

**РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ**

**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»**

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

ДИССЕРТАЦИЯ

**на соискание ученой степени
кандидата биологических наук**

Научный руководитель:

Доктор биологических наук, чл.-корр. РАН Жарков Д. О.

Новосибирск - 2024

Оглавление

Введение.....	5
Глава 1. Обзор литературы.....	9
1.1. Механизм эксцизионной репарации оснований.....	9
1.3. Клеточные линии и мышинные модели, дефицитные по генам эксцизионной репарации оснований.....	11
1.3.1. Урацил-ДНК-гликозилаза (UNG)	12
1.3.2. Т:G-специфичная тимин-ДНК-гликозилаза (TDG).....	13
1.3.3. Монофункциональная урацил ДНК-гликозилаза 1, специфичная к одноцепочечной ДНК (SMUG1).....	14
1.3.4. CpG-специфичная Т/U:G-ДНК-гликозилаза (MBD4).....	14
1.3.5. Эндонуклеаза III-подобный белок 1 (NTHL1)	15
1.3.6. 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (OGG1)	16
1.3.7. Гомолог MutY (MUTYH).....	19
1.3.8. N-метилпурин ДНК-гликозилаза (MPG).....	21
1.3.9. Эндонуклеаза VIII-подобный белок 1 (NEIL1)	21
1.3.10. Эндонуклеаза VIII-подобный белок 2 (NEIL2)	22
1.3.11. Эндонуклеаза VIII-подобный белок 3 (NEIL3)	23
1.3.12. АП-эндонуклеазы (APEX1, APEX2)	23
1.3.13. ДНК полимеразы β (POL β).....	27
1.3.14. Флэп-эндонуклеаза 1 (FEN1)	30
1.3.15. ДНК-лигаза I (LIG1).....	31
1.3.16. ДНК-лигаза III α (LIG3).....	32
1.3.17. XRCC1	33
1.3.18. Поли(АДФ-рибоза) полимеразы 1 (PARP1)	34
1.4. Использование клеточных линий, дефицитных по генам репарации ДНК	35
1.4.1. Системы для оценки генотоксичности соединений на основе клеточных линий, дефицитных по генам репарации ДНК	35
1.4.2. Репортерные системы для исследования механизмов репарации повреждений на основе клеточных линий, дефицитных по генам репарации ДНК	38
1.5. Получение клеточных линий и мышинных моделей с генными модификациями.....	41
1.5.1. Использование гомологичной рекомбинации для получения генной модификации.....	41
1.5.2. Использование геномного редактирования CRISPR/Cas9 для получения генной модификации	43
1.6. Клеточные линии 293 и A549	45
1.7. Заключение	47

Глава 2. Экспериментальная часть	48
2.1. Материалы	48
2.1.1. Реактивы.....	48
2.1.2. Клеточные линии.....	48
2.1.3. Штаммы бактерий и плазмиды	48
2.1.4. Стандартные буферы и растворы	49
2.1.5. Ферменты и антитела.....	50
2.1.6. Олигонуклеотиды.....	50
2.2. Методы	53
2.2.1. Получение нокаутных клеточных линий.....	53
2.2.2. ТА-клонирование	54
2.2.3. ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени	55
2.2.4. Получение белковых экстрактов из эукариотических клеток	55
2.2.5. Иммуноблотинг	56
2.2.6. Получение двуцепочечных олигонуклеотидных субстратов	57
2.2.7. Введение радиоактивной метки по 5'-концу олигонуклеотидов.....	57
2.2.8. Исследование ферментативной активности в клеточных экстрактах.....	57
2.2.9. Исследование BER <i>in vitro</i>	58
2.2.10. Исследование активности ферментов по отношению к субстратам, содержащим U, sU, sUs.....	58
2.2.11. Исследование клеточного цикла и времени удвоения клеточной популяции	59
2.2.12. Оценка уровня АП-сайтов.....	59
2.2.13. Исследование выживаемости клеток	59
2.2.14. Получение плазмидных конструктов, содержащих повреждения	60
2.2.13.1. Получение плазмид, содержащих два одноцепочечных разрыва	60
2.2.13.2. Получение конструктов, содержащих одноцепочечную брешь.....	60
2.2.13.3. Вставка олигонуклеотида с повреждением	60
2.2.13.4. Получение плазмид с АП-сайтом и аддуктами МХ.....	61
2.2.13.5. Подтверждение наличия повреждения	61
2.2.15. Оценка уровня транскрипционного мутагенеза.....	62
Глава 3. Результаты и обсуждение	63
3.1. Получение клеточных линий, нокаутных по генам BER, с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9.....	63
3.1.1. Нокауты по гену <i>APEX1</i>	63
3.1.2. Нокауты по гену <i>APEX2</i>	67

3.1.3. Нокауты по гену <i>POLB</i>	70
3.1.4. Нокауты по гену <i>OGGI</i>	74
3.1.5. Нокауты по гену <i>MUTYH</i>	78
3.2. Характеристика клеток, дефицитных по гену <i>APEX1</i>	81
3.2.1. Оценка эффективности BER в клеточных экстрактах 293FT <i>APEX1^{KO}</i>	81
3.2.2. Фенотипическая характеристика клеток 293FT <i>APEX1^{KO}</i>	85
3.3. Характеристика клеток, дефицитных по <i>APEX1</i> и <i>APEX2</i>	88
3.4. Характеристика клеток, дефицитных по <i>POLB</i>	89
3.5. Характеристика клеток, дефицитных по <i>MUTYH</i>	90
3.6. Исследование эффективности BER в клетках человека, нокаутных по генам BER	90
3.6.1. Расширение репертуара репортерных конструкторов для исследования систем репарации <i>in vivo</i>	90
3.6.2. Получение плазмидных конструкторов с повреждениями	95
3.6.3. Оценка эффективности репарации повреждений в клетках 293FT <i>APEX1^{KO}</i>	97
3.6.4. Оценка эффективности репарации повреждений в клетках A549 <i>OGGI^{KO}</i>	102
3.6.5. Оценка эффективности репарации повреждений в клетках 293FT <i>MUTYH^{KO}</i>	103
3.7. Использование нокаутных клеточных линий по генам репарации ДНК для исследования механизмов репарации повреждений	104
Заключение	106
Выводы	109
Список сокращений и условных обозначений	110
Список литературы	111
Приложение 1	144

Введение

Многие эндогенные и экзогенные факторы приводят к появлению в ДНК повреждений [1]. 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) [2]. В основном этот процесс отвечает за исправление небольших повреждений оснований, которые зачастую не приводят к значительному искажению вторичной структуры ДНК, а также апурин-апириимидиновых сайтов (АП-сайтов) и одноцепочечных разрывов. К наиболее распространенному типу окислительных повреждений в ДНК, репарацию которого осуществляют ферменты BER, относят 8-оксогуанин [3]. 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-апириимидиновая эндонуклеаза 1 (APEX1) и ДНК-полимераза β (POL β) [4].

Нарушения в системе BER связаны с риском развития онкологических и нейродегенеративных заболеваний. Для некоторых генов системы BER (*MBD4*, *NTHL1*, *MUTYH*) известны высокопенетрантные наследственные мутации, приводящие к развитию злокачественных новообразований, для других же (*MBD4*, *OGG1*) показана эпидемиологическая ассоциация вариантов генов с повышенным риском онкологических заболеваний. В частности, показано, что некоторые мутации в гене *OGG1* ассоциированы с риском развития рака легкого [5].

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 [6]. 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 [7]. 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 [8]. 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 [9].

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 метоксиаминина 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-2022: 13th International Multiconference «Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/Systems Biology» (Новосибирск, 2022).

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

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.

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.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Механизм эксцизионной репарации оснований

Геном человека постоянно подвергается действию различных факторов окружающей среды и эндогенных факторов, которые могут приводить к повреждениям в ДНК. К таким факторам относят реакции гидролиза, окисления и метилирования активными интермедиатами клеточного метаболизма, генотоксичные ксенобиотики и их метаболиты, повреждения от ультрафиолетового (УФ)-излучения и ионизирующего излучения, ошибки ферментов, ответственных за репликацию ДНК и ее модификацию. Оценки количества повреждений в клетках млекопитающих сильно варьируют, но можно сказать, что общее количество повреждений на клетку в день составляет 10^5 – 10^6 [10–13]. Для того, чтобы поддерживать стабильность генома при постоянных повреждениях ДНК, клетки обладают несколькими частично перекрывающимися путями репарации ДНК и чувствительной системой, детектирующей повреждения. Неспособность исправить повреждения в ДНК приводит к развитию различных патологий: новообразований, нейродегенеративных заболеваний, нарушений иммунитета, старению [12, 14, 15].

Большинство эндогенных повреждений ДНК — это небольшие повреждения азотистых оснований, возникающие из-за гидролиза, дезаминирования, окисления и метилирования. Такие повреждения в основном удаляются системой эксцизионной репарации оснований (BER). Полный цикл BER состоит из пяти стадий [16, 17]: 1) удаление азотистого основания и образование апурин-апиридинового (АП-) сайта, 2) расщепление ДНК по АП-сайту, 3) включение одного или нескольких нуклеотидов по матрице неповрежденной цепи ДНК, 4) удаление 2'-дезоксирibo-5'-фосфата или нависающего одноцепочечного участка (флэпа), 5) лигирование разрыва (Рисунок 1).

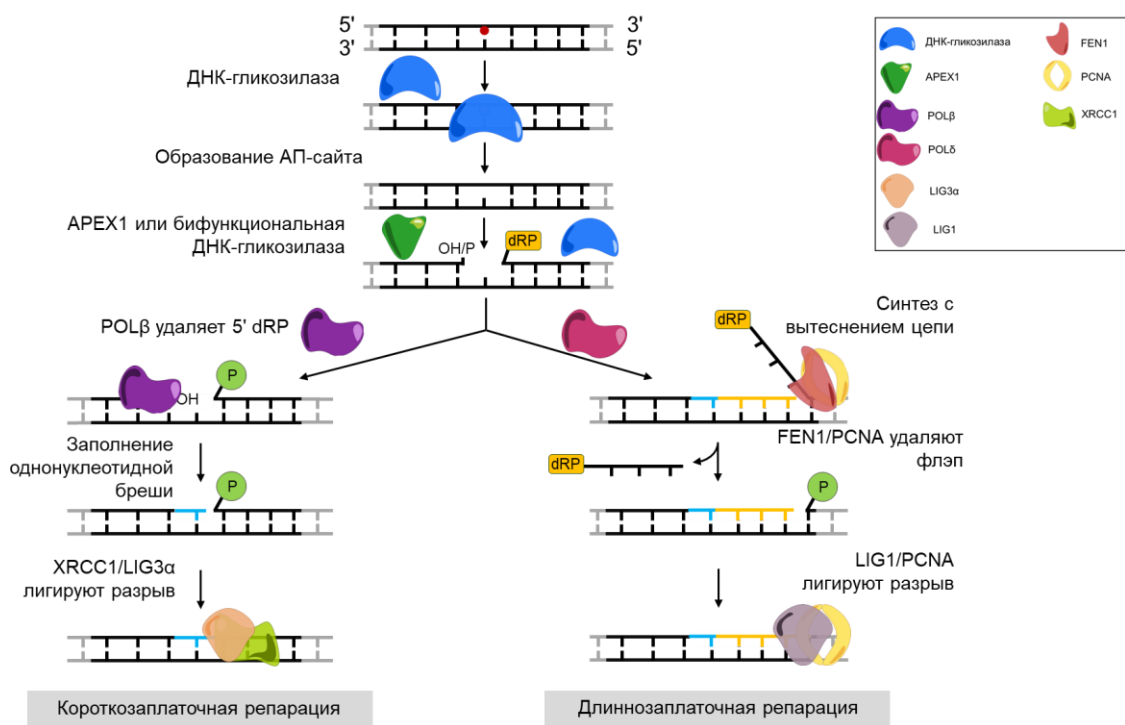


Рисунок 1. Общая схема эксцизионной репарации оснований.

При наличии повреждения в азотистом основании ДНК цикл BER инициируется ДНК-гликозилазами — ферментами, которые узнают поврежденные основания в ДНК и гидролизуют их *N*-гликозидную связь. В клетках человека насчитывается 11 ДНК-гликозилаз, специфичных к определенным типам повреждений. Монофункциональные ДНК-гликозилазы выщепляют только азотистое основание, в то время как бифункциональные ДНК-гликозилазы также могут расщеплять фосфодиэфирную связь путем β - или β,δ -элиминирования [16]. Продукт ДНК-гликозилазной реакции — АП-сайт — расщепляется АП-эндонуклеазой, которая у человека представлена белком АРЕХ1 (в литературе также встречаются другие названия этого фермента — АРЕ1, НАР1, Ref-1). АРЕХ1 также обладает 3'-фосфодиэстеразной активностью, которая удаляет 3'-концевой остаток 2-гидрокси-5-оксопент-3-енил-1-фосфата (т. н. 3'-концевой ненасыщенный фосфоальдегид, 3'-PUA), образовавшийся после β -элиминирования. Кроме того, АРЕХ1 может вытеснять ДНК-гликозилазу сразу после выщепления азотистого основания, таким образом предотвращая β -элиминирование. Неповрежденный нуклеотид обычно включает ДНК-полимераза β (POL β) [18]. После этой стадии BER можно разделить на две ветви: короткозаплаточную и длиннозаплаточную. В этих клеточных процессах принимают участие: 1) различные ДНК-полимеразы, 2) ферменты, удаляющие вытесняемую ДНК (лиазный домен POL β при короткозаплаточной BER, либо эндонуклеаза FEN1 при длиннозаплаточной) и 3) различные ДНК-лигазы (либо LIG III α при короткозаплаточной BER, либо LIG I при длиннозаплаточной [19, 20]). В зависимости от природы повреждения и ДНК-гликозилазы, которая инициировала процесс репарации, существуют альтернативные пути BER, например, «инцизионная репарация

нуклеотидов», когда АП-эндонуклеаза сразу гидролизует ДНК с 5'-стороны от нуклеотида с поврежденным основанием без привлечения ДНК-гликозилазы [21], или АРЕХ1-независимая репарация, которая инициируется ДНК-гликозилазами, выполняющими β,δ -элиминирование, и требует участия полинуклеотидкиназы/3'-фосфатазы РНКР для удаления 3'-концевого фосфата [22]. В процессе BER также участвует несколько дополнительных белков: адапторный белок XRCC1, который способствует сборке временного комплекса репарации, PARP1 — сенсор разрывов в ДНК, и PCNA — фактор процессивности и обмена белков репликативного комплекса. Некоторые белки играют более специализированную роль в BER: например, эндо/экзонуклеаза АРЕХ2 вовлечена в процессинг 3'-PUA, а тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1) может участвовать в репарации восстановленных АП-сайтов и других генотоксичных интермедиатов BER.

Помимо основной функции BER в защите генома от повреждений, в последние годы появились данные о роли этой системы в активном эпигенетическом деметилировании ДНК в клетках млекопитающих, а также в процессах соматического гипермутагенеза и переключения классов при созревании антител в клетках иммунной системы. В первом случае происходит направленное окисление эпигенетической метки — 5-метилцитозина (mC) оксигеназами семейства TET, и модифицированное основание удаляется в ходе BER, инициируемой тимин-ДНК-гликозилазой TDG [23, 24]. При соматическом гипермутагенезе и переключении классов антител в предшественниках В-клеток имеет место направленное дезаминирование цитозина в генах иммуноглобулинов, после чего урацил-ДНК-гликозилаза (UNG) запускает цикл BER с высоким уровнем ошибок при включении dNMP неканоническими ДНК-полимеразами [25, 26].

1.3. Клеточные линии и мышинные модели, дефицитные по генам эксцизионной репарации оснований

Большой вклад в исследование биологической роли репарации ДНК внесли клеточные линии позвоночных. В частности, для исследования роли NER использовали клетки, полученные из биоматериала пациентов с редким генетическим заболеванием — пигментной ксеродермой, также с помощью этих клеток была создана концепция групп комплементации наследственных заболеваний человека, когда несколько генов контролируют проявление фенотипа [27, 28]. Наследственные заболевания, вызванные мутациями в генах, вовлеченных в NER, MMR, HR, репарацию негомологичного воссоединения концов (NHEJ) и ответ на повреждения ДНК, дали большое число клеточных линий, которые тщательно исследовались в лабораториях всего мира. Однако получить дефицитные клеточные линии по генам BER таким образом удастся редко в связи с тем, что мутации в генах системы BER либо приводят к эмбриональной гибели, либо имеют низкую пенетрантность. Для исследования роли этой репарационной системы в клетке использовали либо клеточные линии и мышинные модели со сниженным уровнем экспрессии

исследуемого гена, либо нокаутные модели в зависимости от влияния мутаций в этих генах на жизнеспособность эмбрионов [6]. Помимо этого, с развитием технологий геномного редактирования появились коммерчески доступные панели нокаутных окологаплоидных клеточных линий HAP1 (клетки от пациента с хроническим миелолейкозом), полученных с помощью CRISPR/Cas9 [29], панель клеток HeLa со стабильным подавлением экспрессии гена-мишени [30], а также панели трансгенных мыших эмбрионов и эмбриональных стволовых клеток (Приложение 1). Однако такие клеточные линии и мышинные модели обычно охарактеризованы только на наличие мутации в исследуемом гене. Далее будут рассмотрены только хорошо охарактеризованные клеточные линии и трансгенные организмы.

1.3.1. Урацил-ДНК-гликозилаза (UNG)

UNG — это монофункциональная ДНК-гликозилаза, ответственная за удаление урацила из ДНК. В связи с тем, что урацил может появиться в ДНК как вследствие дезаминирования цитозина, так и при включении dUMP из пула нуклеотидов, UNG имеет низкую специфичность к контексту и выщепляет урацил из любой пары спаренных оснований и даже из одноцепочечной ДНК [31, 32]. Ген *UNG* человека имеет два альтернативных промотора, что приводит к образованию двух изоформ: митохондриальной и ядерной, которые называют UNG1 и UNG2, соответственно [33–35]. Эти белки имеют разные N-концевые фрагменты, но общую каталитическую часть и почти неотличимы по ферментативным свойствам. Современные методы геномного редактирования позволили создать клеточные линии, экспрессирующие определенные изоформы UNG. С помощью таких клеточных линий было, в частности, показано, что UNG1 локализуется не только в митохондриях, но и в ядре и способствует переключению классов антител и репарации урацила в геномной ДНК. Помимо этого, оказалось, что изоформа UNG1 способна репарировать урацил в геномной ДНК клеток человека [36].

Вскоре после обнаружения центральной роли белка UNG в созревании генов иммуноглобулинов было показано, что недостаточность UNG у человека вызывает синдром гипер-IgM, который характеризуется повышенной восприимчивостью к инфекциям из-за сниженной способности к переключению классов иммуноглобулинов [37]. От таких пациентов были получены клеточные линии лимфоцитов, которые активно используются в молекулярной иммунологии. Мутации, обнаруженные у пациентов, представляют в основном мутации сдвига рамки считывания, но одна из аминокислотных замен, F251S, приводит к образованию белка UNG2, который неправильно направляется в митохондрии вместо ядра [38].

Двумя группами исследователей были получены нокаутные мышинные модели, в которых производили нацеливание генетических конструкций на разные экзоны гена *Ung* [39, 40]. Как и ожидалось, у этих животных имеются нарушения иммунной системы, включая подавление

диверсификации генов иммуноглобулинов, несбалансированную популяцию лейкоцитов и В-клеточные лимфомы в зрелом возрасте [41–43]. В дополнение к этому у таких мышей есть нарушения центральной нервной системы, в том числе высокая чувствительность к ишемии и нехватке фолиевой кислоты [40, 44]. Отмечено, что увеличенная экспрессия цитидиновой дезаминазы AID у мышей *Ung*^{-/-} приводит к образованию лимфом [45]. Для клеточных линий мышинных эмбриональных фибробластов (MEF), полученных от таких животных, характерна сниженная репарация урацила; остаточная урацил-ДНК-гликозилазная активность приписывается ДНК-гликозилазе SMUG1 [39, 46]. Не были получены клеточные линии лимфоцитов от мышей *Ung*^{-/-}. Большинство исследований сделано на первичных В-клетках или клетках-предшественниках, также удалось получить гибридомы *Ung*^{-/-} [47].

Клеточная линия куриных лимфоцитов DT40 широко используется для изучения биологии генов иммуноглобулинов, так как в ней происходит постоянная генная конверсия и соматический гипермутагенез. Путем стабильной экспрессии Ugi — белка фага PBS2, который связывает и ингибирует бактериальную и человеческую UNG — была получена производная линия DT40X2U [48]. В этих клетках уменьшена частота мутаций в переменных районах генов IgG, и паттерн замен сдвинут в сторону транзиций С→Т, что ожидаемо из-за неправильной репарации урацила. Традиционные методы получения нокаута гена *UNG* в лимфоцитах имели похожие последствия [49]. Экспрессия Ugi также использовалась для стабильного подавления *Ung* в клеточной линии В-лимфомы мыши CH12F3 [50].

На клеточных линиях 293 и MCF10A, нокаутных по гену *UNG*, было продемонстрировано, что индукция экспрессии цитидиндезаминазы APOBEC3B приводит к клеточной смерти. Для проявления синтетической летальности необходим функциональный белок p53 и MMR [51].

1.3.2. Т:G-специфичная тимин-ДНК-гликозилаза (TDG)

TDG участвует в процессе активного деметилирования ДНК. У позвоночных этот процесс начинается с окисления метильной группы mC до гидроксиметилцитозина диоксигеназами TET1, TET2 и TET3 с последующим окислением до формил- и карбоксилцитозина [23, 24, 52]. Эти интермедиаты также могут быть дезаминированы белками семейства AID и APOBEC. Все производные mC, за исключением гидроксиметилцитозина, подвергаются BER с восстановлением цитозина.

В связи с тем, что активное деметилирование у эукариотических организмов начинается с самых первых моментов после оплодотворения, инактивация генов, кодирующих белки BER, участвующие в стадиях после ДНК-гликозилаз, обычно приводят к эмбриональной смертности. TDG — это единственная ДНК-гликозилаза, которая демонстрирует такой же летальный фенотип у нокаутных мышей, эмбрионы погибают на 11,5 день развития из-за обширного некроза [53].

Иммортализованные MEF демонстрируют глобальные изменения в профиле экспрессии генов и неправильное метилирование промоторов, которое может быть частично восстановлено эктопической экспрессией каталитически активного TDG, в то время как эмбриональные стволовые клетки не могут изменить профиль экспрессии генов при дифференцировке [53, 54].

Для исследования роли Tdg использовали мышинные модели с индуцированным нокаутом на восьмой неделе после рождения, у таких мышей образуются злокачественные опухоли, в первую очередь гепатоцеллюлярные карцины. Помимо это у этих организмов наблюдаются симптомы, ассоциированные с метаболическим синдромом, включая набор веса, высокий уровень глюкозы в крови и накопление желчных кислот с возрастом [55].

Нокаут гена *TDG* в клеточной линии аденокарциномы молочной железы MCF7 приводит к увеличению чувствительности клеток к тамоксифену (агонист эстрогеновых рецепторов) и в то же время к увеличению миграции клеток и их инвазии [56]. Нокаун экспрессии гена *TDG* в клетках меланомы приводит к аресту клеточного цикла и клеточной смерти [57].

1.3.3. Монофункциональная урацил ДНК-гликозилаза 1, специфичная к одноцепочечной ДНК (SMUG1)

Несмотря на свое название, белок SMUG1 не специфичен к одноцепочечной ДНК, как это было предположено в момент его открытия [46, 58, 59]. SMUG1 иногда может заменять UNG или действовать в особых случаях активного деметилирования, однако в целом роль SMUG1 в клетке не очевидна [60]. Мыши с нокаутом по гену *Smug1* и культивируемые эмбриональные фибробласты этих животных не имеют выраженного фенотипа. Животные с двойным нокаутом *Ung^{-/-} Smug1^{-/-}* накапливают значительный уровень урацила в геномной ДНК, но не предрасположены к злокачественным новообразованиям и имеют нормальную продолжительность жизни [61, 62].

Было показано, что клеточная линия гепатоцеллюлярной карциномы HepG2 с нокаутом *SMUG1* менее жизнеспособна, чем клетки дикого типа [63]. Клетки HAP1 с нокаутом *SMUG1* имеют значительно укороченные теломеры, что не связано с участием SMUG1 в BER, а обусловлено недостаточным уровнем зрелой теломерной РНК для поддержания теломеразной активности. Предполагается, что именно этим обусловлено нарушение пролиферации клеток костного мозга у мышей *Smug1^{-/-}* [64]. Нокаун *SMUG1* в клеточной линии U2OS снижает чувствительность клеток к обработке 5-гидроксиметилуридином, что указывает на более высокую токсичность интермедиатов репарации, чем самого 5-гидроксиметилуридина [65].

