

На правах рукописи



КИМ ДАРЬЯ ВЯЧЕСЛАВОВНА

**ПОЛУЧЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА ЛИНИЙ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА,
ДЕФИЦИТНЫХ ПО ГЕНАМ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ
ОСНОВАНИЙ, С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ CRISPR/CAS9**

1.5.3 — молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Новосибирск — 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет»

Научный руководитель:

Жарков Дмитрий Олегович, д. б. н., доцент, чл.-корр. РАН, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет».

Официальные оппоненты:

Коваль Ольга Александровна, д. б. н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии.

Гуляева Людмила Федоровна, д. б. н., профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», заведующая лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза.

Баттулин Нариман Рашитович, к. б. н., Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН», заведующий лабораторией генетики развития.

Защита состоится «16» февраля 2024 г. в 10 часов на заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, Новосибирск, проспект Академика Лаврентьева 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

С авторефератом можно ознакомиться на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан «15» января 2024 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,

к.х.н.



Пестряков П. Е.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Многие эндогенные и экзогенные факторы приводят к появлению в ДНК повреждений. Для предотвращения мутагенного и цитотоксичного эффекта повреждений в клетках существуют системы репарации ДНК, поддерживающие стабильность генома. К одной из таких систем относят эксцизионную репарацию оснований ДНК (BER, от англ. **B**ase **E**xcision **R**epair). В основном этот процесс отвечает за исправление небольших повреждений оснований, которые зачастую не приводят к значительному искажению вторичной структуры ДНК, а также апурин-апиримидиновых сайтов (АП-сайтов) и одноцепочечных разрывов. К наиболее распространенному типу окислительных повреждений в ДНК, репарацию которого осуществляют ферменты BER, относят 8-оксогуанин. У человека это повреждение удаляет из ДНК 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза 1 (OGG1). В связи с тем, что 8-оксогуанин способен образовывать комплементарную пару с аденином, в клетках также существует аденин-ДНК-гликозилаза (MUTYH), которая удаляет аденин из пары с 8-оксогуанином. В дальнейшую репарацию вносят вклад апурин-апиримидиновая эндонуклеаза 1 (APEX1) и ДНК-полимераза β (POL β).

Нарушения в системе BER связаны с риском развития онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Для некоторых генов системы BER (*MBD4*, *NTHL1*, *MUTYH*) известны наследственные мутации, приводящие к развитию злокачественных новообразований, для других же (*MBD4*, *OGG1*) показана эпидемиологическая ассоциация вариантов генов с онкологическими заболеваниями. В частности, показано, что некоторые мутации в гене *OGG1* ассоциированы с риском развития рака легкого.

Для исследования биологической роли BER часто используют нокаутные мышинные и клеточные модели, а также клеточные линии, полученные из биоматериала пациентов с клиническими симптомами недостаточности BER. Нокаутные организмы были получены не по всем генам BER в связи с эмбриональной гибелью таких животных. Для получения клеточных моделей, дефицитных по генам BER, используют различные клеточные линии в зависимости от задач исследований. Дефекты в системе BER приводят к увеличению частоты мутаций, тем самым способствуя инициации и прогрессии онкологических заболеваний, в связи с чем многие модели получены на клеточных линиях ракового происхождения или на клетках тех органов и тканей, где преимущественно возникают опухоли при мутациях в конкретных генах BER. Таким образом, получение клеточных линий, дефицитных по генам BER, актуально для дальнейших исследований роли этого процесса в защите генома от повреждений. Помимо этого, клеточные линии, дефицитные по определенным репарационным путям, используются в прикладных целях в генетической токсикологии. Использование таких клеточных линий позволяет увеличить чувствительность тестов, а также охарактеризовать тип индуцируемых повреждений при обработке генотоксичными веществами.

К числу наиболее популярных клеточных линий неракового происхождения, используемых в исследовательских целях, относят

эмбриональные клетки надпочечника человека 293 и их производные. Эти клеточные линии детально охарактеризованы фенотипически, для них доступны геномные данные высокого качества, что делает клетки 293 превосходной моделью для получения нокаутных клеточных линий. Среди клеточных линий человека ракового происхождения широко используют клетки HeLa, полученные из аденокарциномы шейки матки, и клеточную линию из аденокарциномы легкого A549, которая имеет частичные характеристики легочного эпителия.

В ходе выполнения данной работы была поставлена **цель** получения и характеристики клеточных линий, дефицитных по некоторым генам системы BER человека, и демонстрации их потенциала как инструмента для исследования репарации ДНК.

Для выполнения поставленной цели были определены следующие **задачи**:

1. Получить клеточные линии, нокаутные по отдельным генам системы BER (*APEX1*, *POLB*, *OGG1* и *MUTYH*) или их комбинациям (*APEX1 APEX2*), с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9. Охарактеризовать генотип и фенотип полученных клеточных линий.
2. Сконструировать новые варианты репортерного гена *EGFP*, кодирующие нефлуоресцентные белки, для детекции событий транскрипционного мутагенеза при наличии повреждений в ДНК.
3. Исследовать эффективность репарации часто встречающихся повреждений ДНК — урацила, 8-оксогуанина и АП-сайтов — в клеточных линиях, дефицитных по генам системы BER.
4. Изучить вклад белков BER в репарацию АП-сайтов, образующихся после выщепления азотистого основания монофункциональными ДНК-гликозилазами, и аддуктов метоксиамин с АП-сайтами на клеточных моделях.

Научная новизна работы. В работе впервые получена изогенная панель линий клеток человека неопухолевого происхождения, нокаутных по нескольким генам системы BER. Обнаружено несколько новых вариантов белка EGFP с аминокислотными заменами, приводящими к потере флуоресценции. Открыто существование дублирующих систем репарации АП-сайтов, независимых от основной АП-эндонуклеазы APEX1, в клетках человека. Впервые проведено исследование репарации аддуктов метоксиамин с АП-сайтами в клеточной системе и показано, что репарация этого типа зависит от бифункциональной ДНК-гликозилазы NTHL1.

Теоретическая и практическая значимость работы. В работе впервые решен долго обсуждавшийся в литературе вопрос о возможной роли АП-лиаз, катализирующих реакцию β -элиминирования, в процессе репарации ДНК: показано, что в отсутствие АП-эндонуклеазной активности эта реакция обеспечивает разрыв ДНК по АП-сайтам в живых клетках. С практической стороны полученная панель изогенных клеточных линий, дефицитных по основным белкам — участникам BER, может стать полезным инструментом для

оценки генотоксичности новых соединений и для исследования механизма репарации раннее не изученных типов повреждений в клеточной системе.

Методология и методы исследования. В работе использовали методы молекулярного клонирования, геномного редактирования и методы работы с клеточными культурами. Также использовали биохимические методы для исследования активности ферментов в экстрактах клеток *in vitro*.

Положения, выносимые на защиту:

1. Получены с помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 и охарактеризованы модифицированные клеточные линии 293FT, дефицитные по отдельным генам *APEX1*, *POLB*, *OGG1* и *MUTYH*, а также одновременно по генам *APEX1* и *APEX2*. Также получена модифицированная клеточная линия A549, дефицитная по гену *OGG1*. Определен генотип этих линий по целевым генам.
2. Проведен анализ влияния всех возможных миссенс- и нонсенс-мутаций в области с.607–с.625 гена *EGFP* на флуоресценцию белка EGFP с целью дальнейшего использования в детекции событий транскрипционного мутагенеза.
3. Показано, что в клеточных линиях 293FT *MUTYH^{KO}* и A549 *OGG1^{KO}* снижена эффективность репарации канонических субстратов. В клеточной линии 293FT *APEX1^{KO}* детектируется снижение эффективности репарации АП-сайтов и 8-оксогуанина.
4. Показана роль NTHL1 в репарации АП-сайтов и аддуктов метоксиамины с АП-сайтами в клетках.

