

## ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ RAD51-РЕКОМБИНАЗЫ НА ВЫЖИВАЕМОСТЬ И ПРОХОЖДЕНИЕ ФАЗ ЦИКЛА КЛЕТКАМИ ЧЕЛОВЕКА

© Т. А. Штам, Е. Ю. Варфоломеева, Е. В. Семенова, М. В. Филатов<sup>1</sup>

Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова РАН, Гатчина;

<sup>1</sup> электронный адрес: [filatov@omrb.pnpi.spb.ru](mailto:filatov@omrb.pnpi.spb.ru)

Эукариотический белок RAD51, структурный и функциональный гомолог бактериального белка RecA, играет основную роль в митотической и мейотической гомологичной рекомбинации. В данном исследовании, используя временное выключение гена *Rad51* с помощью интерферирующих коротких молекул РНК, мы продемонстрировали, что снижение уровня белка RAD51 негативно влияет на выживаемость и пролиферативную активность большинства исследованных клеточных культур. Анализ изменений, происходящих в клеточном цикле во время подавления экспрессии гена *Rad51*, показал, что чувствительные клетки задерживаются в прохождении S-фазы клеточного цикла и накапливаются в фазах S и G<sub>2</sub>. Полученные данные в целом демонстрируют, что нарушение нормального функционирования гомологичной рекомбинации может приводить к гибели клеток. В то же время обнаруженное явление не универсально, и некоторые клеточные линии, в частности MCF-7, оказываются устойчивыми к подавлению экспрессии гена *Rad51*.

Ключевые слова: гомологичная рекомбинация, RAD51, репарация ДНК, клеточный цикл.

Принятые сокращения: siРНК — короткая интерференционная РНК; антиRAD51-siРНК — короткая интерферирующая молекула РНК, подавляющая экспрессию гена *Rad51*; ИФА — иммунофлуоресцентный анализ; ФКЧ — фибробласты кожи человека; ФЛЭЧ — эмбриональные фибробласты легкого человека.

Стабильность генома является существенным условием жизнеспособности клетки. Система гомологичной рекомбинации — одна из многочисленных систем поддержания стабильности генетического материала клеток млекопитающих. К настоящему времени определено несколько процессов, участие в которых гомологичной рекомбинации потенциально значимо для жизнедеятельности соматических клеток. Это репарация двухнитевых разрывов и некоторых других повреждений ДНК, возникающих спонтанно или под действием повреждающих агентов (Liang et al., 1998; Johnson, Jasin, 2001), а также преодоление проблем, возникающих при прохождении репликативной вилки, связанных с ее задержкой или коллапсом (Cox et al., 2000; McGlynn, Lloyd, 2002).

Очевидно, что значение этой системы должно быть особенно существенно в ситуациях, когда клетки подвергаются неблагоприятным воздействиям, затрагивающим стабильность генетического материала и нормальное течение процесса репликации. Однако при отсутствии внешних повреждающих воздействий необходимость эффективной работы системы гомологичной репарации для жизнеспособности клетки не кажется очевидной. Более того, до последнего времени гомологичная рекомбинация в соматических клетках млекопитающих считалась малоэффективной и играющей второстепенную роль. Во многом это основано на том, что в клетках млекопитающих, в

отличие от многих других клеток, репарация двухнитевых разрывов осуществляется преимущественно за счет негомологичного сшивания. Кроме того, рекомбинация между внехромосомной и хромосомной ДНК, применяемая в процедуре нокаута генов, радикально менее эффективна по сравнению с клетками дрожжей или дрозофилы (Weaver et al., 1995; Kanaar et al., 1998; Takata et al., 1998). Однако в ряде работ было показано, что нарушение гомологичной репарации за счет выключения функции гена *Rad51* и его паралога может прерывать развитие мышечных эмбрионов (Lim, Nasty, 1996; Tsuzuki et al., 1996; Pittman, Schimenti, 2000), а также существенно повышать чувствительность соматических клеток млекопитающих к действию ДНК-повреждающих агентов (Pierce et al., 2001; Slupianek et al., 2001; Takata et al., 2001; Thompson, Schild, 2002). Таким образом, имеющееся многообразие данных не дает определенного ответа на вопрос о роли системы гомологичной рекомбинации и ее компонентов в поддержании жизнеспособности соматических клеток млекопитающих.