1.3.4. CpG-специфичная T/U:G-ДНК-гликозилаза (MBD4)

Белок MBD4 участвует в репарации продуктов дезаминирования в CpG-динуклеотидах. Он содержит отдельный домен (MBD) для узнавания mC и, вероятно, вовлечен в процесс

эпигенетического деметилирования и предотвращение мутаций в сайтах CpG [66, 67]. Получено несколько нокаутных мышинных моделей с изменениями в разных участках гена *Mbd4*. Такие мыши не имеют выраженного фенотипа, кроме увеличенной частоты мутаций [68–70]. Интересно, что MEF *Mbd4*^{-/-} менее чувствительны к различным агентам, повреждающим ДНК, включая метилнитронитрозогуанидин, оксалиплатин, иринотекан и 5-фторурацил [69], на основании чего можно предположить, что накопление интермедиатов репарации, инициируемой *Mbd4*, более токсично, чем исходные повреждения. Мыши с нокаутом *Mbd4* по экзонам 1–3 гибнут на эмбриональной стадии, однако это оказалось следствием нарушения структуры гена *Ift122*, который кодирует белок, вовлеченный в формирование клеточных ресничек, и частично перекрывается с *Mbd4* в мышинном геноме [70]. Двойной нокаут генов *Mbd4* и *Apc* на мышинных моделях приводит к увеличению количества опухолей в желудочно-кишечном тракте и ускоряет прогрессию рака [71]. Таким образом, инактивация *Mbd4* сама по себе не приводит к развитию раковых заболеваний у мышей, но она может изменить спектр мутаций и увеличить предрасположенность к раку на фоне инактивации других генов. В частности, показано, что двойной нокаут *Mlh1* (участник MMR) и *Mbd4* имеет сниженную выживаемость и более высокий риск развития лимфом, чем нокаут по *Mlh1* [72]. Недавно было обнаружено, что инактивирующие мутации в гене *MBD4* у человека служат причиной наследственного синдрома предрасположенности к множественным неоплазиям типа 2 [73–75], однако клеточные линии из таких пациентов охарактеризованы не были.

Стоит отметить, что нокаут гена *Mbd4* также был получен на клеточной линии В-лимфоцитов мыши CH12 [76]. Линии HAP1 и увеальной меланомы, нокаутные по гену *MBD4*, чувствительны к химиотерапевтическим препаратам гемцитабину и цитарабину, которые представляют собой аналоги цитидина [77].

1.3.5. Эндонуклеаза III-подобный белок 1 (NTHL1)

Белок NTHL1 удаляет из ДНК окисленные пиримидины [78, 79]. Инактивирующие мутации в гене *NTHL1* приводят к развитию семейного аденоматозного полипоза и колоректального рака [80–82]. Также было показано, что пациенты с мутациями в обоих аллелях гена *NTHL1* имеют риск развития многочисленных опухолей за пределами толстого кишечника [83]. Мыши, нокаутные по гену *Nthl1*, не отличаются от мышей дикого типа, и установлено, что белки NEIL1 и NEIL2 могут заменять NTHL1 в репарации окисленных пиримидинов [84–87]. MEF, полученные от мышей с заменой в гене *Nthl1*, приводящей к аминокислотной замене D227Y (у человека D239Y), менее жизнеспособны в условиях нормоксии, а также при обработке менадионом, в связи с образованием окислительных повреждений. Наблюдаемое влияние этого варианта *Nthl1* связано с тем, что белок сохраняет способность узнавать и связываться с ДНК, но

не способен катализировать удаление поврежденного основания, тем самым блокируя репарацию повреждений другими ферментами [88].

В недавнем исследовании с помощью клеточной линии HeLa *NTHL1*^{-/-} была показана центральная роль NTHL1 в репарации тимингликоля — окислительного повреждения, индуцируемого ионизирующим облучением [89].

1.3.6. 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза (OGG1)

8-охоG — основное предмутагенное повреждение ДНК, возникающее под действием активных форм кислорода. Такое поврежденное основание способно образовывать пары не только с C, но и с A, что приводит к включению dAMP напротив 8-охоG во время репликации и к мутациям G:C→T:A после второго цикла репликации [90, 91]. Для предотвращения таких мутаций в клетках человека 8-охоG удаляется 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазой 1 (OGG1), которая также обладает сопутствующей АП-лиазной активностью, расщепляющей цепь ДНК по АП-сайту по механизму β-элиминирования (Рисунок 2). В 1996 г. на основе функциональной комплементации мутаторного штамма *E. coli* был клонирован ген *Saccharomyces cerevisiae*, кодирующий белок с 8-оксогуанин-ДНК-гликозилазной активностью [92]; одновременно и независимо он был клонирован на основе способности его белкового продукта специфично связывать поврежденную ДНК [93]. кДНК человека и мыши, гомологичные последовательности гена *OGG1* дрожжей, были затем независимо клонированы несколькими группами [94–100].

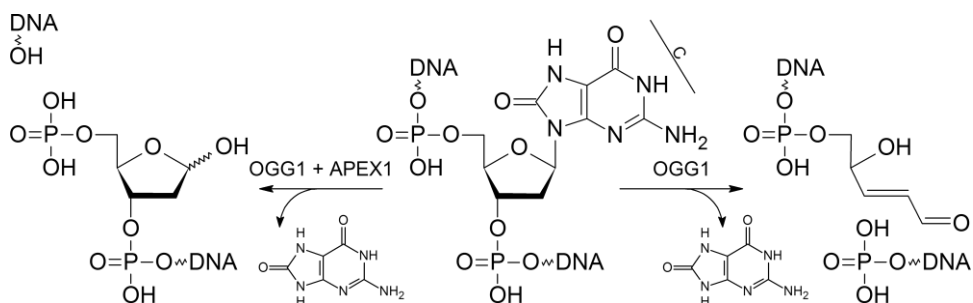


Рисунок 2. Схема реакций, катализируемых ферментом OGG1 в присутствии и в отсутствие APEX1.

Ген *OGG1* человека располагается на хромосоме 3 в локусе 3p25.3, в котором часто наблюдается потеря гетерозиготности при развитии раковых опухолей [94, 100, 101]. Ген содержит 8 экзонов и один дополнительный небольшой, редко используемый экзон 7.5 [95, 101–103]. В интроне между экзонами 7 и 8 находится почти половина гена кальмодулинкиназы 1 (*CAMK1*), транскрибируемого в противоположном направлении. Альтернативный сплайсинг генерирует две группы изоформ мРНК OGG1. Изоформы группы 1 (1a–1e) включают экзоны с 1 по 7, а в изоформах группы 2 (2a–2h) вместо экзона 7 используется экзон 8. В каждой из групп изоформы отличаются друг от друга использованием некоторых внутренних экзонов и альтернативных сайтов сплайсинга. Интересно, что изоформы группы 2 описаны только у

приматов и отсутствуют даже в подробно аннотированных транскриптомах мышей, кур и *D. rerio*.

Соответственно различиям в мРНК, изоформы белка OGG1 делятся на две группы с разными С-концевыми участками. Поскольку изоформы белков группы 2 содержат только N-концевой сигнал митохондриальной локализации, а изоформы группы 1 — еще и сигнал ядерной локализации в С-концевой области, первоначально считалось, что эти группы соответствуют митохондриальным и ядерным белкам соответственно [104]. Однако иммуоцитохимическая локализация «основной ядерной изоформы» OGG1-1a выявила ее как в ядре, так и в митохондриях, тогда как изоформы OGG1-1b, -1c и -2a обнаруживаются исключительно в митохондриях [105, 106]. Более того, микроскопия высокого разрешения показывает, что OGG1-1a находится в митохондриальном матриксе и связан с нуклеоидом митохондриальной ДНК [106].

Практически все исследования белка OGG1-1a человека выполнены на изоформе OGG1-1a. Она содержит 345 а. к. о. и имеет расчетную молекулярную массу 38.8 кДа. По своей структуре OGG1 относится к обширному суперсемейству белков, содержащих ДНК-связывающий мотив «спираль–шпилька–спираль» [107]. Ферментативная активность OGG1 специфично удаляет 8-охоG из пар 8-охоG:С, но не из других пар [96, 99, 108]. Вдобавок к 8-охоG, субстратом для OGG1 может выступать другое поврежденное производное G — 2,4-диамино-6-оксо-5-формадинопиримидин [109, 110]. Собственная АП-лиазная активность OGG1 примерно на порядок ниже ДНК-гликозилазной активности, и в присутствии АП-эндонуклеазы APEX1 последняя быстро вытесняет OGG1 из комплекса с АП-сайтом — продуктом гликозилазной реакции (см. разд. 1.3.12). Продукция OGG1-1a в штаммах *E. coli* и *S. cerevisiae*, дефицитных по репарации 8-охоG, частично комплементирует их спонтанный мутаторный фенотип [96, 97, 99].

Помимо поддержания геномной стабильности, ДНК-гликозилазе OGG1 приписывается важная роль в эпигенетической регуляции. Впервые она была обнаружена при анализе функциональной связи между деметилированием гистона H3 и экспрессией генов, контролируемых рецептором эстрогена [111]. Связывание рецептора с промоторами этих генов вызывает деметилирование H3K9 деметилазой LSD1. Побочный продукт этой реакции — перекись водорода, которая локально окисляет ДНК, что привлекает OGG1 и топоизомеразу II β , вызывая разрывы ДНК и релаксацию хроматина, необходимую для эстроген-индуцированной транскрипции. Стратегия контролируемого повреждения и репарации ДНК с участием OGG1 для управления транскрипцией с тех пор была показана еще для нескольких генов [112–114].

У человека известен природный полиморфизм OGG1 S326C, который ассоциирован с повышенным риском рака легкого и желудочно-кишечного тракта, хотя пенетрантность этого аллеля низкая [5, 115]. Белок OGG1 Cys326 имеет сниженную ферментативную активность и

легче окисляется, что уменьшает способность клеток к репарации окисленных оснований [109, 116, 117]. Несмотря на то, что вариант OGG1 S326C представляет собой естественный полиморфизм с частотой встречаемости до 0,5 в некоторых восточноазиатских популяциях, о наличии такого аллеля у широко используемых клеточных линий не сообщалось. Однако получено несколько клеточных линий лимфоцитов от здоровых индивидуумов с генотипом 326C/C [117]. Несколько распространённых лабораторных линий мышей гомозиготны по замене R336H, которая приводит к потере сигнала ядерной локализации, или несут комбинацию этого аллеля с инактивирующей заменой R304W, что приводит к повышенному уровню 8-охоG в тканях [118, 119].

Мыши *Ogg1*^{-/-} имеют слабо выраженный фенотип, у них накапливается в клетках 8-охоG, наблюдается незначительное увеличение скорости мутаций, и с возрастом развивается рак легкого [120–122]. В MEF, полученных от этих нокаутных животных, также происходит накопление 8-охоG без значительной потери выживаемости. Стоит отметить, что дополнительные нарушения в антиоксидантной защите, системах репарации окислительных повреждений или повышенный окислительный стресс приводят к гиперчувствительности таких клеток к оксидантам и высокой предрасположенности к раку [123–126]. В частности, нокаут *Ogg1* увеличивает кардиотоксичность доксорубицина (химиотерапевтический препарат, индуцирующий образование активных форм кислорода), что приводит к острой сердечной недостаточности у мышей *Ogg1*^{-/-} [127]. У мышей *Ogg1*^{-/-} на диете с большим содержанием жиров развивается метаболический синдром, происходит изменение микробиома кишечника, что делает их более чувствительными к воспалению кишечника [128, 129]. Клетки яичников китайского хомячка с двойным нокаутом *Ogg1* и *Mutyh*, полученные с помощью CRISPR/Cas9, чувствительны к редокс-активному гербициду метилвиологену (параквату) [130]. Интересно, что другая линия мышей с нокаутом митохондриальных изоформ *Mutyh* и *Ogg1* неотличима от дикого типа даже на уровне мутагенеза мтДНК [131]. У мышей, дефицитных по гену *Ogg1*, нарушен противовоспалительный ответ на бактериальные инфекции, что может говорить о существовании иммунорегуляторной обратной связи, работающей посредством окисления ДНК [132]. На модели легочного фиброза индуцируемого блеомицином удалось продемонстрировать, что нокаут *Ogg1* облегчает симптомы легочного фиброза [133]. Нокаут *Ogg1* в мышинной модели болезни Альцгеймера приводит к увеличению уровня 8-охоG, что вызывает потерю нейронов и ухудшение когнитивных функций [134]. На клеточной линии HeLa с нокаутом гена *OGG1* было показано, что накопление 8-охоG в теломерах приводит к укорочению теломер и последующей их потере [135, 136].

1.3.7. Гомолог MutY (MUTYH)

MUTYH — вторая ДНК-гликозилаза системы BER, которая помогает защитить клетки от мутагенных эффектов окисления G. В *E. coli* фермент MutY и 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза Fpg (известная также как MutM) работают вместе, чтобы предотвратить мутации, вызванные 8-охоG [137]. В случае, если 8-охоG не был удален до репликации, и напротив него включился dAMP, монофункциональная ДНК-гликозилаза MutY удаляет A из образовавшейся пары A:8-охоG [138, 139] и позволяет репарационным ДНК-полимеразам включить dCMP, а в следующем цикле репарации из возникшей пары 8-охоG:C удаляется 8-охоG (Рисунок 3). Функциональным аналогом Fpg/MutM в клетках эукариот служит описанная выше 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза OGG1, хотя эти белки и не гомологичны. Ферментативная активность, идентичная активности MutY *E. coli*, была впервые обнаружена в экстрактах клеток HeLa [140]. Вскоре после этого была клонирована последовательность кДНК человека, гомологичная гену *mutY E. coli* [141].

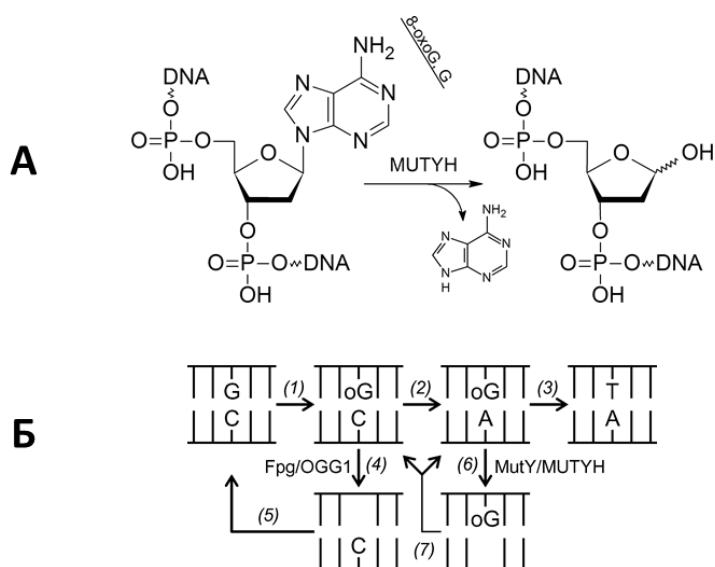


Рисунок 3. А — схема реакций, катализируемых ферментом MUTYH. Б — схема функционального взаимодействия OGG1 и MUTYH или их бактериальных аналогов Fpg и MutY для предотвращения 8-охоG-зависимого мутагенеза. При возникновении 8-охоG в ДНК (1) напротив него может включиться dAMP (2), что вызовет мутацию G→T (3). OGG1 удаляет 8-охоG из пары 8-охоG:C (4), инициируя ее репарацию с восстановлением пары G:C (5). MUTYH удаляет A из пары 8-охоG:A (6), позволяя включение dCMP при репаративном синтезе (7) и повторение цикла репарации с участием OGG1 [137].

Ген *MUTYH* человека располагается на хромосоме 1 в локусе 1p34.1 и состоит из 17 экзонов. Альтернативная инициация транскрипции и сплайсинг пре-мРНК *MUTYH* приводит к образованию по меньшей мере 13 изоформ мРНК и 9 изоформ белка с разными последовательностями 5'-концов мРНК и N-концов белка [142, 143]. Экспериментально идентифицированные транскрипты образуют три группы — α , β и γ — с разными сайтами инициации транскрипции, внутри которых изоформы различаются пропусками экзонов и использованием альтернативных сайтов сплайсинга. Одним из источников изменчивости мРНК

может быть перекрытие между экзоном 1 *MUTYH* и экзоном 1 гена *TOE1*, транскрибируемого в противоположном направлении [143]. Основная ядерная изоформа белка, MUTYH α 1, имеет в длину 546 а. к. о. Функции других изоформ белка неясны: все, они, кроме одной, содержат полный каталитический домен, но, возможно, отличаются по каталитической активности и по специфичности к основанию напротив удаляемого А [144], а некоторые, вероятно, локализованы в митохондриях [105, 142, 145, 146]. Поскольку N-концевой участок MUTYH содержит сайт связывания для фактора репликации RPA, некоторые изоформы белка могут участвовать в репарации, сопряженной с репликацией [144].

Фермент MUTYH обладает монофункциональной ДНК-гликозилазной активностью и удаляет А из пар с 8-охоG и G, но не разрывает при этом цепь ДНК, а оставляет в ней АП-сайт [147]. Помимо этого, он способен выщеплять из ДНК окисленное производное А — 2-гидроксиаденин [146]. Как и в случае OGG1, MUTYH стимулируется АП-эндонуклеазой APEX1 за счет увеличения числа оборотов фермента [148–150]. Белок MUTYH также относится к суперсемейству «спираль–шпилька–спираль», но его структура достаточно сильно отличается от структуры OGG1, и фактически сходство между этими белками ограничивается ДНК-связывающим мотивом и примыкающей к нему петлей, богатой остатками Gly, Pro, Val и Asp [151].

Инактивирующие гомозиготные или составные гетерозиготные мутации в гене *MUTYH* приводят к семейному аденоматозному полипозу [152, 153]. Полученные от таких пациентов клеточные линии лимфоцитов не чувствительны к окислительному стрессу, но, как и OGG1-дефицитные клетки, накапливают 8-охоG и имеют повышенный уровень мутагенеза [154, 155]. Фенотип нокаутных мышей и их эмбриональных стволовых клеток напоминает фенотип нокаутов по гену *Ogg1* и значительно более выражен у двойных нокаутов *Mutyh*^{-/-} *Ogg1*^{-/-} [123, 156–160]. У мышей *Mutyh*^{-/-} на продолжительной диете с высоким содержанием железа образуются гепатоцеллюлярные карциномы, что связано с хроническим окислительным стрессом, вызванным такой диетой [161, 162]. Окислительный стресс, индуцированный D-галактозой, у мышей *Mutyh*^{-/-} приводит к нарушениям работы сердца [163]. На мышинной модели болезни Альцгеймера и на мышинной модели легочного фиброза удалось продемонстрировать, что нокаут гена *Mutyh* приводит к уменьшению тяжести протекания заболеваний, что свидетельствует о роли белка *Mutyh* в их патогенезе [164, 165].

В клеточной линии нейробластомы CHP134 с одиночными нокаутами по генам *OGG1* и *MUTYH* было показано накопление замен C→A с мутационной сигнатурой, идентичной наблюдаемым в образцах от пациентов с нейробластомами [166]. Нокаут гена *MUTYH* в клеточной линии 293T приводит к укорочению теломер, схожий эффект наблюдается и при нокауте гена *OGG1* [167].

1.3.8. *N*-метилпурин ДНК-гликозилаза (MPG)

Белок MPG — это фермент, ответственный за репарацию алкилированных в кольцо пуринов, также способный удалять из ДНК 1,*N*⁶-этенoadенин и гипоксантин [168]. В настоящее время не известно о существовании патологий человека, ассоциированных с недостаточностью MPG, однако у гомозиготных носителей природного полиморфного варианта A135T со сниженной активностью заметно возрастает частота мутаций в соматических тканях [169]. Получена клеточная линия MKN45 аденокарциномы желудка, у которой отсутствует экспрессия MPG [170].

Двумя группами независимо получены нокаутные по *Mpg* мышинные модели [171, 172]. Эмбриональные стволовые (ES) клетки и MEF от таких мышей гиперчувствительны к алкилирующим агентам, и в них повышена частота хромосомных аномалий под действием метилметансульфоната (MMS) и 1,3-бис(2-хлорэтил)-1-нитрозомочевины [172, 173]. Клетки костного мозга, клетки сетчатки и гранулярные нейроны мозжечка нокаутных мышей более устойчивы к действию цитотоксических алкилирующих соединений, чем клетки мышей дикого типа, у которых происходит гибель нейронов, вызванная избыточно инициированной BER [174–177]. По-видимому, в некоторых случаях отсутствие белка MPG защищает клетки от генотоксичных повреждений, а не увеличивает чувствительность к ним. Более того, недавно обнаружено, что активность MPG по отношению к гипоксантину в сочетании с нерегулируемым дезаминированием геномной ДНК служит основной причиной разрывов хромосом в раковых клетках [178]. С другой стороны, показано, что от уровня экспрессии *Mpg* зависит эффект, который оказывает канцероген *N*-нитрозодиметиламин (NDMA), на живой организм. Отсутствие экспрессии гена *Mpg* приводит к увеличению частоты мутаций и образованию опухолей печени при введении NDMA. Генотоксичность NDMA связана с образованием 3-тА в ДНК, которое не репарируется в клетках *Mpg*^{-/-}. Однако увеличенная экспрессия *Mpg* летальна для организма при введении NDMA, так как накапливается значительное количество интермедиатов репарации [179].

1.3.9. Эндонуклеаза VIII-подобный белок 1 (NEIL1)

Белок NEIL1 участвует в репарации окисленных пуринов и пиримидинов и, возможно, нужен для репарации неканонических структур в ДНК [180, 181]. К тому же NEIL1 и его гомолог NEIL3 участвуют в репарации нескольких типов внутри- и межмолекулярных сшивков ДНК [182–184]. На данный момент в литературе не описана ни одна клеточная линия человеческого происхождения, которая несла бы мутацию в этом гене, однако промотор гена *NEIL1* часто гиперметилирован в некоторых типах рака. Показано, что уровень белка NEIL1 в 10–1000 раз понижен в клетках плоскоклеточного рака головы и шеи [185–187].

Фенотип нокаутных мышинных моделей напоминает метаболический синдром человека с ожирением, стеатозом печени и устойчивостью к инсулину, в особенности если животные содержатся на рационе с высоким содержанием жира [188, 189]. У таких мышей также были обнаружены признаки геномной нестабильности, в том числе делеции в митохондриальной ДНК и сниженная репарация формамидопиримидинов, циклопуринов и аддуктов афлатоксина, но они не приводили к развитию опухолей, за исключением карцином, индуцированных афлатоксином [87, 188, 190, 191]. Стоит отметить, что нокаут гена *Neil1* у мышей также влияет на созревание и активацию В-клеток [192]. Помимо этого, у таких животных наблюдаются нарушения центральной нервной системы, которые затрагивают память и обоняние, и замедлено восстановление после инсульта [193, 194]. NEIL1 играет важную роль в нейрогенезе, так как мыши *Neil1*^{-/-} демонстрируют тревожное поведение, у них чаще возникает апоптоз клеток гиппокампа при γ -облучении по сравнению с мышами дикого типа [195]. Однако мыши *Neil1*^{-/-} *Neil2*^{-/-} гиперактивны, имеют сниженную тревожность и улучшенные способности к обучению. Наблюдаемые поведенческие эффекты, по-видимому, не связаны с ролью этих ферментов в BER, так как уровень окислительных повреждений в гиппокампе не отличается от мышей дикого типа. Предположительно, *Neil1* и *Neil2* могут участвовать в регуляции экспрессии генов в гиппокампе [196]. У животных с двойным нокаутом *Neil1*^{-/-} *Nth*^{-/-} злокачественные новообразования возникают значительно чаще, чем у нокаутов по одному из этих генов [87].

Мышинные ES клетки, в которых экспрессия гена *Neil1* снижена с помощью малых интерферирующих РНК (миРНК), показывают незначительное увеличение чувствительности к γ -излучению [197]. У мышей, полученных из таких клеток, уровень экспрессии *Neil1* снижен, но фенотипически нокадаун никак не проявляется [198]. MEF *Neil1*^{-/-} имеют сниженный уровень поли(АДФ-рибоз)илирования белков после генотоксического стресса, вызванного обработкой клеток H₂O₂. Это обусловлено тем, что в норме NEIL1 связывается с PARP1 и стимулирует ее активность [199].

С помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9 получен нокаут *NEIL1* в околোগаплоидной линии клеток человека HAP1. В этих клетках исследовали мутационные сигнатуры, характерные для рака, однако они не отличались по частоте возникновения мутаций и их спектру от родительской клеточной линии [200].

1.3.10. Эндонуклеаза VIII-подобный белок 2 (NEIL2)

ДНК-гликозилаза NEIL2 малоактивна на двуцепочечной ДНК, предпочитая выщеплять окисленные основания из не полностью комплементарных структур, в связи с чем предполагается, что этот фермент вовлечен в репарацию повреждений в интермедиатах транскрипции и в R-петлях [183, 201]. Для *NEIL2* человека в литературе не описана ни одна

клеточная линия, мутантная по этому гену. Мыши, нокаутные по гену *Neil2*, не обладают выраженным фенотипом, хотя у них наблюдается более сильный воспалительный ответ и с возрастом накапливаются окислительные повреждения ДНК, особенно в активно транскрибируемых районах. MEF от таких организмов имеют значительно увеличенный уровень хромосомных aberrаций и потерь теломер [202]. Нокадаун экспрессии гена *Neil2* в эмбрионах *Xenopus laevis* с помощью антисмысловых морфолиновых олигонуклеотидов приводит к патологиям головы и хвоста на стадии хвостовой почки из-за нарушений в развитии клеток нервного гребня, которые претерпевают апоптоз из-за окислительных повреждений. Морфолиновый нокадаун экспрессии гена *Apex1* фенотипически напоминает нокадаун *Neil2* и приводит к микроцефалии и недоразвитию спинного и хвостового плавников [203].

