

На правах рукописи

КАНТИДЗЕ Омар Леванович

ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ДНК В ЯДРЕ И ИНДУЦИРОВАННЫЕ
ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗЫ И ХРОМОСОМНЫЕ ПЕРЕСТРОЙКИ

03.00.03 – молекулярная биология

03.00.26 – молекулярная генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва-2007

Работа выполнена в лаборатории Структурно-функциональной организации хромосом
Института биологии гена РАН

Научные руководители: чл.-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор
С.В. Разин

доктор биологических наук
О.В. Яровая

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
О.В. Зацепина

доктор биологических наук
Е.Н. Набирочкина

Ведущая организация: Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН

Защита состоится мая 2007 г. в часов на заседании диссертационного
совета Д 002.037.01 при Институте биологии гена РАН по адресу:
119334, Москва, ул.Вавилова, д.34/5

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу: 119991, Москва, ул.Вавилова, д.32

Автореферат разослан апреля 2007 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

канд. фарм. наук Л.С.Грабовская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Хромосомные перестройки играют едва ли не главную роль в развитии злокачественных опухолей. Различные хромосомные абберации, ассоциированные с лейкомиями и многими солидными опухолями, приводят обычно либо к активации протоонкогенов, либо, что встречается чаще, к возникновению определенных химерных белков. Белки обеих групп в подавляющем большинстве случаев являются транскрипционными факторами, функционирование которых приводит к неконтролируемой экспрессии генов и, в результате, к малигнизации клеток. Причинами хромосомных перестроек могут стать различные факторы. Соответственно, и механизмы их возникновения могут отличаться: это и VDJ-рекомбинация в лимфоцитах, и Alu-зависимая рекомбинация, и негомологичное соединение концов ДНК и др. По своему происхождению опухоли могут быть первичными и вторичными, то есть связанными с применением лекарственных препаратов и других методов лечения. В последнее время серьезную озабоченность клиницистов вызывают вторичные лейкозы, развитие которых связывают с хромосомными перестройками, возникающими у пациентов в результате химиотерапии с использованием ингибиторов ДНК-топоизомеразы II. Несмотря на то, что ассоциированные с такими лейкозами транслокации изучаются уже порядка двадцати лет, их механизм до последнего времени оставался неизвестен. Выяснение молекулярных основ индуцированных топоизомеразой II хромосомных перестроек имеет фундаментальное значение, поскольку позволяет нам лучше понять процесс возникновения хромосомных аббераций в целом. Именно это определяет актуальность темы настоящей диссертационной работы, направленной на характеристику механизмов возникновения хромосомных перестроек в клетках, обработанных ингибиторами ДНК-топоизомеразы II.

Цели и задачи исследования. Основной целью настоящей работы являлось изучение механизма репарации индуцированных топоизомеразой II двухцепочечных разрывов ДНК, а также выяснение его роли в хромосомных перестройках.

В работе были поставлены следующие задачи:

1. определить, приводит ли подавление лигирующей активности топоизомеразы II к возникновению двухцепочечных разрывов ДНК (ДЦР), которые узнаются репарационными системами клетки;
2. выяснить, репарируются ли внесенные топоизомеразой II ДЦР;
3. выявить механизмы, участвующие в репарации повреждений ДНК, возникающих при обработке клеток ингибиторами ДНК-топоизомеразы II.

Научная новизна и практическая ценность работы. В работе впервые продемонстрировано, что репарация двухцепочечных разрывов ДНК (ДЦР), возникающих в клетке в результате подавления лигирующей активности ДНК-топоизомеразы II, осуществляется преимущественно системой негомологичного соединения концов ДНК (NHEJ). Были также исследованы некоторые детали этого процесса. В частности, было показано, что индуцированные топоизомеразой II ДЦР распознаются клеточными системами мониторинга целостности ДНК с некоторой задержкой. Показано, что в условиях подавления лигирующей активности топоизомеразы II двухцепочечные разрывы возникают преимущественно в участках ДНК, ассоциированных с ядерным матриксом. Показано также, что горячие точки рекомбинации (участки генома, в которых сконцентрированы точки разрыва при различных транслокациях) расположены в прикрепленных к ядерному матриксу участках генома. Полученные результаты позволяют говорить о том, что негомологичное соединение концов ДНК (NHEJ) является основным механизмом индуцированных ДНК-топоизомеразой II хромосомных перестроек, и что эти перестройки происходят между

участками прикрепления ДНК к ядерному матриксу. Это исследование имеет не только фундаментальное значение, но и безусловную практическую ценность. В будущем оно может способствовать разработке более эффективных, обладающих меньшим количеством побочных эффектов методов лечения раковых заболеваний с использованием ингибиторов ДНК-топоизомеразы II.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на 9-ой международной конференции молодых ученых “Биология – наука XXI века” (Пушино, 2005), на 6-ой международной конференции по молекулярной генетике соматических клеток (Звенигород, 2005) на международных конференциях EMBO/FEBS “Nuclear Structure and Dynamics” (Ла Гранд Мотт, Франция, 2005) и “Gliwice Scientific Meeting” (Гливицы, Польша, 2005), на 20-ом конгрессе IUBMB (Киото, Япония, 2006).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 8 печатных работ. Из них статей -3, тезисов устных и стендовых сообщений на конференциях - 5.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 112 страницах, содержит 13 рисунков и 1 таблицу, состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов исследования, Обсуждения, Выводов и списка литературы, включающего 235 источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