Для прояснения этого вопроса мы изучили влияние временного выключения экспрессии ключевого гена гомологичной рекомбинации *Rad51* за счет интерференции с короткой интерференционной РНК (siРНК) на жизнеспособность ряда клеточных линий и способность прохождения ими клеточного цикла.

## Материал и методика

Клеточные культуры, условия культивирования и анализ параметров клеточного цикла. Перевиваемые культуры клеток человека HeLa (аденокарцинома шейки матки), MCF-7 (аденокарцинома молочной железы), HT1080 (фибросаркома), ECV (трансформированные клетки эндотелия), GM08632 (кожные фибробласты, трансформированные вирусом SV40), Mg63 (остеосаркома), а также эмбриональные фибробласты легкого (ФЛЭЧ) и фибробласты кожи человека (ФКЧ) культивировали до монослоя в 24-луночных планшетах в среде DMEM/F12 с добавлением 5 % эмбриональной сыворотки теленка (Биолот, Россия), без антибиотиков, в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub> при 37 °С.

Подавление экспрессии гена *Rad51* проводили с помощью трансфекции коротких интерферирующих молекул РНК (антиRAD51-siРНК) через 24 ч после посева, при этом число клеток составляло приблизительно 10<sup>4</sup> на лунку. По истечении 48—96 ч клетки снимали смесью растворов Версена и Трипсина (2 : 1) и либо рассеивали во флаконы Карреля для определения способности давать колонии, либо окрашивали специфичным для ДНК флуоресцентным красителем Hoechst 33342 в присутствии неионного детергента Тритона X-100 (0.2 %) и анализировали с помощью проточного цитометра для выявления возможных нарушений в прохождении клеточного цикла. В качестве контроля аналогичные измерения проводили на клетках, трансфицированных siРНК другой специфичности.

Система РНК-интерференции для подавления экспрессии гена *Rad51*. Трансфекцию антиRAD51-siРНК (ON-TARGETplus SMARTpool, Dharmacon) в концентрации 100 нМ/мл в 1-кратном трансфекционном буфере (Dharmacon) проводили с использованием липофектамина (Dharmacon-FECT) по методике, предложенной производителем (<http://www.dharmacon.com>). Учитывая возможную токсичность липофектамина, в каждый опыт включали отрицательный контроль трансфекции без siРНК.

Иммунофлуоресцентный анализ. Для иммунофлуоресцентного анализа (ИФА) уровня экспрессии белка RAD51 в исследуемых линиях клетки фиксировали 4%-ным формальдегидом, обрабатывали 0.5%-ным раствором Тритона X-100 в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в течение 10 мин и инкубировали в растворе бычьего сывороточного альбумина (1—5 %) (Биолот, Россия) на ФСБ в течение 1 ч. После каждой обработки суспензию клеток 3 раза промывали раствором ФСБ. Клетки инкубировали в течение ночи при 4 °С с моноклональными антителами к RAD51 (mouse antiRAD51, clone 3C10, Invitrogen, США) в разведении 1 : 200, промывали трижды ФСБ и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч с мечеными флуорохромом вторичными антителами Alexa 488 против иммуноглобулинов мыши в разведении 1 : 2000 (Sigma, США). После 3-кратной промывки ФСБ белок RAD51 в клетках визуализировали с помощью флуоресцентного микроскопа (OPTON-AXIOPLAN).

