

**В.М. Щербіна**  
**А.В. Чумак**  
**О.В. Кашуба**

*Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна*

**Ключові слова:** клітинний цикл, пошкодження ДНК, репарація.

## МОЛЕКУЛЯРНІ МЕХАНІЗМИ ВИНИКНЕННЯ ПОШКОДЖЕНЬ ДНК ТА ЇХ РЕПАРАЦІЇ В НОРМАЛЬНИХ І ЗЛОЯКІСНИХ КЛІТИНАХ

*Реплікативний стрес є одним з вагомих факторів, який відіграє значну роль у процесах формування та прогресії багатьох типів злоякісних новоутворень, що неодноразово було продемонстровано експериментальним шляхом. Помилки в роботі полімерази, які виникають під час процесу реплікації; порушення процесів регуляції, координації та контролю над процесом реплікації; виникнення мутацій у генах, задіяних у цьому процесі тощо — усе це призводить у кінцевому підсумку до розбалансування та затримки реплікації, руйнування реплікативних вилок, виникнення порушень цілісності ланцюгів ДНК, у тому числі за рахунок появи дволанцюгових розривів. Як наслідок, усе вищезазначене зумовлює виникнення нових мутацій та хромосомних перебудов, що спричиняє пухлинну прогресію в цілому. У цій роботі проаналізовано та систематизовано молекулярні механізми, які координують процеси репарації пошкоджень ДНК у нормальних клітинах та за умов виникнення пухлинного росту.*

Злоякісна трансформація клітин є тривалим комплексним процесом, що включає зміну та/або набуття клітиною нових морфо-функціональних ознак, які забезпечують можливість трансформованих клітин активно конкурувати за поживні ресурси, уникати контролю з боку імунної системи, збільшує здатність до неконтрольованого поділу, інвазії та метастазування тощо. На сьогодні виділяють цілий ряд ознак, які є характерними для пухлинного процесу, однією з яких є наявність мутацій та нестабільність геному в цілому [1]. Загалом для будь-якого типу пухлин можна назвати перелік характерних для певної нозології мутацій, наявність яких є не лише пасивним маркером цього типу пухлинного процесу або такого, що корелює із характером перебігу захворювання, а й змінює функціональний стан клітин у цілому. Зокрема, зміни рівня експресії протоонкогенів та генів-супресорів, які виникають внаслідок генетичної нестабільності, зумовлюють високу генетичну пластичність пухлинних клітин і, отже, відіграють провідну роль у процесах ініціації та прогресії пухлинного росту [2]. Уперше гіпотезу про вагомість виникнення мутацій у соматичних клітинах як ініціувального фактора у процесі канцерогенезу було висунуто Альфредом Кнудсоном ще у 1970-х роках; згодом її було трансформовано у теорію мутаційного канцерогенезу, яка наразі є ключовою і загальноприйнятою [3, 4].

Слід наголосити, що реплікативний стрес, який часто супроводжується формуванням розривів у ланцюгах ДНК не є характерною ознакою саме злоякісно трансформованих клітин, також він час-

то виникає в нормальних клітинах під час процесу транскрипції. Однак, на відміну від пухлинних клітин, у нормі в клітинах функціонує цілий спектр точок контролю (чекпойнти) та репараційних процесів, що або відновлюють цілісну структуру ДНК ланцюга у разі наявних пошкоджень, або активують програму апоптозу з метою елімінації таких клітин [5].

### РЕГУЛЯЦІЯ КЛІТИННОГО ЦИКЛУ У ТОЧКАХ ЧЕКПОЙНТІВ ЗА НОРМАЛЬНИХ УМОВ І У РАЗІ ВИНИКНЕННЯ ПОШКОДЖЕНЬ ДНК

Під час проходження клітинного циклу виділяють три основні чекпойнти, тобто контрольні точки, на яких відбувається перевірка основних етапів циклу з метою попередження потенційних порушень та вирішується, чи готова клітина переходити до наступної фази циклу. До таких основних чекпойнтів відносять G<sub>1</sub>/S, G<sub>2</sub>/M та чекпойнт веретена поділу [6]. Щодо останнього, то основна його роль полягає у контролі правильного формування метафазної пластинки та наявності зв'язку мікротрубочок веретена поділу із сестринськими хроматидами, і тому в контексті аналізу відповіді клітин на виникнення пошкоджень ланцюгів ДНК детально розглядатися не буде.

Чекпойнт G<sub>1</sub>/S (також відомий під назвою «точка рестрикції») є найвагомішим етапом клітинного циклу і тією точкою відліку, від якої починається новий цикл поділу клітини, тобто клітина переходить у фазу G<sub>1</sub> або ж вона залишається у ста-

ні спокою ( $G_0$ ). Основними регуляторами початку клітинного циклу є члени родини транскрипційних факторів E2F (так звана група активувальних E2F факторів, до яких належать E2F1, E2F2 та E2F3a), які координують запуск транскрипції генів, необхідних для проходження клітинного циклу. У фазі  $G_0$  та на початку  $G_1$  E2F знаходиться у зв'язаному з білком-інгібітором (білок ретинобластоми (retinoblastoma — RB)) стані, унеможливаючи таким чином ініціацію транскрипції E2F-залежних генів [7, 8]. Коли ж клітина отримує сигнал до початку поділу, упродовж фази  $G_1$  відбувається двоетапне фосфорилування білка RB за рахунок циклінів D (D1, D2 або D3) і E (E1 або E2) та циклін-залежних кіназ CDK4 і CDK2 відповідно, що в кінцевому підсумку призводить до дисоціації RB від E2F та активації транскрипції E2F-залежних генів [9] (рис. 1).

У разі якщо у клітині виникають порушення цілісності структури ДНК, відбувається активація кіназ ATM і CHK2, які надалі фосфорилують білок TP53 (в нефосфорильованому стані TP53 зв'язаний з білком MDM2 і може підлягати убіквітин-залежній деградації). Фосфорилування TP53 призводить до його дисоціації від MDM2 та активації транскрипції TP53-залежних генів, спектр яких включає білок P21, який є інгібітором CDK2 і перешкоджає

взаємодії CDK2 із цикліном E, таким чином призводячи до блокування  $G_1/S$ -переходу [10, 11] (рис. 2).