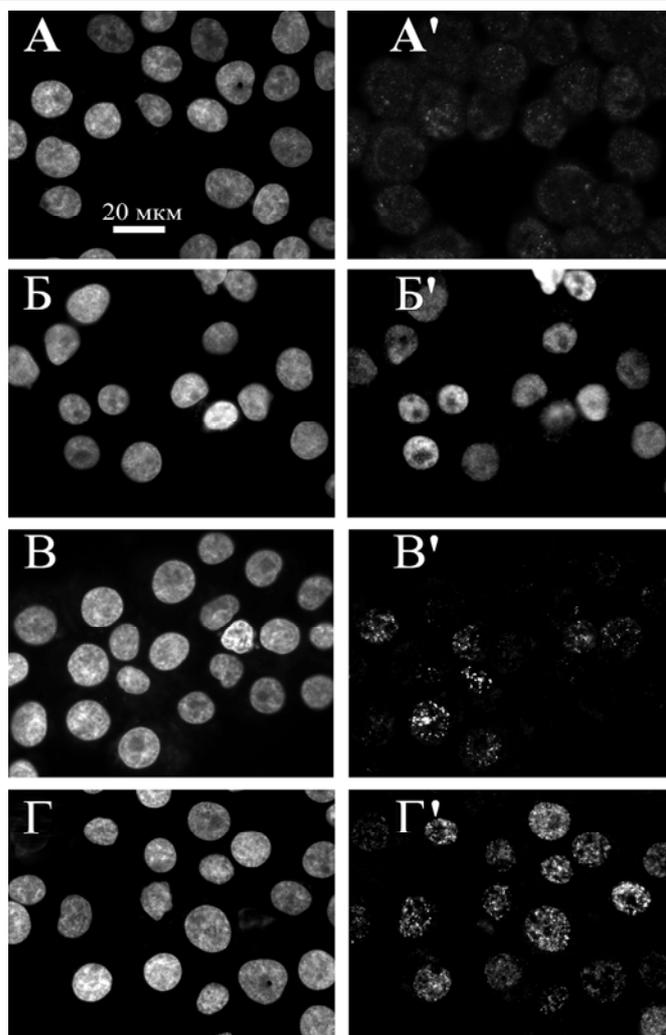
ПОДАВЛЕНИЕ АКТИВНОСТИ ДНК - ТОПОИЗОМЕРАЗЫ II ПРИВОДИТ К ОБРАЗОВАНИЮ

ДВУХЦЕПОЧНЫХ РАЗРЫВОВ ДНК

ДНК-топоизомеразы – ферменты, регулирующие топологию ДНК. По ходу ферментативного цикла сначала фермент вносит разрыв в ДНК (однонитевой в случае топоизомеразы I или двунитевой в случае топоизомеразы II), а затем, после релаксации суперспирали или разделения катенанов, этот разрыв «зашивает». На промежуточной стадии реакции (во время существования разрыва) фермент остается ковалентно связанным с ДНК. Короткоживущий промежуточный комплекс может быть стабилизирован различными ингибиторами. Одним из широко используемых ингибиторов топоизомеразы II является этопозид. Не ясно, каким образом клеточные системы, осуществляющие контроль за целостностью цепи ДНК, узнают «маскированные» разрывы ДНК такого рода и узнают ли вообще? Чтобы выяснить это, мы решили проверить, вызывает ли обработка клеток этопозидом (ингибитором лигазной активности ДНК-топоизомеразы II) образование фокусов гистона γ H2AX. Надо отметить, что одним из первых событий в процессе узнавания и репарации двунитевых разрывов ДНК (ДЦР) является маркирование разрыва, в ходе которого происходит фосфорилирование гистона H2AX (вариантной формы гистона H2A) по 139 положению (Rogakou et al., 1999). Фосфорилирование гистона H2AX имеет процессивный характер и распространяется в обе стороны от ДЦР на расстояния от нескольких сотен до нескольких тысяч т.п.н. (Rogakou et al., 1999; Paull et al., 2000). Таким образом, с момента обнаружения данной модификации гистона, γ H2AX служит универсальным маркером наличия ДЦР, причем при выявлении его с помощью специфичных антител количество фокусов γ H2AX соответствует количеству ДЦР (Sedelnikova et al., 2002). На первом этапе наших исследований эритробласты человека (линия K562), обработанные этопозидом, иммуноокрашивали с помощью антител против γ H2AX. Результаты, представленные на рис. 1, свидетельствуют о том, что подавление

Рис. 1. Обработка клеток этопозидом или блеомицином приводит к образованию фокусов γ H2AX.

a - a' – Иммуноокрашивание клеток K562 антителами против γ H2AX; a - a' – окраска хроматина DAPI. a , a' - необработанные клетки; b , b' - клетки, обработанные 0.1 мкг/мл блеомицина в течение 15 мин; b , b' и c , c' - клетки, обработанные в течение 1 ч этопозидом в концентрации 0.5 и 5 мкг/мл соответственно. Фотографии получены с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DRMB, оснащенного 100x объективом и CCD-камерой.