Количественная оценка уровня экспрессии белка RAD51. Эффективность подавления экспрессии гена *Rad51* оценивали по уровню содержания белка RAD51, выявляемого с помощью иммуноферментного анализа электрофоретически разделенных и иммобилизованных на нитроцеллюлозной мембране исследуемых клеток. Для этого (1—2) · 10<sup>6</sup> клеток, инкубирован-

ных со смесью антиRAD51-siРНК и липофектамина в течение 48 ч, а также контрольные клетки снимали смесью растворов Версена и Трипсина (2 : 1) и дважды промывали раствором ФСБ. Число клеток в каждой пробе подсчитывали для дальнейшего выравнивания нагрузки дорожек и инкубировали при 4 °С в течение 30 мин с лизирующим буфером (10 мМ Трис-НСl, pH 7.4, 0.1 % Тритона X-100, 5 мМ PMSF, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 5 ед./мл ДНКазы I и 20 мМ β-меркаптоэтанола). Полученные клеточные лизаты кипятили в течение 5 мин в стандартном буфере для нанесения (0.25 М Трис, pH 6.8, 8 % SDS, 40 % глицерина, 20 % β-меркаптоэтанола и 0.2 % бромфенолового синего). Электрофоретическое разделение белков проводили в 12%-ном полиакриламидном геле, содержащем 0.1 % SDS, с последующим переносом белков на нитроцеллюлозную мембрану. Визуализацию белка RAD51 на мембране осуществляли с помощью моноклональных мышинных антител в разведении 1 : 500 (antiRAD51, clone 3C10, Invitrogen, США) и последующей инкубации с антителами против иммуноглобулинов (IgG) мыши, конъюгированных с ферментативной активностью пероксидазы хрена. В качестве стандартного контроля за выравниванием нагрузки дорожек на мембране параллельно визуализировали белок GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), используя моноклональные мышинные антитела в разведении 1 : 10 000 (Clone: ZG003, Zymed®).

## Результаты

Влияние трансфекции антиRAD51-siРНК на уровень белка RAD51 в исследуемых клеточных линиях. После трансфекции с помощью липофектамина антиRAD51-siРНК в культивируемые клетки наблюдается значительное уменьшение уровня белка RAD51 во всех исследуемых клеточных линиях (HeLa, MCF-7, HT1080, ECV, GM08632, Mg63, ФЛЭЧ и ФКЧ). На рис. 1 представлены данные для клеток HeLa и MCF-7, полученные методами иммунофлуоресцентного анализа и иммуноблотинга клеточных лизатов. Большинство клеток, культивируемых при стандартных условиях, имеет достаточно яркое диффузное окрашивание антигена RAD51 ядерной локализации. При этом в некоторой части клеток наблюдалось образование так называемых фокусов антигена RAD51 (рис. 1, а). Практически полное подавление экспрессии гена *Rad51* и соответственно снижение интенсивности флуоресценции при ИФА наблюдали через 48—72 ч после трансфекции специфичной siРНК (рис. 1, б). Трансфекция siРНК другой специфичности (в частности, гомологичной тимидинкиназе вируса герпеса или гену ксеродермы пигментозум группы А, использованных в качестве негативного контроля) не вызывала каких-либо изменений (рис. 1, в).

Эффективное подавление экспрессии гена *Rad51* обнаруживалось также с помощью иммуноферментного анализа электрофоретически разделенных и иммобилизованных на нитроцеллюлозной мембране белков клеточных лизатов, трансфицированных антиRAD51-siРНК в течение 48 ч, и контрольных нетрансфицированных клеток (рис. 1, г). При этом количество клеток в пробах перед лизисом (как в контрольной, так и в обработанной антиRAD51-siРНК) было одинаковым. Представленные результаты позволяют с уверенностью использовать РНК-интерференцию для подавления экспрессии гена *Rad51* в выбранных клеточных системах и, что особенно

