерно распределена по всему объему ядра. В данном случае наблюдается ATM-зависимое фосфорилирование p53 и CHK2 [Guo, Z. *et al.*, 2010b]. Аналогичная локализация активированной ATM наблюдается в условиях гипоксии с фосфорилированием транскрипционного фактора KAP-1 в дополнение к вышеупомянутым субстратам [Bencokova, Z. *et al.*, 2009]. Более того, в случае целого ряда типа клеток порция ATM локализована в цитоплазме, где активность киназы важна для координации инсулинового ответа, функционирования митохондрий и пероксисом [Valentin-Vega, Y.A. *et al.*, 2012; Yang, D.Q. & Kastan, M.B., 2000; Zhang, J. *et al.*, 2015]. Относительно недавно было показано, что окислительная активация ATM может происходить в цитоплазме, и цитоплазматические

субстраты АТМ были идентифицированы с использованием методов количественной протеомики [Kozlov, S.V. *et al.*, 2016].

Таким образом, АТМ представляет собой сенсор внутриклеточного окислительно-восстановительного потенциала, активность которого регулируется в зависимости от статуса окисления дисульфидного мостика между остатками цистеина С2991; аналогичная регуляция активности ряда белков была показана ранее [Stamnaes, J. *et al.*, 2010; Wei, P.C. *et al.*, 2012].

### **1.3.3. Механизмы неканонической активации АТМ**

В последние годы вопрос эксклюзивности двунитевых разрывов ДНК и окислительного стресса в качестве индукторов активации АТМ становится все более актуальным. Новейшие экспериментальные данные указывают на значительно более широкую роль АТМ в качестве сенсора и регулятора клеточного гомеостаза в ответ на изменения структуры хроматина и цитоскелета и накопление РНК-ДНК гибридов.

ДР инициируют значительные изменения структуры хроматина, именно поэтому такие структурные изменения были названы возможным индуктором активации АТМ в ответ на ионизирующее облучение [Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B., 2003]. В пользу такой гипотезы говорят данные о роли ТІР60 в индукции активности АТМ (раздел “1.3.1. Каноническая активация АТМ”), а также важности декомпактизации хроматина в отсутствие ДР в процессе активации киназы после обработки культуры человеческих клеток гипотоническим раствором, хлорохином или ингибиторами гистон-деацетилаз, а также киРНК-нокдауна белка гетерохроматина 1 $\alpha$  [Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B., 2003; Kaidi, A. & Jackson, S.P., 2013]. Активация АТМ-киназы в ответ на декомпактизацию хроматина в условиях гипотонического стресса зависит от ее взаимодействия с белком АТМІN и является MRN-независимым процессом, тогда как в ДР-зависимой активации АТМ, индуцируемой облучением, АТМІN роли не играет [Kanu, N. & Behrens, A., 2007].

Интересным развитием данной гипотезы являются данные об активации АТR-киназы, близкого гомолога АТМ, в ответ на механический стресс, играющей роль в регуляции пластичности ядерного конверта и ассоциации с ним хроматина [Kumar, A. *et al.*, 2014]. Инкубация культур человеческих клеток в гипертоническом растворе, вызывающим осмотический шок и механический (мембранный) стресс в отсутствие ДР, при механическом

растяжении клеток и имитирующей физиологическую компрессионную нагрузку приводила к локализации ATR в ядерном конверте и индукции киназной активности. Механизм активации ATR в данном случае остается невыясненным, но независим от RPA-ассоциированной канонической активации киназы. Актуальным является вопрос, играет ли механический стресс какую-либо роль в активации ATM.

Другим неканоническим индуктором активности ATM считают TOP1сс, аддукты ДНК-топоизомеразы I с ДНК, аберрантное накопление которых наблюдалось в клетках мозга *Atm*<sup>-/-</sup> мышей и человеческих ATM-дефицитных клетках по сравнению с контролями [Katyal, S. *et al.*, 2014]. Индукцию активности ATM наблюдали после обработки нереплицирующихся (покоящихся) клеток человека и постмитотических нейронов коры головного мозга мышей ингибитором TOP1 камтотецином, который стабилизирует TOP1сс аддукты [Lin, C.P. *et al.*, 2008]. Индукция TOP1сс и самофосфорилирование ATM были обратимы в присутствии ингибиторов транскрипции DRB (5,6-дихлоро-1-β-рибофуранозилбензимидазол) и протеасомы MG-132. В соответствии с экспериментальными данными в качестве первоначального индуктора активации ATM были предложены ОР с ковалентной связью между 3'-концом разрыва и остатком тирозина активного сайта TOP1 в составе частично деградированного протеасомой пептида. Такие неканонические ОР образовывались в результате стабилизации TOP1сс аддуктов камтотецином с последующей деградацией TOP1 протеасомой, необходимой для репарации ОР. ДР-зависимая активация ATM в данном случае была исключена, поскольку детекции ДР методом ДНК-комет не наблюдалось. Было предположено, что активация ATM-киназы происходит в ответ на локальные изменения структуры хроматина в области арестованных транскрипционных комплексов [Lin, C.P. *et al.*, 2008].

В противоречие авторам [Lin, C.P. *et al.*, 2008], в нереплицирующихся первичных лимфоцитах, нейронах коры головного мозга крыс и синхронизированных культурах первичных фибробластов человека, где образование TOP1сс интермедиатов индуцировали обработкой камтотецином, было обнаружено присутствие ДР [Cristini, A. *et al.*, 2016; Sordet, O. *et al.*, 2009]. Таковое было доказано наличием фокусов, образуемых ДР-маркерами γH2AX и 53BP1, а также методом ДНК-комет в условиях нейтрального лизиса. Активация ATM и образование ДР было обратимо при обработке клеток ингибиторами транскрипции или в случае экспрессии РНКазы H1 [Sordet, O. *et al.*, 2009], которая расщепляет РНК в составе R-петель,

транскрипционных гетеродуплексов РНК и ДНК [Huertas, P. & Aguilera, A., 2003]. Ранее было показано, что R-петли могут образовываться при ингибировании активности TOP1 [Tuduri, S. *et al.*, 2009]. Соответственно была предложена гипотеза, согласно которой блокирующие транскрипцию TOP1cc приводят к образованию R-петель, которые, в свою очередь, стимулируют образование ДР с последующей активацией ATM [Sordet, O. *et al.*, 2010; Sordet, O. *et al.*, 2009]. Таким образом, обсуждается возможность непрямого (через образование ДР) участия R-петель в процессе активации ATM в соответствии с невыясненным механизмом.

Сравнительно недавно было показано, что R-петли могут процессироваться эндонуклеазами XPG и XPF в присутствии белка CSB, которые в совокупности являются частью системы эксцизионной репарации нуклеотидов, сопряженной с транскрипцией [Sollier, J. *et al.*, 2014]. Гипотеза заключается в том, что в процессе разрешения R-петель вышеупомянутые эндонуклеазы могут разрезать обе нити ДНК, приводя к образованию репликационно-независимых ДР, и логично объясняет результаты [Sordet, O. *et al.*, 2009]. С другой стороны, было показано, что прекурсорами ДР в данной ситуации являются ОР с TOP1 в составе частично деградированного пептида на 3'-конце [Cristini, A. *et al.*, 2016]. Как и ранее детальный механизм образования ДР из таких неканонических ОР остается неясным, однако теории включают возникновение близлежащего ОР на другой цепи ДНК в результате репарации другого TOP1cc аддукта, эндогенного повреждения ДНК или R-петли (разрезание одной цепи ДНК в соответствии с классическим механизмом эксцизионной репарации нуклеотидов, сопряженной с транскрипцией).

Роль R-петель в качестве первичного индуктора активности ATM была предложена в [Tresini, M. *et al.*, 2015]. Нереплицирующиеся человеческие фибробласты кожи обрабатывали УФ-излучением с образованием фото-аддуктов ДНК, которые блокировали элонгацию транскрипции РНК-полимеразой II и таким образом приводили к образованию R-петель. Индукция активности ATM была обратима при обработке клеток ингибиторами элонгации транскрипции и экспрессии РНКазы H1, но в отличие от вышеописанных результатов наблюдалась в отсутствие ДР (показано отсутствие  $\gamma$ H2AX и 53BP1 фокусов). ATM-зависимая сигнализация ингибирующих транскрипцию повреждений ДНК обеспечивала регуляцию альтернативного сплайсинга пре-мРНК. Механизм такой неканонической активации ATM в

настоящий момент неясен. Также дополнительного разъяснения требует и степень участия R-петель – прямого или опосредованного через образование ДР - в процессе активации АТМ.



**Рисунок 1.21.** Индукторы активации АТМ, из которых неканонические обозначены овалами. Стрелками со штрихом обозначены гипотетические пути индукции активности АТМ-киназы.

В заключение следует отметить, что в клетках мышинных эмбриональных фибробластов в отсутствие MRN-комплекса активированная ДНК-РКс может функционально замещать АТМ [Hartlerode, A.J. *et al.*, 2015]. В отсутствие Ku-комплекса происходила MRN-зависимая активация АТМ. В отсутствие же обоих сенсоров ДР, комплексов MRN и Ku, авторы наблюдали АТМ-зависимые фосфорилирование гистона H2AX и задержку клеточного цикла в фазе G<sub>2</sub>/M в ответ на облучение ионизирующей радиацией в соответствии с невыясненным механизмом.

Таким образом, экспериментальные результаты последних лет указывают на активацию функции АТМ в присутствии ряда неканонических индукторов (отличных от двунитевых разрывов ДНК), таких как аддукты ДНК-топоизомеразы I с ДНК, РНК-ДНК гибриды и изменения структуры хроматина (Рисунок 1.21). Несмотря на очевидный прогресс в понимании функции АТМ-киназы, вопрос о существовании некоего универсального индуктора активации АТМ (например, повреждений ДНК или изменений структуры хроматина) или же индукции активности этой киназы в ответ на ряд принципиально отличных типов стресса, а также о механизмах такой активации остается открытым.

### 1.3.4. Атаксия телеангиэктазия

Частичная или полная инактивация функции АТМ лежит в основе заболевания атаксия телеангиэктазия (Ataxia Telangiectasia, А-Т), иначе называемого синдромом Луи-Бар, что подчеркивает функциональную значимость данной киназы [Boder, E. & Sedgwick, R.P., 1958; Louis-Bar, D., 1941; Syllaba, L. & Henner, K., 1926]. А-Т является редким аутосомно-рецессивным заболеванием (1 случай на 40,000-100,000; [Su, Y. & Swift, M., 2000; Swift, M. *et al.*, 1986]) с мультисистемными проявлениями, которое развивается в раннем детстве. В соответствии с функцией АТМ в координации клеточного ответа на ДР А-Т характеризуется иммунодефицитом, восприимчивостью к воздействию ионизирующего излучения (радиочувствительностью) и других повреждающих ДНК агентов и повышенной предрасположенностью к развитию онкологических заболеваний [Boder, E. & Sedgwick, R.P., 1970; Epstein, W.L. *et al.*, 1966]. В дополнение к вышеперечисленному пациенты с А-Т страдают от прогрессивной нейродегенерации, включающей атрофию спинного мозга, мозжечка и ствола головного мозга с потерей в основном клеток Пуркинье, гранульных нейронов и клеток молекулярного слоя [Aguilar, M.J. *et al.*, 1968; Paula-Barbosa, M.M. *et al.*, 1983; Vinters, H.V. *et al.*, 1985], а также атаксии, причины которой в настоящий момент неясны. Следует отметить, что эффективного лечения А-Т в настоящее время не существует [Teive, H.A. *et al.*, 2015].

Нейродегенеративная этиология А-Т по-прежнему не имеет четкого объяснения и скорее всего мультисистемна в соответствии с многообразием функций АТМ. Прогресс в понимании молекулярных причин А-Т до недавнего времени был ограничен в связи с отсутствием подходящей животной модели заболевания: прогрессивная нейродегенерация у *Atm*<sup>-/-</sup> мышей проявляется в значительно меньшей степени по сравнению с человеком [Barlow, C. *et al.*, 1996; Barlow, C. *et al.*, 2000; Borghesani, P.R. *et al.*, 2000]. Интересно то, что неярко выраженный нейродегенеративный фенотип *Atm*<sup>-/-</sup> мышей удалось частично компенсировать в присутствии антиоксидантов, указывая на роль окислительного стресса в нейродегенерации [Chen, P. *et al.*, 2003; Reliene, R. & Schiestl, R.H., 2007]. Повышенный окислительный стресс также наблюдался в клетках пациентов с А-Т [Reichenbach, J. *et al.*, 2002; Rybczynska, M. *et al.*, 1996]. Следует упомянуть, что повышенного количества R-петель не было обнаружено в тканях мозга *Atm*<sup>-/-</sup> мышей, отвергая роль таких гетеродуплексов в этиологии заболевания [Yeo, A.J. *et al.*, 2014]. Нейродегенеративная патология А-Т также может быть связана с отсутствием АТМ-зависимой



элиминации клеток, содержащих нерепарированные ДР, в процессе развития нервной системы [Orii, K.E. *et al.*, 2006]. Совсем недавно были описаны чрезвычайно многообещающие для понимания этиологии атаксии телеангиэктазии модели данного заболевания у свиньи и крысы. *ATM*<sup>-/-</sup> свиньи характеризовались потерей клеток Пуркинье в мозжечке с соответствующей задержкой роста и нарушениями двигательного аппарата, причем подобные патологические изменения наблюдались в процессе развития и имели прогрессивную компоненту [Beraldi, R. *et al.*, 2015]. У *Atm*<sup>-/-</sup> крыс существенной дегенерации мозжечка или других отделов мозга обнаружено не было, но ярко проявлялись паралич и атрофия спинного мозга с потерей моторных нейронов, связанной с избыточной активацией микроглиальных клеток в отсутствие АТМ [Quek, H. *et al.*, 2016a; 2016b]. Соответственно, противовоспалительный препарат бетаметазон обеспечивал почти 2-кратное увеличение средней продолжительности жизни и задержку развития патологии у *Atm*<sup>-/-</sup> крыс [Quek, H. *et al.*, 2016a].

#### 1.4. Регуляция эффективности ЭРО и ОР-репарации

Эффективность систем ЭРО и ОР-репарации, а также любых других систем репарации определяется балансом между числом повреждений ДНК и количественным содержанием и/или активностью соответствующих ферментов репарации в каждый конкретный момент времени. Действительно, мутации, негативно влияющие на эффективную концентрацию и/или активность таких ферментов, например, *POL β* приводят к мутагенезу и снижают выживаемость клеток при их обработке вызывающими повреждения ДНК агентами за счет неполной и несвоевременной репарации [Cabelof, D.C. *et al.*, 2003; Lang, T. *et al.*, 2004]. Более того, полное отсутствие генов *XRCC1*, *LIG IIIa* и *POL β* у мышей (нокаут) приводит к гибели эмбрионов [Gao, Y. *et al.*, 2011; Sobol, R.W. *et al.*, 1996; Tebbs, R.S. *et al.*, 2003]. С другой стороны, избыток той же *POL β* приводит к повышенной скорости возникновения мутаций и, как следствие, развитию раковых заболеваний, что в значительной степени связано с низкой точностью данной ДНК-полимеразы и избыточного комплексообразования с другими белками (например, p53), нормальная функция которых таким образом нарушается [Albertella, M.R. *et al.*, 2005]. Аналогичным образом нестабильность генома наблюдается в случае экспрессии избыточного количества *APB1*, что приводит к “перегрузке” клеточных систем репарации за счет

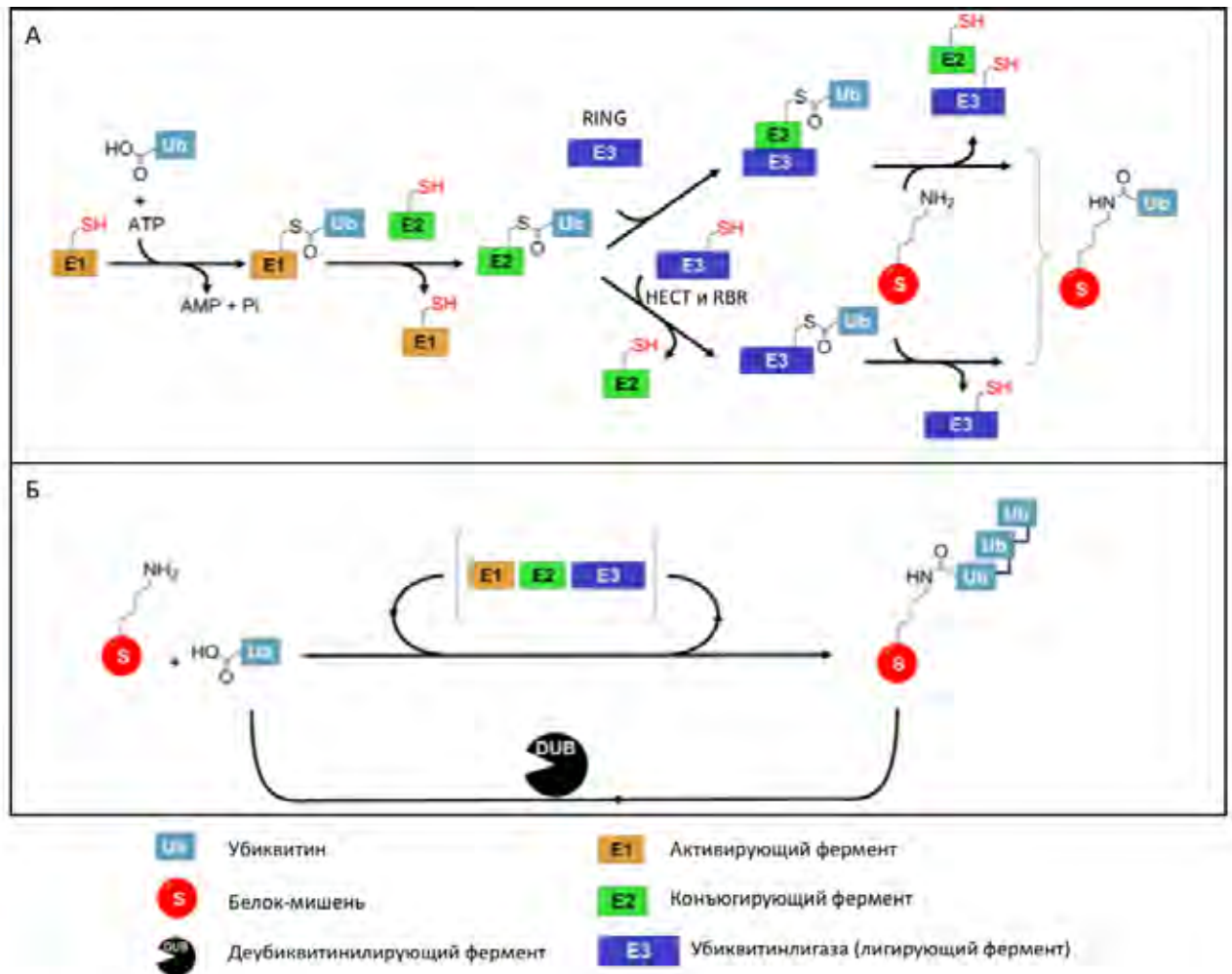
образования повышенного по сравнению с эндогенным уровнем числа ОР и последующего накопления репликационных ДР [Poletto, M. *et al.*, 2016].

Поскольку клеточный уровень повреждений ДНК представляет собой комбинацию возникающих в силу химической нестабильности ДНК и метаболической активности клетки эндогенных и индуцируемых внешними факторами экзогенных повреждений, эффективность ЭРО и ОР-репарации регулируется в соответствии с уровнем повреждений ДНК. Такая регуляция осуществляется путем контроля клеточной ядерной концентрации основных белковых компонентов ЭРО и репарации ОР, таких как XRCC1-LIG III $\alpha$  и POL  $\beta$ , через процессы убиквитинилирования и деубиквитинилирования [Parsons, J.L. *et al.*, 2011; Parsons, J.L. *et al.*, 2008; Parsons, J.L. *et al.*, 2009].

#### **1.4.1. Система убиквитинилирования**

Убиквитинилирование представляет собой посттрансляционную ковалентную модификацию белков, являющуюся сигналом для протеасомной деградации белков, регуляции клеточного цикла, репарации ДНК и везикулярного транспорта [Nakayama, K.I. & Nakayama, K., 2006]. Процесс убиквитинилирования заключается в образовании ковалентной связи между С-концевым остатком G67 небольшого полипептида убиквитина (Ub), состоящего из 76 аминокислот и с молекулярной массой порядка 8 кДа, и  $\epsilon$ -аминогруппой аминокислотного остатка лизина белка-мишени, в роли которого может выступать и сам убиквитин, и катализируется тремя ферментативными каскадами (Рисунок 1.22 А). На первом этапе процесса происходит АТР-зависимая активация Ub с участием остатка цистеина активного центра активирующего фермента E1 при образовании промежуточного тиоэфира Ub-E1. Затем активированный убиквитин переносится на остаток цистеина активного центра конъюгирующего фермента E2 с образованием нового тиоэфира Ub-E2. Наконец, на последней стадии осуществляется присоединение Ub к белковому субстрату посредством лигирующей активности убиквитинлигазы E3. E3-убиквитинлигазы семейства RING взаимодействуют с обоими тиоэфиром Ub-E2 и белком-мишенью с образованием комплекса Ub-E2-E3, тогда как в случае E3-семейств HECT и RBR наблюдается промежуточная стадия переноса Ub на каталитически активный остаток цистеина убиквитинлигазы (Рисунок 1.22 А). Специфичность

реакции убиквитинилирования в наибольшей степени определяется комбинацией ферментов E2 и E3, вовлеченных в процесс.



**Рисунок 1.22.** Схема процессов убиквитинилирования и деубиквитинилирования. **А.** Ферментативный каскад убиквитинилирования начинается с активации убиквитина (Ub) через образование тиоэфира, катализируемого активирующим ферментом E1, с последующим переносом на конъюгирующий фермент E2 и затем на белок-мишень при действии убиквитинлигазы E3. **Б.** Удаление Ub из белка-мишени осуществляется деубиквитинилирующими ферментами. Адаптировано из [Nameed, D.S. *et al.*, 2016].

В настоящее время описано несколько вариантов убиквитинилирования белков-мишеней, включающих моноубиквитинилирование, мульти-моноубиквитинилирование (одновременное моноубиквитинилирование нескольких остатков белка-мишени) и полиубиквитинилирование [Komander, D. & Rape, M., 2012]. В молекуле убиквитина имеется 8 позиций (остатки лизина в позициях 6, 11, 27, 29, 33, 48 и 63 и N-концевой остаток метионина), по которым может происходить присоединение молекул убиквитина с образованием прямых и разветвленных цепей полиубиквитина. Клеточные последствия убиквитинилирования напрямую зависят от варианта модификации, положения модифицированного остатка и типа

цепи в случае полиубиквитина [Akutsu, M. *et al.*, 2016]. В общем случае полиубиквитинилированные через остаток K48 белки распознаются протеасомой 26S с последующей протеолитической деградацией.

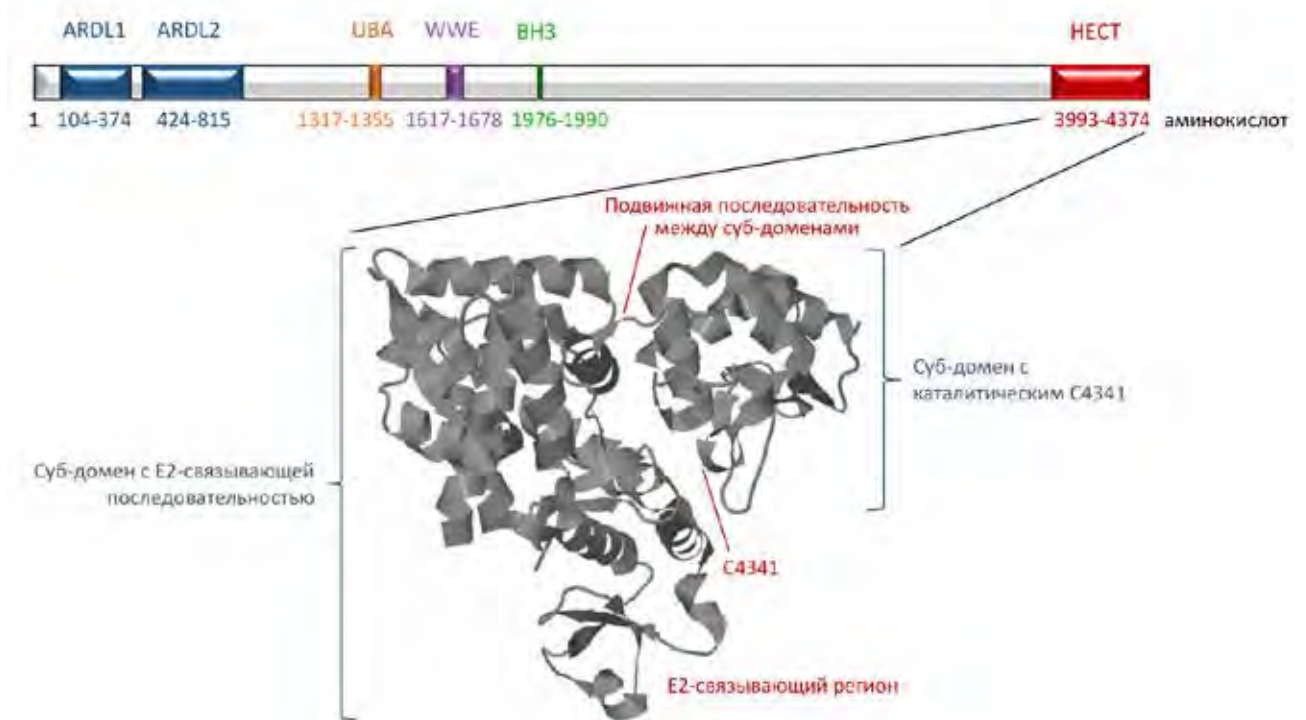
Обратный убиквитинилированию процесс деубиквитинилирования или удаления убиквитина с убиквитинилированных белков-мишеней катализируется классом деубиквитинилирующих ферментов, из которых семейство убиквитин-специфических протеаз (USP) имеет наибольшее значение для данного исследования (Рисунок 1.22 Б) [Komander, D. *et al.*, 2009]. В настоящее время в человеческом геноме охарактеризовано более 90 деубиквитинилирующих ферментов.

#### **1.4.2. E3-убиквитинлигаза MULE и p53-зависимый ответ на повреждения ДНК**

Одним из важных представителей класса E3-убиквитинлигаз семейства HECT является белок MULE, также называемый ARF-BP1, UREB1, HectH9, LASU1 и HUWE1, состоящий из 4374 аминокислот с молекулярной массой 482 кДа [Chen, D. *et al.*, 2005]. Члены данного семейства характеризуются наличием высококонсервативного C-концевого домена HECT, который содержит консервативный остаток цистеина, образующий тиоэфир с E2-активированной молекулой убиквитина [Huibregtse, J.M. *et al.*, 1995; Scheffner, M. *et al.*, 1995]. HECT-домен MULE, в свою очередь, состоит из двух суб-доменов, один из которых содержит необходимый для катализа остаток C4341 активного центра, тогда как другой включает последовательность для взаимодействия с конъюгирующим ферментом E2 (Рисунок 1.23). Суб-домены соединены последовательностью, обеспечивающей конформационную подвижность белковой глобулы, необходимую для переноса молекулы убиквитина на белок-мишень [Pandya, R.K. *et al.*, 2010]. В дополнение к HECT, MULE содержит убиквитин-связывающий домен UBA, домен WWE для белок-белковых взаимодействий, WH3 домен для взаимодействий с про- и анти-апоптотическими членами семейства BCL-2 и два N-концевых Армадилло повтора ARDL1 и ARDL2 неизвестной функции [Aravind, L., 2001; Mueller, T.D. & Feigon, J., 2002; Zhong, Q. *et al.*, 2005].

В соответствии с размером белка и сложной доменной организацией, MULE регулирует стабильность многочисленных белков-мишеней, играя важную роль в процессах клеточной пролиферации, репарации и репликации ДНК, межклеточных взаимодействий, эмбрионального

развития и других. К субстратам MULE относятся вышеупомянутые опухолевые супрессоры p14ARF (далее ARF) и p53 [Chen, D. *et al.*, 2005], POL  $\beta$  [Parsons, J.L. *et al.*, 2009] и POL  $\lambda$  [Markkanen, E. *et al.*, 2011], анти-апоптотический белок MCL-1 [Zhong, Q. *et al.*, 2005], онкогены c-MYC и N-MYC и взаимодействующий с ними транскрипционный фактор MIZ1 [Adhikary, S. *et al.*, 2005; Yang, Y. *et al.*, 2010; Zhao, X. *et al.*, 2008], компонент пре-репликационных комплексов CDC6 [Hall, J.R. *et al.*, 2007], TOP2-связывающий белок TOPBP1 [Herold, S. *et al.*, 2008], гистоны, в том числе H2AX [Atsumi, Y. *et al.*, 2015; Liu, Z. *et al.*, 2005], ядерный антиген пролиферирующих клеток PCNA [Choe, K.N. *et al.*, 2016] и другие.



**Рисунок 1.23.** Доменная и 3D-структура E3-убиквитинлигазы MULE (PDB идентификатор 3H1D [Pandya, R.K. *et al.*, 2010]).

В контексте данной работы заслуживающим отдельного описания субстратом MULE является супрессор опухолевого роста p53. Многофункциональный белок p53 играет важную роль в регуляции судьбы клеток путем контроля различных аспектов клеточного ответа на повреждения ДНК, включая репарацию ДНК, регуляцию клеточного цикла, апоптоза и сенсценс, а также клеточного метаболизма, ангиогенеза, иммунного ответа, клеточной дифференциации и межклеточных взаимодействий [Levine, A.J. & Oren, M., 2009]. В эндогенных условиях содержание и соответственно активность p53 поддерживаются на относительно невысоком уровне за счет баланса процессов его убиквитинилирования и

последующей протеасомной деградации, обеспечиваемых целым рядом E3-убиквитинлигаз, включающих Mdm2 (HDM2 у человека), MULE, E6-AP/E6, COP1, Pirh2, Topors и CHIP, из которых HDM2 является основной, и деубиквитинилирования за счет взаимодействия с деубиквитин-протеазой USP7 и белками-адапторами DAXX и HDM4 (для обзора смотри [Meek, D.W., 2009]). При повышении уровня повреждений ДНК наблюдается ATM- и ATR-зависимая стабилизация белка и соответствующая индукция транскрипционной активности p53 через ряд транскрипционных, посттранскрипционных и посттрансляционных механизмов. Одним из таких механизмов является ARF-зависимое ингибирование активности HDM2 [Honda, R. & Yasuda, H., 1999]. Эндогенный уровень экспрессии супрессора опухолевого роста ARF (иначе называемого p14ARF у человека или p19ARF у мыши), который кодируется альтернативной рамкой считывания локуса *CDKN2A*, как и в случае p53, поддерживается на относительно невысоком уровне. При активной пролиферации клеток наблюдается повышенная экспрессия белка ARF, который ингибирует E3-убиквитинлигирующую активность HDM2 с последующим накоплением p53. Следует отметить, что ARF был позже идентифицирован как основной белок, взаимодействующий с MULE (отсюда и альтернативное имя ARF-BP1 или ARF-взаимодействующий белок 1), и ингибитор активности последнего [Chen, D. *et al.*, 2005].

В настоящий момент идентифицированы десятки и сотни генов-мишеней p53, многие из которых кодируют белки, вовлеченные в регуляцию клеточного цикла и апоптоза в соответствии с функцией p53 в качестве супрессора опухолевого роста, а также различных микроРНК [Menendez, D. *et al.*, 2009]. В качестве примера генов, напрямую регулируемых транскрипционной активностью p53, следует привести регулирующий клеточный цикл ингибитор циклин-зависимых киназ *p21/WAF1* (далее *p21*) и про-апоптотический *BAX* [el-Deiry, W.S. *et al.*, 1993; Miyashita, T. & Reed, J.C., 1995]. С другой стороны, p53-зависимый ответ на повреждения ДНК регулируется, по крайней мере в некоторой степени, E3-убиквитинлигазой MULE.

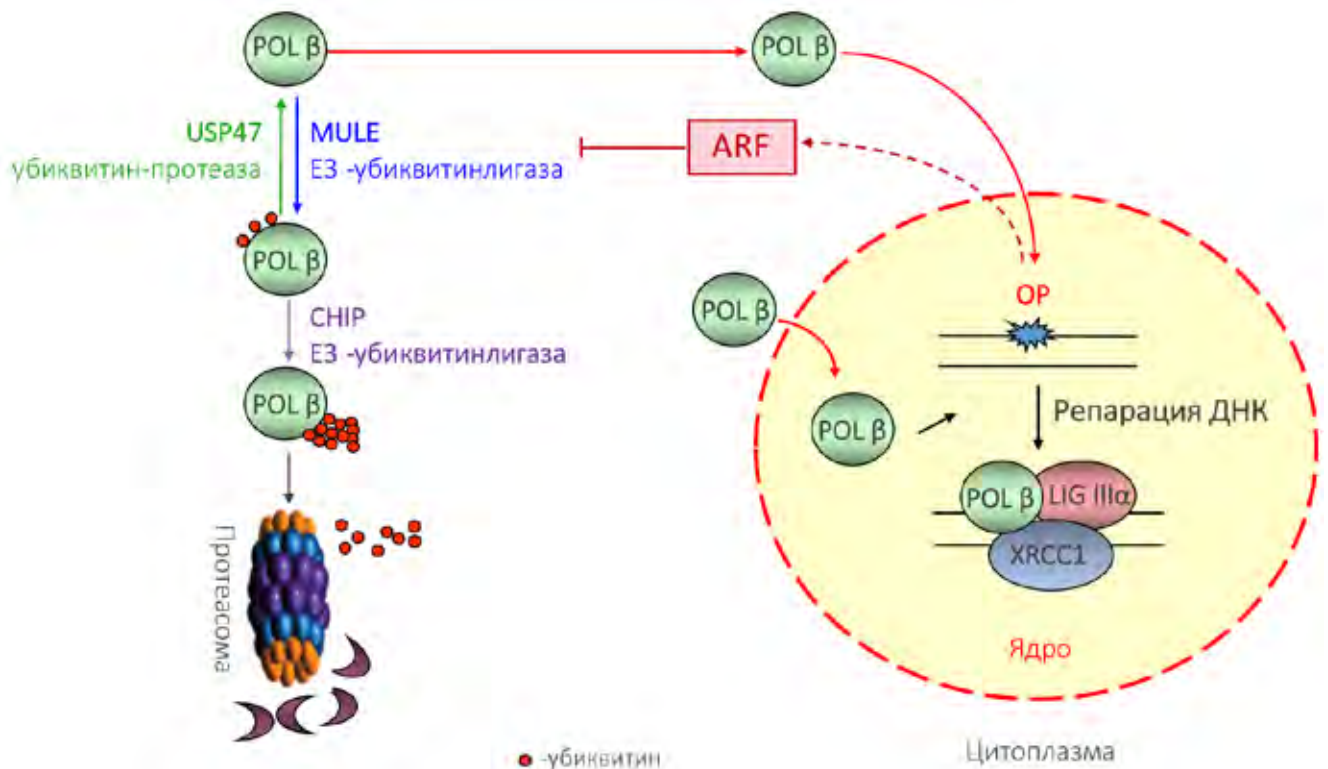
### 1.4.3. MULE-зависимая регуляция ЭРО и репарации ОР

Вышеописанные процессы убиквитинилирования и деубиквитинилирования используются клеткой для регуляции стационарного уровня содержания белков репарации XRCC1-LIG III $\alpha$  и POL  $\beta$  в соответствии со степенью повреждений ДНК. Белки, активно

участвующие в репарации ДНК стабилизируются путем деубиквитинилирования и ограничивающего протеасомную деградацию фосфорилирования, тогда как избыток ферментов репарации подвергается полиубиквитинилированию. Одним из примеров является SHIP-зависимое убиквитинилирование комплекса XRCC1-LIG III $\alpha$  [Parsons, J.L. *et al.*, 2008]. Более того, моноубиквитинилирование POL  $\beta$  при действии E3-убиквитинлигазы MULE с последующим SHIP-зависимым полиубиквитинилированием обеспечивает деградацию излишка новосинтезированного фермента, не вовлеченного в репарацию ДНК [Parsons, J.L. *et al.*, 2009]. В ситуации, когда эффективная ядерная концентрация POL  $\beta$ , которая является лимитирующим фактором ЭРО и ОР-репарации [Parsons, J.L. *et al.*, 2005c], недостаточна для своевременной и эффективной репарации ДНК, предметом негативной регуляции становится активность MULE, ингибитором которой, как и в случае HDM2, является ARF [Chen, D. *et al.*, 2005]. Нами было показано, что в случае долговременного существования нерепарированных повреждений ДНК количество мРНК *ARF* возрастает, приводя к накоплению активного белка в цитоплазме и последующему ингибированию E3-убиквитинлигирующей активности MULE [Orlando, G. *et al.*, 2014]. В результате большее количество POL  $\beta$  избегает протеасомной деградации и релокализуется в ядро, обеспечивая необходимую интенсификацию репарации ДНК (Рисунок 1.24). В дополнение, нами было показано, что MULE- и SHIP-зависимому убиквитинилированию POL  $\beta$  противостоит ее деубиквитинилирование, катализируемое убиквитин-специфической протеазой USP47, которое обеспечивает дополнительный источник немодифицированной POL  $\beta$  для ее ядерной релокализации [Parsons, J.L. *et al.*, 2011]. Интенсификация репарации ДНК в ответ на ингибирование MULE и накопление репарационных ферментов в ядре приводит к снижению уровня нерепарированных повреждений ДНК, пониженному накоплению ARF в цитоплазме, активации MULE и убиквитин-зависимой деградации ферментов репарации, таким образом замыкая цикл регуляции стационарного уровня содержания ферментов ЭРО и ОР-репарации в зависимости от динамических условий среды.

Таким образом, клеточный пул ферментов ЭРО и ОР-репарации состоит из 1) новосинтезированных ферментов, локализованных в цитоплазме, 2) ферментов, находящихся в ядре, но не ассоциированных с хроматином, и 3) ассоциированных с хроматином ферментов, участвующих в репарации ДНК. Как описано выше, соотношение различных фракций

ферментов общеклеточного пула регулируется системой убиквитинилирования, в частности, через протеасом-зависимую деградацию излишка ферментов репарации в цитоплазме с участием E3-убиквитинлигаз MULE и CHIP, которой противостоит USP47-зависимое деубиквитинилирование. Регуляция активности MULE осуществляется белком ARF в зависимости от эффективного уровня повреждений ДНК в случае долговременного существования нерепарированных повреждений ДНК (Рисунок 1.24).



**Рисунок 1.24.** Схема регуляции эффективных уровней содержания белков ЭРО и ОР-репарации в стационарном состоянии и в ответ хронический генотоксический стресс с участием системы убиквитинилирования (в качестве примера рассматривается POL β).

В дополнение к прямой регуляции содержания ферментов репарации в клетке, эффективность ЭРО и ОР-репарации может потенциально регулироваться через длительность фазы клеточного цикла  $G_1$ . В дополнение к стабилизации POL β ARF-зависимое ингибирование активности MULE в ответ на повреждения ДНК должно приводить к предотвращению, по крайней мере частично, протеасомной деградации p53 и стабилизации белка. Одной из функций p53-зависимого ответа на повреждения ДНК является пропорциональная уровню нерепарированных повреждений задержка клеточного цикла в фазе  $G_1$  или, иными словами, задержка инициации репликации ДНК [Baker, S.J. *et al.*, 1990; Mercer, W.E. *et al.*, 1990;



Michalovitz, D. *et al.*, 1990]. В контексте ЭРО и репарации ОР подобная G<sub>1</sub>-задержка должна обеспечивать повышенное количество последовательных циклов репарации в фазе G<sub>1</sub> и, соответственно, бóльшую эффективность прerreпликационной репарации ДНК. Следует отметить, что, несмотря на логичность данного предположения, экспериментального подтверждения данной гипотезы до настоящей работы представлено не было.

Следует также отметить, что в клетках нормального происхождения, содержащих p53 дикого типа, амплитуда положительной регуляции мРНК *ARF* и, соответственно, *ARF*-зависимой регуляции эффективности ЭРО и ОР-репарации в ответ на нерепарированные разрывы ДНК чрезвычайно невелика [Orlando, G. *et al.*, 2014]. Это в значительной степени связано с существованием p53-зависимой отрицательной системы регуляции транскрипции *ARF*, которая необходима для ограничения накопления p53 и регуляции выбора между лицензированием репликации ДНК и апоптозом [Robertson, K.D. & Jones, P.A., 1998]. Другим важным моментом является то, что *ARF*-зависимая регуляция активности MULE наблюдается только в случае долговременного присутствия нерепарированных разрывов ДНК в клетках и не детектируется при кратковременном увеличении количества повреждений ДНК в случае обработки клеток повреждающими ДНК агентами [Orlando, G. *et al.*, 2014]. Это, несомненно, связано с высокой эффективностью систем репарации повреждений оснований и одноцепочечных разрывов ДНК. С другой стороны, вполне возможно, что *ARF*-зависимая система регуляции эффективности ЭРО и ОР-репарации является одной из последних линий клеточной защиты от раковой трансформации клеток. Наконец, в клетках, не содержащих функционального *ARF*, наблюдается стабилизация p53 в ответ на облучение ионизирующей радиацией и повышенная по сравнению со стационарной (то есть в отсутствие экзогенных повреждений) эффективность репарации ДНК [Kamijo, T. *et al.*, 1999]. В совокупности данные наблюдения однозначно указывают на существование дополнительного или, скорее, основного механизма, регулирующего стабильность и/или активность ферментов ЭРО и репарации ОР в зависимости от количества нерепарированных повреждений ДНК и не зависящего от *ARF* или *ARF*-зависимой регуляции активности MULE. Таким образом, целью данной работы является идентификация и детальное исследование механизмов регуляции эффективности ЭРО и ОР-репарации и соответствующих систем клеточного ответа на повреждения ДНК, обеспечивающих передачу сигнала от поврежденной ДНК к системам ее репарации.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Материалы

Все реактивы, использованные для манипуляций с культурами клеток насекомых и человека, имели качество Cell Culture Grade. В экспериментах использовали компоненты сред для культивирования и трипсин фирмы Gibco (США), диметилсульфоксид (ДМСО) и трипановый синий (Sigma, США), реактивы для рутинной экспрессии плазмидной ДНК и кРНК клетках человека (Invitrogen, Великобритания), хлориды натрия и калия, гидрофосфат натрия, дигидрофосфат калия, ингибитор трансляции циклогексимид и реактивы, вызывающие повреждения ДНК, такие как пероксид водорода, метилметансульфонат (ММС), этопозид и камптотecin (Sigma, США). Эксперименты проводились в строго асептических условиях в ламинар-боксе с использованием стерильной посуды и пластика; растворы стерилизовали фильтрацией через мембранный фильтр с размером пор 0,22 мкм.

Культивирование клеток *E.coli* проводили на модифицированной среде LB [Bertani, G., 1951], содержащей 5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л бактотриптона и 10 г/л хлорида натрия, рН 7,5. Для клонирования и рекомбинации фрагментов ДНК, амплификации плазмидной ДНК и экспрессии рекомбинантных белков использовали следующие штаммы бактерий *E.coli*:

*E.coli* DH5 $\alpha$ : F<sup>-</sup> *endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20*  $\phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169, *hsdR17*(*r<sub>K</sub><sup>-</sup>m<sub>K</sub><sup>+</sup>*),  $\lambda$ <sup>-</sup>

*E.coli* DH10Bac: F-*mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74 recA1 endA1 araD139*  $\Delta$ (*ara, leu*)7697 *galU galK*  $\lambda$ -*rpsL nupG*/pMON14272/pMON7124

*E.coli* BL21(DE3) pLysS Codon Plus: B F<sup>-</sup> *ompT hsdS*(*r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>*) *dcm*<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> *gal*  $\lambda$ (DE3) *endA* Hte [pLysS *argU ileY leuW* Cam<sup>r</sup>].

Все реактивы, использованные для генной инженерии, манипуляций с клеточными экстрактами, очистки ферментов и *in vitro* реакций имели качество Molecular Biology Grade и чистоту не менее 99,5%. В экспериментах применяли трис(гидроксиметил)аминометан (Трис), натриевую соль 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин этансульфоновой кислоты (ХЕПЕС), хлориды кальция и магния (Merck, Швейцария), агарозу с низкой и нормальной точками плавления, лизоцим, изопропил- $\beta$ -D-тиогалактозид (ИПТГ), аденозинтрифосфат (АТФ), сахарозу, глюкозу,

канамицин, ампициллин и хлорамфеникол (Acros Organics, Бельгия), уксусную кислоту, метиловый, этиловый и изо-пропиловый спирт, бактотриптон, дрожжевой экстракт, агар, динатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), этиленгликоль бис( $\beta$ -аминоэтильный эфир)-N,N,N',N''-тетрауксусной кислоты (ЭГТА), гидроксиды калия и натрия, глицерин, Тритон X-100, нонидет P40, дитиотреитол (ДТТ) и  $\beta$ -меркаптоэтанол (Fisher, Великобритания), Твин-20, сульфат магния, параформальдегид, бычий сывороточный альбумин (БСА) и имидазол (Sigma, США). Все реактивы, использованные для электрофореза белков и олигонуклеотидов, произведены фирмой Bio-Rad (США).

Для клонирования, модификации концов и направленного мутагенеза фрагментов ДНК использовали эндонуклеазы рестрикции, ДНК-полимеразу, полинуклеотидкиназу и ДНК-полимеразу фага T4, *Taq* ДНК-полимеразу (New England Biolabs, США) и Platinum® *Pfx* ДНК-полимеразу (Invitrogen, Великобритания). Для синтеза первой цепи кДНК на РНК-матрице использовали обратную транскриптазу SuperScript II, рибонуклеазу H, ингибитор рибонуклеаз панкреатического типа и олиго-dT-праймеры (все Invitrogen, Великобритания). Олигонуклеотиды для проведения полимеразной цепной реакции и секвенирования, а также олигонуклеотиды с модификациями концов для использования в качестве субстратов в *in vitro* реакциях были синтезированы фирмой Eurogentec (Бельгия). Для ингибирования активности протеаз, фосфатаз, киназ и поли(АДФ-рибоза)-полимеразы использовали реагенты Sigma (США) и Tocris Bioscience (Великобритания).

Измерения pH растворов проводили при температуре 25 °C на pH-метре HI-2213-02 (Hanna Instruments Ltd, Великобритания). В экспериментах использовали воду, очищенную на установке MilliQ (Millipore, США).

### 2.1.1. Плазмиды

Плазмиды, использованные в данной работе для избыточной экспрессии белков, клонирования рекомбинантной ДНК и направленного мутагенеза генов, приведены в Таблице 2.1.

Название	Ген	Описание	Литература
pCHDM1A HDM2	<i>HDM2</i>	Экспрессия в клетках животных, CMV-промотор	[Chen, J. <i>et al.</i> , 1995]
pGex MULEhect	<i>MULE</i>	Экспрессия в клетках <i>E.coli</i> , С-концевой GST-эпитоп, содержащий НЕСТ-домен	[Adhikary, S. <i>et al.</i> , 2005]
pCMVHA MULEhect	<i>MULE</i>	Экспрессия в клетках животных, CMV-промотор, С-концевой HA-эпитоп, содержащий НЕСТ-домен	[Adhikary, S. <i>et al.</i> , 2005]
pRc/CMV p53	<i>p53</i>	Экспрессия в клетках животных, CMV-промотор	[Lin, J. <i>et al.</i> , 1994]
pCMV6-XL5 PPM1G	<i>PPM1G</i>	Экспрессия в клетках животных, CMV-промотор	Origene, США
eYFP hPPM1G	<i>PPM1G</i>	Экспрессия в клетках животных, CMV-промотор, N-концевой eYFP-химерный белок	[Petri, S. <i>et al.</i> , 2007]
pCl-neo HAUSP	<i>USP7</i>	Экспрессия в клетках животных, CMV-промотор, N-концевой Flag-эпитоп	[Cummins, J.M. <i>et al.</i> , 2004]
pNIC28-Bsa4	-	Экспрессия в клетках <i>E.coli</i> , вектор модифицирован для безлигазного клонирования	[Savitsky, P. <i>et al.</i> , 2010]
pFB-LIC-Bse	-	Вектор для переноса генов в бакмидную ДНК, модифицирован для безлигазного клонирования	[Savitsky, P. <i>et al.</i> , 2010]
pCMV-3Tag3a	-	Экспрессия в клетках животных, CMV-промотор, С-концевой 3x Flag-эпитоп	Agilent Technologies, США

**Таблица 2.1.** Плазмиды, использованные в данной работе.

## 2.2. Клеточные линии человека

### 2.2.1. Условия культивирования

Для культивирования клеточных линий человека в монослое использовали среду Игла модифицированную по Дальбеко (DMEM, [Dulbesso, R. & Freeman, G., 1959]), содержащую GlutaMAX™-I в качестве источника глутамина, 1 г/л глюкозы и 10-15 % бычьей эмбриональной сыворотки (FBS) в зависимости от клеточной линии. Культуры нормальных первичных фибробластов человека TIG-1 (AG06173), GM02052 (пациент с А-Т), GM03489 и

GM03487 (здоровая мать и ребенок с А-Т, соответственно; А-Т семья 516), ATLD-2 (пациент с мутацией в *MRE11*, [Stewart, G.S. *et al.*, 1999]) растили на среде DMEM с добавлением 15 % FBS (за исключением ATLD-2 все культуры были предоставлены хранилищем Coriell Institute Cell Repository, США). Раковые клеточные линии человека HeLa (аденокарцинома шейки матки), HCT116 p53<sup>+/+</sup> (карцинома кишечника) и U-2 OS (остеосаркома) культивировали в DMEM с добавлением 10 % FBS (все ATCC, США). Для поддержания жизнеспособных культур клетки рассеивали по достижении плотности монослоя 80-90 % с использованием раствора, содержащего 0,025 об% трипсина и 0,01 % ЭДТА, при концентрации 1 500-2 000 клеток/см<sup>2</sup>. Подсчет клеток проводили с использованием камеры Горяева. При каждом рассеве проводили оценку жизнеспособности клеток с использованием трипанового синего (для экспериментов использовали культуры в логарифмической фазе роста с коэффициентом жизнеспособности не менее 97 %). Культивирование всех клеточных линий осуществляли в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Thermoscientific, США) в присутствии 5 % CO<sub>2</sub> при минимальной влажности 95 % и температуре 37 °C.

### 2.2.2. Трансфекция клеток человека

Для избыточной экспрессии белков клетки человека растили в течение 24 ч до плотности 80-90 % и обрабатывали катионно-липидным реагентом для трансфекции Lipofectamine 2000 в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen, Великобритания) в присутствии 17-200 нМ плазмидной ДНК. В качестве контроля использовали ДНК экспрессионного вектора, примененного для трансфекции, не кодирующего гена белка. Трансфекцию проводили в течение 24-48 ч.

Временную трансфекцию короткими интерферирующими РНК (киРНК) проводили при плотности клеток 30-40 % с использованием Lipofectamine RNAiMax в соответствии с инструкциями производителя (Invitrogen, Великобритания) в присутствии 33-50 нМ киРНК. В качестве контроля использовали уникальную последовательность киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома. Трансфекцию киРНК рутинно проводили в течение 60 ч, тогда как временная зависимость эффективности трансфекции изучалась в интервале времени 24-72 ч.

Для достижения высокой эффективности нокдауна *HDM2* клетки инкубировали с дуплексами кнРНК и Lipofectamine RNAiMax в среде для трансфекции в течение 8 ч, меняли среду для культивирования на свежую и повторяли трансфекцию с кнРНК против *HDM2* в районе 36 ч после первичной трансфекции.

Последовательности кнРНК, использованные в данной работе для нокдауна генов человека, приведены в Таблице 2.2.

Название	Последовательность кнРНК	Литература
контр	5'- AGGUAGUGUAAUCGCCUUGdTdT -3'	Дизайн Eurofins, Finland
ATM	5'- AACAUACUACUCAAGACAUdTdT -3'	[Andreassen, P.R. <i>et al.</i> , 2004]
CK2 $\alpha$	5'- GAUGACUACCAGCUGGUUCdTdT -3'	[Zhang, Y. <i>et al.</i> , 2007]
CK2 $\alpha'$	5'- AAAGCUGCGACUGAUAGAUUGdTdT -3'	[Luo, H. <i>et al.</i> , 2004]
GFP	5'- GCUGACCCUGAAGUUCAUCUdTdT -3'	Свой дизайн
HDM2	5'- AAGCCAUUGCUUUUGAAGUAdTdT -3'	[Jin, Y. <i>et al.</i> , 2003]
MPG	5'- AAGAAGCAGCGACCAGCUAGAdTdT -3'	[Strom, C.E. <i>et al.</i> , 2011]
MPG#2	5'- ACCGCAGCAUCUAUUUCUCAAdTdT -3'	[Ensminger, M. <i>et al.</i> , 2014]
MPG#3	5'- CCUGUACGUGUACAUCAUUUAdTdT -3'	[Ensminger, M. <i>et al.</i> , 2014]
MRE11	5'- GAGCAUAACUCCAUAAGUAdTdT -3'	[Kaidi, A. & Jackson, S.P.,
MULE	5'- AAUUGCUAUGUCUCUGGGACAdTdT -3'	[Chen, D. <i>et al.</i> , 2005]
NBS1	5'- CAGGAGGAAGAUGUCAAUUGdTdT -3'	[Chai, W. <i>et al.</i> , 2006]
p53	5'- AAGACUCCAGUGGUAUUCUACdTdT -3'	[Zhu, W. <i>et al.</i> , 2004]
PPM1G	5'- AGGCUACCAUGACUAUUGAdTdT -3'	[Petri, S. <i>et al.</i> , 2007]
USP7	5'-ACCCUUGGACAAUAUCCUdTdT -3'	[van der Horst, A. <i>et al.</i> , 2006]
USP7#2	5'-AGUCGUUCAGUCGUCGUAUdTdT -3'	[van der Horst, A. <i>et al.</i> , 2006]
USP7 <sub>s</sub>	5'- AGCGGGCGAGCAGCAGUUGdTdT -3'	Свой дизайн
XRCC1	5'- AGGGAAGAGGAAGUUGGAUdTdT -3'	[Brem, R. & Hall, J., 2005]
XRCC1#2	5'- GCUUGAGUUUUGUACGGUdTdT -3'	[Sultana, R. <i>et al.</i> , 2013]
XRCC1#3	5'- GGCAGACACUUACCGAAAAdTdT -3'	[Sultana, R. <i>et al.</i> , 2013]
XRCC1scr	5'- AAACCCGAUAAUAACGUUGCGdTdT -3'	[Brem, R. & Hall, J., 2005]

**Таблица 2.2.** Последовательности кнРНК, использованные в данной работе.

### 2.2.3. Обработка повреждающими ДНК агентами и ингибиторами

Обработку клеток человека различными агентами, вызывающими повреждения ДНК, проводили при плотности 80-90 % в следующих режимах: 150 мкМ пероксида водорода в

течение 15 мин, 1 мМ ММС в течение 1 ч, 10 мкМ этопозиды в течение 1 ч, 2-10 Гр ионизирующей радиации при дозе облучения 1,8 Гр/мин. В качестве источника ионизирующей радиации использовали  $\gamma$ -излучатель GSR-D1  $^{137}\text{Cs}$  (RPS Services Limited, Великобритания).

Ингибитор активности АТМ-киназы KU55933 (Calbiochem, Германия) использовали при концентрации 10 мкМ в течение 2-72 ч. Для ингибирования трансляции клетки обрабатывали циклогексимидом в концентрации 50 мкг/мл в течение 0,5-24 ч. Ингибитор протеасомы MG-132 (BostonBiochem, США) использовали в концентрации 1-2 мкМ в течение 14 ч.

## 2.3. Анализ белков

### 2.3.1. Приготовление цельных клеточных экстрактов

Для приготовления экстрактов клетки собирали центрифугированием в холодном фосфатно-солевом буфере (ФСБ), содержащем 137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,4 в течение 3 мин при ускорении 250 x g и охлаждении (4 °C). Приготовление цельных клеточных экстрактов проводили по методу Танака с некоторыми модификациями [Tanaka, M. *et al.*, 1992]. Осадок клеток ресуспендировали пипетированием в объеме буфера, равного объему осажденных клеток (ООК), содержащего 10 мМ Трис-HCl, 200 мМ KCl, pH 7,8 с добавлением 1 мМ ДТТ, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида (ФМСФ, ингибитор сериновых протеаз) и 1 мг/мл каждого из нижеперечисленных ингибиторов протеаз (пепстатина, апротинина, химостатина и леупептина). К полученной суспензии клеток добавляли равный двукратному ООК объем буфера для лизиса, содержащего 10 мМ Трис-HCl, 600 мМ KCl, 0,1 мМ ЭДТА, 40 об% глицерин, 0,2 об% нонидет Р40, pH 7,8 с добавлением 1 мМ ДТТ, 1 мМ ФМСФ и 1 мг/мл пепстатин, апротинин, химостатин и леупептин (каждого). Полученную суспензию клеток тщательно перемешивали пипетированием и инкубировали на мини-ротаторе PTR-35 (Grant Instruments Ltd, Великобритания) в течение 30 мин при скорости вращения 5 об/мин и температуре 4 °C. Клеточный дебрис отделяли центрифугированием в течение 20 мин при ускорении 100 000 x g и температуре 4 °C в центрифуге Optima MAX (Beckman Coulter, США). Супернатант, содержащий цельный клеточный экстракт, переносили в чистую пробирку, аликвотировали и хранили при -80 °C.

### 2.3.2. Фракционирование клеточного содержимого

Фракционирование клеточного содержимого на цитоплазматическую и ядерную фракции проводили в соответствии с ранее описанным методом [Woodhouse, B.C. *et al.*, 2008]. Свежеприготовленный осадок клеток ресуспендировали в двукратном по отношению к ООК объеме буфера, содержащего 20 мМ Трис-НСl, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 об% нонидет Р40, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ФМСФ и 1 мг/мл пепстатин, апротинин, химостатин и леупептин (1 мг/мл каждого), инкубировали в течение 10 мин при 4 °С и центрифугировали в течение 2 мин при ускорении 15 000 x g и температуре 4 °С. Супернатант, содержащий цитоплазматические белки, переносили в чистую пробирку. Ядерные белки экстрагировали аналогичным вышеописанному образом в двукратном по отношению к ООК объеме буфера, содержащего 100 мМ фосфатный буфер, 0,5 М КСl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ЭДТА, 0,75 об% Тритон Х-100, 10 об% глицерин, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ФМСФ и 1 мг/мл каждого пепстатин, апротинин, химостатин и леупептин. Полученные фракции разделяли на аликвоты и хранили при -80 °С.

### 2.3.3. Определение концентрации белков

Определение концентрации белков проводили по методу Брэдфорда [Bradford, M.M., 1976]. Для приготовления реагента Брэдфорда 100 мг Кумасси бриллиантового синего G-250 растворяли в 50 мл 95 % этанола, добавляли по каплям 100 мл 85 об% ортофосфорной кислоты, и смесь доводили дистиллированной водой до общего объема 1 л. Перед использованием реагент Брэдфорда фильтровали через целлюлозный фильтр с размером пор 11 мкм (Whatman, тип 1).

Для измерения концентрации раствор белков доводили дистиллированной водой до общего объема 0,1 мл и добавляли 0,9 мл реагента Брэдфорда. После тщательного перемешивания смесь инкубировали в течение 5-10 мин при комнатной температуре и определяли величину оптического поглощения раствора на длине волны 595 нм с использованием спектрофотометра UV-1601PC (Shimadzu, Япония). Концентрацию белков рассчитывали на основании калибровочной кривой, построенной с использованием БСА в диапазоне концентраций 0,2-2 мг/мл.



### **2.3.4. Белковый электрофорез в денатурирующих условиях**

Электрофорез белков в денатурирующих условиях проводили по методу Лэмли [Laemmli, U.K., 1970]. Электрофорез проводили в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) с использованием 10 % полиакриламидных гелей (ПААГ), а также ПААГ с градиентами концентраций полиакриламида 3-8 и 4-16 % на приборе XCell SureLock Mini-Cell (Invitrogen, Великобритания). Для приготовления градиента использовали градиентный миксер объемом 15 мл (Sigma, США). В процессе пробоподготовки образцы (10-30 мкг белка) кипятили в течение 10 мин в буфере для нанесения образцов (60 мМ Трис-НСl, 2 мас% SDS, 10 об% глицерин, 5 об% β-меркаптоэтанол, 0,2 мас% бромового фенола, рН 6,8). Электрофорез белков проводили при постоянном напряжении 125 В в течение 1,5-2 ч в электродном буфере, содержащем 25 мМ Трис-НСl, 192 мМ глицин, 0,1 мас% SDS, рН 8,3.

Окрашивание геля проводили с использованием Кумасси бриллиантового синего R-250 (0,1 мас% Кумасси R-250, 50 об% метанол, 10 об% уксусная кислота) в течение 45 мин при комнатной температуре. Отмывку геля проводили в растворе, содержащем метанол (30 об%) и уксусную кислоту (10 об%).

### **2.3.5. Белковый электрофорез в нативных условиях**

Электрофорез белков в нативных условиях проводили в отсутствие денатурирующих агентов в 3-8 % ПААГ как описано в разделе “2.3.4. Белковый электрофорез в денатурирующих условиях”. Образцы наносили на гель в буфере, содержащем 60 мМ Трис-НСl, 10 об% глицерин, 0,2 мас% бромового фенола, рН 6,8, в отсутствие термообработки, тогда как электрофорез белков проводили в течение 1,5 ч в 25 мМ Трис-НСl, 192 мМ глицин, рН 8,3.

### **2.3.6. Иммуноблоттинг**

Для переноса белков использовали мембрану, изготовленную из поливинилиденфторида и оптимизированную для флуоресцентной детекции (Immobilon-FL PVDF, Millipore, Великобритания), предварительно смоченную в 100 % метаноле. Электроблоттинг проводили в охлажденном буфере для переноса белков (25 мМ Трис-НСl, 192 мМ глицин, 20 об% метанол, рН 8,3) при постоянном напряжении 25 В в течение 1,5-3 ч с использованием модуля XCell II Blot (Invitrogen, Великобритания).

После окончания переноса белков мембрану промывали в ФБС и блокировали с использованием 50 об% блокирующего реагента Odyssey (Li-Cor Biosciences, Великобритания) в ФБС в течение 45 мин при комнатной температуре. Мембрану затем инкубировали с раствором первичных антител в течение 1-4 ч, после чего трижды отмывали в ФБС с 0,1 об% Твин-20 в течение 5 мин. После отмывки проводили инкубацию мембраны с раствором вторичных антител в концентрации 0,1 мкг/мл, меченных флуоресцентными красителями Alexa Fluor 680 (Molecular Probes, США) и IRDye 800 (Rockland, Великобритания), в условиях защиты от света. Отмывка мембраны от несвязавшихся вторичных антител проводилась в вышеописанных условиях. Необходимые разбавления первичных и вторичных антител готовили непосредственно перед использованием в буфере, содержащем 50 об% блокирующего реагента Odyssey в ФБС и 0,1 об% Твин-20. Список первичных и вторичных антител, использованных в данной работе для иммуноблотинга, их источник, клональность и условия применения приведены в Таблице 2.3.

Название	Клональность	Производитель	Номер каталога	Разведение
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Первичные антитела				
Анти-β-актин	Мышиные моноклональные	Abcam	ab6276	1:20 000
Анти-APC1	Кроличьи поликлональные	лаборатория Г. Л. Дианова	[Parsons, J.L. <i>et al.</i> , 2005c]	1:10 000
Анти-ATM	Мышиные моноклональные	Sigma Aldrich	A1106	1:2 000
Анти-ATM <sub>PS1981</sub>	Кроличьи моноклональные	Abcam	ab81292	1:10 000
Анти-ATR	Кроличьи поликлональные	Abcam	ab2905	1:1 000
Анти-Bre1	Кроличьи поликлональные	Abcam	ab32629	1:1 000
Анти-CK2α	Кроличьи поликлональные	Abcam	ab10466	1:2 000
Анти-CK2α'	Кроличьи поликлональные	Abcam	ab10474	1:5 000
Анти-DNA POL β	Кроличьи поликлональные	лаборатория Г. Л. Дианова	[Parsons, J.L. <i>et al.</i> , 2009]	1:5 000
Анти-DNA POL λ	Кроличьи поликлональные	Bethyl	A301-640A	1:500
Анти-DNA-PKcs	Кроличьи поликлональные	Santa Cruz	sc-9051	1:500
Анти-фибрилларин	Мышиные моноклональные	Abcam	ab4566	1:2 000

Анти-FLAG M2	Мышиные моноклональные	Stratagene	200471	1:2 000
<i>Продолжение таблицы</i>				
<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>
Анти- $\gamma$ H2A.X	Мышиные моноклональные	Millipore	05-636	1:2 000
Анти-НА-эпитоп	Кроличы поликлональные	Santa Cruz	sc-805	1:500
Анти-His-эпитоп	Мышиные моноклональные	Novagen	70796-3	1:1 000
Анти-MDM2	Мышиные моноклональные	AbD Serotec	MCA3255Z	1:1 000
Анти-MPG	Кроличы моноклональные	Abcam	ab155092	1:25 000
Анти-MRE11	Кроличы поликлональные	Novus	NB100-142	1:5 000
Анти-MULE	Кроличы поликлональные	Axxora	A300-486A	1:2 000
Анти-MULE <sub>нест</sub>	Кроличы поликлональные	ProSci	4213	1:2 000
Анти-NBS1	Кроличы поликлональные	Novus Biologicals	NB100-143	1:1 000
Анти-p21	Кроличы моноклональные	Cell Signaling	2947	1:2 000
Анти-p53	Мышиные моноклональные	Santa Cruz	sc-126	1:500
Анти-PAR	Мышиные моноклональные	Trevigen	4335AMC050	1:2 000
Анти-PARP-1	Кроличы поликлональные	лаборатория Г. Л. Дианова	[Woodhouse, B.C. <i>et al.</i> , 2008]	1:5 000
Анти-PPM1G	Кроличы поликлональные	любезный дар O. Gruss	[Petri, S. <i>et al.</i> , 2007]	1:5 000
Анти-PTEN	Кроличы поликлональные	Santa Cruz	sc-9145	1:1 000
Анти- $\alpha$ -тубулин	Мышиные моноклональные	Sigma Aldrich	T6199	1:5 000
Анти-Ubi1	Мышиные моноклональные	Abcam	ab7254	1:5 000
Анти-USP7 <sub>ps18</sub>	Кроличы поликлональные	Biomatik	A000419	1:1 000
Анти-USP7 <sub>s</sub>	Кроличы поликлональные	Biomatik	A000418	1:1 000
Анти-USP7 <sub>total</sub>	Кроличы поликлональные	Axxora	A300-033A	1:5 000
Анти-винкулин	Мышиные моноклональные	Novus	NB100-65546	1:2 000
Анти-WIP1	Кроличы поликлональные	Santa Cruz	sc-20712	1:500
Вторичные антитела				
Анти-кроличьи, конъюгат Alexa Fluor 680	Козьи поликлональные	Molecular Probes	A-21076	1:20 000
Анти-мышинные, конъюгат IRDye 800	Козьи поликлональные	Rockland	926-32210	0,1 мкг/мл

**Таблица 2.3.** Антитела, использованные в данной работе для иммуноблотинга.

Сканирование мембраны и количественный денситометрический анализ проводили с использованием системы Odyssey (Li-Cor Biosciences, Великобритания). Для контроля количества нанесенного белка использовали нормализацию к  $\beta$ -актину,  $\alpha$ -тубулину или винкулину. В каждом случае для количественного анализа использовали результаты как минимум трех независимых биологических экспериментов.

## 2.4. Иммунофлуоресцентный анализ

Для иммунофлуоресценции клетки человека рассеивали на покровные стекла диаметром 9 мм, помещенные в 12-луночные планшеты, в концентрации  $10^4$  клеток/луночка и растили в течение 24-48 ч. По достижении плотности монослоя 70-80 % клетки промывали ФБС и фиксировали с использованием свежеприготовленного раствора 4 мас% параформальдегида в деионизованной воде в течение 30 мин при комнатной температуре. После трехкратной отмывки в ФБС в течение 5 мин проводили пермеабиллизацию клеток в 0,2 об% Тритон X-100 в течение 10 мин при 4 °С, трехкратную отмывку в ФБС как описано выше и блокирование неспецифических взаимодействий с использованием блокирующего буфера (2 мас% БСА - фракция V в ФБС) в течение 1 ч при комнатной температуре. После блокирования клетки инкубировали с первичными и вторичными антителами как описано в разделе “2.2.7. Иммуноблотинг” (список использованных антител приведен в Таблице 2.4) с отмывкой в ФБС. Для разбавления антител использовали блокирующий буфер. В качестве вторичных антител использовали конъюгаты F(ab')<sub>2</sub> фрагментов антител с флуоресцентными метками Alexa Fluor 488 и 594 (Molecular Probes, США) в концентрации 4 мкг/мл. После инкубации с антителами покровное стекло с клетками трижды отмывали в ФБС по 5 мин и закрепляли на предметном стекле с использованием среды для микроскопирования Vectashield (Vector Laboratories, Великобритания), содержащей 4,6-диамидино-2-фенилиндол дигидрохлорид (DAPI) для окрашивания ядер. Полученные образцы хранили в темноте при 4 °С до анализа.

Для анализа фокусов белков (маркеров повреждений ДНК) готовили два независимых образца каждого препарата и анализировали 150 клеток/образец или 300 клеток/препарат. Подсчет фокусов проводили вручную в отсутствие информации об анализируемом образце

(слепой метод). Результаты представляли в виде средней частоты фокусов на клетку и процента клеток, содержащих определенное количество фокусов.

Название	Клональность	Производитель	Номер каталога	Разведение
<b>Первичные антитела</b>				
Анти-53BP1	Кроличыи поликлональные	Bethyl	A300-272A	1:1 000
Анти-АТМ рS1981	Кроличыи моноклональные	Abcam	ab81292	1:1 000
Анти- $\gamma$ H2A.X	Мышиные моноклональные	Millipore	05-636	1:1 000
Анти-USP7 <sub>S</sub>	Кроличыи поликлональные	Biomatik	A000418	1:250
<b>Вторичные антитела</b>				
Анти-кроличьи, конъюгат Alexa Fluor 488	Козьи поликлональные	Molecular Probes	A-11034	1:500
Анти-мышинные, конъюгат IRDye 594	Козьи поликлональные	Molecular Probes	A-11032	1:500

**Таблица 2.4.** Антитела, использованные в данной работе для иммунофлуоресцентного анализа.

Для иммунофлуоресцентного анализа синтеза ДНК использовали аналог тимидина, 5-этинил-2'-дезоксинуридин (EdU). Для включения EdU в ДНК в среду для культивирования клеток добавляли 1 мкМ EdU и инкубировали в течение 1-60 ч в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. Клетки промывали ФБС, фиксировали в 3,7 об% формальдегиде в ФБС в течение 15 мин при комнатной температуре, дважды промывали препараты в 3 мас% БСА в ФБС в течение 5 мин, пермеабелизовали в 0,5 об% Тритон X-100 в ФБС в течение 20 мин при комнатной температуре, еще раз промывали как описано выше и конъюгировали с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 647 (Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Kit, Molecular Probes, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. Затем проводили инкубацию образцов с первичными и вторичными антителами и окрашивание ядер как описано ранее.

Визуализацию флуоресцентных сигналов проводили с использованием конфокального микроскопа Zeiss LSM 780 (Zeiss, Германия) и масляно-иммерсионного 63-кратного объектива. Для возбуждения флуоресценции на длинах волн 488, 594 и 647 нм использовали многоканальный аргонный лазер (эмиссия 520 нм) и гелий-неоновые лазеры (эмиссия 640-750 и 680-750 нм), соответственно. На зеленом (488 нм) и красном (594 нм) каналах получали

изображения 10 фокальных плоскостей с шагом 0,75 мкм; полученные фокальные плоскости сливали в единое изображение. Съемка с помощью синего фильтра (DAPI) и на длине волны 647 нм проводилась в единой фокальной плоскости.

## **2.5. Иммунопреципитация**

Метод иммунопреципитации использовали для детекции взаимодействий между белками или обогащения образцов трудно детектируемыми белковыми продуктами. Для иммунопреципитации использовали эквиобъемную смесь магнитных частиц с иммобилизованными белками А и G. Для снижения неспецифических взаимодействий магнитные частицы инкубировали в присутствии 100 мкг/мл БСА в буфере для связывания (50 мМ Трис-НСl, 150 мМ КСl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДГТ, рН 8,0) в течение 30 мин при перемешивании (5 об/мин) и 4 °С с последующим связыванием специфических антител в течение 12-14 ч в аналогичных условиях. После 5-кратной отмывки магнитных частиц от несвязавшихся антител проводили иммунопреципитацию из смеси очищенных рекомбинантных белков или цельных клеточных экстрактов в буфере для связывания в течение 2 ч при 4 °С при использовании 1 мкг специфических антител на 1 мг цельного клеточного экстракта с содержанием целевого белка не более 1 %. Для контроля неспецифического связывания использовали нормальные кроличьи IgG. Магнитные частицы с осажденными белками многократно отмывали в буфере для связывания, добавляли буфер для нанесения образцов и анализировали методами белкового SDS-электрофореза и иммуноблотинга.

## **2.6. Сортировка клеток с активированной флуоресценцией (FACS)**

### **2.6.1. Анализ клеточного цикла**

Для анализа клеточного цикла клетки инкубировали в присутствии 10 мкМ 5-бром-2'-дезоксинуридина (BrdU) в течение 20 мин, снимали с посуды помощью 0,025 об% раствора трипсина и 0,01 % ЭДТА и собирали центрифугированием (3 мин при ускорении 250 x g и 4 °С) в ФБС, содержащем 2 об% эмбриональной телячьей сыворотки (ФБС-2 % FBS). Затем клетки ( $5 \times 10^5$ ) промывали холодным ФБС и фиксировали в ледяном 70 об% этиловом спирте в течение 30 мин при температуре -20 °С. После удаления фиксирующего агента центрифугированием (3 мин при 250 x g и 4 °С) клетки инкубировали в растворе 2 М НСl,

содержащем 0,1 мг/мл свежеприготовленного пепсина, в течение 20 мин при комнатной температуре и затем трехкратно отмывали от кислоты в ФБС и затем ФБС-2 % FBS. Клетки инкубировали с первичными антителами к BrdU (разбавление 1:100 в ФБС-2 % FBS; каталожный номер 347580, BD Biosciences, США) в течение 2 ч при периодическом перемешивании, промывали ФБС-2 % FBS, инкубировали со вторичными антителами к иммуноглобулинам мыши, конъюгированными с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 488, в течение 45 мин (Molecular Probes, США) и 10 мкг/мл йодидом пропидия в ФБС (Sigma, США) в течение 10-15 мин в темноте.

В качестве альтернативы клетки инкубировали с 10 мкМ EdU в течение 1 ч или 0,5 мкМ EdU в течение 60 ч (время трансфекции кнРНК), собирали трипсинизированием, фиксировали, конъюгировали с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 647 (Molecular Probes, США) и инкубировали с йодидом пропидия как описано в предыдущем абзаце.

### **2.6.2. Анализ апоптоза**

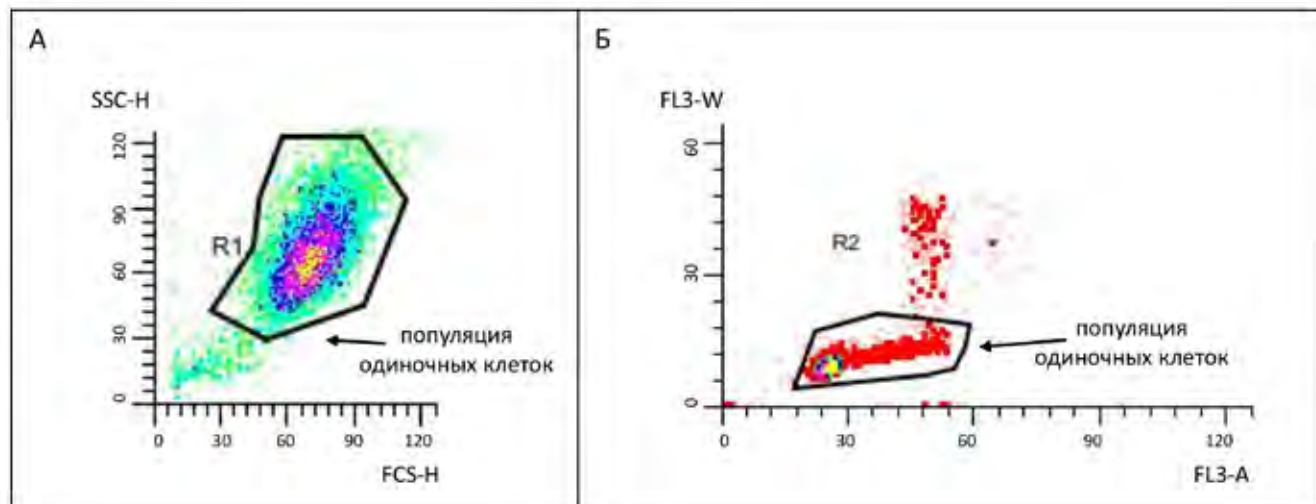
Для анализа апоптоза клетки ( $2,5 \times 10^5$ ) собирали с помощью трипсина и последующего центрифугирования (3 мин при ускорении  $250 \times g$  и  $4^\circ\text{C}$ ), промывали холодным ФБС, ресуспендировали в 0,5 мл аннексин-связывающего буфера с добавлением 5 мкл аннексин V-FITC (Abscam, Великобритания) и 10 мкг/мл йодидом пропидия и инкубировали в течение 10-15 мин в темноте.

### **2.6.3. Проточная цитометрия**

Образцы анализировали методом проточной цитометрии на приборе FACSCalibur (BD Biosciences, США), оснащенном лазерами с длинами волн 488, 530, 585, 670 нм для возбуждения флуорофоров. Анализ полученных данных проводили с использованием программы FlowJo (FlowJo, США). В каждом случае анализировали не менее  $10^4$  событий. В качестве отрицательного контроля использовали фиксированные неокрашенные клетки. Для компенсации использовали контрольные образцы клеток, окрашенные единичными флуорофорами.

Для анализа гомогенности клеточной популяции использовали данные по прямому (FSC) и угловому (SSC) светорассеянию путем построения двумерных гистограмм распределения клеток по размеру и степени зернистости. На данной стадии для дальнейшего анализа выделяли

основную популяцию клеток (75-90 % во всех случаях), исключая клеточные агрегаты и дебрис (Рисунок 2.1 А). Для дополнительного исключения агрегатов клеток и посторонних частиц проводили анализ интенсивности флуоресценции йодида пропидия в канале FL2 или FL3 в зависимости от конкретного эксперимента (Рисунок 2.1 Б).



**Рисунок 2.1.** Пример отбора клеточных субпопуляций для анализа клеточного цикла и апоптоза. **А.** Определение основной популяции клеток по двумерной гистограмме распределения клеток по размеру и степени зернистости. **Б.** Анализ клеточных агрегатов по интенсивности флуоресценции йодида пропидия.

## 2.7. Выделение нуклеиновых кислот

### 2.7.1. Выделение общей РНК из клеточных культур

Выделение общей РНК из клеток человека проводили с использованием специального набора RNeasy Kit (QIAGEN, США). Клетки ( $5-8 \times 10^5$ ) лизировали на 60 мм чашках Петри в 350 мкл буфера RLT, содержащего изотиоцианат гуанидина, с добавлением 1 об%  $\beta$ -меркаптоэтанола. Лизат переносили в пластиковую пробирку объемом 1,5 мл, тщательно ресуспендировали пипетированием и гомогенизировали пропусканием в течение 8-10 раз через иглу шприца диаметром 0,9 мм. К полученному гомогенату добавляли равный объем 70 об% этилового спирта, тщательно перемешивали пипетированием и наносили на колонку RNeasy. Для удаления неспецифически связавшихся углеводов, белков, жирных кислот, микроРНК и небольших фрагментов РНК колонку промывали 700 мкл буфера RW1, содержащего этиловый спирт и соль гуанидина. Для удаления солей колонку дважды промывали с использованием 500 мкл буфера RPE, содержащего этанол. Десорбцию РНК с колонки осуществляли добавлением



50 мкл свободной от РНКаз воды, которую получали обработкой деионизированной воды 0,1 мас% диэтилпирокарибонатом с последующим автоклавированием.

Определение концентрации РНК проводили по величине оптического поглощения на длине волны 260 нм ( $A_{260}$ ) с учетом коэффициента экстинкции  $\epsilon_{260} = 0,025 \text{ (мкг/мл)}^{-1} \text{ см}^{-1}$  на спектрофотометре NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies Inc, США). Для дальнейших экспериментов использовали образцы РНК с соотношениями  $A_{260}/A_{280}$  и  $A_{260}/A_{230}$  не менее 2,0. Для оценки качества РНК также проводили электрофорез в агарозном геле, и в дальнейших экспериментах использовали образцы РНК с содержанием субъединиц 28S:18S  $\approx$  3:1.

### 2.7.2. Выделение плазмидной ДНК

Выделение плазмидной ДНК рутинно проводили с использованием набора Plasmid MiniPrep Kit (QIAGEN, США). Ночную культуру (4-10 мл) клеток *E.coli* DH5 $\alpha$ , содержащих требуемую плазмиду, осаждали центрифугированием (5 мин, 4 000 x g, 4 °C) и осадок тщательно ресуспендировали пипетированием в 250 мкл буфера P1 (50 мМ Трис-НСl, 10 мМ ЭДТА, 100 мкг/мл РНКазы А, рН 8,0). Для лизиса клеток добавляли 250 мкл буфера P2 (200 мМ NaOH, 1 мас% SDS) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Лизис клеток останавливали при добавлении 350 мкл охлажденного нейтрализующего буфера N3 (4,2 М гуанидин гидрохлорид, 0,9 М ацетат калия, рН 4,8). Полученную смесь тщательно перемещивали и центрифугировали в течение 10 мин при 15 000 x g для осаждения клеточного дебриса, геномной ДНК бактерий и выпавших в осадок белков. Супернатант наносили на колонку QIAprep Mini и центрифугировали в течение 1 мин при 15 000 x g для сорбции плазмидной ДНК. Затем колонку промывали 750 мкл буфера PE (10 мМ Трис-НСl, 80 об% этанол, рН 7,5) и центрифугировали дважды (1 мин, 15 000 x g) для удаления остатков этилового спирта. Для десорбции ДНК добавляли 30-50 мкл буфера EB (10 мМ Трис-НСl, рН 8,5), инкубировали в течение 1-2 мин и центрифугировали в течение 1 мин при 15 000 x g.

Для выделения значительных количеств ДНК высокого качества использовали набор Plasmid Maxi Kit (QIAGEN, США) аналогичным вышеописанному образом. Культуру клеток *E.coli* DH5 $\alpha$  (100-500 мл в зависимости от копияности плазмиды), содержащих требуемую плазмиду и находящихся в экспоненциальной фазе роста, осаждали центрифугированием (15 мин, 6 000 x g, 4 °C), осадок ресуспендировали в 10 мл буфера P1, лизировали добавлением

10 мл буфера P2 и затем добавляли 10 мл охлажденного нейтрализующего буфера P3 (3,0 М ацетат калия, pH 5,5). Полученную смесь инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре, супернатант наносили на колонку QIAGEN-tip 500, уравновешенную 10 мл буфера QBT (750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15 об% изопропанол, 0,15 об% Тритон X-100, pH 7,0). Затем колонку дважды промывали 30 мл буфера QC (1,0 М NaCl, 50 mM MOPS, 15 об% изопропанол, pH 7,0). Элюцию ДНК с колонки проводили в 15 мл буфера QF (1,25 М NaCl, 50 mM Трис-НСl, 15 % изопропанол, pH 8,5). К полученному раствору ДНК добавляли 10,5 мл изопропанола, тщательно перемешивали и немедленно осаждали в течение 30 мин при 15 000 x g. Осадок промывали 1 мл 70 об% этанола и повторно центрифугировали в течение 10 мин при 15 000 x g. Полученный осадок подсушивали на воздухе в течение 10-15 мин и растворяли в 200-500 мкл буфера TE (10 mM Трис-НСl, 1 mM ЭДТА, pH 8,0).

Определение концентрации ДНК проводили по величине оптического поглощения на длине волны 260 нм ( $A_{260}$ ) с учетом коэффициента экстинкции  $\epsilon_{260} = 0,02 \text{ (мкг/мл)}^{-1} \text{ см}^{-1}$  на спектрофотометре NanoDrop 1000. Для дальнейших экспериментов использовали образцы ДНК с соотношениями  $A_{260}/A_{280}$  и  $A_{260}/A_{230}$  не менее 1,8. Качество ДНК определяли с помощью электрофореза в агарозном геле и при необходимости секвенирования.

### **2.7.3. Выделение ДНК-фрагментов из агарозного геля**

Фрагменты ДНК разделяли с помощью препаративного электрофореза в 1 % агарозном геле (0,8 % низкоплавкой агарозы и 0,2 % агарозы с нормальной точкой плавления). Полоску геля, содержащую требуемый фрагмент помещали в пробирку объемом 0,5 мл и замораживали в течение 1 ч при температуре  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ . После размораживания образца дно пробирки прокалывали с помощью стерильной иглы, помещали пробирку в чистую пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировали в течение 10 мин при 10 000 x g для удаления агарозы. Для увеличения выхода на 10-15 % к агарозе добавляли 50-100 мкл буфера TE и повторяли процедуру заморозки-разморозки. К полученному раствору ДНК добавляли 2,5-кратный объем 96 об% этилового спирта в присутствии 0,3 М ацетата натрия, pH 5,5, инкубировали в течение 30 мин при  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  и центрифугировали (10 мин, 15 000 x g). Осадок промывали 70 об% этанолом, центрифугировали (10 мин, 15 000 x g), высушивали на воздухе и растворяли в

30 мкл буфера TE. Качество и концентрацию ДНК определяли по  $A_{260}$  и путем электрофореза в агарозном геле.

#### **2.7.4. Очистка продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР)**

Для очистки продуктов ПЦР от олигонуклеотидных праймеров, нуклеотидов, ДНК-полимеразы и солей использовали набор QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN, США). К продукту ПЦР-реакции добавляли 5-тикратный объем буфера PB (5 М гидрохлорид гуанидина, 30 об% изопропанол), содержащий индикатор pH. Для эффективного связывания ДНК-фрагментов с сорбентом в случае изменения окраски буфера PB до оранжевого или фиолетового цветов к смеси добавляли 10 мкл 3 М ацетата калия, pH 5,0 и тщательно перемешивали. Полученную смесь наносили на колонку QIAquick, центрифугировали для сорбции ДНК (30 с, 18 000 x g), промывали 750 мкл буфера PE, дважды центрифугировали и проводили десорбцию ДНК в 30 мкл буфера EB (10 mM Трис-HCl, pH 8,5).

### **2.8. Анализ нуклеиновых кислот**

#### **2.8.1. Электрофорез в агарозном геле**

Электрофорез ДНК и РНК проводили в Трис-ацетатном буфере (40 mM Трис-HCl, 20 mM уксусная кислота, 1 mM ЭДТА, pH 8,3) в 1 % агарозном геле (оптимальное разделение фрагментов ДНК размером 0,5-7,5 т.п.н. и образцов РНК) при напряженности электрического поля 3-4 В/см. В гель добавляли раствор бромистого этидия до конечной концентрации 1,0 мкг/мл. Перед нанесением на гель к образцу нуклеиновой кислоты добавляли буфер для нанесения (10 mM Трис-HCl, 10 mM ЭДТА, 0,03 мас% бромифеноловый синий, 0,03 мас% ксилен цианол FF, 10 об% глицерин, pH 8,0). Для анализа размера фрагментов нуклеиновых кислот использовали маркеры молекулярного веса (New England Biolabs, США). Визуализацию нуклеиновых кислот проводили на УФ-трансиллюминаторе при длине волны 260 нм.

