

ИССЛЕДОВАНИЕ РЕПАРАТИВНЫХ ФОКУСОВ В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ ПОСЛЕ ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК

© *И. И. Суворова*^{1, 2}, * *В. А. Поспелов*^{1, 2}

¹ *Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,*

² *Санкт-Петербургский государственный университет;*

* *электронный адрес: irsuvorov@yandex.ru*

При действии генотоксических агентов клетки активируют сигнальные пути, участвующие в распознавании ДНК-повреждений, формировании фокусов репарации и остановке в клеточном цикле (чекпойнт-ответ). Все эти сигнальные пути координируются сенсорными киназами ATM и ATR. В отличие от соматических клеток эмбриональные стволовые клетки мыши (мЭСК) не имеют функциональной контрольной точки в фазе G₁ и подвергаются только временной задержке на границе фаз G₂/M. В настоящей работе исследовали способность мЭСК распознавать повреждения ДНК и формировать фокусы репарации после облучения. Показано, что облучение вызывает в мЭСК активацию киназ ATM (Ser1981) и ATR (Ser428), которые затем фосфорилируют ключевую мишень в создании репаративных фокусов гистона H2AX с образованием фокусов γ H2AX. Совместно с фокусами γ H2AX, маркирующими разрывы ДНК, были обнаружены белки, участвующие в репарации, — Rad51 и DNA-PK, а также важный регулятор чекпойнт-ответа 53BP1. С помощью ингибиторов киназ ATM, ATR, Chk1 и Chk2 было показано, что вклад сигнального каскада ATR/Chk1 в регуляцию клеточного цикла и выживаемость мЭСК после облучения больше, чем ATM/Chk2, так как подавление активности ATR-Chk1 (в отличие от ATM/Chk2) усиливает действие облучения мЭСК. Таким образом, мЭСК способны к распознаванию повреждений ДНК и формированию репаративных фокусов, однако механизмы их клеточного ответа на генотоксическое воздействие существенно отличаются от соматических клеток.

Ключевые слова: эмбриональные стволовые клетки мыши, разрывы ДНК, ATM, ATR, γ H2AX, репарация ДНК.

Принятые сокращения: ЭСК — эмбриональные стволовые клетки.

Эмбриональные стволовые клетки мыши (мЭСК) представляют собой уникальную клеточную популяцию, так как обладают двумя важными свойствами — самообновлением и плюрипотентностью, т. е. способностью образовывать все типы клеток взрослого организма. Соответственно поддержание стабильности генома мЭСК обеспечивается функционированием тонких механизмов, контролирующих распознавание и репарацию повреждений ДНК. Высокая пролиферативная активность мЭСК создает определенные ограничения в эффективности детекции и репарации повреждений ДНК. Кроме того, мЭСК не имеют функциональной контрольной точки на границе фаз G₁/S клеточного цикла и подвергаются только временному блоку на границе фаз G₂/M (Малашичева и др., 2002; Becker et al., 2006; Chuukin et al., 2008), что не позволяет использовать блок клеточного цикла G₁/S для полноценной репарации повреждений. Поэтому распознавание повреждений ДНК в мЭСК должно происходить одновременно с репликацией ДНК, что требует высокой степени точности и надежности функционирования этих механизмов.

Распознавание повреждений ДНК начинается с активации киназных путей, контролируемых каскадами ATM/Chk2 и ATR/Chk1, и формирования так называемых

репаративных фокусов, т. е. участков поврежденной ДНК, в которых аккумулируются белки, участвующие в репарации, и функционально связанные белки. Ранее считалось, что киназы ATM и ATR строго активируются в ответ на появление различных аберрантных структур ДНК — двухцепочечных и одноцепочечных разрывов соответственно (Smith et al., 2010). Однако в последнее время предполагается, что активация киназ ATM и ATR может быть взаимозависимой и их функции могут перекрываться (Cuadrado et al., 2006; Jazayeri et al., 2006; Myers et al., 2006).

Одной из центральных мишеней киназ ATM и ATR является гистон H2AX, который фосфорилируется по Ser139 с образованием фокусов γ H2AX и маркирует поврежденные участки ДНК (Kuo et al., 2008). В результате к поврежденным участкам привлекаются различные белки, усиливающие и стабилизирующие сигнал, среди которых комплекс Mre11/Nbs1/Rad50, MDC1, адаптерный белок 53BP1, репарационные белки Rad51 и DNA-PK (Fernandez-Capetillo et al., 2003). Параллельно сигнал о повреждении передается эффекторным киназам Chk2 и Chk1, которые являются субстратами для ATM и ATR соответственно и участвуют в остановке прогрессии клеточного цикла (Smith et al., 2010).