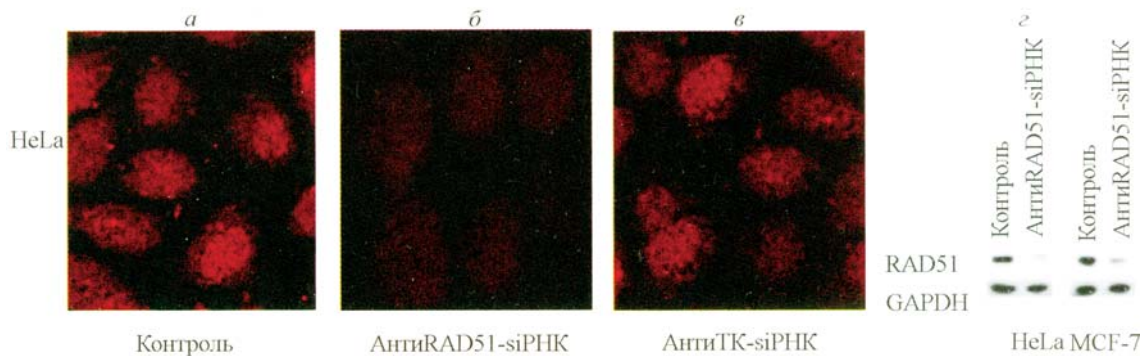


Рис. 1. Влияние трансфекции антиRAD51-siPHK на уровень белка RAD51.

Имунофлуоресцентный анализ уровня белка RAD51 в клетках HeLa.

*a* — контрольные клетки, культивируемые при стандартных условиях; *б* — клетки, трансфицированные специфичной антиRAD51-siPHK в течение 72 ч; *в* — негативный контроль трансфекции — клетки, трансфицированные siPHK, специфичной к гену тимидинкиназы вируса герпеса (анти-TK-siPHK); *г* — иммуноблотинг клеточных лизатов линий HeLa и MCF-7: клетки, трансфицированные антиRAD51-siPHK в течение 48 ч (*правая дорожка*), и контрольные, культивируемые при стандартных условиях (*левая дорожка*); GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) — контроль специфичности действия siPHK и выравнивания нагрузки дорожек.

важно, однозначно интерпретировать данные, полученные на фоне siPHK-трансфекции.

Выживаемость клеток при подавлении экспрессии гена *Rad51*. Жизнеспособность большинства исследованных клеточных линий после трансфекции антиRAD51-siPHK существенно снижается (рис. 2). Рис. 2 показывает результат анализа числа колоний, наблюдаемых через 10 сут после посева трансфицированных антиRAD51-siPHK в течение 72 ч и контрольных клеток в полную среду. В случае нетрансформированных клеток с низкой эффективностью клонирования оценку выживаемости на фоне временного выключения экспрессии гена *Rad51* проводили путем подсчета общего числа клеток, выросших в течение этого периода (10 сут после 72-часовой инкубации с антиRAD51-siPHK). Результаты представлены в виде доли выживших клеток по отношению к необработанному контролю. Наблюдаемое резкое снижение жизнеспособности клеток происходит именно за счет подавления экспрессии гена *Rad51*, поскольку трансфекция siPHK другой специфичности оказывает

лишь незначительное влияние, сравнимое в пределах ошибки измерений с токсичностью действия одного липофектамина без какой-либо siPHK (рис. 2). Значительное уменьшение выживаемости клеток после подавления экспрессии гена *Rad51* с помощью специфичной siPHK наблюдалось для большей части исследованных злокачественно трансформированных клеточных линий (HeLa, HT1080, ECV, GM08632 Mg63). Однако клетки карциномы молочной железы MCF-7 практически полностью сохраняли жизнеспособность при такого рода воздействии (рис. 2), несмотря на наблюдаемое в этой культуре значительное снижение уровня RAD51-рекомбиназы на фоне трансфекции антиRAD51-siPHK (рис. 1, *г*).

Является такая сильная зависимость жизнеспособности клеток от нормального уровня белка RAD51 общей или это специфичное свойство, присущее только злокачественным быстро пролиферирующим клеткам? Полученные данные по выживаемости нормальных ФЛЭЧ и ФКЧ демонстрируют, что подавление белка *RAD51* в этих культурах в целом также снижает пролиферативную актив-