1.3.11. Эндонуклеаза VIII-подобный белок 3 (NEIL3)

Белок NEIL3 — это ДНК-гликозилаза со специфичностью к окисленным основаниям в одноцепочечной ДНК. Помимо этого NEIL3 участвует в удалении межцепочечных сшивок ДНК, вызванных цисплатином и псораленом [204, 205]. В основном этот ген экспрессируется в гематопоетических и эмбриональных нервных тканях [206]. Известны три родственных пациента с гомозиготной мутацией D132V, которая приводит к значительному снижению ферментативной активности NEIL3. Клинически у них наблюдается тяжелый иммунодефицит (гипо-IgG, гипо-IgA), аутоиммунные реакции и чувствительность к оппортунистическим инфекциям [207].

Мыши, нокаутные по гену *Neil3*, так же, как и животные *Neil1^{-/-}* и *Neil2^{-/-}*, жизнеспособны и фертильны [208, 209]. Подобно вышеописанным пациентам, у них увеличен уровень аутоантител в сыворотке и развиваются повреждения почек при введении поли(I:C), что представляет собой характерный признак аутоиммунного состояния [207]. Неврологические проявления состоят в снижении пролиферации нервных стволовых клеток и клеток-предшественников, уменьшении регенерации нервных клеток после перинатальной гипоксической ишемии, нарушении обучения и памяти и изменениях в синаптической передаче в гиппокампе [209–211]. Мыши *Neil3^{-/-}* имеют задержку в созревании нейронов гиппокампа [212]. У первичных MEF *Neil3^{-/-}* скорость пролиферации снижена по сравнению с клетками дикого типа, и они более чувствительны к параквату и цисплатину [211].

1.3.12. АП-эндонуклеазы (APEX1, APEX2)

Дезоксирибонуклеаза APEX1 — это первый общий белок, действующий в пути BER после разных ДНК-гликозилаз. Она обладает активностью АП-эндонуклеазы, 3'→5'-экзонуклеазы, 3'-фосфодиэстеразы и 3'-фосфатазы (Рисунок 4). Белок человека APEX1 гомологичен экзонуклеазе III (Xth) — основной АП-эндонуклеазе *E. coli* [213–215] и относится к большому суперсемейству экзонуклеаз–эндонуклеаз–фосфатаз (EEP), которое помимо АП-эндонуклеаз

включает ДНКазу I, эндонуклеазы ретротранспозонов и ряд гидролаз низкомолекулярных соединений [216]. Все эти разнообразные ферменты имеют общий каталитический механизм гидролиза фосфодиэфирной связи. Активность APEX1 зависит от двухвалентных ионов металлов, из которых фермент предпочитает Mg^{2+} , но проявляет активность также с Mn^{2+} , Ni^{2+} и Zn^{2+} [217]. Помимо натуральных альдегидных АП-сайтов, APEX1 эффективно гидролизует ДНК, содержащую их синтетические аналоги — остатки (3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)метилфосфата (ТНФ), 3-гидроксипропилфосфата и 2-гидроксиэтилфосфата [218]. Первый из них часто применяется в исследованиях как субстрат для APEX1 ввиду своей более высокой стабильности к спонтанной деградации по сравнению с альдегидным АП-сайтом. Продукция белка APEX1 человека и мыши корректирует геномную нестабильность в мутантах *E. coli xth* и *xth nfo*, дефицитных соответственно по основной и по обеим АП-эндонуклеазам *E. coli* [214, 219]. Кроме того, APEX1 человека комплементирует мутаторный штамм *E. coli dut xth^{Ts}*, который погибает при 42 °С из-за неспособности мутантной экзонуклеазы III репарировать АП-сайты после удаления остатков U, накапливающихся в результате отсутствия 2'-дезоксиуридин-5'-трифосфатнуклеотидгидролазы Dut [214].

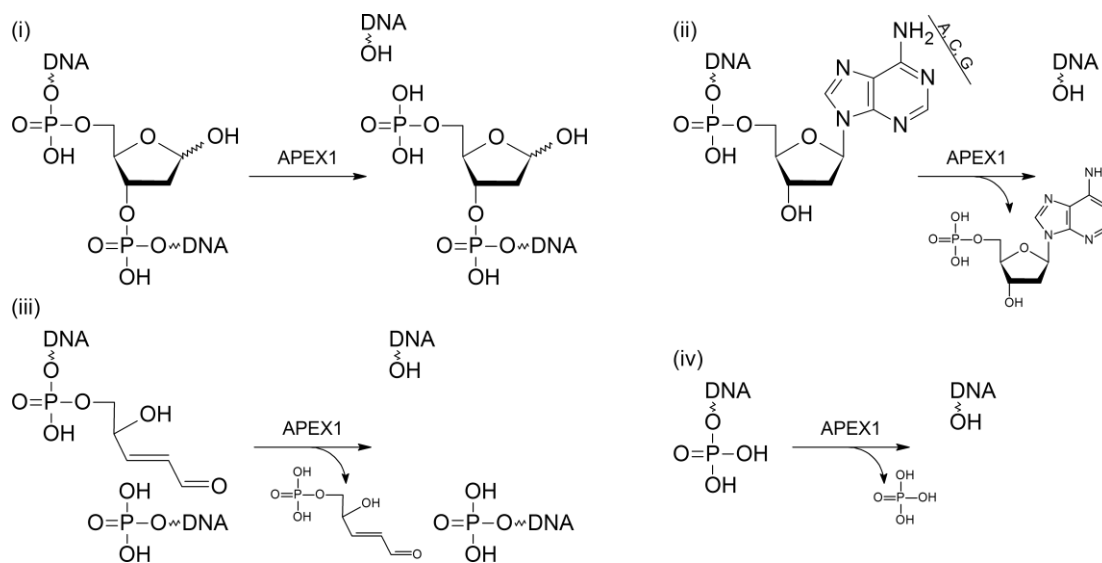


Рисунок 4. Схема реакций, катализируемых ферментом APEX1. (i) АП-эндонуклеазная активность, (ii) 3'→5'-экзонуклеазная активность, (iii) 3'-фосфодиэстеразная активность, (iv) 3'-фосфатазная активность.

Ген *APEX1* располагается на хромосоме 14 в локусе 14q11.2 и содержит 5 экзонов. За счет альтернативных донорных сайтов сплайсинга в экзоне 1 с него производится 4 изоформы мРНК, которые транслируются в один и тот же полипептид.

Как первый общий белок BER, APEX1 выступает в роли важного координатора всего этого пути. Он способен стимулировать многие ДНК-гликозилазы, вытесняя их из комплекса с АП-продуктом и тем самым увеличивая число оборотов фермента. Лучше всего такое взаимодействие изучено для OGG1: показано, что APEX1 связывается с ДНК с 5'-стороны от

связанной молекулы OGG1 и выталкивает последнюю в 3'-направлении, причем медленная АП-лиазная активность OGG1 не успевает проявиться, и продукт реакции представляет собой продукт гидролиза АП-сайта APEX1 [220–224]. Также стимуляция APEX1 показана для UNG [225, 226], SMUG1 [46, 59], TDG [227, 228], MPG [229, 230], NTHL1 [231] и MUTYH [148, 149, 232]. В свою очередь, APEX1 взаимодействует с POL β и белком-адаптором XRCC1, обеспечивая координированный перенос интермедиатов BER между разными участниками процесса [233–235].

Помимо своей роли в защите генома от повреждений, APEX1 принимает участие во множестве других клеточных процессов. Лучше всего изучена его так называемая «редокс-активность»: с использованием остатка Cys65, консервативного у млекопитающих, APEX1 восстанавливает окисленные остатки Cys в транскрипционных факторах c-Fos и c-Jun [236, 237], возвращая им способность связывать ДНК. Описано еще около десятка транскрипционных факторов, реактивируемых APEX1 за счет редокс-активности: NF- κ B, p53, NIF-1 α и др. [238]. 3'→5'-экзонуклеазная активность APEX1 рассматривается как одна из корректирующих экзонуклеазных активностей в репликативном комплексе, удаляющая неправильно включенные нуклеотиды [239]. Также фермент способен удалять с 3'-конца включенные нуклеозидные аналоги, использующиеся как антивирусные и противоопухолевые средства [239, 240]. Кроме того, APEX1 участвует в активном деметилировании ДНК [241, 242], ремоделировании хроматина [243, 244], поддержании длины теломер [245, 246], контроле качества РНК [247, 248], процессинге мРНК и микроРНК [249, 250] и апоптозе [251].

Попытки получить гомозиготных мышей *Arex1*^{-/-} до сих пор оказывались безуспешны, так как эмбрионы погибают на 6,5–7,5 день развития [252–254]. Клеточные линии от таких эмбрионов тоже не удалось получить. На модели рыбы *Danio rerio* было показано, что гибель морфолиновых нокдаунов *arex1* происходит из-за неправильной закладки органов, и что такой фенотип может быть скорректирован экспрессией гена *APEX1* человека [255]. Предполагается, что эмбриональная летальность отражает необходимость в АП-эндонуклеазной активности для BER-опосредованного активного деметилирования ДНК в процессе эпигенетического репрограммирования на ранних стадиях развития.

Для исследования роли APEX1 на уровне организма использовали мышинные модели с индуцированным нокаутом гена у поздних эмбрионов или взрослых организмов. Было показано, что индуцированный нокаут *Arex1* в нервных клетках мыши не влияет на развитие нервной системы эмбрионов. Однако через пять дней после рождения у этих мышей наблюдалось значительное снижение подвижности и роста, развивалась атаксия, и животные погибали к возрасту 3 недель [256]. Индуцированный нокаут *Arex1* в нейронах переднего мозга взрослых мышей приводит к ухудшению памяти. Срезы мозга таких мышей имеют признаки ускоренного

старения [257]. Индуцированный нокаут *Arex1* у взрослых мышей на уровне всего организма, приводит к гиперчувствительности к церебральной ишемии [258]. В отличие от полного нокаута, при замене С64А, приводящей к нарушению окислительно-восстановительной функции, мышцы жизнеспособны и не имеют никаких морфологических и биохимических нарушений [259]. Очевидно, что именно репарационная, а не окислительно-восстановительная функция АРЕХ1 важна для правильного развития, что подтверждает эпигенетическую модель эмбриональной летальности у BER-дефицитных животных. Помимо это были получены гипоморфные мышинные модели со сниженной на 90% экспрессией *Arex1* в легких, сердце, желудке и селезенке. У таких мышей накапливаются окислительные повреждения в эпителиальных клетках желудка при обработке химическими канцерогенами или заражении *Helicobacter pylori* [260].

В отличие от гомозигот *Arex1*^{-/-}, мыши *Arex1*^{+/-} жизнеспособны, но гаплонедостаточны. У них снижена активность системы BER, повышен уровень спонтанных мутаций в тканях [261–265], увеличен уровень маркеров окислительного стресса в крови [254] и ускорено возникновение опухолей с возрастом (что, однако, требует еще и функционального дефицита системы NER) [265–267]. Кроме того, в связи с отсутствием окислительно-восстановительной функции у этих мышей снижено образование оксида азота и способность регенерировать эндотелиальные ткани [268–270]. Клетки, полученные от гаплонедостаточных мышей, чувствительны к окислительным агентам менадиону и параквату, но не к УФ-излучению [254].

На клеточной гипотриплоидной линии CH12F3 удалось успешно получить нокаут всех трех аллелей гена *Arex1*. Такие клетки растут нормально, но чувствительны к MMS и цисплатину [271, 272]. Другая клеточная линия с похожими характеристиками была получена из клеточной линии тройного негативного рака молочной железы HCC1937 с помощью технологии CRISPR/Cas9 и была устойчива к олапарибу и цисплатину [273]. Стоит отметить, что MEF, в которых ген *Arex1* был удален с помощью системы Cre/*lox*, быстро уходят в апоптоз [274].

В связи с тем, что долгое время не удавалось получить нокаутные клеточные линии, для исследования функций АРЕХ1 в основном использовали клетки с нокадауном экспрессии гена. Как и ожидалось, подавление экспрессии гена *APEX1* с помощью миРНК в нескольких клеточных линиях приводит к увеличению чувствительности к различным агентам, повреждающим ДНК, в том числе H₂O₂, MMS, темозоломиду, тиотепе, кармустину, блеомицину, этопозиду и ионизирующему излучению [275–277]. Низкий уровень АРЕХ1 в клеточной линии глиомы человека также коррелирует с уменьшением выживаемости после облучения [278].

После завершения секвенирования генома человека в нем был обнаружен гомолог гена *APEX1*, который получил название *APEX2* [279]. Ген *APEX2* находится на X-хромосоме в локусе Хр11.21 и содержит 6 экзонов. Каталитический домен белка АРЕХ2 принадлежит к тому же суперсемейству ЕЕР, что и АРЕХ1, однако, кроме каталитического домена, последовательность

APEX2 в С-концевом участке несет цинковый палец типа GRF и участок гомологии с бактериальным белком клеточного деления FtsN. Функции этих мотивов APEX2 остаются непонятными. Сам фермент обладает слабой АП-эндонуклеазной активностью, но сильными 3'→5'-эксонуклеазной и 3'-фосфодиэстеразной активностями [280, 281], которые еще больше стимулируются при взаимодействии с PCNA [282]. Вследствие этого APEX2 сейчас обычно рассматривается как корректирующая репликативная экзонуклеаза, важная в условиях окислительного стресса, однако ее участие в качестве вспомогательного фермента BER не исключается. Недавние исследования свидетельствуют о роли APEX2 в репарационном пути микрогомологичного соединения концов. Предполагается, что APEX2 ответственен за удаление 3'-флэпов, образующихся в результате репарации двуцепочечных разрывов [283]. Мыши, нокаутные по гену *Apex2*, отстают в росте от мышей дикого типа и имеют нарушения кроветворения. ES клетки и MEF клетки от таких мышей показывают нормальную чувствительность к H₂O₂, блеомицину и рентгеновскому излучению [284]. Помимо этого, нокаут гена *Apex2* в клеточной линии CH12F3 *Apex1*^{-/-} не приводит к увеличению чувствительности к MMS [271].

1.3.13. ДНК полимеразы β (POLβ)

Клетки человека содержат как минимум 16 ДНК-полимераз, которые участвуют в процессах, требующих синтеза ДНК: репликации, репарации и рекомбинации. ДНК-полимераза β — это самая маленькая ДНК-полимераза человека (335 а. к. о.; 39 кДа). По своей последовательности она относится к семейству X ДНК-полимераз вместе с ДНК-полимеразы λ, μ и терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазой [285]. Ген *POLB* человека расположен на хромосоме 8 в локусе 8p11.21 и насчитывает 14 экзонов. Основная синтезируемая изоформа мРНК включает все эти экзоны и кодирует белок, состоящий из двух доменов: N-концевого домена, в котором локализована 2'-деоксирибо-5'-фосфатлиазная (ДРФазная) активность, необходимая для короткозаплаточного пути BER, и ДНК-полимеразного домена (Рисунок 5). Последний, как и у всех ДНК-полимераз, подразделяется на субдомены «пальцы», «ладонь» и «большой палец». У POLβ отсутствует корректирующая 3'→5'-эксонуклеазная активность, которая повышает точность репликативных ДНК-полимераз.

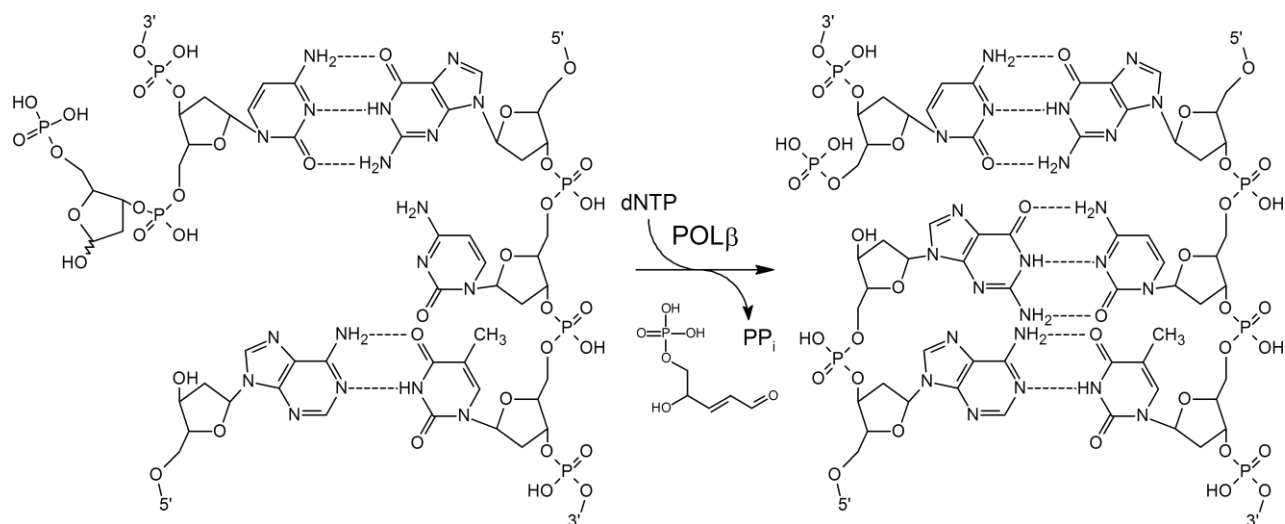


Рисунок 5. Схема реакций, катализируемых ДНК-полимеразой β .

Благодаря своему небольшому размеру и доступности белка в рекомбинантном виде POL β к настоящему времени всесторонне охарактеризована на клеточном, биохимическом, кинетическом и структурном уровнях [286, 287]. POL β может использовать субстраты типа «праймер–матрица», но, в отличие от многих других ДНК-полимераз, отдает заметное предпочтение однунуклеотидной брешке, ограниченной с 3'-стороны фосфатной группой [288]. Это предпочтение вполне логично, так как такой субстрат имитирует интермедиат BER после удаления 5'-dRP-фрагмента. Как ДРФазная, так и ДНК-полимеразная функции POL β необходимы для короткозаплаточной BER. Достаточно долго продолжались дискуссии о том, в каком порядке в ходе BER выполняется удаление 5'-dRP-фрагмента и встраивание неповрежденного dNMP. Недавно была предложена модель сопряжения этих активностей, интегрирующая доступные структурные и кинетические данные [289]. Согласно ей, сначала ДРФазный домен POL β образует временный ковалентный интермедиат с dRP, и включение dNMP происходит без высвобождения dRP. Только после того, как завершен ДНК-полимеразный шаг короткозаплаточной BER, происходит элиминирование dRP, гидролиз ковалентного интермедиата и образование готового к лигированию одноцепочечного разрыва ДНК. POL β физически взаимодействует с APEX1 — ферментом, катализирующим предыдущую стадию BER, [233], и с адапторным белком XRCC1, который координирует передачу интермедиата короткозаплаточной BER от ДНК-полимеразы ДНК-лигазе [290, 291]. Кроме того, после включения одного нуклеотида POL β при невозможности удаления 5'-dRP происходит переключение BER на длиннозаплаточный путь, катализируемый ДНК-полимеразами δ и ϵ [19], для чего POL β взаимодействует с PCNA и его аналогом, комплексом RAD9/RAD1/HUS1 — факторами, отвечающими за ремоделирование репликативных комплексов при репарации и

транслезионном синтезе ДНК [292, 293]. Альтернативная АРЕХ1-независимая ветвь короткозаплаточной BER также задействует POL β в качестве основной ДНК-полимеразы [22].

Таким образом, доступные данные говорят о том, что POL β занимает центральное место во всех вариантах пути BER. Частично ее функции может выполнять ДНК-полимераза λ из того же семейства X, однако последней отводится главная роль в репарации двуцепочечных разрывов ДНК, и полностью заместить POL β она не способна [294, 295].

В опухолях человека часто наблюдается экспрессия aberrантных вариантов POL β , включая низкоточные варианты, которые предположительно приводят к геномной нестабильности из-за репарации с ошибочным включением dNMP, не соответствующего матрице [296, 297]. Мышиные модели с гомозиготной заменой Y265C погибают почти сразу после рождения. MEF, полученные от таких организмов, растут медленно, имеют разнообразные хромосомные aberrации и претерпевают апоптоз при обработке MMS [298]. Попытки получить нокаут *Polb*^{-/-} оказались безуспешны из-за эмбриональной летальности после 10,5 дня развития [299–301], что напоминает ситуацию с нокаутами по генам *Tdg*, *Apex1*, *Xrcc1* и *Lig1/3*. Однако удалось получить MEF от нокаутов по *Polb*. У этих клеток увеличена чувствительность к различным алкилирующим агентам, но не к γ -излучению, УФ-излучению или H₂O₂ [300, 302]. Интересно, что этот фенотип можно скорректировать эктопической экспрессией dRP-азного домена, но не полимеразного домена POL β [303].

Для исследования роли POL β в развитии клеток ЦНС получали мышиные модели индуцированным нокаутом гена *Polb*. Нокаут *Polb* в предшественниках нейронов коры приводит к накоплению двуцепочечных разрывов, апоптозу клеток и в результате происходит истончение кортикальной пластинки (предшественник коры головного мозга) [304]. В свою очередь, Pol β в постмитотических нейронах необходима для дифференциации гиппокампальных нейронов [305]. Индуцированный нокаут *Polb* в клетках-предшественниках нейронов приводит к образованию медуллобластом при дополнительном нокауте гена *Trp53*, аналогичные результаты были получены на мышинных моделях с нокаутом генов *Xrcc1* и *Trp53* [306]. Индуцированный нокаут *Polb* и нокаут *Atm* в этих же клетках приводит к атаксии у мышей без значительных нервных патологий в мозжечке [307].

Клетки 293T *Polb*^{-/-} накапливают больше эндогенных повреждений в митохондриальной ДНК, а нокаутные MEF имеют сниженный мембранный потенциал и содержание митохондриальной ДНК, что говорит о важности Pol β для поддержания целостности мтДНК и гомеостаза митохондрий [308]. Снижение уровня экспрессии *POLB* в клеточной линии рака яичников приводит к увеличению чувствительности к цисплатину, уменьшает инвазию, миграцию и эпителиально-мезенхимальный переход [309]. Для клеточных линий, дефицитных

по *BRCA1* и *BRCA2*, снижение экспрессии *POLB* представляет синтетическую летальность [309, 310].

Известно, что клетки с нокаутом *Polb* чувствительны к MMS, и нокаунт *Apex1* еще более увеличивает эту чувствительность [311]. Помимо это чувствительность клеток *Polb*^{-/-} к алкилирующим агентам возрастает при дополнительном нокауте гена ДНК-лигазы 4 (участник NHEJ), что может свидетельствовать об участии NHEJ в удалении интермедиатов BER [312]. В отсутствие экспрессии гена *Polb* в клетке функцию POLβ может выполнять ДНК-полимераза λ, в связи с этим, нокаут по *Poll* увеличивает чувствительность клеток DT40 *Polb*^{-/-} к H₂O₂ [313].

1.3.14. Флэп-эндонуклеаза 1 (FEN1)

Флэп-эндонуклеаза 1 (FEN1) — это мультифункциональный фермент, обладающий активностями 5'→3'-экзонуклеазы и специфичной к структуре ДНК эндонуклеазы. Первая из них необходима для удаления РНК-праймеров из фрагментов Оказаки, а эндонуклеазная активность функционирует в длиннозаплаточном пути BER для удаления нависающего 5'-концевого фрагмента после синтеза ДНК с вытеснением цепи, что подготавливает дуплекс для дальнейшего лигирования (Рисунок 1) [314–319]. В опухолях человека были обнаружены различные соматические мутации в гене *FEN1* [320].

У трансгенных мышей делеция обоих аллелей *Fen1* приводит к эмбриональной гибели на стадии бластоцисты, вероятно, из-за незаменимой роли FEN1 в репликации [321, 322]. Гетерозиготные животные жизнеспособны и фертильны, однако на фоне проонкогенного гетерозиготного аллеля *Apc*^{1638N} происходит синергичное увеличение частоты злокачественных новообразований [321]. В опухолях человека была обнаружена замена FEN1 E106D, которая значительно снижает активность фермента. Для мышинных моделей с такой заменой в гомозиготном и гетерозиготном состоянии характерны аутоиммунные нарушения, воспаление, развитие рака легкого с возрастом и высокая чувствительность к индукции опухолей 1-метил-1-нитрозомочевинной. MEF, полученные от таких организмов, имеют нарушения в длиннозаплаточной ветви BER, чувствительны ко многим генотоксичным агентам и демонстрируют повышенную частоту хромосомных aberrаций [320, 323]. Похожий фенотип наблюдается в клетках мышей и человека, эктопически экспрессирующих каталитически неактивные мутанты FEN1 D181A и L209P [324, 325]. По-видимому, даже при наличии функционального аллеля *FEN1* инактивирующей мутации в другом аллеле достаточно для проявления геномной нестабильности и развития злокачественных новообразований. Клетки DT40, нокаутные по гену *FEN1*, жизнеспособны, но растут медленно и чувствительны к H₂O₂, алкилирующим агентам, но не к УФ-излучению, ионизирующему излучению или этопозиду [326]. При подавлении экспрессии *FEN1* с помощью миРНК в клеточной линии рака простаты

LNCaP тоже замедляется клеточная пролиферация, возможно, из-за неправильной репликации [327], в то время как подавление экспрессии *FEN1* в клеточной линии глиобластомы LN308 приводит к увеличению чувствительности к алкилирующим агентам и противоопухолевым лекарствам, приводящим к появлению сшивок [328]. На клеточных линиях человека, дефицитных по генам HR *BRCA1* и *BRCA2*, было показано, что инактивация HR синтетически летальна с подавлением *FEN1* [329, 330].

