

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ
СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК

На правах рукописи

ПОПОВ АЛЕКСЕЙ АЛЕКСЕЕВИЧ

НАУЧНЫЙ ДОКЛАД
об основных результатах выполненной
научно-квалификационной работы

Синтетические ДНК в изучении эукариотических клеток

Направление подготовки

06.06.01 Биологические науки

Направленность

03.01.04 Биохимия

Аспирант _____ А. А. Попов

Научный руководитель _____ Академик РАН, профессор, д.х.н. О. И. Лаврик

Новосибирск – 2022

Работа выполнена в Лаборатории биоорганической химии ферментов ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, г. Новосибирск, Россия.

Научный руководитель:

Лаврик Ольга Ивановна

Академик РАН, профессор, доктор химических наук, заведующая Лабораторией биоорганической химии ферментов ФГБУН Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность.

Актуальной проблемой является изучение функционирования молекулярно-клеточных механизмов, определяющих такие важные показатели как стабильность генома, долголетие и онкоустойчивость клеток млекопитающих. Существенный вклад в реализацию этих свойств вносят непрерывно идущие в их клетках процессы репарации ДНК. В ДНК клеток живых организмов с частотой от 1000 до 1 млн в день возникают повреждения, обусловленные воздействием внешних факторов: УФ-света, химиотерапевтических препаратов, продуктов загрязнения окружающей среды, а также нормальных метаболических процессов, возникают в ДНК живых организмов с частотой от 1000 до 1 млн в день [1]. Накопление повреждений приводит к нарушению целостности генома и целому ряду отрицательных последствий, в том числе, к проявлению клеточного старения, которое сопровождается остановкой клеточного цикла, потерей межклеточных контактов и развитием специфичной клеточной морфологии [2,3]. Белковые факторы и ферменты систем репарации ДНК с высокой точностью удаляют различные типы повреждений и обеспечивают восстановление целостности структуры ДНК. В целом, репарация ДНК, противостоящая накоплению повреждений, является одним из главных механизмов, определяющих долголетие и онкоустойчивость [4].

Перспективной моделью для изучения функционирования систем поддержания стабильности генома является голый землекоп (*Heterocephalus glaber*). Этот небольшой грызун демонстрирует экстремально высокую продолжительность жизни (~32 года) по сравнению с близкой по размеру и массе тела мышью (*Mus musculus*) (~4 года) и эффективные системы поддержания стабильности генома [5,6]. Клетки голого землекопа имеют ряд молекулярных особенностей функционирования генома, транскриптома и протеома, которые обуславливают устойчивость его клеток к старению, раковым заболеваниям, а также окислительному стрессу, в условиях которого голый землекоп проводит всю свою жизнь [7]. Результаты проведенной оценки репаративного статуса *in vitro* показывают, что фибробласты голого землекопа имеют более эффективные системы эксцизионной репарации оснований и нуклеотидов, чем фибробласты близкой по размеру тела мыши [8]. Несмотря на это, особенности функционирования белков репарации, обеспечивающие повышенную эффективность репарации ДНК в клетках голого землекопа, требуют более углубленного исследования. Кроме того, изучение репаративного статуса в клетках голого землекопа *ex vivo* в сравнении с клетками других долгоживущих и короткоживущих млекопитающих прежде не проводилось, в связи с чем проведение

подобных исследований является актуальным и может внести вклад в понимание молекулярных основ устойчивости клеток млекопитающих к старению и стрессу.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы является изучение белков репарации голого землекопа и их устойчивости к повреждающим воздействиям. В рамках данной работы были поставлены следующие задачи:

- 1) провести сравнительную оценку устойчивости фибробластов голого землекопа и мыши к воздействию трех цитотоксических агентов – метилметансульфоната, 5-фторурацила и этопозида;
- 2) провести биоинформатический анализ нуклеотидной последовательности гена *Parp1*, а также аминокислотной последовательности белка PARP1 голого землекопа в сравнении с аналогичными последовательностями PARP1 человека и мыши;
- 3) провести сравнительное исследование термостабильности и устойчивости к денатурирующему воздействию мочевины рекомбинантных PARP1 голого землекопа и человека;
- 4) разработать методику определения активности эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) *ex vivo*.

Научная новизна полученных результатов. Изучение молекулярных основ высокой стабильности белков репарации и регуляторных факторов обитающего в условиях генотоксического стресса голого землекопа, выполненное в данной работе, ранее не проводилось. Впервые показано, что фибробласты голого землекопа оказались устойчивы к воздействию высоких доз цитотоксических агентов, что обеспечивается эффективной репарацией ДНК-повреждений, образуемых в результате воздействия данных веществ. Выполненный в данной работе сравнительный биоинформатический анализ позволил впервые установить различия в аминокислотной последовательности ключевого регулятора процессов репарации ДНК – белка PARP1 голого землекопа, которые определяют более высокую термостабильность и устойчивость данного белка к денатурирующему воздействию мочевины в сравнении с PARP1 человека. Полученные результаты позволили приблизиться к пониманию молекулярных основ устойчивости клеток млекопитающих к старению и стрессу.

Теоретическая и практическая значимость работы. Действие большинства применяемых в противоопухолевой терапии цитотоксических препаратов направлено на возникновение в ДНК различных типов повреждений. Тем не менее, эффективность воздействия данных препаратов может значительно снижаться из-за высокой активности систем репарации ДНК в раковых клетках. Таким образом, изучение основ поддержания стабильности генома в клетках млекопитающих, устойчивых к воздействию

генотоксического стресса (в том числе, за счет высокоактивных систем репарации ДНК), имеет важное теоретическое и практическое значение для разработки более эффективных химиотерапевтических препаратов.

Апробация работы. Публикации. По результатам исследования опубликовано 8 работ, в том числе 2 статьи в рецензируемых изданиях рекомендованного перечня ВАК и 6 тезисов конференций:

Evdokimov A.N., **Попов А.А.**, Ryabchikova E.I, Koval O.A., Romanenko S.A., Trifonov V.A., Petruseva I.O., Lavrik I.N., Lavrik O.I Uncovering molecular mechanisms of programmed cell death in the naked mole rat. Aging, 2021 (doi: 10.18632/aging.202577);

Попов А.А., Orishchenko K.E., Naumenko K.N., Evdokimov A.N., Petruseva I.O., Lavrik O.I. A Method for assessing the efficiency of the nucleotide excision repair system ex vivo. Acta Naturae, 2021 (doi: 10.32607/actanaturae.11430);

Попов А. А., Евдокимов А. Н., Петрусева И. О., Лаврик О. И. Модельные ДНК для изучения эксцизионной репарации нуклеотидов. Материалы XXI Зимней Молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии, Санкт-Петербург, 24–29 февраля 2020 (тезисы);

Попов А.А., Romanenko S.A., Lavrik I.N., Evdokimov A.N., Trifonov V.A., Ryabchikova E.I., Petruseva I.O., Koval O.A., Lavrik O.I. Regulated cell death in naked mole rat. The 12th International Multiconference Abstracts (BGRS/SB-2020), Novosibirsk, Russia 06–10 July, 2020 (тезисы);

Попов А.А., Romanenko S.A., Lavrik I.N., Evdokimov A.N., Trifonov V.A., Ryabchikova E.I., Petruseva I.O., Koval O.A., Lavrik O.I. Uncovering molecular mechanisms of regulated cell death in the naked mole rat. Сборник материалов конференции “Bio-top 2020: актуальные вопросы современной биологии, Новосибирск, Россия, 21–24 декабря 2020 (тезисы);

Попов А.А., Evdokimov A.N., Ryabchikova E.I., Koval O.A., Romanenko S.A., Trifonov V.A., Petruseva I.O., Lavrik I.N., Lavrik O.I. Regulated cell death in the naked mole rat. FEBS Open Bio, Slovenia, Ljubljana, 03–08 July, 2021 (тезисы);

Попов А.А., Orishchenko K.E., Naumenko K.N., Evdokimov A.N., Petruseva I.O., Lavrik O.I. Method for assessment of nucleotide excision repair system efficiency ex vivo. 3rd World Aging

and Rejuvenation Conference Book (ARC-2021), Barcelona, Spain, 20–22 September, 2021 (тезисы);

Popov A.A, Petrusheva I.O., Lavrik O.I. Assessment of the Nucleotide Excision Repair System Activity Ex Vivo. The 13th International Multiconference Abstracts (BGRS/SB-2022), Novosibirsk, Russia, 04–08 July, 2022 (тезисы).

Вклад автора. Основная часть исследовательской работы проведена автором лично, либо при его непосредственном участии. Эксперименты по определению морфологических признаков клеточной гибели с применением электронной микроскопии выполнены руководителем группы микроскопических исследований ИХБФМ СО РАН, д.б.н., профессором Рябчиковой Е.И. Биоинформатический анализ нуклеотидной и аминокислотной последовательностей гена *Parp1* голого землекопа, получение кДНК данного гена и синтез на её основе вектора для экспрессии PARP1 голого землекопа в клетках *E.coli* проведены руководителем сектора геномных механизмов онтогенеза ИЦИГ СО РАН, к.б.н., Фишманом В.С. и студентом Нурисламовым А.Р. Экспрессия PARP1 голого землекопа проведена инженером ЛБХФ ИХБФМ СО РАН Наumenко К.Н.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток. Иммуортализованные фибробласты голого землекопа линии NSF8, были любезно предоставлены доктором В. Горбуновой (Университет Рочестера, США). Клетки NSF8 были культивированы с использованием разработанного протокола (32°C, 5% CO₂, αMEM, 15%FBS, 10% AmnioMAX, 0,005 мкг/мл bFGF, смесь антибиотик/анитимикотик (Gibco)). Для культивирования фибробластов мыши линии 3Т3 (любезно предоставлена доктором В. Фишманом (Институт цитологии и генетики СО РАН, Россия)) и клеток почки эмбриона человека НЕК 293Т использовались стандартные условия – 37°C, 5% CO₂, DMEM, 10% FBS, смесь антибиотик/анитимикотик (Gibco).

Анализ метаболической активности. Клетки NSF8 и 3Т3 рассаживали в 96-луночные планшеты в количестве 3×10^3 клеток на лунку в 200 мкл культуральной среды и культивировали, как описано выше, в течение 24 ч (голый землекоп) или 12 ч (мышь). Затем к клеткам добавляли цитотоксические агенты, растворенные в ДМСО, и инкубировали клетки в течение различных временных интервалов. Оценку метаболической активности клеток проводили с помощью EZ4U-теста (Biomedica) по протоколу производителя. Интенсивность люминесценции клеток определяли при 492 нм с помощью считывателя микропланшетов CLARIOstar Plus (BMG LABTECH GmbH). Все эксперименты были повторены в трех экземплярах.

Определение активности каспаз. Клетки NSF8 и 3Т3 рассаживали в 96-луночные планшеты в количестве 3×10^3 клеток на лунку в 200 мкл культуральной среды и культивировали, как описано выше, до достижения 60% конfluence. Активность каспазы измеряли с использованием набора для анализа активности эффекторных каспаз - 3 и -7 Caspase-Glo 3/7 по протоколу производителя (Promega, Madison, WI). Интенсивность люминесценции измеряли с помощью планшетного считывателя Infinite M200 (Tecan, Research Triangle Park, США).

Анализ клеточной гибели методом проточной цитофлюориметрии. Клетки NSF8 и 3Т3 рассаживали в 6-луночные планшеты и культивировали до достижения 80% конfluence, после чего клетки обрабатывали цитотоксическими агентами в течение 16 ч (5-FU) или 20 ч (этопозид и MMS). Для проведения проточной цитометрии клетки снимали с планшета с помощью трипсина (перед обработкой трипсином собирали открепившиеся клетки). К снятым с помощью трипсина клеткам добавляли ингибитор соевого трипсина (Sigma) в концентрации 10 мкг/мл для ингибирования протеолиза, инициируемого трипсином. Открепившиеся и снятые с помощью трипсина клетки объединяли центрифугированием (5 мин при 500 g). Для детекции клеточной гибели был

использован набор FITC Annexin V и проточный цитометр FACSCanto II (BD Biosciences, США). Анализ проводили на проточном цитометре FACSCantoII с использованием программного обеспечения FACSDiva (BD Biosciences). Для каждой окрашиваемой клеточной популяции было записано десять тысяч событий. Ингибиторы Nec-1 (Sigma-Aldrich, США) и zVAD-fmk (BD Biosciences), растворенные в ДМСО, добавляли за 2 часа до добавления цитотоксических агентов.

Определение морфологических признаков клеточной гибели с помощью трансмиссионной электронной микроскопии. Клетки NSF8 и 3Т3 фиксировали после обработки соответствующим цитотоксическим агентом в 4% параформальдегиде с последующей фиксацией в 1% растворе тетроксидом осмия, затем подвергали обычной обработке и добавляли в смесь Araldite–Epon (SPI, США) для получения твердых блоков. Полутонкие срезы получали из твердых блоков, окрашенных в Azur 2, и исследовали с помощью световой микроскопии, чтобы выбрать области для ультратонкого среза. Ультратонкие и полутонкие срезы, полученные с помощью ультрамикротомы UC7 (Leica, Германия), контрастировали с использованием уранилацетата и цитрата свинца (SPI, США) и исследовали с помощью электронного микроскопа JEM 1400 (Jeol, Япония). Изображения были получены с помощью цифровой камеры Veleta, установленной сбоку (EMS IS, Германия).