Однак для пухлин характерне розбалансування цієї регуляторної моделі: за рахунок високого рівня експресії в клітинах MYC/CCND1, які позитивно регулюють активність E2F [12]; виникнення мутацій в гені TP53 [13]; інактивації білка RB [14] тощо.

Чекпойнт  $G_2/M$  відбувається перед початком власне мітотичної фази клітинного циклу, основною метою якого є перевірка завершеності процесу реплікації ДНК та детекція наявності порушень у структурі ДНК-ланцюгів; у разі виявлення порушень виникає тимчасова затримка клітинного циклу та активація репараційних процесів, за необхідності [15]. Регуляція  $G_2/M$ -переходу та перехід у фазу M клітинного циклу зумовлені активацією кінрази CDK1 у результаті її фосфорилування CDK-активувальною кіназою (CDK activating kinase — CAK) та формування комплексу CDK1-циклін B1 з попереднім фосфорилуванням цикліну B1 кінказою PLK1 (див. рис. 1).

У разі виникнення порушень у структурі ДНК аналогічно до чекпойнту  $G_1/S$  відбувається зупинка клітинного циклу в результаті активації TP53-залежних сигнальних шляхів: зокрема, через ATR/ATM-опосередковане інгібування PLK1 та активацію, відповідно, кінз CHK1/CHK2, які надалі блокують CDK1 (під час чекпойнту  $G_2/M$ ) та CDK2 (під час чекпойнту  $G_1/S$ ) [16]. Додатковою ланкою координації зупинки  $G_2/M$  при порушенні ДНК є фосфорилування CHK1 кінз WEE1, яка надалі гіперфосфорилує, а відтак, інактивує комплекс CDK1-циклін B1 [11] (див. рис. 2).

Зазначимо, що у випадку чекпойнту  $G_1/S$ , як вказано вище, у пухлинних клітинах часто виникають інактивувальні мутації у ключовому регуляторі RB або спостерігається підвищення рівня експресії E2F, тобто відбувається перефільювання стану сигнального шляху, який координує проходження клітинного циклу, на проактивувальний, що в цілому сприяє накопиченню та передачі мутацій дочірнім клітинам.

Натомість рівень експресії кінз CHK1, CHK2 та WEE1, які в нормі слугують для блокування проліферації клітин, часто є підвищеним у багатьох нозологічних формах раку; тоді таке регулювання відбувається, у тому числі, с-MYC-опосередкованим шляхом, оскільки с-MYC здатен зв'язуватися з промоторними ділянками генів зазначених кінз і активувати їх транскрипцію.

Цей феномен пов'язують з тим, що пухлинні клітини здатні в разі необхідності активувати механізми репарації пошкоджень ДНК, викликаних дією цитостатичних агентів, або в результаті застосування радіотерапії, що зазвичай асоційовано з розвитком резистентності до лікування [17, 18].

Окрім реакції на наявність порушень у ДНК, під час чекпойнтів також оцінюється, чи досягла клітина достатніх розмірів після попереднього ета-

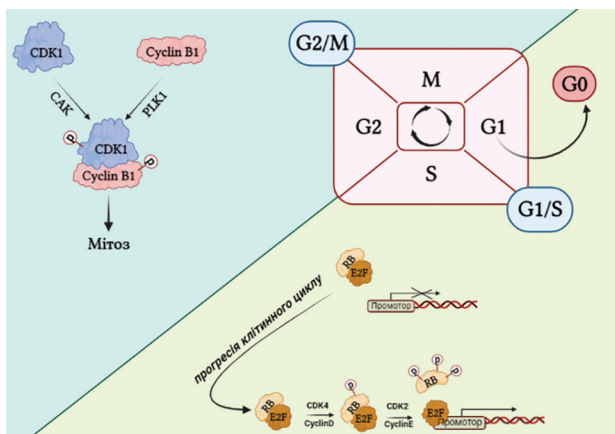


Рис. 1. Схематичне зображення механізмів регуляції проходження чекпойнтів  $G_1/S$  та  $G_2/M$  у нормальних клітинах

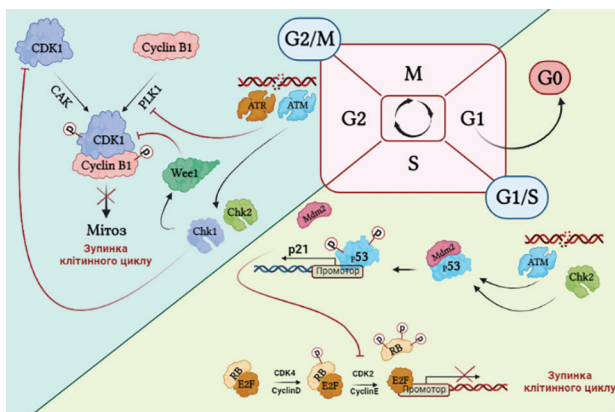


Рис. 2. Схематичне зображення молекулярних механізмів блокування проходження чекпойнтів  $G_1/S$  та  $G_2/M$  у разі виникнення пошкоджень ДНК

пу поділу, кількість синтезованих протягом  $G_1$ -фази білків, необхідних для проходження наступних етапів клітинного циклу, чи правильно відбувся процес реплікації ДНК в S-фазі, чи було завершено процес саме поділу клітин під час M-фази циклу тощо. І на кожному з етапів клітинного циклу (у нормальній клітині) у разі виявлення порушень клітина може зупинити цей процес з метою їх виправлення (якщо це можливо) або ініціювати процес запрограмованої елімінації клітини/апоптозу [6].

### ЕНДОГЕННІ ТА ЕКЗОГЕННІ ФАКТОРИ ЯК ПРИЧИНА ВИНИКНЕННЯ ПОШКОДЖЕНЬ У СТРУКТУРІ ДНК

Пошкодження, які виникають у структурі ДНК, мають різні причини і механізми; вони можуть бути спричинені дією різних факторів, залежно від походження яких виокремлюють ендогенно та екзогенно індуковане пошкодження ДНК.