Личный вклад соискателя. Представленные в работе экспериментальные данные были получены лично автором. Сортировка клеток по уровню флуоресценции EGFP для получения нокаутных клеточных линий была выполнена Малаховой А. А. (лаборатория эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН), Лемзой А. Е. и Матвеевой А. М. (лаборатория геномного редактирования ИХБФМ СО РАН), Нуштаевой А. А. (лаборатория биотехнологии ИХБФМ СО РАН). Оптимизация системы детекции транскрипционного мутагенеза в клетке на основе плазмиды с репортерным геном *EGFP* была проведена под руководством Родригес-Альварес М. и Хобты А. (Йенский университет им. Ф. Шиллера, Германия). Измерение уровня мРНК в клетках методом ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени выполнено Мелентьевым В. С. (лаборатория геномной и белковой инженерии ИХБФМ СО РАН). Исследование активности ферментов на олигонуклеотидных субстратах, содержащих урацил с замещенными фосфодиэфирными связями, было выполнено Дятловой Е. А. (лаборатория геномной и белковой инженерии ИХБФМ СО РАН).

Степень достоверности и апробация результатов. Основные положения работы представлены на международных конференциях: BGRS/SB-2018: 11th International Multiconference «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology» (Новосибирск, 2018), «CRISPR 2018. International Congress» (Новосибирск, 2018), «GENOME ENGINEERING: CRISPR FRONTIERS» (Колд-Спринг-Харбор, онлайн-конференция, 2021), BGRS/SB-

По материалам диссертационной работы опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

Структура и объем работы. Текст диссертации включает введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждения, заключение, выводы и список литературы. Работа изложена на 144 страницах, содержит 70 рисунков и 3 таблицы. Библиография состоит из 504 литературных источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. *Получение клеточных линий, нокаутных по генам **BER**, с помощью системы геномного редактирования **CRISPR/Cas9***

Клеточную линию 293FT, нокаутную по гену *APEX1*, получали с помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9. Были подобраны три последовательности протоспейсеров: две располагались во втором экзоне гена *APEX1*, содержащем стартовый кодон ATG, а третий протоспейсер полностью находился в кодирующей части гена в третьем экзоне (рис. 1).

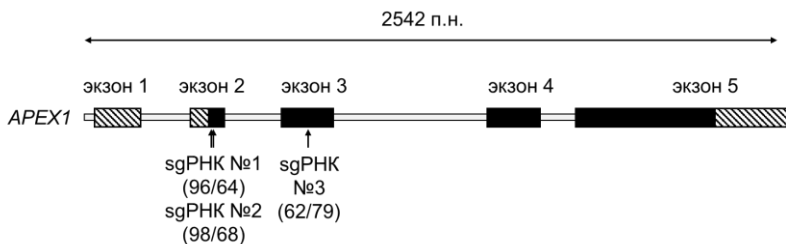


Рисунок 1. Схема гена *APEX1*. Отмеченные штриховкой блоки обозначают некодирующие участки экзонов. Стрелками указано расположение подобранных sgPHK, для каждой из них в скобках приведены расчетные значения целевой активности и специфичности.

До получения нокаутной клеточной линии была проведена оценка целевой активности подобранных единых направляющих РНК (sgPHK), так как известно, что предсказанные показатели эффективности работы sgPHK могут отличаться на практике в связи с использованием разных клеточных линий и нацеливания на разные последовательности в геноме. Для этого плазмиды рХ458, кодирующие нуклеазу Cas9, подобранные sgPHK и репортер EGFP, трансфицировали в клетки линии 293FT. Через 24 ч популяцию сортировали на проточном цитометре и собирали EGFP-положительные клетки для последующего анализа. Оценку эффективности работы системы CRISPR/Cas9 проводили в программе TIDE, которая на основе выравнивания секвеннограмм модифицированных клеток и клеток дикого типа и разделения компонентов сигнала рассчитывает процент последовательностей с делециями и инсерциями. Сначала нарабатывали продукт ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих район внесения двуцепочечного разрыва, а затем

секвенировали его по Сэнгеру. Эффективность работы системы CRISPR/Cas9 с подобранными sgPHK составила порядка 15% вне зависимости от последовательности протоспейсера. Для дальнейшей работы использовали sgPHK №3, так как в результате работы системы CRISPR/Cas9 с такой sgPHK и последующей репарацией возникали в основном однонуклеотидные делеции и инсерции, в отличие от первых двух sgPHK.

Клетки 293FT трансфицировали плазмидой pX458, содержащей последовательность sgPHK №3, через 24 ч осуществляли сортировку EGFP-положительных клеток и рассаживали их для получения отдельных клонов. Было получено 113 клонов, которые генотипировали анализом длин рестрикционных фрагментов с использованием эндонуклеазы рестрикции DraIII, сайт узнавания которой перекрывается с 3'-концом протоспейсера. Для этого сначала нарабатывали продукт ПЦР с праймеров, фланкирующих район внесения двуцепочечного разрыва, затем гидролизовали его эндонуклеазой DraIII. При наличии мутации исходный сайт узнавания DraIII исчезает, и гидролиз невозможен. Было проанализировано 19 случайных клонов, 6 из которых потеряли все копии сайта DraIII. По результатам секвенирования по Сэнгеру было показано, что клон 1С4 содержал однонуклеотидные делеции и инсерции в примерно равном соотношении (делеций в ~1,2 раза больше), а клон 2А9 содержал в четыре раза больше инсерций +1 инсерций, чем делеций -1 (рис. 2А). Стоит отметить, что на основе анализа данных в TIDE невозможно охарактеризовать отдельные аллели гена в связи с тем, что секвенирование проводится на общей геномной ДНК. Для характеристики аллелей гена *APEX1* в модифицированных клонах 1С4 и 2А9 осуществляли ТА-клонирование продукта ПЦР района модификации гена *APEX1* в вектор pCR 2.1 (рис. 2Б). Для клеточной линии 1С4 было получено 13 клонов, для линии 2А9 — 15 клонов. Четыре клона 1С4 содержали инсерцию одного нуклеотида С в области расщепления нуклеазой Cas9 (с.165dupC), а девять клонов — делецию одного нуклеотида С (с.165delC). Все клоны 2А9 содержали инсерцию с.165dupC в сайте внесения двуцепочечного разрыва нуклеазой Cas9. Исходя из того, что клеточная линия 293FT имеет гипотриплоидный кариотип и содержит три копии хромосомного района 14q11.2, где расположен ген *APEX1*, можно заключить, что наиболее вероятный генотип линии 1С4 — это два аллеля с.165delC и один с.165dupC, а генотип 2А9 — три аллеля с.165dupC.

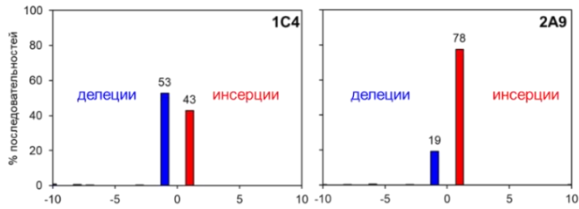
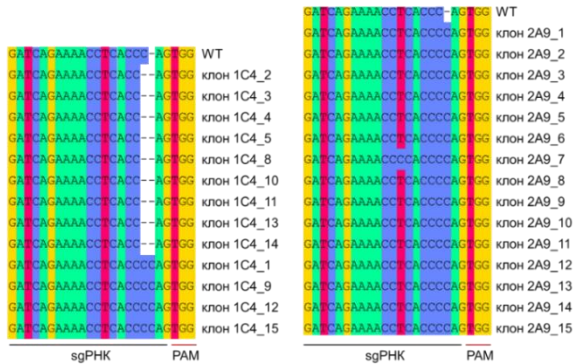
А**Б**

Рисунок 2. Исследование мутаций в гене *APEX1* в клонах 1C4 и 2A9. **А.** С помощью TIDE. **Б.** Результаты секвенирования участка модификации гена *APEX1* после ТА-клонирования нокаутных клонов 1C4 и 2A9.

