

Екстрахромосомні ДНК у клітинах еукаріот

К. В. Крисан

Інститут молекулярної біології та генетики НАН України
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

Відомо дві основні форми існування трансгенів — інтегрована в геном реципієнта та екстрахромосомна. Хоча інтегровані трансгени зустрічаються значно частіше, ніж такі, які здатні до сталого позахромосомного існування, останні є набагато цікавішими і перспективнішими для біотехнології та біомедицини. Однак механізми, що визначають форму існування екстрахромосомних ДНК, наразі досліджені ще недостатньо. В даному огляді проаналізовано ці механізми та розглянуто екстрахромосомні ДНК різного походження.

Вступ. Кожна стадія розвитку організму характеризується диференційною активацією або репресією певних генів, пов'язаними зі специфічною взаємодією окремих частин геному. Трансгенез наразі став одним з важливіших підходів для вивчення механізмів функціонування геному в цілому, взаємодії його частин, ролі окремих генів та регуляції їхньої експресії. Цей метод широко використовується для виявлення функцій окремих генів шляхом їхнього спрямованого руйнування або випадкового інсерційного мутагенезу з наступним дослідженням отриманих фенотипових ефектів, вивченням активації промоторів на різних етапах онтогенезу та ін. Надзвичайно широке використання цей метод також знаходить при розв'язанні прикладних завдань біотехнології та біомедицини. Тут слід назвати спрямовану зміну генотипу сільськогосподарських тварин для отримання порід, що мають нові господарсько цінні ознаки, та корекцію генетичних захворювань людини завдяки введенню ззовні в її клітини повноцінних копій генів, що мали дефекти. Однак дестабілізація геному реципієнта, викликана внесенням чужорідної генетичної інформації, а також нерідко важкопередбачувана поведінка трансгенів, пов'язана з їхньою частою модифікацією та неконтрольованою експресією, істотно утруднюють використання трансгенезу як у дослідницьких, так і прикладних цілях. У зв'язку з цим важливого значення набуває вивчення взаємодії між трансгенами та геномами ха-

зяїв, а також створення модельних систем для пошуку закономірностей такої взаємодії.

Відомо три основних варіанти поведінки трансгенів — повна елімінація, інтеграція в геном реципієнта та існування в екстрахромосомному стані. Як інтегровані, так і екстрахромосомні форми трансгенів часто зазнають істотних модифікацій, механізми і закономірності яких практично не досліджено. Крім того, інтегровані трансгени (на відміну від більшості екстрахромосомних) можуть викликати небажані інсерційні мутації, що надає важливого значення вивченню спорідненості трансгенів до конкретних геномних нуклеотидних послідовностей. З точки зору передбачуваності та керованості зручнішими видаються трансгени, здатні існувати позахромосомно. Однак увесь комплекс факторів, що визначають форму існування трансгена та впливають на його стабільність, поки що залишається невивченим. У зв'язку з цим привертають увагу екстрахромосомні ДНК еукаріот, які, на думку автора, маючи високу рекомбінаційну активність, можуть відігравати суттєву роль у модифікації трансгенів та їхньому екстрахромосомному функціонуванні.

Довгий час існувала точка зору стосовно того, що геном еукаріот складається лише з хромосом, а наявність екстрахромосомної ДНК є характерною тільки для прокаріот. Тому, коли з'явилися повідомлення про виділення позахромосомних ДНК з ядер еукаріот, спочатку вважалося, що це — артефакти, продукти руйнування хромосом у процесі маніпуляцій. Однак після візуалізації великих позахромосомних ДНК за допомогою електронної

мікроскопії та покращання методів виділення та аналізу малих екстрахромосомних ДНК не залишилося сумнівів, що ці ДНК також є частинами геномів еукаріот та до того ж вельми важливими.

Мініхромосоми та ампліфіковані гени. Взагалі існує доволі умовний поділ екстрахромосомних ДНК еукаріот за розміром на великі й малі, причому до великих звичайно відносять ампліфіковані гени, а до малих — позахромосомні ДНК, що містять повторювані послідовності. Однак нерідко серед малих екстрахромосомних ДНК також знаходяться такі, що містять унікальні нуклеотидні послідовності геномного або вірусного походження. Тому для чіткішої класифікації доцільно виділити в одну групу ампліфіковані гени та часто утворювані ними мініхромосоми, а в другу — екстрахромосомні ДНК, що містять повторювані, неідентифіковані унікальні та вірусні нуклеотидні послідовності.

Вперше ампліфікацію генів було помічено в культурах еукаріотичних клітин, які вирощували в присутності отрут та антиметаболітів. Існують два варіанти ампліфікації: внутрішньохромосомна та позахромосомна. Перший шлях веде до утворення ділянок хромосом, що гомогенно забарвлюються (тобто таких, що не утворюють смуг при забарвленні за методом Гімза) [1], а другий — до появи в ядрі кільцевих копій мультиплікованого гена (генів) розміром від 50 до 3000 тис. п. н.

При культивуванні клітин еукаріот у присутності метатрексату (MTX) у них відбувається ампліфікація гена дигідрофолатредуктази (*dhfr*), продукт якого забезпечує стійкість клітин до цієї речовини. Найчастіше така ампліфікація веде до утворення епісом, кожна з яких містить кілька тандемно розташованих копій гена [2, 3]. Попередниками епісом є лінійні амплікони, кожен з яких складається з однієї копії гена. Ці попередники з'єднуються тандемно (можливо, в цьому процесі бере участь механізм, за допомогою якого утворюються тандемно з'єднані копії трансгенів, що їх було описано в попередньому розділі) та замикаються у кільця [4]. Ген *dhfr* відноситься до групи генів стійкості до отрут «multidrug-resistance genes (*mdr*)». У цю ж групу входить також ген *cad*, який забезпечує стійкість клітин до іншого антиметаболіта — N-фосфонацетил-L-аспартату (PALA). При додаванні цієї речовини до культурального середовища відбувається ампліфікація гена *cad* з утворенням епісом [5, 6]. Ще один представник *mdr*-генів — ген металотіонеїну I, ампліфікується при додаванні до культурального середовища солей важких металів [7, 8]. При вирощуванні клітин у присутності двох агентів — MTX та PALA від-

бувається коампліфікація відповідних генів [9]. Ампліфікація генів, продукти яких надають клітинам стійкості до токсичних компонентів середовища, не обмежується генами групи *mdr*. У присутності овабайну спостерігається ампліфікація α -субодиниці Na, K-АТРази, в результаті чого клітини стають стійкими до цієї сполуки [10]. У клітинах, стійких до піразофурина, виявлено ампліфікацію гена, що кодує UMP-синтазу [11].

Питання про те, чи можуть епісоми, які містять ампліфіковані копії генів, реплікуватися, чи вони просто існують деякий час у позахромосомному стані для збільшення дози генів та поповнюються новими копіями за рахунок ампліфікації, довгий час залишалося відкритим. Для реплікації епісоми мають містити принаймні стартову точку (*ori*) реплікації та, можливо, деякі додаткові нуклеотидні послідовності. Важливі докази на користь вірогідності екстрахромосомної реплікації ампліфікованих генів групи *mdr* було отримано під час вивчення хромосомних *ori* реплікації. Наявність *ori* реплікації було показано у гені *dhfr* та в його екстрахромосомних копіях [12]. Пізніше було підтверджено і екстрахромосомну реплікацію епісом, які містять цей ген [13—15]. Аналогічні дані отримано також для ген *cad* [5, 16]. Іншим відносно добре вивченим випадком ампліфікації є ампліфікація протоонкогенів у клітинах пухлин [17]. Одне з перших спостережень такої ампліфікації було зроблене для протоонкогена *myc* [18—21]. Копії гена звичайно містяться в епісомах у положенні «голова—хвіст», а фізична карта цих копій відповідає такій хромосомного гена [22]. Так само, як і гени групи *mdr*, ген *myc* містить *ori* реплікації, який дозволяє *myc*-епісомам реплікуватися позахромосомно [23]. Будучи клонованим, цей *ori* реплікації здатний здійснювати реплікацію конструкцій, що його містять [24, 25].