#### **2.8.2. Секвенирование ДНК**

Секвенирование ДНК осуществляли дидезокситерминационным методом [Sanger, F. & Coulson, A.R., 1975] с использованием набора реактивов BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, США). Продукты реакции анализировали на автоматическом ДНК-секвенаторе

ABI 3130XL (Applied Biosystems, США). Для обработки результатов секвенирования использовали программу Chromas (версия 2.0), выравнивание нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программы Clustal Omega.

## 2.9. Молекулярное клонирование

### 2.9.1. Приготовление компетентных клеток *E.coli*

Приготовление компетентных клеток осуществляли при обработке клеток раствором хлорида кальция [Dagert, M. & Ehrlich, S.D., 1979]. Ночную культуру *E.coli* рассеивали на чашки Петри с LB, содержащей 1 мас% агара и чашки инкубировали в течение 12-16 ч при 37 °С. В случае штамма *E.coli* BL21(DE3) pLysS Codon Plus к среде LB-агар добавляли хлорамфеникол в конечной концентрации 34 мкг/мл, тогда как клетки *E.coli* DH10Bac растили в присутствии 10 мкг/мл тетрациклина и 50 мкг/мл канамицина. Единичную колонию клеток бактерий использовали для получения ночной культуры *E.coli*. Ночную культуру (500 мкл) разбавляли в 100 раз средой LB (с добавлением антибиотиков в случае штаммов *E.coli* BL21(DE3) pLysS Codon Plus и DH10Bac), колбы помещали в качалку (37 °С, 180-200 об/мин) и выращивали в течение 1,5-2,5 часов до достижения поглощения клеток на длине волны 600 нм  $A_{600} \approx 0,5-0,7$ . Затем 50 мл культуры клеток охлаждали на льду, переносили в охлажденные на льду пробирки объемом 50 мл и центрифугировали в течение 5 мин при 3 000 x g и 4 °С. После тщательного удаления культуральной жидкости осадок клеток ресуспендировали в 16 мл (0,4-кратный объем) стерильного охлажденного 100 мМ раствора CaCl<sub>2</sub> и инкубировали в течение 30 мин на льду. Далее клетки осаждали в условиях, описанных выше, и ресуспендировали в 3,2 мл охлажденного 100 мМ CaCl<sub>2</sub> (0,08-кратный объем). К полученной клеточной суспензии добавляли 0,2-кратный объем 80 об% глицерина, быстро перемешивали пипетированием, помещали аликвоты объемом 100 мкл в охлажденные стерильные пробирки и замораживали в жидком азоте. Полученные аликвоты компетентных клеток хранили не более 2 месяцев при -80 °С.

Для оценки компетентности полученных клеток проводили трансформацию *E.coli* различными количествами плазмидной ДНК pUC19. Степень компетентности составила 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup> колоний/мкг плазмидной ДНК.

### 2.9.2. Трансформация клеток *E.coli*

Трансформацию клеток *E.coli* плазмидной ДНК или реакционной смесью после клонирования проводили согласно методу, описанному в [Sambrook, J. & Russel, D.W., 2001]. К суспензии компетентных клеток (50 мкл) добавляли 1-10 фмоль плазмидной ДНК или реакционную смесь после клонирования и инкубировали в течение 30 мин на льду. После этого клетки подвергали тепловому шоку при 42 °С в водном термостате (точность термостатирования  $\pm 0,1$  °С) в течение 1 мин, охлаждали до 0 °С (1-2 мин), к клеткам добавляли 500 мкл среды LB и инкубировали в течение 1,5-2 ч при 37 °С при перемешивании (180 об/мин). Трансформированные клетки высевали на чашки Петри со средой LB с агаром, содержащей антибиотики, и инкубировали в течение 12-16 ч при 37 °С. Плазмидную ДНК клонов выделяли как описано в разделе “2.7.2. Выделение плазмидной ДНК” и анализировали с помощью эндонуклеаз рестрикции, ПЦР со специфическими праймерами и секвенирования.

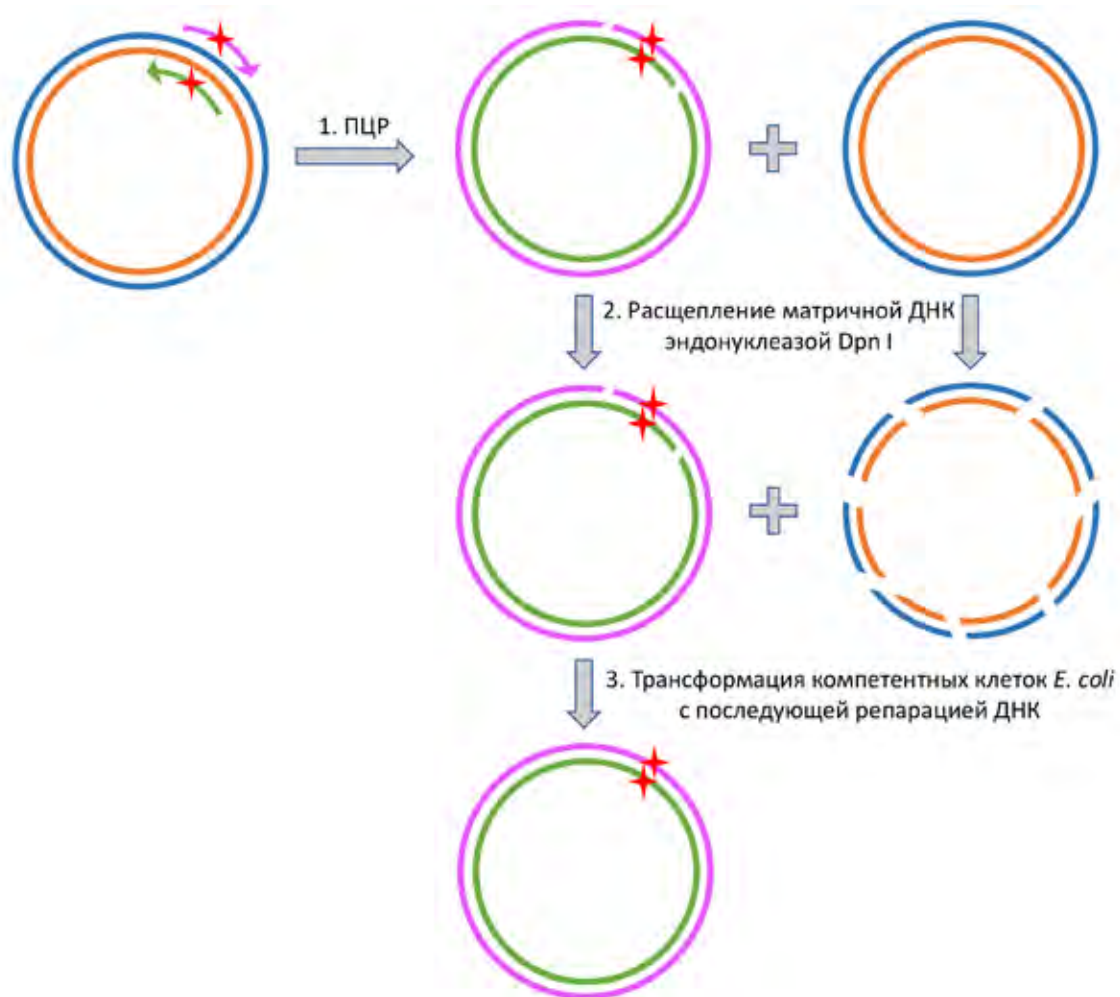
### 2.9.3. Рестрикция ДНК

Рестрикцию плазмидной ДНК проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции фирмы New England Biolabs (США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя. ДНК обрабатывали эндонуклеазами рестрикции Dpn I, Bsa I или BseRI в течение 1 часа при 37 °С в буфере для рестрикции (20 мМ Трис-ацетат, 50 мМ ацетат калия, 10 мМ ацетат магния, 100 мкг/мл БСА, рН 7,9). Затем рестрикционную смесь инкубировали в течение 20 мин при 65 °С или 80 °С для инактивации рестриктаз Bsa I или BseRI и Dpn I, соответственно. Инкубацию рестрикционной смеси осуществляли в термостатируемом ПЦР-приборе Eppendorf MasterCycler (Eppendorf, Германия). Полноту протекания реакции рестрикции контролировали электрофорезом ДНК в 1 % агарозном геле.

### 2.9.4. Направленный мутагенез гена *USP7*

Направленный мутагенез гена *USP7* проводили методом безлигазного клонирования с использованием ПЦР-прибора Eppendorf MasterCycler (Eppendorf, Германия) в тонкостенных пробирках объемом 0,2 мл (Рисунок 2.2) [Braman, J. *et al.*, 1996]. В качестве матрицы для введения аминокислотных замен использовали плазмиду pCl-neo Flag HAUSP для избыточной экспрессии белка в клетках животных, в которой ген *USP7* находится под контролем

минимального промотора цитомегаловируса (CMV) и содержит N-концевой Flag-эпитоп [Cummins, J.M. *et al.*, 2004].



**Рисунок 2.2.** Принцип проведения направленного мутагенеза с использованием метода безлигазного клонирования. Вводимая аминокислотная замена обозначена звездочкой.

Для введения точечных мутаций Ser18Ala (нефосфорилируемая форма) и Cys223Ser (каталитически неактивная форма) в ген *USP7* с помощью ПЦР использовали прямой (F) и обратный (R) праймеры, несущие требуемую замену (Таблица 2.5). Для модификации N-концевой последовательности гена *USP7* с целью клонирования кДНК изоформы USP7ΔN (GenBank ID: AK302771), использовали праймеры с перекрывающимися последовательностями (Таблица 2.5).

Реакционная смесь для проведения ПЦР содержала буфер для высокоточной PfuTurbo ДНК-полимеразы (200 мМ Трис-НСl, 100 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 100 мМ КСl, 1 об% Тритон X-100, 1 мг/мл БСА, рН 8,8), 0,2 мМ смеси dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP), 10 нг ДНК-матрицы, 0,2 мкМ прямого и обратного праймеров (Eurogentec, Бельгия), 2,5 Ед PfuTurbo

ДНК-полимеразы и деионизованную воду до общего объема смеси 50 мкл. В случае праймеров с высоким содержанием GC (Ser18Ala F и R, USP7ΔN F и R) в реакционную смесь добавляли ДМСО в конечной концентрации 2 об%. Реакционную смесь прогревали в течение 2 мин при 94 °С и затем проводили реакцию ПЦР с использованием следующей программы: денатурация - 94 °С, 30 с; отжиг - 55 °С, 60 с и элонгация - 68 °С, 6 мин, всего 16 циклов (18 циклов в случае USP7ΔN). После этого реакционную смесь выдерживали еще 20 мин при 68 °С. Температуру отжига выбирали на 2-3 градуса ниже температуры плавления дуплексов ( $T_m$ ), образуемых праймерами. Для определения  $T_m$  использовали эмпирическую формулу:

$$T_m = 81,5 + 0,41 \times (\%N_{GC}) - (675/N) - \% \text{ нуклеотидных замен}, \quad (2.1)$$

где N – количество нуклеотидов в праймере,  $N_{GC}$  – количество G и C нуклеотидов в праймере.

Мутация	Олигонуклеотид	
Ser18Ala	F	5'- CAGCAGTTGGCCGG <u>CC</u> CCGAGGACATG -3'
	R	5'- CATGTCCTCGGGG <u>CC</u> GGCCAAGTCTGCTG -3'
Cys223Ser	F	5'- GAATCAGGGAGCGACTT <u>C</u> TTACATGAACAGCCTGC -3'
	R	5'- GCAGGCTGTTTCATGTA <u>A</u> GAAGTCGCTCCCTGATTC -3'
USP7ΔN	F	5'- gctgggaaccacaggcttgggctCGAAGCGGGAGATACAGATGACCCACC -3'
	R	5'- agcccaagcctgtggttcccagcCATCTTGTCGTCATCGTCTTTGTAGTCCATGC -3'

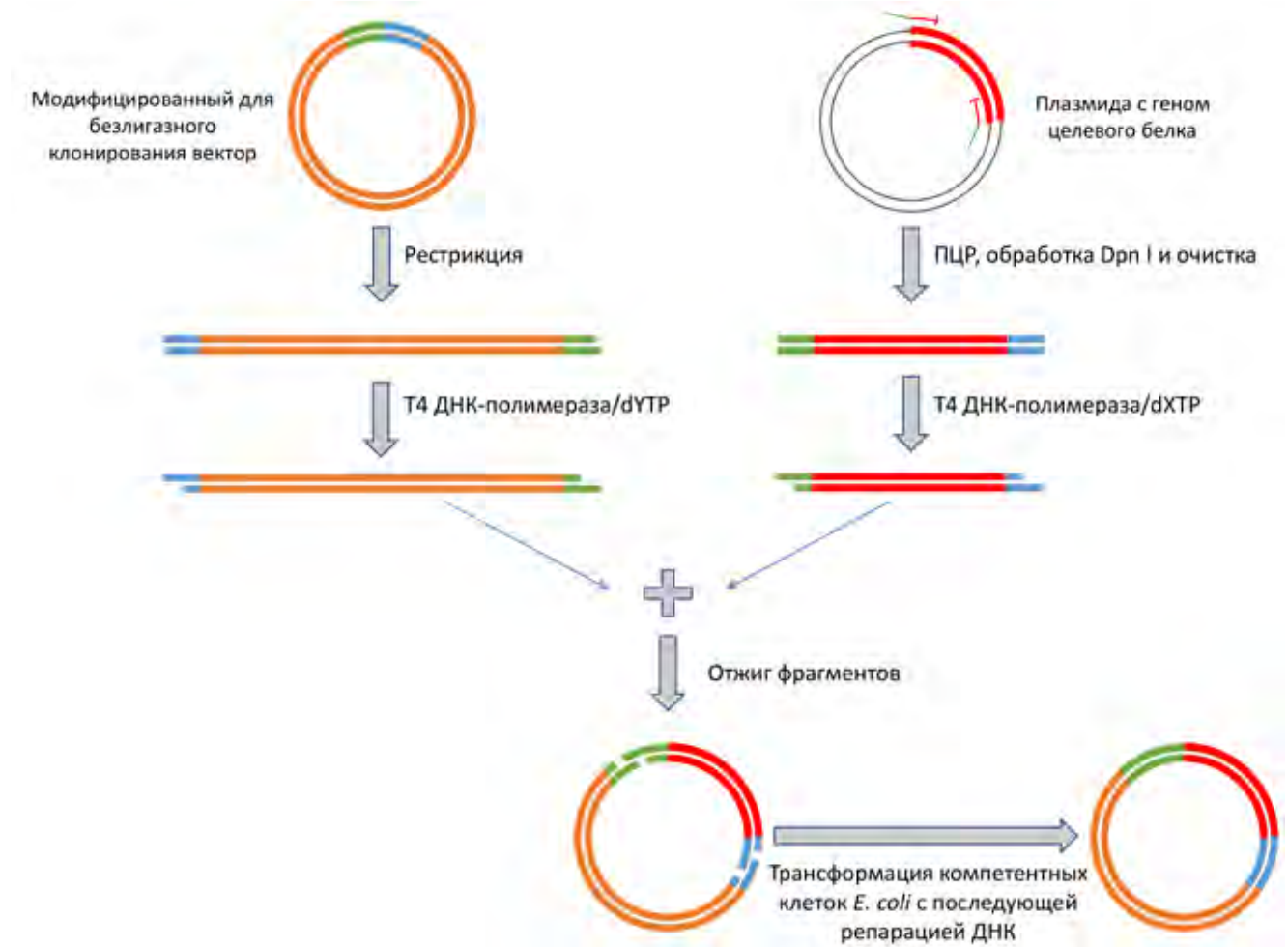
**Таблица 2.5.** Олигонуклеотиды для направленного мутагенеза гена *USP7*. Подчеркиванием выделены нуклеотидные замены, обеспечивающие мутацию. Прописными буквами выделены комплементарные последовательности.

Для расщепления метилированной матричной ДНК, не содержащей нововведенных мутаций, к реакционной смеси после ПЦР добавляли 10 Ед эндонуклеазы рестрикции Dpn I, тщательно перемешивали пипетированием и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Полученной реакционной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* DH5α. Для контроля введения требуемых мутаций проводили секвенирование плазмидной ДНК.

### 2.9.5. Переклонирование рекомбинантной ДНК

Переклонирование рекомбинантной ДНК проводили методом безлигазного клонирования с использованием ПЦР (Рисунок 2.3) [Aslanidis, C. & de Jong, P.J., 1990]. В качестве матрицы для переклонирования использовали следующие плазмиды: вектор pNIC28-Bsa4 для экспрессии белков в клетках *E. coli* (любезный дар П. Савицкого и О. Gileadi),

который представляет собой стандартный вектор pET28a, модифицированный для безлигазного клонирования [Savitsky, P. *et al.*, 2010]; модифицированный для безлигазного клонирования вектор pFB-LIC-Bse для переноса генов в бакмидную ДНК и их последующей экспрессии в клетках насекомых (любезный дар П. Савицкого и О. Gileadi) [Savitsky, P. *et al.*, 2010] и вектор pCMV-3Tag3a для экспрессии генов в клетках животных под контролем CMV-промотора с С-концевым 3x Flag-эпитопом (Agilent Technologies, США).



**Рисунок 2.3.** Переклонирование рекомбинантной ДНК с использованием метода безлигазного клонирования.

Для получения лигированного вектора для переклонирования со специфичными односторонними липкими концами длиной 12 нуклеотидов проводили рестрикцию плазмид pNIC28-Bsa4 или pFB-LIC-Bse эндонуклеазами Bsa I или BseRI, соответственно. В случае pCMV-3Tag3a проводили ПЦР-амплификацию плазмиды с использованием высокоточной PfuTurbo ДНК-полимеразы и pCMV-3Tag3a прямого (F) и обратного (R) праймеров (Таблица 2.6) с последующим расщеплением матричной метилированной ДНК эндонуклеазой Dpn I как описано в разделе “2.9.4. Направленный мутагенез гена *USP7*” . Дизайн сайта



рестрикции и праймеров для амплификации осуществляли так, чтобы последовательности обоих концов линейизованного фрагмента не содержали одного из нуклеотидов (X) на протяжении 12-14 звеньев. Полученную реакционную смесь очищали от солей и эндонуклеазы или ДНК-полимеразы как описано в разделе “2.7.4. Очистка продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР)” и обрабатывали в присутствии ДНК-полимеразы фага Т4, обладающей 3'-экзонуклеазной активностью, и dХТР, что приводило к получению специфичных односторонних липких концов (Рисунок 2.3). Липкие концы были одинаковы в случае всех плазмид, использованных для переклонирования в данной работе. Реакционная смесь содержала буфер для ДНК-полимеразы фага Т4 (10 мМ Трис-НСl, 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, рН 7,9), 1 мг/мл БСА, 5 мМ DTT, 2,5 мМ dGTP, 5 мкг линейизованной ДНК-матрицы, 5 Ед ДНК-полимеразы фага Т4 и деионизованную воду до общего объема смеси 100 мкл. Реакционную смесь инкубировали в течение 30 мин при 22 °С с последующей инактивацией фермента в течение 30 мин при 80 °С. Аликвоты вектора с липкими концами хранили при -20 °С.

ПЦР-матрица	Олигонуклеотид	
вектор pCMV-3Tag3a	F	5'- agtaaagtgataccATCGATACCGTCGACCTCGAGGAT -3'
	R	5'- atggattggaagtaCCCGTGGAGCTCCAGCTTTTGTTCCTCC-3'
ген <i>USP7</i>	F	5'- tacttccaatccatGAACCACCAGCAGCAGCAG -3'
	R	5'- tatccacctttactgGTTATGGATTTTAATGGCCTTTTCAAGGTAAGTG -3'
ген <i>PPM1G</i>	F	5'- tacttccaatccatGGGTGCCTACCTCTCCCAG -3'
	R	5'- tatccacctttactgGTCTCGCTTGGCCTTCTTCTTCTTG -3'

**Таблица 2.6.** Олигонуклеотиды для безлигазного клонирования рекомбинантной ДНК. Прописными буквами обозначены последовательности, образующие липкие концы после обработки ДНК-полимеразой фага Т4. Заглавными буквами обозначена последовательность, комплементарная таковой вектора для переклонирования или клонируемого гена. Старт-кодон обозначен подчеркиванием.

Для получения фрагмента с геном для переклонирования и липкими концами, комплементарными таковым на концах линейизованного фрагмента с вектором для переклонирования, проводили ПЦР-амплификацию гена с использованием специфических праймеров (Таблица 2.6). В качестве матрицы для ПЦР-амплификации генов *USP7* и *PPM1G* использовали плазмиды pCl-neo Flag HAUSP [Cummins, J.M. *et al.*, 2004] и pCMV-XL5 PPM1G

(Origene, США), соответственно. Полученную реакционную смесь обрабатывали Dpn I, очищали и инкубировали с ДНК-полимеразой фага T4 в присутствии 2,5 мМ dCTP для получения липких концов. Фрагменты вектора и гена для переклонирования с липкими концами смешивали в объемных отношениях 1:3, 1:1 и 3:1 и инкубировали в течение 10 мин при комнатной температуре. Полученной смесью трансформировали компетентные клетки *E.coli* DH5 $\alpha$ . Для контроля переклонирования проводили секвенирование или рестрикционный анализ плазмидной ДНК.

### 2.9.6. Получение рекомбинантной бакмидной ДНК

Для получения рекомбинантной бакмидной ДНК проводили трансформацию компетентных клеток *E.coli* DH10Bac конструкциями, полученными переклонированием гена *USP7* в вектор для переноса pFB-LIC-Bse. В результате сайт-специфической рекомбинации между бакуловирусным вектором bMON14272 штамма и плазмидой для переноса получали бакмидную ДНК, содержащую ген *USP7*. Успешная рекомбинация сопровождалась удалением кодирующего  $\beta$ -галактозидазу гена *lacZ* из вектора bMON14272. Селекцию колоний белого цвета, содержащих рекомбинантные бакмиды, проводили на среде LB-агар с добавлением 50 мкг/мл канамицина, 7 мкг/мл гентамицина, 10 мкг/мл тетрациклина, 100 мкг/мл X-gal, 40 мкг/мл ИПТГ. Выделение бакмидной ДНК проводили в асептических условиях с использованием набора Plasmid MiniPrep Kit как описано в разделе “2.7.2. Выделение плазмидной ДНК”. Полученную бакмидную ДНК хранили при 4 °С.

Для контроля транспозиции гена *USP7* проводили ПЦР с использованием выделенной бакмидной ДНК в качестве матрицы и прямого (M13Bac-F) и обратного (M13Bac-R) праймеров:

M13Bac-F: 5'- GTTTCCCCAGTCACGAC -3'

M13Bac-R: 5'- CAGGAAACAGCTATGAC -3'.

Реакцию ПЦР проводили как описано в разделе “2.9.4. Направленный мутагенез гена *USP7*” при температуре отжига праймеров 50 °С. Анализ продуктов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 1 % агарозном геле, успешная транспозиция гена *USP7* приводила к амплификации фрагмента ДНК размером 5,6 т.п.н.

## **2.10. Анализ матричной РНК (мРНК)**

### **2.10.1. Обратная транскрипция РНК**

Для синтеза одноцепочечных комплементарных ДНК (кДНК) 1 мкг общей РНК смешивали с 0,1 мкмоль смеси dNTP (dATP, dGTP, dTTP, dCTP) и 110 пмоль олиго-(dT)<sub>12-18</sub> праймера или 100 пмоль случайного 6-мерного праймера (в случае последующего использования 18S-РНК для нормализации) и доводили свободной от РНК водой до общего объема 10 мкл. Смесь инкубировали в течение 5 мин при температуре 65 °С. Затем к смеси на льду добавляли 10 мкл смеси, содержащей 50 мМ Трис-НСl, 75 мМ КСl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 20 мМ DTT, 40 Ед ингибитора рибонуклеаз RNaseOUT, рН 8,3 и инкубировали в течение 2 мин при 45 °С, после чего к смеси добавляли 50 Ед обратной транскриптазы SuperScript II RT (Invitrogen, Великобритания) и инкубировали в течение дополнительных 50 мин при 45 °С. Инактивацию обратной транскриптазы проводили в течение 15 мин при 70 °С, после чего реакцию смесь охлаждали на льду и инкубировали в присутствии 2 Ед РНКазы Н для расщепления исходной РНК. Растворы кДНК хранили при температуре -20 °С. Для проведения реакции обратной транскрипции использовали термостатируемый ПЦР-прибор Eppendorf MasterCycler (Eppendorf, Германия).

### **2.10.2. ПЦР в реальном времени**

ПЦР в реальном времени проводили с использованием кДНК клеток после трансфекции киРНК или плазмидной ДНК и соответствующих контрольных образцов в качестве матрицы, SYBR Green I в качестве интеркалирующего флуоресцентного красителя и ROX в качестве референсного красителя. Дизайн праймеров для амплификации проводили с использованием программы Universal ProbeLibrary Assay Design Center (Roche, США). Праймеры были длиной 18-21 н. с температурой плавления 58-60 °С, амплификация которых приводила к синтезу фрагментов длиной 50-100 п.н. Список использованных прямых (F) и обратных (R) праймеров приведен в Таблице 2.7. Для каждой клеточной линии определяли оптимальные концентрации праймеров и кДНК в реакционной смеси, при которых достигались значения порогового цикла (Ct) в диапазоне 20-30. Эффективность амплификации в каждом случае составляла 90-110 %.

Реакционная смесь объемом 25 мкл включала: 1-20 нг кДНК, 40-100 нМ 5'- и 3'-праймеров и амплификационную смесь Absolute Blue SYBR Green ROX, содержащую 1,5 мМ

MgCl<sub>2</sub>, 0,125 мкМ dNTPs, Thermo-Start ДНК-полимеразу и SYBR Green I флуоресцентную метку (Invitrogen, Великобритания). Каждую реакцию проводили в трех независимых повторах в каждом независимом эксперименте, и реакция считалась значимой при разбросе значений Ct не более 0,2-0,3. Амплификацию проводили с использованием системы для ПЦР в реальном времени 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, США). Реакционную смесь прогревали в течение 15 мин при 95 °С и затем проводили 40 циклов реакции амплификации с использованием следующей программы: денатурация - 95 °С, 15 с; отжиг - 55 °С, 60 с; элонгация - 72 °С, 30 с. Регистрацию флуоресценции комплекса ДНК-SYBR Green I проводили в каждом цикле амплификации на стадии элонгации. Расчет значений Ct и вычет базовой линии флуоресценции проводили с использованием программного обеспечения. Отсутствие димеров и неспецифических продуктов в реакционной смеси проверяли путем аналитического плавления по завершению процесса амплификации в диапазоне температур от 60 °С до 95 °С в соответствии со следующей программой: 1-я стадия - 95 °С, 15 с; 2-я стадия - 60 °С, 1 мин; 3-я стадия - 95 °С, 30 с и 4-я стадия - 60 °С, 15 с.

Ген-мишень	Олигонуклеотид	
<i>USP7<sub>total</sub></i>	F	5'- AGGCTCAGAAGCGGAAGG -3'
	R	5'- AAAGTGGTCCTCTGCGACTATC -3'
<i>USP7<sub>S</sub></i>	F	5'- CGAGCAGCAGTTGAGCG -3'
	R	5'- CGCTCCACAGTGAAGTGAAG -3'
<i>MULE</i>	F	5'- TGAATGCTCTGGCTGCATAC -3'
	R	5'- CCCCAGGTTTAGGATCAGATT -3'
<i>GAPDH</i>	F	5'- AGCCACATCGCTCAGACAC -3'
	R	5'- GCCCAATACGACCAAATCC -3'
<i>β-актин</i>	F	5'- AGGCACCAGGGCGTGAT -3'
	R	5'- CGCCCACATAGGAATCCTTCT -3'
18S-РНК	F	5'- GCAATTATCCCCATGAACG -3'
	R	5'- GGGACTTAATCAACGCAAGC -3'

**Таблица 2.7.** Олигонуклеотиды для ПЦР в реальном времени.

Расчет относительной экспрессии генов проводили с использованием порогового метода сравнения графиков накопления ДНК  $\Delta\Delta Ct$  [Schmittgen, T.D. & Livak, K.J., 2008]. В качестве стандартного образца использовали кДНК клеток, трансфицированных контрольными кРНК или плазмидной ДНК. Для нормализации количества использованных в реакции транскриптов использовали значения  $Ct$  продуктов генов домашнего хозяйства глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (GAPDH),  $\beta$ -актина и 18S рибосомальную РНК (18S-РНК).

## 2.11. Экспрессия рекомбинантных белков

### 2.11.1. Экспрессия белков в клетках *E.coli*

Для экспрессии белков USP7, PPM1G, PTEN и WIP1 использовали клетки *E.coli* BL21 (DE3) pLysS Codon Plus. С чашки Петри отбирали единичную колонию клеток, трансформированных плазмидой pNIC28-Bsa4-USP7, pNIC28-Bsa4-PPM1G, pET30B-PTEN или pET28-WIP1 и культивировали в течение 12-16 ч при 37 °С в среде LB в присутствии 30 мкг/мл канамицина и 25 мкг/мл хлорамфеникола. Для приготовления посевного материала клетки разбавляли свежей средой LB с антибиотиками в объемном соотношении 1:1 000 и культивировали при 37 °С до величины поглощения на длине волны 600 нм  $A_{600} \approx 0,6-0,8$ . Посевной материал (35 мл, 10 об%) переносили в конические колбы с отбойниками объемом 2 л с 315 мл свежей среды LB, содержащей 30 мкг/мл канамицин, и культивировали при 120 об/мин и температуре 30 °С. Индукцию экспрессии белков осуществляли при  $A_{600} \approx 0,8-1,0$  при добавлении в среду 0,1 мМ ИПТГ. Клетки культивировали в течение 10-16 часов после индукции и осаждали центрифугированием в течение 20 мин при 8 000 x g и 4 °С (центрифуга Beckman J-21). Полученный осадок хранили при -80 °С.

Для оценки уровня экспрессии белков в процессе культивирования каждые 2-4 ч отбирали пробы объемом 1 мл, клетки осаждали центрифугированием (3 мин, 6 800 x g). Осадок ресуспендировали в 200 мкл буфера для нанесения образцов (60 мМ Трис-НСl, 2 мас% SDS, 10 об% глицерин, 5 об%  $\beta$ -меркаптоэтанол, 0,2 мас% бромифеноловый голубой, рН 6,8), клетки разрушали с использованием ультразвукового дезинтегратора Branson W-185 (США) при охлаждении, клеточный дебрис осаждали центрифугированием и проводили анализ экспрессии белков методом SDS-электрофореза как описано в разделе “2.3.4. Белковый электрофорез в денатурирующих условиях”.

### 2.11.2. Экспрессия белков в клетках насекомых

Для экспрессии рекомбинантных белков использовали бакуловирус-инфицированные клетки насекомых *Spodoptera frugiperda* (штамм Sf9) согласно рекомендациям к экспрессионной системе Bac-to-Bac (Invitrogen, Великобритания) [Shrestha, B. *et al.*, 2008]. Рекомбинантную бакмидную ДНК (1 мкг) использовали для трансфекции  $2 \times 10^5$  клеток Sf9 в логарифмической фазе роста в соответствии с инструкциями производителя катионно-липидного реагента для трансфекции Cellfectin (Invitrogen, Великобритания). Для контроля трансфекции использовали необработанные клетки, а также клетки, обработанные Cellfectin в отсутствие ДНК. Трансфекцию проводили в течение 72-120 ч при 27 °С до появления явных признаков инфекции клеток Sf9, включающих увеличение размера и/или деформация (удлинение) инфицированных клеток и более низкую плотность инфицированных клеток в связи с их лизисом вирусными частицами. Клетки и клеточный дебрис после трансфекции осаждали центрифугированием (10 мин, 1 500 x g) и супернатант, содержащий вирусный сток P0, переносили в стерильные пробирки и использовали для последующей амплификации вирусного стока. Клетки Sf9 в логарифмической фазе роста ( $6 \times 10^6$  клеток) инфицировали 120 мкл вируса P0 и инкубировали в течение 48 ч при 450 об/мин и 27 °С. Полученный супернатант (вирусный сток P1) отделяли центрифугированием и использовали для последовательного получения вирусов P2 и P3. Вирусные стоки хранили при 4 °С в темноте.

Для оптимизации экспрессии белков клетки Sf9 в логарифмической фазе роста (3 мл  $2 \times 10^6$  или  $3 \times 10^6$  клеток/мл) инфицировали различными объемами вирусного стока P3 (60, 120 и 240 мкл) и культивировали в течение 48, 72 и 96 ч при 450 об/мин и 27 °С. Клетки осаждали центрифугированием (5 мин, 1 500 x g) и анализировали уровень экспрессии белков как описано в разделе “2.11.1. Экспрессия белков в клетках *E.coli*”.

Для масштабной экспрессии белков 250 мл клеток Sf9 ( $2 \times 10^6$  клеток/мл) инфицировали вирусным стоком P3 (5 мл) в конических колбах объемом 2 л и культивировали в течение 60 ч при 140 об/мин и 27 °С. Клетки, содержащие экспрессируемый белок с N-концевым 6x His-эпитопом, осаждали центрифугированием (25 мин, 1 500 x g) и замораживали при -80 °С перед очисткой. Супернатант, содержащий вирус, собирали и хранили без потери вирусного титра при 4 °С в темноте в течение 6 месяцев. Для длительного хранения при -80 °С к аликвотам вируса добавляли 5 об% FBS.

## 2.12. Очистка белков

### 2.12.1. Очистка рекомбинантных белков с 6х His-эпитопом

Осадок клеток Sf9 (~ 5 г биомассы), полученный из 500 мл инфицированной бакуловирусом культуры, размораживали на льду, ресуспендировали в 10-кратном объеме (~ 50 мл) охлажденного буфера А (20 мМ Трис-НСl, 0,5 М NaCl, 5 об% глицерин, 5 мМ имидазол, 1 об% нонидет Р40, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ФМСФ, рН 8,0) и разрушали с использованием ультразвукового дезинтегратора на льду. В случае *E.coli* BL21 (DE3) рLysS Codon Plus клетки (~ 5 г биомассы из 350 мл культуры) ресуспендировали в буфере А, содержащем 0,1 мг/мл лизоцима и инкубировали в течение 15 мин на льду перед разрушением клеток ультразвуком. Клеточный лизат осветляли центрифугированием (20 мин, 35 000 x g, 4 °С) с последующим фильтрованием через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм. Первичную очистку рекомбинантных белков с 6х His-эпитопом проводили методом метал-афинной хроматографии на Ni<sup>2+</sup>-сефарозе использованием автоматизированного хроматографа низкого давления ÄKТАFPLC (Pharmacia, Швеция). Клеточный лизат наносили на колонку HisTrap HP объемом 1 мл (GE Healthcare, США), промывали 10-15 мл буфера А и проводили десорбцию белка в линейном градиенте 5-500 мМ имидазола (20 объемов колонки), буфер А со скоростью 0,5 мл/мин. В случае неудовлетворительной очистки на Ni<sup>2+</sup>-сефарозе содержащие очищаемый белок целевые фракции объединяли (например, в случае HDM2), диализовали против буфера Б (20 мМ Трис-НСl, 50 мМ KCl, 5 об% глицерин, 1 мМ ДТТ, 0,1 мМ ФМСФ, рН 8,0) и очищали методом ионообменной хроматографии на колонке MonoQ HR 5/5 (Pharmacia, Швеция) с элюцией белка в линейном градиенте 0,05-1 М KCl (градиент 20 объемов колонки, скорость элюции 0,5 мл/мин). На заключительном этапе фракции, содержащие очищенный белок, диализовали против буфера для длительного хранения (50 мМ Трис-НСl, 50 мМ KCl, 10 об% глицерин, 1 мМ ЭДТА, рН 8,0) и хранили в аликвотах при -80 °С. Чистоту препаратов фермента на всех стадиях определяли методом белкового SDS-электрофореза как описано в разделе “2.3.4. Белковый электрофорез в денатурирующих условиях”.

### 2.12.2. Очистка рекомбинантных белков с GST-эпитопом

Очистку рекомбинантных белков с GST-эпитопом проводили аналогичным вышеописанному образом (раздел “2.12.1. Очистка рекомбинантных белков с

6x His-эпитопом”). Клетки *E.coli* лизировали в ФБС с добавлением 5 об% глицерина, 1 мМ ДТТ, 1 мМ ФМСФ и 0,1 мг/мл лизоцима в течение 15 мин на льду с последующим разрушением ультразвуком. Клеточный лизат осветляли и наносили на колонку GStrap FF (GE Healthcare, США). Десорбцию белка проводили в свежеприготовленном буфере для элюции (50 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 5 об% глицерин, 10 мМ глутатион, pH 8,0).

### 2.12.3. Определение киназы и фосфатазы для USP7S

Для выделения киназы и фосфатазы, использующих USP7S в качестве субстрата, проводили хроматографическое фракционирование клеточного содержимого. Осадок клеток HeLa (~ 20 г) использовали для приготовления цельного клеточного экстракта как описано в разделе “2.3.1. Приготовление цельных клеточных экстрактов”. Полученный экстракт диализовали против буфера А (50 мМ Трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, 5 об% глицерин, 1 мМ ДТТ, 0,1 мМ ФМСФ, pH 8,0), содержащего 150 мМ KCl, и наносили на колонку XK 50/30 (Pharmacia, Швеция) с фосфоцеллюлозой P11 (Whatman, США). Фракцию несвязавшихся белков (Ф150) сохраняли для последующего анализа. Десорбцию белков с колонки проводили в буфере А, содержащем 1 М KCl (фракция Ф1000). Фракцию Ф1000, содержащую USP7S-киназную активность диализовали против буфера А, содержащего 50 мМ KCl, и фракционировали на колонке HiTrapQ HP объемом 5 мл (GE Healthcare, США) в линейном градиенте 0,05-1 М KCl, буфер А. Активные фракции объединяли, концентрировали с использованием центрифужного концентратора Amicon Ultra-10 (Millipore, США) и подвергали аналитической гель-фильтрации на колонке HR 10/30 с носителем Superdex 200 (Pharmacia, Швеция) в буфере А, содержащем 150 мМ KCl. Пул активных фракций затем наносили на Mono Q HR 5/5 объемом 1 мл (Pharmacia, Швеция) в том же буфере с последующей элюцией связавшихся белков в линейном градиенте соли (150-700 мМ KCl), буфер А. После объединения активных фракций и диализа против буфера Б (5 мМ фосфат калия, 5 об% глицерин, pH 7,0) проводили заключительную стадию фракционирования на колонке HR 5/5 (Pharmacia, Швеция) с керамическим гидроксипатитом типа СНТ (Bio-Rad, США). Десорбцию белков проводили в градиенте фосфатной соли 5-500 мМ, буфер Б. Активность киназ в каждой из полученных фракций анализировали как описано ниже в разделе “2.13.1 Анализ активности киназ” с использованием дефосфорилированного USP7S в качестве субстрата.



В случае выделения USP7S-фосфатазной активности использовали аналогичную последовательность фракционирования за исключением хроматографии на Mono Q HR 5/5. Активность фракций анализировали с использованием фосфорилированного USP7S в качестве субстрата (раздел “2.13.2 Анализ активности фосфатаз”).

## 2.13. *In vitro* реакции

### 2.13.1. Анализ активности киназ

Для приготовления субстрата для *in vitro* анализа активности киназ очищенный рекомбинантный USP7<sub>S</sub> (100 пмоль) обрабатывали 50 Ед щелочной фосфатазы из креветок (USB Corporation, США) в течение 1 ч при 37 °С в буфере, содержащем 20 мМ Трис-НСl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, рН 8,0. К реакционной смеси добавляли NaCl и имидазол до конечной концентрации 0,5 М и 5 мМ, соответственно, и наносили на колонку HisTrap HP объемом 1 мл (GE Healthcare, США). Десорбцию дефосфорилированного USP7S проводили в буфере А с добавлением 250 мМ имидазола. Полученный раствор белка диализовали (50 мМ Трис-НСl, 50 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 10 об% глицерин, рН 8,0), концентрировали и хранили в аликвотах при -80 °С. Эффективность реакции дефосфорилирования контролировали иммуноблотингом с антителами против USP7S, фосфорилированного по аминокислотному остатку Ser18 (pUSP7S).

Для *in vitro* анализа активности киназ рекомбинантный дефосфорилированный USP7S (USP7S<sup>дефос</sup>, 1 пмоль) инкубировали с фракцией после хроматографии (2-5 мкл) в буфере для фосфорилирования (20 мМ Трис-НСl, 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, 5 об% глицерин, 1 мМ АТФ, 5 мМ NaF, 1 мМ Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 мМ Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, 1 мМ β-глицерофосфат натрия, рН 7,4). Реакцию проводили в течение 30-60 мин при 300 об/мин и 30 °С в термостатируемом миксере Thermomixer Comfort (Eppendorf, Германия). Реакцию останавливали добавлением буфера для нанесения образцов и анализировали методами белкового SDS-электрофореза и иммуноблотинга с первичными антителами pUSP7S (разделы “2.3.4. Белковый электрофорез в денатурирующих условиях” и “2.3.6. Иммуноблотинг”).

### 2.13.2. Анализ активности фосфатаз

Для *in vitro* анализа активности фосфатаз рекомбинантный USP7<sub>S</sub> (1 пмоль) инкубировали с хроматографической фракцией, рекомбинантными фосфатазами PPM1G, PTEN

и WIP1, очищенными из клеток *E.coli*, или PPM1G, полученной с использованием системы для *in vitro* экспрессии (Wheat Germ Expression System, Abnova, Тайвань). Реакции проводили в буфере для дефосфорилирования (50 мМ Трис-НСl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2 мМ ЭГТА, 0,1 об% β-меркаптоэтанол, 100 мкг/мл БСА, 10 мМ стауроспорин, 10 мМ 4,5,6,7-тетрабром-1H-бензотриазол, рН 7,4) в течение 30-60 мин при 300 об/мин и 30 °С.

Для фосфорилирования рекомбинантной PPM1G, очищенной из клеток *E.coli*, 3 пмоль фермента инкубировали с очищенной рекомбинантной АТМ (любезный дар Т. Paull) в буфере, содержащем 50 мМ ХЕПЕС, 50 мМ KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ MnCl<sub>2</sub>, 1 мМ АТФ, 1 мМ ДТТ, 5 об% глицерин, рН 7,5 в течение 1,5 ч при 300 об/мин и 30 °С. В качестве контроля проводили аналогичную реакцию в отсутствие АТМ. Полученную реакционную смесь использовали в реакции *in vitro* дефосфорилирования USP7<sub>S</sub>.

### 2.13.3. *In vitro* убиквитинилирование и деубиквитинилирование

Для самоубиквитинилирования очищенный рекомбинантный MULE (25 пмоль) инкубировали в присутствии 7 пмоль убиквитин-активирующего фермента E1, 65 пмоль убиквитин-конъюгирующего фермента UbcH7 и 6 пмоль убиквитина в буфере для убиквитинилирования (25 мМ Трис-НСl, 4 мМ АТФ, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 200 мМ CaCl<sub>2</sub>, 1 мМ ДТТ, 10 мМ MG-132, рН 8,0) в течение 1 ч при 300 об/мин и 30 °С. Для удаления убиквитина и UbcH7 реакционную смесь переводили в буфер для деубиквитинилирования (50 мМ Трис-НСl, 150 мМ KCl, 1 мМ ЭДТА, 5 об% глицерин, 2 мМ ДТТ, рН 8,0) с использованием центрифужного концентратора Amicon Ultra-30 (Millipore, США).

Для *in vitro* деубиквитинилирования убиквитинилированный MULE (0,6 пмоль) инкубировали с равными количествами USP7<sub>S</sub> дикого типа или каталитически неактивного мутантного USP7<sub>S</sub><sup>C223S</sup> (1,2 и 2,4 пмоль) в буфере для деубиквитинилирования в течение 30 мин при 300 об/мин и 30 °С. Реакцию останавливали добавлением буфера для нанесения образцов и анализировали методами белкового SDS-электрофореза и иммуноблотинга (разделы “2.3.4. Белковый электрофорез в денатурирующих условиях” и “2.3.6. Иммуноблотинг”).

## 2.14. Тандемная масс-спектрометрия

Для осаждения белков использовали смесь хлороформа с метанолом с их последующим гидролизом трипсином в растворе [Wessel, D. & Flugge, U.I., 1984]. Гидролизат обессоливали с

использованием картриджей C18 Sep-Pack в соответствии с инструкцией производителя (Waters, США), концентрировали с использованием вакуумного концентратора SpeedVac (Thermo Scientific, США). В качестве альтернативы белки разделяли методом белкового электрофореза в денатурирующих условиях как описано в разделе “2.3.4. Белковый электрофорез в денатурирующих условиях”. Полоски окрашенного Кумасси R-250 геля, содержащие белок, использовали для гидролиза трипсином в геле [Borodovsky, A. *et al.*, 2002]. Гидролизованный материал анализировали методом tandemной жидкостной хромато-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС/МС) с использованием либо ионной ловушки высокой емкости HCTplus (Bruker Daltonics, Германия) [Batycka, M. *et al.*, 2006], либо хроматографической системы NanoAcquity UPLC, объединенной с квадрупольным времяпролетным tandemным хромато-масс-спектрометром QTOFpremier (Waters, США). Интерпретацию полученных данных проводили в соответствии с общепринятыми рекомендациями [Taylor, G.K. & Goodlett, D.R., 2005]. Поиск гомологов по спектрам фрагментации МС/МС проводили с использованием базы данных SwissProt (версия 54.0, июль 2007, количество записей 276256) и программы Mascot версии 2.2. Спектры МС/МС индивидуальных пептидов с параметром достоверности менее 40 (значение параметра Expect < 0,015) анализировали вручную и считали статистически достоверными только если наблюдалось соответствие сигнала масс-спектра серии из 4-х последовательных ионов у или b. Эксперименты по масс-спектрометрии проводились в сотрудничестве с лабораторией профессора В. Kessler (Оксфордский университет, Великобритания).

## **2.15. Метод ДНК-комет**

### **2.15.1.Щелочной вариант**

Щелочной вариант гель-электрофореза единичных клеток (метод ДНК-комет) использовали для оценки уровня и кинетики репарации щелочеллабильных повреждений, одно- и двунцепочечных разрывов ДНК. Анализ проводили по ранее описанному методу с некоторыми модификациями [Olive, P.L. & Vanath, J.P., 2006]. Суспензию клеток в экспоненциальной фазе роста ( $2 \times 10^5$  клеток/мл) обрабатывали агентом, повреждающим ДНК, на льду. Для этого использовали 35 мкМ пероксид водорода в ФБС в течение 5 мин, 2 Гр ионизирующей радиации или 0,5 мМ ММС в течение 30 мин. Обработку клеток ММС

проводили в монослое с последующей 2-кратной промывкой ФБС и трипсинизацией. Затем к суспензии клеток (250 мкл) добавляли 1 мл 1 мас% низкоплавкой агарозы в ФБС (Acros Organics, Бельгия) при 37 °С, тщательно перемешивали пипетированием, наносили 1 мл суспензии на предметное стекло, предварительно покрытое 1 мас% раствором агарозы в дистиллированной воде, и накрывали покровным стеклом. Препарат помещали на лед в течение 2 мин и инкубировали в течение требуемого времени в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 5 % CO<sub>2</sub>, влажности не менее 95 % и температуре 37 °С для изучения кинетики репарации повреждений ДНК. Затем покровное стекло снимали и помещали препарат в свежеприготовленный буфер для щелочного лизиса (10 мМ Трис, 2,5 М NaCl, 100 мМ ЭДТА, 1 об% ДМСО, 1 об% Тритон X-100, pH 10,5) в течение 1 ч при 4 °С в темноте. Для релаксации ДНК препарат инкубировали в свежеприготовленном охлажденном буфере для электрофореза (300 мМ NaOH, 1 мМ ЭДТА, 1 об% ДМСО) в течение 30 мин в темноте и затем проводили электрофорез при напряжении 1,2 В/см в течение 25 мин. Препарат трижды промывали в буфере для нейтрализации (0,5 М Трис-HCl, pH 8,0) и проводили окрашивание ДНК с использованием SYBR Gold (1:10 000; Invitrogen, Великобритания) в течение 30 мин в темноте.

Визуализацию и регистрацию ДНК-комет осуществляли с использованием флуоресцентного микроскопа Zeiss 2M (Zeiss, Германия), оснащенного цифровой камерой AxioCam MRc. Для анализа ДНК-комет готовили два независимых образца каждого препарата и анализировали 150 клеток/образец или 300 клеток/препарат. Подсчет ДНК-комет проводили слепым методом с использованием программы Comet 5.5 (Andor Technology, Великобритания). Относительный уровень повреждений оценивали по процентной доле ДНК в хвосте кометы.

### **2.15.2. Условия нейтрального лизиса**

Приготовление ДНК-комет в условиях нейтрального лизиса проводили аналогично щелочному варианту метода. Препарат лизировали в буфере для нейтрального лизиса (10 мМ Трис, 2,5 М NaCl, 100 мМ ЭДТА, 1 мас% лаурилсаркозинат натрия, 10 об% ДМСО, 0,5 об% Тритон X-100, pH 9,5) в течение 2 ч при 4 °С в темноте. В качестве буфера для электрофореза использовали 90 мМ Трис-борат, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0.

## 2.16. Статистический анализ

Для проверки гипотезы о нормальном распределении экспериментальных данных использовали критерий Шапиро-Уилка [Shapiro, S.S. & Wilk, M.B., 1965]. Статистические данные представлены в виде среднее  $\pm$  стандартное отклонение для 3-х и более независимых биологических экспериментов. Сравнение данных для совокупностей с нормальным распределением и равными дисперсиями проводили с использованием парного t-критерия Стьюдента. Для анализа данных совокупностей с распределением, отличающимся от нормального, использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни [Mann, H.B. & Whitney, D.R., 1947]. Статистически значимыми считали различия данных при  $p < 0,05$ . Статистическую обработку результатов осуществляли с использованием пакета программ SPSS Statistics 18.0 (SPSS Inc., США).

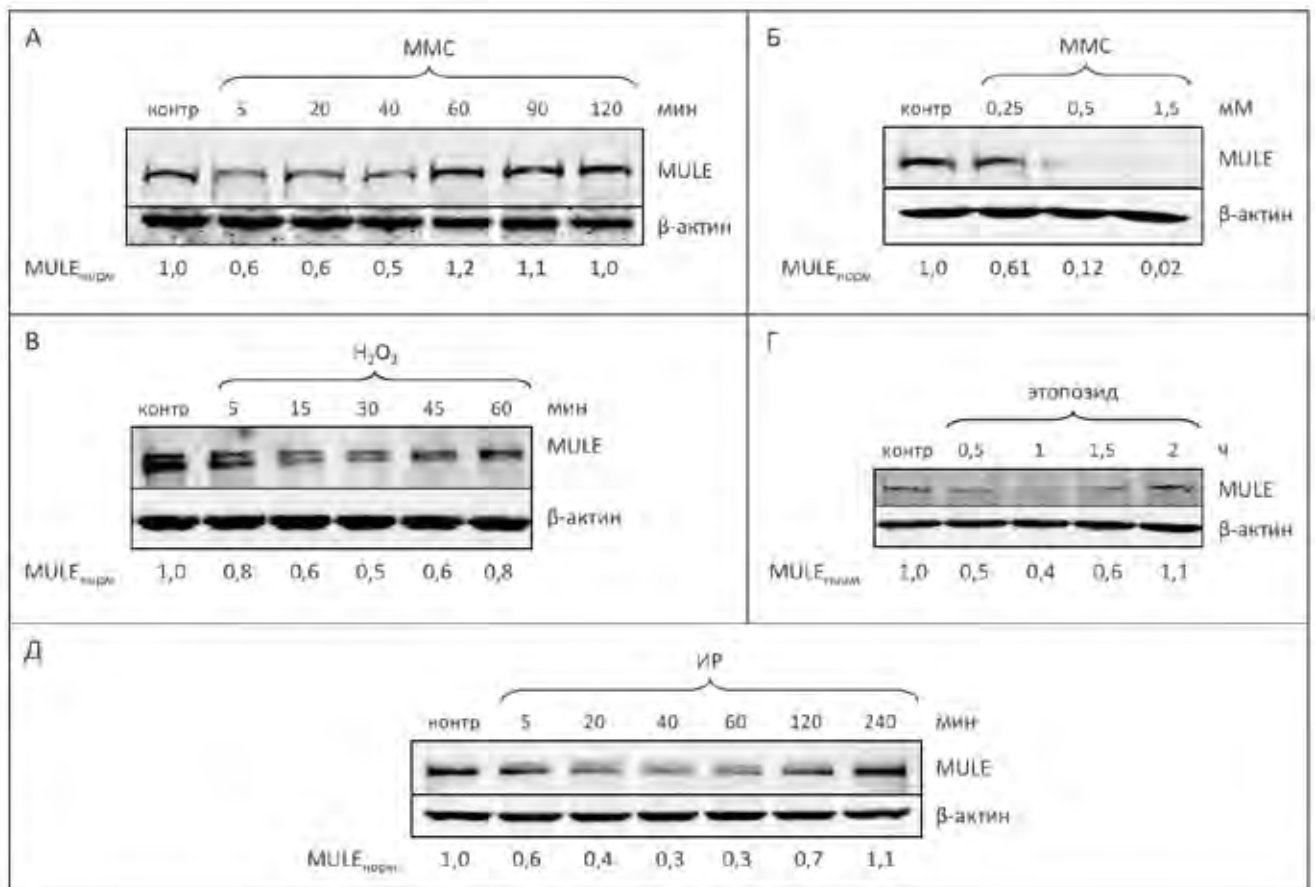
## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Регуляция клеточного уровня содержания E3-убиквитинлигазы MULE

Выживание живых организмов определяется их способностью к размножению, необходимой компонентой которого является корректное удвоение генетического материала. Для исправления ошибок в последовательности ДНК и поддержания стабильности генома в процессе эволюции возникли разнообразные системы клеточного ответа на повреждения ДНК и ее репарации. Многие из таких систем являются частично перекрывающимися с функциональной точки зрения: например, функция сигнализации нерепарированных ДР может выполняться протеинкиназами ATM и ДНК-РКcs, тогда как репарация ДР может осуществляться по механизмам негомологичного соединения концов или гомологичной рекомбинации (раздел “1.2. Целостность генома”). Принимая во внимание частоту возникновения эндогенных повреждений ДНК и их негативный эффект на процессы жизнедеятельности клетки, было выдвинуто предположение о существовании многочисленных перекрывающихся механизмов, обеспечивающих передачу сигнала от поврежденных оснований и одноцепочечных разрывов ДНК к соответствующим системам ЭРО и ОР-репарации. Из подобных систем на данный момент нами впервые была предложена система ARF-зависимой регуляции активности E3-убиквитинлигазы MULE, которая, в свою очередь, обеспечивает модуляцию эффективности ЭРО и ОР-репарации в ответ на долговременное накопление нерепарированных разрывов ДНК [Orlando, G. *et al.*, 2014]. Следуя данному предположению, а также учитывая в некотором смысле узкую специализацию вышеупомянутой системы и наличие ARF-независимого(-ых) механизма(-ов) передачи сигнала от поврежденных оснований и ОР к системам их репарации (подробно смотри раздел “1.4.3. MULE-зависимая регуляция ЭРО и репарации ОР”), была выдвинута гипотеза о существовании основной, хотя, возможно, и в некоторой степени функционально перекрывающейся с вышеупомянутым ARF-зависимым механизмом, системы регуляции белкового уровня содержания MULE, которая индуцируется повреждениями ДНК и, таким образом, позволяет динамически регулировать уровень экспрессии ферментов ЭРО и ОР-репарации в зависимости от количества повреждений ДНК.

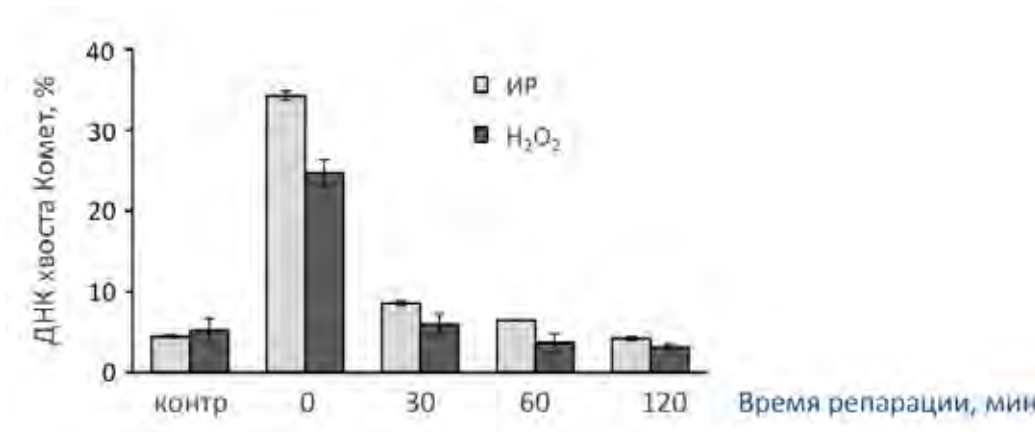
### 3.1.1. Негативная регуляция MULE в ответ на повреждения ДНК и ее значимость

Для проверки гипотезы о регуляции белкового уровня MULE в зависимости от количества повреждений ДНК была проведена обработка человеческих клеток остеосаркомы U-2 OS и карциномы кишечника HCT116  $p53^{+/+}$  различными агентами, вызывающими повреждения ДНК, с последующей детекцией MULE методом иммуноблотинга в течение различных интервалов времени после обработки (Рисунок 3.1). Было обнаружено значительное снижение клеточного уровня экспрессии MULE (40-50 %) в течение 15-60 мин после обработки клеток метилметансульфонатом, пероксидом водорода, этопозидом и ионизирующей радиацией (Рисунок 3.1) с последующим восстановлением содержания белка до исходного в течение 2-4 ч.



**Рисунок 3.1.** Кинетика изменения клеточного уровня содержания MULE в ответ на обработку клеток человека повреждающими ДНК агентами. Клетки (А-Б) U-2 OS и (В-Д) HCT116  $p53^{+/+}$  подвергали обработке (А) 250 мкМ метилметансульфоната (ММС) в течение 1 ч, (Б) 0,25-1,5 мМ ММС в течение 40 мин, (В) 150 мкМ пероксида водорода ( $H_2O_2$ ) в течение 15 мин, (Г) 10 мкМ этопозид в течение 1 ч и (Д) 8 Гр ионизирующей радиации (ИР). После обработки среду для культивирования меняли, и клетки инкубировали в присутствии 5 %  $CO_2$  и 37 °С в течение указанных интервалов времени. В качестве контроля (контр) использовали клетки, обработанные аналогично вышеописанному, в отсутствие повреждающих ДНК агентов. Клетки собирали, проводили экстракцию белков и разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с антителами к MULE. Денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по  $\beta$ -актину.

Следует отметить, что репарация большинства повреждений ДНК, индуцированных вышеупомянутыми реагентами (повреждения оснований и разрывы ДНК), осуществляется в течение порядка 2 ч (Рисунок 3.2), что согласуется с временными рамками, в течение которых наблюдается восстановление белкового содержания MULE до исходного. Данное наблюдение в совокупности со значимой функцией MULE в регуляции стационарного клеточного уровня экспрессии POL  $\beta$  [Parsons, J.L. *et al.*, 2009] и POL  $\lambda$  [Markkanen, E. *et al.*, 2011], необходимых для эффективной репарации модифицированных оснований ДНК и ОР, указывает на возможную роль негативной регуляции данной E3-убиквитинлигазы в ответ на генотоксический стресс в обеспечении повышенного клеточного уровня содержания данных ДНК-полимераз. В поддержку выдвинутой гипотезы говорит наблюдение о повышении эффективности репарации ДНК в клетках, где экспрессия MULE была подавлена при использовании специфических кнРНК [Parsons, J.L. *et al.*, 2009]. Более того, подобный эффект отсутствовал при обработке эмбриональных фибробластов мыши с нокаутом гена *Pol  $\beta$*  (*Pol  $\beta$ <sup>-/-</sup>*) пероксидом водорода, то есть повышение эффективности репарации ДНК в отсутствие MULE зависит от клеточной функции POL  $\beta$ .

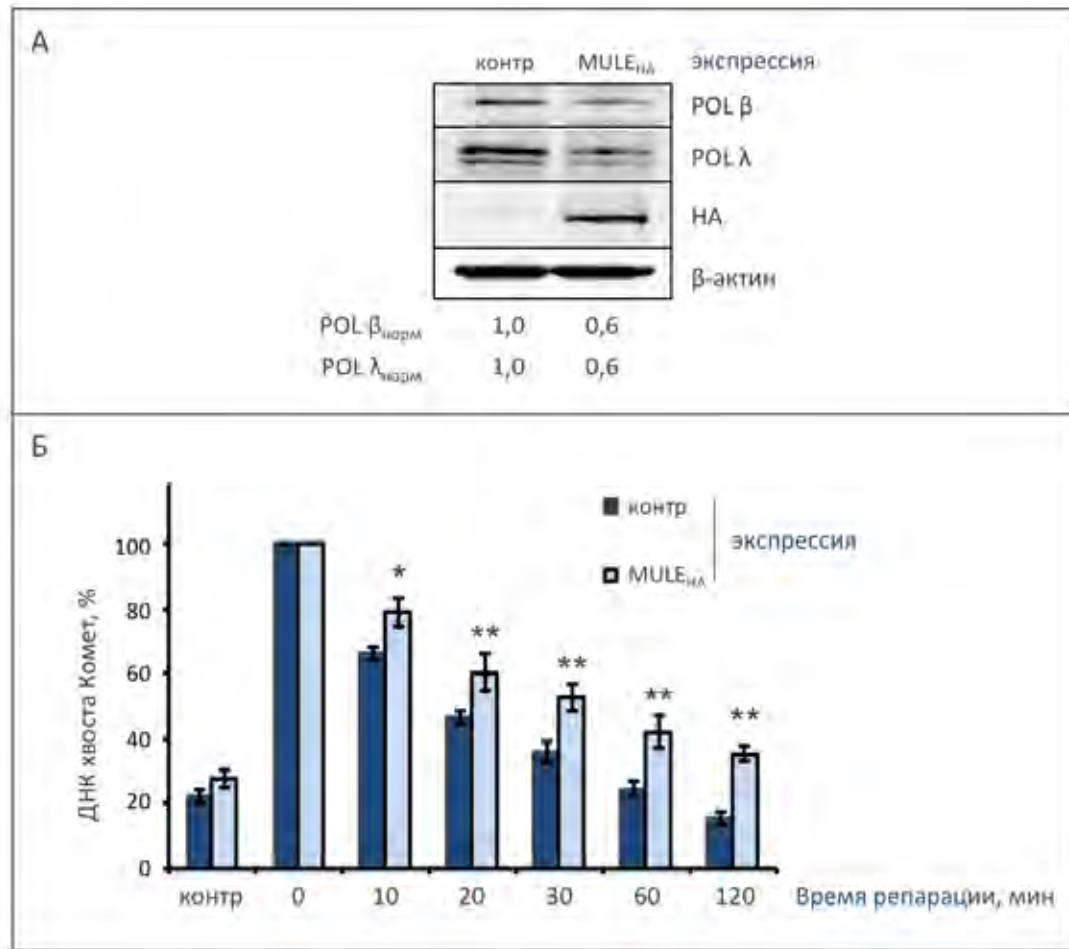


**Рисунок 3.2.** Кинетика репарации повреждений ДНК клетками NCT116 p53<sup>+/+</sup>. Повреждения ДНК индуцировали обработкой клеток 25 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 5 мин и 8 Гр ионизирующей радиации (ИР). В качестве контроля (контр) использовали необработанные клетки. Эффективность репарации определяли методом ДНК-комет в условиях щелочного лизиса.

В соответствии с вышесказанным было высказано предположение, что, если снижение содержания MULE в ответ на повреждения ДНК необходимо для повышения эффективности репарации, то избыточная экспрессия данной E3-убиквитинлигазы должна негативно повлиять на репарацию ДНК в ответ на генотоксический стресс. Действительно, при частичном блокировании негативной регуляции MULE в ответ на повреждения ДНК путем избыточной



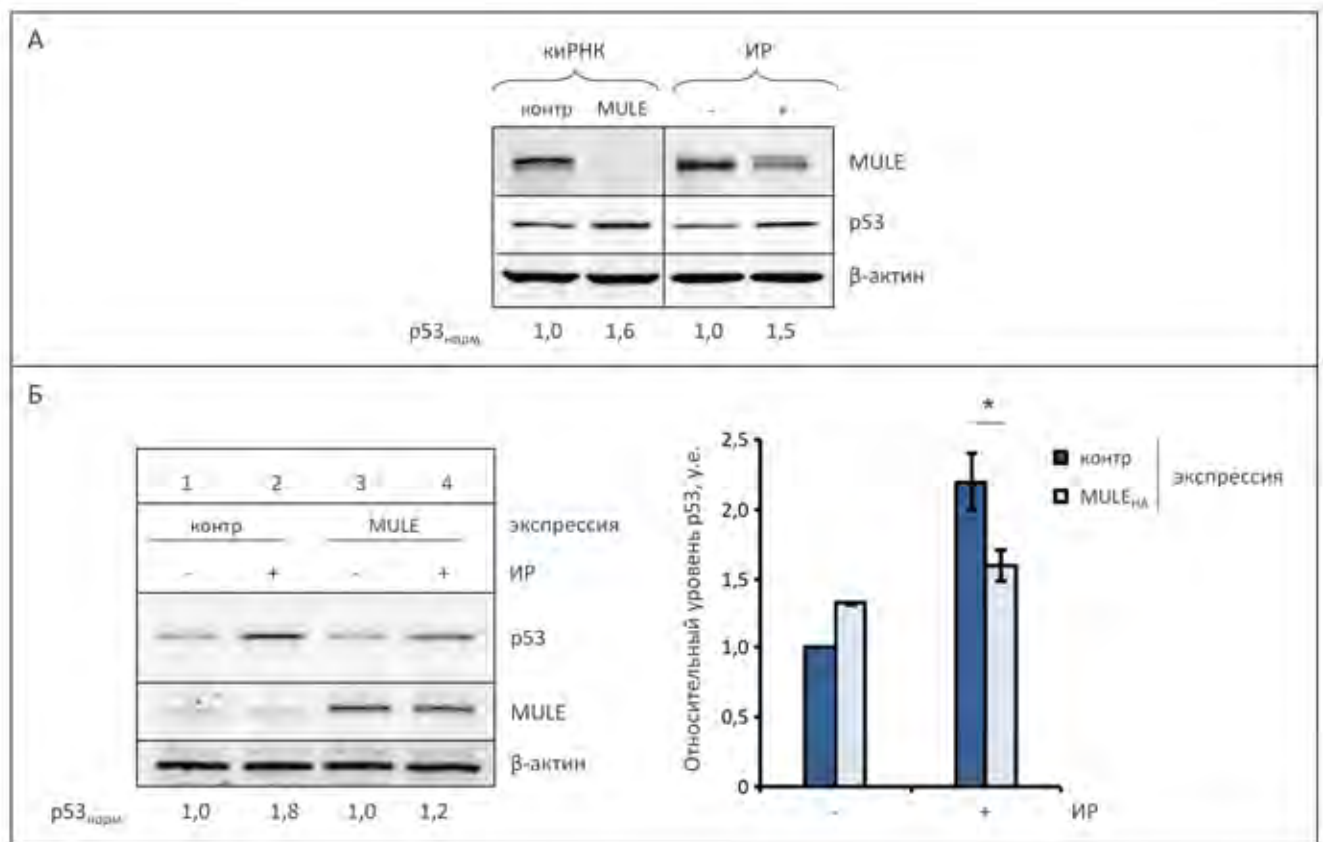
экспрессии MULE с HA-эпитопом в клетках НСТ116 p53<sup>+/+</sup> наблюдается уменьшение количества ферментов POL  $\beta$  и POL  $\lambda$  (Рисунок 3.3 А) и соответствующее снижение эффективности репарации ДНК после обработки клеток пероксидом водорода (Рисунок 3.3 Б).



**Рисунок 3.3.** Эффективность репарации ДНК в клетках с избыточным уровнем экспрессии MULE. **А-Б.** Клетки НСТ116 p53<sup>+/+</sup> трансфицировали 1 пмоль плазмидной ДНК, кодирующей ген *MULE* с HA-эпитопом, в течение 24 ч. В качестве контроля использовали ДНК экспрессионного вектора, не кодирующего гена белка (контр). Экстрагированные белки разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по  $\beta$ -актину. **Б.** Повреждения ДНК индуцировали обработкой клеток 25 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 5 мин, и исследовали кинетику репарации методом ДНК-комет в условиях щелочного лизиса. В качестве контроля (контр) использовали необработанные клетки. Представлены данные 3-х независимых экспериментов, \* $P < 0,01$ , \*\* $P < 0,001$ .

Более того, подобная регуляция E3-убиквитинлигазы MULE, очевидно, является частью более глобальной системы передачи сигнала от поврежденной ДНК к ЭРО, детальное исследование механизма которой является целью данного исследования. Было показано, что снижение содержания MULE с использованием киРНК-нокдауна или в ответ на обработку клеток ионизирующей радиацией, приводит к накоплению p53, что находится в соответствии с

тем, что супрессор опухолевого роста p53 является субстратом E3-убиквитинлигазной активности MULE (Рисунок 3.4 А). Основной общепринятой функцией стабилизации p53 в данном контексте является регуляция клеточного цикла и индукция p53-зависимого апоптоза в случае невозможности качественной и/или своевременной репарации повреждений ДНК [Chen, D. *et al.*, 2005; Kon, N. *et al.*, 2012]. Поэтому была предложена гипотеза, суть которой заключается в том, что в дополнение к стимуляции репарации ДНК снижение клеточного уровня экспрессии MULE в ответ на генотоксический стресс вносит свой вклад в активацию p53-зависимого клеточного ответа на повреждения ДНК.



**Рисунок 3.4.** Эффективность репарации ДНК в клетках с избыточным уровнем экспрессии MULE. **А-Б.** Клетки HCT116 p53<sup>+/+</sup> трансфицировали 1 пмоль плазмидной ДНК, кодирующей ген *MULE* с HA-эпитопом, в течение 24 ч. В качестве контроля использовали ДНК экспрессионного вектора, не кодирующего гена белка (контр). Экстрагированные белки разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по β-актину. **Б.** Повреждения ДНК индуцировали обработкой клеток 8 Гр ионизирующей радиацией (ИР). В качестве контроля (контр) использовали необработанные клетки. Относительные значения белкового клеточного содержания p53 рассчитаны по данным 3-х независимых экспериментов, \**P* < 0,001.

Было показано, что избыточная экспрессия MULE ограничивает стимуляцию клеточного уровня содержания p53 в ответ на облучение клеток человека ионизирующей радиацией, что

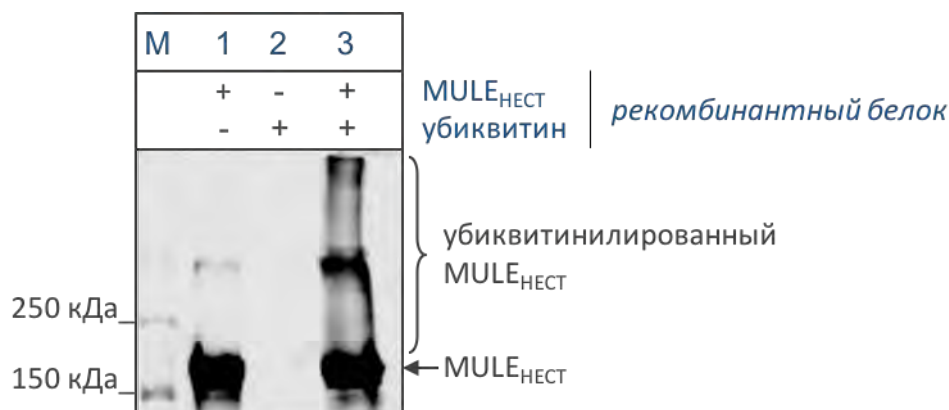
согласуется с выдвинутой гипотезой (Рисунок 3.4 Б, дорожка 4 по сравнению с дорожкой 2 левой панели и численные значения правой панели). Следует отметить, что такое ограничение индукции p53 является лишь частичным, поскольку регуляция содержания p53 в ответ на генотоксический стресс является принципиально важным процессом, и потому осуществляется в соответствии с многочисленными механизмами (раздел “1.4.2. E3-убиквитинлигаза MULE и p53-зависимый ответ на повреждения ДНК” и [Lakin, N.D. & Jackson, S.P., 1999]).

Таким образом, было установлено, что клеточный уровень содержания E3-убиквитинлигазы MULE временно снижается в ответ на увеличение эффективного количества повреждений ДНК. Подобная регуляция обеспечивает пониженное MULE-зависимое убиквитинилирование и, соответственно, повышенную стабильность (или время полужизни) субстратов данной E3-убиквитинлигазы, среди которых находятся ферменты репарации POL  $\beta$  и POL  $\lambda$ , а также супрессор опухолевого роста p53. Данный эффект наблюдается в течение относительно короткого временного промежутка, необходимого для репарации ДНК и p53-зависимой сигнализации повреждений ДНК, после чего регуляторная петля замыкается: клеточный уровень содержания MULE увеличивается до исходного, также как и убиквитинилирование с последующей протеасомной деградацией субстратов данной E3-убиквитинлигазы. Следует отметить, что вышеописанная модуляция клеточного уровня экспрессии MULE в ответ на повреждения ДНК происходит на уровне регуляции стабильности белка, а не на уровне транскрипции и/или трансляции, поскольку в присутствии ингибитора протеасомы MG-132 подобного эффекта не наблюдалось. На сегодня механизм, согласно которому осуществляется детекция эффективного количества повреждений ДНК и передача сигнала от белка-детектора повреждений к эффектору (-ам), регулирующим внутриклеточное содержание MULE, остается неясным, и его исследование является целью настоящей работы.

Для понимания системы клеточной регуляции количества MULE в ответ на повреждения ДНК в первую очередь требовалось установить механизм регуляции стационарного белкового уровня содержания MULE или, другими словами, его стабильности в отсутствие экзогенных повреждений ДНК.

### 3.1.2. Убиквитин-зависимая регуляция стационарного уровня содержания MULE

Многие E3-убиквитинлигазы могут подвергаться самоубиквитинилированию, что является сигналом для их деградации протеасомой 26S [de Vlie, P. & Ciechanover, A., 2011], из которых MULE не является исключением. При инкубации очищенного рекомбинантного С-концевого фрагмента MULE (аминокислоты 1891-4374), содержащего каталитический НЕСТ-домен, в присутствии АТФ и рекомбинантных убиквитина и ферментов E1 и E2, наблюдается самоубиквитинилирование данной E3-убиквитинлигазы (Рисунок 3.5, дорожка 3 и [Chen, D. *et al.*, 2005]). Следует отметить, что в исходном препарате очищенного MULE<sub>НЕСТ</sub> и смеси рекомбинантных убиквитина и ферментов E1 и E2 отсутствуют сколько-нибудь значимые количества убиквитинилированных форм с молекулярной массой 250 кДа и выше (Рисунок 3.5, дорожки 1 и 2, соответственно).



**Рисунок 3.5.** Самоубиквитинилирование E3-убиквитинлигазы MULE. Очищенный рекомбинантный С-концевой фрагмент MULE, содержащий каталитический НЕСТ-домен (25 пмоль), инкубировали в присутствии 7 пмоль убиквитин-активирующего фермента E1, 65 пмоль убиквитин-конъюгирующего фермента UbcH7, 6 пмоль убиквитина и 4 мМ АТФ в буфере для убиквитинилирования в течение 1 ч при 300 об/мин и 30 °С. Реакционные смеси разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблоттингом и гибридизацией с антителами к MULE<sub>НЕСТ</sub>; М – белковый маркер.

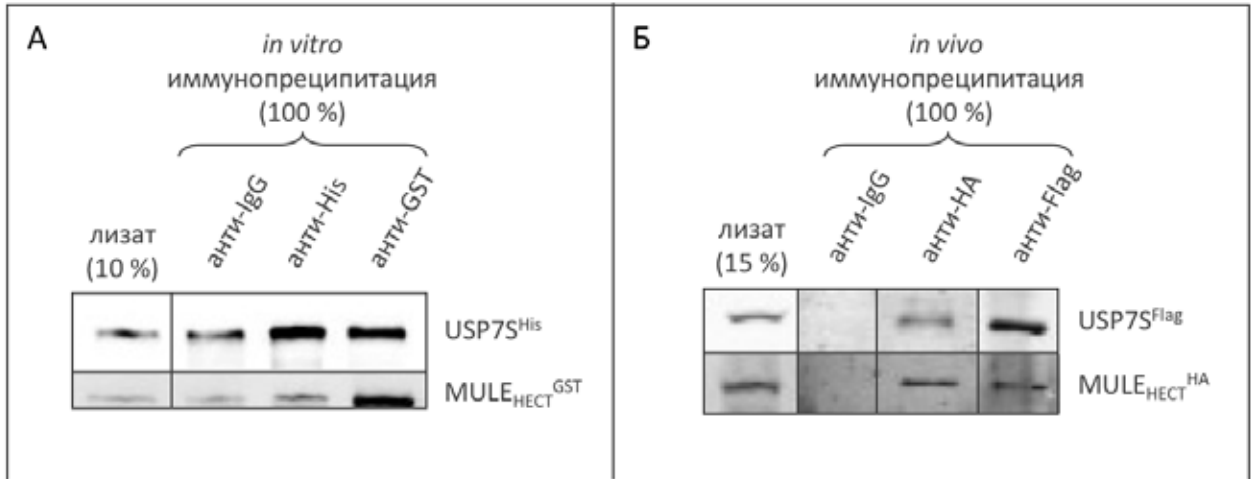
В клетке подобное самоубиквитинилирование MULE может являться сигналом для убиквитин-зависимого гидролиза белка протеасомой, которому обычно противопоставлен процесс деубиквитинилирования для поддержания некоей положительной стационарной концентрации фермента [Wilkinson, K.D., 2000]. При проведении глобального протеомного анализа белков, ассоциированных с различными деубиквитинилирующими ферментами клеток человека, было показано, что MULE может взаимодействовать с убиквитин-специфической

протеазой USP7, указывая на возможную роль данного деубиквитилирующего фермента в регуляции стабильности MULE [Sowa, M.E. *et al.*, 2009].

Перед дальнейшим описанием проведенных экспериментов следует отметить, что в данной работе, как и в случае большинства приведенных в научной литературе работ, для трансфекции клеток животных использовали плазмидную ДНК, кодирующую специфическую изоформу гена *USP7*, которая в дальнейшем упоминается как USP7S (раздел “3.2.1. Специфическая изоформа USP7 (USP7S) фосфорилирована по остатку S18”). Данную плазмидную ДНК использовали для получения рекомбинантного фермента дикого типа USP7S и его мутантных форм. Именно изоформа USP7S была описана в литературе как обладающая деубиквитилирующей активностью протеаза USP7, субстратом которой является E3-убиквитинлигаза HDM2, являющаяся одним из основных регуляторов клеточного содержания опухолевого супрессора p53 [Brooks, C.L. *et al.*, 2007; Li, M. *et al.*, 2004; Meulmeester, E. *et al.*, 2005]. Для идентификации возможного взаимодействия между MULE и USP7 использовали экспрессирующий вектор, кодирующий *USP7S* [Sowa, M.E. *et al.*, 2009]. Для модуляции содержания фермента использовали кРНК, связывающуюся с мРНК транскрипционного варианта 1 *USP7* (идентификатор базы данных NCBI: NM\_003470.2), при трансляции которого продуцируется изоформа USP7S, либо кРНК против всех известных мРНК *USP7* (всего 5 последовательностей, одна из которых не является кодирующей), включая транскрипционный вариант 1 (*USP7<sub>total</sub>*-кРНК). Наконец, для детекции USP7 методами иммуноблоттинга и иммунофлуоресцентного анализа использовали антитела, распознающие либо специфическую изоформу белка (USP7S), либо все идентифицированные изоформы фермента (*USP7<sub>total</sub>*). В каждом случае использовали соответствующие обозначения.

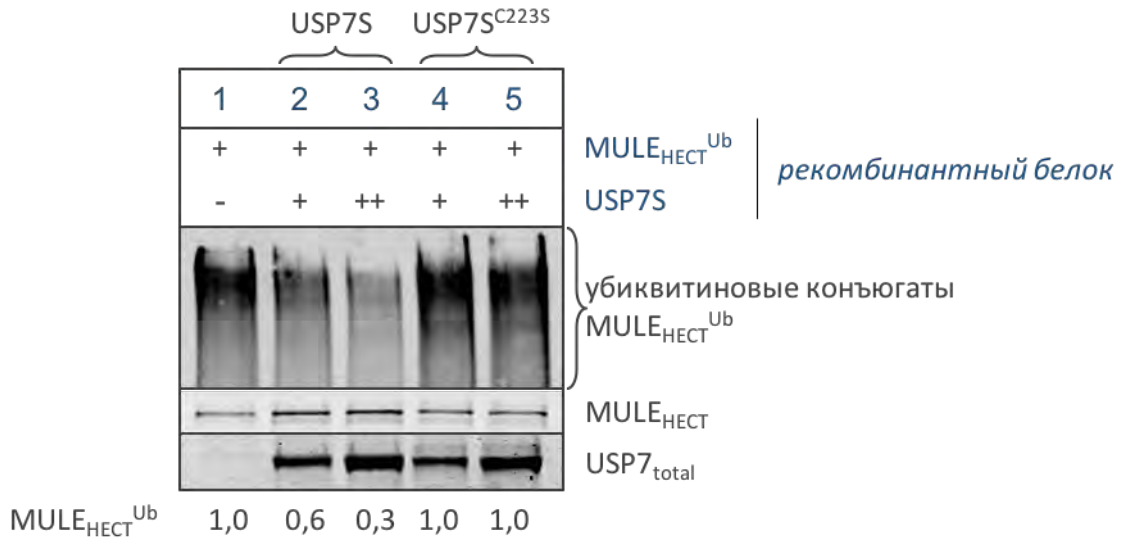
Для проверки существования взаимодействия между MULE и USP7S был использован метод коиммунопреципитации *in vitro* и *in vivo* (Рисунок 3.6). В первом случае проводили коиммунопреципитацию очищенных рекомбинантных MULE<sub>HECT</sub> и USP7S, экспрессированных с эпитопами His и GST, соответственно (Рисунок 3.6 А). При использовании анти-His-эпитоп антител наблюдалась эффективная иммунопреципитация USP7S<sup>His</sup> и коиммунопреципитация некоторого количества MULE<sub>HECT</sub><sup>GST</sup>, и, наоборот, при иммунопреципитации MULE<sub>HECT</sub><sup>GST</sup> с использованием антител против GST-эпитопа в полученном образце было обнаружено значительное количество белка USP7S. Взаимодействие белков было также подтверждено *in*

*in vivo* при их коиммунопреципитации из цельного клеточного экстракта после коэкспрессии MULE и USP7S с эпитопами HA и Flag, соответственно, в клетках HeLa (Рисунок 3.6 Б). Для контроля неспецифического связывания в обоих случаях использовали нормальные кроличьи IgG. Таким образом, было доказано существование взаимодействия E3-убиквитинлигазы MULE и убиквитин-специфической протеазы USP7S *in vitro* и *in vivo*.



**Рисунок 3.6.** Взаимодействие MULE и USP7S *in vitro* и *in vivo*. **А.** Иммунопреципитацию с использованием антител против His- и GST-эпитопов проводили из эквимольной смеси (2,5 пмоль) очищенных рекомбинантных MULE<sub>HECT</sub><sup>GST</sup> и USP7S<sup>His</sup>. **Б.** Клетки HeLa одновременно трансфицировали эквимольными количествами плазмид (1 пмоль), экспрессирующими гены MULE<sub>HECT</sub> и USP7S с эпитопами HA и Flag, соответственно, в течение 24 ч. Клетки собирали и проводили иммунопреципитацию из цельных клеточных экстрактов. Цельный клеточный экстракт (лизат, (А) 10 или (Б) 15 %) и иммунопреципитаты (100 %) разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 10 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Для контроля неспецифического связывания использовали нормальные кроличьи IgG.

Для выяснения, может ли USP7S ограничивать самоубиквитинирование MULE благодаря его каталитической активности, были проведены реакции деубиквитинирования *in vitro*, в которых роль субстрата выполнял самоубиквитинированный MULE<sub>HECT</sub> (Рисунок 3.7, дорожка 1). Было показано, что USP7S дикого типа катализирует эффективный протеолиз убиквитиновых конъюгатов MULE<sub>HECT</sub>, тогда как белковая форма USP7S, содержащая замену каталитически активного остатка цистеина C223 на серин (USP7S<sup>C223S</sup>), подобной активности не проявляет (Рисунок 3.7, дорожки 2-3 и 4-5, соответственно). Таким образом, было установлено, что убиквитин-специфическая протеаза USP7S взаимодействует с MULE и ограничивает самоубиквитинирование данной E3-убиквитинлигазы *in vitro*.

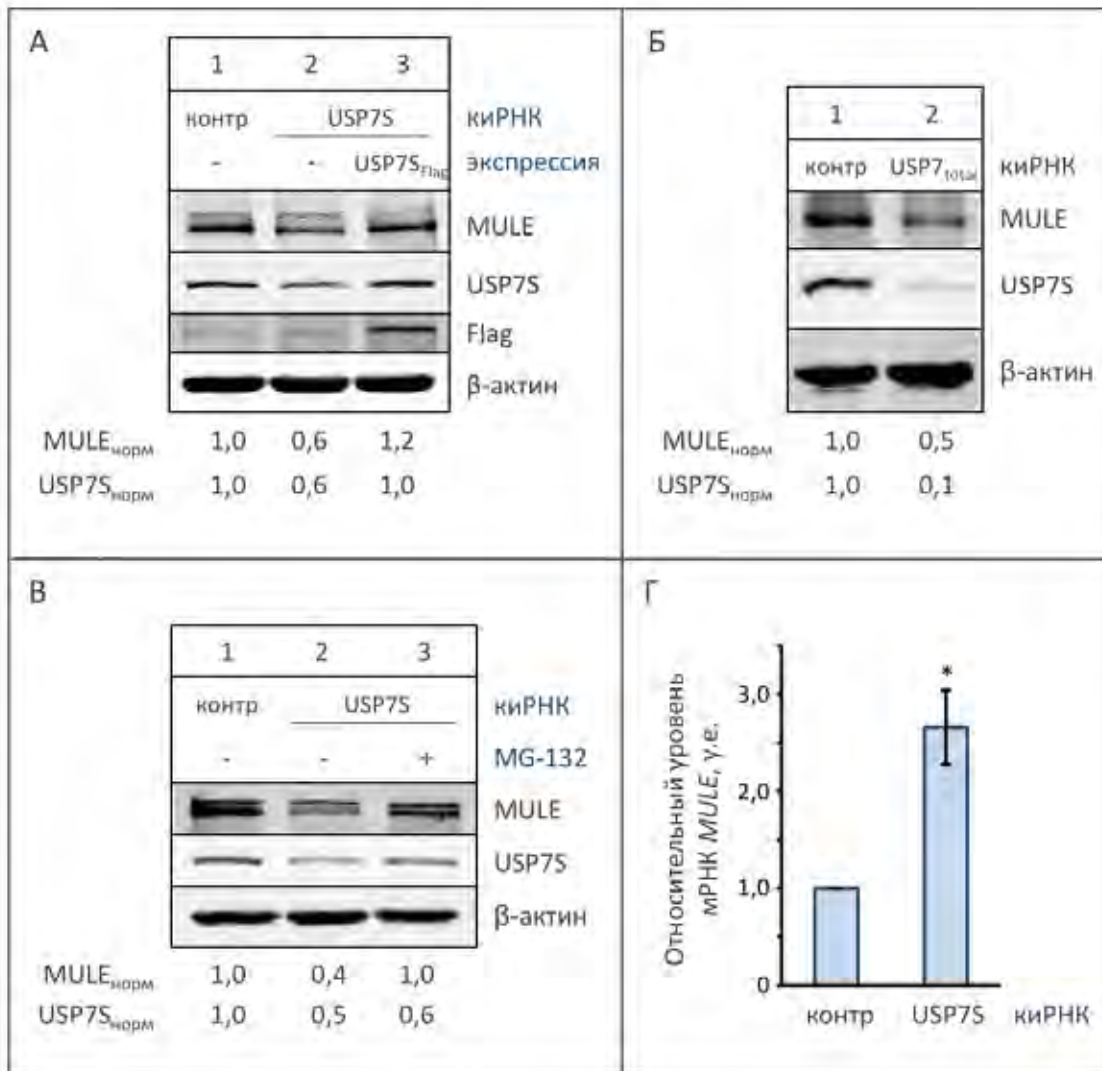


**Рисунок 3.7.** USP7S катализирует протеолиз убиквитиновых конъюгатов MULE *in vitro*. Самоубиквитинированный MULE<sub>HECT</sub> (0,6 пмоль) инкубировали в присутствии эквимольных количеств USP7S дикого типа (USP7S<sup>wt</sup>) или каталитически неактивного мутантного USP7S<sup>C223S</sup> (0,6 и 1,2 пмоль) в буфере для деубиквитинирования в течение 30 мин при 300 об/мин и 30 °С. Реакционные смеси разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с антителами к убиквитиновым конъюгатам (MULE<sub>HECT</sub><sup>Ub</sup>). Для контроля нанесения равных количеств субстрата и фермента использовали гибридизацию с антителами к MULE<sub>HECT</sub> и USP7<sub>total</sub>.

