

МЕХАНИЗМЫ НЕКАНОНИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ АТМ-КИНАЗЫ

©2016 г.

С. В. ХОРОНЕНКОВА^{1, 2}

¹*Кафедра Биохимии, Университет Кембриджа, Кембридж CB2
1GA, Великобритания*

²*Химический факультет, Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова, Москва 119991, Россия*

I. Введение. II. Неканонические активаторы АТМ. III. Этиология А-Т.
IV. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

АТМ (Ataxia Telangiectasia mutated, КФ 2.7.11.1) является серин/треониновой протеинкиназой и относится к семейству киназ, родственных по отношению к фосфатидилинозитол-3-киназе (phosphatidylinositol 3-kinase related kinases, PIKK). Последовательность АТМ состоит из 3056 аминокислот, молекулярная масса белка составляет порядка 350 кДа. Доменная организация последовательности АТМ включает повторы HEAT, FAT (FRAM/ATM/TRRAP), С-концевой FATC и киназные домены и подробно рассмотрена в [1]. Другими важными киназами семейства PIKK, аминокислотные последовательности которых имеют значительную гомологию с последовательностью АТМ, являются ATR (АТМ- и Rad3-родственная киназа) и ДНК-РКс (каталитическая субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы). По аналогии с АТМ, ATR и ДНК-РКс функционируют в рамках клеточного ответа на повреждения ДНК, хотя специфические функции этих киназ существенно различаются [2].

Одной из основных канонических функций АТМ является координация клеточного ответа после облучения ионизирующей

Принятые сокращения: АТМ – Ataxia Telangiectasia mutated; ATR – АТМ- и Rad3-родственная киназа; ДНК-РКс – субъединица ДНК-зависимой протеинкиназы; ДР – двунитевые разрывы ДНК; ОР – однонитевые разрывы ДНК; MRN – Mre11-Rad50-Nbs1 комплекс; Top1 – ДНК-топоизомераза I; Top1cc – Top1-ДНК интермедиат; А-Т – атаксия-телеангиэктазия (Ataxia Telangiectasia); R-петля – РНК–ДНК гибрид.

Адрес для корреспонденции: e-mail – sk870@cam.ac.uk

радиацией. Механизм активации АТМ в ответ на облучение, предложенный лабораторией М. Kastan, включает внутримолекулярное самофосфорилирование белка по остатку серина 1981 с последующей мономеризацией и активацией киназы [3]. Позже было показано, что в дополнение к серину 1981 другие аминокислотные остатки АТМ подвергаются пост-трансляционным модификациям: ацетилирование лизина 3016 гистон-ацетилтрансферазой Tip60 необходимо для индукции киназной активности и последующего самофосфорилирования [4, 5], также было показано самофосфорилирование остатков серина 367, 1893, 2996 и тирозина 1885 [6–8]. Функциональная значимость всех вышеупомянутых модификаций АТМ экспериментально доказана в человеческих клетках и спорна в мышцах и экстрактах *Xenopus* [9, 10]. Каноническим индуктором активности АТМ в ответ на облучение считаются двунитевые разрывы ДНК (ДР), одни из наиболее мутагенных повреждений ДНК, тогда как сама активация происходит в присутствии MRN – комплекса (Mre11–Rad50–Nbs1), который обеспечивает первоначальную локализацию АТМ в комплексе с Tip60 на ДР [4, 5, 11–14]. Последующее АТМ-зависимое фосфорилирование многочисленных субстратов (более тысячи!) координируют процессы реорганизации структуры хроматина, транскрипции и сплайсинга, прогрессии клеточного цикла, репарации ДНК, апоптоза и многие другие (подробно см. исчерпывающие обзоры [15–17]).

В дополнение к активации АТМ в ответ на облучение был предложен принципиально другой механизм активации этой киназы в условиях окислительного стресса [18]. В соответствии с этим механизмом активный димер АТМ образуется при окислении остатков цистеина 2991 с образованием дисульфидной связи. Контрастируя с ДР-зависимой активацией АТМ в ядре, данный механизм реализуется, в том числе, и в цитоплазме, где активность АТМ важна для координации инсулинового ответа, функционирования митохондрий и пероксисом и др. [19–21]. Цитоплазматические субстраты АТМ были идентифицированы сравнительно недавно с использованием методов количественной протеомики [22]. Механизмы активации АТМ в ответ на ДР и окислительный стресс обсуждаются в ряде исчерпывающих обзорных работ [17, 23–26].

Подчеркивая функциональную значимость АТМ, инактивация функции этой киназы лежит в основе заболевания атаксия-телеангиэктазия (Ataxia Telangiectasia, А-Т), иначе называемого синдромом Луи-Бар [27–29]. А-Т является редким аутосомно-рецессивным заболеванием (1 случай на 40 000–100 000 [30, 31]) с мультисистем-

ными проявлениями, которое развивается в раннем детстве. А-Т характеризуется иммунодефицитом, прогрессирующей нейродегенерацией и предрасположенностью к онкологическим заболеваниям. Эффективного лечения А-Т в настоящее время не существует [32].