У разі ендогенних пошкоджувальних агентів їх джерелом переважно є хімічно активні сполуки, які часто виникають під час окисно-відновних реакцій та процесів гідролізу (так звані активні форми кисню — АФК), що відбуваються у мітохондріях, пероксисомах, ендоплазматичному ретикулумі тощо [19, 20]. За механізмом дії АФК безпосередньо призводять до виникнення пошкоджень у структурі ланцюга ДНК шляхом окиснення азотистих основ у складі нуклеотидів. Дуже часто спостерігається окиснення саме гуаніну за рахунок високого окисдативного потенціалу цієї азотистої основи і утворення таким чином 8-гідроксигуаніну, що надалі провокує трансверсію, перехід гуаніну в тимін та, як наслідок, виникнення розривів у зв'язку з наявністю неспарених пар основ [21, 22]. Окрім АФК, до ендогенних чинників, що призводять до порушення структури ДНК, відносять: помилки під час роботи ДНК-полімераза, у результаті чого, зокрема, трапляються випадки неспарених пар основ і які є потенційними слабкими місцями у структурі полінуклеотидного ланцюга; порушення у роботі топоізомераза, які володіють нуклеазною активністю; спонтанне дезамінування азотистих основ у складі полінуклеотидного ланцюга ДНК; точкова втрата нуклеотиду, тобто формування так званих апуринових/апуримідинових сайтів, що відбувається або спонтанним шляхом, або за рахунок дії ДНК глікозилази та ін. [23, 24].

До групи екзогенних пошкоджувальних агентів відносять ті з них, джерело яких знаходиться поза межами клітини/організму; більша частина з них має хімічне або фізичне походження. До фізичних чинників зазвичай відносять вплив тривалого іонізуючого рентгенівського (особливо спектр гамма-променів) та ультрафіолетового опромінювання [23, 25]. Пошкодження структури ДНК у результаті впливу зазначених вище факторів може відбуватися за двома механізмами: прямо та опосередковано. У разі прямої дії фотони взаємодіють

безпосередньо з азотистими основами полінуклеотидного ланцюга, у результаті чого формуються так звані фотопродукти (наприклад циклобутанові піримідинові димери), на які припадає близько 75% мутацій, спричинених впливом іонізуючого випромінювання [26]. Окрім безпосередньої взаємодії з ДНК, фотони іонізуючого випромінювання також можуть поглинатися фотосенсибілізаторами, що спричиняє окисно-відновні реакції у клітинах, у результаті яких утворюються АФК і, таким чином, відбувається вторинне пошкодження структур усередині клітини [25]. Окрім іонізуючого випромінювання, до групи екзогенних пошкоджувальних агентів належать хімічні речовини та біологічні агенти/токсини, що характеризуються надзвичайно великим різноманіттям походження та механізмів дії і тому в контексті цієї роботи детально характеризуватися не будуть [23].

### МЕХАНІЗМИ РЕПАРАЦІЇ ПОШКОДЖЕНЬ У СТРУКТУРІ ПОЛІНУКЛЕОТИДНОГО ЛАНЦЮГА ДНК

Як було зазначено вище, порушення структури полінуклеотидного ланцюга ДНК є достатньо частим явищем, яке постійно відбувається у клітині та здебільшого не призводить до серйозних наслідків для нормального функціонування клітини/організму, що зумовлено функціонуванням систем репарації. Залежно від типу пошкодження виділяють наступні механізми репарації: ексцизійна репарація основ (base excision repair— BER), ексцизійна репарація нуклеотидів (nucleotide excision repair — NER), репарація дволанцюгових розривів шляхом негомологічного об'єднання кінців (non-homologous end joining — NHEJ) та репарація дволанцюгових розривів шляхом гомологічної рекомбінації (Homologous recombination— HR).

**Ексцизійна репарація основ.** Ця система репарації призначена для коригування пошкоджених азотистих основ, або так званих апуринових/апіримідинових сайтів (AP-сайти). Основні етапи цього процесу включають розпізнавання ДНК-глікозилазою пошкодженої азотистої основи та вирізання відповідного фрагменту ланцюга ДНК; подальше заповнення прогалини ДНК-полімеразою за принципом компліментарності та у разі необхідності (залежно від типу ДНК-глікозилази, див. далі) зшивання ланцюгів ДНК-лігазою [27–30]. На сьогодні у людини ідентифіковано 11 типів ДНК-глікозилаз, які розподілені на три групи за механізмом їх дії, залежно від чого розрізняють короткий та довгий шлях ексцизійної репарації основ (рис. 3).

Раніше зазначені три групи ДНК-глікозилаз здатні видаляти лише пошкоджену азотисту основу (монофункціональні), азотисту основу разом з пентозою (біфункціональні) або весь нуклеотид, інколи разом з декількома сусідніми (Nei-подібні); потрібно зауважити, що біфункціональні та Nei-подібні ДНК-глікозилази також володіють ДНК-

ендонуклеазною активністю для можливості руйнування фосфодієфірного зв'язку в зоні репарації [31].

**Екцизійна репарація нуклеотидів.** У результаті впливу пошкоджувальних агентів часто спостерігаються явища, які призводять до порушення нуклеотидів у складі полінуклеотидного ланцюга ДНК; найбільш широко розповсюдженим є формування циклобутанових піримідинових димерів, що виникає у результаті дії на клітину іонізуючого випромінювання [32]. Формування таких структур унеможливає проходження РНК-полімерази під час транскрипції генів, тому якщо це пошкодження не буде репаровано, існує висока ймовірність порушення експресії деяких генів у зв'язку із зупинкою транскрипції у цій ділянці або розвитком реплікативного стресу. Крім того, наявність неправильно спарених основ призводить до локального послаблення цілісності ланцюга ДНК і в майбутньому може бути причиною розривів [33]. Відповідно до цього у клітині існує дві системи екцизійної репарації нуклеотидів, які відрізняються за механізмом розпізнавання таких пошкоджених ділянок: повногеномна NER та NER, асоційована з транскрипцією (рис. 4).

У разі повногеномної NER відбувається розпізнавання пошкодженої ділянки комплексом білків XPC (XP-C complementing protein) та УФ-залежним білком системи репарації RAD23. Водночас зупинка РНК-полімерази перед пошкодженням нуклеотидом під час транскрипції і викликана таким чином дисоціація великої субодиниці рибосомального комплексу теж є сигналом для необхідності активації системи NER [34, 35]. Наступним етапом після розпізнавання пошкодженої ділянки ланцюга є локальне розплітання полінуклеотидного ланцюга довжиною приблизно 20–30 пар нуклеотидів, опосередковане дією транскрипційного фактора TFIIH, який володіє хеліказною активністю. Надалі за участю білка ERCC1 по обидва боки від пошкодженої ділянки формуються ендонуклеазні комплекси, що вирізають частину одного з полінуклеотидних ланцюгів ДНК, на якому розташована пошкоджена ділянка. Власне репарація ділянки відбувається шляхом добудови ДНК-полімеразою фрагмента ДНК з використанням неушкодженого ланцюга в якості матриці, після чого ДНК-лігази зшивають одноланцюгові розриви в місці новосинтезованого фрагменту [36].