На следующем этапе необходимо было выяснить, контролирует ли USP7S клеточное содержание MULE *in vivo*. Для этого в клетках HeLa подавляли экспрессию USP7S с использованием киРНК и оценивали уровень экспрессии MULE в отсутствие USP7S (Рисунок 3.8 А). Как и предполагалось, при подавлении экспрессии убиквитин-специфической протеазы происходило смещение баланса процессов самоубиквитинирования-деубиквитинирования в сторону первого, и наблюдалось соответствующее снижение клеточного уровня содержания MULE (Рисунок 3.8 А, дорожка 2 по сравнению с дорожкой 1). Следует отметить, что эффективность USP7S-нокдауна была относительно невысока (порядка 50 %) из-за близости комплементарной киРНК последовательности к 5'-концевому участку мРНК USP7S. Для исключения неспецифического влияния киРНК на уровень экспрессии MULE клетки, предварительно обработанные киРНК против USP7S, трансфицировали плазмидой, кодирующей экспрессию мутантной формы мРНК USP7S, которая устойчива к действию киРНК. При этом наблюдалось полное восстановление клеточного уровня содержания MULE, что говорит о специфической взаимосвязи между уровнями экспрессии MULE и USP7S (Рисунок 3.8 А, дорожка 3). Аналогичное снижение клеточного содержания



MULE в отсутствие убиквитин-специфической протеазы наблюдалось при использовании альтернативной последовательности USP7<sub>total</sub>-киРНК против всех транскрипционных вариантов USP7 (Рисунок 3.8 Б).

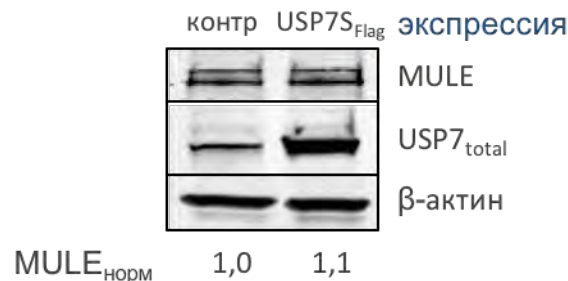


**Рисунок 3.8.** Клеточный уровень содержания MULE регулируется убиквитин-специфической протеазой USP7S. **А, В.** Клетки HeLa трансфицировали 200 пмоль киРНК против USP7S в течение 48 ч и затем либо **(А)** 0,3 пмоль плазмидной ДНК, кодирующей киРНК-устойчивый USP7S (USP7S<sub>Flag</sub>), в течение дополнительных 24 ч, либо **(В)** обрабатывали 2 μМ MG-132 в течение 14 ч. В качестве контроля использовали уникальную последовательность киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (контр) или ДНК экспрессионного вектора, примененного для трансфекции, но не кодирующего гена белка. **Б.** Трансфекция клеток HeLa с использованием 200 пмоль альтернативной последовательности киРНК против всех транскрипционных вариантов USP7 (USP7<sub>total</sub>) в течение 72 ч. **Г.** После нокдауна USP7S с использованием USP7S киРНК, как описано в **(Б)** выделяли тотальную РНК, и анализировали количество мРНК MULE методом количественного ПЦР в реальном времени. В качестве референсных генов использовали ген домашнего хозяйства GAPDH и 18S-РНК. Представлены данные 3-х независимых экспериментов, \* $P < 0,05$ . **А-В.** Целые клеточные экстракты разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по β-актину.



Эффективное самоубиквитинирование MULE в отсутствие USP7S приводило к протеасомному протеолизу белка, поскольку в присутствии ингибитора протеасомы MG-132 снижения клеточного уровня содержания MULE после обработки клеток кИРНК против *USP7S* не наблюдалось (Рисунок 3.8 В, дорожка 3 по сравнению с дорожкой 2). Дополнительным доказательством того, что регуляция эффективной клеточной концентрации MULE осуществляется на уровне белка, а не транскрипции, являются данные об увеличении, а не уменьшении уровня экспрессии мРНК *MULE* в *USP7S*-дефицитных клетках (Рисунок 3.8 Г). Такой эффект с высокой вероятностью является компенсаторным и направлен на поддержание стационарного уровня содержания MULE и субстратов данной E3-убиквитинлигазы в отсутствие *USP7S*.

Следует отметить, что при избыточной экспрессии *USP7S* в клетках HeLa изменений содержания MULE не наблюдалось, указывая на то, что в клетке существует избыток активного *USP7S*, обеспечивающий относительно высокую стабильность MULE (Рисунок 3.9), что, в свою очередь, необходимо для поддержания относительно низкого стационарного содержания субстратов MULE, включающих p53 и POL  $\beta$ .



**Рисунок 3.9.** Избыточная экспрессия *USP7S* в клетках HeLa. Клетки трансфицировали 0,6 пмоль плазмидной ДНК, экспрессирующей *USP7S*, или ДНК экспрессионного вектора, примененного для трансфекции, но не кодирующего гена белка, в течение 24 ч. Цельные клеточные экстракты разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Нормализацию денситометрических значений иммуноблотинга проводили по  $\beta$ -актину.

Таким образом, было показано, что *USP7S* взаимодействует с MULE *in vivo* и предотвращает самоубиквитинирование и последующую протеасомную деградацию MULE. Принимая во внимание то, что в ответ на длительный генотоксический стресс наблюдается ARF-зависимое ингибирование активности MULE [Chen, D. *et al.*, 2005], то есть выявленное снижение клеточного уровня содержания E3-убиквитинлигазы не может осуществляться через снижение эффективности самоубиквитинирования. Было высказано предположение, что

клеточный уровень экспрессии и/или активность USP7S, и/или, возможно, комплексообразование USP7S и MULE регулируются в соответствии с количеством повреждений ДНК. Поэтому следующей стадией данной работы было исследование регуляции клеточного уровня содержания USP7S в эндогенных условиях, а также в ответ на генотоксический стресс.

### **3.2. Регуляция клеточного уровня содержания USP7S**

Убиквитин-специфическая протеаза USP7, также называемая HAUSP, в дополнение к MULE регулирует стабильность целого ряда клеточных субстратов, из которых наиболее важным в контексте данной работы является E3-убиквитинлигаза HDM2. Как и в случае MULE, стабильность HDM2 относительно невысока, поскольку самоубиквитинилирование данной E3-убиквитинлигазы является сигналом для протеасомной деградации белка [Fang, S. *et al.*, 2000; Honda, R. & Yasuda, H., 2000]. Стабилизация HDM2 достигается путем образования комплекса с деубиквитинилирующим ферментом USP7 и некоторыми другими клеточными компонентами [Li, M. *et al.*, 2004]. Учитывая то, что HDM2 является основной E3-убиквитинлигазой, поддерживающей стационарный уровень экспрессии и активность p53 на относительно низком уровне [Fuchs, S.Y. *et al.*, 1998], регуляторный каскад USP7 - HDM2 - p53 является критическим в функции ограничения эндогенного уровня содержания p53 в клетках. Соответственно, нокаун гена *USP7* (различных изоформ одновременно в данном случае) в клеточных линиях человека приводит к стабилизации p53 и p53-зависимому ингибированию деления клеток [Cummins, J.M. & Vogelstein, B., 2004; Meulmeester, E. *et al.*, 2005], тогда как нокаут *Usp7* у мышей приводит к гибели эмбрионов, которая может быть частично восстановлена при нокауте *p53* [Kon, N. *et al.*, 2010]. Несмотря на значимую клеточную роль USP7, какая-либо информация о регуляции клеточного уровня содержания данного фермента до настоящей работы отсутствовала.

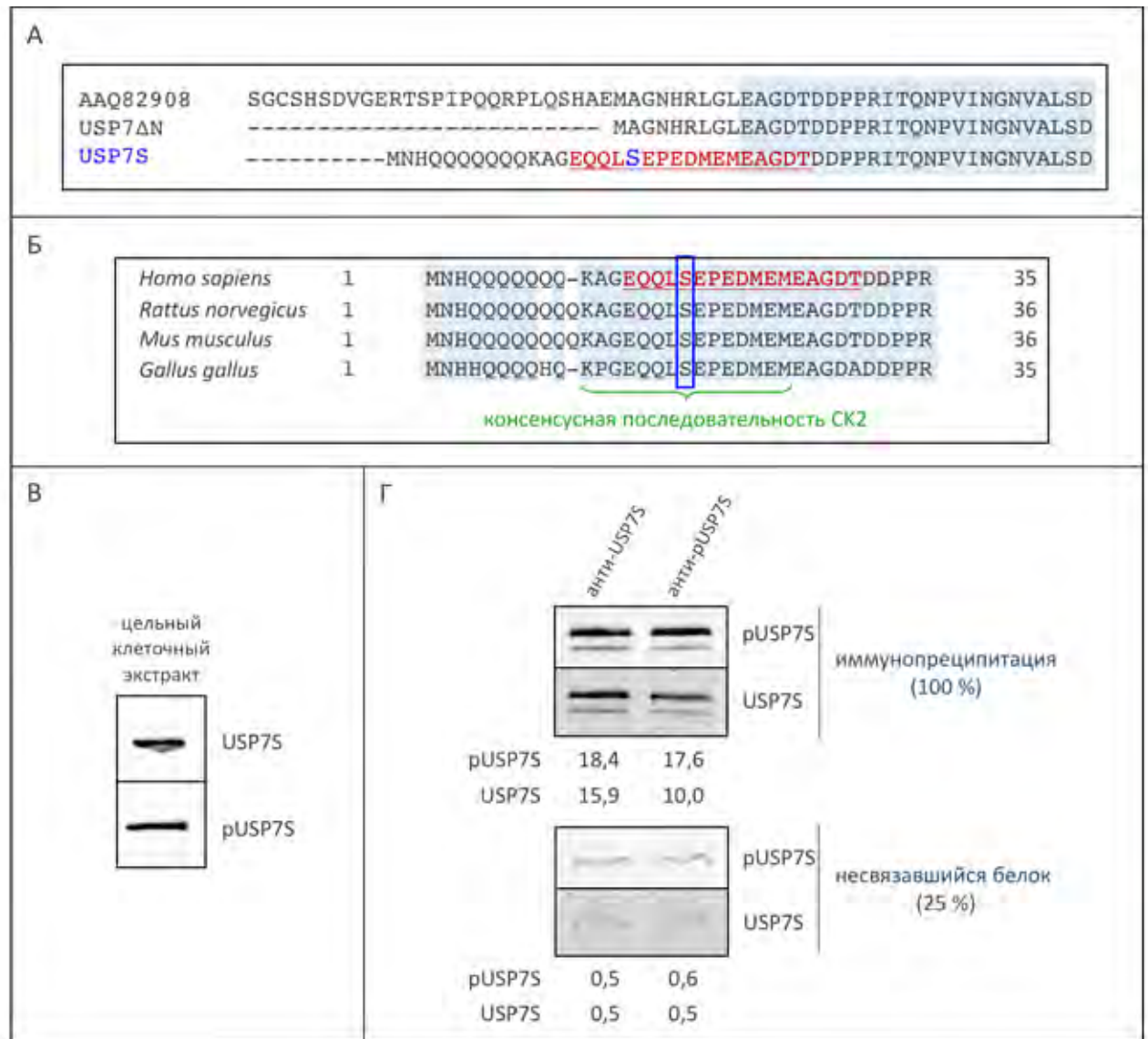
#### **3.2.1. Специфическая изоформа USP7 (USP7S) фосфорилирована по остатку S18**

Фосфорилирование является одной из наиболее распространенных форм посттрансляционных модификаций белков и играет важную роль в регуляции многочисленных аспектов их функции, включая модуляцию активности ферментов, их стабильности, клеточной локализации и взаимодействия с другими белками [Cohen, P., 2000]. При проведении

глобального протеомного анализа фосфорилированных белков и независимом биохимическом исследовании свойств USP7S было показано, что данный фермент фосфорилирован по аминокислотному остатку серина 18 [Beausoleil, S.A. *et al.*, 2004; Fernandez-Montalvan, A. *et al.*, 2007]. Несмотря на наличие экспериментальных данных о фосфорилировании USP7S, статус данного фосфорилирования в клетках животных и его функциональная значимость изучены не были. В настоящем исследовании было выдвинуто предположение, что посттрансляционная модификация S18 в USP7S может играть важную регуляторную роль в функционировании фермента и, соответственно, иметь значение для вышеописанной USP7S-зависимой регуляции клеточного уровня содержания MULE и возможно HDM2 и p53.

Как упоминалось в разделе “3.1.2. Убиквитин-зависимая регуляция стационарного уровня содержания MULE” в настоящий момент идентифицировано несколько изоформ USP7 с различающимися N-концевыми последовательностями белка (идентификаторы базы данных NCBI: NP\_003461.2, NP\_001273386.1, NP\_001273387.1 и NP\_001308787.1 и GenBank AAQ82908.1). Чрезвычайно интересным является то, что среди этих изоформ лишь USP7S содержит сайт фосфорилирования S18, который высококонсервативен в аминокислотных последовательностях фермента из различных высших животных (Рисунок 3.10 А и Б). Для исследования роли фосфорилирования USP7S по остатку S18 были генерированы на заказ кроличьи поликлональные антитела с использованием фосфорилированного и нефосфорилированного по S18 пептидов USP7S, включающих аминокислотные остатки 14-30, в качестве антигенов (Рисунок 3.10 А, последовательность пептида выделена красным цветом и подчеркиванием). В случае обоих антител наблюдалась гибридизация USP7S, содержащегося в цельных экстрактах клеток HeLa, что указывает на существование фосфорилированной формы белка в клетках человека (Рисунок 3.10 В). Для понимания возможных путей регуляции функции фермента через фосфорилирование требовалось оценить относительное количество фосфорилированной формы USP7S в эндогенных условиях. Для этого была проведена иммунопреципитация белка из цельных клеточных экстрактов HeLa с использованием антител к фосфорилированной по остатку S18 (pUSP7S) и нефосфорилированной (USP7S) форме фермента. В случае использования pUSP7S и USP7S антител наблюдалась иммунопреципитация равных количеств фосфорилированного фермента (Рисунок 3.10 Г, верхняя панель), тогда как при использовании pUSP7S антител удалось осадить 60-80 % от

общего количества (модифицированного фосфорилированием и нет) белка (Рисунок 3.10 Г, нижняя панель). Такие данные указывают на эндогенный уровень фосфорилирования USP7S по остатку S18, составляющий порядка 60-80 % в клетках HeLa.



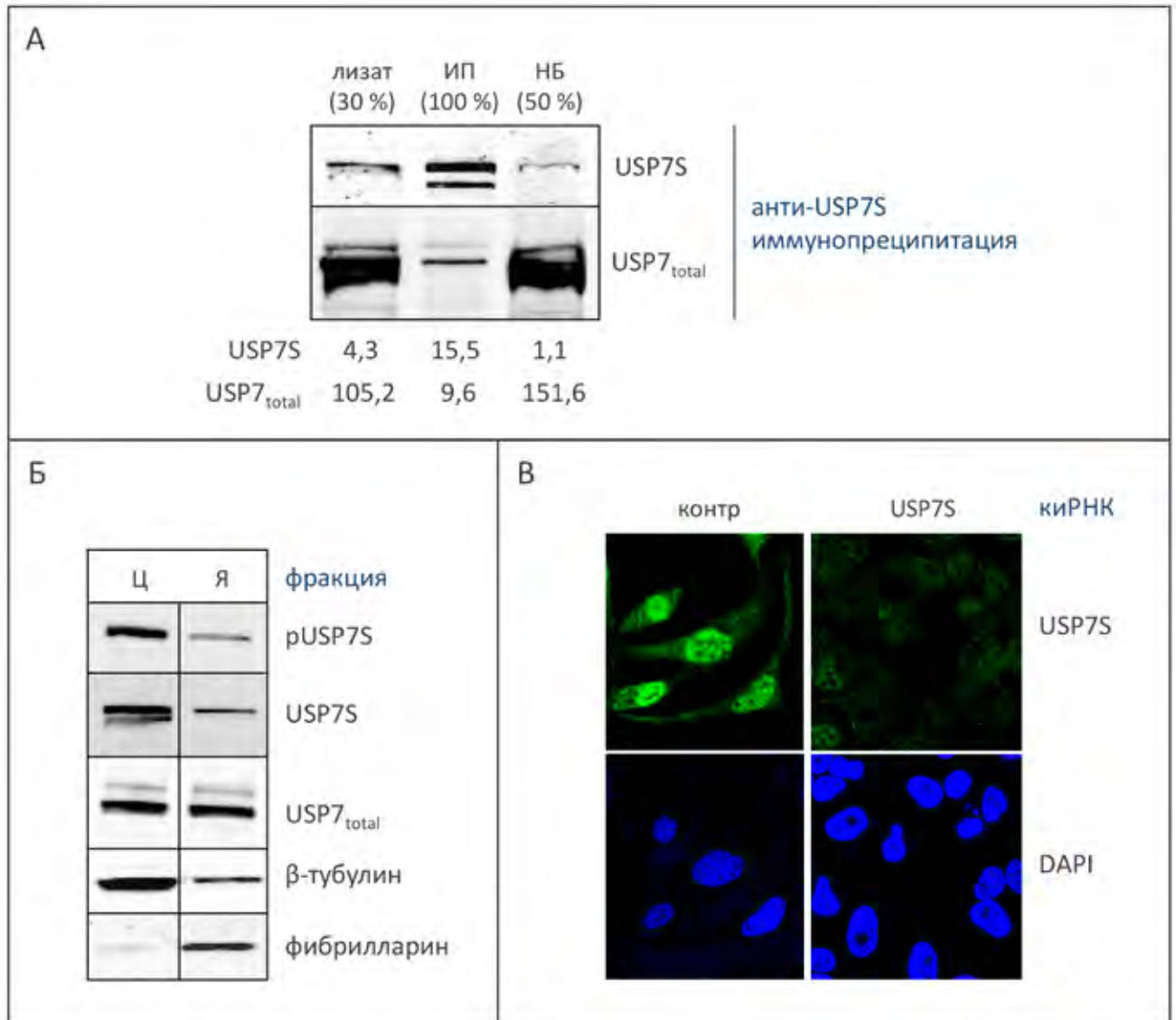
**Рисунок 3.10.** Фосфорилирование USP7S по остатку S18 в клетках человека. **А.** Выравнивание N-концевых аминокислотных последовательностей различных изоформ USP7S. Приведены 3 изоформы фермента: AAQ82908.1, NP\_001273386.1 (USP7ΔN) и NP\_003461.2 (USP7S). Изоформы NP\_001273387.1 и NP\_001308787.1 обладают значительно более короткими N-концевыми последовательностями и потому не показаны. **Б.** Выравнивание N-концевых аминокислотных последовательностей USP7S из различных источников. **А-Б.** Синим цветом выделен сайт фосфорилирования S18; красным цветом и подчеркиванием обозначен пептид, использованный в качестве антигена для производства антител к pUSP7S и USP7S; голубым фоном выделены консервативные участки последовательностей; зеленым цветом отмечена консенсусная последовательность протеинкиназы CK2. **В.** Цельный клеточный экстракт HeLa разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 10 % ПААГ с последующим иммуноблоттингом и гибридизацией с антителами к pUSP7S и USP7S. **Г.** Иммунопреципитацию с использованием антител против pUSP7S и USP7S проводили из цельных клеточных экстрактов HeLa и анализировали как в (В). Для контроля равной эффективности иммунопреципитации анализировали количества несвязавшегося белка.

Для ответа на вопрос, является ли USP7S основной изоформой убиквитин-специфической протеазы USP7, были проведены эксперименты по иммунопреципитации белка с использованием антител против USP7S (Рисунок 3.11 А). Эффективность иммунопреципитации составила порядка 90-95 % как следует из гибридизации с антителами к USP7S (Рисунок 3.11 А, верхняя панель). Для определения процентного содержания изоформы USP7S среди всех других изоформ была проведена гибридизация USP7S-преципитата с использованием коммерчески доступных антител, которые распознают все идентифицированные изоформы белка за счет их генерации против С-концевого эпитопа USP7 в качестве антигена (USP7<sub>total</sub>). Полностью осажденная из цельного клеточного экстракта изоформа USP7S составила лишь небольшую часть (порядка 3-5 %) от общего количества белка (Рисунок 3.11 А, нижняя панель).

Для более детального исследования потенциальных различий в функции USP7S и других изоформ убиквитин-специфической протеазы было проведено фракционирование клеточного содержимого с целью определения клеточной локализации различных форм белка, а также детекция локализации методом иммунофлуоресценции (Рисунок 3.11 Б и В). При анализе результатов фракционирования клеточного содержимого с учетом более высокого объема цитоплазмы по сравнению с объемом ядер количество USP7S в цитоплазме составило порядка 70-80 %. Тем не менее концентрация USP7S является наиболее высокой в ядре, причем фермент исключен из ядрышек. Все изоформы USP7 суммарно характеризуются преимущественно ядерной локализацией, что и USP7S (Рисунок 3.11 Б), что указывает на существование возможной синергии между функциями USP7S и других изоформ белка.

Таким образом, было показано, что значительная фракция USP7S (60-80 %) в эндогенных условиях фосфорилирована по аминокислотному остатку S18, причем S18-содержащая изоформа USP7S не является основной и составляет лишь 3-5 % от общего количества клеточного USP7. Соответственно, важным является вопрос о роли USP7S в регуляции клеточного уровня содержания канонических субстратов данного деубиквитилирующего фермента, таких как MULE и HDM2. Через модуляцию стабильности последних осуществляется опосредованная регуляция содержания ферментов репарации повреждений оснований и ОР или, другими словами, эффективности систем ЭРО и

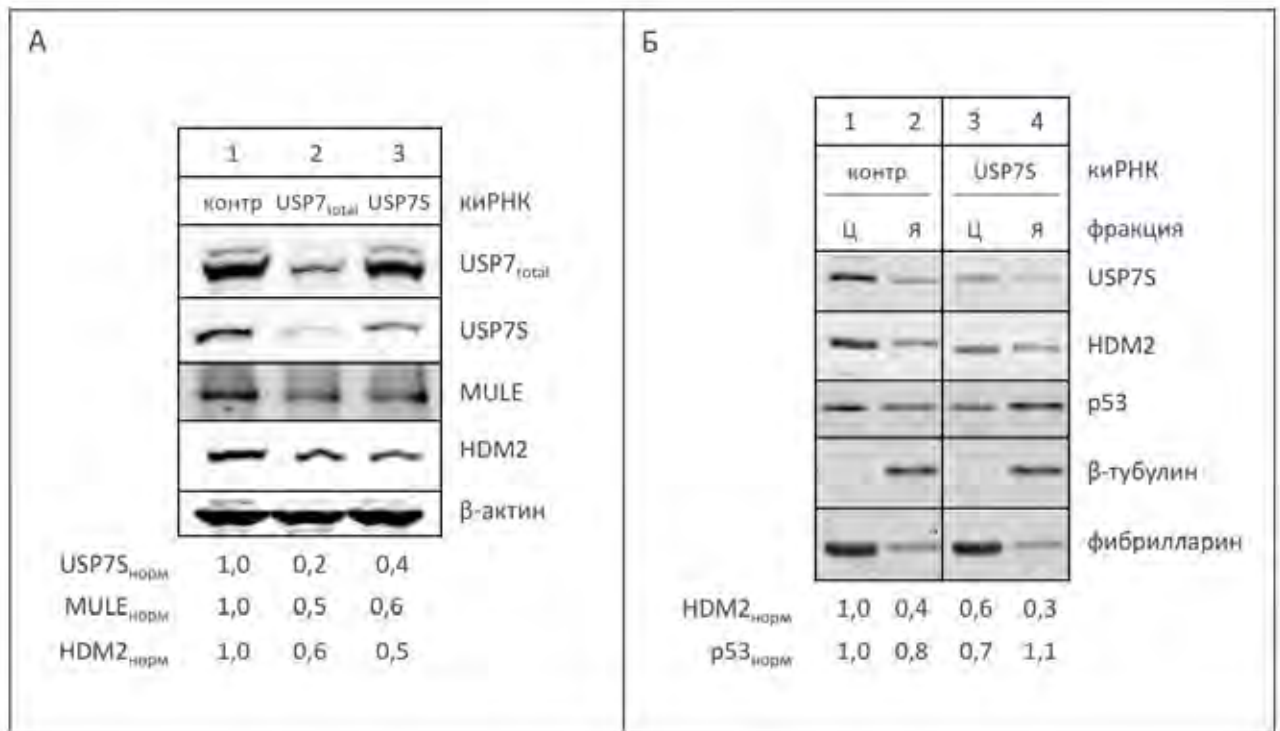
ОР-репарации, а также уровня экспрессии p53, который обеспечивает контроль клеточного цикла и/или апоптоза.



**Рисунок 3.11.** S18-Содержащая USP7S не является основной по процентному содержанию изоформой белка. **А.** Иммунопреципитацию из цельных клеточных экстрактов HeLa проводили с использованием антител против USP7S. Полученный иммунопреципитат (ИП, 100 %), фракцию несвязавшихся белков (НБ, 50 %) и лизат (30 %) разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 10 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с антителами к USP7S и USP7<sub>total</sub>, которые распознают все изоформы USP7. **Б.** Фракционирование клеток HeLa на цитоплазматическую (Ц) и ядерную (Я) фракции с последующим анализом равных объемов фракций методом иммуноблотинга как описано в (А) с указанными антителами. Фибрилларин и β-тубулин использовали в качестве ядерного и цитоплазматического маркеров, соответственно. **В.** Клетки HeLa трансфицировали 200 пмоль контрольной киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (контр) или киРНК против USP7S в течение 60 ч с последующим анализом методом иммунофлуоресценции с антителами к USP7S и DAPI для окрашивания ядер.

### 3.2.2. USP7S является основным регулятором стабильности MULE и HDM2

Для выяснения роли USP7S в регуляции клеточного уровня содержания MULE, HDM2 и p53 экспрессию убиквитин-специфической протеазы подавляли с использованием киРНК против всех транскрипционных вариантов *USP7* или варианта, кодирующего USP7S, и оценивали клеточное содержание субстратов белка методом иммуноблотинга (Рисунок 3.12). Как и предполагалось, общий нокдаун гена фермента с использованием USP7<sub>total</sub>-киРНК привел к снижению клеточного уровня содержания всех его изоформ, включая USP7S, и соответствующей повышенной протеасомной деградации обоих MULE и HDM2 за счет их самоубиквитинирования в отсутствие деубиквитинирующего фермента (Рисунок 3.12 А, дорожки 1-2 и Рисунок 3.8 Б). При этом снижение уровня экспрессии MULE и HDM2 в случае нокдауна лишь изоформы USP7S аналогично таковому в случае нокдауна всех изоформ фермента (Рисунок 3.12 А, дорожка 3 по сравнению с дорожкой 2).



**Рисунок 3.12.** USP7S-Зависимая регуляция стабильности MULE, HDM2 и p53. А-Б. Клетки (А) HeLa или (Б) HCT116 p53<sup>+/+</sup> трансфицировали 200 пмоль контрольной киРНК (контр), киРНК против всех транскрипционных вариантов *USP7* (USP7<sub>total</sub>) или основного варианта, кодирующего изоформу USP7S, в течение 60 ч. Клетки собирали и (А) экстрагировали белки или (Б) проводили фракционирование клеточного содержимого на цитоплазматическую (Ц) и ядерную (Я) фракции с последующим SDS-электрофорезом (А) цельного клеточного экстракта или (Б) равных объемов Ц и Я фракций в 10 % ПААГ, иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по β-актину или β-тубулину и фибрилларину.

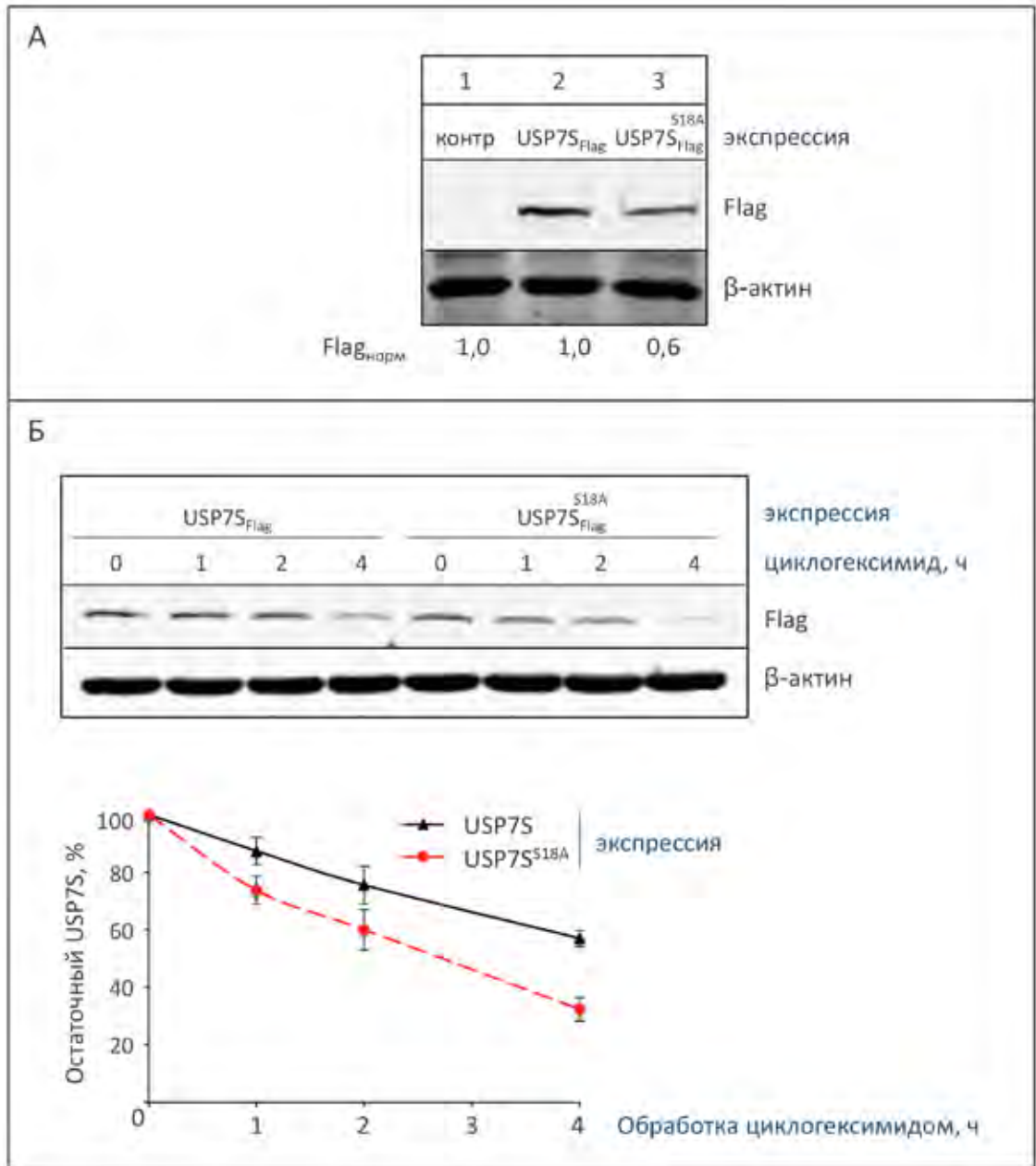
Наиболее значительное снижение клеточного уровня содержания HDM2 после нокдауна *USP7S*, которое сопровождалось характерной стабилизацией и накоплением p53 в ядре [Wu, X. *et al.*, 1993], наблюдали в цитоплазме (Рисунок 3.12 Б, дорожки 3 и 4 по сравнению с дорожками 1 и 2, соответственно).

Таким образом, было продемонстрировано, что специфическая изоформа *USP7S*, значительная часть которой фосфорилирована по остатку S18 в эндогенных условиях, является основным среди других изоформ белка регулятором E3-убиквитинлигаз MULE и HDM2, а также p53. Полученные данные подчеркивают важность биологической функции *USP7S*, именно поэтому последующие эксперименты были посвящены исследованию механизма регуляции клеточного уровня содержания и активности данной изоформы, а также взаимосвязи последних со статусом фосфорилирования *USP7S* по аминокислотному остатку серина 18.

### **3.2.3. S18-Фосфорилирование *USP7S* регулирует стабильность и активность белка**

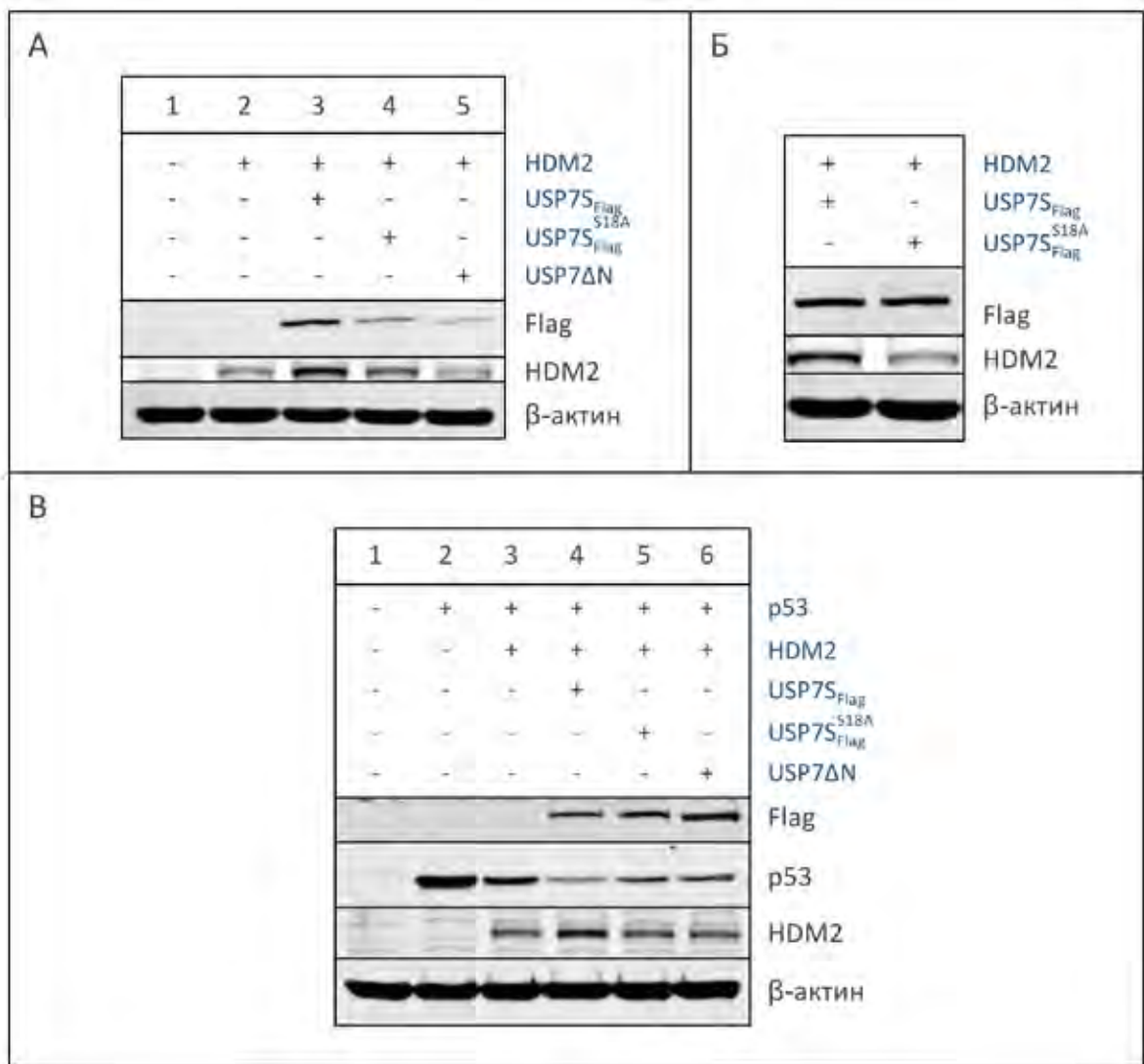
Для исследования роли фосфорилирования по остатку S18 в функции *USP7S* в первую очередь была проведена оценка стабильности фосфорилированной и мутантной форм фермента с заменой остатка серина 18 на аланин (Рисунок 3.13). Для этого клетки HeLa трансфицировали эквимоллярными количествами плазмидной ДНК, кодирующей гены *USP7S* дикого типа и нефосфорилируемой мутантной формы *USP7S<sup>S18A</sup>*. Было показано, что стационарный уровень экспрессии мутантного фермента *USP7S<sup>S18A</sup>* после избыточной экспрессии белка значительно ниже по сравнению с таковым в случае *USP7S* дикого типа (Рисунок 3.13 А). Более того, при использовании обработки клеток циклогексимидом, который представляет собой ингибитор рибосомального синтеза белков, было показано, что среднее время полужизни *USP7S<sup>S18A</sup>* равно 2,8 ч по сравнению со средним временем полужизни фермента дикого типа, составляющим более 4 ч (Рисунок 3.13 Б). Таким образом, полученные экспериментальные данные указывают на то, что мутантный фермент *USP7S* с заменой S18A, который не подвергается внутриклеточному фосфорилированию по остатку S18, обладает пониженной стабильностью по сравнению с ферментом дикого типа, 60-80 % которого фосфорилировано по данному аминокислотному остатку.





**Рисунок 3.13.** Влияние фосфорилирования USP7S по остатку S18 на стабильность фермента. **А.** Клетки HeLa трансфицировали эквимольными количествами (0,3 пмоль) плазмидной ДНК, кодирующей *USP7S* или *USP7S<sup>S18A</sup>*, в течение 24 ч. В качестве контроля (контр) использовали ДНК экспрессионного вектора, примененного для трансфекции, но не кодирующего гена белка. **Б.** Трансфекция клеток HeLa плазмидной ДНК, кодирующей *USP7S* дикого типа (0,2 пмоль) или *USP7S<sup>S18A</sup>* (0,6 пмоль), в течение 24 ч с последующей обработкой 50 мкг/мл циклогексимидом в течение указанных интервалов времени. В результате избыточной экспрессии были достигнуты равные клеточные уровни содержания белков *USP7S* и *USP7S<sup>S18A</sup>*. **А-Б.** Клетки собирали, экстрагировали белки и разделяли методом SDS-электрофореза в 10 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по β-актину. **Б.** Приведены численные результаты иммуноблотинга по данным 3-х независимых экспериментов (нижняя панель).

Поскольку стабильность нефосфорилируемого мутантного USP7S<sup>S18A</sup> невысока по сравнению с USP7S, значительное количество которого фосфорилировано по остатку S18 в эндогенных условиях, клеточная функция такого мутантного фермента предположительно должна быть неполной. Для проверки такой гипотезы проводили эксперимент по одновременной избыточной экспрессии USP7S дикого типа, USP7S<sup>S18A</sup> или изоформы USP7ΔN с N-концевой делецией, которая не содержит остатка S18 (Рисунок 3.10 А), с использованием эквимоллярных количеств экспрессионных векторов и E3-убиквитинлигазы HDM2, которая является субстратом USP7S. Было показано, что нефосфорилируемый по S18 мутантный USP7S<sup>S18A</sup> и не содержащий остатка для фосфорилирования USP7ΔN не способны поддерживать стабильность HDM2 на уровне, аналогичном наблюдаемому в случае USP7S дикого типа (Рисунок 3.14 А, дорожки 4 и 5 по сравнению с дорожкой 3), что является прямым последствием пониженной стабильности USP7S<sup>S18A</sup> и USP7ΔN в отсутствие S18-фосфорилирования. Для оценки активности USP7S<sup>S18A</sup> независимо от его стабильности был проведен дополнительный эксперимент, аналогичный вышеописанному, в котором для достижения равного клеточного уровня содержания форм фермента использовали большее количество экспрессионного вектора, кодирующего USP7S<sup>S18A</sup>, по сравнению с таковым для USP7S дикого типа. Несмотря на идентичные эффективные количества экспрессированных USP7S и USP7S<sup>S18A</sup>, стабильность HDM2 была ниже в случае его коэкспрессии с мутантной формой убиквитин-специфической протеазы по сравнению с ферментом дикого типа (Рисунок 3.14 Б). Аналогичные результаты были получены при избыточной экспрессии всех трех белков, включающих p53, HDM2 и варианты USP7S (Рисунок 3.14 В). Уровень экспрессии только p53 относительно высок, причем наблюдается его снижение при коэкспрессии p53 с его основной E3-убиквитинлигазой HDM2 (Рисунок 3.14 В, дорожка 3 по сравнению с дорожкой 2). При избыточной экспрессии p53, HDM2 и USP7S наблюдается еще более эффективная дестабилизация p53, обусловленная повышенной стабильностью HDM2 в присутствии дополнительных количеств деубиквитилирующего фермента (Рисунок 3.14 В, дорожка 4), причем способность мутантного USP7S<sup>S18A</sup> и изоформы USP7ΔN к поддержанию стабильности HDM2 и соответствующей опосредованной дестабилизации p53 значительно ниже таковой в случае USP7S дикого типа (Рисунок 3.14 В, дорожки 5, 6 по сравнению с дорожкой 4).



**Рисунок 3.14.** Влияние фосфорилирования USP7S по остатку S18 на активность фермента. **А.** Клетки U-2 OS одновременно трансфицировали плазмидной ДНК, кодирующей *HDM2* (0,7 пмоль), и эквимольными количествами плазмид (0,2 пмоль), экспрессирующими *USP7S* дикого типа, *USP7S<sup>S18A</sup>* или *USP7ΔN*. **Б.** Котрансфекция клеток U-2 OS плазмидными ДНК, кодирующими *USP7S* дикого типа (0,2 пмоль) или *USP7S<sup>S18A</sup>* (0,6 пмоль) и *HDM2* (0,7 пмоль). В результате избыточной экспрессии были достигнуты равные клеточные уровни содержания *USP7S* и *USP7S<sup>S18A</sup>*. **В.** Котрансфекция как в (Б) с добавлением 0,45 пмоль ДНК, кодирующей *p53*. Плазмидную ДНК, кодирующую *USP7ΔN*, экспрессировали в количестве 0,8 пмоль. **А-В.** Клетки собирали в течение 24 ч после трансфекции; в качестве нетрансфицированного контроля использовали ДНК экспрессионного вектора для *USP7S*, но не кодирующего гена белка. Экстрагированные белки разделяли методом SDS-электрофореза в 10 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Показана основная изоформа *HDM2* с молекулярной массой 70 кДа, клеточный уровень содержания 90-кДа изоформы фермента изменялся аналогично показанному. Денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по β-актину.

Таким образом, фосфорилированный *USP7S* обладает повышенной ферментативной активностью по отношению к его субстратам, включающим, например, E3-убиквитинлигазу *HDM2*. Логично предположить, что фосфорилированная форма убиквитин-специфической

протеазы также более активна по отношению к MULE по сравнению с нефосфорилированным ферментом. Несмотря на то, что напрямую (например, с использованием *in vivo* котрансфекции экспрессирующих MULE и различные формы USP7 плазмидных ДНК при нормализации клеточного уровня содержания убиквитин-специфической протеазы) данное утверждение не проверялось, USP7S-зависимая регуляция MULE, по сути включающая зависящий от комбинации активности и стабильности USP7S контроль, была экспериментально продемонстрирована выше (разделы “3.1.2. Убиквитин-зависимая регуляция стационарного уровня содержания MULE” и “3.2.2. USP7S является основным регулятором стабильности MULE и HDM2”). Для дальнейшего исследования регуляторной роли данной посттрансляционной модификации в функционировании фермента было решено выделить протеинкиназу, ответственную за фосфорилирование остатка S18 в USP7S, и установить, регулируется ли данная модификация или активность/клеточный уровень экспрессии обеспечивающей ее киназы в зависимости от количества повреждений ДНК.

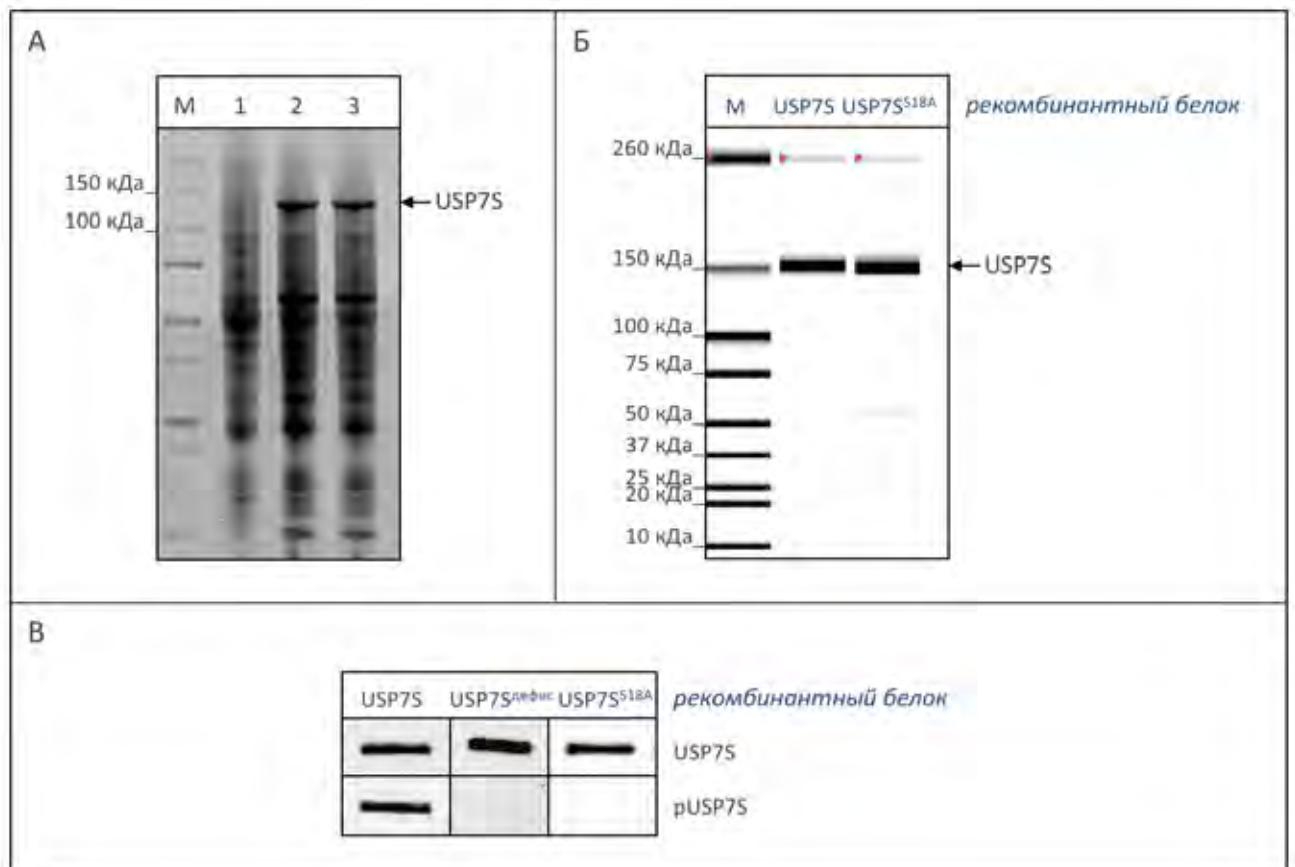
#### **3.2.4. Казеин-киназа 2 фосфорилирует USP7S по остатку серина 18**

Несмотря на то, что биоинформатический анализ N-концевой аминокислотной последовательности USP7S выявил консенсусный S18-содержащий мотив казеин-киназы CK2 (Рисунок 3.10 Б), для выделения киназной активности, ответственной за фосфорилирование USP7S по остатку S18, было решено использовать объективный биохимический подход. Подобный метод был разработан нами ранее и опробован при идентификации MULE в качестве E3-убиквитинлигазы для POL  $\beta$  [Parsons, J.L. *et al.*, 2009].

Суть данного подхода применительно к случаю идентификации USP7S-фосфорилирующей активности заключалась в проведении последовательного хроматографического фракционирования цельного клеточного экстракта через ряд хроматографических колонок. Полученные после хроматографии фракции анализировали в реакции *in vitro* фосфорилирования с использованием USP7S в качестве субстрата. Фракции, демонстрирующие S18-киназную активность, объединяли и подвергали дальнейшему фракционированию. Активные фракции, полученные после 5-7 последовательных хроматографических разделений цельного клеточного экстракта, анализировали методом

хромато-масс-спектрометрии с целью идентификации протеинкиназы, ответственной за фосфорилирование USP7S по аминокислотному остатку S18.

Для получения рекомбинантного USP7S и его мутантных форм использовали бакуловирус-инфицированные клетки насекомых *Spodoptera frugiperda* (Sf9) в качестве продуцентов (Рисунок 3.15 А-Б). Значительным преимуществом данной системы является наличие широкого ряда систем посттрансляционных модификаций белков, включающих фосфорилирование.



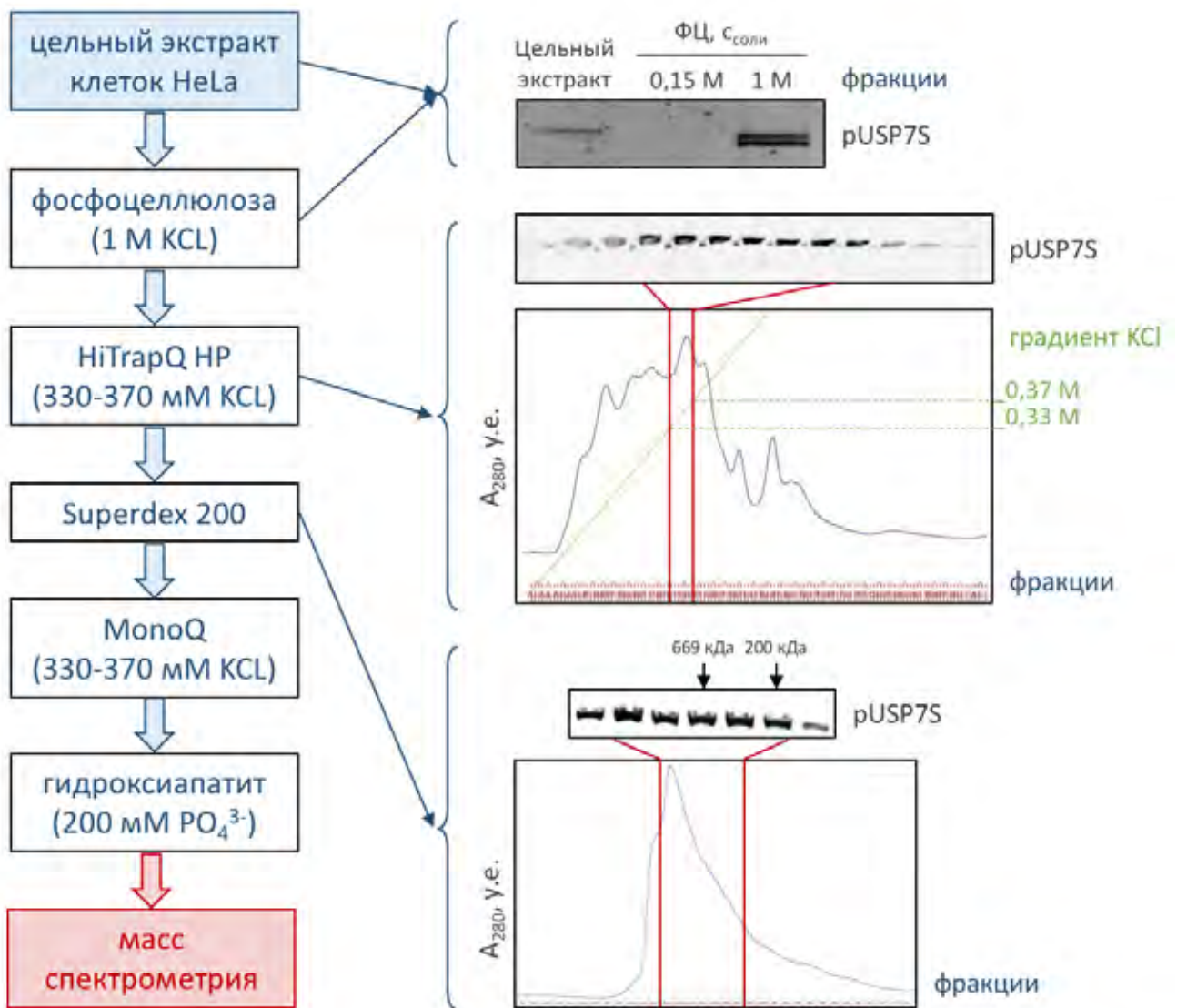
**Рисунок 3.15.** Экспрессия и очистка рекомбинантного USP7S из бакуловирус-инфицированных клеток насекомых Sf9. **А.** Клетки Sf9 (дорожка 1) инфицировали амплифицированным вирусным стоком P3 и культивировали в суспензии в течение 24 ч при 450 об/мин и 27 °С с целью экспрессии рекомбинантных USP7S (дорожка 2) или USP7S<sup>S18A</sup> (дорожка 3). Образцы полученных цельных клеточных экстрактов анализировали методом SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ с окрашиванием геля в Кумасси R-250. **Б.** Очистку рекомбинантных USP7S или USP7S<sup>S18A</sup> проводили из цельных клеточных экстрактов из (А) методом метал-афинной хроматографии на Ni<sup>2+</sup>-сефарозе с элюцией в буфере, содержащем 250 мМ имидазола. Показаны результаты электрофореза очищенных белков в денатурирующих условиях с использованием автоматизированной системы гель-электрофореза Experion (Bio-Rad, США). **В.** Очищенные рекомбинантные USP7S, дефосфорилированный USP7S (USP7S<sup>дефос</sup>) или USP7S<sup>S18A</sup> (0,2 пмоль) разделяли методом SDS-электрофореза в 10 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с антителами к USP7S и pUSP7S. Для получения USP7S<sup>дефос</sup> проводили инкубацию USP7S (1 пмоль) со щелочной фосфатазой из креветки (1 пмоль) в течение 1 ч при 37 °С в буфере для дефосфорилирования. USP7S<sup>дефос</sup> очищали на Ni<sup>2+</sup>-сефарозе с элюцией в буфере, содержащем 250 мМ имидазола.

Действительно, очищенный рекомбинантный USP7S был активен в реакции *in vitro* деубиквитинилирования с использованием самоубиквитинилированного MULE<sub>HECT</sub> в качестве субстрата (Рисунок 3.7). Более того, полученный USP7S дикого типа, в отличие от мутантного USP7S<sup>S18A</sup>, демонстрировал гибридизацию с антителами против рUSP7S, что указывает на очистку фосфорилированной формы USP7S из клеток Sf9, причем уровень фосфорилирования рекомбинантного USP7S составил порядка 60 % (Рисунок 3.15 В). Для повышения чувствительности *in vitro* фосфорилирования USP7S с использованием хроматографических фракций в качестве источника киназной активности было проведено дефосфорилирование рекомбинантного USP7S с последующей очисткой фермента (Рисунок 3.15 В). Именно дефосфорилированный USP7S (USP7S<sup>дефос</sup>) был использован в качестве субстрата для оценки киназной активности в реакциях *in vitro*.

Для выделения киназной активности, ответственной за фосфорилирование USP7S по остатку S18, использовали следующую последовательность хроматографического фракционирования цельного клеточного экстракта HeLa: 1) ионообменная хроматография на фосфоцеллюлозе с элюцией активной фракции в 1 М KCl, 2) препаративная ионообменная хроматография на Q-сефарозе с элюцией киназной активности в 0,33-0,37 М KCl, 3) гель-фильтрация на носителе Superdex 200, 4) аналитическая ионообменная хроматография на MonoQ с элюцией активной фракции как в 2), и 5) заключительная стадия хроматографического разделения на гидроксиапатите с десорбцией целевой киназы в 0,2 М фосфата калия (Рисунок 3.16). Также приведены примеры анализа полученных фракций в реакции *in vitro* фосфорилирования с использованием USP7S<sup>дефос</sup> в качестве субстрата.

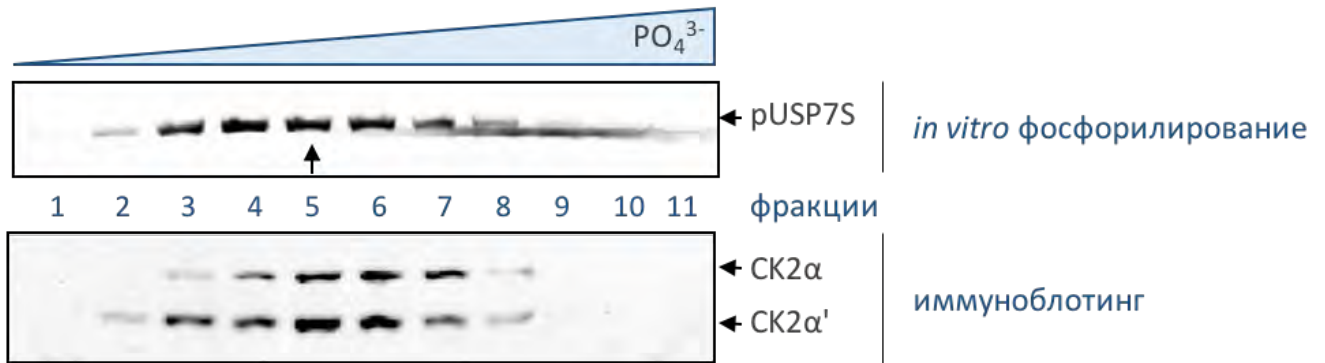
Фракции, полученные после заключительной стадии 5-тиступенчатого фракционирования цельного клеточного экстракта HeLa на гидроксиапатите, обладали значительной активностью в реакции *in vitro* фосфорилирования USP7S по остатку S18, имели относительно высокую степень очистки (по результатам SDS-электрофореза в ПААГ последующим окрашиванием геля в Кумасси R-250) и потому были проанализированы методом tandemной масс-спектрометрии (Рисунок 3.17, верхняя панель). Единственной протеинкиназой, обнаруженной в полученных фракциях, является казеин-киназа 2 (СК2), причем в анализируемых фракциях наблюдали детекцию ряда пептидов каталитических СК2 $\alpha$  и СК2 $\alpha'$  и регуляторной СК2 $\beta$  субъединиц СК2 (в качестве примера приведены данные для СК2 $\alpha$ ,

Таблица 3.1). При иммуноблоттинге полученных фракций с антителами к СК2 было обнаружено соответствие пика активности, фосфорилирующей USP7S по остатку S18, пику детекции каталитических субъединиц данной киназы (Рисунок 3.17, нижняя панель). Таким образом, учитывая результаты анализа фракций после хроматографического разделения экстракта HeLa, а также того, что консенсусная последовательность протеинкиназы СК2 включает S18-содержащий пептид USP7S (Рисунок 3.10 Б), было высказано предположение, что СК2 может выполнять роль протеинкиназы, фосфорилирующей USP7S по остатку S18.



**Рисунок 3.16.** Схема биохимической идентификации киназы, ответственной за фосфорилирование USP7S по остатку S18 (левая панель). Показаны примеры фосфорилирования *in vitro* с использованием фракций после хроматографического разделения цельного клеточного экстракта HeLa на фосфоцеллюлозе, Q-сефарозе и Superdex 200 (2-5 мкл) и 1 пмоль USP7S<sup>дефос</sup> в качестве субстрата (правая панель). Реакции проводили в буфере для фосфорилирования в течение 60 мин при 300 об/мин и 30 °С. Реакционные смеси анализировали методом белкового SDS-электрофореза в 10 % ПААГ с последующим иммуноблоттингом и гибридизацией с антителами к pUSP7S.





**Рисунок 3.17.** Анализ киназной активности фракций после заключительной стадии фракционирования цельного клеточного экстракта HeLa на колонке с гидроксиапатитом. Реакции фосфорилирования *in vitro* проводили с использованием USP7S<sup>дефос</sup> (1 пмоль) в качестве субстрата и 2 мкл каждой фракции (верхняя панель). Реакционные смеси (верхняя панель) или полученные фракции (нижняя панель) разделяли методом SDS-электрофореза в 10 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с антителами к pUSP7S и каталитическим субъединицам CK2. Фракцию 5 (обозначена стрелкой) подвергали масс-спектрометрическому анализу с целью детекции содержащихся во фракции протеинкиназ.

**P19784: Казеин-киназа 2, субъединица α (CK2α)**

MPGPAAGSRARVYAEVNSLRSREYWDYEAHVPSWGNQDDYQLVRKLGRGKY  
SEVFEAINITNNERVVVKILKPVKKKKIKREVKILENLRGGTNIKLIDTVKDPV  
**SKTPALVFEYINNTDFKQLYQILTDFDIRFYMYELLKALDYCHSKGIMHRDVK**  
PHNVMIDHQQKRLIDWGLAEFYHPAQEYNVRVASRYFKGPELLVDYQMYD  
YSLDMWSLGCMLASMIFRREPFFHGGQDNYDQLVRIAKVLGTEELYGYLKKY  
HIDLDPHFNDILGQHSRKRWENFIHSENRLVSPALDLLDKLLRYDHQQRLT  
AKEAMENPYFYPVVKESQPCADNAVLSSGLTAAR

Значение Mascot Score: 470

Пептид	M <sub>эксп</sub> , [Да]	M <sub>расч</sub> , [Да]	ΔM, [Да]
<b>12VYAEVNSLR</b> <sub>20</sub>	1049.4	1049.5	-0.1
<b>85ILENLR</b> <sub>90</sub>	756.5	756.4	0.1
<b>98LIDTVKDPVSK</b> <sub>108</sub>	1213.8	1213.7	0.1
<b>109TPALVFEYINNTDFK</b> <sub>123</sub>	1771.1	1770.9	0.2
<b>157DVKPHNVMIDHQQK</b> <sub>170</sub>	1688.2	1687.8	0.4
<b>231EPFFHGGQDNYDQLVR</b> <sub>245</sub>	1864.1	1863.8	0.4
<b>249VLGTEELYGYLK</b> <sub>261</sub>	1511.1	1511.8	0.7
<b>282WENFIHSEN</b> <sub>291</sub>	1330.8	1330.6	0.2
<b>292HLVSPEALDLLDK</b> <sub>304</sub>	1448.9	1448.8	0.1
<b>318EAMENPYFYPVVK</b> <sub>330</sub>	1609.0	1608.8	0.2
<b>331EQSQPCADNAVLSSGLTAAR</b> <sub>350</sub>	2074.1	2073.9	0.2

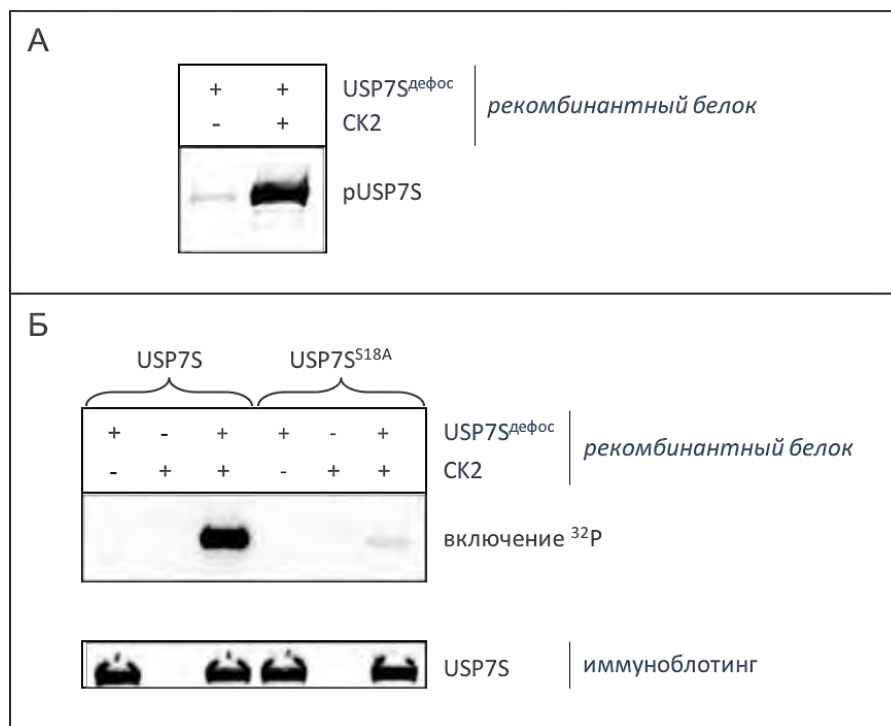
**Таблица 3.1.** Идентификация казеин-киназы CK2 во фракции 5 после хроматографического разделения на гидроксиапатите методом тандемной масс-спектрометрии. Отмечены все обнаруженные пептиды CK2α (жирный шрифт) с указанием номера аминокислотного остатка в последовательности белка (идентификатор SwissProt: P19784), а также экспериментальная (M<sub>эксп</sub>) и расчетная (M<sub>расч</sub>) молекулярная масса идентифицированных пептидов.



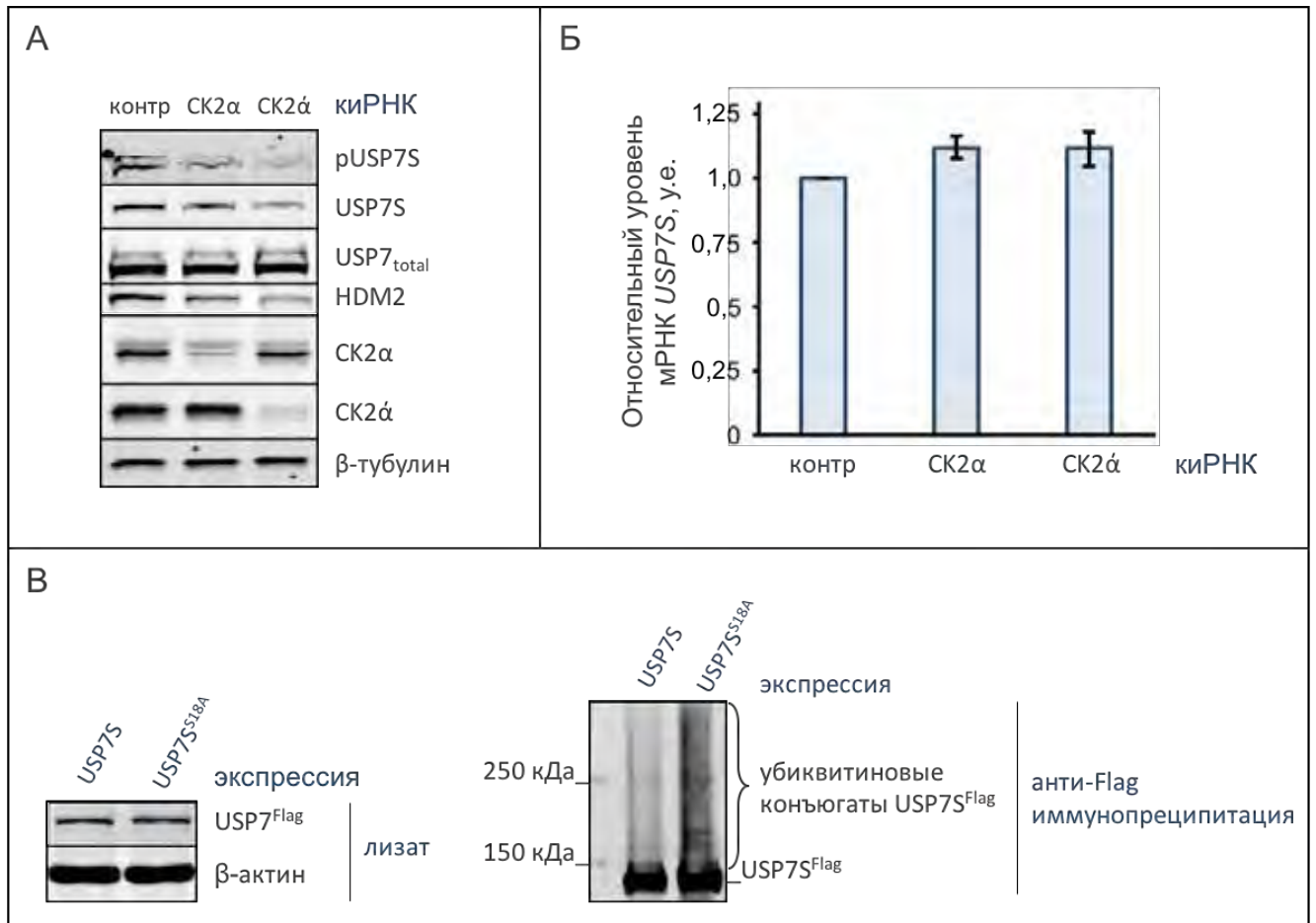
Для выяснения, действительно ли киназа CK2 может фосфорилировать USP7S по аминокислотному остатку S18, был проведен ряд реакций фосфорилирования *in vitro*. При инкубировании очищенных рекомбинантных дефосфорилированного USP7S и CK2 в буфере для фосфорилирования и последующим разделением полученных реакционных смесей методом SDS-электрофореза в ПААГ с последующим иммуноблотингом с антителами pUSP7S, наблюдалось образование USP7S, фосфорилированного по остатку S18 (Рисунок 3.18 А). Для выяснения является ли остаток S18 в USP7S основным сайтом фосфорилирования киназой CK2 были проведены реакции фосфорилирования *in vitro* с использованием дефосфорилированных USP7S дикого типа и нефосфорилируемого по остатку S18 мутантного USP7S<sup>S18A</sup> в качестве субстратов. Реакции проводили с использованием АТФ, меченного радиоактивным изотопом фосфора <sup>32</sup>P. По эффективности включения радиоактивного изотопа в рекомбинантный фермент было установлено, что уровень фосфорилирования мутантного фермента незначителен по сравнению с таковым в случае фермента дикого типа, то есть CK2-зависимое фосфорилирование USP7S осуществляется по остатку S18 (Рисунок 3.18 Б). Таким образом, было показано, что CK2 может напрямую фосфорилировать остаток S18 в USP7S, причем данный сайт фосфорилирования является основным.

Для изучения клеточной роли CK2-зависимого фосфорилирования USP7S была проведена временная трансфекция клеток HeLa ксРНК против CK2 с последующей оценкой уровня фосфорилирования USP7S по остатку S18. Было установлено, что нокдаун экспрессии обеих каталитических субъединиц киназы 2 приводит к пониженному уровню S18-фосфорилирования USP7S, а также снижению клеточного уровня содержания обоих белков USP7S и его субстрата HDM2 в соответствии с функцией фосфорилирования USP7S по остатку S18 в поддержании стабильности и активности фермента как описано в разделе “3.2.3. S18-Фосфорилирование USP7S регулирует стабильность и активность белка” (Рисунок 3.19 А). Для доказательства того, что снижение фракции фосфорилированного USP7S после CK2-нокдауна связано со стабильностью фермента, потенциально регулируемой через систему убиквитинирования, а не со снижением эффективности транскрипции мРНК USP7S было проведено выделение тотальной РНК из клеток, обработанных контрольной ксРНК (контр), которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома, и ксРНК против CK2 $\alpha$  и CK2 $\beta$  и последующий анализ мРНК USP7S методом

количественного ПЦР в реальном времени (Рисунок 3.19 Б). Было установлено, что количество мРНК *USP7S* одинаково во всех проанализированных образцах, что говорит о регуляции стабильности нефосфорилированного *USP7S* на уровне белка. Действительно, экспериментально детектированная повышенная эффективность полиубиквитинилирования дефосфорилированной мутантной формы *USP7S*<sup>S18A</sup> по сравнению с ферментом дикого типа указывает на регуляцию стабильности *USP7S* через систему убиквитин-зависимого гидролиза белка протеасомой. При этом нефосфорилированная форма *USP7S* подвергается более эффективной протеасомной деградации по сравнению с фосфорилированным субстратом (Рисунок 3.19 Б).



**Рисунок 3.18.** CK2 фосфорилирует *USP7S* по остатку S18 *in vitro*. **А.** Дефосфорилированный *USP7S* (*USP7S*<sup>дефос</sup>, 2,8 пмоль) инкубировали в присутствии очищенной рекомбинантной протеинкиназы CK2 (2 пмоль) в буфере для фосфорилирования в течение 30 мин при 300 об/мин и 30 °С. **Б.** *In vitro* фосфорилирование проводили как в (А) с использованием эквимольных количеств (2,8 пмоль) дефосфорилированных *USP7S* или мутантного *USP7S*<sup>S18A</sup> в качестве субстрата в присутствии [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-АТФ. **А-Б.** Реакционные смеси разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 10 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с антителами к (А) р*USP7S* и (Б) *USP7S* (для контроля нанесения равных количеств субстрата) и (Б) регистрацией включения радиоактивной метки методом автордиографии.



**Рисунок 3.19.** CK2 фосфорилирует USP7S по остатку S18 *in vivo*, регулируя стабильность белка. **А-Б.** Клетки HeLa трансфицировали 200 пмоль киРНК против CK2 $\alpha$  и CK2 $\beta$  в течение 60 ч. В качестве контроля использовали уникальную последовательность киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (контр). Анализ образцов проводили либо **(А)** методом белкового SDS-электрофореза в 10 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами, либо **(Б)** выделяли тотальную РНК и анализировали количество мРНК USP7S методом количественного ПЦР в реальном времени. В качестве референсных генов использовали ген домашнего хозяйства GAPDH и 18S-РНК. Представлены данные 3-х независимых экспериментов, различия не являются статистически значимыми. **В.** Котранфекция клеток HeLa плазмидными ДНК, кодирующими USP7S (0,2 пмоль) или USP7S<sup>S18A</sup> (0,6 пмоль) с последующей иммунопреципитацией с использованием антител против Flag-эпитопа. Клеточные лизаты и иммунопреципитаты анализировали методами SDS-электрофореза и иммуноблотинга как в **(А)**. Эффективность убиквитинирования определяли с использованием антител к убиквитиновым конъюгатам. Для контроля нанесения равных количеств иммунопреципитатов USP7S и USP7S<sup>S18A</sup> проводили гибридизацию с антителами к Flag-эпитопу.

Таким образом, было показано, что фосфорилирование остатка S18 в USP7S осуществляется CK2, киназой 2. Поскольку в эндогенных условиях 60-80 % USP7S находится в фосфорилированной форме, которая стабильна, CK2-зависимое фосфорилирование USP7S по S18 обеспечивает поддержание стационарного уровня содержания субстратов данного фермента, таких как E3-убиквитинлигазы MULE и HDM2, на относительно высоком уровне. При этом стационарный клеточный уровень экспрессии p53 и ферментов ЭПО и

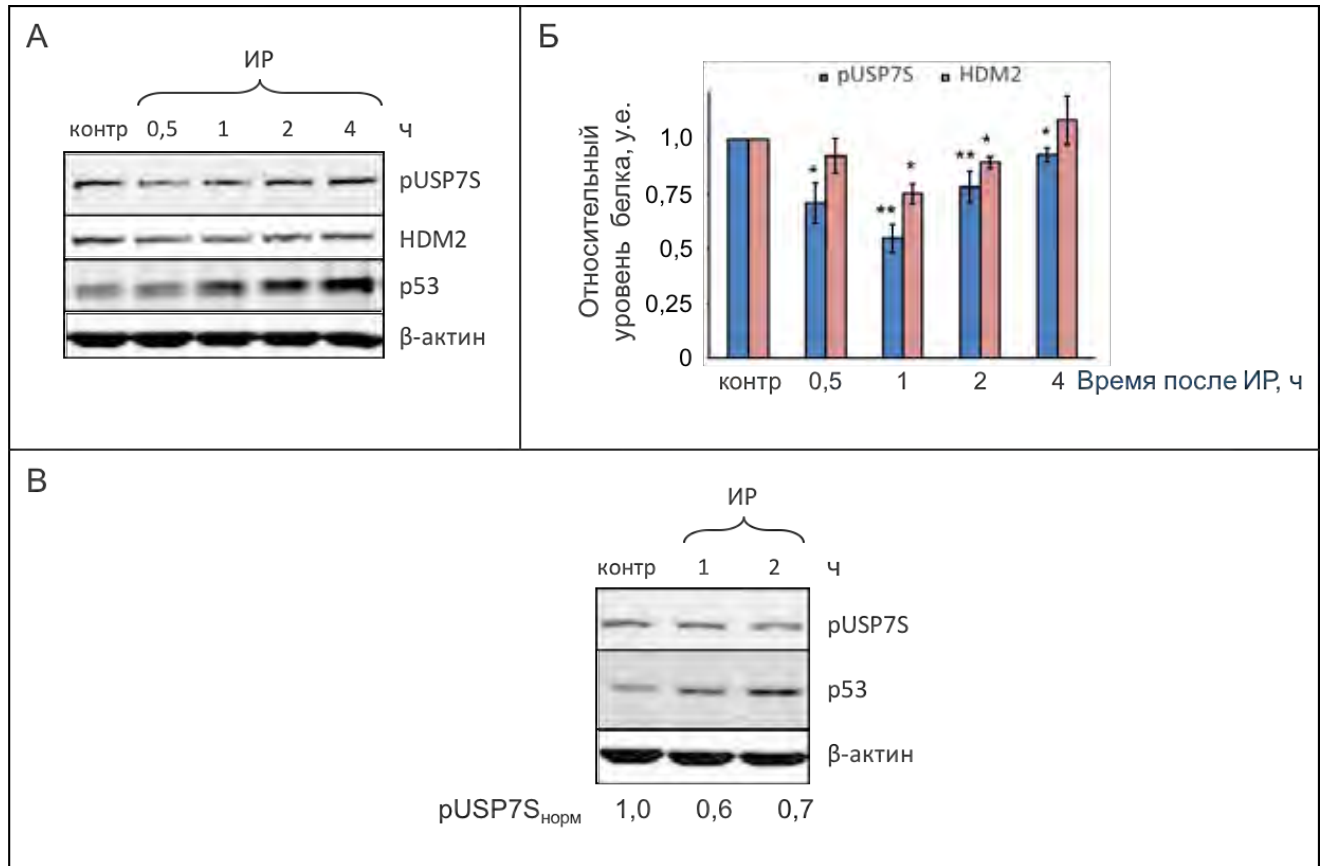
ОР-репарации (например, POL  $\beta$  и POL  $\lambda$ ), являющихся субстратами MULE и HDM2, поддерживается на относительно низком уровне, который, впрочем, достаточен для сигнализации и репарации эндогенных повреждений ДНК. В ответ на повреждения ДНК было показано заметное (и кратковременное) снижение клеточного уровня экспрессии E3-убиквитинлигазы MULE, функцией которого является стабилизация p53 и соответствующее повышение эффективности репарации ДНК (“3.1.1. Негативная регуляция MULE в ответ на повреждения ДНК и ее значимость”). С учетом того, что дефосфорилирование USP7S по остатку S18 приводит к протеасомной деградации фермента, было высказано предположение, что причиной дестабилизации MULE в ответ на повреждения ДНК может являться кратковременное и регулируемое в зависимости от количества нерепарированных повреждений ДНК дефосфорилирование (дестабилизация) USP7S.

### **3.2.5. Дефосфорилирование USP7S в ответ на повреждения ДНК**

Для исследования изменений статуса фосфорилирования USP7S в ответ на повреждения ДНК клетки нормальных первичных фибробластов человека обрабатывали различными агентами, вызывающими повреждения ДНК, и оценивали уровень экспрессии USP7S, фосфорилированного по S18, в течение нескольких часов после обработки. В качестве примера приведены результаты подобного эксперимента с использованием ионизирующей радиации (Рисунок 3.20 А). Как и в случае MULE, было обнаружено статистически достоверное кратковременное снижение клеточного уровня содержания pUSP7S после обработки клеток повреждающим ДНК агентом, сопровождающееся дестабилизацией HDM2 и соответствующим накоплением p53 (Рисунок 3.20 А-Б). Аналогичные результаты, хотя и с меньшей амплитудой, наблюдали и в клетках HCT116 p53<sup>+/+</sup>, что исключает специфичность эффекта в зависимости от типа клеток (Рисунок 3.20 В).

Наблюдаемое дефосфорилирование может быть последствием либо пониженной активности/стабильности или комплексообразования киназы CK2 с USP7S в ответ на повреждения ДНК, либо повышенной активности/стабильности или комплексообразования с USP7S фосфатазы, ответственной за фосфорилирование USP7S по остатку S18. Активность и клеточный уровень экспрессии CK2, а также эффективность взаимодействия киназы с USP7S не подвергались изменениям в ответ на обработку клеток агентами, повреждающими ДНК.

Соответственно, было высказано предположение, что дефосфорилирование USP7S может регулироваться путем модуляции активности/клеточного содержания фосфатазы в ответ на повреждения ДНК. Поэтому на следующем этапе данной работы была проведена биохимическая идентификация фосфатазы, ответственной за дефосфорилирование USP7S по аминокислотному остатку S18.

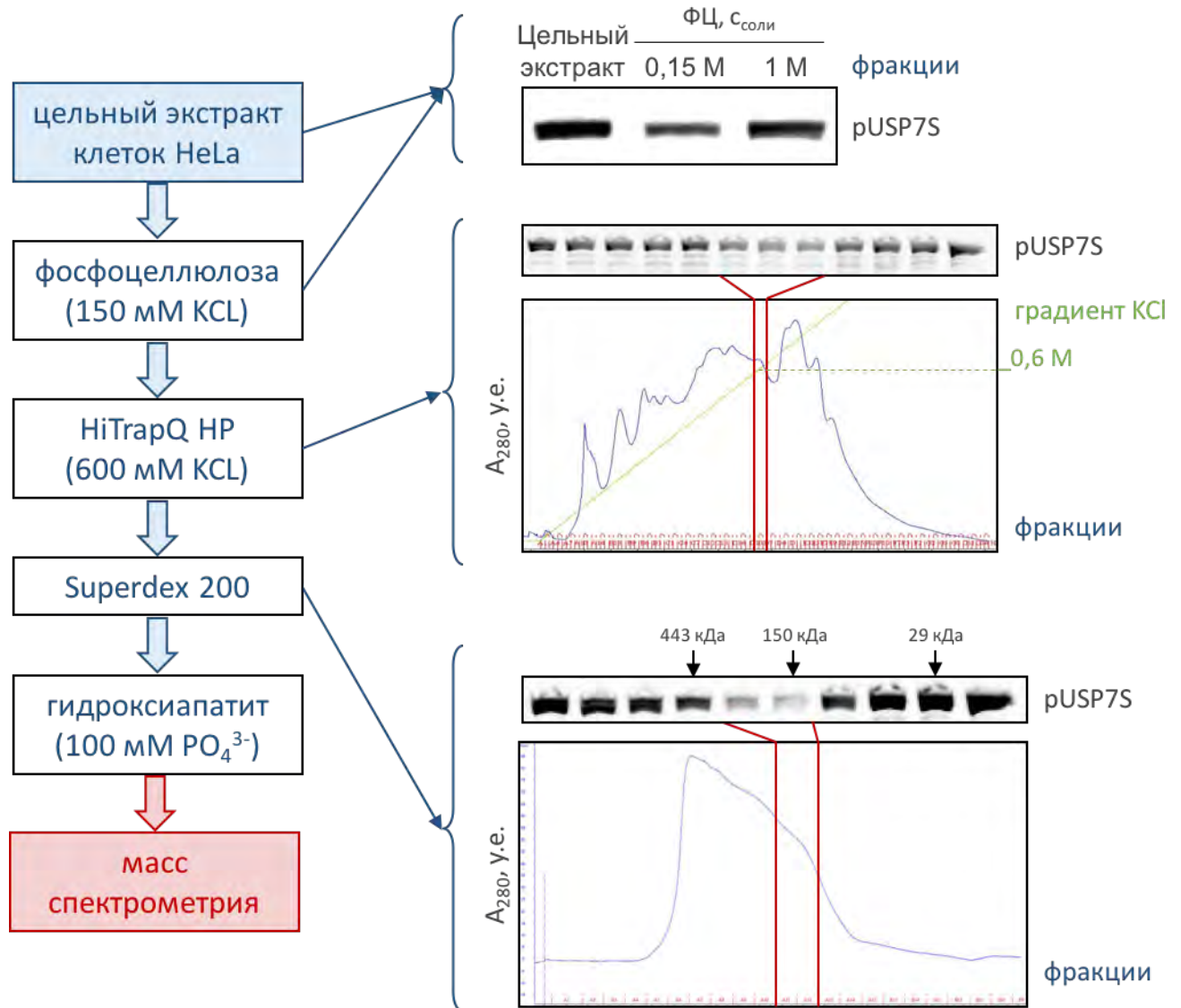


**Рисунок 3.20.** Кинетика изменения клеточного содержания рUSP7S после обработки клеток человека ионизирующей радиацией. Клетки (**А-Б**) TIG-1 и (**В**) HCT116 p53<sup>+/+</sup> подвергали обработке 10 Гр ионизирующей радиации (ИР) с последующей кинетикой репарации в течение указанных интервалов времени. Контрольные клетки (контр) обрабатывали аналогично остальным в отсутствие ИР. Образцы анализировали методом белкового SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по β-актину. **Б.** Представлены данные 3-х независимых экспериментов, \* $P < 0,01$ , \*\* $P < 0,001$ .

### 3.2.6. Фосфатаза PPM1G дефосфорилирует остаток S18 в USP7S

Для биохимического выделения фосфатазной активности, дефосфорилирующей остаток S18 в USP7S, использовали ранее описанный принцип последовательного фракционирования цельного клеточного экстракта HeLa через ряд хроматографических колонок (раздел “3.2.4. Казеин-киназа 2 фосфорилирует USP7S по остатку серина 18”). Для идентификации фракций, содержащих требуемую фосфатазную активность, использовали реакции

дефосфорилирования *in vitro*, в которых роль субстрата играл рекомбинантный USP7S, очищенный из клеток Sf9 и в значительной степени фосфорилированный по остатку S18 (порядка 60 %; Рисунок 3.15).

