

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«ДАЛЬНЕВОСТОЧНЫЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

*На правах рукописи*

ГОНЧАРОВ НИКОЛАЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ХРОМОСОМНОЙ  
НЕСТАБИЛЬНОСТИ И НОВЫЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ  
ТРАНСМИССИИ ХРОМОСОМ ЧЕЛОВЕКА**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Научный руководитель:  
кандидат биологических наук  
Кумейко Вадим Владимирович

ВЛАДИВОСТОК – 2019

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:</b> .....	5
<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	6
<b>ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....	12
1.1. Молекулярные детерминанты трансмиссии хромосом .....	12
1.1.1. ДНК центромерного и перицентромерного гетерохроматина .....	12
1.1.2. Белковые комплексы, участвующие в построении кинетохора и трансмиссии хромосом .....	18
1.1.3. Эпигенетические модификации и формирование стабильной пространственной структуры центромерного гетерохроматина.....	25
1.1.4. Активный хроматин и транскрипция центромерного хроматина.....	27
1.2. Молекулярные механизмы хромосомной нестабильности .....	30
1.3. Технологии и модели с использованием искусственных хромосом человека .....	32
1.3.1. Искусственные хромосомы человека.....	32
1.3.2. Технология tetO–НАС .....	36
1.3.3. Модели и методы для анализа хромосомной нестабильности .....	38
<b>ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ</b> .....	44
2.1 Материалы .....	44
2.2 Методы .....	51
2.2.1. Сборка шаттл-вектора, содержащего систему сенсоров клеточного цикла.....	51
2.2.2. Приготовление компетентных клеток.....	56

2.2.3. Трансформация.....	57
2.2.4. ПЦР бактериальных клонов.....	57
2.2.5. Выделение плазмидной ДНК.....	58
2.2.6. Определение нуклеотидной последовательности ДНК по методу Сэнгера.....	58
2.2.7. Загрузка кассет в <i>alphoid-tetO</i> НАС с помощью шаттл-векторов через сайт <i>loxP</i> рекомбинации.....	59
2.2.8. Оценка эффективности трансфекции с помощью конфокальной микроскопии.....	59
2.2.9. Оценка эффективности трансфекции с помощью проточной цитофлуориметрии.....	60
2.2.10. Отбор HPRT-положительных клонов.....	60
2.2.11. Выделение хромосомной ДНК из культуры HPRT-положительных клонов.....	60
2.2.12. Подтверждение восстановления HPRT с помощью ПЦР.....	60
2.2.13. Передача НАС от клеток-доноров CHO к клеткам фибросаркомы человека HT1080.....	61
2.2.14. Отбор клонов HT1080 НАС/dGFP.....	63
2.2.15. Флуоресцентная гибридизация <i>in situ</i> (FISH).....	63
2.2.16. Определение скорости пролиферации клеточной популяции HT1080 НАС/dGFP и скорости восстановления экспрессии GFP после трансфекции миРНК.....	65
2.2.17. Оптимизация протокола трансфекции миРНК против генов-кандидатов.....	65
2.2.18. Трансфекция миРНК для анализа с помощью проточной цитофлуориметрии.....	66
2.2.19. Обработка клеточной линии HT1080 НАС dGFP экстрактами для анализа потери искусственной хромосомы.....	66
2.2.20. Проточная цитофлуориметрия.....	67
2.2.21. Трансфекция миРНК на 384 луночном планшете.....	68

2.2.22.	Фиксация клеток HT1080 HAC/dGFP .....	68
2.2.23.	Вычисление вероятности потери HAC под действием миРНК-опосредованного подавления экспрессии гена или лекарственного кандидата.....	68
<b>ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ</b> .....		70
3.1.	Создание тест-системы на основе искусственной хромосомы человека tetO–HAC для массового скрининга факторов, вызывающих хромосомную нестабильность .....	70
3.2.	Поиск новых генов, вовлеченных в процесс хромосомной трансмиссии.....	86
3.3.	Апробация созданной тест-системы для скрининга лекарственных кандидатов, вызывающих хромосомную нестабильность .....	97
<b>ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ</b> .....		105
4.1	Сравнение тест-системы HT1080 HAC/dGFP с существующими методами идентификации хромосомной нестабильности.....	105
4.2	Структурно-функциональные особенности продуктов экспрессии обнаруженных генов, вовлеченных в процесс хромосомной трансмиссии .....	106
4.3	Новые молекулярные детерминанты хромосомной нестабильности .....	108
4.4	Возможные молекулярные механизмы участия выявленных генов в хромосомной нестабильности.....	113
4.5	Эффект экстракта из листьев <i>Punica granatum</i> на процесс трансмиссии хромосом и клеточный цикл.....	118
<b>ЗАКЛЮЧЕНИЕ</b> .....		122
<b>ВЫВОДЫ</b> .....		125
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b> .....		126

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ:**

ДМСО – диметилсульфоксид

миРНК – малые интерферирующие РНК

м.н.п. – миллионы нуклеотидных пар

т.н.п. – тысячи нуклеотидных пар

н.п. – нуклеотидные пары

ХН – хромосомная нестабильность

ВАС – Bacterial artificial chromosome (Бактериальная искусственная хромосома);

СЕН – Centromeric chromatin (Центромерный хроматин)

FISH – Fluorescence *in situ* hybridization (Флуоресцентная гибридизация ДНК на микро препаратах)

GFP – Green fluorescence protein (Зеленый флуоресцентный белок)

НАС – Human artificial chromosome (Искусственная хромосома человека)

IC 50 Half maximal inhibitory concentration (Концентрация полумаксимального ингибирования)

МАР – Mitogen-activated protein kinase

Plk1 – Polo-like kinase 1 (Поло-подобная киназа 1)

SAC – Spindle assembly checkpoint (Комплекс инициации сборки веретена деления)

TRF1 – Telomeric repeat binding factor 1 (Фактор связывания теломерных повторов)

УАС – Yeast artificial chromosome (Дрожжевая искусственная хромосома)

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность темы исследования.** Трансмиссия хромосом во время клеточного деления обеспечивается согласованной работой множества молекулярных детерминант, к которым относятся белки кинетохорного комплекса и митотического цитоскелета, компоненты центрального хроматина и его эпигенетические модификации. Нарушение работы этих элементов приводит к хромосомной нестабильности и образованию анеуплоидных клеток.

Явление хромосомной нестабильности характерно для злокачественных новообразований и может достигать порогового уровня, за которым прекращается деление клеток и рост опухоли (Janssen, 2009). Медикаментозное увеличение хромосомной нестабильности в опухолевых клетках используется в терапии некоторых форм рака. Для этого применяют препараты, которые препятствуют функционированию комплексов, отвечающих за образование и стабилизацию кинетохора. Мишенями для подобного рода препаратов служат молекулярные детерминанты, а именно продукты экспрессии генов, вовлечённые в процессы стабилизации трансмиссии хромосом.

Таким образом, важной фундаментальной задачей является поиск новых молекулярных детерминант, участвующих в трансмиссии хромосом в клетках человека, и выявление препаратов-кандидатов, способных вызывать хромосомную нестабильность.

**Степень разработанности темы.** На сегодняшний день доказано участие приблизительно 400 генов в трансмиссии хромосом человека, тогда как при исследовании дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe* было обнаружено 937 таких генов (Stirling et al., 2011, 2012). Поскольку митоз – эволюционно древний и консервативный процесс, можно предположить, что в геноме человека есть неописанные гены-регуляторы сегрегации и репликации хромосом, ортологичные генам дрожжей.

Химические соединения, способные нарушать механизмы сегрегации хромосом являются перспективными препаратами-кандидатами для

противоопухолевой терапии (Janssen, 2009). Такие химические соединения блокируют работу молекулярных детерминант, вовлечённых в процессы стабилизации трансмиссии хромосом, и приводят к хромосомной нестабильности. Множество молекулярных детерминант трансмиссии хромосом в клетках человека остаются неизвестными (Stirling et al., 2011, 2012).

Для детекции хромосомной нестабильности в человеческих клетках необходимо создание удобной тест-системы, позволяющей производить массовый скрининг генов и продуктов их экспрессии, участвующих в трансмиссии хромосом, и выявлять химические соединения, способные вызывать хромосомную нестабильность. Удобными экспериментальными моделями для создания подобной тест-системы являются клеточные линии с искусственными хромосомами человека (human artificial chromosome, НАС), представляющие собой синтетическую модель кинетохора человека.

**Цель и задачи исследования.** Целью данной работы является разработка тест-системы для количественной оценки уровня хромосомной нестабильности и поиск новых молекулярных детерминант трансмиссии хромосом в клетках человека.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

1. Сконструировать тест-систему на основе клеточной линии с искусственной хромосомой человека, позволяющую проводить идентификацию молекулярных детерминант, вовлечённых в трансмиссию хромосом.
2. Провести поиск генов и белков, не идентифицированных ранее в качестве молекулярных детерминант трансмиссии хромосом в клетках человека.
3. Апробировать созданную тест-систему для поиска новых препаратов, вызывающих хромосомную нестабильность.

**Научная новизна.** В ходе данной работы разработана тест-система на основе искусственной хромосомы человека, позволяющая проводить высокоэффективный массовый поиск новых генов, участвующих в процессе хромосомной трансмиссии и проводить скрининг препаратов-кандидатов, вызывающих хромосомную

нестабильность. Производительность данной системы позволяет в течение 72 ч осуществить скрининг нескольких сотен генов или препаратов с целью выявления их вовлеченности в процесс трансмиссии хромосом. Данная система может быть совместима с различными приборами для анализа флуоресценции, такими как проточные цитофлуориметры, лазерные сканирующие микроскопы, высокопроизводительные системы микроскопии и автоматического анализа изображений (high-content imaging).

Данные, полученные с применением разработанной тест-системы в ходе выполнения работ по теме диссертационного исследования, представляют собой точные количественные характеристики уровня хромосомной нестабильности, возникающей после подавления экспрессии генов-кандидатов, а также в результате действия различных растительных экстрактов, примененных с целью апробирования системы для поиска препаратов, влияющих на трансмиссию хромосом.

В ходе выполнения данной работы в результате скрининга молекулярной библиотеки, включающей 714 миРНК, таргетированных на кодирующие последовательности протеинкиназ, была доказана связь генов *PINK1*, *IRAK1*, *PNCK*, *TAOK1* и *TRIO* с процессом митотической трансмиссии хромосом. Была обнаружена способность экстрактов из листьев *Punica granatum* вызывать хромосомную нестабильность.

**Теоретическая и практическая значимость.** Результаты данного исследования пополняют существующий список молекулярных детерминант трансмиссии хромосом человека и позволяют расширить понимание того, как изменились в процессе эволюции функции генов, регулирующих процессы хромосомной трансмиссии, а также установить их роль в репликации и сегрегации хромосом. Обнаружение новых молекулярных детерминант трансмиссии хромосом человека позволяет обновить список потенциальных мишеней для противоопухолевых препаратов. Выявление мутаций в обнаруженных генах может быть использовано для ранней диагностики некоторых форм рака. Дальнейшее использование созданной тест-системы для анализа препаратов-кандидатов и



подробное изучение механизмов действия зафиксированного эффекта экстракта из *P. granatum* может стать основой для создания новых лекарственных средств для терапии онкологических заболеваний.

**Методология и методы диссертационного исследования.** В данном диссертационном исследовании применены классические и современные методы молекулярной и клеточной биологии. Для получения рекомбинантных клеточных линий были использованы методы молекулярного клонирования, полимеразной цепной реакции (ПЦР), трансфекции и селекции эукариотических клеток. Расшифровку нуклеотидных последовательностей (секвенирование) проводили по методу Сэнгера. Анализ данных реализован с помощью специализированного программного обеспечения и статистических программ. Для конструирования искусственной хромосомы человека применяли методы рекомбинации плазмидного вектора через сайт *LoxP*. Для анализа флуоресценции были использованы методы проточной цитофлуориметрии, лазерной сканирующей микроскопии, высокоэффективной автоматизированной микроскопии. Для подавления экспрессии генов был использован метод РНК интерференции. Потерю белкового продукта в клеточной популяции после РНК интерференции оценивали с помощью вестерн-блоттинга.

**Личный вклад автора.** Экспериментальная часть, представленная в результатах работы, выполнена непосредственно автором в полном объеме. Личный вклад автора заключается в выполнении работ по конструированию тест-системы и ее апробации для скрининга генов и препаратов-кандидатов, выполнении обработки и анализа экспериментальных данных, участии в обсуждении результатов, подготовке иллюстраций и написании научных публикаций, материалов конференций, выступлении с докладами на конференциях.

**Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Тест-система NT1080 HAC/dGFP на основе клеточной линии, содержащей искусственную хромосому человека с укороченным временем деградации флуоресцентного репортера, позволяет количественно оценивать уровень хромосомной нестабильности и проводить поиск препаратов, вызывающих хромосомную нестабильность.
2. Тест-система NT1080 HAC/dGFP позволяет проводить скрининг библиотек малых интерферирующих РНК и идентифицировать молекулярные детерминанты трансмиссии хромосом человека.
3. Нокадаун генов *BUB1*, *BUB1B*, *IRAK*, *TAOK1*, *TRIO*, *PNCK*, *PINK1* вызывает хромосомную нестабильность.

**Степень достоверности результатов.** Достоверность результатов работы обеспечивается использованием современных методов молекулярного клонирования и конструирования искусственных хромосом человека, применением апробированных методик, использованием взаимодополняющих методов исследования, применением статистических методов при обработке данных экспериментов. Повтор результатов при дополнительных экспериментах и достаточный объем выборок позволили всесторонне проанализировать полученные данные и определили достоверность полученных данных. Фактические материалы, представленные в диссертации, полностью соответствуют первичной документации – протоколам исследований. Результаты, научные положения и выводы базируются на экспериментальных данных, приведенных в виде рисунков, фотографий и таблиц.

**Апробация работы и публикации.** Материалы диссертации были представлены на Школе-конференции для молодых ученых «Future Biotech», Звенигород, Россия, февраль 2014; на VI Международной школе-конференции для молодых ученых по молекулярной генетике «Геномная и системная биология», Москва, Россия, февраль 2014; на Конференции студентов и аспирантов Школы биомедицины «Биомедицина, биотехнология и биомедицинские системы», ДВФУ, Владивосток, Россия, 2015; на Международной конференции «Nuclear structure and

genome integrity», НИИ, Бетезда, США, февраль 2016; на Международной конференции «Future of Biomedicine 2017», Владивосток, Россия, сентябрь 2017; на Региональной конференции для молодых ученых «Дни науки 2018», ДВФУ, Владивосток, Россия, 2018, на Международной конференции «The 44<sup>th</sup> FEBS congress», Краков, Польша, 2019; на Международной конференции «Future of Biomedicine 2019», Владивосток, Россия, сентябрь 2019.

По теме диссертации опубликовано 7 работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых международных журналах, индексируемых Scopus и Web of Science, входящих в список изданий, рекомендованных ВАК, и 5 тезисов научных конференций.

**Структура и объем работы.** Диссертационная работа состоит из введения, основных глав: «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение», а также выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 146 страницах, содержит 27 рисунков и 14 таблиц. Список литературы содержит 195 источников на английском языке.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Процесс трансмиссии хромосом обеспечен согласованной работой многих систем, которые поддерживают стабильность генома на разных этапах клеточного цикла. В представленных ниже главах подробно рассмотрены группы генов и различные последовательности центромерной и перицентромерной ДНК, белковые комплексы кинетохора и эпигенетические сигнальные системы, обеспечивающие стабильность хромосомной трансмиссии.

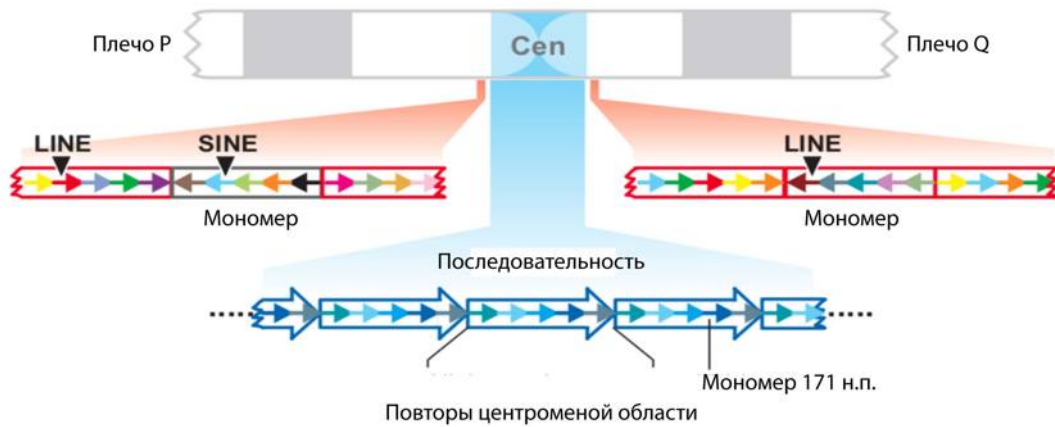
### 1.1. Молекулярные детерминанты трансмиссии хромосом

#### 1.1.1. ДНК центромерного и перицентромерного гетерохроматина

Важными участниками процессов расхождения хромосом во время митоза и мейоза являются **центромеры** – области хроматина, расположенные преимущественно в перетяжках эукариотических хромосом. Данные структуры необходимы для сегрегации сестринских хроматид во время клеточных делений. **Центромерный хроматин** представляет собой фундамент для сборки кинетохора – сложного белкового комплекса, необходимого для связи митотического веретена и центромеры. Правильное взаимодействие белков кинетохорного комплекса между собой и с центромерными участками ДНК необходимо для корректной сегрегации хромосом. **Сегрегация** хромосом является частью более комплексного процесса – **хромосомной трансмиссии**, регулирующего движение хромосом во время клеточного деления и определяющего стабильность генома.

Последовательности ДНК в центромерных областях хроматина представляют собой многократно повторенные структуры, многие тысячи нуклеотидных пар (н.п.) в длину. У приматов, например, центромеры представляют собой сателлитные ДНК, устроенные как тандемно-повторенные последовательности, следующие друг за другом по принципу «голова к хвосту», мономеры таких сателлит состоят из 170 н.п. каждый. Такие центромеры способны участвовать в сегрегации большого количества хромосом. В хромосомах человека центромеры содержат тандемно-повторяющийся повтор  $\alpha$ -сателлитной ДНК

протяженностью 171 н.п. (Schueler, 2001). На рисунке 1 представлена общая схема организации центромер человека (Mary, Sullivan, 2006).



(Mary, Sullivan, 2006)

**Рисунок 1** – Организация центромерной ДНК человека (по: Mary, Sullivan, 2006).

Изображение типичной человеческой хромосомы, перицентромерные области (синие) и сателлитные ДНК. Каждая маленькая стрелка представляет один сателлитный мономер. В перицентромерных областях блоки тандемных сателлитных мономеров из одного семейства (обозначены красными или серыми прямоугольниками) иногда содержат встроенные повторяющиеся элементы (например, длинные диспергированные повторы (перевод с англ. long interspersed nuclear element, LINE) и короткие диспергированные повторы (перевод с англ. short interspersed nuclear element, SINE)). Соседние сателлитные блоки могут существовать в одинаковой или противоположной ориентации. В области центромер повторяющиеся единицы более высокого порядка  $\alpha$ -сателлиты (состоят из пяти мономеров) обозначены большими синими стрелками (Рисунок 1).

Повторы ДНК составляют первичную последовательность всех сложных центромер как у растений, так и у животных. Исключением может послужить *Saccharomyces cerevisiae*, центромера которого представляет собой последовательность протяженностью около 125 т.н.п. и функционирует как основа

для кинетохора, которые связывают по одной микротрубочке (Human, Sorger, 1995).

Еще одной хорошо изученной моделью являются центромеры *Schizosaccharomyces pombe*, у которых описаны последовательности всех центромерных ДНК из трех хромосом (Wood et al., 2002). Центромеры *S. pombe* имеют неповторяющуюся центральную последовательность длиной 5–7 т.н.п., которая окружена «скрытыми повторами» (перевод с англ., innermost repeats, IMR), на которых происходит сборка кинетохора. (Blackwell et al., 2004).

Существует группа сателлитных последовательностей, которые представлены в различных организмах и являются относительно консервативными. Примером таких последовательностей может послужить мотив CENPB box, характерный для  $\alpha$ -сателлитной ДНК человека, длина данного повтора 17 н.п. (Ohzeki, 2002). CENPB box, представляет собой сайт связывания центромерного белка B (перевод с англ., centromere protein B, CENPB). С помощью технологии сборки искусственных хромосом млекопитающих было продемонстрировано, что появление замен в сайте связывания CENPB снижает эффективность образования искусственных хромосом на синтетических  $\alpha$ -сателлитных последовательностях, а следовательно, данный сайт играет критическую роль при сборке кинетохора (Ohzeki et al., 2002) и участвует в построение его структуры (Masumoto, 2004). Присутствие CENPB box-подобных мотивов в филогенетически отдаленных группах позвоночных говорит о его потенциальной роли в формировании кинетохора у многих эукариот (Canapa, 2000; Gindullis, 2001; Mravinac, 2005; Mestrovic et al., 2013).

Сателлитные ДНК больше подвержены мутагенезу, чем экспрессируемые участки хроматина, развитие данных последовательностей происходит по пути согласованной эволюции, что объясняется принципами хромосомного наследования во время кроссинговера, кольцевой амплификации и транспозон-ассоциированом переносе участков последовательности (Dover, Tautz, 1986). Так же объяснением данному способу эволюции может послужить тот факт, что в последовательностях сателлитной ДНК подавлены процессы рекомбинации,

поэтому данные последовательности сохраняют идентичность внутри одного вида, но могут иметь различия между видами не согласованно с их филогенетическим положением (Sturt, Smith, 1976; Mahtani, Willard, 1998; Talbert, Henikoff, 2010). Тем не менее, ранее на приматах был проведен ряд исследований, в которых раскрывается роль сегментальной дупликации в процессе амплификации сателлитных повторов в геноме и, следовательно, в формировании пространственной организации центромерного и перичентромерного районов. Таким образом, сателлитная ДНК становится консервативной и не поддается изменениям после кроссинговера (Horvath et al., 2005; Ma, Jackson, 2006).

Как правило, для образования функциональных комплексов ДНК и белков определяющим фактором является последовательность ДНК, которую специфично распознают сайты связывания белков. Такие белки взаимодействуют с определенными мотивами последовательностей ДНК, а результатом этого взаимодействия является появления функционального комплекса ДНК – белок. Такие механизмы имеют место в регуляции экспрессии генов, например, сборке комплекса инициации транскрипции или распознавания транскрипционным фактором последовательности энхансера. Данные процессы всегда происходят благодаря распознаванию структуры ДНК белком. В центромерных областях хроматина последовательности ДНК не являются ключевыми факторами, обуславливающими (инициирующими) образование кинетохора. Последовательности центромер, обладающие высокой степенью изменчивости между видами, могут быть субстратом для связывания гомологичных белков, образующих кинетохор. Тот факт, что вариабельные, быстро эволюционирующие последовательности ДНК могут быть распознаны и использованы группой так же быстро эволюционирующих аналогичных белков кинетохора, при том, что сам процесс сегрегации хромосом крайне консервативен у всех эукариот, описывается как центромерный парадокс (Eichler, 1999; Henikoff, 2001). Несмотря на вариабельность центромерной ДНК, на ней происходит формирование кинетохора. Поэтому важно заметить, что эволюция сателлитных ДНК не может идти без

коэволюции белковых компонентов кинетохора – таких, как варианты центромерных гистонов и других.

Структурной единицей хроматина является нуклеосома. В основе своей организации нуклеосомы имеют так называемую коровую частицу, представляющую собой белковый октамер, окруженный последовательностью ДНК протяженностью в 147 п.н., которая делает 1,75 витка вокруг поверхности октамера. Октамер состоит из димеров гистонов H3 и H4, а также из гистонов H2A и H2B. Связь октамера с ДНК и октамеров между собой обеспечивает пятый гистон – H1, он стабилизирует два полных витка ДНК вокруг гистонового октамера. Нуклеосомы образуют компартменты протяженностью в 200 п.н., которые классифицируют как первичный уровень упаковки хроматина.

Отличительной особенностью центромерного хроматина млекопитающих является содержание специфичного только для центромерных областей варианта гистона H-3, иначе именуемого центромерным белком А (перевод с англ., centromere protein A, CENPA) (Blower, 2002; Sullivan, Karpen, 2004), так же обозначаемым как CENPA. Альтернативой CENPA млекопитающих является гомологичный и аналогичный ему белок CID у *Drosophila melanogaster*, и Cse4 у *Saccharomyces cerevisiae*. Родственные варианты этих белков были обнаружены при исследовании кинетохора многих одноклеточных и многоклеточных эукариот (Black, Bassett, 2008; Malik, Henikoff, 2009). Считается, что центромерный белок А является ключевым инициатором образования центромеры и определяет локализацию центромер на хромосомах. Однако расположение центромер не обязательно имеет одну строго определенную локализацию, существует также группа так называемых диффузных центромер, кинетохоры которых образуются вдоль всей длины хромосомы. Хромосомы, имеющие один локус расположения центромеры, называют моноцентрическими, а в случае, когда центромеры занимают несколько локусов вдоль всей хромосомы – голоцентрическими (Dernburg, 2001). Примером организма с голоцентрической хромосомой может послужить *Caenorhabditis elegans*. Большинство эукариот имеют



моноцентрические центромеры, состоящие из длинных участков повторяющейся ДНК.

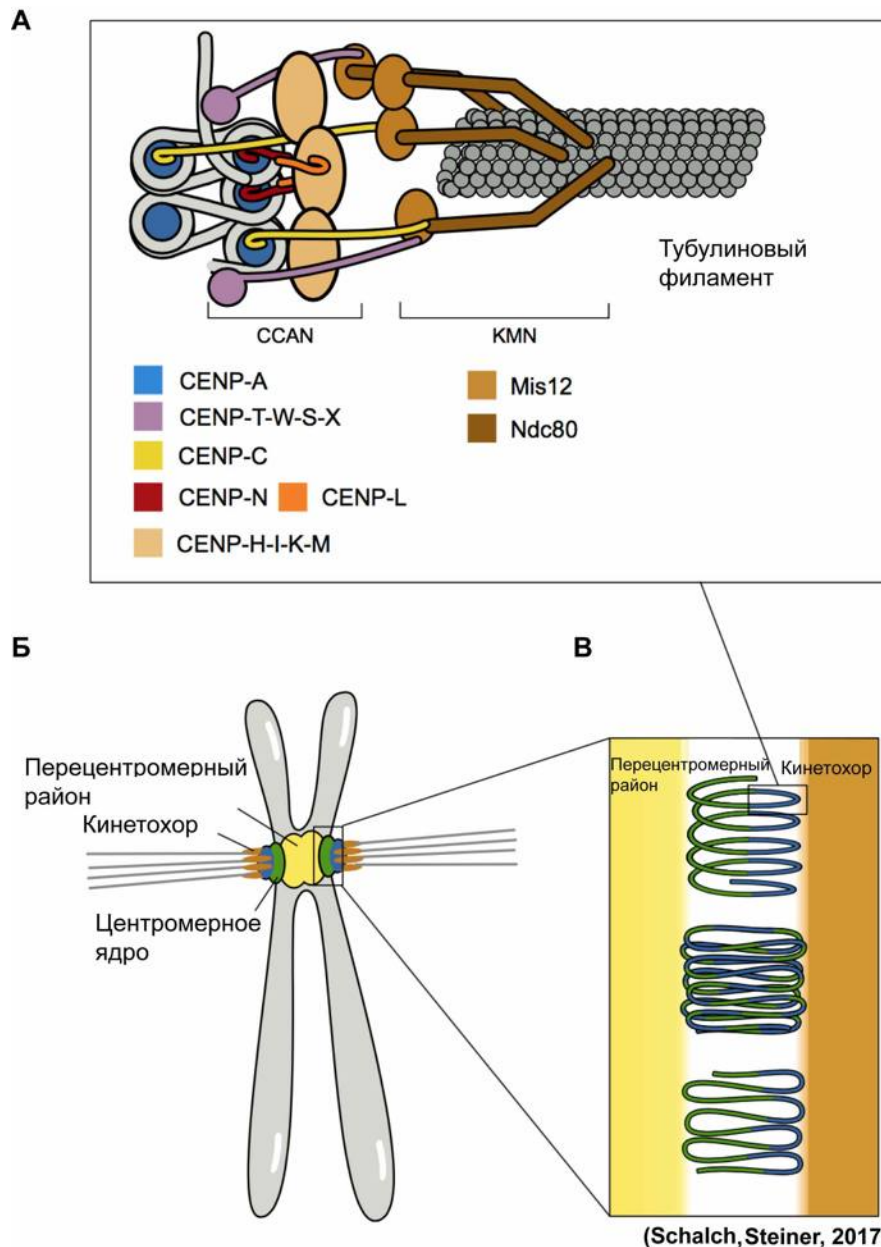
На сегодняшний день принято считать, что центромеры возникают не только в участках повторенных последовательностей  $\alpha$ -сателлитов или последовательностей транспозонных элементов (TEs), но и могут возникать *de novo* вследствие эпигенетических модификаций хроматина. Таки центромеры называют неоцентромерами. Частым участником образования *de novo* центромер является описанный выше компонент сайта связывания CENPB (Okada et al., 2007). Образование неоцентромер обусловлено способностью хроматина собираться в конденсированные домены, что стимулирует образование кинетохора на вторичном и третичном уровне компактизации структуры хроматина. Повторы в ДНК не являются ключевым необходимым условием для образования центромер: они являются частью окружения, необходимого для самосборки наследуемых стабильных центромер. Примером такой самоорганизации центромер в присутствии повторенных последовательностей может послужить  $\alpha$ -сателлитные повторы, находящиеся внутри искусственных хромосом человека. Такие хромосомы при помещении в клетки человека начинают включать в состав своих центромер гистон CENPA, где на их основе формируются функциональные кинетохоры *de novo* (Masumoto et al., 2004). Имеют место примеры экспериментов, демонстрирующие, что в некоторых случаях у взрослых мышей отсутствие CENPB не приводит к нарушению функций центромер и кинетохора (Karoor et al., 1998). Из данной работы можно сделать предположение, что во взрослом, сформированном организме, в образовании центромер принимают участие не только факторы на уровне последовательностей ДНК или белков, ассоциированных с кинетохором, но и эпигенетические сигналы, важность которых описана в главе «Эпигенетические модификации и формирование стабильной пространственной структуры центромерного гетерохроматина».

### 1.1.2. Белковые комплексы, участвующие в построении кинетохора и трансмиссии хромосом

Для центромерного хроматина характерно наличие нуклеосом, содержащих белок CENPA, который заменяет гистон H3, характерный для других участков хроматина. Другие центромер-специфические белки формируют пространственную структуру хроматина в центромере путем связывания центромерной ДНК независимо от CENPA. Так, компоненты конститутивной центромер-ассоциированной сети (перевод с англ., constitutive centromere-associated network, CCAN): CENPT, CENPW, CENPS и CENPX имеют домены связывания с ДНК (Foltz et al., 2006b; Izuta et al., 2006). CENPX работает в качестве субъединицы CENPS ( Foltz et al., 2006b; Amano et al., 2009) и CENPW в качестве посредника в работе CENPT (Hori et al., 2008). Рентгеноструктурный анализ показал, что CENPT, CENPW, CENPS и CENPX представляют собой белки, третичная структура которых напоминает гистоны. Они способны гетеротетрамеризоваться и связываться с суперскрученными районами ДНК (Nishino et al., 2012), при этом, вокруг получившегося белкового комплекса ДНК делает оборот протяженностью около 100 н.п. Для сборки функционального кинетохора необходимы как гетеротетрамеризация, так и связывание с ДНК. Интересно, что комплекс CENPT–W–S–X сам по себе способствует образованию суперспирализованных областей ДНК (Takeuchi et al., 2014), что было продемонстрировано на модели центромер *S. cerevisiae* (Furuyama, Henikoff, 2009; Diaz-Ingelmo et al., 2015;). Таким образом, набор белков CCAN может служить альтернативным механизмом связывания кинетохора с хроматином, который частично пропускает нуклеосомы CENPA. Молекулярный механизм такого образования кинетохора остается неизвестным (Hori et al., 2013).

Как упоминалось выше, последовательности ДНК, которые лежат в основе центромер, сильно различаются между организмами, тогда как центромер-специфические белки относительно консервативны. Как следствие, большинство центромерных белков не проявляют сродства к определенным

последовательностям. Наиболее известным исключением из этого правила является CENPB, который специфически связывается с консервативной последовательностью ДНК, называемой CENPB-box, в повторах  $\alpha$ -сателлитной ДНК центромер (Masumoto, 1989; Muro et al., 1992). CENPB был приобретен независимо от рога-подобной транспозазы (перевод с англ., rogo-like transposase) в нескольких группах, включая приматов, *S. pombe* и некоторых насекомых (Mateo, Gonzalez, 2014). CENPB взаимодействует с N-концевым «хвостом» CENPA (Fachinetti et al., 2015), а его связывание с CENPB-box в окрестности CENPA стабилизирует CENPA-содержащую нуклеосому на альфоидной ДНК (Fujita et al., 2015). По результатам, полученным с помощью методов расщепления с использованием микрококковой нуклеазы (перевод с англ., micrococcal nuclease, MNase), CENPB-box расположен между двумя CENPA-содержащими нуклеосомами в тандемных повторах  $\alpha$ -сателлитной ДНК (Henikoff, 2015). Результаты данного исследования нельзя назвать однозначными, поэтому функциональная важность CENPB-box и самой CENPB не совсем понятна. Имеются примеры центромер без CENPB-box, что наблюдается в нецентромерах на человеческой Y-хромосоме, также во всех центромерах у некоторых приматов (Masumoto et al., 1989; Voullaire, 1993; Haaf, Ward, 1995; Goldberg, 1996), а для центромер мышей белок CENPB вообще не является существенным (Karoor et al., 1998; Perez-Castro et al., 1998). Более того, гомологи CENPB у *S. pombe* контролируют активность ретротранспозонов, но не играют существенной роли в хромосомной сегрегации (Cam, 2008; Zaratiegui et al., 2011).



**Рисунок 2** – Трехмерное расположение центромерного комплекса во время митоза (по: Schalch, Steiner, 2017). Кинетохор, связывающий CENPA-содержащий хроматин с микротрубочками (А). Нуклеосомы с CENPA координируют белковую сеть CCAN, рекрутируя внешний кинетохор (сеть KMN), который прикрепляется к микротрубочкам. Перичентромерный район обеспечивает сцепление между сестринскими хроматидами и служит основой для центрального ядра, которое собирает комплексы кинетохора для прикрепления микротрубочек (Б). Хроматин ядра центромеры свернут, чтобы обнажить нуклеосомы с CENPA (В). Было предложено несколько моделей для этой сборки: модель соленоида (вверху) (по: Blower et al., 2002), слоистый бустрофедон (в центре) (по: Ribeiro et al., 2010) и модель петли (внизу) (по: Blower et al., 2002).

Однако недавнее исследование показало, что CENPB человека связывает и стабилизирует CENPA и CENPC и улучшает точность функции центромеры (Fachinetti et al., 2015). Кроме того, для формирования функциональных человеческих искусственных хромосом необходимы ячейки CENPB (Ohzeki et al., 2002). Поэтому CENPB может не требоваться для сборки центромера, но может способствовать стабилизации его структуры. Современная модель ключевых участников процесса сборки кинетохора представлена на рисунке 2 (Schalch, Steiner, 2017).

CENPA – это консервативный маркер центромерного хроматина, представленный практически у всех эукариот. Однако, в отличие от других вариантов гистонов, консервативные аминокислоты образуют всю третичную структуру, за исключением С-концевых гистоновых доменов (перевод с англ., C-terminal histone fold domains) и N-концевых хвостов (перевод с англ., N-terminal tails), которые широко варьируются как по размеру, так и по последовательности аминокислот (Malik, Henikoff, 2003). Несмотря на эту вариабельность, CENPA из *S. cerevisiae* может заменять человеческий CENPA и еще более отдаленный CENPA *Arabidopsis thaliana*, при этом не происходит значительных изменений в функционировании центромер (Wiel, 2004; Ravi et al., 2010; Maheshwari et al., 2015). Сравнение кристаллической структуры человеческого октамера, включающего CENPA, с таковой H3-содержащего октамера показало два наиболее выраженных различия: CENPA петля 1 выступает наружу и содержит на две аминокислоты больше, чем в H3 (Arg 80 и Gly 81), второе отличие – это наличие  $\alpha$ -спирали на N-конце (перевод с англ.,  $\alpha$ N-helix) у CENPA, который примерно на один оборот короче, чем в H4, что оказывает эффект на то, как ДНК оборачивается вокруг октамера (Tachiwana, Kurumizaka, 2011; Roull et al., 2016).

Данные эксперименты хорошо коррелируют с работами по экспрессии химерных вариантов H3 и CENPA, в которых было показано, что гистон CENPA способен обеспечивать жесткую структуру центромерного хроматина путем связи с гистонем H4. Данный комплекс способен удерживать CENPA посредством петли 1 (перевод с англ., loop1) и  $\alpha$ 2-спирали (перевод с англ.,  $\alpha$ 2-helix) в молекуле

CENPA, правильная конформация данных доменов очень важна для образования кинетохора (Black et al., 2007). Получившаяся жесткая структура способна распознавать центромеру через CENPA и имеет название центромер-таргетирующий домен (перевод с англ., centromere targeting domain, CATD) (Schueler, 2006; Black, 2008).

Таргетирование центромера с помощью CATD невозможно без взаимодействия CATD с гистоновым шапероном HJURP (Foltz et al., 2009; Fachinetti et al., 2015). Кристаллографическая структура данного взаимодействия на модели *S. cerevisiae* иллюстрирует существование комплекса HJURP/CENPA/H4 и показывает, что CATD взаимодействует с N-терминальным доменом HJURP, вместе с этим C-терминальный домен HJURP копирует ДНК-связывающий регион CENPA/H4 гетеродимера, посредством которого CATD связывается с ДНК (Cho, 2011; Zhou et al., 2011). В комплексе CATD находятся шесть аминокислот экспонированных на поверхности CENPA, регулирующих взаимодействие с HJURP в области  $\alpha$ 1-спирали, обеспечивая изгиб, тем самым ограничивая конформационную гибкость димера CENPA/H4 (Zhou et al., 2011; Bassett et al., 2012; Zhao et al., 2016;). Кроме того, в стабилизации комплекса HJURP/CENPA/H4 участвует серин 68, находящийся в  $\alpha$ 1-спирали CATD, данная аминокислота должна быть дефосфорилирована, в противном случае комплекс теряет стабильность (Logsdon et al., 2015). Эти данные подчеркивают важное отличие CENPA от H3, которое позволяет ему участвовать в образовании центромеры.

Поскольку комплекс HJURP с CENPA не способен связывать ДНК, HJURP должен быть элиминирован из димера CENPA/H4 для его включения в нуклеосому, тем самым делая CATD доступным для взаимодействия с другими факторами организации центромеры.

В центромерном хроматине наблюдается замена гистона H3 на альтернативный его вариант CENPA. Мутации *CENPA* вызывают нарушения в процессе митоза посредством остановки сегрегации хромосом. Значение CENPA для функции центромер и кинетохора показано на многих модельных объектах *S. cerevisiae*, *S. pombe*, *C. elegans*, *D. melanogaster* и клетках человека. Мутантам по

гену *CENPA* характерно полное или частичное разрушение морфологической структуры центромерного хроматина и кинетохорного комплекса, высокий уровень хромосомной нестабильности и чрезвычайно низкий уровень экспрессии многих белков кинетохора и регуляторов перехода в интерфазу митоза (Zhou et al., 2011). Эти результаты подтверждаются тем, что *CENPA* замещает НЗ в активных центромерах и неоцентромерных нуклеосомах, но не присутствует в неактивных центромерах, обнаруживаемых в псевдо-дицентрических хромосомах (Warburton, 2001). На хроматине, насыщенном гистонами *CENPA*, происходит формирование нуклеосом-ассоциированного комплекса (перевод с англ., proximal *CENPA* nucleosome associated complex, *CENPANAC*), который включает в себя 7 центромерных белков: *CENPA*, *CENPM*, *CENPN*, *CENPT*, *CENPU*, *CENPC* и *CENPH*. *CENPANAC* – ключевой регулятор сборки компонентов центромер и кинетохора во время митоза (Foltz et al., 2006). *CENPA* является ключевым участником сборки кинетохора, но, тем не менее, функционирование центромер также требует набора белков, которые образуют так называемую центромер-ассоциированный сигнальный путь.