Для дальнейшей характеристики клеточных линий, нокаутных по гену *APEX1*, оценивали уровень мРНК методом ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени и в клеточных экстрактах уровень целевого белка методом иммуноблоттинга. Уровень мРНК *APEX1* был ниже в клетках 1C4 и 2A9 по сравнению с клетками дикого типа, что позволяет предположить, что мРНК, кодирующие белок с ранним стоп-кодоном, подвергаются нонсенс-опосредованному распаду РНК (рис. 3А). Измеренные для сравнения уровни мРНК нескольких ДНК-гликозилаз не изменились или даже повысились (рис. 3А). Примечательно, что статистически значимое увеличение мРНК *OGG1* наблюдалось в обеих нокаутных линиях, тогда как в клетках 1C4 была повышена экспрессия *MUTYH*, а в клетках 2A9 — экспрессия *NEIL2* (рис. 3А). Это может свидетельствовать о том, что потеря *APEX1* индуцирует компенсаторное увеличение экспрессии генов ДНК-гликозилаз, обладающих АП-лиазной активностью или участвующих в репарации окислительных повреждений ДНК. Иммуноблоттинг с антителами, специфичными к *APEX1*, выявил отсутствие целевого белка в клеточных экстрактах обоих нокаутных моноклонов (рис. 3Б).

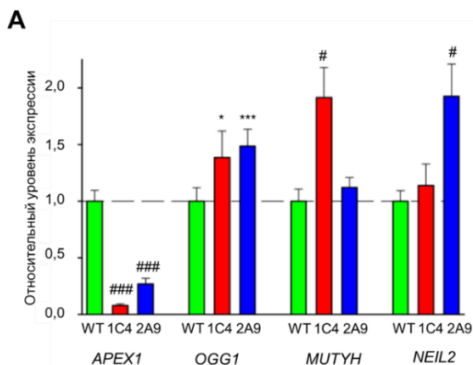
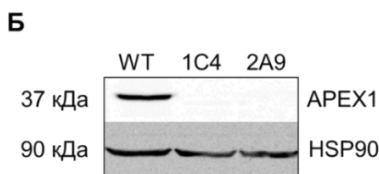


Рисунок 3. А. Относительный уровень экспрессии генов *APEX1*, *OGG1*, *MUTYH* и *NEIL2* в клетках *APEX1^{KO}* 1C4 и 2A9. Приведены значения среднего и стандартного отклонения. * — $p < 0,05$, *** — $p < 0,005$, # — $p < 0,001$, ### — $p < 0,0001$ (критерий Стьюдента). **Б.** Анализ уровня белка *APEX1* методом иммуноблоттинга в клеточных экстрактах дикого типа (WT) и нокаутных клеточных линиях 1C4 и 2A9.



С помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 в работе также были получены производные клеточной линии 293FT, нокаутные по генам *MUTYH*, *OGG1*, *POLB* и клеточная линия A549, нокаутная по гену *OGG1*. Помимо этого была получена клеточная линия 293FT с двойным нокаутом генов *APEX1* *APEX2*, на основе клеточной линии 293FT *APEX1^{KO}* клон 1C4 (табл. 1). Общая схема получения нокаутных клеточных линий была аналогичной выше приведенной для получения нокаута гена *APEX1*. Все полученные клеточные линии характеризовали на наличие мутаций в участке модификации генамишени с помощью ТА-клонирования. Полученные клеточные линии содержат мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания. Для клеточных линий 293FT *MUTYH^{KO}* и 293FT *POLB^{KO}* методом иммуноблоттинга было подтверждено отсутствие целевого белка.

Таблица 1. Характеристика полученных клеточных линий 293FT и A549, нокаутных по генам системы BER

Ген	Клон	ТА-клонирование	RT-ПЦР	Иммуноблоттинг	Выживаемость		
					MMS	H ₂ O ₂	KBrO ₃
<i>MUTYH</i>	4H1	+		+		+	+
<i>OGG1</i>	293FT:						
	1A3, 4C9,	+					
	4D3; A549: 2F5						
<i>APEX1</i>	1C4, 2A9	+	+	+	+	+	+
<i>APEX1</i> <i>APEX2</i>	1A4, 2A2	+			+	+	
<i>POLB</i>	4D2, 5B7	+		+	+	+	

2. Оценка эффективности BER в клеточных экстрактах 293FT *APEX1^{KO}*

Для исследования репаративного потенциала клеток с нокаутом *APEX1* *in vitro* использовали радиоактивно меченые двуцепочечные олигонуклеотидные субстраты, содержащие либо альдегидный АП-сайт, полученный путем обработки dU-содержащего олигонуклеотида урацил-ДНК-гликозилазой (Ung), либо его синтетический аналог (3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)метилфосфат (ТНФ). Экстракты, полученные из клеток дикого типа, эффективно гидролизуют оба субстрата (рис. 4, дорожки 3 и 8), а клеточные экстракты 1С4 и 2А9 были неспособны расщеплять такие субстраты (рис. 4, дорожки 4–5 и 9–10). В то же время все клеточные экстракты были способны выщеплять урацил из двуцепочечных субстратов и включать dNMP в субстрат, содержащий однонуклеотидную брешь. Это говорит о том, что путь BER в клетках с нокаутом *APEX1* остается в полной мере функциональным как на стадиях, предшествующих действию *APEX1* (удаление основания), так и на последующих стадиях (заполнение однонуклеотидной брешы).

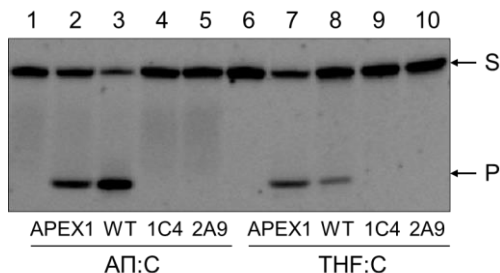


Рисунок 4. Электрофореграмма 20%-ного денатурирующего полиакриламидного геля после разделения продуктов реакции расщепления двуцепочечного субстрата, содержащего пары АП:С (дорожки 1–5) или ТНФ:С (дорожки 6–10), экстрактами клеток 293FT дикого типа (дорожки 3 и 8), нокаута 1С4 (дорожки 4 и 9) и 2А9 (дорожки 5 и 10). Контроль без фермента и клеточного экстракта приведен в дорожках 1 и 6, контроль с рекомбинантным белком *APEX1* — в дорожках 2 и 7. Стрелки отмечают подвижность субстрата (S) и продукта реакции (P).

Для оценки эффективности работы всей системы BER в нокаутных клеточных линиях олигонуклеотидные дуплексы, содержащие урацил или ТНФ, обрабатывали клеточными экстрактами в присутствии dNTP *in vitro* (рис. 5).

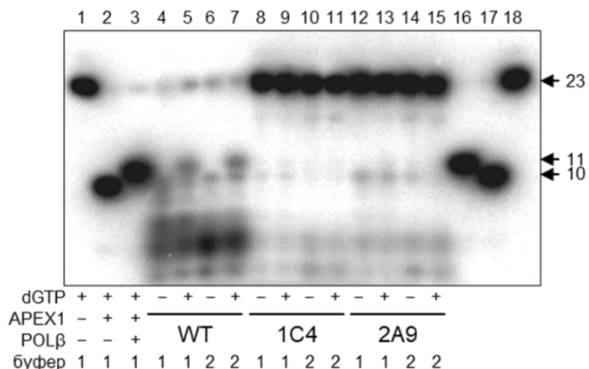


Рисунок 5. Исследование BER в экстрактах клеток 293FT дикого типа и нокаут *APEX1* 1C4 и 2A9 на двуцепочечном субстрате, содержащем пару ТНФ:С. Дорожки 1–3 — реакции, с использованием рекомбинантных белков *APEX1* и *POLβ*. Продукты реакции с экстрактами клеток дикого типа 293FT приведены на дорожках 4–7, с экстрактами клеток 1C4 — на дорожках 8–11, с экстрактами клеток 2A9 — на дорожках 12–15. Буфер 1 оптимизирован для активности *APEX1*, буфер 2 — для активности *POLβ*. На дорожки 16–18 нанесены маркеры подвижности, отмеченные стрелками с указанной длиной маркера.