Биоинформатический анализ нуклеотидной и аминокислотной последовательностей гена *Parp1*. Выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей были проведены при помощи сервисов MAFFT и Clustal Omega, соответственно. Для анализа транскриптомных данных сырые риды были конвертированы в формат fastq утилитой fastq-dump и выравнены утилитой BWA со стандартными параметрами. Полученные данные были обработаны программой Samtools (Genome Research Limited, Англия) и визуализированы при помощи программного обеспечения IGV Browser (США). Подбор праймеров осуществлялся программой NCBI Blast. В таблице 1 представлены нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных для амплификации кДНК гена *Parp1* голого землекопа

Название праймера	Последовательность (5'-3')
Ensembl HGlAb PARP1 F1	atgaagcagagctctgcgcttgg
NCBI HGlAb PARP1 F1	atggccgaggcagcggac
HGlAb PARP1 F2	gactctggtctggaacactcagcac

HGlab PARP1 F3	ggcaccctgacgtggaggtg
HGlab PARP1 R1	ccacagggaggacttaaaattgaac
HGlab PARP1 R2	tgctaccaatctcagtccccacacg
HGlab PARP1 R3	gccttgccgccaactccatc

Получение плазмидного вектора для экспрессии рекомбинантного PARP1 голого землякопа. С использованием Aurum™ Total RNA Mini Kit (Biorad) была выделена тотальная РНК из клеток голого землякопа. Методом обратной транскрипции с использованием соответствующих праймеров для амплификации целевой последовательности, разработанных ранее, была наработана кДНК гена *Parp1* голого землякопа. Полученная кДНК была амплифицирована в ходе PCR, после чего продукт PCR отжигали с линейаризованным вектором pLATE31 и проводили электротрансформацию клеток *E.coli* XLBlue для наработки плазмидной ДНК. Последовательность амплифицированной плазмидной ДНК проанализировали методом секвенирования по Сэнгеру.

Получение рекомбинантных PARP1 голого землякопа и человека. Проведена экспрессия рекомбинантных PARP1 человека и голого землякопа с использованием векторов pET32A(hPARP1) и pLATE31 (hglPARP1) в клетках BL21(DE3) Gene X. Для выделения рекомбинантных белков PARP1 человека и голого землякопа была использована методика, включающая хроматографическую очистку на колонках: 1) Ni-NTA агароза, 5 мл; 2) гепарин-сефароза (GE Healthcare, США), 5 мл; 3) ss-ДНК-целлюлоза 10 мл (Bio-Rad Laboratories, США). Чистота полученного препарата была охарактеризована методом электрофореза в полиакриламидном геле. Полученные препараты хранили при -20°C в растворе, содержащем 20 mM трис pH 7.8, 50 mM NaCl, 50% глицерин и 7 mM β-меркаптоэтанол.

Определение термостабильности PARP1 голого землякопа и человека. Термостабильность PARP1 голого землякопа и человека оценивали методом дифференциальной сканирующей флуориметрии на амплификаторе Real-Time CFX96 Touch (Bio-Rad Laboratories, США). Для этого пробы, содержащие белок PARP1 и краситель SYPRO Orange (Lumiprobe, Россия), растворенные в 100 mM Na₂HPO₄, нагревали с 25 до 95,4°C со скоростью 1°C/мин. Детекцию флуоресцентного сигнала проводили в режиме FRET. Для анализа устойчивости PARP1 голого землякопа и человека к мочеvine проводили нагревание реакционных смесей, содержащих белок PARP1, краситель SYPRO Orange и различные концентрации мочеvine, с 25 до 95,4°C со скоростью 1°C/мин. Анализ

полученных данных проводили в программе Biorad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad Laboratories, США).

Получение рекомбинантных плазмид для определения активности NER ex vivo.

Из плазмиды pTagRFP-N с помощью эндонуклеаз рестрикции HindIII и BamHI (СибЭнзим, Россия) вырезали участок длиной 38 п.н. (622–660 п.н., MCS) путем инкубации 1 мкг плазмиды с 1 ед. HindIII и 1 ед. BamHI в буфере W в течение 1 ч при 37°C. После инактивации ферментов (70°C, 20 мин), линейаризованную плазмиду растворяли в воде и добавляли 40-кратный молярный избыток ДНК-вставки, 2 ед. T4-ДНК-лигазы (СибЭнзим, Россия) в SE-буфере, содержащем 1 мМ АТФ. Лигирование плазмиды проводили при температуре 4°C в течение 16 ч, затем реакцию смесь прогревали (65°C, 20 мин), а ДНК, содержащуюся в реакционной смеси после лигирования, разделяли в 0.8% агарозном геле. Кольцевую плазмиду с введенными вставками элюировали из агарозного геля с использованием набора для элюции ДНК (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя.

Трансфекция клеток и регистрация их флуоресценции. Трансфекцию клеток плазмидой проводили с помощью Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen, США) согласно протоколу производителя. Клетки рассаживали на 24-луночный планшет в количестве 2.5×10^4 клеток на лунку в 500 мкл культуральной среды без антибиотиков. По достижению 50–70% конфлюентности среду удаляли и добавляли к клеткам комплекс плазмиды (150 нг) с реагентом Lipofectamine™ 2000 в среде, не содержащей сыворотки. Флуоресценцию регистрировали с использованием системы для длительного прижизненного наблюдения за клетками Cell-IQ MLF (Chip-Man Technologies, Финляндия) в ЦКП клеточных технологий ФИЦ Института цитологии и генетики СО РАН. Съемку клеток проводили с интервалом 10 мин в режимах фазового контраста и флуоресценции с использованием $\times 10$ объектива Nikon CFI Plan Fluorescence DL. Полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ (НИН, США) и программного обеспечения Cell-IQ Analyser (Chip-Man Technologies, Финляндия).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Анализ устойчивости клеток голого землекопа к генотоксическому воздействию.

Ранее было показано, что репарация ДНК в клетках голого землекопа происходит с большей эффективностью по сравнению с клетками мыши [8]. Белки цельноклеточного экстракта голого землекопа, по сравнению с мышью, в 1,5-3 раза более эффективно распознавали и удаляли из ДНК повреждения, являющиеся субстратами систем эксцизионной репарации оснований (base excision repair, BER) и нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER), а также «мисматч» репарации (mismatch repair, MMR).

Работа систем репарации ДНК может существенно влиять на устойчивость клеток голого землекопа к повреждающим воздействиям. В этой связи большой интерес представляет изучение функционирования в его клетках механизмов клеточной смерти, которые взаимосвязаны с процессами репарации ДНК. Есть данные, что для фибробластов землекопа, по сравнению с мышью, характерны низкий уровень спонтанного апоптоза и другой тип регуляции клеточной гибели, отличный от существующего в клетках мыши и человека [9]. Анализ изменений метаболической активности фибробластов голого землекопа и мыши показал, что фибробласты голого землекопа более устойчивы к действию метилметансульфоната (MMS) и параквата по сравнению с фибробластами мыши, но в тоже время менее устойчивы к действию перекиси водорода и ротенона [10]. В целом, вопрос о том, почему клетки голого землекопа устойчивы к воздействию одних токсических факторов и менее устойчивы к воздействию других, малоизучен.

В рамках данного исследования проведено сравнительное изучение воздействия на фибробласты голого землекопа и мыши трех ДНК-повреждающих («проапоптотических») агентов с различными механизмами действия: MMS, 5-фторурацила (5-FU) и этопозида.

MMS представляет собой метилирующий агент, механизм действия которого на ДНК и РНК хорошо изучен [11]. Метилирование ДНК, вызванное воздействием MMS, может приводить к точечным мутациям. Кроме того, в активно делящихся клетках MMS вызывает нарушение репликации, блокируя продвижение репликационной вилки, что может привести к остановке клеточного цикла и апоптозу.

5-FU является модифицированным аналогом азотистого основания, который подвергается в клетке метаболическому превращению в фтордезоксифуридин монофосфат - ингибитор тимидилатсинтазы [12]. Другое эффект воздействия 5-FU связан с нарушением синтеза ДНК при репликации. Кроме того, фтордезоксифуридин монофосфат может

включаться в состав РНК в процессе транскрипции, что ведет к «РНК-стрессу» и апоптозу [13].

Этопозид - ингибитор топоизомеразы II. Этопозид связывается с топоизомеразой II и предотвращает ре-лигирование ДНК, что ведет к появлению большого числа одноцепочечных и двухцепочечных разрывов ДНК в делящихся клетках [14].

Устойчивость фибробластов голого землекопа мыши к цитотоксическому действию MMS, 5-FU и этопозиды оценивали по снижению метаболической активности клеток. Клетки голого землекопа (Hgl) и мыши (Mmu) обрабатывали с помощью MMS, 5-FU и этопозиды, варьируя время и концентрацию цитотоксических агентов (рис. 1).

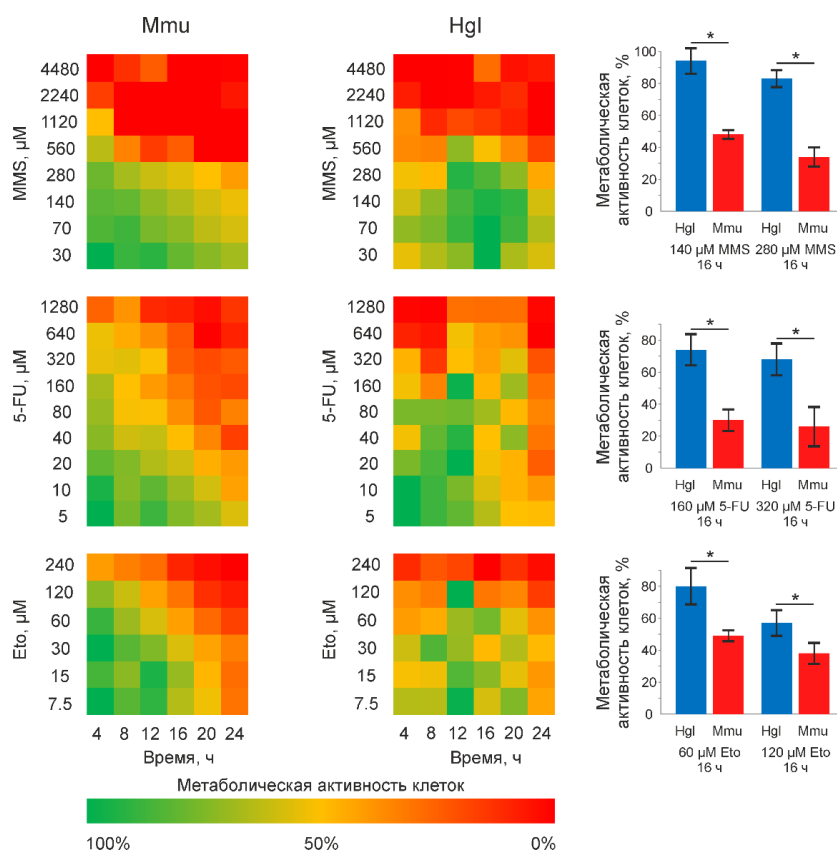


Рис. 1. Метаболическая активность фибробластов мыши (Mmu) и голого землекопа (Hgl) при обработке 5-FU, MMS и этопозиды (Eto). Метаболическая активность необработанных клеток была принята за 100% и соответствует зеленому цвету на графике. Изменение на графиках с зеленого цвета на красный цвет указывает на снижение метаболической активности. Справа приведено сравнение снижения метаболической активности клеток голого землекопа и мыши при обработке разными концентрациями MMS, 5-FU и этопозиды. Достоверность различий рассчитана на основе U-теста Манна-Уитни, *P < 0,05.

Выраженное снижение метаболической активности клеток голого землекопа наблюдалось лишь при более высоких концентрациях MMS, 5-FU и этопозиды по сравнению с клетками мыши. При одинаковых концентрациях MMS, 5-FU и этопозиды снижение метаболической активности клеток мыши происходило быстрее по сравнению с клетками голого землекопа. Таким образом, фибробласты мыши более чувствительны к потере метаболической активности, вызванной повреждением ДНК, по сравнению с фибробластами голого землекопа.

Различия в метаболической активности в ответ на повреждение ДНК позволили предположить, что динамика развития апоптоза различается в клетках голого землекопа и мыши. Было проведено сравнительное изучение активации эффекторных каспаз-3 и -7 в клетках голого землекопа и мыши путем измерения активности проапоптотических каспаз-3 и -7 спустя 4, 8, 12, 16, 20 и 24 ч после воздействия используемых реагентов. Для этого был использован пролюминесцентный субстрат, содержащий тетрапептид DEVD, который способен расщепляться каспазами-3 и -7 с образованием аминолоциферина субстрата люциферазы. По наблюдаемой интенсивности люминесценции можно оценить степень активности каспаз-3 и -7.

В соответствии с наблюдаемым менее выраженным снижением метаболической активности, активность каспаз-3 и -7 в фибробластах голого землекопа была низкой по сравнению с фибробластами мыши. Незначительная активность каспаз-3 и -7 обнаружена при обработке клеток голого землекопа MMS, в то время как почти никакого увеличения активности указанных каспаз не наблюдалось при обработке этопозидом и 5-FU (рис. 2).