В последние годы вопрос эксклюзивности двунитевых разрывов ДНК и окислительного стресса в качестве индукторов активации АТМ становится все более актуальным. В данном обзоре обобщены новейшие экспериментальные данные, указывающие на значительно более широкую роль АТМ в качестве сенсора и регулятора клеточного гомеостаза в ответ на накопление одонитевых разрывов ДНК и РНК-ДНК гибридов, а также изменения структуры хроматина и цитоскелета.

II. НЕКАНОНИЧЕСКИЕ АКТИВАТОРЫ АТМ

ПОВРЕЖДЕНИЯ ДНК (ЗА ИСКЛЮЧЕНИЕМ ДВУНИТЕВЫХ РАЗРЫВОВ)

Одонитевые разрывы ДНК

Еще в 1993 г. ныне Нобелевский лауреат Томас Линдал (Нобелевская премия 2015 г. по химии) показал, что количество эндогенных двунитевых разрывов ДНК (10–20/клетка/день) незначительно по сравнению с числом одонитевых разрывов (15,000–20,000/день), возникающих благодаря нестабильности ДНК [33]. Более того, дополнительные одонитевые разрывы ДНК (ОР) образуются в качестве интермедиатов в процессе эксцизионной репарации поврежденных оснований ДНК [34]. Репарация ОР чрезвычайно важна для клетки, поскольку репликация ДНК с ОР приводит к образованию высокомутатогенных ДР [35], а транскрипция такой ДНК либо неэффективна, либо блокирована [36, 37]. Более того, дефекты репарации ОР ассоциированы с рядом заболеваний, включая нейродегенерацию и рак [38–42].

В соответствии с вышесказанным, авторами [43] было показано, что нерепарированные ОР стимулируют активацию АТМ в отсутствие ДР. Активация АТМ приводила к задержке клеточного цикла в фазе G_1 , необходимой для контролируемой репарации ОР перед репликацией ДНК, таким образом предотвращая образование репликационных двунитевых разрывов. В дополнение к контролю клеточного цикла АТМ-зависимая передача сигнала также стимулирует повышение эффективности репарации ОР [44, 45]. Дефекты сигнализации нерепарированных ОР в отсутствие АТМ приводили к репликации

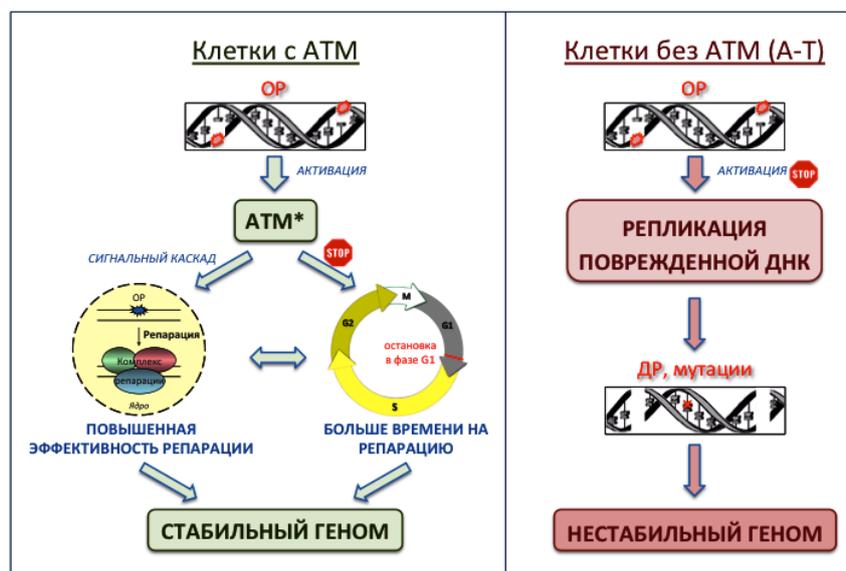


Рис. 1. ATM-зависимая координация репарации ОР и клеточного цикла.

Активация ATM в ответ на нерепарированные ОР обеспечивает повышенную эффективность репарации поврежденной ДНК, а также задержку клеточного цикла в фазе G_1 , то есть дополнительное время для последовательных раундов репарации. Таким образом, репарация ОР осуществляется вовремя, т.е. до репликации ДНК, и поддерживается стабильность генома (левая панель). В отсутствие ATM (А-Т клетки) детекция ОР не осуществляется, что приводит к репликации поврежденной ДНК, образованию ДР и последующему накоплению мутаций (правая панель).

поврежденной ДНК и накоплению мутагенных ДР, внося свой вклад в фенотип генетической нестабильности, характерный для А-Т (рис. 1).

Предложенная авторами роль ATM в сигнализации ОР проливает свет на ранее необъясненное явление чувствительности А-Т клеток к агентам, вызывающим повреждения оснований ДНК и ОР [46, 47]. В то же время вопрос о механизме активации ATM в ответ на однонитевые разрывы ДНК – зависимость от компонентов MRN комплекса или окисления дисульфидной/ых связи/ей в ядре, или же существование альтернативного механизма – остается открытым. Также открытым остается вопрос о вкладе ОР-зависимой активации ATM в ее активацию в ответ на облучение ионизирующей радиацией, которая в дополнение к ДР индуцирует значительные количества ОР и повреждений оснований ДНК [48].