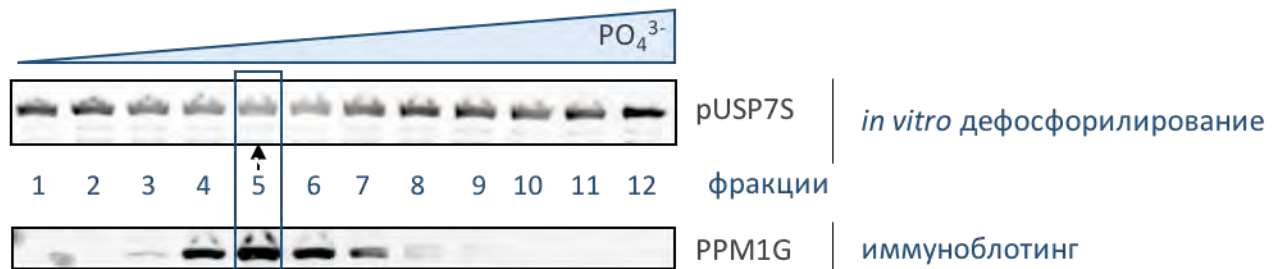


**Рисунок 3.21.** Схема биохимической идентификации фосфатазы, ответственной за дефосфорилирование USP7S по остатку S18 (левая панель). Реакции дефосфорилирования *in vitro* проводили в буфере для дефосфорилирования в течение 60 мин при 300 об/мин и 30 °C с использованием фракций после хроматографического разделения цельного клеточного экстракта HeLa на фосфоцеллюлозе, Q-сефарозе и Superdex 200 (5 мкл) и USP7S (1 пмоль) в качестве субстрата (правая панель). Реакционные смеси анализировали методом белкового SDS-электрофореза в 10 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с антителами к pUSP7S.

В целом, последовательность фракционирования цельного клеточного экстракта HeLa для выделения фосфатазной активности состояла из 4-х стадий и была схожа с последовательностью хроматографического разделения экстракта, использованной для идентификации киназной активности, за исключением повторной стадии ионообменной

хроматографии на MonoQ (Рисунок 3.21, левая панель). Более короткая схема анализа в данном случае связана с высокой степенью разделения экстракта на анионообменном носителе MonoQ, элюция фосфатазной активности с которого происходила в буфере с относительно высокой концентрацией соли (0,6 М KCl). Также приведены примеры детекции фосфатазной активности полученных фракций на различных стадиях хроматографического разделения с использованием USP7S в качестве субстрата (Рисунок 3.21, правая панель).

Фракции, полученные после заключительной стадии хроматографического разделения цельного клеточного экстракта на гидроксиапатите, демонстрировали значительную фосфатазную активность в реакции дефосфорилирования *in vitro*, и проявляющая наиболее высокую активность фракция 5 была проанализирована методом тандемной масс-спектрометрии (Рисунок 3.22, верхняя панель). Единственным кандидатом на роль дефосфорилирования USP7S, обнаруженным в данной фракции, является серин/треонин-специфичная протеинфосфатаза PPM1G, также часто называемая PP2C $\gamma$  (Таблица 3.2). PPM1G была обнаружена в хроматографических фракциях, демонстрирующих USP7S-фосфатазную активность, методом иммуноблотинга, что подтверждает данные масс-спектрометрии (Рисунок 3.22, нижняя панель).



**Рисунок 3.22.** Анализ фосфатазной активности фракций после заключительной стадии фракционирования цельного клеточного экстракта HeLa на колонке с гидроксиапатитом. Реакции *in vitro* дефосфорилирования проводили с использованием USP7S (1 пмоль) и 5 мкл фракции (верхняя панель). Реакционные смеси (верхняя панель) или хроматографические фракции (нижняя панель) разделяли методом SDS-электрофореза в 10 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с антителами к pUSP7S и PPM1G. Фракцию 5 (обозначена стрелкой) анализировали методом тандемной масс-спектрометрии.

**O15355: протеинфосфатаза человека 1G (PPM1G)**

MGAYLSQPNTVK**CSGDGVGAPRL**LPLPYGFSAMQGWVSMEDAHNCIPEL  
DSETAMFSVYDGHGGEEVALYCAKYL**PDI**IKDQKAYKEGKLQKALEDAFL  
AIDAKLTTEEVIKELAQIAGRPT**EDEDEKEKVA**DEDDVDNEEAALLHEEAT  
MTIEELLTRYGQ**NCHKGPPH**SKSGGGT**GEE**PGSQGLNGEAGPED**STRETPS**  
**QENGPTAK**AYTG**FSSNS**ERGTEAGQ**VGE**PGIPTGEAGPSCSSASDKLPRVA  
KSKFFEDSEDESDEAE**EEEEED**SEECSE**EEED**GYSSEEAE**NEEDED**DTEEA**EED**  
DEEEEE**EM**VPGMEG**KEE**PGSDSGTTAVVALIRGKQLIVANAGDSRC**CVVS**  
**EAGK**ALDMSYDHKPEDEVELARIKNAGGKVTMDGRVNGGLNLSRAIGDH  
FYKRNK**NLP**PEEQMISAL**PDI**KVLT**LTDD**HEFMVIACDGIW**NVM**SSQEVVD  
FIQSKISQRDENGELRLLSSIVE**ELL**DQCLAPD**TS**GDGTGCDN**MTC**IIICFKPR  
NTAELQPESGKRKLEEV**LST**E**GAE**ENGNSDKKKK**KAKRD**

Значение Mascot Score: 140

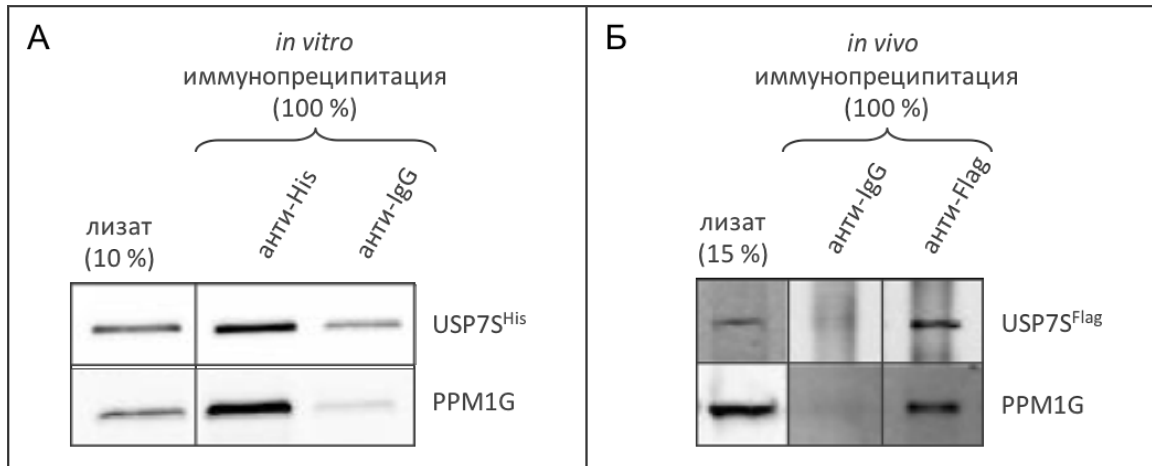
Пептид	$M_{\text{эксп}}$ [Да]	$M_{\text{расч}}$ [Да]	$\Delta M$ , [Да]
<sup>13</sup> CSGDGVGAPR <sub>22</sub>	974.433	974.424	0.009
<sup>198</sup> ETPSQENGPTAK <sub>209</sub>	1257.594	1257.583	0.011
<sup>351</sup> CVVSEAGK <sub>358</sub>	848.407	848.406	0.001

**Таблица 3.2.** Идентификация фосфатазы PPM1G во фракции 5 после хроматографического разделения на гидроксипатите методом тандемной масс-спектрометрии. Жирным шрифтом отмечены обнаруженные пептиды PPM1G с указанием номера аминокислотного остатка в последовательности белка (идентификатор SwissProt: O15355). Приведены данные о экспериментальной ( $M_{\text{эксп}}$ ) и расчетной ( $M_{\text{расч}}$ ) молекулярной массе идентифицированных пептидов.

Вышеописанная идентификация PPM1G методом масс-спектрометрии создала основу для ряда дальнейших экспериментов по определению, действительно ли данная фосфатаза обеспечивает дефосфорилирование остатка S18 в USP7S. Для проверки существования взаимодействия между PPM1G и USP7S *in vitro* проводили иммунопреципитацию из смеси очищенных рекомбинантных USP7S<sup>His</sup> и PPM1G (Рисунок 3.23 А). При преципитации USP7S<sup>His</sup> с использованием антител против His-эпитопа наблюдалась коиммунопреципитация PPM1G, причем аналогичного эффекта не было обнаружено в контрольном эксперименте, в котором для иммунопреципитации использовали нормальные кроличьи IgG. Аналогичным образом было показано взаимодействие USP7S и PPM1G *in vivo*. В данном случае проводили одновременную экспрессию USP7S с эпитопом Flag и PPM1G в клетках HeLa с последующей иммунопреципитацией USP7S<sup>Flag</sup> с использованием Flag-эпитоп-антител (Рисунок 3.23 Б). При



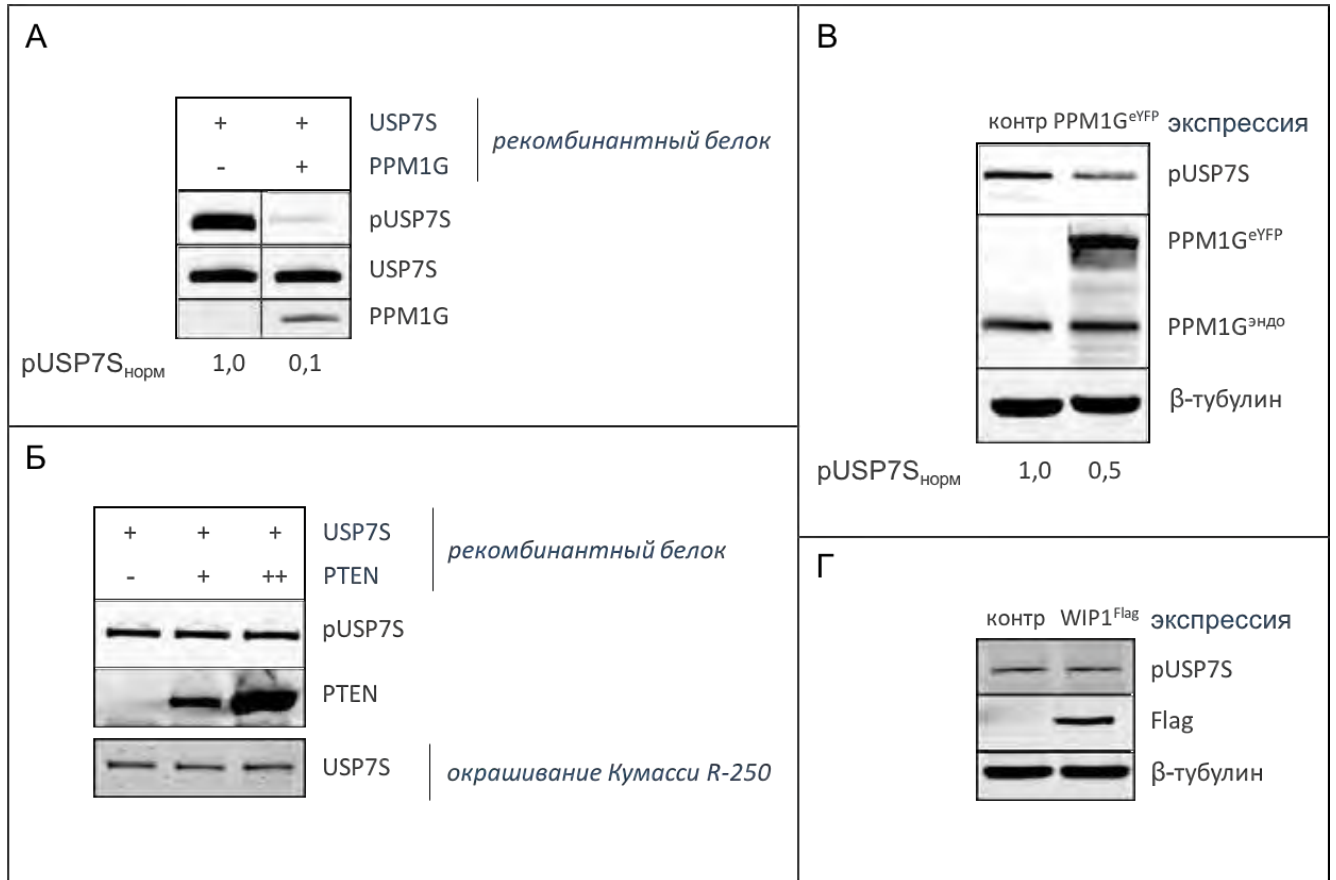
этом наблюдалась коиммунопреципитация PPM1G с осажденным USP7S. Полученные данные доказывают существование белкового взаимодействия между убиквитин-специфической протеазой USP7S и серин/треонин-специфичной протеинфосфатазой PPM1G *in vitro* и *in vivo*, а также указывают на возможную роль PPM1G в дефосфорилировании USP7S.



**Рисунок 3.23.** Взаимодействие USP7S и PPM1G *in vitro* и *in vivo*. **А.** Иммунопреципитацию с использованием антител против His-эпитопа проводили из эквимольной смеси (0,5 пмоль) очищенных рекомбинантных USP7S<sup>His</sup> и PPM1G. **Б.** Клетки HeLa одновременно трансфицировали эквимольными количествами плазмид (0,5 пмоль), экспрессирующими гены USP7S с Flag-эпитопом и PPM1G в течение 24 ч. Иммунопреципитацию USP7S<sup>Flag</sup> проводили из цельного клеточного экстракта с использованием анти-Flag антител. Цельный клеточный экстракт (лизат, (А) 10 или (Б) 15 %) и иммунопреципитаты (100 %) разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 10 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Для контроля неспецифического связывания использовали нормальные кроличьи IgG.

Для выяснения, является ли PPM1G фосфатазой, дефосфорилирующей аминокислотный остаток S18 в USP7S, были проведены реакции дефосфорилирования *in vitro* в присутствии PPM1G, полученной с использованием системы для трансляции *in vitro*, и USP7S в качестве субстрата (Рисунок 3.24 А). Было показано, что PPM1G катализирует эффективное дефосфорилирование USP7S по остатку S18 *in vitro*, причем данный эффект является специфическим, поскольку аналогичного дефосфорилирования USP7S не наблюдалось при инкубации фермента с очищенной рекомбинантной фосфатазой PTEN, которая играет важную роль в различных аспектах клеточного ответа на повреждения ДНК (Рисунок 3.24 Б) [Ming, M. & He, Y.Y., 2012]. Для исследования PPM1G-зависимого дефосфорилирования USP7S *in vivo* была проведена трансфекция клеток HeLa экспрессионным вектором, кодирующим PPM1G с GST-эпитопом, с последующей детекцией уровня фосфорилирования USP7S методом иммуноблотинга (Рисунок 3.24 В). Было установлено, что избыточная экспрессия PPM1G

приводит к дефосфорилированию остатка S18 в USP7S, тогда как избыточная экспрессия фосфатазы WIP1, в клеточной ситуации индуцируемая в ответ на повреждения ДНК, влияния на уровень фосфорилирования USP7S не оказывала (Рисунок 3.24 В-Г).

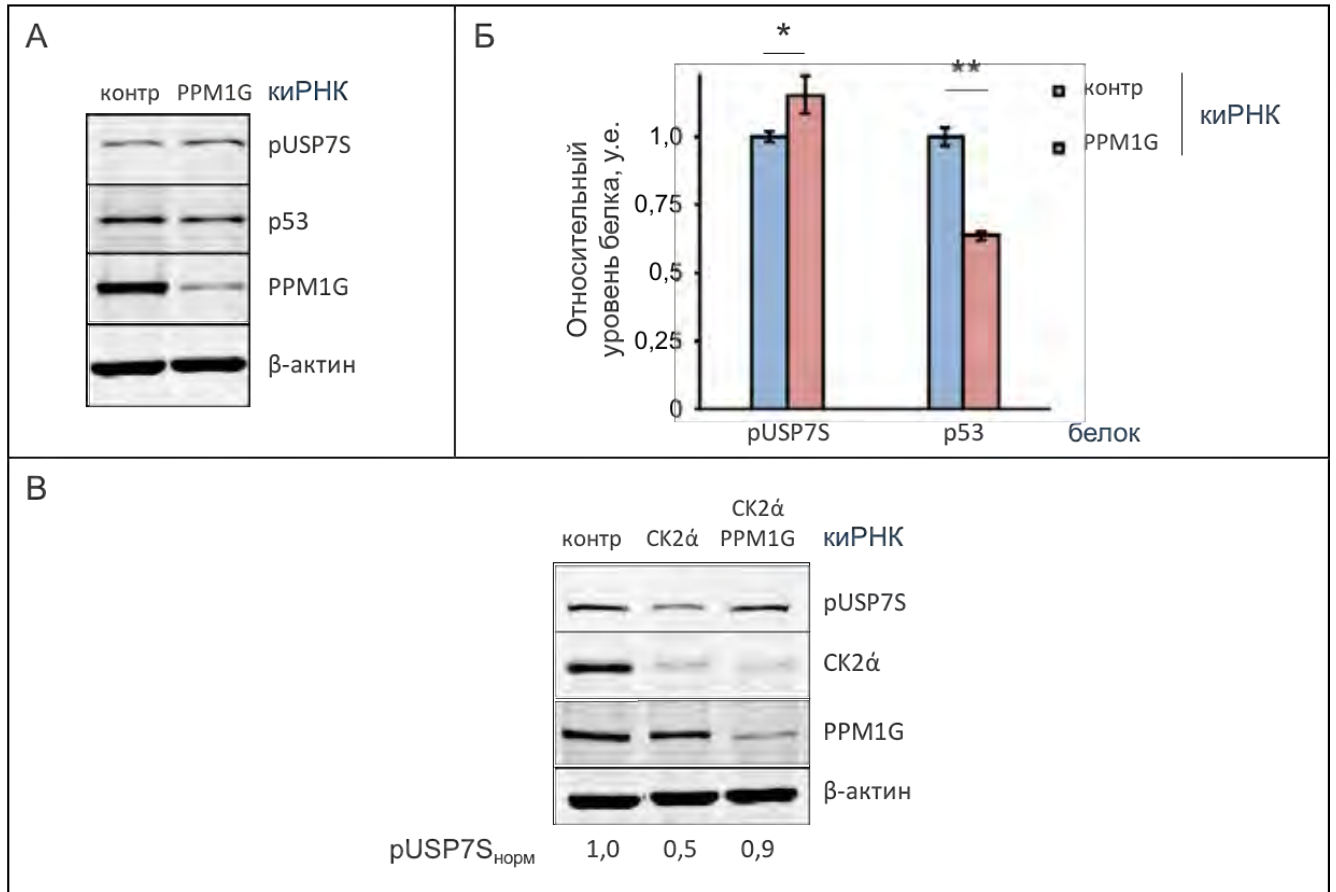


**Рисунок 3.24.** PPM1G дефосфорилирует остаток S18 в USP7S *in vitro* и *in vivo*. **А-Б.** Реконбинантный USP7S (2,8 пмоль) инкубировали в присутствии реконбинантных фосфатаз PPM1G (2,8 пмоль; получена с использованием системы для трансляции *in vitro*) или PTEN (2,8 и 11,2 пмоль, очищена из *E.coli*) в буфере для дефосфорилирования в течение 30 мин при 300 об/мин и 30 °С. **В-Г.** Клетки HeLa трансфицировали 1 пмоль плазмидной ДНК, кодирующей ген **(В)** PPM1G с eYFP-эпитопом или **(Г)** WIP1 с Flag-эпитопом, в течение 24 ч. В качестве контроля использовали ДНК экспрессионного вектора, не кодирующего гена белка (контр). **А-Г.** Образцы разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 10 % ПААГ с последующим иммуноблотингом. Для контроля нанесения равных количеств субстрата использовали гибридизацию с антителами к USP7S или окрашивание геля в Кумасси R-250. Денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по β-тубулину.

Для исследования физиологических последствий потери функциональной активности PPM1G в клетках человека был проведен нокдаун экспрессии PPM1G с использованием киРНК. Было показано сравнительно небольшое, но статистически значимое увеличение количества фосфорилированного USP7S (Рисунок 3.25 А-Б), что согласуется с наблюдением о высоком уровне фосфорилирования эндогенного фермента (раздел “3.2.1. Специфическая изоформа USP7 (USP7S) фосфорилирована по остатку S18”). Результатом подобного увеличения

количества фосфорилированного USP7S после обработки клеток кИРНК против *PPM1G* явилось снижение клеточного уровня содержания p53 (Рисунок 3.25 А-Б), что говорит о важности присутствия функциональной фосфатазы в клетках, особенно в случае изменения стационарного количества повреждений ДНК. Для демонстрации того, что эффективность фосфорилирования USP7S по остатку S18 зависит от баланса клеточных активностей киназы CK2 и фосфатазы PPM1G, была проведена оценка количества pUSP7S в отсутствие экспрессии CK2 или CK2 и PPM1G одновременно. Результатом нокдауна CK2 явилось снижение уровня содержания фосфорилированного USP7S, тогда как при одновременном нокдауне CK2 и PPM1G наблюдалось восстановление содержания pUSP7S до исходного (Рисунок 3.25 В). Полученные результаты говорят о противоположном действии киназы CK2 и фосфатазы PPM1G на процесс фосфорилирования USP7S.

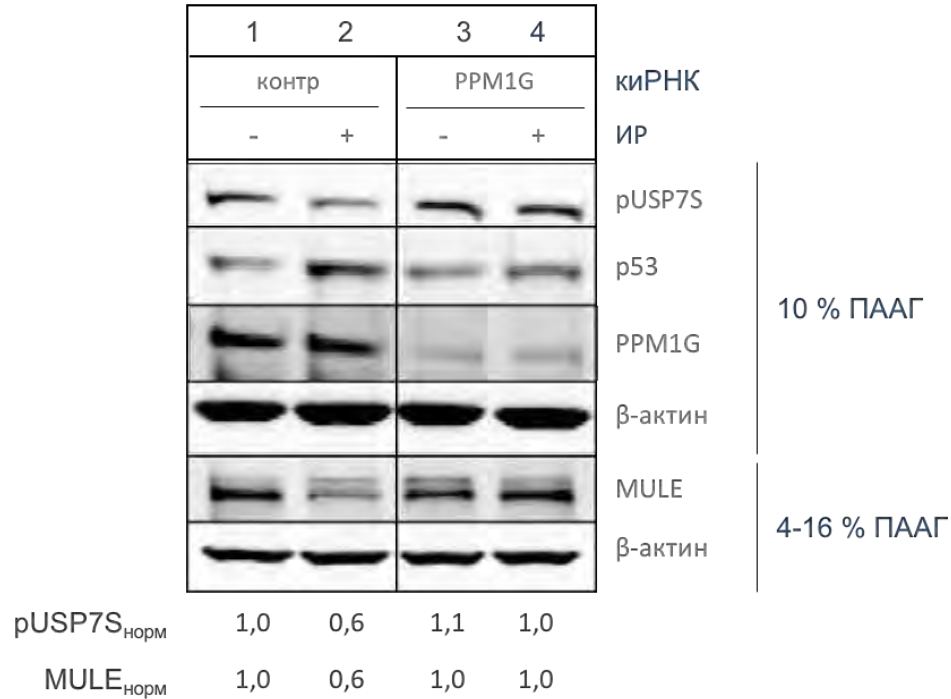
Таким образом, была проведена биохимическая идентификация протеинфосфатазы PPM1G, которая ответственна за дефосфорилирование остатка S18 в USP7S. Было показано, что PPM1G взаимодействует с USP7S, а также обеспечивает дефосфорилирование деубиквитинилирующего фермента *in vitro* и *in vivo*. Стационарный уровень фосфорилирования USP7S, который составляет порядка 60-80 % (Рисунок 3.10 Г), поддерживается за счет баланса активностей фосфорилирующей остаток S18 в USP7S киназы CK2 и фосфатазы PPM1G. Интересным наблюдением является то, что в отсутствие PPM1G наблюдается снижение стационарного уровня содержания p53, обусловленное стабилизацией USP7S через S18-зависимое фосфорилирование и соответствующим повышением стабильности E3-убиквитинлигаз MULE и HDM2 (Рисунок 3.25 А-Б). Полученные данные указывают на значимость функциональной активности PPM1G для клеточного ответа на повреждения ДНК, важной частью которого является USP7S-зависимая стабилизация p53 и ферментов ЭРО и ОР-репарации. Соответственно, на следующей стадии данного исследования была проведена экспериментальная проверка ранее высказанной гипотезы о том, что дефосфорилирование USP7S в ответ на повреждения ДНК зависит от модуляции активности и/или клеточного уровня содержания фосфатазы PPM1G или ее комплексообразования с USP7S (раздел “3.2.5. Дефосфорилирование USP7S в ответ на повреждения ДНК”).



**Рисунок 3.25.** Стационарный уровень фосфорилирования USP7S по остатку S18 обеспечивается балансом ферментативных активностей киназы CK2 и фосфатазы PPM1G. **А-В.** Клетки HCT116 p53<sup>+/+</sup> трансфицировали 200 пмоль киРНК против (**А-Б**) PPM1G и (**В**) CK2α или одновременно CK2α и PPM1G в течение 60 ч. В качестве контроля использовали уникальную последовательность киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (контр). Образцы анализировали методом белкового SDS-электрофореза в 10 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами, денситометрические значения которого нормализовали по β-актину. **Б.** Представлены данные 3-х независимых экспериментов, \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 10^{-4}$ .

### 3.2.7. Эффективность фосфорилирования USP7S и стабильность MULE в ответ на повреждения ДНК регулируются фосфатазой PPM1G

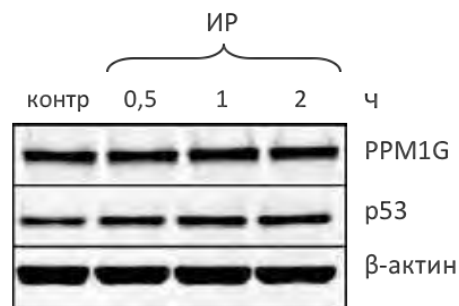
Для оценки изменений клеточного содержания фосфорилированного USP7S в ответ на повреждения ДНК в зависимости от статуса протеинфосфатазы проводили нокдаун экспрессии PPM1G с использованием киРНК в клетках нормальных первичных фибробластов человека TIG-1 с последующей обработкой клеток ионизирующей радиацией и оценивали содержание USP7S, фосфорилированного по остатку S18 (Рисунок 3.26). Как и было показано ранее (Рисунок 3.20), эффективность фосфорилирования USP7S снижалась в ответ на индукцию повреждений ДНК, тогда как в отсутствие PPM1G подобного снижения не наблюдалось (Рисунок 3.26, дорожка 4 по сравнению с дорожкой 2).



**Рисунок 3.26.** Снижение содержания фосфорилированного USP7S и стабильности MULE в ответ на обработку клеток человека ионизирующей радиацией (ИР) регулируются в зависимости от статуса PPM1G. Нормальные первичные фибробласты человека TIG-1 трансфицировали 200 пмоль киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (контр), или киРНК против *PPM1G* в течение 60 ч. Клетки затем обрабатывали 10 Гр ИР с последующей заменой среды для культивирования на свежую и инкубацией клеток в присутствии 5 % CO<sub>2</sub> и 37 °C в течение 1 ч. Клетки собирали, проводили экстракцию белков и разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 10 или 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по β-актину.

Принимая во внимание то, что USP7S предотвращает самоубиквитинирование и последующую протеасомную деградацию MULE, и уровень клеточного содержания последнего регулируется в соответствии с количеством повреждений ДНК, была также проведена оценка стабильности MULE в зависимости от клеточного статуса PPM1G. Как и предполагалось, продемонстрированное ранее USP7S-зависимое снижение стабильности MULE в ответ на обработку клеток агентами, вызывающими повреждения ДНК (Рисунок 3.1 и раздел “3.1.2. Убиквитин-зависимая регуляция стационарного уровня содержания MULE”), в отсутствие PPM1G не наблюдалось (Рисунок 3.26, дорожка 4 по сравнению с дорожкой 2). Следует также отметить, что стабилизация p53, который является субстратом обоих MULE и HDM2, в ответ на обработку клеток ионизирующей радиацией наблюдалась только в присутствии PPM1G (Рисунок 3.26, дорожка 2).

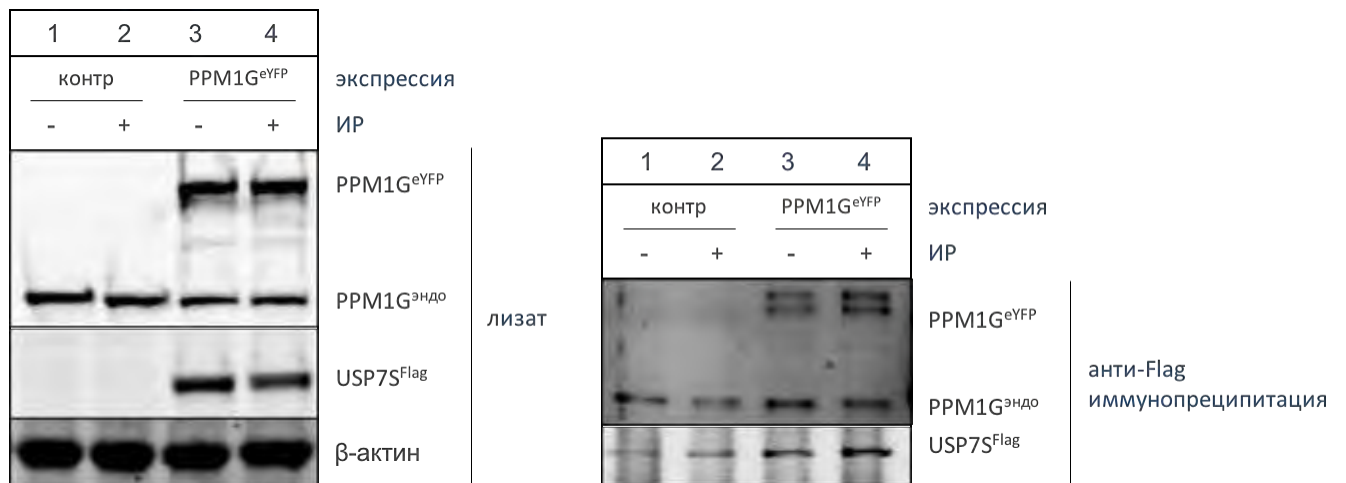
Полученные данные свидетельствуют о том, что дефосфорилирование USP7S, и, как следствие, стабильность MULE и важных в контексте данной работы субстратов этой E3-убиквитинлигазы, включающих p53 и POL  $\beta$ , регулируются протеинфосфатазой PPM1G в зависимости от количества повреждений ДНК. Следует отметить, что, несмотря на наблюдаемое снижение содержания фосфорилированного USP7S после обработки клеток ионизирующей радиацией, клеточный уровень экспрессии PPM1G в ответ на повреждения ДНК не увеличивается (Рисунок 3.26, дорожки 1, 2 и Рисунок 3.27). Поскольку влияние СК2 на статус фосфорилирования USP7S в ответ на повреждения ДНК было исключено (раздел “3.2.5. Дефосфорилирование USP7S в ответ на повреждения ДНК”), данное наблюдение свидетельствует о том, что более эффективное дефосфорилирование USP7S в ответ на облучение обеспечивается либо повышенной активностью PPM1G, либо более эффективным образованием белкового комплекса между PPM1G и USP7S после обработки клеток ионизирующей радиацией.



**Рисунок 3.27.** Отсутствие изменений клеточного уровня PPM1G после обработки клеток человека ионизирующей радиацией (ИР). Клетки TIG-1 подвергали обработке 10 Гр ИР с последующей кинетикой репарации в течение указанных интервалов времени. Контрольные клетки (контр) обрабатывали аналогично остальным в отсутствие ИР. Образцы анализировали методом белкового SDS-электрофореза в 10 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Контроль нанесения равных количеств цельного клеточного экстракта проводили по  $\beta$ -актину.

Для исследования зависимости эффективности взаимодействия между USP7S и PPM1G *in vivo* от уровня повреждений ДНК была проведена коэкспрессия USP7S<sup>Flag</sup> и PPM1G<sup>eYFP</sup> в клетках TIG-1 с последующей коиммунопреципитацией данных белков из цельного клеточного экстракта, полученного в отсутствие и после обработки клеток ионизирующей радиацией (Рисунок 3.28). При использовании антител против Flag-эпитопа наблюдалась эффективная иммунопреципитация USP7S<sup>Flag</sup> и коиммунопреципитация эндогенной и экзогенной форм фосфатазы PPM1G, причем каких-либо значительных изменений в количестве осаждаемой

PPM1G до и после обработки клеток ионизирующей радиацией не наблюдалось (Рисунок 3.28, правая панель, дорожка 4 по сравнению с дорожкой 2). Таким образом, генотоксический стресс не оказывает положительного влияния на образование белкового комплекса между USP7S и PPM1G, указывая на потенциальную роль изменяющейся в ответ на повреждения ДНК активности фосфатазы в наблюдаемом дефосфорилировании USP7S. С учетом данного предположения задачей следующей стадии данного исследования была идентификация белков, контролирующих активность PPM1G в ответ на повреждения ДНК.

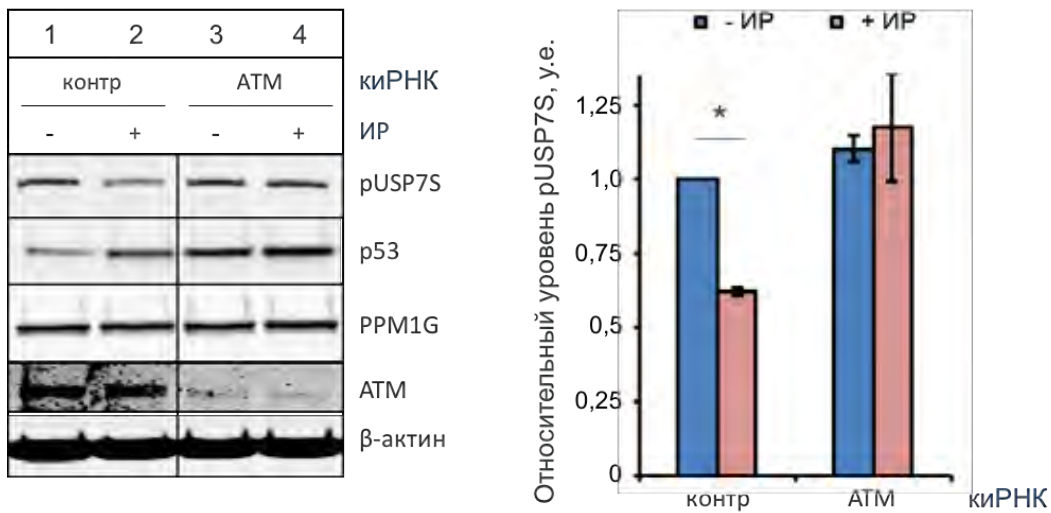


**Рисунок 3.28.** Отсутствие изменений в эффективности взаимодействия *in vivo* между USP7S и PPM1G после обработки клеток человека ионизирующей радиацией (ИР). Клетки TIG-1 одновременно трансфицировали эквимольными количествами плазмидных ДНК (1 пмоль), кодирующих USP7S с Flag-эпитопом и PPM1G с eYFP-эпитопом, в течение 24 ч. В качестве контроля использовали ДНК экспрессионных векторов, не кодирующих генов белков (контр). Клетки затем обрабатывали 10 Гр ИР с последующей заменой среды для культивирования на свежую и инкубацией клеток в присутствии 5 % CO<sub>2</sub> и 37 °С в течение 1 ч. Контрольные клетки подвергали аналогичным манипуляциям в отсутствие обработки ИР. Клетки собирали, проводили экстракцию белков и использовали для иммунопреципитации USP7S<sup>Flag</sup> с использованием антител против Flag-эпитопа. Клеточные лизаты (левая панель) и иммунопреципитаты (правая панель) анализировали методами белкового SDS-электрофореза в 10 % ПААГ и иммуноблотинга с гибридизацией с указанными антителами. Для контроля нанесения равных количеств цельного клеточного экстракта и иммунопреципитатов USP7S<sup>Flag</sup> проводили гибридизацию с антителами к β-актину и Flag-эпитопу, соответственно.

### 3.2.8. Активность PPM1G и статус фосфорилирования USP7S регулируются протеинкиназой ATM в ответ на повреждения ДНК

С учетом того, что фосфатаза PPM1G не взаимодействует с ДНК напрямую, открытым остается вопрос идентификации вышестоящих сенсоров повреждений ДНК, которые регулируют активность PPM1G, таким образом опосредованно контролируя изменения в эффективности репарации таких повреждений системой ЭРО. Для ответа на данный вопрос был

проведен глубокий поиск белков-сенсоров и белков-преобразователей сигнала в рамках клеточного ответа на повреждения ДНК, которые взаимодействуют с PPM1G, с использованием литературы и хранилищ данных масс-спектрометрических экспериментов PRIDE и The Global Proteome Machine Organization. В результате подобного поиска было обнаружено, что, по данным полногеномного анализа белков, фосфорилируемых в ответ на повреждения ДНК, PPM1G является субстратом протеинкиназы ATM, причем ATM может фосфорилировать аминокислотный остаток S183 в PPM1G в ответ на облучение клеток человека ионизирующей радиацией и УФ-излучением [Matsuoka, S. *et al.*, 2007]. Соответственно, необходимо было выяснить, является ли дефосфорилирование USP7S, наблюдаемое в ответ на повреждения ДНК, ATM-зависимым процессом.



**Рисунок 3.29.** Дефосфорилирование USP7S в ответ на обработку клеток человека ионизирующей радиацией (ИР) регулируется в зависимости от статуса киназы ATM. **А-Б.** Нормальные первичные фибробласты человека TIG-1 трансфицировали 200 пмоль киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (контр), или киРНК против *ATM* в течение 60 ч. Клетки обрабатывали 10 Гр ИР с последующей заменой среды для культивирования на свежую и инкубацией клеток в присутствии 5 % CO<sub>2</sub> и 37 °С в течение 1 ч. Клетки собирали и экстрагированные белки разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по β-актину. **Б.** Представлены данные 3-х независимых экспериментов, \* $P < 10^{-9}$ .

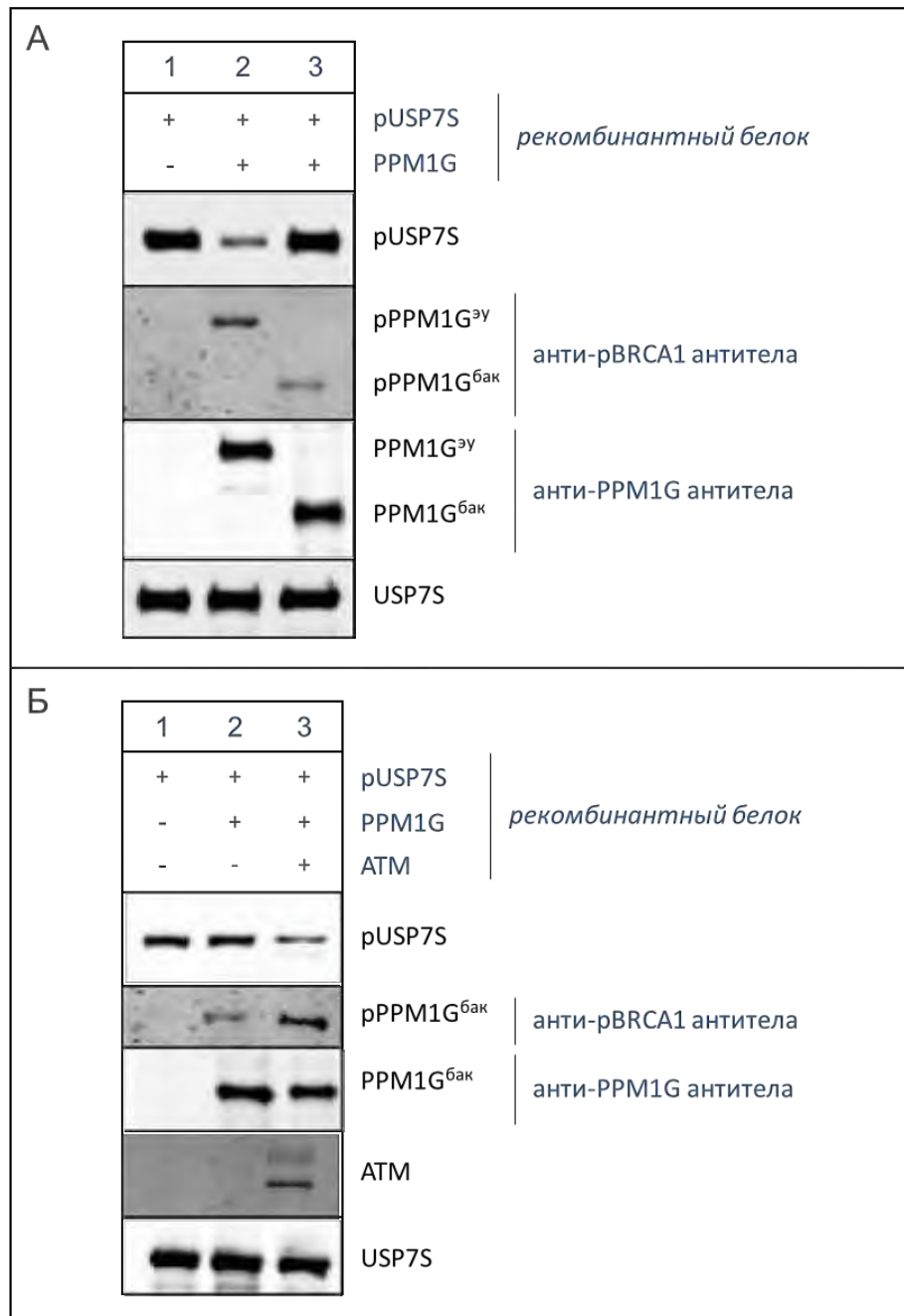
Для оценки влияния клеточного статуса ATM на содержание фосфорилированного USP7S в ответ на повреждения ДНК был проведен нокдаун экспрессии *ATM* с использованием киРНК в клетках TIG-1 с последующей обработкой клеток ионизирующей радиацией и детекцией клеточного уровня содержания рUSP7S (Рисунок 3.29). Было обнаружено, что в этих



условиях дефосфорилирование USP7S наблюдается только в ATM-положительных клетках, тогда как в отсутствие ATM снижения концентрации фосфорилированного USP7S в ответ на облучение не происходит (Рисунок 3.29, дорожка 4 по сравнению с дорожкой 2). Полученные данные свидетельствуют о том, что дефосфорилирование USP7S фосфатазой PPM1G в ответ на генотоксический стресс является ATM-зависимым процессом. Аналогичные результаты наблюдали при обработке клеток TIG-1 пероксидом водорода и метилметансульфонатом. Несмотря на относительно высокую стабильность USP7S в отсутствие ATM, нокаун экспрессии *ATM* привел к значительному повышению клеточного содержания p53, причем последний не увеличился существенно после обработки ATM-дефицитных клеток ионизирующей радиацией (Рисунок 3.29, дорожки 3, 4 по сравнению с дорожкой 1). Подобный эффект, вероятно, связан с существованием альтернативных путей индукции p53-зависимого клеточного ответа на повреждения ДНК в отсутствие ATM, регулируемых, например, другими протеинкиназами семейства PIKK, включая ATR и ДНК-ПКс [Kim, S.T. *et al.*, 1999; Tibbetts, R.S. *et al.*, 1999].

Продемонстрировав, что PPM1G-зависимое снижение эффективности фосфорилирования USP7S после генотоксического стресса зависит от присутствия в клетках киназы ATM, и с учетом того, что ATM может фосфорилировать PPM1G в ответ на облучение [Matsuoka, S. *et al.*, 2007], было решено выяснить, контролируется ли фосфатазная активность PPM1G через ATM-зависимое фосфорилирование. Для этого была проведена очистка рекомбинантной фосфатазы PPM1G из двух источников: PPM1G<sup>yu</sup> была очищена из эукариотических клеток с использованием системы для трансляции *in vitro*, тогда как человеческую рекомбинантную PPM1G<sup>бак</sup> выделяли из клеток *E.coli* (Рисунок 3.30 А, дорожки 2 и 3, соответственно). Следует отметить, что разница в молекулярной массе между вышеописанными ферментами обусловлена наличием GST-эпитопа в PPM1G<sup>yu</sup>. Очищенные ферменты были проанализированы методом белкового SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с антителами против фосфорилированного по остатку S1423 опухолевого супрессора BRCA1, которые распознают фосфорилированные аминокислотные мотивы SQ/TQ, являющиеся консенсусными последовательностями для ATM-зависимого фосфорилирования [Matsuoka, S. *et al.*, 2007]. В результате иммуноблотинга с

использованием анти-pBRCA1 антител было установлено, что очищенная из эукариотических клеток PPM1G<sup>эу</sup> частично фосфорилирована по ATM-специфическим сайтам.



**Рисунок 3.30.** ATM-зависимое фосфорилирование стимулирует фосфатазную активность PPM1G. **А-Б.** Реакции дефосфорилирования рекомбинантного USP7S (2,8 пмоль) *in vitro* в присутствии рекомбинантной фосфатазы (**А**) PPM1G<sup>эу</sup> (2,8 пмоль), полученной с использованием системы для трансляции *in vitro*, или человеческой PPM1G<sup>бак</sup> (2,8 пмоль), очищенной из *E.coli*, и (**Б**) PPM1G<sup>бак</sup> (2,8 пмоль), которая была фосфорилирована *in vitro* с использованием 2,8 пмоль ATM, очищенной из клеток человека, в буфере для дефосфорилирования в течение 30 мин при 300 об/мин и 30 °С. Образцы разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблотингом с указанными антителами. Для контроля нанесения равных количеств субстрата и фосфатазы использовали гибридизацию с антителами к USP7S и PPM1G, соответственно. Эффективность ATM-зависимого фосфорилирования PPM1G (pPPM1G) определяли с использованием антител против фосфорилированного по остатку S1423 BRCA1 (pBRCA1).

Было показано, что PPM1G<sup>cy</sup> демонстрирует фосфатазную активность в реакциях дефосфорилирования *in vitro* с использованием USP7S, 60-80 % которого находится в фосфорилированной форме, в качестве субстрата (Рисунок 3.30 А, дорожка 2). В отличие от PPM1G<sup>cy</sup>, выделенная из бактериальных клеток PPM1G<sup>бак</sup> нефосфорилирована, хотя и демонстрирует незначительную неспецифичную гибридизацию с анти-pBRCA1 антителами, и не проявляет фосфатазной активности в реакциях дефосфорилирования USP7S *in vitro* (Рисунок 3.30 А, дорожка 3). В дополнение было продемонстрировано, что фосфорилирование неактивной PPM1G<sup>бак</sup> *in vitro* с использованием активной рекомбинантной ATM, очищенной из клеток человека (любезный дар Т. Paull), приводит к индукции фосфатазной активности фермента в реакции USP7S-дефосфорилирования (Рисунок 3.30 Б, дорожка 3 по сравнению с дорожкой 2). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что ATM-зависимое фосфорилирование PPM1G, стимулируемое в ответ на повреждения ДНК через активацию ATM, необходимо для индукции фосфатазной активности фермента и последующего дефосфорилирования USP7S.

### **3.2.9. Биохимическая значимость PPM1G-зависимой регуляции USP7S в ответ на повреждения ДНК**

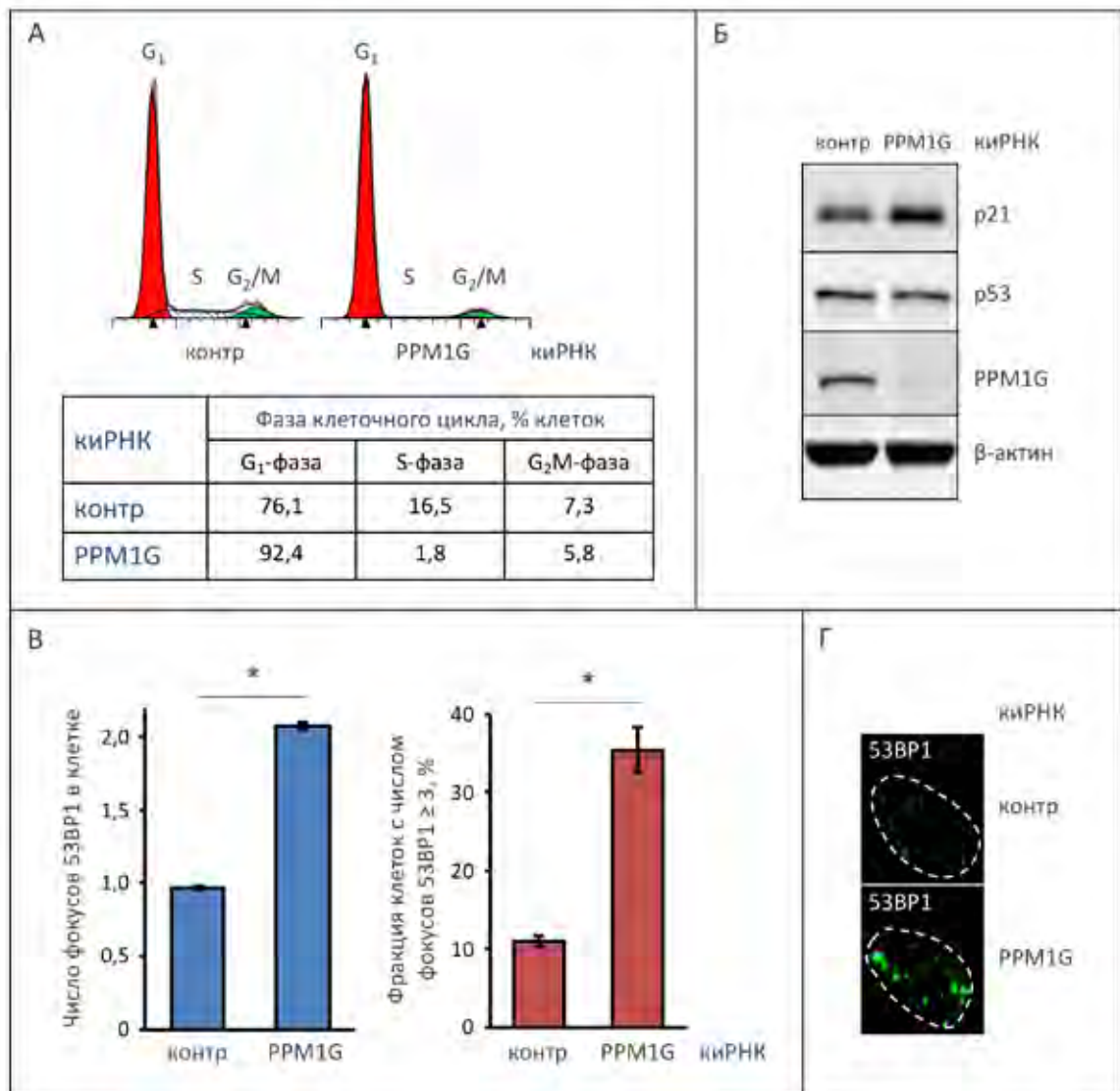
Для выяснения значимости PPM1G-зависимой регуляции стабильности USP7S через фосфорилирование данной убиквитин-специфической протеазы были исследованы краткосрочные последствия нокдауна экспрессии *PPM1G* в клетках нормальных первичных фибробластов человека TIG-1. Выбор данной клеточной линии в настоящем и ряде вышеописанных экспериментов был обусловлен тем, что в отличие от раковых клеточных линий нормальные первичные клетки сохраняют свой кариотип в течение 10-15 пассажей, экспрессируют p53 дикого типа и демонстрируют функциональный ответ на повреждения ДНК.

При подавлении экспрессии *PPM1G* в клетках TIG-1 с использованием кнРНК наблюдалась задержка клеточного цикла в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, несмотря на то, что уровень экспрессии p53 не претерпел изменений (Рисунок 3.31 А-Б). Следует отметить, что отсутствие изменений в клеточном содержании опухолевого супрессора p53 связано с тем, что в PPM1G-дефицитных клетках последовательность передачи сигнала от повреждений ДНК к USP7S нарушена. Наблюдаемая задержка клеточного цикла в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-фазе с высокой вероятностью обеспечивается

p53-независимой стабилизацией ингибитора циклин-зависимых киназ p21/WAF1 (далее p21) на поздних стадиях клеточного ответа на нерепарированные повреждения ДНК (Рисунок 3.31 Б) [Aliouat-Denis, C.M. *et al.*, 2005]. Было установлено, что в отсутствие функциональной PPM1G клетки обладают пониженной способностью к репарации эндогенных повреждений ДНК и/или проявляют относительно неэффективный/замедленный чекпойнт-контроль, что приводит к накоплению нерепарированных ДР как показано при оценке количества фокусов ДР-маркера 53BP1, что соответствует высказанному предположению (Рисунок 3.31 В-Г). Следует отметить, что в PPM1G-дефицитных клетках в наибольшей степени наблюдалось образование укрупненных фокусов 53BP1, иначе называемых ядерными тельцами (Рисунок 3.31 Г), которые образуются в фазе G<sub>1</sub> клеточного цикла в результате митотического переноса нерепарированных повреждений ДНК в дочернюю клетку [Lukas, C. *et al.*, 2011]. В заключение, полученные данные подчеркивают роль PPM1G в клеточном ответе на повреждения ДНК.

Таким образом, было показано, что в эндогенных условиях значительная часть (60-80 %) изоформы USP7S убиквитин-специфической протеазы 7 фосфорилирована по аминокислотному остатку S18. Данное фосфорилирование обеспечивается конститутивно активной казеин-киназой CK2 и поддерживает стабильность и активность фермента, тогда как дефосфорилирование S18 в USP7S осуществляется низкоактивной в эндогенных условиях фосфатазой PPM1G. Стабильный USP7S активно деубиквитинилирует и поддерживает стабильность его субстратов, E3-убиквитинлигаз HDM2 и MULE. HDM2- и MULE-зависимое убиквитинилирование обеспечивает поддержание стационарного уровня содержания (и как следствие эффективной активности) ферментов репарации POL β и POL λ и онкосупрессора p53 на относительно невысоком уровне, которые, тем не менее, обеспечивают эффективную репарацию эндогенных повреждений ДНК. В случае повышенного количества повреждений ДНК в результате генотоксического стресса наблюдается описанная в научной литературе активация протеинкиназы ATM [Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B., 2003] с последующим ATM-зависимым фосфорилированием фосфатазы PPM1G, что стимулирует активность последней. Соответственно, в ответ на повреждения ДНК наблюдается PPM1G-зависимая дестабилизация USP7S благодаря дефосфорилированию остатка S18 фермента, обеспечивающая снижение клеточных уровней содержания HDM2 и MULE за счет повышенного самоубиквитинилирования данных E3-убиквитинлигаз. Последствием последнего

является стабилизация ДНК-полимераз  $\beta$  и  $\lambda$ , которые обеспечивают более эффективную по сравнению с эндогенной ситуацией репарацию дополнительных повреждений ДНК, а также активацию р53-зависимого ответа на повреждения ДНК.



**Рисунок 3.31.** Нокаун экспрессии *PPM1G* приводит к р53-независимой остановке клеточного цикла и накоплению фокусов 53BP1. **А-Г.** Клетки TIG-1 трансфицировали 200 пмоль контрольной кнРНК (контр) или кнРНК против *PPM1G* в течение 60 ч. Клетки анализировали методами (**А**) проточной цитометрии (для анализа содержания ДНК использовали окраску йодидом пропидия), (**Б**) белкового SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблоттингом и гибридизацией с указанными антителами (для контроля нанесения равных количеств цельного клеточного экстракта использовали антитела к  $\beta$ -актину) и (**В-Г**) иммунофлуоресцентного анализа с подсчетом числа фокусов ДР-маркера 53BP1 (для окрашивания ядер использовали DAPI). **А, В.** Представлены численные данные 4-х независимых экспериментов,  $*P < 10^{-6}$ .

Каноническим индуктором киназной активности АТМ являются двуцепочечные разрывы ДНК в соответствии с MRN-зависимым механизмом (раздел “1.3.1. Каноническая активация

АТМ”). Тем не менее в настоящей работе было показано, что регуляция клеточных уровней содержания USP7S и MULE и, как следствие, эффективности систем ЭРО и ОР-репарации контролируется АТМ-зависимой системой передачи сигнала в ответ на изменение количества нерепарированных повреждений ДНК. В соответствии с данным наблюдением, а также литературными экспериментальными данными о том, что АТМ-дефицитные клетки чувствительны к действию пероксида водорода и агентов, вызывающих алкилирование азотистых оснований ДНК [Adamson, A.W. *et al.*, 2002; Guo, Z. *et al.*, 2010b; Haince, J.F. *et al.*, 2007; Pizarro, J.G. *et al.*, 2009], в данной работе было высказано предположение, что в дополнение к канонической активации двуцепочечными разрывами ДНК активность АТМ может модулироваться в зависимости от количества нерепарированных одноцепочечных разрывов ДНК. Экспериментальная проверка данного предположения является основной задачей следующего раздела.

### **3.3. Активация АТМ одноцепочечными разрывами ДНК**

ОР являются одними из наиболее опасных эндогенных типов повреждений ДНК, десятки тысяч которых образуются в результате химической нестабильности ДНК. В дополнение, ОР накапливаются в качестве промежуточных соединений в процессе ЭРО за счет того, что процесс лигирования ДНК является стадией, ограничивающей скорость репарации поврежденных оснований ДНК и ОР. Нерепарированные вовремя ОР являются прекурсорами для образования высокотоксичных ДР в процессе репликации и препятствуют эффективной транскрипции ДНК как описано в разделе “1.1.5. Разрывы цепей ДНК”. Убедительным доказательством того, что эффективная репарация одноцепочечных разрывов ДНК играет важную роль в поддержании стабильности генома, является то, что дефекты ОР-репарации связывают с развитием целого ряда нейродегенеративных и онкологических заболеваний [Date, H. *et al.*, 2001; Markkanen, E. *et al.*, 2015; Moreira, M.C. *et al.*, 2001; Shen, J. *et al.*, 2010; Takashima, H. *et al.*, 2002].

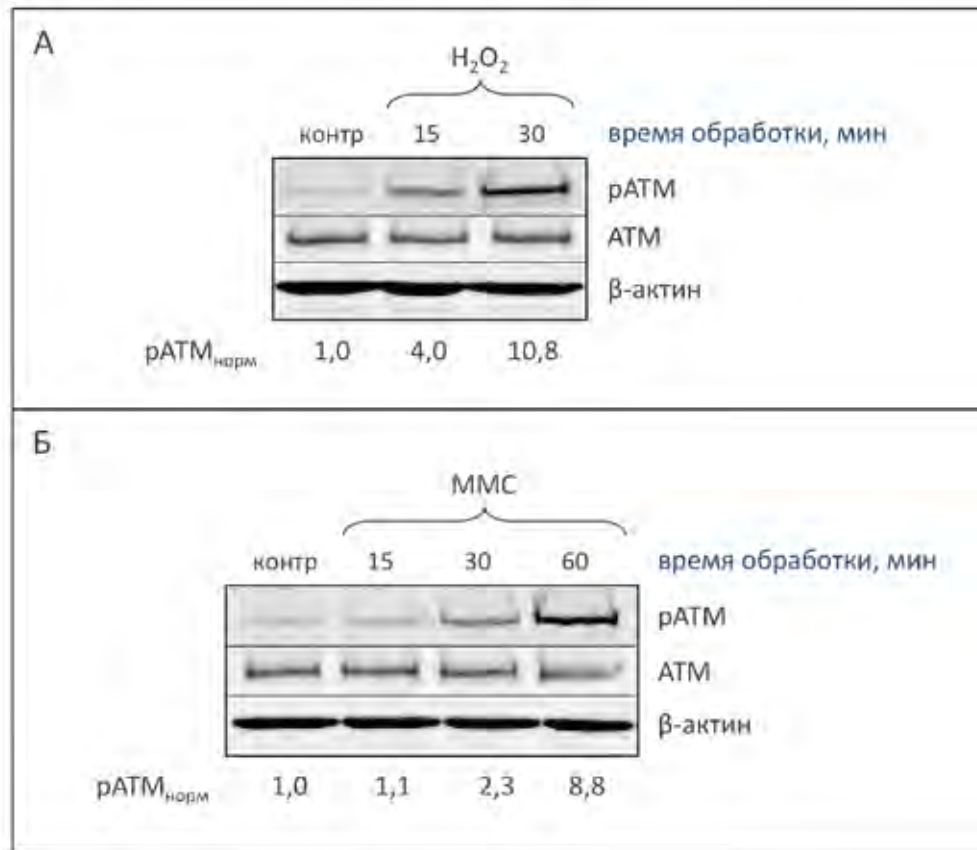
Необходимость обеспечения эффективной репарации ОР перед репликацией ДНК предполагает существование системы клеточного ответа на нерепарированные ОР. По аналогии с описанным в разделе “1.2. Целостность генома” принципом клеточного ответа на повреждения ДНК подобная система должна включать стадии детекции нерепарированных ОР,

передачи сигнала о данных повреждениях белкам-трансдюсерам с последующей амплификацией сигнала и активацией функции белков чекпойнт-контроля и, наконец, задержки клеточного цикла в фазе  $G_1$  с целью своевременной репарации ОР перед репликацией ДНК. В данной работе была впервые продемонстрирована обратная корреляция между клеточным уровнем содержания E3-убиквитинлигазы MULE и эффективным количеством нерепарированных ОР. Подобный механизм обеспечивает регуляцию эффективности репарации ОР и клеточного цикла через модуляцию стабильности ферментов репарации POL  $\beta$  и POL  $\lambda$ , а также p53-зависимую сигнализацию нерепарированных повреждений ДНК, соответственно (раздел “3.1.1. Негативная регуляция MULE в ответ на повреждения ДНК и ее значимость”). В свою очередь, уровень экспрессии MULE контролируется через многоступенчатый каскад посттрансляционных модификаций фосфатазы PPM1G и убиквитин-протеазы USP7S в ответ на изменение количества нерепарированных ОР, причем вышестоящим регулятором данного каскада является протеинкиназа ATM (разделы “3.1. Регуляция клеточного уровня содержания E3-убиквитинлигазы MULE” и “3.2. Регуляция клеточного уровня содержания USP7S”). Соответственно, в данном разделе была высказана и проведена экспериментальная проверка гипотезы, что киназная активность ATM, которая канонически обеспечивает функцию данного фермента в клеточном ответе на двуцепочечные разрывы ДНК, может регулироваться в ответ на нерепарированные ОР, таким образом, обеспечивая передачу и амплификацию сигнала от одноцепочечных разрывов ДНК к системам их репарации. Следует отметить, что до настоящей работы механизма клеточного ответа на нерепарированные ОР описано не было.

### **3.3.1. Дефекты репарации одноцепочечных разрывов ДНК индуцируют активность ATM**

Явление индукции киназной активности ATM в ответ на ДР, регулируемое через самофосфорилирование данной киназы по остатку S1981 и инициирующее клеточный ответ на повреждения ДНК, хорошо изучено [Shiloh, Y. & Ziv, Y., 2013]. Для ответа на вопрос, вызывают ли повреждения оснований ДНК и/или ОР активацию ATM, была проведена обработка нормальных первичных фибробластов человека TIG-1 пероксидом водорода, индуцирующим образование значительного количества ОР среди прочих повреждений ДНК, и алкилирующим основания ДНК метилметансульфонатом (ММС). Было обнаружено увеличение эффективности

S1981-самофосфорилирования АТМ (рАТМ), отражающего активность киназы, при увеличении времени обработки (Рисунок 3.32). Следует отметить, что аналогичное наблюдение было сделано ранее в случае ряда раковых клеточных линий, хотя детальных исследований взаимосвязи между типом повреждений ДНК и индукцией активности АТМ проведено не было [Chou, W.C. *et al.*, 2008].

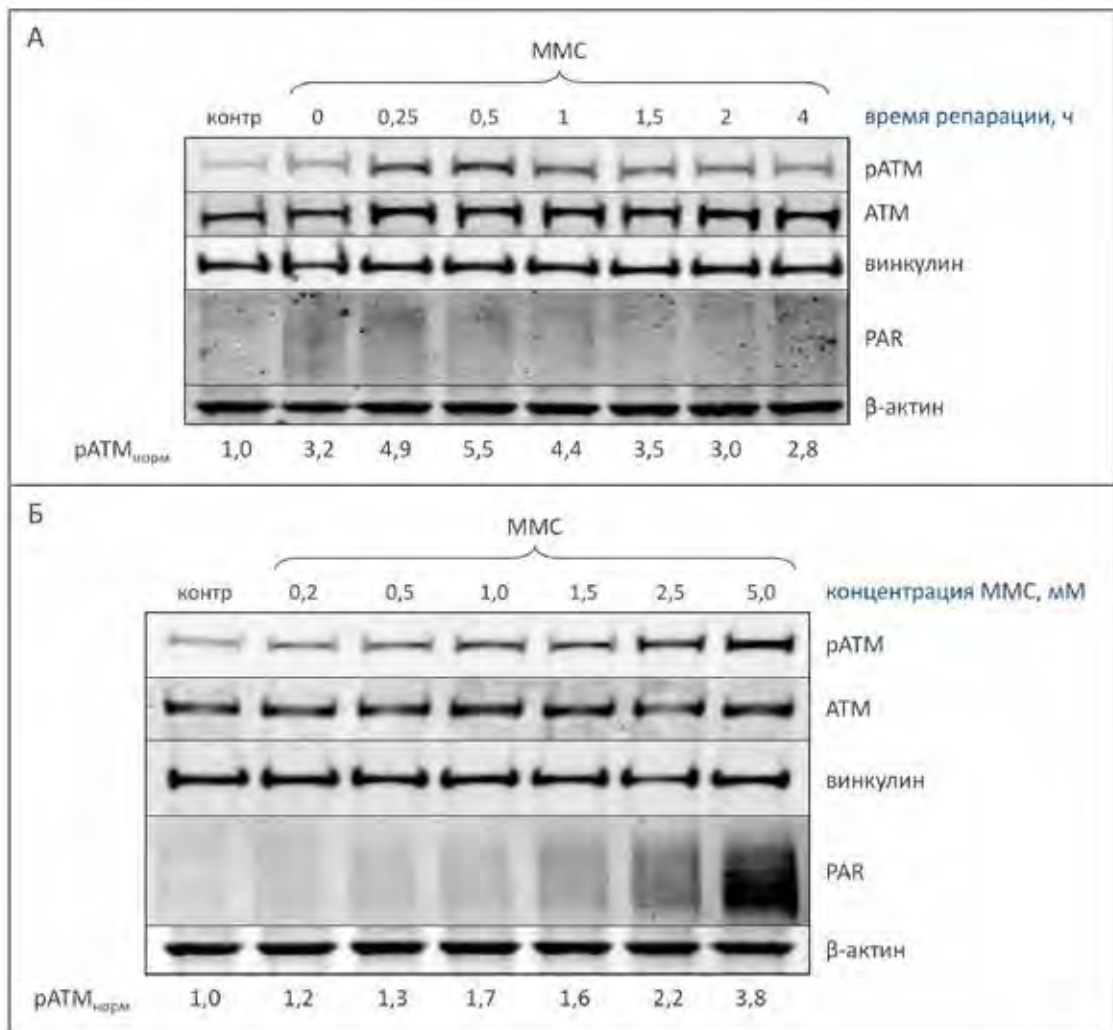


**Рисунок 3.32.** Активация АТМ при обработке клеток человека агентами, индуцирующими повреждения оснований ДНК и ОР. Нормальные первичные фибробласты человека TIG-1 обрабатывали (А) 150 мкМ пероксида водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) и (Б) 1,5 мМ метилметансульфоната (ММС) в течение указанных интервалов времени. В качестве контроля (контр) использовали клетки, обработанные аналогично вышеописанному, но в отсутствие повреждающих ДНК агентов. Клетки собирали, проводили экстракцию белков и разделяли полученные клеточные экстракты методом белкового SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по АТМ и β-актину.

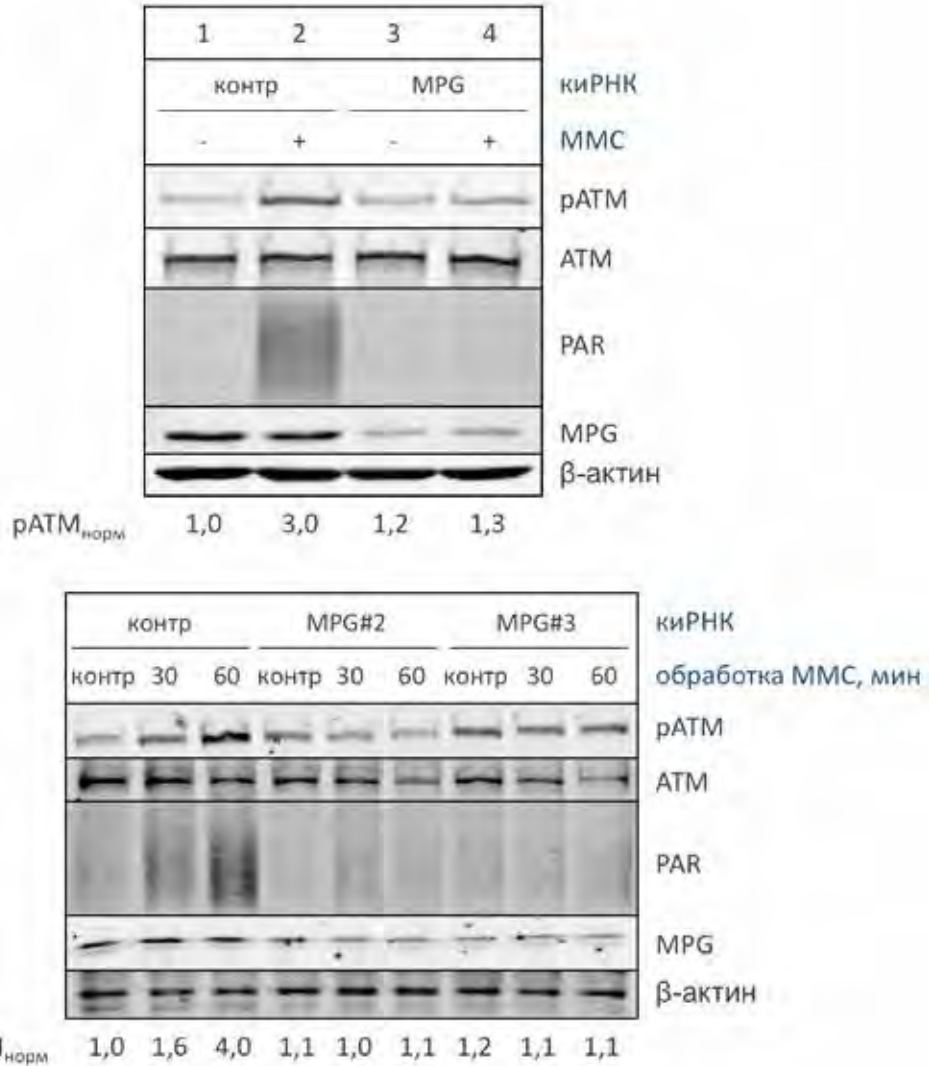
При более детальном исследовании кинетики самофосфорилирования АТМ после обработки клеток ММС в зависимости от времени репарации было обнаружено значительное увеличение клеточного уровня содержания рАТМ с последующим снижением содержания фосфорилированного фермента до исходного в течение 2-4 ч (Рисунок 3.33 А). Подобная кинетика S1981-самофосфорилирования АТМ согласуется с временными рамками репарации



поврежденных оснований ДНК системой ЭРО с образованием ОР в качестве интермедиатов репарации как видно по эффективности синтеза и деградации полимеров ADP-рибозы (PAR; см. также Рисунок 3.2). При исследовании зависимости процесса фосфорилирования ATM от дозы повреждающего ДНК агента была обнаружена прямая корреляция между pATM и накоплением PAR (Рисунок 3.33 Б). Полученные данные указывают на то, что самофосфорилирование остатка S1981 в ATM и, с большой вероятностью, активность ATM-киназы индуцируются в ответ на повышение количества поврежденных оснований и/или разрывов ДНК.



**Рисунок 3.33.** Активация ATM, детектируемая по фосфорилированию остатка S1981, при обработке клеток человека метилметансульфонатом (MMC). Клетки TIG-1 обрабатывали (А) 1,5 мМ MMC в течение 1 ч и подвергали репарации в течение указанных интервалов времени или (Б) 0-2,5 мМ MMC в течение 30 мин. В качестве контроля (контр) использовали клетки, обработанные аналогично вышеописанному, но в отсутствие MMC. Целые клеточные экстракты, полученные из собранных клеток, разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 3-8 (для детекции pATM) или 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по ATM и винкулину.

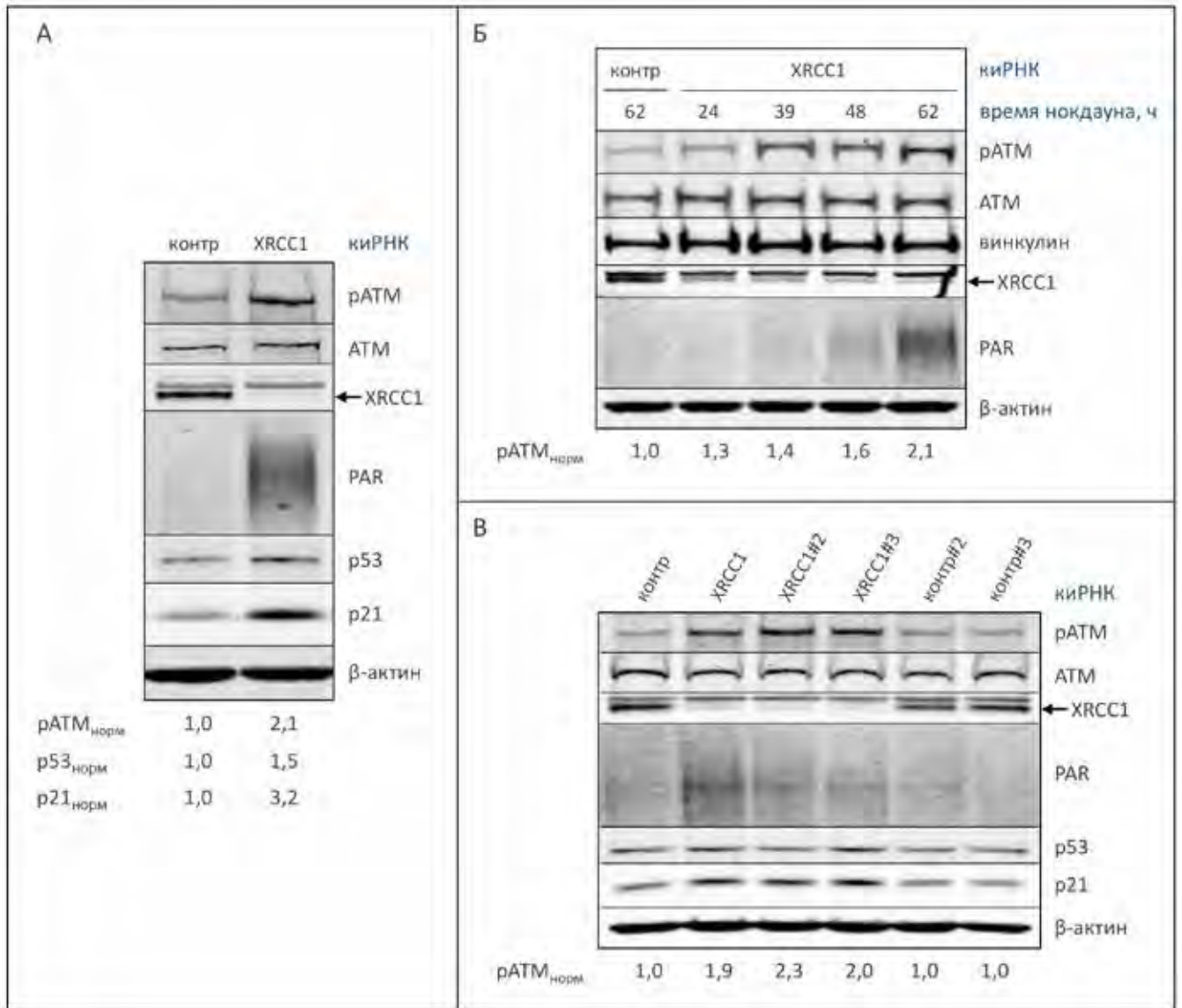


**Рисунок 3.34.** Разрывы, а не повреждения оснований ДНК индуцируют активацию АТМ через самофосфорилирование по остатку S1981. Нормальные первичные фибробласты человека TIG-1 трансфицировали киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (контр), или различными последовательностями киРНК против *MPG* в течение 60 ч (200 пмоль). Клетки обрабатывали 1 мМ ММС в течение 1 ч или подвергали аналогичным манипуляциям в отсутствие ММС (контр). Клетки собирали и экстрагированные белки разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по АТМ и β-актину.

Для более детального исследования вопроса о типе повреждений ДНК, вызывающих самофосфорилирование АТМ в ответ на обработку клеток ММС, стадия выщепления метилированных оснований ДНК в рамках ЭРО была блокирована с использованием киРНК-нокдауна экспрессии *N*-метилпури-н-ДНК-гликозилазы *MPG* [Jacobs, A.L. & Schar, P., 2012]. При этом, в соответствии с первичной ролью *MPG* в инициации репарации метилированных оснований ДНК, индуцируемых ММС, наблюдали отсутствие как синтеза PAR, так и

S1981-фосфорилирования АТМ (Рисунок 3.34, дорожка 4 по сравнению с дорожкой 2 верхней панели). С целью исключения неспецифического влияния киРНК на самофосфорилирование АТМ данное наблюдение было подтверждено с использованием 3-х разных последовательностей MPG-киРНК (Рисунок 3.34, нижняя панель). Полученные результаты позволяют сделать вывод, что образование именно разрывов ДНК (в первую очередь одноцепочечных, хотя на данном этапе работы нельзя исключить и ДР-зависимую активацию АТМ) в процессе ЭРО, а не поврежденных оснований ДНК является причиной самофосфорилирования и активации АТМ.

Подчеркивая биологическое значение полученных результатов, нами было установлено, что ОР, образующиеся в качестве интермедиатов при репарации эндогенных повреждений ДНК, стимулируют S1981-самофосфорилирование/активацию АТМ. Для повышения эффективного количества эндогенных ОР на клетку в данной работе использовали кратковременное киРНК-зависимое снижение экспрессии *XRCC1*, который необходим для лигирования ДНК в процессах ЭРО и ОР-репарации [Caldecott, K.W., 2003] (Рисунок 3.35). При этом происходило процессирование эндогенных повреждений оснований ДНК ферментами ЭРО с образованием ОР, а также накопление эндогенных ОР, причем образование ОР являлось значительно более быстрым процессом по сравнению с лигированием ОР в присутствии лишь незначительных количеств *XRCC1* и, соответственно, активного лигазного комплекса *XRCC1-LIG IIIα*. В результате наблюдалось накопление нерепарированных ОР как видно из увеличения количества PAR, а также фосфорилирование АТМ по остатку S1981 (Рисунок 3.35 А). Следует отметить, что несмотря на высокую эффективность нокдауна *XRCC1* уже после 24 ч обработки киРНК, накопление нерепарированных ОР происходило постепенно и коррелировало со временем киРНК-обработки как видно из результатов иммуноблотинга с антителами против PAR, сопровождаясь постепенным увеличением содержания S1981-фосфорилированной АТМ (Рисунок 3.35 Б). ОР-зависимое самофосфорилирование АТМ по остатку S1981 также сопровождалось активацией фермента как следует из увеличения уровня экспрессии p53 и p21, являющихся каноническими субстратами киназы в ответ на повреждения ДНК (Рисунок 3.35 А). Активация АТМ эндогенными ОР была подтверждена с использованием 3-х различных последовательностей киРНК против *XRCC1* (Рисунок 3.35 В).



**Рисунок 3.35.** Эндогенные ОР индуцируют самофосфорилирование ATM по остатку S1981 и активацию киназы. Нормальные первичные фибробласты человека TIG-1 трансфицировали контрольными киРНК, которые не демонстрируют комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (контр), или различными последовательностями киРНК против *XRCC1* в течение (А, В) 60 ч или (Б) указанных интервалов времени. Клетки собирали, проводили экстракцию белков и разделяли полученные клеточные экстракты методом белкового SDS-электрофореза в (Б) 3-8 и (А-В) 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по (А, В) ATM и  $\beta$ -актину или (Б) ATM и винкулину в случае pATM и по  $\beta$ -актину в случае p53 и p21.

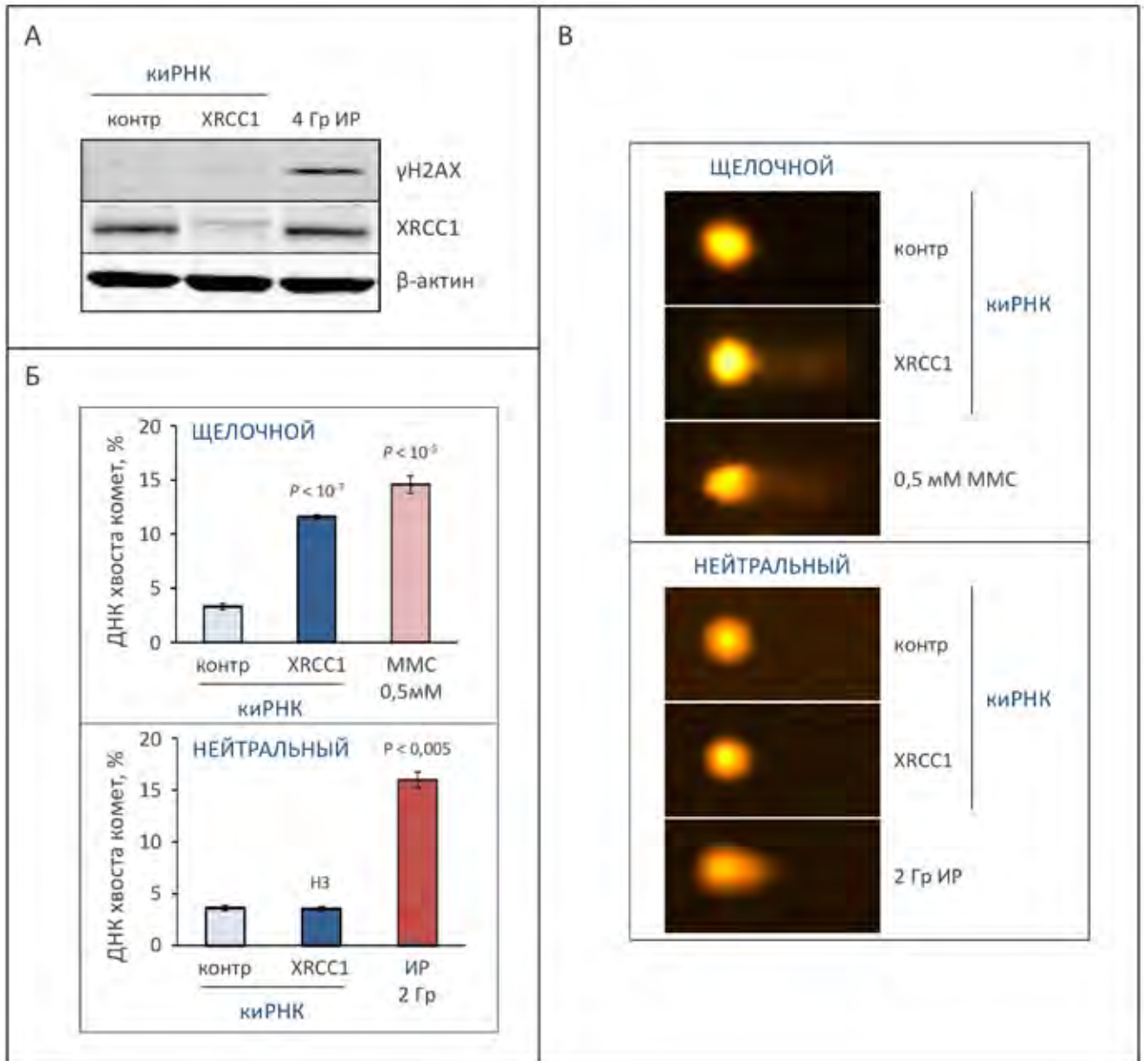
Таким образом, было показано, что самофосфорилирование по остатку S1981 и активация протеинкиназы ATM индуцируются в ответ на обработку клеток человека алкилирующим основанием ДНК метилметансульфонатом и в отсутствие эффективного лигирования эндогенных ОР в клетках, в которых уровень экспрессии *XRCC1* понижен до 5-10 % от исходного с использованием киРНК. С учетом полученных данных, а также факта,

что обработка клеток ММС и *XRCC1*-киРНК индуцируют образование ОР [Caldecott, K.W., 2003; Lundin, C. *et al.*, 2005], нами было высказано предположение, что именно нерепарированные одноцепочечные разрывы ДНК являются причиной активации киназы АТМ. Следует отметить, что вышеописанные эксперименты не позволяют исключить образование незначительного количества ДР в результате репликации ОР-содержащей ДНК, которые могут инициировать активацию АТМ. Именно поэтому следующей стадией данного исследования было детальное изучение типа разрывов ДНК, образующихся при нокдауне *XRCC1* с использованием киРНК.

### **3.3.2. Активация АТМ в ответ на накопление нерепарированных ОР не связана с образованием репликационных ДР**

При репликации ДНК, содержащей ОР, могут образовываться репликационные ДР [Kathe, S.D. *et al.*, 2004; Kuzminov, A., 2001; Zhou, W. & Doetsch, P.W., 1993]. Учитывая то, что ДР являются каноническим активатором киназы АТМ, было важно исключить ДР-зависимую компоненту активации киназы АТМ в ответ на нерепарированные ОР в клетках человека, в которых дефекты лигирования эндогенных ОР были индуцированы за счет кратковременного снижения экспрессии *XRCC1* с использованием киРНК (раздел “3.3.1. Дефекты репарации одноцепочечных разрывов ДНК индуцируют активность АТМ”).

Для детекции образования ДР в *XRCC1*-дефицитных клетках изначально была проведена оценка содержания фосфорилированного гистона H2АХ по остатку S139 ( $\gamma$ H2АХ), который является одним из ДР-маркеров [Rogakou, E.P. *et al.*, 1998], методом иммуноблотинга. В клетках TIG-1, которые обрабатывали 4 Гр ионизирующей радиации в качестве положительного контроля, наблюдали накопление  $\gamma$ H2АХ, тогда как в случае *XRCC1*-дефицитных клеток связывания антител против  $\gamma$ H2АХ с антигеном не наблюдали (Рисунок 3.36 А, дорожка 3 по сравнению с дорожкой 2). С учетом относительно невысокой чувствительности метода иммуноблотинга полученные данные позволяют исключить образование если не всех, то значительного количества двуцепочечных разрывов ДНК в клетках TIG-1 с повышенным количеством нерепарированных ОР, экспериментально индуцированных при их обработке *XRCC1*-киРНК.