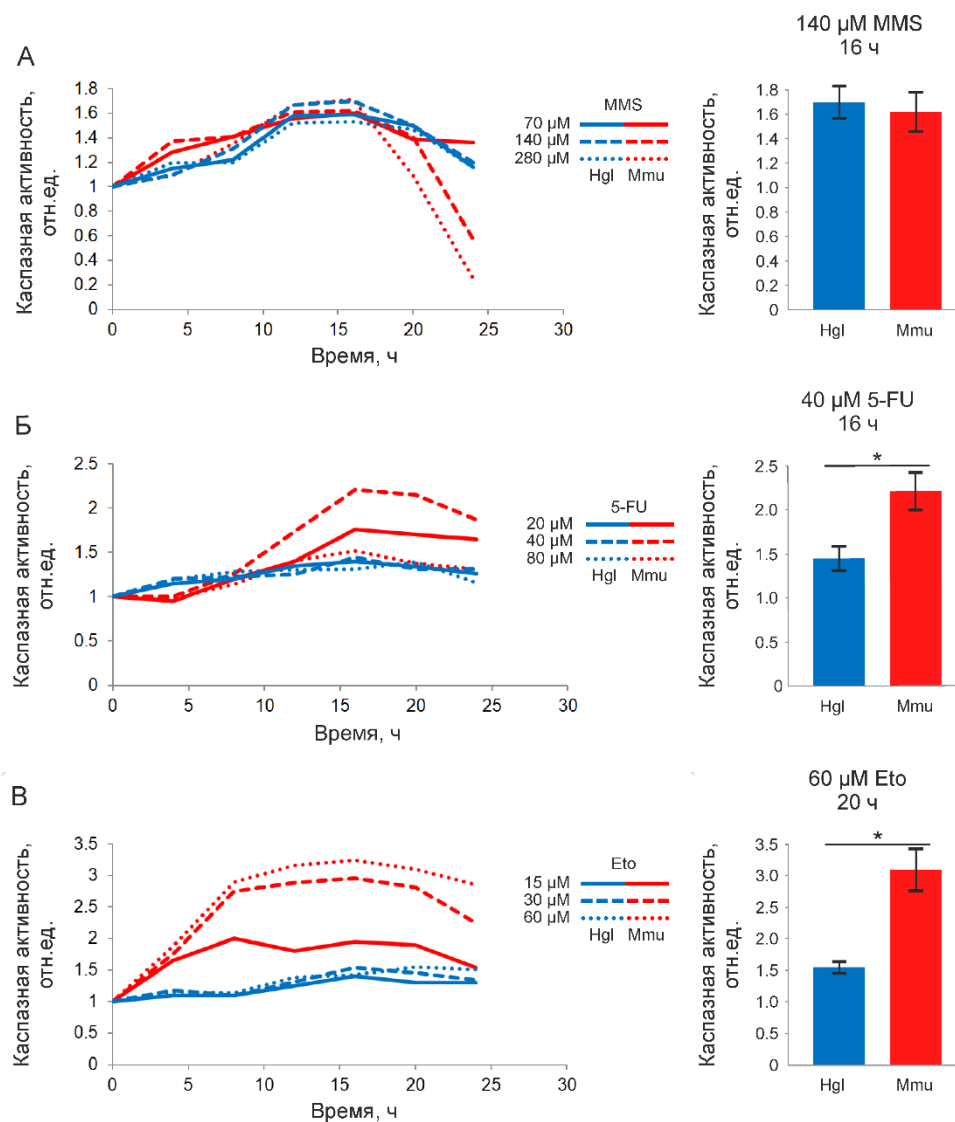


Рис. 2. Активность эффекторных каспаз-3/7 фибробластов мыши (красный цвет, Mmu) и голого землякопа (синий цвет, Hgl) при обработке ДНК-повреждающими агентами. А – обработка клеток MMS; Б - обработка 5-FU; В - обработка этопозидом (Eto). Активность эффекторных каспаз-3/7 в необработанных клетках принималась за одну относительную единицу. Справа приведены данные о каспазной активности фибробластов голого землякопа и мыши при обработке 140 мкМ MMS в течение 16 ч, 40 мкМ 5-FU в течение 20 ч и 60 мкМ Eto в течение 16 ч. Достоверность различий рассчитана на основе U-теста Манна-Уитни, *P < 0,05.

При обработке клеток голого землякопа 70 мкМ MMS увеличение активности эффекторных каспаз наблюдалось уже через 8 часов после обработки MMS, достигая максимума через 16 часов. Аналогичная зависимость наблюдалась при более высоких концентрациях MMS (рис. 2, А). Зависимость от времени была также обнаружена при обработке 5-FU и этопозидом, хотя активность каспаз-3 и -7 была довольно слабой в

выбранном диапазоне концентраций реагентов. Полученные результаты могут свидетельствовать о высокой устойчивости клеток голого землекопа к действию этопозида и 5-FU. Обнаруженное незначительное снижение метаболической активности клеток голого землекопа в сочетании с низкой активностью каспаз-3 и -7 предполагает существование различий в механизмах регуляции клеточной гибели в клетках землекопа и мыши.

Анализ популяций клеток, подвергшихся воздействию генотоксического стресса, проводили с пл проточная цитометрия с окрашиванием клеток FITC-аннексином V и йодидом пропидия. Диапазон концентраций цитотоксических агентов и время их воздействия выбирались в соответствии с данными, полученными путем оценки метаболической активности клеток и времени активации эффекторных каспаз-3 и -7. После обработки цитотоксическими агентами определяли относительное количество жизнеспособных (AnV-/PI-), ранних апоптотических (AnV+/PI-) и поздних апоптотических/некротических (AnV+/PI+) клеток. Предполагается, что популяция AnV+/PI+-клеток может включать также клетки, которые подвергаются регулируемому некрозу [15] в ответ на повреждение ДНК, вызванное воздействием высоких концентраций цитотоксических агентов [16].

Снижение процента жизнеспособных фибробластов мыши наблюдалось в присутствии 70 мкМ MMS, 15 мкМ этопозида и 5-FU в минимальной из использованных концентраций (10 мкМ). Дальнейшее повышение концентрации приводило к появлению большого количества некротических и поздних апоптотических клеток (рис. 3, Б-Г). Относительное количество жизнеспособных клеток голого землекопа уменьшалось при более высоких концентрациях реагентов по сравнению с клетками мыши (рис. 3, Д-Ж). Выраженные различия наблюдались при обработке 5-FU, где клетки голого землекопа оставались в значительной степени устойчивыми, а также при обработке MMS (70 и 140 мкМ) и этопозидом (15 и 30 мкМ).

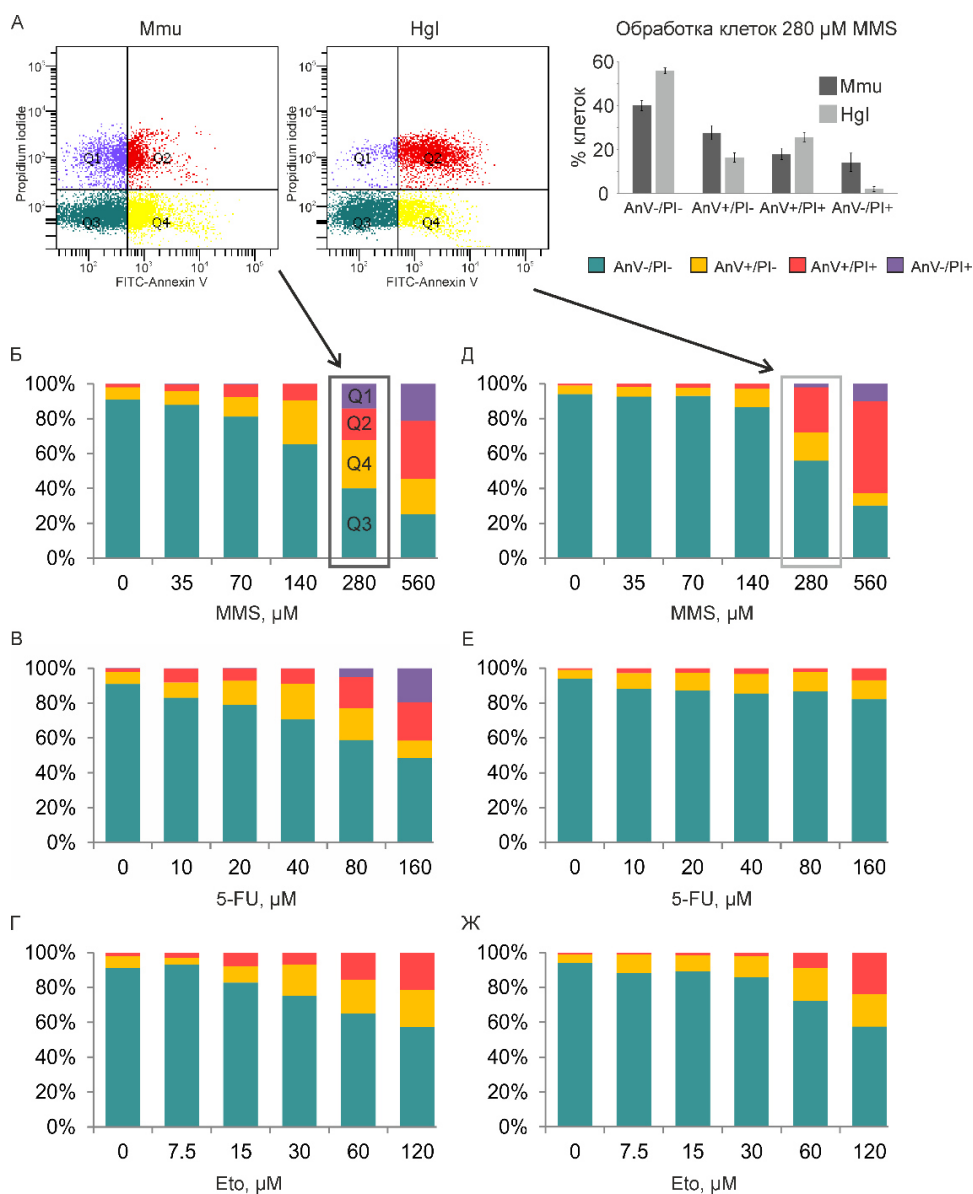


Рис. 3. Анализ фибробластов мыши (Mmu) и голого землекопа (Hgl) методом проточной цитометрии после обработки ДНК-повреждающими агентами. А - приведена расстановка «гейтов» для четырех наблюдаемых популяций клеток - AnV-/PI- (Q3), AnV+/PI- (Q4), AnV-/PI+ (Q1) и AnV+/PI+ (Q2). Клеточную гибель фибробластов мыши (Б-Г) и голого землекопа (Д-Ж) оценивали в широком спектре цитотоксических условий. Общее количество клеток принималось за 100%. Зеленым цветом обозначена популяция жизнеспособных клеток (AnV-/PI-), желтым - ранних апоптотических клеток (AnV+/PI-), красным - популяция поздних апоптотических клеток (AnV+/PI+) и фиолетовым цветом обозначена популяция некротических клеток (AnV-/PI+)

При обработке клеток голого землекопа более высокими концентрациями MMS и этопозида выявлена популяция ранних апоптотических клеток (AnV+/PI-) (рис. 3, Д-Ж, обозначена желтым цветом). Появление данной популяции указывает на процесс

апоптотической гибели клеток голого землекопа, несмотря на то что количественно данная популяция была намного меньше по сравнению с клетками мыши, обработанными той же концентрацией цитотоксических агентов. Воздействие высоких концентраций цитотоксических агентов также приводило к появлению популяции AnV+/PI+-клеток, которая может включать как поздние апоптотические, так и некроптотические клетки. Чтобы проверить, вызывают ли высокие концентрации цитотоксических агентов некроптотический тип клеточной гибели в клетках голого землекопа, мы использовали фармакологический ингибитор некроптоза (Nec-1) (рис. 4).

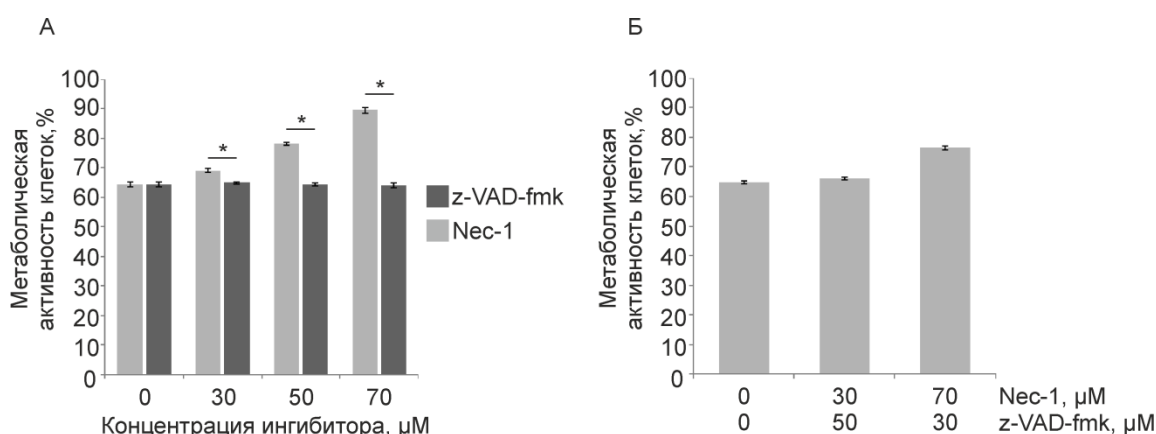


Рис. 4. Метаболическая активность фибробластов голого землекопа после обработки 280 мкМ MMS в присутствии Nec-1, либо z-VAD-fmk (А) и одновременная обработка 280 мкМ MMS в присутствии обоих ингибиторов (Б). Достоверность различий рассчитана на основе U-теста Манна-Уитни, *P < 0,05

В присутствии Nec-1, наблюдалось незначительное снижение метаболической активности, несмотря на воздействие высокой дозой (280 мкМ) MMS. По всей видимости, воздействие высоких доз MMS и этопозида может инициировать не только апоптотический, но и, вероятно, некроптотический типы клеточной гибели в клетках голого землекопа. Тем не менее, для подтверждения этой теории требуются дополнительные исследования.