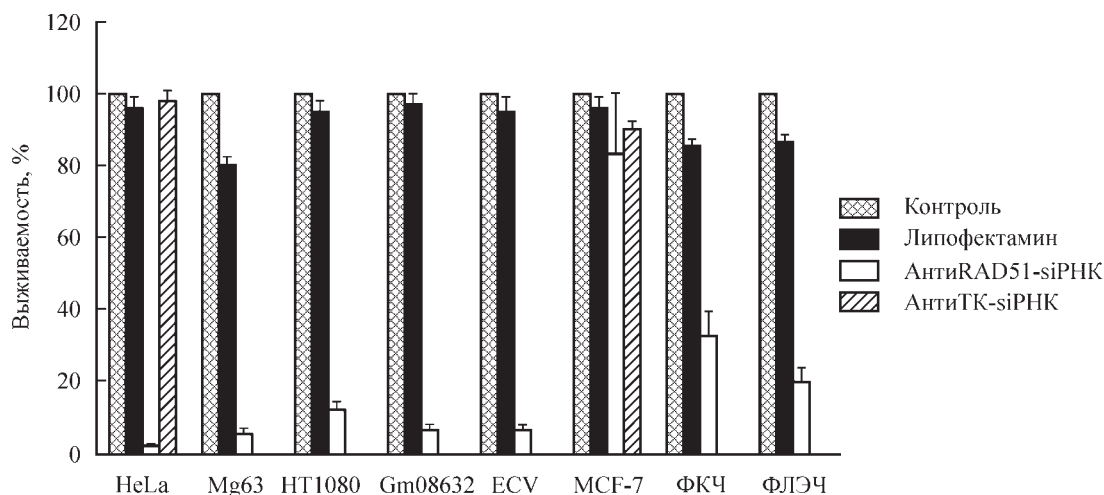


Рис. 2. Выживаемость злокачественно трансформированных клеток линий HeLa, Mg63, HT1080, GM08632, ECV и MCF-7, а также эмбриональных фибробластов легкого (ФЛЭЧ) и фибробластов кожи человека (ФКЧ) при подавлении экспрессии гена *Rad51*.

Белые столбцы демонстрируют токсический эффект от трансфекции siPHK, гомологичной гену *Rad51*, в различные клетки; черные столбцы — ответ клеток, обработанных только липофектамино; полосатые столбцы — ответ клеток, трансфицированных siPHK, специфичной к гену тимидинкиназы вируса герпеса; клетчатые столбцы — контроль — выживаемость необработанных клеток, принятая за 100 %.

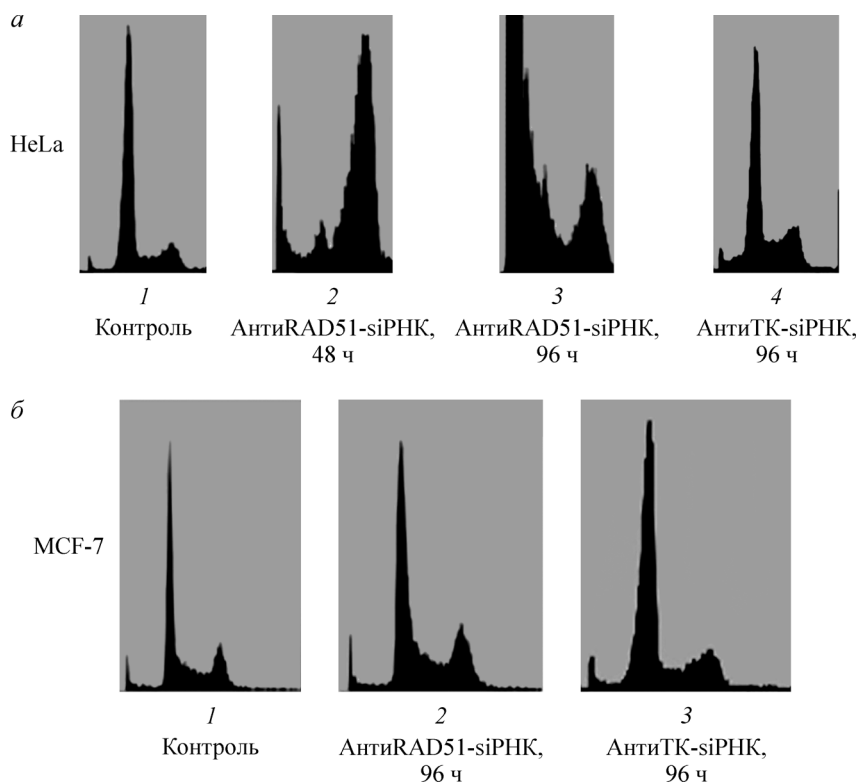


Рис. 3. Проточно-цитометрический анализ изменений распределения клеток по фазам клеточного цикла при подавлении экспрессии гена *Rad51* специфической siРНК.