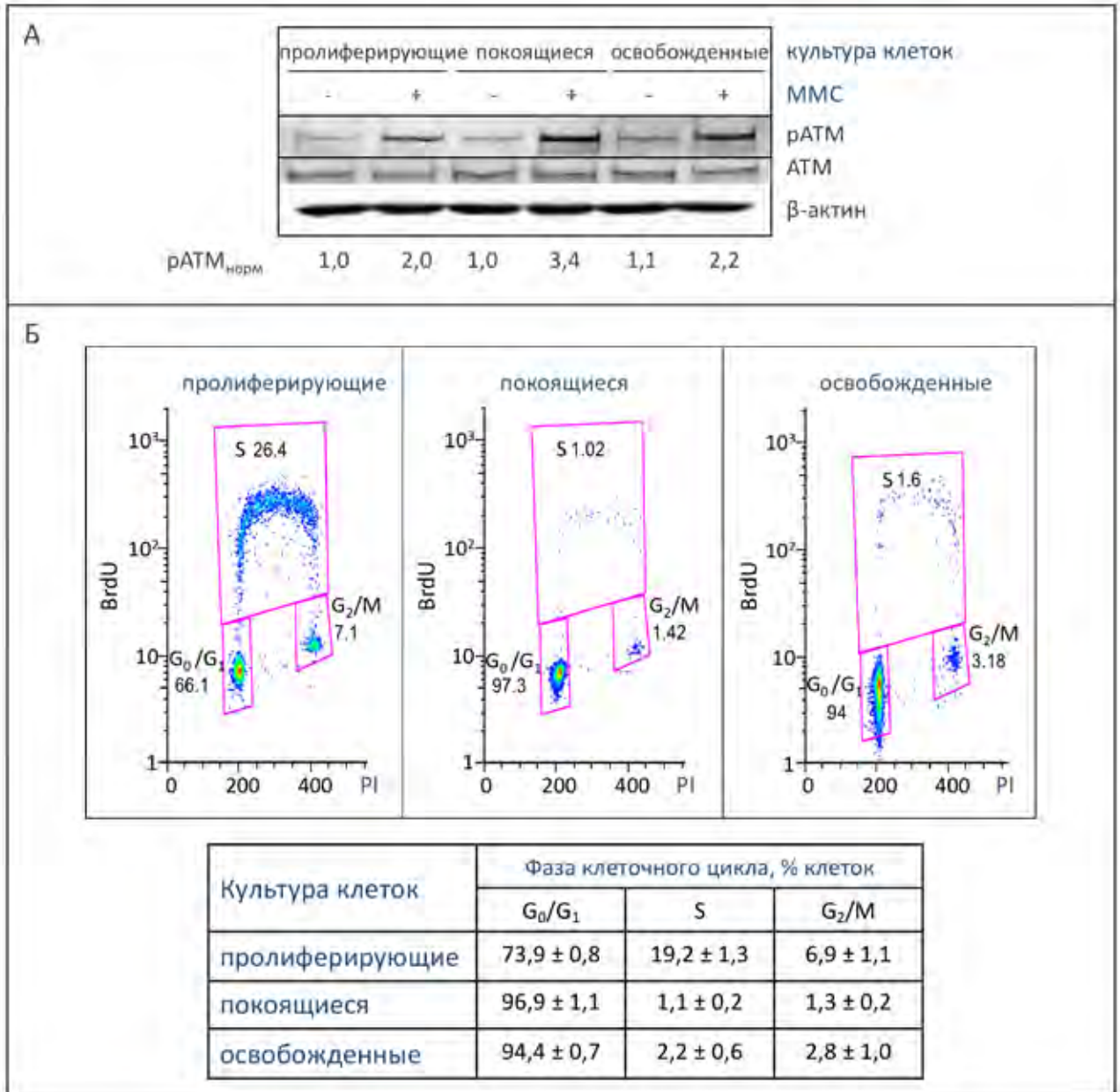


**Рисунок 3.36.** Активация АТМ эндогенными ОР в XRCC1-дефицитных клетках не связана с образованием ДР. Клетки TIG-1 трансфицировали киРНК (200 пмоль) против *XRCC1* в течение 60 ч. В качестве контроля использовали последовательность киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (контр). **(А)** Клетки собирали и готовили цельные клеточные экстракты с последующим разделением методом белкового SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ, иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. В качестве положительного контроля гибридизации с антителами к  $\gamma$ H2AX использовали клетки TIG-1, облученные 4 Гр ионизирующей радиации (ИР). Для контроля нанесения равных количеств экстракта использовали гибридизацию с антителами к  $\beta$ -актину. **(Б-В)** Клетки анализировали методом ДНК-комет в условиях щелочного (верхние панели) или нейтрального (нижние панели) лизиса. В качестве положительного контроля для щелочного и нейтрального вариантов метода использовали обработку клеток TIG-1 0,5 мМ ММС и 2 Гр ИР, соответственно. Представлены данные 5-ти независимых экспериментов с уровнем значимости, НЗ – незначимо ( $P > 0,05$ ). **(В)** Показаны типичные примеры ДНК-комет из экспериментов **(Б)**.

Для дальнейшего доказательства отсутствия ДР в XRCC1-дефицитных клетках был использован метод гель-электрофореза единичных клеток (ДНК-комет) в условиях щелочного и нейтрального лизиса. При использовании щелочного варианта метода ДНК-комет, который позволяет детектировать ОР и ДР, наблюдалось увеличение количества разрывов ДНК в XRCC1-дефицитных клетках по сравнению с контролем, причем это количество было сравнимо с таковым, индуцируемым при обработке клеток 0,5 мМ ММС в течение 30 мин (Рисунок 3.36 Б-В, верхние панели). В то же время при детекции специфически ДР с использованием метода ДНК-комет в условиях нейтрального лизиса [Olive, P.L. & Vanath, J.P., 2006] образования повышенного количества разрывов ДНК в отсутствие XRCC1 по сравнению с контролем не наблюдали, несмотря на отчетливую детекцию ДР после обработки клеток 2 Гр ионизирующей радиации (Рисунок 3.36 Б-В, нижние панели). Полученные результаты указывают на то, что все разрывы ДНК, образующиеся в результате подавления экспрессии *XRCC1* с использованием кнРНК, являются одноцепочечными.

С целью исключения недостаточно высокой чувствительности детекции ДР вышеописанными методами иммуноблотинга и ДНК-комет было проведено исследование активации АТМ в нереплицирующихся (покоящихся) культурах клеток. Для этого была проведена оценка эффективности фосфорилирования АТМ по остатку S1981 в ряде культур нормальных первичных фибробластов человека TIG-1, обработанных ММС для индукции ОР: стандартным образом пролиферирующих клетках (Рисунок 3.37 А, пролиферирующие), культуре нереплицирующихся клеток в фазе клеточного цикла  $G_0/G_1$ , пролиферация которых была обратимо ингибирована путем контактного (плотностно-зависимого) торможения [Abercrombie, M., 1970] (Рисунок 3.37 А, покоящиеся) и нереплицирующихся клетках, которые были освобождены от контактного торможения в течение 8 ч перед обработкой ММС (Рисунок 3.37 А, освобожденные). “Освобожденные” от контактного торможения клетки в течение 8 ч находились в  $G_0/G_1$  фазе клеточного цикла в момент обработки ММС и использовались в качестве внутреннего контроля способности нереплицирующихся клеток к активации АТМ (Рисунок 3.37 Б).



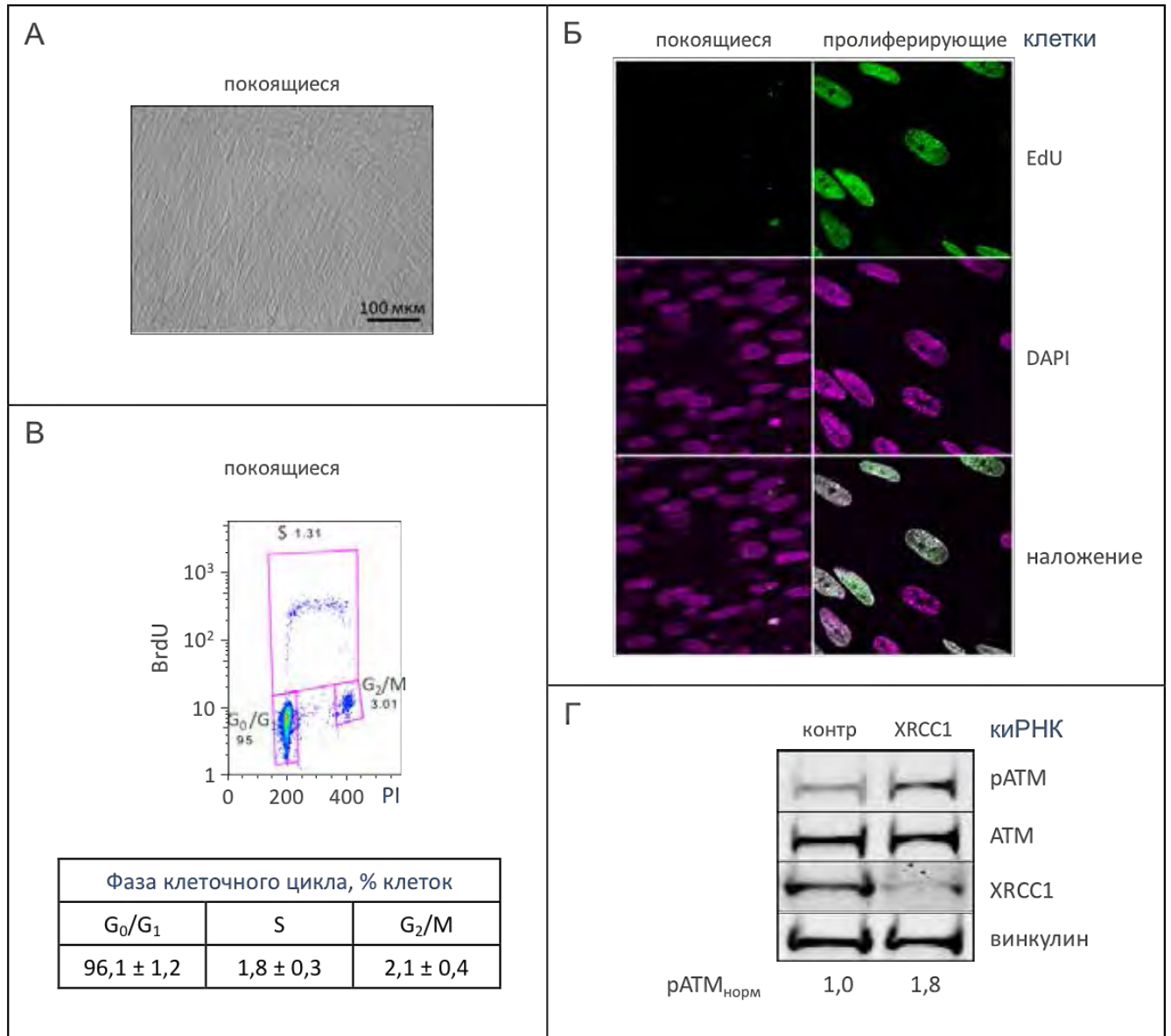


**Рисунок 3.37.** Активация ATM в ответ на нерепарированные ОР в обработанных MMC клетках не связана с образованием репликационных ДР. Нормальные первичные фибробласты человека TIG-1 культивировали до плотности монослоя 60-70 % (пролиферирующие), до 100 %-ного монослоя с дополнительным культивированием в состоянии контактного торможения в течение 24 ч (покоящиеся) или до 100 %-ного монослоя с последующим 24-часовым культивированием в состоянии контактного торможения и дальнейшим рассеиванием клеток в свежей среде для культивирования (в соотношении 1:5) в течение 8 ч (покоящиеся клетки, освобожденные от контактного торможения; освобожденные). Клетки затем обрабатывали 1 мМ MMC в течение 30 мин или подвергали аналогичным манипуляциям в отсутствие повреждающего ДНК агента. **(А)** Клетки собирали, проводили экстракцию белков и разделяли полученные клеточные экстракты методом белкового SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по ATM и β-актину. **(Б)** Порцию клеток метили в присутствии 10 мкМ 5-бром-2'-дезоксисуридина (BrdU) в течение 20 мин, клетки собирали трипсинизацией и центрифугированием и проводили анализ клеточного цикла методом проточной цитометрии. Окраску ДНК проводили с использованием 10 мкг/мл йодида пропидия (PI). Представлены двумерные гистограммы анализа клеточного цикла и численные результаты распределения клеток по фазам клеточного цикла по данным 5-ти независимых экспериментов.



Было установлено, что S1981-фосфорилирование ATM наблюдаются во всех 3-х культурах клеток: пролиферирующих, нереплицирующихся (покоящихся) и освобожденных от контактного торможения и находящихся в фазе  $G_0/G_1$  (Рисунок 3.37 А), то есть активация ATM происходит перед репликацией ДНК в фазе клеточного цикла  $G_0/G_1$ . Следует также отметить, что содержание фосфорилированной ATM по остатку S1981 в культуре нереплицирующихся клеток оказалось несколько выше такового в нормально в пролиферирующих клетках, что с высокой вероятностью связано с метаболическим и другими типами стресса, индуцируемым в процессе контактного торможения [Kalluri, R., 2016; Lemons, J.M. *et al.*, 2010]. В поддержку данного объяснения также говорит одинаковая эффективность S1981-фосфорилирования ATM, которая наблюдалась в пролиферирующих и освобожденных от контактного торможения клетках. Таким образом, полученные результаты указывают на то, что индуктором активности ATM после обработки клеток ММС действительно являются ОР, тогда как репликационные ДР в процессе активации роли не играют.

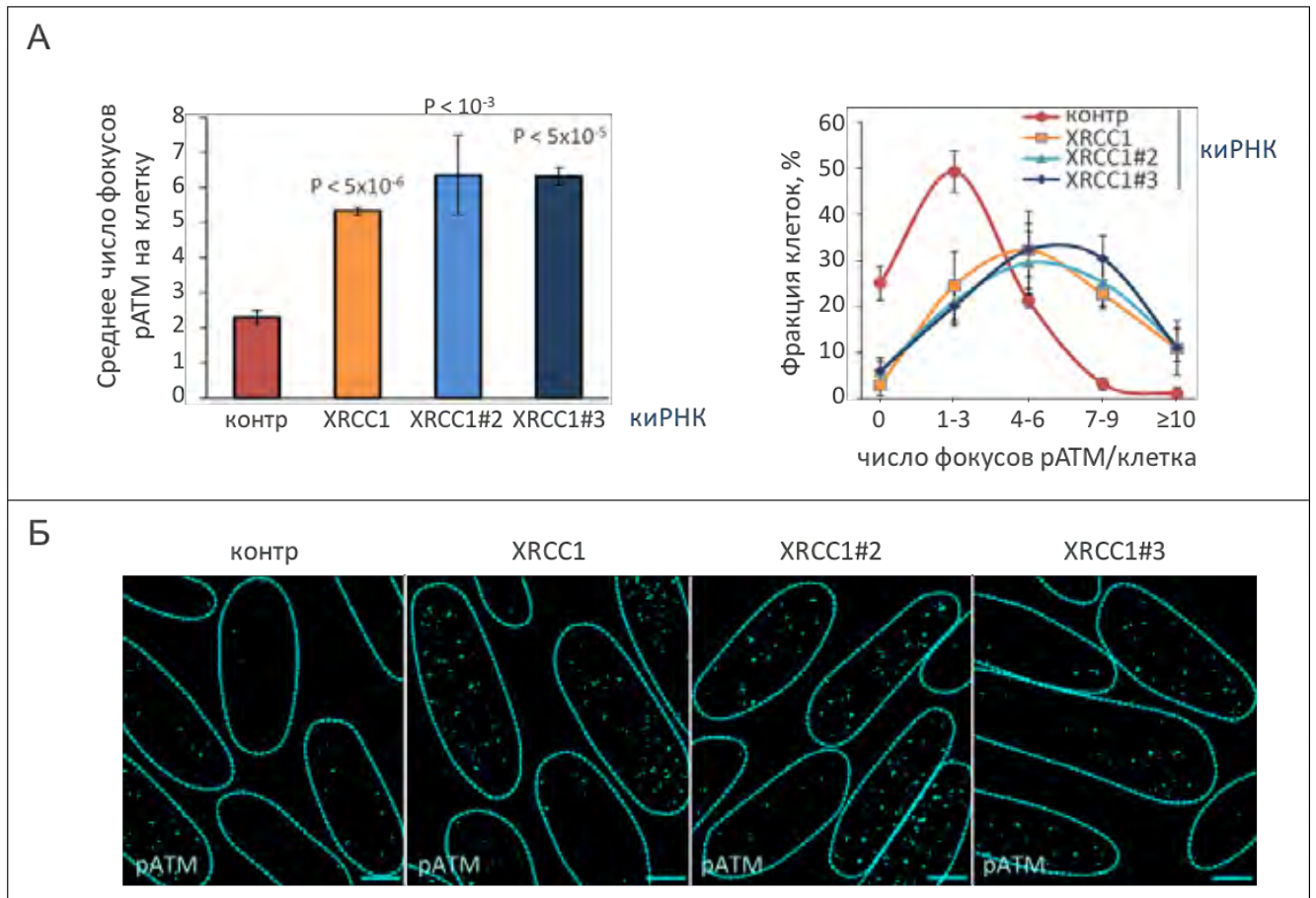
Наконец, чтобы исключить роль репликационных ДР в активации ATM в присутствии эндогенных ОР, было проведено исследование S1981-фосфорилирования ATM в нереплицирующихся XRCC1-дефицитных клетках (Рисунок 3.38). Для детекции репликации ДНК одновременно с обработкой покоящихся клеток кРНК против XRCC1 в среду для их культивирования был добавлен аналог тимидина, 5-этинил-2'-дезоксисуридин (EdU), в течение 60 ч. Было показано отсутствие включения EdU в ДНК покоящихся культур клеток, что говорит об отсутствии репликации ДНК в таких клетках (Рисунок 3.38 Б). При анализе распределения нереплицирующихся XRCC1-дефицитных клеток по фазе клеточного цикла методом проточной цитометрии было установлено, что приблизительно 96 % клеток находятся в фазе  $G_0/G_1$  (Рисунок 3.38 В). Как и в случае покоящихся клеток, обработанных ММС (Рисунок 3.37), в нереплицирующихся XRCC1-дефицитных клетках наблюдали увеличение содержания фосфорилированной ATM по остатку S1981 по сравнению с контролем, что указывает на предрепликационную активацию ATM в фазе клеточного цикла  $G_0/G_1$  (Рисунок 3.38 Г). Следует отметить, что при анализе методом проточной цитометрии была также обнаружена незначительная фракция клеток, составляющая порядка 1,8 %, в фазе S клеточного цикла (Рисунок 3.38 В), которая могла бы быть ответственна за ДР-зависимую активацию ATM.



**Рисунок 3.38.** Активация ATM нерепарированными ОР в нереплицирующихся клетках. **А-Г.** Клетки TIG-1 культивировали до плотности монослоя 60-70 % (пролиферирующие) или до 100 %-ного монослоя с дополнительным культивированием в состоянии контактного торможения в течение 24 ч (покоящиеся). **А.** Светлопольное изображение монослоя культуры покоящихся клеток. **Б-В.** Клетки инкубировали в присутствии 10 мкМ (**Б**) EdU или (**В**) BrdU в течение 20 мин и проводили анализ полученных образцов методами (**Б**) иммунофлуоресценции (ИФ) или (**В**) проточной цитометрии с окрашиванием ДНК с использованием DAPI или йодида пропидия (PI), соответственно. **Б.** Показаны типичные примеры ИФ-анализа. **В.** Представлена типичная двумерная гистограмма анализа клеточного цикла и численные результаты распределения клеток по фазам клеточного цикла по данным 5-ти независимых экспериментов. **Г.** Покоящиеся клетки TIG-1 трансфицировали киРНК (200 пмоль) против *XRCC1* в течение 60 ч. В качестве контроля использовали последовательность киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (контр). Клетки собирали, белки экстрагировали и полученные клеточные экстракты разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 3-8 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Денситометрические значения иммуноблотинга нормализовали по ATM и винкулину.

С учетом идентификации незначительной фракции нереплицирующихся XRCC1-дефицитных клеток в фазах S и G<sub>2</sub>/M клеточного цикла дальнейший анализ самофосфорилирования ATM по остатку S1981 проводили методом иммунофлуоресценции в единичных клетках. Для анализа использовали покоящиеся клетки в фазе клеточного цикла G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, в которых увеличения эффективного количества нерепарированных эндогенных ОР, являющихся предполагаемым индуктором активности ATM, достигали путем кратковременного нокдауна экспрессии XRCC1 с использованием 3-х различных последовательностей кРНК (Рисунок 3.39). Клетки, находившиеся только в G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-фазе клеточного цикла в течение всего эксперимента, идентифицировали по отсутствию включения EdU, который добавляли в среду для культивирования одновременно с XRCC1-кРНК. Было установлено, что в ответ на нерепарированные ОР в нереплицирующихся XRCC1-дефицитных клетках наблюдается увеличение среднего количества фокусов фосфорилированной по остатку S1981 формы ATM по сравнению с контрольными клетками (Рисунок 3.39 А, левая панель, и 3.39 Б). В дополнение в клетках с повышенным содержанием нерепарированных ОР наблюдалось существенное увеличение фракции клеток, содержащих многочисленные (7 и более) фокусы рАТМ (Рисунок 3.39 А, правая панель).

Таким образом, было показано, что фосфорилирование ATM по остатку S1981 индуцируется нерепарированными одноцепочечными разрывами ДНК, которые накапливаются при кратковременном снижении уровня экспрессии XRCC1 с использованием кРНК. В поддержку данного вывода говорит отсутствие репликационных двуцепочечных разрывов ДНК в нереплицирующихся XRCC1-дефицитных клетках, что позволяет исключить ДР-зависимую активацию ATM в используемой в данной работе экспериментальной системе. Для детального понимания неканонической роли ATM в клеточном ответе на нерепарированные ОР на следующем этапе данной работы были проведены детальные исследования биохимических последствий активации ATM в нереплицирующихся XRCC1-дефицитных клетках.



**Рисунок 3.39.** Активация ATM нерепарированными ОР происходит перед репликацией ДНК в  $G_0/G_1$ -клетках. Клетки TIG-1 культивировали до плотности монослоя 100 % и затем в течение дополнительных 24 ч в состоянии контактного торможения. Клетки затем трансфицировали различными последовательностями киРНК (200 пмоль) против *XRCC1* и инкубировали в присутствии 1 мкМ EdU в течение 60 ч. В качестве контроля использовали контрольную киРНК, не обладающую комплементарностью к какой-либо последовательности человеческого генома (контр). Количество фокусов pATM анализировали в EdU-отрицательных ( $G_0/G_1$ ) клетках методом иммунофлуоресценции (ИФ). Показаны данные 3-х независимых экспериментов по (А) среднему числу фокусов pATM на клетку (левая панель) и распределению клеток по фракциям, содержащим 0, 1-3, 4-6, 7-9 и 10 и более фокусов на клетку и (Б) типичные примеры ИФ-анализа. ИФ-анализ включения EdU и светлоскопическое изображение культуры покоящихся клеток приведены выше (Рисунок 3.38 А-Б).

### 3.3.3. ОР-зависимая активация ATM замедляет вход в S-фазу клеточного цикла

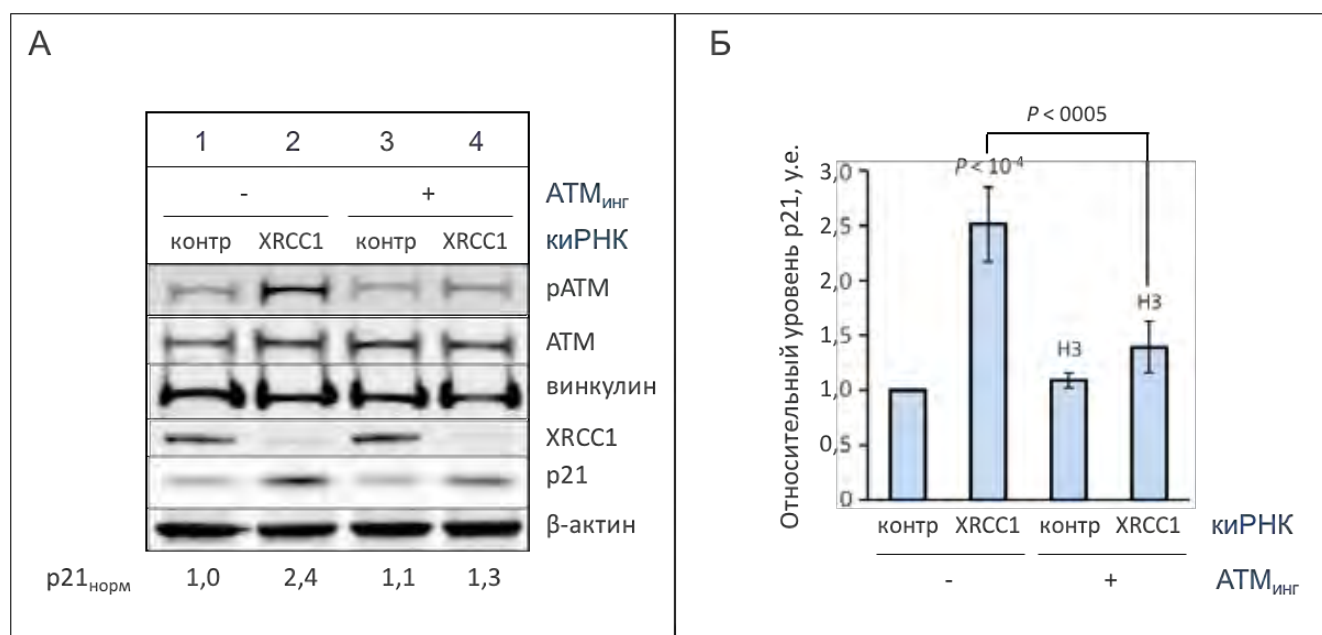
Поскольку основным последствием кратковременного нокдауна *XRCC1* является снижение эффективности репарации ДНК, требовалось установить, приводит ли повышение количества нерепарированных ОР к снижению жизнеспособности клеток. При измерении фосфатидилсерин-зависимого апоптоза с использованием аннексин V, а также выживаемости клеток при окрашивании трипановым синим разницы в жизнеспособности нереплицирующихся *XRCC1*-дефицитных клеток по сравнению с контролем обнаружено не было (Таблица 3.1). Полученные результаты свидетельствуют о том, что несмотря на пониженную экспрессию

*XRCC1*, нереплицирующиеся *XRCC1*-дефицитные клетки обеспечивают относительно эффективную репарацию эндогенных ОР, таким образом предотвращая инициацию программируемой клеточной смерти, иначе называемой апоптозом.

киРНК	Апоптоз, % клеток
контр	1,5 ± 0,3
<i>XRCC1</i>	1,3 ± 0,3

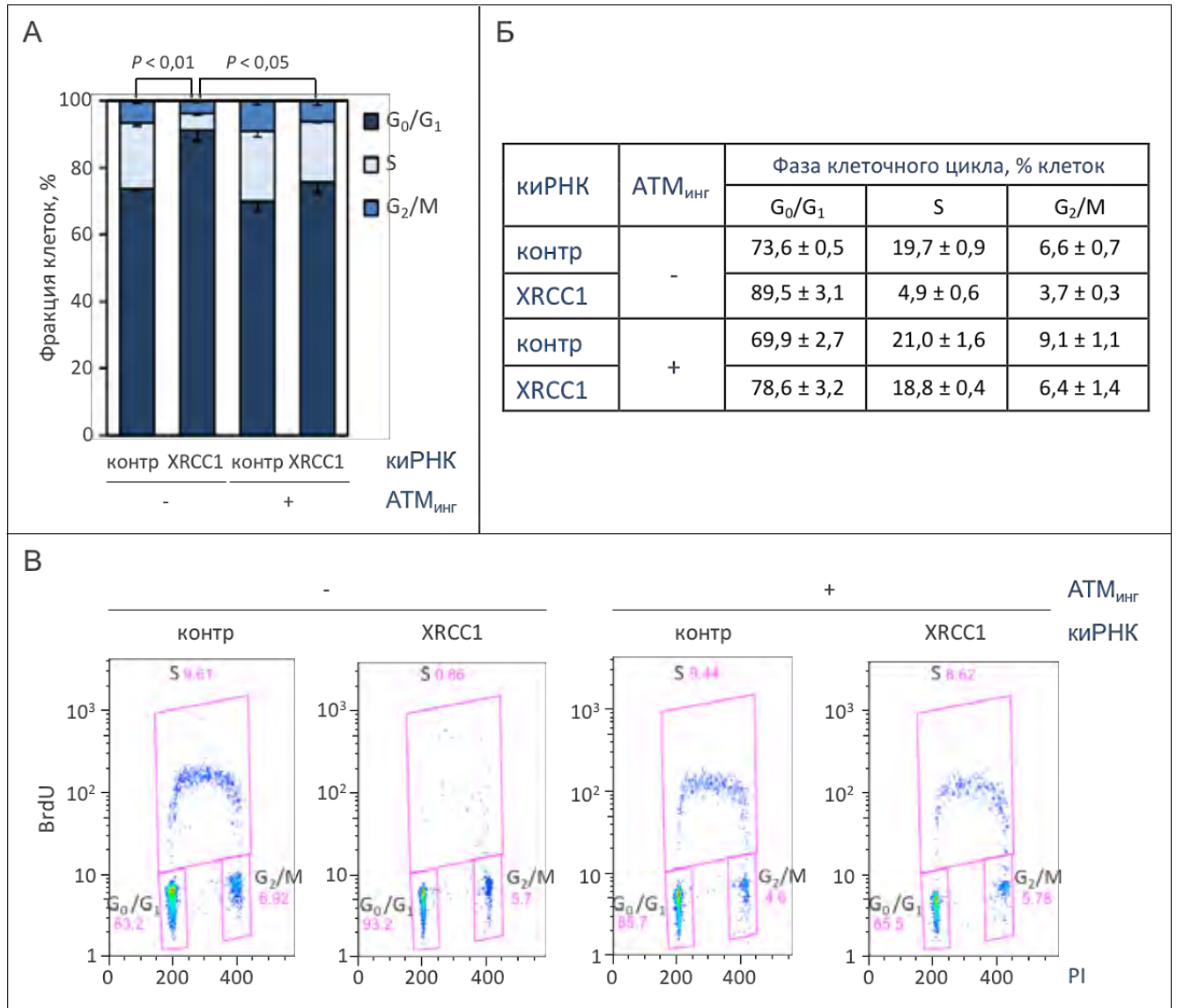
**Таблица 3.3.** Отсутствие апоптоза в *XRCC1*-дефицитных клетках, характеризующихся нерепарированными ОР. Клетки TIG-1 трансфицировали киРНК (200 пмоль) против *XRCC1* в течение 60 ч. В качестве контроля использовали контрольную киРНК, не обладающую комплементарностью к какой-либо последовательности человеческого генома (контр). Анализ фракции апоптотических клеток проводили с использованием аннексин V.

В соответствии с полученными данными было высказано предположение об участии АТМ, активированной в ответ на нерепарированные ОР, в регуляции клеточного цикла. Поскольку наблюдаемая активация киназы происходит перед репликацией ДНК в  $G_0/G_1$ -клетках, было высказано предположение, что функцией АТМ-зависимого клеточного ответа может являться задержка входа клеток с нерепарированными ОР в S-фазу клеточного цикла с целью репарации повреждений ДНК перед ее репликацией и, соответственно, избежания образования высокомутагенных репликационных ДР. Для проверки данной гипотезы была проведена обработка TIG-1 клеток *XRCC1*-киРНК с целью индукции образования повышенного количества ОР в присутствии или отсутствии специфического ингибитора активности АТМ-киназы KU55933. Было установлено, что фосфорилирование АТМ по остатку S1981, индуцируемое *XRCC1*-нокдауном, не наблюдается в присутствии ингибитора активности АТМ, что свидетельствует о S1981-самофосфорилировании АТМ, а не фосфорилировании данного аминокислотного остатка какой-либо другой протеинкиназой (Рисунок 3.40 А, дорожка 4 по сравнению с дорожкой 2). Как и ранее (Рисунок 3.35 А), при образовании излишка ОР наблюдалось существенное увеличение экспрессии ингибитора циклин-зависимых киназ *p21*, причем при использовании KU55933 в клетках, обработанных *XRCC1*-киРНК, было установлено, что данный эффект зависел от киназной активности АТМ (Рисунок 3.40 А-Б, дорожки 4 по сравнению с дорожками 2). Учитывая основную функцию *p21* в контроле клеточного цикла, полученные данные говорят в поддержку предложенной выше гипотезы о существовании АТМ-зависимой регуляции репарации ОР.



**Рисунок 3.40.** ATM-зависимая индукция экспрессии *p21* в ответ на нерепарированные ОР. **А-Б.** Клетки TIG-1 трансфицировали киРНК против *XRCC1* или контрольной киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (200 пмоль), и инкубировали в присутствии 1 мкМ ингибитора активности ATM, KU55933, или в его отсутствие с использованием равной концентрации ДМСО в качестве контроля (-ATM<sub>инг</sub>) в течение 60 ч. Полученные образцы анализировали методом белкового SDS-электрофореза в 4-16 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Денситометрические значения иммуноблотинга *p21* нормализовали по  $\beta$ -актину. **Б.** Приведены численные результаты иммуноблотинга (**А**) по данным 3-х независимых экспериментов, НЗ – незначимо ( $P > 0,05$ ).

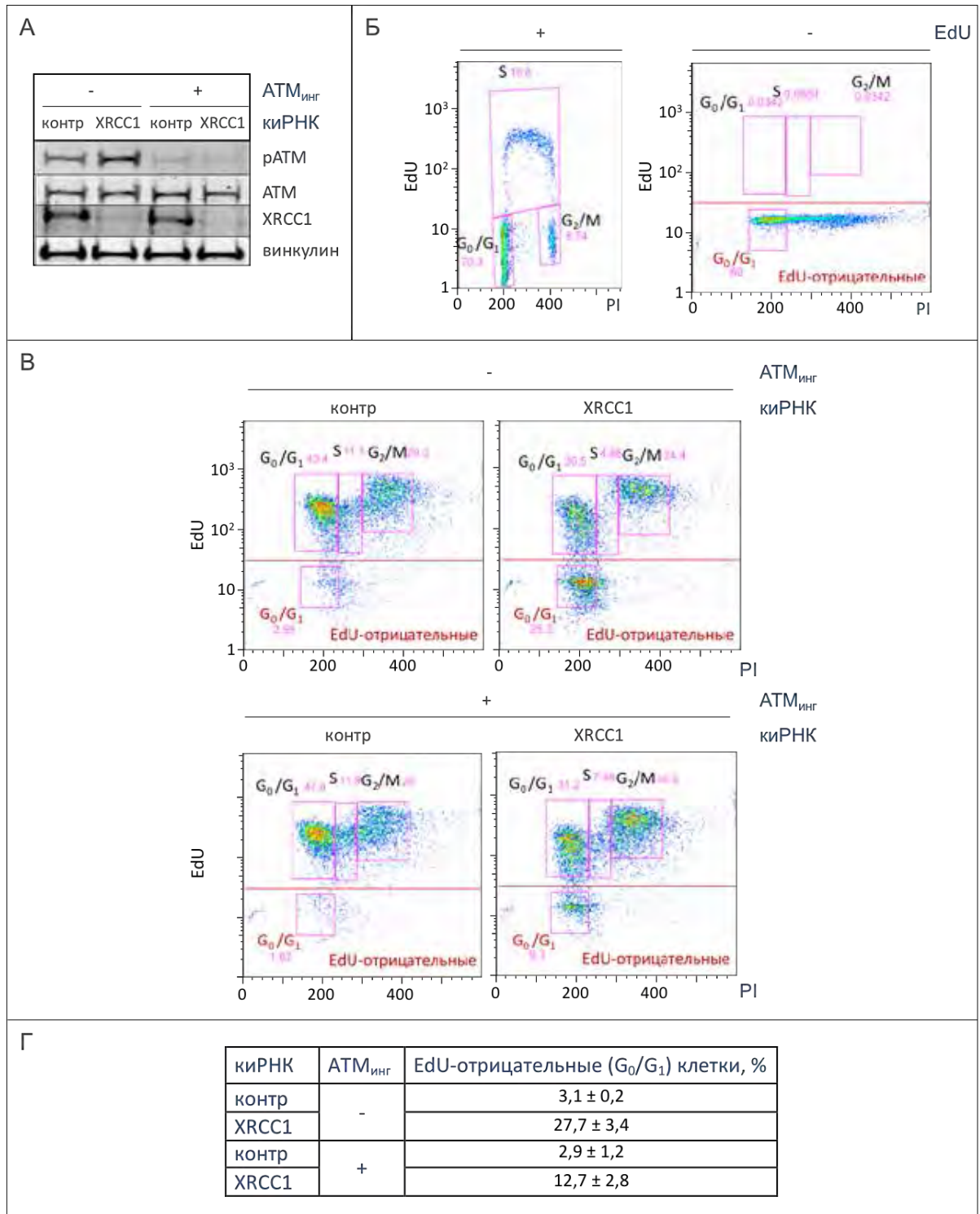
При прямом измерении распределения клеток по фазам клеточного цикла методом проточной цитометрии было установлено, что нерепарированные ОР индуцируют задержку клеточного цикла в фазе  $G_0/G_1$  (Рисунок 3.41 А-Б). Более того, в отсутствие активной ATM в содержащих ОР клетках, что экспериментально достигали обработкой XRCC1-дефицитных клеток в присутствии KU55933, наблюдали статистически значимое восстановление клеточного цикла до такового в неповрежденных клетках (Рисунок 3.41 А-Б, дорожка 4 по сравнению с дорожками 1 и 2). Следует отметить, что обработка неповрежденных клеток ингибитором активности ATM не вызывала существенных изменений в распределении клеток по фазам клеточного цикла, что связано с относительно невысоким эффективным содержанием нерепарированных ОР в таких клетках и эффективной репарацией эндогенных ОР. Суммируя, полученные экспериментальные данные свидетельствуют о существовании системы ATM-зависимой сигнализации нерепарированных ОР, обеспечивающей задержку входа клеток с поврежденной ДНК в S-фазу клеточного цикла.



**Рисунок 3.41.** ATM-зависимая задержка клеточного цикла в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> в ответ на нерепарированные ОР. **А-В.** Клетки TIG-1 обрабатывали киРНК против XRCC1 в присутствии ингибитора активности ATM как описано в подписи к Рисунку 3.40. По истечении 60 ч клетки инкубировали в присутствии 10 мкМ BrdU в течение 20 мин и анализировали методом проточной цитометрии с окрашиванием ДНК йодидом пропидия (PI). Показаны (**В**) типичные примеры двумерных гистограмм анализа клеточного цикла и (**А-Б**) численные результаты распределения клеток по фазам клеточного цикла по данным 4-х независимых экспериментов.

На следующем этапе работы требовалось установить, действительно ли ATM-зависимая задержка клеточного цикла в XRCC1-дефицитных клетках является результатом индукции нерепарированных ОР в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. Альтернативным сценарием, который подробно обсуждался в разделе “3.3.2. Активация ATM в ответ на накопление нерепарированных одноцепочечных разрывов ДНК не связана с образованием двуцепочечных разрывов”, является ATM-зависимая задержка клеточного цикла в ответ на образование двуцепочечных разрывов ДНК в процессе репликации в XRCC1-дефицитных клетках.



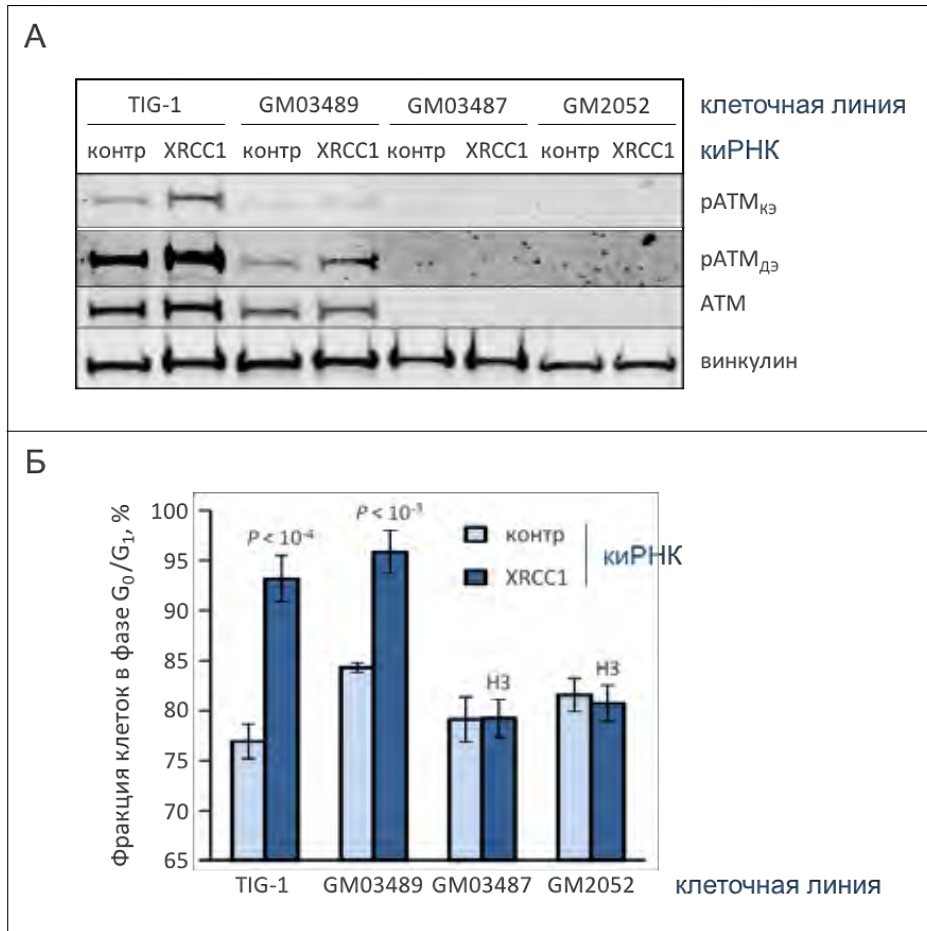


**Рисунок 3.42.** ATM-зависимая задержка клеточного цикла происходит специфически в ответ на образование нерепарированных ОР в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. **А-Г.** Клетки TIG-1 обрабатывали киРНК против *XRCC1* в присутствии 1 мкМ KU55933 как описано в подписи к Рисунку 3.40 с добавлением 1 мкМ EdU в среду для культивирования. Образцы анализировали методами (**А**) иммуноблотинга и (**Б-Г**) проточной цитометрии с окрашиванием ДНК йодидом пропидия (PI). Показаны (**В**) типичные примеры гистограмм анализа клеточного цикла с (**Б**) контролями по включению EdU и (**Г**) численные результаты распределения EdU-отрицательных клеток, которые не реплицировали ДНК за время киРНК-обработки, по фазам клеточного цикла (по данным 2-х независимых экспериментов).



Для различения обсуждаемых вариантов пролиферирующие клетки обрабатывали кнРНК против *XRCC1* для повышения количества нерепарированных ОР и культивировали в EdU-содержащей среде (Рисунок 3.42). При анализе образцов методом проточной цитометрии было установлено, что задержка клеточного цикла в фазе  $G_0/G_1$  в ответ на нерепарированные ОР происходит в клетках, не содержащих EdU: фракция EdU-отрицательных  $G_0/G_1$ -клеток составляет  $27,7 \pm 3,4 \%$  в *XRCC1*-дефицитных клетках по сравнению с  $3,1 \pm 0,2 \%$  в контрольной культуре неповрежденных клеток (Рисунок 3.42 В-Г). Следует также отметить, что  $G_0/G_1$ -задержка клеточного цикла в ответ на нерепарированные ОР была в значительной, хотя и неполной степени обратима (фракция EdU-отрицательных  $G_0/G_1$ -клеток составила  $12,7 \pm 2,8 \%$ ) в отсутствие активной АТМ при обработке клеток KU55933 (Рисунок 3.42 В-Г). Полученные экспериментальные данные говорят о независимости контролируемой активностью киназы АТМ сигнализации нерепарированных ОР от репликации ДНК и образования репликационных ДР и однозначно подтверждают одноцепочечную природу разрывов ДНК, индуцирующих активность АТМ.

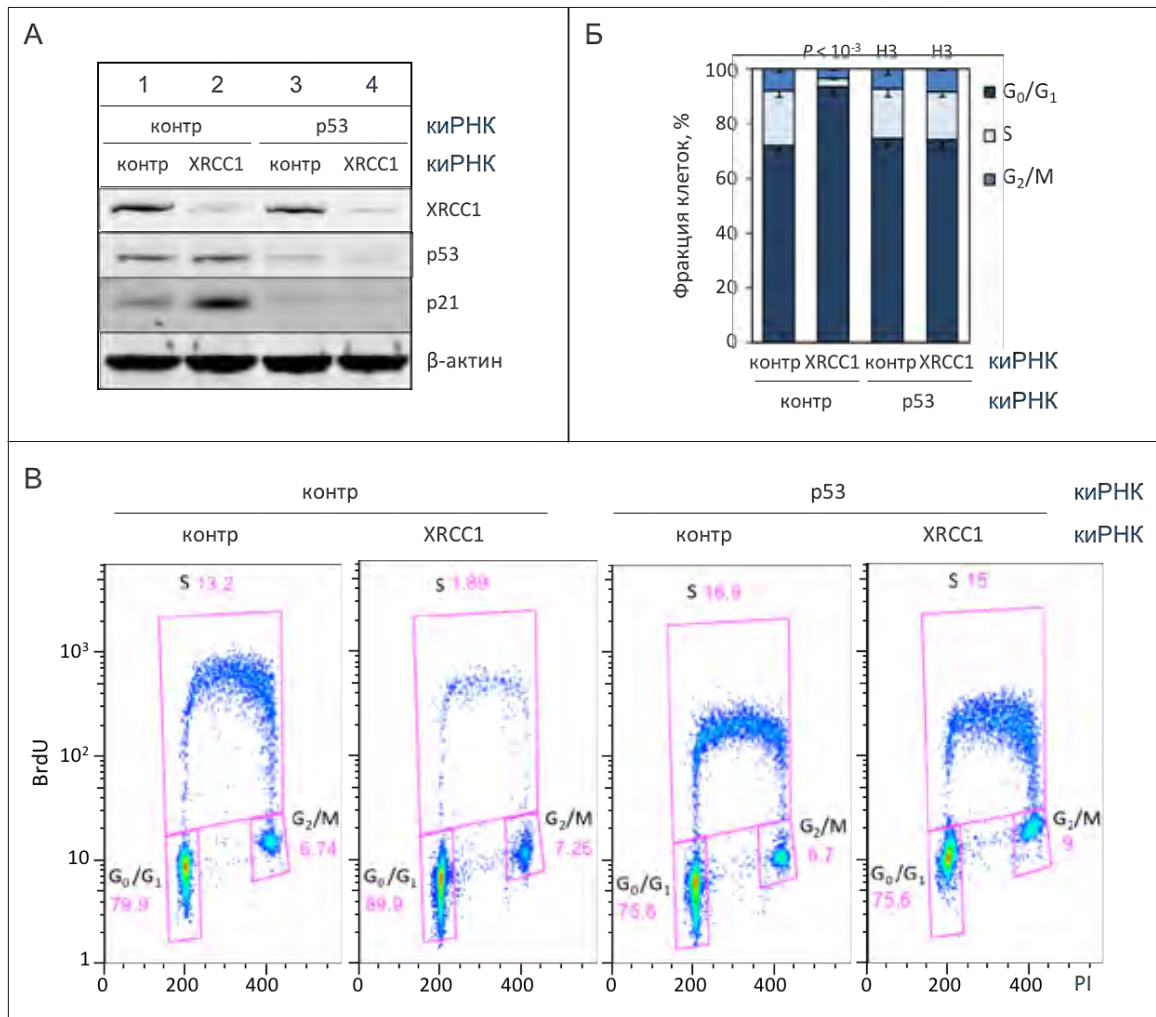
Важность АТМ в сигнализации нерепарированных одноцепочечных разрывов ДНК была дополнительно подтверждена при использовании нормальных первичных фибробластов, полученных из пациентов с заболеванием атаксия телеангиэктазия (А-Т) и соответствующих контрольных клеточных линий из здоровых родственников. Было показано, что в отличие от АТМ-положительных контрольных клеточных линий (TIG-1 и GM03489) в клетках А-Т (GM02052 и GM03487, соответственно) не наблюдается замедления входа в S-фазу клеточного цикла в ответ на накопление нерепарированных ОР, индуцированное понижением экспрессии *XRCC1* с использованием кнРНК (Рисунок 3.43). Данные результаты свидетельствуют о первостепенной роли АТМ в регуляции задержки клеточного цикла в фазе  $G_0/G_1$  в ответ на нерепарированные ОР. Следует также подчеркнуть, что экспериментальные данные об активации АТМ в ответ на нерепарированные ОР (раздел “3.3.1. Дефекты репарации одноцепочечных разрывов ДНК индуцируют активность АТМ”) и отсутствии  $G_0/G_1$ -задержки клеточного цикла в ОР-содержащих клетках после их обработки ингибитором активности АТМ (Рисунок 3.41 и 3.42) свидетельствуют о том, что описанная выше регуляция клеточного цикла в АТМ-положительных клетках обеспечивается именно киназной активностью АТМ, а не просто присутствием полноразмерного белка в клетках.



**Рисунок 3.43.** Задержка клеточного цикла в фазе  $G_0/G_1$  в ответ на нерепарированные ОР является зависит от ATM. **А-Б.** Клетки нормальных первичных фибробластов человека из пациентов с А-Т (GM02052 и GM03487) и соответствующие контрольные клеточные линии (TIG-1 и GM03489) трансфицировали киРНК (200 пмоль) против *XRCC1* в течение 60 ч. В качестве контроля использовали последовательность киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (контр). GM03489 (здоровая мать) и GM03487 (пациент с А-Т) принадлежат к одному семейству (А-Т семья 516, Coriell Institute Cell Repository, США) и потому могут сравниваться напрямую. Клетки собирали и анализировали методами **(А)** белкового SDS-электрофореза в 3-8 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами или **(Б)** проточной цитометрии. **А.** Показаны короткая (КЭ) и длинная (ДЭ) экспозиция иммуноблотинга с антителами против pATM. Для контроля нанесения равных количеств цельного клеточного экстракта использовали антитела против винкулина. **Б.** Представлены численные данные процентного содержания клеток в фазе  $G_0/G_1$  клеточного цикла по данным 3-х независимых экспериментов с уровнем значимости, НЗ – незначимо ( $P > 0,05$ ).

Полученные результаты по ATM-зависимой задержке клеточного цикла в ответ на нерепарированные ОР (Рисунок 3.41 и 3.42) хорошо согласуются с описанными выше данными об изменениях клеточного уровня экспрессии p21 в ОР-содержащих клетках в присутствии и отсутствие активной ATM (Рисунок 3.40 А-Б). Поскольку *p21* является одним из генов, напрямую регулируемых транскрипционной активностью p53 [Miyashita, T. & Reed, J.C., 1995],

а стабильность p53, в свою очередь, контролируется E3-убиквитинлигазами MULE и HDM2 через многоступенчатый каскад АТМ-зависимых посттрансляционных модификаций фосфатазы PPM1G и убиквитин-протеазы USP7S в ответ на повреждения ДНК (разделы “3.1.1. Негативная регуляция MULE в ответ на повреждения ДНК и ее значимость” и “3.2. Регуляция клеточного уровня содержания USP7S”), логичным было предположение, что регуляция клеточного цикла в ответ на ОР осуществляется в соответствии с p53-зависимым механизмом.



**Рисунок 3.44.** Задержка клеточного цикла в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> в ответ на нерепарированные ОР, регулируемая активностью АТМ, зависит от присутствия p53. **А-В.** Клетки TIG-1 трансфицировали киРНК (200 пмоль каждой) против *XRCC1*, *p53* или одновременно *XRCC1* и *p53* в течение 60 ч. В качестве контроля использовали последовательность киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (контр). По истечении 60 ч клетки инкубировали в присутствии 10 мкМ BrdU в течение 20 мин и проводили анализ полученных образцов методами **(А)** белкового SDS-электрофореза в 10 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами и **(Б-В)** проточной цитометрии с окрашиванием ДНК йодидом пропидия (PI). Показаны **(Б)** численные результаты анализа клеточного цикла по данным 5-ти независимых экспериментов с уровнем значимости (НЗ – незначимо,  $P > 0,05$ ) и **(В)** типичные примеры двумерных гистограмм распределения клеток по фазам клеточного цикла.

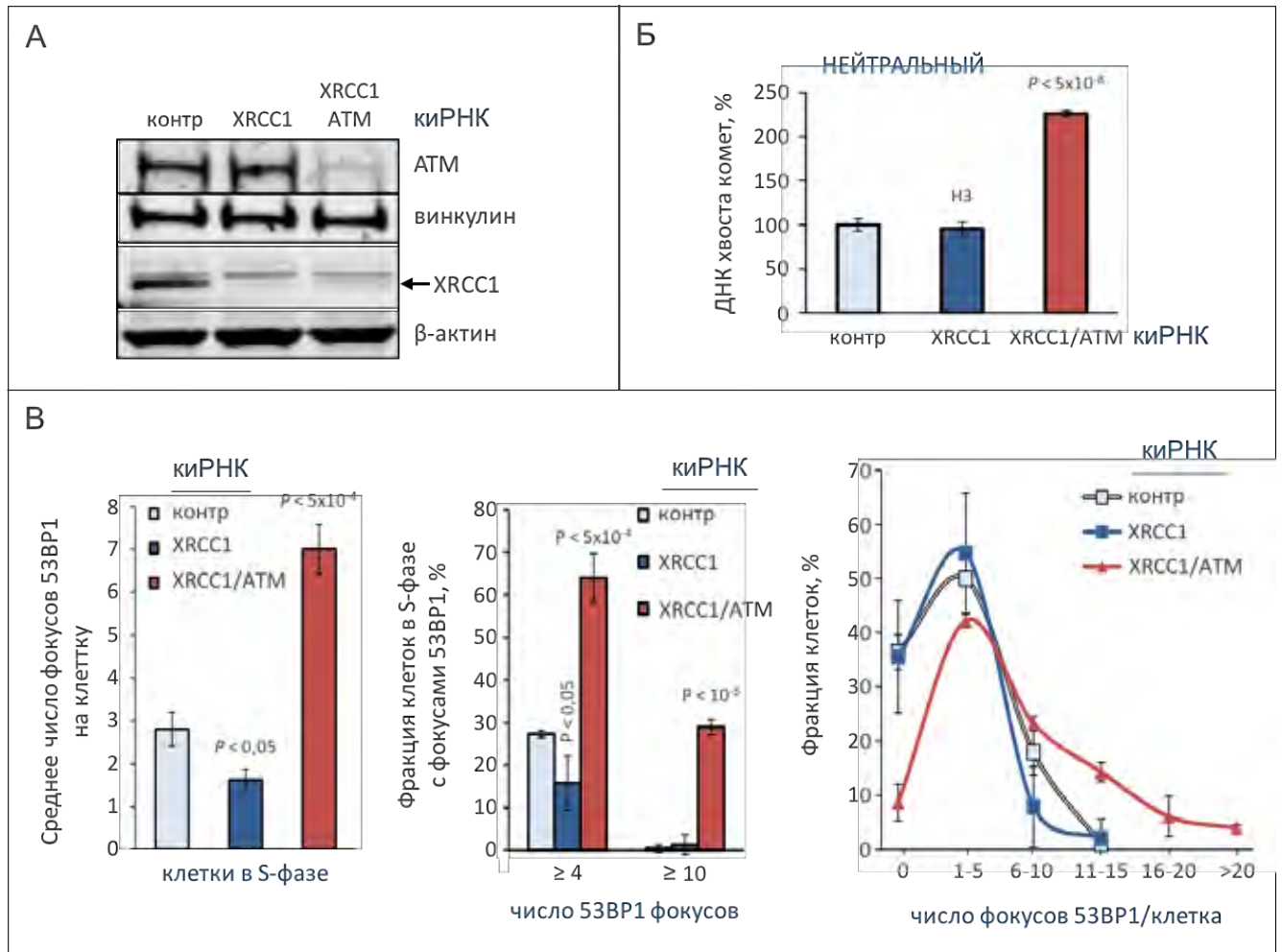
Действительно, в ОР-содержащих p53-дефицитных клетках задержки клеточного цикла в фазе  $G_0/G_1$  не наблюдалось, подтверждая зависимость ATM-контролируемой сигнализации нерепарированных ОР от присутствия в клетках функционального p53 (Рисунок 3.44).

Таким образом, ОР-зависимая активация ATM обеспечивает замедление входа клеток с нерепарированными ОР в фазу S клеточного цикла, что предположительно необходимо для предотвращения конверсии ОР в процессе репликации ДНК с образованием мутагенных ДР и поддержания стабильности генома. Соответственно, на следующем этапе данной работы было проведено исследование биологической значимости активации ATM в ответ на нерепарированные ОР и индуцируемой ею задержки клеточного цикла в фазе  $G_0/G_1$ .

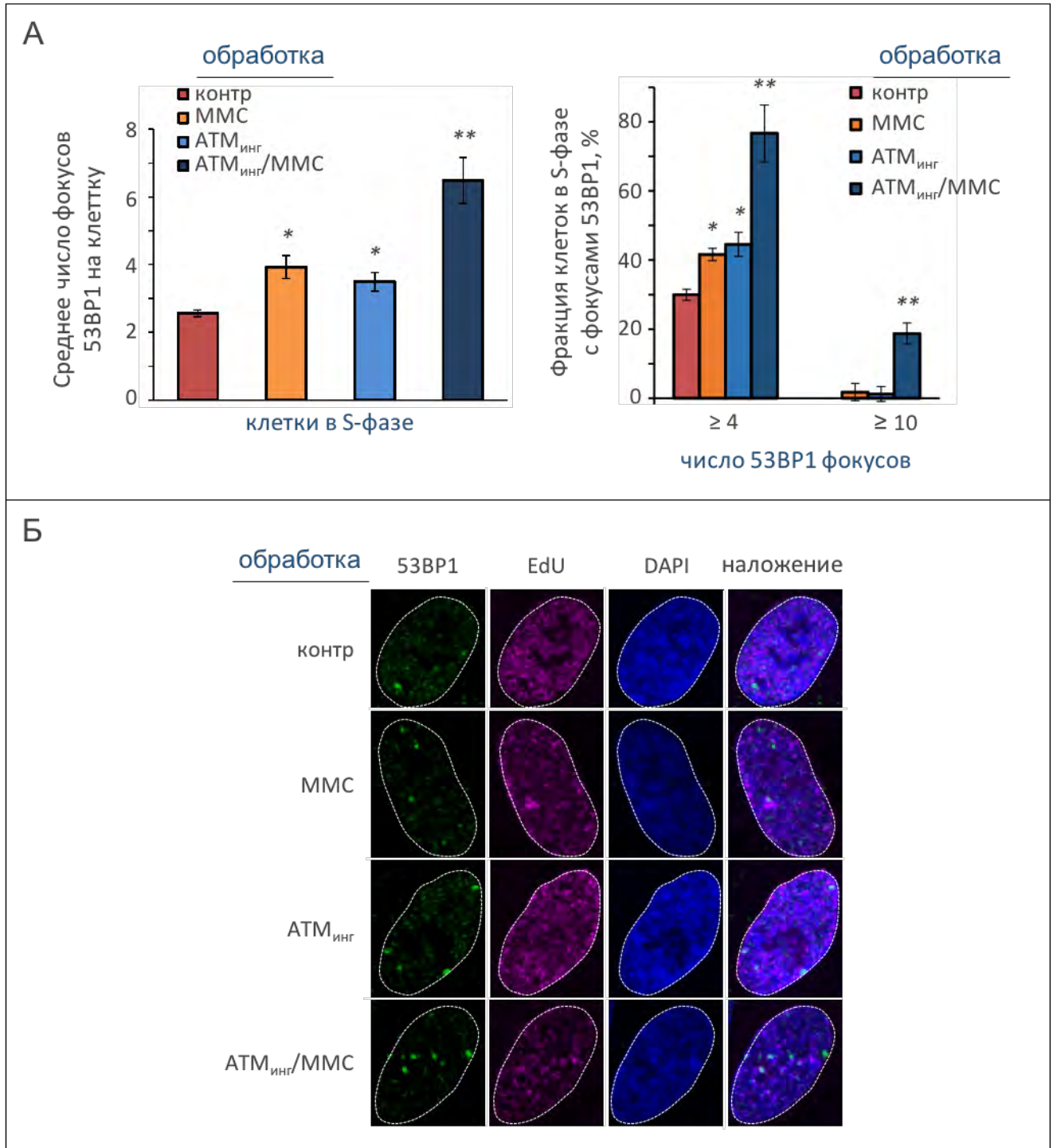
### **3.3.4. ATM-зависимая сигнализация нерепарированных ОР в фазе $G_0/G_1$ предотвращает образование высокомутагенных репликационных ДР**

Из описанных выше результатов следует, что ингибирование киназной активности ATM или отсутствие функционального фермента приводит к снятию блока прогрессии клеток в фазу S клеточного цикла даже в случае присутствия значительных количеств ОР, что наблюдается в XRCC1-дефицитных клетках (Рисунки 3.41-3.43). Логично предположить, что в отсутствие ATM-зависимого контроля времени входа клеток в S-фазу клеточного цикла репликация ОР-содержащей ДНК должна приводить к образованию репликационных ДР. Для проверки данной гипотезы был проведен анализ содержания эндогенных ДР в ATM-дефицитных клетках, содержащих избыток нерепарированных ОР, а также оценка числа фокусов ДР-маркера 53BP1 в клетках  $G_0/G_1$ - и S-фаз. При использовании метода ДНК-комет в условиях нейтрального лизиса, который позволяет измерять специфически ДР, было продемонстрировано накопление значительного количества ДР в отсутствие ATM в содержащих нерепарированные ОР XRCC1-дефицитных клетках, тогда как в ATM-положительных ОР-содержащих клетках подобного эффекта не наблюдалось (Рисунок 3.45 А). Для более детального анализа природы накапливающихся ДР ATM- и XRCC1-дефицитные клетки инкубировали в присутствии EdU в течение времени всего эксперимента (60 ч обработки киРНК) и анализировали количество фокусов 53BP1 методом иммунофлуоресценции в EdU-отрицательных ( $G_0/G_1$ -фазных) и EdU-положительных (прошедших через репликацию ДНК S-фазных) клетках. Клетки, находящиеся в  $G_2/M$ -фазе, детектировали по иммунофлуоресцентной гибридизации с

антителами против циклина В1 (маркер фазы G<sub>2</sub>/M) и из анализа исключали. Было установлено, что увеличение среднего числа фокусов 53BP1 на клетку, а также процента клеток, содержащих многочисленные фокусы 53BP1 (Рисунок 3.45 В), наблюдается в ATM-дефицитных клетках в ответ на нерепарированные ОР специфически в S-фазе клеточного цикла. Полученные данные свидетельствуют о накоплении ДР в результате репликации поврежденной ДНК в отсутствие ATM-зависимой сигнализации нерепарированных ОР.



**Рисунок 3.45.** Образование репликационных ДР в ответ на нерепарированные ОР в отсутствие ATM-зависимой сигнализации повреждений ДНК. Клетки TIG-1 трансфицировали киРНК (200 пмоль каждой) против *XRCC1* или одновременно *XRCC1* и *ATM* и инкубировали в присутствии 1 мкМ EdU в течение 60 ч. В качестве контроля использовали последовательность киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (контр). **А.** Анализ методом белкового SDS-электрофореза в 10 и 3-8 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. **Б.** Анализ ДР проводили методом ДНК-комет в условиях нейтрального лизиса. **В.** Иммунофлуоресцентный анализ количества фокусов 53BP1 в EdU-положительных клетках. Результаты представлены в виде среднего числа 53BP1-фокусов на клетку (левая панель), процентного содержания клеток с  $\geq 4$  и  $\geq 10$  фокусов 53BP1 (средняя панель) и распределения клеток по фракциям, содержащим 0, 1-5, 6-10, 11-15, 16-20 и более 20 фокусов 53BP1 на клетку. **Б-В.** Представлены данные 5-ти независимых экспериментов с уровнем значимости, НЗ – незначимо ( $P > 0,05$ ).

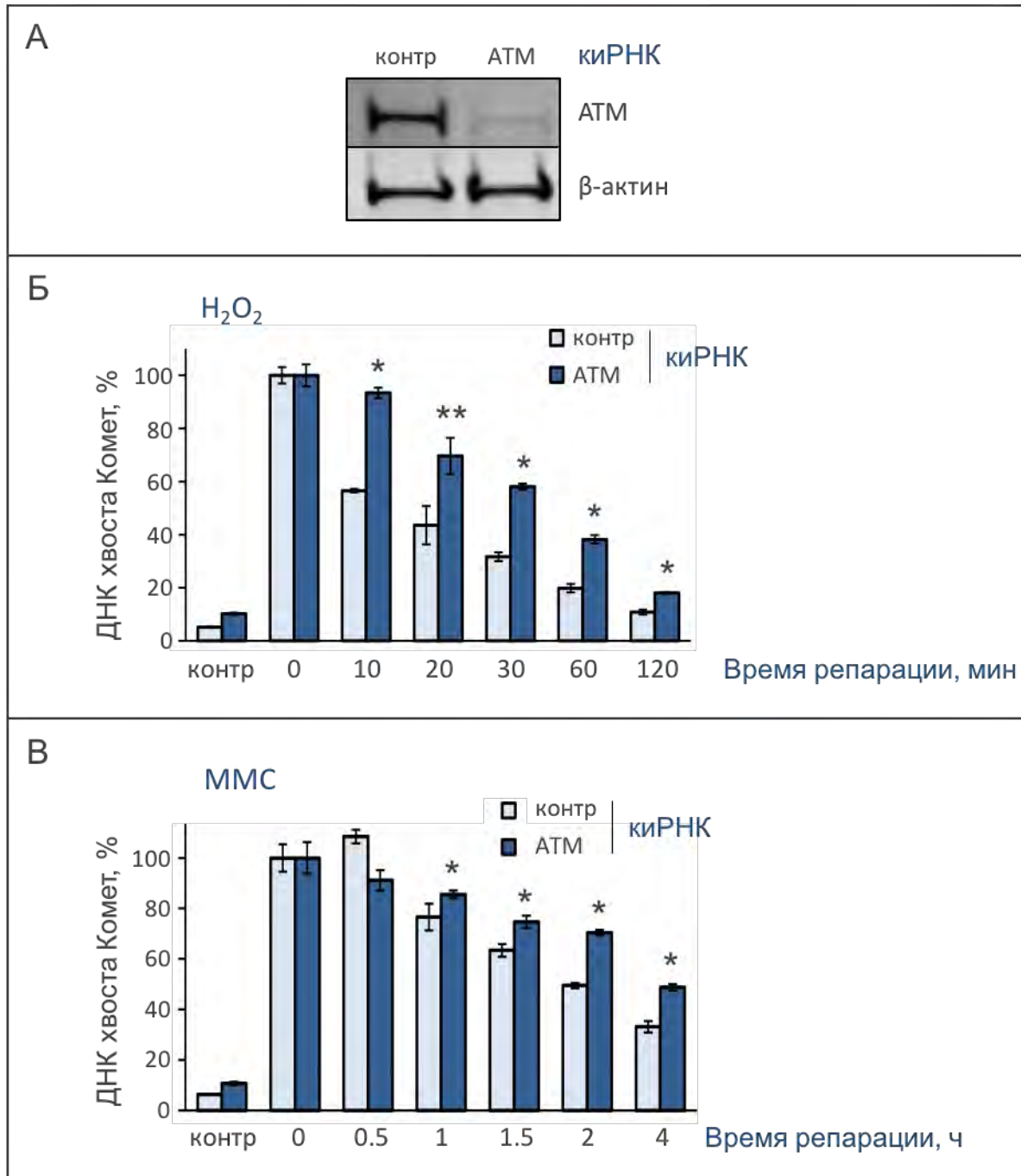


**Рисунок 3.46.** Киназная активность ATM необходима для предотвращения образования репликационных ДР в ответ на нерепарированные ОР. **А-Б.** Клетки TIG-1 преинкубировали в присутствии 1 мкМ ингибитора активности ATM, KU55933, в течение 2 ч. В качестве контроля (контр) использовали клетки, обработанные равной концентрацией ДМСО. Повреждения ДНК индуцировали обработкой 250 мкМ метиметансульфоната (ММС) в течение 1 ч в присутствии KU55933 и 1 мкМ EdU. Проводили иммунофлуоресцентный анализ фокусов 53BP1 в EdU-положительных (S-фазных) клетках. **А.** Результаты представлены в виде среднего числа 53BP1-фокусов на клетку (левая панель) и процентного содержания клеток с  $\geq 4$  и  $\geq 10$  фокусов 53BP1 (правая панель). Показаны данные 3-х независимых экспериментов,  $*P < 0,05$ ,  $**P < 0,01$ . **Б.** Приведены типичные примеры ИФ-анализа.



В описанном ранее эксперименте для установления роли АТМ в предотвращении образования ДР при репликации ОР-содержащей ДНК использовали АТМ-дефицитные клетки, полученные при обработке кИРНК против АТМ (Рисунок 3.45). Учитывая ранее продемонстрированную активацию АТМ в ответ на нерепарированные ОР (раздел “3.3.1. Дефекты репарации одноцепочечных разрывов ДНК индуцируют активность АТМ”), было необходимо установить роль киназной активности АТМ в предотвращении репликации ОР-содержащей ДНК. Для этого проводили обработку клеток ингибитором активности АТМ, тогда как повышение количества нерепарированных ОР индуцировали при инкубации клеток в присутствии ММС. Было обнаружено, что для сигнализации нерепарированных ОР, обеспечивающих задержку клеточного цикла и предотвращение образования репликационных ДР, требуется именно киназная активность АТМ, а не просто присутствие данного белка в клетках (Рисунок 3.46). Таким образом, было показано, что при высоком фоновом содержании одноцепочечных разрывов ДНК в отсутствие АТМ происходит неконтролируемая репликация поврежденной ДНК с образованием мутагенных ДР. В АТМ-положительных клетках наблюдается АТМ- и p53-зависимая сигнализация нерепарированных ОР, обеспечивающая регуляцию времени входа клеток в S-фазу клеточного цикла с целью предотвращения репликации поврежденной ДНК.

Важным является то, что неконтролируемое образование репликационных ДР в отсутствие функциональной АТМ может быть частично связано с нарушениями положительной модуляции эффективности ЭРО и ОР-репарации через клеточный уровень содержания POI β в ответ на повреждения ДНК в соответствии с выявленным в настоящей работе PPM1G—USP7S—MULE-зависимым многоступенчатым сигнальным каскадом. Для проверки данного предположения было проведено исследование кинетики репарации ОР методом ДНК-комет после обработки культуры АТМ-дефицитных нормальных первичных фибробластов человека пероксидом водорода и ММС. При проведении эксперимента в условиях щелочного лизиса было установлено, что эффективность ОР-репарации в клетках, обработанных АТМ-кИРНК, значительно ниже таковой по сравнению с контрольными клетками, тогда как при использовании нейтрального варианта метода ДНК-комет, измеряющего репарацию ДР, подобного эффекта обнаружено не было (Рисунок 3.47).



**Рисунок 3.47.** Кинетика репарации ОР в АТМ-дефицитных клетках. Клетки TIG-1 трансфицировали киРНК против АТМ (200 пмоль) в течение 60 ч. В качестве контроля использовали последовательность киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (контр). **А.** Клетки анализировали методом белкового SDS-электрофореза в 3-8 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. **Б-В.** Повреждения ДНК индуцировали обработкой (Б) суспензии клеток 35 мкМ  $H_2O_2$  в течение 5 мин или (В) клеток в монослое в присутствии 1 мМ ММС в течение 30 мин и исследовали кинетику репарации методом ДНК-комет в условиях щелочного лизиса. Различий в кинетике репарации повреждений ДНК между клетками, обработанными контрольной и АТМ-киРНК, методом ДНК-комет в условиях нейтрального лизиса обнаружено не было. В качестве контроля (контр) использовали необработанные клетки. Представлены данные 3-х независимых экспериментов, \* $P < 0,001$ , \*\* $P < 0,05$ .

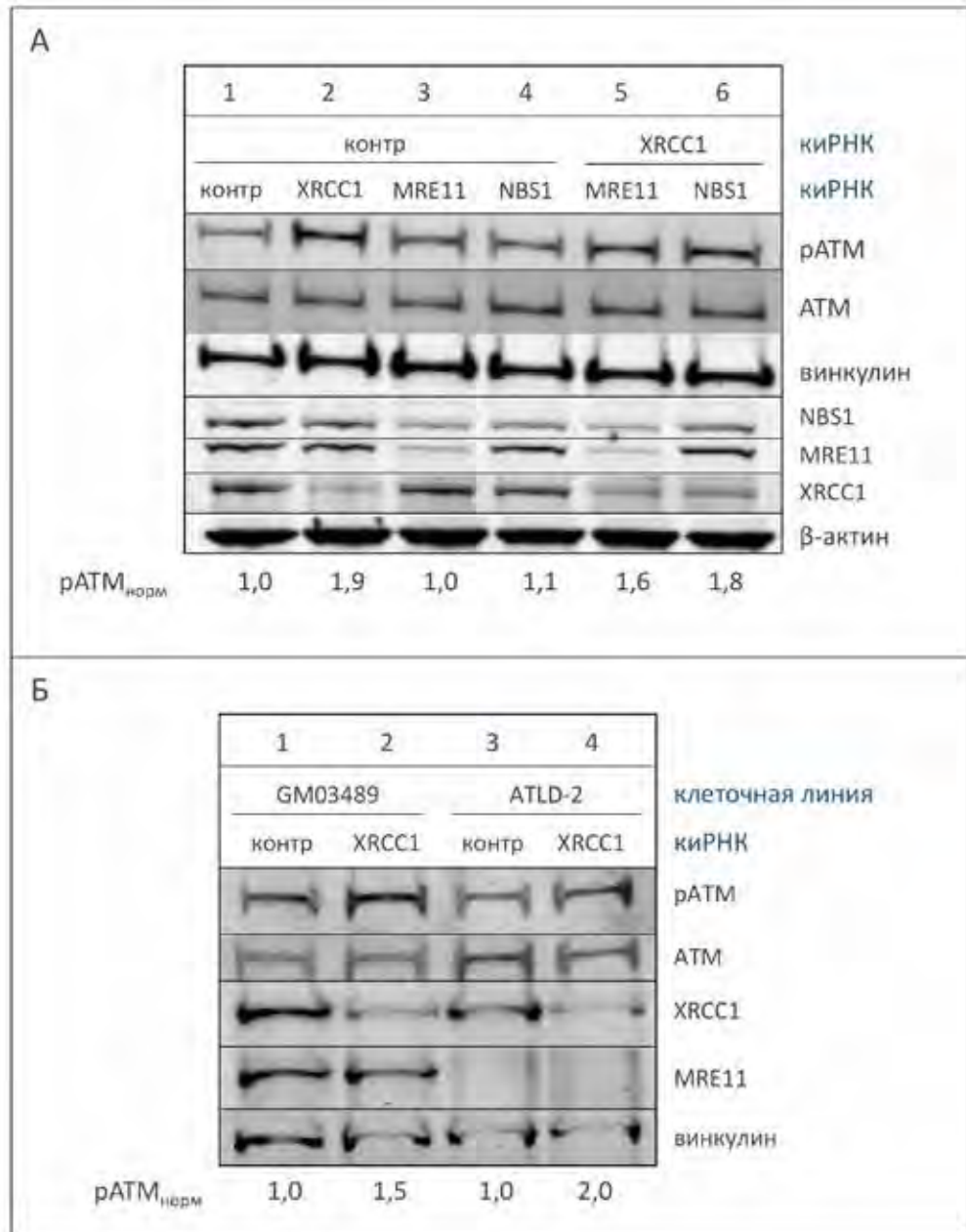


Таким образом, в данном разделе была продемонстрирована первостепенная важность ATM в обеспечении функциональной передачи сигнала в ответ на нерепарированные ОР, биохимическим результатом которой является p53-зависимая регуляция времени нахождения клеток в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> клеточного цикла в зависимости от количества повреждений ДНК, а также POI β-зависимая модуляция эффективности репарации ОР. Подобная ATM-зависимая система передачи сигнала обеспечивает координацию эффективной репарации ОР перед репликацией ДНК и, таким образом, предотвращает образование высокомуtagenных репликационных ДР.

Поскольку протеинкиназа ATM не является сенсором повреждений ДНК, задачей следующей стадии данного исследования было установление схожести механизма активации ATM в ответ на нерепарированные ОР с ранее описанными механизмами активации ATM в ответ на окислительный стресс и ДР, а также выявление сенсора ОР, обеспечивающего передачу сигнала от повреждений ДНК к ATM.

### **3.4. Предварительные исследования механизма активации ATM одноцепочечными разрывами ДНК**

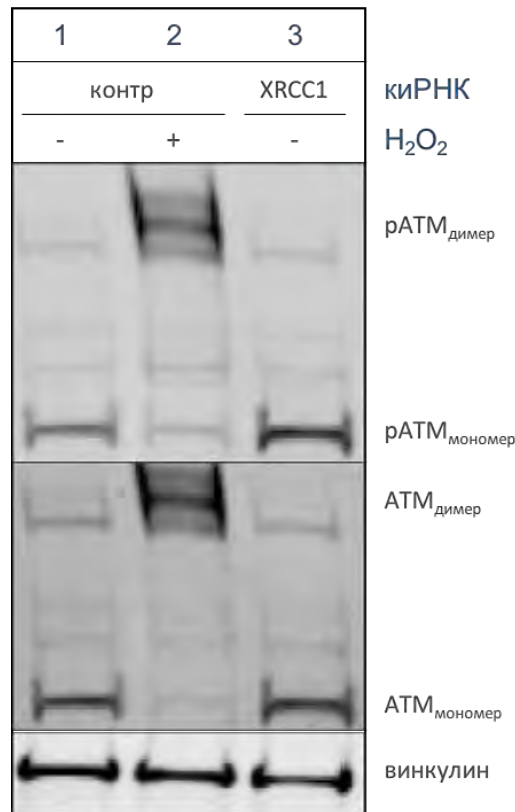
Протеинкиназа ATM играет роль трансдьюсера в клеточном ответе клеток на повреждения ДНК (раздел “1.2. Целостность генома”), что предполагает существование сенсора/ов нерепарированных ОР, обеспечивающего детекцию данного типа повреждений ДНК и передачу сигнала к ATM. Как установлено в разделе “3.3. Активация ATM одноцепочечными разрывами ДНК”, результатом данного процесса является индукция киназной активности ATM, но вопрос о механизме активации ATM в ответ на ОР остается открытым. В частности, принципиальным является вопрос об уникальности ОР-зависимой активации ATM по сравнению с хорошо изученными механизмами канонической MRN-зависимой активации ATM в ответ на образование ДР (раздел “1.3.1. Каноническая активация ATM”), а также индукции активности ATM через образование дисульфидного мостика по аминокислотным остаткам цистеина 2991 в ответ на окислительный стресс (раздел “1.3.2. Активация ATM в ответ на окислительный стресс”).



**Рисунок 3.48.** Независимость активации ATM в ответ на нерепарированные ОР от компонентов MRN-комплекса. **А.** Клетки TIG-1 трансфицировали киРНК (200 пмоль каждой) против *XRCC1*, *MRE11* или *NBS1*, или одновременно *XRCC1* и *MRE11* или *XRCC1* и *NBS1* и инкубировали в течение 60 ч. **Б.** Клетки нормальных первичных фибробластов человека из пациентов с заболеванием, похожим на атаксию телеангиэктазию (ATLD-2) с мутацией в *MRE11*, приводящей к потере полноразмерного и функционального белка, и контрольные клетки GM03489 культивировали до плотности монослоя 100 % и затем в течение дополнительных 24 ч в состоянии контактного торможения с последующей трансфекцией киРНК против *XRCC1* (200 пмоль) в течение 60 ч. **А-Б.** В качестве контроля использовали последовательность киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (контр). Клетки собирали, проводили экстракцию белков и полученные цельные клеточные экстракты разделяли методом белкового SDS-электрофореза в (А-Б) 3-8 и (А) 10 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Денситометрические значения pATM нормализовали по ATM и винкулину.

Для установления зависимости активации АТМ в ответ на нерепарированные ОР от присутствия компонентов MRN-комплекса клетки TIG-1 обрабатывали кiPHK против *MRE11* или *NBS1*, и оценивали содержание фосфорилированного АТМ по остатку S1981 после индукции ОР. Было показано, что активация АТМ в ответ на эндогенные нерепарированные ОР сравнима с таковой в отсутствие *MRE11* и *NBS1* (Рисунок 3.48 А, дорожки 5 и 6 по сравнению с дорожкой 1). Аналогичные выводы были сделаны при оценке эффективности активации АТМ в синхронизированных культурах нормальных первичных фибробластов человека, полученных из пациентов с заболеванием, похожим на атаксию телеангиэктазию (ATLD), характеризующимся мутациями в гене *MRE11* [Stewart, G.S. *et al.*, 1999], по сравнению с контрольными клетками GM03489 (Рисунок 3.48 Б, дорожка 4 по сравнению с дорожкой 2). Накопление нерепарированных ОР индуцировали при обработке фибробластов с использованием кiPHK против *XRCC1*. Полученные результаты указывают на независимость индукции киназной активности АТМ в ответ на нерепарированные ОР от присутствия в клетках MRN-комплекса, который является установленным сенсором ДР в контексте активации АТМ.

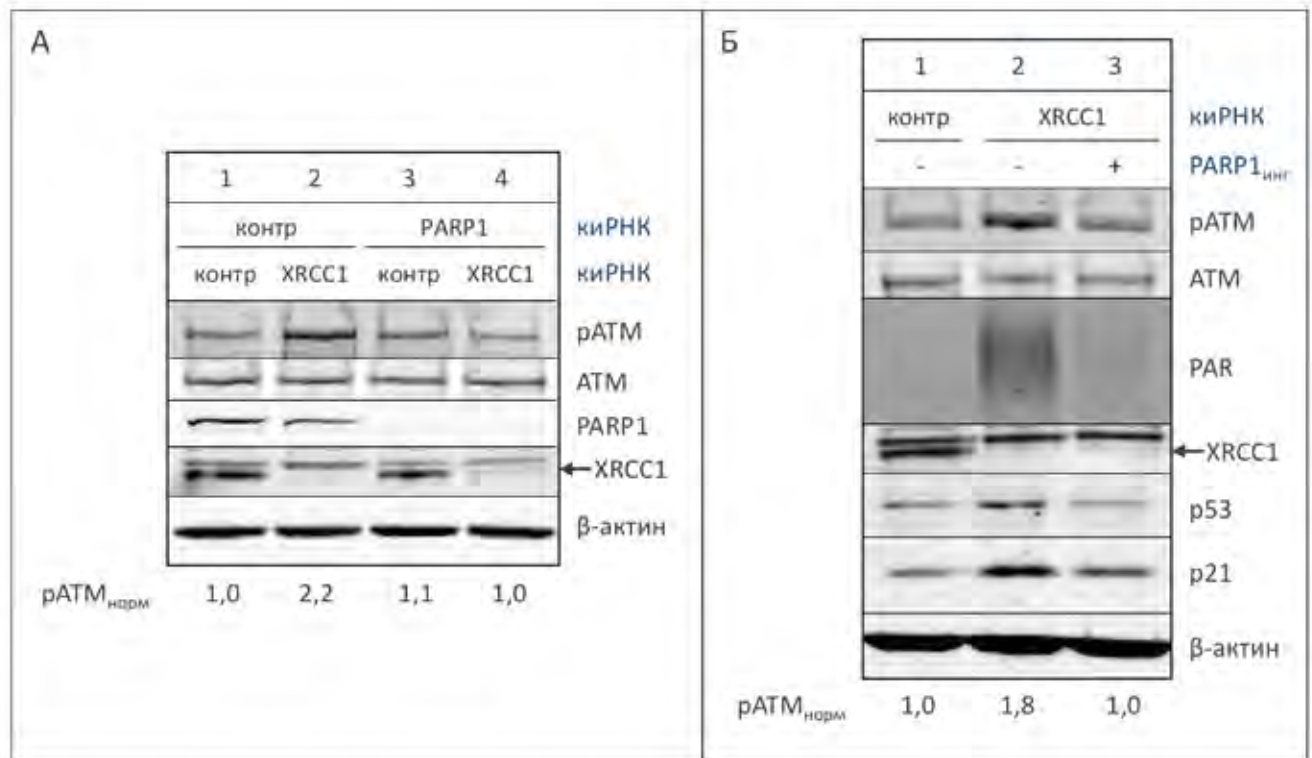
Также было проведено исследование зависимости активации АТМ нерепарированными ОР от образования дисульфидной связи между остатками C2991 двух субъединиц фермента. В соответствии с механизмом окислительной активации АТМ активной формой киназы является димерный белок в отличие от мономера в случае ДР-зависимой активации АТМ (раздел “1.3.2. Активация АТМ в ответ на окислительный стресс”). Для выяснения степени олигомеризации активной киназы АТМ в ответ на нерепарированные ОР проводили белковый электрофорез цельных клеточных экстрактов после индукции образования ОР с использованием кiPHK против *XRCC1* в нативных (неденатурирующих) условиях. Было установлено, что, в отличие от активированной активными формами кислорода димерной АТМ, S1981-фосфорилированная в ответ на нерепарированные ОР АТМ является мономером (Рисунок 3.49, дорожка 3), что указывает на независимость исследуемого механизма активации АТМ от ранее описанного окисления дисульфидной связи.



**Рисунок 3.49.** Активированная в ответ на нерепарированные ОР АТМ является мономером. Клетки TIG-1 трансфицировали киРНК против *XRCC1* (200 пмоль) в течение 60 ч или обрабатывали 150 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 15 мин. В качестве контроля использовали последовательность киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (контр). Целые клеточные экстракты разделяли методом белкового электрофореза в нативных условиях в 3-8 % ПААГ с последующим иммуноблотингом и гибридизацией с указанными антителами. Для контроля нанесения равных количеств экстракта использовали гибридизацию с антителами против винкулина.

Полученные экспериментальные данные предполагают существование уникального механизма активации АТМ в ответ на ОР. Одним из хорошо охарактеризованных сенсоров одноцепочечных разрывов ДНК является PARP1 и в значительно меньшей степени другие члены семейства поли(ADP-рибозо)полимераз, PARP2 и PARP3 (раздел “1.2.2. Репарация одноцепочечных разрывов ДНК (ОР)”). Соответственно, было высказано предположение, что PARP1 может являться сенсором нерепарированных ОР, обеспечивающим передачу сигнала от данных повреждений ДНК к АТМ, то есть активация АТМ в ответ на ОР может зависеть от присутствия и/или активности PARP1. Было продемонстрировано, что активация АТМ в ответ на нерепарированные ОР не происходит в PARP1-дефицитных клетках, что соответствует высказанному предположению (Рисунок 3.50 А, дорожка 4 по сравнению с дорожкой 2). Следует отметить, что ярко выраженной зависимости активации АТМ в ответ на ОР от

присутствия PARP2 и PARP3 не наблюдалось, хотя данные паралоги могут играть более значительную роль в отсутствие PARP1.



**Рисунок 3.50.** Активация ATM нерепарированными ОР зависит от активности PARP1. **А.** Клетки TIG-1 трансфицировали киРНК (200 пмоль каждой, 60 ч) против (**А**) *XRCC1*, *PARP1* или одновременно *XRCC1* и *PARP1* или (**Б**) *XRCC1* и инкубировали в присутствии 10 мкМ ингибитора активности ферментов PARP, NU1025, в течение 60 ч. **А-Б.** В качестве контроля использовали последовательность киРНК, которая не демонстрирует комплементарности к какой-либо последовательности человеческого генома (контр). Целые клеточные экстракты разделяли методом белкового SDS-электрофореза в 10-16 % ПААГ с последующим иммуноблоттингом и гибридизацией с указанными антителами. Денситометрические значения pATM нормализовали по ATM и β-актину.

Более того, активация ATM была блокирована при обработке XRCC1-дефицитных клеток ингибитором активности членами семейства поли(ADP-рибозо)полимераз, NU1025, который предотвращает синтез полимеров PAR в ответ на накопление ОР (Рисунок 3.50 Б, дорожка 3). Полученные результаты указывают на важность PARP1-зависимого синтеза поли(ADP-рибозы) в активации ATM в ответ на нерепарированные ОР.