В процессе клеточной гибели клетки обретают специфическую морфологию, которая является ключевым признаком, указывающим на конкретный тип клеточной гибели. С использованием электронной микроскопии (ЭМ) мы провели анализ морфологии клеток голого землекопа и мыши, обработанных цитотоксическими агентами, чтобы подтвердить наличие различных морфологических признаков клеточной гибели. В ультраструктуре клеток голого землекопа и мыши в контрольных образцах (рис. 5, А и В соответственно) не было обнаружено признаков разрушения.

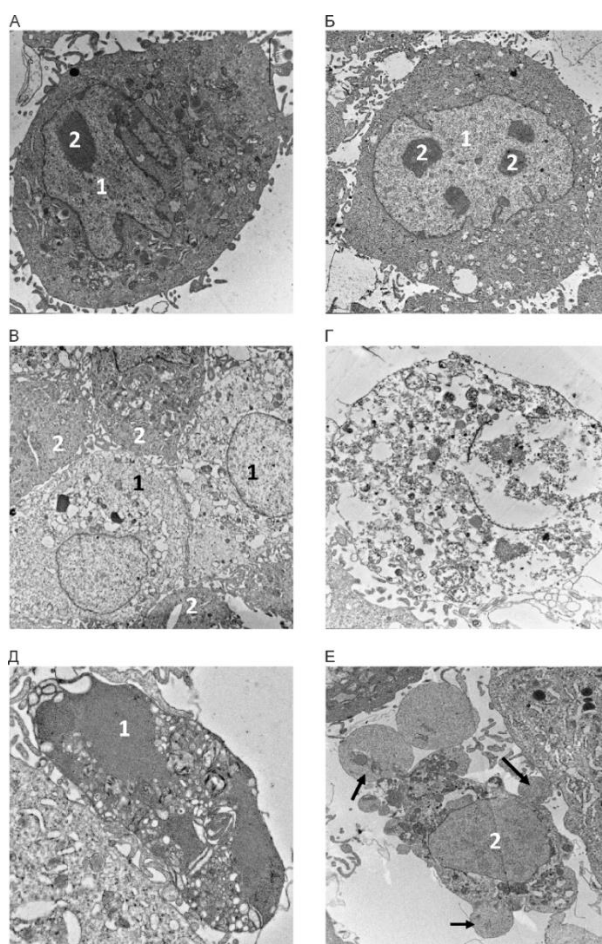


Рис. 5. Электронно-микроскопический анализ фибробластов мышцы и голого землякопа после обработки MMS. А и Б – необработанные фибробласты мышцы и голого землякопа соответственно (1 – ядро, 2 – ядрышко). В - набухающие клетки голого землякопа (1) с цитоплазмой низкой электронной плотности и клетки без признаков изменений (2). Г - клетка мышцы в состоянии некроза (органеллы полностью разрушены). Д – апоптоз клетки голого землякопа. Показано ядро клетки голого землякопа с характерным конденсированным хроматином (1); Е - обширный «апоптотический блеббинг» мышечной клетки («апоптотические тельца» показаны стрелками), 2 - ядро без конденсации хроматина, но с измененной морфологией.

Цитоплазма со средней электронной плотностью содержала хорошо развитый эндоплазматический ретикулум и другие органеллы. Ядра обоих типов клеток содержали несколько ядрышек. Контрольные образцы в обоих случаях содержали очень мало некротических клеток (0-1 на 100 клеток).

Инкубация клеток голого землякопа и мышцы с 280 мкМ MMS в течение 16 ч привела к появлению большого количества «набухающих» клеток в обоих случаях, что может быть характерным признаком начальной стадии некроза (рис. 5, В). Тем не менее, плазмалемма

этих клеток еще сохраняла свою целостность, что более характерно для позднего апоптоза. Кроме того, наблюдалось некоторое количество некротических клеток с разрушенной плазмалеммой, ядром и другими органеллами (рис. 5, Г). Ультраструктура некротических клеток не отличалась в клетках голого землекопа и мыши. Таким образом, воздействие 280 мкМ MMS приводило к индукции обоих типов клеточной гибели: апоптоза и некроза.

Исследуя ультратонкие срезы клеток после 16 часов обработки, мы наблюдали клетки на разных стадиях апоптоза, что объясняет их различия, в частности, в морфологии ядра и наличии «апоптотического блеббинга» (рис. 5, Д, Е). Это согласуется с данными, полученными с помощью проточной цитофлуориметрии при обработке клеток 280 мкМ MMS.

При обработке мышечных клеток 160 мкМ 5-FU в течение 16 ч обнаружено много разрушенных клеток с морфологическими признаками некроза (3-4,5 на 100 клеток), в то время как некротические клетки на ультратонких срезах клеток голого землекопа были редкими (0,5-1 на 100 клеток). Клетки с признаками апоптоза (рис. 6, А, В) были относительно редки в обоих случаях, что соответствует данным, полученным с использованием проточной цитофлуориметрии. Более того, эти данные хорошо согласуются с предположением о том, что при высоких концентрациях агентов, повреждающих ДНК, клетки могут подвергаться некроптозу, который наблюдался в этих экспериментах.

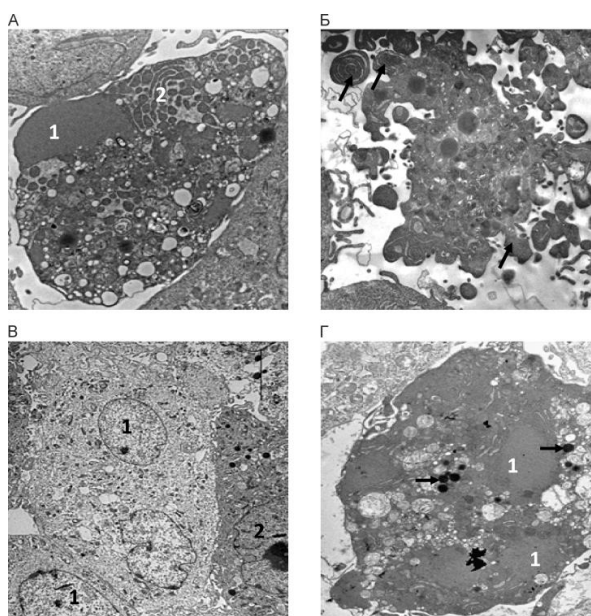


Рис. 5. Электронно-микроскопический анализ фибробластов мыши и голого землекопа после обработки 5-FU и этопозидом. Показаны особенности апоптоза клеток голого землекопа (А) и мыши (Б), инкубированных со 160 мкМ 5FU. В клетке голого

землекопа присутствуют фрагменты ядра с конденсированным хроматином (1); цифрой 2 обозначена область эндоплазматического ретикула. Б – участок периферии мышинной клетки с обширным «апоптотическим блеббингом» («апоптотические тельца» показаны стрелками). В и Г – фибробласты голого землекопа, обработанные Eto. В – набухающая клетка (1) с цитоплазмой низкой электронной плотности и клетка без признаков изменений (2). Г - апоптотическая клетка с сильно конденсированным ядром (1) и цитоплазмой. Органеллы не видны; стрелки показывают липидные капли.

Чтобы детектировать начальные этапы клеточной гибели в клетках голого землекопа и мышцы при воздействии этопозидом, была использована его более низкая концентрация. При обработке клеток этопозидом (60 мкМ) в течение 16 ч в обоих случаях на ультратонких срезах не наблюдались видимые признаки разрушения, однако в некоторых клетках голого землекопа наблюдалось характерное «набухание». Цитоплазма и ядро имели меньшую электронную плотность, чем необработанные клетки (рис. 6, В). Некротические клетки были немногочисленны в обоих случаях (0,8-1,0 на 100 клеток). Также немногочисленными были и апоптотические клетки (рис. 6, Г), что согласуется с данными о низком количестве гибнущих клеток при такой концентрации этопозидом.

Таким образом, электронно-микроскопическое исследование ультратонких срезов клеток голого землекопа и мышцы, инкубированных с MMS, 5-FU и этопозидом, выявило морфологические признаки апоптоза и некроза в образцах клеток, что в совокупности согласуется с данными, полученными с использованием проточной цитофлюориметрии.

Одна из предполагаемых причин разной реакции клеток голого землекопа на генотоксическое воздействие по сравнению с клетками мышцы, заключается в более высоком пороге «перехода» клеток голого землекопа в процесс клеточной гибели, инициированный в ответ на повреждение ДНК. Действительно, как было сказано ранее, клетки голого землекопа обладают более эффективно работающими системами репарации ДНК по сравнению с клетками мышцы [8]. Индуцируемые воздействием MMS, 5-FU и этопозидом повреждения ДНК являются субстратами таких систем репарации, как BER, MMR, а также гомологичной рекомбинации (HR). Высокоэффективная репарация ДНК в клетках голого землекопа позволяет устранить повреждения ДНК прежде, чем будет инициирована клеточная гибель, таким образом, обеспечивая устойчивость клеток голого землекопа к генотоксическому воздействию.

Другой причиной могут быть различия в молекулярных механизмах апоптоза и некроза в клетках голого землекопа и мышцы, что подразумевает потенциальный дисбаланс апоптотической сети в клетках голого землекопа. Ранее показано, что долгоживущие

организмы имеют относительно низкие уровни экспрессии проапоптотических генов [17]. В целом, комплексы, инициирующие гибель клеток, и их ингибиторы практически не изучены по отношению к клеткам голого землекопа и должны быть исследованы в будущем.

2. Сравнительный биоинформатический анализ нуклеотидной последовательности гена *Parp1* и аминокислотной последовательности PARP1 голого землекопа, человека и мыши

Центральным регулятором ряда ключевых клеточных процессов, в том числе репарации ДНК, клеточной гибели и старения, является поли(АДФ-рибоза)полимераза 1 (PARP1) [18-21]. При участии NAD⁺, PARP1 катализирует поли(АДФ-рибозил)ирование многих клеточных белков, а также осуществляет аутомодификацию, обеспечивая регуляции собственной активности [22].

Данный белок высоко консервативен у позвоночных [23]. В его составе выделяют N-концевой домен, ДНК-связывающие домены, представленные доменами типа «цинковых пальцев», BRCT-домен, WGR-консервативный домен, хеликазный домен HD, каталитический домен ART и C-концевой домен, ответственный за связывание NAD⁺.

Поскольку PARP1 регулирует процессы репарации ДНК, особенности функционирования которых, как было указано ранее, могут определять продолжительность жизни и устойчивость клеток млекопитающих к старению и генотоксическому стрессу, данный белок рассматривается исследователями как одна из основных детерминант высокой продолжительности жизни долгоживущих организмов.

Недавно было проведено сравнение активности PARP1 в цельноклеточных экстрактах белков человека (HEK 293), мыши (3T3) и голого землекопа (NSF8) в реакции синтеза поли(АДФ)рибозы (PAR) [24]. Высокий уровень продукции PAR продемонстрировал PARP1 человека, в то время как у долгоживущего голого землекопа уровень продукции PAR был в 3 раза выше, чем у мыши. Фотоаффинная модификация белков экстрактов клеток исследуемых животных с использованием фотоактивных ДНК, содержащих интермедиаты процесса BER, показала, что белки репарации голого землекопа и мыши, в том числе PARP1, демонстрируют более низкую эффективность взаимодействия с модельными ДНК в сравнении с человеком [24]. Это может быть связано как с более низким содержанием данных белков в экстрактах голого землекопа и мыши, так и с особенностями структурной организации PARP1 в клетках голого землекопа и мыши.

Несмотря на то, что изучению роли и механизма функционирования PARP1 в работе различных систем репарации было посвящено много исследований [25-29], вопрос об

особенностях функционирования и структурной организации PARP1 в клетках различных долгоживущих организмов, тем не менее, изучен недостаточно.

Одной из основных задач данного исследования была характеристика белка PARP1 голого землекопа. Для этого предполагалось провести сравнительный биоинформатический анализ нуклеотидной последовательности гена *Parp1* и аминокислотной последовательности PARP1 голого землекопа, человека и мыши. На основе полученных результатов планировалось синтезировать вектор, содержащий кДНК гена *Parp1* голого землекопа и провести с его помощью экспрессию белка PARP1 голого землекопа в клетках *E. coli*.

Нами проведен поиск последовательности кДНК гена *Parp1* голого землекопа в базах данных Ensembl, NCBI и The Naked Mole-Rat Genome Resource (NMRGR). Были обнаружены три различных варианта последовательностей кДНК гена *Parp1* голого землекопа, представленные на рисунке 6.



Рис. 6. Выравнивание 1 и 2 экзонов CDS PARP1 из баз данных NCBI, Ensembl и NMRGR. Показан участок, содержащий экзон 1 и фрагмент экзона 2, а также отдельно вынесен участок экзона 13, содержащий несинонимичную замену

Для того чтобы определить, какая из последовательностей соответствует экспрессирующемуся в клетках голого землекопа транскрипту *Parp1*, проведено выравнивание транскриптомных данных, полученных из различных органов голого землекопа (мозг: SRS899007; тестикулы: SRR1959204; печень: ERS1090459) на три

альтернативные матрицы гена *Parp1*. Анализ выравниваний показал, что варианты последовательности Ensembl и NMRGR не соответствуют транскриптомным данным (покрытия ридами 1-го экзона не обнаружено), в то время как все участки последовательности из базы данных NCBI, включая первый экзон, демонстрируют высокий уровень покрытия. Таким образом, экспрессируемый вариант *Parp1* голого землекопа соответствует последовательности из базы данных NCBI.

Используя инструмент NCBI Primer Blast, выполнен дизайн праймеров для амплификации различных фрагментов кДНК *Parp1* (см. Таблица 1, раздел Материалы и методы). Полноразмерный транскрипт из образцов кДНК, полученных из клеток голого землекопа, амплифицировать не удалось, однако были успешно амплифицированы перекрывающиеся фрагменты кДНК, содержащие экзоны 1-2, 1-12 и 11-22.