1.3.15. ДНК-лигаза I (*LIG1*)

У человека *LIG1* — это основная репликативная ДНК-лигаза, которая образует фосфодиэфирную связь между фрагментами Оказаки в отстающей цепи, привлекаясь в репликативный комплекс за счет взаимодействия с PCNA и *FEN1* [331–333]. Помимо этого, *LIG1* участвует в нескольких системах репарации ДНК, в частности, в длиннозаплаточном пути BER (Рисунок 1) [332, 334]. Несмотря на очевидно важную роль этого белка в репликации, известен пациент, у которого обнаружены миссенс-мутации в гене *LIG1*, приводящие к частичной потере функции (замены в белке E566K и R771W). В число клинических симптомов этого пациента входят иммунодефицит (гипо-IgG), замедленный рост и светочувствительность [335, 336]. Полученные от него фибробласты 46BR и 46BR.1G1 имеют нарушения в системах репарации ДНК, гиперчувствительны к УФ-излучению, ионизирующему излучению, алкилирующим агентам и ингибиторам PARP1, у них увеличено число обменов между сестринскими хроматидами, замедлен рост и лигирование фрагментов Оказаки [337–342]. Эктопическая экспрессия *LIG1* исправляет некоторые характеристики этих клеток [342, 343]. Протеомный анализ клеток 46BR выявил белки *LIG1* и PCNA, уровень которых в фибробластах кожи человека обычно низок [344], что предполагает наличие компенсаторного ответа в клетках путем увеличения продукции *LIG1* и белков, необходимых для соединения фрагментов Оказаки.

Клетки 46BR менее чувствительны к ионизирующему излучению, чем клеточные линии, дефицитные по генам сигнального пути ответа на повреждения ДНК [345, 346]. Ответ на разрывы, вызванные ионизирующим излучением и нарушениями в репликации ДНК, измеренный на основе фосфорилирования гистона H2AX, находится в пределах нормы [347]. Однако эти клетки не способны активировать контрольную точку ATR/Chk1, специфичную для S-фазы, и в конечном счете накапливают интермедиаты репликации [343]. Мышиные модели с заменой *Lig1* R771W воспроизводят фенотип заболевания: они жизнеспособны, но растут медленно, имеют аномальный гематопоз в раннем возрасте и склонны к росту опухолей [348].

Также были обнаружены пациенты с мутациями в обоих аллелях гена *LIG1*, их симптомы включают гипогаммаглобулинемию, лимфопению, увеличение доли циркулирующих $\gamma\delta$ -Т-лимфоцитов и макроцитоз эритроцитов. Клинически пациенты страдают от дефицита антител со

степенью выраженности от средней тяжести до тяжелого комбинированного иммунодефицита [349].

Мышиные эмбрионы, нокаутные по гену *Lig1*, развиваются нормально до 11,5 дня после зачатия, когда у них начинают возникать нарушения эритропоэза и увеличивается радиочувствительность; такие организмы погибают пренатально на 16,5 день эмбрионального развития [350, 351]. Интересно, что трансплантация гематопозитических клеток из печени мышей *Lig1*^{-/-} может спасти летально облученных взрослых мышей дикого типа, что говорит о том, что эмбриональная летальность связана с низкой скоростью пролиферации предшественников гематопозитических клеток, а не с блоком гематопоза. У первичных фибробластов, полученных от таких эмбрионов, наблюдается повышенная хромосомная нестабильность, однако в отличие от клеток человека 46BR, они нечувствительны к ионизирующему излучению, алкилирующим агентам и ингибиторам PARP1 [351]. Хотя в другом исследовании не удалось получить живые мышинные эмбриональные клетки *Lig1*^{-/-} с помощью традиционных подходов [352], позже нокаут гена *Lig1* был успешно получен в В-лимфоцитах мыши [353] и клетках DT40 [354], а также удалось стабильно подавить экспрессию *LIG1* в нескольких линиях клеток человека с помощью миРНК [355]. Во всех случаях было показано, что *LIG3* может заменить *LIG1* в процессах репарации и клеточной пролиферации.

1.3.16. ДНК-лигаза III α (LIG3)

Белок *LIG3* лигирует разрыв в короткозаплаточной ветви пути BER (Рисунок 1). Альтернативный сплайсинг последнего экзона приводит к образованию двух изоформ *LIG3* — повсеместно экспрессируемой *LIG3 α* и специфичной для половых клеток *LIG3 β* [333, 356–358]. Кроме того, мРНК *LIG3* имеет два альтернативных сайта инициации трансляции: более длинный белок содержит канонический амфипатический сигнал митохондриальной локализации, а более короткий направляется в ядро [358, 359].

В отличие от *LIG1*, о существовании организмов, дефицитных по *LIG3 α* не сообщалось. Нокаут гена *Lig3* приводит к эмбриональной гибели на 8,5 день развития, а MEF не поддерживаются в культуре из-за неизбежного апоптоза клеток [360]. В другом исследовании полный нокаут гена *Lig3* в мышинных эмбриональных стволовых клетках был летален, но экспрессия митохондриальной изоформы *LIG3 α* , направленной в митохондрии *LIG1*, и даже ДНК-лигаз *E. coli* и хлореллавируса предотвращала гибель клеток [361]. Также показано, что индуцированный нокаут гена *Lig3* в первичных или трансформированных В-клетках приводит к их гибели [362]. Были получены две мышинные модели с индуцированным на стадии позднего эмбриона нокаутом *Lig3* в нервной системе или в скелетных мышцах и миокарде [363]. В обоих случаях мыши рождались, но продолжительность жизни составляла меньше пяти недель; при

отсутствии нейрональной LIG3 α у животных развивалась атаксия, при отсутствии же мышечной LIG3 α — острая сердечная недостаточность. Патологии органов сопровождались нарушениями в митохондриях и уменьшением содержания мтДНК, в то время как репарация в ядре была нормальной [361, 363]. С помощью мРНК удалось получить клетки со сниженным уровнем экспрессии LIG3 α , которые незначительно чувствительны к повреждениям ДНК и содержат увеличенное число сестринских хроматидных обменов [360, 363]. По-видимому, именно митохондриальная, а не ядерная изоформа LIG3 α необходима для выживания клеток, что, возможно, связано с отсутствием других ДНК-лигаз в митохондриях и наличием дублирующей активности LIG1 в ядре.

1.3.17. XRCC1

XRCC1 — это белок, играющий важную роль в короткозаплаточной ветви BER (Рисунок 1), который координирует многие белки BER и организует передачу интермедиатов репарации между последовательно действующими ферментами [364–366]. Исследования этого белка и BER в целом были значительно облегчены тем, что некоторые клоны клеточной линии яичников китайского хомячка CHO не способны осуществлять репарацию и чувствительны к повреждениям, но могут быть комплементированы геном или белком XRCC1 человека [367–371]. Был обнаружен пациент с составной гетерозиготной мутацией, запускающей нонсенс-опосредованный распад мРНК XRCC1, и получены иммортализованные клеточные линии фибробластов и лимфоцитов [372]. В этих клетках снижена репарация одноцепочечных разрывов и увеличено число сестринских хроматидных обменов, в то время как на уровне организма недостаток XRCC1 приводит к глазодвигательной апраксии, аксональной нейропатии и прогрессивной мозжечковой атаксии [372].

Мыши, нокаутные по гену *Xrcc1*, погибают внутриутробно на 8,5 день эмбрионального развития, однако клеточные линии от таких эмбрионов были получены [373–375]. MEF *Xrcc1*^{-/-} гиперчувствительны к этилметансульфонату и ионизирующему излучению и демонстрируют недостаточность BER, хромосомные аномалии и высокий уровень эндогенных повреждений ДНК. Индуцированный нокаут гена *Xrcc1* в эмбриональной нервной системе приводит к остановке формирования мозжечковых интернейронов; такой фенотип напоминает вышеупомянутого пациента [375]. В экспериментах по комплементации 10% от нормального уровня экспрессии *Xrcc1* было достаточно для поддержания развития [374], так же, как и у пациента небольшое количество XRCC1 было достаточно для выживания, но не для правильного нейрогенеза [372]. Интересно, что дополнительный нокаут *Trp53* позволяет мышам развиваться дальше, но не до рождения [373, 374], в то время как делеция *Parp1* частично корректирует нейродегенеративный фенотип в индуцированном нокауте [372]. Возможно, подавление BER из-

за ослабления клеточной сигнализации, опосредованной PARP1, позволяет другим репарационным системам исправить повреждения. Индуцированный нокаут *Xrcc1* в примордиальных половых клетках мыши приводит к стерильности самцов мышей. Стерильность вызвана нарушениями в сперматогенезе, которые обусловлены повышенным уровнем активных форм кислорода, сбоям в работе митохондрий и апоптозом [376].

Клетки человека с нокаутом *XRCC1*, фибробласты, полученные от пациента с мутацией в гене *XRCC1*, и мышечные нейроны *Xrcc1*^{-/-} не способны быстро восстановить транскрипцию после повреждения ДНК. Это связано с отсутствием регуляции активности PARP1 белком XRCC1, что приводит к излишней активности PARP1, которая подавляет восстановление транскрипции [377, 378]. Помимо этого, было показано, что PARP1 остается связанным с повреждением в клетках, дефицитных по *XRCC1*, что и объясняет чувствительность клеток к агентам, повреждающим ДНК [379, 380]. Ингибиторы LIG1 и киназ ATR, ATM и WEE1, отвечающих за прохождение контрольных точек клеточного цикла, проявляют синтетическую летальность в раковых клетках, дефицитных по *XRCC1* [381, 382].

1.3.18. Поли(АДФ-рибоза) полимеразы 1 (PARP1)

Белок PARP1 не участвует в BER непосредственно, но играет важную регуляторную роль ввиду своей способности обнаруживать одноцепочечные разрывы в ДНК и модифицировать находящиеся рядом белки хроматина, включая самого себя, длинными разветвленными цепями поли(АДФ-рибозы) (PAR), помечая таким образом сайт повреждения [383, 384]. Клеточный сигнальный путь ответа на повреждения в ДНК привлекает факторы ремоделирования хроматина, в том числе белки, производящие разборку нуклеосом и подавляющие транскрипцию, для облегчения доступа белков репарации и для контроля хода репарации [384].

Во многих клеточных линиях, происходящих из плоскоклеточного рака и аденокарцином, в том числе в широко используемых клетках A549, экспрессия *PARP1* исходно низка [385]. Получено несколько нокаутных мышечных моделей без значительных нарушений из-за отсутствия экспрессии *PARP1*. Фенотипически они отличаются кожными повреждениями, чувствительностью к алкилирующим и радиационным повреждениям и устойчивостью к диабету, вызываемому стрептозотоцином [386–388]. Мыши *Parp1*^{-/-} имеют нарушения развития мозга, в частности мозг меньшего веса, что обусловлено уменьшенной площадью поверхности и толщины [389]. Также у таких мышей наблюдается нарушение дифференциации предшественников олигодендроцитов и миелинизации центральной нервной системы [390]. В клетках, полученных от таких нокаутных животных, репарация ДНК и стабильность хромосом остается нормальной, хотя скорость пролиферации немного снижена. При скрещивании мышей *Parp1*^{-/-} с мышами, имеющими дефекты в системах репарации ДНК и сигнализации о

повреждениях, потомство было нежизнеспособно [391–393]. Помимо белка PARP1, в ядре локализуется его гомолог PARP2, который участвует в синтезе разветвленных цепей PAR и тем самым способствует дальнейшей репарации [394]. Мыши *Parp1^{-/-} Parp2^{-/-}* нежизнеспособны и погибают в начале стадии гастрюляции [393].

С помощью клеточной линии HeLa, нокаутной по гену *PARP1*, удалось продемонстрировать, что структура PAR, а именно длина и разветвленность, влияет на жизнеспособность клеток, течение клеточного цикла и устойчивость к генотоксическому стрессу [395]. Помимо этого было показано, что в клеточной линии 293 с нокаутом гена *PARP1* значительно снижен уровень экспрессии ряда генов BER, в частности, *NEIL1*, *NEIL3*, *SMUG1*, *MPG*, *POLB* и *FEN1*, а также некоторых вспомогательных субъединиц ДНК-полимераз δ и ϵ [396].

Благодаря большому количеству исследований, выполненных на клеточных линиях с разным уровнем экспрессии *PARP1*, была сформулирована концепция синтетической летальности, на основе которой были разработаны противоопухолевые препараты — ингибиторы PARP1. В общем случае под синтетической летальностью понимают взаимодействие между двумя генами, при котором отсутствие экспрессии одного из них совместимо с жизнью, но одновременная потеря экспрессии двух генов приводит к клеточной гибели. При отсутствии PARP1 возникает коллапс репликативной вилки из-за одноцепочечных разрывов, а при ингибировании — из-за захвата PARP1 на ДНК, что запускает HR. Соответственно, раковые клетки, дефицитные по HR, гиперчувствительны к ингибиторам PARP1 [397–400]. Было показано, что подавление экспрессии *LIG3* увеличивает эффективность ингибиторов PARP1 против рака молочной железы, дефицитного по *BRCA1* [401].

1.4. Использование клеточных линий, дефицитных по генам репарации ДНК

1.4.1. Системы для оценки генотоксичности соединений на основе клеточных линий, дефицитных по генам репарации ДНК

Современная генетическая токсикология использует набор исследований для оценки повреждений ДНК на молекулярном и клеточном уровне. Широко используются тест Эймса и его вариации, исследование мутаций в гене тимидинкиназы клеток лимфомы мыши, исследования микроядер, тест на хромосомные aberrации и исследование ДНК комет [402–404]. Основной недостаток этих способов оценки генотоксичности заключается в том, что не учитывается разница в ответе между разными организмами и между разными тканями одного организма. В связи с этим в середине 1980-х годов было предложено использовать клеточные линии, дефицитные по генам репарации ДНК, для увеличения чувствительности таких тестов [7] (Таблица 1). Как было описано выше, большинство мутантов по репарации гиперчувствительны

к агентам, повреждающим ДНК, что позволяет увеличить эффект от возможных генотоксических соединений.

Исходный подход к оценке генотоксичности основывался на мониторинге роста клеток и их жизнеспособности. Соединения, повреждающие ДНК, вызывают более значительное ингибирование роста или клеточную смерть в клетках с дефектами в репарационных системах, чем в клетках дикого типа. Соотношение параметров роста клеточных линий использовали в качестве количественного показателя генотоксичности. Этот DRAG-тест (Detection of Repairable Adducts by Growth inhibition) был адаптирован для исследования в формате 96-луночного планшета и был использован на клетках CHO, дефицитных по BER и NER, для детекции генотоксичности полигалогенированных ароматических соединений [405].

Помимо клеток CHO, для исследования генотоксичности используют клеточную линию В-лимфоцитов DT40. Была создана панель клеточных линий с мутациями почти во всех известных генах репарации ДНК и ответа на повреждение ДНК и исследована в скрининге библиотек генотоксичных соединений и загрязнителей окружающей среды. В дополнение к количественной оценке генотоксичности панель клеток DT40 дает информацию о возможных механизмах репарации вызванных повреждений [406].

Для оценки генотоксичности цитогенетическими методами зачастую используют тест на формирование микроядер. Основная проблема использования в нем клеток дикого типа состоит в том, что повреждения быстро подвергаются репарации, и сложно детектировать какой-то эффект. В связи с этим уменьшение способности клеток репарировать повреждения ДНК значительно увеличивает чувствительность теста. С помощью систем геномного редактирования CRISPR/Cas9 и TALEN была получена панель изогенных клеточных линий, дефицитных по репарации ДНК, на основе линии клеток человека ТК6, которую затем использовали в микроядерном тесте после обработки повреждающими ДНК агентами с разным механизмом действия — митомицином С, MMS, H₂O₂ и γ -радиацией [407].

Для использования в формате 96-луночного планшета также был адаптирован метод ДНК-комет для изучения библиотек химических веществ с использованием клеток HTC116 *POLB*^{-/-}, полученных с помощью CRISPR/Cas9 [408].

Таблица 1. Примеры использования клеточных линий, дефицитных по генам репарации ДНК, для исследования генотоксичности соединений.

Тип исследования	Клеточные линии	Гены, экспрессия которых снижена ^{1, 2}	Соединение	Ссылка
Тест на формирование микроядер	ТК6 (клеточная линия лимфобластов человека)	<i>XRCC1, RAD54, LIG4, FANCD2, REV3</i>	MMS, H ₂ O ₂ , γ-излучение, митомицин С	[407]
Метод ДНК-комет	НСТ116 (клеточная линия колоректальной карциномы человека)	<i>POLB, TP53</i>	74 соединения из библиотеки соединений национальной токсикологической программы США	[408]
Выживаемость	DT40 (клеточная линия куриных лимфоцитов)	<i>Polb, Ku70, Rad54, Rev3, Xpa</i>	Бисфенолы А, AP, С, F, М, Р, S	[409]
			Фармацевтические препараты: сульфаметазин, сульфатиазол, хлортетрациклин, окситетрациклин, диклофенак	[410]
			Трихостатин А	[411]
			γ-излучение, УФ-излучение, NaAsO ₂	
		<i>Polb, Fen1, Rev1, Polq</i> и 11 других генов	MMS, цисплатин, 14 полициклических ароматических углеводородов	[406, 412]
		<i>Ku70, Rad54, Rev3</i>	Библиотека соединений Tox21 10К (>8300 уникальных соединений)	[413]
		<i>Polb, Atm, Fancs, Rad54, Ku70, Rev3, Ubc13</i>	Актиномицин D, адриамицин, алахлор, 2-аминотиамин, бензотрихлорид, диглицидиловый эфир резорцина, ловастатин, мелфалан, транс-1,4-дихлор-2-бутен, трис(2,3-эпоксипропил)изоцианурат	[414]

	СНО (клетки китайского хомячка)	<i>Xrcc1, Ercc1, Xpd</i>	УФ-излучение, H ₂ O ₂ , производное бензопирена, этилметансульфонат, митомицин С, библиотека полигалогенированных ароматических соединений, библиотека 22-х генотоксичных соединений	[7, 405]
--	---------------------------------	--------------------------	--	----------

¹ Полуожирным отмечены гены, которые кодируют белки BER

² Для приведенных исследований использовали клеточные линии с одиночными нокаутами и комбинированными

1.4.2. Репортерные системы для исследования механизмов репарации повреждений на основе клеточных линий, дефицитных по генам репарации ДНК

Эффективность репарации повреждений ДНК варьирует как среди разных индивидуумов, так и среди разных клеток в организме [415]. Помимо того, что нормальные клетки могут быть гетерогенны по своей способности осуществлять репарацию, такая же неоднородность характерна и для клеток злокачественных новообразований [416]. Эта особенность раковых клеток позволила разработать терапевтические агенты, которые ингибируют определенные компоненты системы репарации или ответа на повреждение, например, ингибиторы PARP1 для лечения онкологических заболеваний с дефектами в системе HR [417].

Для исследования процессов репарации в клеточных системах удобно использовать плазмидные конструкции с геном-репортером, в последовательность которого введены повреждения. При использовании в качестве репортеров флуоресцентных белков можно судить об эффективности репарации на основе измерения уровня флуоресценции клеточной популяции. Здесь стоит отметить, что повреждение можно встраивать как в исходную последовательность репортера, так и в измененную, куда специально введена инактивирующая репортер мутация. В первом случае будет наблюдаться реактивация флуоресценции в клетках (host cell reactivation, HCR) как результат эффективной репарации повреждения (Рисунок 6). Во втором варианте появление флуоресценции свидетельствует о событиях транскрипционного мутагенеза (ТМ): если РНК-полимераза ошибочно включает рибонуклеотид напротив поврежденного звена ДНК, это может вести к синтезу мРНК, кодирующую флуоресцентный вариант (Рисунок 6) [418]. Основное преимущество систем на основе таких плазмидных конструкций для изучения репарации состоит в том, что, в отличие от использования клеточных экстрактов и рекомбинантных белков, они детектируют события в естественных внутриклеточных условиях. С другой стороны, недостаток использования плазмидных конструкций связан с тем, что на

выходе считывается сигнал, который представляет сумму событий репарации, транскрипции и трансляции. Кроме того, плазмидная ДНК не всегда существует в том же состоянии хроматина, что и геномная ДНК.

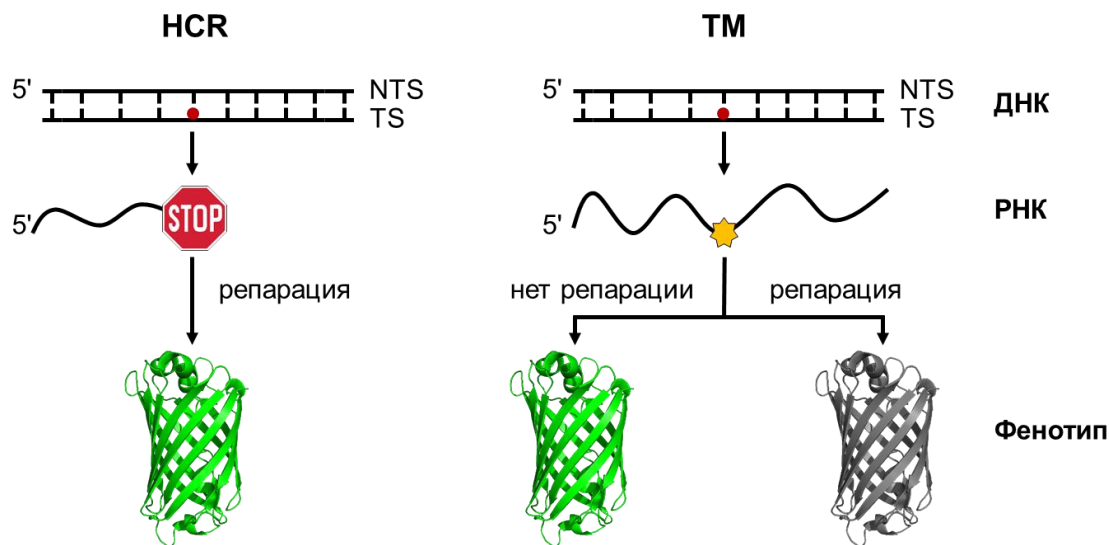


Рисунок 6. Типы репортерных систем на основе плазмид с введённым повреждением. **HCR** – сигнал детектируется только при репарации исходного повреждения, **TM** – детекция сигнала происходит при отсутствии репарации. Красным кругом обозначено повреждение, желтая звезда обозначает нуклеотид, включенный РНК-полимеразой напротив повреждения.

Существует несколько подходов получения плазмид с повреждениями (Рисунок 7). Исторически первые из них были основаны на обработке плазмид агентами, повреждающими ДНК (Рисунок 7А) [419]. Этот подход наиболее прост в реализации, однако позволяет получить только набор повреждений ДНК разной химической природы в случайных участках плазмиды, что затрудняет последующий анализ. Один из самых распространенных методов состоит в получении одноцепочечной кольцевой молекулы ДНК, последующем отжиге праймера с введённым повреждением и ферментативном синтезе второй цепочки ДНК (Рисунок 7Б) [420]. Таким образом можно вводить повреждение в любой участок плазмиды, но необходимость получения одноцепочечной кольцевой молекулы ДНК и проблемы с работой ДНК-полимераз на длинных одноцепочечных матрицах делают этот вариант достаточно трудоемким и дорогим. Третий подход в получении конструктов с повреждением основан на использовании эндонуклеаз рестрикции с никирующей активностью, которые имеют сайты узнавания, расположенные тандемно в последовательности репортерного гена (Рисунок 7В). В частности, в оптимизированной для экспрессии в клетках человека последовательности гена усиленного зеленого флуоресцентного белка (*EGFP*) содержится два сайта узнавания для нуклеаз Nb.Vpu10I и Nt.Vpu10I, что позволяет вводить повреждения как в транскрибируемую, так и в кодирующую цепь соответственно [421]. Эта технология отличается простотой и быстротой в исполнении, хотя

при ее использовании область для введения повреждения ограничена наличием сайтов узнавания никаз.

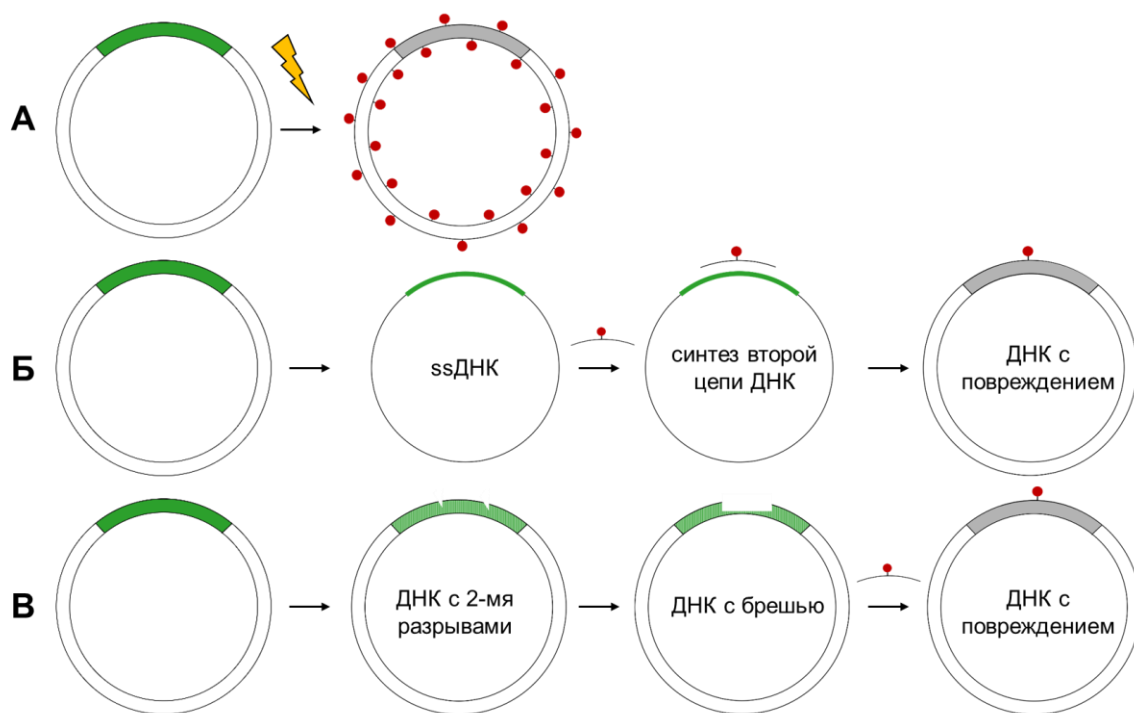


Рисунок 7. Способы получения плазмид с повреждениями. **А.** Способ, основанный на обработке плазмиды агентами, повреждающими ДНК. **Б.** Способ на основе получения одноцепочечной кольцевой молекулы ДНК (ssДНК) и последующем синтезе второй цепочки с повреждением. **В.** Получение плазмид с повреждением с помощью эндонуклеаз рестрикции с никирующей активностью. Красным кругом отмечено повреждение.