*а* — клетки HeLa: 1 — необработанный контроль; 2, 3 — клетки соответственно через 48 и 96 ч после трансфекции антиRad51-siРНК; 4 — контроль на специфичность — клетки, трансфицированные siРНК, специфичной к гену тимидинкиназы (антиTK-siРНК) вируса герпеса. *б* — клетки MCF-7: 1 — необработанный контроль; 2 — клетки через 96 ч после трансфекции антиRad51-siРНК; 3 — контроль на специфичность — клетки, трансфицированные siРНК, специфичной к гену тимидинкиназы (антиTK-siРНК) вируса герпеса.

ность клеток и негативно влияет на их жизнеспособность (рис. 2).

Параметры клеточного цикла перевиваемых клеточных линий человека при снижении уровня RAD51-рекомбиназы. Анализ изменений, происходящих в клеточном цикле во время подавления экспрессии RAD51 специфической siРНК, показал, что чувствительные клетки линий HeLa, HT1080, ECV, Mg63 и GM08632 задерживаются в прохождении фазы S и накапливаются в фазах S и G<sub>2</sub> через 48—72 ч после трансфекции антиRAD51-siРНК (рис. 3, *а*). Нарушения в прохождении клеточного цикла могут приводить к апоптотической гибели клеток с выраженной деградацией ДНК, что и наблюдается в этих клеточных линиях уже через 96 ч после трансфекции siРНК, комплементарной гену RAD51-рекомбиназы (рис. 3, *а*). Устойчивые линии, такие как MCF-7, не претерпевают изменений в распределении по фазам клеточного цикла даже после длительной инкубации с антиRAD51-siРНК (рис. 3, *б*). Ни одна из клеточных линий не демонстрировала нарушений в прохождении клеточного цикла при трансфекции siРНК другой специфичности (рис. 3, *а*, *б*).

### Обсуждение

По существующим представлениям, гомологичная рекомбинация в клетках млекопитающих может быть существенна для репарации двухнитевых разрывов ДНК и преодоления проблем, связанных с нарушением нормаль-

ного прохождения вилки репликации (Liang et al., 1998; Cox et al., 2000; Johnson, Jasin, 2001; McGlynn, Lloyd, 2003). Однако в отсутствие внешних повреждающих воздействий необходимость эффективной работы системы гомологичной рекомбинации для жизнеспособности клетки и ее репродуктивного потенциала не кажется явной. Имеют право на существование предположения о том, что при репликации ДНК, особенно в злокачественно трансформированных клетках, неизбежно происходят остановки и необратимые нарушения прохождения вилок репликации, которые требуют репарации с помощью гомологичной рекомбинации (Tashiro et al., 1996). Эти предположения подтверждаются наблюдениями повышенного содержания белка RAD51 в злокачественно трансформированных клетках и увеличения частоты возникновения фокусов репарации, содержащих RAD51, в ядрах последних (Xia et al., 1997; Raderschall et al., 2002). Существуют данные о накоплении в клеточных ядрах в ходе S-фазы клеточного цикла фосфорилированных вариантов гистона H2AX и связанного с ядерным матриксом белка RAD51 (Schwartz et al., 2005; Mladenov et al., 2007). Все эти описанные ранее факты интерпретируются как указание на то, что в ходе репликации происходит накопление остановленных и коллапсированных репликативных вилок, которые репарируются с помощью гомологичной рекомбинации и предполагают (косвенно) необходимость этой системы репарации для жизнеспособности клеток.