Аддукты ДНК-топоизомеразы I с ДНК

ДНК-топоизомераза I (Top1) катализирует релаксацию сверхспирализованной ДНК, которая образуется в процессах репликации и транскрипции, путем расщепления одной ее цепи с образованием Top1-ДНК интермедиатов (Top1ss) и последующим религированием [49]. Ингибиторы Top1 (например, камтотецин) предотвращают лигирование ДНК, стабилизируя Top1ss аддукты, которые препятствуют эффективной транскрипции [50]. Авторами [51] была продемонстрирована активация АТМ после обработки камтотецином покоящихся (нереплицирующихся) клеток человека и постмитотических нейронов коры головного мозга мышей. В качестве индуктора активации АТМ были предложены однонитевые разрывы ДНК с ковалентной связью между 3'-концом разрыва и остатком тирозина активного сайта Top1 в составе частично деградированного протеасомой пептида – такие неканонические ОР образовывались в результате стабилизации Top1ss аддуктов камтотецином с последующей деградацией Top1 протеасомой, необходимой для репарации ОР. Соответственно, индукция повреждений и самофосфорилирование АТМ были обратимы в присутствии ингибиторов транскрипции DRB (5,6-дихлоро-1-β-рибофуранозилбензимидазол) и протеасомы MG-132. Присутствие ДР было исключено методом ДНК-комет.

Механизм и истинный индуктор активации АТМ в данном случае остаются неясными и требуют дополнительных исследований. Сами авторы [51] упомянули возможность активации киназы в ответ на локальные изменения структуры хроматина в области арестованных транскрипционных комплексов. С другой стороны, индуктором активации АТМ в данном случае могут являться непосредственно однонитевые разрывы ДНК с модификацией на 3'-конце.

В подтверждение данных [51], аберрантное накопление эндогенных Top1ss аддуктов наблюдалось в клетках мозга *Atm*^{-/-} мышей и человеческих А-Т клетках [52]. Данный эффект был независим от активности АТМ киназы и связан с нарушенной протеасомной деградацией Top1, необходимой для процессирования Top1ss аддуктов, в отсутствие АТМ.

R-петли

Более поздние работы указали на возможность участия R-петель, транскрипционных гетеродуплексов РНК и ДНК [53], которые могут образовываться при ингибировании активности Top1 [54], в процессе активации АТМ.

В противоречие работе [51], в нереплицирующихся первичных лимфоцитах, нейронах коры головного мозга крыс и синхронизированных культурах первичных фибробластов человека, где образование Top1ss интермедиатов индуцировали обработкой камтотецином, было обнаружено присутствие ДР [55, 56]. Таковое было доказано наличием фокусов, образуемых ДР-маркерами – γ H2AX и 53BP1, и методом ДНК-комет в условиях нейтрального лизиса. Активация ATM и образование ДР было обратимо при обработке клеток ингибиторами транскрипции или в случае экспрессии РНКазы H1, которая расщепляет РНК в составе R-петель. Авторами [55, 57] была предложена гипотеза, согласно которой блокирующие транскрипцию Top1ss приводят к образованию R-петель, которые, в свою очередь, стимулируют образование ДР в соответствии с неустановленным механизмом с последующей ДР-зависимой активацией ATM. Сравнительно недавно было показано, что R-петли могут процессироваться эндонуклеазами XPG и XPF в присутствии белка CSB, которые в совокупности являются частью системы эксцизионной репарации нуклеотидов, сопряженной с транскрипцией [58]. Гипотеза заключается в том, что в процессе разрешения R-петель вышеупомянутые эндонуклеазы могут разрезать обе нити ДНК, приводя к образованию ДР независимо от репликации ДНК, и логично объясняет результаты [55]. С другой стороны, было показано, что прекурсорами ДР в данной ситуации являются ОР с Top1 в составе частично деградированного пептида на 3'-конце [56]. Как и ранее детальный механизм образования ДР из таких неканонических ОР остается неясным, однако теории включают возникновение близлежащего ОР на другой цепи ДНК в результате репарации другого Top1ss аддукта, эндогенного повреждения ДНК или R-петли (разрезание одной цепи ДНК в соответствии с классическим механизмом эксцизионной репарации нуклеотидов, сопряженной с транскрипцией).

Роль R-петель в качестве первичного индуктора активности ATM была предложена в [59]. Нереплицирующиеся человеческие фибробласты кожи обрабатывали УФ с образованием фото-аддуктов ДНК, который блокировали элонгацию транскрипции РНК-полимеразой II и таким образом приводили к образованию R-петель. Индукция активности ATM была обратима при обработке клеток ингибиторами элонгации транскрипции и экспрессии РНКазы H1, но в отличие от вышеописанных результатов наблюдалась в отсутствие ДР (показано отсутствие γ H2AX и 53BP1 фокусов). ATM-зависимая сигнализация ингибирующей транскрипцию повреждений ДНК обеспечивала

регуляцию альтернативного сплайсинга пре-мРНК. Механизм такой неканонической активации АТМ в настоящий момент неясен [59]. Также дополнительного разъяснения требует и степень участия R-петель – прямого или опосредованного через образование ДР – в процессе активации АТМ.

СТРУКТУРНЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ

Изменения структуры хроматина

ДР инициируют значительные изменения структуры хроматина (для обзора см. [60]); именно поэтому такие структурные изменения были названы возможным индуктором активации АТМ в ответ на ионизирующее облучение в оригинальной работе 2003 г. [3]. Экспериментальные доказательства важности декомпактизации хроматина включают активацию АТМ в отсутствие ДР после помещения культуры человеческих клеток в гипотонический раствор, обработки клеток хлорохином и ингибиторами гистон-деацетилаз, а также кРНК-нокдауна белка гетерохроматина 1 α [3, 61]. MRN-независимая активация АТМ в условиях гипотонического стресса зависела от взаимодействия АТМ с белком АТМ1N, тогда как активация АТМ в ответ на облучение была независима от АТМ1N [62].

Подробно роль реорганизации структуры хроматина в индукции активности АТМ обсуждается в [63].

Механический стресс

Недавно было показано, что активность АТМ киназы, близкого гомолога АТМ, индуцируется в ответ на механический стресс [64]. Инкубация культур человеческих клеток в гипертоническом растворе, вызывающим осмотический шок и механический (мембранный) стресс в отсутствие ДР, приводила к локализации АТМ в ядерном конверте и активации киназы. Аналогичные результаты были получены при механическом растяжении клеток и имитирующей физиологическую компрессионную нагрузку. Активация АТМ в данном случае происходит в соответствии с невыясненным механизмом в отсутствие нуклеофиламентов однострессовой ДНК и репликативного белка А, которые необходимы для канонической активации АТМ, и важна для регуляции пластичности ядерного конверта и ассоциации с ним хроматина [64]. Актуальным является вопрос, играет ли механический стресс какую-либо роль в активации АТМ.

АКТИВАЦИЯ АТМ В ОТСУТСТВИЕ СЕНСОРОВ ДР

В эукариотах детекция ДР осуществляется двумя независимыми белковыми комплексами [65]: ассоциация MRN-комплекса с ДР обеспечивает активацию АТМ, тогда как Ku (Ku70–Ku80) комплекс индуцирует активность ДНК-РКс для репарации ДР методом негомологичного воссоединения концов (NHEJ) [66]. Авторами [67] было элегантно продемонстрировано, что в отсутствие MRN-комплекса активированная ДНК-РКс может функционально замещать АТМ в клетках мышечных эмбриональных фибробластов. В отсутствие Ku-комплекса происходила MRN-зависимая активация АТМ. В отсутствие же обоих сенсоров ДР, комплексов MRN и Ku, авторы наблюдали АТМ-зависимое фосфорилирование гистона H2AX и задержку клеточного цикла в фазе G₂M в ответ на облучение ионизирующей радиацией. Механизм такой MRN-независимой активации АТМ в настоящее время остается невыясненным [67].

III. ЭТИОЛОГИЯ А-Т

Проявления А-Т, связанные с функцией АТМ в координации клеточного ответа на ДР, включают иммунодефицит, восприимчивость к воздействию ионизирующего излучения (радиочувствительность) и других повреждающих ДНК агентов и повышенную предрасположенность к развитию онкологических заболеваний [68, 69]. В дополнение к вышеперечисленному А-Т пациенты страдают от прогрессивной нейродегенерации, включающей атрофию спинного мозга, мозжечка и ствола головного мозга с потерей в основном клеток Пуркинье, гранульных нейронов и клеток молекулярного слоя [70–72], а также атаксии, причины которой в настоящий момент неясны.

Нейродегенеративная этиология А-Т по-прежнему не имеет четкого объяснения и скорее всего мультисистемна в соответствии с многообразием функций АТМ. Прогресс в понимании молекулярных причин А-Т был ограничен в связи с отсутствием подходящей животной модели заболевания: прогрессивная нейродегенерация у *Atm*^{-/-} мышей проявляется в значительно меньшей степени по сравнению с человеком [73–75]. Интересно то, что неярко выраженный нейродегенеративный фенотип *Atm*^{-/-} мышей удалось частично компенсировать в присутствии антиоксидантов, указывая на роль окислительного стресса в нейродегенерации [76, 77]. Повышенный окислительный стресс также наблюдался в клетках А-Т пациентов [78, 79]. Следует упомянуть, что повышенного количества R-петель не было обнаружено в тканях мозга *Atm*^{-/-} мышей, отвергая роль таких

гетеродуплексов в этиологии заболевания [80]. Нейродегенеративная патология А-Т также может быть связана с отсутствием АТМ-зависимой элиминации клеток, содержащих нерепарированные ДР, в процессе развития нервной системы [81]. Более того, открытие роли АТМ в координации репарации ОР указывает на вероятный вклад ингибирующих транскрипцию однонитевых разрывов ДНК в этиологию заболевания атаксия-телеангиэктазия.

IV. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспериментальные результаты последних лет указывают на активацию функции АТМ в присутствии ряда неканонических индукторов (отличных от двунитевых разрывов ДНК), таких как однонитевые разрывы ДНК, РНК–ДНК гибриды и изменения структуры хроматина (рис. 2). Несмотря на очевидный прогресс в понимании функции АТМ киназы, вопрос о существовании некоего универсального индуктора активации АТМ (например, повреждений ДНК или изменений структуры хроматина) или же индукции активности этой киназы в ответ на ряд принципиально отличных типов стресса, а также о механизмах такой активации остается открытым.