Системы на основе использования плазмидных конструктов с введенными повреждениями и клеточных линий, нокаутных по генам репарации ДНК, используют для различных исследовательских целей. С их помощью можно изучать системы репарации, ответственные за удаление определенных повреждений ДНК. Например, было показано, что продукт радиационного повреждения ДНК тимингликоль подвергается NTHL1-зависимой BER, а окислительные повреждения пуринов 5',8-цикло-2'-дезоксигуанозин и 5',8-цикло-2'-дезоксаденозин — NER, сопряженной с транскрипцией [89]. Также с помощью плазмидных конструктов удалось продемонстрировать вклад NER в репарацию АП-сайтов [422]. Методом HCR исследуют варианты белков репарации, ассоциированных с развитием онкологических заболеваний. В частности, было показано, что варианты белка MUTYH Y165C, Q324H и G382D имеют сниженную ферментативную активность по отношению к каноническому субстрату 8-охоG:A [423]. Наконец, плазмидные репортерные конструкции находят применение в исследовании общей организации систем репарации ДНК и роли в них разных белков. Так, при их помощи подробно исследовали функцию белков RAD51, XRCC3, RAD52, BRCA1, BRCA2, Ku70 и BARD1 в HR [424, 425].

1.5. Получение клеточных линий и мышинных моделей с генными модификациями

1.5.1. Использование гомологичной рекомбинации для получения генной модификации

Получение генных нокаутов стало одним из основных способов исследовать функцию гена в клетке и организме. Основы этой технологии были заложены в 1980-х гг. Для получения нокаутных организмов — например, мышей — сначала получают необходимую векторную конструкцию, затем с ее помощью в культуре эмбриональных стволовых клеток получают желаемую модификацию с помощью HR, после чего редкие целевые рекомбинанты вводят в эмбрион, находящийся на стадии преимплантации, и подсаживают суррогатной матери [426]. При таком подходе клетки, содержащие модификацию, будут вносить вклад в формирование всех тканей мыши, в том числе и половых клеток. Таким образом, желаемая модификация будет передаваться потомкам [427].

Существует два типа векторных конструкций для генных нокаутов — замещающего и вставочного типа (Рисунок 8) [428]. Вектор замещающего типа представляет собой линейризованную донорную молекулу ДНК, содержащую плечи гомологии с эндогенным локусом и ген устойчивости к антибиотику (чаще всего к неомицину). Эндогенная последовательность замещается последовательностью вектора посредством двух кроссоверных событий. Вставочный тип приводит к линейризации вектора внутри района гомологии эндогенного локуса, что приводит к дупликации геномной последовательности. Большая часть нокаутных мышинных моделей была создана с использованием векторов замещающего типа [427].

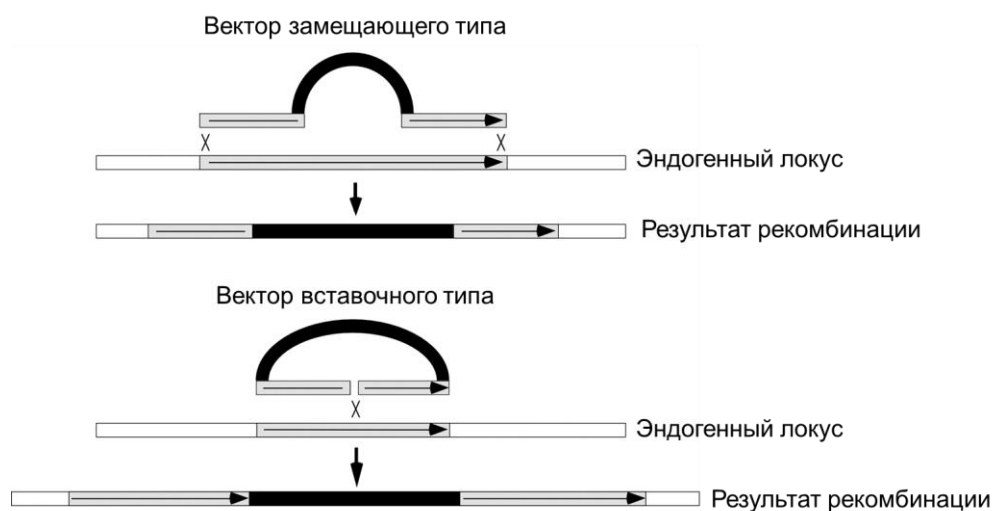


Рисунок 8. Получение генной модификации с помощью векторов замещающего и вставочного типа [429]. Серым отмечен участок гомологии, черным обозначен маркер для селекции.

Следующий этап включает селекцию рекомбинантов. Изначально в качестве селективного маркера использовали ген устойчивости к неомицину, однако затем была предложена система положительной/отрицательной селекции (Рисунок 9) [430]. Линейные молекулы ДНК при вставке в случайные сайты сохраняют концы, однако при рекомбинации с целевым локусом

генома происходит потеря концов исходного линейаризованного вектора. В состав системы для селекции входит два компонента. Первый из них — это ген устойчивости к неомицину для позитивной селекции клеток-реципиентов, которые несут вставку. Такие клетки будут выживать на среде с аминогликозидным антибиотиком генетицином (G418). Второй компонент — это негативный маркер, последовательность гена тимидинкиназы вируса простого герпеса (*HSV-tk*), расположенная на конце линейаризованного вектора. Этот маркер используют для селекции против клеток, содержащих вставку целевого вектора в случайном локусе, на среде с ганцикловиром или 1-(2'-дезоксидезокси-2'-фтор-β-D-арабинофуранозил)-5-иодоурацилом (FIAU). Клетки, экспрессирующие вирусную тимидинкиназу, не способны выживать на такой среде.

Нокаутные мышинные модели, созданные с помощью такого подхода, позволяют изучать патологию заболеваний. Также их можно использовать для разработки и оценки терапевтических препаратов [426]. К основным недостаткам этого метода относят возможность возникновения больших геномных делеций, что, в частности, может приводить к нежелательным потерям еще не идентифицированных генов, расположенных в интронах, или закодированных в комплементарной цепи, а также регуляторных элементов, обеспечивающих экспрессию других генов [427]. В качестве иллюстрации можно привести нокаутные мышинные модели по гену миогенного регуляторного фактора 4 (*MRF4*). Три группы исследователей получали нокауты, делетируя различные части гена, что приводило к совершенно разным результатам — как к появлению полностью жизнеспособных особей, так и к эмбриональной смертности [431].

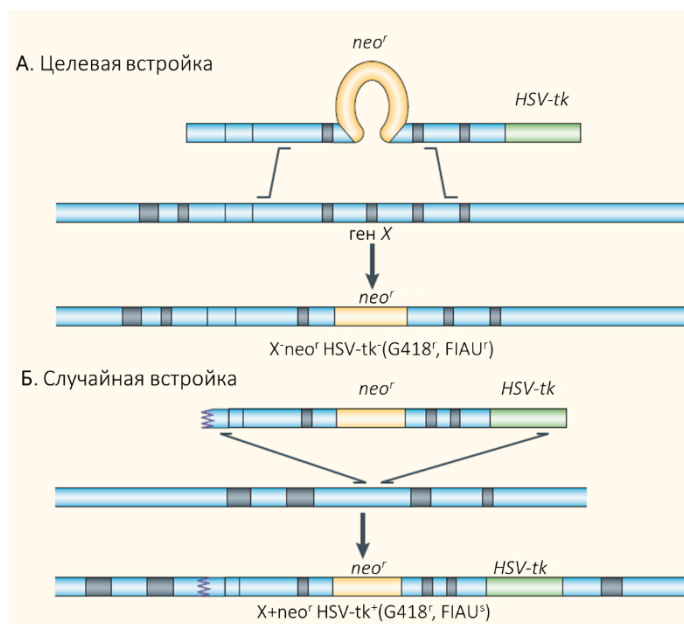


Рисунок 9. Схема положительной/отрицательной селекции. **А.** Векторная конструкция содержит ген устойчивости к неомицину (*neo'*), встроенный в экзон гена *X*, и ген тимидинкиназы вируса герпеса (*HSV-tk*) на конце. Гомологичная рекомбинация между векторной конструкцией и районом хромосомы приводит к инактивации гена *X* в хромосоме и к потере гена *HSV-tk*. Клетки, в которых произошло такое событие, будут иметь генотип $X^{+/-} neo'^{+} HSV-tk^{-}$ и будут расти на среде с G418 и FIAU. **Б.** Конструкция интегрируется в случайный локус генома хозяина, при этом сохраняется ген *HSV-tk*. Получившиеся клетки $X^{+/+} neo'^{+} HSV-tk^{+}$ будут расти на среде с G418, но погибнут на среде с FIAU [426].

1.5.2. Использование геномного редактирования CRISPR/Cas9 для получения генной модификации

Возможность осуществления точного и направленного редактирования генома высших эукариот открыло новую страницу в современных генетических технологиях. К настоящему времени существует несколько систем для введения модификаций в целевые районы генома. Самые распространенные из них основаны на применении нуклеаз с цинковыми пальцами (ZFN) [432–434], TAL-эффektorных нуклеаз [435–437] и системы CRISPR/Cas9, которая пользуется в наши дни наибольшей популярностью [438, 439].

Система CRISPR/Cas эволюционировала у прокариот для обеспечения адаптивного иммунитета против чужеродных генетических элементов — вирусов и плазмид [439]. Она состоит из локуса CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats), с которого транскрибируются некодирующие РНК, и белок-кодирующих генов *cas* (CRISPR-associated). Локус CRISPR — это кластер коротких палиндромных повторов длиной 30–40 п. н., разделенных участками вариабельной ДНК — спейсерами по 20–80 п. н. Спейсеры соответствуют коротким последовательностям чужеродных генетических элементов — протоспейсерам, например, фрагментам фаговых геномов [440]. В настоящее время обнаружено два класса, шесть типов и 33 подтипа различных систем CRISPR/Cas, выделяемых на основе организации *cas*-оперона и различных механизмов достижения CRISPR-опосредованного иммунитета [441].

Нуклеазу Cas9 из CRISPR/Cas системы типа II наиболее широко используют в геномном редактировании. Общую схему работы системы адаптивного иммунитета CRISPR/Cas типа II можно разделить на три стадии. Первая из них — адаптация, заключающаяся в приобретении спейсера [439]. Вторая стадия включает синтез и процессинг CRISPR-РНК (сгРНК): CRISPR локус транскрибируется и в дальнейшем подвергается процессингу в малые сгРНК, каждая из которых состоит из прямого повтора и спейсера [442]. Вспомогательная некодирующая РНК — транскрибирующая CRISPR-РНК (tracrРНК), транскрибирующаяся с CRISPR локуса, вносит вклад в процессинг сгРНК и участвует в формировании гибрида сгРНК/tracrРНК [443]. Эта гибридная молекула служит для адресации эндонуклеазы Cas9 к нужной последовательности ДНК. Конечная стадия — интерференция, в ходе которой Cas9 и сгРНК формируют активный рибонуклеопротеидный комплекс, проверяющий чужеродную ДНК на наличие районов комплементарности с последовательностью сгРНК и расщепляющий ДНК при наличии такого соответствия [438, 444, 445]. Узнавание мишени белком Cas9 требует 20-нуклеотидной комплементарной последовательности в сгРНК и наличия короткого мотива, прилежащего к протоспейсеру (PAM) [438, 446]. В самой широко применяемой системе CRISPR/Cas9 из

Streptococcus pyogenes PAM представляет собой последовательность 5'-NGG-3' [438]. Для ортологов Cas9 могут быть другие требования к PAM [444, 445].

Главная идея, лежащая в основе геномного редактирования — внесение в целевой сайт ДНК двуцепочечных разрывов, которые подвергаются репарации в клетке. Главное преимущество системы CRIPSR/Cas9 заключается в том, что ДНК-мишень для белка Cas9 можно задать, всего лишь изменить 20-нуклеотидную последовательность спейсера в crPHK. В современных вариантах технологии CRIPSR/Cas9 обычно используют химерные единичные направляющие РНК (sgPHK), которые имитируют комплекс tracrPHK-crPHK [444]. sgRNA содержат два главных структурных элемента: 20-нуклеотидную последовательность с 5'-конца sgPHK, которая задает ДНК-мишень по механизму комплементарности, и несколько шпилек на 3'-конце sgPHK, которые отвечают за связывание с Cas9 [438]. После внесения нуклеазой Cas9 адресованного двуцепочечного разрыва активируется процесс репарации. В присутствии донорной молекулы ДНК с гомологией участкам по сторонам разрыва происходит HR с точной заменой нуклеотидной последовательности на донорную, в противном случае репарация происходит по механизму NHEJ [447–449]. NHEJ приводит к появлению инсерций и делеций в целевом сайте, мутации такого типа используют для получения нокаутов. При размере инсерции/делеции, не кратном 3, происходит сдвиг рамки считывания, и образуется нефункциональный белок (Рисунок 10) [446, 450, 451].

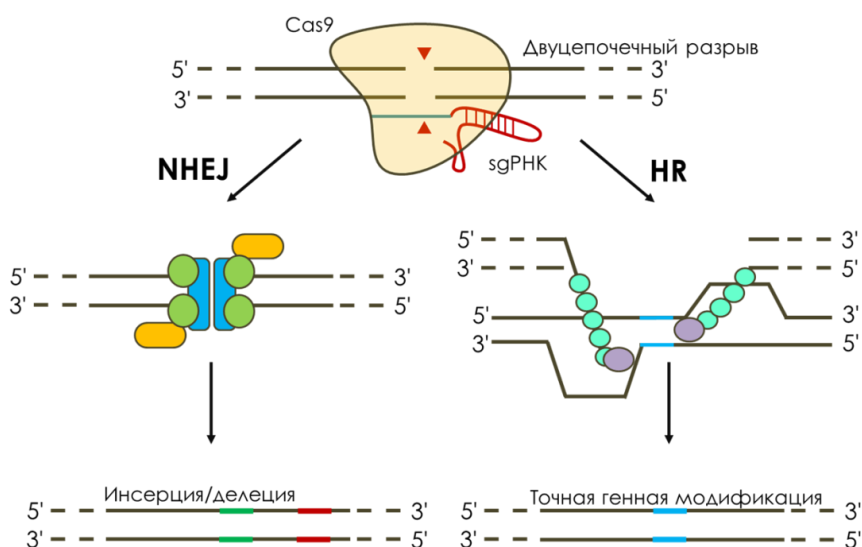


Рисунок 10. Общая схема использования CRISPR/Cas9 для редактирования геномов [452]. NHEJ — репарационный путь нехомологичного соединения концов, HR — гомологичная рекомбинация.

Для получения клеточной линии с нокаутом экспрессии гена с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 используют стратегию, включающую несколько этапов (Рисунок 11) [453]. На первом этапе происходит выбор последовательностей протоспейсеров гена-мишени *in silico*, затем клонирование подобранных последовательностей в плазмиду,

содержащую ген нуклеазы Cas9. Далее для оценки эффективности работы системы CRISPR/Cas9 осуществляют трансфекцию плазмиды с подобранной sgРНК в клетки и затем секвенируют пул трансфицированных клеток. На следующем этапе клетки рассеивают до отдельных моноклонов, которые генотипируют с помощью анализа полиморфизма длин рестриционных фрагментов (RFLP) и секвенирования.

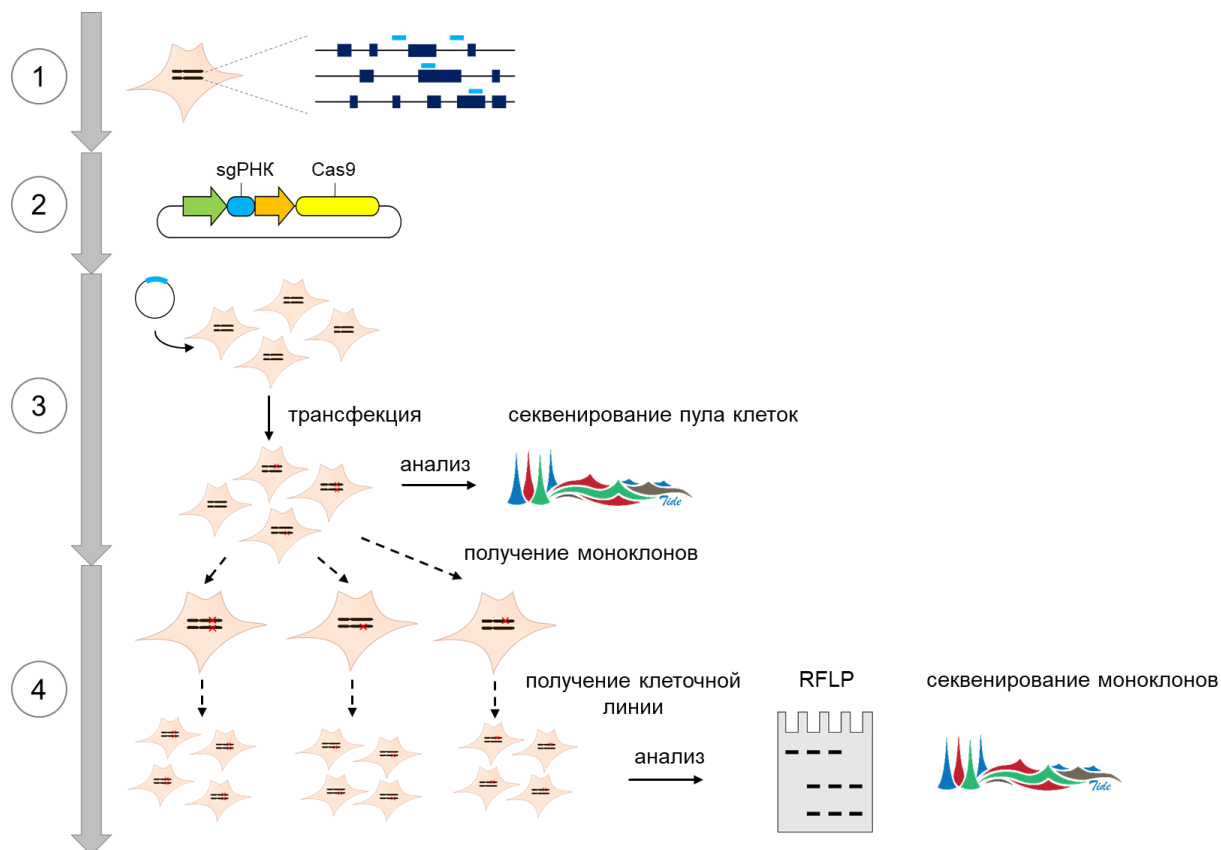


Рисунок 11. Общая схема получения клеточной линии с нокаутом гена с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 (по [453]). Стадии отмечены слева цифрами. 1 – дизайн *in silico* sgРНК (отмечены синим); 2 – клонирование sgРНК в плазмиду, содержащую ген Cas9; 3 – оценка эффективности подобранной sgРНК с помощью секвенирования пула трансфицированных клеток; 4 – получение отдельных моноклонов и их валидация с помощью анализа RFLP и секвенирования.

1.6. Клеточные линии 293 и A549

Культивируемые линии клеток человека и других животных широко применяют в исследовательских и промышленных целях для решения фундаментальных научных вопросов, создания вакцин, получения рекомбинантных белков, разработок генной терапии, исследования токсичности фармацевтических препаратов и т. п. В настоящей работе использовались клетки 293FT и A549.

Исходные клетки 293 были получены в 1973 г. из эмбриональной почки человека (абортный материал) путем трансформации ДНК аденовируса типа 5 [454]. Известно, что встройка фрагмента генома аденовируса размером 4000 п. н. произошла в хромосому 19 [455]. Этот участок генома аденовируса несет кодирующие последовательности белков E1A и E1B,

которые влияют на контроль клеточного цикла и блокируют апоптоз [456, 457]. Согласно цитогенетическим данным, клеточная линия 293 гипотриплоидна [458]. Данные секвенирования транскриптома этой клеточной линии и ее производных говорят в пользу происхождения из надпочечника, а не почки, как считалось ранее, поэтому ее часто встречающееся в литературе название НЕК293 (Human Embryonic Kidney cells) предложено пересмотреть. Помимо этого, при анализе данных секвенирования не было выявлено следов последовательностей Y-хромосомы, что свидетельствует в пользу женского происхождения этих клеток [8].

Получено несколько производных исходной клеточной линии 293 для различных целей. Линия 293Т экспрессирует термочувствительный аллель Т антигена вируса SV40 [459]. Это позволяет нарабатывать векторы, содержащие ориджин репликации SV40, тем самым значительно увеличивая уровень экспрессии при временной трансфекции. Впоследствии из клеточной линии 293Т были получены клетки 293FT, отличающиеся высокой скоростью роста. Существует клеточная линия 293S, адаптированная для роста в суспензии [460]. Эта линия была подвергнута случайному мутагенезу этилметансульфонатом, были отобраны клоны, устойчивые к ризицину. Показано, что эти клетки не способны синтезировать комплексные N-гликаны и соответственно преобладающая модификация гликопротеинов — это Man₅GlcNAc₂. Затем из них был получен клон, стабильно экспрессирующий репрессор TetR для тетрациклин-индуцированной продукции белков. Эта клеточная линия получила название 293SG и широко используется для производства гомогенно N-гликозилированных белков [461].

A549 — это широко используемая клеточная линия немелкоклеточного рака легкого человека. A549 представляет собой гипотриплоидные альвеолярные базальные эпителиальные клетки. Эта клеточная линия была получена в 1972 г. из образца легочной карциномы [462]. Клетки A549 используют для продукции аденовирусов, в частности для репликации аденовирусных конструкторов, которые не нуждаются в комплементации вирусным онкогеном E1A [463]. Помимо это клеточную линию A549 интенсивно используют в качестве модели альвеолярного легочного эпителия II типа. Было показано, что эти клетки наиболее подходят для исследования метаболизма легочной ткани и способов доставки лекарств [9].

1.7. Заключение

Многие основополагающие исследования в области репарации ДНК были сделаны на описанных выше клеточных и мышинных моделях, дефицитных по генам BER. В большинстве случаев изначально предпринимались попытки создать клеточные линии из биоматериала пациентов или получить нокаутные мышинные модели по генам системы BER. Дефицитные по некоторым генам BER организмы не выживают, что свидетельствует о ключевой роли BER в процессе эмбрионального развития, однако в ряде случаев от таких организмов удается получить эмбриональные стволовые клетки или эмбриональные фибробласты. Изучение скорости роста, частоты мутаций и чувствительности к генотоксичным соединениям таких клеток по сравнению с клетками дикого типа внесло значительный вклад в понимание того, каким образом мутации в генах системы BER могут увеличивать риск развития заболеваний или вызывать их. Однако при использовании нокаутных клеточных линий разного происхождения возникают сложности с интерпретацией результатов исследования в связи с исходной разницей в генотипе клеточных линий. Такого рода вклад генотипа нивелирован при использовании изогенных клеточных линий. Появившаяся в 2013 г. технология редактирования ДНК на основе системы адаптивного иммунитета бактерий CRISPR/Cas9 значительно облегчила процесс получения клеток и животных с целенаправленно измененным геномом. С помощью этой технологии можно получать нокауты и нокадауны генов, а также вносить в них точечные замены. Представляется перспективным получение изогенной панели нокаутных клеточных линий по генам системы BER с помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9. С помощью клеточных линий, дефицитных по определенным участникам BER, можно исследовать генотоксичность соединений, а также механизмы репарации повреждений в клеточной системе.