В экстрактах клеток дикого типа наблюдалось расщепление с последующей 3'→5' экзонуклеазной деградацией субстрата, которую можно приписать действию *APEX1* или других экзонуклеаз, присутствующих в клеточных экстрактах. Интересно, что такая деградация не наблюдалась для субстратов с однонуклеотидной брешью, что предполагает необходимость наличия для нее полного комплекса белков BER. Несмотря на экзонуклеазную деградацию продукта расщепления *APEX1*, можно было детектировать включение dNMP по наличию продукта длиной 11 нт. В отличие от экстрактов клеток дикого типа, в экстрактах нокаутных клеток было видно лишь незначительное расщепление. Продукты расщепления, присутствующие в незначительных количествах в реакциях с субстратом U:С, имеют меньшую подвижность, чем продукты гидролиза *APEX1*, что, вероятно, отражает β-элиминирование любой клеточной АП-лиазой, образующей 3'-ненасыщенный альдегид, который не может быть удлинен ДНК-полимеразами. Из полученных результатов можно сделать вывод, что в нокаутных линиях 1C4 и 2A9 репарация урацила и ТНФ по каноническому пути BER неэффективна в связи с отсутствием функционального белка *APEX1*.

3. Фенотипическая характеристика клеток 293FT, нокаутных по генам системы BER

Клеточные линии 1C4 и 2A9, нокаутные по гену *APEX1*, морфологически ничем не отличались от клеток 293FT дикого типа. Для фенотипической характеристики клеток была исследована продолжительность стадий клеточного цикла. Для клеток *APEX1*^{KO} не наблюдалось изменений в клеточном

цикле по сравнению с клетками дикого типа. Между клетками дикого типа и нокаутными клетками не наблюдалось существенной разницы во времени удвоения популяции (21,7 ч для клеток дикого типа, 20,4 ч для 1С4, 19,4 ч для 2А9).

Ожидается, что нокаут гена *APEX1* приведет к увеличению количества АП-сайтов, образующихся в клетке без дополнительного генотоксического стресса в геномной ДНК. Для оценки уровня АП-сайтов в клетке был использован тест с альдегидной реактивной пробой. Нокаут гена *APEX1* привел к росту числа АП-сайтов по сравнению с клетками дикого типа, что в свою очередь сравнимо с уровнем АП-сайтов в клетках дикого типа после обработки алкилирующим агентом метилметансульфонатом (MMS). При обработке клеток *APEX1^{KO}* MMS количество АП-сайтов не увеличилось. Вероятно, в отсутствие *APEX1* высокореакционноспособные АП-сайты конвертируются в более опасные повреждения, не детектируемые с помощью этого теста, например, в ДНК-белковые сшивки или окисленные формы АП-сайтов.

Для оценки последствий нокаута гена *APEX1* исследовали выживаемость клеток при обработке генотоксическими агентами — MMS, H₂O₂ и KBrO₃ (рис. 6).

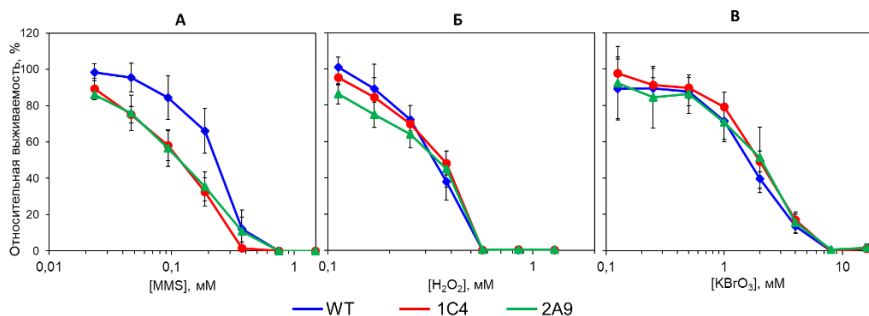


Рисунок 6. Графики зависимости выживаемости клеток *APEX1^{KO}* от концентрации MMS (А, $n = 4$), H₂O₂ (Б, $n = 3$) и KBrO₃ (В, $n = 3$). Обозначения клеточных линий указаны под графиками. Приведены значения среднего и стандартного отклонения.

К основным известным типам повреждений, индуцируемых MMS, относятся *N7*-метилпурины, *N3*-метилпурины и *O⁶*-метилгуанин. H₂O₂ проявляет меньшую специфичность, индуцируя как одноцепочечные разрывы, так и различные окисленные повреждения оснований. KBrO₃ в основном приводит к образованию 8-оксогуанина (8-oxoG) и в меньшей степени одноцепочечных разрывов. Согласно полученным данным, клетки, дефицитные по *APEX1*, были более чувствительны к MMS, но не к H₂O₂ и KBrO₃ (рис. 6). Это может быть связано с разными механизмами репарации повреждений, индуцированных данными агентами. Алкилированные основания ДНК выпещляются монофункциональной ДНК-гликозилазой MPG, после которой *APEX1* гидролизует АП-сайт. С другой стороны, для репарации окислительных повреждений в ДНК описан *APEX1*-независимый клеточный путь, в котором участвует NEIL1 или NEIL2 и PNKP. Более того, появляются данные,

свидетельствующие о роли эксцизионной репарации нуклеотидов в репарации окисленных повреждений ДНК в клетках человека.

Дополнительный нокаут гена *APEX2* в клеточной линии 293FT *APEX1^{KO}* не привел к увеличению чувствительности клеток к MMS и H₂O₂. По-видимому, APEX2 вносит незначительный вклад в репарацию повреждений, вызванных MMS, что согласуется с ранее опубликованными данными для линии мышинных В-лимфоцитов CH12F3.

POL β участвует в последних стадиях BER, катализируя удаление 5'-концевого остатка dRP и включение неповрежденного нуклеотида. Для оценки последствий нокаута гена *POLB* исследовали чувствительность клеток 293FT *POLB^{KO}* к MMS и H₂O₂. Было показано, что выживаемость клеток с нокаутом *POLB* резко снижена при обработке MMS, но не H₂O₂ (рис. 7). Эти результаты хорошо согласуются с литературными данными, полученными на эмбриональных стволовых клетках мышей, нокаутных по гену *Polb*.

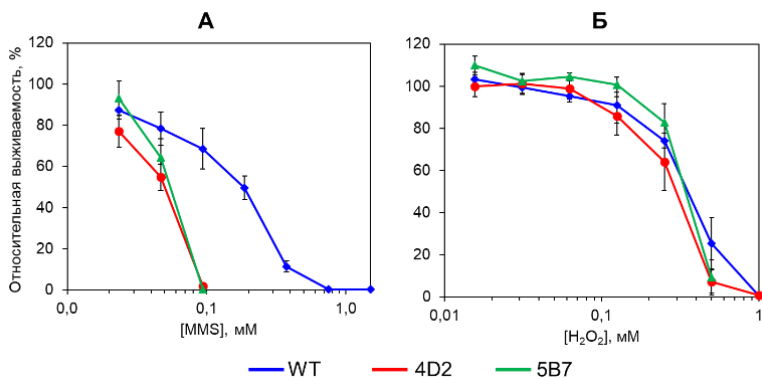


Рисунок 7. Графики зависимости выживаемости клеток *POLB^{KO}* от концентрации MMS (А, $n = 4$) и H₂O₂ (Б, $n = 4$). Обозначения клеточных линий указаны под графиками. Приведены значения среднего и стандартного отклонения.

ДНК-гликозилаза MUTYH отвечает за удаление аденина, ошибочно включенного ДНК-полимеразой напротив 8-охоG. В связи с этим исследовали чувствительность клеток дефицитных по *MUTYH* к окислительному стрессу, вызванному обработкой H₂O₂ и KBrO₃. Было показано, что нокаут гена *MUTYH* не увеличивает чувствительность к этим генотоксическим агентам. Эти данные также согласуются с ранее полученными результатами обработки H₂O₂ клеточных линий лимфоцитов, полученных от пациентов с *MUTYH*-ассоциированным полипозом, и мышинных эмбриональных фибробластов *Mutyh^{-/-}*, обработанных KBrO₃.