активности топоII в клетках K562 приводит к формированию четких фокусов γ H2AX. Такие фокусы отсутствовали в контрольных клетках (рис. 1a), а в клетках, обработанных ингибитором топоизомеразы II, количество фокусов увеличивалось с увеличением использованной в эксперименте концентрации этопозида. Увеличение числа ДЦР согласуется с кинетикой деградации ДНК, определенной с помощью гель-электрофореза в пульсирующем поле (рис. 2). В качестве положительного контроля использовали клетки, обработанные блеомицином, индуцирующим разрывы ДНК вне зависимости от подавления активности топоизомеразы II (Huang et al., 1981; Olive & Banath, 1993). Как видно из рис. 1, обработка блеомицином приводит к образованию очень большого числа фокусов γ H2AX, тогда как деградация ДНК в этих условиях ничтожна (рис. 2). Кроме того, мы показали, что этопозид, в отличие от блеомицина, индуцирует образование фокусов γ H2AX с некоторой

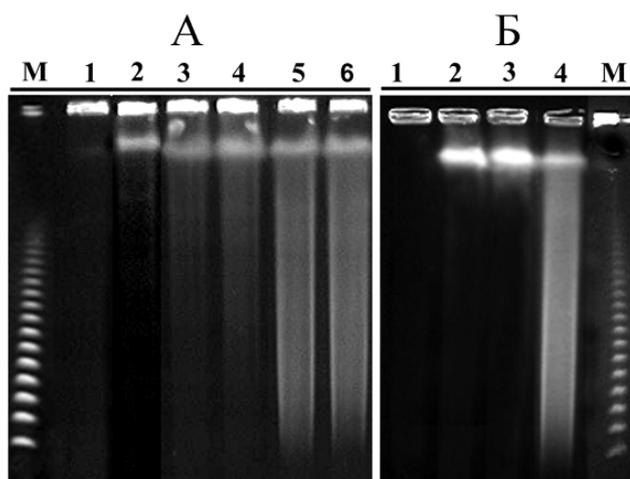
задержкой. Все это, а также данные, полученные другими исследователями (Rogakou et al., 1999; Riballo et al., 2004), позволяет предположить, что комплексы топоизомеразы II и ДНК не могут непосредственно узнаваться клеточными системами, контролирующими целостность ДНК и, вероятно, необходимо некоторое время для того, чтобы привести такие ДЦР в распознаваемую форму. Очевидно, существуют определенные механизмы преобразования топоII/ДНК-комплексов в распознаваемые ДЦР. Поскольку “яды” топоизомеразы II активно используются в химиотерапии опухолей, изучение этих механизмов имеет и практическое значение, так как может помочь найти способ уменьшить побочные эффекты антираковых препаратов, подавляющих активность топоизомеразы II.

Результаты, полученные на культуре клеток K562, были подтверждены на клетках HeLa. Выбор этих клеток был обусловлен тем, что для дальнейших исследований нам требовались объемные (3D) препараты для конфокальной микроскопии, для изготовления которых в большей степени подходят прикрепленные культуры клеток. В данном случае мы решили более детально изучить кинетику образования ДЦР в ответ на подавление активности топоизомеразы II. Было показано, что количество фокусов гистона γ H2AX (а

Рис. 2. Анализ деградации ДНК в клетках K562, обработанных этопозидом и блеомицином.

Клетки, находящиеся в экспоненциальной стадии роста, обрабатывали этопозидом или блеомицином. ДНК разделяли с помощью гель-электрофореза в пульсирующем поле и окрашивали 30 мин бромистым этидием (1 мкг/мл). В качестве маркера (*M*) использовали 50 т.п.н. ДНК-“лестницу”.

a - ДНК клеток, обработанных этопозидом: 0.5 мкг/мл, 1 ч (2); 5 мкг/мл, 1 (3) или 2 ч (4); и 100 мкг/мл, 1 (5) или 2 ч (6). *б* - ДНК клеток, обработанных блеомицином в концентрации 0.1, 0.5 и 5 мкг/мл в течение 15 мин (2, 3 и 4 соответственно). 1 - ДНК необработанных клеток.

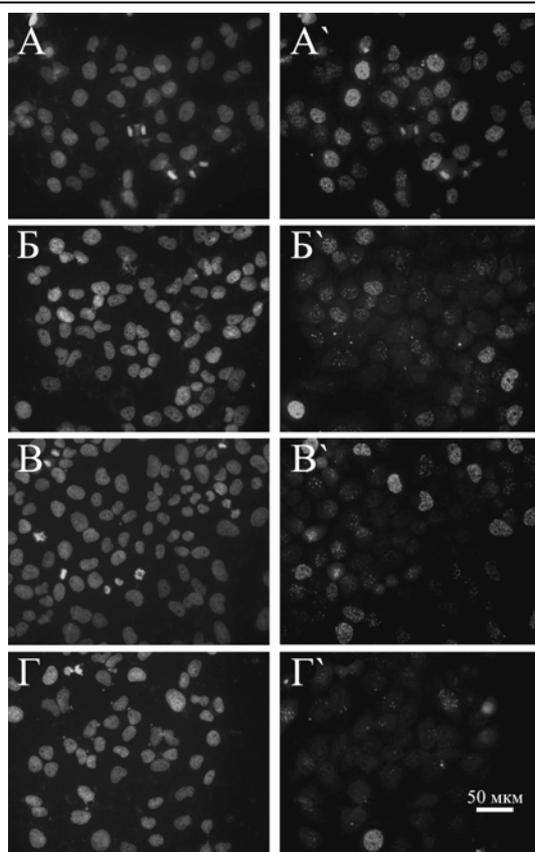


значит и ДЦР) увеличивалось с увеличением концентрации этопозида (см. рис. 3 ДИССЕРТАЦИИ). Хотелось бы подчеркнуть, что количество ДЦР зависело в большей степени именно от концентрации ингибитора, а не от времени обработки.