Ампліфікація протоонкогенів майже завжди спостерігається в різних пухлинах, причому набір ампліфікованих онкогенів є пухлиноспецифічним. Ампліфікація — одна з найранішніх подій пухлиноутворення, тобто збільшення дози та гіперекспресія відповідних генів стають причиною розвитку пухлини [17]. Низькі концентрації певних агентів, таких як гідроксисечовина чи диметилсульфоксид, знижують кількість епісом та мініхромосом у клітинах. При цьому клітини пухлин, які були іморталізовані внаслідок ампліфікації гена *myc*, втрачають іморталізований статус та починають диференціюватися [26].

Активне вивчення ДНК різних пухлин дозволило виявити численні випадки ампліфікації генів, що не відносяться до групи протоонкогенів. У

клітинах пухлини молочної залози та однієї з форм гліобластоми виявлено ампліфікацію гена рецептора епідермального фактора росту [27]. Ампліфікований ген однієї з серин-треонінових кіназ також знайдено в клітинах пухлини молочної залози людини [28]. Гени, що кодують дві інші серин-треонінові кінази, відповідальні за регуляцію клітинного циклу, ампліфікуються в деяких пухлинах людини [29]. Велику зацікавленість представляє ампліфікація генів циклінів D1 та D2 у різних пухлинах [30–32]. Гени, що кодують білки CDK4 та MDM2, часто коампліфікуються у саркомах людини [33]. В клітинах пухлини передміхурової залози *in vivo* спостерігається ампліфікація гена, який кодує рецептор андрогенних гормонів [34]. У деяких пухлинах типу гліом ампліфікується ген білка GAC1, члена родини лейцин-багатих білків. Функції цього білка не зовсім зрозумілі, але він має гомологію з білками, які забезпечують клітинну адгезію, та з рецепторами, що беруть участь у передачі сигналу [35]. Хотілося б підкреслити той факт, що, крім протоонкогенів, в іморталізованих клітинах ампліфікуються або гени білків, що беруть участь у регуляції клітинного циклу, або гени рецепторів чи сигнальних молекул. Сучасні методи дозволяють також виявити ампліфікацію окремих ділянок хромосом. Не завжди вдається пов'язати ці ділянки з конкретними генами, але поступово, по мірі накопичення інформації про локалізацію генів на хромосомах, це стає можливим [29, 35].

Епісоми, що містять гени групи *mdr*, протоонкогени, епідермальний фактор росту та, вочевидь, інші гени, що ампліфікуються у пухлинах, об'єднуючись, здатні до утворення мініхромосом (DM's — double minute chromosomes), які часто є видимими у світловому мікроскопі [37]. Як епісоми, так і мініхромосоми можуть інтегрувати в геном, утворюючи ділянки хромосом, що гомогенно забарвлюються, та навпаки, виникати з таких ділянок шляхом ексцизії [38]. Між інтра- та екстрахромосомними копіями генів спостерігається також так звана інтерконверсія — вторинні перебудови, пов'язані з рекомбінацією окремих ділянок та копій генів [39]. Мініхромосоми (як і епісоми), що містять гени *mdr*, поступово елімінують при відсутності селективного тиску [40].

Всі згадані випадки ампліфікації було виявлено при різних патологіях та стресових станах. Про ампліфікацію генів у нормі відомо значно менше, але вона є дуже цікавою, оскільки демонструє необхідність цього процесу для життєдіяльності клітини. Хоча ідентифіковано лише невелику кількість генів, здатних до подібної ампліфікації, і пошук ампліфікації в нормі, особливо у дорослих

організмів, є досить важким [41, 42], все ж таки можна припустити, що це — розповсюджене явище, переважно в ранньому ембріогенезі, коли на деяких стадіях потрібний швидкий синтез великих кількостей певних білків або при перебудовах деяких нестабільних локусів, як у випадку β -рецептора Т-клітин, який ампліфікується у тимусі мишачих ембріонів [43]. Під час ембріогенезу дрозофіли ампліфікуються гени білків хоріону, продукти яких з'являються на певних стадіях онтогенезу у великих кількостях [44, 45]. Слід зазначити, що цей процес контролюється спеціальним елементом (ACE — amplification control element), який може викликати ампліфікацію розташованих поруч нуклеотидних послідовностей при переміщенні в іншу область геному. Ампліфікація окремих генів ще однієї комахи, *Sciara coprophila*, регулюється екдизонзв'язуючий елемент. Інший характерний приклад — це ампліфікація генів, що кодують рибосомні РНК (рРНК), яка відбувається у різних організмів. Вперше епісоми, що містили гени рРНК, було виявлено в ооцитах шпорцевої жаби *Xenopus laevis*. Ці епісоми мали різний розмір у залежності від кількості копій гена [46]. Аналогічне явище відбувається також в ооцитах деяких комах [47, 48]. На універсальність цих процесів вказує той факт, що екстрахромосомні копії кількох генів виявлено на деяких стадіях клітинного циклу зеленої водорості хламідомонади [49]. У дріжджів збільшення кількості екстрахромосомних кільцевих копій генів рРНК у клітині є ознакою старіння. Клітини, в яких вміст таких епісом переважає деяке порогове значення, гинуть [50].

Оскільки гени рРНК та міжгенні області містять численні *ori* реплікації, ампліфіковані копії цих генів можуть реплікуватися автономно [50, 51]. Гени рРНК демонструють здатність коампліфікуватися з геном *cad* у клітинах, стійких до PALA [52]. Для генів, що кодують рРНК (рДНК), характерним є високий ступінь метильованості. Не є виключенням і ампліфікована рДНК. Гени рРНК, які містяться в епісомах, також метильовані, що вказує на збереження відповідних сигнальних нуклеотидних послідовностей [53].

Ампліфікуватися можуть не лише гени структурних білків. Ще в 1991 році було запропоновано апріорну гіпотезу про екстрахромосомні регуляторні гени [54]. Згідно з цією гіпотезою, регуляторні гени, продукти яких відповідають за диференціювання клітин та тканинспецифічну експресію генів, є неактивними в складі хромосом, а під час індукції ампліфікуються та замикаються у кільця, виходячи з-під контролю негативних регу-

ляторних елементів, після чого починається їхня експресія. Останнім часом отримано докази на користь цієї гіпотези. З печінки людини виділено кільцеву екстрахромосомну ДНК, що має хромосомне походження. При трансфекції дедиференційованих клітин гепатоми цією ДНК вони зазнають термінальної диференціації. Згадана ДНК могла індукувати диференціювання тільки перебуваючи у формі епісоми, але не в інтегрованому в геном вигляді [55—57]. Під час диференціювання *in vitro* ембріональних стовбурових клітин, з них було виділено екстрахромосомні ДНК, що містили унікальні послідовності геномного походження, яких не було в таких ДНК у недиференційованих клітинах [58]. З клітин ембріональної карциноми, диференціацію яких у нейроноподібні клітини було індуковано додаванням ретиноевої кислоти, також виділено епісоми, що містили унікальні нуклеотидні послідовності, які мали гомологію з геномними послідовностями та були відсутніми у фракції кільцевих позахромосомних ДНК недиференційованих клітин [59]. Існує обґрунтоване припущення, що гени, які визначають асиметрію організмів хребетних у ході ембріогенезу, також ампліфікуються, що дозволяє їм виконувати свої функції [60]. Отже, стає очевидним, що гіпотеза про екстрахромосомні регуляторні гени має сенс.

На основі наведених даних можна зробити висновок про те, що ампліфікація та екстрахромосомна форма існування генів є вельми розповсюдженими та, напевно, відіграють важливу роль у функціонуванні геномів. Порушення нормальної ампліфікації може призвести до загибелі всього організму, як у випадку з генами рРНК дріжджів.