В настоящей работе исследовали активацию киназ ATM и ATR в эмбриональных стволовых клетках мыши (мЭСК) и формирование репаративных фокусов. Было показано, что облучение вызывает активацию киназ ATM и ATR, которые участвуют в образовании фокусов γ H2AX в мЭСК. Мы выявили, что с фокусами γ H2AX локализуются адаптерный белок 53BP1, а также ключевые белки обоих типов репараций, ответственных за восстановление двухнитевых повреждений ДНК — Rad51 и DNA-ПК соответственно. Кроме того, с помощью ингибиторов киназ ATM, ATR, Chk1 и Chk2 был проведен анализ вклада каскадов ATM/Chk2 и ATR/Chk1 в распределение мЭСК по фазам клеточного цикла и жизнеспособность в норме и после облучения. Было обнаружено, что сигнальный путь ATR/Chk1 в большей степени вовлечен в регуляцию чекпойнт-ответа и выживаемость мЭСК, чем ATM/Chk2.

Материал и методика

Клетки мЭСК линии IOUD2 культивировали при 37 °C и 5 % CO₂ на пластиковых чашках Петри (Corning, США), покрытых 0.2 %-ным раствором желатина (Sigma, США) в среде DMEM/F12 (Биолот, Россия), содержащей 0.1 мМ 2-меркаптоэтанола, 0.1 мМ заменимых аминокислот и 1 мМ пирувата (Gibco, США), 10 % сыворотки (Hyclone, США), 50 ед./мл фактора LIF (Sigma, США) или 1000 ед./мл рекомбинантного LIF. Последний был экспрессирован *E. coli* с конструкции pGEX-2T-hLIF и очищен на глутатион-сефарозе (конструкция любезно предоставлена А. Н. Томилиным, Институт цитологии РАН).

В работе использовали следующие ингибиторы (Calbiochem, Германия): ингибитор киназ ATM/ATR (CGK733, 4 мкМ), ингибитор только киназы ATM (KU55933, 10 мкМ), ингибитор киназы Chk2 (2-(4-(4-chlorophenyl)phenyl)-1H-benzimidazole-5-carboxamide, 8 мкМ) и ингибитор киназы Chk1 (4-(2-Phenyl)-9-hydroхуругло[3,4-c]carbazole-1,3-(2H,6H)-dione, 2 мкМ).

Культивируемые клетки подвергали рентгеновскому облучению в дозе 6 Гр на установке РУМ-17 (200 кВ, 13 мА, без фильтра, фокусное расстояние 40 см).

Распределение клеток по фазам клеточного цикла изучали методом проточной цитофлуориметрии. Клетки снимали с чашек и промывали раствором PBS. Пермеабиллизацию клеток проводили в 0.01%-ном растворе сапонина в PBS и инкубировали при комнатной температуре 30 мин. Затем пробы дважды промывали PBS и инкубировали в растворе РНКазы А (100 мкг/мл) и иодистого пропидия (40 мкг/мл) 15 мин при 37 °C. Пробы подвергали анализу на содержание ДНК на проточном цитометре Becton Dickinson FAC scan (США).

Жизнеспособность клеток оценивали колориметрическим методом, используя метилтиазолилдифенил-тетразолиум бромид (МТТ) (Sigma, США). Метод основан на том, что митохондриальные оксидоредуктазы (преимущественно дегидрогеназы) восстанавливают желтый МТТ до пурпурного формазана, количество которого затем измеряют спектрофотометрически. Поскольку эта реакция происходит только в живых клетках с активными митохондриальными ферментами, количество формазана коррелирует с числом живых клеток в популяции. Клеткам заменяли среду на раствор PBS, содержащий 0.5 мг/мл МТТ, и инкубировали 1 ч при 37 °C в атмосфере

ре 5 % CO₂. Образовавшийся осадок формазана растворяли в ДМСО (Sigma, США). Оптическую плотность измеряли при длине волны 570 нм против раствора МТТ в ДМСО на спектрофотометре Multiskan EX (Thermo Electron, США). Для каждой экспериментальной точки проводили 6 повторений и подсчитывали стандартную ошибку среднего.

Для иммунофлуоресцентного анализа клетки промывали раствором PBS, фиксировали 4%-ным параформальдегидом 15 мин и пермеабиллизировали 0.2%-ным Тритоном X-100 в PBS 20 мин при комнатной температуре. Затем клетки промывали 3 раза по 5 мин в PBS и инкубировали в блокирующем растворе (PBS, 5 % БСА, 0.01 % Tween-20) 1 ч при комнатной температуре. Первые и вторые антитела разводили в блокирующем растворе. В качестве первых антител в разведении 1 : 300 использовали мышинные антитела против фосфорилированной по Ser1981 киназы ATM (Millipore, США), фосфорилированной по Ser428 киназы ATR (SantaCruz, США), фосфорилированного по Ser139 гистона H2AX (γ H2AX) (Cell Signalling, США), кроличьи антитела против белка 53BP1, белка Rad51 (Santa Cruz, США), фосфорилированной по Ser2056 киназы DNA-ПК (Abcam, Англия). В качестве вторых антител использовали антитела против иммуноглобулинов кролика или иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с флуорохромом GAM/GAR-Alexa488 или GAM/GAR-Alexa 568; ядра окрашивали Top-ro3 (Invitrogen, США).

Для измерения интенсивности иммунофлуоресценции полученные цифровые изображения с помощью конфокального микроскопа обрабатывали с помощью программного обеспечения IPLab.