В настоящей работе мы впервые показали, что подавление функции гена *Rad51* может приводить к массовой репродуктивной гибели клеток человека в отсутствие

## Список литературы

внешних повреждающих воздействий. Так, в большинстве исследованных клеток человека подавление экспрессии гена *Rad51* за счет нокдауна с помощью siРНК приводит к невозможности полноценно завершить текущий период репликации ДНК, что выражается в виде блока клеточного цикла в S- и (или) G<sub>2</sub>-фазе. Такого рода блоки приводят к драматическому снижению жизнеспособности этих клеток, сопровождающемуся апоптозом или необратимой потерей способности к пролиферации. Интересно, что ранее предпринятая попытка постоянного подавления экспрессии гена *Rad51* с помощью ДНК-векторов, кодирующих последовательности специфичной siРНК, оказалась несостоятельной в некоторых клеточных системах (Schwartz et al., 2005; Biard, 2007). Это, с нашей точки зрения, согласуется с представленными результатами и показывает невозможность получения жизнеспособных клонов клеток с подавленной функцией исследуемого гена для большинства клеточных линий.

Полученные в настоящей работе данные, касающиеся снижения выживаемости нормальных ФЛЭЧ и ФКЧ на фоне временного подавления экспрессии гена *Rad51*, несомненно, демонстрируют чувствительность к такой процедуре не только злокачественно трансформированных, но и нормальных клеток человека. Несколько меньшая эффективность снижения выживаемости для нетрансформированных клеток связана скорее со значительно более медленным репродуктивным циклом этих клеток, чем с каким-то принципиальным различием в значимости нормального функционирования системы гомологичной рекомбинационной репарации.

На первый взгляд, представленные результаты в согласии с имеющимися литературными данными указывают на необходимость гомологичной рекомбинации для осуществления нормальной репликации ДНК и пролиферации клеток. Однако наличие клеточных линий (таких, как MCF-7 в этой работе), демонстрирующих высокую выживаемость и пролиферативную активность при значительном снижении уровня RAD51-рекомбиназы, не позволяет сделать такое однозначное заключение. Следует отметить, что совокупность всех опубликованных ранее косвенных аргументов и данных, полученных в этой работе, формально не может рассматриваться как доказательство необходимости системы гомологичной рекомбинационной репарации для жизнеспособности клеток. Речь может идти лишь о том, что нарушение нормального течения гомологичной рекомбинации фатально для клеток. При этом причиной гибели потенциально может быть не только отсутствие гомологичной рекомбинации, но и сама по себе гомологичная рекомбинация, протекающая в аномальных условиях, связанных со снижением содержания ключевого белка RAD51. Можно предположить, что устойчивость клеток MCF-7 к подавлению RAD51 может возникать из-за выключения более ранних, иницирующих стадий гомологичной рекомбинации, благодаря чему клетки не пытаются запустить акты гомологичной рекомбинации и становятся нечувствительными к нехватке белка RAD51. Это положение, однако, требует прямой экспериментальной проверки.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-48902), а также персональной стипендии Т. А. Штам от губернатора Ленинградской обл.

Biard D. 2007. Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones. *Nucl. Acids Res.* 35 : 3535—3550.

Cox M., Goodman M., Kreuzer K., Sherratt D., Sandler S., Marians K. 2000. The importance of repairing stalled replication forks. *Nature.* 2 : 37—41.

Johnson R., Jasin M. 2001. Double-strand-break-induced homologous recombination in mammalian cells. *Biochem. Soc. Trans.* 29 : 196—201.

Kanaar R., Hoeijmakers J., van Gent D. 1998. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. *Trends Cell Biol.* 8 : 483—489.

Liang F., Han M., Romanienko P., Jasin M. 1998. Homology-directed repair is a major double-strand break repair pathway in mammalian cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 95 : 5172—5177.

Lim D., Hasty P. 1996. A mutation in mouse *rad51* results in an early embryonic lethal that is suppressed by a mutation in *p53*. *Mol. Cell. Biol.* 16 : 7133—7143.

McGlynn P., Lloyd R. 2002. Recombinational repair and restart of damaged replication forks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3 : 859—870.

Mladenov E., Tsaneva I., Anachkova B. 2007. Cell cycle-dependent association of Rad51 with the nuclear matrix. *DNA Cell Biol.* 26 : 36—43.