Рис. 2. Индукторы активации АТМ. Неканонические индукторы, подробно рассмотренные в данном обзоре, обозначены овалами.

ЛИТЕРАТУРА

1. Lavin, M.F., Scott, S., Gueven, N., Kozlov, S., Peng, C., Chen, P. (2004) Functional consequences of sequence alterations in the ATM gene. *DNA Repair (Amst.)*, **3**, 1197–1205.
2. Falck, J., Coates, J., Jackson, S.P. (2005) Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*, **434**, 605–611.
3. Bakkenist, C.J., Kastan, M.B. (2003) DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, **421**, 499–506.
4. Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., Fernandes, N., Price, B.D. (2005) A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 13182–13187.
5. Sun, Y., Xu, Y., Roy, K., Price, B.D. (2007) DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. *Mol. Cell Biol.*, **27**, 8502–8509.
6. Kozlov, S., Gueven, N., Keating, K., Ramsay, J., Lavin, M.F. (2003) ATP activates ataxia-telangiectasia mutated (ATM) in vitro. Importance of autophosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **278**, 9309–9317.
7. Kozlov, S.V., Graham, M.E., Peng, C., Chen, P., Robinson, P.J., Lavin, M.F. (2006) Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J.*, **25**, 3504–3514.
8. Kozlov, S.V., Graham, M.E., Jakob, B., Tobias, F., Kijas, A.W., Tanuji, M., Chen, P., Robinson, P.J., Taucher-Scholz, G., Suzuki, K., So, S., Chen, D., Lavin, M.F. (2011) Autophosphorylation and ATM activation: additional sites add to the complexity. *J. Biol. Chem.*, **286**, 9107–9119.
9. Pellegrini, M., Celeste, A., Difilippantonio, S., Guo, R., Wang, W., Feigenbaum, L., Nussenzweig, A. (2006) Autophosphorylation at serine 1987 is dispensable for murine Atm activation in vivo. *Nature*, **443**, 222–225.
10. Daniel, J.A., Pellegrini, M., Lee, J.H., Paull, T.T., Feigenbaum, L., Nussenzweig, A. (2008) Multiple autophosphorylation sites are dispensable for murine ATM activation in vivo. *J. Cell Biol.*, **183**, 777–783.
11. Uziel, T., Lerenthal, Y., Moyal, L., Andegeko, Y., Mittelman, L., Shiloh, Y. (2003) Requirement of the MRN complex for ATM activation by DNA damage. *EMBO J.*, **22**, 5612–5621.
12. Carson, C.T., Schwartz, R.A., Stracker, T.H., Lilley, C.E., Lee, D.V., Weitzman, M.D. (2003) The Mre11 complex is required for ATM activation and the G2/M checkpoint. *EMBO J.*, **22**, 6610–6620.
13. Sun, Y., Jiang, X., Xu, Y., Ayrappetov, M.K., Moreau, L.A., Whetstone, J.R., Price, B.D. (2009) Histone H3 methylation links DNA damage detection to activation of the tumour suppressor Tip60. *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1376–1382.
14. Deshpande, R.A., Williams, G.J., Limbo, O., Williams, R.S., Kuhnlein, J., Lee, J.H., Classen, S., Guenther, G., Russell, P., Tainer, J.A., Paull, T.T. (2014) ATP-driven Rad50 conformations regulate DNA tethering, end resection, and ATM checkpoint signaling. *EMBO J.*, **33**, 482–500.
15. Bhatti, S., Kozlov, S., Farooqi, A.A., Naqi, A., Lavin, M., Khanna, K.K. (2011) ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. *Cell Mol. Life Sci.*, **68**, 2977–3006.
16. Shiloh, Y., Ziv, Y. (2013) The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **14**, 197–210.
17. Paull, T.T. (2015) Mechanisms of ATM Activation. *Annu Rev. Biochem.*, **84**, 711–738.
18. Guo, Z., Kozlov, S., Lavin, M.F., Person, M.D., Paull, T.T. (2010) ATM activation by oxidative stress. *Science*, **330**, 517–521.
19. Yang, D.Q., Kastan, M.B. (2000) Participation of ATM in insulin sig-