После дефосфорилирования *CENPA* и его интеграции в центромеру происходит взаимодействие *CENPA* с *CENPB* и несколькими компонентами *CCAN*, включая *CENPC*, *CENPN* и *CENPT*, и они, в свою очередь, взаимодействуют с другими компонентами *CCAN*, образуя связь с тубулином микротрубочек. Из компонентов *CCAN*, *CENPC* наиболее тесно связан с нуклеосомой *CENPA*. Человеческий *CENPC* также обладает ДНК-связывающим мотивом (Sugimoto, 1994), но неясно, связывает ли он ДНК независимо от нуклеосом *CENPA*. На моделях человеческих клеток, используя химеры НЗ/*CENPA*, было показано, что *CENPC* распознает С-терминальный конец *CENPA*, при этом только шесть С-терминальных аминокислот *CENPA* являются минимально достаточными для распознавания *CENPC* и сборки кинетохора на модели *Xenopus laevis* (Guse, 2011). Данные работы иллюстрируют, что *CATD* в основном требуется для наведения на цель *CENPA*, после чего кинетохор собирается через его С-терминальный домен и *CENPC*. Однако последующие

исследования *Xenopus* показали, что CATD также играет роль в рекрутировании CENPC, особенно при более низкой плотности нуклеосом CENPA (Westhorpe, 2015). Эксперименты с использованием подавления экспрессии химер человеческих CENPA/НЗ подтвердили необходимость как С-концевого домена CENPA, так и CATD для рекрутирования CENPC, так же было показано, что N-концевые последовательности еще больше усиливают это взаимодействие (Logsdon et al., 2015). Хотя гомологи CENPC были идентифицированы во всех модельных организмах, не все части белка сохраняются у различных организмов, а способ, которым CENPC связывается с CENPA-содержащей нуклеосомой, различается между видами. У млекопитающих центральная область CENPC имеет решающее значение для этого взаимодействия, тогда как в куриных клетках требуется только С-терминальная часть CENPC (Carroll et al., 2010; Kato et al., 2013; Nagpal et al., 2015).

С помощью методов ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и определения кристаллической структуры показано, что центральный домен CENPC связывается с поверхностью нуклеосом путем взаимодействия с отрицательно заряженной поверхностью нуклеосом (Kato et al., 2013). Эти результаты объясняют низкую консервативность и универсально гидрофобную природу С-конца CENPA, в отличие от С-концов НЗ-гистонов. Связывание человеческого CENPC укрепляет структуру нуклеосом с CENPA (Falk et al., 2015, 2016). CATD человеческого CENPA также необходим для взаимодействия с CENPN, который работает независимо от активации CENPC (Carroll et al., 2009). Эти данные свидетельствуют о том, что существует конкуренция между CENPC и CENPN, которые способны распознавать CATD CENPA, и не способны делать это одновременно, причём значение такой конкуренции остаются не ясными.

В *Schizosaccharomyces pombe* N-конец CENPA, по-видимому, является основным драйвером для взаимодействия с CENPT (Folco et al., 2015). Центромерный белок Т (CENPT) связывает нуклеосомы с CENPA как у *S. pombe*, так и у человека (Thakur, 2016). Удаление эктопического CENPA, лучше всего изучено у *S. cerevisiae*. Psh1 – это Е3 убиквитиновая лигаза которая направленно



взаимодействует с гистоном Cse4 (варианта CENPA у *S. cerevisiae*) и регулирует уровень его деградации, а отсутствие экспрессии Psh1 приводит к накоплению Cse4 в эухроматиновых локусах, таких как промоторы, и может приводить к дефектам сегрегации (Hewawasam et al., 2010; Ranjitkar et al., 2010; Hildebr, 2016).

### **1.1.3. Эпигенетические модификации и формирование стабильной пространственной структуры центромерного гетерохроматина**

Гистоновые белки являются мишенями для эпигенетических модификаций, которые регулируют пространственную структуру перицентромерного и центромерного хроматина во время образования кинетохора (Kouzarides, 2007). Значительная часть эпигенетических модификаций действуют на изменение уровня компактизации хроматина и тем самым открывая или закрывая доступ к последовательностям ДНК для компонентов инициации образования кинетохора (Sims, 2003).

Эпигенетические модификации центромер происходят посредством изменения структуры хроматина через модификации связанных с ним белков. Можно выделить несколько групп эпигенетических сигналов, происходящих на хроматине: FLA-рибозилирование, убиквитинирование, фосфорилирование, ацетилирование и метилирование.

У людей и *D. melanogaster* гистон H3 (CENPA), находящийся в составе центромера, всегда деметилирован по лизину номер 4 и обозначается как (H3K4me2), а гистон H3, расположенный в перицентромерных областях, маркирован метилированием по лизину номер 9 и обозначается как (H3K9me). Эти эпигенетические метки позволяют разделять центромерную и перицентромерную области хроматина, и определяют трехмерную структуру центромер. Кластеры эухроматина и гетерохроматина тоже маркированы эпигенетическими сигналами. В гетерохроматине, в отличие от эухроматина, можно наблюдать пониженное количество гистонов H3 и H4 с ацетилированным N-концом лизина, гистону H4 в

гетерохроматине характерно триметилирование лизина 20. Так же на гистонах H3 наблюдается триметилирование лизина 9 и лизина 27.

Эухроматин отличается ацетилированием лизинов гистоновых белков, но метилирование тоже может выступать в качестве эпигенетического маркера эухроматиновых районов. Часто оно наблюдается на гистоне H3 по лизинам 4 и 36 (Cheung, Lau, 2005).

Включение гистоновых вариантов в хроматин и последующая пост-трансляционная модификация представляет собой дополнительный эпигенетический механизм. Гистон CENPA может быть фосфорилирован с помощью Aurora A или Aurora B киназ, данная модификация необходима для образования структур кинетохора (Kunitoku et al., 2003).

Еще одна группа эпигенетических меток возникает не на белковых компонентах хроматина, а непосредственно на ДНК по сайтам цитозин–фосфат–гуанин (перевод с англ., cytosine–phosphate–guanine, CpG) посредством работы фермента ДНК-метилтрансферазы (Lettini et al., 2007). Опыты с мышами нокдаунными по генам ДНК-метилтрансфераз демонстрируют критическую роль данного фермента: нокдаун данного фермента приводил к смерти животных в экспериментальной группе (Pike, 2016). Данная группа эпигенетических модификаций важна для формирования центромерного хроматина и кинетохора, эту роль можно проследить на примере генетического заболевания ICF (immunodeficiency, centromere instability and facial anomalies syndrome) это очень редкое аутосомно рецессивное заболевание иммунной системы (Jiang, 2005). В результате данного заболевания возникает явление центромерной нестабильности, обусловленное аномальным гипометилированием в  $\alpha$ -сателлитной ДНК. Данные эффекты приводят к нарушению продукции всех типов антител в крови. Это происходит вследствие дефектов в формировании пространственной структуры хроматина и расхождения хромосом в митозе, следствием чего часто являются хромосомные aberrации. Так, в хромосомах 1, 9 и 16 были детектированы делеции целых плеч хромосом, транслокации и изохромосомы. У людей с такими

перестройками часто обнаруживают мутации в гене, кодирующем *de novo* ДНК-метилтрансферазу (*DNMT3B*).

#### 1.1.4. Активный хроматин и транскрипция центромерного хроматина

Посттрансляционные модификации гистонов коррелируют с доменной организацией хроматина и могут влиять на уровень его компактизации. Эпигенетические метки гистонов, которые коррелируют с транскрипционной активностью, как правило, связаны с хроматином, менее плотно упакованным, нежели чем метки гистонов, которые коррелируют со спящими участками генома. Хроматин в центральных районах центромер характеризуется вариантом гистона H3K4me<sub>2</sub>, обычно ассоциированным с активным хроматином, который перемежается с CENPA. Это контрастирует с преобладающим H3K9me<sub>3</sub>, обнаруженным в перицентромерных областях хроматина (Sullivan, Karpen, 2004).

Центромерный гистон H3K4me<sub>2</sub> является функционально важным, так как он необходим для ориентации NJURP и сборки CENPA на синтетическом человеческом кинетохоре (Bergmann et al., 2012). Моноубиквитинирование H2B, другая модификация, связанная с активно транскрибированным хроматином, необходима для поддержания целостности центромер, без этой модификации происходит нарушение сегрегации хромосом (Sadeghi, 2014). Часто формирование правильной пространственной структуры кинетохора зависит от уровня метилирования гистона H3K9 по лизину 9. Связывание гистона CENPA с альфоидной ДНК происходит исключительно в случаях, когда в клетке снижен уровень триметилирования гистона H3K9me<sub>3</sub>. Триметилированный гистон H3K9 замещает CENPA в сателлитной ДНК, поэтому не происходит формирование кинетохора и, следовательно, теряется стабильность хромосом в клеточном цикле.

Центромерный хроматин состоит из доменов для которых характерно наличие гистонов H3K9me<sub>3</sub>, и доменов с высокой частотой встречаемости гистонов H3K9me<sub>3</sub> и небольшим количеством H3K4me<sub>2</sub> (Ribeiro et al., 2010). Очень важен баланс между модификациями гистонов, представленных в активном и «молчащем» хроматине. При сборке искусственных хромосом человека изменение

состояния хроматина на более транскрипционно-активное или неактивное путем введения транскрипционных активаторов или ингибиторов приводит к дисбалансу между соотношением H3K4me2 и H3K9me3 гистонов и потере центромер (Nakano et al., 2008). Однако, существует некоторая пластичность равновесия между H3K4me2 и H3K9me3, поскольку искусственное внедрение метильных групп и превращение H3 в H3K9me3 или H3K27me в искусственных хромосомах человека приводит к уменьшению количества H3K4me2, но, при этом, до определенной степени функция центромер сохраняется (Martins et al., 2016).

Один из основных участников формирования гетерохроматина в центромерах представляет собой гистоновую ацетилтрансферазу KAT7/HBO1/MYST2 (Ohzeki et al., 2016). Она связана с OIP5-компонентом системы загрузки CENPA в центромерном ядре в фазе G1, кроме того, данный фермент способствует уплотнению нуклеосом, что предотвращает накопление H3K9me3 и инактивации центромера. Предполагается, что тонко настроенный хроматин необходим для обеспечения требуемой стабильности и трехмерной организации центромерного хроматина во время митоза.

Эпигенетическое профилирование гистонов, связанных с транскрипционно активным хроматином, показало, что по крайней мере некоторые области центромера активно транскрибируются. Действительно, транскрипты центромерной РНК-полимеразы II (РНК-Pol II) были зарегистрированы в различных организмах, включая людей, некоторых растений, *S. pombe* и *D. melanogaster*. Во многих случаях ингибирование транскрипции приводит к потере функции центромера (Lam et al., 2006; Choi et al., 2011; Chan et al., 2012).

Кроме того, эти исследования, выявили важное свойство центромерного гетерохроматина, которое состоит в том, что центромер пластичен, и для функционирования центромер не нужно, чтобы транскрипция полностью отсутствовала. Функционирование центромер относительно толерантно к изменениям уровней транскрипции. В областях центромерного хроматина с высоким содержанием гистона H3, ацетилированным по лизину 9 (H3K9ac) при 10-кратном повышении уровня транскрипции, не происходило существенного

изменения в сборке или функционировании кинетохора. Однако существует верхний предел: увеличение транскрипции в 150 раз быстро инактивирует функции центромера и вызывает потерю CENPA (Bergmann et al., 2012). У кенгуру Дерби гиперэкспрессия центромерных малых РНК приводит к нарушению локализации CENPA (Carone et al., 2013).

Поскольку только сильные изменения в транскрипции центромерных районов могут изменить нормальное функционирование центромер, то это обстоятельство делает маловероятным возможность того, что транскрипты некодирующих РНК могут ингибировать работу центромерной ДНК. Тем не менее, центромерные транскрипты необходимы для загрузки CENPA, поскольку истощение этих транскриптов приводит к митотическим дефектам (Quenet, Dalal, 2014). РНК полимеразы II работает в ДНК центромерного домена в *S. pombe*, однако при этом количественно можно детектировать только относительно низкие уровни транскрипции, то есть транскрипция центромерного хроматина сопровождается приостановкой работы РНК полимеразы II (Catania et al., 2015). Это остановка позволяет ремоделировать хроматин и рекрутировать нуклеосомы CENPA.

Еще один важный эпигенетический регулятор формирования структуры центромерного хроматина – комплекс «ФАСТ» (facilitates chromatin transcription). Он играет важную роль замещения НЗ на CENPA (Okada et al., 2009). Мутация ФАСТ нарушает работу НЗ-содержащего хроматина в транскрибируемых областях и способствует широкомасштабному встраиванию CENPA в нецентромерных сайтах *S. pombe* (Choi et al., 2012). ФАСТ взаимодействует с CAL-1 и гистоном CENPA у дрозофилы и имеет важное значение для транскрипции и включения CENPA в центромер (Chen et al., 2015). Кроме того, ФАСТ взаимодействует непосредственно с компонентами SSAN CENPT–W и требуется для их включения в центромеры (Prendergast et al., 2016). Было показано, что центромерная транскрипция и сами центромерные транскрипты играют важную роль в поддержании стабильности кинетохора. (Grenfell et al., 2017). Хроматиновые метки, связанных с эухроматином и активной транскрипцией, вероятно, противодействует гетерохроманизации, характерной для периферических

областей, и создают возможность для включения CENPA и сборки кинетохора. Точная роль центромерных транскриптов в этих белковых комплексах в настоящее время неизвестна. Хотя возможно, что они просто служат средствами поддержания пространственной структуры центромерной ДНК (Grenfell et al., 2017).

## **1.2. Молекулярные механизмы хромосомной нестабильности**

Хромосомная нестабильность (ХН) (перевод с англ., Chromosomal Instability) (CIN) – это совокупность процессов, происходящих в геноме и приводящих к его дестабилизации. При возникновении хромосомной нестабильности часто происходят нарушения митоза и клеточного цикла, в результате образуются клетки с измененным кариотипом. В таких клетках наблюдаются приобретения или потери хромосом или их участков. В основе механизма возникновения ХН лежат нарушения в трансмиссии хромосом. Трансмиссия хромосом во время клеточного деления обеспечивается огромным количеством регуляторных элементов, включая белки кинетохорного комплекса. Нарушение работы этих элементов часто приводит к образованию анеуплоидных клеток. Все эти признаки являются характерными чертами некоторых видов рака (Yuen, 2008). Хромосомная нестабильность характерна для злокачественных новообразований, особенно для клеток солидных опухолей (Lengauer et al., 1997; Yuen, 2008). ХН часто выражается в виде потери целой хромосомы, добавления хромосомы во время деления или перегруппировки хромосом, известных как большие хромосомные перестройки (перевод с англ., gross chromosomal rearrangements, GCR).

Хромосомная нестабильность способствует прогрессированию опухоли, обеспечивая высокую генетическую изменчивость, которая может способствовать быстрым процессам адаптации и развитию резистентности к терапии. Тем не менее, молекулярные механизмы, которые вызывают хромосомную нестабильность в раковых клетках, до сих пор плохо изучены (Bastians, 2015).

В настоящее время предложено несколько механизмов, лежащих в основе хромосомной нестабильности, к ним относятся: нарушения сигналинга в комплексе инициации сборки веретена деления (перевод с англ., spindle assembly checkpoint

(SAC), дополнительные centrosомы (перевод с англ., *supernumerary centrosomes*), дефекты в сцеплении хроматид (перевод с англ., *defects in chromatid cohesion*), аномальные прикрепления кинетохора к микротрубочкам (перевод с англ., *abnormal kinetochore–microtubule attachments*) и увеличение динамики микротрубочек веретена деления (перевод с англ., *increased spindle microtubule dynamics*) (Heng et al., 2013).

Хромосомная нестабильность может произойти из-за делеций, инсерций или транслокаций, которые возникают вследствие нарушений в генах системах репарации ДНК, которые, в свою очередь, допускают увеличение частоты одно- и двухцепочечных разрывов в ДНК (перевод с англ. *single/double strand breaks*), приводя к дестабилизации генома. Также хромосомная нестабильность может возникать из-за ошибок во время митоза, обусловленных мутациями в генах, управляющих хромосомной трансмиссией (Geigl, 2008).

Ошибки в прикреплении веретена деления (тубулиновых элементов цитоскелета микротрубочек) к хроматидам может привести к активации SAC, вследствие чего происходит задержка перехода от метафазы к анафазе. Остановка продолжается до момента прикрепления всех хромосом к митотическому веретену. Механизм инактивации данной задержки происходит за счет способности кинетохора реагировать на уровень напряжения, возникающего при взаимодействии с микротрубочками. Именно эти сбои приводят к нестабильности хромосом во время онкогенеза, приводя к дефектам сегрегации, анеуплоидии и онкогенному прогрессированию.

Гены, контролирующие нестабильность хромосом, известны как гены хромосомной нестабильности, они регулируют процесс митоза и репликации ДНК. Они также контролируют транскрипцию и процесс ядерной транспортировки. Кроме разрывов в последовательности ДНК, хромосомная нестабильность может быть обусловлена эпигенетически, из-за нарушения процессов компактизации хромосом и сбоев в работе факторов, обеспечивающих сборку кинетохора во время клеточного деления. Большой группой белков, регулирующих процессы хромосомной трансмиссии, являются цетромерные белки из группы CNP (перевод

с англ. centromeric proteins), тубулины микротрубочек, гистоны и негистоновые факторы компактизации хроматина (Stirling et al., 2011).

В процессе стабилизации генома во время клеточных делений ключевую роль играет эпигенетическое маркирование различных центромерных и перицентромерных районов хроматина. Разумеется, в процессе маркирования принимают участие ферменты, осуществляющие данные эпигенетические модификации. Выход из строя ферментов, способных присоединять различные функциональные группы к другим участникам стабилизации митоза, может привести к нарушениям в хромосомной трансмиссии (Toda et al., 2015).

### **1.3. Технологии и модели с использованием искусственных хромосом человека**

#### **1.3.1. Искусственные хромосомы человека**

Искусственные хромосомы человека (перевод с англ., Human Artificial Chromosome, HАC) представляют собой функциональный центромер, который обладает способностью образовывать комплексы с белками кинетохора и, следовательно, участвовать в процессах хромосомной трансмиссии в ходе митоза и мейоза наравне с нативными хромосомами. В настоящее время существует два типа искусственных хромосом человека. Первый тип создан на основе центромера 21 человеческой хромосомы (Kazuki et al., 2011), второй представляет собой полностью синтетическую последовательность «альфоид tetO», синтезированную на основе повторов  $\alpha$ -сателлитной ДНК (Nakano et al., 2008; Kourprina et al., 2012) На сегодняшний день разработано два способа конструирования искусственных хромосом. Первый подход называется «top-down», он предполагает редукцию плеч нативных хромосом, именно с помощью данного подхода и была сконструирована искусственная хромосома на основе 21 человеческой хромосомы. Вторым подход – «bottom-up» – стал возможен благодаря накоплению данных об устройстве центромерных районов хромосом человека, он предполагает сборку хромосомы *de novo*, используя синтетические последовательности ДНК из центромерных



районов. Подход «top-down» основан на гомологической рекомбинации в клетках линии DT40. Для создания таких хромосом конструируют вектор, который содержит набор повторов теломерных последовательностей (TTAGGG)<sub>n</sub> и участок, гомологичный хромосоме 21. В результате рекомбинации данного вектора в клетках DT40 возникает обмен фрагментами хромосомы и вектора, при этом из хромосомы удаляется массивный участок, а на его месте оказывается последовательность теломер. Повторяя данные манипуляции, можно последовательно удалять фрагменты q- и p-плеч хромосомы. Данный подход позволил получить искусственную хромосому центромер которой стабилен в клетках человека и мыши. При помощи подобного подхода были успешно сконструированы искусственные хромосомы человека из нативных хромосом X, Y, 14 и 21 (Farr et al., 1992; Kakeda et al., 2011).

Кроме клеток DT40 для конструирования искусственных хромосом используют клеточную линию фибросаркомы человека HT1080, в которой так же возможно проводить рекомбинантные преобразования. Именно на данной линии был впервые апробирован подход «Bottom-up». Для осуществления данного подхода конструируется бактериальная искусственная хромосома (перевод с англ. bacterial artificial chromosome, BAC) или линейная дрожжевая искусственная хромосома (перевод с англ. yeast artificial chromosome, YAC), содержащий теломеры (Harrington et al., 1997; Kotzamanis et al., 2005), после чего происходит трансфекция в клетки HT1080 и отбор клонов, содержащих данную последовательность в свободном, не интегрированном виде. В составе BAC или YAC может находиться нативная центромерная ДНК или синтетическая  $\alpha$ -сателлитная (альфоидная) последовательность размером 50–200 т.н.п.

Эффективная сборка искусственных хромосом невозможна без вектора на основе вируса простого гепатита-1 (ВПГ-1). Имея емкость до 150 т.н.п., он позволил проводить сборку хромосом посредством доставки альфоидной ДНК огромными блоками (Moralli et al., 2006). Работы группы Н. Masumoto (Ohzeki et al., 2012) продемонстрировали возможность сборки искусственных хромосом в различных типах клеток, благодаря модификации, вводимой в клетку альфоидной

ДНК посредством присоединения к ней гистоновой ацетил-трансферазы.

Искусственные хромосомы, применяемые для изучения функций генов, должны иметь техническую возможность встраивания в них интересующих исследователя последовательностей ДНК, причем не на этапе сборки хромосомы, а в культуре клеток с искусственными хромосомами. Только в таком случае возможно проведение экспериментов в приемлемый и сравнимый с технологией классических векторов срок. Эту возможность обеспечивает наличие сайтов рекомбинации, таких как *LoxP*, которые позволяют производить Cre-опосредованную направленную рекомбинацию вектора, несущего ген интереса, при условии наличия в его составе гомологичной последовательности *LoxP*.

Ранее были разработаны несколько искусственных хромосом по технологии «top-down» и «bottom-up», имеющие уникальные сайты для загрузки интересующих генов (Katoh et al., 2004; Dafhnis-Calas et al., 2005; Ren et al., 2005; Kazuki et al., 2008; Iida et al., 2010). С помощью технологии «top-down», под руководством М. Ошимуры были разработаны искусственные хромосомы 21DqHAC и 21DpqHAC. Из их названий следует что, эти хромосомы созданы на основе 21 хромосомы человека. Конструирование данных хромосом было проведено в клетках линии DT40, а их размер составил около 10 м.н.п. (Katoh et al., 2004; Ren et al., 2005; Kazuki et al., 2008). Данные хромосомы так же имеют сайт *LoxP* для загрузки последовательностей интереса. В деконденсированный участок оставшегося q-плеча хромосомы встроен беспромоторный ген устойчивости к неомицину (Neo R). Экспрессия гена Neo в этих ИХ может быть активирована, если в составе шаттл-вектора будет находиться промотор для гена Neo, и через Cre-опосредованную *loxP*-рекомбинацию произойдет встраивание данного промотора а, следовательно, и активация гена резистентности к неомицину. Данная техника позволяет проводить селекцию клеток с положительным встраиванием по сайту *LoxP*, отбирать клональные популяции, содержащие гены интереса. Данные искусственные хромосомы стабильны во время клеточных делений при внедрении в различные типы клеток (Katoh et al., 2004; Dafhnis-Calas et al., 2005; Ren et al., 2005; Kazuki et al., 2008; Iida et al., 2010). Для доказательства успешности данной

технологии было продемонстрировано встраивание человеческого эритропоэтина в искусственную хромосому с рабочим названием 21DpqHAC через loxP рекомбинацию (Kakeda et al., 2005).

Еще один пример искусственной хромосомы на основе человеческой хромосомы 21, был получен путем удаления не только p-, но и q-плеча (Kazuki, Oshimura, 2011). Размер получившейся ИХ составляет 5 м.н.п. Данная хромосома не несет в своем составе никаких кодирующих районов ДНК и является иллюстрацией возможности создания хромосом с полностью прогнозируемым составом их последовательности. Нуклеотидная последовательность получившейся хромосомы была установлена с помощью прямого секвенирования YAC-вектора, в составе которого была клонирована искусственная хромосома по технологии TAR-клонирования (перевод с англ., transformation associated cloning).

Также на основе 21 хромосомы была создана хромосома, включающая полноразмерный ген дистрофина (DYS) 2,4 м.н.п. (Kazuki et al., 2010). Полученная хромосома была использована для восстановления экспрессии гена дистрофина на нокаутных по данному гену клетках, полученных из мышей линии MDX и, что особо важно, на клетках, полученных от людей с генетическим дефектом (Kazuki et al., 2010). Таким образом, рекомбинантные ИХ потенциально могут быть использованы в терапии нарушений, связанных с функционированием гена *DYS*.

### 1.3.2. Технология tetO–НАС

Использованный в данном диссертационном исследовании тип искусственных хромосом был создан по технологии сборки хромосомы *de novo* и представляет собой полностью синтетический «альфоид–tetO». Центромерный участок альфоид–tetO–НАС образован чередующимися последовательностями  $\alpha$ -сателлитной ДНК и тетрациклинового оператора (tetO) (Ebersole et al., 2005; Nakano et al., 2008; Kouprina et al., 2012). Использование тетрациклинового репрессора (tetR) позволяет инактивировать образование кинетохора на центромере. Данные белки могут быть экспрессированы в определенный момент, вследствие чего уменьшается стабильность хромосомы в клеточном цикле, и она теряется в течение нескольких поколений. Использование альфоид tetO–НАС дает возможность наблюдать изменение фенотипа клетки после удаления хромосомы, несущей ген интереса.

При создании альфоид tetO–НАС путем гомологической рекомбинации в клетках линии DT40 в последовательность НАС был встроен сайт LoxP (Iida et al., 2010; Kononenko et al., 2015). На следующем этапе альфоид tetO–НАС была передана в клетки рака яичника китайского хомячка, линия СНО (перевод с англ., chinese hamster ovary). Эта линия клеток позволяет с легкостью переносить искусственную хромосому в любой другой тип клеток. Таким образом, используя LoxP рекомбинацию в клетках СНО можно встроить в искусственную хромосому любой ген или кластер интересующих генов, после чего хромосома вместе со встроенными последовательностями интереса может быть перенесена в любой клеточный тип, необходимый экспериментатору. Примером такой стратегии использования искусственных хромосом для исследования влияния генной экспрессии с искусственной хромосомы может послужить работа по генетической коррекции клеток, полученных от пациентов, с нарушениями в работе генов VHL и NBS1 (Kim et al., 2011). В данной работе было продемонстрирована функциональная активность встроенных генов и последующая инактивация центромера искусственной хромосомы с помощью tet–R–репрессора. Важным

наблюдением данной работы является тот факт, что не было обнаружено никаких значительных изменений в уровне экспрессии генов VHL и NBS1 на протяжении более чем шести месяцев после введения альфоид tetO–НАС в клетки пациентов. Значит, можно сделать вывод о стабильной экспрессии, которая, по всей видимости, не подвержена эпигенетическому сайленсингу.

Искусственные хромосомы человека представляют собой перспективную альтернативу классическим плазмидным и вирусным системам доставки генетического материала в клетки. Главными преимуществами искусственных хромосом перед классическими векторами являются их высокая емкость и способность стабильно наследоваться в клеточном цикле в виде отдельных хромосом. Еще одним преимуществом искусственных хромосом является возможность встраивания и экспрессии полноразмерных генов. Известно, что манипуляции с клетками человека с целью коррекции профиля генной экспрессии требуют максимально точного соблюдения уровня мРНК в клетке (Shi et al., 2017). При использовании этих классических векторов не удастся контролировать число их копий, попадающих в клетки-реципиенты, а, следовательно, предсказать уровень экспрессии после трансфекции. Возможность встраивания строго определенного количества полноразмерных генов со всеми нативными регуляторными элементами позволяет достичь физиологического уровня генной экспрессии. (Wade-Martins, 2008; Epstein, 2009; Lufino et al., 2010; Mingozzi, High, 2011). Искусственные хромосомы позволяют успешно экспрессировать не только одиночные гены, но и группы генов, кодирующие целые кластеры сигнальных каскадов (Yamaguchi et al., 2011). Ранее была опубликована работа, показывающая возможность использовать искусственные хромосомы для получения индуцированных стволовых клеток из фибробластов человека (Hiratsuka et al., 2011).

Среди вирусных систем доставки генов наибольшей емкостью обладают векторы на основе вируса простого герпеса (ВПГ-1) и вируса Эпштейна–Барр (ВЭБ), с их помощью в клетки реципиента можно доставить и обеспечить экспрессию полноразмерного гена до 150 т.п.н. (Hibbitt, Wade-Martins, 2006; Lufino

et al., 2008), но эти векторы не позволяют производить экспрессию генных кластеров большего размера, в отличие от искусственных хромосом.

### **1.3.3. Модели и методы для анализа хромосомной нестабильности**

Изучение механизмов трансмиссии хромосом во время деления эукариотических клеток является фундаментальной задачей современной клеточной биологии. На протяжении последних двадцати лет изучение трансмиссии хромосом у эукариот происходило преимущественно путем описания отдельных генов и продуктов их экспрессии, участвующих в митотической трансмиссии хромосом. Очевидно, что такой подход не позволяет комплексно описать механизмы хромосомной трансмиссии, в которых принимают участие множество элементов, эпигенетических сигналов и происходит регуляция на уровне транскрипции. До сих пор большое число генов, кодирующих структурные белки, необходимые для процесса сегрегации хромосом, остаются не выявленным (Stirling et al., 2011, 2012).

Прогресс в изучении трансмиссии хромосом начался с применения мутационного подхода на моделях дрожжей *S. cerevisiae*, с получением первых мутантов с дестабилизацией хромосом. На сегодняшний день мутационный подход может быть применен только для ограниченного числа эукариотических объектов. Одним из наиболее распространенных модельных организмов для изучения трансмиссии хромосом у эукариот являются дрожжи-сахаромицеты, среди которых наибольшую популярность приобрели пекарские дрожжи *S. cerevisiae*. Преимущество дрожжей-сахаромицетов как модельного объекта объясняется не только легкостью получения мутантов на гаплоидных линиях дрожжей, но также и тем фактом, что главные структурные элементы воспроизведения хромосом (центромерные последовательности, области начала репликации и теломерные последовательности) изолированы и детально охарактеризованы. Именно на дрожжах получены мутанты по основным генам, обеспечивающим репликацию ДНК: генам трех ДНК полимераз, гену ДНК лигазы и генам основных репликативных факторов. На сегодняшний день доказано участие приблизительно

400 генов в процессе трансмиссии хромосом человека, тогда как при исследовании дрожжей *S. cerevisiae* и *S. pombe* было обнаружено 937 гена, участвующих в данных процессах (Stirling et al., 2011, 2012). Поскольку митоз – эволюционно древний и консервативный процесс, можно предположить, что в геноме человека есть неописанные гены-регуляторы процессов сегрегации хромосом и репликации ДНК, ортологичные генам дрожжей.

Нарушения функционирования молекулярных детерминант, участвующих в регуляции репликации и сегрегации хромосом приводит к хромосомной нестабильности. Явление хромосомной нестабильности характерно для злокачественных новообразований и может достигать порогового уровня, за которым прекращается деление клеток и рост опухоли (Janssen et al., 2009; Swanton et al., 2009; McGranahan et al., 2012; Silk et al., 2013). Эта особенность раковых клеток используется в противоопухолевой терапии для лечения некоторых форм рака путем медикаментозного увеличения хромосомной нестабильности. Для этого применяют препараты, которые препятствуют функционированию комплексов, отвечающих за образование и стабилизацию кинетохора. Мишенями для подобного рода противоопухолевых терапий служат молекулярные детерминанты, вовлеченные в процессы стабилизации трансмиссии хромосом.

Таким образом, важной фундаментальной задачей является создание тест-систем для поиска новых молекулярных детерминант, участвующих в процессе трансмиссии хромосом в клетках человека и выявление лекарственных кандидатов, способных вызывать хромосомную нестабильность.

В настоящее время для оценки уровня хромосомной нестабильности применяют некоторые классические и современные методы цитогенетики (Pikor, 2013). Частоту ошибочной сегрегации хромосом обычно определяют количественно путем сочетания теста на образование микроядер (перевод с англ., micronucleus test, MNi) и кариотипирования методом флуоресцентной гибридизации (перевод с англ., Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) (Kirsch-Volders, 1997). Тест на образование микроядер является наиболее широко используемым методом (Pikor et al., 2013). Тем не менее, не существует

стандартного протокола для количественного измерения скорости потери хромосом на основе подсчета накопления микроядер. Также следует отметить, что в анализе накопления микроядер не измеряется доля поврежденных клеток, которые входят в митоз и образуют жизнеспособные анеуплоидные клетки.

Собранные с помощью этих методов данные позволяют заключить, что нормальные клетки производят ошибки в сегрегации хромосом в 1% клеточных делений, в то время как в клетках с хромосомной нестабильностью ошибки сегрегации хромосом наблюдаются примерно в 20% клеточных делений (McGranahan et al., 2012).

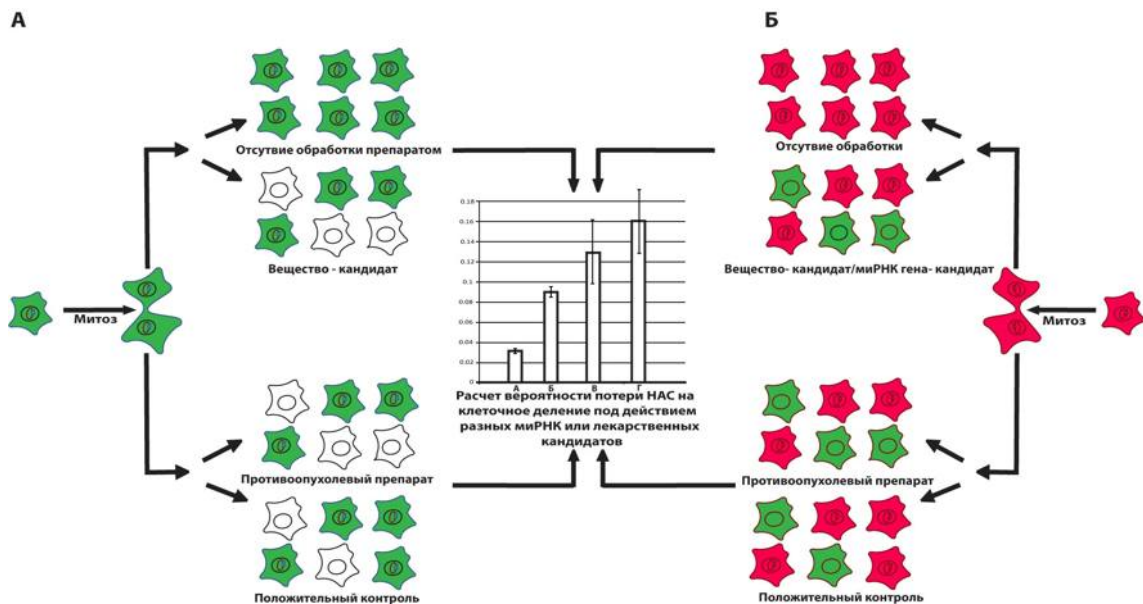
В качестве альтернативы существующим методам оценки хромосомной нестабильности можно применять технологии на основе искусственных хромосом человека, представленные на рисунке 3. К настоящему моменту существует две модификации тест-системы для анализа хромосомной нестабильности на основе искусственной хромосомы tetO–HAC, (Lee et al., 2013; Kim et al., 2016; Kouprina et al., 2018). Эти системы представляют собой уникальные подходы к измерению уровня хромосомной нестабильности и основаны на обнаружении потери искусственных хромосом в клеточной модели человеческой фибросаркомы HT1080. Для регистрации хромосомной нестабильности в тест-системах предусмотрена флуоресцентная индикация, которая обеспечивается генетической конструкцией в составе искусственной хромосомы, реагирующей на увеличение уровня нестабильности генома. По содержанию флуоресцентных клеток в популяции можно количественно определять развитие хромосомной нестабильности. В системе HT1080 HAC/GFP (Рисунок 3А) чем больше GFP негативных клеток, тем сильнее хромосомная нестабильность, вызванная лекарственным кандидатом (Lee et al., 2013). В клеточной линии HT1080 HAC/mCherry/shRNA eGFP (Рисунок 3Б) для регистрации хромосомной нестабильности предусмотрена двухцветная флуоресцентная индикация. По смене сигнала и соотношению mCherry положительных и GFP положительных клеток можно определять эффект на развитие хромосомной нестабильности вследствие



воздействия лекарственного кандидата или подавления экспрессии гена-кандидата (Kim et al., 2016a).

Тем не менее, ни одна из сконструированных систем не позволяет производить массовый скрининг факторов, вызывающих хромосомную нестабильность. Это связано с особенностью флуоресцентных репортеров, используемых в данных клеточных линиях. Флуоресцентные белки mChery и GFP, имеют время полной естественной деградации 52 ч (Corish, 1999). Что не позволяет детектировать потерю искусственной хромосомы сразу после ее потери в клеточном делении. Поскольку хромосомная нестабильность развивается в течение нескольких делений после воздействия тестируемого фактора, то время эксперимента может достигать от 10 до 14 сут.

В данном диссертационном исследовании разработана система, позволяющая преодолеть ограничение стабильности флуоресцентного репортера и проводить массовый скрининг факторов, вызывающих хромосомную нестабильность в течение нескольких клеточных делений.



**Рисунок 3** – Тест-системы для анализа хромосомной нестабильности на основе клеточной линии HT1080 с искусственной хромосомой человека (tetO НАС). А – клеточная линия HT1080 НАС/GFP. ( по: Lee et al., 2013). Б – клеточная линия HT1080 НАС/ mChery/shRNA eGFP(по: Kim et al., 2016).

Во время митоза искусственная хромосома образует функциональный кинетохор и обычно является митотически стабильной. Однако факторы, которые могут дестабилизировать правильную сегрегацию нормальных человеческих хромосом, вызывают неправильную сегрегацию искусственной хромосомы. Способ детекции хромосомной нестабильности предлагает использование человеческих клеточных линий HT1080, содержащих искусственную хромосому человека, экспрессирующую зеленый флуоресцентный белок GFP. При возникновении даже незначительных нарушений сборки кинетохора клеточная популяция начинает ее терять. Вследствие этого происходит потеря флуоресценции клетками, утратившими искусственную хромосому. По соотношению GFP позитивных и GFP негативных клеток в популяции можно количественно определять эффект от подавления экспрессии генов на развитие хромосомной нестабильности (Lee et al., 2013). Изменение флуоресценции можно обнаружить с помощью флуоресцентной микроскопии, проточной цитофлуориметрии или флуоресцентного планшетного ридера.

Есть несколько преимуществ анализа хромосомной нестабильности с применением технологий с искусственными хромосомами человека по сравнению с анализом кариотипа или микроядерными тестами. Во-первых, анализ на основе технологии искусственных хромосом человека значительно быстрее и менее трудоемок. Во-вторых, использование высокопроизводительной микроскопии, а также проточной цитофлуориметрии позволяют легко анализировать десятки тысяч клеток по сравнению с сотнями клеток, которые могут анализировать первые два метода, что позволяет получать данные с больших выборок. Наконец, искусственные хромосомы содержат функциональный центромер (Kourgrina et al., 2012), его спонтанная потеря примерно в 10 раз выше, чем у нативных хромосом (Nakano et al., 2008; Lee et al., 2013), что делает анализ с использованием искусственных хромосом человека чувствительной моделью для измерения хромосомной нестабильности. Вместе эти особенности искусственных хромосом человека позволяют обнаруживать даже небольшие различия между частотами

потери хромосом, вызванными различными факторами, такими как химические соединения или подавление экспрессии генов.

Данные системы являются инструментами поиска новых противоопухолевых препаратов, они могут быть использованы для сравнительной количественной оценки существующих противоопухолевых веществ.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1 Материалы

#### *Реактивы*

1. 50-кратный трис–ацетатный буфер (ТАЕ) для электрофореза нуклеиновых кислот
  - 2 М Трис – гидроксиметиламинометан
  - 5,71% Ледяная уксусная кислота
  - 0,05М ЭДТА

рН 8.0
2. Раствор зонда PNA–FITC–tetO для проведения гибридизации *in situ*
  - 0,01 М Трис рН 7,2
  - 70% Формамид
  - 5% Декстран сульфат
  - 5 нг/мкл PNA–FITC–tetO
3. Отмывочный раствор для гибридизации *in situ*
  - 70% Формамид
  - 10 мМ Трис рН 7.2
  - 0,1% БСА (бычий сывороточный альбумин)
4. Трис-буферный солевой раствор (Tris-buffered saline, TBS)
  - 19,98 мМ Трис (рН 7,4)
  - 136 мМ NaCl

рН 7,4
5. Трис-буферный солевой раствор с твином-20 (Tris-buffered saline Tween-20, TBS–T)

- 0,08% Tween-20 в 100 мл TBS
6. Кальцеид (10 мкг/мл)
  7. 10-кратный натрий-фосфатный буфер (Phosphate buffered saline, PBS)
    - 137мМ NaCl
    - 2,7 мМ KCl
    - 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
    - 1,76 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>pH 7,4
  8. 20-кратный цитратно-солевой буфер (saline-sodium citrate, SSC)
    - 3 М NaCl
    - 300 мМ Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>pH 7,0
  9. Окрашивающий раствор для гибридизации *in situ*
    - DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole 10 мкг/мл на 2-кратный SSC

### ***Наборы для выделения ДНК***

- Набор для выделения плазмидной ДНК (Plasmid Miniprep, Thermo Fisher Scientific)
- Наборы для очистки ДНК из геля и реакционных смесей (GeneJET Gel Extraction Kit, Thermo Fisher Scientific)
- Набор для выделения геномной ДНК (GeneJET Genomic DNA Purification Kit, Thermo Fisher Scientific)

### ***Среды для культивирования бактерий***

- LB-бульон (pH 7,2), содержащий 0,5% дрожжевой экстракт («Difco», Германия), 1% бактотриптон (Difco, США) с 1% NaCl.