Малі кільцеві екстрахромосомні ДНК. На відміну від епісом, що містять ампліфіковані гени розміром від 50 до 3000 тис. п. н. (за виключенням екстрахромосомних регуляторних генів, які мають дещо менші розміри), не кажучи вже про мініхромосоми, малі кільцеві ДНК мають розмір від кількох сотень до кількох тисяч п. н. [61, 62]. Одне з перших повідомлень щодо наявності в клітинах еукаріот малих кільцевих ДНК було зроблене ще в 1978 році. Тоді було відмічено, що ДНК, які було виділено з клітин Фабрицієвої сумки курячих ембріонів та курчат, різняться за розміром та кількістю на клітину [63]. Автори роботи припустили, що, оскільки екстрахромосомні ДНК було виділено з Фабрицієвої сумки, вони можуть містити продукти перебудов імуноглобулінових генів. Це припущення підтвердилося, коли в ембріонах мишей було знайдено кільцеві інтермедіати перебудов імуноглобулінових генів, що містили нуклеотидні послідовності, які не транскрибуються [64].

Досить швидко з'ясувалося, що малі кільцеві ДНК присутні в клітинах практично всіх досліджених еукаріот, у тому числі і в рослин [65]. Згодом велику кількість малих кільцевих ДНК різного походження було детально проаналізовано [66]. Більшість з них складалася з повторюваної ДНК різних родин. При цьому представленість тих чи інших повторів в екстрахромосомній ДНК не відповідала частоті зустрічаємості цих повторів у геномі. В складі малих кільцевих ДНК знайдено практично всі типи повторюваних послідовностей: *Sau3A*-повтори [67], *AluI*-, *B1*-, *B2*- та *IAP* (intracisternal A-particles)-повтори [68, 69], *L1*-повтори [70], *KpnI*-повтори [66], β -сателітну ДНК [71]. Деякі з цих повторюваних послідовностей, таких як *IAP*-повтори, *L1*-, *B1*- та *B2*-повтори, мають у своєму складі регуляторні елементи (енхансери та промотори) та кодуєть білки з властивостями зворотної транскриптази [72—75]. Характерним є те, що склад повторів в екстрахромосомних ДНК розрізняється в різних органах [68], що може свідчити про органоспецифічні розбіжності в процесах перебудов ДНК. Аналогічно склад (але не кількість) малих кільцевих ДНК достовірно змінюється у мишей різних вікових груп [69]. Можливо, це пов'язане зі змінами в рекомбінаційній активності різних повторів у результаті старіння організму або з тим, що самі ці ДНК беруть участь у цьому процесі (про подібне явище з ампліфікованими генами рРНК вже йшлося раніше).

З приводу реплікації малих кільцевих ДНК єдиної думки немає. Такі ДНК виявлено, наприклад, серед нуклеотидних послідовностей приматів, що реплікуються в ранній S-фазі [76]. Разом з тим додекасателітні повтори, суперпредставлені в малих кільцевих ДНК (існувала думка, що вони містять численні *ori* реплікації), є нездатними підтримувати реплікацію плазмід у культурі клітин [77]. Незважаючи на це, можливість реплікації малих кільцевих ДНК здається більш ймовірною, ніж неможливість, оскільки частина повторюваних послідовностей, що входять до їхнього складу, здатна виконувати функції *ori* реплікації. Крім того, зокрема, *B1*-повтори мають істотну гомологію з *ori* реплікації паповавірусів [78] і, можливо, це не унікальний випадок. Слід усе ж зазначити, що реплікацію малих кільцевих ДНК вивчено значно гірше, ніж реплікацію ампліфікованих генів та мініхромосом, але докладно це буде обговорюватися пізніше.

На закінчення цього розділу хотілося б згадати про інші класи малих кільцевих ДНК. У клітинах мишей лінії L(tk⁻) виявлено близько 5000 копій на клітину плазмідів, що стабільно передавалася на-

щадкам в екстрахромосомному стані без патологічного ефекту для клітин. Її було названо L-фактором. Аналіз плазміди показав, що вона складається з нуклеотидних послідовностей вірусу поліоми та деяких геномних послідовностей миші [79, 80]. Вочевидь, ця плазміда утворилася в результаті рекомбінації вірусу поліоми (можливо, його мутантної форми) з геномною ДНК миші. Для ряду вірусів ссавців взагалі є характерною наявність у життєвому циклі кільцевих реплікативних форм.

Ще одну групу екстрахромосомних ДНК виявлено в клітинах асцитної пухлини Ерліха. На відміну від тих, про які йшлося раніше, ці ДНК є лінійними (розміром від 50 до 500 п. н.) та знаходяться в цитоплазмі. Вони міцно зв'язані з кількома білками та відсутні в нормальних клітинах. Їхні функції незрозумілі, але вони здатні модулювати активність промоторів та індукувати іморталізацію інших клітин *in vitro* [81, 82].

Отже, малі кільцеві ДНК відіграють певну, але ще недостатньо вивчену роль. Можливо, якась частина їх дійсно є інтермедіатами спадкових перебудов геному та транспозиції, але основна частина присутня в клітинах не випадково. Не виключено, що вони являють собою один із механізмів, що регулюють роботу геному та забезпечують його стабільність. Крім того, малі кільцеві ДНК, які містять регуляторні елементи, можуть оперативно змінювати експресію тих чи інших генів, якщо припустити наявність специфічних механізмів інтеграції чи *транс*-регуляції за типом послідовної передачі сигналу. Порушення механізмів, які контролюють динаміку кільцевих ДНК, може призвести до дестабілізації геному та, в підсумку, до загибелі клітини. Фактори, здатні викликати таке порушення, будуть обговорюватися у наступних розділах.

Утворення та підтримання чисельності екстрахромосомних ДНК. Найвагомий внесок в утворення екстрахромосомних ДНК робить гомологічна та негомологічна рекомбінація. На користь цього свідчить той факт, що гени, які здатні до ампліфікації, часто фланковані повторюваними послідовностями [83, 84]. Так, у фланкуючих послідовностях гена *cad* виявлено «гарячі точки» незаконної рекомбінації, що являють собою мозаїчно організовані нуклеотидні послідовності, які складаються з *AluI*-подібних повторів та довгих АТ-багатих недосконалих паліндромів. Ці паліндроми обмежені GC-багатими блоками [85—87]. Ген β -рецептора Т-клітин має у 5'- та 3'-фланкуючих областях семи- та дев'ятичленні повні паліндроми [43]. Ген *dhfr*, що ампліфікується в клітинах, стійких до МТХ, подовжений *Alu*-повторами

[14]. Довгі обернені повтори виявлено також у складі епісом, DM's та ділянок хромосом, що гомогенно забарвлюються [88]. Такі повтори є суттєвими і для утворення зворотних дуплікацій генів у процесі ампліфікації [89]. Отже, рекомбінація між повторюваними нуклеотидними послідовностями виконує важливу роль в ампліфікації генів. Описано також ампліфікацію кількох генів внаслідок нерівної рекомбінації між сестринськими хроматидами [90]. У цей же час сигнали, які індукують ці процеси, поки що є незрозумілими. Відомо, наприклад, що антибіотик мітоміцин С викликає у дрозофіли різні перебудови геному, в тому числі активацію ретропозонів [91]. Аналогічно інші отрути та антиметаболіти призводять до активації всіх видів рекомбінації в клітинах ссавців *in vitro* [92, 93]. Разом з тим проміжні події між обробкою отрутами та індукцією ампліфікації невідомі. Можна лише припустити, що після індукції в ексцизії генів, які ампліфікуються, беруть участь нуклеази. В клітинах, стійких до отрут та антиметаболітів, відмічено збільшену активність Zn^{2+} -незалежної нуклеази, яка, за припущенням, генерує екстрахромосомну ДНК [94]. Деякі нуклеази, що відносяться до групи рестриктаз, упізнають саме паліндромні нуклеотидні послідовності, які часто присутні у фланкуючих областях генів, що ампліфікуються. Певний внесок в ампліфікацію генів робить і їхня транскрипція. При активації гена *тус* у його регуляторній області утворюється тетраплекс з неканонічною структурою ДНК, яка, можливо, сприяє ампліфікації [95]. Так само регуляторні елементи транскрипції генів рРНК можуть бути причетними до їхньої ампліфікації [51].