Также проведен дизайн праймера, комплементарного участку экзона 1 гена *Parp1* по версии последовательностей баз данных Ensembl и NMRGR. С использованием этого праймера амплифицирован фрагмент, содержащий экзоны 1 и 2. Данный фрагмент был клонирован и отсеквенирован (рис. 7). В результате показано, что нуклеотидная последовательность соответствует предсказаниям базы данных Ensembl, поскольку делеция, выявленная в последовательности базы данных NMRGR, не обнаружена. Полученные данные позволяют предположить, что в геноме голого землекопа присутствуют два варианта *Parp1*, один из которых, исходя из данных РНК-секвенирования, экспрессируется на существенно более низком уровне, чем другой.



Рис. 7. Секвенограмма фрагмента гена *Parp1*, амплифицированного с праймерами NCBI HGlAb PARP1 F1 (специфически амплифицирует вариант первого экзона *Parp1* из базы данных Ensembl и NMRGR) и HGlAb PARP1 R3 (комплементарен последовательности второго экзона гена *Parp1*, одинаковый для всех баз данных).

Далее был проведен сравнительный анализ аминокислотных последовательностей белка PARP1 голого землекопа, соответствующих трем описанным выше вариантам кДНК,

с аминокислотными последовательностями белка PARP1 десяти видов млекопитающих, включая трех грызунов (*M. musculus*, *R. norvegicus*, *N. galili*), а также широкой филогенетической группы из шести млекопитающих (*H. sapiens*, *Equus caballus*, *D. novemcinctus*, *L. africana*, *M. domestica*, *O. anatinus*), содержащей сумчатых и однопроходных. Время дивергенции голого землекопа и вышеперечисленных видов варьирует от ~40 до ~100 млн лет.

Результаты множественного выравнивания полученных аминокислотных последовательностей демонстрируют высокую консервативность белка PARP1. При этом вариант аминокислотной последовательности, полученный на основе последовательности кДНК из базы NCBI совпадает с последовательностями других млекопитающих, в то время как последовательности из баз данных Ensembl и NMRGR существенно отличаются от них. Этот факт дополнительно подтверждает гипотезу о том, что последовательность базы данных NCBI соответствует гену *Parp1* голого землекопа.

Ген *Parp1* голого землекопа сохраняет все функциональные домены, выявленные у других млекопитающих: Zn-finger-, PARPD1-, BRCT-, WGR- и a-Helix-домены, а также каталитический домен. Большая часть аминокислот является консервативными и сохраняется неизменной на протяжении сотни миллионов лет. В то же время, было выявлено 13 аминокислот, консервативных у всех проанализированных видов млекопитающих и изменившихся исключительно у голого землекопа (таблица 2). Было предположено, что найденные замены могут влиять как на активность белка PARP1 голого землекопа, так и на его устойчивость к повреждающим воздействиям.

Таблица 2. Замены эволюционно-консервативных аминокислот в белке PARP1 голого землекопа. * - различие в версиях кДНК баз данных Ensembl и NMRGR с базой данных NCBI.

Наименование и позиция аминокислоты в последовательности PARP1 человека	Соответствующая аминокислотная замена в PARP1 голого землекопа	Домен, в котором выявлена замена
K119	R	Zn-finger
K305	R	PADR1
T397	L	BRCT
S427	G	BRCT
G461	H	BRCT

S467	A	BRCT
V595	T	WGR
E620	D	WGR
K664	A/T*	α -спираль
K703	T	α -спираль
S711	A	α -спираль
K798	R	Каталитический
E840	A	Каталитический

Полученная на данном этапе работы кДНК была амплифицирована в ходе ПЦР, после чего продукт ПЦР отжигали с линейризованным вектором pLATE31 и проводили электротрансформацию клеток E.coli XLBlue для наработки плазмидной ДНК. Последовательность амплифицированной плазмидной ДНК проанализировали методом секвенирования по Сэнгеру. Для изучения свойств рекомбинантных PARP1 человека и голого землекопа была проведена экспрессия белков в клетках BL21(DE3) Gene X с использованием векторов pET32A(hPARP1) и pLATE31 (hglPARP1). Очистку белков проводили хроматографически.

Дифференциальная сканирующая флуориметрия широко применяется не только для оценки термостабильности белков, но и для изучения влияния различных факторов (рН, концентрация солей, присутствие химически активных агентов) на конформационное состояние белка [30]. Нами был проведен сравнительный анализ термостабильности рекомбинантных белков PARP1 голого землекопа и человека (рис. 9).

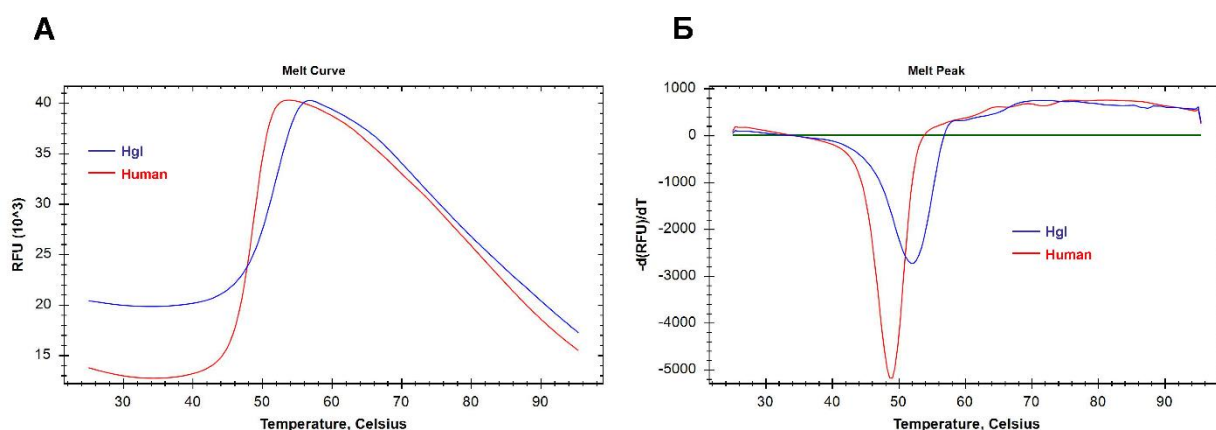


Рис. 9. Анализ термостабильности PARP1 голого землекопа (фиолетовый цвет, Hgl) и человека (красный цвет, Human). Представлены профили термической денатурации белков (А) и производные величины флуоресценции от температуры (Б)

Показано, что PARP1 голого землекопа более термостабилен, чем PARP1 человека. Величина температуры плавления PARP1 голого землекопа и человека составила $52,0 \pm 0,4^\circ\text{C}$ и $48,7 \pm 0,2^\circ\text{C}$ соответственно. Был также проведен сравнительный анализ термостабильности двух белков в присутствии денатурирующего агента – мочевины (рис. 10, 11).

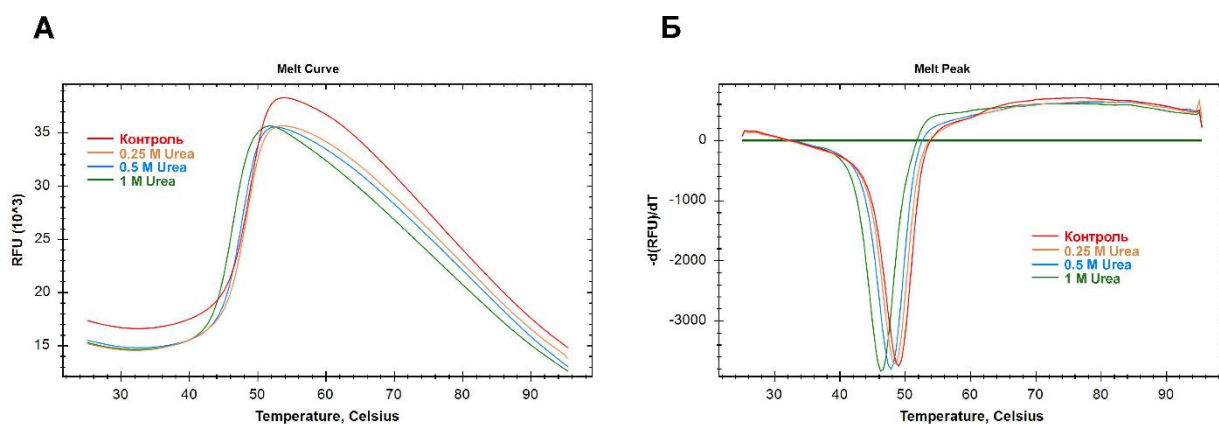


Рис. 10. Анализ термостабильности PARP1 человека при выдерживании белка с различными концентрациями мочевины (указаны разными цветами). Представлены профили термической денатурации белка (А) и производные величины флуоресценции от температуры (Б).

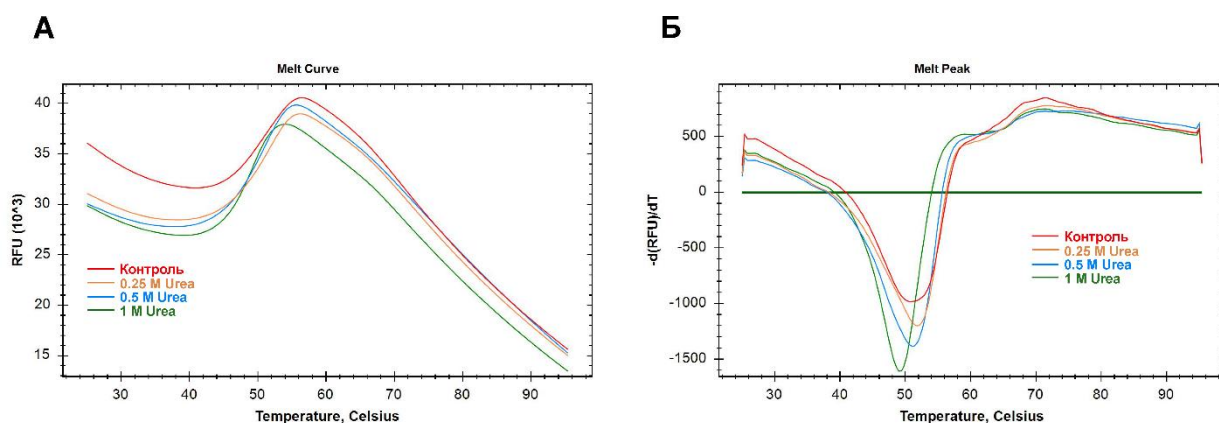


Рис. 11. Анализ термостабильности PARP1 голого землекопа при выдерживании белка с различными концентрациями мочевины (указаны разными цветами). Профили термической денатурации белков (А) и производные величины флуоресценции от температуры (Б)

Наблюдаемое снижение температуры плавления PARP1 человека, вызванное денатурирующим воздействием 1 М мочевины, составило $2,8^\circ\text{C}$, в то время как температура плавления PARP1 голого землекопа снижалась лишь на $1,9 \pm 0,3^\circ\text{C}$ (рис. 12). При

воздействии меньших концентраций мочевины, разница в снижении температуры плавления PARP1 в обоих случаях была менее выраженной.

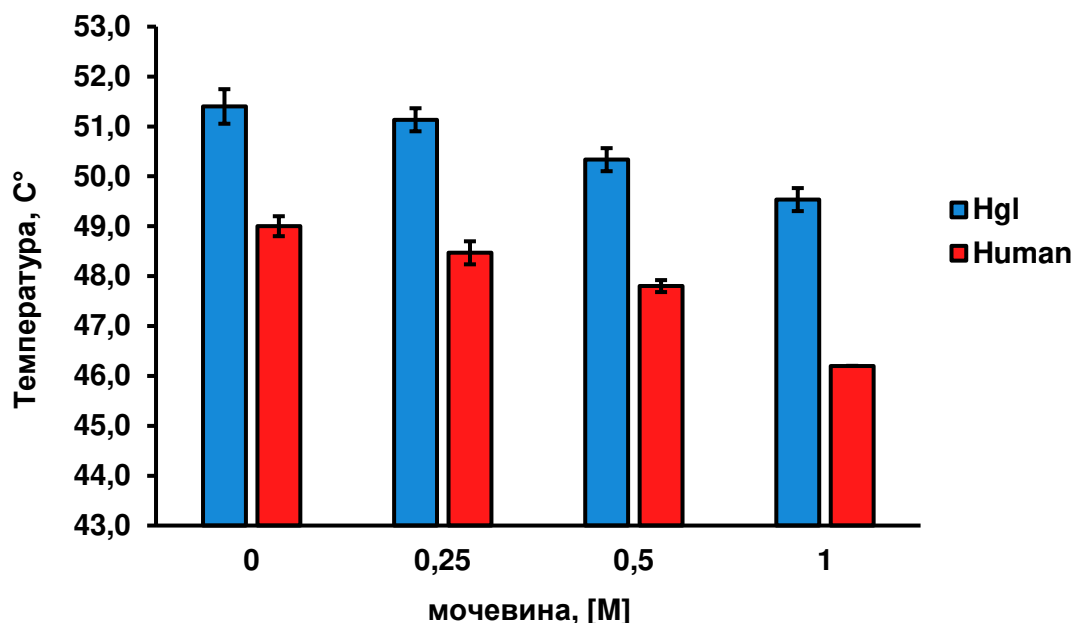


Рис. 12. Величины температуры плавления PARP1 голого землекопа (синий цвет, Hgl) и человека (красный цвет, Human) в зависимости от концентрации мочевины

Таким образом, PARP1 голого землекопа оказался более устойчив к воздействию 1 М мочевины, чем PARP1 человека. Данных о других белках репарации в литературе нет, известно, однако, что фермент глицеральдегидфосфатдегидрогеназа (GAPDH) голого землекопа сохраняет 60% активности в присутствии 1 М мочевины, в отличие от 10% у GAPDH мыши [31]. Таким образом, белки голого землекопа, участвующие в различных процессах, проявляют большую устойчивость к денатурирующему воздействию мочевины. По данным биоинформатического анализа, в аминокислотной последовательности PARP1 голого землекопа выявлены 13 аминокислотных замен по сравнению с PARP1 человека и мыши. Значительная часть аминокислотных замен, выявленных в PARP1 голого землекопа (10 аминокислот), обнаруживается в структурно-регуляторных доменах, таких как BRCT (T397L, S427G, G461H, S467A), PARPD1 (K305R), WGR (V595T, E620D) и α -спиральный домен (K664A, K703T, S711A). Большинство этих замен представлено аминокислотами с гидрофобными боковыми радикалами – лейцин (L), глицин (G), гистидин (H), аланин (A), что обеспечивает дополнительную стабильность гидрофобного кора белка. Поскольку PARP1 голого землекопа оказался более термостабилен и устойчив к действию мочевины, чем PARP1 человека, можно предположить, что это обусловлено большей устойчивостью его гидрофобного кора к денатурирующим воздействиям.