4. *Расширение репертуара репортерных конструктов для исследования систем репарации in vivo*

Для исследования репарации в живых клетках часто применяют системы на основе плазмид с повреждением, введенным в последовательность репортерного гена. В одной из таких систем используют введение повреждения в нефункциональный ген-репортер и детектируют уровень транскрипционного мутагенеза (ТМ). В частности, замена в гене *EGFP* с.613С>Т приводит к замене кодона 5'-CAG-3' на стоп-кодон 5'-TAG-3', что приводит к потере флуоресценции. В свою очередь, другие возможные замены в положении с.613 не влияют на уровень флуоресценции. При репарации повреждения, расположенного в транскрибируемой цепи *EGFP* в положении с.613, будет восстанавливаться исходная последовательность нефлуоресцирующего варианта *EGFP*. В случае же отсутствия репарации будет наблюдаться обусловленная ТМ флуоресценция. Таким образом, эффективность репарации того или иного типа повреждения обратно пропорциональна уровню ТМ. Основное ограничение этой системы заключается в том, что в положение с.613 можно вводить лишь повреждения, которые представляют собой модификации аденина. В связи с этим поиск альтернативных позиций для введения повреждения в последовательность *EGFP* представляет собой актуальную задачу.

В последовательности гена *EGFP* находятся два сайта узнавания нуклеазы *Nb.Bpu10I*, находящиеся друг от друга на расстоянии 18 нт, что позволяет вводить повреждения в участок с.607–с.625. С целью поиска других позиций в гене *EGFP* для введения повреждений кодирующую последовательность исследовали на предмет замен, которые приводят к смене аминокислоты. В исследуемом районе можно заменить 11 нуклеотидов, что дает 33 возможных замены. Из-за избыточности генетического кода всего 25 замен приводят к смене аминокислоты в позициях 204–207 белка *EGFP*. Для исследования влияния замен на уровень флуоресценции *EGFP* получали плазмидные конструкты, содержащие по одному мисматчу в позициях с.612, с.613, с.615–с.617, с.618, с.619, с.621, с.622 гена *EGFP*. С этой целью вектор *pZAJ_5c* обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *Nb.Bpu10I*, которая вносит одноцепочечные разрывы в транскрибируемую цепь (ТС) ДНК в позиции с.607 и с.625 (рис. 8А). При добавлении и гибридизации конкурентного олигонуклеотида, комплементарного выщепленному, образуется брешь размером 18 нт. Для получения конструкта с измененной последовательностью в эту брешь лигировали олигонуклеотид с нужной заменой.

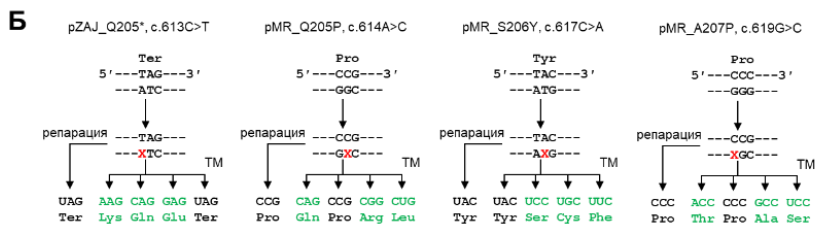
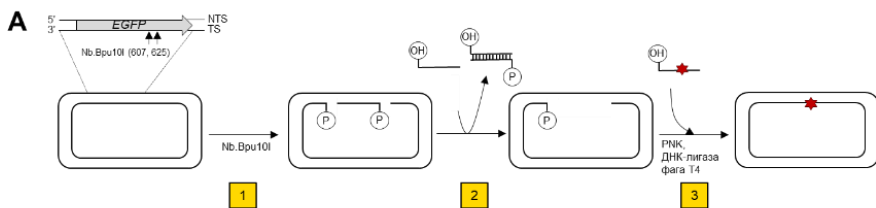


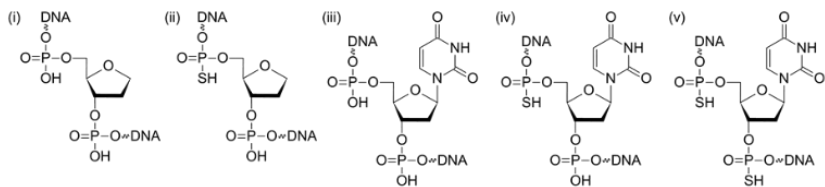
Рисунок 8. Исследование эффективности репарации повреждений *in vivo* с помощью плазмидных репортерных конструкций. А. Общая схема получения плазмидных конструкций с заменами или повреждениями. **1**, гидролиз плазмиды ферментом Nb.Bpu10I. **2**, добавление олигонуклеотида, комплементарного выщепленному, приводит к образованию бреши длиной 18 нт. **3**, встраивание олигонуклеотида с измененной последовательностью или повреждением. Красной звездочкой обозначен измененный нуклеотид. Б. Концептуальная схема системы детекции событий TM в клетках с помощью плазмид pZAJ_Q205*, pMR_Q205P, pMR_S206Y, pMR_A207P. Ter — стоп-кодон.

Для оценки влияния мисматча использовали клеточную линию DLD-1, полученную из колоректального рака и дефицитную по мисматч-репарации. Конструкции с мисматчами трансфицировали вместе с плазмидой, кодирующей красный флуоресцентный белок DsRed, в клетки DLD-1. Уровень флуоресценции исследуемых вариантов нормализовали на уровень флуоресценции клеток, трансфицированных плазмидой с последовательностью гена *EGFP* дикого типа. Для дальнейшей работы были отобраны замены с.613C>T, с.614A>C, с.617C>A, с.619G>C, которые приводят к снижению уровня флуоресценции EGFP. Обнаруженные замены приводят к появлению раннего стоп-кодона или пролина в составе β -складок, что в конечном итоге приводит к потере флуоресценции. Для создания репортерной системы на основе этих вариантов EGFP в лаборатории проф. А. Хобты (Йенский университет им. Ф. Шиллера, Германия) были получены плазмиды pZAJ_Q205*, pMR_Q205P, pMR_S206Y, pMR_A207P (рис. 8Б).

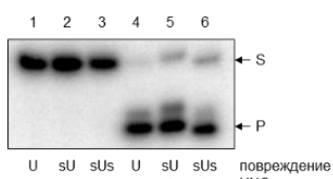
5. *Исследование эффективности репарации повреждений в клетках 293FT, нокаутных по генам системы BER*

Для исследования репаративного потенциала клеток с нокаутом генов BER использовали репортерные конструкции с различными повреждениями (рис. 9). В качестве повреждений использовали остаток ТНФ, ТНФ с 5'-фосфоротиоатной связью (sF), 2'-дезоксисуридин, 2'-дезоксисуридин с 5'-фосфоротиоатной связью (sU), 2'-дезоксисуридин с 5'- и 3'-фосфоротиоатными связями (sUs), 8-охоГ, 8-охоГ с 5'-фосфоротиоатной связью (s8-охоГ) и аддукт АП-сайта с метоксиамином с 5'- и/или 3'-фосфоротиоатными связями. Наличие 5'-фосфоротиоатной связи блокирует гидролиз АП-эндонуклеазой, а 3'-фосфоротиоатная связь — действие АП-лиаз. Для подтверждения присутствия повреждения в полученном конструкте проводили реакцию расщепления с ферментом, специфичным к этому типу повреждения.

А



Б



В

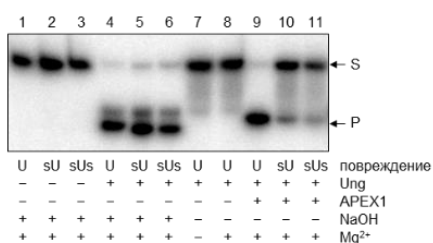


Рисунок 9. А, Структуры модифицированных звеньев ДНК, использованных в работе. (i) (3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)метилфосфат (ТНФ); (ii) (3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)метилфосфоротиоат (sF); (iii) 2'-дезоксисуридин-5'-фосфат (U); (iv) 2'-дезоксисуридин-5'-фосфоротиоат (sU); (v) 2'-дезоксисуридин-5'-фосфоротиоат с 3'-фосфоротиоатной связью (sUs). **Б**, расщепление олигонуклеотидных субстратов, содержащих U, sU, sUs ферментом UNG. **В**, расщепление олигонуклеотидных субстратов с АП-сайтом, полученным из U, sU, sUs, ферментом АРЕХ1.

В связи с тем, что АРЕХ1 — это основная АП-эндонуклеаза в клетках человека, сначала исследовали репарацию АП-сайтов. Учитывая, что альдегидная форма АП-сайта нестабильна, использовали конструкции, содержащие синтетический аналог АП-сайта — ТНФ, sF и контрольный конструкт с А (рис. 10).