На інтенсивність ампліфікації впливає також метилювання ДНК. При обробці клітин 5-азацитидином ампліфікація маркерного гена, що кодує асоційований з пухлиноутворенням поверхневий антиген, різко знижується [96]. Можна припустити, що цей механізм пов'язаний з припиненням транскрипції метильованої ДНК або з тим, що вона стає недоступною для факторів, які здійснюють ампліфікацію.

Що стосується малих кільцевих ДНК, більшість з яких складається з повторів, то роль рекомбінації в їхньому утворенні є очевидною. У попередньому розділі вже згадувалося, що нестабільність мінісателітів у ранньому ембріогенезі веде до утворення малих кільцевих ДНК [97]. Екстрахромосомні кільцеві копії повторів родини *Sau3A* утворюються за участю коротких нуклеотидних послідовностей, які гомологічні *chi*-послідовностям, необхідним для рекомбінації у прокаріот [67, 98].

Рекомбінація — не єдиний з відомих механізмів

мів утворення малих кільцевих ДНК. Частина з них утворюється шляхом зворотної транскрипції та є інтермедіатами ретротранспозиційних подій. Елементи, здатні до ретротранспозиції, виявлено також у міжгенних областях генів рРНК дрозофіли [91]. Питання про те, як регулюється цей процес, залишається відкритим. Слід відзначити той факт, що кількість малих кільцевих ДНК у клітині збільшується при трансгенозі [99].

Суттєвий внесок в ампліфікацію генів та ділянок хромосом роблять дволанцюгові розриви хромосом. На думку деяких авторів, пошкодження хромосом відіграють центральну роль в ампліфікації [100]. Фрагменти, які утворюються при розривах, можуть замикатися в кільця та, якщо вони досить великі, утворювати мініхромосоми [101], а якщо ні — то поповнювати фракцію малих кільцевих ДНК. Можливо, завдяки такому механізмові утворення іноді в одній мініхромосомі виявляється кілька різних генів. Наприклад, ген *tus* може коампліфікуватися з генами орнітиндекарбоксілази, рибонуклеотидредуктази, синдекана-1 та іншими [102, 103]. Ген епідермального фактора росту також майже завжди коампліфікується з іншими генами [104]. Це явище можна пояснити тим, що гени, здатні до сумісної ампліфікації, локалізовані на хромосомах поруч та при фрагментації хромосом виявляються в одному фрагменті. З іншого боку, можливе і злиття екстрахромосомних ДНК, які містять різні гени. Утворення дволанцюгових розривів є однією з причин ампліфікації генів групи *mdr*. У цьому випадку обробка отрутами та антиметаболітами може призвести до виникнення розривів хромосом у гіперчутливих сайтах, що знаходяться у фланкуючих областях генів. Показано, що сайти, які формують ламкі ділянки хромосом, розташовані поблизу протоонкогенів та відіграють важливу роль в їхній ампліфікації [105]. Таким чином, незважаючи на уявну випадковість ампліфікації шляхом дволанцюгових розривів хромосом, існує механізм, котрий забезпечує переважне утворення розривів у певних місцях. Звичайно, при цьому не відбувається вибіркової ампліфікації одного гена, однак у популяції екстрахромосомної ДНК з великою ймовірністю виявиться потрібний ген, який забезпечить клітині стійкість проти того чи іншого агента.

Певним чином з дволанцюговими розривами хромосом пов'язаний і третій основний механізм ампліфікації — шляхом повторної активації *ori* реплікації. Це можливе у випадку стресорних впливів на клітину, які пригнічують реплікацію ДНК. Коли після зняття стресорного тиску реплікація відновлюється, то вона знов починається з *ori* ре-

плікації, раніше синтезовані фрагменти при цьому видаляються [100]. Вони можуть замкнутися в кільця (якщо не зазнають нуклеазного гідролізу) та існувати позахромосомно. Цей спосіб ампліфікації не буде видаватися таким неспецифічним, якщо згадати, що багато з генів, які було знайдено в ампліфікованому стані, містять у своєму складі (або у фланкуючих областях) *ori* реплікації, про що вже йшлося в попередніх розділах. Якщо в згаданих недореплікованих фрагментах виявляються гени, що надають клітині селективну перевагу, то такі клітини дають початок популяціям клітин з новим набором екстрахромосомних ДНК. Можливо, цей механізм діє при виникненні резистентних клітин під час хіміотерапії пухлин. Крім того, він сам може бути причиною пухлиноутворення. Показано, що одна з форм раку виникає у зв'язку з наявністю мутацій в генах, продукти яких залучені до системи реплікації ДНК [106]. Як уже згадувалося, в *ori* реплікації часто формуються неканонічні структури ДНК, що є «гарячими точками» рекомбінації. Один з білків, що зв'язуються з *ori* реплікації, сприяє утворенню петель ДНК поблизу *ori* гена *dhfr* [107].

Цікаве спостереження зроблено авторами роботи [108], які виявили, що після короткого періоду гіпоксії в клітинах починається суперреплікація та ампліфікація ДНК. Оскільки відомо, що клітини пухлин постійно перебувають у гіпоксичних умовах, можливо, цим пояснюється ампліфікація в них багатьох генів.

Наявність вільних кінців ДНК (при розривах хромосом, повторній активації *ori* реплікації, трансгенозі) активує захисні механізми клітини. При цьому часто виникає блокада клітинного циклу, до якої причетний білок p53. Останній блокує клітинний цикл також при зниженні концентрації рибонуклеотидів у клітині, що може бути викликане, наприклад, обробкою таким антиметаболітом, як PALA. Якщо через деякий час не відбувається репарації вільних кінців ДНК чи не відновлюється нормальний рівень синтезу нуклеотидів, починається апоптоз. Отже, для успішної ампліфікації необхідними є додаткові чинники, які сприяють зняттю блокади клітинного циклу. Якщо не зважати на ліквідацію вільних кінців ДНК шляхом замикання лінійних молекул у кільця, таким чинником може бути втрата обох алелей p53 в результаті помилкової рекомбінації [109, 110], мутації [111—113] (при цьому введення екзогенного p53 відновлює нормальний клітинний цикл та пригнічує ампліфікацію [114]) або інактивація функціонально активного p53. Така інактивація може бути викликана, наприклад, великим Т-антигеном віру-

су SV40, який зв'язується з р53. В цей же час реплікація клітинної ДНК відновлюється та починається ампліфікація [115]. Інший шлях — це зняття блокади клітинного циклу в результаті над-експресії протоонкогенів, яка є наслідком їхньої попередньої ампліфікації. Продукт протоонкогена *тус* індукуює початок мітозу в клітинах з р53-залежною зупинкою клітинного циклу, що стимулює початок ампліфікації інших генів [116]. Можливо, саме таким чином діють цикліни та циклін-залежні кінази, про ампліфікацію генів яких йшлося раніше. Отже, стає очевидним, що ампліфікація — це складний ланцюг подій, котрий зачіпає різні системи клітини та серйозно впливає на її функції та життєдіяльність.

Питання про те, як відбувається реплікація екстрахромосомних ДНК, вже обговорювалося під час розгляду окремих класів цих молекул. Практично всі вони мають у своєму складі *цис*-діючі послідовності, на яких починається реплікація (*ori* реплікації). Відзначу тільки, що в еукаріот є родина білків MCM (minichromosome maintenance proteins). Вперше їх було виявлено у дріжджів як білки, що зв'язуються з *ori* реплікації дріжджових епісом. У дріжджів, які були мутантними за генами цих білків, епісоми не могли реплікуватися [117]. Ці білки знайдено у всіх еукаріот і вони є висококонсервативними. Різні члени родини зв'язуються з різними типами *ori* реплікації [118]. Мутанти за генами окремих MCM-білків не можуть підтримувати реплікації мініхромосом з відповідними *ori* реплікації [119]. У таких мутантів також спостерігаються порушення реплікативного циклу хромосом [120].