3. Разработка метода определения активности эксцизионной репарации нуклеотидов *ex vivo*

Эксцизионная репарация нуклеотидов (NER) обеспечивает эффективное удаление из ДНК объемных повреждений, возникающих при воздействии химически активных соединений, УФ- и рентгеновского излучения. Существуют два типа NER. Общегеномная NER осуществляет поиск и удаление объемных повреждений во всем геноме, при любом его функциональном состоянии, используя для первичного распознавания поврежденного участка ДНК комплексы фактора ХРС [32]. NER, связанная с транскрипцией, активируется при блокировании продвижения транскрипционного комплекса РНК-полимеразы II объемным повреждением в транскрибируемой цепи ДНК [33]. Около 30 ферментов и факторов, одинаковых для обоих типов NER, формируют затем на ДНК последовательные комплексы, обеспечивающие удаление повреждения и восстановление нативной структуры ДНК.

Для определения активности NER в настоящее время применяются различные подходы как *in vitro*, так и *ex vivo* [32, 34]. Активность эукариотической системы NER *in vitro* в большинстве работ оценивают с использованием протяженных ДНК, содержащих в заданной позиции природные объемные повреждения, либо их синтетические аналоги, а также фракционированные экстракты клеток, содержащие набор белков NER (NER-компетентные экстракты) [35, 36]. Для определения активности NER *ex vivo* используют подходы, основанные на реактивации экспрессии гена репортерного белка в клетках хозяина (host cell reactivation, HCR). В этом случае, в качестве субстрата используют модельные плазмиды с объемным повреждением, которое блокирует экспрессию гена репортерного белка в исследуемых клетках. Подходы, основанные на реактивации экспрессии флуоресцентных белков после удаления повреждения из ДНК, блокирующего их экспрессию, ранее успешно применяли в исследованиях NER [37, 38]. Несмотря на свои преимущества, существующие подходы имеют ряд недостатков, связанных со способом регистрации восстановления экспрессии. Так в этих исследованиях регистрацию восстановления экспрессии гена флуоресцентного белка EGFP в клетках человека осуществляли с помощью проточной цитометрии, что подразумевает предварительное снятие клеток для анализа с помощью трипсина [37, 38]. Подобные воздействия на клетки могут значительно повлиять на итоговый результат. В целом, данный метод является технически сложным и непременно ведет к возникновению ошибок на разных этапах его выполнения. Таким образом, разработка более совершенных подходов, нацеленных на

исследование и сравнение эффективности протекания репарации объемных повреждений в живых клетках (*ex vivo*) остается актуальной.

В данной работе нами разработан метод, основанный на использовании модельных плазмид с объемным повреждением вблизи промоторной области гена, кодирующего флуоресцентный белок TagRFP. Схема создания модельных плазмид с объемным повреждением и оценки эффективности NER *ex vivo* путем наблюдения за результатом восстановления репаративным аппаратом эукариотических клеток экспрессии репортерного флуоресцентного белка, нарушенной присутствием объемного повреждения в ДНК, представлена на рисунке 13.

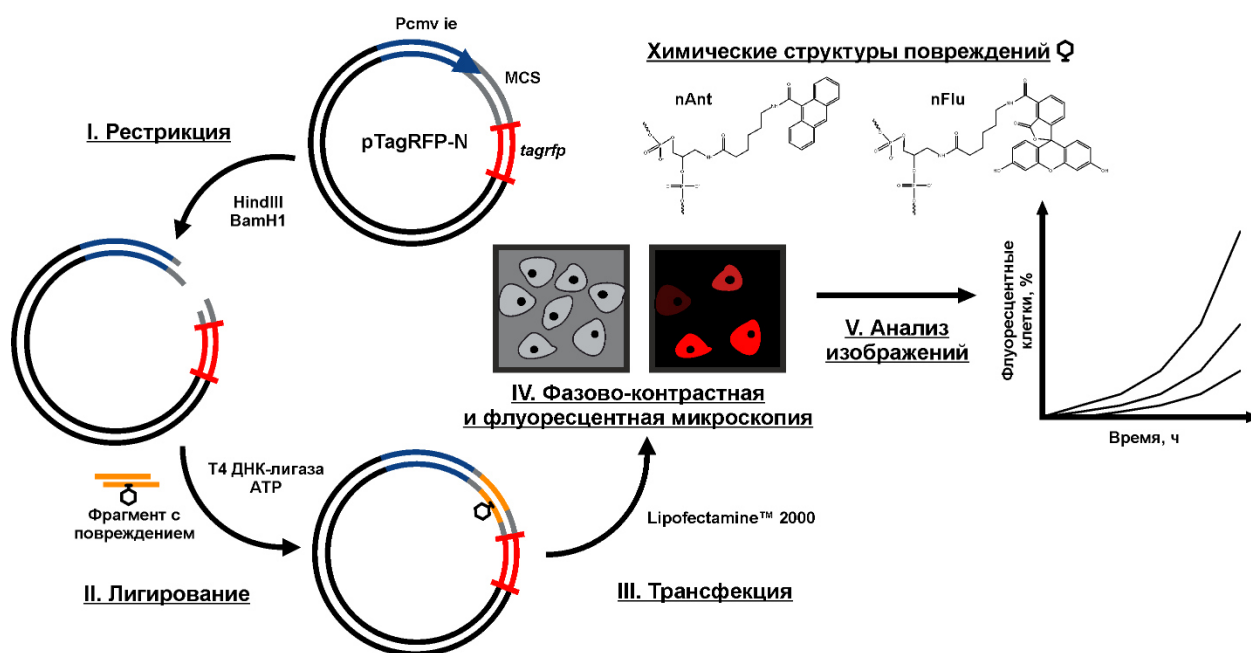


Рис. 13. Схема метода оценки эффективности работы системы NER *ex vivo*

Регистрацию флуоресцентного сигнала в живых клетках осуществляли с помощью оборудования для прижизненных исследований Cell-IQ MLF, представляющее собой микроскоп с фазово-контрастным и флуоресцентным режимами съемки и встроенную систему для подачи CO₂ и поддержания температуры культивирования, что позволяет проводить длительную съемку клеток в оптимальных для клеток условиях. Анализ полученных изображений проводили с помощью прилагаемого к оборудованию программного обеспечения.

Для создания ДНК с объемными повреждениями использовали вектор pTagRFP-N (4.7 т.п.н.), который содержит ген *tagrfp*, кодирующий мономерный флуоресцентный белок RFP. Ген *tagrfp* находится под контролем раннего промотора цитомегаловируса (Pcmv ie), вблизи которого находится сайт множественного клонирования (MCS) с участками

узнавания различных эндонуклеаз рестрикции, что дает возможность клонирования необходимой ДНК-вставки в данную область.

Синтезированы рекомбинантные плазмиды, содержащие объемные повреждения nFlu и nAnt (далее nFlu- и nAnt-ДНК соответственно). Выявленные субстратные свойства данных повреждений, выявленные в реакции специфической эксцизии, катализируемой белками NER различных клеточных экстрактов *in vitro* [36, 39], учитывали при использовании nFlu и nAnt для создания модельных плазмид.

Проанализирована эффективность репарации nFlu- и nAnt-ДНК в клетках эмбриональной почки человека НЕК 293Т. В качестве контроля использовали плазмиду, содержащую ДНК-вставку без объемного повреждения. Оценивали время появления клеток, флуоресценция которых свидетельствовала о восстановлении экспрессии белка TagRFP (рис. 14).

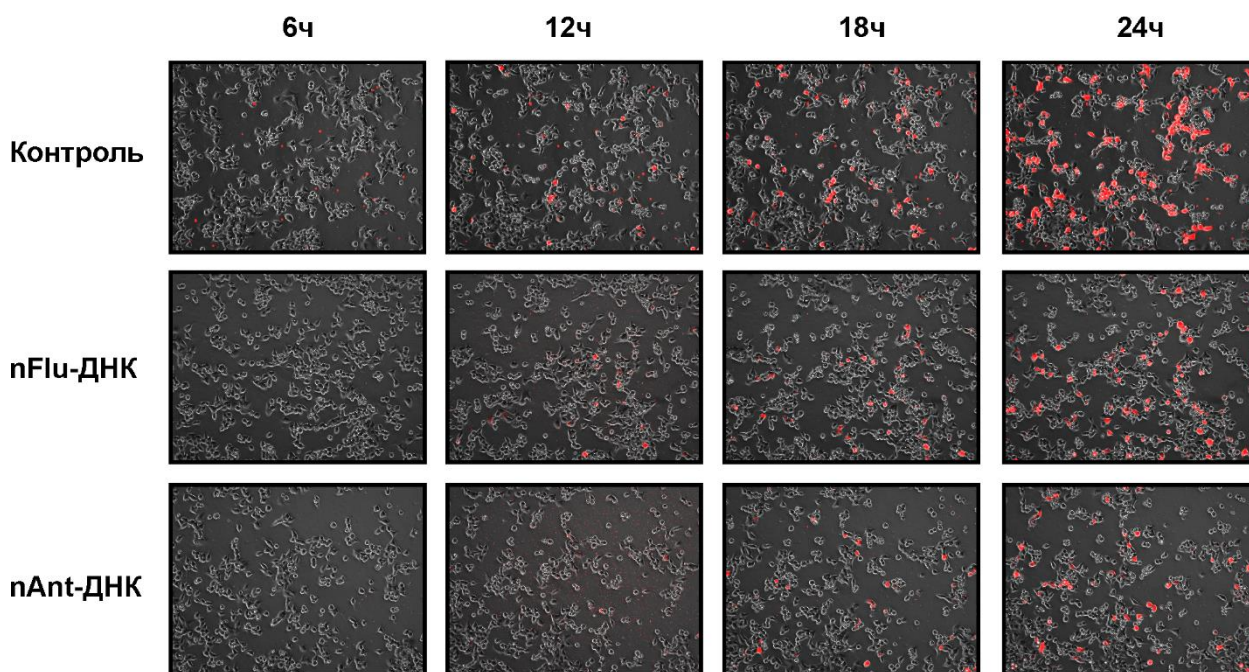


Рис. 14. Экспрессия TagRFP в клетках НЕК 293Т, трансфицированных плазмидными ДНК. Представленные изображения получены путем наложения флуоресцентных и фазово-контрастных снимков с помощью ImageJ. Слева указаны типы плазмидных ДНК-субстратов; сверху – время после трансфекции клеток

В случае клеток, для трансфекции которых использовали nAnt-ДНК, это время составило 10 ч, в то время как в случае nFlu-ДНК появление первых флуоресцентных клеток можно было наблюдать уже спустя 8 ч после трансфекции (рис. 15, А).

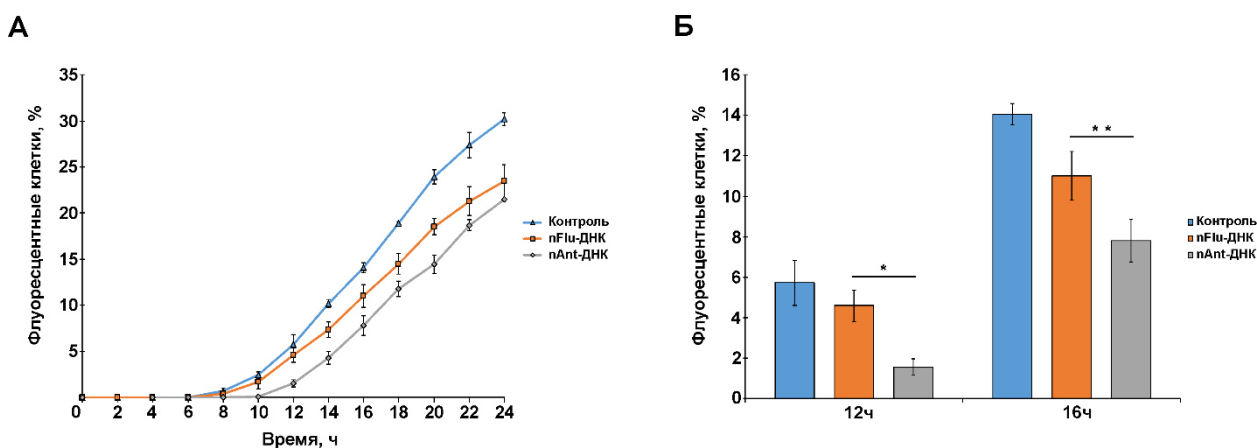


Рис. 15. Анализ эффективности NER плазмидных ДНК *ex vivo* в клетках HEK 293Т

А – график изменения количества флуоресцентных клеток (%) во времени после трансфекции плазмидными ДНК; Б – репрезентативная диаграмма, демонстрирующая различия в количестве флуоресцентных клеток, трансфицированных nFlu- или nAnt-ДНК, через 12 и 16 часов после трансфекции. Статистические уровни значимости соответствуют * $p < 0.01$ и ** $p < 0.05$

Зависимость количества флуоресцентных клеток в общей популяции клеток от времени после трансфекции, представлена на рисунке 15. С помощью Cell-IQ Analyser и ImageJ выявлены различия в эффективности репарации nAnt- и nFlu-ДНК. Через 12 ч после трансфекции клеток nAnt-ДНК количество флуоресцентных клеток составило $1.56 \pm 0.39\%$, в то время как в случае nFlu-ДНК количество таких клеток составляло $4.59 \pm 0.76\%$. Для достижения близкого количества флуоресцентных клеток, трансфицированных nAnt-ДНК, потребовалось еще 2 ч, через 14 ч оно составило $4.27 \pm 0.67\%$.