**Репарація дволанцюгових розривів.** З точки зору факторів, що спричиняють формування нестабільності геному, саме наявність дволанцюгових розривів у структурі полінуклеотидного ланцюга ДНК є найбільш вагомою. Це зумовлено тим, що у разі наявності одночасного пошкодження обох ланцюгів ДНК виникає висока ймовірність не лише локальних мутацій, а й виникнення хромосомних аберацій (наприклад делеції чи дуплікації цілих фрагментів хромосоми, транслокації ділянок між різними хромосомами тощо), наслідком чого є масштабна перебудова структури хромосом. Відповідно, у клі-

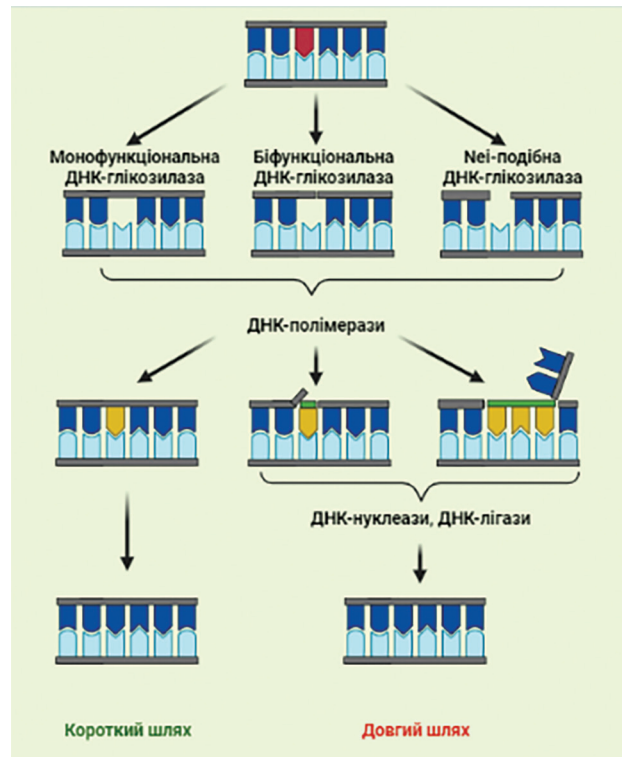


Рис. 3. Основні етапи екцизійної репарації основ

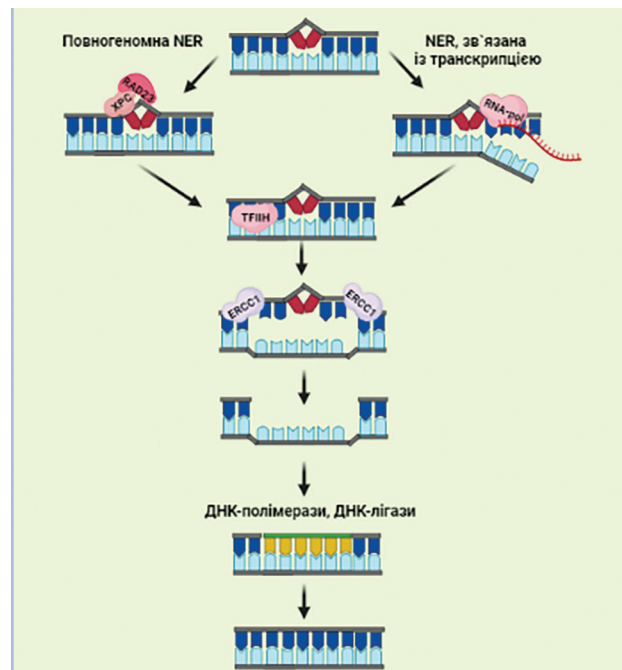


Рис. 4. Основні етапи екцизійної репарації нуклеотидів

тині (у нормі) існують механізми швидкого реагування та репарації таких розривів, а саме: шляхом NHEJ або шляхом HR [23, 25].

Зазначені шляхи відновлення дволанцюгових розривів у структурі ДНК відрізняються за точністю репарації та за тим, на якій стадії клітинного циклу виникло це пошкодження [37]. У випадку NHEJ відбувається розпізнавання дволанцюгових розривів ДНК Ku-білковим комплексом, який є гетеродимером та сформований з білків Ku-70 та Ku-80; після фланкування вільних кінців ДНК гетероди-

мерним Ku-комплексом відбувається рекрутування ДНК-протеїнкіназ, їх зв'язування із С-кінцем білка Ku-80 по обидва боки розриву і у результаті наступного етапу перехресного фосфорильовання протеїнкіназ — формування стабільного комплексу, який, з одного боку, надійно фіксує ділянки розриву, а з другого — зближує їх для можливості подальшої репарації.

Зауважимо, що ДНК-зв'язувальна активність гетеродимера Ku70/Ku80 може негативно регулюватися за рахунок дії комплексу циклін A1/кіназа CDK2 через безпосередню взаємодію Ku70 із С-кінцем цикліну A1. Наслідком такої взаємодії є фосфорильовання білка Ku70 кіназою CDK2, у результаті чого ДНК-зв'язувальна активність Ku70 і, як наслідок, рівень репарації пошкоджень у структурі ДНК значно знижуються [38].

У випадках гострого мієлоїдного лейкозу (ГМЛ) рівень експресії цикліну A1 зазвичай є значно підвищеним, що може бути пов'язано з низькою ефективністю репараційних процесів у зв'язку з вищеписаним інгібувальним ефектом цикліну A1. Окрім Ku70, циклін A1 здатен диференційно регулювати експресію ряду інших генів, серед яких особливої уваги заслуговує ген *WT1*, білковий продукт якого, з одного боку, задіяний у контролі над процесами транскрипції та сплайсингу, а з другого — може сприяти арешту клітин у фазі G1 клітинного циклу та активації апоптозу [39].