Що стосується сегрегації екстрахромосомних ДНК, то вона може відбуватися по-різному. Перший шлях — це сегрегація по механізму, за допомогою якого сегрегують хромосоми, тобто за участю центромер. Центромерну ДНК було виявлено у складі багатьох епісом та мініхромосом [121]. Екстрахромосомна ДНК може набувати центромер або внаслідок потрапляння відповідних ділянок при утворенні цієї ДНК шляхом фрагментації хромосом, реініціації *ori* реплікації чи ретропозиції, або шляхом утворення нецентромер з латентних центромер, які містяться в деяких повторюваних послідовностях, наприклад, сателітній ДНК [122]. Доказом останнього припущення є той факт, що ацентричні мініхромосоми дрозофіли сегрегують так само, як і нормальні хромосоми, тобто функції центромер виконують інші нуклеотидні послідовності [123]. В малих кільцевих ДНК також знайдено послідовності, які входять до складу центромер [124]. Можливо, функцій нецентромер може

набувати сателітна ДНК, що дуже часто зустрічається у складі малих кільцевих ДНК.

Другий шлях сегрегації екстрахромосомної ДНК — випадкове розділення між дочірніми ядрами в процесі клітинного поділу. При досить великому вмісті екстрахромосомних ДНК у клітині дочірні клітини будуть отримувати приблизно однакові кількості цих ДНК. Достатня кількість екстрахромосомних ДНК у клітині перед її поділом може накопичуватися (навіть якщо ці ДНК реплікуються у той самий час, що й хромосомна ДНК клітини) завдяки тому, що внаслідок малих розмірів цих молекул вони можуть пройти кілька раундів реплікації поки реплікує хромосомна ДНК.

Є й третій шлях сегрегації екстрахромосомних ДНК, що здається досить перспективним для розділення тих ДНК, які не мають у своєму складі центромер. Цей шлях ґрунтується на тому ж принципі, що й сегрегація низькокопійних плазмід у прокаріот. Такі плазміди кодують білки, які зв'язуються з центромероподібними нуклеотидними послідовностями цих плазмід та одночасно з певними ділянками бактеріальної хромосоми. Під час поділу клітини плазміди розходяться в новоутворені дочірні клітини разом з дочірніми хромосомами, а потім від'єднуються від них. Аналогічний механізм діє при сегрегації кільцевої реплікативної форми вірусу папіломи бика. Один з білків, що кодується вірусом, приєднує вірусну епісому до хромосоми хазяїна протягом мітозу і, таким чином, здійснює розподіл вірусу між дочірніми клітинами [125]. У дріжджів виявлено білок Abp1, котрий зв'язується з численними сайтами одного з ацентричних екстрахромосомних елементів. Цей білок має високу гомологію з ідентифікованим раніше білком людини CENP-B, який асоційований з ДНК центромер [126]. Можливо, цей білок (Abp1) бере участь у сегрегації згаданого елемента. Не виключено, що подібний механізм діє також у випадку інших екстрахромосомних ДНК, які, хоча й не кодують специфічних білків, але можуть використовувати для цього хазяїнські ДНК-зв'язуючі білки.

К. В. Крисан

Екстрахромосомные ДНК в клетках эукариот

Резюме

В настоящее время известны две основные формы существования трансгенов — интегрированная в геном реципиента и экстрахромосомная. Хотя интегрированные трансгены встречаются значительно чаще, чем таковые, способные к постоянному внехромосомному существованию, последние являются намного интереснее и перспективнее для биотехнологии и биомедицины. Однако механизмы, определяющие форму существования экстрахромосомных ДНК, исследованы еще

недостаточно. В данном обзоре проанализированы эти механизмы и рассмотрены экстрахромосомные ДНК различного происхождения.

К. В. Крысан

Extrachromosomal DNA in eukaryotic cells

Summary

Two forms of transgenes are known -- integrated into the host genome and extrachromosomal. Although the integrated transgenes are more common, the extrachromosomal ones are more interesting and perspective for the purposes of biotechnology and biomedicine. However, the mechanisms determining the fate of the extra-chromosomal DNA molecule, have not been entirely studied so far. In this review we discuss these mechanisms and consider the extrachromosomal DNA of different origin.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schimke R. T. Gene amplification in cultured animal cells // Cell.—1984.—27, N 3.—P. 705—713.
- Maurer B. J., Lai E., Hamkalo B.A., Hood L. et al. Novel submicroscopic extrachromosomal elements containing amplified genes in human cells // Nature.—1987.—327.—P. 434—437.
- Looney J. E., Hamlin J. L. Isolation of the amplified dihydrofolate reductase domain from methotrexate-resistant Chinese hamster ovary cells // Mol. Cell. Biol.—1987.—7, N 2.—P. 569—577.
- Gronidin K., Kundig C., Roy G., Oullete M. Linear amplicons as precursors of amplified circles in methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* // Nucl. Acids Res.—1998.—26, N 14.—P. 3372—3378.
- Carrol S. M., Gandray P., DeRose M. L. et al. Characterization of an episome produced in hamster cells that amplify a transfected CAD gene at high frequency: functional evidence for a mammalian replication origin // Mol. Cell. Biol.—1987.—7, N 5.—P. 1740—1750.
- Nonet G. H., DeRose M. L., Wahl G. M. Molecular dissection of an extrachromosomal amplicon reveals a circular structure consisting of an imperfect inverted duplication // Genomics.—1993.—15, N 3.—P. 543—548.
- Hamlin J. L., Milbrandt J. D., Heintz N. H., Azizkhan J. C. DNA sequence amplification in mammalian cells // Int. Rev. Cytol.—1984.—90.—P. 31—82.
- Yamada K., Kato H., Kanda N. et al. Sequence homology of Chinese hamster metallothionein genes I and II to those of the mouse and rat and their amplification in Cd-resistant cells // Biochim. et biophys. acta.—1994.—1219, N 3.—P. 581—591.
- Giulotto E., Knights C., Stark G. R. Hamster cells with increased rates of DNA amplification, a new phenotype // Cell.—1987.—48, N 5.—P. 837—845.
- Emanuel J. R., Garetz S., Shneider J. et al. Amplification of DNA sequences coding for the Na, K-ATPase α -subunit in ouabain-resistant C⁺ cells // Mol. Cell. Biol.—1986.—6, N 7.—P. 2476—2481.
- Kanagas J. J., Suttle D. P. Amplification of the UMP synthase gene and enzyme overproduction in pyrasofurin-resistant Rat hepatoma cells // J. Biol. Chem.—1984.—259, N 3.—P. 1848—1853.
- Ma C., Ley T.-H., Hamlin J. L. Multiple origins of replication in the dihydrofolate reductase amplicons of a methotrexate-resistant Chinese hamster cell line // Mol. Cell. Biol.—1990.—10.—P. 1338—1346.
- Dijkwel P. A., Vaughn J. P., Hamlin J. L. Replication initiation sites are distributed widely in the amplified CHO dihydrofolate reductase domain // Nucl. Acids Res.—1994.—22, N 23.—P. 4889—4996.
- DePamphilis M. L. Origins of DNA replication in Metazoan chromosomes // J. Biol. Chem.—1993.—268.—P. 1—4.
- Calos M. P., Caddle M. S. Analysis of the autonomous replication behavior in human cells of the dihydrofolate reductase putative chromosomal origin of replication // Nucl. Acids Res.—1992.—20, N 22.—P. 5971—5978.
- Kelly R. E., DeRose M. L., Draper B. W., Wahl G. M. Identification of an origin of bidirectional DNA replication in the ubiquitously expressed mammalian CAD gene // Mol. Cell. Biol.—1995.—15, N 8.—P. 4136—4148.
- Brison O. Gene amplification and tumor progression // Biochim. et biophys. acta.—1993.—1155.—P. 25—41.
- Brodeur G. M., Seeger R. C., Schwab N. et al. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates advanced disease stage // Science.—1984.—224.—P. 1121—1124.
- Kinzler K. W., Zehnbaue B. A., Brodeur G. M. et al. Amplification units containing human *N-myc* and *c-myc* genes // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83, N 4.—P. 1031—1035.
- Slamon D. J., Clark G. M., Wong S. G. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene // Science.—1987.—235.—P. 177—182.
- Trent J., Meltzer P., Rosenblum M. et al. Evidence for rearrangement, amplification and expression of *c-myc* in human glioblastoma // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1986.—83.—P. 470—473.
- Shneider S. S., Hiemstra J. L., Zehnbaue B. A. et al. Isolation and structural analysis of a 1,2 megabase *N-myc* amplicon from a human neuroblastoma // Mol. Cell. Biol.—1992.—12, N 12.—P. 5563—5570.
- VonHoff D. D., Needham-VanDevanter D. R., Yucel J. et al. Amplified human MYC oncogenes localized to replicating submicroscopic circular DNA molecules // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85, N 13.—P. 4804—4808.
- McWhinney C., Leffak M. Autonomous replication of a DNA fragment containing the chromosomal replication origin of the human *c-myc* gene // Nucl. Acids Res.—1990.—18.—P. 1233—1242.
- Sudo K., Ogata M., Sato Y. et al. Cloned origin of DNA replication in *c-myc* gene can function and be transmitted in transgenic mice in an episomal state // Nucl. Acids Res.—1990.—18.—P. 5425—5432.
- Eckhardt S. G., Dai A., Davidson K. K. et al. Induction of differentiation in HL60 cells by the reduction of extrachromosomally amplified *c-myc* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1994.—91.—P. 6674—6678.
- Filmus J., Trent J. M., Pollak M. N., Buick R. N. Epidermal growth factor receptor gene-amplified MDA-468 breast cancer cell line and its nonamplified variants // Mol. Cell. Biol.—1987.—7, N 1.—P. 251—257.
- Sen S., Zhou H., White A. A putative serine/threonine kinase encoding gene BTAK on chromosome 20q13 is amplified and overexpressed in human breast cancer cell lines // Oncogene.—1997.—14, N 18.—P. 2195—2200.
- Lisitsyn N. A., Lisitsyna N. M., Dalbagni G. et al. Comparative genomic analysis of tumors: detection of DNA losses and amplification // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1995.—92.—P. 151—155.
- Tsuruta H., Sakamoto H., Onda M., Torada M. Amplification and over expression of EXP1 and EXP2/cyclin D1 genes in human esophageal carcinomas // Biochem. and Biophys. Res. Commun.—1993.—196.—P. 1529—1536.