Для исследования содержания белков методом Вестерн-блоттинга клетки лизировали в PBS, содержащем 1 % NP40, 0.5 % деоксихолата натрия, 0.1 % SDS, ингибиторы протеаз и фосфатаз, и далее центрифугировали. Количество белка в пробах измеряли по методу Брэдфорд, на гель наносили равное количество белка в каждой пробе (50 мкг). После диск-электрофореза в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях белки переносили на мембрану PVDF (Amersham, Англия). В качестве первых антител использовали мышинные антитела против фосфорилированного по Ser139 гистона H2AX (γ H2AX) (CellSignaling, США) в разведении 1 : 1000, а также кроличьи антитела против GAPDH (CellSignaling, США; разведение 1 : 1000). В качестве вторых антител использовали антитела кролика против иммуноглобулинов мыши и антитела козла против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена. Белки выявляли методом усиленной хемилюминесценции (ECL, Amersham, Англия).

Результаты

Активация киназ ATM и ATR в мЭСК после облучения. В ответ на генотоксическое воздействие киназы ATM и ATR активируются автофосфорилированием по Ser1981 и Ser428 соответственно и привлекают к поврежденным одно- и двухнитевым участкам ДНК различные белки. На рис. 1, а, б видно, что облучение индуцирует активацию киназ ATM и ATR по сайтам автофосфорилирования и их накопление в ядре.

Формирование фокусов γ H2AX и их ко-локализация с белками RAD51, DNA-ПК и

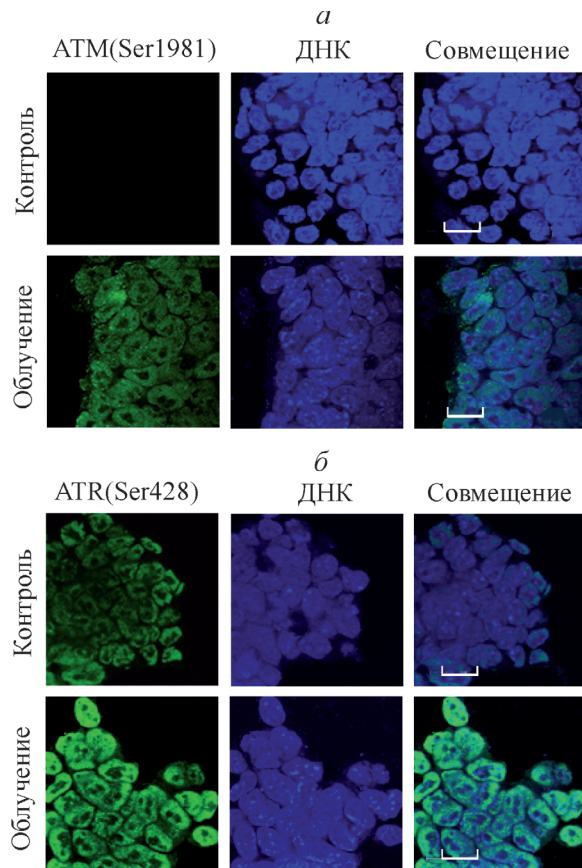


Рис. 1. Активация киназ ATM и ATR в ЭСК мыши (мЭСК) после облучения.

a — иммунофлуоресцентное мечение антителами против фосфорилированной по Ser1981 формы киназы ATM в мЭСК в контроле и через 30 мин после облучения в дозе 6 Гр; ядра окрашены То-про3. *б* — иммунофлуоресцентное мечение антителами против фосфорилированной по Ser428 формы киназы ATR в мЭСК в контроле и через 30 мин после облучения в дозе 6 Гр; ядра окрашены То-про3. Масштабные отрезки (*a, б*) — 15 мкм.

53BP1 в мЭСК после облучения. Через 30 мин после облучения активация киназ ATM и ATR сопровождается фосфорилированием гистона H2AX по Ser139 с образованием фокусов γ H2AX (рис. 2). Поскольку γ H2AX привлекает к местам повреждения ДНК другие белки, мы исследовали колокализацию фокусов γ H2AX с белками Rad51, DNA-ПК и 53BP1 после облучения. Показали, что ключевой белок процесса репарации по типу гомологичной рекомбинации (HRR) Rad51 локализуется совместно с фокусами γ H2AX через 30 мин после облучения (рис. 2, *a*). Используя антитела к активированной по Ser2056 киназе DNA-ПК, которая участвует в репарации по типу негомологичного воссоединения концов (NHEJ), мы также обнаружили ее колокализацию с фокусами γ H2AX в мЭСК через 30 мин после облучения (рис. 2, *б*). Белок 53BP1, который является адапторным для опухолевого супрессора p53 и одним из центральных участников в создании репаративных фокусов, был локализован с фокусами γ H2AX через 30 мин после облучения (рис. 2, *в*).