Надалі після збирання комплексу Ku70/Ku80 на місці виявленого розриву ДНК ланцюга, рекрутована ДНК-протеїнкіназа (у фосфорильованому стані) є сайтом зв'язування ДНК-репарувального білка (DNA repair protein) XRCC4 та ДНК-лігази 4-го типу, основним завданням яких є об'єднання вільних кінців ДНК між собою та відновлення фосфодієфірного зв'язку (рис. 5a) [40, 41]. Існують дані стосовно того, що наявність генетичних аберацій ділянки довжиною в 30 нуклеотидів у межах 3-го інтрону гена *XRCC4* є характерною для випадків ГМЛ з перебудовами в гені *KMT2A*, який кодує лізин-метилтрансферазу 2a, і що є ознакою несприятливого прогнозу для хворих із ГМЛ [42].

Потребує уваги також той факт, що прогноз перебігу ГМЛ для пацієнтів, у яких перебудови в гені *KMT2A* виникли внаслідок лікування з приводу ГМЛ, є більш несприятливим порівняно з тими хворими, у яких перебудови у *KMT2A* було виявлено *de novo* [43]. Загалом важливим недоліком NHEJ є низька специфічність такого шляху репарації дволанцюгових розривів, адже тоді відбувається просто об'єднання вільних кінців ДНК між собою, які у разі масивного пошкодження ДНК можуть належати різним хромосомам і, таким чином, здатні формувати нові хромосомні аберації.

Слід зазначити, що репарація шляхом NHEJ зазвичай відбувається протягом  $G_1/S$ -фази клітинного циклу. У разі активації процесів поділу клітини та входження її у  $S/G_2$ -фазу, що супроводжується ак-

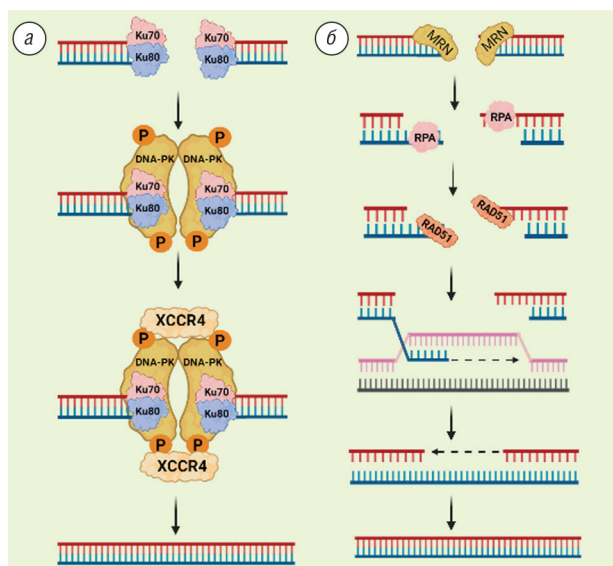


Рис. 5. Основні етапи репарації дволанцюгових розривів у полінуклеотидному ланцюзі ДНК шляхом NHEJ (a) та шляхом HR (б)

тивним реплікативним процесом з метою подвоєння генетичної інформації та її рівноправної передачі дочірнім клітинам, репарація ДНК є надзвичайно важливим процесом та вимагає високоспецифічної системи виправлення пошкоджень у разі їх виникнення [37]. У цьому випадку репарація відбувається шляхом гомологічної рекомбінації. Окрім необхідності високого рівня точності, використання саме цього методу репарації протягом циклів S та  $G_2$  зумовлено наявністю у цей період гомологічних хромосом, які виступають у якості матриці.

У разі виникнення дволанцюгових розривів у структурі полінуклеотидного ланцюга ДНК першочерговим завданням є їх стабілізація та попередження процесу деградації, що відбувається шляхом збирання MRN-комплексу (включає білки MRE11, RAD50 та NBS1) на місцях розриву. Для процесу гомологічної рекомбінації необхідна наявність вільних 3'-кінців фрагментів ДНК. Розрив у структурі ДНК може відбуватися будь-яким чином, у результаті чого кінці ДНК по обидва боки від місця розриву можуть бути різними, тому існує механізм, який забезпечує формування таких вільних 3'-кінців фрагментів незалежно від того, який «край» ланцюга утворився у місцях розриву. Для цього відбувається часткова деградація ланцюга і формування вільного 3'-кінця ДНК-ланцюга, з яким одразу зв'язується реплікативний білок A (Replication protein A — RPA), що захищає одностанцюгову ДНК від деградації нуклеазами. Надалі одностанцюговий фрагмент ДНК розпізнається рекомбіназою RAD51, що надалі задіяна у пошуку комплементарної ділянки на гомологічній хромосомі; після встановлення такого зв'язку відбувається добудовування ДНК-полімеразою відповідного фрагмента другого ланцюга ДНК на пошкодженій хромосомі та відновлення фосфодієфірного зв'язку ДНК-лігазою. Після цього фактич-

но формується вже односторонній розрив, який легко заповнюється ДНК-полімеразою за принципом комплементарності з використанням у якості матриці щойно репарованого другого ланцюга ДНК (рис. 5б) [11, 44, 45].

Відомо, що наявність порушень у структурі білків — складових компонентів MRN-комплексу — асоційована з порушенням нормального функціонування систем репарації пошкоджень у ланцюгах ДНК. Зокрема, наявність у зразках хворих на ГМЛ мікросателітної нестабільності в гені *MRE11* асоційована зі зниженням ефективності репарації ДНК шляхом гомологічної рекомбінації [46]. Водночас у пацієнтів з ГМЛ внаслідок певної мутації в гені *NBS1* після транскрипції мРНК вищезгаданого гена відбувається порушення нормального процесу сплайсингу і, як наслідок, втрачається 13-й екзон. Важливість цієї мутації з точки зору порушень у процесах репарації при ГМЛ зумовлена тим, що саме цей 13-й екзон у нормі кодує домен білка, за рахунок якого власне відбувається зв'язування *NBS1* з *MRE11* під час формування MRN-комплексу [47].