Несмотря на то, что индуцированные топоизомеразой II разрывы ДНК с той или иной эффективностью узнаются клеткой, о чем свидетельствует образование фокусов γ H2AX, открытым оставался вопрос об их репарации. Одной из стандартных методик изучения кинетики репарации ДЦР является определение количества фокусов гистона γ H2AX в ядре через определенные промежутки времени после индукции разрывов (Kuhne et al., 2003). Мы провели серию иммуноокрашиваний клеток, обработанных этопозидом в стандартных условиях (10 мкг/мл, 1 ч) и инкубированных после обработки в свежей среде в течение 6, 14 и 24 часов. Результаты, представленные на рис. 3, показывают, что количество фокусов γ H2AX в клетках уменьшалось с увеличением времени инкубации клеток в среде без этопозиды. Это свидетельствует о том, что вносимые топоизомеразой II ДЦР эффективно

Рис. 3. Иммунофлуоресцентный анализ репарации ДЦР, индуцированных топоизомеразой II.

Кинетику репарации ДЦР анализировали в клетках HeLa, обработанных этопозидом (*a, a'*), которые инкубировали в свежей среде 6, 14 и 24 ч (*б, б'*; *в, в'* и *г, г'* соответственно). После этого клетки иммуноокрашивали антителами против γ H2AX (*a'-г'*). ДНК выявляли с помощью окраски DAPI (*a-г*). Фотографии получены с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DRMB, оснащенного 40x объективом.



репарируются. Достаточно большая часть ДЦР репарировалась уже спустя несколько часов после обработки клеток этопозидом (рис. 3б), через сутки в клетках практически не оставалось ДЦР (рис. 3г). В ходе этого эксперимента контролировалась также и выживаемость клеток. Её определяли с помощью окраски трипановым синим; она составила более 94% и не отличалась от таковой во фракции не обработанных ингибитором клеток. Полученные нами результаты, свидетельствуют о том, что индуцированные топоизомеразой II ДЦР эффективно репарируются.

РОЛЬ ЯДЕРНОГО МАТРИКСА В РЕПАРАЦИИ ДЦР, ИНДУЦИРОВАННЫХ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗОЙ II

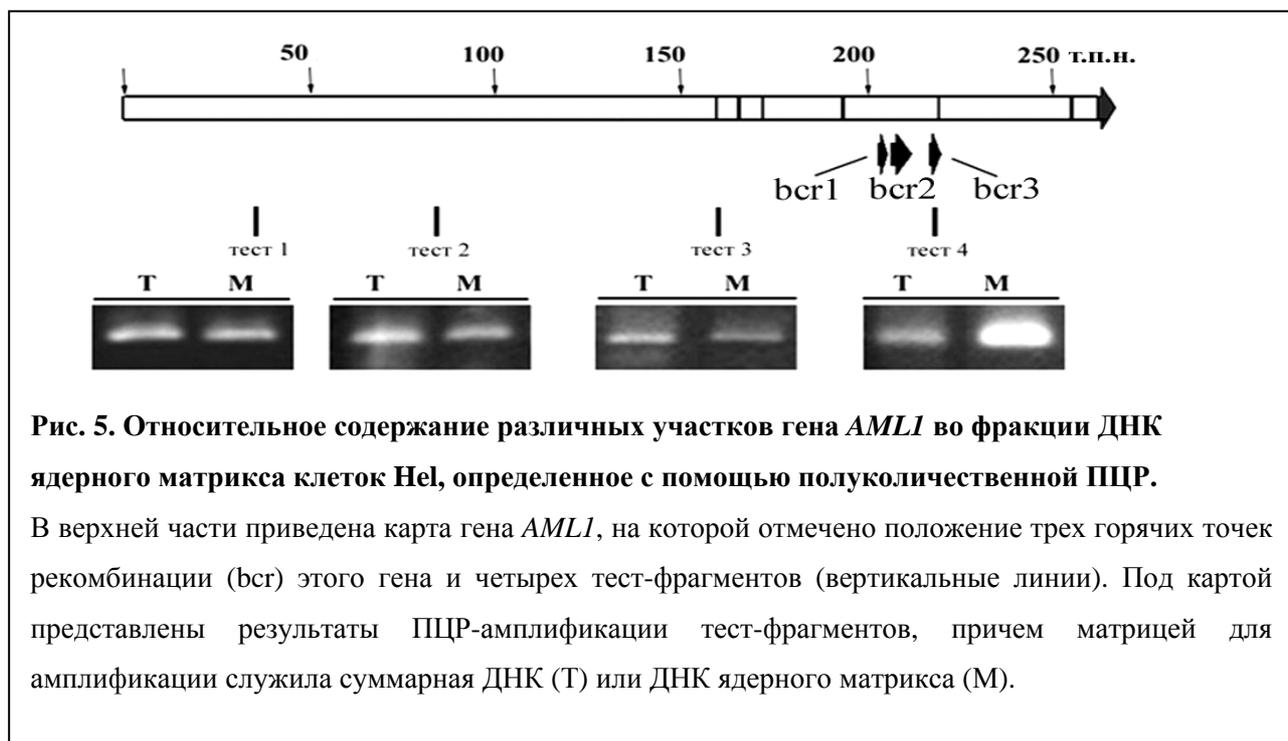
Скелетная структура, которая сохраняет общую форму клеточного ядра после удаления основной массы ДНК и связанных с ней белков называется ядерным матриксом. В составе ядерного матрикса остаются фрагменты ДНК, прочно связанные с белковым скелетом и устойчивые к действию высоких концентраций солей и нуклеаз (так называемые фрагменты прилежащей к ядерному матриксу ДНК). Основной функцией, приписываемой этим последовательностям, является образование, поддержание и регуляция петлевых доменов интерфазного хроматина (подробнее см. ДИССЕРТАЦИЮ). Поскольку основной мишенью ингибиторов топоизомеразы II является топоизомераза II ядерного матрикса (так называемая нерастворимая форма ДНК-топоизомеразы II) (Fernandes & Catapano, 1995), вполне логично было предположить, что индуцированные этопозидом ДЦР будут возникать преимущественно в участках ДНК, ассоциированной с ядерным матриксом. Для проверки этого предположения мы проводили иммуноокрашивание антителами против гистона γ H2AX препаратов так называемого «*in situ* ядерного матрикса» (Staufenbiel & Deppert, 1984; Chaly et al., 1985). Согласно классической методике, при получении ядерных матриксов используют экстракцию обработанных нуклеазами ядер 2М раствором NaCl. Понятно, что такая обработка приведет к удалению всех гистонов, в том числе и γ H2AX. Поэтому мы