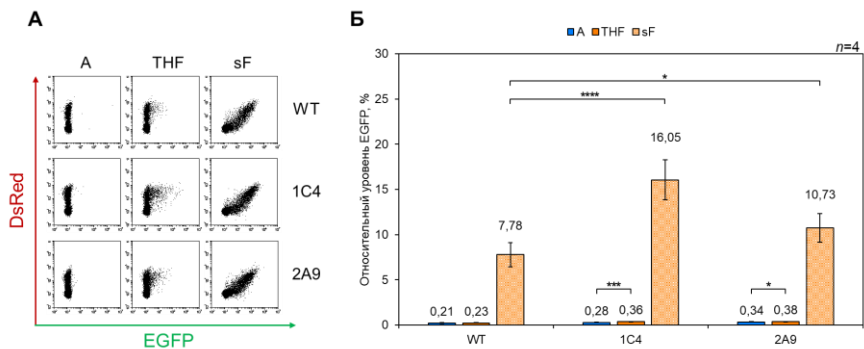


Рисунок 10. Исследование репарации THF и sF в клетках дикого типа и нокаута по *APEX1* с использованием конструкций на основе pZAJ_Q205*. **А**, распределение клеток по флуоресценции EGFP и DsRed, где DsRed использовали в качестве контроля трансфекции. По оси X в логарифмической шкале указана флуоресценция EGFP, по оси Y в логарифмической шкале указана флуоресценция DsRed. **Б**, уровень ТМ для конструкций, содержащих А, THF и sF. Данные 4 независимых экспериментов представлены как среднее и стандартное отклонение, * — $p < 0,05$, *** — $p < 0,005$, **** — $p < 0,001$.

На основе анализа диаграмм распределения клеток по флуоресценции, трансфицированных конструктами с THF, можно наблюдать накопление популяции флуоресцирующих в зеленом канале клеток в случае нокаутных клеточных линий. Однако в пуле трансфицированных клеток превалирует популяция с базовым уровнем флуоресценции по EGFP. В связи с этим при количественном обсчете таких данных уровень ТМ для конструкций с THF в случае нокаута незначительно отличается от уровня ТМ контрольных конструкций с А. Это может свидетельствовать о наличии альтернативных путей репарации синтетических АП-сайтов в клетке. Уровень ТМ sF в нокауте по *APEX1* был несколько выше, чем в клетках дикого типа, что можно объяснить остаточной активностью *APEX1* по отношению к таким субстратам.

Синтетический аналог АП-сайта не подвергается β -элиминированию, поэтому АП-лиазы не могут процессировать конструкты с THF в клетках. Вероятно, в репарацию этого повреждения вносят вклад и другие ферменты. В частности, известно, что *in vitro* АП-сайты могут подвергаться репарации с участием эндонуклеазы *APEX2*, апратаксин- и PNKP-подобного фактора (APLF), системы NER, тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы I и человеческих гомологов бактериальной экзонуклеазы TatD — TATDN1 и TATDN3. На основании того, что введение фосфоротиоатной связи с 5'-стороны от АП-сайта значительно увеличивает уровень ТМ, логично предположить, что в репарации THF в клетке участвует фермент, гидролизующий АП-сайт с 5'-стороны. Для *APEX2* показана минорная АП-эндонуклеазная активность. Для того, чтобы проверить возможность участия этого фермента в репарации THF, с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 была получена клеточная линия 293FT с двойным нокаутом генов *APEX1* и *APEX2*. Полученные

клеточные линии 1A4 и 2A2 с двойным нокаутом трансфицировали конструктами, содержащими A, THF или sF. Уровень ТМ THF в клетках с двойным нокаутом генов *APEX1* и *APEX2* незначительно отличался от уровня ТМ контрольного отрицательного конструкта, а также от уровня ТМ THF в клетках с нокаутом *APEX1* (табл. 2). Исходя из этого, можно заключить, что *APEX2* не вносит заметного вклада в репарацию АП-сайтов в клетке.

Таблица 2. Уровень транскрипционного мутагенеза (%) для конструктов, содержащих повреждения, в клеточных линиях, дефицитных по генам системы BER

pZAJ_Q205*	293FT	<i>APEX1^{KO}</i> (1C4)	<i>APEX1^{KO}</i> (2A9)		
A	0,21	0,28	0,34		
THF	0,23	0,36	0,38		
sF	7,78	16,05	10,73		
pZAJ_Q205*	293FT	<i>APEX1^{KO}</i> (1C4)	<i>APEX1^{KO}</i> <i>APEX2^{KO}</i> (1A4)	<i>APEX1^{KO}</i> <i>APEX2^{KO}</i> (2A2)	
A	0,15	0,22	0,31	0,24	
THF	0,15	0,3	0,43	0,33	
sF	6,8	15,67	19,45	16,59	
pZAJ_Q205*	293FT	<i>APEX1^{KO}</i> (1C4)	<i>APEX1^{KO}</i> (2A9)	HeLa	<i>NTHL1^{KO}</i>
A	0,19	0,27	0,33	0,81	0,78
U	0,23	0,35	0,39	0,93	0,9
sU	0,4	0,64	0,71	2,92	4,51
sUs	1,75	2,26	2,01	3,87	4,3
pMR_Q205P	293FT	<i>APEX1^{KO}</i> (1C4)	<i>APEX1^{KO}</i> (2A9)		
G	0,21	0,27	0,32		
8-oxoG	3,79	6,87	5,43		
s8-oxoG	16,59	21,33	17,73		
pMR_A207P	293FT	<i>APEX1^{KO}</i> (1C4)	<i>APEX1^{KO}</i> (2A9)		
G	0,2	0,27	0,33		
8-oxoG	3,56	7,7	6,06		
s8-oxoG	13,22	17,22	14,42		
pMR_Q205P	A549	<i>OGG1^{KO}</i>	pMR_A207P	A549	<i>OGG1^{KO}</i>
G	0,69	0,95	G	0,74	0,99
8-oxoG	3,21	12,94	8-oxoG	4,19	16,11
s8-oxoG	22,26	24,75	s8-oxoG	21,11	22,05
pZAJ_Q205*	293FT	<i>MUTYH^{KO}</i>			
T/A	2,4	2,0			
8-oxoG/A	81,5	24,4			
8-oxoG/fA	33,1	23,1			

Далее исследовали репарацию конструктов, содержащих урацил с замещенными фосфодиэфирными связями (sU, sUs). Урацил из ДНК в основном удаляют монофункциональные ДНК-гликозилазы UNG и SMUG1, и образовавшийся АП-сайт процессируется ферментом APEX1.

Олигонуклеотидные субстраты с U, sU и sUs эффективно процессируются UNG человека *in vitro*, в то время как АП-сайты, полученные из sU и sUs, более устойчивы к расщеплению APEX1, чем натуральный АП-сайт (рис. 9). Уровень ТМ для конструкторов с sUs был гораздо больше, чем для sU и U, из чего можно сделать вывод, что АП-сайт, который образовался в результате выщепления U, в значительной мере подвергается процессингу АП-лиазами (табл. 2). Несмотря на это, была показана статистически значимая разница в уровне ТМ для U по сравнению с А в нокауте 1С4. Таким образом, несмотря на то, что в системе, реконструированной из рекомбинантных белков и двуцепочечных олигонуклеотидных субстратов, была показана репарация с участием UNG/SMUG1 и APEX1, в живых клетках APEX1 нельзя считать абсолютно необходимым для гидролиза АП-сайтов в высокомолекулярных субстратах. Накапливаются данные, свидетельствующие о том, что взаимодействие белковых молекул может отличаться на олигонуклеотидных субстратах и субстратах, моделирующих хроматин.