31. Buckley M. F., Sweeney K. J., Hamilton J. A. et al. Expression and amplification of cyclin genes in human breast cancer // *Oncogene*.—1993.—8.—P. 2127—2133.
32. Leach F. S., Elledge S. J., Sherr C. J. et al. Amplification of cyclin genes in colorectal carcinomas // *Cancer Res.*—1993.—53.—P. 1986—1989.
33. Khatib Z. A., Matsushime H., Valentine M. et al. Coamplification of the CDK 4 gene with MDM 2 and G1I in human sarcomas // *Cancer Res.*—1993.—53.—P. 5535—5541.
34. Visakorpi T., Hyytinen E., Koivisto P. et al. In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer // *Nat. Genet.*—1995.—9.—P. 401—406.
35. Almeida A., Zhu X. X., Vogt N. et al. GAC1, a new member of the leucine-rich repeat superfamily on chromosome band 1q32.1, is amplified and overexpressed in malignant gliomas // *Oncogene*.—1998.—16.—P. 2997—3002.
36. Kokkola A., Monni O., Puolakkainen P. et al. 17q12-21 amplicon, a novel recurrent genetic change in intestinal type of gastric carcinoma: a comparative genomic hybridization study // *Genes Chromosomes Cancer*.—1997.—20, N 1.—P. 38—43.
37. Carrol S. M., DeRose M. L., Gaudray P. et al. Double-minute chromosomes can be produced from precursors derived from a chromosomal deletion // *Mol. Cell. Biol.*—1988.—8, N 4.—P. 1525—1533.
38. Balaban-Mallenbaum G., Grove G., Gilbert F. W. The proposed origin of double-minutes from homogeneously staining regions (HSR)-marker chromosomes in human neuroblastoma hybrid cell lines // *Cancer Genet. Cytogenet.*—1981.—1.—P. 339—348.
39. George P., Powers V. Amplified DNA sequences in Y1 mouse adrenal tumor cells: association with double minutes and localization to a homogeneously staining regions // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1982.—79.—P. 1597—1601.
40. Hahn P. J. Molecular biology of double minute chromosomes // *BioEssays*.—1993.—15, N 7.—P. 477—484.
41. Wright J. A., Smith H. S., Watt F. M. et al. DNA amplification is rare in normal human cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87.—P. 1791—1795.
42. Tlsty T. D. Normal diploid human and rodent cells lack a detectable frequency of gene amplification // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1990.—87.—P. 3132—3136.
43. Okazaki K., Davis D. D., Sakano H. T-cell receptor β gene sequences in the circular DNA of thymocyte nuclei: direct evidence for intramolecular DNA deletion in V-D J Joining // *Cell*.—1987.—49, N 4.—P. 477—485.
44. Spradling A. C., Mahowald A. P. Amplification of genes for chorion proteins during oogenesis in *Drosophila melanogaster* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1980.—77, N 13.—P. 1096—1100.
45. Calvi B. R., Lilly M. A., Spradling A. C. Cell cycle control of chorion gene amplification // *Genes and Development*.—1998.—12.—P. 734—744.
46. Wu Z., Gall J. G. «Micronucleoli» in the *Xenopus* germinal vesicle // *Chromosoma*.—1997.—105, N 7—8.—P. 438—443.
47. Kloc M., Matuszewski B., Nurkowska J. Ribosomal gene amplification in the oocytes of *Creophilus maxillosus* (Staphylinidae, *Colyoptera polyphaga*) — an insect with telotrophic ovaries // *Folia Histochem. and Cytobiol.*—1995.—33, N 4.—P. 267—276.
48. Kubrakiewicz J., Bilinski S. M. Extrachromosomal amplification of rDNA in oocytes of *Hemerobius* spp. (*Insecta, Neuroptera*) // *Chromosoma*.—1995.—103.—P. 606—612.
49. Suzuki H., Ingersoll J., Stern D. B., Kindle K. L. Generation and maintenance of tandemly repeated extrachromosomal plasmid DNA in *Chlamydomonas* chloroplast // *The Plant J.*—1997.—11, N 4.—P. 635—648.
50. Sinclair D. A., Guarente L. Extrachromosomal rDNA circles — a cause of aging in yeast // *Cell*.—1997.—91.—P. 1033—1042.
51. Wegner M., Zastrow G., Klavinius A. et al. Cis-acting sequences from mouse rDNA promote plasmid DNA amplification and persistence in mouse cells: implication of HMG-1 in their function // *Nucl. Acids Res.*—1989.—17.—P. 9909—9932.
52. Wahl G. M., Vitto L., Rubnitz J. Co-amplification of rRNA genes with CAD genes in N-(phosphonacetyl)-L-aspartate-resistant Syrian hamster cells // *Mol. Cell. Biol.*—1983.—3, N 11.—P. 2066—2075.
53. Tantravahi U., Guntaka R. V., Erlanger B. F., Miller O. J. Amplified ribosomal DNA genes in a rat hepatoma cell line are enriched in 5'-methylcytosine // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1981.—78.—P. 489—493.
54. Романчиков Ю. М. Гипотеза об экстрахромосомных регуляторных генах // *Успехи соврем. биологии*.—1991.—111.—С. 643—653.
55. Boccaccio C., Apiou F., Deschatrette J. et al. Chromosomal localization and sequence analysis of a human episomal sequence with *in vitro* differentiating activity // *Somat. Cell Mol. Genet.*—1994.—20, N 3.—P. 163—170.
56. Ng K. H., Maigne J., Deschatrette J. The inductive effect of a human DNA sequence (HALF 1) on the differentiation of a variant rat hepatoma cell (C2) is restricted to episomal forms of the molecule // *J. Cell Sci.*—1995.—108.—P. 1703—1713.
57. Boccaccio C., Mennier-Rotival M., Deschatrette J. Analysis of the inductive effect of the genomic equivalent of HALF-1 sequence in the reversion of rat dedifferentiated hepatoma cells // *Exp. Cell Res.*—1994.—213.—P. 113—120.
58. Arakawa H., Shimizu T., Iwakura Y., Yamagishi H. Molecular characterization of extrachromosomal circular DNAs from differentiating embryonic stem cells // *Cell Struct. Funct.*—1996.—21.—P. 451—457.
59. Iwasato T., Shimizu T., Kanari Y., Yamagishi H. Molecular characterization of extrachromosomal circular DNAs from an embryonal carcinoma cell line induced to differentiate into neuron-like cells *in vitro* // *Cell Struct. Funct.*—1993.—18.—P. 261—266.
60. Levin M. Left-right asymmetry in vertebrate embryogenesis // *BioEssays*.—1997.—19, N 4.—P. 287—296.
61. Rush M. G., Misra R. Extrachromosomal DNA in eucaryotes // *Plasmid*.—1985.—14.—P. 177—191.
62. Сальников К. В. Экстрахромосомная ДНК в клетках млекопитающих // *Цитология*.—1990.—32, № 11.—С. 1061—1071.
63. DeLap R. J., Rush M. G. Change in quantity and size distribution of small circular DNAs during development of chicken bursa // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1978.—75.—P. 5855—5859.
64. Makino Y., Kanno R., Koseki H., Taniguchi M. Development of V alpha 4+NK T-cells in the early stages of embryogenesis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1996.—93.—P. 6516—6520.
65. Buchowitz J. Nuclear extrachromosomal DNA of higher plant // *Acta biochim. Pol.*—1997.—44, N 1.—P. 13—19.
66. Stanfield S. W., Helinski D. R. Cloning and characterization of small circular DNA from Chinese hamster ovary cells // *Mol. Cell. Biol.*—1984.—4, N 1.—P. 173—180.
67. Kiyama R., Matsui H., Oishi M. A repetitive DNA family (*Sau3A* family) in human chromosomes: extrachromosomal DNA and DNA polymorphism // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1986.—83, N 13.—P. 4665—4669.
68. Flores S. C., Moore T. K., Gaubatz J. W. Dispersed repetitive