- LB-агар, содержащий LB-бульон, 1,5% агар (Difco, США)

### **Ферменты**

1. Рестриктазы: XhoI, XbaI, SacII, AvrII, SpeI, EcoRI, BamHI и соответствующие буферы для проведения рестрикции (New England Biolabs, США)
2. ДНК-лигаза T4 (New England Biolabs, США)
3. PhusionHF ДНК полимераза (New England Biolabs, США)
4. Фосфатаза FastAP (Thermo Fisher Scientific США)
5. T4 полинуклеотид киназа (Thermo Fisher Scientific США)

### **Интерферирующие РНК**

Для проведения миРНК опосредованного подавления экспрессии генов-кандидатов использовали интерферирующих РНК производства компании «Dharmacon» (Таблица 1).

**Таблица 1** – Последовательности и интерферирующих РНК, использованные в работе.

номер	Название гена и номер миРНК	Последовательность миРНК
1.	RPL13 1#	5'-CACUGAGGAAGAGAAGAAUUUCAA-3'
2.	RPL13 #2	5'-AGGAAGAGAAGAAUUUCAAAGCCUU-3'
3.	MLL-AF9 1#	5'-UUCUUUUCAGACUUGUUGG
4.	NF1 1#	5'-CAGTGAACGTAAGGGTTC'-3'
5.	PIGB 1#	5'-GAAUAAGCGCUUCCUAAUUUCdGdC-3'
6.	MUC4 1#	5'-CAGCGACACTAGAGGGACAUU-3'
7.	Dis3-like 1#	5'-CCAUGUAACCGUAAGAAUAdTdT-3'
8.	Dis3-like 1#	5'-UGACGGAGUUAUUUAUUCA-3'
9.	PRC1 1#	5'-GGGAUUCAGAGGACCAA-3'
10.	MYO5B 1#	5'-GUGCCAGUCUAAAGAUGAAUU-3'
11.	MYO5B 2#	5'-GAAUUUGAAGAACGGGUAA-3'
12.	MYO5B 3#	5'-CAGUAAUAUAACAGGCUUA-3'

13.	<i>PRKCE</i> 1#	5'-AAGCCCCTAAAGACAATGAAGdTdT-3'
14.	<i>PRKCE</i> 2#	5'-GUGGAGACCUCAUGUUUCA-3'
15.	<i>PRKCE</i> 3#	5'-CGGAAACACCCGUACCUUA-3'
16.	BIG1 1#	5'-GUCCAAAUGUCCUCGCAUA-3'
17.	MSI1 1#	5'-GGAGAAAGUGUGUGAAAUdTdT-3'
18.	MSI1 2#	5'-AUAAAGUGCUGGCGAAUC-3'
19.	SMARCAD1 1#	5'-GCATGAACCCCTTGTGCTG-3'
20.	SMARCAD1 2#	5'-GAGGAUGGCUAUAAGGUA-3'
21.	XAB2-1 1#	5'-GAACCAAUUCUCUGUCAAAdTdT-3'
22.	XAB2-2 2#	5'-GUAUUTAUTGAUUAATdTdT-3'
23.	XAB2-2 3#	5'-CCAAAUUCAUUGCCCGCUA-3'
24.	GFP 1#	5'-CGAGAAGCGCGAUCACAUGdTdT-3'
25.	GFP 2#	5'-GCCACAACGUCUAUAUCAU-3'
26.	Неспецифическая ми РНК	5'-UGGUUUACAUGUCGACUAA-3'
27.	PIGU	не предоставлена компанией-производителем
28.	PIGB	не предоставлена компанией-производителем
29.	PIGZ	не предоставлена компанией-производителем
30.	UAP1	не предоставлена компанией-производителем
31.	NPE	не предоставлена компанией-производителем
32.	PIGs	не предоставлена компанией-производителем
33.	FAM	не предоставлена компанией-производителем
34.	RTN2	не предоставлена компанией-производителем
35.	C12	не предоставлена компанией-производителем
36.	MEMO	не предоставлена компанией-производителем
37.	GPN2	не предоставлена компанией-производителем
38.	TMCO7	не предоставлена компанией-производителем
39.	WDR76	не предоставлена компанией-производителем
40.	UAP1 1#	5'-AGAUUCAAGCAGCGUAU-3'
41.	RAB1A 1#	5'-CAGCAUGAAUCCCGAAUAU-3'
42.	PLCD3	5'-UGAACGACAUGUACGCCUA-3'
43.	PPIP5K1	5'-GUAUUUGCCUGAUCGAAA-3'
44.	IPO11	5'-GACGGAAGAUCUGAAACA-3'
45.	NAT10	5'-GGAAUAUGGUGGACUAUCA-3'
46.	AP2B1	5'-GUACAAUGAUCCCAUCUAU-3'

***Последовательность гибридизационной метки (PNA–FITC–tetO)***

Последовательность гибридизационной метки комплементарная последовательности повтора tetO:

FITC–OO–ACCACTCCSTATCAG

***Библиотека малых интерферирующих РНК***

Скрининг человеческих протеинкиназ проводили с использованием библиотеки миРНК произведенной компанией «Dharmacon». Название библиотеки: Human siGENOME миРНК Library – Proteinkinases – SMARTpool, каталожный номер G–003505–E2–025

***Плазмидные векторы***

В работе были использованы следующие векторы:

1. pGFP–CDT1
2. pCX–GFP–GEMININ
3. pCX–GFP–CDT1
4. pCX–GFP
5. p264–noGFP
6. pMC–CRE
7. p264–GFP–CDT1–GFP–GEMININ

***Штаммы E. coli, использованные в работе***

1. Штамм DH5α (Life Technologies, США) предназначен для клонирования и бело-голубого скрининга
2. Штамм DH10B (Life Technologies, США)
3. Штамм Xl–1–blu

***Культуры эукариотических клеток***

1. Линия человеческой фибросаркомы HT1080
2. Фосфорибозилтрансфераза (HPRT)-дефицитные клетки китайского хомячка (CHO–alfoid–tetO–HAC) (JCRB0218)



**Среды и вспомогательные растворы для культивирования клеток млекопитающих**

1. Среда Игла модифицированной Дульбекко DMEM (Gibco, США), с 10% содержанием бычьей сыворотки (fetal bovine serum, FBS) (Gibco, США)
2. Питательная смесь F-12 (Gibco, США) с 10% содержанием FBS
3. Среда для проведения трансфекции ДНК и миРНК в клетках млекопитающих Opti-MEM (Gibco)
4. 0,25% раствор трипсина в PBS

**Селективные антибиотики для клеток бактерий и клеток млекопитающих**

**Таблица 2** – Селективные антибиотики для клеток бактерий и клеток млекопитающих

<b>Добавки</b>	<b>Концентрированный раствор</b>	<b>Конечная концентрация</b>	<b>Назначение</b>
Ампициллин	100 мг/мл	100 мкг/мл	Селекция клонов <i>E. coli</i> , содержащих маркер устойчивости AmpR
Бластицидин	100 мг/мл	4 мкг/мл	Селекция клонов CHO и HT1080, содержащих маркер устойчивости BlastR
Пуромицин	100 мг/мл	0,5 мкг/мл	Селекция клонов CHO и HT1080, содержащих маркер устойчивости PurR
НАТ	100-кратный	1-кратный	Селекция клонов CHO и HT1080, содержащих восстановленную форму гена HPRT

### **Маркеры размера и молекулярной массы**

Для электрофореза ДНК в агарозном геле в качестве стандартов молекулярных использовали маркеры 100 п.н. + 1500 п.н. + 3000 п.н. (Thermo fisher scientific, США).

Для электрофореза белковых продуктов в полиакриламидном геле в качестве стандартов молекулярных масс использовали PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder (Thermo fisher scientific, США).

### **Праймеры**

Праймеры синтезированы компанией «ACGTCORP» (США). Характеристики и назначение праймеров представлены в Таблице 3.

**Таблица 3** – Нуклеотидные последовательности и температуры отжига праймеров, использованных в работе.

Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Темп. °С
PrimerF–3'HPRT: ck3HPRT–01–5'	5'–CCAAACATGTA AAAAGAATGTTTCTT–3'	57,6
PrimerR–5'HPRT: ck3HPRT–02–3'	5'–GTAGTGTTTCAGTAATGTTGACT–3'	57,6
EcoRI–GFP–FWD	5'–AGAATTCGCCACCATGGTGAGCA–3'	64,6
EcoRI–GFP– CDT1–REV	5'–TGAATTCTTAGATGGTGTCCTGGTCCT–3'	66,6
EcoRI–GFP– hGEMININ–REV	5'–TGAATTCTTACAGCGCCTTTCTCCG–3'	65,8

## 2.2 Методы

### 2.2.1. Сборка шаттл-вектора, содержащего систему сенсоров клеточного цикла

*I этап.* Амплификация целевых фрагментов, содержащих сенсоры клеточного цикла *CDT1* и *GEMININ*.

ПЦР амплификацию целевых фрагментов проводили по следующему протоколу:

**Таблица 4** – Температурный режим и состав реакционной смеси ПЦР для амплификации последовательности *GFP-CDT1*.

Температурный режим ПЦР			Состав реакционной смеси
Шаг ПЦР	Температура	Время	
Денатурация	95°C	2 мин	1-кратный Taq Buffer
Денатурация	95°C	30 с	5 нг/мкл Матрица
Отжиг праймеров	63,2°C	30 с	2,5 mM dNTP
Элонгация	72°C	1 мин	5 mM EcoRI-GFP-F
Финальная элонгация	72°C	5 мин	5 mM EcoRIGFP-CDT1R
			2,5 ед.акт./мкл Taq полимеразы

ПЦР проводили в 35 циклах, результаты анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле (Рисунок 1). В результате получили фрагменты длиной 1043 п.н. и 1091 п.н. из плазмид *pGFP-CDT1* и *pGFP-GEMININ* соответственно. Фрагменты разделяли в агарозном геле и выделяли по протоколу, предложенному в наборе GeneJET Gel Extraction Kit – Thermo Fisher Scientific.

**II этап.** Рестрикция амплифицированных фрагментов и вектора *pCX-GFP* по сайту EcoRI

**Таблица 5** – Ожидаемые длины фрагментов после проведения рестрикции вектора *pCX-GFP*

Название матрицы для рестрикции	Размер, н.п.	Фермент рестрикции	Буфер NEB№
GFP-CDT1	1043	EcoR1	2
GFP-GEMININ	1091	EcoR1	2
<i>pCX-GFP</i>	5510	EcoR1	2

Рестрикцию проводили по следующему протоколу:

- 5 нг/мкл ДНК
- 5 нг/мкл БСА
- 0,5 ед. акт./мкл Фермент
- 1-кратный буфер NEB

Общий объем реакционной смеси – 20 мкл.

После рестрикции размеры амплифицированных фрагментов не изменились, так как сайты рестрикции были добавлены с помощью праймеров и находились на концах ампликонов. Для дальнейшей сборки из агарозного геля вырезали фрагмент длиной 4500 н.п. получившийся в результате рестрикции вектора *pCX-GFP*. После очистки в геле и выделения вектор обрабатывали фосфатазой CIP.

**III этап.** Лигирование *pCX-GFP-EcoRI-CIP* и *GFPCDT1-EcoRI*, производили по следующему протоколу:

**Таблица 6** – Лигирование рестрицированных фрагментов *pCX-GFP-EcoRI-CIP* и *GFPCDT1-EcoRI*.

Название фрагментов	Размер фрагментов, н.п.	Концентрация, нг/мкл
<i>pCX-GFP-EcoRI-CIP</i>	4770	80
<i>GFPCDT1-EcoRI</i>	1043	90

Лигирование проводили по следующему протоколу:

- 21 нг/мкл *pCX-GFP-EcoRI-CIP*
- 14 нг/мкл *GFPCDT1-EcoRI*
- 0,5 ед. акт. /мкл Лигаза T4
- 1-кратный 4-буфер

Общий объем реакционной смеси 25 мкл

В результате лигирования получилась плазида *pCX-CDT1-GFP* имеющая размер 5813 н.п.

**IV этап.** Лигирование *pCX-GFP-EcoRI-CIP* и *GFP-GEMININ -EcoRI*, производили по следующему протоколу:

**Таблица 7** – Лигирование рестрицированных фрагментов *pCX-GFP-EcoRI-CIP* и *GFP-GEMININ -EcoRI*.

Название фрагментов	Размер фрагментов, н.п.	Концентрация, нг/мкл
<i>pCX-GFP-EcoRI-CIP</i>	4770	80
<i>GFP-GEMININ-EcoRI</i>	1091	90

Лигирование проводили по следующему протоколу:

- 21 нг/мкл *pCX-GFP-EcoRI-CIP*
- 14 нг/мкл *GFP-GEMININ -EcoRI*
- 0,5 ед. акт./мкл Лигаза T4

- 1-кратный буфер 4

В результате лигирования получилась плазида рСХ–GFP–GEMININ имеющая размер 5861 н.п.

Далее делали трансформацию приготовленных компетентных клеток лигазной смесью плазмид рСХ–GFP–GEMININ и рСХ–GFP–CDT1 по ниже представленному протоколу.

*V этап.* Клонирование кассет рСХ–GFP–GEMININ и рСХ–CDT1–GFP в шаттл–вектор.

Для завершения сборки кассеты, сенсоры клеточного цикла в комплексе с GFP были клонированы в пустой шаттл-вектор с рабочим названием р264 noGFP, содержащий сайт рекомбинации LoxP. Для этого последовательность шаттл-вектора была рестрицирована по сайтам рестрикции BamHI и SpeI (Таблица 8).

**Таблица 8** – Рестрикция вектора р264 noGFP (backbone) по сайтам BamHI и SpeI.

Название матрицы для рестрикции	Размер, н.п.	Фермент рестрикции	Буфер NEB №
р264 noGFP	7328	BamHI/SpeI	CutSmart
рСХ–GFP–CDT1	5813	BamHI/SpeI	CutSmart

Рестрикция была проведена по следующему протоколу:

- 5 нг/мкл ДНК
- 5 нг/мкл БСА
- 0,5 ед. акт./мкл Фермент
- 1-кратный буфер CutSmart

Общий объем – 20 мкл

В результате рестрикции получились целевые фрагменты длиной 7272 н.п. и 3465 н.п. соответственно.

**Таблица 8** – Размер фрагментов после рестрикции векторов.

Название фрагментов	Размер фрагментов, н.п.	Концентрация, нг/мкл
p264 noGFP–BamHI/SpeI	7328	90
pCX–GFP–CDT1–BamHI/SpeI	5813	97

Данные фрагменты были экстрагированы из геля и лигированы по следующему протоколу:

- 24 нг/мкл p264 noGFP\_ BamHI/SpeI
- 34 нг/мкл pCX–GFP–CDT1\_ BamHI/SpeI
- 0,5 ед.акт./мкл Лигаза T4
- 1-кратный буфер 4

Общий объем 25 мкл

В результате лигирования получился вектор p264–GFP–CDT1 размером 10737 н.п. Далее проводили рестрикцию векторов p264–CDT1–GFP и pCX–GFP–GEMININ по сайтам рестрикции AvrII и SpeI/AvrII соответственно.

**Таблица 9** – Рестрикцию векторов p264–CDT1–GFP и pCX–GFP–GEMININ по сайтам рестрикции AvrII и SpeI/AvrII.

Название матрицы для рестрикции	Размер, н.п.	Фермент рестрикции	Буфер NEB №
p264–GFP–CDT1	10737	AvrII	CutSmart
pCX–GFP–GEMININ	5861	SpeI/AvrII	CutSmart

Рестрикцию проводили по следующему протоколу:

- 5 нг/мкл ДНК
- 5 нг/мкл БСА

- 0,5 ед. акт./мкл Фермент
- 1кратный буфер CutSmart

После окончания рестрикции вектор p264–CDT1–GFP обрабатывали фосфатазой (CIP).

Далее проводили электрофорез продуктов рестрикции и экстрагировали из геля линейные фрагмент длиной 10700 н.п. для p264–CDT1–GFP и 3700 н.п. для pCX–GFP–GEMININ (Рисунок 4), после чего вырезанные фрагменты лигировали по следующему протоколу:

**Таблица 10** – Ожидаемые размеры фрагментов после рестрикции.

Название фрагментов	Размер фрагментов	Концентрация, нг/мкл
p264–GFP–CDT1– AvrII	10700	100
pCX–GFP–GEMININ–SpeI/AvrII	3700	110

Полученные фрагменты лигировали по следующему протоколу:

- 24 нг/мкл p264–GFP–CDT1\_AvrII
- 24 нг/мкл pCX–GFP–GEMININ\_SpeI/AvrII
- 0,5 ед. акт./мкл Лигаза T4
- 1-кратный буфер 4

В результате лигирования был получен конечный вариант вектор p264–GFP–CDT1–GFP–GEMININ (Рисунок 4).

### 2.2.2. Приготовление компетентных клеток

Несколько колоний штамма DH5 $\alpha$  было взято с чашки Петри и инокулировано в пробирки с 3 мл среды LB. Пробирки инкубировали при 37°C в течение 16 ч при интенсивном перемешивании. Культуру инкубировали до тех пор, пока оптическая плотность суспензии при длине волны 600 нм не стала равна 0,6. После этого бактериальную культуру помещали на лед на 10 мин и



центрифугировали при 2500 g 10 мин. Отмывали осадок деионизованной водой и центрифугировали при аналогичных оборотах. Супернатант сливали и к осадку добавляли 20% глицерин, помещали на 10 мин на лед. Далее переносили аликвоты клеток (по 40 мкл) в 1,5 мл пробирки и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 2.2.3. Трансформация

Компетентные клетки DH5 $\alpha$ /BL21(DE3) (40 мкл) помещали на лед и инкубировали в течение 5 мин. Добавляли охлажденную лигазную смесь (4 мкл) и оставили инкубировать на льду в течение 10 мин. Трансформацию проводили в электропораторе Multiporator (Eppendorf, Германия). Затем добавляли 1 мл среды LB и инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение 1 ч. Отбирали 100 мкл клеточной суспензии и распределяли шпателем по чашке Петри с LB-агаром, содержащего 50 мкг/мл ампициллина. Чашки инкубировали при  $37^{\circ}\text{C}$  в течение ночи (12–16 ч).

### 2.2.4. ПЦР бактериальных клонов

ПЦР амплификацию целевых фрагментов для лигированных плазмид проводили по следующим протоколу:

**Таблица 11** – Температурный режим и состав реакционной смеси для ПЦР бактериальных клонов.

Температурный режим ПЦР			Состав реакционной смеси
Шаг ПЦР	Температура	Время	
Денатурация	$98^{\circ}\text{C}$	2 мин	1 кратный Phusion RED buffer 100 нг/мкл Матрица (pGFP-CDT1/ pGFP-GEMININ)
Денатурация	$98^{\circ}\text{C}$	20 с	2,5 mM dNTP
Отжиг праймеров	$55^{\circ}\text{C}$	20 с	5 mM Праймер-F
Элонгация	$72^{\circ}\text{C}$	1 мин	5 mM Праймер-R
Финальная элонгация	$72^{\circ}\text{C}$	5 мин	2,5 ед. акт./мкл Phusion полимеразы

ПЦР проводили в 35 циклах, результаты анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле.

### **2.2.5. Выделение плазмидной ДНК**

Выделение ДНК производили по протоколу из набора для выделения плазмидной ДНК (Plasmid Miniprep, Thermo Fisher Scientific). Для выделения рекомбинантной плазмиды, колонию трансформированных клеток DH5 $\alpha$ /BL21(DE3) отбирали в 3 мл жидкой среды LB (с содержанием 100 мкг/мл ампициллина) и культивировали в термо-шейкере со скоростью вращения 150 об/мин в течение 16–18 ч при 37°C. Клетки осаждали центрифугированием при 3000 g, в течении 10 мин, супернатант сливали, к осадку добавляли 250 мкл ресуспендирующего буфера и разбивали осадок до однородной суспензии, далее в пробирку добавляли 250 мкл лизирующего раствора и инкубировали 1 мин при комнатной температуре. После добавляли 350 мкл нейтрализующего раствора и центрифугировали в течение 1 мин при 12000 g. Далее плазмидную ДНК очищали с помощью спин-колонки по методике, предложенной в наборе для выделения плазмидной ДНК. Качество выделенной плазмидной ДНК определяли с помощью электрофореза в 1% агарозном геле.

### **2.2.6. Определение нуклеотидной последовательности ДНК по методу Сэнгера**

Нуклеотидные последовательности рекомбинантных кассет определяли секвенированием с помощью следующих пар праймеров: EcoRI–GFP–FWD, EcoRI–GFP–CDT1–REV, EcoRI–GFP–hGEMININ–REV на генетическом анализаторе ABI 3130xL (Applied BioSystem, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Реакцию мечения проводили с использованием флуоресцентных предшественников ддНТФ (Applied BioSystem, США). Обработку

результатов секвенирования проводили с использованием программы CHROMAS (Applied BioSystem, США).

### **2.2.7. Загрузка кассет в *alphoid-tetO* HAC с помощью шаттл-векторов через сайт *loxP* рекомбинации**

За 1 день до трансфекции активно растущие фосфорибозилтрансфераза (HPRT)–дефицитные клетки китайского хомячка (CHO) (JCRB0218), несущие *AlphoidtetO*–HAC рассаживали на 6 луночный культуральный планшет (Thermo Scientific, США) в количестве 150000 клеток на лунку. Клетки помещали в инкубатор 37°C, 5% CO<sub>2</sub> и культивировали 16 ч в среде F–12 (Invitrogen, США) с 10% содержанием FBS и в присутствии антибиотиков: пенициллин/стрептомицин и бластицидина в концентрации 10 мг/мл.

Трансфекцию проводили с помощью трансфецирующего реагента XtremeGENE 9 (Roche, США). В реакционной смеси использовали 3 мкг шаттл-вектора, 1 мкг плазмиды Cre и 10 мкл липофектамина, которые по отдельности растворяли в 100 мкл среды Opti–Mem, полученную смесь инкубировать 5 мин при комнатной температуре. Далее смесь перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 20 мин. Для трансфекции клетки промывали 1-кратный PBS, и оставляли в 2 мл среды Opti–Mem с содержанием 2% FBS. После чего к клеткам по каплям приливали по 200 мкл смеси для трансфекции и инкубировали 12 ч при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. После трансфекции заменяли среду на новую F12, содержащую NAT для проведения селекции клеток с восстановленным HPRT.

### **2.2.8. Оценка эффективности трансфекции с помощью конфокальной микроскопии**

Экспрессию GFP анализировали с помощью конфокальной микроскопии с системой автоматизированного имиджинга LSM 700 AxioObserver Z1 (Zeiss, Германия). Флуоресценцию GFP активировали с помощью синего лазера (488 нм)

при увеличении 40x и 20x. Анализ экспрессии производили визуально по наличию или отсутствию флуоресценции.

### **2.2.9. Оценка эффективности трансфекции с помощью проточной цитофлуориметрии**

Суспензию клеток в концентрации  $1 \times 10^6$  помещали в пробирки для проточного цитофлуориметра. Анализ флуоресценции проводили на приборе BD FACS Calibur (BD Biosciences, США). Флуоресценцию возбуждали с помощью синего лазера (488 нм).

### **2.2.10. Отбор HPRT-положительных клонов**

HPRT-положительные колонии были выбраны на основе визуального анализа после 3 недель роста в присутствии НАТ.

### **2.2.11. Выделение хромосомной ДНК из культуры HPRT-положительных клонов**

Выделение ДНК из культуры клеток CHO производили с помощью набора для выделения геномной ДНК GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Концентрацию ДНК определяли спектрофотометрически на приборе NanoPhotometer Pearl Design Edition UV/Vis с принтером.

### **2.2.12. Подтверждение восстановления HPRT с помощью ПЦР**

ПЦР проводили с использованием специфических HPRT-праймеров (Таблица 3).

В качестве матриц для ПЦР использовали геномную ДНК, выделенную из клонов, показавших устойчивость к НАТ.

ПЦР проводили по следующему протоколу (Таблица 12).

**Таблица 12** – Температурный режим и состав реакционной смеси ПЦР на восстановление HPRT.

Температурный режим ПЦР			Состав реакционной смеси
Шаг ПЦР	Температура	Время	
Денатурация	98°C	2 мин	1-кратный Phusion RED buffer
Денатурация	98°C	20 с	100 нг/мкл 5 нг/мкл Матрица (СНО геномная ДНК)
Отжиг праймеров	60°C	20 с	2,5мМ dNTP
Элонгация	72°C	1 мин	5 мМ Праймер 3'HPRT:ck3HPRT-01-5'
Финальная элонгация	72°C	5 мин	5 мМ Праймер 5'HPRT: ck3HPRT-0 0,05 ед. акт./мкл Phusion полимеразы

ПЦР проводили в 35 циклах, результаты анализировали методом электрофореза в 1% агарозном геле. Количество геномной ДНК, добавляемой в реакцию, составило 100 нг.

### **2.2.13. Передача НАС от клеток-доноров СНО к клеткам фибросаркомы человека HT1080**

Клетки СНО, содержащие Alphoid tetO-НАС несущий рекомбинантные кассеты с сенсорами клеточного цикла, культивировали в среде F12 содержащей 10% FBS, 1% P/S, 1% глутамин в присутствии бластицидина 10 мкг/мл. Клетки растили в 12 культуральных флаконах (Nunc T24), стенки которых предварительно инкубировали с раствором коллагена (50 мкг/мл в 20 мМ уксусной кислоте) в течение ночи при комнатной температуре. После чего раствор коллагена удалили, а культуральные флаконы осторожно промывали PBS 3 раза. Далее во флаконы добавляли раствор ламинина (25 мкг/мл в PBS) и инкубировали в течение ночи при комнатной температуре, после 3 раза промывали PBS.

В момент достижения клетками СНО 90% конфлюентности, среду заменяли на среду, содержащую цитостатический коктейль: 160 мкМ TN-16 (SantaCruz, sc-204347) и 50 мкМ Griseofulvin (SantaCruz, sc-202171) и инкубировали в течение 72 ч. Отбирали среду из всех культуральных флаконов и центрифугировали 3 мин при 1200 g. Осадок ресуспендировали в среде Latranculin B, добавив 40 мкл 2 мМ Latranculin B (Santa Cruz, sc-203318) в 400 мл DMEM 37°C (60 мл среды на флакон). Флаконы T24 помещали в 0,5-литровую бутылку. Каждую бутылку заполняли предварительно нагретой (37 °C) дистиллированной H<sub>2</sub>O (130 мл на каждую бутылку).

Бутылки с флаконами центрифугировали в течение 60 мин при 34°C при 8000 g. После центрифугирования удаляли всю среду, содержащую Latranculin B. В каждый флакон добавляли 1 мл среды DMEM и ресуспендировали осадок. Далее суспензию переносили во флаконы объемом 50 мл и промывали PBS, после центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин. Общую суспензию разделяли на 4 равные части и фильтровали каждую часть последовательно через фильтры с диаметром пор 8 мкм, 5 мкм и 3 мкм (Millipore) в держателях фильтров Swinnex (Millipore, SX0002500), посредством центрифугирования на 3000 g в течение 5 мин. После центрифугирования повторно суспендировали осадок в 1 мл бессывороточной DMEM, центрифугировали при 3000 g в течение 5 мин. Далее все суспензии объединяли в 10 мл полного DMEM.

Следующий этап подразумевает конъюгацию микроклеток из предыдущего шага и клеток-реципиентов. В качестве реципиентов использовали клетки линии человеческой фибросаркомы HT1080. Для осуществления протокола переноса из активно растущей клеточной популяции HT1080 отбирали  $4,5 \times 10^6$  клеток и ресуспендировали в 3 мл среды. Процедуру слияния проводили с помощью «Набора для слияния клеточных оболочек HVJ» (Cosmo Bio ltd, Япония). Для этого осадки микроклеток и клеток реципиентов ресуспендировали в PBS. Далее ресуспендировали микроклетки доноры и клетки реципиенты в 0,5 мл, охлажденного на льду буфере для слияния клеток. Центрифугировали при 3000 g в

течение 3 мин при +4°C. Смешивали обе суспензии вместе, добавляли 10 мкл HIVJ-E и инкубировали на льду в течение 5 мин. После чего перемещали смесь на 37°C на 15 мин, далее центрифугировали смесь при комнатной температуре при 3000 g в течение 3 мин. Ресуспендировали осадки клеток в 10 мл полного DMEM и рассаживали на культурный флаконы. К клеткам добавляли бластицидин (Life Technologies, A11139–03) (10 мкг/мл) после 24 ч инкубации.

#### **2.2.14. Отбор клонов HT1080 HAC/dGFP**

Отбор положительных клонов производили через 20 сут культивирования клеток HT1080 в присутствии бластицидина после ММСТ. Для этого клон окружили стеклянным цилиндром для отбора клонов клеток млекопитающих, торец которого был обработан силиконом, и при помощи раствора трипсина 0,25%/PBS инкубировали в течение 5 мин при 37°C.

#### **2.2.15. Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH)**

Для визуализации искусственной хромосомы человека в интерфазном хроматине или на метафазных пластинках был использован метод количественной флуоресцентной гибридизации *in situ* (Q-FISH). В качестве зонда использовали синтетические олигонуклеотиды (peptide nucleic acid, PNA) связанные с флуорофорами Cy3 или FITC. В данном протоколе проба PNA была подобрана на поседовательность tetO в составе искусственной хромосомы. На первом этапе протокола поверхность предметных стекол (Fisherfinest Premium Superfrost) инкубировали в 6 н соляной кислоте в течение 2 ч, после оставляли под протоком холодной воды на 10 мин. К клеткам CHO или HT1080, достигшим 70–80% конфлюентности (log фаза) добавляли 100 мкл кальцемида (10 мкг/мл), оставляли на ночь в CO<sub>2</sub>-инкубаторе. На следующий день клетки обрабатывали трипсином по стандартному протоколу для открепления клеток от субстрата. Все клетки, среда и PBS были собраны в фальконе на 50 мл, который центрифугировали 5 мин при 120

g используя бакет-ротатор. Далее асперировали надосадочную, осадок ресуспендировали в 10 мл PBS, после чего снова центрифугировали 5 мин при 120 g используя бакет-ротатор. Асперировали надосадочную оставив около 500 мкл PBS, в котором аккуратно ресуспендировали осадок, после чего к осадку по каплям добавили 10 мл 0,56% KCL (37°C) и инкубировали 20 мин при 37°C на водяной бане. После инкубации к суспензии добавили 200 мкл смеси метанола и уксусной кислоты в соотношении 3:1. Образцы переносили на лед на 5 мин, далее центрифугировали в холодной центрифуге (4°C) 5 мин при 120 g используя бакет-ротатор, удаляли супернатант, осадок аккуратно разбивали. К осадку добавляли 1 мл охлажденной (4°C) смеси метанола: уксусной кислоты (3:1) центрифугировали в холодной центрифуге (4°C) 5 мин при 120 g используя бакет-ротатор. Данную процедуру (фиксация) повторяли 3 раза. Далее суспензию метафазных пластинок одной каплей (50 мкл) наносили на предметное стекло и просушивали при комнатной температуре в течение ночи. Затем предметные стекла инкубировали в PBS в течение 15 мин при комнатной температуре. И фиксировали в растворе 4% формальдегида на PBS в течение 2 мин, после чего стекла переносили в PBS и инкубировали в течение 5 мин, данную процедуру повторяли 3 раза в свежих порциях PBS. Далее образцы обезвоживали путем последовательной 5-минутной инкубации в разных концентрациях этилового спирта: 70, 90 и 100%. После предметные стекла просушивали при комнатной температуре. На центр предметного стекла наносили 20 мкл гибридизационной смеси, содержащей зонд PNA. Каплю гибридизационной смеси накрывали покровным стеклом и денатурировали образец при температуре 80°C в течение 3 мин в темном месте. После оставляли на 2 ч в темной комнате. После этого отмывали стекла от гибридизационной смеси по следующему протоколу:

1. 15 мин с помощью 70% формамида; 10 mM Трис pH 7,2; 0,1% BSA
2. 5 мин с помощью TBS-T (80 мкл Tween-20/100 мл TBS)
3. 2 мин с помощью PBS



После окрашивали хроматин DAPI в концентрации 1 мг/мл в SSC в течение 5 мин, далее отмывали с помощью SSC по 5 мин.

Далее образцы обезвоживали путем последовательной 5-минутной инкубации в разных концентрациях этилового спирта: 70, 90 и 100%. После предметные стекла просушивали при комнатной температуре. Препараты заключали в 100% мавиол. Флуоресценцию оценивали с помощью флуоресцентного микроскопа Olimpus BX63, используя светофильтр для FITC.

### **2.2.16. Определение скорости пролиферации клеточной популяции HT1080 HAC/dGFP и скорости восстановления экспрессии GFP после трансфекции миРНК**

Для определения скорости пролиферации клеточной линии HT1080–HAC–CDT1–GFP–GEMININ был использован подход отслеживания роста клеток в реальном времени. Для этого клетки высаживали на 24–луночный планшет в концентрации 1000 клеток на 1 см<sup>2</sup> и с помощью микроскопической системы Cell iQ проводили съемку одиночных клеток. В каждой лунке выбирали 8 полей зрения и делали снимки каждые 60 мин в течение 120 ч. Съемку проводили в режиме фазового контраста. Для съемки был использован объектив Nikon Plan Fluor 10x с числовой апертурой 0,30.

### **2.2.17. Оптимизация протокола трансфекции миРНК против генов-кандидатов**

В качестве инструмента оптимизации была использована интерферирующая РНК против серин/трионин протеинкиназы 1 (Serine/threonine–protein kinase PLK1), которая при максимальном эффекте трансфекции приводит к гибели клеток (Chen et al., 2006). Эффективность условий трансфекции была оценена по показателям жизнеспособности клеток, при 100% гибели клеток эффективность трансфекции –

максимальна, а значит условия, при которых достигнут такой эффект – оптимальны.

В качестве положительного контроля для проведения скрининга была использована интерферирующие РНК против генов *SKA3* и *OIP5*. Эффект на развитие хромосомной нестабильности от подавления экспрессии этих генов продемонстрирован в нашей предыдущей работе (Kim et al., 2016a).

Отрицательный контроль представлял собой набор неспецифических молекул, интерферирующих РНК, поставляемый компанией Dharmacon (<http://dharmacon.gelifesciences.com/миРНК/acell-non-targeting-control-миРНК/>).

### **2.2.18. Трансфекция миРНК для анализа с помощью проточной цитофлуориметрии**

За день до трансфекции клетки рассаживали в количестве 12500 на лунку 24 луночного планшета в полной среде DMEM, содержащей 10мкг/мл бластицидина. На следующий день проводили трансфекцию с помощью трансфецирующего реагента «Lipofectamine RNAiMAX™» Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific).

В реакционной смеси использовали по 17 нМ миРНК, 3 мкл липофектамина, которые по отдельности растворяли в 50 мкл среды Opti-Mem, полученную смесь инкубировать 5 мин при комнатной температуре. Далее образцы перемешивали и оставляли инкубироваться при комнатной температуре на 20 мин. Для трансфекции клетки промывали PBS, и оставляли в 2 мл среды Opti-Mem. После чего к клеткам по каплям приливали по 100 мкл смеси для трансфекции и инкубировали 12 ч при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. После трансфекции заменяли среду на новую DMEM без бластицидина и культивировали 96 ч.

### **2.2.19. Обработка клеточной линии HT1080 НАС dGFP экстрактами для анализа потери искусственной хромосомы**

За день до обработки экстрактами клетки рассаживали в количестве 12500 клеток на лунку 24 луночного планшета в полной среде DMEM, содержащей 10мкг/мл бластицидина. На следующий день проводили обработку экстрактами. Для этого разные концентрации экстрактов растворяли в 500 микролитрах среды DMEM и приливали к клеткам, инкубировали 12 ч при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. После 24 ч инкубации заменяли среду на новую DMEM без бластицидина и культивировали 96 ч (время, необходимое клеткам для прохождения 4 делений). Для проведения экспериментов использовали экстракты, представленные в таблице 14.

### **2.2.20. Проточная цитофлуориметрия**

Анализ проводили на проточном цитофлуориметре BD Accuri™ C6 Plus. Для подготовки клеток к анализу, из шести луночных планшетов аспирировали культуральную среду, клетки промывали PBS (37°C) и добавляли 300 мкл раствора трипсина 0,25%/PBS. Клетки инкубировали 5 мин при 37°C, после добавляли новую среду и ресуспендировали открепившиеся клетки до одноклеточной суспензии. Клетки центрифугировали при 120g 5 мин. Убирали надосадочную, осадок ресуспендировали в PBS. Репортерными сигналами служил зеленый флуоресцентный белок GFP с максимумом возбуждения при длине волны 488 нм, и DRAQ7™ (Biolegend, USA) с максимумом возбуждения при 695nm. GFP и DRAQ7™ регистрировали разными каналами. DRAQ7™ проникает только в клетки с поврежденной мембраной и окрашивает их ДНК (синяя флуоресценция). DRAQ7™ использовали в концентрации 0,02 мМ с последующей инкубацией в течение 10 мин при температуре 22°C. Для каждого образца было взято 20 тысяч клеток. Популяцию оценивали в плоскости двухпараметрической гистограммы, на которой можно наблюдать соотношения положительных и отрицательных по GFP и DRAQ7™ клеток.

### **2.2.21. Трансфекция миРНК на 384 луночном планшете**

Трансфекцию миРНК проводили на 384–луночных планшетах фирмы Thermo Scientific, на дне лунок которого была лиофилизирована миРНК в количестве 20 мкм. Концентрацию клеток НТ1080 НАС/dGFP подбирали исходя из продолжительности эксперимента, так что бы конfluence к моменту фиксации клеток не превышала 95%. Клетки рассаживали на планшет в среде Opti-MEM (Thermo Scientific) в количестве 400 клеток на лунку или 300 клеток на мм<sup>2</sup>. Для рассадки клеток использовали автоматизированную систему Multidrop™ Combi Reagent Dispenser (Thermo Scientific). Для рассадки, 200 000 клеток смешивали с липофектаминоном в концентрации 0,05мкл на 100 мкл среды Opti-MEM в объеме 50 мл, получившуюся суспензию разделяли в объеме 100 мкл на лунку, таким образом в каждую лунку планшета попадало по 400 клеток. Далее клетки инкубировали 20 ч при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. После чего промывали клетки PBS и помещали в среду DMEM, 10% FBS, 1%P/S на 72 ч.

### **2.2.22. Фиксация клеток НТ1080 НАС/dGFP**

Через 72 ч инкубации клеток после трансфекции, планшет промывали 100мкл PBS и добавляли 50 мкл фиксирующего раствора: 4% Параформальдегида на PBS инкубировали 15 мин при комнатной температуре после чего промывали 2 раза PBS и добавляли раствор DAPI 10мкг/мл на PBS, инкубировали 15 мин.

### **2.2.23. Вычисление вероятности потери НАС под действием миРНК-опосредованного подавления экспрессии гена или лекарственного кандидата**

Долю GFP-положительных клеток (P<sub>0</sub>) определяли по формуле:

$$P_0 = \frac{x}{x+y}$$

где  $x$  – число GFP-положительных клеток,  $y$  – число GFP-отрицательных клеток.

Вероятность того, что одна из дочерних клеток потеряла НАС под действием ( $R_{si}$ ), определяли по формуле:

$$R_{si} = 2 - 2 * \left(\frac{P_4}{P_0}\right)^{0,25}$$

где  $P_4$  – доля GFP-положительных клеток через 4 клеточных деления.

Так рассчитывается вероятность потери НАС на одно клеточное деление, этот параметр отражен на графиках (главы «Результаты» и «Обсуждение»).

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

### 3.1. Создание тест-системы на основе искусственной хромосомы человека tetO–НАС для массового скрининга факторов, вызывающих хромосомную нестабильность

В качестве системы для детекции хромосомной нестабильности в данной работе была получена клеточная линия человеческой фибросаркомы HT1080, несущая искусственную хромосому человека (tetO–НАС), чувствительную к факторам, влияющим на трансмиссию хромосом.