- nalling through phosphorylation of eIF-4E-binding protein 1. *Nat. Cell Biol.*, **2**, 893–898.
20. Valentin-Vega, Y.A., Maclean, K.H., Tait-Mulder, J., Milasta, S., Steeves, M., Dorsey, F.C., Cleveland, J.L., Green, D.R., Kastan, M.B. (2012) Mitochondrial dysfunction in ataxia-telangiectasia. *Blood*, **119**, 1490–1500.
21. Zhang, J., Tripathi, D.N., Jing, J., Alexander, A., Kim, J., Powell, R.T., Dere, R., Tait-Mulder, J., Lee, J.H., Paull, T.T., Pandita, R.K., Charaka, V.K., Pandita, T.K., Kastan, M.B., Walker, C.L. (2015) ATM functions at the peroxisome to induce pexophagy in response to ROS. *Nat. Cell Biol.*, **17**, 1259–1269.
22. Kozlov, S.V., Waardenberg, A.J., Engholm-Keller, K., Arthur, J.W., Graham, M.E., Lavin, M.F. (2016) ROS-activated ATM-dependent phosphorylation of cytoplasmic substrates identified by large scale phosphoproteomics screen. *Mol. Cell Proteomics*, **15**, 1032–1047.
23. McKinnon, P.J. (2012) ATM and the molecular pathogenesis of ataxia telangiectasia. *Annu Rev. Pathol.*, **7**, 303–321.
24. Di Domenico, E.G., Romano, E., Del Porto, P., Ascenzioni, F. (2014) Multifunctional role of ATM/Tell kinase in genome stability: from the DNA damage response to telomere maintenance. *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 787404.
25. Shiloh, Y. (2014) ATM: expanding roles as a chief guardian of genome stability. *Exp. Cell Res.*, **329**, 154–161.
26. Lavin, M.F., Kozlov, S., Gatei, M., Kijas, A.W. (2015) ATM-Dependent Phosphorylation of All Three Members of the MRN Complex: From Sensor to Adaptor. *Biomolecules*, **5**, 2877–2902.
27. Syllaba, L., Henner, K. (1926) Contribution à l'étude de l'indépendance de l'athétose double idiopathique et congénitale. Atteinte familiale, syndrome dystrophique, signe du réseau vasculaire conjonctival, inté-grité psychique. *Rev. Neurol. (Paris)*, **1**, 541–560.
28. Louis-Bar, D. (1941) Sur un syndrome progressif comprenant des télangiectasies capillaires cutanées et conjonctivales symétriques, à disposition naevoïde et des troubles cérébelleux. *Confin. Neurol.*, **4**, 32–42.
29. Boder, E., Sedgwick, R.P. (1958) Ataxia-telangiectasia; a familial syndrome of progressive cerebellar ataxia, oculocutaneous telangiectasia and frequent pulmonary infection. *Pediatrics*, **21**, 526–554.
30. Su, Y., Swift, M. (2000) Mortality rates among carriers of ataxia-telangiectasia mutant alleles. *Ann. Intern. Med.*, **133**, 770–778.
31. Swift, M., Morrell, D., Cromartie, E., Chamberlin, A.R., Skolnick, M.H., Bishop, D.T. (1986) The incidence and gene frequency of ataxia-telangiectasia in the United States. *Am. J. Hum. Genet.* **39**, 573–583.
32. Teive, H.A., Moro, A., Moscovich, M., Arruda, W.O., Munhoz, R.P., Raskin, S., Ashizawa, T. (2015) Ataxia-telangiectasia – A historical review and a proposal for a new designation: ATM syndrome. *J. Neurol. Sci.*, **355**, 3–6.
33. Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA. *Nature*, **362**, 709–715.
34. Dianov, G., Price, A., Lindahl, T. (1992) Generation of single-nucleotide repair patches following excision of uracil residues from DNA. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 1605–1612.
35. Kuzminov, A. (2001) Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 8241–8246.
36. Zhou, W., Doetsch, P.W. (1993) Effects of abasic sites and DNA single-strand breaks on prokaryotic RNA polymerases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 6601–6605.
37. Kathe, S.D., Shen, G.P., Wallace, S.S. (2004) Single-stranded breaks

- in DNA but not oxidative DNA base damages block transcriptional elongation by RNA polymerase II in HeLa cell nuclear extracts. *J. Biol. Chem.*, **279**, 18511–18520.
38. Date, H., Onodera, O., Tanaka, H., Iwabuchi, K., Uekawa, K., Igarashi, S., Koike, R., Hiroi, T., Yuasa, T., Awaya, Y., Sakai, T., Takahashi, T., Nagatomo, H., Sekijima, Y., Kawachi, I., Takiyama, Y., Nishizawa, M., Fukuhara, N., Saito, K., Sugano, S., Tsuji, S. (2001) Early-onset ataxia with ocular motor apraxia and hypoalbuminemia is caused by mutations in a new HIT superfamily gene. *Nat. Genet.*, **29**, 184–188.
 39. Moreira, M.C., Barbot, C., Tachi, N., Kozuka, N., Uchida, E., Gibson, T., Mendonca, P., Costa, M., Barros, J., Yanagisawa, T., Watanabe, M., Ikeda, Y., Aoki, M., Nagata, T., Coutinho, P., Sequeiros, J., Koenig, M. (2001) The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nat. Genet.*, **29**, 189–193.
 40. Takashima, H., Boerkoel, C.F., John, J., Saifi, G.M., Salih, M.A., Armstrong, D., Mao, Y., Quiocho, F.A., Roa, B.B., Nakagawa, M., Stockton, D.W., Lupski, J.R. (2002) Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nat. Genet.*, **32**, 267–272.
 41. Shen, J., Gilmore, E.C., Marshall, C.A., Haddadin, M., Reynolds, J.J., Eyaid, W., Bodell, A., Barry, B., Gleason, D., Allen, K., Ganesh, V.S., Chang, B.S., Grix, A., Hill, R.S., Topcu, M., Caldecott, K.W., Barkovich, A.J., Walsh, C.A. (2010) Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair. *Nat. Genet.*, **42**, 245–249.
 42. Markkanen, E., Fischer, R., Ledentcova, M., Kessler, B.M., Dianov, G.L. (2015) Cells deficient in base-excision repair reveal cancer hallmarks originating from adjustments to genetic instability. *Nucleic Acids Res.*, **43**, 3667–3679.
 43. Khoronenkova, S.V., Dianov, G.L. (2015) ATM prevents DSB formation by coordinating SSB repair and cell cycle progression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 3997–4002.
 44. Khoronenkova, S.V., Dianova, I.I., Ternette, N., Kessler, B.M., Parsons, J.L., Dianov, G.L. (2012) ATM-dependent downregulation of USP7/HAUSP by PPM1G activates p53 response to DNA damage. *Mol. Cell*, **45**, 801–813.
 45. Khoronenkova, S.V., Dianov, G.L. (2013) USP7S-dependent inactivation of Mule regulates DNA damage signalling and repair. *Nucleic Acids Res.*, **41**, 1750–1756.
 46. Hoar, D.I., Sargent, P. (1976) Chemical mutagen hypersensitivity in ataxia telangiectasia. *Nature*, **261**, 590–592.
 47. Yi, M., Rosin, M.P., Anderson, C.K. (1990) Response of fibroblast cultures from ataxia-telangiectasia patients to oxidative stress. *Cancer Lett.*, **54**, 43–50.
 48. Roots, R., Kraft, G., Gosschalk, E. (1985) The formation of radiation-induced DNA breaks: the ratio of double-strand breaks to single-strand breaks. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, **11**, 259–265.
 49. Champoux, J.J., Dulbecco, R. (1972) An activity from mammalian cells that untwists superhelical DNA—a possible swivel for DNA replication (polyoma-ethidium bromide-mouse-embryo cells-dye binding assay). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 143–146.
 50. Hsiang, Y.H., Hertzberg, R., Hecht, S., Liu, L.F. (1985) Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J. Biol. Chem.*, **260**, 14873–14878.
 51. Lin, C.P., Ban, Y., Lyu, Y.L., Desai, S.D., Liu, L.F. (2008) A ubiquitin-proteasome pathway for the repair of topoisomerase I-DNA covalent