получали ядерные матриксы с использованием более «мягкой» экстракции 0.5 М NaCl. Эта экстракция удаляет гистон H1, что обеспечивает возможность солюбилизации отщепившихся фрагментов хроматина. В то же время гистоны нуклеосомного ядра остаются связанными с ДНК (Rzeszowska-Wolny et al., 1988).

Результаты, представленные на Рис. 4, показывают, что основная часть фокусов γ H2AX, появившихся в результате обработки клеток этопозидом, остается связанной с ядерным матриксом. Чтобы убедиться в том, что ассоциация с ядерным матриксом зависит от природы ДЦР и характерна для разрывов, индуцированных топоизомеразой II, мы провели серию опытов, в которых ДЦР индуцировали γ -излучением. Оказалось, что ничтожно малая часть фокусов γ H2AX, сформировавшихся в ответ на γ -излучение, оставалась связанной с ядерным матриксом (рис. 4a). Таким образом, можно говорить о том, что индукция ДЦР в ответ на обработку клеток ингибиторами топоизомеразы II носит достаточно специфичный характер и происходит в основном в участках ДНК, ассоциированных с ядерным матриксом.



Известно, что транслокации, ассоциированные с развитием некоторых лейкозов, имеют характерную черту – точки разрыва сосредоточены в достаточно узких участках генома, названных кластерами точек разрыва (breakpoint cluster region, *bcr*). В настоящее время выявлено уже достаточно много таких горячих точек рекомбинации, однако, наиболее хорошо изучены три из них в гене *AML1* - партнере гена *ETO* по транслокациям. Нам представлялось интересным определить, взаимодействуют ли эти участки с ядерным матриксом. С этой целью мы использовали полуколичественный ПЦР-анализ. На рис. 5 показано относительное содержание различных участков гена *AML1* (*bcr3* и нескольких удаленных транскрибируемых участков) в суммарной ДНК и во фракции ДНК ядерного матрикса. Для ПЦР-амплификации мы использовали одинаковое количество ДНК из обеих фракций. Совершенно очевидно, что обогащение фракции ДНК ядерного матрикса происходит только фрагментом, соответствующим *bcr3* гена *AML1*. Это свидетельствует о том, что горячие точки рекомбинации (по крайней мере, в гене *AML1*) взаимодействуют с ядерным матриксом.



НЕГОМОЛОГИЧНОЕ СОЕДИНЕНИЕ КОНЦОВ ДНК, КАК МЕХАНИЗМ ХРОМОСОМНЫХ ПЕРЕСТРОЕК,

ИНДУЦИРОВАННЫХ ДНК-ТОПОИЗОМЕРАЗой II

Несмотря на то, что вопрос о роли ингибиторов топоизомеразы II в индукции хромосомных перестроек (и, соответственно, вторичных лейкозов) изучается уже достаточно давно, до сих пор не вполне ясно какой молекулярный механизм (-ы) задействован в этом процессе. К моменту начала данной работы в научной литературе существовало некоторое количество косвенных указаний на возможное участие в этих процессах системы негомологического соединения концов ДНК (non-homologous end joining, NHEJ) (Adachi et al., 2003; Adachi et al., 2004). Поскольку, нам уже было известно, что, подавление активности топоизомеразы II с одной стороны приводит к индукции ДЦР, причем разрывы возникают преимущественно в участках ДНК, ассоциированных с ядерным матриксом (см. предыдущий раздел), а с другой стороны – может привести к хромосомным перестройкам, лежащим в основе вторичных (ассоциированных с химиотерапией опухолей ингибиторами топоизомеразы II) лейкозов (Maraschin et al., 1990; Shibuya et al., 1994), оставалось только соединить эти два этапа в логическую цепочку.