- sequences of the mouse genome are differentially represented in extrachromosomal circular DNAs *in vivo* // *Plasmid*.—1987.—17.—P. 257—263.
69. Flores S. C., Sunnerhagen P., Moore T. K., Gaubatz J. W. Characterization of repetitive sequence families in mouse heart small polydisperse circular DNAs: age-related studies // *Nucl. Acids Res.*—1988.—16, N 9.—P. 3889—3906.
 70. Jones R. S., Potter S. S. L1 sequences in HeLa extrachromosomal circular DNA: evidence for circularisation by homologous recombination // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—82, N 7.—P. 1989—1993.
 71. Assumi G., Fink T., Steinbeisser T., Fisel K. J. Analysis of human extrachromosomal DNA elements originating from different beta-satellite subfamilies // *Hum. Genet.*—1993.—91.—P. 489—495.
 72. Yang Z., Boffelli D., Boonmark N. et al. Apolipoprotein (a) gene enhancer residues within a LINE element // *J. Biol. Chem.*—1998.—273.—P. 891—897.
 73. Naas T. P., DeBerardinis R. J., Moran J. V. et al. An actively retrotransposing, novel subfamily of mouse L1 elements // *EMBO J.*—1998.—17.—P. 590—597.
 74. Paulson K. E., Deka N., Schmid C. W. et al. A transposon-like element in human DNA // *Nature*.—1985.—316.—P. 359—361.
 75. Fujimoto S. F., Tsuda T., Toda M., Yamaguchi H. Transposon-like sequences in extrachromosomal circular DNA from mouse thymocytes // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1985.—82.—P. 2072—2076.
 76. Landry S., Zennis-Hadjopoulos M. Classes of autonomously replicating sequences are found among early-replicating monkey DNA // *Biochim. et biophys. acta.*—1991.—1088.—P. 234—244.
 77. Renault S., Degroote F., Picard G. Despite in high representation in extrachromosomal circular DNAs from *Drosophila* embryos, the dodecasatellite does not allow autonomous replication in cultured cells // *Biol. Cell.*—1993.—79, N 1.—P. 51—54.
 78. Sunnerhagen P., Sjoberg R.-M., Karlsson A.-L. et al. Molecular cloning and characterization of small polydisperse circular DNA from mouse 3T6 cells // *Nucl. Acids Res.*—1986.—14, N 20.—P. 7823—7838.
 79. Kusano T., Uehara H., Saito H. et al. Multicopy plasmid with a structure related to the polyoma virus genome // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1987.—84.—P. 1789—1793.
 80. Nishimori K., Kohda T., Fujivara J., Oishi M. Establishment of composite DNA derived from L factor as a plasmid in mouse embryonal carcinoma (F9) cells // *Mol. Cell. Biol.*—1988.—8, N 5.—P. 2097—2104.
 81. Hegger R., Abken H. The short DNA sequences in the cytoplasm of Erlich ascites tumor cells are tightly associated with proteins // *Physiol. Chem. Phys. Med. NMR.*—1995.—27, N 4.—P. 321—328.
 82. Abken H., Hegger R., Bultzler C., Willecke R. Short DNA sequences from the cytoplasm of mouse tumor cells induce immortalization of human lymphocytes *in vitro* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1993.—90.—P. 6518—6522.
 83. Van Loon N., Miller D., Murane J. P. Formation of extrachromosomal circular DNA in HeLa cells by nonhomologous recombination // *Nucl. Acids Res.*—1994.—22, N 13.—P. 2447—2452.
 84. Calos M. P. The potential of extrachromosomal replicating vector for gene therapy // *Trends Genet.*—1996.—12, N 11.—P. 463—466.
 85. Hyrien O., Debatisse M., Buttin G., de Saint Vincent B. R. A hotspot for novel amplification joints in a mosaic of Alu-like repeats and palindromic A+T-rich DNA // *EMBO J.*—1987.—6, N 8.—P. 2401—2408.
 86. Meinkoth J., Killary A. M., Fournier B. E. K., Wahl G. M. Unstable and stable CAD gene amplification: importance of flanking sequences and nuclear environment in gene amplification // *Mol. Cell. Biol.*—1987.—7, N 4.—P. 1415—1424.
 87. Von Hoff D. D. New mechanisms of gene amplification in drug resistance (the episomal model) // *Cancer Treat. Res.*—1991.—57.—P. 1—11.
 88. Ford M., Fried M. Large inverted duplications are associated with gene amplification // *Cell.*—1986.—45, N 3.—P. 425—430.
 89. Passananti C., Davies B., Ford M., Fried M. Structure of an inverted duplication formed as a first step in a gene amplification event: implications for a model of gene amplification // *EMBO J.*—1987.—6, N 6.—P. 1697—1703.
 90. Ma C., Martin S., Trask B., Hamlin J. L. Sister chromatid fusion initiates amplification on the dihydrofolate reductase gene in Chinese hamster cells // *Genes and Development.*—1993.—7.—P. 605—620.
 91. Georgiev P. G., Korochkina S. E., Georgieva S. G., Gerasimova T. I. Mitomycin C induces genomic rearrangements involving transposable elements in *Drosophila melanogaster* // *Mol. and Gen. Genet.*—1990.—220.—P. 229—233.
 92. Hellgren D. Mutagen-induced recombination in mammalian cells *in vitro* // *Mutat. Res.*—1992.—284.—P. 37—51.
 93. Lavi S. Carcinogen-mediated amplification of viral DNA sequences in simian virus 40-transformed Chinese hamster embryo cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1981.—78.—P. 6144—6148.
 94. Лунская Л. А., Житкович А. В., Васюхин В. И. и др. Участие эндонуклеазы в образовании экстрахромосомной ДНК и возможные механизмы возникновения амплификации генов // *Цитология.*—1993.—35, № 1.—С. 70—78.
 95. Simonsson T., Pecinka P., Kubista M. DNA tetraplex formation in the control region of *c-myc* // *Nucl. Acids Res.*—1998.—26.—P. 1167—1172.
 96. Alberti S., Nutini M., Herzenberg L. A. DNA methylation prevents the amplification of TROP1, a tumor-associated cell surface antigen gene // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1994.—91.—P. 5833—5837.
 97. Gibbs M., Collick A., Kelly R. G., Jeffreys A. J. A tetranucleotide repeat mouse minisatellite displaying substantial somatic instability during early preimplantation development // *Genomics.*—1993.—17.—P. 121—128.
 98. Ohki R., Oishi M., Kiyama R. Preference of the recombination sites involved in the formation of extrachromosomal copies of the human alphoid *Sau3A* repeat family // *Nucl. Acids Res.*—1995.—23, N 24.—P. 4971—4977.
 99. Wiberg F. C., Sunnerhagen P., Bjursdl G. New, small circular DNA in transfected mammalian cells // *Mol. Cell. Biol.*—1986.—6, N 2.—P. 653—662.
 100. Windle B., Draper B. W., Yin Y. et al. A central role for chromosome breakage in gene amplification, deletion formation, and amplicon integration // *Genes and Development.*—1991.—5.—P. 160—174.
 101. Sen S., Sen P., Mulac-Jericevic B. et al. Microdissected double-minute DNA defects variable patterns of chromosomal localizations and multiply abundantly expressed transcripts in normal and leukemic cells // *Genomics.*—1994.—19.—P. 542—551.
 102. George R. E., Kenyon R. M., McGuckin A. G. et al. Investigation of co-amplification of the candidate genes ornithine decarboxylase, ribonucleotide reductase, syndecan-1 and DEAD box gene, DDX 1, with *N-myc* in neuroblastoma // *Oncogene.*—1996.—12, N 7.—P. 1583—1587.