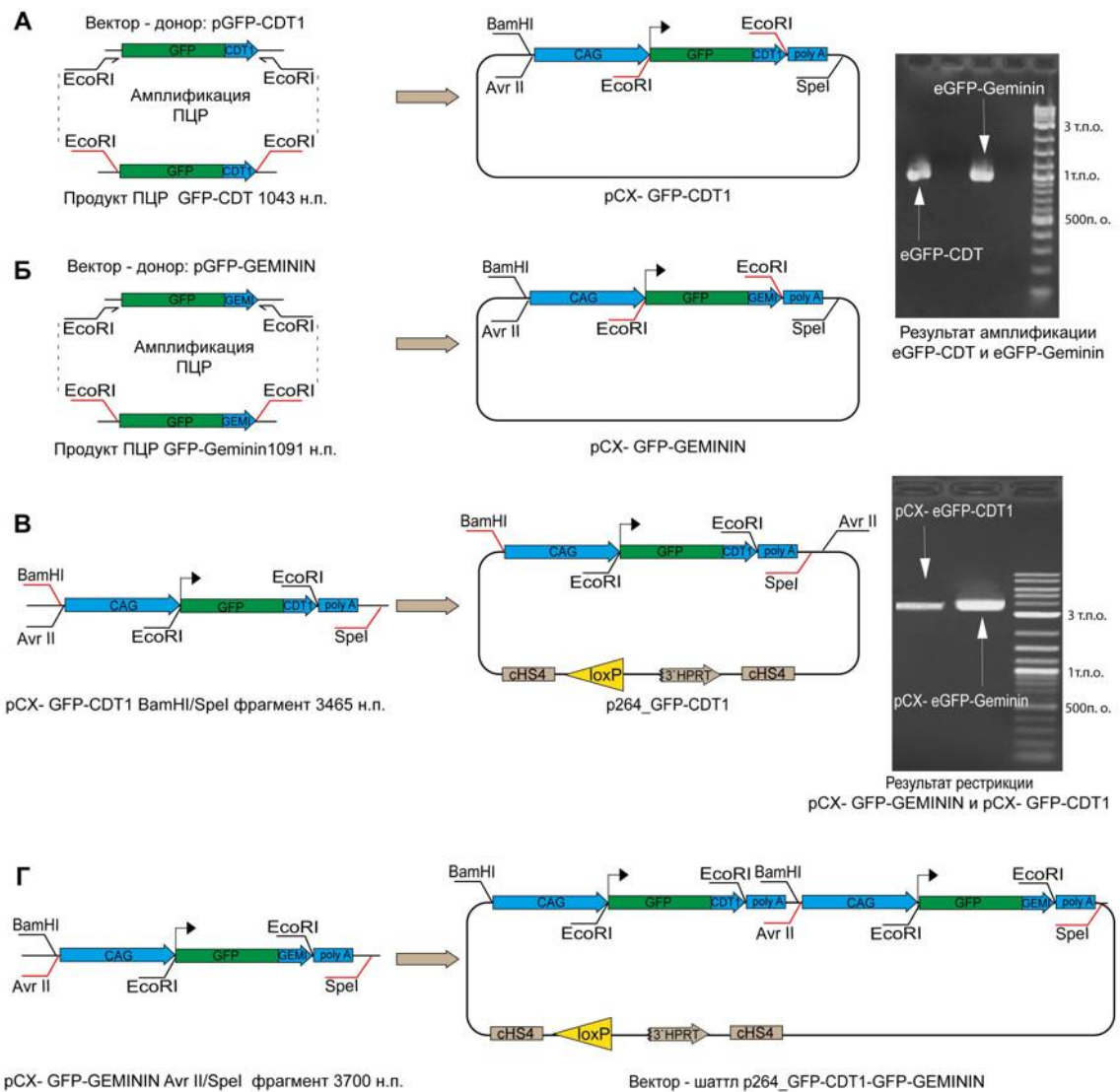
Для визуализации искусственной хромосомы в клеточном цикле нами был использован подход, описанный в работе (Sakaue-Sawano et al., 2008, 2013). В основе данного метода лежит экспрессия коротких пептидных последовательностей белков – регуляторов клеточного цикла FUCCI (fluorescent ubiquitination–based cell–cycle indicator), находящихся в общих рамках считывания с кодирующими последовательностями флуоресцентных белков, деградирующих в такой системе каждый клеточный цикл. Для этого была разработана и сконструирована рекомбинантная система (Рисунок 4), на основе ранее опубликованных С–концевых пептидных последовательностей, которые являются частью белков CDT1 и GEMININ–регуляторов клеточного цикла (далее сенсоров клеточного цикла).

Сенсоры клеточного цикла CDT1 и GEMININ приводят к протеасомной деградации любого белка, связанного с их С–концевыми последовательностями, причем время активного функционирования каждого из них строго связано с продолжительностью различных фаз клеточного цикла. CDT1 экспрессируются в течение G1 периода, тогда как GEMININ в S, G2 и M периодах. Таким образом, экспрессируя в клетке химерный флуоресцентный белок вместе с С–концевыми пептидами GEMININ или CDT1 можно визуализировать весь клеточный цикл.

На первом этапе работы над клеточной линией было выполнено конструирование плазмидных векторов в клеточных системах на основе *E. coli*. Для этого мы амплифицировали последовательности сенсоров клеточного цикла вместе

с белок-кодирующими районами зеленых флуоресцентных белков (GFPs), причём при проведении ПЦР были использованы праймеры, имеющие в своем составе последовательности сайтов рестрикции *EcoRI*. В качестве матрицы для ПЦР были использованы векторы pCX-GFP-CDT1 и pCX-GFP-GEMININ. Схема амплификации и электрофорез продуктов ПЦР представлены на рисунке 4 (А и Б), длины ампликонов составили 1043 и 1091 н.п. для *CDT1* и *GEMININ*, соответственно. Далее последовательности были помещены под контроль плазмидного вектора pCX, который служил источником промоторной области. Для этого продукты амплификации были рестрицированы по сайтам *EcoRI* и лигированы в вектор pCX, также имеющий липкие концы после рестрикции по *EcoRI* (Рисунок 4А). На первом этапе сборки мы получили 2 вектора: pCX-GFP-CDT1 длиной 5813 н.п. и вектор pCX-GFP-GEMININ размером 5861 н.п. Каждая пара сенсоров и зеленых флуоресцентных белков находилась в отдельной рамке считывания под контролем промоторов CV40.

На втором этапе полученные векторы были линейаризованы посредством рестрикции по сайтам *BamHI/SpeI* для вектора pCX-CDT1-GFP и *AvaI/SpeI* для вектора pCX-GFP-GEMININ. На электрофореграмме (Рисунок 4Б) можно видеть, что длина продуктов рестрикции соответствует расчетной и составляет 5813 н.п. и 5861 н.п. для pCX-GFP-CDT1 и pCX-GFP-GEMININ соответственно. Далее было проведено последовательное лигирование продуктов рестрикции и «пустого» шаттл-вектора p264, сначала было выполнено лигирование pCX-GFP-CDT1 и шаттл-вектора, а после чего к получившейся конструкции был лигирован pCX-GFP-GEMININ (Рисунок 4Б).

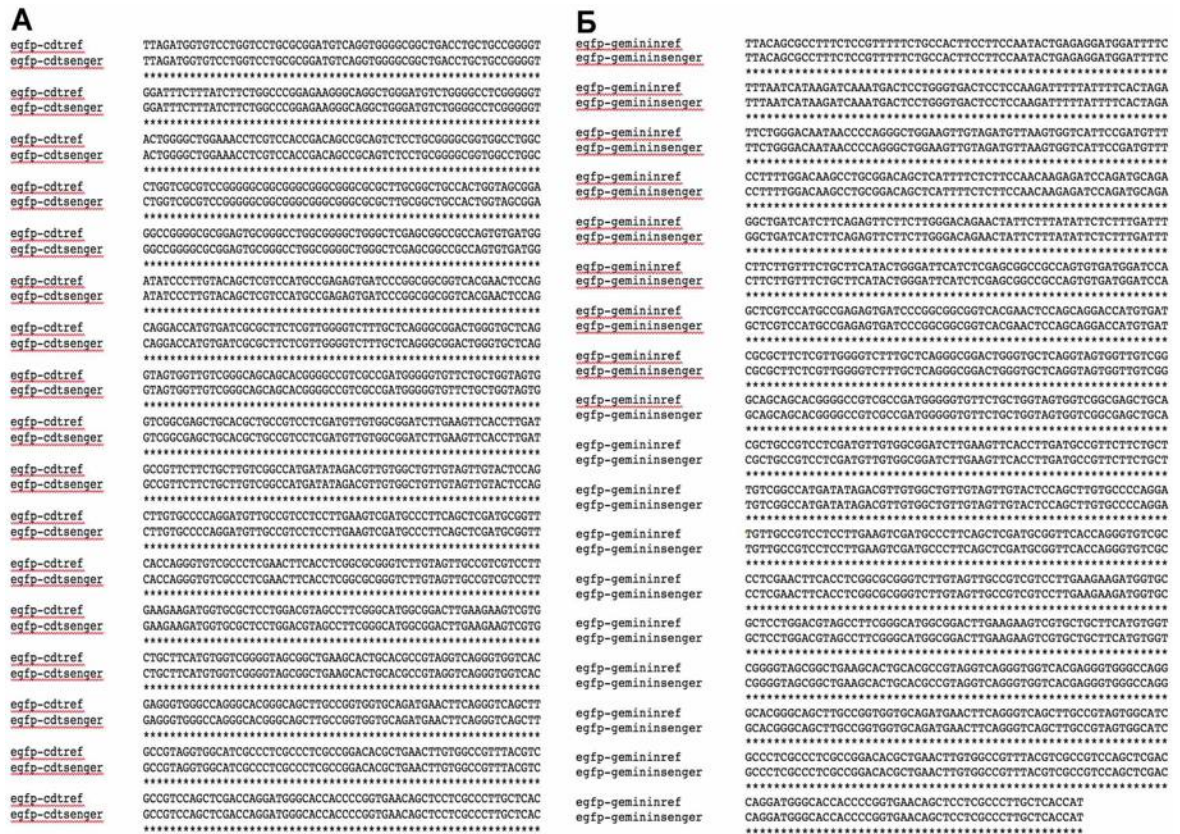


**Рисунок 4** – Сборка шаттл-вектора p264-GFP-CDT1-GEMININ, содержащего систему сенсоров клеточного цикла. А – схема амплификации фрагмента, содержащего сенсор клеточного цикла GFP-CDT1 и его лигирования в плазмидный вектор pCX; Б – схема амплификации фрагмента, содержащего сенсор клеточного цикла GFP-GEMININ, и его лигирования в плазмидный вектор pCX; В – схема рестрикции и лигирования вектора pCX-GFP-CDT1 и пустого вектора шаттл-вектора p264; Г – схема лигирования вектора pCX-GFP-CDT1 и pCX-GFP-GEMININ.



Таким образом, на последнем этапе сборки был получен финальный вектор, содержащий открытые рамки считывания GFP–CDT1 и GFP–GEMININ под контролем независимых промоторов, подходящих для экспрессии в клетках млекопитающих. Также в последовательности шаттл-вектора присутствует сайт LoxP рекомбинации, который был использован для рекомбинантного встраивания созданной конструкции в состав искусственной хромосомы человека в клетках СНО на этапе загрузки шаттл-вектора.

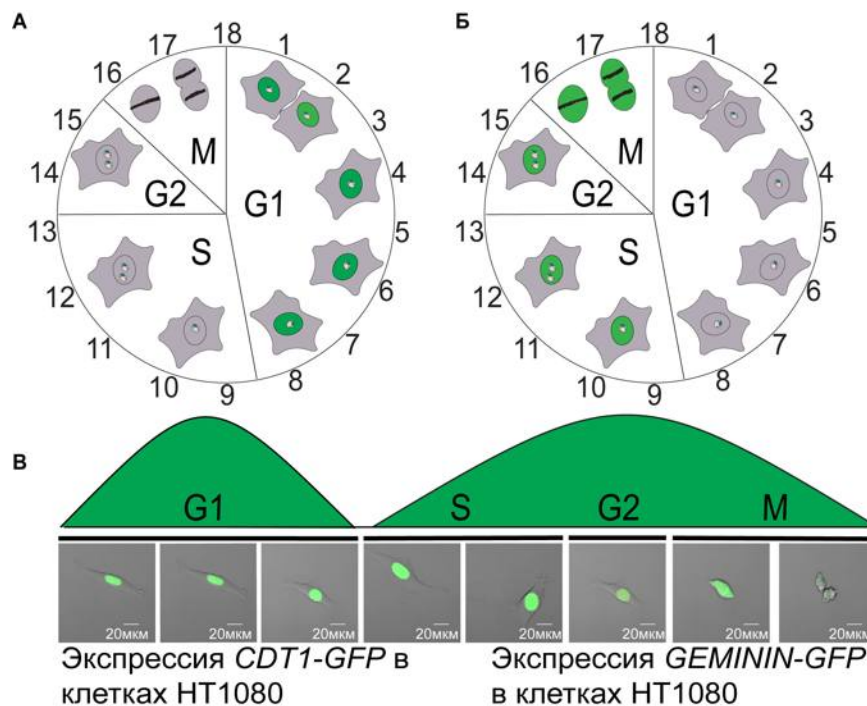
Используя классический метод секвенирования по Сенгеру, мы определили первичную последовательность шаттл-вектора, анализ последовательностей показал отсутствие замен в рамках считывания сенсоров *CDT1* и *GEMININ*, а также связанных с ними *GFPs* (Рисунок 5).



**Рисунок 5** – Выравнивание последовательностей *GFP–CDT1* и *GFP–GEMININ*, полученных в результате секвенирования плазмидных векторов pCX–GFP–CDT1 и pCX–GFP–GEMININ на аналогичные последовательности, спроектированные в программе Vector NTI. А – проект последовательности *GFP–CDT1*, выравненный на результат секвенирования *GFP–CDT1*; Б – проект последовательности *GFP–GEMININ*, выравненный на результат секвенирования *GFP–GEMININ*.

Поскольку GFP связан с каждым из сенсоров клеточного цикла, то флуоресцентный сигнал детектируется только в период, когда сенсор находится в нуклеоплазме, согласно сигналу ядерной локализации.

Экспрессия генов *GFP-CDT1* и *GFP-GEMININ* в клетках человеческой фибросаркомы HT1080 продемонстрирована на рисунке 6. Как видно из результатов, флуоресценция GFP имеет ядерную локализацию, а период флуоресценции соответствует изменению фаз клеточного цикла: G1 для *GFP-CDT1* (Рисунок 6Б) и G2, S и M для *GFP-GEMININ* (Рисунок 6В). Продолжительность флуоресценции составила 8–9 ч для каждого из рекомбинантных белков. При этом в клетках экспрессирующих оба химерных белка происходит визуализация всего клеточного цикла (Рисунок 6А). Данный результат демонстрирует корректность сборки рекомбинантных конструкций.



**Рисунок 6** – Экспрессия сенсоров клеточного цикла в клетках HT1080.

А – экспрессия вектора *pCX-GFP-CDT1* в клетках HT1080 в течение клеточного цикла; Б – экспрессия *pCX-GFP-GEMININ* в клетках HT1080 в течение клеточного цикла; В – экспрессия шаттл-вектора *p264-GFP-CDT1-GFP-GEMININ* в клетках HT1080 в течение клеточного цикла.

Задачей создания рекомбинантных белков в данной работе является не визуализация различных фаз клеточного цикла, а демонстрация потери НАС под действием тестируемых нами факторов. Поэтому кодирующие последовательности данных рекомбинантных белков были помещены в состав искусственной хромосомы человека.

На рисунке 7 представлена схема *LoxP Cre* рекомбинации шаттл-вектора и пустой искусственной хромосомы в клетках СНО (*chinese hamster ovary*). Как видно на рисунке 7А, последовательность искусственной хромосомы имеет половину гена *HPRT* (*hypoxanthine-guanine phosphoribosyl transferase*), полноразмерная последовательность которого, экспрессируясь, обеспечивает резистентность при культивировании клеток в селективной среде с содержанием гипоксантин – 5 мМ, аминоптерин – 20 мМ, тимидин – 0,8 мМ (*hypoxanthine-aminopterin-thymidine*, НАТ). После рекомбинации (Рисунок 7А), произошло восстановление последовательности *HPRT* и шаттл-вектор был интегрирован в состав искусственной хромосомы (Рисунок 4В). Восстановление *HPRT* позволило провести селекцию клонов, содержащих последовательности интереса в составе искусственной хромосомы и получить необходимое количество клеток СНО, для проведения завершающего этапа сборки системы – переноса полученной хромосомы в клеточную линию НТ1080 с помощью протокола микроклеточно-опосредованного переноса хромосом (перевод с англ., *microcell-mediated chromosome transfer*, ММСТ).

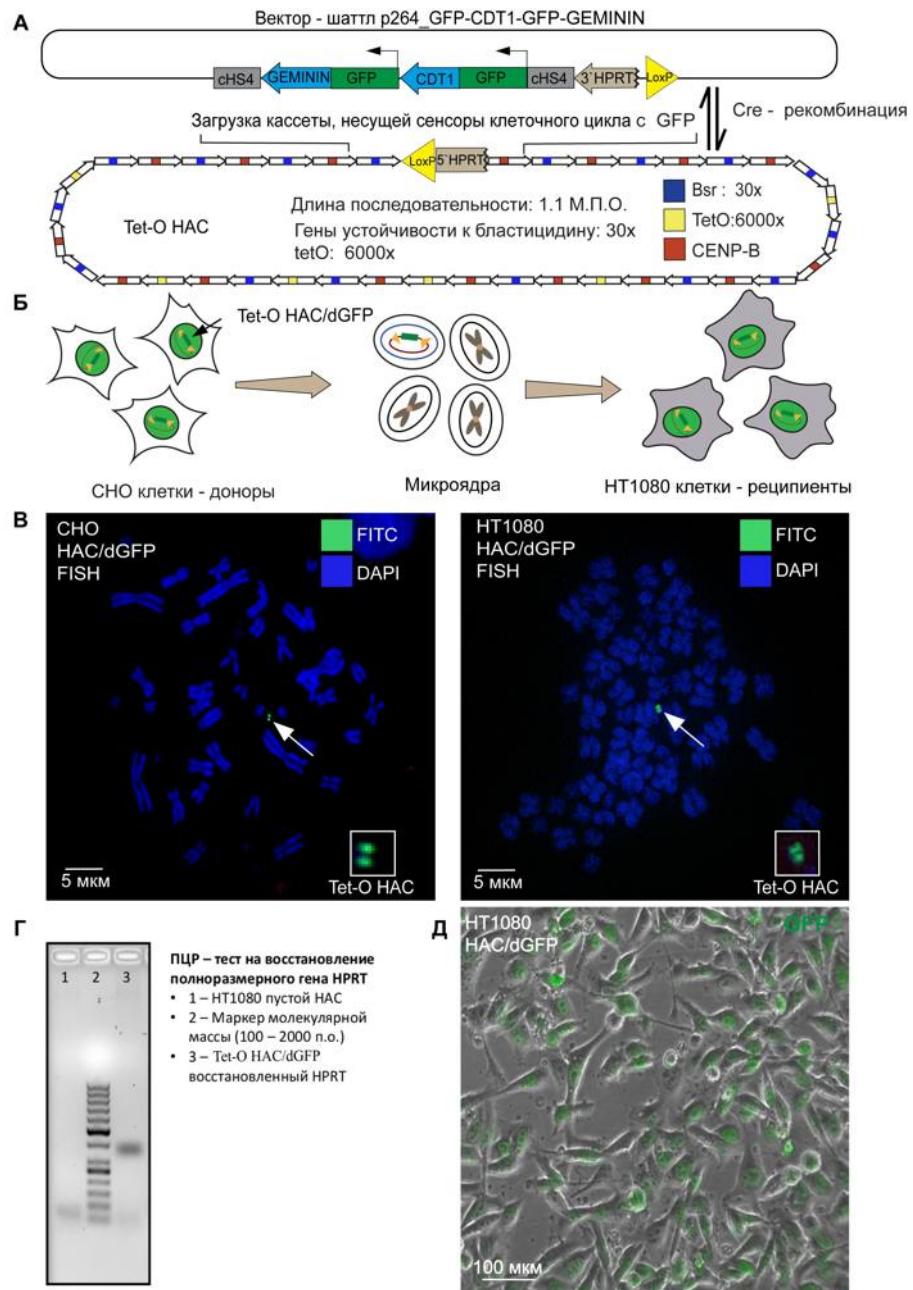
На рисунок 7Б показана схема переноса искусственной хромосомы в клетки-реципиенты НТ1080 с помощью протокола ММСТ (см. главу «Материалы и методы»). Для подтверждения корректности переноса и наличия искусственной хромосомы в клетках донорах и реципиентах, СНО и НТ1080 соответственно, была проведена гибридизация *in situ* препаратов метафазных пластинок.

В качестве маркера мы использовали зонд РНА, меченый FITC, на последовательность *tetO* в составе искусственной хромосомы, данная последовательность уникальна по отношению к остальным последовательностям нативных хромосом линии НТ1080. На рисунке 7В слева видно, что клетки-

реципиенты имеют четкий сигнал зеленой флуоресценции (FITC) исходящий от комплекса tetO в последовательности искусственной хромосомы и флуоресцентной метки PNA–FITC. После осуществления переноса из клеток CHO в клетки HT1080, в них также наблюдается сигнал от последовательности tetO, которая является свидетельством наличия искусственной хромосомы в клетках HT1080 (Рисунок 7B). После проведения ММСТ клетки HT1080 были подвергнуты селекции в присутствии селективного антибиотика бластицидина. Гены устойчивости к бластицидину локализованы в последовательности HAC (Рисунок 7) и позволяют провести селекцию клеток с искусственной хромосомой. После селекции мы выбрали клон с наиболее стабильной экспрессией GFP и использовали его для дальнейших экспериментов.

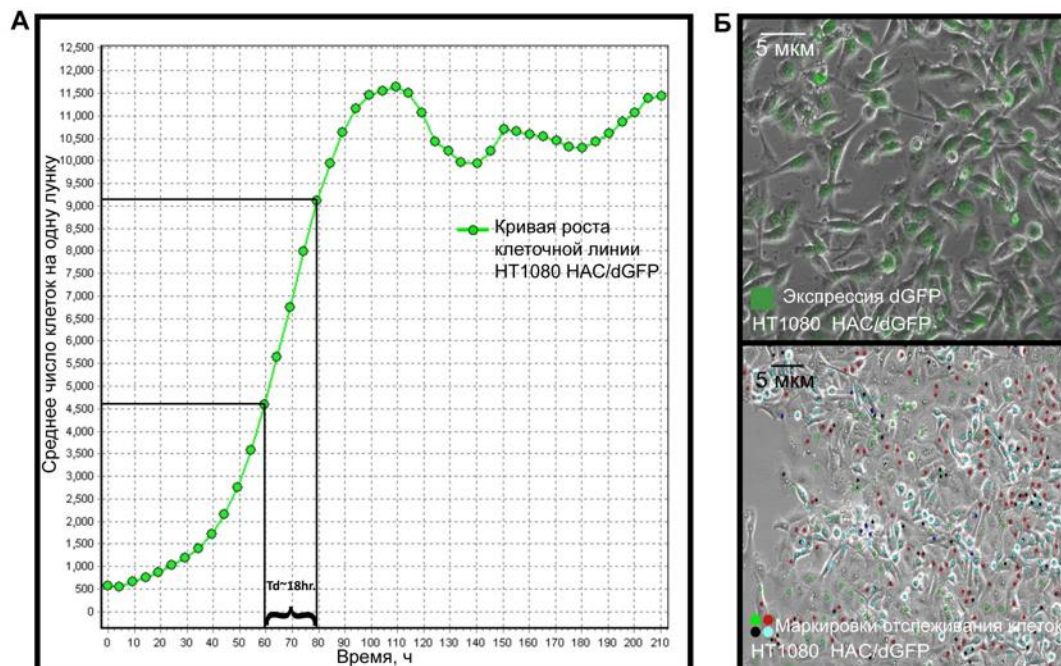
Таким образом, нами была получена линия человеческой фибросаркомы HT1080, которая содержит искусственную хромосому человека (HAC) в которой экспрессируются сенсоры клеточного цикла *GFP–CDT1* и *GFP–GEMININ*, для упрощения названия системы сенсоров клеточного цикла мы используем аббревиатуру dGFP (destabilized green fluorescence protein). Далее в тексте работы созданная клеточная линия будет называться HT1080 HAC/dGFP (или тест–система).





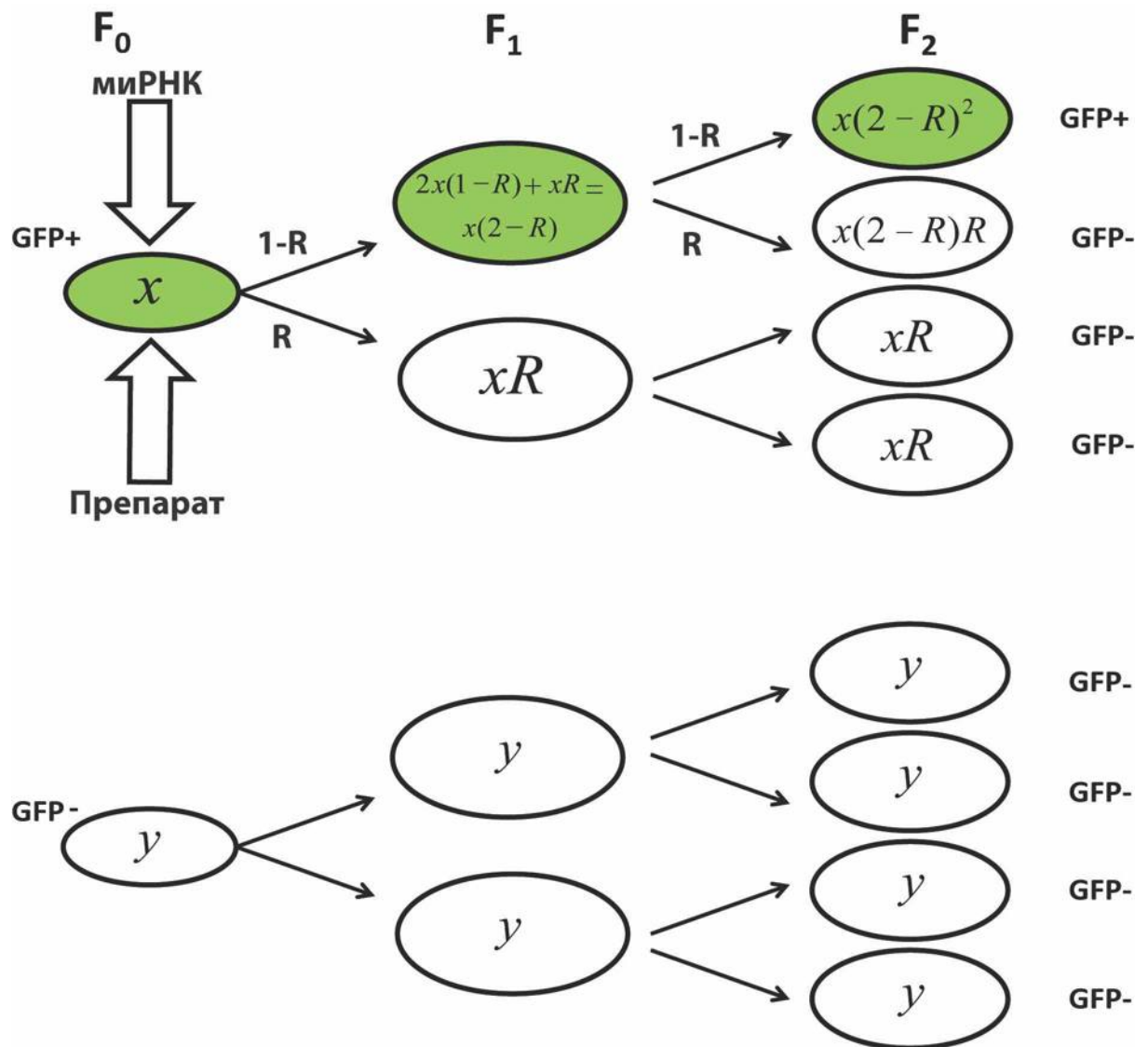
**Рисунок 7** – Получение рекомбинантной клеточной линии человеческой фибросаркомы HT1080 с искусственной хромосомой человека и системой сенсоров клеточного цикла GFP-CDT1и GFP-GEMININ. А – Cre опосредованная рекомбинация через сайт loxP, для помещения шаттл-вектора p264-GFP-CDT1-GFP-GEMININ в состав искусственной хромосомы в клетках CHO; карты искусственной хромосомы (Alphoid<sup>tetO</sup> – HAC) и вектора p264-GFP-CDT1-GFP-GEMININ; Б – схема протокола переноса искусственной хромосомы человека из клеточной линии CHO в клеточную линию HT1080; В – снимок метафазы клеток CHO и HT1080 и FISH на последовательность tetO в искусственной хромосоме человека; Г – ПЦР восстановленного в результате Cre-loxP рекомбинации полноразмерного гена селективного маркера HPRT; Д – снимок популяции клеток

HT1080 HAC/dGFP после проведения ММСТ. В эксперименте по определению уровня хромосомной нестабильности, клетки, подвергшиеся обработке факторами, вызывающими хромосомную нестабильность, проходят несколько делений. При расчете уровня хромосомной нестабильности мы использовали выражение, представленное на рисунке 9, вывод формулы описан в главе материалы и методы. Для определения количества делений, которые клетки проходят в течение эксперимента мы провели анализ скорости клеточного цикла (Рисунок 8). Кривая роста была построена посредством прижизненного мониторинга GFP-позитивных клеток методом высокоэффективной автоматизированной микроскопии.



**Рисунок 8** – Определение продолжительности клеточного цикла для клеток HT1080/dGFP методом высокоэффективной автоматизированной микроскопии на платформе Cell iQ. А – продолжительность клеточного цикла (время удвоения клеточной популяции, перевод с англ. doubling time, Td), рассчитанное в логарифмической фазе кривой роста клеток HT1080 HAC/dGFP; один клеточный цикл занимает приблизительно 18 ч; Б – изображения клеток HT1080 HAC/dGFP, экспрессирующих трансген dGFP (вверху) и клетки HT1080 HAC/dGFP с маркерами автоматической идентификации клеток в системе Cell iQ (внизу): распластанные клетки (красная маркировка), делящиеся клетки (голубая маркировка), мертвые клетки (черная маркировка), клеточный дебрис (зеленая маркировка).

Используя данные анализа продолжительности клеточного цикла линии НТ1080 НАС/dGFP, мы разработали модель вычисления вероятности потери НАС под действием факторов, вызывающих хромосомную нестабильность.



**Рисунок 9** – Вычисление вероятности потери НАС под действием факторов, вызывающих хромосомную нестабильность.

Экспрессия GFP с сенсорами клеточного цикла должна позволить детектировать потерю искусственной хромосомы непосредственно после развития хромосомной нестабильности. При действии на клеточную популяцию химических

веществ, вызывающих хромосомную нестабильность, или подавления экспрессии важных для процесса сегрегации хромосом генов, происходит нарушение хромосомной трансмиссии и потеря флуоресценции утратившими НАС клетками. По соотношению GFP позитивных и GFP негативных клеток в популяции, можно определять уровень хромосомной нестабильности.

На рисунке 10 показаны результаты эксперимента, демонстрирующего эффективность работы, созданной тест-системы. В данном эксперименте показана способность клеточной популяции NT1080 НАС/dGFP отвечать на воздействие известного ингибитора деполимеризации микротрубочек – цитотоксического соединения таксол (Рисунок 10Б), который используется в противоопухолевой терапии и входит в перечень важнейших лекарственных средств по решению Всемирной организации здравоохранения (Weaver, 2014); также показана реакция клеток на нокдаун *SKA3* – одного из ключевых генов, участвующих в процессе формирования кинетохора и продемонстрирован результат нокдауна генов *dGFP*. Таксол и миРНК против *SKA3* часто применяют в качестве положительных контролей в опытах для изучения митотического цитоскелета и хромосомной трансмиссии (Park et al., 2011; Lee et al., 2013). Рисунок 10 отражает результаты, полученные методом проточной цитофлуориметрии. Разница между количеством клеток, потерявших сигнал в отрицательном контроле и в эксперименте, является необходимым результатом для измерения вероятности возникновения хромосомной нестабильности под воздействием веществ-кандидатов или нокдауна генов-регуляторов хромосомной трансмиссии. В экспериментах для определения уровня хромосомной нестабильности мы использовали клетки без селекции в качестве отрицательного контроля. Для того, чтобы исключить из расчета мертвые клетки, мы использовали витальный краситель Drug 7, количество клеток положительных по данному красителю можно наблюдать во всех нижних левых квадратах каждого плота.

Рисунок 10А показывает, как ведет себя клеточная популяция под воздействием интерферирующей РНК против центрального белка *SKA3*, нокдаун

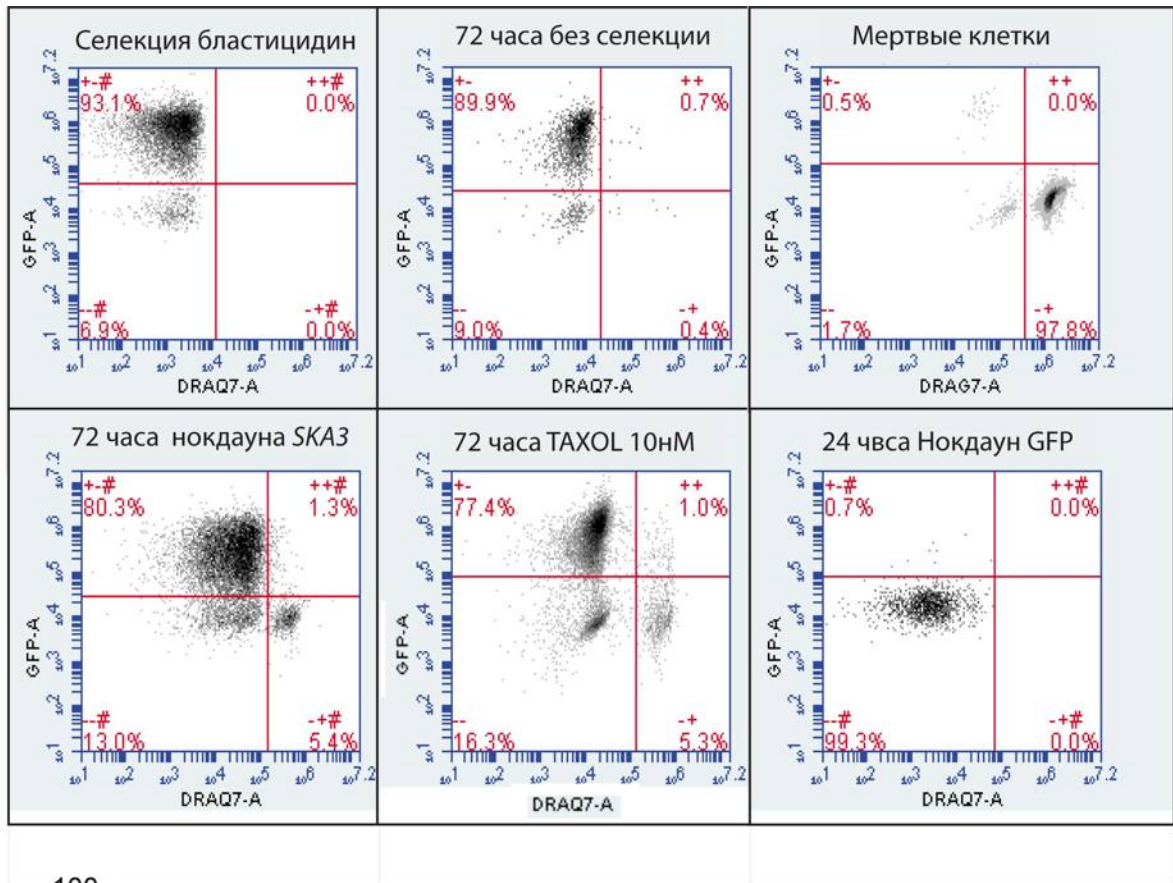


которого вызывает хромосомную нестабильность (Kim et al., 2016a). На рисунке 10А видно, что 17% клеточной популяции потеряло флуоресценцию GFP.

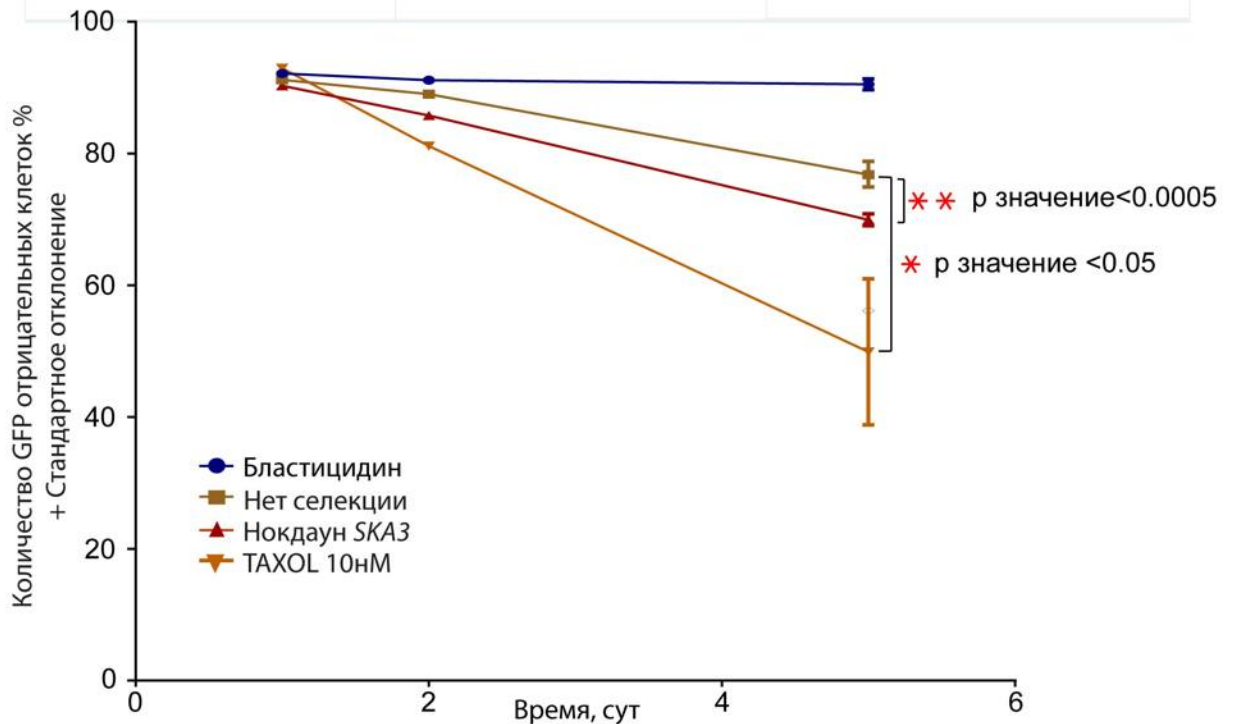
На рисунке 10А видно, что 93% клеток в популяции, не обработанной таксомом и культивируемой в присутствии селективного антибиотика бластицидина в концентрации 1мкг/мл, имеют GFP сигнал (GFP +), а около 7% клеток не имеют сигнала GFP. Это связано с особенностями деградации сенсоров клеточного цикла: CDT1 и GEMININ не экспрессированы в поздней телофазе одновременно, поэтому часть клеточной популяции в этот момент не имеет флуоресценции. Клетки, культивируемые в течение 5 дней в отсутствии селекции, начинают самопроизвольно терять НАС (Lee et al., 2013), что представлено на рисунке 10Б, и доля GFP+ клеток через 72 ч после прекращения обработки бластицидином составляет 90%. Клеточная популяция, находившаяся в течение 24 ч под воздействием таксола в концентрации 10нМ, через 4 клеточных деления демонстрирует потерю сигнала GFP, только 77% клеточной популяции имеют сигнал GFP (Рисунок 10А).

В данном опыте была также продемонстрирована способность системы быстро отвечать на воздействие интерферирующей РНК против зеленого флуоресцентного белка. На рисунке 10А видно, что 97% популяции теряет флуоресценцию GFP на следующий день после трансфекции. Этот результат демонстрирует чувствительность тест-системы и ее способность реагировать на исчезновение источника экспрессии GFP, который является индикатором хромосомной нестабильности.

A

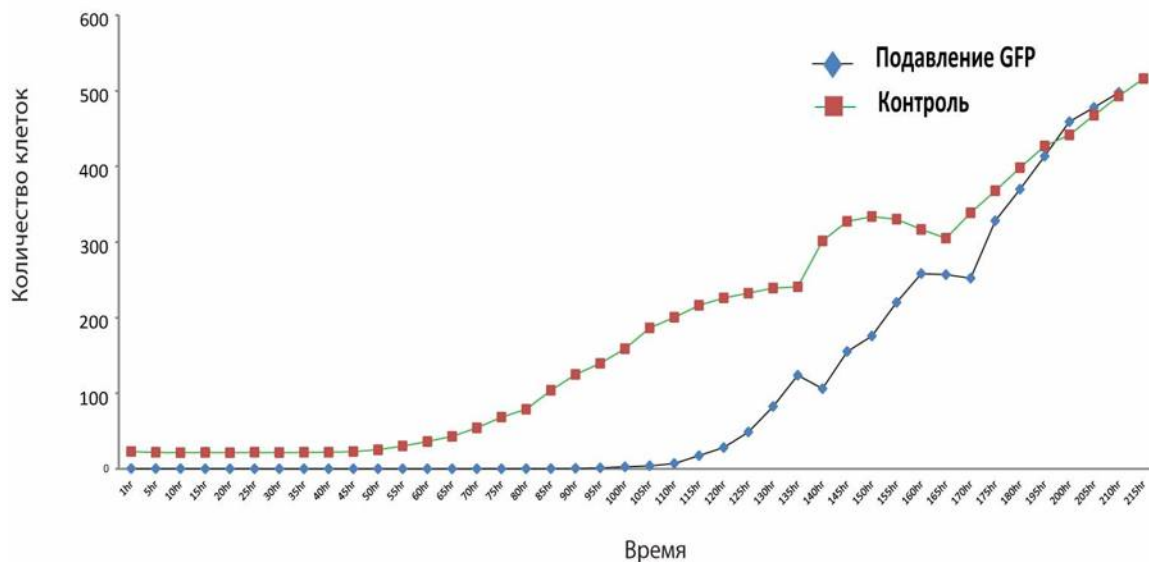


Б



**Рисунок 10** – Оценка эффективности работы тест-системы методом проточной цитофлуориметрии. А – результаты проточной цитофлуориметрии клеточной популяция HT1080 HAc/dGFP через 72 ч после нокдауна SKA3, GFP и обработки таксолом; Б – динамика потери сигнала GFP клетками HT1080 HAc/dGFP после нокдауна SKA3 и обработкой таксолом.