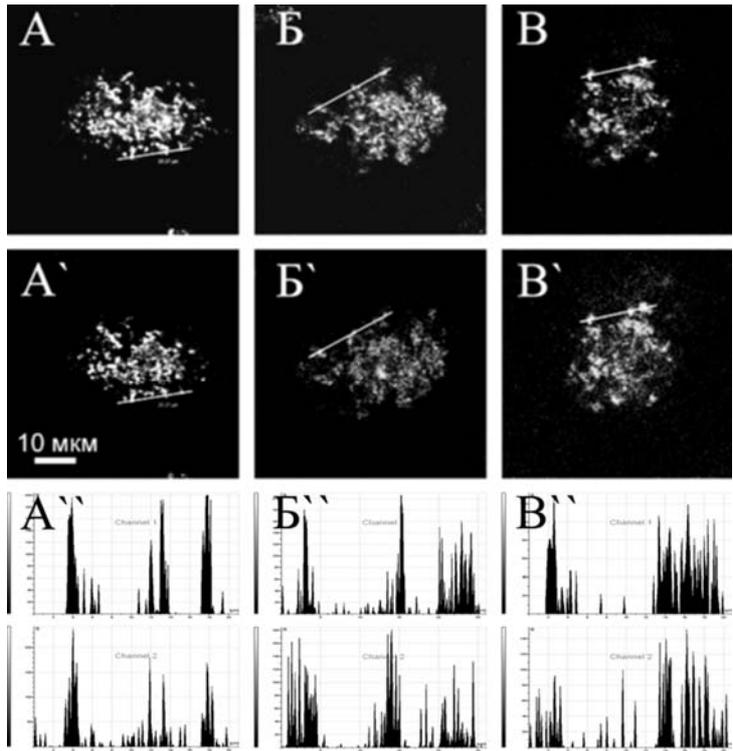
Среди белков, участвующих в NHEJ, наиболее изучены Ku70/80, каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PKcs), ДНК-лигаза IV, ее кофактор XRCC4, а также ДНК-полимераза μ и полинуклеотидкиназа/фосфатаза. Мы решили проверить возможность колокализации основных компонентов системы незаконной рекомбинации ДНК (таких как Ku80, DNA-PKcs, ДНК-лигаза IV) с фокусами гистона γ H2AX, индуцированными путем подавления в клетках активности топоII. Мы провели серию экспериментов по двойному иммуноокрашиванию *in situ* ядерных матриксов, полученных из обработанных этопозидом клеток. Было показано, что Ku80, DNA-PKcs и ДНК-лигаза IV образуют четкие фокусы на ядерных матриксах, которые колокализуются с фокусами гистона γ H2AX (рис. 6; см. также рис. 8 ДИССЕРТАЦИИ). С помощью программного обеспечения Leica LCS нами была посчитана интенсивность флуоресценции вдоль

Рис. 6. Белки Ku80, DNA-PK_{cs} и ДНК-лигаза IV колокализуются с фокусами гистона γ H2AX на ядерном матриксе.

Препараты *in situ* ядерных матриксов, полученные из обработанных этопозидом (10 мкг/мл, 1 ч) клеток HeLa, иммуноокрашены с помощью антител против γ H2AX (а-в) и одного из белков, участвующих в незаконной рекомбинации: Ku80 (а'), DNA-PK_{cs} (б'), ДНК-лигазы IV (в').

а''- в'' — интенсивность флуоресценции вдоль проведенной линии в зеленом и красном каналах, показывающая полную колокализацию фокусов γ H2AX и фокусов белков незаконной

рекомбинации. Линии проведены по краю клеток для того, чтобы показать несколько отдельных пиков флуоресценции. Фотографии получены с помощью сканирующего конфокального микроскопа Leica, интенсивность флуоресценции определяли с помощью программы LCS (Leica Confocal Software).



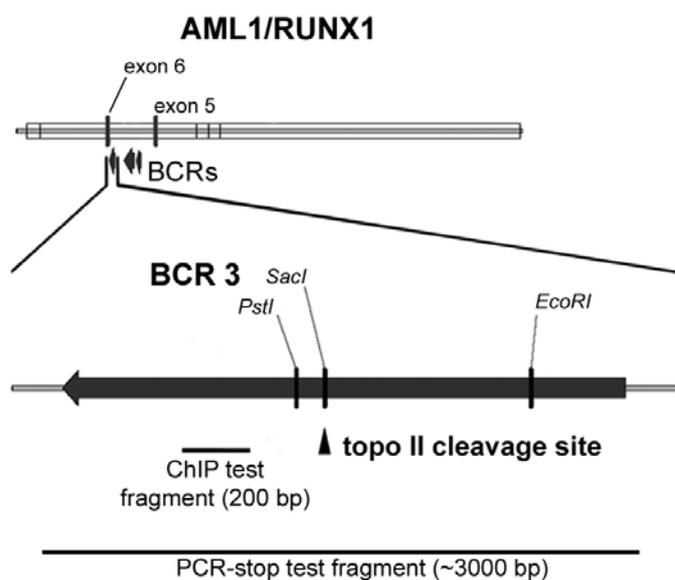
проведенной линии в зеленом и красном каналах, показывающая полную колокализацию фокусов γ H2AX и фокусов перечисленных выше белков незаконной рекомбинации (рис. 6а''-в''). Эти результаты свидетельствуют о том, что репарация ДЦР, индуцированных топоизомеразой II, происходит на ядерном матриксе с помощью механизма негомологичного соединения концов ДНК (незаконной рекомбинации).

Выводы, сделанные на основе данных по иммунофлуоресценции, были подтверждены с помощью независимого молекулярно-биологического подхода. Необходимо было показать, что в результате подавления активности топоизомеразы II происходит связывание (ассоциация) белков системы незаконной рекомбинации (таких как Ku80, DNA-PKcs, ДНК-лигаза IV) с участками ДНК, прилегающими к вновь возникшим ДЦР. Наиболее удобным

инструментом для достижения такой цели является метод иммунопреципитации хроматина - один из немногих биохимических подходов, позволяющих изучать ДНК-белковые взаимодействия, существующие *in vivo*. ДНК-белковые комплексы фиксируются посредством обработки живых клеток формальдегидом. После лизиса клеток и фрагментации хроматина проводится иммунопреципитация, в ходе которой происходит ассоциация фрагментов хроматина, содержащих определенный белок, с антителами против данного белка. Затем проводится второй раунд преципитации - очистка таких фрагментов с помощью агарозы (либо любого другого носителя), конъюгированной с белком *A. S.aureus*, способным специфически связывать иммуноглобулины. После депротенизации и очистки преципитированной ДНК в руках экспериментатора оказывается набор фрагментов ДНК, взаимодействовавших *in vivo* с тем или иным белком, антитела против которого были использованы для иммунопреципитации. Дальнейший количественный анализ последовательности X во фракции преципитированной (с помощью антител к белку Y) ДНК может дать ответ на вопрос о наличии в живых клетках взаимодействия между белком Y и последовательностью X.