Глава 2. Экспериментальная часть

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы

В ходе работы использовали следующие реактивы: бромфеноловый синий, DTT, Triton X-100 («Диаэм», Россия); dNTP, BSA, X-gal, раствор пропидия иодида, маркер подвижности ДНК 1 т. п. н. («Сибэнзим», Россия); маркер подвижности ДНК 100 п. н. «GeneRuler» («Thermo Fisher Scientific», США); MgCl₂, NaCl, формамид, глюкоза, глицерин, глицин, ампициллин, бакто-триптон, бакто-дрожжевой экстракт, агароза, трис-(гидроксиметил)аминометан, SDS, EDTA, метоксиамин («MP Biomedicals», США); IPTG («AppliChem», США); MTT, MMS, H₂O₂, смесь ингибиторов протеаз «Protease Inhibitor Cocktail» («Sigma-Aldrich», США); наборы для выделения плазмид «Plasmid Purification Midi Kit», «Plasmid Purification Mini Kit», набор для очистки продуктов из геля «QIAquick Purification Kit», реагент Effectene («Qiagen», Нидерланды); набора для ТА-клонирования «TA cloning kit» («Thermo Fisher Scientific»); липофектамин 3000, модифицированная Дульбекко среда Игла, модифицированный Дульбекко фосфатно-солевой буфер («Invitrogen», США); эмбриональная телячья сыворотка («GE Healthcare Life Sciences», США); трипсин-EDTA (0,25%) («Life Technology», США); реагент для проявки хемилюминесценции «Optiblot ECI Max Detection Kit» («Abcam», Великобритания).

Для культуральных и клеточных работ использовали одноразовую посуду производства «Thermo Fisher Scientific» и «Corning» (США). Для приготовления всех растворов использовали деионизованную воду класса milliQ, за исключением микробиологических сред, которые готовили на дистиллированной воде.

2.1.2. Клеточные линии

В работе использовали клеточную линию 293FT любезно предоставленную лабораторией эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН и клеточную линию аденокарциномы легкого человека A549, любезно предоставленную лабораторией биотехнологии ИХБФМ СО РАН. Клеточные линии HeLa, DLD-1 и HeLa с нокаутом гена *NTHL1*, полученную с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 [89], были любезно предоставлены для работы проф. А. Хобтой (Йенский университет им. Ф. Шиллера, Германия). Клеточные линии регулярно проверяли на отсутствие заражения микоплазмой с помощью ПЦР района гена 16S рибосомальной РНК.

2.1.3. Штаммы бактерий и плазмиды

Для получения плазмидных конструкторов использовали плазмиду pZAJ_5с, кодирующую флуоресцентный вариант EGFP, и плазмиды pZAJ_Q205*, pMR_Q205P и pMR_A207P, кодирующие нефлуоресцентные варианты EGFP [464]. Данные плазмиды и плазида для

контроля трансфекции pDsRed-Monomer-N1 были любезно предоставлены проф. А. Хобтой. Плазмиду pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458) [453] для получения нокаутов с помощью системы CRISPR/Cas9 любезно предоставила лаборатория эпигенетики развития ИЦиГ СО РАН. В работе использовали клетки штамма *E. coli* DH5 α ($F^- \Delta(argF-lac)169 \phi80dlacZ58(M15) glnX44(AS) \lambda^- rfbC1 gyrA96(Nal^R) recA1 endA1 spoT1 thiE1 hsdR17$). Клетки хранили при -70°C в 20%-ном глицерине.

2.1.4. Стандартные буферы и растворы

В работе использовали буферы и растворы, приведенные в Таблица 2.

Таблица 2. Состав буферов и растворов, использованных в работе

Название	Состав
Блокирующий раствор	5%-ное обезжиренное сухое молоко, TBST
Буфер 1	20 мМ Трис–HCl (pH 8,0), 50 мМ NaCl, 10 мМ MgCl ₂ , 2 мМ DTT, 5%-ный глицерин
Буфер 2	50 мМ Трис–HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl ₂ , 10 мМ DTT, 0,1 мМ dATP, 0,1 мМ ATP
Буфер 3	25 мМ Трис–HCl (pH 7,5), 50 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 1 мМ DTT
Буфер 4	50 мМ Трис–HCl (pH 7,5), 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl ₂ , 1 мМ DTT
Буфер I	10 мМ Трис–HCl (pH 7,8), 200 мМ KCl
Буфер II	10 мМ Трис–HCl (pH 7,8), 600 мМ KCl, 2 мМ EDTA, 40%-ный глицерин, 0,2%-ный Нонидет Р-40
Буфер III	10 мМ HEPES (pH 7,6), 60 мМ KCl, 1 мМ EDTA, 0,075%-ный Нонидет Р-40, 1 мМ PMSF, 1 мМ DTT
Буфер IV	20 мМ Трис–HCl (pH 8,0), 420 мМ NaCl, 1,5 мМ MgCl ₂ , 0,2 мМ EDTA, 25%-ный глицерин, 1 мМ PMSF
Буфер NEB 4	20 мМ Трис-ацетат (pH 7,9), 50 мМ ацетат калия, 10 мМ ацетат магния, 1 мМ DTT
Буфер VEN	10 мМ HEPES (pH 7,5), 200 мМ NaCl, 1 мМ EDTA
Буфер VER	50 мМ Трис–HCl (pH 7,5), 10 мМ MgCl ₂ , 10 мМ DTT, 0,1 мМ dGTP, 1 мМ ATP
Буфер POL β	10 мМ Трис–HCl (pH 7,6), 10 мМ MgCl ₂ , 1 мМ DTT, 0,1 мМ dGTP
Буфер R	10 мМ Трис–HCl (pH 8,5), 10 мМ MgCl ₂ , 100 мМ KCl, 0,1 мг/мл BSA
Буфер для РНК фага Т4	50 мМ Трис–HCl (pH 7,6), 10 мМ MgCl ₂ , 5 мМ DTT
Буфер для <i>Taq</i> -полимеразы	75 мМ Трис–HCl (pH 8,8), 20 мМ (NH ₄) ₂ SO ₄ , 0,01%-ный (v/v) Tween 20
Буфер для ДНК-лигазы фага Т4	40 мМ Трис–HCl (pH 7,8), 10 мМ MgCl ₂ , 10 мМ DTT, 0,5 мМ ATP
Буфер для очистки олигонуклеотидов	100 мМ Трис–HCl (pH 7,5), 1 мМ EDTA
Буфер для переноса	25 мМ Трис–HCl (pH 8,3), 190 мМ глицин, 0,1%-ный SDS, 10%-ный метанол
Буфер с протеиназой К	10 мМ Трис–HCl (pH 8,0), 10 мМ EDTA, 3,5% Igepal CA630, 3,5%-ный Tween 20, 0,4 мг/мл протеиназы К
Краситель ВРВ-Gly (6 \times)	30%-ный глицерин, 0,1%-ный бромфеноловый синий
Краситель с формамидом	20 мМ EDTA, 0,1%-ный ксиленцианол, 0,1%-ный бромфеноволовый синий в формамиде
Лэммли буфер	0,125 мМ Трис–HCl (pH 6,8), 4%-ный SDS, 10%-ный β -меркаптоэтанол, 20%-ный глицерин, 0,004%-ный бромфеноловый синий

Среда LB	1%-ный (w/v) бакто-триптон, 0,5%-ный (w/v) бакто-дрожжевой экстракт, 1%-ный (w/v) NaCl
Среда SOC	2%-ный (w/v) бакто-триптон, 0,5%-ный (w/v) бакто-дрожжевой экстракт, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 20 mM глюкоза
EB	10 mM Трис–HCl (pH 8,5)
ТАЕ	40 mM Трис–ацетат (pH 7,6), 1 mM EDTA
TE	10 mM Трис–HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA
TBE	89 mM Трис, 89 mM борная кислота, 2 mM Na-EDTA
TBST	20 mM Трис–HCl (pH 7,6), 150 mM NaCl, 0,1%-ный Tween 20
TGS	25 mM Трис–HCl (pH 8,3), 250 mM глицин, 0,1%-ный SDS

2.1.5. Ферменты и антитела

В работе использовали протеиназу К, урацил-ДНК-гликозилазу *E. coli* (Ung), эндонуклеазы рестрикции DraIII, Hpy188III, NgoMIV, PfuI («Сибэнзим»), эндонуклеазу рестрикции BbsI, эндонуклеазу IV *E. coli* («New England BioLabs», США); никазы Nb.Bpu10I, Nt.Bpu10I, *Taq*-полимеразу, ДНК-лигазу фага Т4, полинуклеотидкиназу (PNK) фага Т4 («Thermo Fisher Scientific»); рекомбинантные белки APEX1 и Frg, выделенные в лаборатории геномной и белковой инженерии ИХБФМ СО РАН; рекомбинантный белок POLβ, любезно предоставленный лабораторией биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН. Для проведения иммуноблоттинга использовали первичные кроличьи антитела к белку APEX1 человека (NB100-101), первичные мышинные антитела к белку MUTYH человека (H00004595-M01, «Novus Biologicals», США), первичные мышинные антитела к белку POLβ человека (ab1831, «Abcam»), первичные мышинные антитела к белку PCNA человека (sc-56, «Santa Cruz Biotechnology», США), вторичные козы антитела против иммуноглобулинов кролика (ab6721) и мыши (ab6789), конъюгированные с пероксидазой хрена («Abcam»).

2.1.6. Олигонуклеотиды

В Таблица 3 приведены последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе. Олигонуклеотиды для получения плазмид с повреждениями были любезно предоставлены проф. А. Хобтой (Йенский университет им. Ф. Шиллера, Германия). Остальные олигонуклеотиды были синтезированы в лаборатории медицинской химии ИХБФМ СО РАН. Для синтеза олигонуклеотидов с повреждениями использовали коммерчески доступные амидофосфиты («Glen Research», США). Метоксиаминовые аддукты АП-сайта с фосфатными или фосфоротиоатными межнуклеозидными связями (MX, sMX и sMXs) получали обработкой соответствующих урацилсодержащих плазмид Ung и метоксиамином (см. разд. 2.2.13.4).

Таблица 3. Последовательности олигонуклеотидов.

Название	Последовательность (5'→3')
Праймеры для ТА-клонирования	
T7APEX1_3_for	GGCTTTCGTTGGGTCTATAGTTA
T7APEX1_3_rev	CAACATTCCTGGGAAGAGGAGAG
T7_APEX2_2 nd _for	CTTTGCTTCCTTCAGCGTCC
T7_APEX2_2 nd _rev	TTCGGGGGTTTGACTTGG

T7POLB_1_for	CCGTCTCCAAGTCCTGGTA
T7POLB_1_rev	GGCTCACGTTCTTCTCAAAGT
T7_OGG1_1ex_1_F	TGTTAAACAGCACCGTGTGGG
T7_OGG1_1ex_1_R	GGTTGGCTACCCGTGCTT
T7_MUTYH_7ex_F	TGTCTCTTTCTGCCTGCCTG
T7_MUTYH_7ex_R	CTACGTTGCCATCCACCACA
Олигонуклеотиды для получения двуцепочечных субстратов для исследования активности BER	
<i>in vitro</i>	
U	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT (X = U)
THF	CTCTCCCTTCXCTCCTTTCCTCT (X = THF)
coml	AGAGGAAAGGAGCGAAGGGAGAG
primer	CGAGACCGTTCG
downstream	GAGGAAAGAAGCGAAGGAATTCCAGAGC
template	GCTCTGGAATTCTTCGCTTCTTTCTCCTCTCGACGGTCTCG
Маркеры подвижности	
23	CTCTCCCTTCGCTCCTTTCCTCT
11	CTCTCCCTTCG
10	CTCTCCCTTC
Олигонуклеотиды для получения плазмид с повреждениями	
pZA_Bpu10I botttom	TCAGGGCGGACTGGGTGC
pZAJ_5C TS compl	GCACCCAGTCCGCCCTGA
Cloning EGFP_Q204X BTM	TCAGGGCGGACTAGGTGC
nts.613_8G	TGAGCACCXAGTCCGCCC (X=8-oxoG)
ts.613_THF	TCAGGGCGGACTXGGTGC (X = THF)
ts.613_SF	TCAGGGCGGACTXGGTGC (X = sF)
ts.613_U	TCAGGGCGGACTXGGTGC (X = U)
ts.613_sU	TCAGGGCGGACTXGGTGC (X = sU)
ts.613_sUs	TCAGGGCGGACTXGGTGC (X = sUs)
ts.613_fA	TCAGGGCGGACTXGGTGC (X=fA)
Q204* NB compl	GCACCTAGTCCGCCCTGA
ts.614G	TCAGGGCGGACGGGGTGC
ts.614_8G	TCAGGGCGGACXGGGTGC (X = 8-oxoG)
ts.614_s8G	TCAGGGCGGACXGGGTGC (X = s8-oxoG)
pMR_Q205P TS compl	GCACCCCGTCCGCCCTGA
ts.619G	TCAGGGGGGACTGGGTGC
ts.619_8G	TCAGGGXGGACTGGGTGC (X = 8-oxoG)
ts.619_s8G	TCAGGGXGGACTGGGTGC (X = s8-oxoG)
pMR_A207P TS compl	GCACCCAGTCCCCCTGA
Олигонуклеотиды для клонирования протоспейсеров в плазмиду pX458	
APEX1_1_for	CACCGGTAACGGGAATGCCGAAGCG
APEX1_1_rev	AAACCGCTTCGGCATTCCTCGTTACC
APEX1_2_for	CACCGTAACGGGAATGCCGAAGCGT
APEX1_2_rev	AAACACGCTTCGGCATTCCTCGTTAC
APEX1_3_for	CACCGGATCAGAAAACCTCACCCAG
APEX1_3_rev	AAACCTGGGTGAGGTTTCTGATCC
APEX2_2_top	CACCGATTCGGAGACCCCTGCAAG
APEX2_2_bot	AAACCTTGCAGGGGTCTCCGAATC
POLB1_for	CACCGGCCGCAGGAGACTCTCAACG
POLB1_rev	AAACCGTTGAGAGTCTCCTGCGGCC
POLB_2_for	CACCGGGCCGCATGAGCAAACGGA
POLB_2_rev	AAACTCCGTTTGGCTCATGGCGGCC
OGG1_1ex_1_top	CACCGCACCGGAAAGATTGTCCAGA
OGG1_1ex_1_bot	AAACTCTGGACAATCTTTCCGGTGC
OGG1_1ex_2_top	CACCGCCAGGCGCAGCTCAGAGCGA
OGG1_1ex_2_bot	AAACTCGCTCTGAGCTGCGCCTGGC

MUTYH_5_top	CACCGGTATAGTAGTTGATCACAG
MUTYH_5_bot	AAACCTGTGATCAACTACTATACC
MUTYH_7_top	CACCGCTACTATTCTCGTGGCCGG
MUTYH_7_bot	AAACCCGGCCACGAGAATAGTAGC
sF — THF с 5'-фосфоротиоатной связью, sU — остаток dU с 5'-фосфоротиоатной связью, sUs — остаток dU с фосфоротиоатной связью с 5'- и 3'-стороны, s8-охоG — 8-охоG с 5'-фосфоротиоатной связью	
Олигонуклеотиды для получения плазмидных конструктов с мисматчами	
ts.610C	TCAGGGCGGACTGGGCGC
ts.610G	TCAGGGCGGACTGGGGGC
ts.611T	TCAGGGCGGACTGGTTGC
ts.611C	TCAGGGCGGACTGGCTGC
ts.611A	TCAGGGCGGACTGGATGC
ts.613T	TCAGGGCGGACTTGGTGC
ts.613C	TCAGGGCGGACTCGGTGC
ts.613A	TCAGGGCGGACTAGGTGC
ts.614C	TCAGGGCGGACCGGGTGC
ts.614G	TCAGGGCGGACGGGGTGC
ts.614A	TCAGGGCGGACAGGGTGC
ts.615G	TCAGGGCGGAGTGGGTGC
ts.615A	TCAGGGCGGAATGGGTGC
ts.616T	TCAGGGCGGTCTGGGTGC
ts.616C	TCAGGGCGGCCTGGGTGC
ts.616G	TCAGGGCGGGCTGGGTGC
ts.617T	TCAGGGCGTACTGGGTGC
ts.617C	TCAGGGCGCACTGGGTGC
ts.617A	TCAGGGCGAACTGGGTGC
ts.619T	TCAGGGTGGACTGGGTGC
ts.619G	TCAGGGGGGACTGGGTGC
ts.619A	TCAGGGAGGACTGGGTGC
ts.620T	TCAGGTCCGACTGGGTGC
ts.620C	TCAGGCCCGACTGGGTGC
ts.620A	TCAGGACCGACTGGGTGC
Олигонуклеотиды для проведения ПЦР в режиме реального времени	
rtAPEX1_fwd	GTTTCTTACGGCATAGGCGAT
rtAPEX1_rev	CACAAACGAGTCAAATTCAGCC
rtMBD4_fwd	CCGTCACCTCTAGTGAGCG
rtMBD4_rev	GCAGAAGCGATGGGTCTTGTA
rtMPG_fwd	CCCATAACCGCAGCATCTATTT
rtMPG_rev	GGCTGGTTCGAAGAACTCCA
rtMUTYH_fwd	ATACCGGATGGATGCAGAAGT
rtMUTYH_rev	GCCCAGAGTTGATTACCTCC
rtNEIL1_fwd	CCTACCGCATCTCAGCTTCAG
rtNEIL1_rev	GTCCACGAAACATAGGGCGAG
rtNEIL2_fwd	CTGTCTGCTATACACTGCTGGA
rtNEIL2_rev	GCACTCAGGACTGAACCGA
rtNEIL3_fwd	TGGATCAGAACGTATTGCCTGG
rtNEIL3_rev	GACCACAATTAGGACGCTTGTA
rtNTHL1_fwd	TGAGCACTGCTATGACTCCAG
rtNTHL1_rev	AGCGTGGCATCATCTGTCTG
rtOGG1_fwd	ACTCCCACTTCCAAGAGGTG
rtOGG1_rev	GGATGAGCCGAGGTCCAAAAG
rtSMUG1_fwd	CGCAACTACGTGACTCGCTAC
rtSMUG1_rev	ACTGGTCGTTTAGGATGCTCTT
rtTDG_fwd	TCACACTCTACCAGGGAAGTATG

rtTDG_rev	ACGTCCCTCCTTCACGAAATTCT
rtUNG_fwd	CCCCACACCAAGTCTTCACC
rtUNG_rev	TTGAACACTAAAGCAGAGCCC
rtB2M_fwd	ATGTCTCGCTCCGTGGCCTTA
rtB2M_rev	ATCTTGCGCTGTGACAAAGTC

Модифицированные нуклеотиды ДНК, репарация которых исследована в работе, приведены на Рисунок 12.

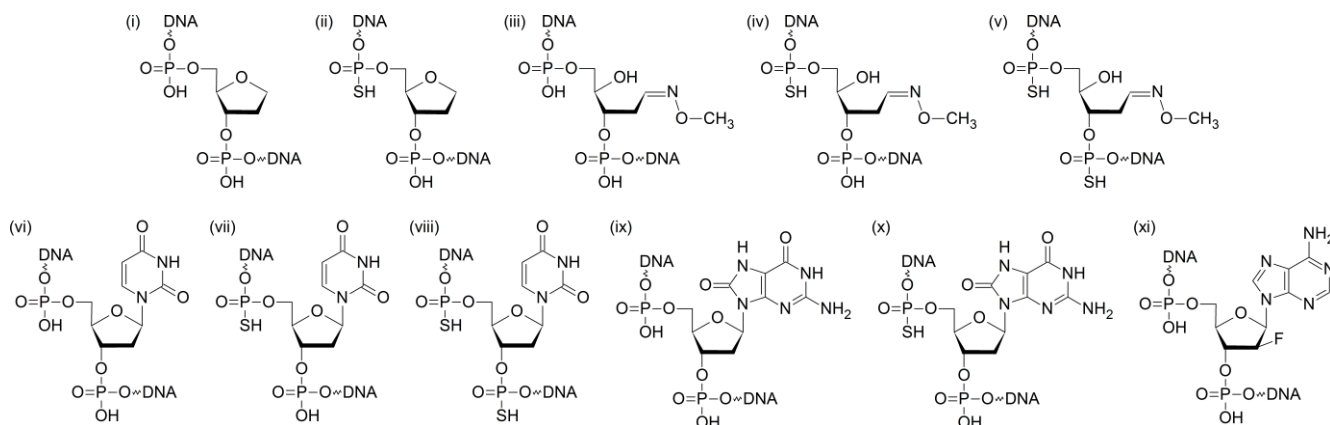


Рисунок 12. Структуры модифицированных звеньев ДНК, использованных в работе. (i) (3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)метилфосфат (THF); (ii) (3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)метилфосфотиоат (sF); (iii) 2,3-дигидрокси-5-(метилсульфонило)пентилфосфат (MX); (iv) 2,3-дигидрокси-5-(метилсульфонило)пентилфосфотиоат (sMX); (v) 2,3-дигидрокси-5-(метилсульфонило)пентилфосфотиоат с 3-фосфотиоатной связью (sMXs); (vi) 2'-деоксиуридин-5'-фосфат (U); (vii) 2'-деоксиуридин-5'-фосфотиоат (sU); (viii) 2'-деоксиуридин-5'-фосфотиоат с 3-фосфотиоатной связью (sUs); (ix) 7,8-дигидро-8-оксо-2'-деоксигуанозин-5'-фосфат (8-охоG); (x) 7,8-дигидро-8-оксо-2'-деоксигуанозин-5'-фосфотиоат (s8-охоG); (xi) 2'-β-фтор-2'-деоксиаденозин-5'-фосфат (fA).

2.2. Методы

2.2.1. Получение нокаутных клеточных линий

Вставку, содержащую последовательность протоспейсера к гену-мишени (см. разд. 2.1.6), клонировали по сайту *BbsI* в плазмиду pX458. Эта плазида содержит ген нуклеазы Cas9 из *Streptococcus pyogenes*, слитый с геном *EGFP* через последовательность T2A, которая приводит к синтезу двух отдельных полипептидов, а также последовательность для синтеза направляющей РНК (sgРНК). Плазмиду, содержащую последовательность спейсера к гену-мишени, выделяли с помощью набора «Plasmid Mini Kit», правильность вставки определяли секвенированием по Сэнгеру в центре коллективного пользования «Геномика» СО РАН.

Для оценки целевой активности подобранных sgРНК клетки 293FT в количестве 10^5 трансфицировали 1,25 мкг ДНК плазмиды с помощью липофектамина 3000. Через 24 ч клетки открепляли трипсинизацией и сортировали EGFP-положительную популяцию клеток на приборе S3e Cell Sorter («Bio-Rad Laboratories», США). Всего собирали порядка 10^5 клеток, из которых

получали клеточный лизат: собранные клетки инкубировали в течение 3 ч при 65 °С в буфере с протеиназой К (см. разд. 2.1.4). ДНК полученных клеточных лизатов использовали в ПЦР с праймерами (см. разд. 2.1.6), фланкирующими район модификации, и затем проводили секвенирование по Сэнгеру. Целевую активность sgРНК оценивали с помощью биоинформатического инструмента TIDE [465].

Плазмиду рХ458 со вставкой для синтеза наиболее активной sgРНК, трансфицировали в клетки 293FT или A549 и проводили проточную сортировку (FACS) их по уровню флуоресценции EGFP. Собирали 1000 клеток и рассеивали на 96-луночные планшеты в количестве 0,5, 1 и 2 клетки на лунку в ручном режиме. В течение двух недель в культуральных планшетах каждые три дня производили смену среды на свежую, моноклоны с плотностью монослоя порядка 70% пересаживали (одна лунка для каждого моноклона) на два новых 96-луночных планшета: один для поддержания клеток, а другой для последующего генотипирования.

Для генотипирования полученных моноклонов также получали клеточный лизат и проводили ПЦР с использованием праймеров, фланкирующих участок модификации гена-мишени. Продукт ПЦР обрабатывали 1 ед. акт. эндонуклеазы рестрикции (см. разд. 2.1.5) в присутствии 12,5 мМ MgCl₂ в течение 1 ч при 37 °С. Продукты гидролиза эндонуклеазой рестрикции разделяли в 1%-ном агарозном геле.

2.2.2. ТА-клонирование

Для характеристики спектра модификаций, внесенных системой геномного редактирования CRISPR/Cas9 в целевой район гена, проводили ТА-клонирование. Для этого нарабатывали продукт ПЦР с использованием праймеров, обрамляющих район модификации гена (см. разд. 2.1.6). Реакционная смесь объемом 50 мкл содержала 100 нг ДНК-матрицы, буфер для Taq-полимеразы (см. разд. 2.1.4), смесь dNTP по 0,2 мМ каждого из dATP, dGTP, dTTP, dCTP, 2 мМ MgCl₂, 1,25 ед. акт. Taq-полимеразы и по 0,5 мкМ каждого праймера. Программа для амплификации необходимого участка включала следующие стадии: 1) предварительная денатурация в течение 3 мин при 95 °С, 2) 35 циклов, включающих денатурацию в течение 30 с при 95 °С, отжиг праймеров в течение 30 с при 60 °С (для амплификации гена *APEX1*), при 56 °С (для *POLB*) или при 62 °С (для *APEX2*, *OGG1* и *MUTYH*), элонгацию в течение 30 с (для *APEX1* и *POLB*), в течение 42 с (для *APEX2*) или 36 с (для *OGG1* и *MUTYH*) при 72 °С, 3) финальная элонгация в течение 5 мин при 72 °С. Одну десятую всего объема реакционной смеси анализировали электрофорезом в 1%-ном агарозном геле. Затем производили очистку наработанного продукта ПЦР от компонентов реакции с помощью набора «QIAquick PCR purification kit». Далее проводили реакцию лигирования с использованием компонентов набора для ТА-клонирования «TA cloning kit», в состав которого входит вектор pCR 2.1,

представляющий собой линейризованную плазмиду с выступающими 3'-концами из одного нуклеотида dTMP. Реакцию лигирования проводили в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем половину реакционной смеси трансформировали в электрокомпетентные клетки *E. coli* DH5 α . Клетки высевали на агаризованные чашки Петри, содержащие ампициллин в концентрации 100 мкг/мл, 40 мг/мл X-gal и 100 мМ IPTG. Для первичного скрининга использовали бело-голубую селекцию, далее белые колонии использовали в ПЦР, продукт которой секвенировали по Сэнгеру.