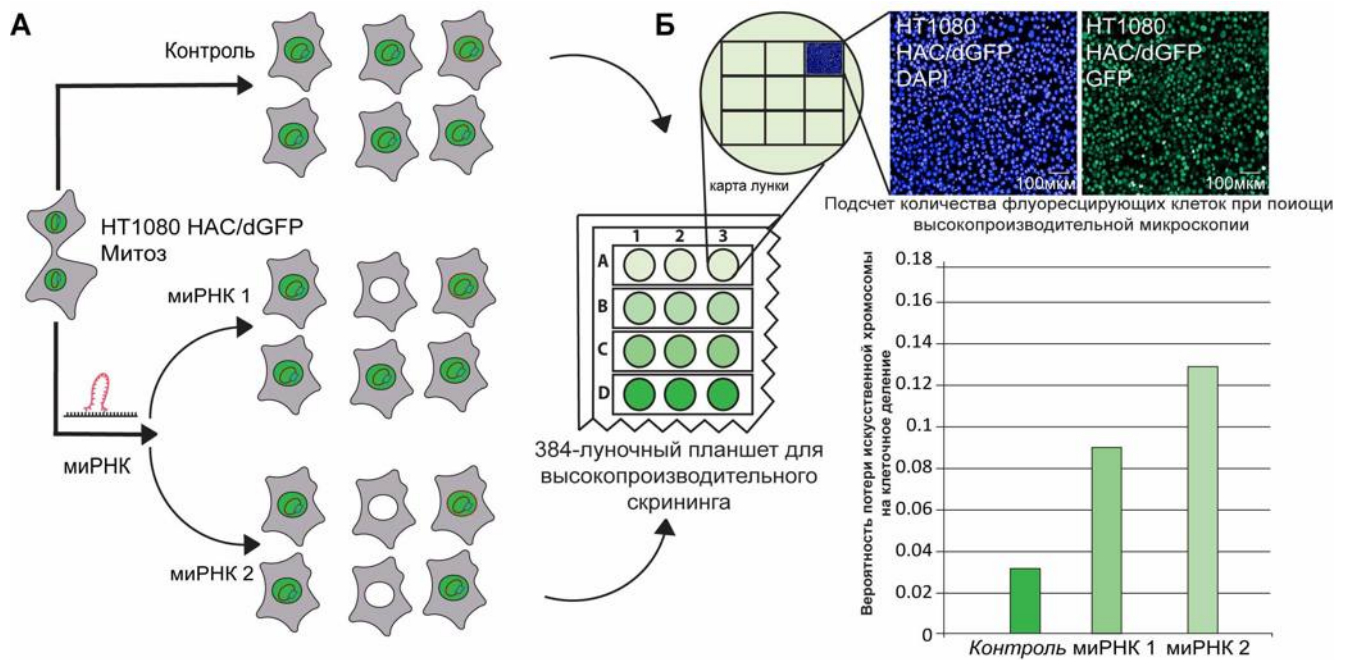
На рисунке 11 представлен результат эксперимента по анализу динамики клеточной популяции после нокдауна *GFP* с помощью пула интерферирующих РНК. В эксперименте была использована система высокоэффективной автоматизированной микроскопии для слежения за клеточной популяцией в режиме реального времени (Cell iQ). При этом трансфицированные клетки культивировали в течение 215 ч (до достижения конfluence) и детектировали изменение количества *GFP* положительных клеток в популяции. Как видно на рисунке 11, после трансфекции наблюдается стабильный рост клеточной популяции, при этом клетки, подвергшихся трансфекции, сначала не флуоресцируют, а затем восстанавливают экспрессию *GFP* через 150 ч. Данный опыт доказывает способность системы мгновенно отвечать на остановку экспрессии *GFP*. Таким образом, клеточная линия HT1080 HAC/dGFP позволяет детектировать потерю искусственной хромосомы непосредственно после развития хромосомной нестабильности.



**Рисунок 11** – Время восстановления флуоресцентного сигнала после миРНК-опосредованного ингибирования экспрессии *GFP* в клетках линии HT1080 HAC/dGFP.

В данной работе клеточная линия HT1080 HAC/dGFP была использована для проведения скрининга новых генов, участвующих в митотическом расхождении хромосом. Для этого нами был разработан протокол эксперимента по проведению miРНК-опосредованного подавления экспрессии генов-кандидатов и последующего анализа потери флуоресценции GFP.

Клетки, экспрессирующие систему сенсоров клеточного цикла GFP–CDT1 и GFP–GEMININ, имеют ядерную локализацию флуоресценции в течение всего клеточного цикла. Трансфекция miРНК с последующим нокдауном генов, участвующих в трансмиссии хромосом, приводит к хромосомной нестабильности и вызывает потерю HAC/dGFP. Ядра клеток, которые утратили HAC/dGFP после обработки miРНК против продукта экспрессии гена-мишени, теряют зеленое свечение. Потерю флуоресценции можно оценить путем анализа изображений, полученных с помощью эпифлуоресцентной, конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, высокопроизводительной автоматизированной микроскопии, а также методом проточной цитофлуориметрии. Использование конфокальной микроскопии в сочетании с высокопроизводительным автоматизированным имиджингом позволяет применять тест-систему для высокопроизводительного скрининга библиотек miРНК на 384 луночных планшетах, что обеспечивает высокую производительность и возможность увеличить количество повторов в экспериментах. Каждая отдельная лунка 384 луночного планшета содержала пул miРНК против продуктов экспрессии одного гена-интереса. Каждую лунку планшета снимали в 9 полях зрения, а трансфекция была выполнена в 3 повторах, таким образом подсчет флуоресцентных событий производился путем анализа 27 независимых изображений (Рисунок 12), что позволяло получать статистически достоверные данные. Кроме того, в системе предусмотрен внутренний контроль эффективности трансфекции, который предполагает использование miРНК против GFP, эффект от которой будет пропорционален эффективности трансфекции (как на рисунках 10 и 11). В качестве негативного контроля мы использовали пул неспецифических miРНК, который позволит исключить артефакты трансфекции.

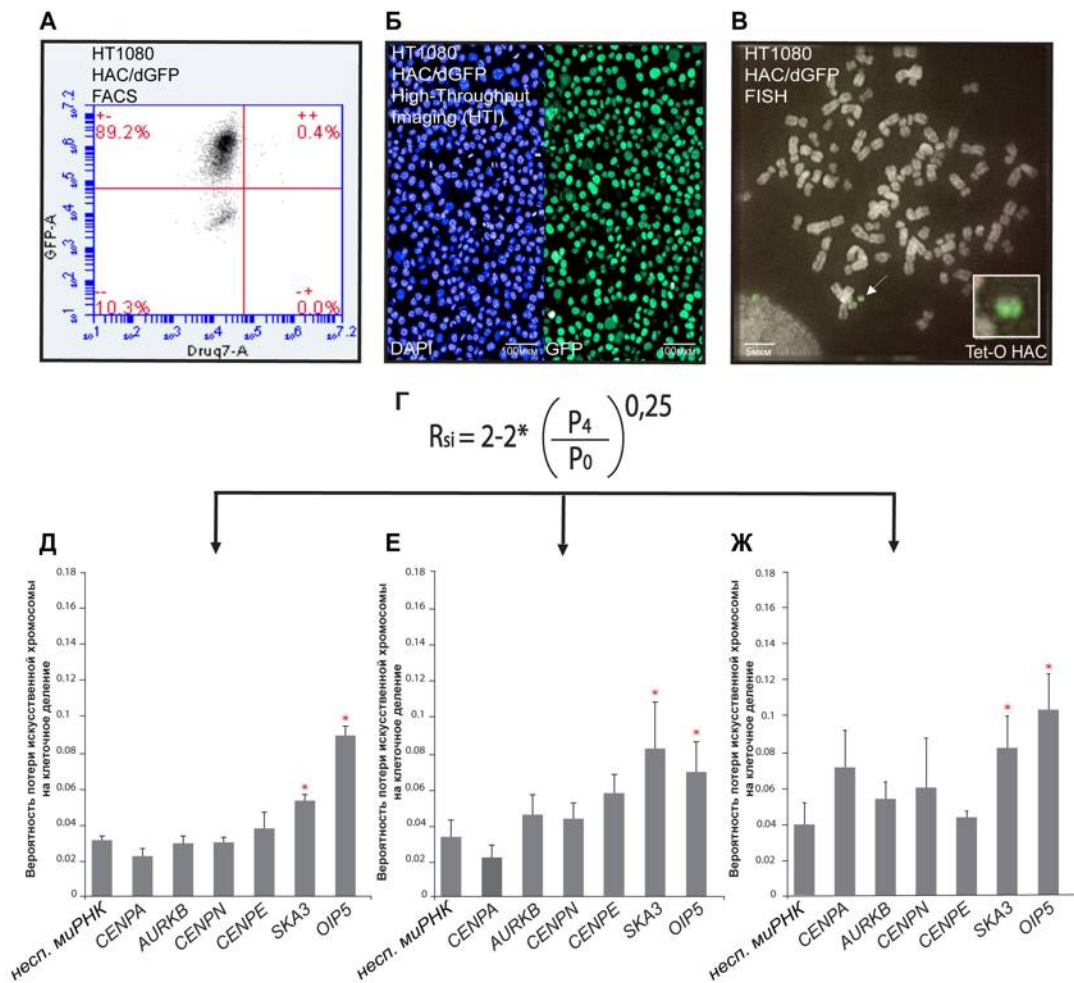


**Рисунок 12** – Общая схема эксперимента с клеточной линией HT1080 HAC/dGFP для проведения высокопроизводительного скрининга библиотек миРНК. А – схема потери флуоресценции GFP клетками после нокдауна генов интереса. Контрольная популяция необработанных клеток демонстрирует равномерную зеленую флуоресценцию; клетки, потерявшие искусственную хромосому в результате нокдауна гена интереса, теряют зеленое свечение; Б – масштабирование посадки клеток на 384-луночный планшет для высокопроизводительного скрининга и детекция флуоресценции DAPI и GFP. Фактическое количество и долю клеток с HAC/dGFP можно измерить с помощью лазерной сканирующей флуоресцентной микроскопии (LSM) в сочетании с высокопроизводительным автоматизированным имиджингом или применением проточной цитометрии. Интерпретация данных осуществляется в виде вероятности потери искусственной хромосомы на клеточное деление (Рисунок 12).

### 3.2. Поиск новых генов, вовлеченных в процесс хромосомной трансмиссии

На основе анализа наиболее важных белков, участвующих в формировании пространственной структуры центрального гетерохроматина и образования кинетохорного комплекса, был составлен список генов, нокдаун которых должен приводить к сбоям при расхождении хромосом во время митоза. Данные гены были использованы в качестве положительных контролей, среди них: *CENPA*, *AURKB*, *CENPN*, *SKA3*, *OIP5*. На рисунке 13 продемонстрирована вероятность потери искусственной хромосомы, после нокдауна выбранных генов. Рисунок 13 (А и Д) иллюстрирует результаты, полученные с помощью метода проточной цитофлуориметрии, а на рисунке 13 (Б и Е) представлены результаты, полученные с помощью высокоэффективного скрининга на автоматизированном конфокальном микроскопе Yokogawa CV7000 Imaging. На рисунке 13 (В и Ж) приведены результаты, полученные с помощью FISH. По результатам сравнения данных, полученных с помощью 3 методов, мы можем заключить, что наиболее достоверный эффект на развитие хромосомной нестабильности показало подавление экспрессии генов *SKA3* и *OIP5*, что подтверждается в нашей ранее опубликованной работе с применением другой тест-системы (Kim et al., 2016a). Результаты данного эксперимента позволяют использовать данные гены в качестве положительного контроля для проведения дальнейшего скрининга.





**Рисунок 13** – Подбор положительного контроля для проведения скрининга генов-кандидатов. А – измерение соотношения GFP-положительных и GFP-отрицательных клеток в популяции HT1080 HAC/dGFP через 72 ч после нокдауна контрольных генов (метод проточной цитофлуориметрии); Б – измерение соотношения GFP-положительных и GFP-отрицательных клеток в популяции HT1080 HAC/dGFP через 72 ч после нокдауна контрольных генов (метод конфокальной микроскопии); В – измерение соотношения HAC-положительных и HAC-отрицательных клеток в популяции HT1080 HAC/dGFP через 72 ч после нокдауна контрольных генов методом флуоресцентной гибридизации *in situ* FISH; Г – формула расчета вероятности потери искусственной хромосомы на одно клеточное деление (вывод формулы в материалах и методах); Вероятность потери искусственной хромосомы в клетках HT1080 HAC/dGFP через 72 ч после нокдауна контрольных генов методом проточной цитофлуориметрии (Д); конфокальной микроскопии (Е); гибридизации *in situ* (Ж); Красная звездочка указывает на статистическую значимость ( $p < 0,005$ ) по сравнению с отрицательным контролем (неспецифическая миРНК).

Чтобы сформировать список генов для проведения скрининга, был проведен поиск генов, которые соответствуют двум критериям, сформулированным нами для выполнения данной работы:

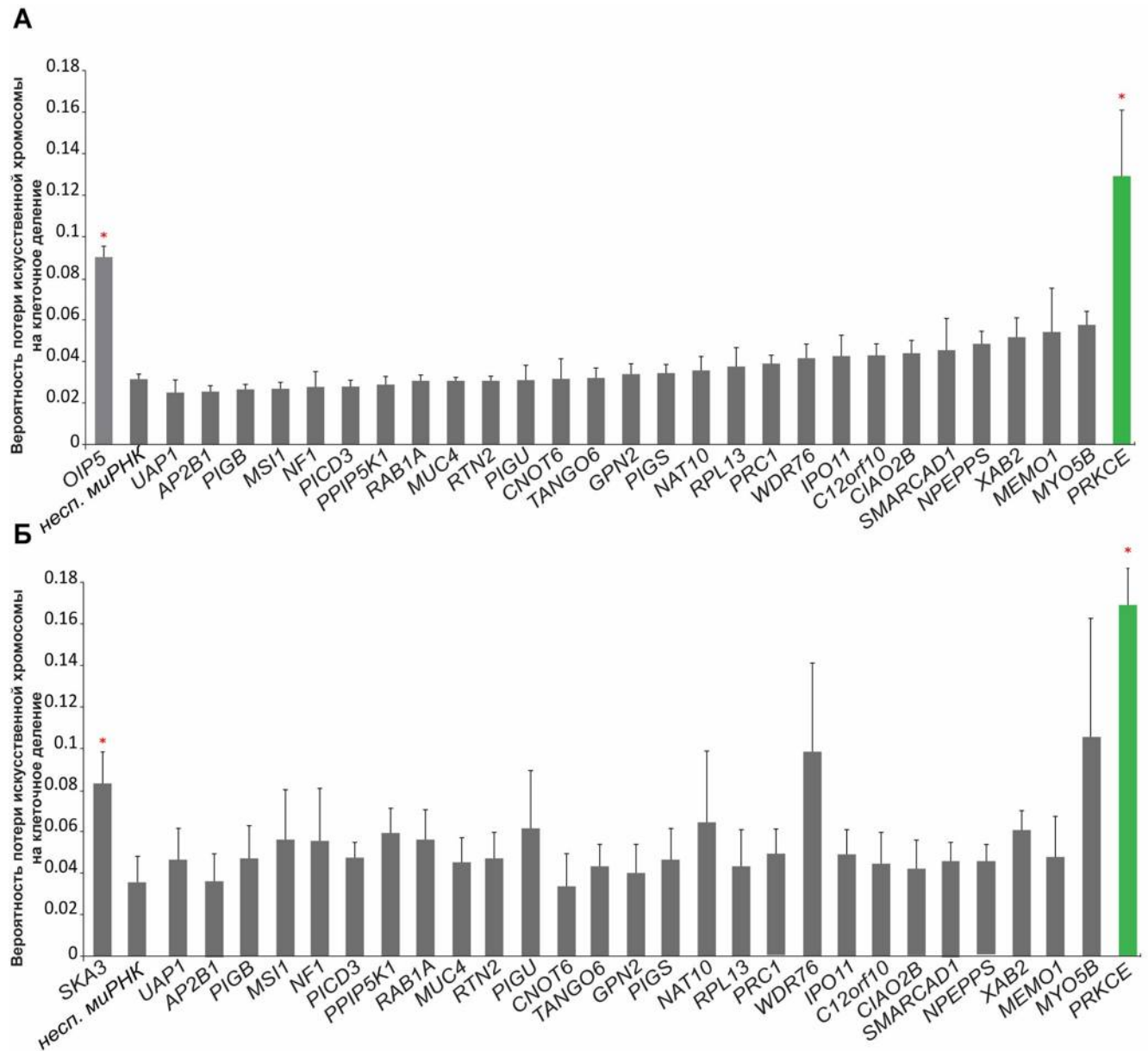
1. Ген-кандидат – это ортолог гена дрожжей *S. cerevisiae* или *S. pombe*, для которого есть хотя бы одно упоминание в литературе о его вовлеченности в процессы сегрегации хромосом или репликации ДНК у дрожжей.
2. Не должно быть упоминаний в литературе, что ген-кандидат играет роль в сегрегации или репликации хромосом в клетках человека.

На рисунке 14А показаны результаты анализа 28 генов-кандидатов из числа ортологов в человеческом геноме (Таблица 13). По результатам можно сказать, что наиболее сильный и статистически значимый эффект на формирование хромосомной нестабильности оказывает подавление экспрессии гена протеинкиназы С эпсилон (*PRKCE*) (выделена зеленым). Рисунок 14Б демонстрирует результаты анализа тех же 28 генов методом высокоэффективного скрининга на системе Yokogawa CV7000 Imaging. Небольшие различия в данных проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии можно объяснить разностью объемов выборок. Это связано с тем, что метод проточной цитофлуориметрии позволяет учитывать нескольких десятков тысяч клеток, а при проведении высокоэффективного скрининга количество клеток ограничено площадью лунки планшета и составляет не больше 10000 на лунку. Тем не менее, по результатам скрининга, проведенного с применением 2 методов, можно однозначно говорить о зафиксированном эффекте на потерю флуоресценции GFP, что может быть объяснено возникновением хромосомной нестабильности, вызванной подавлением экспрессии гена протеинкиназы С эпсилон.

Результаты скрининга дрожжевых ортологов и тот факт, что антисмысловые РНК против кодирующей последовательности протеинкиназы С эпсилон показали наибольший эффект на развитие хромосомной нестабильности, доказывают чувствительность данной системы для проведения скрининга по выявлению новых генов хромосомной нестабильности. Роль протеинкиназы С эпсилон при формировании структур кинетохора была описана в работе Пайка и Паркера (Pike,



Parker, 2016), что служит подтверждением работоспособности созданной тест-системы.

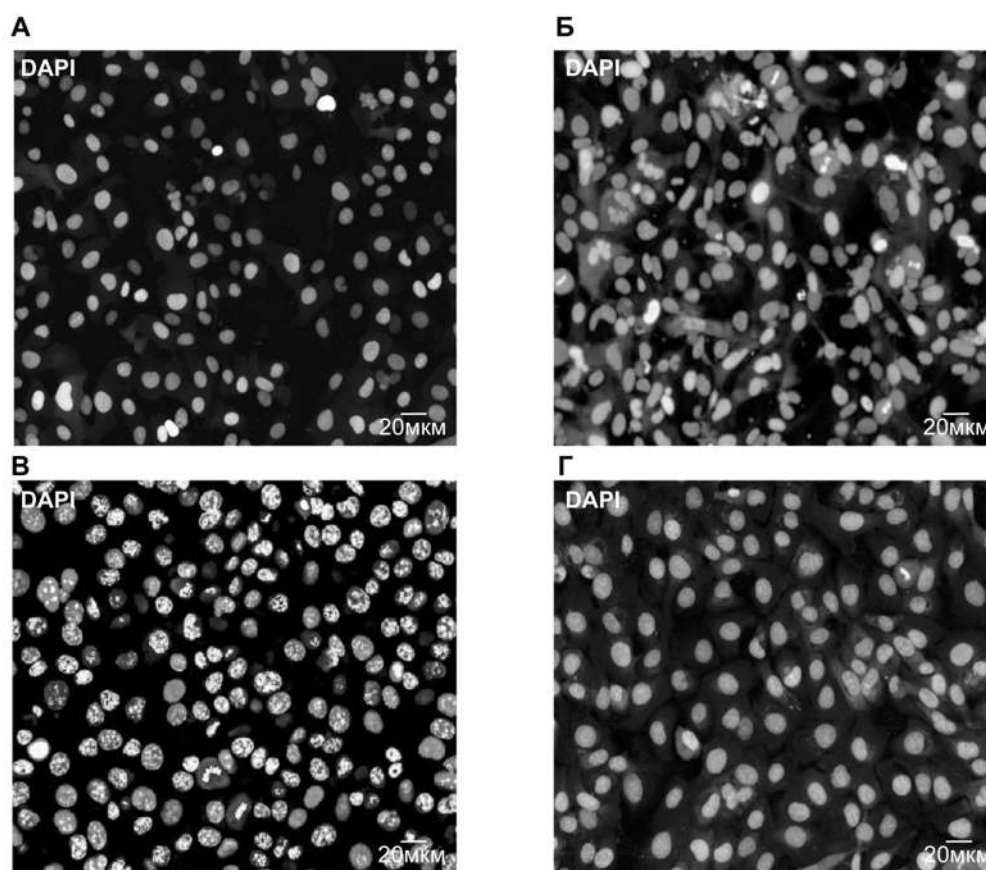


**Рисунок 14.** Результаты скрининга генов-кандидатов, полученные при помощи метода проточной цитофлуориметрии и конфокальной микроскопии с системой автоматизированного имиджинга. А – вероятности потери искусственной хромосомы в клетках HT1080 HAC/dGFP через 72 ч после нокдауна генов-кандидатов методом проточной цитофлуориметрии; Б – вероятности потери искусственной хромосомы в клетках HT1080 HAC/dGFP через 72 ч после нокдауна генов-кандидатов методом высокопроизводительной микроскопии. Красная звездочка указывает на статистическую значимость ( $p < 0,005$ ) по сравнению с отрицательным контролем (неспецифическая миРНК).

В данной работе мы применили клеточную линию HT1080 HAc/dGFP для проведения высокопроизводительного скрининга генов на предмет их вовлеченности в процесс митотической трансмиссии хромосом, продукты которых стали мишенями для библиотеки антисмысловых РНК. В качестве инструмента для скрининга была использована библиотека интерферирующих РНК против мРНК генов протеинкиназ человека.

Для проведения скрининга был применен подход реверс-трансфекции, который предполагает использование заранее подготовленного 384-луночного планшета с лиофильно-высушенными на дне лунок образцами миРНК против мРНК скринируемых генов, данный подход позволяет выполнить трансфекцию большого количества миРНК практически одновременно, что улучшает чистоту эксперимента и позволяет проводить массовый скрининг.

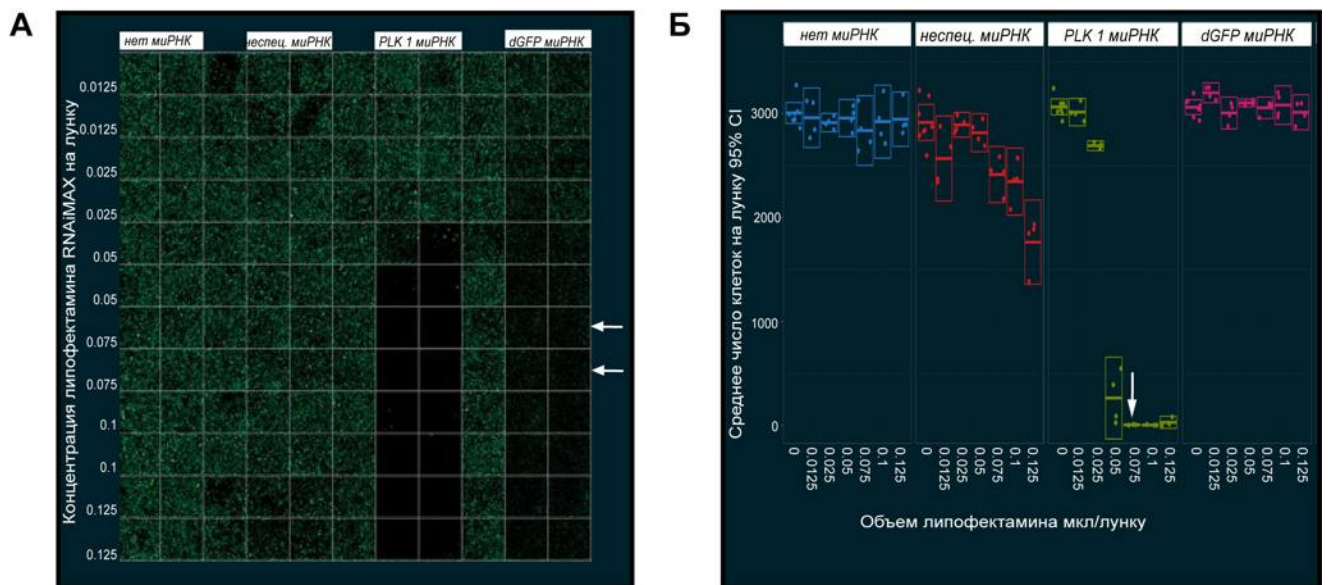
На первом этапе работ была выполнена оптимизация протокола культивирования клеток и трансфекции миРНК в формате 384-луночных планшетов для получения изображений, на которых можно надежно производить автоматизированный подсчет количества клеток, визуализируя их ядра. Концентрацию клеток подбирали исходя из продолжительности эксперимента, так, чтобы конfluence к моменту фиксации клеток не превышала 95%. Только при соблюдении данного условия возможна программная обработка снимков и подсчета GFP+ и GFP- клеток. Примеры снимков с различной конfluence, достигнутой через 96 ч с момента посадки клеток представлены на рисунке 15. По результатам визуального анализа была выбрана концентрация 300 клеток на см<sup>2</sup> (Рисунок 15В). На снимках, полученных при других значениях плотности клеток в культуре: 150 клеток на мм<sup>2</sup> (Рисунок 15А) и 250 клеток на см<sup>2</sup> (Рисунок 15Г) количество клеток мало и тотальный набор событий, использованных для подсчета, не обеспечивает максимально возможную выборку для статистического анализа. В случае конfluence в 450 клеток на мм<sup>2</sup> (Рисунок 15Б), отдельные ядра клеток неразличимы, и поэтому корректный программный анализ изображений невозможен.



**Рисунок 15** – Подбор концентрации клеток HT1080 HAC/dGFP для проведения скрининга библиотеки миРНК. Ядра клеток окрашены DAPI. Представлены конфокальные снимки клеток (оптический срез толщиной 20 мкм) через 96 ч культивирования при плотности посадки 150 клеток на мм<sup>2</sup> (А), 450 клеток на мм<sup>2</sup> (Б), 350 клеток на мм<sup>2</sup> (В) и 250 клеток на мм<sup>2</sup> (Г).

Объем липофектамина для проведения трансфекции также подбирали специально для клеточной линии HT1080 HAC/dGFP, исходя из токсичности данного трансфецирующего реагента и эффективности трансфекции (Рисунок 16). Эксперимент по подбору количества трансфецирующего реагента на лунку 384-луночного планшета предполагал использование 3 миРНК: siNEG – это пул неспецифических миРНК, siGFP – миРНК против GFP, siPLK1 – это миРНК против серин/трионин протеинкиназы, а также анализ клеток без обработки миРНК. На графике (Рисунок 16) видно, что в зависимости от концентрации липофектамина происходит изменение жизнеспособности клеток, исходя из чего концентрация подбиралась так, чтобы количество клеток, подвергнутых обработке

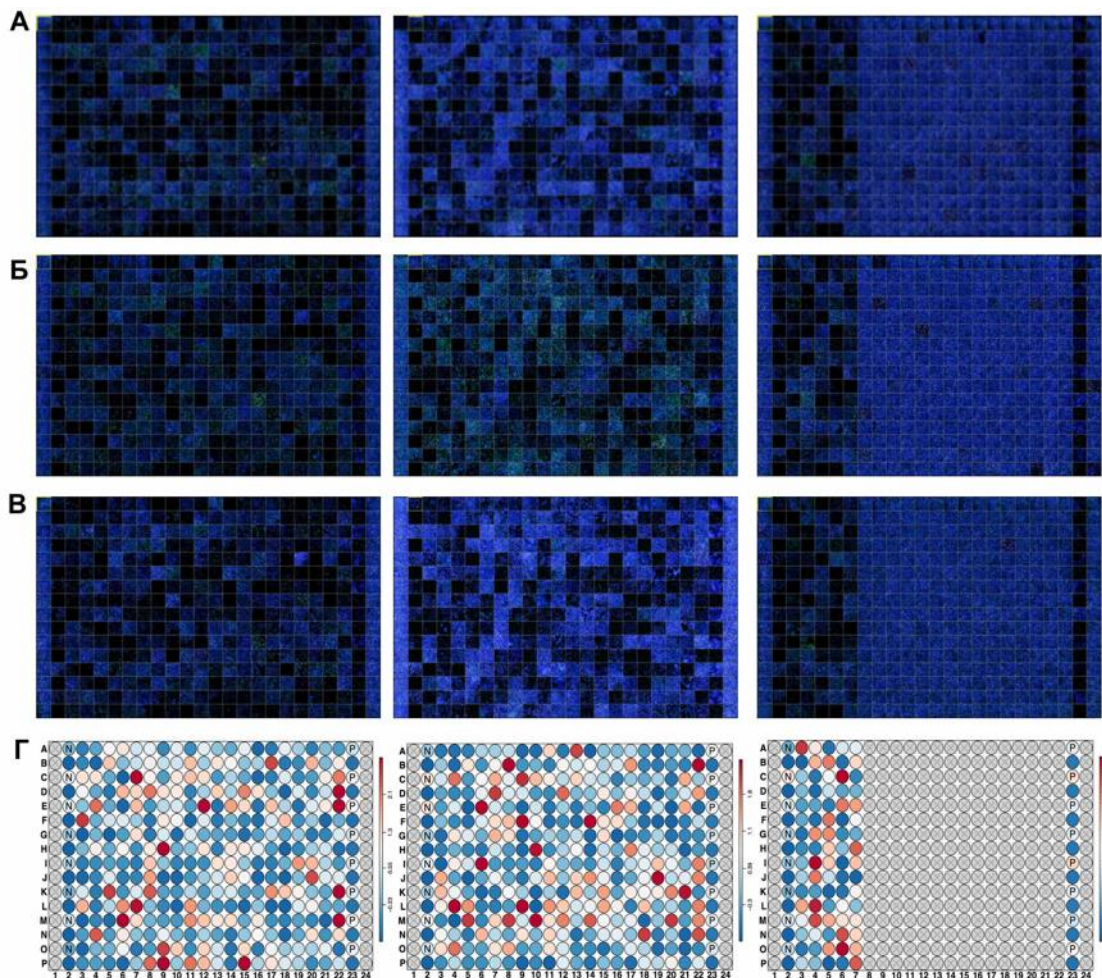
липофектамином, максимально совпадало с количеством клеток в контроле без обработки липофектамином, чем достигалось минимизация токсического эффекта трансфекции. При этом положительный контроль с использованием летальной миРНК против PLK1 должен показывать максимальную цитотоксичность после трансфекции, что является показателем эффективности трансфекции. Дополнительный контроль на эффективность трансфекции – это миРНК против GFP, в данном случае эффективность трансфекции пропорциональна количеству клеток, потерявших флуоресценцию после трансфекции. Исходя из проведенного эксперимента, нами был выбран объем 0,05 мкл липофектамина на лунку (Рисунок 16).



**Рисунок 16** – Оптимизация условий трансфекции миРНК клеточной линии HT1080 НАС/dGFP на 384-луночном планшете для проведения скрининга библиотеки миРНК. А – репрезентативное изображение объединенных конфокальных изображений при 10-кратном увеличении. Каждый квадрат представляет собой комбинацию из девяти независимых полей зрения. Клетки HT1080, содержащие НАС/dGFP, трансфицированные миРНК против PLK1 и dGFP на 384-луночном планшете с различными концентрациями липофектамина. Съемка GFP-положительных клеток произведена через 72 ч после трансфекции; Б – Определение оптимальной концентрации липофектамина на основе жизнеспособности клеток после трансфекции PLK1 и потери сигнала GFP. Столбики ошибок представляют стандартное отклонение при трех независимых повторах. Объем липофектамина составил 0,075 мкл на лунку, этот объем был определен как оптимальный для скрининга библиотеки миРНК.

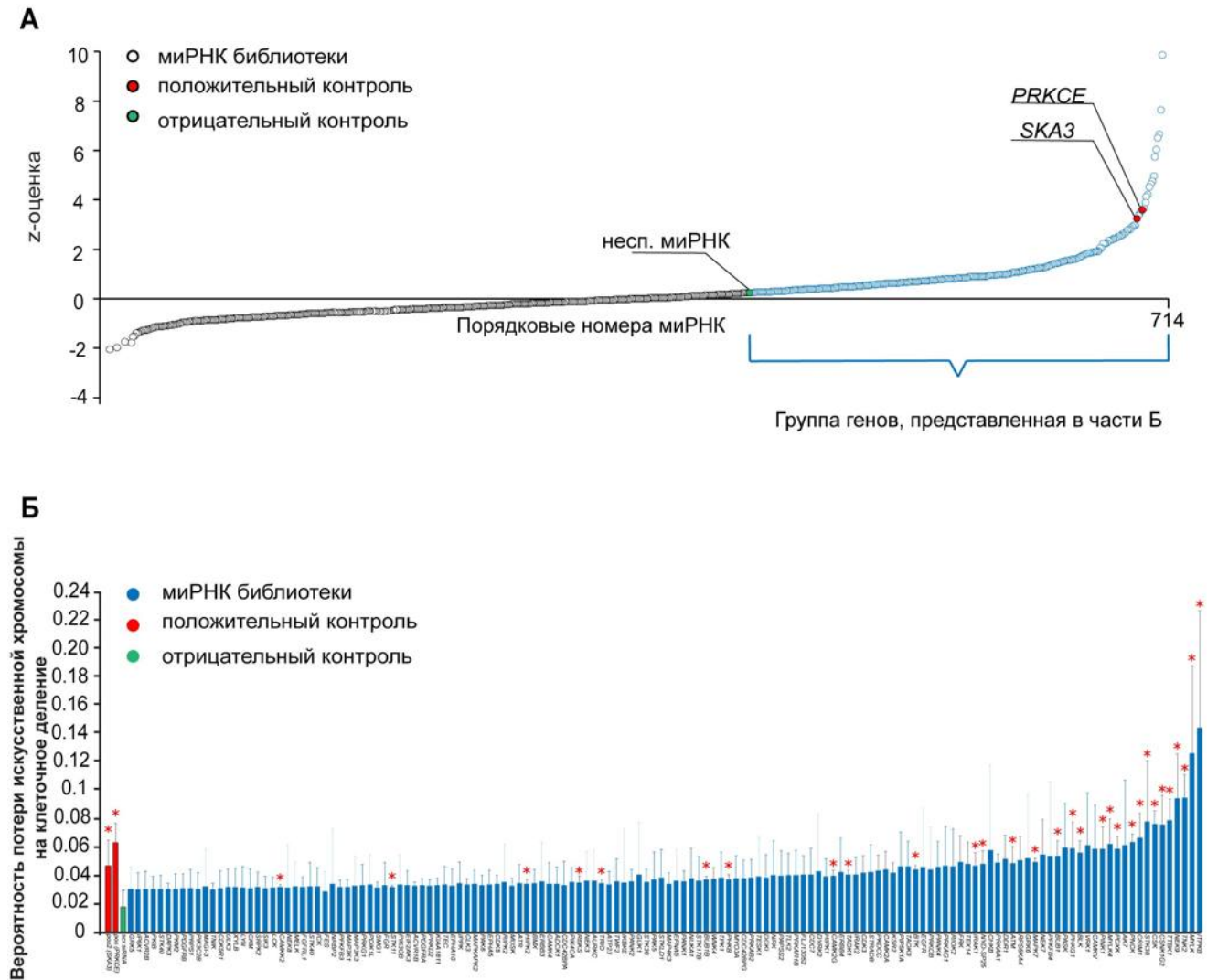


Используя оптимизированный протокол трансфекции библиотеки миРНК, мы провели скрининг библиотеки миРНК против транскриптов генов протеинкиназ человека. Результаты скрининга приведены на рисунках 17 и 18, по результатам подсчета соотношения GFP+ и GFP- клеток, а также дальнейшего расчета вероятности потери искусственной хромосомы на одно клеточное деление нами было выявлено 35 возможных кандидатов среди генов данной библиотеки, показавших статистически достоверные различия по отношению к контролю (Рисунок 18).



**Рисунок 17** – Результаты скрининга библиотеки миРНК.

А, Б, В – репрезентативное изображения конфокальных снимков 384-луночных планшетов в каналах флуоресценции DAPI и GFP, в 3 повторах; Г – тепловая карта (англ. heatmap) результатов скрининга 3 повторов библиотеки миРНК, отражает количество GFP-позитивных клеток. Цвета лунок обозначают интенсивность флуоресценции, от синего к красному уровень флуоресценции уменьшается.



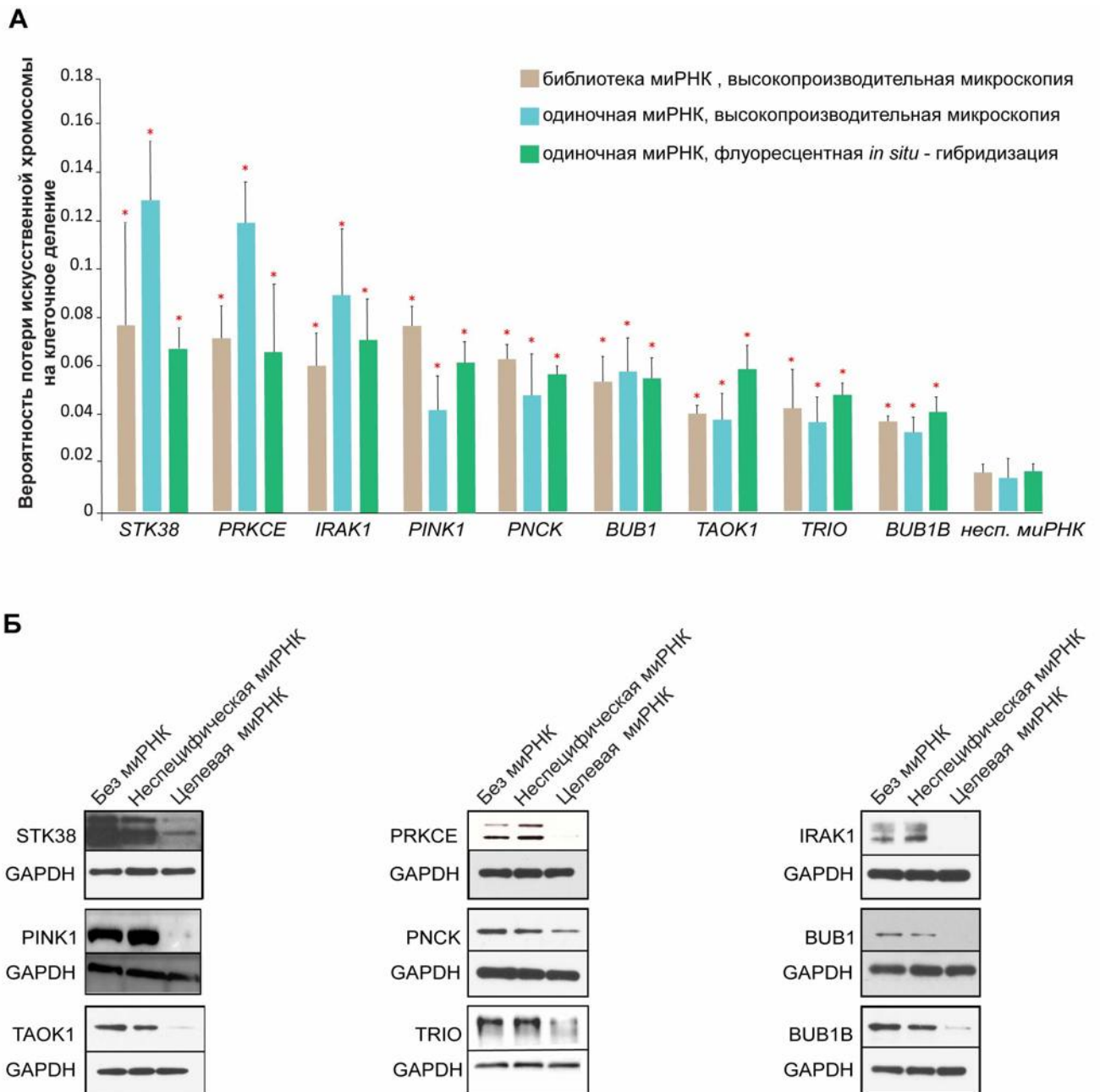
**Рисунок 18** – Результаты высокоэффективного скрининга библиотеки протеинкиназ с помощью конфокальной микроскопии. А – средняя интенсивность флуоресценции GFP в лунках 384-луночного планшета через 72 ч после нокдауна с помощью библиотеки миРНК против транскриптов генов протеинкиназ; Б – вероятность потери искусственной хромосомы на клеточное деление через 72 ч после нокдауна генов с помощью библиотеки миРНК; Красная звездочка указывает на статистическую значимость ( $p < 0,005$ ) по сравнению с отрицательным контролем (неспецифические миРНК).