Далее мы выявили, что неиндуцированные фокусы γ H2AX, которые обнаруживаются в необлученных мЭСК, колокализуются только с Rad51, в то время как белки DNA-ПК и 53BP1 обнаруживаются с фокусами γ H2AX

только в облученных клетках (рис. 2, *a*). Используя ингибитор киназ ATM/ATR, мы исследовали вклад этих киназ в формирование эндогенных и индуцированных облучением фокусов γ H2AX. Было показано, что ингибитор ATM/ATR не влияет на число фокусов в контрольных клетках, в то время как в облученных клетках предварительная обработка этим ингибитором приводит к снижению числа фокусов γ H2AX, индуцированных облучением (рис. 3).

Распределение мЭСК по фазам клеточного цикла после ингибирования киназ ATM, ATR, Chk1 и Chk2 в норме и после облучения. Киназы ATM и ATR играют ключевую роль не только в формировании репаративных фокусов, но и в ак-

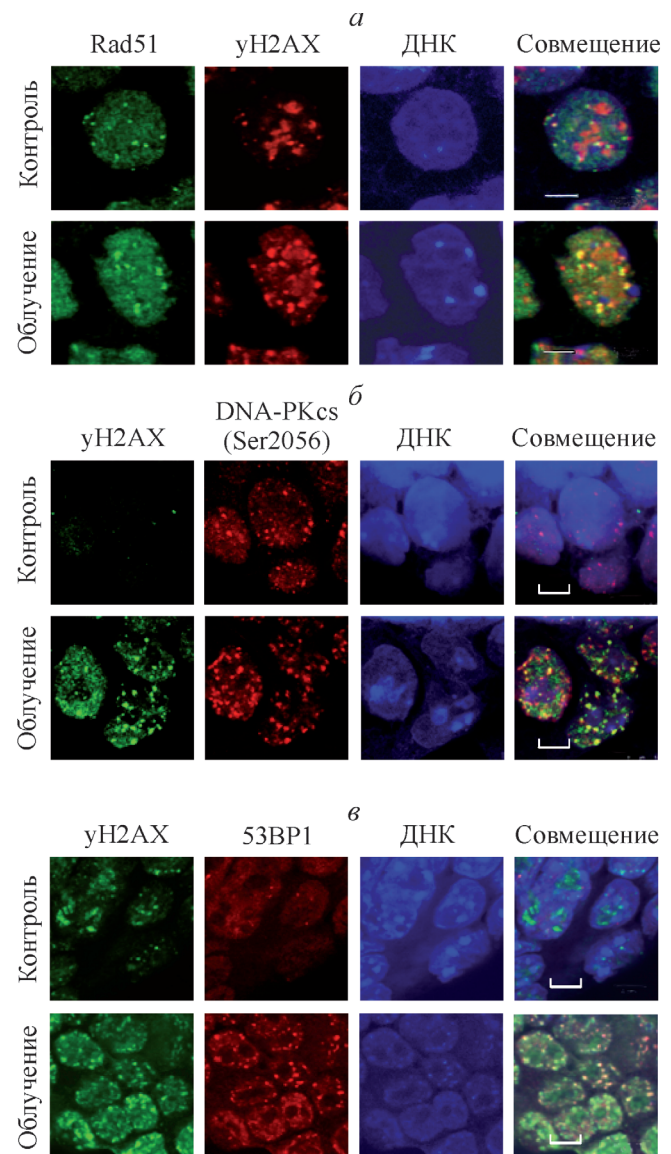


Рис. 2. Образование фокусов γ H2AX, колокализованных с белками Rad51, DNA-ПК и 53BP1, в мЭСК через 30 мин после облучения в дозе 6 Гр.

a — иммунофлуоресцентный анализ локализации фокусов γ H2AX (красный цвет) и белка Rad51 (зеленый цвет), ядра окрашены То-про3; *б* — иммунофлуоресцентное мечение антителами против фосфорилированного по Ser139 гистона H2AX (γ H2AX) (зеленый цвет) и фосфорилированного по Ser2056 белка DNA-ПК (красный цвет); *в* — иммунофлуоресцентное мечение антителами против фосфорилированного по Ser139 гистона H2AX (γ H2AX) (зеленый цвет) и белка 53BP1 (красный цвет). Масштабные отрезки — 3.75 (*a*), 5 (*б*) и 6 (*в*) мкм.