В заключение, было установлено, что важной частью клеточного ответа на нерепарированные ОР является стимуляция киназной активности ATM. Детекция нерепарированных ОР обеспечивается поли(ADP-рибозо)полимеразой PARP1, ферментативная активность которой необходима для активации ATM. Активированная ATM инициирует

сигнальный каскад, последовательно обеспечивающий стимуляцию активности фосфатазы RRM1G, дефосфорилирование активной изоформы убиквитин-специфической протеазы USP7S с ее дестабилизацией, повышенную эффективность самоубиквитинирования и соответственно пониженную стабильность E3-убиквитинлигаз MULE и HDM2 и, наконец, стабилизацию белковых субстратов последних, таких как супрессора опухолевого роста p53 и ДНК-полимеразы системы эксцизионной репарации оснований POL  $\beta$ . Результатом ATM-зависимого повышения стабильности p53 в ответ на нерепарированные ОР является задержка входа клеток с поврежденной ДНК в фазу S клеточного цикла, что обеспечивает дополнительное время для последовательных раундов репарации ДНК перед ее репликацией. Стабилизация POL  $\beta$  в ответ на ОР необходима для повышения эффективности репарации поврежденных оснований и одноцепочечных разрывов ДНК. Таким образом, ATM-зависимая сигнализация нерепарированных ОР обеспечивает координацию эффективной и своевременной репарации данного типа повреждений ДНК, предотвращая образование высокомутатогенных репликационных ДР и обеспечивая поддержание стабильности генома.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

### 4.1. Дестабилизация MULE в ответ на повреждения ДНК

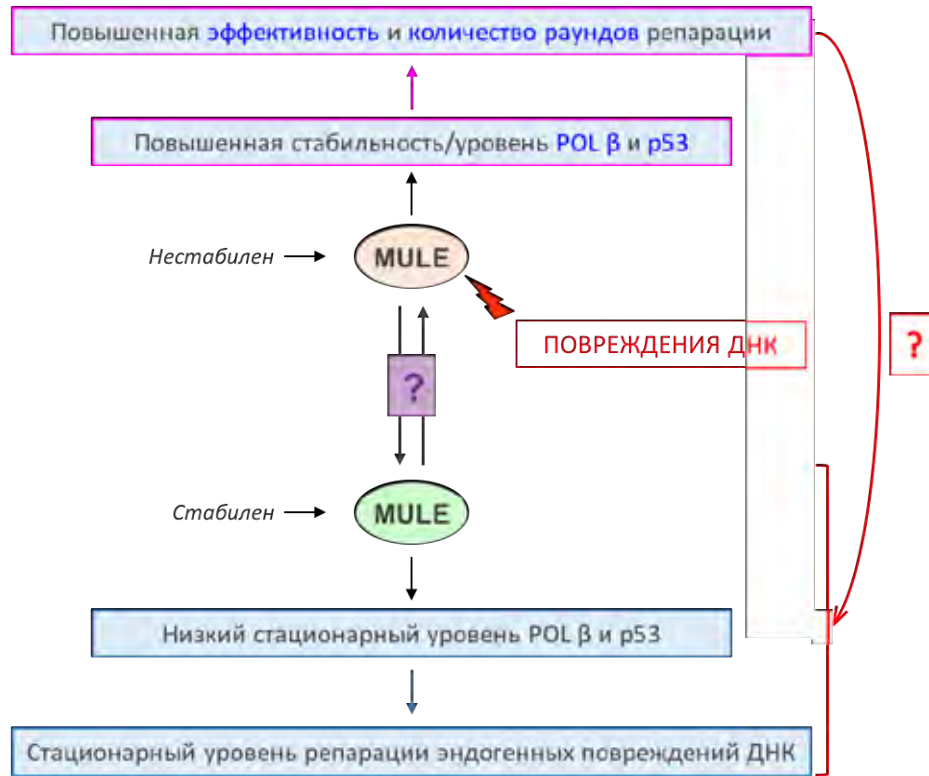
В соответствии с основной гипотезой, выдвинутой в данном исследовании, эффективность ЭРО и ОР-репарации может потенциально регулироваться через координацию длительности фазы клеточного цикла  $G_0/G_1$  в зависимости от количества нерепарированных ОР, разрешая последовательные циклы репарации ДНК, и собственно стабильности и/или активности ферментов ЭРО и репарации ОР, напрямую связанных с эффективностью репарации ДНК (раздел “1.4.3. MULE-зависимая регуляция ЭРО и репарации ОР”). E3-убиквитинлигаза MULE является белком, контролирующим клеточный уровень содержания не только ДНК-полимеразы POL  $\beta$ , которая является лимитирующим фактором ЭРО и ОР-репарации ферментов, но и супрессора опухолевого роста p53, ответственного за регуляцию клеточного цикла в ответ на повреждения ДНК, в числе прочих [Khoronenkova, S.V. & Dianov, G.L., 2011]. Нокаут *Mule* у мышей приводит к гибели эмбрионов из-за накопления значительных количеств p53 [Kon, N. *et al.*, 2012], что говорит о важной роли Mule в поддержании относительно низкого клеточного содержания p53 в эндогенных условиях. Аналогичным образом MULE обеспечивает оптимальный эндогенный уровень экспрессии POL  $\beta$ , избыток которой ассоциирован с повышенной скоростью мутагенеза и онкотрансформации [Albertella, M.R. *et al.*, 2005]. В соответствии с вышесказанным представляется логичным, что активность и/или стабильность MULE должны обратно регулироваться в зависимости от эффективного содержания репарируемых с участием POL  $\beta$  повреждений ДНК, разрешая стабилизацию последней, а также и p53 в рамках клеточного ответа на нерепарированные ОР. Действительно, нами недавно была открыта система ARF-зависимой негативной регуляции активности MULE в ответ на разрывы ДНК неопределенного типа, предположительно включающие ОР и ДР [Orlando, G. *et al.*, 2014]. Как детально обсуждалось в разделе “1.4.3. MULE-зависимая регуляция ЭРО и репарации ОР”, данная система обладает относительно невысокой эффективностью в нормальных (содержащих p53 дикого типа) клетках, индуцируется лишь в случае длительного присутствия нерепарированных разрывов ДНК в клетках и, судя по всему, не является специфической для ОР. Более того, в ARF-дефицитных клетках наблюдается

повышение уровня экспрессии p53 в ответ на облучение ионизирующей радиацией [Kamijo, T. *et al.*, 1999]. Учитывая колоссальную способность нормальных клеток к репарации ОР и совокупность описанных выше экспериментальных данных, существование специализированного (ARF-независимого) механизма клеточного ответа на нерепарированные ОР является неоспоримым. Следует отметить, что, если стабильность p53 может регулироваться многочисленными E3-убиквитинлигазами (раздел “1.4.2. E3-убиквитинлигаза MULE и p53-зависимый ответ на повреждения ДНК”), то контроль клеточного уровня содержания POL  $\beta$  осуществляется именно на уровне белка (ранее описанная положительная регуляция мРНК *POL  $\beta$*  в ответ на генотоксический стресс не приводит к повышенному содержанию белка [Fornace, A.J., Jr. & Little, J.B., 1977]), и первостепенным регулятором POL  $\beta$  является E3-убиквитинлигаза MULE [Parsons, J.L. *et al.*, 2009]. Таким образом, спектр субстратов MULE делает данный фермент идеальным кандидатом на роль эффектора клеточного ответа на нерепарированные ОР. Учитывая вышесказанное, гипотеза о существовании клеточного ответа на нерепарированные ОР была развита до предположения о существовании системы регуляции белкового уровня содержания MULE, индуцируемой специфически одноцепочечными разрывами ДНК и обеспечивающей динамическую регуляцию клеточного содержания ферментов ЭРО и ОР-репарации, а также времени, в течение которого такая репарация может происходить, в зависимости от количества нерепарированных повреждений ДНК.

Экспериментальные данные о том, что при обработке клеток различными химическими агентами, которые индуцируют повреждения оснований и разрывы ДНК, наблюдается значительное (40-50 %) и относительно быстрое (15-60 мин после обработки) снижение уровня экспрессии MULE свидетельствуют в пользу данной гипотезы. Подобный эффект не зависит от типа клеток и является кратковременным, поскольку наблюдается восстановление количества MULE до исходного в течение 1-2 ч после обработки (см. Рисунок 3.1). Более того, описанные результаты по регуляции MULE в ответ на повреждения ДНК были позже экспериментально подтверждены в других работах [Edmonds, M.J. *et al.*, 2017; Yi, J. *et al.*, 2015]. Следует отметить, что подобные временные рамки характерны для полной репарации индуцированных повреждений системами ЭРО и ОР-репарации, что указывает на возможную взаимосвязь регуляции содержания MULE и эффективности репарации. Действительно, при блокировании дестабилизации MULE в ответ на повышение эффективного количества повреждений ДНК



наблюдается, во-первых, уменьшение количества POL  $\beta$  и соответствующее снижение эффективности репарации разрывов ДНК, и, во-вторых, частичное, за счет существования компенсаторных механизмов, ограничение эффективности p53-зависимого ответа на повреждения ДНК (раздел “3.1.1. Негативная регуляция MULE в ответ на повреждения ДНК и ее значимость”).



**Рисунок 4.1.** Схема регуляции клеточного уровня содержания MULE и важных в контексте данного исследования субстратов (p53 и POL  $\beta$ ) в ответ на повреждения ДНК. В эндогенной ситуации MULE обеспечивает поддержание стационарного уровня эффективности POL  $\beta$ -зависимой репарации ДНК и относительно низкого уровня содержания p53. В ответ на повреждения ДНК наблюдается кратковременная дестабилизация MULE на уровне белка с соответствующей индукцией p53-зависимого клеточного ответа и стимуляцией ЭРО и ОР-репарации.

Таким образом, дестабилизация MULE в ответ на повреждения ДНК необходима для обеспечения повышенной стабильности субстратов данной E3-убиквитинлигазы, за счет чего осуществляется повышение эффективности ЭРО и ОР-репарации, а также p53-зависимая сигнализация нерепарированных повреждений ДНК (Рисунок 4.1). Данная система должна быть высокодинамичной, поскольку эффективная репарация избытка повреждений ДНК приводит, в соответствии с открытым в рамках данного исследования механизмом, к восстановлению стабильности MULE и стационарного уровня эффективности убиквитинилирования с последующей протеасомной деградацией субстратов данной E3-убиквитинлигазы, что

обеспечивает поддержание клеточного уровня экспрессии POL  $\beta$  и p53 на относительно низком, но достаточном для репарации эндогенных повреждений ДНК уровне. Впрочем, механизм подобной динамичности на данном этапе работы был неизвестен. Следует также отметить, что в дополнение к POL  $\beta$  и p53 MULE контролирует клеточный уровень содержания POL  $\lambda$ , CDC6, TOPBP1, H2AX, MCL-1 и ряда других субстратов, вовлеченных в регуляцию различных аспектов клеточного ответа на повреждения ДНК [Khoronenkova, S.V. & Dianov, G.L., 2011], которые в рамках данного исследования обсуждаются лишь в общих деталях.

Подчеркивая значимость вышеописанной негативной регуляции белковой стабильности MULE в зависимости от количества повреждений ДНК, в значительном многообразии (с частотой до 15 %) раковых клеточных линий, включающих клетки рака груди и легких [Adhikary, S. *et al.*, 2005], шейки матки, желудка и желчного протока [Yoon, S.Y. *et al.*, 2005], меланомы [Hodis, E. *et al.*, 2012], множественной миеломы [Crawford, L. & Irvine, A.E., 2016] и многих других типов раковых образований в соответствии с данными базы соматических мутаций COSMIC [Forbes, S.A. *et al.*, 2011], наблюдается значительно более высокий уровень содержания фермента, чем в нормальных (здоровых) клетках. Более того, при использовании первичных клеток, полученных из раковых образований толстой кишки различных пациентов, было установлено, что количество мРНК MULE напрямую коррелирует со стадией рака: в нормальных клетках было обнаружено лишь незначительное количество мРНК MULE, тогда как в аденомах и аденокарциномах уровень экспрессии данного гена был приблизительно на 30 и 50 % выше, соответственно [Yoon, S.Y. *et al.*, 2005]. При этом уровень экспрессии MULE был аннотирован как средний или повышенный в 40 % тканей рака толстой кишки (выборка из 70 пациентов) по сравнению с окружающими здоровыми тканями. В дополнение было показано, что снижение экспрессии MULE с использованием киРНК репрессирует пролиферативную способность клеточных линий рака груди, содержащих мутации в гене p53 [Chen, D. *et al.*, 2006], и множественных миелом с p53 дикого типа [Crawford, L. & Irvine, A.E., 2016]. Эти и полученные в настоящем исследовании экспериментальные данные указывают на то, что высокий уровень экспрессии MULE в некоторых раковых клетках может являться важной причиной прогрессии онкогенеза. Это, по крайней мере частично, связано с тем, что в подобных случаях p53-зависимый ответ и эффективность ЭРО и ОР-репарации при характерном для раковых клеток высоком количестве нерепарированных повреждений ДНК ограничены за счет

повышенного уровня содержания MULE, что обеспечивает высокую частоту образования и закрепления мутаций и сопряженный злокачественный раковый процесс. Подобные данные поддерживают идею потенциального терапевтического эффекта ингибирования активности данного белка в контексте MULE-зависимой регуляции p53 с целью стабилизации и активации последнего. Следует отметить, что онкогенная функция MULE далеко не ограничивается обсуждаемыми выше; например, K63-зависимое убиквитинилирование С-концевого домена MYC обеспечивает транскрипционную активацию последнего с соответствующим повышением пролиферативного потенциала клеток [Adhikary, S. *et al.*, 2005].

Важность специфического подхода к ингибированию узкоспециализированных функций MULE обусловлена тем, что данная E3-убиквитинлигаза также может выполнять функцию опухолевого супрессора. Например, MULE является ингибитором канонического ( $\beta$ -катенинового) сигнального каскада Wnt, дерегуляция которого играет значительную роль в развитии рака кишки [Morin, P.J. *et al.*, 1997]. Механистически MULE-зависимая регуляция Wnt-каскада осуществляется через контроль олигомеризации цитоплазматического компонента сигнального каскада DVL путем K63-зависимого убиквитинилирования [de Groot, R.E. *et al.*, 2014], а также регуляцию клеточных уровней содержания с-Мус и рецептора тирозинкиназы EphB3, обеспечивающих поддержание ниши стволовых и других клеток-предшественников [Dominguez-Brauer, C. *et al.*, 2016]. В дополнение, у мышей Mule играет роль супрессора Ras-зависимой онкотрансформации кератиноцитов кожи *in vivo*, предотвращая осуществляемую комплексом с-Мус и Miz1 негативную регуляцию экспрессии генов ингибиторов циклинзависимых киназ *p21/WAF1* и *p15* [Inoue, S. *et al.*, 2013]. Наконец, было показано, что в отсутствие функции Mule у мышей, гетерозиготных по гену-супрессору опухолевого роста в кишечнике *Apc*, наблюдается повышенная частота инициации и значительное ускорение ракового процесса за счет стабилизации MYC и накопления нерепарированных повреждений ДНК [Myant, K.V. *et al.*, 2017]. Последнее исследование согласуется с данными о роли MULE в PCNA-зависимой координации сигнализации и репарации повреждений ДНК на остановившихся репликационных вилках с целью предотвращения их коллапса и неблагоприятных последствий репликационного стресса [Choe, K.N. *et al.*, 2016]. Экспериментальные результаты данного исследования находятся в согласии с изложенными

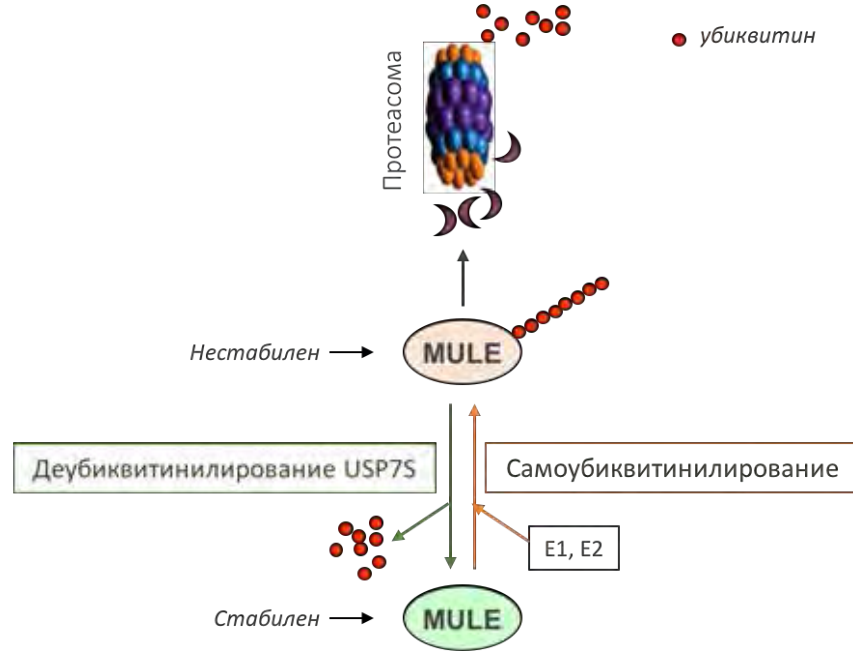
выше литературными данными, и дополнительно подчеркивают ключевую и многогранную роль MULE в репарации повреждений ДНК.

В нормальной ситуации MULE необходим для эффективной репарации эндогенных повреждений ДНК. Повышение нагрузки повреждений ДНК стимулирует частичную кратковременную деградацию данного фермента, обеспечивая координированный и быстрый клеточный ответ на повреждения ДНК с их эффективной репарацией (Рисунок 4.1). Как обсуждается ниже (раздел “4.5. Одноцепочечные разрывы ДНК стимулируют активность АТМ”), данный MULE-зависимый сигнальный каскад особенно важен в фазе G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> клеточного цикла перед репликацией ДНК и в идеальной ситуации обеспечивает репарацию всех предрепликационных повреждений оснований ДНК и ОР. В S-фазе клеточного цикла, особенно в случае индуцируемой повреждениями ДНК остановки репликационных вилок, действует упомянутый выше MULE- и PCNA-зависимый механизм защиты от репликационного стресса [Choe, K.N. *et al.*, 2016].

#### **4.2. USP7S-зависимая регуляция стационарного уровня содержания MULE**

После определения несомненной биологической важности эффекта кратковременной дестабилизации MULE в ответ на повреждения ДНК для координации их репарации возник вопрос о молекулярном механизме и вышестоящих регуляторах подобного эффекта. На основании данных о ранее описанном феномене самоубиквитинирования MULE [de Bie, P. & Ciechanover, A., 2011] и глобального протеомного анализа, указывающего на возможное существование взаимодействия MULE с убиквитин-специфическими протеазами [Sowa, M.E. *et al.*, 2009], была предложена убиквитин-зависимая схема регуляции клеточного уровня содержания MULE. С использованием разнообразных биохимических методик (реакций *in vitro* деубиквитинирования, коиммунопреципитации и модуляции уровня экспрессии генов белков с использованием кРНК и избыточной экспрессии) было установлено, что стационарный уровень содержания MULE регулируется балансом процессов самоубиквитинирования и обратного последнему деубиквитинирования специфической изоформой убиквитин-специфической протеазы USP7, USP7S, *in vivo* и *in vitro* (раздел “3.1.2. Убиквитин-зависимая регуляция стационарного уровня содержания MULE” и Рисунок 4.2), что соответствует предложенной гипотезе. Следует отметить, что в неповрежденной клетке присутствует избыток

активного USP7S, обеспечивающий относительно высокий стационарный уровень содержания MULE и, соответственно, пониженный уровень экспрессии субстратов данной E3-убиквитинлигазы, который, тем не менее, достаточен для эффективной репарации эндогенных повреждений ДНК (см. Рисунок 3.9).



**Рисунок 4.2.** Механизм убиквитин-зависимой регуляции клеточного содержания MULE. Самоубиквитинилированию MULE противостоит USP7S-зависимое деубиквитинилирование. E1 и E2 – активирующий и конъюгирующий ферменты. Несмотря на отсутствие формальных экспериментальных доказательств, самоубиквитинилирование MULE схематически показано как неразветвленное полиубиквитинилирование единственного аминокислотного остатка.

Нужно упомянуть, что до нашего открытия USP7S-зависимой регуляции стационарного уровня содержания MULE аналогичная функция была предписана другой убиквитин-специфической протеазе, называемой USP4 [Zhang, X. *et al.*, 2011]. При модуляции уровня USP4 с использованием избыточной экспрессии кодирующего ген вектора или киРНК в клетках U-2 OS авторы наблюдали соответствующую их теории модуляцию содержания MULE. Экспериментальные данные были подтверждены с использованием *Usp4*-нокаут клеток мышей и ряда *in vitro* экспериментов. В противоречие описанным выше данным [Zhang, X. *et al.*, 2011] и в полном согласии с результатами новейшего исследования [Li, Z. *et al.*, 2016], в настоящей работе эффекта избыточной экспрессии USP4 или обработки киРНК против *USP4* на клеточный уровень MULE обнаружено не было (данные не показаны). Подобные расхождения в результатах могут быть связаны с существованием эффектов, зависящих от типа клеток (в нашем случае подобная вероятность была исключена при использовании клеточных линий

различного происхождения в случае модуляции клеточных уровней содержания обоих USP4 и USP7S), или эффективности нокдауна/ избыточной экспрессии USP4.

Поскольку в ответ на повреждения ДНК осуществляется ингибирование активности MULE в соответствии с ARF-зависимым регуляторным каскадом [Orlando, G. *et al.*, 2014], повышенная эффективность самоубиквитинирования данной E3-убиквитинлигазы не может быть причиной ее дестабилизации в ответ на генотоксический стресс. Это означает, что механизм кратковременного снижения клеточного уровня содержания MULE в ответ на повреждения ДНК с большой вероятностью является USP7S-зависимым.

### 4.3. Регуляция стабильности/активности USP7S S18-фосфорилированием

Для выяснения молекулярных деталей USP7S-зависимого механизма регуляции MULE требовалось понимание роли изоформы USP7S среди других форм фермента, системы контроля стационарного уровня содержания USP7S, а также функции данного фермента в ответ на повреждения ДНК. Несмотря на то, что в литературе было описано существование нескольких изоформ убиквитин-специфической протеазы USP7 (раздел “3.2.1. Специфическая изоформа USP7 (USP7S) фосфорилирована по остатку S18”), их биологическое значение оставалось неясным. В данном исследовании было впервые установлено, что USP7S составляет лишь незначительную часть (3-5 %) от общего количества белка (см. Рисунок 3.11). Несмотря на это, при использовании кнРНК против специфически *USP7S* или всех изоформ *USP7*, а также плазмидных ДНК, экспрессирующих *USP7S*, было показано, что именно изоформа USP7S обеспечивает регуляцию уровней экспрессии E3-убиквитинлигаз HDM2 и MULE, а также опосредованно контролирует стабильность p53 и POL  $\beta$  (раздел “3.2.2. USP7S является основным регулятором стабильности MULE и HDM2”). Учитывая полученные в данном исследовании экспериментальные данные, использование первооткрывателями роли USP7 в регуляции содержания E3-убиквитинлигазы HDM2 и опухолевого супрессора p53 экспрессионных векторов, кодирующих специфическую S18-содержащую изоформу USP7 (USP7S), несмотря на то, что данная форма белка не является основной с точки зрения клеточного содержания, можно назвать “научным везением” [Brooks, C.L. *et al.*, 2007; Li, M. *et al.*, 2004; Meulmeester, E. *et al.*, 2005]. С другой стороны, для нокдауна *USP7* применяли кнРНК против всех известных последовательностей мРНК, обеспечивая снижение количества всех

изоформ белка [Li, M. *et al.*, 2004]; аналогичный принцип использовали и для нокаута гена [Cummins, J.M. & Vogelstein, B., 2004].

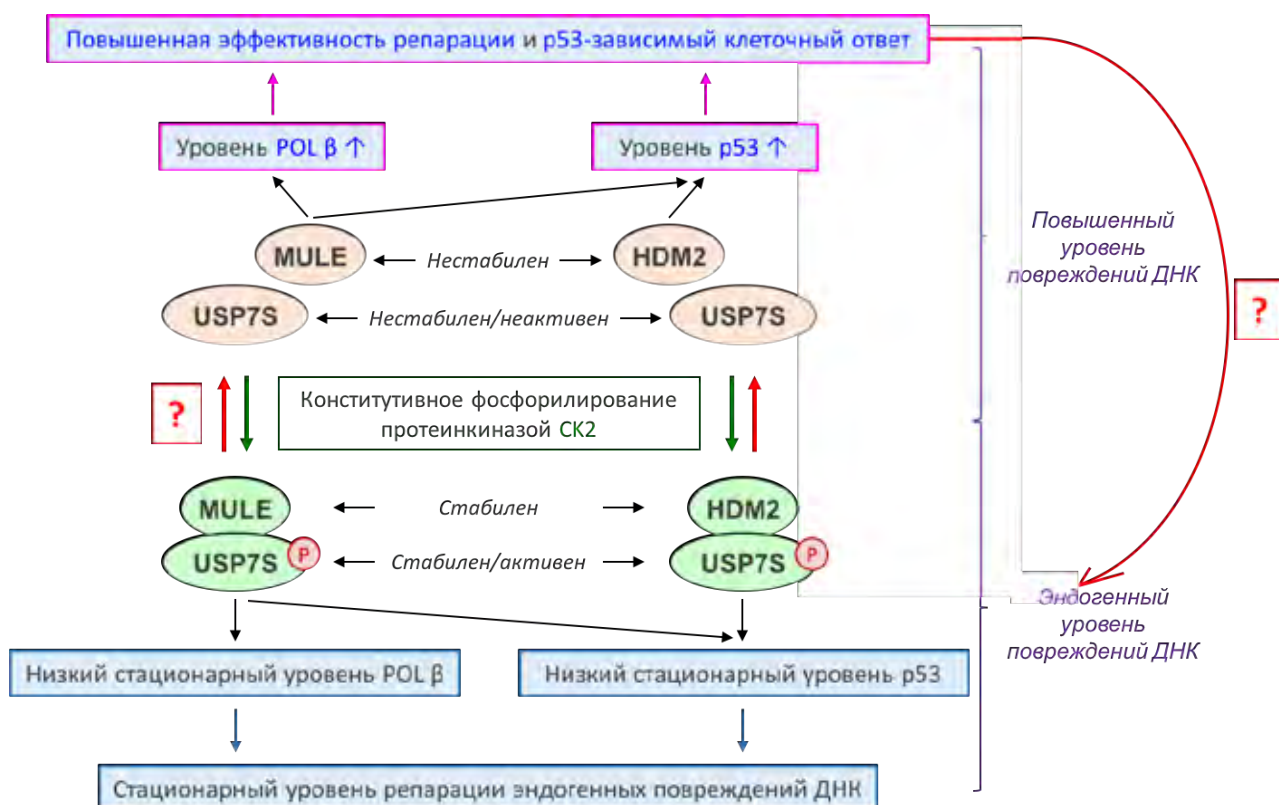
При проведении аминокислотного выравнивания последовательностей различных изоформ USP7 было найдено, что USP7S является единственной изоформой белка, содержащей высококонсервативный среди ферментов из высших животных сайт фосфорилирования по остатку серина 18. В дальнейшем было впервые показано, что значительная часть USP7S (60-80 %) фосфорилирована по серину 18 в клетках человека в эндогенных условиях (см. Рисунок 3.10). Более того, при исследовании биологического значения обсуждаемой модификации была установлена ее первостепенная роль в регуляции стабильности и активности убиквитин-специфической протеазы USP7S (раздел “3.2.3. S18-Фосфорилирование USP7S регулирует стабильность и активность белка”). Подобные данные об относительно высокой стабильности и активности USP7S в эндогенной ситуации благодаря S18-фосфорилированию находятся в полном согласии с экспериментальными результатами о невозможности дополнительной стабилизации MULE при избыточной экспрессии USP7S (см. Рисунок 3.9). Таким образом, поддерживаемый за счет эффективного деубиквитинирования S18-фосфорилированным USP7S относительно высокий стационарный уровень содержания MULE и HDM2 обеспечивает довольно низкий уровень экспрессии субстратов последних в неповрежденных клетках. Следует подчеркнуть, что в дополнение к активно обсуждаемым в рамках данного исследования POL  $\beta$  и p53 обе E3-убиквитинлигазы контролируют клеточный уровень экспрессии ряда других субстратов через убиквитин-зависимую протеасомную деградацию, в том числе вовлеченных в регуляцию различных аспектов клеточного ответа в ответ на повреждения ДНК, а также обеспечивают функционирование некоторых других субстратов независимо от их E3-убиквитинлигазной активности [Riley, M.F. & Lozano, G., 2012; Xu, Y. *et al.*, 2016].

Несмотря на то, что существование S18-фосфорилирования USP7S было установлено за несколько лет до данного исследования, никакой (даже минимальной) информации о значимости и биологической роли данной модификации в литературе представлено не было [Beausoleil, S.A. *et al.*, 2004; Fernandez-Montalvan, A. *et al.*, 2007]. С учетом рабочей гипотезы настоящей работы о существовании USP7S-зависимого механизма регуляции клеточного уровня содержания MULE (и, возможно, HDM2) в ответ на повреждения ДНК, а также

регуляции стационарных стабильности и активности USP7S через фосфорилирование по остатку S18, логичным представлялось предположение о контроле эффективности S18-фосфорилирования USP7S неизвестной протеинкиназой в соответствии с эффективным количеством повреждений ДНК. Соответственно, был применен объективный биохимический подход к выделению фосфорилирующей USP7S по остатку S18 активности из клеток человека. С использованием такого подхода, реакций *in vitro* с использованием очищенных рекомбинантных белков и ряда экспериментов *in vivo* было установлено, что S18-фосфорилирование USP7S осуществляется казеин-киназой CK2 (раздел “3.2.4. Казеин-киназа 2 фосфорилирует USP7S по остатку серина 18”).

CK2 является высококонсервативной среди различных видов (от дрожжей до человека), высокоэкспрессируемой и в ряде случаев конститутивно активной серин/треонин-специфичной протеинкиназой с чрезвычайно широким спектром субстратной специфичности, которая расположена в обеих цитоплазме и клеточном ядре [Ahmed, K. *et al.*, 2002; Meggio, F. & Pinna, L.A., 2003]. Среди многообразия субстратов CK2 описаны белки, вовлеченные в клеточный ответ на повреждения ДНК: к таковым относятся p53 [Meek, D.W. *et al.*, 1990], Mdm2 [Guerra, B. *et al.*, 1997], XRCC1 [Loizou, J.I. *et al.*, 2004; Parsons, J.L. *et al.*, 2010] и XRCC4 [Koch, C.A. *et al.*, 2004], APE1 [Fritz, G. & Kaina, B., 1999], MDC1 [Spycher, C. *et al.*, 2008] и другие. В некоторых случаях (например, для XRCC1 и PTEN) было показано, что CK2-зависимое фосфорилирование необходимо для поддержания стабильности субстратов путем предотвращения их полиубиквитинилирования и последующей протеасомной деградации [Parsons, J.L. *et al.*, 2010; Torres, J. *et al.*, 2003]. Следует отметить, что аналогичная ситуация наблюдается и в случае USP7S, поскольку нефосфорилируемая мутантная форма USP7S<sup>S18A</sup> обладает пониженной по сравнению с S18-фосфорилированным ферментом стабильностью и эффективность ее полиубиквитинилирования *in vivo* сравнительно высока (см. Рисунок 3.19 В). Соответственно, в данном исследовании было впервые показано, что изоформа USP7S, активность и стабильность которой контролируется конститутивным фосфорилированием остатка S18 казеин-киназой 2, играет важнейшую роль в HDM2- и MULE-зависимой регуляции клеточного содержания опухолевого супрессора p53, а также эффективности ЭРО и ОР-репарации через контроль стационарного клеточного уровня содержания MULE и опосредованно POL β (Рисунок 4.3).





**Рисунок 4.3.** Схема регуляции USP7S через S18-фосфорилирование и субстратов фермента в ответ на повреждения ДНК. В эндогенных условиях большая часть USP7S (до 80 %) фосфорилирована СК2, что обеспечивает стабильность и активность фермента. За счет эффективного USP7S-зависимого деубиквитинилирования наблюдается относительно высокая стабильность MULE и HDM2, которые, в свою очередь, поддерживают сравнительно низкий стационарный уровень содержания POL β и p53. Экспериментально наблюдаемая дестабилизация MULE в ответ на повреждения ДНК в соответствии с невыясненным на данном этапе механизмом обеспечивает стабилизацию POL β и p53 с соответствующим повышением эффективности ЭРО и ОР-репарации и активацией p53-зависимого клеточного ответа.

В соответствии с антиапоптотической ролью СК2 в USP7S-зависимой регуляции стабильности опухолевого супрессора p53, а также контроле стационарной эффективности репарации эндогенных повреждений через уровень содержания POL β можно предположить, что повышенная экспрессия и/или активация данной протеинкиназы может вносить частичный вклад (лишь частичный, поскольку роль СК2 в защите клеток от апоптоза путем регуляции активности ряда опухолевых супрессоров и онкогенов чрезвычайно обширна) в генетическую нестабильность клеток и их последующую неопластическую трансформацию. Действительно, повышенная активность СК2 ассоциирована с онкотрансформацией различных типов тканей и коррелирует с агрессивным поведением опухолей (обобщено в [Duncan, J.S. & Litchfield, D.W., 2008]). Повышенная экспрессия СК2 наблюдается в раке почек [Stalter, G. *et al.*, 1994], молочной железы [Filhol, O. *et al.*, 2015; Landesman-Bollag, E. *et al.*, 2001], легких [Daya-Makin,

M. *et al.*, 1994], простаты [Yenice, S. *et al.*, 1994] и опухолях головы и шеи [Faust, R.A. *et al.*, 2000]. Направленная экспрессия СК2 в ряде трансгенных мышинных моделей, включая *p53*<sup>-/-</sup> мышь, приводит к повышению онкогенной активности и прогрессии развития онкогенеза [Landesman-Bollag, E. *et al.*, 1998; Seldin, D.C. & Leder, P., 1995]. Наконец, более широкая антиапоптотическая роль данной киназы связана с тем, что за счет близости консенсусных сайтов СК2-зависимое фосфорилирование блокирует протеолитическое расщепление множества субстратов каспазами и, таким образом, может способствовать выживанию клеток в отсутствие апоптотической программы [Duncan, J.S. *et al.*, 2011; Turowec, J.P. *et al.*, 2014].

Обобщая, было установлено, что СК2-зависимое фосфорилирование остатка S18 в USP7S является конститутивным. Несмотря на то, что субстратами СК2 являются многие белки, участвующие в ответе клеток на повреждения ДНК, и их фосфорилирование данной киназой часто обеспечивает повышение эффективности репарации ДНК, в большинстве случаев подобное фосфорилирование наблюдается в неповрежденных клетках [Melander, F. *et al.*, 2008; Spycher, C. *et al.*, 2008; Torres, J. *et al.*, 2003], что, конечно, может быть результатом существования эндогенных повреждений ДНК, обеспечивающих минимальную активность киназы. Как бы то ни было, эффективность СК2-зависимого фосфорилирования в ответ на генотоксический стресс в большинстве случаев контролируется индивидуально через локализацию на сайтах повреждений ДНК (в частности, ДР), регуляторные взаимодействия с ингибиторами и активаторами фермента, экспрессию генов, а также комплексообразование с субстратом [Duan, Y. *et al.*, 2014; Herhaus, L. *et al.*, 2015; Olsen, B.V. *et al.*, 2012; Wang, D. & Jang, D.J., 2009], и текущий консенсус заключается в том, что базовая каталитическая активность данной киназы не изменяется в ответ на стресс, под действием специфических лигандов или при изменении метаболизма [Montenarh, M., 2010; Pinna, L.A., 2003]. В данном исследовании не было обнаружено изменения киназной активности СК2 по отношению к USP7S или эффективности образования комплекса СК2-USP7S в ответ на повреждения ДНК. Соответственно, наша исходная гипотеза о механизме регуляции уровня содержания MULE в зависимости от количества повреждений ДНК через контролируемое СК2 снижение S18-фосфорилирования и как следствие стабильности USP7S оказалась неверной. Именно поэтому, было высказано альтернативное предположение о положительной регуляции дефосфорилирования USP7S в ответ на повреждения ДНК.

#### 4.4. Механизм дефосфорилирования USP7S в ответ на повреждения ДНК

Прежде всего было проведено исследование изменения эффективности S18-фосфорилирования USP7S после обработки различных типов клеток человека повреждающими ДНК агентами. В подтверждение предложенной выше гипотезы было установлено, что содержание фосфорилированного USP7S по остатку S18 кратковременно снижается в ответ на повреждения ДНК во временных рамках, аналогичных наблюдаемым в случае MULE (см. Рисунки 3.20 и 3.1). Следует отметить, что подобный эффект дестабилизации USP7S был описан в более поздних работах в ответ на облучение ионизирующей радиацией [Cui, H. *et al.*, 2015; Papp, S.J. *et al.*, 2015] и отсутствовал при обработке клеток УФ-радиацией, доксорубицином и этопозидом [Papp, S.J. *et al.*, 2015; Park, J.J. *et al.*, 2015; Reddy, B.A. *et al.*, 2014], что указывает на возможную специфичность данного феномена в зависимости от типа повреждений ДНК. Другое объяснение связано с использованием авторами упомянутых выше работ антител, распознающими все изоформы USP7, в результате чего изменения в уровне экспрессии USP7S в ответ на обработку клеток повреждающими ДНК агентами будут неразличимы за счет низкого содержания функциональной изоформы. В полном соответствии с USP7S-зависимой дестабилизацией MULE в ответ на повреждения ДНК, аналогичный эффект наблюдается и в случае клеточного уровня содержания HDM2. Таким образом, снижение клеточного уровня содержания USP7S при повышении количества повреждений ДНК вызывает дестабилизацию субстратов данного белка, E3-убиквитинлигаз MULE и HDM2, обеспечиваемую их самоубиквитинилированием.

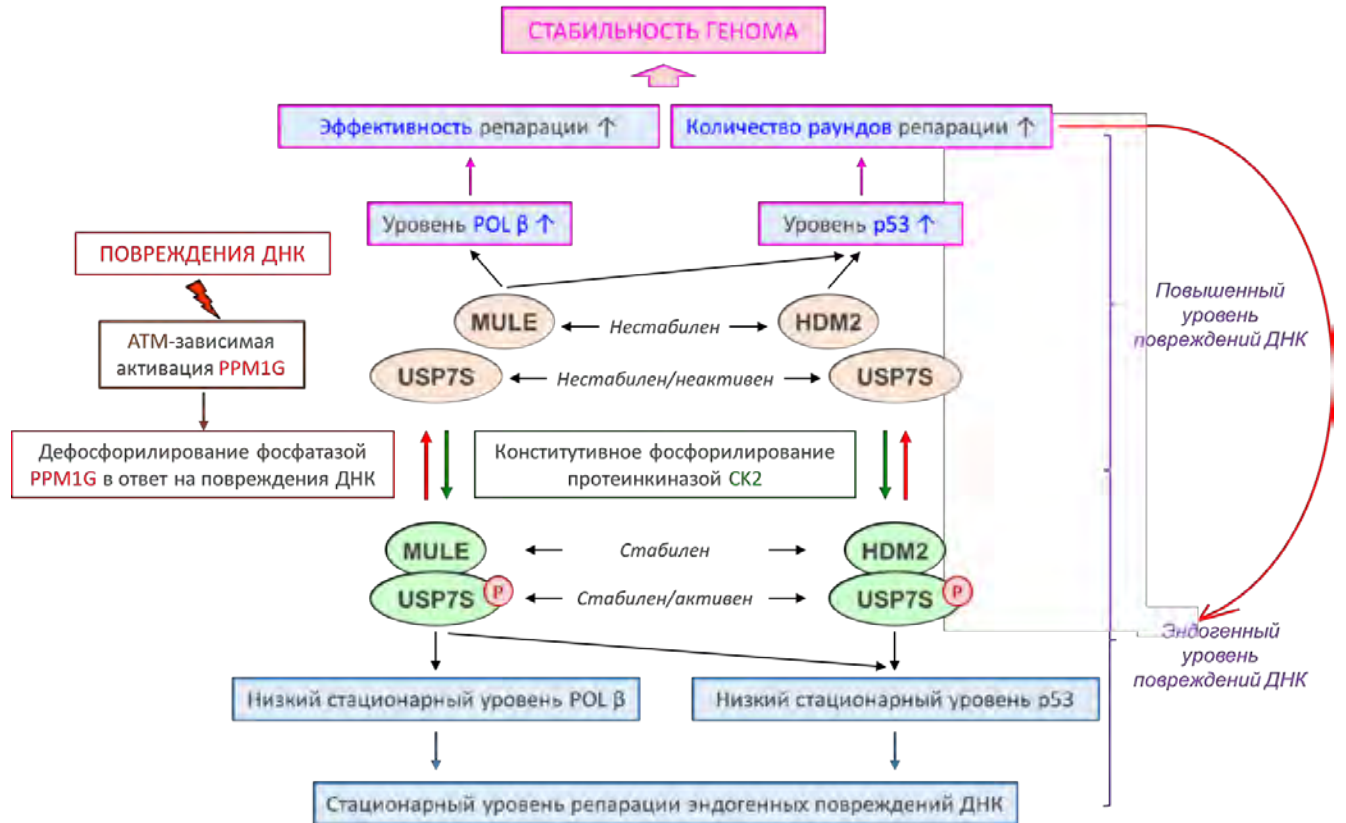
Исторически классической клеточной ролью опухолевого супрессора p53 считается координация ответа на экзогенный генотоксический стресс [Vousden, K.H. & Lane, D.P., 2007]. Тем не менее, учитывая существенную химическую нестабильность ДНК и присутствие в клетках значительного количества эндогенных мутагенов (например, АФК), роль p53 должна включать рутинный контроль качества ДНК перед, например, репликацией последней. С другой стороны, эндогенные повреждения ДНК постоянно репарируются, соответственно, для неповрежденных клеток характерен не стабильный уровень содержания p53, а его постоянные пульсовые флуктуации, отражающие баланс между образованием и репарацией повреждений ДНК [Loewer, A. *et al.*, 2010]. Смещение равновесия между вышеописанными процессами приводит к повышению уровня экспрессии p53, - подобный феномен наблюдается в

предраковых клетках, указывая на повышенное количество повреждений ДНК и/или неэффективную репарацию. Результаты данной работы указывают на то, что аналогичная ситуация наблюдается и в случае регуляции эффективности систем ЭРО и ОР-репарации, ответственных за репарацию большинства эндогенных повреждений ДНК. Действительно, в отсутствие эффективной репарации последних наблюдается последовательное “перепрограммирование” клеточного метаболизма в таковое, наблюдаемое в предраковых клетках и, судя по всему, являющееся одним из условий и причин онкотрансформации [Markkanen, E. *et al.*, 2015]. Несмотря на то, что классическая модель клеточного ответа на генотоксический стресс основана на фосфорилировании и стабилизации p53 с последующей индукцией транскрипционной активности, литературные данные последних лет указывают на первостепенную роль E3-убиквитинлигаз MULE и HDM2 в регуляции уровня экспрессии p53 в ответ на нерепарированные повреждения ДНК [de Rozières, S. *et al.*, 2000; Kon, N. *et al.*, 2012; Kruse, J.P. & Gu, W., 2009; Ringshausen, I. *et al.*, 2006; Vousden, K.H. & Lane, D.P., 2007; Vousden, K.H. & Prives, C., 2009]. С другой стороны, в соответствии с данными настоящего исследования содержание MULE и HDM2 регулируется USP7S, который предотвращает их самоубиквитинирование и последующую протеасомную деградацию. С учетом независимости статуса CK2-зависимого фосфорилирования USP7S от количества повреждений ДНК подобная регуляция стабильности USP7S может осуществляться только через дефосфорилирование по остатку S18, индуцируемое генотоксическим стрессом. Ключевым оставался вопрос о последовательности событий и вышестоящих компонентах сигнального каскада, в рамках которого осуществляется количественная передача сигнала от поврежденной ДНК к MULE и HDM2, обеспечивая регуляцию не только p53, но и POI  $\beta$ -зависимой эффективности системы ЭРО и ОР-репарации в зависимости от количества повреждений ДНК.

Фосфорилирование/дефосфорилирование целого ряда белков обеспечивает регуляцию значительного количества клеточных процессов, включая репликацию ДНК и репарацию. Например, в механизме завершения клеточного ответа на генотоксический стресс после эффективной репарации двуцепочечных разрывов ДНК основную роль играет фосфатаза PPM1D (или WIP1), обеспечивающая дефосфорилирование ATM, HDM2 и p53 с восстановлением пула немодифицированных ферментов [Lu, X. *et al.*, 2008]. Тем не менее, протеинфосфатаза, вовлеченная в активацию p53-зависимого ответа на повреждения ДНК, до

настоящей работы не была идентифицирована. С использованием биохимического выделения фосфатазной активности, ответственной за дефосфорилирование остатка S18 в USP7S, было установлено, что данное дефосфорилирование осуществляется серин/треонин-специфичной фосфатазой PPM1G (также называемой PP2C $\gamma$ ), причем данный процесс регулируется в зависимости от количества повреждений ДНК (разделы “3.2.6. Фосфатаза PPM1G дефосфорилирует остаток S18 в USP7S” и “3.2.7. Эффективность фосфорилирования USP7S и стабильность MULE в ответ на повреждения ДНК регулируются фосфатазой PPM1G”). Следует упомянуть, что, хотя взаимодействие USP7 и PPM1G было описано ранее в рамках глобального протеомного анализа белок-белковых комплексов, образуемых убиквитин-специфическими протеазами, информации о биологической значимости подобного взаимодействия в открытом доступе не было [Sowa, M.E. *et al.*, 2009]. В данном исследовании было показано, что при повышении эффективного количества повреждений ДНК наблюдается АТМ-зависимая стимуляция фосфатазной активности PPM1G с повышением эффективности дефосфорилирования USP7S по остатку S18 и последующей дестабилизацией последнего. К последствиям снижения содержания фосфорилированного USP7S относится эффективный протеасомный протеолиз HDM2 и MULE с соответствующей стабилизацией p53 и POL  $\beta$ , обеспечивающими поддержание целостности генома через активацию клеточного ответа на повреждения ДНК и повышение эффективности систем ЭРО и ОР-репарации (Рисунок 4.4).

Полученные экспериментальные данные находятся в полном согласии с литературными наблюдениями о повышенной чувствительности PPM1G-дефицитных куриных клеток DT-40 к обработке ионизирующей радиацией в присутствии кофеина, ингибитора активности PIKK-киназ АТМ и АТР [Kimura, H. *et al.*, 2006]. Более того, одновременно с нашим открытием появились данные о колокализации PPM1G и  $\gamma$ H2AX на сайте повреждений ДНК, индуцированных лазерной микрорадиацией, и аминокислотный остаток S183 был биохимически идентифицирован в качестве сайта АТМ-зависимого фосфорилирования PPM1G [Beli, P. *et al.*, 2012]. Несколько позже было дополнительно установлено, что АТМ-зависимое S183-фосфорилирование PPM1G в ответ на повреждения ДНК необходимо для активации транскрипции ряда NF- $\kappa$ B-зависимых генов с секрецией воспалительных цитокинов [Gudipaty, S.A. *et al.*, 2015].



**Рисунок 4.4.** Схема АТМ- и PPM1G-зависимой регуляции POL β и p53 в ответ на повреждения ДНК. В неповрежденных клетках конститутивное фосфорилирование остатка S18 в USP7S киназой СК2 необходимо для поддержания стабильности и активности фермента. Соответственно, стационарный белковый уровень содержания MULE и HDM2, являющихся субстратами USP7S, относительно высок, а таковой в случае POL β и p53 сравнительно низок. В ответ на повреждения ДНК происходит АТМ-зависимая активация PPM1G фосфорилированием с последующим дефосфорилированием и дестабилизацией/снижением активности USP7S и дестабилизацией MULE и HDM2. Результатом является более эффективная репарация поврежденных оснований ДНК и ОР за счет повышенного количества POL β и активация p53-зависимого клеточного ответа. Регуляторная петля замыкается по факту репарации избытка повреждений ДНК.

Таким образом, нами был открыт регулируемый киназой АТМ сигнальный каскад, включающий фосфатазу PPM1G, специфическую S18-содержащую изоформу убиквитин-специфической протеазы USP7S, E3-убиквитинлигазы MULE и HDM2, p53 и POL β, призванный обеспечивать передачу информации о существовании нерепарированных повреждений ДНК от сенсора последних к системам координированного клеточного ответа, важной частью которых данный каскад и является (Рисунок 4.4). Следует отметить, что АТМ играет роль эффектора в обсуждаемом сигнальном каскаде, тогда как возможные сенсоры повреждений ДНК обсуждаются в следующем разделе. По нашим предположениям, величина сигнала, условно выражаемая клеточным уровнем содержания p53 и эффективностью ЭРО и

ОР-репарации, обеспечивает высокоточную и координированную регуляцию клеточного цикла, в частности, времени перехода из фазы  $G_1$  в  $S$  (немедленный переход в отсутствие повреждений ДНК или задержка клеточного цикла на время, необходимое для репарации или инициации апоптоза в случае нерепарируемого количества повреждений ДНК) и собственно процесса репарации ДНК путем модуляции ядерного содержания  $POI\ \beta$ . В соответствии с предложенной схемой (Рисунок 4.4), клетки в отсутствие  $PPM1G$  в начальный момент времени отражают поведение  $p53$ -дефицитных клеток, поскольку сигнальный каскад в подобном случае оказывается нефункциональным, результатом чего является переход  $G_1$ - $S$  без задержки для репарации и накопление повреждений ДНК. Тем не менее даже в  $PPM1G$ -дефицитных клетках существует ряд запасных механизмов поддержания целостности генома, один из которых приводит к  $p53$ -независимому, но зависимому от количества повреждений ДНК, накоплению ингибитора циклинзависимых киназ  $p21/WAF1$ , который обеспечивает задержку репликации и накопление клеток в фазе  $G_1$  [Aliouat-Denis, C.M. *et al.*, 2005]. Действительно, было показано, что репликация ДНК в отсутствие координированной системы клеточного ответа на повреждения ДНК в нормальных  $PPM1G$ -дефицитных клетках приводит к накоплению разрывов ДНК, индукции  $p21$  и  $p53$ -независимой задержке клеточного цикла в фазе  $G_1$  (Рисунок 3.33). Следует подчеркнуть, что описанные выше механизмы обеспечения целостности генома нехарактерны для раковых клеток, в которых в отсутствие  $PPM1G$  на фоне практически нефункционального за счет низкого содержания или мутантного  $p53$  наблюдается повышенная скорость пролиферации, несмотря на присутствие нерепарированных повреждений ДНК [Suh, E.J. *et al.*, 2006; Sun, C. *et al.*, 2016].

О важной роли  $PPM1G$  в поддержании целостности генома в ответ на изменения эффективной клеточной нагрузки по повреждениям ДНК говорят данные о повышенной чувствительности мышечных эмбриональных фибробластов  $Ppm1g^{-/-}$  к окислительному стрессу [Foster, W.H. *et al.*, 2013]. Следует также отметить, что нокаут  $Ppm1g$  у мышей приводит к гибели эмбрионов из-за повышенной эффективности апоптоза, который в основном наблюдается в тканях мозга [Foster, W.H. *et al.*, 2013]. Несмотря на то, что формального объяснения данного факта в настоящий момент не предложено, это предположительно связано с низким пороговым количеством индуцирующих апоптоз нерепарированных повреждений ДНК в процессе раннего развития [Gatz, S.A. *et al.*, 2011]. Логично предположить, что

нарушения координации репарации ОР и повреждения оснований ДНК в отсутствие PPM1G будут особенно пагубны в клетках развивающегося мозга, обладающих высоким уровнем транскрипционной и пролиферативной активности. Наконец, было показано, что фосфатаза PPM1G положительно контролирует уровень экспрессии принадлежащего к семейству p53 опухолевого супрессора p73 и является отрицательным регулятором функционально противостоящей ему изоформы  $\Delta Np73$  [Chaudhary, N. & Maddika, S., 2014]. Таким образом, учитывая результаты настоящего исследования о роли PPM1G в регуляции p53-зависимого ответа и эффективности систем ЭРО и ОР-репарации в ответ на повреждения ДНК и на текущий момент ограниченные литературные данные о других клеточных функциях данной фосфатазы [Chaudhary, N. & Maddika, S., 2014], можно рассуждать о важности PPM1G в качестве опухолевого супрессора.

#### **4.5. Одноцепочечные разрывы ДНК стимулируют активность АТМ**

Химическая нестабильность ДНК и постоянное образование эндогенных повреждений ДНК требуют эффективной репарации последних во избежание нестабильности генома [Lindahl, T., 1993]. ЭРО является первостепенной системой репарации эндогенных повреждений ДНК, которые в большей степени включают повреждения оснований ДНК и ОР, также возникающие и под действием ряда экзогенных факторов, причем нокаут любого из основных генов ЭРО в мышах приводит к гибели эмбрионов [Dianov, G.L. & Hubscher, U., 2013]. Отражая важность эффективной репарации упомянутых выше повреждений ДНК в рамках данного исследования был открыт многоступенчатый АТМ-зависимый сигнальный каскад контроля эффективности ЭРО и ОР-репарации. Одним из первоначальных событий подобного каскада является индукция киназной активности АТМ с последующим фосфорилированием фосфатазы PPM1G и последующей передачи сигнала к системам ЭРО и ОР-репарации и p53 (Рисунок 4.4). Соответственно, возник вопрос о модуляции активности АТМ в ответ на повреждения оснований ДНК и ОР.

В рамках данного исследования было установлено, что активация АТМ и последующая инициация АТМ-зависимого сигнального каскада происходит в ответ на нерепарированные ОР, тогда как непосредственно повреждения оснований ДНК на уровень киназной активности фермента не влияют (раздел “3.3.1. Дефекты репарации одноцепочечных разрывов ДНК

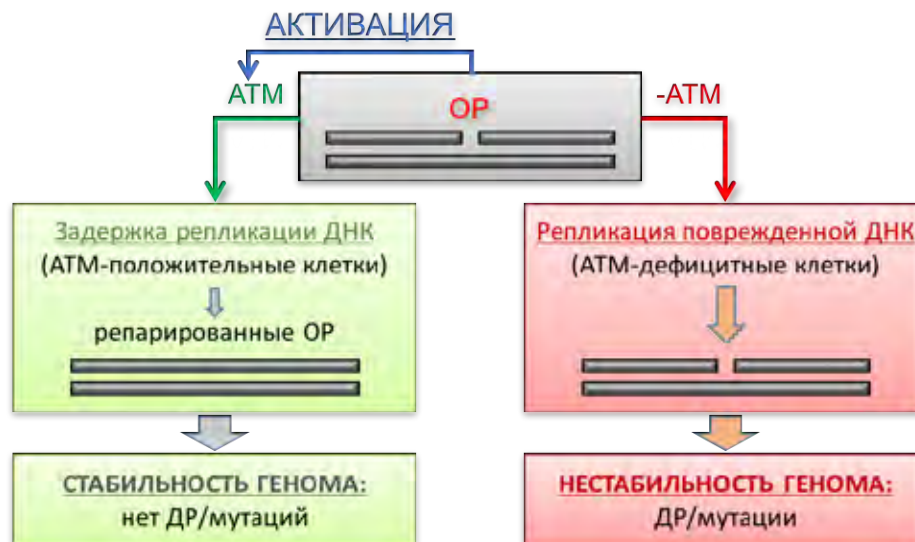


индуцируют активность АТМ”). Важная роль АТМ в сигнальном каскаде, контролирующем p53- и *GADD45*-зависимую задержку клеточного цикла в фазе G<sub>1</sub> в ответ на облучение мышинных фибробластов ИР, была описана ранее [Kastan, M.V. *et al.*, 1992]. Более того, было показано, что в ответ на облучение ионизирующей радиацией наблюдается активация АТМ, и предложено, что индуктором необходимого для активации самофосфорилирования АТМ по остатку S1981 являются индуцируемые радиацией ДР [Bakkenist, C.J. & Kastan, M.V., 2003]. В настоящей работе для повышения клеточной нагрузки по нерепарированным повреждениям оснований ДНК и ОР были использованы алкилирующий основания ДНК метилметансульфонат, а также кратковременное кРНК-зависимое снижение экспрессии *XRCC1*, в результате которого происходило накопление эндогенных ОР в отсутствие лигирования ДНК. Важно то, что в случае обоих типов обработки клеток прямого образования ДР не происходит, хотя невозможно исключить возникновение незначительного количества ДР в результате репликации ОР-содержащей ДНК. В нашем случае чрезвычайно важным был вопрос о присутствии в клетках ДР, которые могут инициировать активацию АТМ в соответствии с описанным ранее механизмом [Bakkenist, C.J. & Kastan, M.V., 2003]. С использованием метода ДНК-комет и анализа активации АТМ и присутствия маркеров ДР в ОР-содержащих нереплицирующихся культурах клеток первичных нормальных фибробластов методами иммуноблотинга на уровне популяции клеток и иммунофлуоресценции на уровне индивидуальных клеток было установлено, что нерепарированные ОР стимулируют активацию АТМ в отсутствие ДР (раздел “3.3.2. Активация АТМ в ответ на накопление нерепарированных ОР не связана с образованием репликационных ДР”). Следует отметить, что в дополнение к ДР ионизирующая радиация индуцирует образование значительных количеств ОР и повреждений оснований ДНК [Roots, R. *et al.*, 1985]. Таким образом, открытая в данной работе ОР-зависимая активация АТМ может вносить свой вклад в активацию киназы в ответ на облучение ИР, хотя вопрос о количественности подобного вклада остается открытым.

Количество эндогенных ДР (10-20/клетка/день) несущественно по сравнению с числом эндогенных ОР (15,000-20,000/день), возникающих благодаря нестабильности ДНК [Lindahl, T., 1993], а также в качестве интермедиатов в процессе ЭРО [Dianov, G. *et al.*, 1992]. Именно поэтому в настоящем исследовании было высказано предположение о роли ОР-зависимой активации АТМ в поддержании целостности генома путем координации времени и

эффективности репарации ОР с целью предотвращения образования репликационных ДР. Если подобное предположение верно, АТМ-положительные клетки должны быть способны инициировать задержку перехода клеточного цикла из фазы  $G_1$  в  $S$  в присутствии нерепарированных ОР, таким образом, обеспечивая дополнительное время для репарации ОР перед репликацией ДНК. С другой стороны, в неспособных к сигнализации нерепарированных ОР АТМ-дефицитных клетках должно наблюдаться образование ДР в результате репликации ОР-содержащей ДНК.

В настоящем исследовании было установлено, что активация АТМ в ответ на нерепарированные ОР приводит к р53-зависимой задержке перехода клеточного цикла в фазу  $S$ , необходимой для контролируемой репарации ОР перед репликацией ДНК, таким образом предотвращая образование высокомуtagenных ДР (раздел “3.3.3. ОР-зависимая активация АТМ замедляет вход в  $S$ -фазу клеточного цикла”). Подтверждая центральную роль АТМ в предотвращении образования мутагенных ДР, было показано, что в отсутствие АТМ клетки неспособны к координации своевременной сигнализации и репарации ОР, что приводит к неконтролируемой репликации поврежденной ДНК и соответствующему накоплению репликационных ДР (раздел “3.3.4. АТМ-зависимая сигнализация нерепарированных ОР в фазе  $G_0/G_1$  предотвращает образование высокомуtagenных репликационных ДР” и Рисунок 4.5).



**Рисунок 4.5.** Схема АТМ-зависимой координации репарации ОР и прогрессии клеточного цикла. В АТМ-положительных клетках активация АТМ в ответ на нерепарированные ОР обеспечивает задержку входа клеток с поврежденной ДНК в фазу  $S$  клеточного цикла, обеспечивая дополнительное время для репарации ОР перед репликацией ДНК. Таким образом, предотвращается образование ДР и закрепление мутаций, то есть поддерживается целостность генома. АТМ-дефицитные клетки неспособны к детекции нерепарированных ОР, и репликация поврежденной ДНК приводит к образованию ДР и повышенной частоте мутагенеза.

Важным моментом является то, что ОР-зависимая активация АТМ наблюдается в MRE11-дефицитных клетках, тогда как активная форма киназы является мономером, что указывает на независимость индукции активности АТМ в ответ на нерепарированные ОР от компонентов MRN-комплекса (классическая модель ДР-зависимой активации АТМ, [Bakkenist, C.J. & Kastan, M.B., 2003]) и окисления дисульфидной/ых связи/ей (модель активации АТМ в условиях окислительного стресса, [Guo, Z. *et al.*, 2010b]), соответственно, и существование альтернативного механизма (см. Рисунки 3.48 и 3.49). В настоящем исследовании были также проведены предварительные эксперименты, указывающие на вовлеченность PARP1, который является классическим сенсором ОР [Shieh, W.M. *et al.*, 1998], и специфически PARP1-зависимого синтеза поли(ADP-рибозы) в активацию АТМ нерепарированными ОР (см. Рисунок 3.50). Хотя более детальных механистических исследований взаимосвязи PARP1-зависимой детекции нерепарированных ОР и последующей активации АТМ в настоящем исследовании не проводилось, в литературе существуют данные о взаимодействии PARP1 и АТМ [Haince, J.F. *et al.*, 2007]. Более того, было показано, что в присутствии полимера PAR наблюдается повышенная эффективность АТМ-зависимого фосфорилирования p53 *in vitro* [Goodarzi, A.A. & Lees-Miller, S.P., 2004]. Следует, впрочем, отметить, что, хотя данные последнего исследования и указывают на предположительную PAR-зависимую активацию АТМ, возможность того, что PARилированный p53 [Mendoza-Alvarez, H. & Alvarez-Gonzalez, R., 2001] является лучшим субстратом АТМ, не была исключена. В совокупности описанные экспериментальные данные указывают на возможность прямой активации АТМ на сайте нерепарированных ОР в зависимости от активности PARP1. Альтернативным механизмом, заслуживающим упоминания, является истощение пула клеточного  $NAD^+$ , являющегося субстратом в реакции PARP1-зависимого синтеза PAR в ответ на нерепарированные ОР [Nakamura, J. *et al.*, 2003]. Результатом снижения клеточного  $NAD^+$  является пониженная активность  $NAD^+$ -зависимой деацетилазы SIRT1 [El Ramy, R. *et al.*, 2009], что приводит к активации гистон-ацетилтрансферазы TIP60/KAT5 [Wang, J. & Chen, J., 2010], которая, в свою очередь, является известным регулятором активности АТМ в ответ на повреждения ДНК [Sun, Y. *et al.*, 2005].

Открытая в рамках настоящего исследования роль АТМ в координации репарации ОР проливает свет на ранее необъясненное явление чувствительности А-Т клеток к агентам, вызывающим повреждения оснований ДНК и ОР [Hoar, D.I. & Sargent, P., 1976; Yi, M. *et al.*,

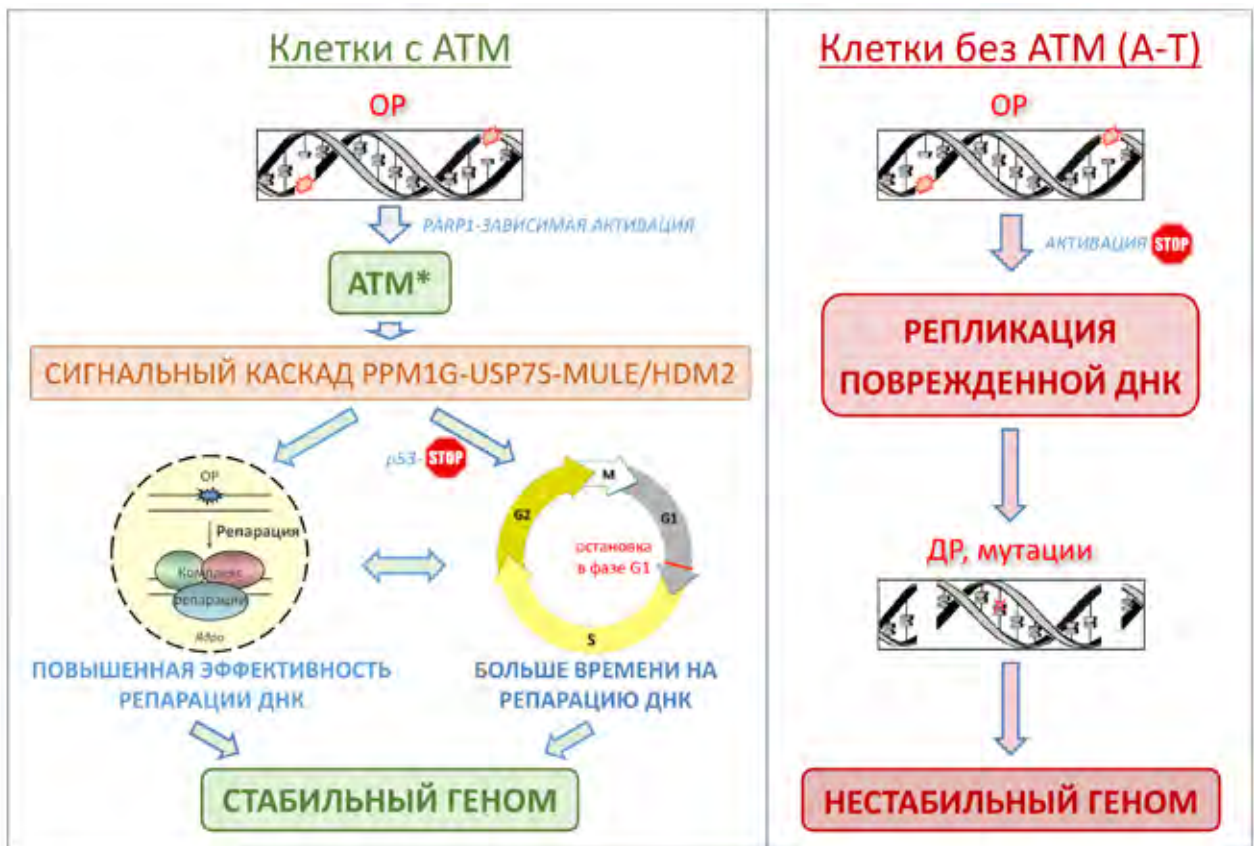
1990]. С учетом важной роли АТМ в поддержании целостности генома через координацию репарации ОР возникает, впрочем, вопрос о том, почему раковые заболевания не являются основной причиной смертности у пациентов с А-Т [Chessa, L. *et al.*, 2016]. В качестве возможного объяснения следует вспомнить о чрезвычайно высокой эффективности ОР-репарации клеток человека. В нормальных клетках лишь незначительное число ОР остается нерепарированным перед репликацией ДНК; подобные нерепарированные ОР детектируются и их наличие сигнализируется описанным в настоящем исследовании АТМ-зависимым сигнальным каскадом, обеспечивающим задержку репликации ДНК и репарацию ОР. В случае АТМ-дефицитных клеток детекции и сигнализации нерепарированных ОР не происходит, что приводит к репликации ОР-содержащей ДНК и постепенному образованию потенциально мутагенных ДР. Повышение эффективного количества подобных пострепликационных ДР может смещать равновесие между их репарацией процессами НГСК и ГР. Репарация ДР путем негомологичного соединения концов повышает вероятность мутагенного исхода с возникновением хромосомных/хроматидных делеций или геномных перестроек, которые препятствуют нормальной экспрессии генов и, в конце концов, вносят свой вклад в фенотип генетической нестабильности, характерный для А-Т. В поддержку подобного объяснения следует привести данные о частом образовании локализованных опухолей у долгоживущих пациентов с А-Т [Chessa, L. *et al.*, 2016].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Частота возникновения эндогенных повреждений ДНК за счет спонтанной химической нестабильности данной биомолекулы и действия внутриклеточных метаболитов составляет десятки и даже сотни тысяч повреждений в сутки на геном. Дополнительная нагрузка создается экзогенными факторами окружающей среды. Наибольшая часть таких повреждений ДНК должна своевременно и аккуратно репарироваться для предотвращения возникновения и закрепления нежелательных мутаций и поддержания целостности генома. Учитывая динамическую природу образования повреждений ДНК и значительную амплитуду колебаний их эффективного содержания в клетке, в случае большинства типов повреждений ДНК идентифицированы сложные системы клеточного ответа на их возникновение, целью которых является предотвращение нежелательных последствий их образования через координированную и эффективную репарацию ДНК. Несмотря на то, что повреждения оснований и одноцепочечные разрывы ДНК являются одними из наиболее часто возникающих повреждений ДНК, мутагенность которых значительна, до настоящего исследования системы клеточного ответа на их образование описано не было. Именно поэтому высокочисленным достижением настоящего исследования было выявление механизма клеточного ответа на нерепарированные одноцепочечные разрывы ДНК, включая принципы их детекции белком-сенсором, молекулярные пути передачи сигнала от сенсора поврежденной ДНК к белку-трансдюсеру клеточного ответа и идентификацию важных в рамках данного сигнального каскада субстратов последнего, и, наконец, нижестоящие каскады передачи сигнала к белкам-эффекторам клеточного ответа на повреждения ДНК и механизмы контролируемой ими своевременной и эффективной репарации данного типа повреждений.

Было установлено, что в ответ на образование нерепарированных одноцепочечных разрывов ДНК, накапливающихся в качестве интермедиатов при репарации повреждений оснований ДНК системой эксцизионной репарации оснований и в отсутствие лигирования ДНК либо при их непрямой индукции обработкой клеток повреждающими основания ДНК агентами, наблюдается PARP1-зависимая активация киназы ATM через ее самофосфорилирование по остатку S1981. Активная ATM фосфорилирует фосфатазу PPM1G с последующей индукцией активности фермента. PPM1G дефосфорилирует иначе конститутивно фосфорилированный

казеин-киназой 2 остаток S18 специфической изоформы убиквитин-специфической протеазы USP7S, что приводит к дестабилизации и снижению активности последней. В отсутствие стабильного/активного USP7S наблюдается повышенное самоубиквитинирование и протеасомная деградация субстратов фермента, к которым относятся E3-убиквитинлигазы MULE и HDM2. Результатом дестабилизации MULE и HDM2 является стабилизация опухолевого супрессора p53, который является субстратом обеих E3-убиквитинлигаз и обеспечивает задержку перехода клеток в фазу S, таким образом предотвращая репликацию ДНК с нерепарированными одноцепочечными разрывами. Субстратом MULE также является ДНК-полимераза  $\beta$ , стабилизация и комплексообразование которой с ДНК-лигазой III $\alpha$  и XRCC1 в ситуации пониженной стабильности MULE обеспечивает эффективную репарацию одноцепочечных разрывов ДНК (Рисунок 4.6, левая панель).



**Рисунок 4.6.** Схема клеточного ответа на нерепарированные одноцепочечные разрывы ДНК. В нормальных (ATM-положительных) клетках PARP1- и ATM-зависимый многоступенчатый сигнальный каскад обеспечивает координацию эффективной репарации одноцепочечных разрывов ДНК с p53-зависимым контролем длины фазы G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> клеточного цикла, в течение которого и происходит данная репарация ДНК (левая панель). В отсутствие подобного сигнального каскада, например, в ATM-дефицитных клетках пациентов с заболеванием атаксия телеангиэктазия наблюдается неконтролируемая репликация ДНК, содержащей одноцепочечные разрывы, образование двуцепочечных разрывов ДНК и нестабильность генома (правая панель).

В отсутствие функциональной ATM (а также PARP1 и PPM1G), например, в клетках пациентов с заболеванием атаксия телеангиэктазия описанной выше сигнализации нерепарированных одноцепочечных разрывов ДНК не происходит. В результате наблюдается неконтролируемая репликация поврежденной ДНК с образованием высокомуtagenных пострепликационных двуцепочечных разрывов ДНК и повышенной частотой мутагенеза, вносящего свой вклад в характерный для данного заболевания фенотип нестабильности генома, являющийся первым вестником предрасположенности к раковым и другим патологическим состояниям (Рисунок 4.6, правая панель).

Открытый в рамках настоящей работы многоступенчатый сигнальный каскад, регулируемый рядом посттрансляционных модификаций, и связывающий PARP1, ATM, PPM1G, USP7S, MULE и HDM2, p53 и ДНК-полимеразу  $\beta$ , представляет собой первый пример системы клеточного ответа на одноцепочечные разрывы ДНК. Подобный сигнальный механизм детекции нерепарированных одноцепочечных разрывов ДНК, сигнализации об их присутствии различным эффекторам клеточного ответа и обеспечении их эффективной репарации является неотъемлемым свойством нормальных (здоровых) клеток человека и играет первостепенную роль в поддержании целостности генома путем своевременной и координированной репарации одноцепочечных разрывов ДНК и предотвращения образования высокомуtagenных двуцепочечных разрывов ДНК.

## ВЫВОДЫ

Настоящая работа представляет собой законченное систематическое научное исследование, в рамках которого впервые описана система клеточного ответа на одноцепочечные разрывы ДНК, регулируемая многоступенчатым каскадом посттрансляционных модификаций.

1. Показано, что ответом на повышение количества одноцепочечных разрывов ДНК является кратковременное снижение стабильности E3-убиквитинлигазы MULE. Установлена биохимическая значимость подобного явления, связанная с обеспечением повышенной стабильности субстратов данного фермента, среди которых находятся ДНК-полимераза  $\beta$ , а также супрессор опухолевого роста p53.
2. Выявлен механизм регуляции стационарного уровня содержания MULE через поддержание баланса процессов самоубиквитинилирования и деубиквитинилирования специфической S18-содержащей изоформой USP7S убиквитин-специфической протеазы USP7. Показано, что пониженная стабильность MULE в ответ на одноцепочечные разрывы ДНК связана с кратковременным снижением уровня экспрессии USP7S.
3. Установлено, что USP7S является основным регулятором стабильности E3-убиквитинлигазы HDM2 и, опосредованно, p53, несмотря на относительно низкое содержание USP7S среди других изоформ фермента (3-5 %). Показано, что в неповрежденных клетках большая часть USP7S (60-80 %) фосфорилирована по остатку серина 18, и данная посттрансляционная модификация обеспечивает стабильность и активность фермента.
4. Проведена биохимическая идентификация киназы и фосфатазы, в совокупности ответственных за поддержание клеточного статуса фосфорилирования USP7S по остатку серина 18. Показано, что фосфорилирование осуществляется конститутивно активной казеин-киназой 2, тогда как за дефосфорилирование S18 в USP7S ответственна фосфатаза PPM1G.
5. Продемонстрирована активация фосфатазы PPM1G в ответ на одноцепочечные разрывы ДНК, которая индуцируется фосфорилированием киназой ATM. Установлено, что снижение



стабильности USP7S, а также субстратов фермента MULE и HDM2 в ответ на повреждения ДНК, является ATM- и PPM1G-зависимым процессом.

6. Открыто явление активации ATM в ответ на нерепарированные одноцепочечные разрывы ДНК эндогенной и экзогенной природы. Доказано, что подобная неканоническая активация ATM происходит в отсутствие двуцепочечных разрывов ДНК и не зависит от присутствия компонентов MRN-комплекса или окисления аминокислотных остатков цистеина с образованием дисульфидных связей. В качестве сенсора нерепарированных одноцепочечных разрывов ДНК в контексте активации ATM предложена поли(ADP-рибозо)полимераза PARP1, и продемонстрирована важность PARP1-зависимого синтеза поли(ADP-рибозы) в данном процессе.
7. Показано, что результатом активации ATM в ответ на нерепарированные одноцепочечные разрывы ДНК является p53-зависимая задержка входа клеток с поврежденной ДНК в фазу S клеточного цикла, обеспечивающая дополнительное время для репарации ДНК перед ее репликацией. Параллельно наблюдается ATM-зависимое повышение эффективности системы эксцизионной репарации оснований и одноцепочечных разрывов ДНК за счет стабилизации ДНК-полимеразы  $\beta$  в условиях пониженной стабильности MULE. Результатом подобной координации процессов репарации ДНК и прогрессии клеточного цикла является своевременная репарация одноцепочечных разрывов ДНК и предотвращение образования репликационных двуцепочечных разрывов ДНК, являющихся одним из важных источников нестабильности генома в ATM-дефицитных клетках пациентов с заболеванием атаксия телеангиэктазия. Таким образом, раскрыта ключевая роль киназы ATM в координации своевременной и эффективной репарации одноцепочечных разрывов ДНК в соответствии с многоступенчатым сигнальным каскадом:

PARP1—ATM—PPM1G—USP7S—MULE и HDM2—p53 и ДНК-полимераза  $\beta$ .

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AB1	афлатоксин В1
A-НГСК	негомологичное соединение концов
АП-сайт	апуринный/апиримидиновый сайт
АМФ	аденозинмонофосфат
АТФ	аденозинтрифосфат
АФК	активные формы кислорода
БСА	бычий сывороточный альбумин
ВНС	внутринитевые сшивки ДНК
ВЭЖХ-МС/МС	тандемная жидкостная хромато-масс-спектрометрия
ГР	гомологичная рекомбинация
ДБС	ДНК-белковые сшивки
ДМСО	диметилсульфоксид
ДНК-РК <sub>cs</sub>	каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы
ДР	двунитевые разрывы ДНК
ДРР	репарация двухцепочечных разрывов
ДТТ	дитиотреитол
ИПТГ	изопропил-β-D-тиогалактозид
ИР	ионизирующая радиация
ИФ	иммунофлуоресценция
киРНК	короткие интерферирующие РНК
метод ДНК-комет	гель-электрофорез единичных клеток
ММС	метилметансульфонат
МНС	межнитевые сшивки ДНК
НГСК	негомологичное соединение концов
ООК	объем осажденных клеток
ОР	однонитевые разрывы ДНК
ОЦО	одноцепочечный отжиг по прямым повторам
ПААГ	полиакриламидный гель
ПАУ	полициклические ароматические углеводороды
ПЦР	полимеразная цепная реакция
СЗОЦ	синтез-зависимого отжиг цепей
т.п.н.	тысяч пар оснований
Трис	трис(гидроксиметил)аминометан

УФ	ультрафиолет
ФМСФ	фенилметилсульфонилфторид
ФСБ	фосфатно-солевой буфер
ХЕПЕС	натриевая соль 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин этансульфоновой кислоты
ЭГТА	этиленгликоль бис(β-аминоэтильный эфир)-N,N,N",N"-тетрауксусной кислоты
ЭДТА	динатриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты
8-oxo-dG	7,8-дигидро-8-оксогуанин
18S-РНК	18S рибосомальная РНК
A <sub>260</sub>	оптическое поглощение на длине волны 260 нм
A-T	атаксия телеангиэктазия (мутации в <i>ATM</i> )
ATLD	заболевание, похожее на атаксию телеангиэктазию (мутации в <i>MRE11</i> )
APЕ1	АПЭндоуклеаза 1
APLF	апратаксин- и РНКР-подобный фактор
APTX	апратаксин
ATM	протеинкиназа Ataxia Telangiectasia mutated
ATR	ATM- и Rad3-родственная киназа
BRCA2	белковый продукт гена рака молочной железы 2
BrdU	5-бром-2'-дезоксинуридин
СК2	казеин-киназа 2
Ct	значение порогового цикла
DAPI	4,6-диамино-2-фенилиндол дигидрохлорид
dG, dC, dA, dT	2'-дезоксигуанозин, -цитозин, -аденозин и -тимидин, соответственно
dR	2'-дезоксирибоза
dRP	2'-дезоксирибо-фосфатная группа
E1	убиквитин-активирующий фермент
E2	убиквитин-конъюгирующий фермент
E3	E3-убиквитинлигаза или убиквитин-лигирующий фермент
EdU	5-этинил-2'-дезоксинуридин
FACS	сортировка клеток с активированной флуоресценцией
FBS	бычья эмбриональная сыворотка
FSC	прямое светорассеяние
FEN 1	флэп-эндонуклеаза 1
GAPDH	глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа
γH2AX	гистон H2AX, фосфорилированный по аминокислотному остатку S139

LIG I	ДНК-лигаза I
LIG III $\alpha$	ДНК-лигаза III $\alpha$
LIG IV	ДНК-лигаза IV
MPG	N-метилпурин-ДНК-гликозилаза
MRN-комплекс	комплекс MRE11-RAD50-NBS1
PAR	поли(ADP-рибоза)
PARG	поли(ADP-рибозо)гликогидролаза
PARP1	поли(ADP-рибозо)полимераза 1
PAXX	паралог XRCC4 и XLF
PCNA	ядерный антиген пролиферирующих клеток
PIKK	фосфатидилинозитол-3-киназа
PNKP	полинуклеотидкиназа/3'-фосфатаза
POL $\beta$	ДНК-полимераза $\beta$
POL $\lambda$	ДНК-полимераза $\lambda$
POL $\theta$	ДНК-полимеразой $\theta$
RFC	репликативный белок C
RPA	репликационный белок A
SAM	S-аденозилметионин
SDS	додецилсульфат натрия
SSC	угловое светорассеяние
TARG1/C6orf130	терминальная (ADP-рибозо)гликогидролаза
TDP1	тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1
TOP1	ДНК-топоизомераза I
TOP1cc	промежуточный ДНК-Top1 комплекс
Ub	убиквитин
UNG	урацил-ДНК-N-гликозилаза
USP	убиквитин-специфическая протеаза
USP7S	белковая изоформа USP7, содержащая остаток серина 18
WRN	хеликаза RecQ5-семейства Werner
XLF	XRCC4-подобный фактор

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бугреев, Д.В. Структура и механизм действия ДНК-топоизомераз IA-типа / Д.В. Бугреев, Г.А. Невинский // *Успехи Биологической Химии*. – 2009. – V. 49. – P. 129-158.
2. Грин, И.Р. Эукариотические гомологи эндонуклеазы VIII: новые элементы системы эксцизионной репарации оснований ДНК / И.Р. Грин, Д.О. Жарков // *Биохимия*. – 2011. – V. 76. – № 1. – P. 99-114.
3. Дырхеева, Н.С. Взаимодействие APE1 и других репарационных белков с ДНК-дуплексами, имитирующими интермедиаты репарации и репликации ДНК / Н.С. Дырхеева, С.Н. Ходырева, О.И. Лаврик // *Биохимия*. – 2008. – V. 73. – № 3. – P. 322-335.
4. Лебедева, Н.А. Репарация апуриновых/апиримидиновых сайтов в одноцепочечных участках ДНК, инициируемая тирозил-ДНК-фосфодиестеразой 1 / Н.А. Лебедева, Н.И. Речкунова, О.И. Лаврик // *Доклады АН*. – 2014. – V. 455. – № 4. – P. 474-477.
5. Abercrombie, M. Contact inhibition in tissue culture / M. Abercrombie // *In Vitro*. – 1970. – V. 6. – № 2. – P. 128-142.
6. Adamson, A.W. ATM is activated in response to N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine-induced DNA alkylation / A.W. Adamson, W.J. Kim, S. Shangary, R. Baskaran, K.D. Brown // *J Biol Chem*. – 2002. – V. 277. – № 41. – P. 38222-38229.
7. Adhikary, S. The ubiquitin ligase HectH9 regulates transcriptional activation by Myc and is essential for tumor cell proliferation / S. Adhikary, F. Marinoni, A. Hock, E. Hulleman, N. Popov, R. Beier, S. Bernard, M. Quarto, M. Capra, S. Goettig, U. Kogel, M. Scheffner, K. Helin, M. Eilers // *Cell*. – 2005. – V. 123. – № 3. – P. 409-421.
8. Agarwal, S.K. Chemical characterization of DNA adducts derived from the configurationally isomeric benzo[c]phenanthrene-3,4-diol 1,2-epoxides / S.K. Agarwal, J.M. Sayer, H.J.C. Yeh, L.K. Pannell, B.D. Hilton, M.A. Pigott, A. Dipple, H. Yagi, D.M. Jerina // *J Am Chem Soc*. – 1987. – V. 109. – № 8. – P. 2497-2504.
9. Aguilar, M.J. Pathological observations in ataxia-telangiectasia. A report of five cases / M.J. Aguilar, S. Kamoshita, B.H. Landing, E. Boder, R.P. Sedgwick // *J Neuropathol Exp Neurol*. – 1968. – V. 27. – № 4. – P. 659-676.
10. Ahel, I. The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates / I. Ahel, U. Rass, S.F. El-Khamisy, S. Katyal, P.M. Clements, P.J. McKinnon, K.W. Caldecott, S.C. West // *Nature*. – 2006. – V. 443. – № 7112. – P. 713-716.
11. Ahmad, A. ERCC1-XPF endonuclease facilitates DNA double-strand break repair / A. Ahmad, A.R. Robinson, A. Duensing, E. van Drunen, H.B. Beverloo, D.B. Weisberg, P. Hasty, J.H. Hoeijmakers, L.J. Niedernhofer // *Mol Cell Biol*. – 2008. – V. 28. – № 16. – P. 5082-5092.
12. Ahmed, K. Joining the cell survival squad: an emerging role for protein kinase CK2 / K. Ahmed, D.A. Gerber, C. Cochet // *Trends Cell Biol*. – 2002. – V. 12. – № 5. – P. 226-230.
13. Ahnesorg, P. XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining / P. Ahnesorg, P. Smith, S.P. Jackson // *Cell*. – 2006. – V. 124. – № 2. – P. 301-313.
14. Akbari, M. Repair of U/G and U/A in DNA by UNG2-associated repair complexes takes place predominantly by short-patch repair both in proliferating and growth-arrested cells / M. Akbari, M. Otterlei, J. Pena-Diaz, P.A. Aas, B. Kavli, N.B. Liabakk, L. Hagen, K. Imai, A. Durandy, G. Slupphaug, H.E. Krokan // *Nucleic Acids Res*. – 2004. – V. 32. – № 18. – P. 5486-5498.
15. Akutsu, M. Ubiquitin chain diversity at a glance / M. Akutsu, I. Dikic, A. Bremm // *J Cell Sci*. – 2016. – V. 129. – № 5. – P. 875-880.
16. Albertella, M.R. The overexpression of specialized DNA polymerases in cancer / M.R. Albertella, A. Lau, M.J. O'Connor // *DNA Repair (Amst)*. – 2005. – V. 4. – № 5. – P. 583-593.