Для подтверждения результатов, полученных при высокопроизводительном скрининге библиотеки миРНК, мы использовали трансфекцию дополнительными миРНК, подобранными на независимые участки мРНК 35 генов-кандидатов.

Данный подход был применен, чтобы избежать неспецифического воздействия миРНК на нецелевые транскрипты. На рисунке 19 представлены 8 генов-кандидатов, результаты нокдауна которых приводят к возникновению хромосомной нестабильности. Для каждого из 8 генов был выполнен иммуноблоттинг, который позволил подтвердить отсутствие белкового продукта подавляемого гена в клетках, трансфецированных миРНК (Рисунок 19Б).

Кроме того, на рисунке 19 представлен результат FISH-анализа – непосредственный подсчет метафазных пластин, имеющих и не имеющих сигнал от гибридизационной пробы PNA на последовательности *tetO* в составе искусственной хромосомы (Рисунок 19А). В данном эксперименте мы выполнили сравнение количества метафаз, не имеющих сигнала PNA-FITC в положительном и отрицательном контролях и в эксперименте, выполненном аналогично экспериментам, проводимым во время скрининга. Данные об уровне потери искусственной хромосомы были дополнительно подтверждены с помощью высокопроизводительной конфокальной микроскопии.

Таким образом, с помощью миРНК-опосредованного нокдауна генов-кандидатов, подтвержденного иммуноблоттингом и FISH-гибридизацией, мы можем сказать, что нокдаун генов: *IRAK*, *BUB1*, *BUB1B*, *PINK1*, *TAOK1*, *STK38*, *TRIO*, *PNCK*, *PRKCE* вызывает хромосомную нестабильность.

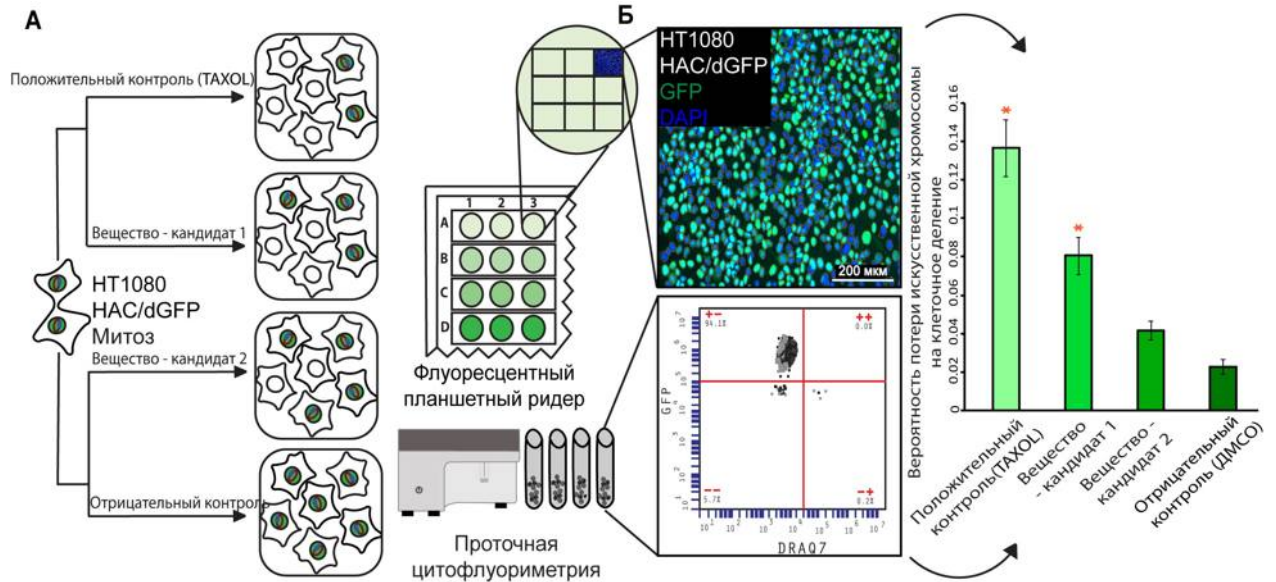


**Рисунок 19** – Подтверждение результатов скрининга с помощью методов флуоресцентной гибридизации *in situ* и иммуноблотинга. А – вероятность потери искусственной хромосомы на одно клеточного деления после нокдауна генов-кандидатов миРНК из библиотеки и дополнительными миРНК; подтверждение полученного результата с помощью гибридизации *in situ* и высокопроизводительной конфокальной микроскопии; Б – иммуноблотинг через 72 ч после нокдауна-генов кандидатов; Красная звездочка указывает на статистическую значимость ( $p < 0,005$ ) по сравнению с отрицательным контролем (неспецифическая миРНК).



### **3.3. Аprobация созданной тест-системы для скрининга лекарственных кандидатов, вызывающих хромосомную нестабильность**

Для проведения апробации клеточной линии HT1080 HAc/dGFP для скрининга препаратов-кандидатов, способных влиять на уровень хромосомной нестабильности, была проведена серия экспериментов с применением библиотеки экстрактов из объектов живой природы. Для этого был применен принцип, аналогичный тому, что был использован для идентификации генов хромосомной нестабильности (Рисунок 20). Вещества-кандидаты, вызывающие хромосомную нестабильность, приводят к потере HAc, вследствие чего происходит потеря флуоресценции утратившими HAc клетками. В данном случае детекцию хромосомной нестабильности проводили с использованием флуоресцентного планшетного ридера и проточной цитофлуориметрии (Рисунок 20Б). В качестве положительного контроля был использован ингибитор деполимеризации микротрубочек – таксол в концентрации 10 нМ, что соответствует значению IC<sub>50</sub> для клеток HT1080 (Lee et al., 2013) (Рисунок 20). В клетках, обработанных таксолом, происходит образование микроядер и возникает хромосомная нестабильность (Dumontet, 2010). Ранее таксол уже применялся в качестве положительного контроля для определения уровня хромосомной нестабильности в системах с HAc (Lee et al., 2013). Для проведения скрининга все высушенные экстракты растворяли в диметилсульфоксиде (ДМСО) для получения маточных растворов, разбавляемых средой для культивирования до конечной концентрации, при которой доля ДМСО обеспечивает незначительную концентрацию, нетоксичную для клеток (0,2%). В качестве отрицательного контроля использовали 0,2% ДМСО в питательной среде.



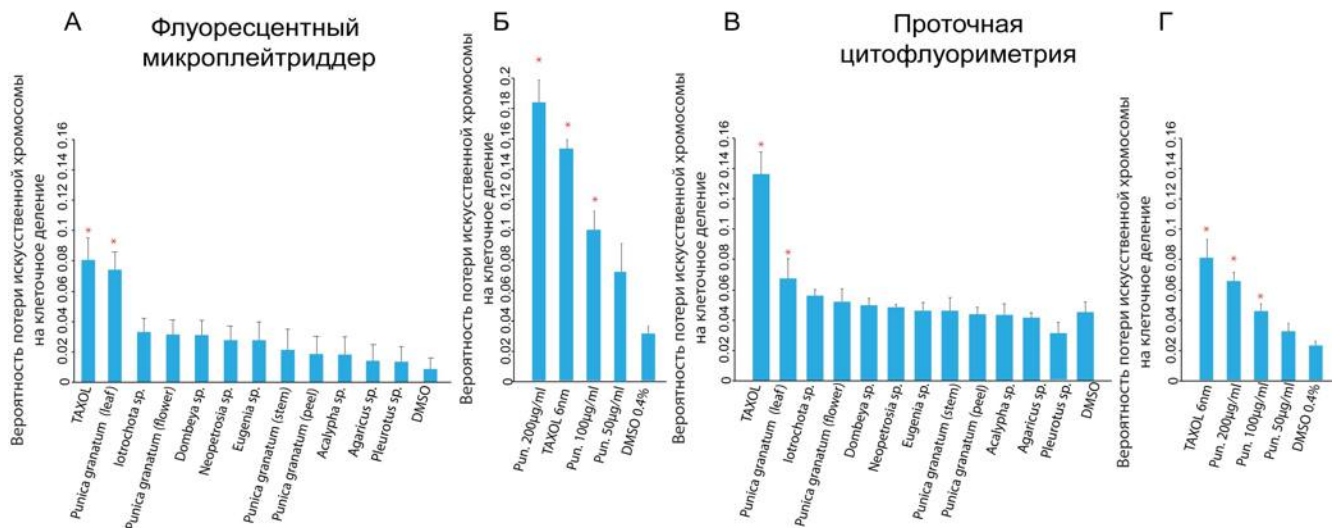
**Рисунок 20** – Схема эксперимента для поиска лекарственных кандидатов, вызывающих хромосомную нестабильность, с помощью клеточной линии HT1080 HAC/dGFP. А – организация контрольных и экспериментальных точек скрининга лекарственных кандидатов; Б – визуализация потери флуоресценции с использованием флуоресцентного планшетного ридера с функцией имиджинга и проточной цитофлуориметрии, последующая интерпретация данных в виде расчета вероятности потери HAC на одно клеточное деление.

В соответствии с описанными выше принципами нами был проведен поиск лекарственных кандидатов, вызывающих хромосомную нестабильность и дана ее количественная оценка (Рисунок 21). В качестве препаратов для скрининга мы использовали уникальную коллекцию экстрактов с потенциальными противораковыми свойствами (Таблица 14). Экстракты были выделены из различных представителей биоты: *Punica granatum*; *Acalypha* sp.; *Dombeya* sp.; *Eugenia* sp.; *Agaricus* sp.; *Pleurotus* sp.; *Lotrochota* sp.; *Neopetrosia* sp. Данная коллекция экстрактов была любезно предоставлена Александром Каганским, заведующим Центра геномной и регенеративной медицины Школы биомедицины Дальневосточного федерального университета. Критерием выбора вида были данные о противоопухолевом действии экстрактов из этих организмов (Таблица 14).

**Таблица 14** – Образцы экстрактов, используемые для поиска лекарственных препаратов-кандидатов, обладающих противоопухолевым эффектом, опосредованным индукцией хромосомной нестабильности.

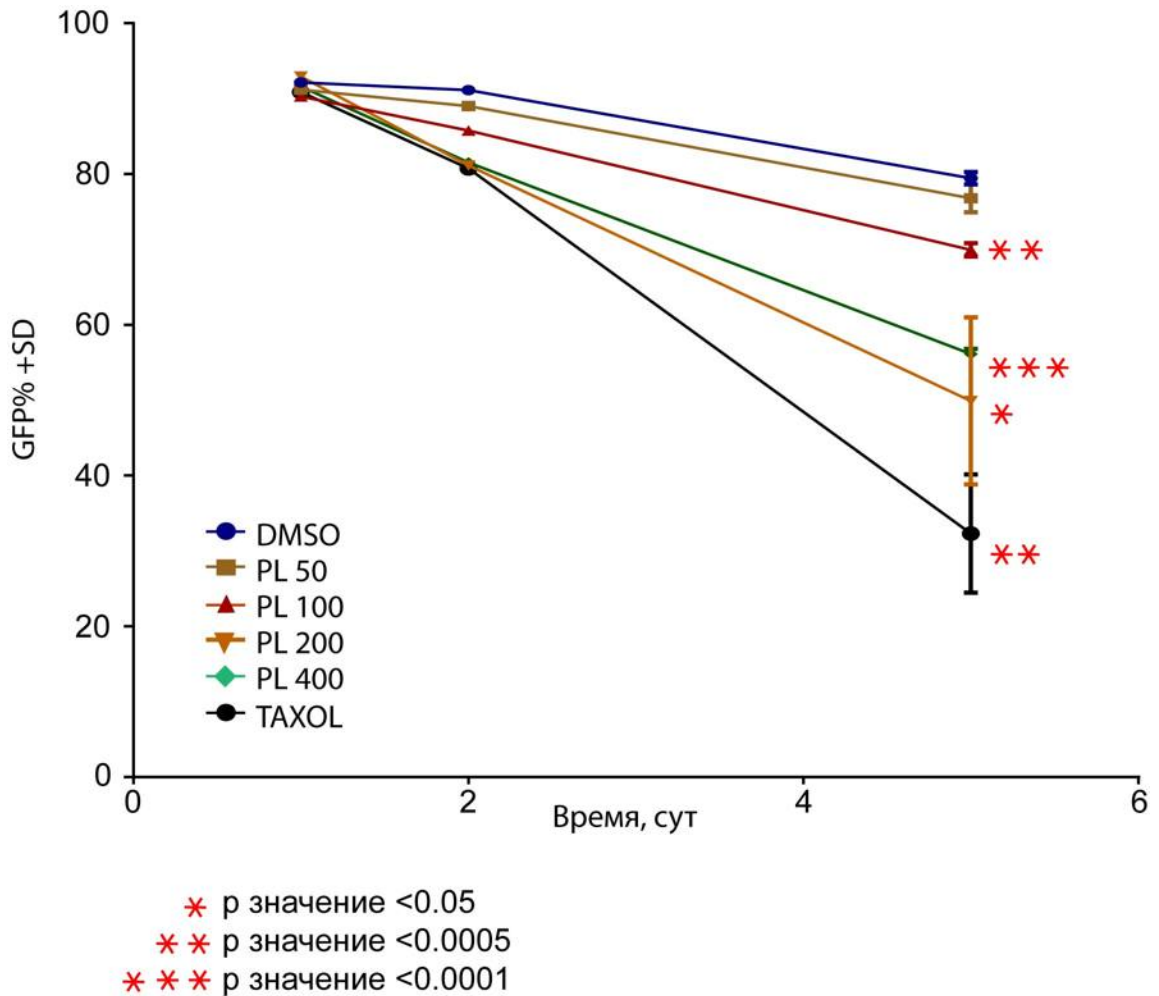
	<b>Организм</b>	<b>Способ экстракции</b>	<b>Возможные действующие вещества</b>	<b>Ссылка</b>
1	<i>Punica granatum</i> (Листья)	Гомогенизирование в 70% метаноле	Полифенолы	Kiraz et al., 2016 Shirode et al., 2014
2	<i>Iotrochota</i> sp.	Гомогенизирование в этилацетате	Алкалоиды, полифенолы, пептиды, макролиды.	Mauricio et al., 2016 Calcabrini et al., 2017
3	<i>Punica granatum</i> (Цветы)	Гомогенизирование в 70% метаноле	Полифенолы	Kiraz et al., 2016 Shirode et al., 2014
4	<i>Dombeya</i> sp. (Листья)	Гомогенизирование в 70% метаноле	Полифенолы	Rummun et al., 2019
5	<i>Neopetrosia</i> sp.	Гомогенизирование в этилацетате	Терпеноиды, стероиды, алкалоиды, полифенолы, пептиды, макролиды, воски, пигменты.	Abdillah et al., 2013 Liang et al., 2015
	<i>Eugenia</i> sp. (Листья)	Гомогенизирование в 70% метаноле	Полифенолы	Nunez et al., 2018 Charepalli et al., 2016
6	<i>Punica granatum</i> (стебель)	Гомогенизирование в 70% метаноле	Полифенолы	Kiraz et al., 2016 Shirode et al., 2014
7	<i>Punica granatum</i> (Плоды)	Гомогенизирование в 70% метаноле	Полифенолы	Kiraz et al., 2016 Shirode AB et al., 2014
8	<i>Acalypha</i> sp.	Гомогенизирование в 70% метаноле	Полифенолы	Chekuri, 2017 Madlener et al., 2009
9	<i>Agaricus</i> sp.	Гомогенизирование в 70% метаноле	Белки, углеводы, натрий, калий, фосфор, фенольные кислоты, эрготионеин	Yu et al., 2009 Ohno et al., 2001
10	<i>Pleurotus</i> sp. CC114	Гомогенизирование в 70% метаноле	Белки, углеводы, натрий, калий, фосфор, фенольные кислоты, эрготионеин	Jedinak et al., 2008 Wu et al., 2011

Для проведения скрининга клетки линии HT1080 HAC/dGFP культивировали в присутствии различных концентраций экстрактов (Рисунок 21). Мы наблюдали дозозависимый эффект концентраций 50, 100 и 200 мкг/мл экстрактов из листьев *P. granatum* на развитие хромосомной нестабильности (Рисунок 21А, Б). Для подтверждения данных, полученных с помощью флуоресцентного планшетного ридера с функцией имиджинга, был использован метод проточной цитофлуориметрии (21В, Г). Результаты, полученные с применением обоих методов, показали, что наибольший уровень хромосомной нестабильности наблюдался в концентрациях 100 и 200 мкг/мл через 24 ч действия препарата.



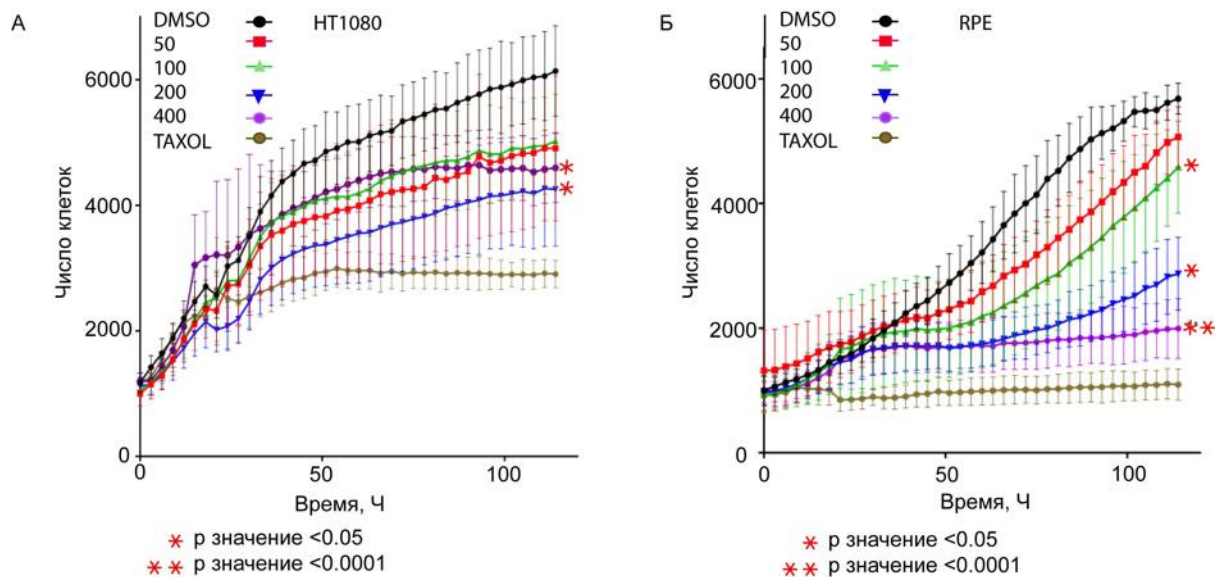
**Рисунок 21** – Результаты скрининга фармакологических кандидатов. А – вероятность потери искусственной хромосомы человека на одно клеточное деление под действием коллекции природных экстрактов (флуоресцентный планшетный ридер); Б – вероятность потери искусственной хромосомы человека на одно клеточное деление под действием различных концентраций экстракта из листьев *P. granatum* (флуоресцентный планшетный ридер); В – вероятность потери искусственной хромосомы человека на одно клеточное деление под действием коллекции природных экстрактов (проточная цитофлуориметрия); Г – вероятность потери искусственной хромосомы человека на одно клеточное деление под действием различных концентраций экстракта из листьев *P. granatum* (проточная цитофлуориметрия).

Динамика потери флуоресцентного сигнала клетками HT1080 HAc/dGFP демонстрирует дозозависимое увеличение накопления GFP отрицательных клеток после обработки экстрактами из листьев *P. granatum* (Рисунок 22). Данный опыт дополнительно подтверждает, что экстракты из листьев *P. granatum* вызывают хромосомную нестабильность.



**Рисунок 22** – Динамика потери GFP клетками HT1080 HAc/dGFP под действием экстрактов из листьев *P. granatum*. Эксперимент выполнен с помощью метода проточной цитофлуориметрии.

Для выявления возможных цитостатических эффектов от экстрактов из листьев *P. granatum* был выполнен опыт с использованием высокопроизводительной прижизненной микроскопии и отслеживания изменения скорости пролиферации клеток с помощью цейтраферной съемки. Для этого на клетках линии HT1080 HAc/dGFP и иммортализованной клеточной линии пигментированного эпителия RPE1 исследовали влияние различных концентраций (50, 100 и 200 мкг/мл) экстракта листьев *P. granatum*. Была выявлена дозозависимая антипролиферативная активность в отношении клеток HT1080 и RPE1 через 24 ч инкубации при регистрации поведения клеток в течение 5 сут (Рисунок 23).

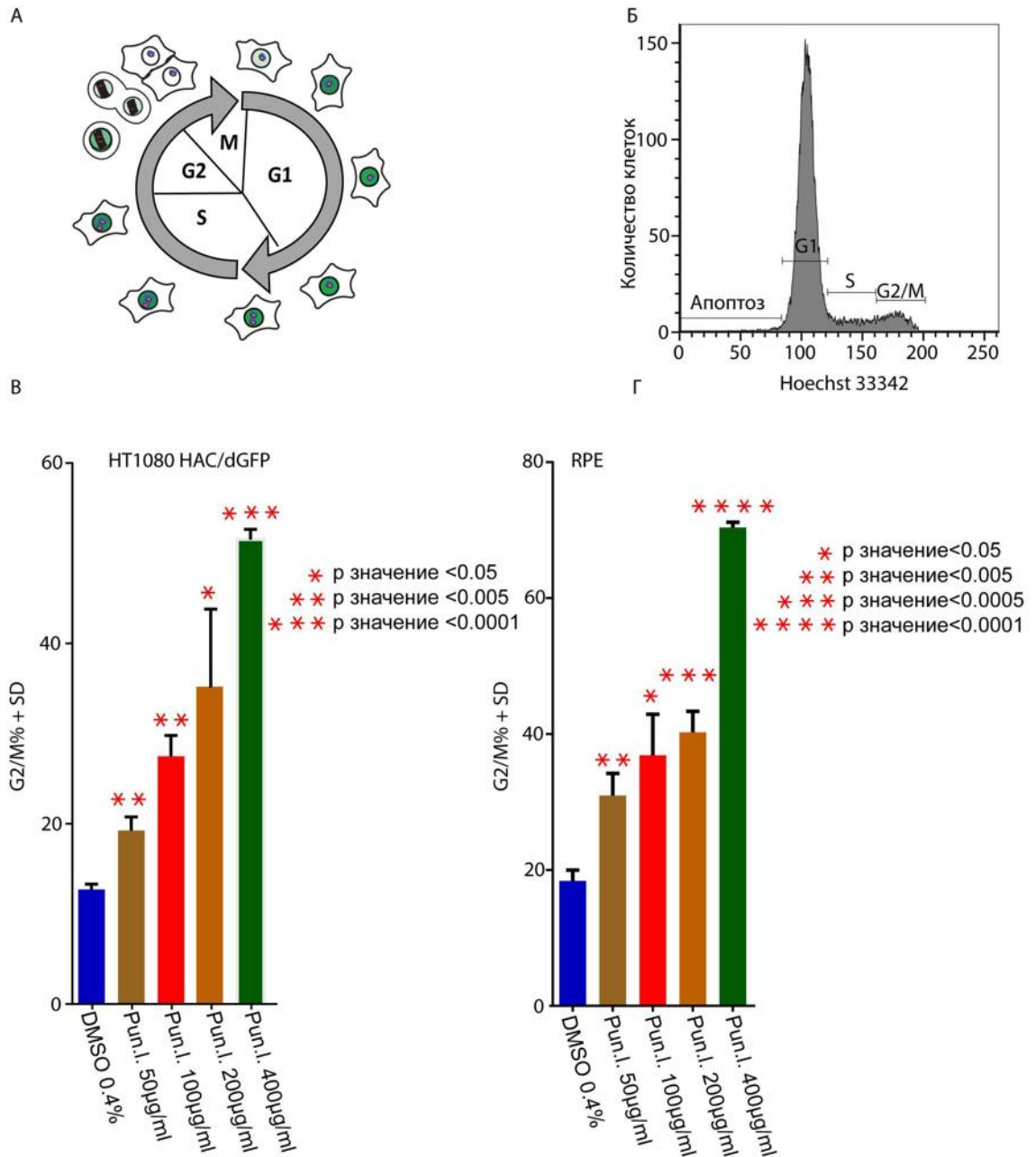


**Рисунок 23** – Динамика численности клеток HT1080 HAc/dGFP и RPE1 после воздействия различных концентраций (50, 100, 200, 400 мкг/мл) экстракта листьев *P. Granatum*. А – клеточная линия HT1080; Б – клеточная линия RPE1.

Для установления возможных причин замедления клеточной пролиферации под действием тестируемого экстракта был выполнен анализ клеточного цикла линий HT1080 HAc/dGFP и RPE1 после обработки различными концентрациями экстракта листьев *P. granatum* (Рисунок 24). Данные проточной цитофлуориметрии

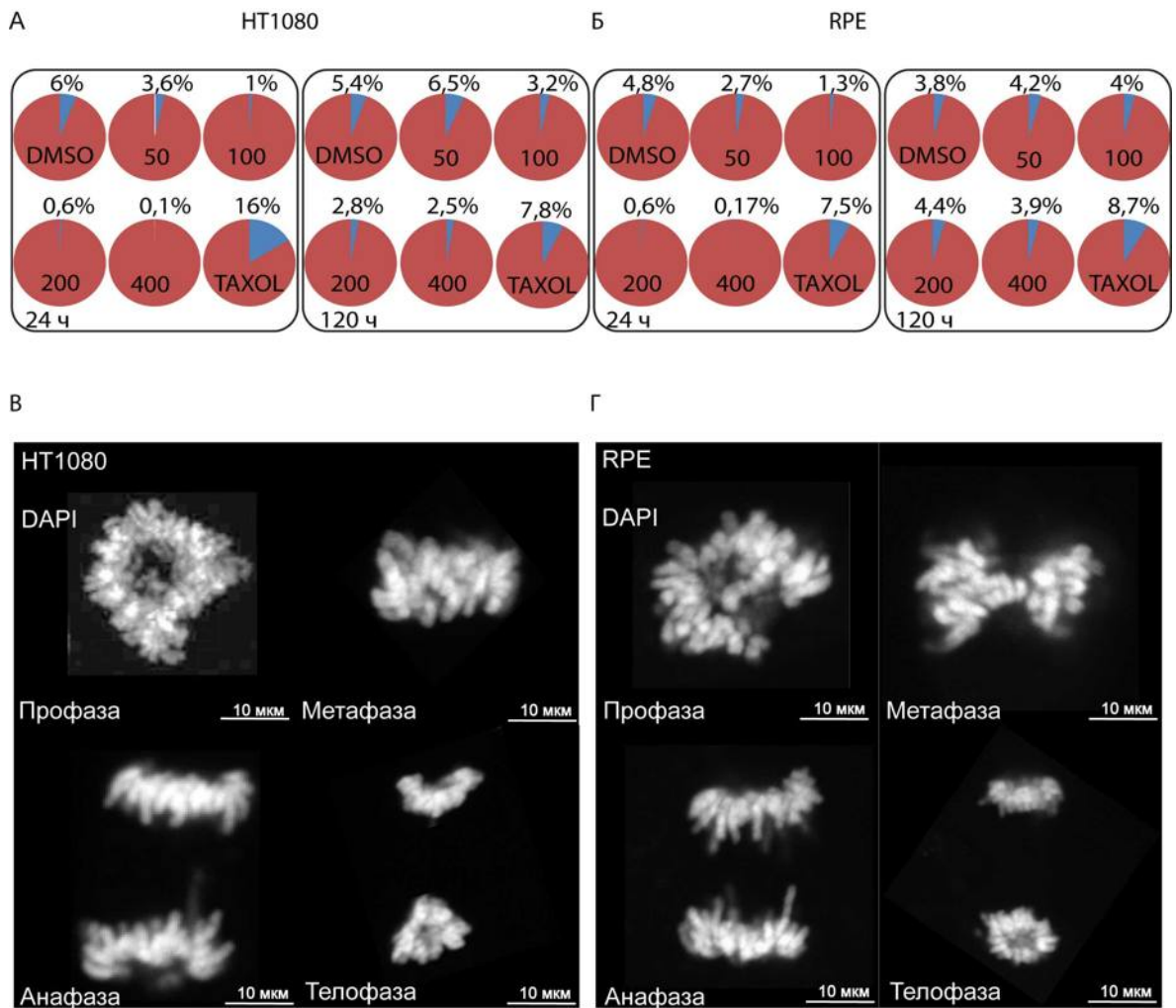


с использованием красителя Hoeschst 33342 показали, что под действием экстрактов из листьев *P. granatum* происходит блок клеточного цикла в фазах G2/M.



**Рисунок 24** – Анализ клеточного цикла с помощью проточной цитофлуориметрии и использования Hoeschst 33342. А – модель клеточного цикла и возможные причины его блокировки в фазе G2/M; Б – пример диаграммы проточной цитофлуориметрии клеток, окрашенных Hoeschst 33342, и определение фаз клеточного цикла; В – доля клеток HT1080 HAC/dGFP в фазе G2/M после обработки экстрактами из листьев *P. granatum*; Г – доля клеток RPE1 в фазе G2/M после обработки экстрактами из листьев *P. granatum*.

Чтобы определить, на какой стадии клеточного цикла, G2 или M, происходит остановка клеточного цикла, был проведен анализ митотического индекса клеток RPE1 и HT1080 после обработки экстрактами в концентрациях 50, 100, 200 и 400 мкг/мл (Рисунок 25). Результаты показали, что с увеличением концентрации число митозов уменьшается (Рисунок 25). Отсюда следует, что остановка клеточного цикла происходит на стадии G2, что увеличивает вероятность того, что клеточный цикл блокируется в контрольной точке G2-митоз.



**Рисунок 25** – Доля (%) митотических клеток для клеточных линий HT1080 и RPE1 под воздействием экстракта листьев *P. granatum* в концентрациях 50, 100, 200 и 400 мкг/мл. DMSO – отрицательный контроль, TAXOL – положительный контроль. А – клеточная линия HT1080, Б – клеточная линия RPE1, В и Г – примеры нормальных стадий митоза для клеточных линий HT1080 и RPE1 соответственно.



## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

### 4.1 Сравнение тест-системы NT1080 HAC/dGFP с существующими методами идентификации хромосомной нестабильности

Для идентификации хромосомной нестабильности в настоящее время применяют подходы, основанные на классических методах цитологии, к которым относятся кариотипирование и тест на образование микроядер (Pikor, 2013). Для количественного определения частоты ошибочной сегрегации хромосом используют сочетание теста на образование микроядер (MNi) и кариотипирования методом флуоресцентной гибридизации (FISH) (Kirsch-Volders, 1997). Тем не менее, на основе этих методов не существует тест-систем для количественного измерения скорости потери хромосом (McGranahan et al., 2012). Стоит отметить, что ни один из существующих подходов не подходит для массового скрининга факторов, вызывающих хромосомную нестабильность.

Попытки создания системы детекции для массового скрининга хромосомной нестабильности начались в 2013 году. Тогда впервые был применен альтернативный подход, предполагающий оценку хромосомной нестабильности с использованием технологии искусственных хромосом человека. К настоящему моменту существует две модификации тест-системы для анализа хромосомной нестабильности на основе искусственной хромосомы tetO-HAC, (Lee et al., 2013; Kim et al., 2016). Эти системы основаны на обнаружении потери искусственных хромосом в клеточной модели человеческой фибросаркомы NT1080. Для регистрации хромосомной нестабильности в тест-системах предусмотрена флуоресцентная индикация, которая обеспечивается генетической конструкцией в составе искусственной хромосомы, реагирующей на увеличение уровня нестабильности генома. По содержанию флуоресцентных клеток в популяции можно количественно определять развитие хромосомной нестабильности. Тем не менее, ни одна из сконструированных систем не позволяет производить массовый скрининг факторов, вызывающих хромосомную нестабильность. Это связано с особенностью флуоресцентных репортеров, используемых в данных клеточных

линиях – флуоресцентные белки mChery и GFP имеют время полной естественной деградации 52 ч (Corish, 1999), что не позволяет детектировать потерю искусственной хромосомы сразу после ее потери при клеточном делении. Поскольку хромосомная нестабильность развивается в течение нескольких делений после воздействия тестируемого фактора, то время эксперимента может достигать от 10 до 14 сут, при этом медленная деградация репортера в ходе нескольких клеточных делений приводит к накоплению продуктов, отличающихся по интенсивности флуоресценции, что может обеспечить появление артефактов детекции и получение «размазанных» картин при оценке доли клеток с нарушениями трансмиссии хромосом.

В данном диссертационном исследовании разработана система, позволяющая преодолеть затруднения с длительностью работы флуоресцентного репортера, привести его под контроль клеточного цикла, дискретизировав скорость деградации репортера внутри одного цикла, что позволило надежно количественно детектировать хромосомную нестабильность в течение 72 ч. Полученный результат достигнут благодаря использованию рекомбинантных белков dGFP (destabilized green fluorescence protein) с зависимым от продолжительности клеточного цикла временем деградации. Короткое время деградации позволяет детектировать эффект от потери искусственной хромосомы непосредственно после митотического нерасхождения искусственной хромосомы, что дало возможность проведения массового скрининга библиотек миРНК, который был невозможен из-за высокой продолжительности экспериментов и отсутствия дискретизации сигнала при использовании ранних версий тест-систем (Lee et al., 2013; Kim et al., 2016b).

#### **4.2 Структурно-функциональные особенности продуктов экспрессии обнаруженных генов, вовлеченных в процесс хромосомной трансмиссии**

Протеинкиназы – это ферменты, осуществляющие фосфорилирование белков, они являются одной из наиболее распространенных групп молекул, функционирующих как мессенджеры клеточного сигналинга. Митоз и регуляция

клеточного цикла задействуют около 5% кодирующих белок генов (Stirling et al., 2011, 2012), большая часть из которых не взаимодействует с хроматином напрямую, а является частью сигнального пути, регулирующего механизмы митоза и клеточного цикла. Поэтому среди человеческих протеинкиназ огромное количество новых потенциальных детерминант хромосомной трансмиссии.

Формирование кинетохора определяется согласованной работой трех систем: структурой ДНК, хроматин-образующими белками и их эпигенетическими модификациями. Эпигенетическое маркирование обеспечивается огромным количеством молекул, формирующих эпигенетический профиль хроматина, они регулируют профилирование гистонов перицентромерных и центромерных районов, данные молекулярные детерминанты, так же, как и мессенджеры сигналинга, могут влиять на формирование кинетохора и митотическую стабильность хромосом. Нарушение в работе любой из систем может привести к неправильной сборке кинетохора и хромосомной нестабильности.

Метод детекции потери искусственной хромосомы показывает не только потенциальную роль обнаруженных генов непосредственно в процессе хромосомной трансмиссии, но и открывает возможности для поиска прочих молекулярных детерминант путем анализа интерактома обнаруженных кандидатов. До сих пор нет общей теории, описывающей формирование центромерного комплекса у различных организмов с участием всего многообразия молекулярных детерминант (Masumoto et al., 1989; Voullaire et al., 1993; Haaf, Ward, 1995; Goldberg et al., 1996; Kapoor et al., 1998; Foltz et al., 2006b; Izuta et al., 2006). Причиной отсутствия общей теории является неполный перечень охарактеризованных молекул и их взаимодействий внутри кинетохора.

В данной работе мы попытались охарактеризовать найденные гены и проанализировать их роль в процессе трансмиссии хромосом в клетках человека.

Список потенциальных факторов, нарушения в работе которых может привести к хромосомной нестабильности, очень широк, и неудивительно, что в ходе данного исследования были обнаружены гены и продукты их экспрессии, относящиеся к различным группам биологических процессов, таких как сигналинг,

различные метаболические процессы, клеточное деление и пролиферация (Рисунок 13), а так же процессы прогрессирования опухолей.

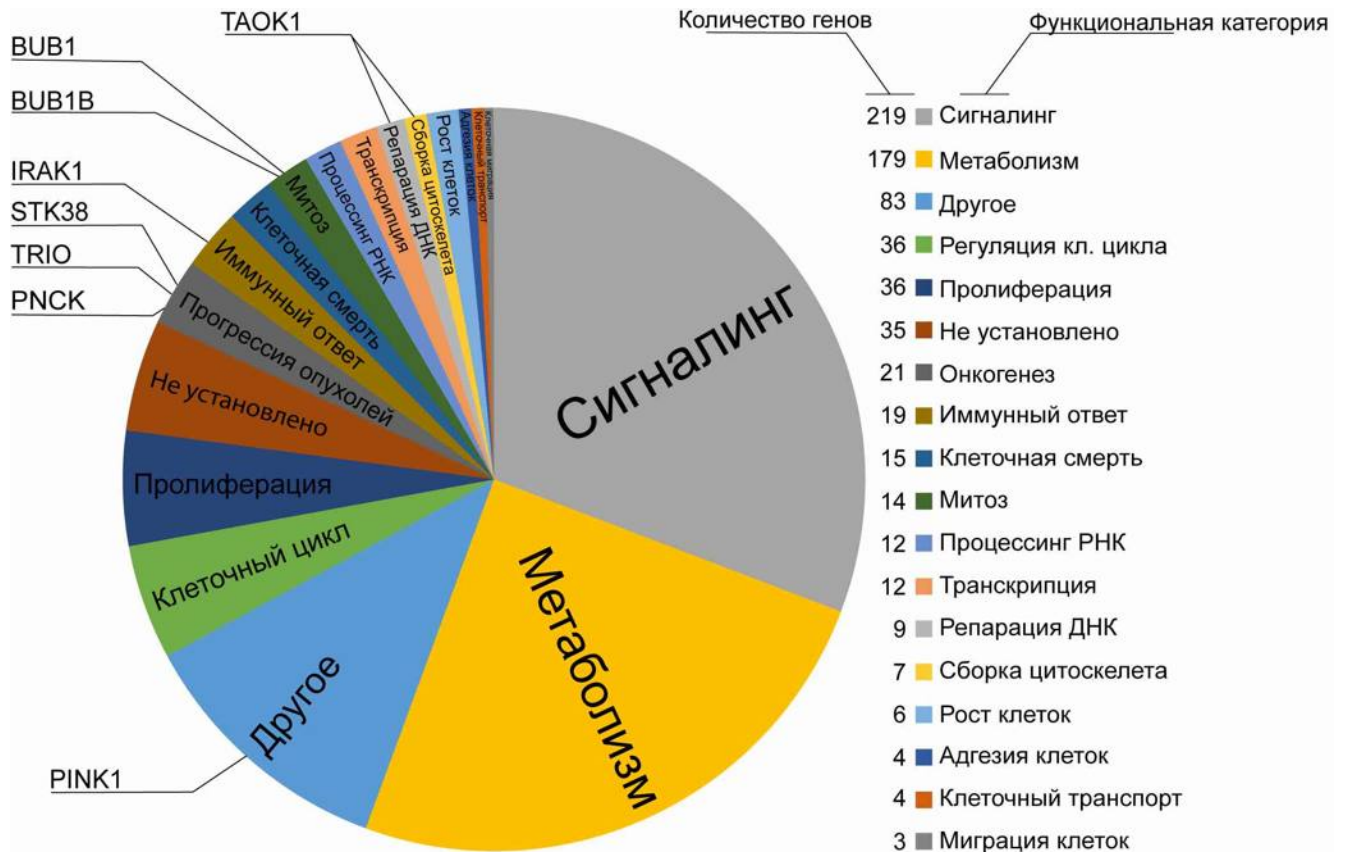
Среди обнаруженных генов наиболее показательными являются *BUB1* и *BUB1B* – важные участники чекпойнта образования веретена деления (от англ. spindle assembling checkpoint, SAC), вовлеченные в регуляцию митоза. Тот факт, что подавление экспрессии генов *BUB1*, *BUB1B* приводит к формированию хромосомной нестабильности, еще раз подтверждает правомерность использования сконструированной системы для проведения масштабного поиска генов-кандидатов. Ранее было показано, что подавление экспрессии гена *STK38* также приводит к хромосомной нестабильности (Hergovich et al., 2007). Продукт экспрессии гена *TAOK1* является регулятором поддержания стабильности актиновых филаментов, позволяет предположить его возможный вклад в поддержание стабильности хромосом (Chen et al., 2003; Yustein et al., 2003; Zihni et al., 2006; Raman et al., 2007; Wu, Wang, 2008).

Таким образом, роль генов *BUB1*, *BUB1B*, *STK38* в процессе хромосомной трансмиссии может быть описана непосредственно исходя из их функции, в то время как возможные механизмы генов *IRAK*, *TAOK1*, *TRIO*, *PNCK*, *PINK1* остаются не совсем ясными и требуют более детального анализа, изложенного в следующей подглаве.