- complexes. *J. Biol. Chem.*, **283**, 21074–21083.
52. Katyal, S., Lee, Y., Nitiss, K.C., Downing, S.M., Li, Y., Shimada, M., Zhao, J., Russell, H.R., Petrini, J.H., Nitiss, J.L., McKinnon, P.J. (2014) Aberrant topoisomerase-1 DNA lesions are pathogenic in neurodegenerative genome instability syndromes. *Nat. Neurosci.*, **17**, 813–821.
53. Huertas, P., Aguilera, A. (2003) Co-transcriptionally formed DNA:RNA hybrids mediate transcription elongation impairment and transcription-associated recombination. *Mol. Cell*, **12**, 711–721.
54. Tudurî, S., Crabbe, L., Conti, C., Tourriere, H., Holtgreve-Grez, H., Jauch, A., Pantescio, V., De Vos, J., Thomas, A., Theillet, C., Pommier, Y., Tazi, J., Coquelle, A., Pasero, P. (2009) Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription. *Nat. Cell Biol.*, **11**, 1315–1324.
55. Sordet, O., Redon, C.E., Guirouilh-Barbat, J., Smith, S., Solier, S., Douarre, C., Conti, C., Nakamura, A.J., Das, B.B., Nicolas, E., Kohn, K.W., Bonner, W.M., Pommier, Y. (2009) Ataxia telangiectasia mutated activation by transcription- and topoisomerase I-induced DNA double-strand breaks. *EMBO Rep.*, **10**, 887–893.
56. Cristini, A., Park, J.H., Capranico, G., Legube, G., Favre, G., Sordet, O. (2016) DNA-PK triggers histone ubiquitination and signaling in response to DNA double-strand breaks produced during the repair of transcription-blocking topoisomerase I lesions. *Nucleic Acids Res.*, **44**, 1161–1178.
57. Sordet, O., Nakamura, A.J., Redon, C.E., Pommier, Y. (2010) DNA double-strand breaks and ATM activation by transcription-blocking DNA lesions. *Cell Cycle*, **9**, 274–278.
58. Sollier, J., Stork, C.T., Garcia-Rubio, M.L., Paulsen, R.D., Aguilera, A., Cimprich, K.A. (2014) Transcription-coupled nucleotide excision repair factors promote R-loop-induced genome instability. *Mol. Cell*, **56**, 777–785.
59. Tresini, M., Warmerdam, D.O., Kolovos, P., Snijder, L., Vrouwe, M.G., Demmers, J.A., van, I.W.F., Grosveld, F.G., Medema, R.H., Hoeijmakers, J.H., Mullenders, L.H., Vermeulen, W., Marteijn, J.A. (2015) The core spliceosome as target and effector of non-canonical ATM signalling. *Nature*, **523**, 53–58.
60. Price, B.D., D'Andrea, A.D. (2013) Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks. *Cell*, **152**, 1344–1354.
61. Kaidi, A., Jackson, S.P. (2013) KAT5 tyrosine phosphorylation couples chromatin sensing to ATM signalling. *Nature*, **498**, 70–74.
62. Kanu, N., Behrens, A. (2007) ATMIN defines an NBS1-independent pathway of ATM signalling. *EMBO J.*, **26**, 2933–2941.
63. Bakkenist, C.J., Kastan, M.B. (2015) Chromatin perturbations during the DNA damage response in higher eukaryotes. *DNA Repair (Amst)*, **36**, 8–12.
64. Kumar, A., Mazzanti, M., Mistrik, M., Kosar, M., Beznoussenko, G.V., Mironov, A.A., Garre, M., Parazzoli, D., Shivashankar, G.V., Scita, G., Bartek, J., Foiani, M. (2014) ATR mediates a checkpoint at the nuclear envelope in response to mechanical stress. *Cell*, **158**, 633–646.
65. Goodarzi, A.A., Jeggo, P.A. (2013) The repair and signaling responses to DNA double-strand breaks. *Adv. Genet.*, **82**, 1–45.
66. Taccioli, G.E., Gottlieb, T.M., Blunt, T., Priestley, A., Demengeot, J., Mizuta, R., Lehmann, A.R., Alt, F.W., Jackson, S.P., Jeggo, P.A. (1994) Ku80: product of the XRCC5 gene and its role in DNA repair and V(D)J recombination. *Science*, **265**, 1442–1445.