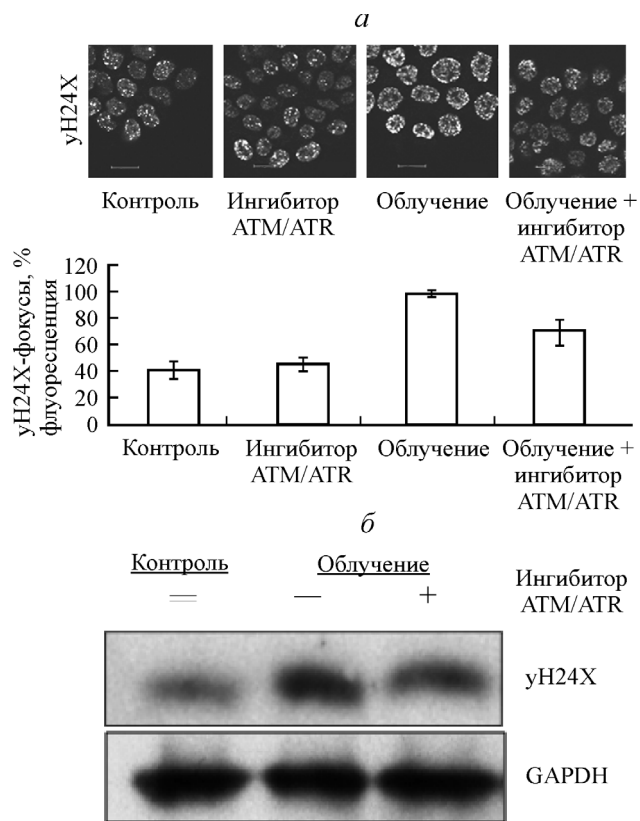


Рис. 3. Интенсивность флуоресценции фокусов γ H2AX, меченых антителами к γ H2AX, в мЭСК.

а — флуоресценция клеток (вверху) и ее количественная оценка с помощью программного обеспечения IPlab (внизу). Анализировали мЭСК в контроле, после обработки ингибитором киназ ATM/ATR (4 мкМ) в течение 1 ч, через 30 мин после облучения (6 Гр) и после совместного действия ингибитора и облучения. *б* — Вестерн-блот-анализ фосфорилированного по Ser139 гистона H2AX (γ H2AX) в контроле, через 30 мин после облучения и через 30 мин после облучения в присутствии ингибитора ATM/ATR (4 мкМ). В качестве контроля нагрузки использовали антитела к белку GAPDH. Масштабные отрезки — 15 мкМ.

тивации контрольных точек клеточного цикла при повреждении ДНК через фосфорилирование своих субстратов Chk2 и Chk1 соответственно (Helt et al., 2005). Мы проанализировали эффект ингибиторов киназ ATM/ATR и их мишеней киназ Chk2/Chk1 на распределение мЭСК по фазам клеточного цикла до и после облучения. Оказалось, что облученные мЭСК не останавливаются в контрольной точке G₁ клеточного цикла и реализуют лишь временную задержку на границе фаз G₂/M (рис. 4), что согласуется с данными литературы (Малашичева и др., 2002; Hong et al., 2004; Chuykin et al., 2008; Momcilovic et al., 2009). Мы обнаружили существенное снижение (с 72 до 56 %) числа мЭСК, находящихся в фазе S, через 20 ч культивирования в присутствии ингибитора киназ ATM/ATR (рис. 4, *а*). В сочетании с облучением ингибитор киназ ATM/ATR вызывал еще большее снижение числа S-фазных клеток (до 31 %) и значительную аккумуляцию клеток в фазе G₂ (рис. 4, *б*). Ингибирование только киназы ATM слабо влияло на распределение мЭСК по фазам клеточного цикла как в норме, так и после облучения по сравнению с совместным ингибированием киназами ATM и ATR (рис. 5, *а, б*).

Ингибирование киназы Chk1 в норме ведет к незначительному увеличению числа мЭСК в фазе G₁ за счет

понижения доли S-фазных клеток (рис. 4, *а*). При совместном действии с облучением ингибитор Chk1 вызывал значительную аккумуляцию мЭСК в фазе G₁ и их уменьшение в фазе G₂ (рис. 4, *б*). Ингибирование киназы Chk2 не влияло на параметры распределения мЭСК по клеточному циклу как в норме, так и после облучения (рис. 4, *а, б*). Таким образом, сигнальный путь ATR/Chk1, а не ATM/Chk2 вносит значительный вклад в прогрессию мЭСК по клеточному циклу.

Влияние ингибирования киназ ATM, ATR, Chk1 и Chk2 на выживаемость мЭСК в норме и после облучения. Используя МТТ-тест, мы проанализировали выживаемость мЭСК через 20 ч после обработки клеток ингибиторами киназ ATM, ATM/ATR, Chk1 и Chk2 до и после облучения (рис. 5). Облучение в дозе 6 Гр вызывало гибель около 50 % всей клеточной популяции, в то время как ингибитор ATM/ATR обладал еще большим подавляющим действием на жизнеспособность мЭСК: гибель контрольных клеток составила свыше 70, а облученных — 80 % (рис. 5, *а*). Ингибитор киназы Chk1 также приводил к существенной гибели клеточной популяции после облучения, хотя и сам по себе несколько влиял на выживаемость мЭСК в норме (рис. 5, *а*). В отличие от ингибиторов киназ ATR и Chk1 ингибирование киназы ATM и ее мишени Chk2 незначительно влияло на жизнеспособность клеток как в норме, так и после облучения (рис. 5, *а, б*). Таким образом, именно сигнальный каскад ATR/Chk1 вносит существенный вклад в выживаемость мЭСК.