17. Aliouat-Denis, C.M. p53-Independent regulation of p21Waf1/Cip1 expression and senescence by Chk2 / C.M. Aliouat-Denis, N. Dendouga, I. Van den Wyngaert, H. Goehlmann, U. Steller, I. van de Weyer, N. Van Slycken, L. Andries, S. Kass, W. Luyten, M. Janicot, J.E. Vialard // *Mol Cancer Res.* – 2005. – V. 3. – № 11. – P. 627-634.
18. Allinson, S.L. Poly(ADP-ribose) polymerase in base excision repair: always engaged, but not essential for DNA damage processing / S.L. Allinson, Dianova, II, G.L. Dianov // *Acta Biochim Pol.* – 2003. – V. 50. – № 1. – P. 169-179.
19. Althaus, F.R. ADP-ribosylation of proteins. Enzymology and biological significance / F.R. Althaus, C. Richter // *Mol Biol Biochem Biophys.* – 1987. – V. 37. – P. 1-237.
20. Andreassen, P.R. ATR couples FANCD2 monoubiquitination to the DNA-damage response / P.R. Andreassen, A.D. D'Andrea, T. Taniguchi // *Genes Dev.* – 2004. – V. 18. – № 16. – P. 1958-1963.
21. Aravind, L. The WWE domain: a common interaction module in protein ubiquitination and ADP ribosylation / L. Aravind // *Trends Biochem Sci.* – 2001. – V. 26. – № 5. – P. 273-275.
22. Aslanidis, C. Ligation-independent cloning of PCR products (LIC-PCR) / C. Aslanidis, P.J. de Jong // *Nucleic Acids Res.* – 1990. – V. 18. – № 20. – P. 6069-6074.
23. Aspinwall, R. Cloning and characterization of a functional human homolog of *Escherichia coli* endonuclease III / R. Aspinwall, D.G. Rothwell, T. Roldan-Arjona, C. Anselmino, C.J. Ward, J.P. Cheadle, J.R. Sampson, T. Lindahl, P.C. Harris, I.D. Hickson // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1997. – V. 94. – № 1. – P. 109-114.
24. Atsumi, Y. ATM and SIRT6/SNF2H Mediate Transient H2AX Stabilization When DSBs Form by Blocking HUWE1 to Allow Efficient  $\gamma$ H2AX Foci Formation / Y. Atsumi, Y. Minakawa, M. Ono, S. Dobashi, K. Shinohe, A. Shinohara, S. Takeda, M. Takagi, N. Takamatsu, H. Nakagama, H. Teraoka, K. Yoshioka // *Cell Rep.* – 2015. – V. 13. – № 12. – P. 2728-2740.
25. Audebert, M. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining / M. Audebert, B. Salles, P. Calsou // *J Biol Chem.* – 2004. – V. 279. – № 53. – P. 55117-55126.
26. Ayene, I.S. DNA strand breakage by bivalent metal ions and ionizing radiation / I.S. Ayene, C.J. Koch, R.E. Krisch // *Int J Radiat Biol.* – 2007. – V. 83. – № 3. – P. 195-210.
27. Baertschi, S.W. Preparation of the 8,9-epoxide of the mycotoxin aflatoxin B1: the ultimate carcinogenic species / S.W. Baertschi, K.D. Raney, M.P. Stone, T.M. Harris // *J Am Chem Soc.* – 1988. – V. 110. – № 23. – P. 7929-7931.
28. Bai, Y. Telomere instability in a human tumor cell line expressing NBS1 with mutations at sites phosphorylated by ATM / Y. Bai, J.P. Murnane // *Mol Cancer Res.* – 2003. – V. 1. – № 14. – P. 1058-1069.
29. Baker, B.S. The genetic control of meiosis / B.S. Baker, A.T. Carpenter, M.S. Esposito, R.E. Esposito, L. Sandler // *Annu Rev Genet.* – 1976. – V. 10. – P. 53-134.
30. Baker, S.J. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53 / S.J. Baker, S. Markowitz, E.R. Fearon, J.K. Willson, B. Vogelstein // *Science.* – 1990. – V. 249. – № 4971. – P. 912-915.
31. Bakkenist, C.J. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation / C.J. Bakkenist, M.B. Kastan // *Nature.* – 2003. – V. 421. – № 6922. – P. 499-506.
32. Barbarella, G. Imidazole ring opening of 7-methylguanosine at physiological pH / G. Barbarella, V. Tugnoli, M. Zambianchi // *Nucleos Nucleot.* – 1991. – V. 10. – № 8. – P. 1759-1769.
33. Barlow, C. Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia / C. Barlow, S. Hirotsumi, R. Paylor, M. Liyanage, M. Eckhaus, F. Collins, Y. Shiloh, J.N. Crawley, T. Ried, D. Tagle, A. Wynshaw-Boris // *Cell.* – 1996. – V. 86. – № 1. – P. 159-171.

34. Barlow, C. ATM is a cytoplasmic protein in mouse brain required to prevent lysosomal accumulation / C. Barlow, C. Ribaut-Barassin, T.A. Zwingman, A.J. Pope, K.D. Brown, J.W. Owens, D. Larson, E.A. Harrington, A.M. Haeberle, J. Mariani, M. Eckhaus, K. Herrup, Y. Bailly, A. Wynshaw-Boris // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – V. 97. – № 2. – P. 871-876.
35. Barrows, L.R. Nonenzymatic methylation of DNA by S-adenosylmethionine *in vitro* / L.R. Barrows, P.N. Magee // *Carcinogenesis.* – 1982. – V. 3. – № 3. – P. 349-351.
36. Bartkova, J. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis / J. Bartkova, Z. Horejsi, K. Koed, A. Kramer, F. Tort, K. Zieger, P. Guldborg, M. Sehested, J.M. Nesland, C. Lukas, T. Orntoft, J. Lukas, J. Bartek // *Nature.* – 2005. – V. 434. – № 7035. – P. 864-870.
37. Basu, A.K. Genetic effects of thymine glycol: site-specific mutagenesis and molecular modeling studies / A.K. Basu, E.L. Loechler, S.A. Leadon, J.M. Essigmann // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1989. – V. 86. – № 20. – P. 7677-7681.
38. Batycka, M. Ultra-fast tandem mass spectrometry scanning combined with monolithic column liquid chromatography increases throughput in proteomic analysis / M. Batycka, N.F. Inglis, K. Cook, A. Adam, D. Fraser-Pitt, D.G. Smith, L. Main, A. Lubben, B.M. Kessler // *Rapid Commun Mass Spectrom.* – 2006. – V. 20. – № 14. – P. 2074-2080.
39. Beausoleil, S.A. Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins / S.A. Beausoleil, M. Jedrychowski, D. Schwartz, J.E. Elias, J. Villen, J. Li, M.A. Cohn, L.C. Cantley, S.P. Gygi // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2004. – V. 101. – № 33. – P. 12130-12135.
40. Bebenek, K. 5'-Deoxyribose phosphate lyase activity of human DNA polymerase  $\epsilon$  *in vitro* / K. Bebenek, A. Tissier, E.G. Frank, J.P. McDonald, R. Prasad, S.H. Wilson, R. Woodgate, T.A. Kunkel // *Science.* – 2001. – V. 291. – № 5511. – P. 2156-2159.
41. Bekker-Jensen, S. Human Xip1 (C2orf13) is a novel regulator of cellular responses to DNA strand breaks / S. Bekker-Jensen, K. Fugger, J.R. Danielsen, I. Gromova, M. Sehested, J. Celis, J. Bartek, J. Lukas, N. Mailand // *J Biol Chem.* – 2007. – V. 282. – № 27. – P. 19638-19643.
42. Beli, P. Proteomic investigations reveal a role for RNA processing factor THRAP3 in the DNA damage response / P. Beli, N. Lukashchuk, S.A. Wagner, B.T. Weinert, J.V. Olsen, L. Baskcomb, M. Mann, S.P. Jackson, C. Choudhary // *Mol Cell.* – 2012. – V. 46. – № 2. – P. 212-225.
43. Bencokova, Z. ATM activation and signaling under hypoxic conditions / Z. Bencokova, M.R. Kaufmann, I.M. Pires, P.S. Lecane, A.J. Giaccia, E.M. Hammond // *Mol Cell Biol.* – 2009. – V. 29. – № 2. – P. 526-537.
44. Bennett, R.A. Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase  $\beta$  in the base excision repair pathway / R.A. Bennett, D.M. Wilson, 3rd, D. Wong, B. Demple // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1997. – V. 94. – № 14. – P. 7166-7169.
45. Beraldi, R. A novel porcine model of ataxia telangiectasia reproduces neurological features and motor deficits of human disease / R. Beraldi, C.H. Chan, C.S. Rogers, A.D. Kovacs, D.K. Meyerholz, C. Trantzas, A.M. Lambert, B.W. Darbro, K.L. Weber, K.A. White, R.V. Rheaden, M.C. Kruer, B.A. Dacken, X.J. Wang, B.T. Davis, J.A. Rohret, J.T. Struzynski, F.A. Rohret, J.M. Weimer, D.A. Pearce // *Hum Mol Genet.* – 2015. – V. 24. – № 22. – P. 6473-6484.
46. Berger, N.A. Poly(ADP-ribose) polymerase mediates the suicide response to massive DNA damage: studies in normal and DNA-repair defective cells / N.A. Berger, J.L. Sims, D.M. Catino, S.J. Berger // *Princess Takamatsu Symp.* – 1983. – V. 13. – P. 219-226.
47. Berkovich, E. Roles of ATM and NBS1 in chromatin structure modulation and DNA double-strand break repair / E. Berkovich, R.J. Monnat, Jr., M.B. Kastan // *Nat Cell Biol.* – 2007. – V. 9. – № 6. – P. 683-690.
48. Bertani, G. Studies on lysogeny. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli* / G. Bertani // *J Bacteriol.* – 1951. – V. 62. – № 3. – P. 293-300.

49. Bhatti, S. ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress / S. Bhatti, S. Kozlov, A.A. Farooqi, A. Naqi, M. Lavin, K.K. Khanna // *Cell Mol Life Sci.* – 2011. – V. 68. – № 18. – P. 2977-3006.
50. Bigger, C.A. Mutagenic specificity of a potent carcinogen, benzo[*c*]phenanthrene (4*R*,3*S*)-dihydrodiol (2*S*,1*R*)-epoxide, which reacts with adenine and guanine in DNA / C.A. Bigger, J. Strandberg, H. Yagi, D.M. Jerina, A. Dipple // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1989. – V. 86. – № 7. – P. 2291-2295.
51. Bodell, W.J. Comparison of sister-chromatid exchange induction caused by nitrosoureas that alkylate or alkylate and crosslink DNA / W.J. Bodell, T. Aida, J. Rasmussen // *Mutat Res.* – 1985. – V. 149. – № 1. – P. 95-100.
52. Boder, E. Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection / E. Boder, R.P. Sedgwick // *Pediatrics.* – 1958. – V. 21. – № 4. – P. 526-554.
53. Boder, E. Ataxia-telangiectasia. (Clinical and immunological aspects) / E. Boder, R.P. Sedgwick // *Psychiatr Neurol Med Psychol Beih.* – 1970. – V. 13-14. – P. 8-16.
54. Boiteux, S. Mutagenesis by alkylating agents: coding properties for DNA polymerase of poly (dC) template containing 3-methylcytosine / S. Boiteux, J. Laval // *Biochimie.* – 1982. – V. 64. – № 8-9. – P. 637-641.
55. Boiteux, S. The human *OGG1* gene: structure, functions, and its implication in the process of carcinogenesis / S. Boiteux, J.P. Radicella // *Arch Biochem Biophys.* – 2000. – V. 377. – № 1. – P. 1-8.
56. Boorstein, R.J. Formation and stability of repairable pyrimidine photohydrates in DNA / R.J. Boorstein, T.P. Hilbert, R.P. Cunningham, G.W. Teebor // *Biochemistry.* – 1990. – V. 29. – № 46. – P. 10455-10460.
57. Borghesani, P.R. Abnormal development of Purkinje cells and lymphocytes in *Atm* mutant mice / P.R. Borghesani, F.W. Alt, A. Bottaro, L. Davidson, S. Aksoy, G.A. Rathbun, T.M. Roberts, W. Swat, R.A. Segal, Y. Gu // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – V. 97. – № 7. – P. 3336-3341.
58. Borodovsky, A. Chemistry-based functional proteomics reveals novel members of the deubiquitinating enzyme family / A. Borodovsky, H. Ovaa, N. Kolli, T. Gan-Erdene, K.D. Wilkinson, H.L. Ploegh, B.M. Kessler // *Chem Biol.* – 2002. – V. 9. – № 10. – P. 1149-1159.
59. Boveris, A. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen / A. Boveris, B. Chance // *Biochem J.* – 1973. – V. 134. – № 3. – P. 707-716.
60. Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M.M. Bradford // *Anal Biochem.* – 1976. – V. 72. – P. 248-254.
61. Braman, J. Site-directed mutagenesis using double-stranded plasmid DNA templates / J. Braman, C. Papworth, A. Greener // *Methods Mol Biol.* – 1996. – V. 57. – P. 31-44.
62. Brem, R. XRCC1 is required for DNA single-strand break repair in human cells / R. Brem, J. Hall // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33. – № 8. – P. 2512-2520.
63. Brookes, P. Reaction of Some Mutagenic and Carcinogenic Compounds with Nucleic Acids / P. Brookes, P.D. Lawley // *J Cell Comp Physiol.* – 1964. – V. 64. – P. SUPPL 1:111-127.
64. Brooks, C.L. The p53--Mdm2--HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP / C.L. Brooks, M. Li, M. Hu, Y. Shi, W. Gu // *Oncogene.* – 2007. – V. 26. – № 51. – P. 7262-7266.
65. Bryans, M. Absence of DNA ligase IV protein in XR-1 cells: evidence for stabilization by XRCC4 / M. Bryans, M.C. Valenzano, T.D. Stamato // *Mutat Res.* – 1999. – V. 433. – № 1. – P. 53-58.



66. Bryant, H.E. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase / H.E. Bryant, N. Schultz, H.D. Thomas, K.M. Parker, D. Flower, E. Lopez, S. Kyle, M. Meuth, N.J. Curtin, T. Helleday // *Nature*. – 2005. – V. 434. – № 7035. – P. 913-917.
67. Buechner, C.N. Lesion search and recognition by thymine DNA glycosylase revealed by single molecule imaging / C.N. Buechner, A. Maiti, A.C. Drohat, I. Tessmer // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43. – № 5. – P. 2716-2729.
68. Buening, M.K. Tumorigenicity of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo[a]pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides in newborn mice: exceptional activity of (+)-7 $\beta$ ,8 $\alpha$ -dihydroxy-9 $\alpha$ ,10 $\alpha$ -epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene / M.K. Buening, P.G. Wislocki, W. Levin, H. Yagi, D.R. Thakker, H. Akagi, M. Koreeda, D.M. Jerina, A.H. Conney // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1978. – V. 75. – № 11. – P. 5358-5361.
69. Buis, J. Mre11 nuclease activity has essential roles in DNA repair and genomic stability distinct from ATM activation / J. Buis, Y. Wu, Y. Deng, J. Leddon, G. Westfield, M. Eckersdorff, J.M. Sekiguchi, S. Chang, D.O. Ferguson // *Cell*. – 2008. – V. 135. – № 1. – P. 85-96.
70. Burcham, P.C. Genotoxic lipid peroxidation products: their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts / P.C. Burcham // *Mutagenesis*. – 1998. – V. 13. – № 3. – P. 287-305.
71. Burma, S. Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity / S. Burma, B.P. Chen, D.J. Chen // *DNA Repair (Amst)*. – 2006. – V. 5. – № 9-10. – P. 1042-1048.
72. Buscemi, G. Chk2 activation dependence on Nbs1 after DNA damage / G. Buscemi, C. Savio, L. Zannini, F. Micciche, D. Masnada, M. Nakanishi, H. Tauchi, K. Komatsu, S. Mizutani, K. Khanna, P. Chen, P. Concannon, L. Chessa, D. Delia // *Mol Cell Biol*. – 2001. – V. 21. – № 15. – P. 5214-5222.
73. Cabelof, D.C. Base excision repair deficiency caused by polymerase  $\beta$  haploinsufficiency: accelerated DNA damage and increased mutational response to carcinogens / D.C. Cabelof, Z. Guo, J.J. Raffoul, R.W. Sobol, S.H. Wilson, A. Richardson, A.R. Heydari // *Cancer Res.* – 2003. – V. 63. – № 18. – P. 5799-5807.
74. Caldecott, K.W. Protein-protein interactions during mammalian DNA single-strand break repair / K.W. Caldecott // *Biochem Soc Trans.* – 2003. – V. 31. – № Pt 1. – P. 247-251.
75. Caldecott, K.W. Single-strand break repair and genetic disease / K.W. Caldecott // *Nat Rev Genet.* – 2008. – V. 9. – № 8. – P. 619-631.
76. Caldecott, K.W. XRCC1 polypeptide interacts with DNA polymerase  $\beta$  and possibly poly (ADP-ribose) polymerase, and DNA ligase III is a novel molecular 'nick-sensor' in vitro / K.W. Caldecott, S. Aoufouchi, P. Johnson, S. Shall // *Nucleic Acids Res.* – 1996. – V. 24. – № 22. – P. 4387-4394.
77. Caldecott, K.W. Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex in vitro and its absence from mutant hamster cells / K.W. Caldecott, J.D. Tucker, L.H. Stanker, L.H. Thompson // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – V. 23. – № 23. – P. 4836-4843.
78. Cannon, B. Visualization of local DNA unwinding by Mre11/Rad50/Nbs1 using single-molecule FRET / B. Cannon, J. Kuhnlein, S.H. Yang, A. Cheng, D. Schindler, J.M. Stark, R. Russell, T.T. Paull // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. – V. 110. – № 47. – P. 18868-18873.
79. Carmichael, P.L. Detection and characterization by 32P-postlabelling of DNA adducts induced by a Fenton-type oxygen radical-generating system / P.L. Carmichael, M.N. She, D.H. Phillips // *Carcinogenesis*. – 1992. – V. 13. – № 7. – P. 1127-1135.
80. Carson, C.T. The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint / C.T. Carson, R.A. Schwartz, T.H. Stracker, C.E. Lilley, D.V. Lee, M.D. Weitzman // *EMBO J.* – 2003. – V. 22. – № 24. – P. 6610-6620.
81. Ceccaldi, R. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break / R. Ceccaldi, B. Rondinelli, A.D. D'Andrea // *Trends Cell Biol.* – 2016. – V. 26. – № 1. – P. 52-64.

82. Chadha, A. Structures of covalent nucleoside adducts formed from adenine, guanine, and cytosine bases of DNA and the optically active bay-region 3,4-diol 1,2-epoxides of dibenz[*a,j*]anthracene / A. Chadha, J.M. Sayer, H.J.C. Yeh, H. Yagi, A.M. Cheh, L.K. Pannell, D.M. Jerina // *J Am Chem Soc.* – 1989. – V. 111. – № 14. – P. 5456–5463.
83. Chai, W. The involvement of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres / W. Chai, A.J. Sfeir, H. Hoshiyama, J.W. Shay, W.E. Wright // *EMBO Rep.* – 2006. – V. 7. – № 2. – P. 225-230.
84. Chakravarti, D. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a human cDNA encoding the DNA repair protein N-methylpurine-DNA glycosylase / D. Chakravarti, G.C. Ibeanu, K. Tano, S. Mitra // *J Biol Chem.* – 1991. – V. 266. – № 24. – P. 15710-15715.
85. Champoux, J.J. An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA - a possible swivel for DNA replication (polyoma-ethidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay) / J.J. Champoux, R. Dulbecco // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1972. – V. 69. – № 1. – P. 143-146.
86. Chaudhary, N. WWP2-WWP1 ubiquitin ligase complex coordinated by PPM1G maintains the balance between cellular p73 and  $\Delta$ Np73 levels / N. Chaudhary, S. Maddika // *Mol Cell Biol.* – 2014. – V. 34. – № 19. – P. 3754-3764.
87. Chaung, W. Molecular spectrum of mutations induced by 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine in (CHO)-PL61 cells / W. Chaung, R.J. Boorstein // *Mutat Res.* – 1997. – V. 373. – № 1. – P. 125-137.
88. Chen, D. ARF-BP1 as a potential therapeutic target / D. Chen, C.L. Brooks, W. Gu // *Br J Cancer.* – 2006. – V. 94. – № 11. – P. 1555-1558.
89. Chen, D. ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor / D. Chen, N. Kon, M. Li, W. Zhang, J. Qin, W. Gu // *Cell.* – 2005. – V. 121. – № 7. – P. 1071-1083.
90. Chen, D.S. Two distinct human DNA diesterases that hydrolyze 3'-blocking deoxyribose fragments from oxidized DNA / D.S. Chen, T. Herman, B. Demple // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – V. 19. – № 21. – P. 5907-5914.
91. Chen, H. RPA coordinates DNA end resection and prevents formation of DNA hairpins / H. Chen, M. Lisby, L.S. Symington // *Mol Cell.* – 2013. – V. 50. – № 4. – P. 589-600.
92. Chen, J. Regulation of transcription functions of the p53 tumor suppressor by the mdm-2 oncogene / J. Chen, J. Lin, A.J. Levine // *Mol Med.* – 1995. – V. 1. – № 2. – P. 142-152.
93. Chen, P. Oxidative stress is responsible for deficient survival and dendritogenesis in purkinje neurons from ataxia-telangiectasia mutated mutant mice / P. Chen, C. Peng, J. Luff, K. Spring, D. Watters, S. Bottle, S. Furuya, M.F. Lavin // *J Neurosci.* – 2003. – V. 23. – № 36. – P. 11453-11460.
94. Chen, X. Cell cycle regulation of DNA double-strand break end resection by Cdk1-dependent Dna2 phosphorylation / X. Chen, H. Niu, W.H. Chung, Z. Zhu, A. Papusha, E.Y. Shim, S.E. Lee, P. Sung, G. Ira // *Nat Struct Mol Biol.* – 2011. – V. 18. – № 9. – P. 1015-1019.
95. Cheng, S.C. Characterization of 7,12-dimethylbenz[*a*]anthracene-adenine nucleoside adducts / S.C. Cheng, A.S. Prakash, M.A. Pigott, B.D. Hilton, J.M. Roman, H.M. Lee, R.G. Harvey, A. Dipple // *Chem Res Toxicol.* – 1988. – V. 1. – № 4. – P. 216-221.
96. Chessa, L. Focusing new Ataxia Telangiectasia therapeutic approaches / L. Chessa, R. Micheli, A. Molinaro // *J Rare Dis Diagn Ther.* – 2016. – V. 2. – № 2. – P. 12-20.
97. Chiruvella, K.K. Repair of double-strand breaks by end joining / K.K. Chiruvella, Z. Liang, T.E. Wilson // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2013. – V. 5. – № 5. – P. a012757.
98. Choe, K.N. HUWE1 interacts with PCNA to alleviate replication stress / K.N. Choe, C.M. Nicolae, D. Constantin, Y. Imamura, M.R. Delgado-Diaz, S. De, R. Freire, V.A. Smits, G.L. Moldovan // *EMBO Rep.* – 2016. – V. 17. – № 6. – P. 874-886.

99. Chou, W.C. Chk2-dependent phosphorylation of XRCC1 in the DNA damage response promotes base excision repair / W.C. Chou, H.C. Wang, F.H. Wong, S.L. Ding, P.E. Wu, S.Y. Shieh, C.Y. Shen // *EMBO J.* – 2008. – V. 27. – № 23. – P. 3140-3150.
100. Clark, R.A. The human neutrophil respiratory burst oxidase / R.A. Clark // *J Infect Dis.* – 1990. – V. 161. – № 6. – P. 1140-1147.
101. Clauson, C. Advances in understanding the complex mechanisms of DNA interstrand cross-link repair / C. Clauson, O.D. Scharer, L. Niedernhofer // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2013. – V. 5. – № 10. – P. a012732.
102. Clements, P.M. The ataxia-oculomotor apraxia 1 gene product has a role distinct from ATM and interacts with the DNA strand break repair proteins XRCC1 and XRCC4 / P.M. Clements, C. Breslin, E.D. Deeks, P.J. Byrd, L. Ju, P. Bieganski, C. Brenner, M.C. Moreira, A.M. Taylor, K.W. Caldecott // *DNA Repair (Amst).* – 2004. – V. 3. – № 11. – P. 1493-1502.
103. Cohen, P. The regulation of protein function by multisite phosphorylation--a 25 year update / P. Cohen // *Trends Biochem Sci.* – 2000. – V. 25. – № 12. – P. 596-601.
104. Cooper, M.P. Ku complex interacts with and stimulates the Werner protein / M.P. Cooper, A. Machwe, D.K. Orren, R.M. Brosh, D. Ramsden, V.A. Bohr // *Genes Dev.* – 2000. – V. 14. – № 8. – P. 907-912.
105. Cortizas, E.M. Alternative end-joining and classical nonhomologous end-joining pathways repair different types of double-strand breaks during class-switch recombination / E.M. Cortizas, A. Zahn, M.E. Hajjar, A.M. Patenaude, J.M. Di Noia, R.E. Verdun // *J Immunol.* – 2013. – V. 191. – № 11. – P. 5751-5763.
106. Cox, M.M. Lehninger principles of biochemistry / M.M. Cox, D.L. Nelson // 5th ed. – New York, USA: W. H. Freeman, 2008. – 1158 p.
107. Crawford, L. The E3 ubiquitin ligase HUWE1 Is a potential therapeutic target for multiple myeloma / L. Crawford, A.E. Irvine // *Blood.* – 2016. – V. 128. – № 22. – P. 240.
108. Crespan, E. Microhomology-mediated DNA strand annealing and elongation by human DNA polymerases  $\lambda$  and  $\beta$  on normal and repetitive DNA sequences / E. Crespan, T. Czabany, G. Maga, U. Hubscher // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – V. 40. – № 12. – P. 5577-5590.
109. Cristini, A. DNA-PK triggers histone ubiquitination and signaling in response to DNA double-strand breaks produced during the repair of transcription-blocking topoisomerase I lesions / A. Cristini, J.H. Park, G. Capranico, G. Legube, G. Favre, O. Sordet // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44. – № 3. – P. 1161-1178.
110. Cui, H. The stress-responsive gene ATF3 regulates the histone acetyltransferase Tip60 / H. Cui, M. Guo, D. Xu, Z.C. Ding, G. Zhou, H.F. Ding, J. Zhang, Y. Tang, C. Yan // *Nat Commun.* – 2015. – V. 6. – P. 6752.
111. Cummins, J.M. Tumour suppression: disruption of HAUSP gene stabilizes p53 / J.M. Cummins, C. Rago, M. Kohli, K.W. Kinzler, C. Lengauer, B. Vogelstein // *Nature.* – 2004. – V. 428. – № 6982. – P. 1 p following 486.
112. Cummins, J.M. HAUSP is required for p53 destabilization / J.M. Cummins, B. Vogelstein // *Cell Cycle.* – 2004. – V. 3. – № 6. – P. 689-692.
113. d'Adda di Fagagna, F. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence / F. d'Adda di Fagagna, P.M. Reaper, L. Clay-Farrace, H. Fiegler, P. Carr, T. Von Zglinicki, G. Saretzki, N.P. Carter, S.P. Jackson // *Nature.* – 2003. – V. 426. – № 6963. – P. 194-198.
114. Dagert, M. Prolonged incubation in calcium chloride improves the competence of Escherichia coli cells / M. Dagert, S.D. Ehrlich // *Gene.* – 1979. – V. 6. – № 1. – P. 23-28.
115. Daniel, J.A. Multiple autophosphorylation sites are dispensable for murine ATM activation in vivo / J.A. Daniel, M. Pellegrini, J.H. Lee, T.T. Paull, L. Feigenbaum, A. Nussenzweig // *J Cell Biol.* – 2008. – V. 183. – № 5. – P. 777-783.

116. Date, H. Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene / H. Date, O. Onodera, H. Tanaka, K. Iwabuchi, K. Uekawa, S. Igarashi, R. Koike, T. Hiroi, T. Yuasa, Y. Awaya, T. Sakai, T. Takahashi, H. Nagatomo, Y. Sekijima, I. Kawachi, Y. Takiyama, M. Nishizawa, N. Fukuhara, K. Saito, S. Sugano, S. Tsuji // *Nat Genet.* – 2001. – V. 29. – № 2. – P. 184-188.
117. Davis, A.J. DNA double strand break repair via non-homologous end-joining / A.J. Davis, D.J. Chen // *Transl Cancer Res.* – 2013. – V. 2. – № 3. – P. 130-143.
118. Daya-Makin, M. Activation of a tumor-associated protein kinase (p40TAK) and casein kinase 2 in human squamous cell carcinomas and adenocarcinomas of the lung / M. Daya-Makin, J.S. Sanghera, T.L. Mogentale, M. Lipp, J. Parchomchuk, J.C. Hogg, S.L. Pelech // *Cancer Res.* – 1994. – V. 54. – № 8. – P. 2262-2268.
119. de Bie, P. Ubiquitination of E3 ligases: self-regulation of the ubiquitin system via proteolytic and non-proteolytic mechanisms / P. de Bie, A. Ciechanover // *Cell Death Differ.* – 2011. – V. 18. – № 9. – P. 1393-1402.
120. de Groot, R.E. Huwe1-mediated ubiquitylation of dishevelled defines a negative feedback loop in the Wnt signaling pathway / R.E. de Groot, R.S. Ganji, O. Bernatik, B. Lloyd-Lewis, K. Seipel, K. Sedova, Z. Zdrahal, V.M. Dhople, T.C. Dale, H.C. Korswagen, V. Bryja // *Sci Signal.* – 2014. – V. 7. – № 317. – P. ra26.
121. de Rozières, S. The loss of mdm2 induces p53-mediated apoptosis / S. de Rozières, R. Maya, M. Oren, G. Lozano // *Oncogene.* – 2000. – V. 19. – № 13. – P. 1691-1697.
122. Demple, B. Dynamics and diversions in base excision DNA repair of oxidized abasic lesions / B. Demple, M.S. DeMott // *Oncogene.* – 2002. – V. 21. – № 58. – P. 8926-8934.
123. Deng, S.K. RPA antagonizes microhomology-mediated repair of DNA double-strand breaks / S.K. Deng, B. Gibb, M.J. de Almeida, E.C. Greene, L.S. Symington // *Nat Struct Mol Biol.* – 2014. – V. 21. – № 4. – P. 405-412.
124. Deshpande, R.A. ATP-driven Rad50 conformations regulate DNA tethering, end resection, and ATM checkpoint signaling / R.A. Deshpande, G.J. Williams, O. Limbo, R.S. Williams, J. Kuhnlein, J.H. Lee, S. Classen, G. Guenther, P. Russell, J.A. Tainer, T.T. Paull // *EMBO J.* – 2014. – V. 33. – № 5. – P. 482-500.
125. Dexheimer, T.S. The DNA binding and 3'-end preferential activity of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase / T.S. Dexheimer, A.G. Stephen, M.J. Fivash, R.J. Fisher, Y. Pommier // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – V. 38. – № 7. – P. 2444-2452.
126. Di Virgilio, M. PIKK-dependent phosphorylation of Mre11 induces MRN complex inactivation by disassembly from chromatin / M. Di Virgilio, C.Y. Ying, J. Gautier // *DNA Repair (Amst).* – 2009. – V. 8. – № 11. – P. 1311-1320.
127. Dianov, G. Preferential recognition of I.T base-pairs in the initiation of excision-repair by hypoxanthine-DNA glycosylase / G. Dianov, T. Lindahl // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – V. 19. – № 14. – P. 3829-3833.
128. Dianov, G. Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA / G. Dianov, A. Price, T. Lindahl // *Mol Cell Biol.* – 1992. – V. 12. – № 4. – P. 1605-1612.
129. Dianov, G.L. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel / G.L. Dianov, U. Hubscher // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – V. 41. – № 6. – P. 3483-3490.
130. DiBiase, S.J. DNA-dependent protein kinase stimulates an independently active, nonhomologous, end-joining apparatus / S.J. DiBiase, Z.C. Zeng, R. Chen, T. Hyslop, W.J. Curran, Jr., G. Iliakis // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – № 5. – P. 1245-1253.
131. Ding, Q. Autophosphorylation of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase is required for efficient end processing during DNA double-strand break repair / Q. Ding, Y.V. Reddy,

- W. Wang, T. Woods, P. Douglas, D.A. Ramsden, S.P. Lees-Miller, K. Meek // *Mol Cell Biol.* – 2003. – V. 23. – № 16. – P. 5836-5848.
132. Ding, R. Depletion of poly(ADP-ribose) polymerase by antisense RNA expression results in a delay in DNA strand break rejoining / R. Ding, Y. Pommier, V.H. Kang, M. Smulson // *J Biol Chem.* – 1992. – V. 267. – № 18. – P. 12804-12812.
133. Dipple, A. Metabolism of chemical carcinogens / A. Dipple, C.J. Michejda, E.K. Weisburger // *Pharmacol Ther.* – 1985. – V. 27. – № 3. – P. 265-296.
134. Dipple, A. Optically active benzo[c]phenanthrene diol epoxides bind extensively to adenine in DNA / A. Dipple, M.A. Pigott, S.K. Agarwal, H. Yagi, J.M. Sayer, D.M. Jerina // *Nature.* – 1987. – V. 327. – № 6122. – P. 535-536.
135. Dirksen, M.L. Effect of DNA conformation on the hydroxyl radical-induced formation of 8,5'-cyclopurine 2'-deoxyribonucleoside residues in DNA / M.L. Dirksen, W.F. Blakely, E. Holwitt, M. Dizdaroglu // *Int J Radiat Biol.* – 1988. – V. 54. – № 2. – P. 195-204.
136. DiTullio, Jr., R.A. 53BP1 functions in an ATM-dependent checkpoint pathway that is constitutively activated in human cancer / R.A. DiTullio, Jr., T.A. Mochan, M. Venere, J. Bartkova, M. Sehested, J. Bartek, T.D. Halazonetis // *Nat Cell Biol.* – 2002. – V. 4. – № 12. – P. 998-1002.
137. Dizdaroglu, M. Chemical characterization of ionizing radiation-induced damage to DNA / M. Dizdaroglu // *Bio Techniques.* – 1986. – V. 4. – P. 536-546.
138. Doetsch, P.W. The enzymology of apurinic/apyrimidinic endonucleases / P.W. Doetsch, R.P. Cunningham // *Mutat Res.* – 1990. – V. 236. – № 2-3. – P. 173-201.
139. Dominguez-Brauer, C. Mule Regulates the Intestinal Stem Cell Niche via the Wnt Pathway and Targets EphB3 for Proteasomal and Lysosomal Degradation / C. Dominguez-Brauer, Z. Hao, A.J. Elia, J.M. Fortin, R. Nechanitzky, P.M. Brauer, Y. Sheng, M.D. Mana, Chio, II, J. Haight, A. Pollett, R. Cairns, L. Tworzyanski, S. Inoue, C. Reardon, A. Marques, J. Silvester, M.A. Cox, A. Wakeham, O.H. Yilmaz, D.M. Sabatini, J.H. van Es, H. Clevers, T. Sato, T.W. Mak // *Cell Stem Cell.* – 2016. – V. 19. – № 2. – P. 205-216.
140. Duan, Y. HspA1A facilitates DNA repair in human bronchial epithelial cells exposed to Benzo[a]pyrene and interacts with casein kinase 2 / Y. Duan, S. Huang, J. Yang, P. Niu, Z. Gong, X. Liu, L. Xin, R.W. Currie, T. Wu // *Cell Stress Chaperones.* – 2014. – V. 19. – № 2. – P. 271-279.
141. Dulbecco, R. Plaque production by the polyoma virus / R. Dulbecco, G. Freeman // *Virology.* – 1959. – V. 8. – № 3. – P. 396-397.
142. Duncan, J.S. Too much of a good thing: the role of protein kinase CK2 in tumorigenesis and prospects for therapeutic inhibition of CK2 / J.S. Duncan, D.W. Litchfield // *Biochim Biophys Acta.* – 2008. – V. 1784. – № 1. – P. 33-47.
143. Duncan, J.S. A peptide-based target screen implicates the protein kinase CK2 in the global regulation of caspase signaling / J.S. Duncan, J.P. Turowec, K.E. Duncan, G. Vilks, C. Wu, B. Luscher, S.S. Li, G.B. Gloor, D.W. Litchfield // *Sci Signal.* – 2011. – V. 4. – № 172. – P. ra30.
144. Durkacz, B.W. (ADP-ribose)<sub>n</sub> participates in DNA excision repair / B.W. Durkacz, O. Omidiji, D.A. Gray, S. Shall // *Nature.* – 1980. – V. 283. – № 5747. – P. 593-596.
145. Durkacz, B.W. The effect of inhibition of (ADP-ribose)<sub>n</sub> biosynthesis on DNA repair assayed by the nucleoid technique / B.W. Durkacz, S. Shall, J. Irwin // *Eur J Biochem.* – 1981. – V. 121. – № 1. – P. 65-69.
146. Dutta, S. Interstrand cross-links generated by abasic sites in duplex DNA / S. Dutta, G. Chowdhury, K.S. Gates // *J Am Chem Soc.* – 2007. – V. 129. – № 7. – P. 1852-1853.
147. Eastman, A. Reevaluation of interaction of cis-dichloro(ethylenediamine)platinum(II) with DNA / A. Eastman // *Biochemistry.* – 1986. – V. 25. – № 13. – P. 3912-3915.

148. Edmonds, M.J. Ubiquitylation-dependent regulation of NEIL1 by Mule and TRIM26 is required for the cellular DNA damage response / M.J. Edmonds, R.J. Carter, C.M. Nickson, S.C. Williams, J.L. Parsons // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45. – № 2. – P. 726-738.
149. El Ramy, R. Functional interplay between Parp-1 and SirT1 in genome integrity and chromatin-based processes / R. El Ramy, N. Magroun, N. Messadecq, L.R. Gauthier, F.D. Boussin, U. Kolthur-Seetharam, V. Schreiber, M.W. McBurney, P. Sassone-Corsi, F. Dantzer // *Cell Mol Life Sci.* – 2009. – V. 66. – № 19. – P. 3219-3234.
150. el-Deiry, W.S. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression / W.S. el-Deiry, T. Tokino, V.E. Velculescu, D.B. Levy, R. Parsons, J.M. Trent, D. Lin, W.E. Mercer, K.W. Kinzler, B. Vogelstein // *Cell.* – 1993. – V. 75. – № 4. – P. 817-825.
151. El-Khamisy, S.F. A requirement for PARP-1 for the assembly or stability of XRCC1 nuclear foci at sites of oxidative DNA damage / S.F. El-Khamisy, M. Masutani, H. Suzuki, K.W. Caldecott // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31. – № 19. – P. 5526-5533.
152. El-Khamisy, S.F. Defective DNA single-strand break repair in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy-1 / S.F. El-Khamisy, G.M. Saifi, M. Weinfeld, F. Johansson, T. Helleday, J.R. Lupski, K.W. Caldecott // *Nature.* – 2005. – V. 434. – № 7029. – P. 108-113.
153. Ensminger, M. DNA breaks and chromosomal aberrations arise when replication meets base excision repair / M. Ensminger, L. Iloff, C. Ebel, T. Nikolova, B. Kaina, M. Lbrich // *J Cell Biol.* – 2014. – V. 206. – № 1. – P. 29-43.
154. Epstein, W.L. Immunologic studies in ataxia-telangiectasia. I. Delayed hypersensitivity and serum immune globulin levels in probands and first-degree relatives / W.L. Epstein, H.H. Fudenberg, W.B. Reed, E. Boder, R.P. Sedgwick // *Int Arch Allergy Appl Immunol.* – 1966. – V. 30. – № 1. – P. 15-29.
155. Esashi, F. Stabilization of RAD51 nucleoprotein filaments by the C-terminal region of BRCA2 / F. Esashi, V.E. Galkin, X. Yu, E.H. Egelman, S.C. West // *Nat Struct Mol Biol.* – 2007. – V. 14. – № 6. – P. 468-474.
156. Escribano-Diaz, C. A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice / C. Escribano-Diaz, A. Orthwein, A. Fradet-Turcotte, M. Xing, J.T. Young, J. Tkac, M.A. Cook, A.P. Rosebrock, M. Munro, M.D. Canny, D. Xu, D. Durocher // *Mol Cell.* – 2013. – V. 49. – № 5. – P. 872-883.
157. Essigmann, J.M. Structural identification of the major DNA adduct formed by aflatoxin B1 in vitro / J.M. Essigmann, R.G. Croy, A.M. Nadzan, W.F. Busby, Jr., V.N. Reinhold, G. Buchi, G.N. Wogan // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1977. – V. 74. – № 5. – P. 1870-1874.
158. Fabbro, M. BRCA1-BARD1 complexes are required for p53Ser-15 phosphorylation and a G1/S arrest following ionizing radiation-induced DNA damage / M. Fabbro, K. Savage, K. Hobson, A.J. Deans, S.N. Powell, G.A. McArthur, K.K. Khanna // *J Biol Chem.* – 2004. – V. 279. – № 30. – P. 31251-31258.
159. Fajardo-Cavazos, P. Molecular cloning and characterization of the *Bacillus subtilis* spore photoproduct lyase (spl) gene, which is involved in repair of UV radiation-induced DNA damage during spore germination / P. Fajardo-Cavazos, C. Salazar, W.L. Nicholson // *J Bacteriol.* – 1993. – V. 175. – № 6. – P. 1735-1744.
160. Falck, J. Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage / J. Falck, J. Coates, S.P. Jackson // *Nature.* – 2005. – V. 434. – № 7033. – P. 605-611.
161. Fang, S. Mdm2 is a RING finger-dependent ubiquitin protein ligase for itself and p53 / S. Fang, J.P. Jensen, R.L. Ludwig, K.H. Vousden, A.M. Weissman // *J Biol Chem.* – 2000. – V. 275. – № 12. – P. 8945-8951.
162. Farmer, H. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy / H. Farmer, N. McCabe, C.J. Lord, A.N. Tutt, D.A. Johnson, T.B. Richardson, M. Santarosa, K.J. Dillon,

- I. Hickson, C. Knights, N.M. Martin, S.P. Jackson, G.C. Smith, A. Ashworth // *Nature*. – 2005. – V. 434. – № 7035. – P. 917-921.
163. Faust, R.A. Antisense oligonucleotides against protein kinase CK2- $\alpha$  inhibit growth of squamous cell carcinoma of the head and neck in vitro / R.A. Faust, S. Tawfic, A.T. Davis, L.A. Bubash, K. Ahmed // *Head Neck*. – 2000. – V. 22. – № 4. – P. 341-346.
164. Feng, L. The E3 ligase RNF8 regulates KU80 removal and NHEJ repair / L. Feng, J. Chen // *Nat Struct Mol Biol*. – 2012. – V. 19. – № 2. – P. 201-206.
165. Ferguson, D.O. Recombinational repair of gaps in DNA is asymmetric in *Ustilago maydis* and can be explained by a migrating D-loop model / D.O. Ferguson, W.K. Holloman // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1996. – V. 93. – № 11. – P. 5419-5424.
166. Fernandez-Capetillo, O. DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1 / O. Fernandez-Capetillo, H.T. Chen, A. Celeste, I. Ward, P.J. Romanienko, J.C. Morales, K. Naka, Z. Xia, R.D. Camerini-Otero, N. Motoyama, P.B. Carpenter, W.M. Bonner, J. Chen, A. Nussenzweig // *Nat Cell Biol*. – 2002. – V. 4. – № 12. – P. 993-997.
167. Fernandez-Montalvan, A. Biochemical characterization of USP7 reveals post-translational modification sites and structural requirements for substrate processing and subcellular localization / A. Fernandez-Montalvan, T. Bouwmeester, G. Joberty, R. Mader, M. Mahnke, B. Pierrat, J.M. Schlaepfli, S. Worpenberg, B. Gerhartz // *FEBS J*. – 2007. – V. 274. – № 16. – P. 4256-4270.
168. Ferro, A.M. Poly(ADP-ribosylation) in vitro. Reaction parameters and enzyme mechanism / A.M. Ferro, B.M. Olivera // *J Biol Chem*. – 1982. – V. 257. – № 13. – P. 7808-7813.
169. Filhol, O. Protein kinase CK2 in breast cancer: the CK2 $\beta$  regulatory subunit takes center stage in epithelial plasticity / O. Filhol, S. Giacosa, Y. Wallez, C. Cochet // *Cell Mol Life Sci*. – 2015. – V. 72. – № 17. – P. 3305-3322.
170. Foote, R.S. Demethylation of O6-methylguanine in a synthetic DNA polymer by an inducible activity in *Escherichia coli* / R.S. Foote, S. Mitra, B.C. Pal // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1980. – V. 97. – № 2. – P. 654-659.
171. Forbes, S.A. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer / S.A. Forbes, N. Bindal, S. Bamford, C. Cole, C.Y. Kok, D. Beare, M. Jia, R. Shepherd, K. Leung, A. Menzies, J.W. Teague, P.J. Campbell, M.R. Stratton, P.A. Futreal // *Nucleic Acids Res*. – 2011. – V. 39. – № Database issue. – P. D945-950.
172. Fornace, Jr., A.J. DNA crosslinking induced by x-rays and chemical agents / A.J. Fornace, Jr., J.B. Little // *Biochim Biophys Acta*. – 1977. – V. 477. – № 4. – P. 343-355.
173. Fortini, P. The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells / P. Fortini, E. Parlanti, O.M. Sidorkina, J. Laval, E. Dogliotti // *J Biol Chem*. – 1999. – V. 274. – № 21. – P. 15230-15236.
174. Foster, W.H. Nuclear phosphatase PPM1G in cellular survival and neural development / W.H. Foster, A. Langenbacher, C. Gao, J. Chen, Y. Wang // *Dev Dyn*. – 2013. – V. 242. – № 9. – P. 1101-1109.
175. Fraga, C.G. Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat organ DNA and urine / C.G. Fraga, M.K. Shigenaga, J.W. Park, P. Degani, B.N. Ames // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1990. – V. 87. – № 12. – P. 4533-4537.
176. Franklin, R.E. Molecular configuration in sodium thymonucleate / R.E. Franklin, R.G. Gosling // *Nature*. – 1953. – V. 171. – № 4356. – P. 740-741.
177. Franklin, W.A. Structural determination of the ultraviolet light-induced thymine-cytosine pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct / W.A. Franklin, P.W. Doetsch, W.A. Haseltine // *Nucleic Acids Res*. – 1985. – V. 13. – № 14. – P. 5317-5325.
178. Friedberg, E.C. DNA repair and mutagenesis / E.C. Friedberg, G.C. Walker, W. Siede, R.D. Wood // 2nd ed. – Washington DC, USA: ASM Press, 2005. – 1164 p.

179. Frit, P. Alternative end-joining pathway(s): bricolage at DNA breaks / P. Frit, N. Barboule, Y. Yuan, D. Gomez, P. Calsou // *DNA Repair (Amst)*. – 2014. – V. 17. – P. 81-97.
180. Fritz, G. Phosphorylation of the DNA repair protein APE/REF-1 by CKII affects redox regulation of AP-1 / G. Fritz, B. Kaina // *Oncogene*. – 1999. – V. 18. – № 4. – P. 1033-1040.
181. Fuchs, S.Y. Mdm2 association with p53 targets its ubiquitination / S.Y. Fuchs, V. Adler, T. Buschmann, X. Wu, Z. Ronai // *Oncogene*. – 1998. – V. 17. – № 19. – P. 2543-2547.
182. Gao, Y. DNA ligase III is critical for mtDNA integrity but not Xrcc1-mediated nuclear DNA repair / Y. Gao, S. Katyal, Y. Lee, J. Zhao, J.E. Rehg, H.R. Russell, P.J. McKinnon // *Nature*. – 2011. – V. 471. – № 7337. – P. 240-244.
183. Garcia-Diaz, M. Identification of an intrinsic 5'-deoxyribose-5-phosphate lyase activity in human DNA polymerase  $\lambda$ : a possible role in base excision repair / M. Garcia-Diaz, K. Bebenek, T.A. Kunkel, L. Blanco // *J Biol Chem*. – 2001. – V. 276. – № 37. – P. 34659-34663.
184. Gargiulo, D. Structural and function modification of DNA by mitomycin C. Mechanism of the DNA sequence specificity of mitomycins / D. Gargiulo, G.S. Kumar, S.S. Musser, M. Tomasz // *Nucleic Acids Symp Ser*. – 1995. – № 34. – P. 169-170.
185. Gasparro, F.P. Ultraviolet-induced 8,8-adenine dehydrodimers in oligo- and polynucleotides / F.P. Gasparro, J.R. Fresco // *Nucleic Acids Res*. – 1986. – V. 14. – № 10. – P. 4239-4251.
186. Gatei, M. ATM protein-dependent phosphorylation of Rad50 protein regulates DNA repair and cell cycle control / M. Gatei, B. Jakob, P. Chen, A.W. Kijas, O.J. Becherel, N. Gueven, G. Birrell, J.H. Lee, T.T. Paull, Y. Lerenthal, S. Fazry, G. Taucher-Scholz, R. Kalb, D. Schindler, R. Waltes, T. Dork, M.F. Lavin // *J Biol Chem*. – 2011. – V. 286. – № 36. – P. 31542-31556.
187. Gatz, S.A. Requirement for DNA ligase IV during embryonic neuronal development / S.A. Gatz, L. Ju, R. Gruber, E. Hoffmann, A.M. Carr, Z.Q. Wang, C. Liu, P.A. Jeggo // *J Neurosci*. – 2011. – V. 31. – № 27. – P. 10088-10100.
188. Gentil, A. Mutation spectra induced by replication of two vicinal oxidative DNA lesions in mammalian cells / A. Gentil, F. Le Page, J. Cadet, A. Sarasin // *Mutat Res*. – 2000. – V. 452. – № 1. – P. 51-56.
189. Gerchman, L.L. The properties of O<sup>6</sup>-methylguanine in templates for RNA polymerase / L.L. Gerchman, D.B. Ludlum // *Biochim Biophys Acta*. – 1973. – V. 308. – № 2. – P. 310-316.
190. Goodarzi, A.A. The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks / A.A. Goodarzi, P.A. Jeggo // *Adv Genet*. – 2013. – V. 82. – P. 1-45.
191. Goodarzi, A.A. Biochemical characterization of the ataxia-telangiectasia mutated (ATM) protein from human cells / A.A. Goodarzi, S.P. Lees-Miller // *DNA Repair (Amst)*. – 2004. – V. 3. – № 7. – P. 753-767.
192. Gorelick, N.J. Fluoranthene-DNA adducts: identification and quantification by an HPLC-32P-postlabeling method / N.J. Gorelick, G.N. Wogan // *Carcinogenesis*. – 1989. – V. 10. – № 9. – P. 1567-1577.
193. Gostissa, M. Mechanisms that promote and suppress chromosomal translocations in lymphocytes / M. Gostissa, F.W. Alt, R. Chiarle // *Annu Rev Immunol*. – 2011. – V. 29. – P. 319-350.
194. Gottlieb, T.M. The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen / T.M. Gottlieb, S.P. Jackson // *Cell*. – 1993. – V. 72. – № 1. – P. 131-142.
195. Grawunder, U. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells / U. Grawunder, M. Wilm, X. Wu, P. Kulesza, T.E. Wilson, M. Mann, M.R. Lieber // *Nature*. – 1997. – V. 388. – № 6641. – P. 492-495.
196. Grogan, D. Formaldehyde-induced mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: molecular properties and the roles of repair and bypass systems / D. Grogan, S. Jinks-Robertson // *Mutat Res*. – 2012. – V. 731. – № 1-2. – P. 92-98.



197. Grundy, G.J. PARP3 is a sensor of nicked nucleosomes and monoribosylates histone H2B(Glu2) / G.J. Grundy, L.M. Polo, Z. Zeng, S.L. Rulten, N.C. Hoch, P. Paomephan, Y. Xu, S.M. Sweet, A.W. Thorne, A.W. Oliver, S.J. Matthews, L.H. Pearl, K.W. Caldecott // *Nat Commun.* – 2016. – V. 7. – P. 12404.
198. Grundy, G.J. APLF promotes the assembly and activity of non-homologous end joining protein complexes / G.J. Grundy, S.L. Rulten, Z. Zeng, R. Arribas-Bosacoma, N. Iles, K. Manley, A. Oliver, K.W. Caldecott // *EMBO J.* – 2013. – V. 32. – № 1. – P. 112-125.
199. Gu, J. XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps / J. Gu, H. Lu, B. Tippin, N. Shimazaki, M.F. Goodman, M.R. Lieber // *EMBO J.* – 2007. – V. 26. – № 4. – P. 1010-1023.
200. Guan, L. DNA interstrand cross-link formation by the 1,4-dioxobutane abasic lesion / L. Guan, M.M. Greenberg // *J Am Chem Soc.* – 2009. – V. 131. – № 42. – P. 15225-15231.
201. Gudipaty, S.A. PPM1G Binds 7SK RNA and Hexim1 To Block P-TEFb Assembly into the 7SK snRNP and Sustain Transcription Elongation / S.A. Gudipaty, R.P. McNamara, E.L. Morton, I. D'Orso // *Mol Cell Biol.* – 2015. – V. 35. – № 22. – P. 3810-3828.
202. Guerra, B. The carboxy terminus of p53 mimics the polylysine effect of protein kinase CK2-catalyzed MDM2 phosphorylation / B. Guerra, C. Gotz, P. Wagner, M. Montenarh, O.G. Issinger // *Oncogene.* – 1997. – V. 14. – № 22. – P. 2683-2688.
203. Guillet, M. Endogenous DNA abasic sites cause cell death in the absence of Apn1, Apn2 and Rad1/Rad10 in *Saccharomyces cerevisiae* / M. Guillet, S. Boiteux // *EMBO J.* – 2002. – V. 21. – № 11. – P. 2833-2841.
204. Guo, Z. ATM activation in the presence of oxidative stress / Z. Guo, R. Deshpande, T.T. Paull // *Cell Cycle.* – 2010a. – V. 9. – № 24. – P. 4805-4811.
205. Guo, Z. ATM activation by oxidative stress / Z. Guo, S. Kozlov, M.F. Lavin, M.D. Person, T.T. Paull // *Science.* – 2010b. – V. 330. – № 6003. – P. 517-521.
206. Haffner, M.C. Transcription-induced DNA double strand breaks: both oncogenic force and potential therapeutic target? / M.C. Haffner, A.M. De Marzo, A.K. Meeker, W.G. Nelson, S. Yegnasubramanian // *Clin Cancer Res.* – 2011. – V. 17. – № 12. – P. 3858-3864.
207. Haince, J.F. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) signaling network is modulated by a novel poly(ADP-ribose)-dependent pathway in the early response to DNA-damaging agents / J.F. Haince, S. Kozlov, V.L. Dawson, T.M. Dawson, M.J. Hendzel, M.F. Lavin, G.G. Poirier // *J Biol Chem.* – 2007. – V. 282. – № 22. – P. 16441-16453.
208. Haince, J.F. PARP1-dependent kinetics of recruitment of MRE11 and NBS1 proteins to multiple DNA damage sites / J.F. Haince, D. McDonald, A. Rodrigue, U. Dery, J.Y. Masson, M.J. Hendzel, G.G. Poirier // *J Biol Chem.* – 2008. – V. 283. – № 2. – P. 1197-1208.
209. Hall, J.R. Cdc6 stability is regulated by the Huwe1 ubiquitin ligase after DNA damage / J.R. Hall, E. Kow, K.R. Nevis, C.K. Lu, K.S. Luce, Q. Zhong, J.G. Cook // *Mol Biol Cell.* – 2007. – V. 18. – № 9. – P. 3340-3350.
210. Halliwell, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life / B. Halliwell // *Plant Physiol.* – 2006. – V. 141. – № 2. – P. 312-322.
211. Hameed, D.S. How chemical synthesis of ubiquitin conjugates helps to understand ubiquitin signal transduction / D.S. Hameed, A. Sapmaz, H. Ovaia // *Bioconjug Chem.* – 2016.
212. Hammel, M. Ku and DNA-dependent protein kinase dynamic conformations and assembly regulate DNA binding and the initial non-homologous end joining complex / M. Hammel, Y. Yu, B.L. Mahaney, B. Cai, R. Ye, B.M. Phipps, R.P. Rambo, G.L. Hura, M. Pelikan, S. So, R.M. Abolfath, D.J. Chen, S.P. Lees-Miller, J.A. Tainer // *J Biol Chem.* – 2010. – V. 285. – № 2. – P. 1414-1423.
213. Harper, J.W. The DNA damage response: ten years after / J.W. Harper, S.J. Elledge // *Mol Cell.* – 2007. – V. 28. – № 5. – P. 739-745.

214. Hartlerode, A.J. Recruitment and activation of the ATM kinase in the absence of DNA-damage sensors / A.J. Hartlerode, M.J. Morgan, Y. Wu, J. Buis, D.O. Ferguson // *Nat Struct Mol Biol.* – 2015. – V. 22. – № 9. – P. 736-743.
215. Hartlerode, A.J. Mechanisms of double-strand break repair in somatic mammalian cells / A.J. Hartlerode, R. Scully // *Biochem J.* – 2009. – V. 423. – № 2. – P. 157-168.
216. Hazra, T.K. Identification and characterization of a human DNA glycosylase for repair of modified bases in oxidatively damaged DNA / T.K. Hazra, T. Izumi, I. Boldogh, B. Imhoff, Y.W. Kow, P. Jaruga, M. Dizdaroglu, S. Mitra // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2002a. – V. 99. – № 6. – P. 3523-3528.
217. Hazra, T.K. Identification and characterization of a novel human DNA glycosylase for repair of cytosine-derived lesions / T.K. Hazra, Y.W. Kow, Z. Hatahet, B. Imhoff, I. Boldogh, S.K. Mokkapat, S. Mitra, T. Izumi // *J Biol Chem.* – 2002b. – V. 277. – № 34. – P. 30417-30420.
218. Heale, J.T. Condensin I interacts with the PARP-1-XRCC1 complex and functions in DNA single-strand break repair / J.T. Heale, A.R. Ball, Jr., J.A. Schmiesing, J.S. Kim, X. Kong, S. Zhou, D.F. Hudson, W.C. Earnshaw, K. Yokomori // *Mol Cell.* – 2006. – V. 21. – № 6. – P. 837-848.
219. Hemminki, K. Reactions of 'bay-region' and non-'bay-region' diol-epoxides of benz(a)anthracene with DNA: evidence indicating that the major products are hydrocarbon-N2-guanine adducts / K. Hemminki, C.S. Cooper, O. Ribeiro, P.L. Grover, P. Sims // *Carcinogenesis.* – 1980. – V. 1. – № 3. – P. 277-286.
220. Herhaus, L. Casein kinase 2 (CK2) phosphorylates the deubiquitylase OTUB1 at Ser16 to trigger its nuclear localization / L. Herhaus, A.B. Perez-Oliva, G. Cozza, R. Gourlay, S. Weidlich, D.G. Campbell, L.A. Pinna, G.P. Sapkota // *Sci Signal.* – 2015. – V. 8. – № 372. – P. ra35.
221. Herold, S. Miz1 and HectH9 regulate the stability of the checkpoint protein, TopBP1 / S. Herold, A. Hock, B. Herkert, K. Berns, J. Mullenders, R. Beijersbergen, R. Bernards, M. Eilers // *EMBO J.* – 2008. – V. 27. – № 21. – P. 2851-2861.
222. Hertzog, P.J. Characterisation of the imidazole ring-opened forms of trans-8,9-dihydro-8,9-dihydro-8-(7-guanyl)9-hydroxy aflatoxin B1 / P.J. Hertzog, J.R. Smith, R.C. Garner // *Carcinogenesis.* – 1982. – V. 3. – № 6. – P. 723-725.
223. Heyer, W.D. Regulation of homologous recombination in eukaryotes / W.D. Heyer, K.T. Ehmsen, J. Liu // *Annu Rev Genet.* – 2010. – V. 44. – P. 113-139.
224. Higuchi, Y. Purification of all forms of HeLa cell mitochondrial DNA and assessment of damage to it caused by hydrogen peroxide treatment of mitochondria or cells / Y. Higuchi, S. Linn // *J Biol Chem.* – 1995. – V. 270. – № 14. – P. 7950-7956.
225. Hill-Perkins, M. Site-specific mutagenesis *in vivo* by single methylated or deaminated purine bases / M. Hill-Perkins, M.D. Jones, P. Karran // *Mutat Res.* – 1986. – V. 162. – № 2. – P. 153-163.
226. Hirano, M. DNA single-strand break repair is impaired in aprataxin-related ataxia / M. Hirano, A. Yamamoto, T. Mori, L. Lan, T.A. Iwamoto, M. Aoki, K. Shimada, Y. Furiya, S. Kariya, H. Asai, A. Yasui, T. Nishiwaki, K. Imoto, N. Kobayashi, T. Kiriya, T. Nagata, N. Konishi, Y. Itoyama, S. Ueno // *Ann Neurol.* – 2007. – V. 61. – № 2. – P. 162-174.
227. Hoar, D.I. Chemical mutagen hypersensitivity in ataxia telangiectasia / D.I. Hoar, P. Sargent // *Nature.* – 1976. – V. 261. – № 5561. – P. 590-592.
228. Hodis, E. A landscape of driver mutations in melanoma / E. Hodis, I.R. Watson, G.V. Kryukov, S.T. Arold, M. Imielinski, J.P. Theurillat, E. Nickerson, D. Auclair, L. Li, C. Place, D. Dicara, A.H. Ramos, M.S. Lawrence, K. Cibulskis, A. Sivachenko, D. Voet, G. Saksena, N. Stransky, R.C. Onofrio, W. Winckler, K. Ardlie, N. Wagle, J. Wargo, K. Chong, D.L. Morton, K. Stemke-Hale, G. Chen, M. Noble, M. Meyerson, J.E. Ladbury, M.A. Davies, J.E. Gershenwald, S.N. Wagner, D.S. Hoon, D. Schadendorf, E.S. Lander, S.B. Gabriel, G. Getz, L.A. Garraway, L. Chin // *Cell.* – 2012. – V. 150. – № 2. – P. 251-263.

229. Hoeijmakers, J.H. DNA damage, aging, and cancer / J.H. Hoeijmakers // *N Engl J Med.* – 2009. – V. 361. – № 15. – P. 1475-1485.
230. Holliday, R. Gene silencing in mammalian cells by uptake of 5-methyl deoxycytidine-5'-triphosphate / R. Holliday, T. Ho // *Somat Cell Mol Genet.* – 1991. – V. 17. – № 6. – P. 537-542.
231. Holm, C. Differential requirement of DNA replication for the cytotoxicity of DNA topoisomerase I and II inhibitors in Chinese hamster DC3F cells / C. Holm, J.M. Covey, D. Kerrigan, Y. Pommier // *Cancer Res.* – 1989. – V. 49. – № 22. – P. 6365-6368.
232. Honda, R. Activity of MDM2, a ubiquitin ligase, toward p53 or itself is dependent on the RING finger domain of the ligase / R. Honda, H. Yasuda // *Oncogene.* – 2000. – V. 19. – № 11. – P. 1473-1476.
233. Honda, R. Association of p19(ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53 / R. Honda, H. Yasuda // *EMBO J.* – 1999. – V. 18. – № 1. – P. 22-27.
234. Hopkins, P.B. Sequence preferences of DNA interstrand cross-linking agents: Importance of minimal DNA structural reorganization in the cross-linking reactions of mechlorethamine, cisplatin and mitomycin C / P.B. Hopkins, J.T. Millard, J. Woo, M.F. Weidner, J.J. Kirchner, S.T. Sigurdsson, S. Raucher // *Tetrahedron.* – 1991. – V. 47. – № 14-15. – P. 2475-2489.
235. Howard, S.M. DNA damage response factors from diverse pathways, including DNA crosslink repair, mediate alternative end joining / S.M. Howard, D.A. Yanez, J.M. Stark // *PLoS Genet.* – 2015. – V. 11. – № 1. – P. e1004943.
236. Hsiang, Y.H. Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I / Y.H. Hsiang, R. Hertzberg, S. Hecht, L.F. Liu // *J Biol Chem.* – 1985. – V. 260. – № 27. – P. 14873-14878.
237. Hu, Y. PARP1-driven poly-ADP-ribosylation regulates BRCA1 function in homologous recombination-mediated DNA repair / Y. Hu, S.A. Petit, S.B. Ficarro, K.J. Toomire, A. Xie, E. Lim, S.A. Cao, E. Park, M.J. Eck, R. Scully, M. Brown, J.A. Marto, D.M. Livingston // *Cancer Discov.* – 2014. – V. 4. – № 12. – P. 1430-1447.
238. Hubscher, U. DNA polymerases: discovery, characterization and functions in cellular DNA transactions / U. Hubscher, S. Spadari, G. Villani, G. Maga ed. – New Jersey: World Scientific Publishing Company, 2010. – 340 p.
239. Huen, M.S. RNF8 transduces the DNA-damage signal via histone ubiquitylation and checkpoint protein assembly / M.S. Huen, R. Grant, I. Manke, K. Minn, X. Yu, M.B. Yaffe, J. Chen // *Cell.* – 2007. – V. 131. – № 5. – P. 901-914.
240. Huertas, P. Cotranscriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination / P. Huertas, A. Aguilera // *Mol Cell.* – 2003. – V. 12. – № 3. – P. 711-721.
241. Huertas, P. Human CtIP mediates cell cycle control of DNA end resection and double strand break repair / P. Huertas, S.P. Jackson // *J Biol Chem.* – 2009. – V. 284. – № 14. – P. 9558-9565.
242. Huff, A.C. DNA damage at thymine N-3 abolishes base-pairing capacity during DNA synthesis / A.C. Huff, M.D. Topal // *J Biol Chem.* – 1987. – V. 262. – № 26. – P. 12843-12850.
243. Huibregtse, J.M. A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase / J.M. Huibregtse, M. Scheffner, S. Beaudenon, P.M. Howley // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1995. – V. 92. – № 7. – P. 2563-2567.
244. Hurov, K.E. A genetic screen identifies the Triple T complex required for DNA damage signaling and ATM and ATR stability / K.E. Hurov, C. Cotta-Ramusino, S.J. Elledge // *Genes Dev.* – 2010. – V. 24. – № 17. – P. 1939-1950.
245. Iles, N. APLF (C2orf13) is a novel human protein involved in the cellular response to chromosomal DNA strand breaks / N. Iles, S. Rulten, S.F. El-Khamisy, K.W. Caldecott // *Mol Cell Biol.* – 2007. – V. 27. – № 10. – P. 3793-3803.

246. Iliakis, G. Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation / G. Iliakis, H. Wang, A.R. Perrault, W. Boecker, B. Rosidi, F. Windhofer, W. Wu, J. Guan, G. Terzoudi, G. Pantelias // *Cytogenet Genome Res.* – 2004. – V. 104. – № 1-4. – P. 14-20.
247. Inamdar, K.V. Conversion of phosphoglycolate to phosphate termini on 3' overhangs of DNA double strand breaks by the human tyrosyl-DNA phosphodiesterase hTdp1 / K.V. Inamdar, J.J. Pouliot, T. Zhou, S.P. Lees-Miller, A. Rasouli-Nia, L.F. Povirk // *J Biol Chem.* – 2002. – V. 277. – № 30. – P. 27162-27168.
248. Inoue, S. Mule/Huwei1/Arf-BP1 suppresses Ras-driven tumorigenesis by preventing c-Myc/Miz1-mediated down-regulation of p21 and p15 / S. Inoue, Z. Hao, A.J. Elia, D. Cescon, L. Zhou, J. Silvester, B. Snow, I.S. Harris, M. Sasaki, W.Y. Li, M. Itsumi, K. Yamamoto, T. Ueda, C. Dominguez-Brauer, C. Gorrini, Chio, II, J. Haight, A. You-Ten, S. McCracken, A. Wakeham, D. Ghazarian, L.J. Penn, G. Melino, T.W. Mak // *Genes Dev.* – 2013. – V. 27. – № 10. – P. 1101-1114.
249. Irani, K. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Ras-transformed fibroblasts / K. Irani, Y. Xia, J.L. Zweier, S.J. Sollott, C.J. Der, E.R. Fearon, M. Sundaresan, T. Finkel, P.J. Goldschmidt-Clermont // *Science.* – 1997. – V. 275. – № 5306. – P. 1649-1652.
250. Ivanov, E.L. Genetic requirements for the single-strand annealing pathway of double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae* / E.L. Ivanov, N. Sugawara, J. Fishman-Lobell, J.E. Haber // *Genetics.* – 1996. – V. 142. – № 3. – P. 693-704.
251. Jackson, S.P. The DNA-damage response in human biology and disease / S.P. Jackson, J. Bartek // *Nature.* – 2009. – V. 461. – № 7267. – P. 1071-1078.
252. Jacobs, A.L. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond / A.L. Jacobs, P. Schar // *Chromosoma.* – 2012. – V. 121. – № 1. – P. 1-20.
253. Jilani, A. Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage / A. Jilani, D. Ramotar, C. Slack, C. Ong, X.M. Yang, S.W. Scherer, D.D. Lasko // *J Biol Chem.* – 1999. – V. 274. – № 34. – P. 24176-24186.
254. Jimeno, S. Neddylation inhibits CtIP-mediated resection and regulates DNA double strand break repair pathway choice / S. Jimeno, M.J. Fernandez-Avila, A. Cruz-Garcia, C. Cepeda-Garcia, D. Gomez-Cabello, P. Huertas // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43. – № 2. – P. 987-999.
255. Jin, Y. MDM2 promotes p21<sup>waf1/cip1</sup> proteasomal turnover independently of ubiquitylation / Y. Jin, H. Lee, S.X. Zeng, M.S. Dai, H. Lu // *EMBO J.* – 2003. – V. 22. – № 23. – P. 6365-6377.
256. Johnson, B.A. Formation of isoaspartate at two distinct sites during *in vitro* aging of human growth hormone / B.A. Johnson, J.M. Shirokawa, W.S. Hancock, M.W. Spellman, L.J. Basa, D.W. Aswad // *J Biol Chem.* – 1989. – V. 264. – № 24. – P. 14262-14271.
257. Johnson, R.E. Eukaryotic polymerases  $\iota$  and  $\zeta$  act sequentially to bypass DNA lesions / R.E. Johnson, M.T. Washington, L. Haracska, S. Prakash, L. Prakash // *Nature.* – 2000. – V. 406. – № 6799. – P. 1015-1019.
258. Kaelin, Jr., W.G. The concept of synthetic lethality in the context of anticancer therapy / W.G. Kaelin, Jr. // *Nat Rev Cancer.* – 2005. – V. 5. – № 9. – P. 689-698.
259. Kaidi, A. KAT5 tyrosine phosphorylation couples chromatin sensing to ATM signalling / A. Kaidi, S.P. Jackson // *Nature.* – 2013. – V. 498. – № 7452. – P. 70-74.
260. Kalam, M.A. Genetic effects of oxidative DNA damages: comparative mutagenesis of the imidazole ring-opened formamidopyrimidines (Fapy lesions) and 8-oxo-purines in simian kidney cells / M.A. Kalam, K. Haraguchi, S. Chandani, E.L. Loechler, M. Moriya, M.M. Greenberg, A.K. Basu // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – V. 34. – № 8. – P. 2305-2315.
261. Kalluri, R. The biology and function of fibroblasts in cancer / R. Kalluri // *Nat Rev Cancer.* – 2016. – V. 16. – № 9. – P. 582-598.

262. Kamijo, T. Loss of the ARF tumor suppressor reverses premature replicative arrest but not radiation hypersensitivity arising from disabled atm function / T. Kamijo, E. van de Kamp, M.J. Chong, F. Zindy, J.A. Diehl, C.J. Sherr, P.J. McKinnon // *Cancer Res.* – 1999. – V. 59. – № 10. – P. 2464-2469.
263. Kan, L.S. The Dewar valence isomer of the (6-4) photoadduct of thymidyl-(3'-5')-thymidine monophosphate: formation, alkaline lability and conformational properties / L.S. Kan, L. Voituriez, J. Cadet // *J Photochem Photobiol B.* – 1992. – V. 12. – № 4. – P. 339-357.
264. Kanno, S. A novel human AP endonuclease with conserved zinc-finger-like motifs involved in DNA strand break responses / S. Kanno, H. Kuzuoka, S. Sasao, Z. Hong, L. Lan, S. Nakajima, A. Yasui // *EMBO J.* – 2007. – V. 26. – № 8. – P. 2094-2103.
265. Kanu, N. ATMIN defines an NBS1-independent pathway of ATM signalling / N. Kanu, A. Behrens // *EMBO J.* – 2007. – V. 26. – № 12. – P. 2933-2941.
266. Karanam, K. Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase / K. Karanam, R. Kafri, A. Loewer, G. Lahav // *Mol Cell.* – 2012. – V. 47. – № 2. – P. 320-329.
267. Karimi-Busheri, F. Molecular characterization of a human DNA kinase / F. Karimi-Busheri, G. Daly, P. Robins, B. Canas, D.J. Pappin, J. Sgouros, G.G. Miller, H. Fakhrari, E.M. Davis, M.M. Le Beau, M. Weinfeld // *J Biol Chem.* – 1999. – V. 274. – № 34. – P. 24187-24194.
268. Karran, P. Hypoxanthine in deoxyribonucleic acid: generation by heat-induced hydrolysis of adenine residues and release in free form by a deoxyribonucleic acid glycosylase from calf thymus / P. Karran, T. Lindahl // *Biochemistry.* – 1980. – V. 19. – № 26. – P. 6005-6011.
269. Kasai, H. Hydroxylation of deoxyguanosine at the C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents / H. Kasai, S. Nishimura // *Nucleic Acids Res.* – 1984. – V. 12. – № 4. – P. 2137-2145.
270. Kastan, M.B. A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia / M.B. Kastan, Q. Zhan, W.S. el-Deiry, F. Carrier, T. Jacks, W.V. Walsh, B.S. Plunkett, B. Vogelstein, A.J. Fornace, Jr. // *Cell.* – 1992. – V. 71. – № 4. – P. 587-597.
271. Kathe, S.D. Single-stranded breaks in DNA but not oxidative DNA base damages block transcriptional elongation by RNA polymerase II in HeLa cell nuclear extracts / S.D. Kathe, G.P. Shen, S.S. Wallace // *J Biol Chem.* – 2004. – V. 279. – № 18. – P. 18511-18520.
272. Katyal, S. Aberrant topoisomerase-1 DNA lesions are pathogenic in neurodegenerative genome instability syndromes / S. Katyal, Y. Lee, K.C. Nitiss, S.M. Downing, Y. Li, M. Shimada, J. Zhao, H.R. Russell, J.H. Petrini, J.L. Nitiss, P.J. McKinnon // *Nat Neurosci.* – 2014. – V. 17. – № 6. – P. 813-821.
273. Keeney, S. Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family / S. Keeney, C.N. Giroux, N. Kleckner // *Cell.* – 1997. – V. 88. – № 3. – P. 375-384.
274. Kelner, A. Photoreactivation of Ultraviolet-Irradiated *Escherichia Coli*, with Special Reference to the Dose-Reduction Principle and to Ultraviolet-Induced Mutation / A. Kelner // *J Bacteriol.* – 1949. – V. 58. – № 4. – P. 511-522.
275. Kent, T. Mechanism of microhomology-mediated end-joining promoted by human DNA polymerase  $\theta$  / T. Kent, G. Chandramouly, S.M. McDevitt, A.Y. Ozdemir, R.T. Pomerantz // *Nat Struct Mol Biol.* – 2015. – V. 22. – № 3. – P. 230-237.
276. Khoronenkova, S.V. The emerging role of Mre11 and ARF in the regulation of base excision repair / S.V. Khoronenkova, G.L. Dianov // *FEBS Lett.* – 2011. – V. 585. – № 18. – P. 2831-2835.
277. Kiianitsa, K. A rapid and sensitive assay for DNA-protein covalent complexes in living cells / K. Kiianitsa, N. Maizels // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – V. 41. – № 9. – P. e104.

278. Kim, G. FDA Approval Summary: Olaparib Monotherapy in Patients with Deleterious Germline BRCA-Mutated Advanced Ovarian Cancer Treated with Three or More Lines of Chemotherapy / G. Kim, G. Ison, A.E. McKee, H. Zhang, S. Tang, T. Gwise, R. Sridhara, E. Lee, A. Tzou, R. Philip, H.J. Chiu, T.K. Ricks, T. Palmby, A.M. Russell, G. Ladouceur, E. Pfuma, H. Li, L. Zhao, Q. Liu, R. Venugopal, A. Ibrahim, R. Pazdur // *Clin Cancer Res.* – 2015. – V. 21. – № 19. – P. 4257-4261.
279. Kim, H. Ubiquitin-binding protein RAP80 mediates BRCA1-dependent DNA damage response / H. Kim, J. Chen, X. Yu // *Science.* – 2007. – V. 316. – № 5828. – P. 1202-1205.
280. Kim, S.T. Substrate specificities and identification of putative substrates of ATM kinase family members / S.T. Kim, D.S. Lim, C.E. Canman, M.B. Kastan // *J Biol Chem.* – 1999. – V. 274. – № 53. – P. 37538-37543.
281. Kim, S.T. Photochemistry, photophysics, and mechanism of pyrimidine dimer repair by DNA photolyase / S.T. Kim, A. Sancar // *Photochem Photobiol.* – 1993. – V. 57. – № 5. – P. 895-904.
282. Kimura, H. A novel histone exchange factor, protein phosphatase 2Cgamma, mediates the exchange and dephosphorylation of H2A-H2B / H. Kimura, N. Takizawa, E. Allemand, T. Hori, F.J. Iborra, N. Nozaki, M. Muraki, M. Hagiwara, A.R. Krainer, T. Fukagawa, K. Okawa // *J Cell Biol.* – 2006. – V. 175. – № 3. – P. 389-400.
283. Klungland, A. Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1) / A. Klungland, T. Lindahl // *EMBO J.* – 1997. – V. 16. – № 11. – P. 3341-3348.
284. Koch, C.A. Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV / C.A. Koch, R. Agyei, S. Galicia, P. Metalnikov, P. O'Donnell, A. Starostine, M. Weinfeld, D. Durocher // *EMBO J.* – 2004. – V. 23. – № 19. – P. 3874-3885.
285. Komander, D. Breaking the chains: structure and function of the deubiquitinases / D. Komander, M.J. Clague, S. Urbe // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2009. – V. 10. – № 8. – P. 550-563.
286. Komander, D. The ubiquitin code / D. Komander, M. Rape // *Annu Rev Biochem.* – 2012. – V. 81. – P. 203-229.
287. Kon, N. Inactivation of HAUSP *in vivo* modulates p53 function / N. Kon, Y. Kobayashi, M. Li, C.L. Brooks, T. Ludwig, W. Gu // *Oncogene.* – 2010. – V. 29. – № 9. – P. 1270-1279.
288. Kon, N. Inactivation of *arf-bp1* induces p53 activation and diabetic phenotypes in mice / N. Kon, J. Zhong, L. Qiang, D. Accili, W. Gu // *J Biol Chem.* – 2012. – V. 287. – № 7. – P. 5102-5111.
289. Kozlov, S. ATP activates ataxia-telangiectasia mutated (ATM) *in vitro*. Importance of autophosphorylation / S. Kozlov, N. Gueven, K. Keating, J. Ramsay, M.F. Lavin // *J Biol Chem.* – 2003. – V. 278. – № 11. – P. 9309-9317.
290. Kozlov, S.V. Autophosphorylation and ATM activation: additional sites add to the complexity / S.V. Kozlov, M.E. Graham, B. Jakob, F. Tobias, A.W. Kijas, M. Tanuji, P. Chen, P.J. Robinson, G. Taucher-Scholz, K. Suzuki, S. So, D. Chen, M.F. Lavin // *J Biol Chem.* – 2011. – V. 286. – № 11. – P. 9107-9119.
291. Kozlov, S.V. Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation / S.V. Kozlov, M.E. Graham, C. Peng, P. Chen, P.J. Robinson, M.F. Lavin // *EMBO J.* – 2006. – V. 25. – № 15. – P. 3504-3514.
292. Kozlov, S.V. Reactive Oxygen Species (ROS)-Activated ATM-Dependent Phosphorylation of Cytoplasmic Substrates Identified by Large-Scale Phosphoproteomics Screen / S.V. Kozlov, A.J. Waardenberg, K. Engholm-Keller, J.W. Arthur, M.E. Graham, M. Lavin // *Mol Cell Proteomics.* – 2016. – V. 15. – № 3. – P. 1032-1047.
293. Kreutzer, D.A. Oxidized, deaminated cytosines are a source of C → T transitions *in vivo* / D.A. Kreutzer, J.M. Essigmann // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1998. – V. 95. – № 7. – P. 3578-3582.
294. Kruse, J.P. Modes of p53 regulation / J.P. Kruse, W. Gu // *Cell.* – 2009. – V. 137. – № 4. – P. 609-622.

295. Kubota, Y. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase  $\beta$  and the XRCC1 protein / Y. Kubota, R.A. Nash, A. Klungland, P. Schar, D.E. Barnes, T. Lindahl // *EMBO J.* – 1996. – V. 15. – № 23. – P. 6662-6670.
296. Kumar, A. ATR mediates a checkpoint at the nuclear envelope in response to mechanical stress / A. Kumar, M. Mazzanti, M. Mistrik, M. Kosar, G.V. Beznoussenko, A.A. Mironov, M. Garre, D. Parazzoli, G.V. Shivashankar, G. Scita, J. Bartek, M. Foiani // *Cell.* – 2014. – V. 158. – № 3. – P. 633-646.
297. Kuo, H.K. 5-Azacytidine induced methyltransferase-DNA adducts block DNA replication *in vivo* / H.K. Kuo, J.D. Griffith, K.N. Kreuzer // *Cancer Res.* – 2007. – V. 67. – № 17. – P. 8248-8254.
298. Kuzminov, A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks / A. Kuzminov // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2001. – V. 98. – № 15. – P. 8241-8246.
299. Kvam, E. Induction of oxidative DNA base damage in human skin cells by UV and near visible radiation / E. Kvam, R.M. Tyrrell // *Carcinogenesis.* – 1997. – V. 18. – № 12. – P. 2379-2384.
300. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – V. 227. – № 5259. – P. 680-685.
301. Lakin, N.D. Regulation of p53 in response to DNA damage / N.D. Lakin, S.P. Jackson // *Oncogene.* – 1999. – V. 18. – № 53. – P. 7644-7655.
302. Lakshmipathy, U. The human DNA ligase III gene encodes nuclear and mitochondrial proteins / U. Lakshmipathy, C. Campbell // *Mol Cell Biol.* – 1999. – V. 19. – № 5. – P. 3869-3876.
303. Lan, L. *In situ* analysis of repair processes for oxidative DNA damage in mammalian cells / L. Lan, S. Nakajima, Y. Oohata, M. Takao, S. Okano, M. Masutani, S.H. Wilson, A. Yasui // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2004. – V. 101. – № 38. – P. 13738-13743.
304. Landesman-Bollag, E. p53 deficiency and misexpression of protein kinase CK2 $\alpha$  collaborate in the development of thymic lymphomas in mice / E. Landesman-Bollag, P.L. Channavajhala, R.D. Cardiff, D.C. Seldin // *Oncogene.* – 1998. – V. 16. – № 23. – P. 2965-2974.
305. Landesman-Bollag, E. Protein kinase CK2 in mammary gland tumorigenesis / E. Landesman-Bollag, R. Romieu-Mourez, D.H. Song, G.E. Sonenshein, R.D. Cardiff, D.C. Seldin // *Oncogene.* – 2001. – V. 20. – № 25. – P. 3247-3257.
306. Lang, T. A DNA polymerase  $\beta$  mutant from colon cancer cells induces mutations / T. Lang, M. Maitra, D. Starcevic, S.X. Li, J.B. Sweasy // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2004. – V. 101. – № 16. – P. 6074-6079.
307. Langelier, M.F. PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1 / M.F. Langelier, A.A. Riccio, J.M. Pascal // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42. – № 12. – P. 7762-7775.
308. Langevin, F. Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice / F. Langevin, G.P. Crossan, I.V. Rosado, M.J. Arends, K.J. Patel // *Nature.* – 2011. – V. 475. – № 7354. – P. 53-58.
309. LaRocque, J.R. Interhomolog recombination and loss of heterozygosity in wild-type and Bloom syndrome helicase (BLM)-deficient mammalian cells / J.R. LaRocque, J.M. Stark, J. Oh, E. Bojilova, K. Yusa, K. Horie, J. Takeda, M. Jasin // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2011. – V. 108. – № 29. – P. 11971-11976.
310. Lau, W.C. Structure of the human dimeric ATM kinase / W.C. Lau, Y. Li, Z. Liu, Y. Gao, Q. Zhang, M.S. Huen // *Cell Cycle.* – 2016. – V. 15. – № 8. – P. 1117-1124.
311. Lavin, M.F. Functional consequences of sequence alterations in the *ATM* gene / M.F. Lavin, S. Scott, N. Gueven, S. Kozlov, C. Peng, P. Chen // *DNA Repair (Amst).* – 2004. – V. 3. – № 8-9. – P. 1197-1205.

312. Lazzerini-Denchi, E. Stop pulling my strings - what telomeres taught us about the DNA damage response / E. Lazzerini-Denchi, A. Sfeir // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2016. – V. 17. – № 6. – P. 364-378.
313. Lebedeva, N.A. AP-site cleavage activity of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 / N.A. Lebedeva, N.I. Rechkunova, O.I. Lavrik // *FEBS Lett.* – 2011. – V. 585. – № 4. – P. 683-686.
314. Lee, J.H. Regulation of Mre11/Rad50 by Nbs1: effects on nucleotide-dependent DNA binding and association with ataxia-telangiectasia-like disorder mutant complexes / J.H. Lee, R. Ghirlando, V. Bhaskara, M.R. Hoffmeyer, J. Gu, T.T. Paull // *J Biol Chem.* – 2003. – V. 278. – № 46. – P. 45171-45181.
315. Lee, J.H. Ataxia telangiectasia-mutated (ATM) kinase activity is regulated by ATP-driven conformational changes in the Mre11/Rad50/Nbs1 (MRN) complex / J.H. Lee, M.R. Mand, R.A. Deshpande, E. Kinoshita, S.H. Yang, C. Wyman, T.T. Paull // *J Biol Chem.* – 2013. – V. 288. – № 18. – P. 12840-12851.
316. Lee, J.H. Direct activation of the ATM protein kinase by the Mre11/Rad50/Nbs1 complex / J.H. Lee, T.T. Paull // *Science.* – 2004. – V. 304. – № 5667. – P. 93-96.
317. Lee, J.H. ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex / J.H. Lee, T.T. Paull // *Science.* – 2005. – V. 308. – № 5721. – P. 551-554.
318. Lehman, I.R. DNA ligase: structure, mechanism, and function / I.R. Lehman // *Science.* – 1974. – V. 186. – № 4166. – P. 790-797.
319. Lemons, J.M. Quiescent fibroblasts exhibit high metabolic activity / J.M. Lemons, X.J. Feng, B.D. Bennett, A. Legesse-Miller, E.L. Johnson, I. Raitman, E.A. Pollina, H.A. Rabitz, J.D. Rabinowitz, H.A. Collier // *PLoS Biol.* – 2010. – V. 8. – № 10. – P. e1000514.
320. Leppard, J.B. Physical and functional interaction between DNA ligase III $\alpha$  and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair / J.B. Leppard, Z. Dong, Z.B. Mackey, A.E. Tomkinson // *Mol Cell Biol.* – 2003. – V. 23. – № 16. – P. 5919-5927.
321. Levin, W. Tumorigenicity of optical isomers of the diastereomeric bay-region 3,4-diol-1,2-epoxides of benzo(c)phenanthrene in murine tumor models / W. Levin, R.L. Chang, A.W. Wood, D.R. Thakker, H. Yagi, D.M. Jerina, A.H. Conney // *Cancer Res.* – 1986. – V. 46. – № 5. – P. 2257-2261.
322. Levine, A.J. The first 30 years of p53: growing ever more complex / A.J. Levine, M. Oren // *Nat Rev Cancer.* – 2009. – V. 9. – № 10. – P. 749-758.
323. Lewis, S.M. The mechanism of V(D)J joining: lessons from molecular, immunological, and comparative analyses / S.M. Lewis // *Adv Immunol.* – 1994. – V. 56. – P. 27-150.
324. Li, M. A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway / M. Li, C.L. Brooks, N. Kon, W. Gu // *Mol Cell.* – 2004. – V. 13. – № 6. – P. 879-886.
325. Li, S. Functional link of BRCA1 and ataxia telangiectasia gene product in DNA damage response / S. Li, N.S. Ting, L. Zheng, P.L. Chen, Y. Ziv, Y. Shiloh, E.Y. Lee, W.H. Lee // *Nature.* – 2000. – V. 406. – № 6792. – P. 210-215.
326. Li, Z. USP4 inhibits p53 and NF- $\kappa$ B through deubiquitinating and stabilizing HDAC2 / Z. Li, Q. Hao, J. Luo, J. Xiong, S. Zhang, T. Wang, L. Bai, W. Wang, M. Chen, W. Wang, L. Gu, K. Lv, J. Chen // *Oncogene.* – 2016. – V. 35. – № 22. – P. 2902-2912.
327. Lin, C.P. A ubiquitin-proteasome pathway for the repair of topoisomerase I-DNA covalent complexes / C.P. Lin, Y. Ban, Y.L. Lyu, S.D. Desai, L.F. Liu // *J Biol Chem.* – 2008. – V. 283. – № 30. – P. 21074-21083.
328. Lin, F.L. Model for homologous recombination during transfer of DNA into mouse L cells: role for DNA ends in the recombination process / F.L. Lin, K. Sperle, N. Sternberg // *Mol Cell Biol.* – 1984. – V. 4. – № 6. – P. 1020-1034.