Одним з основних факторів, що спричиняють розвиток нестабільності геному при онкологічних захворюваннях різного генезу (у тому числі при ГМЛ), є реплікативний стрес [48]. Наразі можна знайти багато інформації щодо причин, які лежать в основі виникнення реплікативного стресу, однак у контексті цієї роботи важливим фактом для нас є те, що у результаті порушень, які виникають внаслідок розрегулювання нормальних процесів реплікації, відбувається формування та накопичення розривів у структурі ДНК [49–51]. Враховуючи, що реплікативний стрес асоційований з накопиченням пошкоджень ДНК та часто супроводжується активацією ATR-сигнального шляху, нами було поставлено за мету дослідити наявність зв'язку між ключовими елементами ATR-сигнального шляху (а саме білками *CHK1* і *claspin*) та білками, що є складовими систем репарації. Окрім того, до переліку досліджуваних білків нами було включено *c-MYC*, адже відомо, що при ГМЛ відмічена висока експресія гена *c-MYC*, який є відомим онкогеном і також відіграє роль у ініціації розривів у структурі ДНК та спричиняє формування стану реплікативного стресу в клітині [52].

Аналіз інформації, що представлена у базі даних Funcoup5 (<https://funcoup5.scilifelab.se/>), дозволяє виявити наявність функціональних зв'язків між різними білками в клітині. Тому нами було проаналізовано наявність асоціативних зв'язків між білками *CHK1*, *claspin*, *c-MYC* та елементами систем репарації пошкоджень ланцюгів ДНК. Загалом встановлено наявність функціональних зв'язків *CHK1* з великою вибіркою білків, що беруть участь у різних сигнальних шляхах, серед яких на наступному етапі нами було обрано ті з них, які задіяні у механізмах репарації пошкоджень ДНК (рис. 6а). Зокре-

ма, білок *CHK1* має функціональний зв'язок з білком *PARP1* (BER); *MSH2* (репарація помилково спарених нуклеотидів, mismatch repair); *TOPBP1*, *BRCA1*, *RAD51* (HR), а також із рядом білків, за-

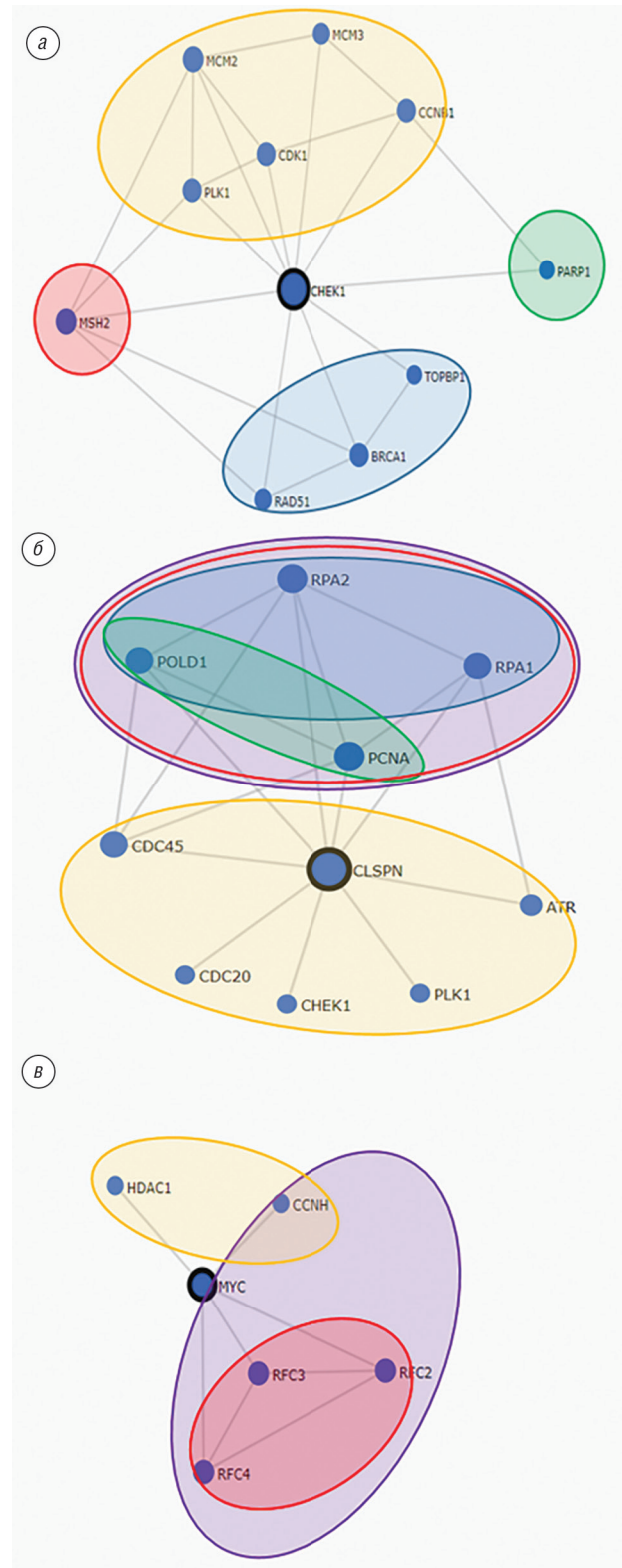


Рис. 6. Функціональні зв'язки *CHK1* (а), *claspin* (б) та *c-myc* (в) із білками, що задіяні в процесах репарації та регуляції клітинного циклу. Сектори: синій — HR, зелений — BER, червоний — mismatch repair, фіолетовий — NER, жовтий — клітинний цикл

лучених до регуляції прогресії клітинного циклу: CDK1, PLK1, CCNB1, MCM2, MCM3.

Згідно з результатами аналізу даних, представлених у Funcoup5, лише невелика частина білків, з якими було встановлено функціональний зв'язок з claspin, задіяна у сигнальних шляхах, що регулюють процеси репарації в клітині (рис. 6б). Зокрема, claspin має функціональний зв'язок з білками PCNA, POLD1, RPA1, RPA2 (NER; mismatch repair; HR (окрім PCNA) та ексцизійна репарація основ, BER (тільки PCNA та POLD1)). Щодо білків, задіяних у координації проходження етапів клітинного циклу, то для claspin відомо про наявність зв'язків з CDC20, CHEK1, PLK1, PCNA, CDC45 та ATR.

Серед вибраних нами для аналізу білків найменш задіяним у процесах репарації пошкоджень ДНК є білок c-MYC, свідченням чого є зовсім невелика вибірка білків, які напряму взаємодіють з c-MYC і певним чином задіяні в репараційних процесах у клітині (рис. 6в). До таких білків належать RFC2, RFC3, RFC4, CCNH (NER, mismatch repair (окрім CCNH)). Щодо білків, задіяних у регуляції клітинного циклу, то функціонально пов'язаними із c-MYC є лише CCNH та HDAC1.