Репарация nFlu-ДНК проходит быстрее, чем nAnt-ДНК, что согласуется с результатами изучения репарации nAnt- и nFlu-содержащих ДНК-дуплексов *in vitro* в присутствии белков NER-компетентных экстрактов различных линий раковых клеток (HeLa, SiHa, C33A) [36].

Существует много факторов, определяющих разницу в эффективности удаления объемных повреждений системой NER. Это могут быть структурные различия повреждений, определяющие характер первичного узнавания поврежденного участка и эффективность последующей верификации повреждения белками комплекса TFIIH [40], а также скорость и эффективность ответа системы NER различных клеток на повреждающее воздействие. Дальнейшее изучение NER с использованием комбинации методов *in vitro* и *ex vivo* может способствовать значительному прогрессу в понимании функционирования данного процесса в клетках эукариот.

Таким образом, предложенный нами метод позволил определить эффективность удаления объемных повреждений nAnt и nFlu из модельных плазмид системой NER клеток HEK 293T. Метод является перспективным инструментом изучения NER, он позволяет сравнивать как репаративный статус различных клеток, так и эффективность репарации повреждений различной структуры.

ВЫВОДЫ

1. С применением различных методик показано, что фибробласты голого землекопа, в сравнении с фибробластами мыши, оказались более устойчивы к воздействию высоких доз трех цитотоксических агентов – метилметансульфоната, 5-фторурацила и этопозида, сохраняя метаболическую активность и демонстрируя низкую активность эффекторных каспаз-3 и -7. Клетки голого землекопа, при воздействии указанных цитотоксических агентов, демонстрировали морфологические признаки как апоптотической, так и некротической гибели.

2. По данным сравнительного биоинформатического анализа в аминокислотной последовательности PARP1 голого землекопа обнаружены 13 аминокислотных замен, 10 из которых представлены в структурно-регуляторных доменах белка. Получена кДНК гена *PARP1* голого землекопа, синтезирован плазмидный вектор, содержащий данную кДНК, и проведена экспрессия белка PARP1 голого землекопа в клетках *E. coli*.

3. Методом дифференциальной сканирующей флуориметрии показано, что PARP1 голого землекопа более термостабилен, чем PARP1 человека (величина температуры плавления PARP1 голого землекопа и человека составила $52,0 \pm 0,4^\circ\text{C}$ и $48,7 \pm 0,2^\circ\text{C}$ соответственно). Кроме того, PARP1 голого землекопа более устойчив к воздействию 1 М мочевины; снижение температуры плавления PARP1 голого землекопа при воздействии 1 М мочевины составило $1,9 \pm 0,3^\circ\text{C}$, в то время как температура плавления PARP1 человека снижалась на $2,8^\circ\text{C}$.

4. Разработана методика определения активности эксцизионной репарации нуклеотидов *ex vivo*. Определена эффективность удаления объемных повреждений nAnt и nFlu из модельных плазмид системой NER клеток НЕК 293Т. Показано, что репарация nFlu-ДНК в клетках НЕК 293Т проходит быстрее, чем репарация nAnt-ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gillet, L. C. J., Schärer, O. D. (2006) Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair, *Chem. Rev.*, **106**, 253–276, doi: 10.1021/cr040483f.
2. Hooten, N. H., Evans, M. K. (2017) Techniques to induce and quantify cellular senescence, *J. Vis. Exp.*, **123**, doi: 10.3791/55533.
3. Ben-Porath, I., Weinberg, R. A. (2005) The signals and pathways activating cellular senescence, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, **37**, 961–976, doi: 10.1016/j.biocel.2004.10.013.
4. MacRae, S. L., et al. (2015) DNA repair in species with extreme lifespan differences, *Aging (Albany NY)*, **7**, 1171–1184, doi: 10.18632/aging.100866.
5. Lagunas-Rangel, F. A., Chávez-Valencia, V. (2017) Learning of nature: The curious case of the naked mole rat, *Mech. Ageing Dev.*, **164**, 76–81, doi: 10.1016/j.mad.2017.04.010.
6. Skulachev, V.P. et al. (2017) Neoteny, prolongation of youth: from naked mole rats to "naked apes" (humans), *Physiol. Rev.*, **97**, 699–720, doi: 10.1152/physrev.00040.2015.
7. Petrusheva, I. O., Evdokimov, A. N., Lavrik, O. I. (2017) Genome stability maintenance in naked mole-rat, *Acta Naturae*, **9**, 31–41, doi: 10.32607/2075851-2017-31-41.
8. Evdokimov A. N., et al. (2018) Naked mole rat cells display more efficient excision repair than mouse cells, *Aging (Albany NY)*, **10**, 1454–1473, doi: 10.18632/aging.101482.
9. Seluanov, A., et al. (2009) Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 19352–19357, doi: 10.1073/pnas.0905252106.
10. Salmon, A. B., Sadighi Akha, A. A., Buffenstein, R., Miller, R. A. (2008) Fibroblasts from naked mole-rats are resistant to multiple forms of cell injury, but sensitive to peroxide, ultraviolet light, and endoplasmic reticulum stress, *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.*, **63**, 232–241, doi: 10.1093/gerona/63.3.232.
11. Wyatt, M. D., Pittman, D. L. (2006) Methylating agents and DNA repair responses: Methylated bases and sources of strand breaks, *Chem. Res. Toxicol.*, **19**, 1580–1594, doi: 10.1021/tx060164e.
12. Longley, D. B., Harkin, D. P., Johnston, P. G. (2003) 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies, *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 330–338, doi: 10.1038/nrc1074.
13. Akpınar, B., et al. (2015) 5-fluorouracil-induced RNA stress engages a TRAIL-DISC-dependent apoptosis axis facilitated by p53, *Oncotarget*, **6**, 43679–43698, doi: 10.18632/oncotarget.6030.
14. Hande, K. R. (1998) Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor, *Eur. J. Cancer*, **34**, 1514–1521, doi: 10.1016/s0959-8049(98)00228-7.

15. Pietkiewicz, S., Schmidt, J. H., Lavrik, I. N. (2015) Quantification of apoptosis and necroptosis at the single cell level by a combination of Imaging Flow Cytometry with classical Annexin V/propidium iodide staining, *J. Immunol. Methods*, **423**, 99-103, doi: 10.1016/j.jim.2015.04.025.
16. Zamaraev, A. V., et al. (2018) Caspase-2 is a negative regulator of necroptosis, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **102**, 101–108, doi: 10.1016/j.biocel.2018.07.006
17. Ma, S., et al. (2016) Cell culture-based profiling across mammals reveals DNA repair and metabolism as determinants of species longevity, *Elife*, **5**, doi: 10.7554/eLife.19130.
18. Beneke, S. (2008) Poly(ADP-ribose) polymerase activity in different pathologies - the link to inflammation and infarction, *Exp. Gerontol.*, **43**, 605–614, doi: 10.1016/j.exger.2008.04.008.
19. Bock, F. J., Chang, P. (2015) Stress response: PARP1 911, *Nat. Chem. Biol.*, **11**, 179–180, doi: 10.1038/nchembio.1756.
20. Kraus, W. L., Hottiger, M. O. (2013) PARP-1 and gene regulation: progress and puzzles, *Mol. Aspects Med.*, **34**, 1109–1123, doi: 10.1016/j.mam.2013.01.005.
21. Bürkle, A., Virág, L. (2013) Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes, *Mol. Aspects Med.*, **34**, 1046–1065, doi: 10.1016/j.mam.2012.12.010.
22. Isabelle, M., et al. (2010) Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry, *Proteome Sci.*, **8**, doi: 10.1186/1477-5956-8-22.
23. de Murcia, G., et al. (1994) Structure and function of poly(ADP-ribose) polymerase, *Mol. Cell Biochem.*, **138**, 15–24, doi: 10.1007/BF00928438.
24. Kosova, A. A., et al. (2019) Poly(ADP-ribosyl)ation and DNA repair synthesis in the extracts of naked mole rat, mouse, and human cells, *Aging (Albany NY)*, **11**, 2852–2873, doi: 10.18632/aging.101959.
25. Sukhanova, M., Khodyreva, S., Lavrik, O. (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates activity of DNA polymerase beta in long patch base excision repair, *Mutat. Res.*, **685**, 80–89, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.08.009.
26. Khodyreva, S. N., et al. (2010) Apurinic/aprimidinic (AP) site recognition by the 5'-dRP/AP lyase in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 22090–22095, doi: 10.1073/pnas.1009182107.
27. Mansour, W. Y., et al. (2013) The absence of Ku but not defects in classical non-homologous end-joining is required to trigger PARP1-dependent end-joining, *DNA Repair (Amst)*, **12**, 1134–1142, doi: 10.1016/j.dnarep.2013.10.005.

28. Fischer, J. M. F., et al. (2014) Poly(ADP-ribose)-mediated interplay of XPA and PARP1 leads to reciprocal regulation of protein function, *FEBS J.*, **281**, 3625–3641, doi: 10.1111/febs.12885.
29. Maltseva, E. A., Rechkunova, N. I., Sukhanova, M. V., Lavrik, O. I. (2015) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 modulates interaction of the nucleotide excision repair factor XPC-RAD23B with DNA via poly(ADP-ribosylation), *J. Biol. Chem.*, **290**, 21811–21820, doi: 10.1074/jbc.M115.646638.
30. Gao, K., Oerlemans, R., Groves, M. R. (2020) Theory and applications of differential scanning fluorimetry in early-stage drug discovery, *Biophys. Rev.*, **12**, 85–104, doi: 10.1007/s12551-020-00619-2.
31. Perez, V., et al. (2009) Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 3059–3064, doi: 10.1073/pnas.0809620106.
32. Schärer, O. D. (2013) Nucleotide excision repair in eukaryotes, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, doi: 10.1101/cshperspect.a012609.
33. Svejstrup, J. Q. (2002) Mechanisms of transcription-coupled DNA repair, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **3**, 21–29, doi: 10.1038/nrm703.
34. Luijsterburg, M. S., et al. (2010) Stochastic and reversible assembly of a multiprotein DNA repair complex ensures accurate target site recognition and efficient repair, *J. Cell. Biol.*, **189**, 445–463, doi: 10.1083/jcb.200909175.
35. Reardon, J. T., Sancar, A. (2006) Purification and characterization of Escherichia coli and human nucleotide excision repair enzyme systems, *Methods Enzymol.*, **408**, 189–213, doi: 10.1016/S0076-6879(06)08012-8.
36. Evdokimov, A. N., et al. (2013) New synthetic substrates of mammalian nucleotide excision repair system, *Nucleic Acids Res.*, **41**, doi: 10.1093/nar/gkt301.
37. Kitsera, N., et al. (2014) Cockayne syndrome: varied requirement of transcription-coupled nucleotide excision repair for the removal of three structurally different adducts from transcribed DNA, *PLoS One*, **9**, doi: 10.1371/journal.pone.0094405.
38. Kitsera, N., et al. (2019) Nucleotide excision repair of abasic DNA lesions, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 8537–8547, doi: 10.1093/nar/gkz558.
39. Lukyanchikova, N. V., et al. (2016) DNA with damage in both strands as affinity probes and nucleotide excision repair substrates, *Biochemistry (Mosc)*, **81**, 263–274, doi: 10.1134/S0006297916030093.
40. Batty, D. P., Wood, R. D. (2000) Damage recognition in nucleotide excision repair of DNA, *Gene*, **241**, 193–204, doi: 10.1016/S0378-1119(99)00489-8.

Отчет о проверке на заимствования №1



Автор: Попов А.