103. Kim J.-O., Nau M. M., Allikian K. A. et al. Co-amplification of a novel cyclophilin-like gene (PPIE) with L-myc in small cell lung cancer cell lines // *Oncogene*.—1998.—17, N 8.—P. 1019—1026.
104. Wang X. Y., Smith D. I., Frederick L., James C. D. Analysis of EGF receptor amplicons reveals amplification of multiple expressed sequences // *Oncogene*.—1998.—16.—P. 191—195.
105. Coquelle A., Pipiras E., Toledo F. et al. Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons // *Cell*.—1997.—89.—P. 215—225.
106. Schlegel J., Stumm G., Scherthan H. et al. Comparative genomic *in situ* hybridization of colon carcinomas with replication error // *Cancer Res*.—1995.—55, N 24.—P. 6002—6005.
107. Caddle M. S., Dailey L., Heintz N. RIP60, a mammalian origin-binding protein, enhances DNA binding near the dihydrofolate reductase origin of replication // *Mol. Cell. Biol.*—1990.—10. P. 6236—6243.
108. Rice G. C., Hoy C., Schimke R. T. Transient hypoxia enhances the frequency of dihydrofolate reductase gene amplification in Chinese hamster ovary cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1986.—83, N 16.—P. 5978—5982.
109. Albertoni M., Daub D. M., Arden K. C. et al. Genetic instability leads to loss of boss p53 alleles in a human glioblastoma // *Oncogene*.—1998.—16.—P. 321—326.
110. Queimado L., Reis A., Fonseca J. et al. A refined localization of two deleted regions in chromosome 6q associated with salivary gland carcinomas // *Oncogene*.—1998.—16.—P. 83—88.
111. Livingstone L. R., White A., Sprouse J. et al. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53 // *Cell*.—1992.—70.—P. 923—935.
112. Paulson T. G., Almasan A., Brody L. L., Wahl G. M. Gene amplification in a p53-deficient cell line requires cell cycle progression under conditions that generate DNA breakage // *Mol. Cell. Biol.*—1998.—18, N 5.—P. 3089—3100.
113. Shimizu N., Itoh N., Utiyama H., Wahl G. M. Selective entrapment of extrachromosomally amplified DNA by nuclear budding and micronucleation during S phase // *J. Cell Biol.*—1998.—140, N 6.—P. 1307—1320.
114. Yin Y., Tainsky M. A., Bischoff F. Z. et al. Wild type p53 restores cell cycle control and inhibits gene amplification in cells with mutant p53 alleles // *Cell*.—1992.—70.—P. 937—948.
115. Ishizaka Y., Chernov M. V., Burns C. M., Stark G. R. p53-dependent growth arrest of REF52 cells containing newly amplified DNA // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1995.—92, N 8.—P. 3224—3228.
116. Chernova O. B., Chernov M. V., Ishizaka Y. et al. MYC abrogates p53-mediated cell cycle arrest in N-(phosphoacetyl)-L-aspartate-treated cells, permitting CAD gene amplification // *Mol. Cell. Biol.*—1998.—18.—P. 536—545.
117. Maiti A. K., Sinha P. The *mcm2* mutation of yeast affects replication, rather than segregation or amplification of the two micron plasmid // *J. Mol. Biol.*—1992.—224.—P. 545—558.
118. Chong J. P. J., Thommes P., Blow J. J. The role of MCM/P1 proteins in the licensing of DNA replication // *Trends Biochem. Sci.*—1996.—21.—P. 102—106.
119. Yan H., Merchant A. M., Tye B. K. Cell cycle-regulated nuclear localization of MCM2 and MCM3, which are required for the initiation of DNA synthesis at chromosomal replication origins in yeast // *Genes and Development*.—1993.—7.—P. 2149—2160.
120. Treisman J. E., Follette R. J., O'Farrell P. H., Rubin G. M. Cell proliferation and DNA replication defects in a *Drosophila* MCM2 mutant // *Genes and Development*.—1995.—9.—P. 1709—1715.
121. Hammond D. W., Hancock B. W., Goyns M. H. Identification of a subclass of double minute chromosomes containing centromere-associated DNA // *Genes. Chromosomes. Cancer*.—1994.—10.—P. 139—142.
122. Choo K. H. A. Turning on the centromere // *Nat. Genet.*—1998.—18.—P. 3—4.
123. Williams B. C., Murphy T. D., Goldberg M. L., Karpen G. H. Neocentromere activity of structurally acentric mini-chromosomes in *Drosophila* // *Nat. Genet.*—1998.—18.—P. 30—37.
124. Renault S., Degroote F., Picard P. Identification of short tandemly repeated sequences in extrachromosomal circular DNAs from *Drosophila melanogaster* embryos // *Genome*.—1993.—36, N 2.—P. 244—254.
125. Lehman C. W., Botchan M. P. Segregation of viral plasmids depends on tethering to chromosomes and is regulated by phosphorylation // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1998.—95.—P. 4338—4343.
126. Murakami Y., Huberman J. A., Hurwitz J. Identification, purification, and molecular cloning of autonomously replicating sequence-binding protein 1 from fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1996.—93, N 1.—P. 502—507.

УДК 577.29; 577.218

Надійшла до редакції 27.01.2000