В этих экспериментах в качестве модельной системы мы использовали участок кластеризации точек разрыва в гене *AML1* (*AML1-bcr3*). Как уже говорилось выше, *AML1*-

Рис. 7. Схематическое изображение гена *AML1/RUNX1*. Показано положение сайта чувствительности к ДНК-топоизомеразе II и тест-фрагментов, использованных в экспериментах по иммунопреципитации хроматина (ChIP) и остановки ПЦР (PCR-stop).



bcr3 взаимодействует *in vivo* с ядерным матриксом (см. предыдущий раздел), к тому же, ранее в нем был локализован сайт гиперчувствительности к топоизомеразе II (рис. 7) (Zhang et al., 2001).

Перед началом основных экспериментов необходимо было проверить, во-первых, как данные клетки реагируют на обработку достаточно большой концентрацией этопозиды (100 мкг/мл) и, во-вторых, действительно ли в использованных нами клетках (клетки эритролейкемии человека, линия Jurkat) исследуемый участок ДНК содержит сайт предпочтительного расщепления ДНК-топоизомеразой II. Для решения первой задачи мы воспользовались описанной выше методикой, основанной на иммуноокрашивании клеток антителами против гистона γ H2AX; индуцированные топоизомеразой II ДЦР достаточно эффективно репарируются (см. рис. 11 ДИССЕРТАЦИИ). Что же касается наличия сайтов чувствительности к топоизомеразе II, мы использовали относительно новый подход – ингибирование полимеразной цепной реакции (ПЦР-стоп; Oshita et al., 1998). Суть метода заключается в том, что при внесении двунитевого разрыва в исследуемый участок ДНК полимеразная цепная реакция с праймеров, фланкирующих предполагаемое место разрыва, проходит с нулевой (если разрыв вносится в ДНК всех клеток) либо меньшей (если разрыв вносится в ДНК некоторой части клеток) эффективностью, чем ПЦР контрольного участка

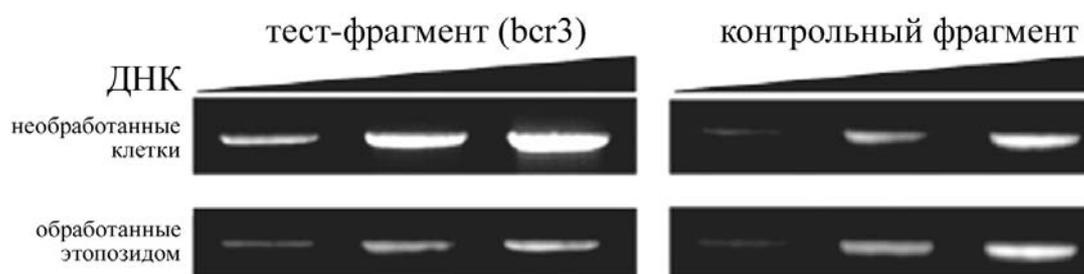


Рис. 8. Участок *bcr3* гена *AML1* действительно содержит сайт предпочтительного расщепления ДНК-топоизомеразой II (объяснения см. в тексте).

ДНК, не содержащего сайтов расщепления топоизомеразой II. В качестве матрицы использовалась ДНК из обработанных и не обработанных этопозидом клеток. Олигонуклеотиды для ПЦР подбирались таким образом, чтобы амплифицируемый фрагмент был длиной порядка 3 т.п.н. и содержал предполагаемые сайты чувствительности к топоизомеразе II, а также последовательности олигонуклеотидов, использованных для полуколичественного анализа фракции осажденной ДНК (см. схему на Рис. 7). Таким же образом подбирались олигонуклеотиды для амплификации контрольного (не содержащего ДЦР) фрагмента ДНК. Из результатов, представленных на рис. 8, следует, что, в отличие от контрольного фрагмента, исследуемый фрагмент ДНК (*AML1-bcr3*), действительно содержит сайт предпочтительного расщепления топоизомеразой II в условиях подавления активности этого фермента *in vivo*.

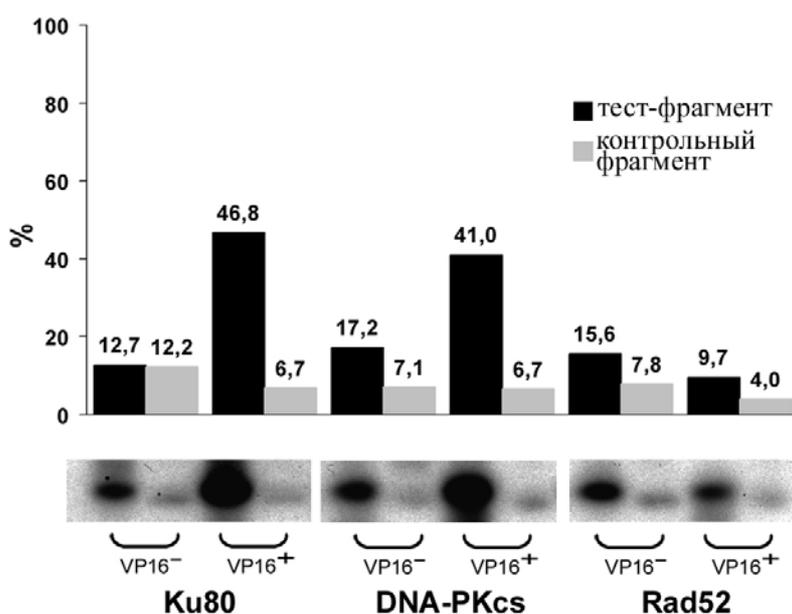


Рис. 9. Подавление лигирующей активности ДНК-топоизомеразы II приводит к сборке белковых комплексов, участвующих в негомологичном соединении концов ДНК, на участке *bcr3* гена *AML1/RUNX1* человека.