Pierce A., Stark J., Araujo F., Moynahan M., Berwick M., Jasin M. 2001. Double-strand breaks and tumorigenesis. *Trends Cell Biol.* 11 : 52—59.

Pittman D., Schimenti J. 2000. Midgestation lethality in mice deficient for the RecA-related gene, *Rad51d/Rad5113*. *Genesis.* 26 : 167—173.

Raderschall E., Stout K., Freier S., Suckow V., Schweiger S., Haaf T. 2002. Elevated levels of Rad 51 recombination protein in tumor cells. *Cancer Res.* 62 : 219—225.

Schwartz M., Zlotorynski E., Goldberg M., Ozeri E., Rahat A., le Sage C., Chen B., Chen D., Agami R., Kerem B. 2005. Homologous recombination and nonhomologous end-joining repair pathways regulate fragile site stability. *Genes Develop.* 19 : 2715—2726.

Slupianek A., Schmutte C., Tomblin G., Nieborowska-Skorska M., Hoser G., Nowicki M., Pierce A., Fishel R., Skorski. 2001. BCR/ABL regulates mammalian RecA homologs, resulting in drug resistance. *Mol. Cell.* 8 : 795—806.

Takata M., Sasaki M., Sonoda E., Morrison C., Hashimoto M., Utsumi H., Yamaguchi-Iwai Y., Shinohara A., Takeda S. 1998. Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* 17 : 5497—5508.

Takata M., Sasaki M., Tachiiri S., Fukushima T., Sonoda E., Schild D., Thompson L., Takeda S. 2001. Chromosome instability and defective recombinational repair in knockout mutants of the five *Rad51* paralogs. *Mol. Cell. Biol.* 21 : 2858—2866.

Tashiro S., Kotomura N., Shinohara A., Tanaka K., Ueda K., Kamada N. 1996. S phase specific formation of the human *Rad51* protein nuclear foci in lymphocytes. *Oncogene.* 12 : 2165—2170.

Thompson L., Schild D. 2002. Recombinational DNA repair and human disease. *Mutat. Res.* 509 : 49—78.

Tsuzuki T., Fujii Y., Sakumi K., Tominaga Y., Nakao K., Sekiguchi M., Matsushiro A., Yoshimura Y., Morita T. 1996. Targeted disruption of the *Rad51* gene leads to lethality in embryonic mice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 93 : 6236—6240.

Weaver D. 1995. What to do at an end: DNA double-strand break repair. *Trends Genet.* 11 : 388—392.

Xia S., Shamans M., Shmookler Reis R. 1997. Elevated recombination in immortal cells is mediated by *HsRad51* recombinase. *Mol. Cell. Biol.* 17 : 7151—7158.

Поступила 27 XII 2007

---

HUMAN RAD51 RECOMBINASE: THE ROLE IN THE CELL CYCLE CHECKPOINT  
AND CELLULAR SURVIVAL

*T. A. Shtam, E. Yu. Varfolomeeva, E. V. Semenova, M. V. Filatov*<sup>1</sup>

Petersburg B. P. Konstantinov Nuclear Physics Institute RAS, Gatchina;

<sup>1</sup> e-mail: filatov@omrb.pnpi.spb.ru

The RAD51 protein, an eukaryotic homologue of *Escherichia coli* RecA, plays a central role in both mitotic and meiotic homologous recombination. Here, we demonstrate that short-term silencing of *Rad51* gene by specific small interfering (si) RNA induces cell death of the most part of investigated cancer cell lines and normal fibroblasts. Disruption of the *Rad51* gene in these cells results in S or (and) G<sub>2</sub> cell cycle arrest leading to apoptosis. But some human cancer cell lines demonstrate abolishment of pre-mitotic checkpoint and are not sensitive to siRNA silencing of RAD51 recombinase. Recent experiments show that normal functioning of the recombination repair system is essential for maintenance of genome stability, proliferation of vertebrate cells and, finally, for prevention of dramatic cell death.

Key words: homologous recombination, Rad51, cell cycle, DNA reparation.

---