Бифункциональные ДНК-гликозилазы обладают АП-лиазной активностью, поэтому могут участвовать в удалении АП-сайта, который образовался после выщепления урацила. В клетках человека известно пять бифункциональных ДНК-гликозилаз: NTHL1, OGG1, NEIL1, NEIL2 и NEIL3. OGG1 обладает слабой лиазной активностью. NEIL1 и NEIL2 способны процессировать АП-сайты, однако эти ферменты катализируют согласованное элиминирование 3'- и 5'-фосфатов, поэтому плохо подходят для репарации sU. NTHL1, с другой стороны, представляет собой эффективную АП-лиазу, которая катализирует β -элиминирование АП-сайта, образовавшегося после удаления основания. Исследований возможного вклада NTHL1 в репарацию АП-сайтов *in vivo* ранее не проводилось. В связи с этим плазмидные конструкторы с U, sU и sUs трансфицировали в клетки HeLa дикого типа и нокаута по *NTHL1*. Не было обнаружено статистически значимой разницы в уровне ТМ U и sUs между клетками дикого типа и нокаутом по гену *NTHL1* (табл. 2). Однако уровень ТМ sU в клетках с нокаутом *NTHL1* был значительно больше, чем в клетках дикого типа, и достигал сходного уровня с ТМ sUs, что свидетельствует о возможном вкладе NTHL1 в процессинг АП-сайтов, образующихся после удаления U.

Дальнейший процессинг 3'-концевого ненасыщенного фосфоальдегида с фосфоротиоатной группой после β -элиминирования, вероятно, происходит с образованием брешы с 5'-стороны от повреждения. В ходе этого процесса ДНК-геликаза RECQ1 расплетает несколько пар нуклеотидов с 5'-стороны от разрыва, оставшегося на месте повреждения, эндонуклеаза XPF-ERCC1 отщепляет образовавшийся 3'-концевой одноцепочечный фрагмент, и реакция далее протекает по длиннозаплаточной ветви BER.

Помимо своей АП-эндонуклеазной активности, APEX1 может стимулировать бифункциональную ДНК-гликозилазу OGG1 и, несмотря на то, что OGG1 обладает АП-лиазной активностью, «перехватывать» АП-продукт после удаления 8-охоГ и расщеплять его гидролитически. Для исследования эффективности репарации 8-охоГ в клетках, дефицитных по *APEX1*, были использованы конструкторы на основе pMR_Q205P и pMR_A207P, содержащие

8-охоG и s8-охоG. Использование двух конструкторов с этими повреждениями связано с разным нуклеотидным контекстом: в pMR_Q205P 8-охоG находится в контексте 5'-CXG-3', а в pMR_A207P — в контексте 5'-GXG-3'. У нокаутов 293FT *APEX1^{KO}* уровень ТМ 8-охоG был выше, чем у клеток дикого типа (табл. 2). Стоит отметить, что в клетках с нокаутом *APEX1* наблюдается статистически значимое увеличение уровня экспрессии *OGG1*. Таким образом, в клетках *APEX1^{KO}* происходит снижение эффективности репарации 8-охоG. Предположительно это происходит из-за того, что в отсутствие *APEX1* фермент *OGG1* ввиду своей слабой лиазной активности остается связанным с АП-продуктом долгое время.

Для исследования эффективности репарации 8-охоG в клетках, дефицитных по *OGG1*, использовали такие же плазмидные конструкторы, содержащие 8-охоG, s8-охоG и G. Уровень ТМ 8-охоG в нокауте A549 *OGG1^{KO}* оказался в 4 раза выше, чем в клетках дикого типа для обоих плазмидных конструкторов (табл. 2).

Для исследования эффективности репарации аденина напротив 8-охоG в клетках 293FT *MUTYH^{KO}* использовали плазмидные конструкторы на основе вектора pZAJ_5c, содержащего последовательность гена *EGFP* дикого типа. Олигонуклеотид с 8-охоG или контрольный с G вводили в кодирующую цепь, на следующем этапе вводили в транскрибируемую цепь олигонуклеотид с 2'-дезоксаденозином, олигонуклеотид с 2'-деокси-2'-фтораденозином (fA) и контрольный олигонуклеотид с C. Введение атома F в положение 2' дезоксирибозы приводит к блокированию активности всех ДНК-гликозилаз, включая *MUTYH*, в связи с чем конструкторы, содержащие 8-охоG:fA, выступают в качестве нерепарируемого контроля. Уровень ТМ для конструкторов с парой 8-охоG:A в клетках дикого типа был примерно в три раза выше, чем для нокаутов по *MUTYH* (табл. 2). Это связано с тем, что в клетках дикого типа функциональный *MUTYH* выщепляет A, и ДНК-полимераза включает dCMP напротив 8-охоG, что приводит к реактивации флуоресценции. В свою очередь уровень ТМ конструкторов с 8-охоG:A и 8-охоG:fA в клетках 293FT *MUTYH^{KO}* достигает сходных значений, что свидетельствует об отсутствии *MUTYH*-зависимой эксцизионной репарации.

6. Использование нокаутных клеточных линий по генам репарации ДНК для исследования механизмов репарации повреждений

Метоксиамин (МХ) — это небольшая органическая молекула, которая способна формировать аддукты с альдегидной формой АП-сайта. Такие аддукты с умеренной эффективностью расщепляются эндонуклеазой III, но не АП-эндонуклеазой человека или экстрактами клеток человека. МХ рассматривается как потенциальный противоопухолевый агент нового класса, сенситизирующий раковые клетки к повреждению ДНК за счет ингибирования BER, и в настоящее время находится на I–II фазах клинических испытаний в комбинации с традиционными средствами химиотерапии. До сих пор остается малоизученным механизм репарации аддуктов МХ с АП-сайтами на клеточном уровне. Для исследования эффективности репарации аддуктов МХ с АП-сайтами использовали конструкторы на основе плазмиды pZAJ_Q205*. Протокол

получения таких конструкторов включал несколько стадий: 1) в транскрибируемую цепь вводили U, sU или sUs, 2) обрабатывали UNG для получения АП-сайта, 3) инкубировали с МХ. Полученные конструкторы трансфицировали в клетки HeLa дикого типа и HeLa с нокаутом гена *NTHL1*. В качестве контролей использовали плазмидные конструкторы с исходной последовательностью нефлуоресцирующего варианта EGFP, и конструкторы с THF и sF. Уровень ТМ аддуктов МХ оказался примерно равным ТМ отрицательного контроля в клетках дикого типа (рис. 11). Таким образом, аддукты МХ эффективно подвергаются репарации, несмотря на ингибирование APX1. При введении одной 5'-фосфоротиоатной группы наблюдается увеличение уровня ТМ аддуктов МХ, что снова свидетельствует о репарации этого типа повреждений АП-эндонуклеазой либо АП-лиазами с дальнейшим процессингом, зависимым от 5'-фосфата. Стоит отметить, что уровень ТМ аддуктов sMX меньше, чем sF, и, вероятно, больший вклад в их репарацию вносят именно АП-лиазы. Уровень ТМ МХ в клетках с нокаутом гена *NTHL1* был примерно на порядок выше, чем в клетках дикого типа, что свидетельствует об эффективности *NTHL1*-зависимой репарации аддуктов МХ с АП-сайтами.

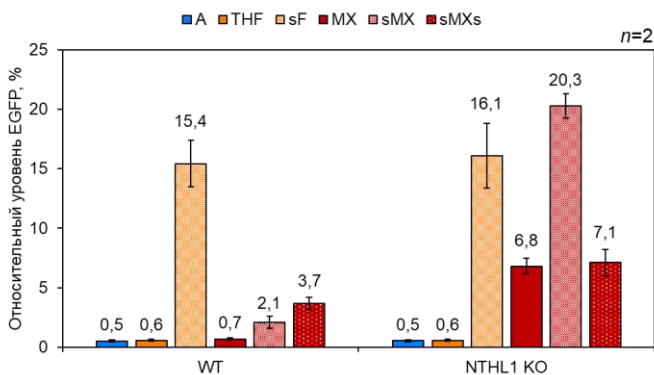


Рисунок 11. Исследование репарации THF, sF, MX, sMX и sMXs в клетках дикого типа и нокауте по *NTHL1* с использованием конструкторов на основе pZAJ_Q205*. Приведена диаграмма с данными по уровню ТМ для конструкторов, содержащих А, THF, SF, MX, sMX и sMXs. Данные 2 независимых экспериментов представлены как среднее и стандартное отклонение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы были получены клеточные линии — производные иммортализованных клеток 293FT, происходящих из эмбрионального надпочечника человека, с нокаутами генов ДНК-гликозилаз OGG1 и MUTYH, основной АП-эндонуклеазы APX1 и ДНК-полимеразы β, а также двойной нокаут по генам основной и минорной АП-эндонуклеаз APX1 и APX2. Генные нокауты *APX1* и *POLB* летальны при наследовании по зародышевой линии, а инактивирующие мутации в генах *OGG1* и *MUTYH* ведут к высокому риску развития злокачественных опухолей легкого и кишечника. Следует

отметить, что на момент начала работы не существовало клеточных линий человека, дефицитных по гену *APEX1*. Изогенные панели клеток, дефицитных по генам репарационных путей, представляют собой удобную модель как для решения исследовательских задач, так и для биофармацевтической промышленности. Возможное практическое применение таких клеток заключается в создании на их основе платформ для высокопроизводительного скрининга и оценки генотоксичности новых химических соединений и фармацевтических препаратов. В таких подходах уже используют панели на основе клеток китайского хомячка CHO и куриных клеток DT40, но удобных наборов человеческих клеток пока нет. Стоит отметить, что система CRISPR/Cas9 позволяет, помимо получения нокаутных клеточных линий, создавать модели с точечными заменами, воспроизводящими природные полиморфизмы. Это в свою очередь позволит анализировать генотоксичность препаратов с учетом природной вариабельности по генам репарации.