2.2.3. ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени

Суммарную РНК выделяли с помощью набора «RNeasy Plus Mini Kit» («Qiagen»). Обратную транскрипцию проводили с использованием праймера (dT)₁₆, 1 мкг РНК и набора «MuLV-RN First Strand cDNA Synthesis Kit» («Биолабмикс», Россия) согласно протоколу производителя. Для проведения ПЦР в режиме реального времени использовали набор «BioMaster HS-qPCR SYBR Blue kit» («Биолабмикс», Россия) и амплификатор «LightCycler 96» («Roche», Германия). Последовательности праймеров (см. разд. 2.1.6) были подобраны таким образом, чтобы они располагались в разных экзонах или находились на стыке экзонов. В качестве референтного транскрипта для нормализации уровня экспрессии генов-мишеней использовали мРНК β 2-микроглобулина (ген *B2M*, экспрессируемый на высоком уровне во всех клетках человека) [466]. В двух биологических повторах было выполнено выделение РНК. Расчет статистической значимости выполнен с помощью критерия Стьюдента, где * — $p < 0,05$, *** — $p < 0,005$, # — $p < 0,001$, ### — $p < 0,0001$.

2.2.4. Получение белковых экстрактов из эукариотических клеток

Для получения клеточных экстрактов использовали буферы I и II (см. разд. 2.1.4) [467]. К буферу II добавляли смесь ингибиторов протеаз «Protease Inhibitor Cocktail». Затем к осадку клеток добавляли один объем буфера I и двойной объем буфера II, тщательно ресуспендировали осадок клеток и оставляли на 30 мин при 4 °С. Далее экстракты центрифугировали при 14000 g 30 мин, супернатант переносили в новую пробирку. Полученные экстракты хранили при -80 °С.

Для получения ядерных экстрактов использовали буферы III и IV (см. разд. 2.1.4) [468]. Осадок клеток ресуспендировали в 5 объемах буфера III, затем инкубировали в течение 3 мин на льду. Далее клеточный лизат осаждали центрифугированием при 100 g 4 мин. После удаления супернатанта осадок, состоящий из ядер клеток, аккуратно ресуспендировали в 100 мкл буфера III без детергента. Ядра осаждали центрифугированием при 100 g в течение 4 мин. Затем удаляли супернатант и к осадку добавляли один объем буфера IV и довели концентрацию соли до 400 мМ путем добавления 5 М NaCl. Далее добавляли еще один объем буфера IV и перемешивали. Экстракт инкубировали на льду в течение 10 мин, затем центрифугировали в

течение 10 мин при 14000 g и отбирали супернатант, содержащий ядерный экстракт. Ядерные экстракты хранили при -80°C .

Концентрацию белка в клеточных экстрактах определяли спектрофотометрически по методу Брэдфорда. К 20 мкл образца добавляли 600 мкл реагента Брэдфорда и инкубировали при комнатной температуре не менее 5 мин, но не более 1 ч, затем оценивали интенсивности окраски по оптической плотности на длине волны 595 нм, с помощью спектрофотометра «Genesis 10S UV-Vis» («Thermo Fisher Scientific»). Концентрацию белка в образце определяли с помощью калибровочной кривой, построенной с разведениями BSA 0,25; 0,5; 1; 1,4 мг/мл.

2.2.5. Иммуоблотинг

Для исследования белковых экстрактов нокаутных клеточных линий проводили электрофорез в системе Лэммли. Электрофорез проводили в буфере TGS (см. разд. 2.1.4) при 130 В. Перед нанесением образцов на гель, белковые экстракты смешивали с равным объемом буфера Лэммли (см. разд. 2.1.4) и прогревали 5 мин при 95°C . На гель наносили по 40 мкг образца. После разделения белки переносили из геля на поливинилиденфторидную (ПВДФ) мембрану («Bio-Rad») с помощью «мокрого» переноса, используя камеру «Mini PROTEAN Tetra Cell» («Bio-Rad»). Перед укладыванием «сэндвича» губки и фильтровальную бумагу оставляли в буфере для переноса (см. разд. 2.1.4) на 5 мин, а ПВДФ мембрану активировали инкубацией в метаноле. Затем укладывали «сэндвич» в следующей последовательности: губка, фильтровальная бумага, гель, мембрана, фильтровальная бумага, губка. Сэндвич помещали в камеру для переноса и заливали буфером для переноса. Перенос проводили на льду при 200 мА в течение 1 ч. После завершения процесса для контроля переноса белков и их визуализации мембрану окрашивали 0,1%-ным раствором красителя Ponceau S в 5%-ной уксусной кислоте, который потом смывали дистиллированной водой.

Мембрану инкубировали с блокирующим раствором (см. разд. 2.1.4) в течение часа для блокировки неспецифического связывания антител. Затем проводили последовательные отмывки TBST (см. разд. 2.1.4) по 5, 10 и 10 мин. Инкубацию с первичными антителами проводили в 2%-ном обезжиренном сухом молоке в TBST в течение ночи при 4°C . После отмывки мембрану инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в течение 1 ч. Затем осуществляли отмывку в TBST и наносили на мембрану реагент «Optiblot ECl Max Detection Kit» для визуализации связавшихся антител в реакции с пероксидазы хрена с субстратом. Регистрацию хемилюминесцентного сигнала проводили с помощью сканера «VersaDoc» («Bio-Rad»).

2.2.6. Получение двуцепочечных олигонуклеотидных субстратов

Очистку олигонуклеотидов после синтеза от побочных продуктов реакции проводили путем разделения гель-электрофорезом в 20%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Затем под УФ-светом вырезали часть геля, содержащую олигонуклеотид, и помещали в пробирку. Гель измельчали, добавляли буфер для очистки олигонуклеотидов (см. разд. 2.1.4) и инкубировали при перемешивании в течение ночи при 4 °С. Олигонуклеотиды очищали обращеннофазовой хроматографией на сорбенте C₁₈ NenSorb («DuPont», США). Перед нанесением образца колонку, наполненную суспензией 200 мкл сорбента в метаноле, промывали последовательно 1 мл метанола, затем 1 мл H₂O, а затем уравнивали 2 мл буфера для очистки олигонуклеотидов (см. разд. 2.1.4). После нанесения образца колонку промывали последовательно 2 мл того же буфера и 2 мл воды и элюировали олигонуклеотиды добавлением 1 мл 50%-ного метанола. Элюат упаривали досуха под вакуумом и растворяли в 30 мкл буфера 0,1×TE. Концентрацию олигонуклеотидов определяли спектрофотометрически, измеряя оптическое поглощение раствора олигонуклеотидов на длине волны 260 нм, коэффициент экстинкции рассчитывали с помощью онлайн-программы «OligoAnalyzer 3.1» («Integrated DNA Technologies», США).

Для получения двуцепочечных олигонуклеотидных субстратов проводили гибридизацию с двукратным молярным избытком немеченной комплементарной цепи, в течение 2 мин при 95 °С, затем охлаждали до 25 °С со скоростью 0,1 °С/с. Полученный двуцепочечный олигонуклеотидный субстрат хранили при -20 °С.

2.2.7. Введение радиоактивной метки по 5'-концу олигонуклеотидов

Для получения 5'-³²P-меченых олигонуклеотидов в реакционную смесь объемом 20 мкл добавляли 100 пмоль олигонуклеотида (см. разд. 2.1.6), 1 МБк γ[³²P]-АТФ, буфер для РНК фага Т4 (см. разд. 2.1.4) и 5 ед. акт. РНК фага Т4. Реакцию проводили в течение 40 мин при 37 °С и останавливали нагреванием в течение 1 мин при 95 °С. Из реакционной смеси отбирали аликвоту объемом 0,5 мкл для последующего определения эффективности включения метки в олигонуклеотид. Из реакционной смеси олигонуклеотид выделяли, как описано выше для немеченных олигонуклеотидов (см. разд. 2.2.6).

2.2.8. Исследование ферментативной активности в клеточных экстрактах

Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала буфер 1 (см. разд. 2.1.4), 40 нг клеточного экстракта и 50 нМ 5'-флуоресцеин-меченного дуплекса длиной 23 п. н. (см. разд. 2.1.6), содержащий остаток ТНФ. Реакцию проводили в течение 30 мин при 37 °С и останавливали добавлением 5 мкл формамида и прогреванием в течение 5 мин при 95 °С. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20%-ном полиакриламидном геле, содержащем 8 М мочевины, и визуализировали с помощью лазерного сканера Typhoon FLA 9500 Imager («GE Healthcare»),

длина волны возбуждения 473 нм, длина волны поглощения 530 нм. Для исследования активности урацил-ДНК-гликозилазы использовали субстрат, содержащий dU вместо ТНФ (см. разд. 2.1.6), и реакцию останавливали добавлением NaOH до 0,1 М и прогреванием в течение 2 мин при 95 °С. Смесь нейтрализовали эквимолярным количеством HCl. Для исследования способности белков из клеточного экстракта заполнять однонуклеотидную брешь использовали субстрат, состоящий из праймера длиной 11 нт, матрицы длиной 40 нт и запирающего праймера длиной 28 нт (см. разд. 2.1.6), при сборке такой дуплекс содержит однонуклеотидную брешь напротив Т. Реакцию проводили в буфере 2 (см. разд. 2.1.4) с добавлением 50 нМ субстрата и 1 мкг клеточного экстракта в течение 30 мин при 37 °С, затем осуществляли все те же стадии, что и для субстратов с ТНФ.

2.2.9. Исследование BER *in vitro*

Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 50 нМ 5'-³²P-меченый субстрат ТНФ:С или U:С (см. разд. 2.1.6) и 1 мкг клеточного экстракта в буфере BER или буфере POLβ (см. разд. 2.1.4). Реакцию проводили в течение 30 мин при 37 °С, затем останавливали добавлением 5 мкл красителя с формамидом (см. разд. 2.1.4) и нагреванием в течение 5 мин при 95 °С. В случае субстрата U:С некоторые пробы после завершения реакции обрабатывали 100 нМ белком Frg из *E. coli* в течение 5 мин при 37 °С, чтобы подтвердить образование АП-сайта, затем останавливали реакцию, как указано выше. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20%-ном полиакриламидном геле, содержащем 8 М мочевины, и визуализировали с помощью лазерного сканера Typhoon FLA 9500 Imager.

2.2.10. Исследование активности ферментов по отношению к субстратам, содержащим U, sU, sUs

Для исследования активности UNG человека на субстратах содержащих U, sU, sUs использовали ³²P-меченные олигонуклеотиды ts.613 и комплементарный олигонуклеотид Q204* NB compl (см. разд. 2.1.6). Реакционная смесь содержала 50 нМ субстрат и 100 нМ UNG в буфере 3 (см. разд. 2.1.4). Реакцию проводили в течение 10 мин при 37°С, затем останавливали добавлением NaOH (финальная концентрация 0,1 М) и нагреванием в течение 2 мин при 95°С. Смесь нейтрализовали эквимолярным количеством HCl. Для расщепления АП-сайтов, полученных из дуплексов с U, sU, sUs, 50 нМ субстрат инкубировали в буфере 4 (см. разд. 2.1.4) с 2 ед. акт. Ung *E. coli*, 0,1 ед. акт. APX1 в течение 10 мин при 37°С. Реакцию останавливали либо как указано выше, либо добавлением формамида до 40% и нагреванием при 95°С в течение 1 мин. Продукты реакции анализировали электрофорезом в 20%-ном полиакриламидном геле, содержащем 8 М мочевины, и визуализировали с помощью лазерного сканера Typhoon FLA 9500 Imager.

2.2.11. Исследование клеточного цикла и времени удвоения клеточной популяции

Для исследования продолжительности фаз клеточного цикла клетки в экспоненциальной фазе роста пересаживали на 6-луночный планшет в количестве 10^4 на лунку. Через 24 ч удаляли культуральную среду и открепляли клетки от подложки, смывая холодным PBS. Затем клетки фиксировали в растворе 70%-ного этанола при 4 °С в течение 24 ч, далее промывали PBS и инкубировали в 1 мл раствора, содержащего 0,1% (v/v) Triton X-100, 20 мкг пропидия иодида, 200 мкг РНКазы А в течение 15 мин при 37 °С. После окрашивания клетки анализировали на проточном цитофлуориметре NovoCyte 3000 («Agilent Technologies», США). Для детекции флуоресценции пропидия иодида использовали канал PE Texas Red.

Для исследования времени удвоения популяции, клетки в экспоненциальной фазе роста рассаживали в лунки 24-луночного плашета в количестве 4×10^4 на лунку. Каждые 24 ч клетки из отдельных лунок собирали трипсинизацией и подсчитывали их количество с помощью автоматического счетчика клеток Luna II («Logos Biosystems», Корея). Далее строили график зависимости количества клеток от времени. Время удвоения рассчитывали исходя из фазы экспоненциального роста.

2.2.12. Оценка уровня АП-сайтов

Уровень АП-сайтов в клетках определяли с помощью набора «DNA damage assay kit» (ab211154, «Abcam») согласно протоколу производителя. Клетки пересаживали на 6-луночный планшет в количестве 3×10^5 на лунку. Через 24 ч удаляли культуральную среду, промывали PBS и инкубировали в течение 1 ч в 1 мМ MMS, в качестве контроля использовали раствор 0,1% DMSO в PBS. Затем клетки снова омывали PBS и инкубировали в течение 2 ч в полной среде. Далее клетки собирали трипсинизацией, промывали PBS и геномную ДНК выделяли с помощью набора «QIAamp DNA mini kit» («Qiagen») и использовали для определения количества АП-сайтов.

2.2.13. Исследование выживаемости клеток

Для оценки выживаемости клеток использовали 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид (МТТ). Растворы H_2O_2 , $KBrO_3$ и MMS готовили в среде DMEM без сыворотки. Клетки пересаживали на 96-луночный планшет в количестве $4,5 \times 10^3$ на лунку. Через 24 ч к клеткам добавляли равный объем среды, содержащей токсичное соединение, на 24 ч (для H_2O_2) или 48 ч ($KBrO_3$ и MMS). После инкубации среду удаляли и добавляли раствор МТТ в среде с концентрацией 0,25 мг/мл на 2 ч. Затем среду, содержащую МТТ, удаляли и сформировавшиеся кристаллы формазана растворяли в DMSO. Оптическую плотность измеряли на длинах волн 570 нм и 620 нм с помощью спектрофотометра планшетного типа «Apollo-8 Microplate Absorbance Reader LB 912» («Berthold Technologies», Германия). Выживаемость

клеток рассчитывали как процент интенсивности окрашивания в обработанных лунках по отношению к контрольным.

2.2.14. Получение плазмидных конструкторов, содержащих повреждения

2.2.13.1. Получение плазмид, содержащих два одноцепочечных разрыва

Плазмидные векторы pZAJ_5с, pZAJ_Q205*, pMR_Q205P, pMR_A207P использовали для получения контрольных конструкторов и конструкторов с повреждениями. Для этого готовили реакцию смесь объемом 250 мкл, содержащую 50 мкг плазмидной ДНК, буфер R (см. разд. 2.1.4) и 50 ед. акт. никазы Nb. Vpu10I или Nt. Vpu10I. Реакцию проводили в течение 2 ч при 37 °С с последующей инактивацией фермента в течение 20 мин при 80 °С. Наличие двух одноцепочечных разрывов подтверждали следующим образом. Реакционную смесь, содержащую 100 нг никированной плазмиды и 180-кратный молярный избыток конкурентного олигонуклеотида без фосфатной группы на 5'-конце (см. разд. 2.1.6) в буфере для ДНК-лигазы фага T4 (см. разд. 2.1.4), инкубировали 10 мин при 80 °С и затем охлаждали до 4 °С. Затем в реакцию смесь добавляли 2 ед. акт. ДНК-лигазы фага T4 (см. разд. 2.1.5) и инкубировали 1 ч при 37 °С с последующей инактивацией фермента при 65 °С в течение 15 мин. Продукты реакции анализировали разделением в 0,8%-ном агарозном геле, содержащем 0,5 мг/л бромистого этидия. Параллельно готовили реакцию без конкурентного олигонуклеотида, которая служила контролем ДНК-лигазы фага T4. Полное ингибирование реакции лигирования с нефосфорилированным конкурентным олигонуклеотидом свидетельствовало о наличии двух одноцепочечных разрывов.

2.2.13.2. Получение конструкторов, содержащих одноцепочечную брешь

Конструкторы с одноцепочечной брешью получали из конструкторов с двумя одноцепочечными разрывами. Для этого производили денатурацию выщепленного олигонуклеотида длиной 18 нт (10 мин, 80 °С) в буфере для ДНК-лигазы фага T4 (см. разд. 2.1.4) в присутствии 900-кратного молярного избытка комплементарного олигонуклеотида и охлаждали до 4 °С для формирования 18-нуклеотидного дуплекса и плазмиды с олигонуклеотидной брешью. Конструктор с одноцепочечной брешью очищали от избытка комплементарного олигонуклеотида и дуплекса ультрафильтрацией с помощью микроконцентраторов «Amicon Ultra Ultracel 30» («Millipore», США).

2.2.13.3. Вставка олигонуклеотида с повреждением

Для вставки олигонуклеотида в плазмидный конструктор 20 мкг плазмиды с одноцепочечной брешью инкубировали с 180-кратным молярным избытком олигонуклеотида (см. разд. 2.1.6) и 250 ед. акт. PНК фага T4 (см. разд. 2.1.5). Реакцию фосфорилирования проводили в течение

30 мин при 37 °С с последующей инактивацией фермента при 80 °С в течение 10 мин. Затем на льду в реакционную смесь добавляли 100 ед. акт. ДНК-лигазы фага Т4 и инкубировали 1 ч при 37 °С, затем при 65 °С в течение 15 мин. Аликвоту реакции анализировали путем гель-электрофореза с контрольным образцом, который инкубировали без РНК, для подтверждения успешной инкорпорации олигонуклеотида. Очистку полученных конструкторов от избытка олигонуклеотида проводили ультрафильтрацией на микроконцентраторах «Amicon Ultra Ultracel 30».

2.2.13.4. Получение плазмид с АП-сайтом и аддуктами МХ

Для получения плазмидных конструкторов с АП-сайтами плазмиды с введенным урацилом инкубировали в буфере ВЕН (см. разд. 2.1.4) с добавлением 0,1 мг/мл BSA в присутствии избытка UNG из расчета 20 ед. акт. на 1 мкг плазмиды. Реакцию проводили в течение 30 мин при 37 °С и инактивировали фермент в течение 20 мин при 65 °С. Эффективность получения АП-сайта проверяли расщеплением аликвоты полученной плазмиды эндонуклеазой IV с последующим разделением продуктов реакции в 0,8%-ном агарозном геле. Очистку полученных конструкторов проводили ультрафильтрацией на микроконцентраторах «Amicon Ultra Ultracel 30».

Для получения аддуктов МХ с АП-сайтами плазмидные конструкторы с АП-сайтом инкубировали с 5 мМ МХ в буфере ВЕН (см. разд. 2.1.4) при комнатной температуре в течение 30 мин. Эффективность получения аддуктов МХ проверяли реакцией аликвоты полученного конструктора с ферментом АРЕХ1. Очистку полученных конструкторов проводили ультрафильтрацией на микроконцентраторах «Amicon Ultra Ultracel 30».

2.2.13.5. Подтверждение наличия повреждения

Для подтверждения наличия повреждения в полученных конструкторах проводили реакцию со специфичным к повреждению ферментами. Конструкторы с THF, sF, МХ, sМХ и sМХs в количестве 100 нг инкубировали с 4 ед. акт. АРЕХ1 в буфере НЕВ 4 (см. разд. 2.1.4) в течение 30 мин при 37 °С и инактивировали фермент в течение 20 мин при 65 °С. Конструкторы с U, sU и sUs в количестве 100 нг инкубировали с 2 ед. акт. UNG и 2 ед. акт. эндонуклеазы IV в буфере ВЕН с 0,1 мг/мл BSA (см. разд. 2.1.4) в течение 1 ч при 37 °С и инактивировали фермент при 65 °С в течение 20 мин. Конструкторы с 8-охоG и s8-охоG в количестве 100 нг инкубировали с 2 ед. акт. Fpg при таких же условиях как и для конструкторов с урацилом. Конструкторы с АП-сайтом, АП-сайтом с 5'-фосфоротиоатной связью и АП-сайтом с 5',3'-фосфоротиоатными связями в количестве 100 нг инкубировали с 2 ед. акт. эндонуклеазы IV в буфере ВЕН с 0,1 мг/мл BSA (см. разд. 2.1.4) Продукты реакции разделяли в 0,8%-ном агарозном геле, содержащем бромистый этидий в концентрации 0,5 мг/л, также бромистый этидий добавляли в буфер для электрофореза.

2.2.15. Оценка уровня транскрипционного мутагенеза

Для трансфекции клетки 293FT и A549 дикого типа и нокаутов по генам BER рассеивали в количестве $0,3 \times 10^6$ клеток на лунку 6-луночного планшета. Через 24 ч клетки трансфицировали с помощью реагента Effectene. Для трансфекции смешивали 400 нг плазмидного конструкта на основе EGFP и такое же количество контрольной плазмиды pDsRed-Monomer-N1, кодирующей красный флуоресцентный белок DsRed. Еще через 24 ч клетки снимали с поверхности планшета трипсинизацией и фиксировали в 1%-ном растворе формальдегида. Анализ клеток проводили на проточных цитометрах CytoFlex («Beckman Coulter», США) и NovoCyte 3000 («Agilent Technologies», США). Для оценки относительного уровня экспрессии EGFP в расчет брали только трансфицированные клетки на основе уровня флуоресценции DsRed. Затем определяли медиану флуоресценции клеточной популяции по EGFP. Значения медианы флуоресценции EGFP конструктов с повреждениями нормализовали на медиану флуоресценции конструкта, кодирующего полностью функциональный белок EGFP. Расчет статистической значимости выполнен с помощью критерия Стьюдента, где * — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,005$, **** — $p < 0,001$.

Глава 3. Результаты и обсуждение

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

3.1.1. Нокауты по гену *APEX1*

Клеточную линию 293FT, нокаутную по гену *APEX1*, получали с помощью технологии геномного редактирования CRISPR/Cas9. Для этого осуществляли дизайн sgРНК в биоинформатической платформе benchling.com, которая объединяет алгоритмы предсказания целевой активности и специфичности подобранных sgРНК. Выбор последовательностей протоспейсеров для адресации нуклеазы Cas9 осуществляли так, чтобы внесенный двуцепочечный разрыв приводил к сдвигу рамки считывания ближе к началу кодирующей части гена. Были подобраны три последовательности протоспейсеров: две располагались во втором экзоне гена *APEX1*, содержащем стартовый кодон ATG, с разными последовательностями, прилежащими к протоспейсеру (PAM): первый протоспейсер имел последовательность PAM 5'-TGG-3', второй протоспейсер — PAM 5'-GGG-3', а третий протоспейсер полностью находился в кодирующей части гена в третьем экзоне (Рисунок 13) и имел последовательность PAM 5'-TGG-3'.

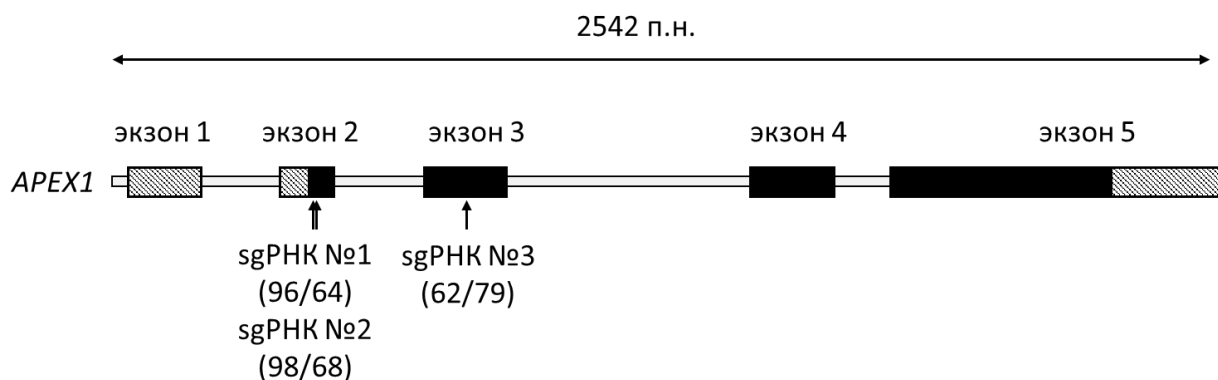


Рисунок 13. Схема гена *APEX1*. Отмеченные штриховкой блоки обозначают некодирующие участки экзонов. Стрелками указано расположение подобранных sgРНК, для каждой из них в скобках приведены расчетные значения целевой активности и специфичности.

До получения нокаутной клеточной линии была проведена оценка целевой активности подобранных sgРНК, так как известно, что предсказанные показатели эффективности работы sgРНК 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 sgРНК и репортер EGFP, трансфицировали в клетки линии 293FT. Через 24 ч трансфицированные клетки сортировали методом FACS и собирали EGFP-положительные клетки, которые далее использовали для анализа. Оценка эффективности работы системы CRISPR/Cas9 проводили в программе TIDE, которая на основе выравнивания

секвенограмм модифицированных клеток и клеток дикого типа и разделения компонентов сигнала рассчитывает процент последовательностей с делециями и инсерциями [465]. Для этого сначала нарабатывали продукт ПЦР с 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 (Рисунок 14). 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.