Хроматин, полученный из обработанных (100 мкг/мл, 1 час; VP16⁺) и необработанных (VP16⁻) этопозидом клеток Jurkat, иммунопреципитировали с помощью антител против белков Ku80, DNA-PKcs и Rad52. Внизу показаны результаты амплификации исследуемых фрагментов при помощи радиоактивной ПЦР. Относительное содержание тест- (*bcr3*) и контрольного фрагментов во фракциях преципитированной ДНК определяли как отношение [интенсивность продукта, амплифицированного с использованием иммунопреципитированной ДНК]/[интенсивность продукта, амплифицированного с использованием тотальной ДНК (*input*)].

Далее необходимо было выяснить какая группа белков (белки, осуществляющие NHEJ, или белки, осуществляющие гомологичную рекомбинацию) связываются с последовательностями, фланкирующими область ДЦР. Для иммунопреципитации хроматина мы использовали антитела против белков Ku80, DNA-PKcs (NHEJ) и Rad52 (гомологичная рекомбинация). Количество тестируемого (фланкирующего ДЦР в участке *AML1-bcr3*, см. Рис. 7) и контрольного фрагмента определяли с помощью радиоактивной ПЦР во фракциях осажденной антителами ДНК из обработанных и не обработанных этопозидом клеток. Мы показали, что в результате подавления лигирующей активности топоизомеразы II и, как следствие, возникновения ДЦР, на участке ДНК, находящемся в непосредственной близости от внесенного разрыва начинают собираться белковые комплексы, участвующие в процессе негомологичного соединения концов ДНК (NHEJ) (рис. 9). Это означает, что наиболее вероятным механизмом репарации индуцированных топоизомеразой II ДЦР является негомологичное соединение концов ДНК (NHEJ), которое часто приводит к хромосомным перестройкам.

Выводы

1. Продemonстрировано, что стабилизированные ингибиторами комплексы топоизомеразы II с ДНК конвертируются в клетке в двухцепочечные разрывы, которые узнаются системами мониторинга целостности ДНК.
2. Показано, что при подавлении лигирующей активности ДНК-топоизомеразы II разрывы вносятся предпочтительно в участки прикрепления ДНК к ядерному матриксу.
3. Продemonстрировано, что участок кластеризации хромосомных разрывов, присутствующий в гене *AML1*, прикреплен к ядерному матриксу.
4. Впервые продemonстрировано, что репарация двухцепочечных разрывов, вносимых в ДНК топоизомеразой II, осуществляется преимущественно системой негомологичного соединения концов ДНК.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Kantidze O.L., Iarovaia O.V., Razin S.V. 2006. Assembly of nuclear matrix - bound protein complexes involved in non-homologous end joining is induced by inhibition of DNA topoisomerase II. *Journal of Cellular Physiology* **207**, 660-667.
2. Кантидзе О.Л., Яровая О.В., Ключков Д.Б., Разин С.В. 2006. Незаконная рекомбинация как возможный механизм хромосомных перестроек, индуцированных ДНК-топоизомеразой II. *Молекулярная Биология* **40** (5), 878-885.
3. Kantidze O.L., Razin S.V. 2007. Chemotherapy-related secondary leukemias: a role for DNA repair by error-prone non-homologous end joining in topoisomerase II – induced chromosomal rearrangements. *Gene* **391** (1-2), 76-79.

Материалы конференций:

1. Кантидзе О.Л., Яровая О.В., Разин С.В. Ингибиторы ДНК-топоизомеразы II индуцируют образование фокусов γ H2AX в клетках K562 и HeLa. 9-ая Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых "Биология - Наука XXI Века", 19 - 21 апреля 2005, Пущино, Россия, с. 4
2. Kantidze O.L., Iarovaia O.V., Razin S.V. Nuclear matrix associated non-homologous end joining is a possible mechanism of topoisomerase II induced chromosomal rearrangements. EMBO/FEBS Conference on Nuclear Structure and Dynamics, 24-28 September 2005, La Grande Motte, France, p. 76
3. Kantidze O.L., Iarovaia O.V., Razin S.V. Assembly of nuclear matrix - bound protein complexes involved in non-homologous end joining is induced by inhibition of DNA topoisomerase II. Gliwice Scientific Meeting, Gliwice, 18-19 November 2005, Gliwice, Poland, p. 30

4. Кантидзе О.Л., Яровая О.В., Разин С.В. Возможным механизмом индуцированных ДНК топоизомеразой II хромосомных перестроек является незаконная рекомбинация. 6-ая Международная конференция по молекулярной генетике соматических клеток. 12-16 декабря 2005, Звенигород, Россия, с. 26
5. Kantidze O.L., Iarovaia O.V., Razin S.V. Illegitimate recombination as a possible mechanism of topoisomerase II - induced chromosomal rearrangements. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, 16-23 June 2006, Kyoto, Japan, p. 557