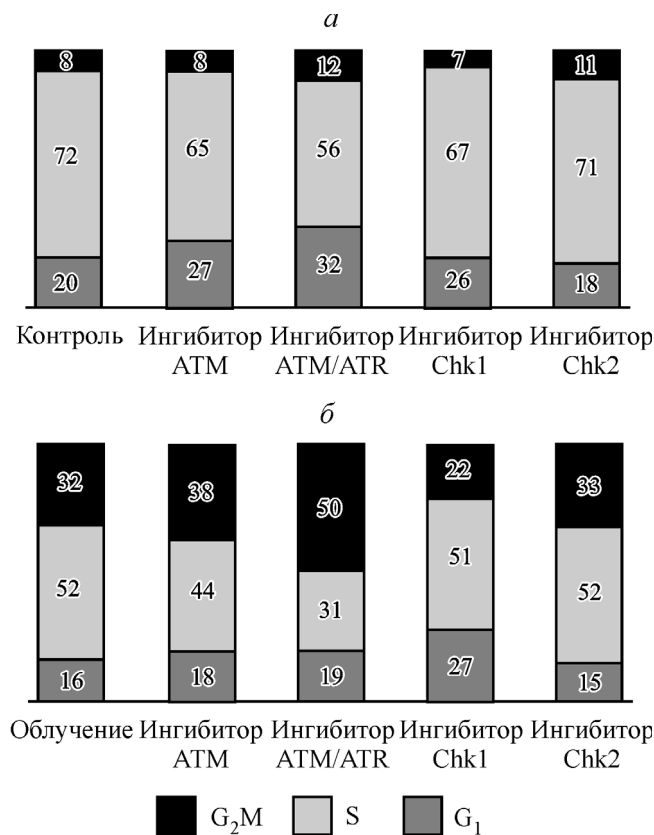


Рис. 4. Диаграммы распределения мЭСК по фазам клеточного цикла в присутствии ингибиторов киназ ATM/ATR (4 мкМ), ATM (10 мкМ), Chk1 (2 мкМ) и Chk2 (8 мкМ) в норме (*а*) и после облучения (*б*). Данные проточной цитофлуориметрии. Ингибиторы вводили за 1 ч до облучения (6 Гр).

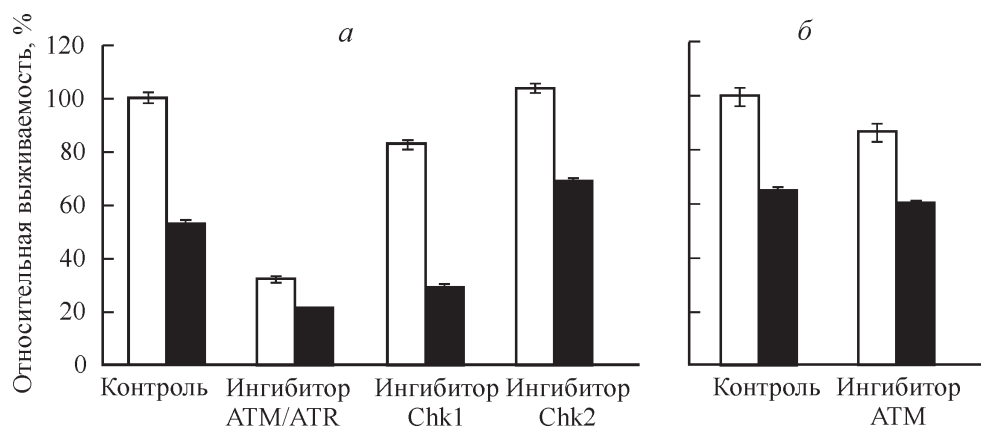


Рис. 5. Влияние ингибиторов киназ ATM/ATR (4 мкМ), Chk2 (8 мкМ), Chk1 (2 мкМ) (а) и ATM (10 мкМ) (б) на жизнеспособность мЭСК в контроле (белые столбцы) и через 20 ч после облучения в дозе 6 Гр (черные столбцы).

МТТ-тест.

Обсуждение

Запуск сигнальных путей, ответственных за остановку клеточного цикла и репарацию ДНК в ответ на действие генотоксического стресса, начинается с активации сенсорных киназ ATM и ATR и детекции повреждения ДНК. мЭСК характеризуются короткой продолжительностью клеточного цикла за счет укороченной фазы G₁ и не имеют функциональной контрольной точки в фазе G₁ (Малашичева и др., 2002; Becker et al., 2006; Chuqin et al., 2008; Coronado et al., 2013). Поскольку пролиферативная активность мЭСК высока, они должны иметь эффективные механизмы репарации повреждений, чтобы не допустить дефектов ДНК и передачи мутаций дочерним клеткам.