Проверяющий: Гапонова Светлана Константиновна

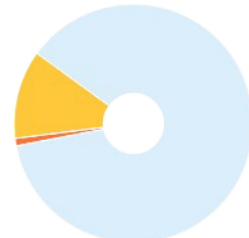
Отчет предоставлен сервисом «Антиплагиат» - <http://users.antiplagiat.ru>

ИНФОРМАЦИЯ О ДОКУМЕНТЕ

№ документа: 10
Начало загрузки: 01.09.2022 08:55:12
Длительность загрузки: 00:01:02
Имя исходного файла: Научный доклад_Попов AA_woref.docx
Название документа: Научный доклад_Попов AA_woref
Языки текста документа: русский, английский
Размер текста: 59 кБ
Символов в тексте: 60431
Слов в тексте: 7480
Число предложений: 369
Способ извлечения текста: OCR

ИНФОРМАЦИЯ ОБ ОТЧЕТЕ

Начало проверки: 01.09.2022 08:56:15
Длительность проверки: 00:06:36
Комментарии: не указано
Поиск с учетом редактирования: да
Модули поиска: Переводные заимствования (RuEn), Переводные заимствования (KuEn), Переводные заимствования (KkEn), Переводные заимствования, Патенты СССР, РФ, СНГ, Медицина, Кольцо вузов, Коллекция Национальной Библиотеки Узбекистана, ИПС Адилет, Интернет Плюс, Издательство Wiley (RuEn), Библиография, Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn), Шаблонные фразы, eLIBRARY.RU, СПС ГАРАНТ, СМИ России и СНГ, Сводная коллекция ЭБС, Сводная коллекция РГБ, Перефразирования по коллекции издательства Wiley, Перефразирования по Интернету (EN), Перефразирования по Интернету, Перефразирования по eLIBRARY.RU, Переводные заимствования по Интернету (KuRu), Переводные заимствования по Интернету (KkRu), Переводные заимствования по Интернету (EnRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KuRu), Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (KkRu), Цитирование, Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu)



ЗАИМСТВОВАНИЯ

0,49%

САМОЦИТИРОВАНИЯ

12,4%

ЦИТИРОВАНИЯ

0%

ОРИГИНАЛЬНОСТЬ

87,11%

Заимствования — доля всех найденных текстовых пересечений, за исключением тех, которые система отнесла к цитированиям, по отношению к общему объему документа.
Самоцитирования — доля фрагментов текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника, автором или соавтором которого является автор проверяемого документа, по отношению к общему объему документа.
Цитирования — доля текстовых пересечений, которые не являются авторскими, но система посчитала их использование корректным, по отношению к общему объему документа. Сюда относятся оформленные по ГОСТу цитаты; общеупотребительные выражения; фрагменты текста, найденные в источниках из коллекций нормативно-правовой документации.
Текстовое пересечение — фрагмент текста проверяемого документа, совпадающий или почти совпадающий с фрагментом текста источника.
Источник — документ, проиндексированный в системе и содержащийся в модуле поиска, по которому проводится проверка.
Оригинальность — доля фрагментов текста проверяемого документа, не обнаруженных ни в одном источнике, по которым шла проверка, по отношению к общему объему документа.
Заимствования, самоцитирования, цитирования и оригинальность являются отдельными показателями и в сумме дают 100%, что соответствует всему тексту проверяемого документа. Обращаем Ваше внимание, что система находит текстовые пересечения проверяемого документа с проиндексированными в системе текстовыми источниками. При этом система является вспомогательным инструментом, определение корректности и правомерности заимствований или цитирований, а также авторства текстовых фрагментов проверяемого документа остается в компетенции проверяющего.

№	Доля в отчете	Доля в тексте	Источник	Актуален на	Модуль поиска	Блоков в отчете	Блоков в тексте	Комментарии
[01]	12,4%	12,4%	Метод оценки эффективности работы... https://elibrary.ru	31 Дек 2021	eLIBRARY.RU	19	19	
[02]	0%	0,96%	Лаборатория биоорганической хими... http://niboch.nsc.ru	11 Апр 2022	Интернет Плюс	0	8	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[03]	0%	0,93%	Мультифункциональный Y-бокс-связ... http://niboch.nsc.ru	01 Дек 2020	Интернет Плюс	0	11	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[04]	0%	0,86%	Сидоренко, Дарья Сергеевна Молеку... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2019	Сводная коллекция РГБ	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[05]	0%	0,84%	НАУЧНЫЕ ТРУДЫ ОБЪЕДИНЕННЫЙ Н... https://docplayer.ru	15 Янв 2020	Интернет Плюс	0	9	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[06]	0%	0,77%	Лаборатория сравнительной геноми... https://mcb.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[07]	0%	0,69%	Информационные события [Институт... http://niboch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[08]	0%	0,69%	Информационные события [Институт... http://niboch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[09]	0%	0,69%	Информационные события [Институт... http://niboch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[10]	0%	0,69%	Информационные события [Институт... http://niboch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[11]	<input type="text" value="0%"/>	0,59%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch... http://niboch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[12]	<input type="text" value="0%"/>	0,58%	не указано	13 Янв 2022	Шаблонные фразы	0	10	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[13]	<input type="text" value="0%"/>	0,56%	Протокол № 21 от 03.07.2020 - сведени... http://web.nioch.nsc.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[14]	<input type="text" value="0%"/>	0,54%	не указано http://science-education.ru	31 Июл 2020	Интернет Плюс	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[15]	<input type="text" value="0%"/>	0,54%	ДНК на замке https://elementy.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[16]	<input type="text" value="0%"/>	0,53%	100_158_112_0_0.600_62532663 rbj-1-20... http://ronc.ru	01 Дек 2020	Интернет Плюс	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[17]	<input type="text" value="0%"/>	0,52%	223_102_151_0_0.600_68728211 Авторе... http://oldvak.ed.gov.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[18]	<input type="text" value="0%"/>	0,52%	Ассоциация генетических детермина... http://journalmeshalkin.ru	17 Мар 2020	Интернет Плюс	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[19]	<input type="text" value="0,49%"/>	0,49%	Поддержание стабильности генома у ... http://elibrary.ru	25 Янв 2018	Перефразирования по eLIBRARY.RU	1	1	
[20]	<input type="text" value="0%"/>	0,49%	Попов, Михаил Петрович Изучение в... http://dlib.rsl.ru	19 Фев 2018	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[21]	<input type="text" value="0%"/>	0,48%	ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАН... https://science-education.ru	31 Июл 2020	Интернет Плюс	0	4	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[22]	<input type="text" value="0%"/>	0,47%	не указано http://science-education.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[23]	<input type="text" value="0%"/>	0,47%	не указано http://science-education.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[24]	<input type="text" value="0%"/>	0,46%	Воробьев, Иван Иванович Методы ф... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2019	Сводная коллекция РГБ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[25]	<input type="text" value="0%"/>	0,45%	file_595465345d1c5мжпфи290617	29 Июн 2017	Кольцо вузов	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[26]	<input type="text" value="0%"/>	0,45%	не указано http://science-education.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[27]	<input type="text" value="0%"/>	0,43%	19 вузов России получили право прис... http://ug.ru	16 Янв 2019	СМИ России и СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[28]	<input type="text" value="0%"/>	0,42%	Постановление Правительства Новос... http://ivo.garant.ru	13 Янв 2017	СПС ГАРАНТ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[29]	<input type="text" value="0%"/>	0,41%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch... http://niboch.nsc.ru	27 Апр 2022	Интернет Плюс	0	3	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[30]	<input type="text" value="0%"/>	0,39%	ИММУНОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ Ф... https://elibrary.ru	31 Дек 2019	eLIBRARY.RU	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[31]	<input type="text" value="0%"/>	0,36%	Сибирские учёные разработали уник... http://russian.cri.cn	08 Янв 2019	СМИ России и СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[32]	<input type="text" value="0%"/>	0,31%	Ингибиторы PARP1: разработка прот... http://elibrary.ru	31 Янв 2015	Перефразирования по eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[33]	<input type="text" value="0%"/>	0,29%	Мартиросян, Ольга Владимировна Ф... http://dlib.rsl.ru	22 Авг 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[34]	<input type="text" value="0%"/>	0,29%	Маркова, Светлана Григорьевна Воз... http://dlib.rsl.ru	21 Сен 2021	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[35]	<input type="text" value="0%"/>	0,29%	Урусов, Александр Евгеньевич Разра... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2012	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[36]	<input type="text" value="0%"/>	0,28%	Поддержание стабильности генома у ... https://cyberleninka.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[37]	<input type="text" value="0%"/>	0,26%	Синтетическая биология https://elementy.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[38]	<input type="text" value="0%"/>	0,26%	сонин диплом на антиплагиат попыт...	25 Мая 2022	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[39]	<input type="text" value="0%"/>	0,26%	T. 2 http://emll.ru	08 Июл 2017	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[40]	<input type="text" value="0%"/>	0,26%	Теоретические основы новых направ... http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[41]	<input type="text" value="0%"/>	0,26%	Модели, методика и средства разраб... http://dep.nlb.by	06 Дек 2018	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[42]	<input type="text" value="0%"/>	0,26%	Способ очистки вируса осповакцины ... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[43]	<input type="text" value="0%"/>	0,26%	Способ получения наноразмерной с... http://findpatent.ru	25 Июн 2015	Патенты СССР, РФ, СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[44]	<input type="text" value="0%"/>	0,25%	Михайловская, Алевтина Сергеевна О... http://dlib.rsl.ru	27 Дек 2019	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[45]	<input type="text" value="0%"/>	0,24%	Разработка метода определения эфф...	19 Мая 2022	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[46]	<input type="text" value="0%"/>	0,23%	Зачем нужна репарация ДНК, что инт... http://novosibirsk.bezformata.com	16 Ноя 2018	СМИ России и СНГ	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[47]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch... http://niboch.nsc.ru	11 Апр 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[48]	<input type="text" value="0%"/>	0,22%	http://www.niboch.nsc.ru/lib/exe/fetch... http://niboch.nsc.ru	26 Мая 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[49]	<input type="text" value="0%"/>	0,21%	Молекулярная биология. 2017. Т. 51, ... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[50]	<input type="text" value="0%"/>	0,21%	Retinal ganglion cell survival and axon r... https://doi.org	01 Фев 2017	Издательство Wiley	0	5	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[51]	<input type="text" value="0%"/>	0,21%	Ультразвуковая и функциональная д... http://biblioclub.ru	21 Янв 2020	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[52]	<input type="text" value="0%"/>	0,21%	Литературно-художественные издан... http://dep.nlb.by	16 Янв 2020	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[53]	<input type="text" value="0%"/>	0,2%	Рецепт «второго дыхания» от академ... http://elibrary.ru	16 Янв 2016	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[54]	<input type="text" value="0%"/>	0,2%	Вестник гематологии. Том IX. № 2, 2013 http://bibliorossica.com	26 Мая 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[55]	<input type="text" value="0%"/>	0,2%	science-education.ru_file_587904378808...	16 Янв 2017	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[56]	<input type="text" value="0%"/>	0,2%	Всероссийская научно-практическая ... http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[57]	<input type="text" value="0%"/>	0,2%	Артериальная гипертония у лиц приз... http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[58]	<input type="text" value="0%"/>	0,2%	Т. XCIV, № 4, июль-август http://emll.ru	21 Дек 2016	Медицина	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[59]	<input type="text" value="0%"/>	0,19%	https://mir.ismu.baikal.ru/src/downloa... https://mir.ismu.baikal.ru	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	2	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[60]	<input type="text" value="0%"/>	0,18%	Одаренко-диплом	09 Июн 2020	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[61]	<input type="text" value="0%"/>	0,18%	Одаренко-магистерская диссертация	25 Мая 2022	Кольцо вузов	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[62]	<input type="text" value="0%"/>	0,18%	141945 http://biblioclub.ru	18 Апр 2016	Сводная коллекция ЭБС	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[63]	<input type="text" value="0%"/>	0,18%	Оценка эффективности функциониро... http://dslib.net	01 Сен 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[64]	<input type="text" value="0%"/>	0,18%	Замбалова, Елена Анатольевна Прогн... http://dlib.rsl.ru	30 Мар 2022	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[65]	<input type="text" value="0%"/>	0,16%	Молекулярная диагностика наследств... http://dep.nlb.by	04 Июл 2017	Диссертации НББ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[66]	<input type="text" value="0%"/>	0,15%	Лагунова, Наталия Леонидовна Обра... http://dlib.rsl.ru	01 Янв 2009	Сводная коллекция РГБ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.

[67]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	https://congress.regenerative-med.ru/files/... https://congress.regenerative-med.ru	27 Фев 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[68]	<input type="text" value="0%"/>	0,14%	https://www.pasteurorg.ru/files/materi... https://pasteurorg.ru	31 Мая 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[69]	<input type="text" value="0%"/>	0,13%	АСПИРАНТЫ ВОРОНЕЖСКОГО ГАУ ПО... http://voronej.bezformata.com	17 Авг 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[70]	<input type="text" value="0%"/>	0,13%	Диссертация на тему «Инструментал... https://dissercat.com	20 Мая 2021	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[71]	<input type="text" value="0%"/>	0,13%	http://www.mycology.ru/congress/mys... http://mycology.ru	21 Фев 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[72]	<input type="text" value="0%"/>	0,13%	http://www.spsl.nsc.ru/FullText/KONFE... http://spsl.nsc.ru	24 Мая 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[73]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	https://www.iephb.ru/wp-content/uplo... https://iephb.ru	29 Авг 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[74]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	Госпремии области вручили новосиб... https://vn.ru	17 Авг 2019	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[75]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	Подведены итоги конкурсов на право... http://novosibirsk.bezformata.ru	31 Дек 2018	СМИ России и СНГ	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[76]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	Матричная сборка днк-наноструктур ... https://elibrary.ru	31 Дек 2021	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[77]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ НАНОКРИСТАЛЛ... http://elibrary.ru	13 Дек 2011	eLIBRARY.RU	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[78]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	https://www.incras.ru/wp-content/uplo... https://incras.ru	12 Мая 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[79]	<input type="text" value="0%"/>	0,11%	https://diss.unn.ru/files/2021/1142/diss-... https://diss.unn.ru	17 Июнь 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.
[80]	<input type="text" value="0%"/>	0,1%	https://www.sechenov.ru/upload/ibloc... https://sechenov.ru	14 Авг 2022	Интернет Плюс	0	1	Источник исключен. Причина: Маленький процент пересечения.