Гены-репортеры, подходящие для прямого обнаружения последствий наличия повреждений ДНК, дают в руки исследователям мощный инструмент для изучения мутагенеза и репарации ДНК в живой клетке. В ходе работы был проведен систематический фенотипический скрининг несинонимичных замен в последовательности ДНК, кодирующей функционально важную область усиленного зеленого флуоресцентного белка (EGFP). В результате были обнаружены четыре мутации, приводящих к потере флуоресценции EGFP с возможностью ее восстановления при любой замене в этих позициях. Было показано, что при наличии в этих позициях повреждений ДНК, которые способны направлять ошибочное включение нуклеотидов РНК-полимеразой, такие события (транскрипционный мутагенез) могут обнаруживаться в клетках за счет появления флуоресценции. Для исследования механизмов репарации ДНК оказалось крайне важна возможность включения в такие репортерные конструкции нуклеотидов с модификациями, затрудняющими удаление повреждений. Из таких модификаций в исследовании использовались фосфоротиоатные межнуклеозидные связи и введение атома фтора по 2'-положению дезоксирибозы.

Из созданных в работе клеток подробнее всего охарактеризованы две моноклональные линии с нокаутом гена *APEX1*. Подтверждено отсутствие в них аллелей дикого типа, сниженный уровень мРНК, отсутствие иммунореактивности с антителами на белок APEX1, отсутствие способности экстрактов из таких клеток расщеплять альдегидный АП-сайт и его тетрагидрофурановый аналог (ТНФ) и инициировать цикл BER *in vitro*, повышенная чувствительность к алкилирующему агенту метиламетансульфонату и повышенный уровень спонтанно образующихся АП-сайтов в геномной ДНК. Тем не менее, клеточный цикл у таких клеток не затронут, и морфологически они не отличаются от клеток дикого типа. Еще удивительнее оказалось то, что при исследовании репарации *in vivo* клетки были способны эффективно репарировать как ТНФ, так и АП-сайты, возникающие при удалении урацила внутри клетки. Это говорит о существовании

дублирующих путей, позволяющих обойти APEX1, несмотря на его ключевую роль в пути BER.

Один из таких путей, который удалось обнаружить в работе, зависит от АП-лиазной активности фермента NTHL1 — ДНК-гликозилазы, удаляющей окисленные пиримидиновые основания. После удаления основания NTHL1 катализирует разрыв цепи ДНК с 3'-стороны от образованного АП-сайта по механизму β -элиминирования, в отличие от эндонуклеазы APEX1, которая расщепляет ДНК с 5'-стороны от АП-сайта по гидролитическому механизму. В отсутствие NTHL1 АП-сайты в клетке репарируются нормально, но при дополнительном блокировании активности APEX1 уровень транскрипционного мутагенеза в репортерной системе возрастает, указывая на затрудненную репарацию. Белок NTHL1 также оказался ответственным за удаление аддуктов АП-сайта с метоксиамином — небольшой молекулой, которая ингибирует BER путем присоединения к альдегидной форме АП-сайта, что делает его устойчивым к действию APEX1. Примечательно, что мутации в гене *NTHL1* у человека вызывают наследственный аденоматозный полипоз, с высокой вероятностью переходящий в колоректальный рак, несмотря на существование нескольких других ДНК-гликозилаз для репарации окисленных пиримидиновых оснований. Не исключено, что АП-лиазная активность NTHL1 и некоторых других ДНК-гликозилаз, которая обычно рассматривается как не имеющая биологического значения, на самом деле важна для системы BER.

ВЫВОДЫ

1. С помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 на основе клеточной линии 293FT впервые получена панель изогенных клеточных линий человека неопухолового происхождения, дефицитных по отдельным генам системы эксцизионной репарации оснований ДНК (BER): *APEX1*, *POLB*, *OGG1* и *MUTYH*, и по комбинации генов *APEX1 APEX2*. Также получена клеточная линия A549, дефицитная по гену *OGG1*. Генотипирование полученных линий показывает полное отсутствие аллелей дикого типа.
2. Устойчивость клеток 293FT к алкилирующему агенту метилметансульфонату зависит от наличия функциональной апурин-апиримидиновой (АП-) эндонуклеазы APEX1 и ДНК-полимеразы β , но не от минорной АП-эндонуклеазы APEX2. Устойчивость к окисляющим агентам KBrO_3 и H_2O_2 не зависит от наличия APEX1, ДНК-полимеразы β и аденин-ДНК-гликозилазы MUTYH.
3. Нуклеотидные замены с.613C>T, с.614A>C, с.617C>A и с.619G>C в кодирующей последовательности гена зеленого флуоресцирующего белка (*EGFP*) приводят к синтезу нефлуоресцирующих вариантов белка Q205*, Q205P, S206Y и A207P соответственно. Введение в эти позиции повреждений ДНК дает возможность детектировать события транскрипционного мутагенеза — ошибочного включения рибонуклеотидов РНК-полимеразой в ходе транскрипции.

4. В нокаутных по гену *APEX1* клеточных линиях отсутствует АП-эндонуклеазная активность *in vitro*, однако эти клетки способны осуществлять репарацию урацила, 8-оксогуанина (8-охоG) и тетрагидрофуранового аналога АП-сайта (ТНФ), что говорит о существовании дублирующих путей ВЕР, не зависящих от фермента АРЕХ1. Белок АРЕХ2 не вносит вклада в репарацию ТНФ в клетке. В клетках, дефицитных по генам 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазы (*OGG1*) или *MUTYH*, система репарации 8-охоG нефункциональна, что указывает на основную роль белков *OGG1* и *MUTYH* в инициации репарации 8-охоG.
5. В отсутствие АП-эндонуклеазы АРЕХ1 АП-лиазная активность бифункциональной ДНК-гликозилазы *NTHL1* способна расщеплять АП-сайты, образовавшиеся после действия монофункциональных ДНК-гликозилаз. Кроме того, с участием *NTHL1* протекает репарация аддуктов АП-сайтов с метоксиамином.

Основные результаты диссертации опубликованы в работах:

1. **Kim D. V.**, Kulishova L. M., Torgasheva N. A., Melentyev V. S., Dianov G. L., Medvedev S. P., Zakian S. M., Zharkov D. O. Mild phenotype of knockouts of the major apurinic/apyrimidinic endonuclease APEX1 in a non-cancer human cell line // PLoS ONE. – 2021. – V. 16. – No. 9. – Article No. e0257473.
2. Rodriguez-Alvarez M., **Kim D.**, Khobta A. EGFP reporters for direct and sensitive detection of mutagenic bypass of DNA lesions // Biomolecules. – 2020. – V. 10. – No. 6. – Article No. 902.
3. **Kim D. V.**, Diatlova E. A., Zharkov T. D., Melentyev V. S., Yudkina A. V., Endutkin A. V., Zharkov D. O. Back-up base excision DNA repair in human cells deficient in the major AP endonuclease, APE1 // Int. J. Mol. Sci. – 2024. – V. 25. – No. 1. – Article No. 64.