Согласно полученным результатам, облучение вызывает активацию киназ ATM и ATR, которые фосфорилируют гистон H2AX по Ser139, что прямо свидетельствует о способности мЭСК опознавать поврежденные участки ДНК и формировать репаративные фокусы (рис. 1—3). Обнаружение белка Rad51 в сайтах локализации фокусов γH2AX прямо свидетельствует об инициации репаративного процесса по типу HRR, который является очень точным, так как в качестве матрицы используется гомологичная последовательность. А колокализация γH2AX с белком Rad51 как в норме, так и после облучения свидетельствует о предпочтении этими клетками HRR-пути независимо от источника повреждений. Наблюдаемые фокусы Rad51 и γH2AX в необлученных мЭСК могут свидетельствовать о неполном созревании репликативной вилки или репликативном коллапсе, возникающем на фоне быстрой пролиферации этих клеток, и их преимущественном нахождении в фазе S. Интересно, что совместно с фокусами γH2AX выявляется киназа DNA-ПК — ключевой белок репарации по типу NHEJ, который в большей степени подвержен ошибкам (рис. 2, б). Ранее сообщалось об отсутствии NHEJ-репарации в мЭСК, обусловленной низкой экспрессией белка DNA-ПК (Banuelos et al., 2008). Однако наши результаты свидетельствуют о том, что наряду с HRR-путем мЭСК используют и NHEJ-путь. Кроме того, обнаруженные фокусы белка 53BP1 с γH2AX свидетельствуют не только об успешной активации чекпойнт-ответа, но и о наличии регуляции репарации по типу NHEJ (Iwabuchi et al., 2003; Gupta et al., 2014). По всей видимости, мЭСК демонстрируют уни-

кальную репаративную стратегию с использованием обоих типов репараций поврежденной ДНК, а также их возможного переключения.

Далее мы выявили различный вклад сигнальных путей ATM/Chk2 и ATR/Chk1 в клеточную прогрессию и выживаемость мЭСК. Мы сравнили эффект ингибиторов сигнальных каскадов ATM/Chk2 и ATR/Chk1 и обнаружили, что сигнальный путь ATR/Chk1 вносит больший вклад в распределение ЭСК по клеточному циклу и их выживаемость после облучения, чем путь ATM/Chk2 (рис. 4, 5). Различный вклад сигнальных путей ATM/Chk2 и ATR/Chk1 в чекпойнт-ответ подтверждается данными, полученными *in vivo*. Так, нокаут гена *atm* у мышей не является летальным, хотя животные характеризуются отсталостью в росте и ослабленной фертильностью, в то время как нокаут гена *atr* ведет к эмбриональной летальности (De Klein et al., 2000). Более того, бластоцисты, полученные от мышей *atr*^{-/-}, умирали в культуре посредством митотической катастрофы (Banuelos et al., 2008). Тем не менее ЭСК с нокаутом по гену *atm* могли осуществлять репарацию повреждений ДНК, хотя и с огромным числом ошибок по сравнению ЭСК, нормально экспрессирующими белок ATM. Сниженная роль киназы ATM в процессе репарации мЭСК может быть связана с функциональными ограничениями ее субстрата Chk2, которая локализована на центросомах (Hong et al., 2007). В согласии с данными этой работы мы показали, что последствия ингибирования киназ Chk1 и Chk2 в мЭСК различны. Подавление активности Chk1 снижает выживаемость и уменьшает число клеток, претерпевающих временной блок на границе фаз G₂/M, в то время как ингибирование Chk2 не имеет никакого влияния на прохождение по клеточному циклу и выживаемость клеток.

Таким образом, мы показали функциональную активность ключевых компонентов репаративных фокусов ATM/ATR-киназного сигнального каскада, что свидетельствует о способности мЭСК детектировать повреждение ДНК с запуском соответствующих сигнальных путей. По-видимому, функционирование этих путей строго скоординировано с основными свойствами ЭСК, самообновлением и плюрипотентностью и может отличаться от соматических клеток.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (про-

ект 11-04-01393), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и проекта НИР С.-Петербургского государственного университета (1.38.247.2014).

Список литературы

Малашичева А. Б., Кислякова Т. В., Саватьер П., Поспелов В. А. 2002. Эмбриональные стволовые клетки не останавливаются в клеточном цикле при действии повреждающих факторов. Цитология. 44 (7) : 643—648. (Malashicheva A. B., Kisliakova T. V., Savatier P., Pospelov V. A. 2002. Embryonal stem cells do not undergo cell cycle arrest upon exposure to damaging factors. Tsitologiya. 44 (7) : 643—648.)

Bañuelos C. A., Banáth J. P., MacPhail S. H., Zhao J., Eaves C. A., O'Connor M. D., Lansdorp P. M., Olive P. L. 2008. Mouse but not human embryonic stem cells are deficient in rejoining of ionizing radiation-induced DNA double-strand breaks. DNA Repair. 7 : 1471—1483.

Becker K. A., Ghule P. N., Therrien J. A., Lian J. B., Stein J. L., van Wijnen A. J., Stein G. S. 2006. Self-renewal of human embryonic stem cells is supported by a shortened G₁ cell cycle phase. J. Cell. Physiol. 209 : 883—893.

Chuykin I. A., Lianguzova M. S., Pospelova T. V., Pospelov V. A. 2008. Activation of DNA damage response signaling in mouse embryonic stem cells. Cell. Cycle. 7 : 2922—2928.