67. Hartlerode, A.J., Morgan, M.J., Wu, Y., Buis, J., Ferguson, D.O. (2015) Recruitment and activation of the ATM kinase in the absence of DNA-damage sensors. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **22**, 736–743.
68. Epstein, W.L., Fudenberg, H.H., Reed, W.B., Boder, E., Sedgwick, R.P. (1966) Immunologic studies in ataxia-telangiectasia. I. Delayed hypersensitivity and serum immune globulin levels in probands and first-degree relatives. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **30**, 15–29.
69. Boder, E., Sedgwick, R.P. (1970) Ataxia-telangiectasia. (Clinical and immunological aspects). *Psychiatr. Neurol. Med. Psychol. Beih.*, **13–14**, 8–16.
70. Aguilar, M.J., Kamoshita, S., Landing, B.H., Boder, E., Sedgwick, R.P. (1968) Pathological observations in ataxia-telangiectasia. A report of five cases. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **27**, 659–676.
71. Paula-Barbosa, M.M., Ruela, C., Tavares, M.A., Pontes, C., Saraiva, A., Cruz, C. (1983) Cerebellar cortex ultrastructure in ataxia-telangiectasia. *Ann. Neurol.*, **13**, 297–302.
72. Vinters, H.V., Gatti, R.A., Rakic, P. (1985) Sequence of cellular events in cerebellar ontogeny relevant to expression of neuronal abnormalities in ataxia-telangiectasia. *Kroc. Found. Ser.*, **19**, 233–255.
73. Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., Liyanage, M., Eckhaus, M., Collins, F., Shiloh, Y., Crawley, J.N., Ried, T., Tagle, D., Wynshaw-Boris, A. (1996) Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell*, **86**, 159–171.
74. Barlow, C., Ribaut-Barassin, C., Zwingman, T.A., Pope, A.J., Brown, K.D., Owens, J.W., Larson, D., Harrington, E.A., Haerberle, A.M., Mariani, J., Eckhaus, M., Herrup, K., Bailly, Y., Wynshaw-Boris, A. (2000) ATM is a cytoplasmic protein in mouse brain required to prevent lysosomal accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 871–876.
75. Borghesani, P.R., Alt, F.W., Bottaro, A., Davidson, L., Aksoy, S., Rathbun, G.A., Roberts, T.M., Swat, W., Segal, R.A., Gu, Y. (2000) Abnormal development of Purkinje cells and lymphocytes in Atm mutant mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 3336–3341.
76. Chen, P., Peng, C., Luff, J., Spring, K., Watters, D., Bottle, S., Furuya, S., Lavin, M.F. (2003) Oxidative stress is responsible for deficient survival and dendritogenesis in purkinje neurons from ataxia-telangiectasia mutated mutant mice. *J. Neurosci.*, **23**, 11453–11460.
77. Reliene, R., Schiestl, R.H. (2007) Antioxidants suppress lymphoma and increase longevity in Atm-deficient mice. *J. Nutr.*, **137**, 229S–232S.
78. Rybczynska, M., Pawlak, A.L., Sikorska, E., Ignatowicz, R. (1996) Ataxia telangiectasia heterozygotes and patients display increased fluidity and decrease in contents of sulfhydryl groups in red blood cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1302**, 231–235.
79. Reichenbach, J., Schubert, R., Schindler, D., Muller, K., Bohles, H., Zielen, S. (2002) Elevated oxidative stress in patients with ataxia telangiectasia. *Antioxid. Redox Signal.*, **4**, 465–469.
80. Yeo, A.J., Becherel, O.J., Luff, J.E., Cullen, J.K., Wongsurawat, T., Jenjaroenpun, P., Kuznetsov, V.A., McKinnon, P.J., Lavin, M.F. (2014) R-loops in proliferating cells but not in the brain: implications for AOA2 and other autosomal recessive ataxias. *PLoS One*, **9**, e90219.
81. Orii, K.E., Lee, Y., Kondo, N., McKinnon, P.J. (2006) Selective utilization of nonhomologous end-joining and homologous recombination DNA repair pathways during nervous system development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 10017–10022.