329. Lin, J. Several hydrophobic amino acids in the p53 amino-terminal domain are required for transcriptional activation, binding to mdm-2 and the adenovirus 5 E1B 55-kD protein / J. Lin, J. Chen, B. Elenbaas, A.J. Levine // *Genes Dev.* – 1994. – V. 8. – № 10. – P. 1235-1246.
330. Lin, W. Isolation and characterization of the cDNA encoding bovine poly(ADP-ribose) glycohydrolase / W. Lin, J.C. Ame, N. Aboul-Ela, E.L. Jacobson, M.K. Jacobson // *J Biol Chem.* – 1997. – V. 272. – № 18. – P. 11895-11901.
331. Lin, W.Y. Repair of chromosomal double-strand breaks by precise ligation in human cells / W.Y. Lin, J.H. Wilson, Y. Lin // *DNA Repair (Amst).* – 2013. – V. 12. – № 7. – P. 480-487.
332. Lindahl, T. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues / T. Lindahl // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1974. – V. 71. – № 9. – P. 3649-3653.
333. Lindahl, T. Instability and decay of the primary structure of DNA / T. Lindahl // *Nature.* – 1993. – V. 362. – № 6422. – P. 709-715.
334. Lindahl, T. New class of enzymes acting on damaged DNA / T. Lindahl // *Nature.* – 1976. – V. 259. – № 5538. – P. 64-66.
335. Lindahl, T. Heat-induced depyrimidination of deoxyribonucleic acid in neutral solution / T. Lindahl, O. Karlstrom // *Biochemistry.* – 1973. – V. 12. – № 25. – P. 5151-5154.
336. Lindahl, T. Heat-induced deamination of cytosine residues in deoxyribonucleic acid / T. Lindahl, B. Nyberg // *Biochemistry.* – 1974. – V. 13. – № 16. – P. 3405-3410.
337. Lindahl, T. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid / T. Lindahl, B. Nyberg // *Biochemistry.* – 1972. – V. 11. – № 19. – P. 3610-3618.
338. Lindahl, T. Regulation and expression of the adaptive response to alkylating agents / T. Lindahl, B. Sedgwick, M. Sekiguchi, Y. Nakabeppu // *Annu Rev Biochem.* – 1988. – V. 57. – P. 133-157.
339. Liu, Y. ATP-dependent DNA binding, unwinding, and resection by the Mre11/Rad50 complex / Y. Liu, S. Sung, Y. Kim, F. Li, G. Gwon, A. Jo, A.K. Kim, T. Kim, O.K. Song, S.E. Lee, Y. Cho // *EMBO J.* – 2016. – V. 35. – № 7. – P. 743-758.
340. Liu, Z. Characterization of E3Histone, a novel testis ubiquitin protein ligase which ubiquitinates histones / Z. Liu, R. Oughtred, S.S. Wing // *Mol Cell Biol.* – 2005. – V. 25. – № 7. – P. 2819-2831.
341. Llorca, O. Electron microscopy and 3D reconstructions reveal that human ATM kinase uses an arm-like domain to clamp around double-stranded DNA / O. Llorca, A. Rivera-Calzada, J. Grantham, K.R. Willison // *Oncogene.* – 2003. – V. 22. – № 25. – P. 3867-3874.
342. Loeb, L.A. Mutagenesis by apurinic/aprimidinic sites / L.A. Loeb, B.D. Preston // *Annu Rev Genet.* – 1986. – V. 20. – P. 201-230.
343. Loewer, A. Basal dynamics of p53 reveal transcriptionally attenuated pulses in cycling cells / A. Loewer, E. Batchelor, G. Gaglia, G. Lahav // *Cell.* – 2010. – V. 142. – № 1. – P. 89-100.
344. Loizou, J.I. The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks / J.I. Loizou, S.F. El-Khamisy, A. Zlatanou, D.J. Moore, D.W. Chan, J. Qin, S. Sarno, F. Meggio, L.A. Pinna, K.W. Caldecott // *Cell.* – 2004. – V. 117. – № 1. – P. 17-28.
345. Lou, Z. MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals / Z. Lou, K. Minter-Dykhouse, S. Franco, M. Gostissa, M.A. Rivera, A. Celeste, J.P. Manis, J. van Deursen, A. Nussenzweig, T.T. Paull, F.W. Alt, J. Chen // *Mol Cell.* – 2006. – V. 21. – № 2. – P. 187-200.
346. Louis-Bar, D. Sur un syndrome progressif comprenant des télangiectasies capillaires cutanées et conjonctivales symétriques, à disposition naevoïde et des troubles cérébelleux / D. Louis-Bar // *Confinia Neurologica* – 1941. – V. 4. – P. 32-42.

347. Lu, X. The type 2C phosphatase Wip1: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways / X. Lu, T.A. Nguyen, S.H. Moon, Y. Darlington, M. Sommer, L.A. Donehower // *Cancer Metastasis Rev.* – 2008. – V. 27. – № 2. – P. 123-135.
348. Lukas, C. 53BP1 nuclear bodies form around DNA lesions generated by mitotic transmission of chromosomes under replication stress / C. Lukas, V. Savic, S. Bekker-Jensen, C. Doil, B. Neumann, R.S. Pedersen, M. Grofte, K.L. Chan, I.D. Hickson, J. Bartek, J. Lukas // *Nat Cell Biol.* – 2011. – V. 13. – № 3. – P. 243-253.
349. Lukas, J. More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance / J. Lukas, C. Lukas, J. Bartek // *Nat Cell Biol.* – 2011. – V. 13. – № 10. – P. 1161-1169.
350. Lundin, C. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable in vivo DNA double-strand breaks / C. Lundin, M. North, K. Erixon, K. Walters, D. Jenssen, A.S. Goldman, T. Helleday // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33. – № 12. – P. 3799-3811.
351. Luo, H. A new XRCC1-containing complex and its role in cellular survival of methyl methanesulfonate treatment / H. Luo, D.W. Chan, T. Yang, M. Rodriguez, B.P. Chen, M. Leng, J.J. Mu, D. Chen, Z. Songyang, Y. Wang, J. Qin // *Mol Cell Biol.* – 2004. – V. 24. – № 19. – P. 8356-8365.
352. Ma, Y. Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination / Y. Ma, U. Pannicke, K. Schwarz, M.R. Lieber // *Cell.* – 2002. – V. 108. – № 6. – P. 781-794.
353. Macrae, C.J. APLF (C2orf13) facilitates nonhomologous end-joining and undergoes ATM-dependent hyperphosphorylation following ionizing radiation / C.J. Macrae, R.D. McCulloch, J. Ylanko, D. Durocher, C.A. Koch // *DNA Repair (Amst).* – 2008. – V. 7. – № 2. – P. 292-302.
354. Maga, G. 8-oxo-guanine bypass by human DNA polymerases in the presence of auxiliary proteins / G. Maga, G. Villani, E. Crespan, U. Wimmer, E. Ferrari, B. Bertocci, U. Hubscher // *Nature.* – 2007. – V. 447. – № 7144. – P. 606-608.
355. Magana-Schwencke, N. The fate of 8-methoxypsoralen photoinduced crosslinks in nuclear and mitochondrial yeast DNA: comparison of wild-type and repair-deficient strains / N. Magana-Schwencke, J.A. Henriques, R. Chanet, E. Moustacchi // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1982. – V. 79. – № 6. – P. 1722-1726.
356. Mahajan K.N., Association of DNA polymerase  $\mu$  (pol  $\mu$ ) with Ku and ligase IV: role for pol  $\mu$  in end-joining double-strand break repair / K.N. Mahajan, S.A. Nick McElhinny, B.S. Mitchell, D.A. Ramsden // *Mol Cell Biol.* – 2002. – V. 22. – № 14. – P. 5194-5202.
357. Mahaney, B.L. XRCC4 and XLF form long helical protein filaments suitable for DNA end protection and alignment to facilitate DNA double strand break repair / B.L. Mahaney, M. Hammel, K. Meek, J.A. Tainer, S.P. Lees-Miller // *Biochem Cell Biol.* – 2013. – V. 91. – № 1. – P. 31-41.
358. Mailand, N. RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins / N. Mailand, S. Bekker-Jensen, H. Faustrup, F. Melander, J. Bartek, C. Lukas, J. Lukas // *Cell.* – 2007. – V. 131. – № 5. – P. 887-900.
359. Malkova, A. Double-strand break repair in the absence of RAD51 in yeast: a possible role for break-induced DNA replication / A. Malkova, E.L. Ivanov, J.E. Haber // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1996. – V. 93. – № 14. – P. 7131-7136.
360. Mani, R.S. XRCC1 stimulates polynucleotide kinase by enhancing its damage discrimination and displacement from DNA repair intermediates / R.S. Mani, M. Fanta, F. Karimi-Busheri, E. Silver, C.A. Virgen, K.W. Caldecott, C.E. Cass, M. Weinfeld // *J Biol Chem.* – 2007. – V. 282. – № 38. – P. 28004-28013.
361. Mani, R.S. Dual modes of interaction between XRCC4 and polynucleotide kinase/phosphatase: implications for nonhomologous end joining / R.S. Mani, Y. Yu, S. Fang, M. Lu, M. Fanta, A.E.

- Zolner, N. Tahbaz, D.A. Ramsden, D.W. Litchfield, S.P. Lees-Miller, M. Weinfeld // *J Biol Chem.* – 2010. – V. 285. – № 48. – P. 37619-37629.
362. Mann, H.B. On a test of whether one of two random variables is stochastically larger than the other / H.B. Mann, D.R. Whitney // *Ann Math Stat.* – 1947. – V. 18. – № 1. – P. 50-60.
363. Markkanen, E. Cells deficient in base-excision repair reveal cancer hallmarks originating from adjustments to genetic instability / E. Markkanen, R. Fischer, M. Ledentcova, B.M. Kessler, G.L. Dianov // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43. – № 7. – P. 3667-3679.
364. Markkanen, E. Ubiquitylation of DNA polymerase  $\lambda$  / E. Markkanen, B. van Loon, E. Ferrari, U. Hubscher // *FEBS Lett.* – 2011. – V. 585. – № 18. – P. 2826-2830.
365. Masson, M. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage / M. Masson, C. Niedergang, V. Schreiber, S. Muller, J. Menissier-de Murcia, G. de Murcia // *Mol Cell Biol.* – 1998. – V. 18. – № 6. – P. 3563-3571.
366. Masutani, C. Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase  $\eta$  / C. Masutani, R. Kusumoto, S. Iwai, F. Hanaoka // *EMBO J.* – 2000. – V. 19. – № 12. – P. 3100-3109.
367. Mateo, J. DNA-Repair Defects and Olaparib in Metastatic Prostate Cancer / J. Mateo, S. Carreira, S. Sandhu, S. Miranda, H. Mossop, R. Perez-Lopez, D. Nava Rodrigues, D. Robinson, A. Omlin, N. Tunariu, G. Boysen, N. Porta, P. Flohr, A. Gillman, I. Figueiredo, C. Paulding, G. Seed, S. Jain, C. Ralph, A. Protheroe, S. Hussain, R. Jones, T. Elliott, U. McGovern, D. Bianchini, J. Goodall, Z. Zafeiriou, C.T. Williamson, R. Ferraldeschi, R. Riisnaes, B. Ebbs, G. Fowler, D. Roda, W. Yuan, Y.M. Wu, X. Cao, R. Brough, H. Pemberton, R. A'Hern, A. Swain, L.P. Kunju, R. Eeles, G. Attard, C.J. Lord, A. Ashworth, M.A. Rubin, K.E. Knudsen, F.Y. Feng, A.M. Chinnaiyan, E. Hall, J.S. de Bono // *N Engl J Med.* – 2015. – V. 373. – № 18. – P. 1697-1708.
368. Mateos-Gomez, P.A. Mammalian polymerase  $\theta$  promotes alternative NHEJ and suppresses recombination / P.A. Mateos-Gomez, F. Gong, N. Nair, K.M. Miller, E. Lazzerini-Denchi, A. Sfeir // *Nature.* – 2015. – V. 518. – № 7538. – P. 254-257.
369. Mathis, G. Release of core DNA from nucleosomal core particles following (ADP-ribose)-modification in vitro / G. Mathis, F.R. Althaus // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1987. – V. 143. – № 3. – P. 1049-1054.
370. Matos, J. Regulatory control of the resolution of DNA recombination intermediates during meiosis and mitosis / J. Matos, M.G. Blanco, S. Maslen, J.M. Skehel, S.C. West // *Cell.* – 2011. – V. 147. – № 1. – P. 158-172.
371. Matsumoto, Y. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase  $\beta$  during DNA repair / Y. Matsumoto, K. Kim // *Science.* – 1995. – V. 269. – № 5224. – P. 699-702.
372. Matsumoto, Y. Proliferating cell nuclear antigen-dependent abasic site repair in *Xenopus laevis* oocytes: an alternative pathway of base excision DNA repair / Y. Matsumoto, K. Kim, D.F. Bogenhagen // *Mol Cell Biol.* – 1994. – V. 14. – № 9. – P. 6187-6197.
373. Matsuoka, S. ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage / S. Matsuoka, B.A. Ballif, A. Smogorzewska, E.R. McDonald, 3rd, K.E. Hurov, J. Luo, C.E. Bakalarski, Z. Zhao, N. Solimini, Y. Lerenthal, Y. Shiloh, S.P. Gygi, S.J. Elledge // *Science.* – 2007. – V. 316. – № 5828. – P. 1160-1166.
374. Maynard, S. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging / S. Maynard, S.H. Schurman, C. Harboe, N.C. de Souza-Pinto, V.A. Bohr // *Carcinogenesis.* – 2009. – V. 30. – № 1. – P. 2-10.
375. Mazur, M. Sequence specificity of mutations induced by benzo[a]pyrene-7,8-diol-9,10-epoxide at endogenous *aprt* gene in CHO cells / M. Mazur, B.W. Glickman // *Somat Cell Mol Genet.* – 1988. – V. 14. – № 4. – P. 393-400.
376. McCarthy, J.G. Inducible repair of phosphotriesters in *Escherichia coli* / J.G. McCarthy, B.V. Edington, P.F. Schendel // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1983. – V. 80. – № 24. – P. 7380-7384.

377. McIlwraith, M.J. Human DNA polymerase  $\eta$  promotes DNA synthesis from strand invasion intermediates of homologous recombination / M.J. McIlwraith, A. Vaisman, Y. Liu, E. Fanning, R. Woodgate, S.C. West // *Mol Cell*. – 2005. – V. 20. – № 5. – P. 783-792.
378. McKinnon, P.J. ATM and ataxia telangiectasia / P.J. McKinnon // *EMBO Rep*. – 2004. – V. 5. – № 8. – P. 772-776.
379. Meek, D.W. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? / D.W. Meek // *Nat Rev Cancer*. – 2009. – V. 9. – № 10. – P. 714-723.
380. Meek, D.W. The p53 tumour suppressor protein is phosphorylated at serine 389 by casein kinase II / D.W. Meek, S. Simon, U. Kikkawa, W. Eckhart // *EMBO J*. – 1990. – V. 9. – № 10. – P. 3253-3260.
381. Meggio, F. One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2? / F. Meggio, L.A. Pinna // *FASEB J*. – 2003. – V. 17. – № 3. – P. 349-368.
382. Melander, F. Phosphorylation of SDT repeats in the MDC1 N terminus triggers retention of NBS1 at the DNA damage-modified chromatin / F. Melander, S. Bekker-Jensen, J. Falck, J. Bartek, N. Mailand, J. Lukas // *J Cell Biol*. – 2008. – V. 181. – № 2. – P. 213-226.
383. Mendoza-Alvarez, H. Regulation of p53 sequence-specific DNA-binding by covalent poly(ADP-ribosylation) / H. Mendoza-Alvarez, R. Alvarez-Gonzalez // *J Biol Chem*. – 2001. – V. 276. – № 39. – P. 36425-36430.
384. Menendez, D. The expanding universe of p53 targets / D. Menendez, A. Inga, M.A. Resnick // *Nat Rev Cancer*. – 2009. – V. 9. – № 10. – P. 724-737.
385. Mercer, W.E. Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53 / W.E. Mercer, M.T. Shields, M. Amin, G.J. Sauve, E. Appella, J.W. Romano, S.J. Ullrich // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1990. – V. 87. – № 16. – P. 6166-6170.
386. Meulmeester, E. Loss of HAUSP-mediated deubiquitination contributes to DNA damage-induced destabilization of Hdmx and Hdm2 / E. Meulmeester, M.M. Maurice, C. Boutell, A.F. Teunisse, H. Ovaa, T.E. Abraham, R.W. Dirks, A.G. Jochemsen // *Mol Cell*. – 2005. – V. 18. – № 5. – P. 565-576.
387. Michalovitz, D. Conditional inhibition of transformation and of cell proliferation by a temperature-sensitive mutant of p53 / D. Michalovitz, O. Halevy, M. Oren // *Cell*. – 1990. – V. 62. – № 4. – P. 671-680.
388. Michel, B. DNA double-strand breaks caused by replication arrest / B. Michel, S.D. Ehrlich, M. Uzest // *EMBO J*. – 1997. – V. 16. – № 2. – P. 430-438.
389. Ming, M. PTEN in DNA damage repair / M. Ming, Y.Y. He // *Cancer Lett*. – 2012. – V. 319. – № 2. – P. 125-129.
390. Miyashita, T. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human *bax* gene / T. Miyashita, J.C. Reed // *Cell*. – 1995. – V. 80. – № 2. – P. 293-299.
391. Mol, C.D. DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination [corrected] / C.D. Mol, T. Izumi, S. Mitra, J.A. Tainer // *Nature*. – 2000. – V. 403. – № 6768. – P. 451-456.
392. Montenarh, M. Cellular regulators of protein kinase CK2 / M. Montenarh // *Cell Tissue Res*. – 2010. – V. 342. – № 2. – P. 139-146.
393. Montesano, R. Mutagenic and carcinogenic N-nitroso compounds: possible environmental hazards / R. Montesano, H. Bartsch // *Mutat Res*. – 1976. – V. 32. – № 3-4. – P. 179-228.
394. Moreira, M.C. The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin / M.C. Moreira, C. Barbot, N. Tachi, N. Kozuka, E. Uchida, T. Gibson, P. Mendonca, M. Costa, J. Barros, T. Yanagisawa, M. Watanabe, Y. Ikeda, M. Aoki, T. Nagata, P. Coutinho, J. Sequeiros, M. Koenig // *Nat Genet*. – 2001. – V. 29. – № 2. – P. 189-193.

395. Morin, P.J. Activation of  $\beta$ -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in  $\beta$ -catenin or APC / P.J. Morin, A.B. Sparks, V. Korinek, N. Barker, H. Clevers, B. Vogelstein, K.W. Kinzler // *Science*. – 1997. – V. 275. – № 5307. – P. 1787-1790.
396. Motycka, T.A. Physical and functional interaction between the XPF/ERCC1 endonuclease and hRad52 / T.A. Motycka, T. Bessho, S.M. Post, P. Sung, A.E. Tomkinson // *J Biol Chem*. – 2004. – V. 279. – № 14. – P. 13634-13639.
397. Mueller, T.D. Solution structures of UBA domains reveal a conserved hydrophobic surface for protein-protein interactions / T.D. Mueller, J. Feigon // *J Mol Biol*. – 2002. – V. 319. – № 5. – P. 1243-1255.
398. Mullins, E.A. The DNA glycosylase AlkD uses a non-base-flipping mechanism to excise bulky lesions / E.A. Mullins, R. Shi, Z.D. Parsons, P.K. Yuen, S.S. David, Y. Igarashi, B.F. Eichman // *Nature*. – 2015. – V. 527. – № 7577. – P. 254-258.
399. Myant, K.B. HUWE1 is a critical colonic tumour suppressor gene that prevents MYC signalling, DNA damage accumulation and tumour initiation / K.B. Myant, P. Cammareri, M.C. Hodder, J. Wills, A. Von Kriegsheim, B. Gyroffy, M. Rashid, S. Polo, E. Maspero, L. Vaughan, B. Gurung, E. Barry, A. Malliri, F. Camargo, D.J. Adams, A. Iavarone, A. Lasorella, O.J. Sansom // *EMBO Mol Med*. – 2017. – V. 9. – № 2. – P. 181-197.
400. Nakamura, J. Quantitation of intracellular NAD(P)H can monitor an imbalance of DNA single strand break repair in base excision repair deficient cells in real time / J. Nakamura, S. Asakura, S.D. Hester, G. de Murcia, K.W. Caldecott, J.A. Swenberg // *Nucleic Acids Res*. – 2003. – V. 31. – № 17. – P. e104.
401. Nakano, T. Homologous recombination but not nucleotide excision repair plays a pivotal role in tolerance of DNA-protein cross-links in mammalian cells / T. Nakano, A. Katafuchi, M. Matsubara, H. Terato, T. Tsuboi, T. Masuda, T. Tatsumoto, S.P. Pack, K. Makino, D.L. Croteau, B. Van Houten, K. Iijima, H. Tauchi, H. Ide // *J Biol Chem*. – 2009. – V. 284. – № 40. – P. 27065-27076.
402. Nakayama, K.I. Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer / K.I. Nakayama, K. Nakayama // *Nat Rev Cancer*. – 2006. – V. 6. – № 5. – P. 369-381.
403. Naslund, M. S-adenosylmethionine, an endogenous alkylating agent / M. Naslund, D. Segerback, A. Kolman // *Mutat Res*. – 1983. – V. 119. – № 3. – P. 229-232.
404. Nassif, N. Efficient copying of nonhomologous sequences from ectopic sites via P-element-induced gap repair / N. Nassif, J. Penney, S. Pal, W.R. Engels, G.B. Gloor // *Mol Cell Biol*. – 1994. – V. 14. – № 3. – P. 1613-1625.
405. Natarajan, A.T. Mechanisms for chromosomal aberrations in mammalian cells / A.T. Natarajan, T.S. Zwanenburg // *Mutat Res*. – 1982. – V. 95. – № 1. – P. 1-6.
406. Nath, R.G. 1,N<sup>2</sup>-propanodeoxyguanosine adducts: potential new biomarkers of smoking-induced DNA damage in human oral tissue / R.G. Nath, J.E. Ocando, J.B. Guttenplan, F.L. Chung // *Cancer Res*. – 1998. – V. 58. – № 4. – P. 581-584.
407. Nick McElhinny, S.A. A gradient of template dependence defines distinct biological roles for family X polymerases in nonhomologous end joining / S.A. Nick McElhinny, J.M. Havener, M. Garcia-Diaz, R. Juarez, K. Bebenek, B.L. Kee, L. Blanco, T.A. Kunkel, D.A. Ramsden // *Mol Cell*. – 2005. – V. 19. – № 3. – P. 357-366.
408. Nick McElhinny, S.A. Ku recruits the XRCC4-ligase IV complex to DNA ends / S.A. Nick McElhinny, C.M. Snowden, J. McCarville, D.A. Ramsden // *Mol Cell Biol*. – 2000. – V. 20. – № 9. – P. 2996-3003.
409. Obe, G. DNA double-strand breaks induced by sparsely ionizing radiation and endonucleases as critical lesions for cell death, chromosomal aberrations, mutations and oncogenic transformation / G. Obe, C. Johannes, D. Schulte-Frohlinde // *Mutagenesis*. – 1992. – V. 7. – № 1. – P. 3-12.

410. Obeid, R. The metabolic burden of methyl donor deficiency with focus on the betaine homocysteine methyltransferase pathway / R. Obeid // *Nutrients*. – 2013. – V. 5. – № 9. – P. 3481-3495.
411. Ochi, T. DNA repair. PAXX, a paralog of XRCC4 and XLF, interacts with Ku to promote DNA double-strand break repair / T. Ochi, A.N. Blackford, J. Coates, S. Jhujh, S. Mehmood, N. Tamura, J. Travers, Q. Wu, V.M. Draviam, C.V. Robinson, T.L. Blundell, S.P. Jackson // *Science*. – 2015. – V. 347. – № 6218. – P. 185-188.
412. Oei, S.L. ATP for the DNA ligation step in base excision repair is generated from poly(ADP-ribose) / S.L. Oei, M. Ziegler // *J Biol Chem*. – 2000. – V. 275. – № 30. – P. 23234-23239.
413. Ohba, M. Production of hydrogen peroxide by transforming growth factor-beta 1 and its involvement in induction of egr-1 in mouse osteoblastic cells / M. Ohba, M. Shibanuma, T. Kuroki, K. Nose // *J Cell Biol*. – 1994. – V. 126. – № 4. – P. 1079-1088.
414. Olive, P.L. Detection of DNA double-strand breaks through the cell cycle after exposure to X-rays, bleomycin, etoposide and 125IdUrd / P.L. Olive, J.P. Banath // *Int J Radiat Biol*. – 1993. – V. 64. – № 4. – P. 349-358.
415. Olive, P.L. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells / P.L. Olive, J.P. Banath // *Nat Protoc*. – 2006. – V. 1. – № 1. – P. 23-29.
416. Olsen, B.B. Protein kinase CK2 localizes to sites of DNA double-strand break regulating the cellular response to DNA damage / B.B. Olsen, S.Y. Wang, T.H. Svenstrup, B.P. Chen, B. Guerra // *BMC Mol Biol*. – 2012. – V. 13. – P. 7.
417. Olsson, M. Repair of alkylated DNA in *Escherichia coli*. Methyl group transfer from O<sup>6</sup>-methylguanine to a protein cysteine residue / M. Olsson, T. Lindahl // *J Biol Chem*. – 1980. – V. 255. – № 22. – P. 10569-10571.
418. Orii, K.E. Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development / K.E. Orii, Y. Lee, N. Kondo, P.J. McKinnon // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2006. – V. 103. – № 26. – P. 10017-10022.
419. Orlando, G. ARF induction in response to DNA strand breaks is regulated by PARP1 / G. Orlando, S.V. Khoronenkova, Dianova, II, J.L. Parsons, G.L. Dianov // *Nucleic Acids Res*. – 2014. – V. 42. – № 4. – P. 2320-2329.
420. Pandya, R.K. A structural element within the HUWE1 HECT domain modulates self-ubiquitination and substrate ubiquitination activities / R.K. Pandya, J.R. Partridge, K.R. Love, T.U. Schwartz, H.L. Ploegh // *J Biol Chem*. – 2010. – V. 285. – № 8. – P. 5664-5673.
421. Papp, S.J. DNA damage shifts circadian clock time via Hausp-dependent Cry1 stabilization / S.J. Papp, A.L. Huber, S.D. Jordan, A. Kriebs, M. Nguyen, J.J. Moresco, J.R. Yates, K.A. Lamia // *Elife*. – 2015. – V. 4.
422. Paques, F. Two pathways for removal of nonhomologous DNA ends during double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae* / F. Paques, J.E. Haber // *Mol Cell Biol*. – 1997. – V. 17. – № 11. – P. 6765-6771.
423. Park, J.J. Annexin-1 regulated by HAUSP is essential for UV-induced damage response / J.J. Park, K.H. Lim, K.H. Baek // *Cell Death Dis*. – 2015. – V. 6. – P. e1654.
424. Parlanti, E. Human base excision repair complex is physically associated to DNA replication and cell cycle regulatory proteins / E. Parlanti, G. Locatelli, G. Maga, E. Dogliotti // *Nucleic Acids Res*. – 2007. – V. 35. – № 5. – P. 1569-1577.
425. Parsons, J.L. Co-ordination of base excision repair and genome stability / J.L. Parsons, G.L. Dianov // *DNA Repair (Amst)*. – 2013. – V. 12. – № 5. – P. 326-333.
426. Parsons, J.L. DNA polymerase  $\beta$  promotes recruitment of DNA ligase III $\alpha$ -XRCC1 to sites of base excision repair / J.L. Parsons, Dianova, II, S.L. Allinson, G.L. Dianov // *Biochemistry*. – 2005a. – V. 44. – № 31. – P. 10613-10619.

427. Parsons, J.L. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 protects excessive DNA strand breaks from deterioration during repair in human cell extracts / J.L. Parsons, Dianova, II, S.L. Allinson, G.L. Dianov // *FEBS J.* – 2005b. – V. 272. – № 8. – P. 2012-2021.
428. Parsons, J.L. End-damage-specific proteins facilitate recruitment or stability of X-ray cross-complementing protein 1 at the sites of DNA single-strand break repair / J.L. Parsons, Dianova, II, E. Boswell, M. Weinfeld, G.L. Dianov // *FEBS J.* – 2005c. – V. 272. – № 22. – P. 5753-5763.
429. Parsons, J.L. XRCC1 phosphorylation by CK2 is required for its stability and efficient DNA repair / J.L. Parsons, Dianova, II, D. Finch, P.S. Tait, C.E. Strom, T. Helleday, G.L. Dianov // *DNA Repair (Amst).* – 2010. – V. 9. – № 7. – P. 835-841.
430. Parsons, J.L. USP47 is a deubiquitylating enzyme that regulates base excision repair by controlling steady-state levels of DNA polymerase  $\beta$  / J.L. Parsons, Dianova, II, S.V. Khoronenkova, M.J. Edelmann, B.M. Kessler, G.L. Dianov // *Mol Cell.* – 2011. – V. 41. – № 5. – P. 609-615.
431. Parsons, J.L. CHIP-mediated degradation and DNA damage-dependent stabilization regulate base excision repair proteins / J.L. Parsons, P.S. Tait, D. Finch, Dianova, II, S.L. Allinson, G.L. Dianov // *Mol Cell.* – 2008. – V. 29. – № 4. – P. 477-487.
432. Parsons, J.L. Ubiquitin ligase ARF-BP1/Mule modulates base excision repair / J.L. Parsons, P.S. Tait, D. Finch, Dianova, II, M.J. Edelmann, S.V. Khoronenkova, B.M. Kessler, R.A. Sharma, W.G. McKenna, G.L. Dianov // *EMBO J.* – 2009. – V. 28. – № 20. – P. 3207-3215.
433. Paula-Barbosa, M.M. Cerebellar cortex ultrastructure in ataxia-telangiectasia / M.M. Paula-Barbosa, C. Ruela, M.A. Tavares, C. Pontes, A. Saraiva, C. Cruz // *Ann Neurol.* – 1983. – V. 13. – № 3. – P. 297-302.
434. Paull, T.T. Mechanisms of ATM Activation / T.T. Paull // *Annu Rev Biochem.* – 2015. – V. 84. – P. 711-738.
435. Pellegrini, M. Autophosphorylation at serine 1987 is dispensable for murine Atm activation *in vivo* / M. Pellegrini, A. Celeste, S. Difilippantonio, R. Guo, W. Wang, L. Feigenbaum, A. Nussenzweig // *Nature.* – 2006. – V. 443. – № 7108. – P. 222-225.
436. Petri, S. Dephosphorylation of survival motor neurons (SMN) by PPM1G/PP2C $\gamma$  governs Cajal body localization and stability of the SMN complex / S. Petri, M. Grimmler, S. Over, U. Fischer, O.J. Gruss // *J Cell Biol.* – 2007. – V. 179. – № 3. – P. 451-465.
437. Pinna, L.A. The raison d'etre of constitutively active protein kinases: the lesson of CK2 / L.A. Pinna // *Acc Chem Res.* – 2003. – V. 36. – № 6. – P. 378-384.
438. Pizarro, J.G. Oxidative stress-induced DNA damage and cell cycle regulation in B65 dopaminergic cell line / J.G. Pizarro, J. Folch, A. Vazquez De la Torre, E. Verdaguer, F. Junyent, J. Jordan, M. Pallas, A. Camins // *Free Radic Res.* – 2009. – V. 43. – № 10. – P. 985-994.
439. Pleschke, J.M. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins / J.M. Pleschke, H.E. Kleczkowska, M. Strohm, F.R. Althaus // *J Biol Chem.* – 2000. – V. 275. – № 52. – P. 40974-40980.
440. Plo, I. Association of XRCC1 and tyrosyl DNA phosphodiesterase (Tdp1) for the repair of topoisomerase I-mediated DNA lesions / I. Plo, Z.Y. Liao, J.M. Barcelo, G. Kohlhagen, K.W. Caldecott, M. Weinfeld, Y. Pommier // *DNA Repair (Amst).* – 2003. – V. 2. – № 10. – P. 1087-1100.
441. Poirier, G.G. Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure / G.G. Poirier, G. de Murcia, J. Jongstra-Bilen, C. Niedergang, P. Mandel // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1982. – V. 79. – № 11. – P. 3423-3427.
442. Poletto, M. p53 coordinates base excision repair to prevent genomic instability / M. Poletto, A.J. Legrand, S.C. Fletcher, G.L. Dianov // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44. – № 7. – P. 3165-3175.
443. Pommier, Y. Repair of and checkpoint response to topoisomerase I-mediated DNA damage / Y. Pommier, C. Redon, V.A. Rao, J.A. Seiler, O. Sordet, H. Takemura, S. Antony, L. Meng, Z. Liao, G. Kohlhagen, H. Zhang, K.W. Kohn // *Mutat Res.* – 2003. – V. 532. – № 1-2. – P. 173-203.

444. Pouliot, J.J. Yeast gene for a Tyr-DNA phosphodiesterase that repairs topoisomerase I complexes / J.J. Pouliot, K.C. Yao, C.A. Robertson, H.A. Nash // *Science*. – 1999. – V. 286. – № 5439. – P. 552-555.
445. Pourquier, P. Effects of uracil incorporation, DNA mismatches, and abasic sites on cleavage and religation activities of mammalian topoisomerase I / P. Pourquier, L.M. Ueng, G. Kohlhagen, A. Mazumder, M. Gupta, K.W. Kohn, Y. Pommier // *J Biol Chem*. – 1997. – V. 272. – № 12. – P. 7792-7796.
446. Povirk, L.F. Processing of 3'-phosphoglycolate-terminated DNA double strand breaks by Artemis nuclease / L.F. Povirk, T. Zhou, R. Zhou, M.J. Cowan, S.M. Yannone // *J Biol Chem*. – 2007. – V. 282. – № 6. – P. 3547-3558.
447. Prasad, R. DNA polymerase  $\beta$ -mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose)polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis / R. Prasad, O.I. Lavrik, S.J. Kim, P. Kedar, X.P. Yang, B.J. Vande Berg, S.H. Wilson // *J Biol Chem*. – 2001. – V. 276. – № 35. – P. 32411-32414.
448. Prasad, R. Substrate channeling in mammalian base excision repair pathways: passing the baton / R. Prasad, D.D. Shock, W.A. Beard, S.H. Wilson // *J Biol Chem*. – 2010. – V. 285. – № 52. – P. 40479-40488.
449. Prasad, R. Specific interaction of DNA polymerase  $\beta$  and DNA ligase I in a multiprotein base excision repair complex from bovine testis / R. Prasad, R.K. Singhal, D.K. Srivastava, J.T. Molina, A.E. Tomkinson, S.H. Wilson // *J Biol Chem*. – 1996. – V. 271. – № 27. – P. 16000-16007.
450. Preussmann, R. Carcinogenic *N*-nitroso compounds and their environmental significance / R. Preussmann // *Naturwissenschaften*. – 1984. – V. 71. – № 1. – P. 25-30.
451. Qi, Y. Strandwise translocation of a DNA glycosylase on undamaged DNA / Y. Qi, K. Nam, M.C. Spong, A. Banerjee, R.J. Sung, M. Zhang, M. Karplus, G.L. Verdine // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2012. – V. 109. – № 4. – P. 1086-1091.
452. Quek, H. A rat model of ataxia-telangiectasia: evidence for a neurodegenerative phenotype / H. Quek, J. Luff, K. Cheung, S. Kozlov, M. Gatei, C.S. Lee, M.C. Bellingham, P.G. Noakes, Y.C. Lim, N.L. Barnett, S. Dingwall, E. Wolvetang, T. Mashimo, T.L. Roberts, M.F. Lavin // *Hum Mol Genet*. – 2016a.
453. Quek, H. Rats with a missense mutation in *Atm* display neuroinflammation and neurodegeneration subsequent to accumulation of cytosolic DNA following unrepaired DNA damage / H. Quek, J. Luff, K. Cheung, S. Kozlov, M. Gatei, C.S. Lee, M.C. Bellingham, P.G. Noakes, Y.C. Lim, N.L. Barnett, S. Dingwall, E. Wolvetang, T. Mashimo, T.L. Roberts, M.F. Lavin // *J Leukoc Biol*. – 2016b.
454. Ranalli, T.A. AP endonuclease 1 coordinates flap endonuclease 1 and DNA ligase I activity in long patch base excision repair / T.A. Ranalli, S. Tom, R.A. Bambara // *J Biol Chem*. – 2002. – V. 277. – № 44. – P. 41715-41724.
455. Rass, U. Actions of aprataxin in multiple DNA repair pathways / U. Rass, I. Ahel, S.C. West // *J Biol Chem*. – 2007. – V. 282. – № 13. – P. 9469-9474.
456. Ravanat, J.L. Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up / J.L. Ravanat, T. Douki, P. Duez, E. Gremaud, K. Herbert, T. Hofer, L. Lasserre, C. Saint-Pierre, A. Favier, J. Cadet // *Carcinogenesis*. – 2002. – V. 23. – № 11. – P. 1911-1918.
457. Realini, C.A. Histone shuttling by poly(ADP-ribosylation) / C.A. Realini, F.R. Althaus // *J Biol Chem*. – 1992. – V. 267. – № 26. – P. 18858-18865.
458. Reddy, B.A. Nucleotide biosynthetic enzyme GMP synthase is a TRIM21-controlled relay of p53 stabilization / B.A. Reddy, J.A. van der Knaap, A.G. Bot, A. Mohd-Sarip, D.H. Dekkers, M.A.



- Timmermans, J.W. Martens, J.A. Demmers, C.P. Verrijzer // *Mol Cell*. – 2014. – V. 53. – № 3. – P. 458-470.
459. Reichenbach, J. Elevated oxidative stress in patients with ataxia telangiectasia / J. Reichenbach, R. Schubert, D. Schindler, K. Muller, H. Bohles, S. Zielen // *Antioxid Redox Signal*. – 2002. – V. 4. – № 3. – P. 465-469.
460. Reliene, R. Antioxidants suppress lymphoma and increase longevity in Atm-deficient mice / R. Reliene, R.H. Schiestl // *J Nutr*. – 2007. – V. 137. – № 1 Suppl. – P. 229S-232S.
461. Reynolds, J.J. Defective DNA ligation during short-patch single-strand break repair in ataxia oculomotor apraxia 1 / J.J. Reynolds, S.F. El-Khamisy, S. Katyal, P. Clements, P.J. McKinnon, K.W. Caldecott // *Mol Cell Biol*. – 2009. – V. 29. – № 5. – P. 1354-1362.
462. Rice, P.A. Holding damaged DNA together / P.A. Rice // *Nat Struct Biol*. – 1999. – V. 6. – № 9. – P. 805-806.
463. Riley, M.F. The Many Faces of MDM2 Binding Partners / M.F. Riley, G. Lozano // *Genes Cancer*. – 2012. – V. 3. – № 3-4. – P. 226-239.
464. Riley, P.A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation / P.A. Riley // *Int J Radiat Biol*. – 1994. – V. 65. – № 1. – P. 27-33.
465. Ringshausen, I. Mdm2 is critically and continuously required to suppress lethal p53 activity *in vivo* / I. Ringshausen, C.C. O'Shea, A.J. Finch, L.B. Swigart, G.I. Evan // *Cancer Cell*. – 2006. – V. 10. – № 6. – P. 501-514.
466. Roberts, S.A. Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends / S.A. Roberts, N. Strande, M.D. Burkhalter, C. Strom, J.M. Havener, P. Hasty, D.A. Ramsden // *Nature*. – 2010. – V. 464. – № 7292. – P. 1214-1217.
467. Robertson, K.D. The human ARF cell cycle regulatory gene promoter is a CpG island which can be silenced by DNA methylation and down-regulated by wild-type p53 / K.D. Robertson, P.A. Jones // *Mol Cell Biol*. – 1998. – V. 18. – № 11. – P. 6457-6473.
468. Robinson, A.B. Deamidation of glutaminyl and asparaginyl residues in peptides and proteins / A.B. Robinson, C.J. Rudd // *Curr Top Cell Regul*. – 1974. – V. 8. – № 0. – P. 247-295.
469. Rochette, P.J. UVA-induced cyclobutane pyrimidine dimers form predominantly at thymine-thymine dipyrimidines and correlate with the mutation spectrum in rodent cells / P.J. Rochette, J.P. Therrien, R. Drouin, D. Perdiz, N. Bastien, E.A. Drobetsky, E. Sage // *Nucleic Acids Res*. – 2003. – V. 31. – № 11. – P. 2786-2794.
470. Rogakou, E.P. DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139 / E.P. Rogakou, D.R. Pilch, A.H. Orr, V.S. Ivanova, W.M. Bonner // *J Biol Chem*. – 1998. – V. 273. – № 10. – P. 5858-5868.
471. Roots, R. The formation of radiation-induced DNA breaks: the ratio of double-strand breaks to single-strand breaks / R. Roots, G. Kraft, E. Gosschalk // *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. – 1985. – V. 11. – № 2. – P. 259-265.
472. Rothenberg, E. Human Rad52-mediated homology search and annealing occurs by continuous interactions between overlapping nucleoprotein complexes / E. Rothenberg, J.M. Grimme, M. Spies, T. Ha // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2008. – V. 105. – № 51. – P. 20274-20279.
473. Rybczynska, M. Ataxia telangiectasia heterozygotes and patients display increased fluidity and decrease in contents of sulfhydryl groups in red blood cell membranes / M. Rybczynska, A.L. Pawlak, E. Sikorska, R. Ignatowicz // *Biochim Biophys Acta*. – 1996. – V. 1302. – № 3. – P. 231-235.
474. Rydberg, B. Nonenzymatic methylation of DNA by the intracellular methyl group donor S-adenosyl-L-methionine is a potentially mutagenic reaction / B. Rydberg, T. Lindahl // *EMBO J*. – 1982. – V. 1. – № 2. – P. 211-216.

475. Sale, J.E. Competition, collaboration and coordination - determining how cells bypass DNA damage / J.E. Sale // *J Cell Sci.* – 2012. – V. 125. – № Pt 7. – P. 1633-1643.
476. Sambrook, J. Molecular cloning: A laboratory manual / J. Sambrook, D.W. Russel // 3rd ed. – New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. – 2344 p.
477. San Filippo, J. Mechanism of eukaryotic homologous recombination / J. San Filippo, P. Sung, H. Klein // *Annu Rev Biochem.* – 2008. – V. 77. – P. 229-257.
478. Sanger, F. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase / F. Sanger, A.R. Coulson // *J Mol Biol.* – 1975. – V. 94. – № 3. – P. 441-448.
479. Sapparbaev, M. *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, rat and human 3-methyladenine DNA glycosylases repair 1,*N*<sup>6</sup>-ethenoadenine when present in DNA / M. Sapparbaev, K. Kleibl, J. Laval // *Nucleic Acids Res.* – 1995. – V. 23. – № 18. – P. 3750-3755.
480. Sapparbaev, M. Excision of hypoxanthine from DNA containing dIMP residues by the *Escherichia coli*, yeast, rat, and human alkylpurine DNA glycosylases / M. Sapparbaev, J. Laval // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1994. – V. 91. – № 13. – P. 5873-5877.
481. Savic, V. Formation of dynamic gamma-H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin / V. Savic, B. Yin, N.L. Maas, A.L. Bredemeyer, A.C. Carpenter, B.A. Helmink, K.S. Yang-Iott, B.P. Sleckman, C.H. Bassing // *Mol Cell.* – 2009. – V. 34. – № 3. – P. 298-310.
482. Savitsky, P. High-throughput production of human proteins for crystallization: the SGC experience / P. Savitsky, J. Bray, C.D. Cooper, B.D. Marsden, P. Mahajan, N.A. Burgess-Brown, O. Gileadi // *J Struct Biol.* – 2010. – V. 172. – № 1. – P. 3-13.
483. Sawicka, M. The Dimeric Architecture of Checkpoint Kinases Mec1ATR and Tel1ATM Reveal a Common Structural Organization / M. Sawicka, P.H. Wanrooij, V.C. Darbari, E. Tannous, S. Hailemariam, D. Bose, A.V. Makarova, P.M. Burgers, X. Zhang // *J Biol Chem.* – 2016. – V. 291. – № 26. – P. 13436-13447.
484. Schaaper, R.M. Infidelity of DNA synthesis associated with bypass of apurinic sites / R.M. Schaaper, T.A. Kunkel, L.A. Loeb // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1983. – V. 80. – № 2. – P. 487-491.
485. Scheffner, M. Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade / M. Scheffner, U. Nuber, J.M. Huibregtse // *Nature.* – 1995. – V. 373. – № 6509. – P. 81-83.
486. Schmittgen, T.D. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method / T.D. Schmittgen, K.J. Livak // *Nat Protoc.* – 2008. – V. 3. – № 6. – P. 1101-1108.
487. Schuster, H. The method of reaction of deoxyribonucleic acid with nitrous acid / H. Schuster // *Z Naturforsch B.* – 1960. – V. 15B. – P. 298-304.
488. Sczepanski, J.T. Self-promoted DNA interstrand cross-link formation by an abasic site / J.T. Sczepanski, A.C. Jacobs, M.M. Greenberg // *J Am Chem Soc.* – 2008. – V. 130. – № 30. – P. 9646-9647.
489. Seldin, D.C. Casein kinase II alpha transgene-induced murine lymphoma: relation to theileriosis in cattle / D.C. Seldin, P. Leder // *Science.* – 1995. – V. 267. – № 5199. – P. 894-897.
490. Setlow, R.B. Pyrimidine dimers in ultraviolet-irradiated DNA's / R.B. Setlow, W.L. Carrier // *J Mol Biol.* – 1966. – V. 17. – № 1. – P. 237-254.
491. Shapiro, R. Isolation and identification of cross-linked nucleosides from nitrous acid treated deoxyribonucleic acid / R. Shapiro, S. Dubelman, A.M. Feinberg, P.F. Crain, J.A. McCloskey // *J Am Chem Soc.* – 1977. – V. 99. – № 1. – P. 302-303.
492. Shapiro, R. The reaction of ribonucleosides with nitrous acid. Side products and kinetics / R. Shapiro, S.H. Pohl // *Biochemistry.* – 1968. – V. 7. – № 1. – P. 448-455.
493. Shapiro, S.S. An analysis of variance test for normality (complete samples) / S.S. Shapiro, M.B. Wilk // *Biometrika.* – 1965. – V. 52. – № 3-4. – P. 591-611.

494. Sharifi, R. Deficiency of terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease / R. Sharifi, R. Morra, C.D. Appel, M. Tallis, B. Chioza, G. Jankevicius, M.A. Simpson, I. Matic, E. Ozkan, B. Golia, M.J. Schellenberg, R. Weston, J.G. Williams, M.N. Rossi, H. Galehdari, J. Krahn, A. Wan, R.C. Trembath, A.H. Crosby, D. Ahel, R. Hay, A.G. Ladurner, G. Timinszky, R.S. Williams, I. Ahel // *EMBO J.* – 2013. – V. 32. – № 9. – P. 1225-1237.
495. Sharma, S. Homology and enzymatic requirements of microhomology-dependent alternative end joining / S. Sharma, S.M. Javadekar, M. Pandey, M. Srivastava, R. Kumari, S.C. Raghavan // *Cell Death Dis.* – 2015. – V. 6. – P. e1697.
496. Shen, J. Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair / J. Shen, E.C. Gilmore, C.A. Marshall, M. Haddadin, J.J. Reynolds, W. Eyaid, A. Bodell, B. Barry, D. Gleason, K. Allen, V.S. Ganesh, B.S. Chang, A. Grix, R.S. Hill, M. Topcu, K.W. Caldecott, A.J. Barkovich, C.A. Walsh // *Nat Genet.* – 2010. – V. 42. – № 3. – P. 245-249.
497. Shen, Z. Activated leukocytes oxidatively damage DNA, RNA, and the nucleotide pool through halide-dependent formation of hydroxyl radical / Z. Shen, W. Wu, S.L. Hazen // *Biochemistry.* – 2000. – V. 39. – № 18. – P. 5474-5482.
498. Shibutani, S. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG / S. Shibutani, M. Takeshita, A.P. Grollman // *Nature.* – 1991. – V. 349. – № 6308. – P. 431-434.
499. Shieh, W.M. Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers / W.M. Shieh, J.C. Ame, M.V. Wilson, Z.Q. Wang, D.W. Koh, M.K. Jacobson, E.L. Jacobson // *J Biol Chem.* – 1998. – V. 273. – № 46. – P. 30069-30072.
500. Shiloh, Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more / Y. Shiloh, Y. Ziv // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2013. – V. 14. – № 4. – P. 197-210.
501. Shiotani, B. Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks / B. Shiotani, L. Zou // *Mol Cell.* – 2009. – V. 33. – № 5. – P. 547-558.
502. Shrestha, B. Baculovirus expression vector system: an emerging host for high-throughput eukaryotic protein expression / B. Shrestha, C. Smee, O. Gileadi // *Methods Mol Biol.* – 2008. – V. 439. – P. 269-289.
503. Simbulan-Rosenthal, C.M. Misregulation of gene expression in primary fibroblasts lacking poly(ADP-ribose) polymerase / C.M. Simbulan-Rosenthal, D.H. Ly, D.S. Rosenthal, G. Konopka, R. Luo, Z.Q. Wang, P.G. Schultz, M.E. Smulson // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – V. 97. – № 21. – P. 11274-11279.
504. Simsek, D. DNA ligase III promotes alternative nonhomologous end-joining during chromosomal translocation formation / D. Simsek, E. Brunet, S.Y. Wong, S. Katyal, Y. Gao, P.J. McKinnon, J. Lou, L. Zhang, J. Li, E.J. Rebar, P.D. Gregory, M.C. Holmes, M. Jasin // *PLoS Genet.* – 2011. – V. 7. – № 6. – P. e1002080.
505. Simsek, D. Alternative end-joining is suppressed by the canonical NHEJ component Xrcc4-ligase IV during chromosomal translocation formation / D. Simsek, M. Jasin // *Nat Struct Mol Biol.* – 2010. – V. 17. – № 4. – P. 410-416.
506. Singer, B. The Nature of the Breaks Occurring in Tmv-Rna under Various Conditions / B. Singer, H. Fraenkel-Conrat // *Biochim Biophys Acta.* – 1963. – V. 76. – P. 143-145.
507. Singer, B. *O*<sup>4</sup>-Methyl, -ethyl, or -isopropyl substituents on thymidine in poly(dA-dT) all lead to transitions upon replication / B. Singer, S.J. Spengler, H. Fraenkel-Conrat, J.T. Kusmierek // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1986. – V. 83. – № 1. – P. 28-32.
508. Slaga, T.J. Marked differences in the skin tumor-initiating activities of the optical enantiomers of the diastereomeric benzo(a)pyrene 7,8-diol-9,10-epoxides / T.J. Slaga, W.J. Bracken, G. Gleason, W. Levin, H. Yagi, D.M. Jerina, A.H. Conney // *Cancer Res.* – 1979. – V. 39. – № 1. – P. 67-71.

509. Sneed, J.L. Reconstitution of recombination-associated DNA synthesis with human proteins / J.L. Sneed, S.M. Grossi, I. Tappin, J. Hurwitz, W.D. Heyer // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – V. 41. – № 9. – P. 4913-4925.
510. So, S. Autophosphorylation at serine 1981 stabilizes ATM at DNA damage sites / S. So, A.J. Davis, D.J. Chen // *J Cell Biol.* – 2009. – V. 187. – № 7. – P. 977-990.
511. Sobol, R.W. Requirement of mammalian DNA polymerase-beta in base-excision repair / R.W. Sobol, J.K. Horton, R. Kuhn, H. Gu, R.K. Singhal, R. Prasad, K. Rajewsky, S.H. Wilson // *Nature.* – 1996. – V. 379. – № 6561. – P. 183-186.
512. Sobol, R.W. Base excision repair intermediates induce p53-independent cytotoxic and genotoxic responses / R.W. Sobol, M. Kartalou, K.H. Almeida, D.F. Joyce, B.P. Engelward, J.K. Horton, R. Prasad, L.D. Samson, S.H. Wilson // *J Biol Chem.* – 2003. – V. 278. – № 41. – P. 39951-39959.
513. Sobol, R.W. The lyase activity of the DNA repair protein beta-polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity / R.W. Sobol, R. Prasad, A. Evenski, A. Baker, X.P. Yang, J.K. Horton, S.H. Wilson // *Nature.* – 2000. – V. 405. – № 6788. – P. 807-810.
514. Sollier, J. Transcription-coupled nucleotide excision repair factors promote R-loop-induced genome instability / J. Sollier, C.T. Stork, M.L. Garcia-Rubio, R.D. Paulsen, A. Aguilera, K.A. Cimprich // *Mol Cell.* – 2014. – V. 56. – № 6. – P. 777-785.
515. Solomon, M.J. Mapping protein-DNA interactions *in vivo* with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene / M.J. Solomon, P.L. Larsen, A. Varshavsky // *Cell.* – 1988. – V. 53. – № 6. – P. 937-947.
516. Sordet, O. DNA double-strand breaks and ATM activation by transcription-blocking DNA lesions / O. Sordet, A.J. Nakamura, C.E. Redon, Y. Pommier // *Cell Cycle.* – 2010. – V. 9. – № 2. – P. 274-278.
517. Sordet, O. Ataxia telangiectasia mutated activation by transcription- and topoisomerase I-induced DNA double-strand breaks / O. Sordet, C.E. Redon, J. Guirouilh-Barbat, S. Smith, S. Solier, C. Douarre, C. Conti, A.J. Nakamura, B.B. Das, E. Nicolas, K.W. Kohn, W.M. Bonner, Y. Pommier // *EMBO Rep.* – 2009. – V. 10. – № 8. – P. 887-893.
518. Sowa, M.E. Defining the human deubiquitinating enzyme interaction landscape / M.E. Sowa, E.J. Bennett, S.P. Gygi, J.W. Harper // *Cell.* – 2009. – V. 138. – № 2. – P. 389-403.
519. Spencer, J.P. Oxidative DNA damage in human respiratory tract epithelial cells. Time course in relation to DNA strand breakage / J.P. Spencer, A. Jenner, O.I. Aruoma, C.E. Cross, R. Wu, B. Halliwell // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1996. – V. 224. – № 1. – P. 17-22.
520. Spycher, C. Constitutive phosphorylation of MDC1 physically links the MRE11-RAD50-NBS1 complex to damaged chromatin / C. Spycher, E.S. Miller, K. Townsend, L. Pavic, N.A. Morrice, P. Janscak, G.S. Stewart, M. Stucki // *J Cell Biol.* – 2008. – V. 181. – № 2. – P. 227-240.
521. Stalter, G. Asymmetric expression of protein kinase CK2 subunits in human kidney tumors / G. Stalter, S. Siemer, E. Becht, M. Ziegler, K. Remberger, O.G. Issinger // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1994. – V. 202. – № 1. – P. 141-147.
522. Stammaes, J. Redox regulation of transglutaminase 2 activity / J. Stammaes, D.M. Pinkas, B. Fleckenstein, C. Khosla, L.M. Sollid // *J Biol Chem.* – 2010. – V. 285. – № 33. – P. 25402-25409.
523. Stewart, G.S. The DNA double-strand break repair gene hMRE11 is mutated in individuals with an ataxia-telangiectasia-like disorder / G.S. Stewart, R.S. Maser, T. Stankovic, D.A. Bressan, M.I. Kaplan, N.G. Jaspers, A. Raams, P.J. Byrd, J.H. Petrini, A.M. Taylor // *Cell.* – 1999. – V. 99. – № 6. – P. 577-587.
524. Stewart, G.S. MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint / G.S. Stewart, B. Wang, C.R. Bignell, A.M. Taylor, S.J. Elledge // *Nature.* – 2003. – V. 421. – № 6926. – P. 961-966.

525. Strom, C.E. Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) is not involved in base excision repair but PARP inhibition traps a single-strand intermediate / C.E. Strom, F. Johansson, M. Uhlen, C.A. Szigartyo, K. Erixon, T. Helleday // *Nucleic Acids Res.* – 2011. – V. 39. – № 8. – P. 3166-3175.
526. Sturzenegger, A. DNA2 cooperates with the WRN and BLM RecQ helicases to mediate long-range DNA end resection in human cells / A. Sturzenegger, K. Burdova, R. Kanagaraj, M. Levikova, C. Pinto, P. Cejka, P. Janscak // *J Biol Chem.* – 2014. – V. 289. – № 39. – P. 27314-27326.
527. Su, Y. Mortality rates among carriers of ataxia-telangiectasia mutant alleles. / Y. Su, M. Swift // *Ann Intern Med.* – 2000. – V. 133. – P. 770-778.
528. Suh, E.J. PP2C $\gamma$ -mediated S-phase accumulation induced by the proteasome-dependent degradation of p21(WAF1/CIP1) / E.J. Suh, T.Y. Kim, S.H. Kim // *FEBS Lett.* – 2006. – V. 580. – № 26. – P. 6100-6104.
529. Sukhanova, M.V. Single molecule detection of PARP1 and PARP2 interaction with DNA strand breaks and their poly(ADP-ribosylation) using high-resolution AFM imaging / M.V. Sukhanova, S. Abrakhi, V. Joshi, D. Pastre, M.M. Kutuzov, R.O. Anarbaev, P.A. Curmi, L. Hamon, O.I. Lavrik // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44. – № 6. – P. e60.
530. Sultana, R. Targeting XRCC1 deficiency in breast cancer for personalized therapy / R. Sultana, T. Abdel-Fatah, R. Abbotts, C. Hawkes, N. Albarakati, C. Seedhouse, G. Ball, S. Chan, E.A. Rakha, I.O. Ellis, S. Madhusudan // *Cancer Res.* – 2013. – V. 73. – № 5. – P. 1621-1634.
531. Sun, C. Regulation of p27Kip1 phosphorylation and G1 cell cycle progression by protein phosphatase PPM1G / C. Sun, G. Wang, K.H. Wrighton, H. Lin, Z. Songyang, X.H. Feng, X. Lin // *Am J Cancer Res.* – 2016. – V. 6. – № 10. – P. 2207-2220.
532. Sun, H. Double-strand breaks at an initiation site for meiotic gene conversion / H. Sun, D. Treco, N.P. Schultes, J.W. Szostak // *Nature.* – 1989. – V. 338. – № 6210. – P. 87-90.
533. Sun, Y. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM / Y. Sun, X. Jiang, S. Chen, N. Fernandes, B.D. Price // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2005. – V. 102. – № 37. – P. 13182-13187.
534. Sun, Y. Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60 / Y. Sun, X. Jiang, Y. Xu, M.K. Ayrappetov, L.A. Moreau, J.R. Whetstine, B.D. Price // *Nat Cell Biol.* – 2009. – V. 11. – № 11. – P. 1376-1382.
535. Sun, Y. DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity / Y. Sun, Y. Xu, K. Roy, B.D. Price // *Mol Cell Biol.* – 2007. – V. 27. – № 24. – P. 8502-8509.
536. Swift, M. The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States / M. Swift, D. Morrell, E. Cromartie, A.R. Chamberlin, M.H. Skolnick, D.T. Bishop // *Am J Hum Genet* – 1986. – V. 39. – P. 573-583.
537. Syllaba, L. Contribution à l'étude de l'indépendance de l'athétose double idiopathique et congénitale. Atteinte familiale, syndrome dystrophique, signe du réseau vasculaire conjonctival, intégrité psychique / L. Syllaba, K. Henner // *Rev Neurol (Paris).* – 1926. – V. 1. – P. 541-560.
538. Tadi, S.K. Microhomology-mediated end joining is the principal mediator of double-strand break repair during mitochondrial DNA lesions / S.K. Tadi, R. Sebastian, S. Dahal, R.K. Babu, B. Choudhary, S.C. Raghavan // *Mol Biol Cell.* – 2016. – V. 27. – № 2. – P. 223-235.
539. Takahashi, T. Aprataxin, causative gene product for EAOH/AOA1, repairs DNA single-strand breaks with damaged 3'-phosphate and 3'-phosphoglycolate ends / T. Takahashi, M. Tada, S. Igarashi, A. Koyama, H. Date, A. Yokoseki, A. Shiga, Y. Yoshida, S. Tsuji, M. Nishizawa, O. Onodera // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – V. 35. – № 11. – P. 3797-3809.
540. Takai, H. Tel2 regulates the stability of PI3K-related protein kinases / H. Takai, R.C. Wang, K.K. Takai, H. Yang, T. de Lange // *Cell.* – 2007. – V. 131. – № 7. – P. 1248-1259.

541. Takao, M. Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage / M. Takao, H. Aburatani, K. Kobayashi, A. Yasui // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – V. 26. – № 12. – P. 2917-2922.
542. Takao, M. A back-up glycosylase in *Nth1* knock-out mice is a functional Nei (endonuclease VIII) homologue / M. Takao, S. Kanno, K. Kobayashi, Q.M. Zhang, S. Yonei, G.T. van der Horst, A. Yasui // *J Biol Chem.* – 2002. – V. 277. – № 44. – P. 42205-42213.
543. Takashima, H. Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy / H. Takashima, C.F. Boerkoel, J. John, G.M. Saifi, M.A. Salih, D. Armstrong, Y. Mao, F.A. Quijcho, B.B. Roa, M. Nakagawa, D.W. Stockton, J.R. Lupski // *Nat Genet.* – 2002. – V. 32. – № 2. – P. 267-272.
544. Tanaka, M. Promoter-selective activation domains in Oct-1 and Oct-2 direct differential activation of an snRNA and mRNA promoter / M. Tanaka, J.S. Lai, W. Herr // *Cell.* – 1992. – V. 68. – № 4. – P. 755-767.
545. Taylor, G.K. Rules governing protein identification by mass spectrometry / G.K. Taylor, D.R. Goodlett // *Rapid Commun Mass Spectrom.* – 2005. – V. 19. – № 23. – P. 3420.
546. Tchou, J. 8-oxoguanine (8-hydroxyguanine) DNA glycosylase and its substrate specificity / J. Tchou, H. Kasai, S. Shibutani, M.H. Chung, J. Laval, A.P. Grollman, S. Nishimura // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1991. – V. 88. – № 11. – P. 4690-4694.
547. Tebbs, R.S. Rescue of *Xrcc1* knockout mouse embryo lethality by transgene-complementation / R.S. Tebbs, L.H. Thompson, J.E. Cleaver // *DNA Repair (Amst).* – 2003. – V. 2. – № 12. – P. 1405-1417.
548. Teive, H.A. Ataxia-telangiectasia - A historical review and a proposal for a new designation: ATM syndrome / H.A. Teive, A. Moro, M. Moscovich, W.O. Arruda, R.P. Munhoz, S. Raskin, T. Ashizawa // *J Neurol Sci.* – 2015. – V. 355. – № 1-2. – P. 3-6.
549. Thyme, S.B. Polq-Mediated End Joining Is Essential for Surviving DNA Double-Strand Breaks during Early Zebrafish Development / S.B. Thyme, A.F. Schier // *Cell Rep.* – 2016. – V. 15. – № 7. – P. 1611-1613.
550. Tibbetts, R.S. A role for ATR in the DNA damage-induced phosphorylation of p53 / R.S. Tibbetts, K.M. Brumbaugh, J.M. Williams, J.N. Sarkaria, W.A. Cliby, S.Y. Shieh, Y. Taya, C. Prives, R.T. Abraham // *Genes Dev.* – 1999. – V. 13. – № 2. – P. 152-157.
551. Titenko-Holland, N. Quantification of epithelial cell micronuclei by fluorescence in situ hybridization (FISH) in mortuary science students exposed to formaldehyde / N. Titenko-Holland, A.J. Levine, M.T. Smith, P.J. Quintana, M. Boeniger, R. Hayes, A. Suruda, P. Schulte // *Mutat Res.* – 1996. – V. 371. – № 3-4. – P. 237-248.
552. Torres, J. Phosphorylation-regulated cleavage of the tumor suppressor PTEN by caspase-3: implications for the control of protein stability and PTEN-protein interactions / J. Torres, J. Rodriguez, M.P. Myers, M. Valiente, J.D. Graves, N.K. Tonks, R. Pulido // *J Biol Chem.* – 2003. – V. 278. – № 33. – P. 30652-30660.
553. Tresini, M. The core spliceosome as target and effector of non-canonical ATM signalling / M. Tresini, D.O. Warmerdam, P. Kolovos, L. Snijder, M.G. Vrouwe, J.A. Demmers, I.W.F. van, F.G. Grosveld, R.H. Medema, J.H. Hoeijmakers, L.H. Mullenders, W. Vermeulen, J.A. Marteijn // *Nature.* – 2015. – V. 523. – № 7558. – P. 53-58.
554. Truong, L.N. Microhomology-mediated End Joining and Homologous Recombination share the initial end resection step to repair DNA double-strand breaks in mammalian cells / L.N. Truong, Y. Li, L.Z. Shi, P.Y. Hwang, J. He, H. Wang, N. Razavian, M.W. Berns, X. Wu // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2013. – V. 110. – № 19. – P. 7720-7725.
555. Tsai, C.J. Cernunnos/XLF promotes the ligation of mismatched and noncohesive DNA ends / C.J. Tsai, S.A. Kim, G. Chu // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2007. – V. 104. – № 19. – P. 7851-7856.

556. Tudek, B. Biological properties of imidazole ring-opened  $N^7$ -methylguanine in M13mp18 phage DNA / B. Tudek, S. Boiteux, J. Laval // *Nucleic Acids Res.* – 1992. – V. 20. – № 12. – P. 3079-3084.
557. Tuduri, S. Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription / S. Tuduri, L. Crabbe, C. Conti, H. Tourriere, H. Holtgreve-Grez, A. Jauch, V. Pantesco, J. De Vos, A. Thomas, C. Theillet, Y. Pommier, J. Tazi, A. Coquelle, P. Pasero // *Nat Cell Biol.* – 2009. – V. 11. – № 11. – P. 1315-1324.
558. Tulin, A. The *Drosophila* heterochromatic gene encoding poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) is required to modulate chromatin structure during development / A. Tulin, D. Stewart, A.C. Spradling // *Genes Dev.* – 2002. – V. 16. – № 16. – P. 2108-2119.
559. Turowec, J.P. An unbiased proteomic screen reveals caspase cleavage is positively and negatively regulated by substrate phosphorylation / J.P. Turowec, S.A. Zukowski, J.D. Knight, D.M. Smalley, L.M. Graves, G.L. Johnson, S.S. Li, G.A. Lajoie, D.W. Litchfield // *Mol Cell Proteomics.* – 2014. – V. 13. – № 5. – P. 1184-1197.
560. Tutt, A. Mutation in *Brca2* stimulates error-prone homology-directed repair of DNA double-strand breaks occurring between repeated sequences / A. Tutt, D. Bertwistle, J. Valentine, A. Gabriel, S. Swift, G. Ross, C. Griffin, J. Thacker, A. Ashworth // *EMBO J.* – 2001. – V. 20. – № 17. – P. 4704-4716.
561. Uematsu, N. Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks / N. Uematsu, E. Weterings, K. Yano, K. Morotomi-Yano, B. Jakob, G. Taucher-Scholz, P.O. Mari, D.C. van Gent, B.P. Chen, D.J. Chen // *J Cell Biol.* – 2007. – V. 177. – № 2. – P. 219-229.
562. Uziel, T. Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage / T. Uziel, Y. Lerenthal, L. Moyal, Y. Andegeko, L. Mittelman, Y. Shiloh // *EMBO J.* – 2003. – V. 22. – № 20. – P. 5612-5621.
563. Valentin-Vega, Y.A. Mitochondrial dysfunction in ataxia-telangiectasia / Y.A. Valentin-Vega, K.H. Maclean, J. Tait-Mulder, S. Milasta, M. Steeves, F.C. Dorsey, J.L. Cleveland, D.R. Green, M.B. Kastan // *Blood.* – 2012. – V. 119. – № 6. – P. 1490-1500.
564. van der Horst, A. FOXO4 transcriptional activity is regulated by monoubiquitination and USP7/HAUSP / A. van der Horst, A.M. de Vries-Smits, A.B. Brenkman, M.H. van Triest, N. van den Broek, F. Colland, M.M. Maurice, B.M. Burgering // *Nat Cell Biol.* – 2006. – V. 8. – № 10. – P. 1064-1073.
565. van Schendel, R. Polymerase  $\Theta$  is a key driver of genome evolution and of CRISPR/Cas9-mediated mutagenesis / R. van Schendel, S.F. Roerink, V. Portegijs, S. van den Heuvel, M. Tijsterman // *Nat Commun.* – 2015. – V. 6. – P. 7394.
566. Varghese, A.J. 5-Thyminy-5,6-dihydrothymine from DNA irradiated with ultraviolet light / A.J. Varghese // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1970. – V. 38. – № 3. – P. 484-490.
567. Vaze, M.B. Recovery from checkpoint-mediated arrest after repair of a double-strand break requires Srs2 helicase / M.B. Vaze, A. Pellicoli, S.E. Lee, G. Ira, G. Liberi, A. Arbel-Eden, M. Foiani, J.E. Haber // *Mol Cell.* – 2002. – V. 10. – № 2. – P. 373-385.
568. Verly, W.G. An endonuclease for depurinated DNA in *Escherichia coli* B / W.G. Verly, Y. Paquette // *Can J Biochem.* – 1972. – V. 50. – № 2. – P. 217-224.
569. Vesselinovitch, S.D. Aflatoxin B<sub>1</sub>, a hepatocarcinogen in the infant mouse / S.D. Vesselinovitch, N. Mihailovich, G.N. Wogan, L.S. Lombard, K.V. Rao // *Cancer Res.* – 1972. – V. 32. – № 11. – P. 2289-2291.
570. Vidal, A.E. Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step / A.E. Vidal, I.D. Hickson, S. Boiteux, J.P. Radicella // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29. – № 6. – P. 1285-1292.

571. Vinters, H.V. Sequence of cellular events in cerebellar ontogeny relevant to expression of neuronal abnormalities in ataxia-telangiectasia / H.V. Vinters, R.A. Gatti, P. Rakic // *Kroc Found Ser.* – 1985. – V. 19. – P. 233-255.
572. Vispe, S. A cellular defense pathway regulating transcription through poly(ADP-ribosylation) in response to DNA damage / S. Vispe, T.M. Yung, J. Ritchot, H. Serizawa, M.S. Satoh // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2000. – V. 97. – № 18. – P. 9886-9891.
573. Vousden, K.H. p53 in health and disease / K.H. Vousden, D.P. Lane // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2007. – V. 8. – № 4. – P. 275-283.
574. Vousden, K.H. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53 / K.H. Vousden, C. Prives // *Cell.* – 2009. – V. 137. – № 3. – P. 413-431.
575. Wagner, J.R. Endogenous oxidative damage of deoxycytidine in DNA / J.R. Wagner, C.C. Hu, B.N. Ames // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1992. – V. 89. – № 8. – P. 3380-3384.
576. Walker, J.R. Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair / J.R. Walker, R.A. Corpina, J. Goldberg // *Nature.* – 2001. – V. 412. – № 6847. – P. 607-614.
577. Wang, B. 53BP1, a mediator of the DNA damage checkpoint / B. Wang, S. Matsuoka, P.B. Carpenter, S.J. Elledge // *Science.* – 2002. – V. 298. – № 5597. – P. 1435-1438.
578. Wang, D. Protein kinase CK2 regulates cytoskeletal reorganization during ionizing radiation-induced senescence of human mesenchymal stem cells / D. Wang, D.J. Jang // *Cancer Res.* – 2009. – V. 69. – № 20. – P. 8200-8207.
579. Wang, H. DNA ligase III as a candidate component of backup pathways of nonhomologous end joining / H. Wang, B. Rosidi, R. Perrault, M. Wang, L. Zhang, F. Windhofer, G. Iliakis // *Cancer Res.* – 2005. – V. 65. – № 10. – P. 4020-4030.
580. Wang, H. The interaction of CtIP and Nbs1 connects CDK and ATM to regulate HR-mediated double-strand break repair / H. Wang, L.Z. Shi, C.C. Wong, X. Han, P.Y. Hwang, L.N. Truong, Q. Zhu, Z. Shao, D.J. Chen, M.W. Berns, J.R. Yates, 3rd, L. Chen, X. Wu // *PLoS Genet.* – 2013. – V. 9. – № 2. – P. e1003277.
581. Wang, J. SIRT1 regulates autoacetylation and histone acetyltransferase activity of TIP60 / J. Wang, J. Chen // *J Biol Chem.* – 2010. – V. 285. – № 15. – P. 11458-11464.
582. Wang, J.C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective / J.C. Wang // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2002. – V. 3. – № 6. – P. 430-440.
583. Wang, M. PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways / M. Wang, W. Wu, W. Wu, B. Rosidi, L. Zhang, H. Wang, G. Iliakis // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – V. 34. – № 21. – P. 6170-6182.
584. Wang, X. Structure of the intact ATM/Tel1 kinase / X. Wang, H. Chu, M. Lv, Z. Zhang, S. Qiu, H. Liu, X. Shen, W. Wang, G. Cai // *Nat Commun.* – 2016. – V. 7. – P. 11655.
585. Waters, T.R. Human thymine DNA glycosylase binds to apurinic sites in DNA but is displaced by human apurinic endonuclease 1 / T.R. Waters, P. Gallinari, J. Jiricny, P.F. Swann // *J Biol Chem.* – 1999. – V. 274. – № 1. – P. 67-74.
586. Watson, J.D. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid / J.D. Watson, F.H. Crick // *Nature.* – 1953. – V. 171. – № 4356. – P. 737-738.
587. Wechsler, T. Aberrant chromosome morphology in human cells defective for Holliday junction resolution / T. Wechsler, S. Newman, S.C. West // *Nature.* – 2011. – V. 471. – № 7340. – P. 642-646.
588. Wei, P.C. Loss of the oxidative stress sensor NPGPx compromises GRP78 chaperone activity and induces systemic disease / P.C. Wei, Y.H. Hsieh, M.I. Su, X. Jiang, P.H. Hsu, W.T. Lo, J.Y. Weng, Y.M. Jeng, J.M. Wang, P.L. Chen, Y.C. Chang, K.F. Lee, M.D. Tsai, J.Y. Shew, W.H. Lee // *Mol Cell.* – 2012. – V. 48. – № 5. – P. 747-759.



589. Wei, Y.F. Molecular cloning and expression of human cDNAs encoding a novel DNA ligase IV and DNA ligase III, an enzyme active in DNA repair and recombination / Y.F. Wei, P. Robins, K. Carter, K. Caldecott, D.J. Pappin, G.L. Yu, R.P. Wang, B.K. Shell, R.A. Nash, P. Schar // *Mol Cell Biol.* – 1995. – V. 15. – № 6. – P. 3206-3216.
590. Wessel, D. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids / D. Wessel, U.I. Flugge // *Anal Biochem.* – 1984. – V. 138. – № 1. – P. 141-143.
591. Weterings, E. The role of DNA dependent protein kinase in synapsis of DNA ends / E. Weterings, N.S. Verkaik, H.T. Bruggenwirth, J.H. Hoeijmakers, D.C. van Gent // *Nucleic Acids Res.* – 2003. – V. 31. – № 24. – P. 7238-7246.
592. Whitehouse, C.J. XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair / C.J. Whitehouse, R.M. Taylor, A. Thistlethwaite, H. Zhang, F. Karimi-Busheri, D.D. Lasko, M. Weinfeld, K.W. Caldecott // *Cell.* – 2001. – V. 104. – № 1. – P. 107-117.
593. Wiederhold, L. AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells / L. Wiederhold, J.B. Leppard, P. Kedar, F. Karimi-Busheri, A. Rasouli-Nia, M. Weinfeld, A.E. Tomkinson, T. Izumi, R. Prasad, S.H. Wilson, S. Mitra, T.K. Hazra // *Mol Cell.* – 2004. – V. 15. – № 2. – P. 209-220.
594. Wilkins, M.H. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids / M.H. Wilkins, A.R. Stokes, H.R. Wilson // *Nature.* – 1953. – V. 171. – № 4356. – P. 738-740.
595. Wilkinson, K.D. Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome / K.D. Wilkinson // *Semin Cell Dev Biol.* – 2000. – V. 11. – № 3. – P. 141-148.
596. Wilson, S.H. Passing the baton in base excision repair / S.H. Wilson, T.A. Kunkel // *Nat Struct Biol.* – 2000. – V. 7. – № 3. – P. 176-178.
597. Winters, T.A. Human HeLa cell enzymes that remove phosphoglycolate 3'-end groups from DNA / T.A. Winters, M. Weinfeld, T.J. Jorgensen // *Nucleic Acids Res.* – 1992. – V. 20. – № 10. – P. 2573-2580.
598. Wogan, G.N. Dose-response characteristics of aflatoxin B1 carcinogenesis in the rat / G.N. Wogan, P.M. Newberne // *Cancer Res.* – 1967. – V. 27. – № 12. – P. 2370-2376.
599. Woodhouse, B.C. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 modulates DNA repair capacity and prevents formation of DNA double strand breaks / B.C. Woodhouse, Dianova, II, J.L. Parsons, G.L. Dianov // *DNA Repair (Amst).* – 2008. – V. 7. – № 6. – P. 932-940.
600. Woudstra, E.C. Role of DNA-PK subunits in radiosensitization by hyperthermia / E.C. Woudstra, A.W. Konings, P.A. Jeggo, H.H. Kampinga // *Radiat Res.* – 1999. – V. 152. – № 2. – P. 214-218.
601. Wu, L. The Bloom's syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination / L. Wu, I.D. Hickson // *Nature.* – 2003. – V. 426. – № 6968. – P. 870-874.
602. Wu, X. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop / X. Wu, J.H. Bayle, D. Olson, A.J. Levine // *Genes Dev.* – 1993. – V. 7. – № 7A. – P. 1126-1132.
603. Xiong, X. 53BP1 promotes microhomology-mediated end-joining in G1-phase cells / X. Xiong, Z. Du, Y. Wang, Z. Feng, P. Fan, C. Yan, H. Willers, J. Zhang // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43. – № 3. – P. 1659-1670.
604. Xu, Y. The HECT domain ubiquitin ligase HUWE1 targets unassembled soluble proteins for degradation / Y. Xu, D.E. Anderson, Y. Ye // *Cell Discov.* – 2016. – V. 2. – P. 16040.
605. Yakubovskaya, E. Functional human mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$  forms a heterotrimer / E. Yakubovskaya, Z. Chen, J.A. Carrodegua, C. Kisker, D.F. Bogenhagen // *J Biol Chem.* – 2006. – V. 281. – № 1. – P. 374-382.

606. Yan, C.T. IgH class switching and translocations use a robust non-classical end-joining pathway / C.T. Yan, C. Boboila, E.K. Souza, S. Franco, T.R. Hickernell, M. Murphy, S. Gumaste, M. Geyer, A.A. Zarrin, J.P. Manis, K. Rajewsky, F.W. Alt // *Nature*. – 2007. – V. 449. – № 7161. – P. 478-482.
607. Yan, H. Replication protein A promotes 5'→3' end processing during homology-dependent DNA double-strand break repair / H. Yan, T. Toczylowski, J. McCane, C. Chen, S. Liao // *J Cell Biol.* – 2011. – V. 192. – № 2. – P. 251-261.
608. Yang, D.Q. Participation of ATM in insulin signalling through phosphorylation of eIF-4E-binding protein 1 / D.Q. Yang, M.B. Kastan // *Nat Cell Biol.* – 2000. – V. 2. – № 12. – P. 893-898.
609. Yang, S.W. A eukaryotic enzyme that can disjoin dead-end covalent complexes between DNA and type I topoisomerases / S.W. Yang, A.B. Burgin, Jr., B.N. Huizenga, C.A. Robertson, K.C. Yao, H.A. Nash // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1996. – V. 93. – № 21. – P. 11534-11539.
610. Yang, Y. E3 ubiquitin ligase Mule ubiquitinates Miz1 and is required for TNF $\alpha$ -induced JNK activation / Y. Yang, H. Do, X. Tian, C. Zhang, X. Liu, L.A. Dada, J.I. Sznajder, J. Liu // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – V. 107. – № 30. – P. 13444-13449.
611. Yano, K. Live cell imaging of XLF and XRCC4 reveals a novel view of protein assembly in the non-homologous end-joining pathway / K. Yano, D.J. Chen // *Cell Cycle.* – 2008. – V. 7. – № 10. – P. 1321-1325.
612. Yano, K. Ku recruits XLF to DNA double-strand breaks / K. Yano, K. Morotomi-Yano, S.Y. Wang, N. Uematsu, K.J. Lee, A. Asaithamby, E. Weterings, D.J. Chen // *EMBO Rep.* – 2008. – V. 9. – № 1. – P. 91-96.
613. Yazdi, P.T. SMC1 is a downstream effector in the ATM/NBS1 branch of the human S-phase checkpoint / P.T. Yazdi, Y. Wang, S. Zhao, N. Patel, E.Y. Lee, J. Qin // *Genes Dev.* – 2002. – V. 16. – № 5. – P. 571-582.
614. Yenice, S. Nuclear casein kinase 2 (CK-2) activity in human normal, benign hyperplastic, and cancerous prostate / S. Yenice, A.T. Davis, S.A. Goueli, A. Akdas, C. Limas, K. Ahmed // *Prostate.* – 1994. – V. 24. – № 1. – P. 11-16.
615. Yeo, A.J. R-loops in proliferating cells but not in the brain: implications for AOA2 and other autosomal recessive ataxias / A.J. Yeo, O.J. Becherel, J.E. Luff, J.K. Cullen, T. Wongsurawat, P. Jenjaroenpun, V.A. Kuznetsov, P.J. McKinnon, M.F. Lavin // *PLoS One.* – 2014. – V. 9. – № 3. – P. e90219.
616. Yeo, J.E. Synthesis of site-specific DNA-protein conjugates and their effects on DNA replication / J.E. Yeo, S. Wickramaratne, S. Khatwani, Y.C. Wang, J. Vervacke, M.D. Distefano, N.Y. Tretyakova // *ACS Chem Biol.* – 2014. – V. 9. – № 8. – P. 1860-1868.
617. Yi, J. DNA damage-induced activation of CUL4B targets HUWE1 for proteasomal degradation / J. Yi, G. Lu, L. Li, X. Wang, L. Cao, M. Lin, S. Zhang, G. Shao // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43. – № 9. – P. 4579-4590.
618. Yi, M. Response of fibroblast cultures from ataxia-telangiectasia patients to oxidative stress / M. Yi, M.P. Rosin, C.K. Anderson // *Cancer Lett.* – 1990. – V. 54. – № 1-2. – P. 43-50.
619. Yoon, S.Y. Over-expression of human UREB1 in colorectal cancer: HECT domain of human UREB1 inhibits the activity of tumor suppressor p53 protein / S.Y. Yoon, Y. Lee, J.H. Kim, A.S. Chung, J.H. Joo, C.N. Kim, N.S. Kim, I.S. Choe, J.W. Kim // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2005. – V. 326. – № 1. – P. 7-17.
620. You, Z. ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C-terminus of Nbs1 / Z. You, C. Chahwan, J. Bailis, T. Hunter, P. Russell // *Mol Cell Biol.* – 2005. – V. 25. – № 13. – P. 5363-5379.
621. Yu, S.L. The stalling of transcription at abasic sites is highly mutagenic / S.L. Yu, S.K. Lee, R.E. Johnson, L. Prakash, S. Prakash // *Mol Cell Biol.* – 2003. – V. 23. – № 1. – P. 382-388.

622. Yu, S.W. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor / S.W. Yu, H. Wang, M.F. Poitras, C. Coombs, W.J. Bowers, H.J. Federoff, G.G. Poirier, T.M. Dawson, V.L. Dawson // *Science*. – 2002. – V. 297. – № 5579. – P. 259-263.
623. Yun, M.H. CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle / M.H. Yun, K. Hiom // *Nature*. – 2009. – V. 459. – № 7245. – P. 460-463.
624. Zhang, J. ATM functions at the peroxisome to induce pexophagy in response to ROS / J. Zhang, D.N. Tripathi, J. Jing, A. Alexander, J. Kim, R.T. Powell, R. Dere, J. Tait-Mulder, J.H. Lee, T.T. Paull, R.K. Pandita, V.K. Charaka, T.K. Pandita, M.B. Kastan, C.L. Walker // *Nat Cell Biol*. – 2015. – V. 17. – № 10. – P. 1259-1269.
625. Zhang, X. USP4 inhibits p53 through deubiquitinating and stabilizing ARF-BP1 / X. Zhang, F.G. Berger, J. Yang, X. Lu // *EMBO J*. – 2011. – V. 30. – № 11. – P. 2177-2189.
626. Zhang, Y. An essential role for CtIP in chromosomal translocation formation through an alternative end-joining pathway / Y. Zhang, M. Jasin // *Nat Struct Mol Biol*. – 2011. – V. 18. – № 1. – P. 80-84.
627. Zhang, Y. SIP, a novel ankyrin repeat containing protein, sequesters steroid receptor coactivators in the cytoplasm / Y. Zhang, H. Zhang, J. Liang, W. Yu, Y. Shang // *EMBO J*. – 2007. – V. 26. – № 11. – P. 2645-2657.
628. Zhao, X. The HECT-domain ubiquitin ligase Huwe1 controls neural differentiation and proliferation by destabilizing the N-Myc oncoprotein / X. Zhao, J.I. Heng, D. Guardavaccaro, R. Jiang, M. Pagano, F. Guillemot, A. Iavarone, A. Lasorella // *Nat Cell Biol*. – 2008. – V. 10. – № 6. – P. 643-653.
629. Zhitkovich, A. Formation of the amino acid-DNA complexes by hexavalent and trivalent chromium in vitro: importance of trivalent chromium and the phosphate group / A. Zhitkovich, V. Voitkun, M. Costa // *Biochemistry*. – 1996. – V. 35. – № 22. – P. 7275-7282.
630. Zhong, Q. Mule/ARF-BP1, a BH3-only E3 ubiquitin ligase, catalyzes the polyubiquitination of Mcl-1 and regulates apoptosis / Q. Zhong, W. Gao, F. Du, X. Wang // *Cell*. – 2005. – V. 121. – № 7. – P. 1085-1095.
631. Zhou, W. Effects of abasic sites and DNA single-strand breaks on prokaryotic RNA polymerases / W. Zhou, P.W. Doetsch // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1993. – V. 90. – № 14. – P. 6601-6605.
632. Zhou, Y. Quantitation of DNA double-strand break resection intermediates in human cells / Y. Zhou, P. Caron, G. Legube, T.T. Paull // *Nucleic Acids Res*. – 2014. – V. 42. – № 3. – P. e19.
633. Zhu, W. Rereplication by depletion of geminin is seen regardless of p53 status and activates a G2/M checkpoint / W. Zhu, Y. Chen, A. Dutta // *Mol Cell Biol*. – 2004. – V. 24. – № 16. – P. 7140-7150.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубочайшую признательность своим учителям, Владимиру Ивановичу Тишкову, профессору Химического факультета Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова, и Григорию Леонидовичу Дианову, заведующему лабораторией репарации ДНК института радиационной онкологии Оксфордского университета. Приношу искреннюю благодарность Владимиру Ивановичу Тишкову за всестороннюю поддержку, многолетнее сотрудничество и ценные обсуждения и рекомендации по подготовке настоящего исследования к публичной защите. Автор искренне благодарен Григорию Леонидовичу Дианову, в лаборатории которого данное исследование выполнялось, за мудрое наставничество в моем становлении как научного исследователя и возможность выполнять научные исследования на самом высоком уровне. Автор выражает благодарность за продуктивное сотрудничество, обсуждение исследований и энтузиазм всем бывшим и настоящим сотрудникам лаборатории репарации ДНК. Особенно глубокую признательность приношу Ирине Диановой за практические знания в области биохимии и молекулярной биологии, а также безоговорочную поддержку и добрые дружеские отношения. Автор искренне признателен сотрудникам лаборатории протеомных методов исследования и ее заведующему Бенедикту Кесслеру (Оксфордский университет, Великобритания) за многолетнее плодотворное сотрудничество.

Автор благодарит свою Alma mater, кафедру химической энзимологии Химического факультета Московского Государственного университета имени М.В.Ломоносова, их руководство, администрацию и сотрудников.

Наконец, сердечное спасибо и низжайший поклон моей маме, Хороненковой Татьяне Владимировне, без литературной правки данного текста, поддержки и замечательного чувства юмора которой выполнение настоящего исследования было бы невозможным. Теплые слова благодарности близким друзьям Екатерине Сбруевой и Стивену Весту, терпение и безоговорочная поддержка которых в любых моих начинаниях поистине безграничны.