Coronado D., Godet M., Bourillot P. Y., Taponnier Y., Bernat A., Petit M., Afanassieff M., Markossian S., Malashicheva A., Iacone R., Anastassiadis K., Savatier P. 2013. A short G₁ phase is an intrinsic determinant of native embryonic stem cell pluripotency. Stem Cell Res. 10 : 118—131.

Cuadrado M., Martinez-Pastor B., Murga M., Toledo L. I., Gutierrez-Martinez P., Lopez E., Fernandez-Capetillo O. 2006. ATM regulates ATR chromatin loading in response to DNA double-strand breaks. J. Exp. Med. 203 : 297—303.

De Klein A., Muijtjens M., van Os R., Verhoeven Y., Smit B., Carr A. M., Lehmann A. R., Hoeijmakers J. H. 2000. Targeted disruption of the cell-cycle checkpoint gene ATR leads to early embryonic lethality in mice. Curr. Biol. 10 : 479—482.

Fernandez-Capetillo O., Celeste A., Nussenzweig A. 2003. Focusing on foci: H2AX and the recruitment of DNA-damage response factors. Cell Cycle. 2 : 426—427.

Helt C. E., Cliby W. A., Keng P. C., Bambara R. A., O'Reilly M. A. 2005. Ataxia telangiectasia mutated (ATM) and ATM and Rad3-related protein exhibit selective target specificities in response to different forms of DNA damage. J. Biol. Chem. 280 : 1186—1192.

Hong Y., Cervantes R. B., Tichy E., Tischfield J. A., Stambrook P. J. 2007. Protecting genomic integrity in somatic cells and embryonic stem cells. Mutat. Res. 614 : 48—55.

Hong Y., Stambrook P. J. 2004. Restoration of an absent G₁ arrest and protection from apoptosis in embryonic stem cells after ionizing radiation. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 101 : 14 443—14 448.

Gupta A., Hunt C. R., Chakraborty S., Pandita R. K., Yordy J., Ramnarain D. B., Horikoshi N., Pandita T. K. 2014. Role of 53BP1 in the regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. Radiat. Res. 181 : 1—8.

Iwabuchi K., Basu B. P., Kysela B., Kurihara T., Shibata M., Guan D., Cao Y., Hamada T., Imamura K., Jeggo P. A., Date T., Doherty A. J. 2003. Potential role for 53BP1 in DNA end-joining repair through direct interaction with DNA. J. Biol. Chem. 278 : 36 487—36 495.

Jazayeri A., Falck J., Lukas C., Bartek J., Smith G. C., Lukas J., Jackson S. P. 2006. ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. Nat. Cell Biol. 8 : 37—45.

Kuo L. J., Yang L. X. 2008. Gamma-H2AX — a novel biomarker for DNA double-strand breaks. In Vivo. 22 : 305—309.

Momcilovic O., Choi S., Varum S., Bakkenist C., Schatten G., Navara C. 2009. Ionizing radiation induces ataxia telangiectasia mutated-dependent checkpoint signaling and G₂ but not G₁ cell cycle arrest in pluripotent human embryonic stem cells. Stem Cells. 27 : 1822—1835.

Myers J. S., Cortez D. 2006. Rapid activation of ATR by ionizing radiation requires ATM and Mre11. J. Biol. Chem. 281 : 9346—9350.

Smith J., Tho L. M., Xu N., Gillespie D. A. 2010. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. Adv. Cancer Res. 108 : 73—112.

Поступила 19 II 2014

ANALYSIS OF IRRADIATION-INDUCED REPAIR FOCI IN MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS

I. I. Suvorova,^{1, 2, *} V. A. Pospelov^{1, 2}

¹ Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, and ² St.-Petersburg State University;

* e-mail: irsuvorov@yandex.ru

Somatic cells in response to DNA damage activate two important protective mechanisms: G₁ checkpoint control and a program for recognizing and repairing DNA defects (DDR signaling). Both mechanisms are triggered by the activation of common sensor kinases ATM and ATR, which in turn phosphorylate downstream targets. Mouse embryonic stem cells (mESCs) lack of G₁ checkpoint and undergo only temporary G₂ delay after DNA damage. We have analyzed the ability of mESCs to detect DNA damage and to form repair foci after irradiation. We showed irradiation-induced activation of ATM and ATR is followed by formation of γ H2AX foci co-localized with DNA repair proteins Rad51, DNA-PK and adapter protein 53BP1. Furthermore, we checked contribution of ATM/Chk2 and ATR/Chk1 cascades to cell cycle control and viability of mESCs after DNA damage. Inhibition of ATR/Chk1 cascade leads to accumulation of G₁ phase cells, whereas perturbation of ATM/Chk2 activity causes no such effect. Moreover, inhibition of ATR/Chk1 activity, but not ATM/Chk2, substantially augments the killing effect of ionizing radiation on mESCs. In summary, our results indicate that mESCs are capable of recognizing DNA damage and forming repair foci, but their DDR signaling it seems to be distinct from somatic cells and tightly connected with maintaining of pluripotency and self-renewal.

Key words: mouse embryonic stem cells, DNA damage, ATM, ATR, γ H2AX, DNA repair.