Як обговорювалося вище, сигнальний шлях ATR-CHEK1, який розпізнає пошкодження одноланцюгової ДНК (single stranded DNA — ssDNA) і в якому задіяний протеїн ATR, активується при підвищеній експресії c-MYC, що призводить до підсиленої проліферації клітин. З іншого боку, слід відзначити, що c-MYC одночасно індукуює сигнальний шлях ATM, який часто призводить до апоптозу. Тому не встановлено кореляції рівня експресії гена c-MYC з рівнем дволанцюгових розривів ДНК. При ГМЛ рівень експресії онкогена c-MYC не корелює з рівнем експресії генів CHEK1 і claspin; тобто c-MYC не відповідає за порушення клітинних шляхів репарації пошкоджень ДНК при ГМЛ.

Роботу виконано в рамках науково-дослідного проекту молодих учених НАН України «Реплікативний стрес при гострому мієлоїдному лейкозі» (2020–2021 рр., № держреєстрації 0121U112028).

## СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; **144** (5): 646–74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- Wijewardhane N, Dressler L, Ciccarelli FD. Normal somatic mutations in cancer transformation. *Cancer cell* 2021; **39** (2): 125–9. doi: 10.1016/j.ccell.2020.11.002.
- Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; **68** (4): 820–3. doi: 10.1073/pnas.68.4.820.
- Chernoff J. The two-hit theory hits 50. *Mol Biol Cell* 2021; **32** (22): rt1. doi: 10.1091/mbc.E21-08-0407.
- Bernstein C, Prasad AR, Nfonso V, Bernstein H. DNA damage, DNA repair and cancer. In: *New research directions in DNA repair*. Chen C (ed). London: IntechOpen, 2013: 413–467. doi: 10.5772/53919.
- Harashima H, Dissmeyer N, Schnittger A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. *Trends Cell Biol* 2013; **23** (7): 345–56. doi: 10.1016/j.tcb.2013.03.002.
- Johnson DG. Regulation of E2F-1 gene expression by p130 (Rb2) and D-type cyclin kinase activity. *Oncogene* 1995; **11** (9): 1685–92.
- Komori T. Regulation of Rb family proteins by Cdk6/Cnd1 in growth plates. *Cell Cycle* 2013; **12** (14): 2161–2. doi: 10.4161/cc.25515.
- Hume S, Dianov GL, Ramadan K. A unified model for the G1/S cell cycle transition. *Nucleic Acids Res* 2020; **48** (22): 12483–501. doi: 10.1093/nar/gkaa1002.
- Latif C, Harvey SH, O'Connell MJ. Ensuring the stability of the genome: DNA damage checkpoints. *Scientific World Journal* 2001; **1**: 684–702. doi: 10.1100/tsw.2001.297.
- Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, et al. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004; **73**: 39–85. doi: 10.1146/annurev.biochem.73.011303.073723.
- Kent LN, Leone G. The broken cycle: E2F dysfunction in cancer. *Nat Rev Cancer* 2019; **19** (6): 326–38. doi: 10.1038/s41568-019-0143-7.
- Sherr CJ, McCormick F. The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002; **2** (2): 103–12. doi: 10.1016/s1535-6108(02)00102-2.
- Goodrich DW. The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule. *Oncogene* 2006; **25** (38): 5233–43. doi: 10.1038/sj.onc.1209616.
- Smith HL, Southgate H, Tweddle DA, et al. DNA damage checkpoint kinases in cancer. *Expert Rev Mol Med* 2020; **22**: e2. doi: 10.1017/erm.2020.3.
- Stark GR, Taylor WR. Analyzing the G2/M checkpoint. *Methods Mol Biol* 2004; **280**: 51–82. doi: 10.1385/1-59259-788-2:051.
- Wang WJ, Wu SP, Liu JB, et al. MYC regulation of CHEK1 and CHEK2 promotes radioresistance in a stem cell-like population of nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Res* 2013; **73** (3): 1219–31. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-1408.
- Matheson CJ, Backos DS, Reigan P. Targeting WEE1 kinase in cancer. *Trends Pharmacol Sci* 2016; **37** (10): 872–81. doi: 10.1016/j.tips.2016.06.006.
- Zhang J, Wang X, Vikash V, et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling. *Oxid Med Cell Longev* 2016; **2016**: 4350965. doi: 10.1155/2016/4350965.
- Renaudin X. Reactive oxygen species and DNA damage response in cancer. *Int Rev Cell Mol Biol* 2021; **364**: 139–61. doi: 10.1016/bs.ircmb.2021.04.001.
- Srinivas US, Tan BWQ, Vellayappan BA, et al. ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biol* 2019; **25**: 101084. doi: 10.1016/j.redox.2018.101084.
- Ohno M, Miura T, Furuichi M, et al. A genome-wide distribution of 8-oxoguanine correlates with the preferred regions for recombination and single nucleotide polymorphism in the human genome. *Genome Res* 2006; **16** (5): 567–75. doi: 10.1101/gr.4769606.
- Chatterjee N, Walker GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* 2017; **58** (5): 235–63. doi: 10.1002/em.22087.
- Mehrotra S, Mitra I. Origin of genome instability and determinants of mutational landscape in cancer cells. *Genes* 2020; **11** (9): 1101. doi: 10.3390/genes11091101.
- Barnes JL, Zubair M, John K, et al. Carcinogens and DNA damage. *Biochem Soc Trans* 2018; **46** (5): 1213–24. doi: 10.1042/BST20180519.
- Sinha RP, Hader DP. UV-induced DNA damage and repair: a review. *Photochem Photobiol Sci* 2002; **1** (4): 225–36. doi: 10.1039/b201230h.