### **4.3 Новые молекулярные детерминанты хромосомной нестабильности**

В результате анализа библиотеки миРНК против транскриптов генов протеинкиназ человека были выявлены пять генов в качестве неидентифицированных ранее молекулярных детерминант трансмиссии хромосом, а именно *PINK1*, *TRIO*, *IRAK1*, *PNCK* и *TAOK1*. Резюмируя результаты проведенного скрининга, обнаруженные гены можно разделить на группы согласно их роли в различных биологических процессах. Принимая во внимание, что многие киназы проявляют активность сразу в нескольких процессах, являясь сигнальными

мессенджерами, мы отнесли данные киназы к группе «Сигналинг» внутри исследованной выборки генов (Рисунок 26). Протеинкиназы, не образующие группы, мы отнесли к категории «Другое», а белки, для которых не описана их биологическая роль, мы выделили в группу «Не установлено».



**Рисунок 26** – Распределение обнаруженных генов-кандидатов среди функциональных групп протеинкиназ скринируемой библиотеки.

Рисунок 26 иллюстрирует, что гены, показавшие эффект на развитие хромосомной нестабильности, ассоциированы с репликацией, митозом, онкогенезом, пролиферацией и некоторыми сигнальными путями. В литературе есть сведения о связи данных генов с патологическими состояниями в организме человека. Ранее проведенные биохимические и генетические исследования показали, что *PINK1* связан с болезнью Паркинсона. Он работает вместе с паркином в процессе контроля митафагии митохондрий (Pickrell, Youle, 2015). *TRIO* является важным игроком в развитии нервной системы. Экспрессия *TRIO* значительно возрастает в различных типах опухолей и предполагается его участие

в онкогенезе (Schmidt, Debant 2014). *IRAK1* ассоциирован с детской системной красной волчанкой и синдромом умственной отсталости Lubs X (Gottipati et al., 2008). *PNCK* сверхэкспрессируется в некоторых опухолях молочной железы и связан с синдромом Джервелла и Ланге-Нильсена 1 (Wu et al., 2013). *TAOK1* участвует в регуляции клеточного цикла и передаче сигналов с участием ГТФазы Rho – семейства клеточных сигнальных белков (Raman et al., 2007). Тот факт, что связь данных генов с процессом хромосомной трансмиссии ранее не была показана, не является уникальным. Так, у дрожжей большая часть генов хромосомной трансмиссии была первоначально идентифицирована в других биологических процессах, таких как синтез тРНК, формировании гликозилфосфатидилинозитоловых якорей и процессов секреции (Yuen et al., 2007; Stirling et al., 2011; Stirling et al., 2012).

В работе, недавно опубликованной нашей исследовательской группой, было показано, что нокдаун миРНК против *PINK1*, *STK38*, *TRIO*, *TAOK1* и *PRKCE* вызывает нарушения во время прогрессирования митоза (Liskovykh et al., 2019). Нокдаун *PINK1* приводит к серьезным дефектам сегрегации метафазных и анафазных хромосом, а также к отставанию движения хромосом в телофазе (Рисунок 27). Нокдаун *STK38* был связан с проблемами формирования митотического веретена в профазе, в то время как нокдаун *TRIO*, *BUB1* и *BUB1B* приводил к образованию хроматиновых мостиков в анафазе (Рисунок 27). Все эти фенотипы могут привести к анеуплоидии, повреждению хромосом и образованию микроядер. Чтобы исключить фенотипы специфичные для линии раковых клеток HT1080, все эксперименты также проводили на клеточной линии RPE1. Нокдаун *PINK1*, *STK38*, *TRIO*, *TAOK1* и *PRKCE* в клетках RPE1 приводил к увеличению числа митотических нарушений, тогда как в клетках HT1080 нарушения митоза наблюдались только после нокдауна *STK38* и *TAOK1* (Liskovykh et al., 2019).

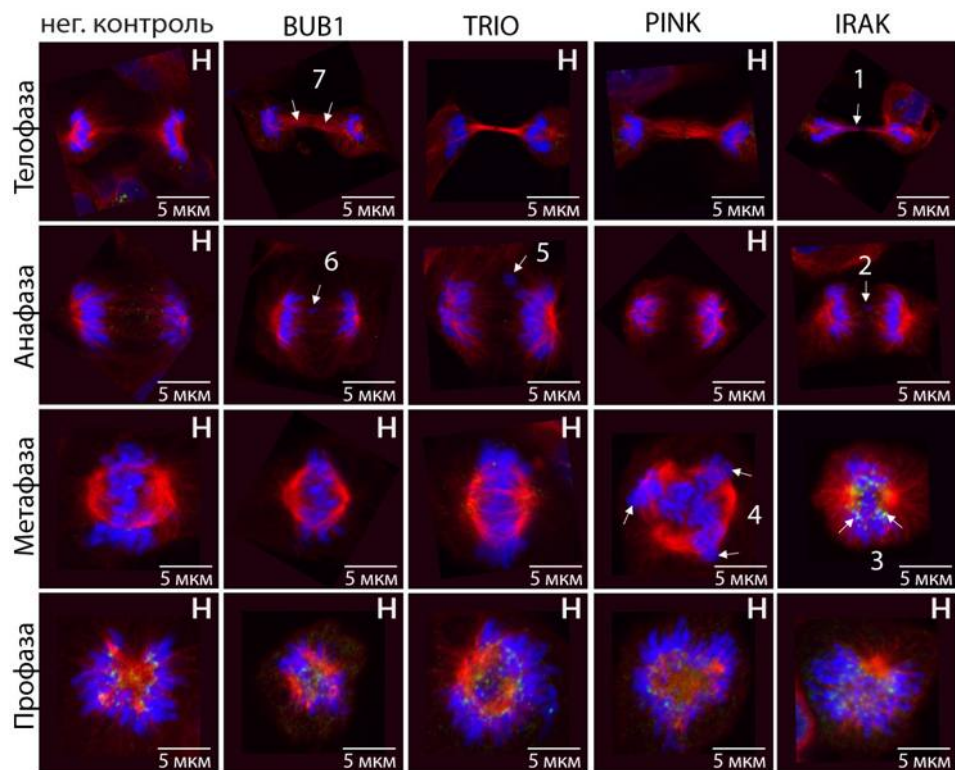
Результаты этих экспериментов позволяют предположить, что гены *PINK1*, *STK38*, *TRIO*, *TAOK1* и *PRKCE* могут быть необходимы для митотической прогрессии и для поддержания клеточного цикла.

Существуют отдельные работы, в которых показана связь некоторых исследованных генов с процессами регуляции клеточного цикла и митотической прогрессии. Так, ранее было показано, что ген *STK38* регулирует дупликацию центросом (Hergovich et al., 2007) и клеточный цикл (Emoto et al., 2006), а *PRKCE* участвует в организации митотического веретена (Brownlow et al., 2014; Martini et al., 2018).

В нашей работе (Liskovykh, 2019) был проанализирован митотический фенотип клеток и отслежена локализация MAD1 (от англ. mitotic arrest deficient) на разных стадиях митоза в клетках RPE1 и HT1080 после нокдауна генов *PINK1*, *STK38*, *TRIO*, *TAOK1* и *PRKCE*. Клетки были маркированы антителами против  $\alpha$ -тубулина для визуализации митотического веретена (Romaniello et al., 2018) и против MAD1, эволюционно консервативного основного белка контролирующего сборку веретена и прикрепление его к кинетохору (Luo et al., 2018). В клетках RPE1 нокдаун нескольких генов выявил ряд митотических нарушений. Нокдаун *STK38* вызвал проблемы с формированием митотического веретена (отсутствие связи с одним полюсом веретена) в профазе. Нокдаун *PINK1* привел к серьезным проблемам с выравниванием хромосом в метафазе, анафазе, а также задержке хромосом в ранней телофазе. Нокдаун *TRIO*, *BUB1* и *BUB1B* приводил к образованию хроматиновых мостиков в анафазе. В клетках HT1080 (Рисунок 26.) были зафиксированы примеры нетипичной локализации MAD1 и ее связи с хромосомами и микротрубочками в профазе, метафазе, анафазе и телофазе. В клетках с подавлением экспрессии *IRAK* было зафиксировано увеличение частоты встречаемости метафаз с MAD1, локализованным на кинетохоре, а также в анафазе и телофазе. Подавление экспрессии *PINK1* приводит к возникновению метафаз с несколькими центросомами (Рисунок 26). Bub1 является частью комплекса SAC, его роль в стабилизации хромосомы является критической, и подавление работы данного белка приводит к хромосомной нестабильности, что подтверждается нашими данными. Зафиксированные аномальные митотические фенотипы могут привести к анеуплоидии, повреждению хромосом и образованию микроядер.

На фоне подавления экспрессии исследуемых генов, в клетках HT1080 наблюдался широкий спектр митотических нарушений. Подобно фенотипам, наблюдаемым в клетках RPE1, нокдаун *PINK1* указывает на серьезные проблемы с образованием митотического веретена. В метафазе образуются множественные полюса веретена деления. Нокдаун *TRIO* коррелировал с потерей хромосом в анафазе, возможно, из-за проблем с прикреплением к структурам кинетохора.

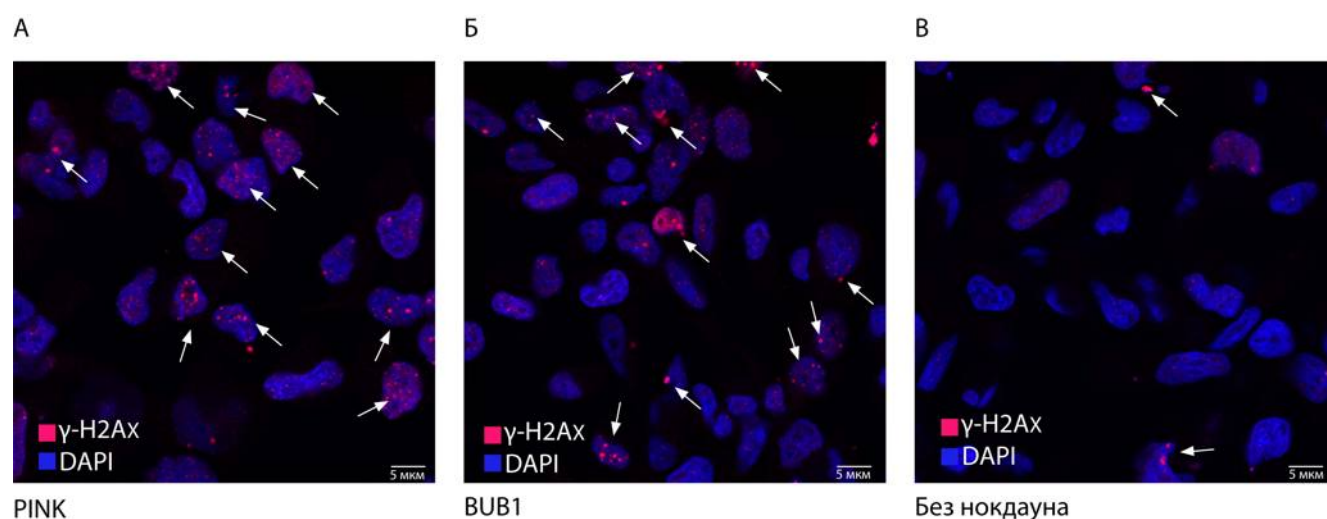
Подводя итог вышеупомянутым экспериментам, мы пришли к выводу, что пять генов, *PINK1*, *IRAK1*, *PNCK*, *TAOK1* и *TRIO*, могут рассматриваться как гены, идентифицированные как новые участники сегрегации хромосом в клетках человека.



**Рисунок 27** – Митотические аномалии, зафиксированные через 72 ч после нокдауна исследуемых генов в клетках линии HT1080 (по: Liskovykh et al., 2019). 1 – нетипичная локализация MAD1 в метафазе после нокдауна *IRAK*; 2 – нарушение сегрегации хромосом в анафазе после нокдауна *IRAK*; 3 – нарушение сегрегации хромосом в телофазе после нокдауна *IRAK*; 4 – образование метафазы с множественными полюсами веретена деления после нокдауна *PINK1*; 5 – нарушение сегрегации хромосом в анафазе после нокдауна *TRIO*; 6 – нарушение сегрегации хромосом в анафазе после нокдауна *BUB1*; 7 – нарушение сегрегации хромосом в телофазе после нокдауна *BUB1*. H – нормальная фаза митоза.



В нашей работе (Liskovykh et al., 2019) также продемонстрировано, что нокадаун *PINK1*, *TRIO*, *STK38*, *BUB1* и *BUB1B* вызывает образование двухцепочечных разрывов ДНК, которые также могут вызывать нестабильность хромосом (Рисунок 28). Кроме того, в данном исследовании было проанализировано накопление  $\gamma$ -H2AX после нокадауна генов-кандидатов. Так,  $\gamma$ -H2AX представляет собой фосфорилированную форму гистона из семейства H2A и является маркером двухцепочечных разрывов в ДНК. По накоплению сигнала от антител к  $\gamma$ -H2AX можно делать выводы о экзогенном или эндогенном повреждении ДНК (Kuo, Yang, 2008). Результаты показали накопление  $\gamma$ -H2AX в клетках линии HT1080 после нокадауна *PINK1* и *BUB1* (Рисунок 28).



**Рисунок 28** – Накопление маркера двухцепочечных разрывов  $\gamma$ -H2AX в клетках линии HT1080 после нокадауна *PINK1* и *BUB1* (по: Liskovykh et al., 2019). А – локализация сигнала  $\gamma$ -H2AX через 72 ч после нокадауна *PINK1*; Б – локализация сигнала  $\gamma$ -H2AX через 72 ч после нокадауна *BUB1*; В – локализация сигнала  $\gamma$ -H2AX через 72 ч после трансфекции неспецифическими миРНК.

#### 4.4 Возможные молекулярные механизмы участия выявленных генов в хромосомной нестабильности

К группе известных молекулярных детерминант хромосомной нестабильности можно отнести белковые комплексы, непосредственно

вовлеченные в формирование кинетохора, факторы, опосредующие эпигенетическую модификацию хроматина, а также последовательности ДНК, мутационный процесс в которых может приводить к нарушениям в расхождении хромосом. Наиболее очевидный механизм развития хромосомной нестабильности можно проследить на примере генов *BUB1* и *BUB1B* которые являются ключевыми регуляторами перехода от метафазы к анафазе, работая в комплексе с белками MAD. Вместе BUB1 и MAD образуют комплекс контрольной точки митоза (от англ. mitotic checkpoint complex, MCC), который активирует мессенджер CDC20, а тот, в свою очередь, активирует комплекс стимуляции анафазы (от англ. anaphase promoting complex, APC), он обеспечивает деградацию циклина Б, отсутствие которого служит сигналом к переходу к анафазе (Musacchio, 2015). Результатом нарушения работы комплекса инициации сборки веретена деления (от англ. spindle assembly checkpoint, SAC) может привести к аресту клеточного цикла в метафазе или к допущению неравномерного расхождения хромосом во время деления и, как следствие, образованию анеуплоидных клеток (Stukenberg, 2015). Полученные нами данные согласуются с существующим представлением о работе данных белков; нами продемонстрировано, что подавление экспрессии *BUB1* и *BUB1B* приводит к возникновению хромосомной нестабильности.

Рассматривая возможные механизмы, посредством которых обнаруженные гены могут инициировать процесс нестабильности хромосом, мы учитывали локализацию маркера MAD1 (Heinrich et al., 2014) на фоне подавления экспрессии обнаруженных генов. MAD1 является важной частью SAC: он контролирует прикрепление хромосом к митотическому веретену и играет решающую роль при переходе от метафазы к анафазе (Lara-Gonzalez et al., 2012).

В клетках с подавлением экспрессии *IRAK* было зафиксировано увеличение частоты встречаемости метафаз с MAD1, локализованного на кинетохоре, а также в анафазе и телофазе. В норме MAD1 не локализуется на кинетохоре, его обнаружение свидетельствует о нарушениях прохождения SAC (Stukenberg, 2015). MAD1 может быть локализован на кинетохоре только в том случае, если SAC

активирован вследствие неправильного прикрепления микротрубочек к кинетохору, при этом переход от метафазы к анафазе не происходит, и клетка оказывается арестована в клеточном цикле. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что подавление экспрессии гена *IRAK* связано с появлением аномального митотического фенотипа, при этом следует отметить, что не удалось обнаружить прямой связи данного гена с формированием кинетохора.

Опираясь на данные некоторых исследований, можно говорить, что нарушения в системе репарации и эпигенетические модификаторы, контролирующие трансмиссию хромосом, тоже могут детерминировать развитие хромосомной нестабильности (Toda et al., 2015; Mahfoudhi et al., 2016). К косвенным подтверждениям того, что сбой в системе репарации способен приводить к хромосомной нестабильности можно отнести полученный нами результат влияния на хромосомную нестабильность нокдауна гена *ТАОК1*. Данный ген экспрессируется в ответ на повреждение ДНК, является одним из участников контрольной точки повреждения ДНК (от англ., DNA damage checkpoint) между G2 и M фазами клеточного цикла, активируя стресс-каскад MAPK p38/MAPK14, являясь посредником при фосфорилировании MAP2K3 и MAP2K6. Кроме того, ТАОК1 может выступать в качестве стабилизатора цитоскелета путем фосфорилирования Thr208 в MARK2, что приводит к активации MARK2-киназы и последующему отделению MAPT/TAU (от англ., microtubule-associated protein tau) от микротрубочек (Chen et al., 2003; Yustein et al., 2003; Zihni et al., 2006; Raman et al., 2007; Wu, Wang, 2008;). Потеря функции данного гена как стабилизатора микротрубочек или как участника процесса репарации ДНК может привести к развитию хромосомной нестабильности.

**TRIO** (от англ., triple functional domain protein) первоначально был охарактеризован, как белок ремоделирования цитоскелета, он участвует в организации актинового цитоскелета и стабилизирует полимеризацию актиновых филаментов путем связывания F-актина. (Seipel et al., 2001).

*TRIO* регулирует работу TRIOBP (F-актин связывающего белка), также упоминаемый как TARA. TRIOBP-1 активирует фактор связывания теломерных повторов (от англ., telomeric repeat binding factor 1 TRF1), он необходим для корректной организации теломерных повторов во время митоза (Lan et al., 2014). TRIOBP-1 фосфорилируется polo-подобной киназой 1 (от англ., polo-like kinase 1, Plk1), которая играет важную регуляторную роль во время митоза. Внутрядерная локализация TRIOBP-1 зависит от наличия фосфорилирования по остатку Thr457, что определяет его centrosомную локализацию. Centrosомная локализация фосфорилированного TRIOBP-1 важна для нормальной сегрегации хромосом (Zhu et al., 2012). Кроме того, TRIOBP-1 может быть убиквитинирован E3-убиквитин-лигазой HECTD3. Убиквитинирование TRIOBP-1 способствует деградации TRIOBP-1. Деградация TRIOBP-1, вызванная нокдауном HECTD3, опосредует геномную нестабильность (Yu et al., 2008). Эти результаты показывают, что регуляция TRIOBP важна для митотических процессов и клеточного цикла и может быть связана с прогрессией опухолей, при этом его партнер TRIO часто ассоциируется с прогрессией опухолей. Так, недавно в одной из работ (Delespaul et al., 2017) были показаны транслокации в кодирующих последовательностях *TRIO*, которые идентифицированы в четырех разных гистотипах сарком. Экзомное секвенирование образцов опухолей показало накопление специфических однонуклеотидных замен в гене *TRIO*, их ассоциацию с раком желудка и кишечника (Thutkawkorapin et al., 2016), также установлено, что в клетках гепатоцеллюлярной карциномы часто наблюдается его повышенная экспрессия (Wang et al., 2015). Все эти данные, дополненные полученными нами результатами, свидетельствующими, что нокдаун *TRIO* приводит к нарушению сегрегации хромосом и возникновению хромосомной нестабильности, позволяют предложить TRIO в качестве нового маркера онкогенеза.

***STK38*** гиперэкспрессирован в некоторых видах раковых опухолей, он способен регулировать активность семейства транскрипционных факторов MYC, что было продемонстрировано на примере MYC-зависимой лимфомы (Burkitt

lymphoma), для которой характерны транслокации между 8 и 14 хромосомами (Bisikirska et al., 2013). Гиперэкспрессия генов семейства MYC характерна для многих типов онкологических заболеваний. Искусственное увеличение уровня экспрессии *STK38* приводит к избыточному удвоению центросом во время центросомного цикла, а нокдаун *STK38* наоборот замедляет удвоение центросом. Было показано, что миРНК-опосредованное подавление экспрессии *STK38* может привести к хромосомной нестабильности (Hergovich et al., 2007). Эти данные согласуются с полученными нами сведениями о том, что нокдаун киназы *STK38* приводит возникновению хромосомной нестабильности.

**PNCK** (от англ., pregnancy up-regulated non-ubiquitous calmodulin kinase) также известна как кальмодулиновая киназа I. Ранее было показано, что она гиперэкспрессирована в клетках злокачественных опухолей молочной железы человека по сравнению с нормальной эпителиальной тканью молочной железы. Было показано, что у мышей во время поздней беременности мРНК гена *PNCK* активно экспрессируется в эпителиальных клетках молочной железы, оказывая влияние на скорость пролиферации (Gardner et al., 2000). В работе Ву с соавторами (Wu et al., 2013) показано, что повышенная экспрессия *PNCK* связана с плохим прогнозом для пациентов с карциномой почек. *PNCK* может представлять собой новый прогностический маркер для почечной карциномы. В клетках с гиперэкспрессированной *PNCK* наблюдается понижение экспрессии EGFR (рецептора эпидермального фактора роста) и ингибирование MAP-сигнального пути (от англ., mitogen-activated protein kinase), в то время, как миРНК-опосредованное подавление экспрессии гена *PNCK* приводило к гиперэкспрессии EGFR (Deb et al., 2008, 2011). Известно, что нарушение уровня экспрессии EGFR часто связано с прогрессированием опухолей (Zhang et al., 2007). Установленная в представленных работах связь между экспрессией *PNCK* и митоген-активируемой протеинкиназой (MAP) позволят предположить, что в основе механизма образования хромосомной нестабильности после нокдауна гена *PNCK* лежит именно его влияние на митоз через MAP-опосредованный сигнальный путь.

Более точное описание механизма требует дополнительных экспериментальных данных.

*PINK1* кодирует серин/треониновую протеинкиназу (PINK1), которая локализуется в митохондриях. Считается, что PINK1 защищает клетки от стрессовой митохондриальной дисфункции. PINK1 работает в паре с белком PARKIN, они регулируют восстановление поврежденных митохондрий после окислительного стресса и участвуют в митофагии (Aguirre et al., 2017). Мутации в этом гене вызывают одну форму аутосомно-рецессивной ранней болезни Паркинсона. Также существуют упоминания, что данный ген гиперэкспрессирован в клетках немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) (Zhang et al., 2017). Кроме того, экспрессия *PINK1* ассоциирована с более инвазивным фенотипом опухоли и плохим прогнозом. Кроме того, исследования *in vitro* с использованием активации и нокдауна *PINK1* подтвердили, что PINK1 способствует клеточной пролиферации, что может происходить через путь NF-κB. Более того, также было продемонстрировано, что снижение экспрессии *PINK1* и использование терапии при помощи цисплатина индуцируют апоптоз клеток НМРЛ. Данные результаты показывают, что PINK1 играет значительную роль в прогрессировании НМРЛ и хеморезистентности, а также подчеркивает потенциальную роль этого белка в будущей противораковой терапии (Zhang et al., 2017). Существующие данные позволяют связать нокдаун гена *PINK1* и явление хромосомной нестабильности, через накопление двухцепочечных разрывов ДНК (Рисунок 27). Данный результат может объясняться отсутствием ингибирования окислительного стресса в митохондриях, что может привести к появлению онкогенных мутаций *de novo* и хромосомной нестабильности.

#### **4.5 Эффект экстракта из листьев *Punica granatum* на процесс трансмиссии хромосом и клеточный цикл**

Природные экстракты представляют собой разнообразный и уникальный источник биологически активных соединений (Kingston, 2011). Среди

противоопухолевых препаратов, используемых в наши дни, по меньшей мере половина получена из животных и растительных экстрактов (Newman, Cragg 2012; Malik et al., 2014). В частности, более 3000 растений содержат соединения, проявляющие противоопухолевую активность (Alves-Silva, 2017; Tariq, 2017).

В данном исследовании тест-система NT1080 HAC/dGFP была апробирована для поиска лекарственных препаратов-кандидатов, вызывающих хромосомную нестабильность. Был проведен скрининг одиннадцати экстрактов, полученных из морских беспозвоночных, грибов и высших растений. Показано, что экстракт из листьев граната обыкновенного (*Punica granatum*) в концентрации 200мкг/мл вызывает хромосомную нестабильность. Кроме того, было показано, что экстракт из листьев *P. granatum* способен останавливать клеточный цикл в фазе G2 и ингибировать пролиферацию клеток. Эти результаты открывают перспективу для дальнейшего исследования данного растительного экстракта и идентификации веществ, вызывающих обнаруженные эффекты.

Гранат обыкновенный (*P. granatum*) веками использовался в народной медицине разных стран, поскольку был признан источником разнообразных биологически активных соединений (Modaeinama et al., 2015). Известно, что *P. granatum* содержит галловую кислоту, эллаговую кислоту, галлокатехины, дельфинидин, цианидин, пеларгонидин и ситостерол, которые не только являются мощными антиоксидантами, но и, как предполагается, имеют противоопухолевую активность. Известно, что экстракты *P. granatum* способны влиять на пролиферацию, клеточный цикл, ангиогенез и инвазивность различных раковых опухолей (Lansky, Newman, 2007). В данной работе мы идентифицировали еще один эффект экстракта листьев *P. granatum*, который имеет непосредственное отношение к терапии рака, а именно, способность экстракта вызывать хромосомную нестабильность.

Мы показали возникновение дозозависимого эффекта экстракта листьев *P. granatum* на развитие хромосомной нестабильности и скорости клеточной пролиферации (Рисунки 21, 22, 23). Для выявления возможных механизмов

влияния данного экстракта на клеточную пролиферацию и трансмиссию хромосом мы провели анализ клеточного цикла под влиянием различных концентраций исследуемого экстракта.

Существует три основных механизма, называемых контрольными точками клеточного цикла, которые регулируют порядок, целостность и точность событий клеточного цикла. Контроль происходит в период между G1 и S, G2 и M, а также в течение G1 периода.

Мы провели анализ клеточного цикла линий HT1080 и RPE1 при обработке различными концентрациями экстракта листьев *P. granatum* (Рисунок 24). Данные проточной цитофлуориметрии с использованием красителя Hoechst 33342 показали, что клетки накапливаются на стадиях G2/M через 24 ч инкубации при обработке экстрактом в концентрации от 200 мкг/мл.

Чтобы определить, на какой стадии клеточного цикла, G2 или M, происходит его остановка, мы провели анализ митотического индекса клеток RPE1 и HT1080 после 24 ч обработки экстрактами в концентрациях 50, 100, 200 и 400 мкг/мл (Рисунок 25). Результаты показали, что при увеличении концентрации экстракта количество митотических событий уменьшается. Отсюда следует, что остановка клеточного цикла происходит на стадии G2 и повышает вероятность того, что клеточный цикл блокируется в контрольной точке G2-митоза.

Примечательно, что в точке G2/M в первую очередь происходит контроль ошибок репликации ДНК (Morris, 2013). Тот факт, что действие экстракта вызывает хромосомную нестабильность и в то же время приводит к пролиферации клеток в G2, может быть результатом повреждения ДНК, вызванного одним или несколькими компонентами экстракта. Повреждение ДНК приводит к остановке клеточного цикла, что дает время для прохождения восстановления ДНК до начала следующей фазы клеточного цикла (Tapia-Alveal, 1994; Latif, 2004; Barnum, 2014). Следовательно, повреждение ДНК может привести к нестабильности хромосом в результате воздействия на экспрессию генов, необходимых для правильной сегрегации хромосом, или ингибирования белков, ответственных за это.



Известно, что повреждение ДНК является одной из ключевых причин блокирования клеточного цикла в контрольной точке G2/M. В этом случае клетки не вступают в митоз. Это было обнаружено в наших экспериментах, что продемонстрировано оценкой митотического индекса (Рисунок 24).

Опубликованные ранее данные других исследователей также предоставляют доказательства, подтверждающие склонность клеток накапливать повреждения ДНК после обработки экстрактами *P. granatum* в результате подавления механизмов репарации ДНК (Amit, 2013), что является дополнительным подтверждением способности экстракта из листьев *P. granatum* вызывать хромосомную нестабильность вследствие повреждения ДНК компонентами экстракта. В нашем исследовании с применением разработанной тест-системы мы впервые продемонстрировали, что экстракт граната обыкновенного содержит компоненты, приводящие к хромосомной нестабильности и блокировке клеточного цикла в точке G2/M. Полученные данные позволят в дальнейшем выявить молекулярные детерминанты, на которые воздействуют компоненты экстракта данного растения, что вероятно будет способствовать установлению конкретного молекулярного механизма противораковой активности препарата, способствовать идентификации и валидации действующего вещества и его мишени.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании разработана тест-система NT1080 HAC/dGFP, представляющая собой клеточную линию фибросаркомы NT1080, несущую искусственную хромосому человека. Данная тест-система имеет флуоресцентную индикацию и позволяет идентифицировать гены и продукты их экспрессии, участвующие в процессе хромосомной трансмиссии, а также проводить скрининг препаратов, вызывающих хромосомную нестабильность. Сконструированная тест-система экспрессирует рекомбинантную версию флуоресцентного репортера dGFP с коротким периодом деградации, система позволяет получать в течение 72 ч данные о результатах скрининга нескольких сотен генов или препаратов, анализируемых в качестве факторов, вызывающих хромосомную нестабильность. Созданная тест-система может быть совместима с обширным количеством приборов для детекции флуоресценции. Использование конфокальной микроскопии в сочетании с высокопроизводительным автоматизированным имиджингом позволяет применять тест-систему для скрининга библиотек миРНК, что обеспечивает высокую производительность и возможность увеличить количество повторов в экспериментах.

В ходе данной работы был проведен скрининг 28 генов человека, имеющих ортологи в клетках дрожжей, которые участвуют в митотической трансмиссии хромосом. В результате скрининга было показано, что подавление экспрессии гена протеинкиназы С эпсилон (*PRKCE*) приводит к хромосомной нестабильности.

Для демонстрации возможности высокопроизводительного скрининга был проведен анализ библиотеки миРНК против кодирующих последовательностей протеинкиназ человека, включающей 714 пулов миРНК. В ходе выполнения данного скрининга впервые была обнаружена связь генов *PINK1*, *IRAK1*, *PNCK*, *TAOK1* и *TRIO* с процессом митотической трансмиссии хромосом.

Резюмируя результаты проведенного скрининга, обнаруженные гены можно разделить на группы согласно их роли в различных биологических процессах. Гены, показавшие эффект на развитие хромосомной нестабильности,

ассоциированы с репликацией, митозом, онкогенезом и пролиферацией. В литературе есть сведения о связи данных генов с патологическими состояниями в организме человека (Raman et al., 2007; Gottipati et al., 2008; Wu et al., 2013; Schmidt, Debant, 2014; Pickrell, Youle, 2015). Тот факт, что связь данных генов с процессом хромосомной трансмиссии теперь установлен, в сочетании с полученными ранее доказательствами связи данных генов с патологиями в организме человека, дополнительно подтверждает существенную роль обнаруженных генов в регуляции базовых процессов в жизни клетки и проектирует возможные механизмы, в которые они вовлечены.

Полученные данные о роли ранее неизвестных регуляторных элементов трансмиссии хромосом позволят обновить список потенциальных мишеней для противоопухолевых препаратов, а выявление мутаций в новых генах этой группы может быть использовано для ранней диагностики некоторых форм рака.

В будущем сконструированную тест-систему можно применять для скрининга различных библиотек миРНК (таких как библиотеки против транскриптов генов регуляции клеточного цикла, реакции на повреждение ДНК, эпигенетических маркеров, факторов транскрипции), а также для полногеномного скрининга с целью выявления других генов, участвующих в поддержании трансмиссии хромосом.

В данном исследовании тест-система NT1080 HAC/dGFP была апробирована для поиска лекарственных кандидатов, вызывающих хромосомную нестабильность. Был проведен скрининг одиннадцати экстрактов, полученных из морских беспозвоночных, грибов и высших растений. Показано, что экстракт из листьев Граната обыкновенного (*P. granatum*) в концентрации 200 мкг/мл вызывает хромосомную нестабильность. Эти данные позволяют использовать тест-систему NT1080 HAC/dGFP для поиска новых соединений, вызывающих хромосомную нестабильность. Это открывает перспективы для обнаружения новых потенциальных средств противоопухолевой терапии.

Идентификация новых молекулярных детерминант трансмиссии хромосом человека имеет решающее значение для понимания механизмов регуляции митоза.

Анализ роли каждого гена хромосомной нестабильности, идентифицированного в этом исследовании, в сложном процессе передачи хромосом будет предметом будущих исследований. А дальнейшее изучение эффектов компонентов экстракта из листьев *P. granatum* на трансмиссию хромосом и регуляцию клеточного цикла может обеспечить создание новых терапевтических подходов, направленных на борьбу с раковыми клетками.

## ВЫВОДЫ

1. На основе клеточной линии, содержащей искусственную хромосому человека, сконструирована тест-система HT1080 HAC/dGFP, позволяющая количественно и в короткие сроки (72 ч) идентифицировать уровень хромосомной нестабильности и выявлять молекулярные детерминанты трансмиссии хромосом.
2. С использованием разработанной системы обнаружены новые молекулярные детерминанты трансмиссии хромосом человека – гены *PINK1*, *IRAK1*, *PNCK*, *TAOK1*, *TRIO* – и продукты их экспрессии.
3. Показано, что сконструированная тест-система позволяет проводить скрининг препаратов, вызывающих хромосомную нестабильность. С применением системы установлено, что экстракт из листьев граната обыкновенного (*Punica granatum*) вызывает хромосомную нестабильность при значительном снижении пролиферативной активности и увеличении доли клеток в периоде G2 клеточного цикла.

**СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

1. Abdillah S., Nurhayati A., Nurhatika S., Setiawan E., Heffen W. Cytotoxic and antioxidant activities of marine sponge diversity at Pecaron Bay Pasir Putih Situbondo East Java Indonesia // *Journal of Pharmacy Research*. 2013. Vol. 6, № 7. P. 685–689.
2. Aguirre J.D., Dunkerley K.M., Mercier P., Shaw G.S. Structure of phosphorylated UBL domain and insights into PINK1-orchestrated parkin activation // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017. Vol. 114, № 2. P. 298–303.
3. Amano M., Suzuki A., Hori T., Backer C., Okawa K., Cheeseman I.M., Fukagawa T. The CENP-S complex is essential for the stable assembly of outer kinetochore structure // *Journal of Cell Biology*. 2009. Vol. 186, № 2. P. 173–182.
4. Bassett E.A., De Nizio J., Barnhart-Dailey M.C., Panchenko T., Sekulic N., Rogers D.J., Black B.E. HJURP uses distinct CENP-A surfaces to recognize and to stabilize CENP-A/histone H4 for centromere assembly // *Developmental Cell*. 2012. Vol. 22, № 4. P. 749–762.
5. Bastians H. Causes of chromosomal instability // *Recent Results in Cancer Research*. 2015. Vol. 200. P. 95–113.
6. Bergmann J.H., Jakubsche J.N., Martins N.M., Kagansky A., Nakano M., Kimura H., Earnshaw W.C. Epigenetic engineering: histone H3K9 acetylation is compatible with kinetochore structure and function // *Journal of Cell Science*. 2012a. Vol. 125, № 2. P. 411–421.
7. Bergmann J.H., Martins N.M.C., Larionov V., Masumoto H., Earnshaw W.C. HACKing the centromere chromatin code: insights from human artificial chromosomes // *Chromosome research*. 2012b. Vol. 20, № 5. P. 505–519.
8. Bisikirska B.C., Adam S.J., Alvarez M.J., Rajbhandari P., Cox R., Lefebvre C., Califano A. STK38 is a critical upstream regulator of MYC's oncogenic activity in human B-cell lymphoma // *Oncogene*. 2013. Vol. 32, № 45. P. 5283–5291.
9. Black B.E., Bassett E.A. Centromere identity maintained by nucleosomes assembled with histone H3 containing the CENP-A targeting domain // *Molecular Cell*. 2007. Vol. 25, № 2. P. 309–322.

10. Black B.E., Jansen L.E., Maddox P.S., Foltz D.R., Desai A.B., Shah J. V, Cleveland D.W. The histone variant CENP-A and centromere specification // *Current opinion in cell biology*. 2008. Vol. 20, № 1. P. 91–100.
11. Blackwell C., Martin K.A., Greenall A., Pidoux A., Allshire R.C., Whitehall S.K. The *Schizosaccharomyces pombe* HIRA-like protein Hip1 is required for the periodic expression of histone genes and contributes to the function of complex centromeres // *Molecular Cell Biology*. 2004. Vol. 24, № 10. P. 4309–4320.
12. Blower M.D., Sullivan B.A., Karpen G.H. Conserved organization of centromeric chromatin in flies and humans // *Developmental Cell*. 2002. Vol. 2, № 3. P. 319–330.
13. Calcabrini C., Catanzaro E., Bishayee A., Turrini E., Fimognari C. Marine Sponge Natural products with anticancer potential: An updated review // *Marine drugs*. 2017. Vol. 15, № 10.
14. Cam H. P., Noma K., Ebina H., Levin H.L., Grewal S.I.S. Host genome surveillance for retrotransposons by transposon-derived proteins // *Nature*. 2008. Vol. 451, № 7177. P. 431–436.
15. Canapa A., Barucca M., Cerioni P.N., Olmo E. A satellite DNA containing CENP-B box-like motifs is present in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki* // *Gene*. 2000. Vol. 247, № 1–2. P. 175–180.
16. Carone D.M., Zhang C., Hall L.E., Oberfell C., Carone B.R., O’Neill M.J., O’Neill R.J. Hypermorphic expression of centromeric retroelement-encoded small RNAs impairs CENP-A loading // *Chromosome research*. 2013. Vol. 21, № 1. P. 49–62.
17. Carroll C.W., Milks K.J., Straight A.F., Centromere assembly requires the direct recognition of CENP-A nucleosomes by CENP-N // *Nature Cell Biology*. 2009. Vol. 11, № 7. P. 896–902.
18. Carroll C.W., Silva M.C.C., Godek K.M., Jansen L.E., T., Straight A.F. Dual recognition of CENP-A nucleosomes is required for centromere assembly // *Journal of Cell Biology*. 2010. Vol. 189, № 7. P. 1143–1155.
19. Catania S., Pidoux A.L., Allshire R.C. Sequence features and transcriptional stalling within centromere DNA promote establishment of CENP-A chromatin // *PLOS genetics*. 2015. Vol. 11, № 3. P. e1004986.

20. Chan F.L., Marshall O.J., Saffery R., Kim B.W., Earle E., Choo K.H.A. Wong L.H., Active transcription and essential role of RNA polymerase II at the centromere during mitosis // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2012. Vol. 109, № 6. P. 1979–1984.
21. Charepalli V., Reddivari L., Vadde R., Walia S., Radhakrishnan S., Vanamala J.K.P. Eugenia jambolana (Java Plum) fruit extract exhibits anti-cancer activity against early stage human HCT-116 colon cancer cells and colon cancer stem cells // *Cancers (Basel)*. 2016. Vol. 8, № 3.
22. Chekuri S., Panjala S., Anupalli R.R. Cytotoxic activity of *Acalypha indica* L. hexane extract on breast cancer cell lines (MCF-7) // *Journal of Phytopharmacology*. 2017. Vol. 6, № 5. P. 264-268.
23. Chen C.C., Bowers S., Lipinszki Z., Palladino J., Trusiak S., Bettini E., Mellone B.G. Establishment of centromeric chromatin by the CENP-A assembly factor CAL1 requires FACT-mediated transcription // *Developmental Cell*. 2015. Vol. 34, № 1. P. 73–84.
24. Chen X.H., Lan B., Qu Y., Zhang X.Q., Cai Q., Liu B.Y., Zhu Z.G. Inhibitory effect of Polo-like kinase 1 depletion on mitosis and apoptosis of gastric cancer cells // *World Journal of Gastroenterology*. 2006. Vol. 12, № 1. P. 29–35.
25. Chen Z., Raman M., Chen L., Lee S.F., Gilman A.G., Cobb M.H. TAO (thousand-and-one amino acid) protein kinases mediate signaling from carbachol to p38 mitogen-activated protein kinase and ternary complex factors // *Journal of Biological Chemistry*. 2003. Vol. 278, № 25. P. 22278–22283.
26. Cheung P., Lau P. Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants // *Journal of Molecular Endocrinology*. 2005. Vol. 19, № 3. P. 563–573.
27. Cho U.S., Harrison S.C. Recognition of the centromere-specific histone Cse4 by the chaperone Scm3 // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011. Vol. 108, № 23. P. 9367–9371.
28. Choi E.S., Stralfors A., Castillo A.G., Durand-Dubief M., Ekwall K., Allshire R.C. Identification of noncoding transcripts from within CENP-A chromatin at fission yeast



- centromeres // Journal of Biological Chemistry. 2011. Vol. 286, № 26. P. 23600–23607.
29. Choi E.S., Stralfors A., Catania S., Castillo A.G., Svensson J. P., Pidoux A.L., Allshire R.C. Factors that promote H3 chromatin integrity during transcription prevent promiscuous deposition of CENP-A(Cnp1) in fission yeast // PLOS genetics. 2012. Vol. 8, № 9. P. e1002985.
30. Corish P., Tyler-Smith C. Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells // Protein Engineering. 1999. Vol. 12, № 1. P. 1035-40.
31. Dafhnis-Calas F., Xu Z., Haines S., Malla S.K., Smith M.C., M., Brown W.R.A. Iterative in vivo assembly of large and complex transgenes by combining the activities of phiC31 integrase and Cre recombinase // Nucleic Acids Research. 2005. Vol. 33, № 22. P. e189.
32. de la Ossa M., López Ortiz J., Márquez Fernández D., Martínez Martínez A., Márquez-Fernández M. Biological activity of fractions from the marine sponge *Iotrochota birotulata* IN mammalian cell lines // Revista Cubana de Farmacia. 2016. Vol. 50, № 4. P. 1561-2988.
33. Deb T.B., Coticchia C.M., Barndt R., Zuo H., Dickson R.B., Johnson M.D. Pregnancy-upregulated nonubiquitous calmodulin kinase induces ligand-independent EGFR degradation // American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2008. Vol. 295, № 2. P. C365-77.
34. Deb T.B., Zuo A.H., Wang Y., Barndt R.J., Cheema A.K., Sengupta S., Johnson M.D. Pnck induces ligand-independent EGFR degradation by probable perturbation of the Hsp90 chaperone complex // American Journal of Physiology-Cell Physiology. 2011. Vol. 300, № 5. P. C1139-54.
35. Delespaul L., Lesluyes T., Perot G., Brulard C., Lartigue L., Baud J., Chibon F. Recurrent TRIO Fusion in Nontranslocation-Related Sarcomas // Clinical Cancer Research. 2017. Vol. 23, № 3. P. 857–867.
36. Dernburg A.F. Here there and everywhere: kinetochore function on holocentric chromosomes // Journal of Cell Biology. 2001. Vol. 153, № 6. P. F33-8.

37. Diaz-Ingelmo O., Martinez-Garcia B., Segura J., Valdes A., Roca J. DNA topology and global architecture of point centromeres // *Cell Reports*. 2015. Vol. 13, № 4. P. 667–677.
38. Dover G.A., Tautz D. Conservation and divergence in multigene families: alternatives to selection and drift // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 1986. Vol. 312, № 1154. P. 275–289.
39. Ebersole T., Okamoto Y., Noskov V.N., Kouprina N., Kim J.H., Leem S.H., Larionov V. Rapid generation of long synthetic tandem repeats and its application for analysis in human artificial chromosome formation // *Nucleic Acids Research*. 2005. Vol. 33, № 15. P. e130.
40. Eichler E.E. Repetitive conundrums of centromere structure and function // *Human Molecular Genetics*. 1999. Vol. 8, № 2. P. 151–155.
41. Epstein A.L. Progress and prospects: biological properties and technological advances of herpes simplex virus type 1-based amplicon vectors // *Gene Therapy*. 2009. Vol. 16, № 6. P. 709–715.
42. Fachinetti D., Han J.S., McMahon M.A., Ly P., Abdullah A., Wong A.J., Cleveland D.W. DNA sequence-specific binding of CENP-B enhances the fidelity of human centromere function // *Developmental Cell*. 2015. Vol. 33, № 3. P. 314–327.
43. Falk S.J., Guo L.Y., Sekulic N., Smoak E.M., Mani T., Logsdon G.A., Black B.E. Chromosomes. CENP-C reshapes and stabilizes CENP-A nucleosomes at the centromere // *Science*. 2015. Vol. 348, № 6235. P. 699–703.
44. Falk S.J., Lee J., Sekulic N., Sennett M.A., Lee T.H., Black B.E. CENP-C directs a structural transition of CENP-A nucleosomes mainly through sliding of DNA gyres // *Nature Structural, Molecular Biology*. 2016. Vol. 23, № 3. P. 204–208.
45. Farr C.J., Stevanovic M., Thomson E.J., Goodfellow P.N., Cooke H.J. Telomere-associated chromosome fragmentation: applications in genome manipulation and analysis // *Nature Genetics*. 1992. Vol. 2, № 4. P. 275–282.
46. Folco H.D., Campbell C.S., May K.M., Espinoza C.A., Oegema K., Hardwick K.G., Desai A. The CENP-A N-tail confers epigenetic stability to centromeres via the

- CENP-T branch of the CCAN in fission yeast // *Current Biology*. 2015. Vol. 25, № 3. P. 348–356.
47. Foltz D.R., Jansen L.E., T., Bailey A.O., Yates J.R. Bassett E.A., Wood S., Cleveland D.W. The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex // *Nature cell biology*. 2006a. Vol. 8, № 5. P. 458–469.
48. Foltz D.R., Jansen L.E., T., Black B.E., Bailey A.O., Yates J.R. 3rd Cleveland D.W. The human CENP-A centromeric nucleosome-associated complex // *Nature Cell Biology*. 2006b. Vol. 8, № 5. P. 458–469.
49. Foltz D.R., Jansen L.E., T., Black B.E., Bailey A.O., Yates J.R., Cleveland D.W. Centromere-specific assembly of CENP-a nucleosomes is mediated by HJURP // *Cell*. 2009. Vol. 137, № 3. P. 472–484.
50. Fujita R., Otake K., Arimura Y., Horikoshi N., Miya Y., Shiga T., Kurumizaka H. Stable complex formation of CENP-B with the CENP-A nucleosome // *Nucleic Acids Research*. 2015. Vol. 43, № 10. P. 4909–4922.
51. Furuyama T., Henikoff S. Centromeric nucleosomes induce positive DNA supercoils // *Cell*. 2009. Vol. 138, № 1. P. 104–113.
52. Gardner H. P., Ha S.I., Reynolds C., Chodosh L.A. The caM kinase Pnck is spatially and temporally regulated during murine mammary gland development and may identify an epithelial cell subtype in Vved in breast cancer // *Cancer Research*. 2000. Vol. 60, № 19. P. 5571–5577.
53. Geigl J.B., Obenauf A.C., Schwarzbraun T., Speicher M.R. Defining “chromosomal instability” // *Trends in Genetics*. 2008. Vol. 24, № 2. P. 64–69.
54. Gindullis F., Desel C., Galasso I., Schmidt T. The large-scale organization of the centromeric region in Beta species // *Genome Research*. 2001. Vol. 11, № 2. P. 253–265.
55. Goldberg I.G., Sawhney H., Pluta A.F., Warburton P.E., Earnshaw W.C. Surprising deficiency of CENP-B binding sites in African green monkey alpha-satellite DNA: implications for CENP-B function at centromeres // *Molecular Cell Biology*. 1996. Vol. 16, № 9. P. 5156–5168.

56. Grenfell A.W., Strzelecka M., Heald R. Transcription brings the complex(ity) to the centromere // *Cell Cycle*. 2017. Vol. 16, № 3. P. 235–236.
57. Guse A., Carroll C.W., Moree B., Fuller C.J., Straight A.F. In vitro centromere and kinetochore assembly on defined chromatin templates // *Nature*. 2011. Vol. 477, № 7364. P. 354–358.
58. Haaf T., Ward D.C. Rabl orientation of CENP-B box sequences in *Tupaia belangeri* fibroblasts // *Cytogenetics and Cell Genetics*. 1995. Vol. 70, № 3–4. P. 258–262.
59. Harrington J.J., Van Bokkelen G., Mays R.W., Gustashaw K., Willard H.F. Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes // *Nature Genetics*. 1997. Vol. 15, № 4. P. 345–355.
60. Heinrich S., Sewart K., Windecker H., Langeegger M., Schmidt N., Hustedt N., Hauf S. MAD1 contribution to spindle assembly checkpoint signalling goes beyond presenting Mad2 at kinetochores // *EMBO Reports*. 2014. Vol. 15, № 3. P. 291–298.
61. Heng H.H., Bremer S.W., Stevens J.B., Horne S.D., Liu G., Abdallah B.Y., Ye C.J. Chromosomal instability (CIN): what it is and why it is crucial to cancer evolution // *Cancer Metastasis Rev.* 2013. Vol. 32, № 3–4. P. 325–340.
62. Henikoff J.G., Thakur J., Kasinathan S., Henikoff S. A unique chromatin complex occupies young alpha-satellite arrays of human centromeres // *Science Advances*. 2015. Vol. 1, № 1.
63. Henikoff S., Ahmad K., Malik H.S. The centromere paradox: stable inheritance with rapidly eVving DNA // *Science*. 2001. Vol. 293, № 5532. P. 1098–1102.
64. Hergovich A., Lamla S., Nigg E.A., Hemmings B.A. Centrosome-associated NDR kinase regulates centrosome duplication // *Molecular Cell*. 2007. Vol. 25, № 4. P. 625–634.
65. Hewawasam G., Shivaraju M., Mattingly M., Venkatesh S., Martin-Brown S., Florens L., Gerton J.L. Psh1 is an E3 ubiquitin ligase that targets the centromeric histone variant Cse4 // *Molecular Cell*. 2010. Vol. 40, № 3. P. 444–454.
66. Hibbitt O.C., Wade-Martins R. Delivery of large genomic DNA inserts >100 kb using HSV-1 amplicons // *Current Gene Therapy*. 2006. Vol. 6, № 3. P. 325–336.

67. Hildebrand E.M., Biggins S. regulation of budding yeast CENP-A levels prevents misincorporation at promoter nucleosomes and transcriptional defects // *PLOS genetics*. 2016. Vol. 12, № 3. P. e1005930.
68. Hiratsuka M., Uno N., Ueda K., Kurosaki H., Imaoka N., Kazuki K., Oshimura M. Integration-free iPS cells engineered using human artificial chromosome vectors // *PLOS ONE* 2011. Vol. 6, № 10. P. e25961.
69. Hori T., Amano M., Suzuki A., Backer C.B., Welburn J. P., Dong Y., Fukagawa T. CCAN makes multiple contacts with centromeric DNA to provide distinct pathways to the outer kinetochore // *Cell*. 2008. Vol. 135, № 6. P. 1039–1052.
70. Hori T., Shang W.H., Takeuchi K., Fukagawa T. The CCAN recruits CENP-A to the centromere and forms the structural core for kinetochore assembly // *Journal of Cell Biology*. 2013. Vol. 200, № 1. P. 45–60.
71. Horvath J.E., Gulden C.L., Vallente R.U., Eichler M.Y., Ventura M., McPherson J.D., Eichler E.E. Punctuated duplication seeding events during the evolution of human chromosome 2p11 // *Genome Research*. 2005. Vol. 15, № 7. P. 914–927.
72. Hyman A.A., Sorger P.K. Structure and function of kinetochores in budding yeast // *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 1995. Vol. 11. P. 471–495.
73. Iida Y., Kim J.H., Kazuki Y., Hoshiya H., Takiguchi M., Hayashi M., Oshimura M. Human artificial chromosome with a conditional centromere for gene delivery and gene expression // *DNA Res*. 2010. Vol. 17, № 5. P. 293–301.
74. Izuta H., Ikeno M., Suzuki N., Tomonaga T., Nozaki N., Obuse C., Yoda K. Comprehensive analysis of the ICEN (Interphase Centromere Complex) components enriched in the CENP-A chromatin of human cells // *Genes Cells*. 2006. Vol. 11, № 6. P. 673–684.
75. Janssen A., Kops G.J.P.L., Medema R.H. Elevating the frequency of chromosome mis-segregation as a strategy to kill tumor cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. Vol. 106, № 45. P. 19108–19113.
76. Jedinak A., Sliva D. *Pleurotus ostreatus* inhibits proliferation of human breast and colon cancer cells through p53-dependent as well as p53-independent pathway // *International Journal of Oncology*. 2008. Vol. 33, № 6. P. 1307–1313.

77. Jiang J.Q., Patrick A., Moss R.B., Rosenthal K.L. CD8<sup>+</sup> T-cell-mediated cross-clade protection in the genital tract following intranasal immunization with inactivated human immunodeficiency virus antigen plus CpG oligodeoxynucleotides // *J. Virol.* 2005. Vol. 79, № 1. P. 393–400.
78. Kakeda M, Hiratsuka M., Nagata K., Kuroiwa Y., Kakitani M., Katoh M., Tomizuka K. Human artificial chromosome (HAC) vector provides long-term therapeutic transgene expression in normal human primary fibroblasts // *Gene Therapy.* 2005. Vol. 12, № 10. P. 852–856.
79. Kakeda Minoru Nagata K., Osawa K., Matsuno H., Hiratsuka M., Sano A., Tomizuka K. A new chromosome 14-based human artificial chromosome (HAC) vector system for efficient transgene expression in human primary cells // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2011. Vol. 415, № 3. P. 439–444.
80. Kapoor M., Montes de Oca Luna R., Liu G., Lozano G., Cummings C., Mancini M., May G.S. The cenpB gene is not essential in mice // *Chromosoma.* 1998. Vol. 107, № 8. P. 570–576.
81. Kato H., Jiang J., Zhou B.R., Rozendaal M., Feng H., Ghirlando R., Bai Y. A conserved mechanism for centromeric nucleosome recognition by centromere protein CENP-C // *Science.* 2013. Vol. 340, № 6136. P. 1110–1113.
82. Katoh M., Ayabe F., Norikane S., Okada T., Masumoto H., Horike S., Oshimura M. Construction of a novel human artificial chromosome vector for gene delivery // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2004. Vol. 321, № 2. P. 280–290.
83. Kazuki Y, Hoshiya H., Kai Y., Abe S., Takiguchi M., Osaki M., Oshimura M. Correction of a genetic defect in multipotent germline stem cells using a human artificial chromosome // *Gene Therapy.* 2008. Vol. 15, № 8. P. 617–624.
84. Kazuki Y, Hoshiya H., Takiguchi M., Abe S., Iida Y., Osaki M., Oshimura M. Complete genetic correction of ips cells from Duchenne muscular dystrophy // *Molecular Therapy.* 2010. Vol. 18, № 2. P. 386–393.

85. Kazuki Y., Oshimura M. Human artificial chromosomes for gene delivery and the development of animal models // *Molecular Therapy*. 2011. Vol. 19, № 9. P. 1591–1601.
86. Kazuki Yasuhiro Hiratsuka M., Takiguchi M., Osaki M., Kajitani N., Hoshiya H., Oshimura M. Refined human artificial chromosome vectors for gene therapy and animal transgenesis // *Gene Therapy*. 2011. Vol. 18, № 4. P. 384–393.
87. Kim J.H., Kononenko A., Erliandri I., Kim T.A., Nakano M., Iida Y., Kouprina N. Human artificial chromosome (HAC) vector with a conditional centromere for correction of genetic deficiencies in human cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011. Vol. 108, № 50. P. 20048–20053.
88. Kim J.H., Lee H.S., Lee N.C., O., Goncharov N.V., Kumeiko V., Masumoto H., Larionov V. Development of a novel HAC-based “gain of signal” quantitative assay for measuring chromosome instability (CIN) in cancer cells // *Oncotarget*. 2016. Vol. 7, № 12. P. 14841–14856.
89. Kiraz Y., Neergheen-Bhujun V.S., Rummun N., Baran Y. Apoptotic effects of non-edible parts of *Punicagranatum* on human multiple myeloma cells // *Tumor Biology*. 2016. Vol. 37, № 2. P. 1803–1815.
90. Kirsch-Vders M. Towards a validation of the micronucleus test // *Mutat. Res*. 1997. Vol. 392, № 1–2. P. 1–4.
91. Kononenko A.V., Lee N.C., O., Liskovykh M., Masumoto H., Earnshaw W.C., Larionov V., Kouprina N. Generation of a conditionally self-eliminating HAC gene delivery vector through incorporation of a tTAVP64 expression cassette // *Nucleic Acids Research*. 2015. Vol. 43, № 9. P. e57.
92. Kotzamanis G., Cheung W., Abdulrazzak H., Perez-Luz S., Howe S., Cooke H., Huxley C. Construction of human artificial chromosome vectors by recombineering // *Gene*. 2005. Vol. 351. P. 29–38.
93. Kouprina N., Pommier Y., Larionov V. Novel screen for anti-cancer drugs that elevate chromosome instability (CIN) using human artificial chromosome (HAC) // *Oncotarget*. 2018. Vol. 9, № 96. P. 36833–36835.

94. Kouprina N., Samoshkin A., Erliandri I., Nakano M., Lee H.S., Fu H., Larionov V. Organization of synthetic alphoid DNA array in human artificial chromosome (HAC) with a conditional centromere. *ACS Synthetic Biology*. 2012 Vol. 1 №12. P. 590–601.
95. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function // *Cell*. 2007. Vol. 128, № 4. P. 693–705.
96. Kunitoku N., Sasayama T., Marumoto T., Zhang D., Honda S., Kobayashi O., Hirota T. CENP-A phosphorylation by aurora-a in prophase is required for enrichment of Aurora-B at inner centromeres and for kinetochore function // *Developmental Cell*. 2003. Vol. 5, № 6. P. 853–864.
97. Kuo L.J., Yang L.X. Gamma-H2AX - a novel biomarker for DNA double-strand breaks // *In Vivo*. 2008. Vol. 22, № 3. P. 305–309.
98. Lam A.L., Boivin C.D., Bonney C.F., Rudd M.K., Sullivan B.A. Human centromeric chromatin is a dynamic chromosomal domain that can spread over noncentromeric DNA // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. Vol. 103, № 11. P. 4186–4191.
99. Lan J., Zhu Y., Xu L., Yu H., Yu J., Liu X., Dou Z. The 68-kDa telomeric repeat binding factor 1 (TRF1)-associated protein (TAP68) interacts with and recruits TRF1 to the spindle pole during mitosis // *Journal of Biological Chemistry*. 2014. Vol. 289, № 20. P. 14145–14156.
100. Lee H.S., Lee N.C., O., Grimes B.R., Samoshkin A., Kononenko A. V, Bansal R., Larionov V. A new assay for measuring chromosome instability (CIN) and identification of drugs that elevate CIN in cancer cells // *BMC Cancer*. 2013a. Vol. 13. P. 252.
101. Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B. Genetic instability in colorectal cancers // *Nature*. 1997. Vol. 386, № 6625. P. 623–627.
102. Lettini A.A., Guidoboni M., Fonsatti E., Anzalone L., Cortini E., Maio M. Epigenetic remodeling of DNA in cancer // *Histol. Histopathol*. 2007. Vol. 22, № 12. P. 1413–1424.



103. Liang Z., Sulzmaier F. J., Yoshida W. Y., Kelly M., Ramos J. W., Williams P. G. Neopetrocyclamines A and B, polycyclic diamine alkaloids from the sponge *Neopetrosia cf exigua* // Journal of natural products. 2015. Vol. 78, № 3. P. 543–547.
104. Liskovykh M., Goncharov N. V, Petrov N., Aksenova V., Pegoraro G., Ozbun L.L., Kouprina N. A novel assay to screen siRNA libraries identifies protein kinases as required for chromosome transmission // Genome Research. 2019.
105. Logsdon G.A., Barrey E.J., Bassett E.A., DeNizio J.E., Guo L.Y., Panchenko T., Black B.E. Both tails and the centromere targeting domain of CENP-A are required for centromere establishment // Journal of Cell Biology. 2015. Vol. 208, № 5. P. 521–531.
106. Lufino M.M.P., Edser P.A.H., Wade-Martins R. Advances in high-capacity extrachromosomal vector technology: episomal maintenance vector delivery and transgene expression // Molecular Therapy. 2008. Vol. 16, № 9. P. 1525–1538.
107. Ma J., Jackson S.A. Retrotransposon accumulation and satellite amplification mediated by segmental duplication facilitate centromere expansion in rice // Genome Research. 2006. Vol. 16, № 2. P. 251–259.
108. Madlener S., Svacinová J., Kitner M., Kopecky J., Eytner R., Lackner A., Vo T.P., Frisch R., Grusch M., De Martin R., Dolezal K., Strnad M., Krupitza G. In vitro anti-inflammatory and anticancer activities of extracts of *Acalypha alopecuroidea* (Euphorbiaceae) // International Journal of Oncology. 2009. Vol. 35, № 4. P. 881-891.
109. Maheshwari S., Tan E.H., West A., Franklin F.C., H., Comai L., Chan S.W.L. Naturally occurring differences in CENPA affect chromosome segregation in zygotic mitosis of hybrids // PLOS genetics. 2015. Vol. 11, № 1. P. e1004970.
110. Mahfoudhi E., Talhaoui I., Cabagnols X., Della Valle V., Secardin L., Rameau P., Plo I. TET2-mediated 5-hydroxymethylcytosine induces genetic instability and mutagenesis // DNA Repair (Amst). 2016. Vol. 43. P. 78–88.
111. Mahtani M.M., Willard H.F. Physical and genetic mapping of the human X chromosome centromere: repression of recombination // Genome Research. 1998. Vol. 8, № 2. P. 100–110.

112. Maier P., Kalle C. von Laufs S. Retroviral vectors for gene therapy // *Future Microbiology*. 2010. Vol. 5, № 10. P. 1507–1523.
113. Malik H.S. Henikoff S. Phylogenomics of the nucleosome // *Nature Structural & Molecular Biology*. 2003. Vol. 10, № 11. P. 882–891.
114. Malik H.S., Henikoff S. Majore. Visionary transitions in centromere complexity // *Cell*. 2009. Vol. 138, № 6. P. 1067–1082.
115. Martins N.M.C., Bergmann J.H., Shono N., Kimura H., Larionov V., Masumoto H., Earnshaw W.C. Epigenetic engineering shows that a human centromere resists silencing mediated by H3K27me3/K9me3 // *Molecular Biology of the Cell*. 2016. Vol. 27, № 1. P. 177–196.
116. Masumoto H, Masukata H., Muro Y., Nozaki N., Okazaki T. A human centromere antigen (CENP-B) interacts with a short specific sequence in alphoidDNA, a human centromeric satellite // *Journal of Cell Biology*. 1989. Vol. 109, № 5. P. 1963–1973.
117. Masumoto H., Nakano M., Ohzeki J.I. The role of CENP-B and alpha-satellite DNA: de novo assembly and epigenetic maintenance of human centromeres // *Chromosome research*. 2004. Vol. 12, № 6. P. 543–556.
118. Mateo L., Gonzalez J. Pogo-like transposases have been repeatedly domesticated into CENP-B-related proteins // *Genome Biol. EV*. 2014. Vol. 6, № 8. P. 2008–2016.
119. McGranahan N., Burrell R.A., Endesfelder D., Novelli M.R., Swanton C. Cancer chromosomal instability: therapeutic and diagnostic challenges // *EMBO Reports*. 2012. Vol. 13, № 6. P. 528–538.
120. Mestrovic N., Pavlek M., Car A., Castagnone-Sereno P., Abad P., Plohl M. Conserved DNA motifs Including the CENP-B box-like are possible promoters of satellite DNA array rearrangements in nematodes // *PLOS ONE*. 2013. Vol. 8, № 6. P. e67328.
121. Mingozzi F., High K.A. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges // *Nature Reviews Genetics*. 2011. Vol. 12, № 5. P. 341–355.

122. Moralli D., Simpson K.M., Wade-Martins R., Monaco Z.L. A novel human artificial chromosome gene expression system using herpes simplex virus type 1 vectors // *EMBO Reports*. 2006. Vol. 7, № 9. P. 911–918.
123. Mravinac B., Ugarkovic E., Franjevic D., Plohl M. Long inversely oriented subunits form a complex monomer of *Tribolium brevicornis* satellite DNA // *Journal of Molecular Evolution*. 2005. Vol. 60, № 4. P. 513–525.
124. Muro Y., Masumoto H., Yoda K., Nozaki N., Ohashi M., Okazaki T. Centromere protein B assembles human centromeric alpha-satellite DNA at the 17-bp sequence CENP-B box // *Journal of Cell Biology*. 1992. Vol. 116, № 3. P. 585–596.
125. Musacchio A. The Molecular Biology of Spindle Assembly Checkpoint Signaling Dynamics // *Current Biology*. 2015. Vol. 25, № 20. P. R1002-18.
126. Nagpal H., Hori T., Furukawa A., Sugase K., Osakabe A., Kurumizaka H., Fukagawa T. Dynamic changes in CCAN organization through CENP-C during cell-cycle progression // *Molecular Biology of the Cell*. 2015. Vol. 26, № 21. P. 3768–3776.
127. Nakano M., Cardinale S., Noskov V.N., Gassmann R., Vagnarelli P., Kandels-Lewis S., Masumoto H. Inactivation of a human kinetochore by specific targeting of chromatin modifiers // *Developmental Cell*. 2008. Vol. 14, № 4. P. 507–522.
128. Nishino T., Takeuchi K., Gascoigne K.E., Suzuki A., Hori T., Oyama T., Fukagawa T. CENP-T-W-S-X forms a unique centromeric chromatin structure with a histone-like fold // *Cell*. 2012. Vol. 148, № 3. P. 487–501.
129. Núñez J.G., Pinheiro J. dos S., Silveira G. F., Beckenkamp A., Buffon A., Bruno A.N. Antineoplastic potential of the aqueous crude extract of *Eugenia uniflora* L. in human cervical cancer // *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018. Vol. 54, № 2.
130. Ohno N., Furukawa M., Miura N.N., Adachi Y., Motoi M., Yadomae T. Antitumor beta glucan from the cultured fruit body of *Agaricus blazei* // *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2001. Vol. 24, № 7. P. 820-828.

131. Ohzeki J., Bergmann J.H., Kouprina N., Noskov V.N., Nakano M., Kimura H., Masumoto H. CENP-B box is required for de novo centromere chromatin assembly on human alphoid DNA // *Journal of Cell Biology*. 2002. Vol. 159, № 5. P. 765–775.
132. Ohzeki J.I., Shono N., Otake K., Martins N.M.C., Kugou K., Kimura H., Masumoto H. KAT7/HBO1/MYST2 regulates CENP-A chromatin assembly by antagonizing suv39h1-mediated centromere inactivation // *Developmental Cell*. 2016. Vol. 37, № 5. P. 413–427.
133. Okada M., Okawa K., Isobe T., & Fukagawa T. CENP-H-containing complex facilitates centromere deposition of CENP-A in cooperation with FACT and CHD1 // *Molecular Biology of the Cell*. 2009. Vol. 20, № 18. P. 3986–3995.
134. Okada M., Okawa K., Isobe T., Fukagawa T. Breaking the HAC barrier: histone H3K9 acetyl/methyl balance regulates CENP-A assembly // *EMBO Journal*. 2012. Vol. 31, № 10. P. 2391–2402.
135. Okada T., Ohzeki J., Nakano M., Yoda K., Brinkley W.R., Larionov V., Masumoto H. CENP-B controls centromere formation depending on the chromatin context // *Cell*. 2007. Vol. 131, № 7. P. 1287–1300.
136. Park J.E., Woo S.R., Kang C.M., Juhn K.M., Ju Y.J., Shin H.J., Lee K.H. Paclitaxel stimulates chromosomal fusion and instability in cells with dysfunctional telomeres: implication in multinucleation and chemosensitization // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011. Vol. 404, № 2. P. 615–621.
137. Perez-Castro A. V., Shamanski F.L., Meneses J.J., Lovato T.L., Vogel K.G., Moyzis R.K., Pedersen R. Centromeric protein B null mice are viable with no apparent abnormalities // *Dev. Biol*. 1998. Vol. 201, № 2. P. 135–143.
138. Pike T., Brownlow N., Kjaer S., Carlton J., Parker P.J. PKC $\epsilon$  switches Aurora B specificity to exit the abscission checkpoint // *Nat. Commun*. 2016. Vol. 7. P. 13853.
139. Pikor L., Thu K., Vucic E., Lam W. The detection and implication of genome instability in cancer // *Cancer Metastasis Rev*. 2013. Vol. 32, № 3–4. P. 341–352.

140. Prendergast L., Muller S., Liu Y., Huang H., Dingli F., Loew D., Almouzni G. The CENP-T/-W complex is a binding partner of the histone chaperone FACT // *Genes Dev.* 2016. Vol. 30, № 11. P. 1313–1326.
141. Quenet D., Dalal Y. A long non-coding RNA is required for targeting centromeric protein A to the human centromere // *Elife.* 2014. Vol. 3. P. e03254.
142. Raman M., Earnest S., Zhang K., Zhao Y., Cobb M.H. TAO kinases mediate activation of p38 in response to DNA damage // *EMBO Journal.* 2007. Vol. 26, № 8. P. 2005–2014.
143. Ranjitkar P., Press M.O., Yi X., Baker R., MacCoss M.J., Biggins S. An E3 ubiquitin ligase prevents ectopic localization of the centromeric histone H3 variant via the centromere targeting domain // *Molecular Cell.* 2010. Vol. 40, № 3. P. 455–464.
144. Ravi M., Kwong P.N., Menorca R.M.G., Valencia J.T., Ramahi J.S., Stewart J.L., Chan S.W.L. The rapidly evolving centromere-specific histone has stringent functional requirements in *Arabidopsis thaliana* // *Genetics.* 2010. Vol. 186, № 2. P. 461–471.
145. Ren X., Katoh M., Hoshiya H., Kurimasa A., Inoue T., Ayabe F., Oshimura M. A novel human artificial chromosome vector provides effective cell lineage-specific transgene expression in human mesenchymal stem cells // *Stem Cells.* 2005. Vol. 23, № 10. P. 1608–1616.
146. Ribeiro S.A., Vagnarelli P., Dong Y., Hori T., McEwen B.F., Fukagawa T., Earnshaw W.C. A super-resolution map of the vertebrate kinetochore // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2010. Vol. 107, № 23. P. 10484–10489.
147. Roulland Y., Ouararhni K., Naidenov M., Ramos L., Shuaib M., Syed S.H., Dimitrov S. The flexible ends of CENP-A nucleosome are required for mitotic fidelity // *Molecular Cell.* 2016. Vol. 63, № 4. P. 674–685.
148. Rummun N., Hughes R.E., Beesoo R., Li W.W., Aldulaimi O., Macleod K.G., Bahorun T., Carragher N.O., Kagansky A., Neergheen-Bhujun V.S. Mauritian endemic medicinal plant extracts induce g2/m phase cell cycle arrest and growth inhibition of oesophageal squamous cell carcinoma in vitro // *Acta Naturae.* 2019. Vol. 11, № 1. P. 81-90.

149. Sadeghi L., Siggins L., Svensson J. P., Ekwall K. Centromeric histone H2B monoubiquitination promotes noncoding transcription and chromatin integrity // *Nature Structural & Molecular Biology*. 2014. Vol. 21, № 3. P. 236–243.
150. Sakaue-Sawano A., Hoshida T., Yo M., Takahashi R., Ohtawa K., Arai T., Miyawaki A. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progression // *Cell*. 2008. Vol. 132, № 3. P. 487–498.
151. Sakaue-Sawano A., Kurokawa H., Morimura T., Hanyu A., Hama H., Osawa H., Miyawaki A. Visualizing developmentally programmed endoreplication in mammals using ubiquitin oscillators // *Development*. 2013. Vol. 140, № 22. P. 4624–4632.
152. Sakaue-Sawano A., Miyawaki A. Visualizing spatiotemporal dynamics of multicellular cell-cycle progressions with fucci technology // *Cold Spring Harbor Protocols*. 2014. Vol. 2014, № 5.
153. Schalch T., Steiner F.A. Structure of centromere chromatin: from nucleosome to chromosomal architecture // *Chromosoma*. 2017. Vol. 126, № 4. P. 443–455.
154. Schueler M G, Higgins A.W., Rudd M.K., Gustashaw K., Willard H.F. Genomic and genetic definition of a functional human centromere // *Science*. 2001. Vol. 294, № 5540. P. 109–115.
155. Schueler M.G., Sullivan B.A. Structural and functional dynamics of human centromeric chromatin // *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2006a. Vol. 7, № 1. P. 301–313.
156. Seipel K., O'Brien S.P., Iannotti E., Medley Q.G., Streuli M. Tara a novel F-actin binding protein associates with the trio guanine nucleotide exchange factor and regulates actin cytoskeletal organization // *Journal of Cell Science*. 2001. Vol. 114, № Pt 2. P. 389–399.
157. Shi Y., Inoue H., Wu J.C., Yamanaka S. Induced pluripotent stem cell technology: a decade of progress // *Nature Reviews Drug Discovery*. 2017. Vol. 16, № 2. P. 115–130.
158. Shirode A.B., Kovvuru P., Chittur S.V., Henning S.M., Heber D., Reliene R. Antiproliferative effects of pomegranate extract in MCF-7 breast cancer cells are

- associated with reduced DNA repair gene expression and induction of double strand breaks // *Molecular Carcinogenesis*. 2014. Vol. 53, № 6. P. 458–470.
159. Silk A.D., Zasadil L.M., Holland A.J., Vitre B., Cleveland D.W., Weaver B.A. Chromosome missegregation rate predicts whether aneuploidy will promote or suppress tumors // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013. Vol. 110, № 44. P. E4134–41.
160. Sims R.J., 3rd Nishioka K., Reinberg D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function // *Trends in Genetics*. 2003. Vol. 19, № 11. P. 629–639.
161. Stirling P.C., Bloom M.S., Solanki-Patil T., Smith S., Sipahimalani P., Li Z., Hieter P. The complete spectrum of yeast chromosome instability genes identifies candidate CIN cancer genes and functional roles for ASTRA complex components // *PLOS genetics*. 2011. Vol. 7, № 4. P. e1002057.
162. Stirling P.C., Crisp M.J., Basrai M.A., Tucker C.M., Dunham M.J., Spencer F.A., Hieter P. Mutability and mutational spectrum of chromosome transmission fidelity genes // *Chromosoma*. 2012. Vol. 121, № 3. P. 263–275.
163. Stukenberg P.T., Burke D.J. Connecting the microtubule attachment status of each kinetochore to cell cycle arrest through the spindle assembly checkpoint // *Chromosoma*. 2015. Vol. 124, № 4. P. 463–480.
164. Sturt E., Smith C.A. The relationship between chromatid interference and the mapping function // *Cytogenetics and Cell Genetics*. 1976. Vol. 17, № 4. P. 212–220.
165. Sugimoto K., Yata H., Muro Y., Himeno M. Human centromere protein C (CENP-C) is a DNA-binding protein which possesses a novel DNA-binding motif // *Journal of Biochemistry*. 1994. Vol. 116, № 4. P. 877–881.
166. Sullivan B.A., Karpen G.H. Centromeric chromatin exhibits a histone modification pattern that is distinct from both euchromatin and heterochromatin // *Nature Structural & Molecular Biology*. 2004. Vol. 11, № 11. P. 1076–1083.
167. Swanton C., Nicke B., Schuett M., Eklund A.C., Ng C., Li Q., Downward J. Chromosomal instability determines taxane response // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2009. Vol. 106, № 21. P. 8671–8676.

168. Tachiwana H., Kurumizaka H. Structure of the CENP-A nucleosome and its implications for centromeric chromatin architecture // *Genes Genet. Syst.* 2011. Vol. 86, № 6. P. 357–364.
169. Takeuchi K., Nishino T., Mayanagi K., Horikoshi N., Osakabe A., Tachiwana H., Fukagawa T. The centromeric nucleosome-like CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA // *Nucleic Acids Research.* 2014. Vol. 42, № 3. P. 1644–1655.
170. Talbert P.B., Henikoff S. Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome // *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2010. Vol. 11, № 4. P. 264–275.
171. Thakur J., Henikoff S. CENPT bridges adjacent CENPA nucleosomes on young human alpha-satellite dimers // *Genome Research.* 2016. Vol. 26, № 9. P. 1178–1187.
172. Thutkawkorapin J., Picelli S., Kontham V., Liu T., Nilsson D., Lindblom A. Exome sequencing in one family with gastric- and rectal cancer // *BMC Genetics.* 2016. Vol. 17. P. 41.
173. Toda K., Nagasaka T., Umeda Y., Tanaka T., Kawai T., Fuji T., Fujiwara T. Genetic and epigenetic alterations of netrin-1 receptors in gastric cancer with chromosomal instability // *Clinical Epigenetics.* 2015. Vol. 7. P. 73.
174. Voullaire L.E., Slater H.R., Petrovic V., Choo K.H. A functional marker centromere with no detectable alpha-satellite satellite III, or CENP-B protein: activation of a latent centromere? // *American Journal of Human Genetics.* 1993. Vol. 52, № 6. P. 1153–1163.
175. Wang B., Fang J., Qu L., Cao Z., Zhou J., Deng B. Upregulated TRIO expression correlates with a malignant phenotype in human hepatocellular carcinoma // *Tumor Biology.* 2015. Vol. 36, № 9. P. 6901–6908.
176. Warburton P.E. Epigenetic analysis of kinetochore assembly on variant human centromeres // *Trends in Genetics.* 2001. Vol. 17, № 5. P. 243–247.
177. Weaver B.A., How Taxol/paclitaxel kills cancer cells // *Molecular Biology of the Cell.* 2014. Vol. 25, № 18. P. 2677–2681.



178. Westhorpe F.G., Fuller C.J., Straight A.F. A cell-free CENP-A assembly system defines the chromatin requirements for centromere maintenance // *Journal of Cell Biology*. 2015. Vol. 209, № 6. P. 789–801.
179. Wieland G., Orthaus S., Ohndorf S., Diekmann S., Hemmerich P. Functional complementation of human centromere protein A (CENP-A) by Cse4p from *Saccharomyces cerevisiae* // *Molecular Cell Biology*. 2004. Vol. 24, № 15. P. 6620–6630.
180. Wood V., Gwilliam R., Rajandream M.A., Lyne M., Lyne R., Stewart A., Nurse P. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe* // *Nature*. 2002. Vol. 415, № 6874. P. 871–880.
181. Wu J.Y., Chen C.H., Chang W.H., Chung K.T., Liu, Y.W., Lu F.J., Chen C.H. Anti-cancer effects of protein extracts from *Calvatia lilacina*, *pleurotus ostreatus* and *Vol.variella Vol.vacea* // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2011. P. 1-10.
182. Wu M.F., Wang S.G. Human TAO kinase 1 induces apoptosis in SH-SY5Y cells // *Cell Biology International*. 2008. Vol. 32, № 1. P. 151–156.
183. Wu S., Lv Z., Wang Y., Sun L., Jiang Z., Xu C., Wang R. Increased expression of pregnancy up-regulated non-ubiquitous calmodulin kinase is associated with poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma // *PLOS ONE* 2013. Vol. 8, № 4. P. e59936.
184. Yamaguchi S., Kazuki Y., Nakayama Y., Nanba E., Oshimura M., Ohbayashi T. A method for producing transgenic cells using a multi-integrase system on a human artificial chromosome vector // *PLOS ONE* 2011. Vol. 6, № 2. P. e17267.
185. Yu C.H., Kan S.F., Shu C.H., Lu T.J., Sun-Hwang L., Wang P.S. Inhibitory mechanisms of *Agaricus blazei* Murill on the growth of prostate cancer *in vitro* and *in vivo* // *Journal of Nutritional Biochemistry*. 2009. Vol. 20, № 10. P. 753–764.
186. Yu J., Lan J., Zhu Y., Li X., Lai X., Xue Y., Huang H. The E3 ubiquitin ligase HECTD3 regulates ubiquitination and degradation of Tara // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2008. Vol. 367, № 4. P. 805–812.

187. Yuen K.W., Desai A. The wages of CIN // *Journal of Cell Biology*. 2008. Vol. 180, № 4. P. 661–663.
188. Yustein J.T., Xia L., Kahlenburg J.M., Robinson D., Templeton D., Kung H.J. Comparative studies of a new subfamily of human Ste20-like kinases: homodimerization subcellular localization and selective activation of MKK3 and p38 // *Oncogene*. 2003. Vol. 22, № 40. P. 6129–6141.
189. Zaratiegui M., Vaughn M.W., Irvine D. V, Goto D., Watt S., Bahler J., Martienssen R.A. CENP-B preserves genome integrity at replication forks paused by retrotransposon LTR // *Nature*. 2011. Vol. 469, № 7328. P. 112–115.
190. Zhang H., Berezov A., Wang Q., Zhang G., Drebin J., Murali R., Greene M.I. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer therapies // *Journal of Clinical Investigation*. 2007. Vol. 117, № 8. P. 2051–2058.
191. Zhang R., Gu J., Chen J., Ni J., Hung J., Wang Z., Ji L. High expression of PINK1 promotes proliferation and chemoresistance of NSCLC // *Oncology Reports*. 2017. Vol. 37, № 4. P. 2137–2146.
192. Zhao H., Winogradoff D., Bui M., Dalal Y., Papoian G.A. Promiscuous histone mis-assembly is actively prevented by chaperones // *Journal of the American Chemical Society*. 2016. Vol. 138, № 40. P. 13207–13218.
193. Zhou Z., Feng H., Zhou B.R., Ghirlando R., Hu K., Zwolak A., Bai Y. Structural basis for recognition of centromere histone variant CENPA by the chaperone Scm3 // *Nature*. 2011. Vol. 472, № 7342. P. 234–237.
194. Zhu Y., Wang C., Lan J., Yu J., Jin C., Huang H. Phosphorylation of Tara by Plk1 is essential for faithful chromosome segregation in mitosis // *Experimental Cell Research*. 2012. Vol. 318, № 18. P. 2344–2352.
195. Zihni C., Mitsopoulos C., Tavares I.A., Ridley A.J., Morris J.D., H. Prostate-derived sterile 20-like kinase 2 (PSK2) regulates apoptotic morphology via C-Jun N-terminal kinase and Rho kinase-1 // *Journal of Biological Chemistry*. 2006. Vol. 281, № 11. P. 7317–7323.