27. Grundy GJ, Parsons JL. Base excision repair and its implications to cancer therapy. *Essays Biochem* 2020; **64** (5): 831–43. doi: 10.1042/EBC20200013.
28. Robertson AB, Klungland A, Rognes T, *et al.* DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. *Cell Mol Life Sci* 2009; **66** (6): 981–93. doi: 10.1007/s00018-009-8736-z.
29. Endutkin AV, Yudkina AV, Sidorenko VS, *et al.* Transient protein-protein complexes in base excision repair. *J Biomol Struct Dyn* 2019; **37** (17): 4407–18. doi: 10.1080/07391102.2018.1553741.
30. Szczesny B, Tann AW, Longley MJ, *et al.* Long patch base excision repair in mammalian mitochondrial genomes. *J Biol Chem* 2008; **283** (39): 26349–56. doi: 10.1074/jbc.M803491200.
31. Fortini P, Parlanti E, Sidorkina OM, *et al.* The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *J Biol Chem* 1999; **274** (21): 15230–6. doi: 10.1074/jbc.274.21.15230.
32. Soifer VN, Matushevich LL, Goroshkina GI. Dimerization of DNA pyrimidine bases of HeLa cells in ultraviolet irradiation and removal of dimers during reparation in the dark. *Radiobiologiya* 1970; **10** (2): 275–8 (in Russian).
33. Liakos A, Lavigne MD, Fousteri M. Nucleotide excision repair: from neurodegeneration to cancer. *Adv Exp Med Biol* 2017; (1007): 17–39. doi: 10.1007/978-3-319-60733-7\_2.
34. Hey T, Lipps G, Sugawara K, *et al.* The XPC-HR23B complex displays high affinity and specificity for damaged DNA in a true-equilibrium fluorescence assay. *Biochemistry* 2002; **41** (21): 6583–7. doi: 10.1021/bi012202t.
35. Apostolou Z, Chatzinikolaou G, Stratigi K, *et al.* Nucleotide excision repair and transcription-associated genome instability. *Bioessays* 2019; **41** (4): e1800201. doi: 10.1002/bies.201800201.
36. Spivak G. Nucleotide excision repair in humans. *DNA Repair* 2015; **36**: 13–8. doi: 10.1016/j.dnarep.2015.09.003.
37. Jachimowicz RD, Goergens J, Reinhardt HC. DNA double-strand break repair pathway choice — from basic biology to clinical exploitation. *Cell Cycle* 2019; **18** (13): 1423–34. doi: 10.1080/15384101.2019.1618542.
38. Ji P, Baumer N, Yin T, *et al.* DNA damage response involves modulation of Ku70 and Rb functions by cyclin A1 in leukemia cells. *Int J Cancer* 2007; **121** (4): 706–13. doi: 10.1002/ijc.22634.
39. Krug U, Yasmeen A, Beger C, *et al.* Cyclin A1 regulates WT1 expression in acute myeloid leukemia cells. *Int J Oncol* 2009; **34** (1): 129–36.
40. Chang H, Pannunzio NR, Adachi N, *et al.* Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2017; **18** (8): 495–506. doi: 10.1038/nrm.2017.48.
41. Lieber MR. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu Rev Biochem* 2010; **79**: 181–211. doi: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131.
42. Louzada-Neto O, Lopes BA, Brisson GD, *et al.* XRCC4 rs28360071 intronic variant is associated with increased risk for infant acute lymphoblastic leukemia with KMT2A rearrangements. *Genet Mol Biol* 2020; **43** (4): e20200160. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2020-0160.
43. Issa GC, Zarka J, Sasaki K, *et al.* Predictors of outcomes in adults with acute myeloid leukemia and KMT2A rearrangements. *Blood Cancer J* 2021; **11** (9): 162. doi: 10.1038/s41408-021-00557-6.
44. Ranjha L, Howard SM, Cejka P. Main steps in DNA double-strand break repair: an introduction to homologous recombination and related processes. *Chromosoma* 2018; **127** (2): 187–214. doi: 10.1007/s00412-017-0658-1.
45. Wright WD, Shah SS, Heyer WD. Homologous recombination and the repair of DNA double-strand breaks. *J Biol Chem* 2018; **293** (27): 10524–35. doi: 10.1074/jbc.TM118.000372.
46. Gaymes TJ, Mohamedali AM, Patterson M, *et al.* Microsatellite instability induced mutations in DNA repair genes CtIP and MRE11 confer hypersensitivity to poly (ADP-ribose) polymerase inhibitors in myeloid malignancies. *Haematologica* 2013; **98** (9): 1397–406. doi: 10.3324/haematol.2012.079251.
47. Varon R, Schoch C, Reis A, *et al.* Mutation analysis of the Nijmegen breakage syndrome gene (NBS1) in nineteen patients with acute myeloid leukemia with complex karyotypes. *Leuk Lymphoma* 2003; **44** (11): 1931–4. doi: 10.1080/1042819031000099724.
48. Gaillard H, Garcia-Muse T, Aguilera A. Replication stress and cancer. *Nat Rev Cancer* 2015; **15** (5): 276–89. doi: 10.1038/nrc3916.
49. Zeman MK, Cimprich KA. Causes and consequences of replication stress. *Nat Cell Biol* 2014; **16** (1): 2–9. doi: 10.1038/ncb2897.
50. Saxena S, Zou L. Hallmarks of DNA replication stress. *Mol Cell* 2022; **82** (12): 2298–314. doi: 10.1016/j.molcel.2022.05.004.
51. Macheret M, Halazonetis TD. DNA replication stress as a hallmark of cancer. *Annu Rev Pathol* 2015; (10): 425–48. doi: 10.1146/annurev-pathol-012414-040424.
52. Curti L, Campaner S. MYC-induced replicative stress: a double-edged sword for cancer development and treatment. *Int J Mol Sci* 2021; **22** (12): 6168. doi: 10.3390/ijms22126168.

## MOLECULAR MECHANISMS OF DNA DAMAGE AND REPAIR IN NORMAL AND MALIGNANT CELLS

*V.M. Shcherbina, A.V. Chumak, O.V. Kashuba*

*RE Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine*

**Summary.** *Replicative stress is one of the important factors that plays a significant role in the processes of malignant neoplasms formation and progression, what had been demonstrated experimentally. Polymerase errors that occur during the replication process; violation of the processes of regulation, coordination and control over the replication process; the occurrence of mutations in the genes involved in this process etc. — all this leads to an imbalance and delay in replication, the destruction of replicative forks, the occurrence of violations of the integrity of DNA chains, including due to the appearance of double-stranded breaks. As a result, all of the above result in the emergence of new mutations and chromosomal rearrangements, which contributes to tumor progression in general. This work analyzed and systematized the molecular mechanisms that coordinate DNA damage and repair processes in normal and malignant cells.*

**Key Words:** cell cycle, DNA damage, reparation.

**Адреса для листування:**

Щербіна В.М.

03022, Київ, вул. Васильківська, 45