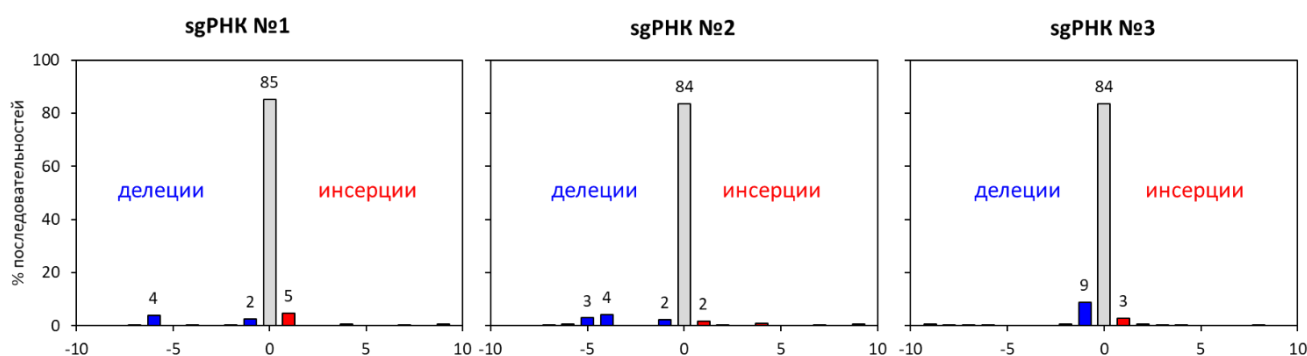


Рисунок 14. Результаты оценки эффективности sgPHK к гену *APEX1*, рассчитанные с помощью программы TIDE. Синие столбцы диаграммы представляют процент последовательностей с делецией, красные столбцы представляют последовательности с инсерцией, серый столбец обозначает последовательности без мутации. По оси X указано количество нуклеотидов, обозначающих размер делеции или инсерции.

Клетки 293FT трансфицировали плазмидой рХ458, содержащей последовательность sgPHK №3, через 24 ч осуществляли сортировку EGFP-положительных клеток и рассаживали их в 96-луночные планшеты для получения отдельных моноклонов. Было получено 113 моноклонов, 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 (Рисунок 15). Было проанализировано 19 случайных клонов, 6 из которых потеряли все копии сайта *DraIII*. По результатам секвенирования по Сэнгеру было показано, что моноклон 1С4 содержал однонуклеотидные делеции и инсерции в примерно равном соотношении (делеций в ~1,2 раза больше), а моноклон 2А9 содержал в четыре раза больше инсерций +1 инсерций, чем делеций -1 (Рисунок 16). 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 [469]. Для характеристики аллелей гена *APEX1* в модифицированных кломах 1С4

и 2A9 осуществляли ТА-клонирование продукта ПЦР участка модификации гена *APEX1* в вектор pCR 2.1 (см. разд. 2.2.2) (Рисунок 17). Для клеточной линии 1C4 было получено 13 клонов, для линии 2A9 — 15 клонов. Четыре клон 1C4 содержали инсерцию одного нуклеотида С в области расщепления нуклеазой Cas9 (с.165dupC), а девять клонов — делецию одного нуклеотида С (с.165delC). Все клоны 2A9 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 1C4 содержит два аллеля с.165delC и один с.165dupC, а генотип 2A9 содержит три аллеля с.165dupC.

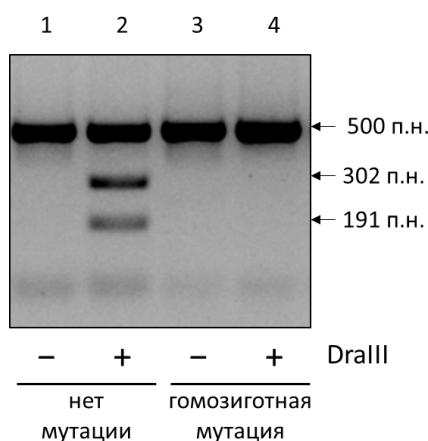


Рисунок 15. Электрофореграмма разделения в 2%-ном агарозном геле продуктов гидролиза ампликонов, наработанных с района модификации гена *APEX1*, эндонуклеазой рестрикции *DraIII* для клеток без мутации (дорожки 1 и 2) и для клеток с гомозиготной мутацией (дорожки 3 и 4). Стрелками отмечен исходный продукт ПЦР и продукты гидролиза.

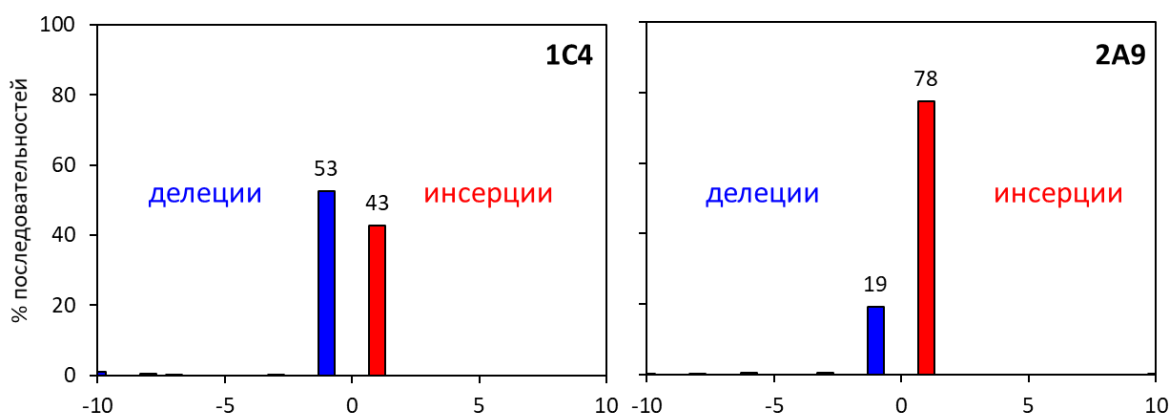


Рисунок 16. Исследование мутаций в гене *APEX1* в клонах 1C4 и 2A9 с помощью TIDE.

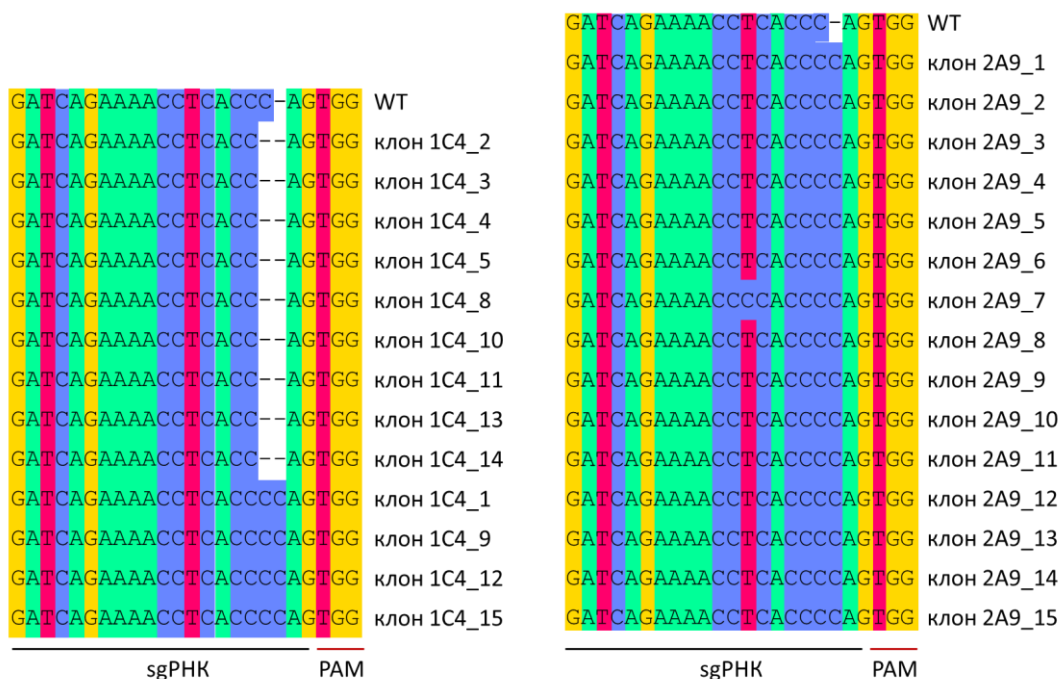


Рисунок 17. Результаты секвенирования района модификации гена *APEX1* в клонах после ТА-клонирования нокаутов 1С4 и 2А9.

На уровне белка вариант с.165dupC сохраняет первые 55 аминокислотных остатка белка дикого типа, и после сдвига рамки считывания образуется стоп-кодон после 76-го аминокислотного остатка (Рисунок 18). Вариант с.165delC также содержит первые 55 аминокислотных остатка белка дикого типа и стоп-кодон образуется после 80-го аминокислотного остатка.

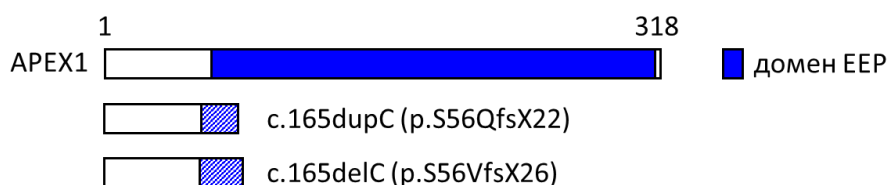


Рисунок 18. Схематичное представление полноразмерного белка *APEX1* и укороченных вариантов, возникших в результате однонуклеотидной вставки и делеции в положении 165. Измененная последовательность белка после мутации сдвига рамки считывания обозначена штриховкой. Каталитический домен ЕЕР обозначен синим цветом.

Для дальнейшей характеристики клеточных линий, нокаутных по гену *APEX1*, оценивали уровень мРНК методом ПЦР с обратной транскрипцией в режиме реального времени (см. разд. 2.2.3) и в клеточных экстрактах уровень целевого белка методом иммуноблоттинга (см. разд. 2.2.5). Уровень мРНК *APEX1* был примерно в 13 раз ниже в клетках 1С4 и в 4 раза ниже в клетках 2А9 по сравнению с клетками дикого типа, что позволяет предположить, что мРНК, кодирующие белок с ранним стоп-кодом, подвергаются нонсенс-опосредованному распаду РНК (Рисунок 19). Измеренные для сравнения уровни мРНК нескольких ДНК-гликозилаз не

изменились или даже повысились (Рисунок 19). Примечательно, что статистически значимое увеличение мРНК *OGG1* наблюдалось в обеих нокаутных линиях, тогда как в клетках 1С4 была повышена экспрессия *MUTYH*, а в клетках 2А9 — экспрессия *NEIL2* (Рисунок 19). 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 (Рисунок 20).

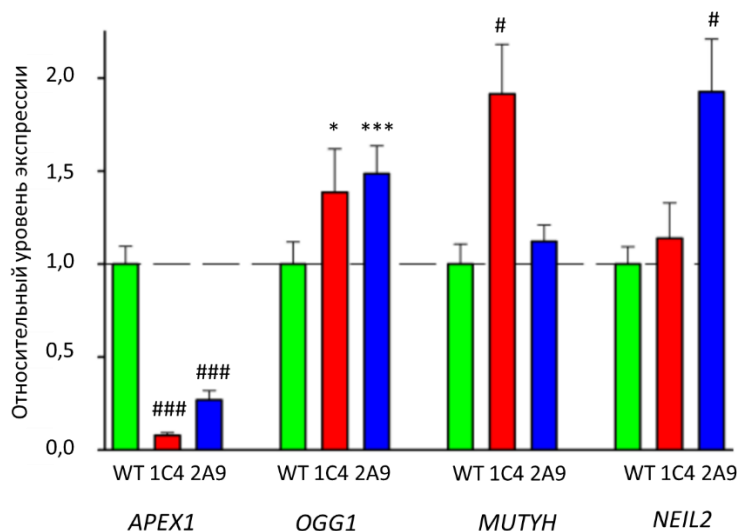


Рисунок 19. Относительный уровень экспрессии генов *APEX1*, *OGG1*, *MUTYH* и *NEIL2* в клетках *APEX1*^{KO} 1С4 и 2А9. Приведены значения среднего и стандартного отклонения.

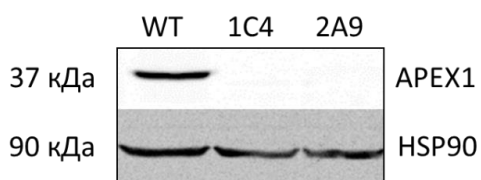


Рисунок 20. Анализ уровня белка *APEX1* методом иммуноблоттинга в клеточных экстрактах дикого типа (WT) и двух нокаутных клеточных линиях 1С4 и 2А9.

3.1.2. Нокауты по гену *APEX2*

Для получения клеточной линии с двойным нокаутом генов *APEX1* и *APEX2* исходно использовали клеточную линию 293FT *APEX1*^{KO} 1С4. С помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 делали нокаут гена *APEX2*, для чего была выбрана последовательность протоспейсера в первом экзоне гена с РАМ 5'-GGG-3' (Рисунок 21А). Эффективность работы системы CRISPR/Cas9 с подобранной sgРНК составила 48,9% (Рисунок 21Б).

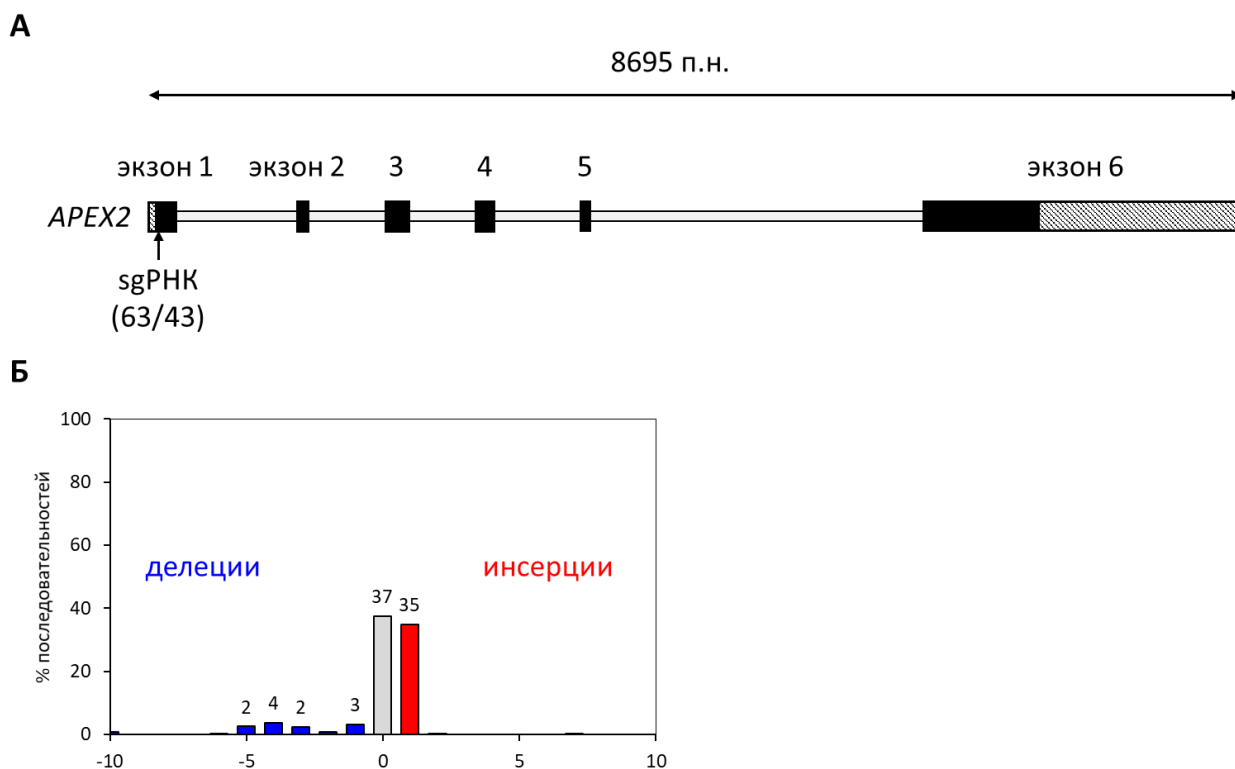


Рисунок 21. Расположение sgRNA к гену *APEX2* (А) и оценка эффективности работы системы CRISPR/Cas9 с подобранной sgRNA (Б). **А.** Схема гена *APEX2*. Отмеченные штриховкой блоки обозначают некодирующие участки экзонов. Стрелкой указано расположение подобранной sgRNA, в скобках приведены расчетные значения целевой активности и специфичности. **Б.** Результаты оценки эффективности sgRNA к гену *APEX2*, рассчитанные с помощью программы TIDE. Синие столбцы диаграммы представляют процент последовательностей с делецией, красные столбцы представляют последовательности с инсерцией, серый столбец обозначает последовательности без мутации. По оси X указано количество нуклеотидов, обозначающих размер делеции или инсерции.

Клетки 293FT, нокаутные по гену *APEX1*, трансфицировали плазмидой pX458, кодирующей выбранную sgRNA, затем осуществляли сортировку EGFP-положительных клеток и получали отдельные моноклоны. Всего было получено 6 моноклонов, ДНК которых секвенировали по Сэнгеру для определения мутаций, полученных в результате геномного редактирования. Клоны 1A4, 2A2, 2B4 имели мутации сдвига рамки считывания, клон 1A1 содержал инсерцию 3 нт, клон 1C2 — делецию 12 нт, в клоне 4D1 содержалось заметное число аллелей дикого типа (Рисунок 22). Для дальнейшего исследования использовали клоны 1A4 и 2A2.

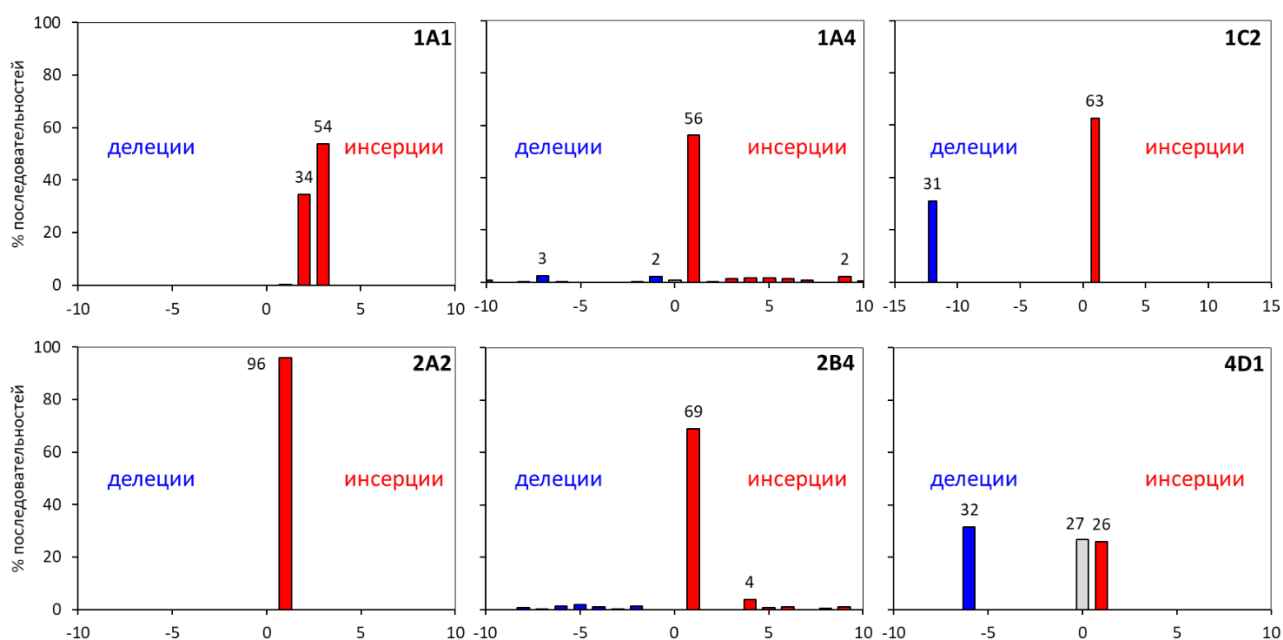


Рисунок 22. Исследование мутаций в гене *APEX2* в клонах 1A1, 1A4, 1C2, 2A2, 2B4, 4D1 с помощью TIDE.

Для характеристики мутаций в целевом районе гена *APEX2* осуществляли ТА-клонирование (см. разд. 2.2.2). Для каждой клеточной линии было получено 13 клонов, которые секвенировали по Сэнгеру. Восемь клонов 1A4 несли инсерцию нуклеотида С (с.49dupC), другие 5 клонов — вставку длиной 45 п.н. (с.50_51insTGCCAGTAACTGTCAGACCCCAAGTTCCATGATTTACTTCCCTCCA) (Рисунок 23). Все клоны 2A2 несли однонуклеотидную инсерцию С (с.49dupC). Так как исходная клеточная линия 293FT гипотриплоидна, то наиболее вероятный генотип линии 1A4 содержит два аллеля с.49dupC и один аллель с.50_51insTGCCAGTAACTGTCAGACCCCAAGTTCCATGATTTACTTCCCTCCA. Клеточная линия 2A2 несет три аллеля с.49dupC.

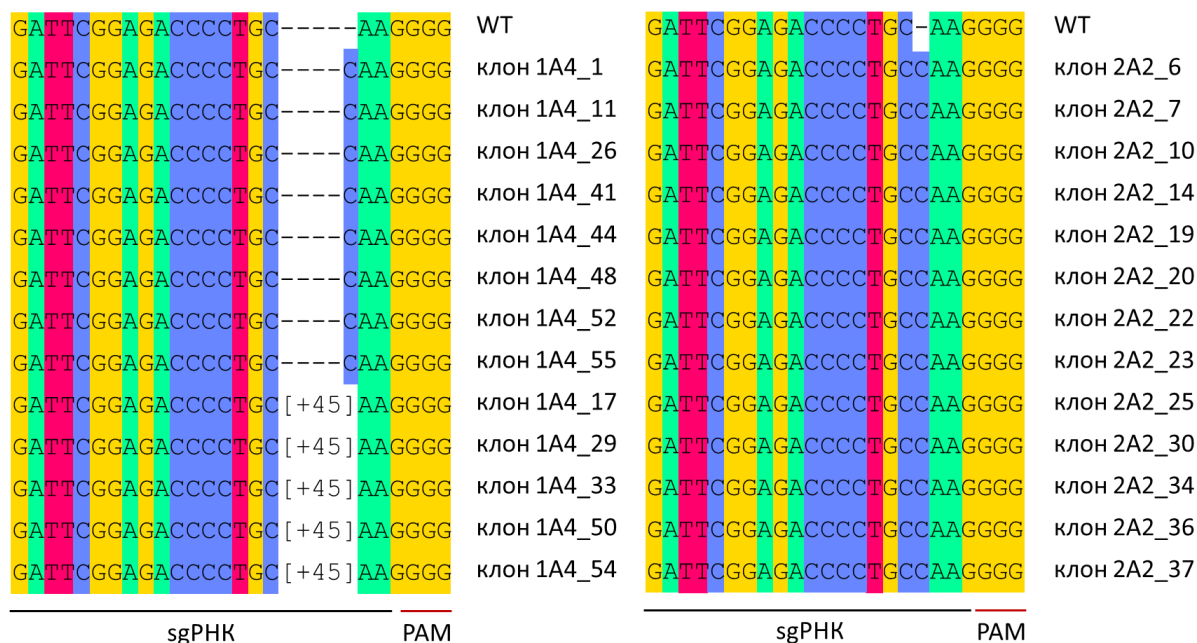


Рисунок 23. Результаты секвенирования района модификации гена *APEX2* в клонах после ТА-клонирования нокаута 1A4 и 2A2.

На уровне белка вариант с.49dupC сохраняет первые 16 аминокислотных остатков белка дикого типа, и после сдвига рамки считывания образуется стоп-кодон после 63 остатка (Рисунок 24). Вариант с 45-нуклеотидной инсерцией сохраняет первые 16 остатков белка дикого типа, и вставленный фрагмент несет стоп-кодон после 26-го аминокислотного остатка.

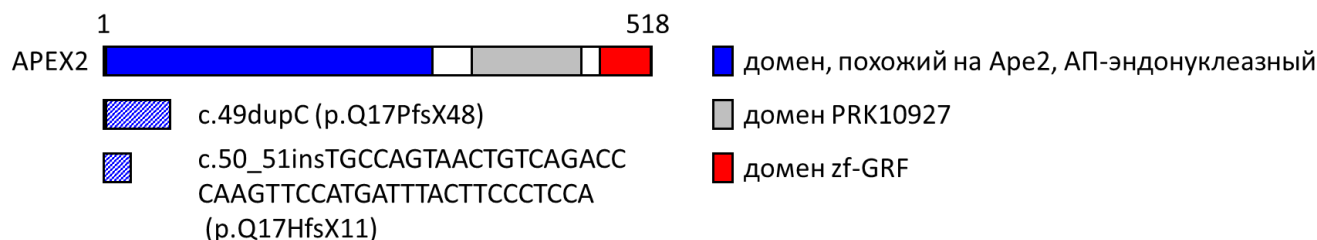


Рисунок 24. Схематичное представление полноразмерного белка *APEX2* и укороченных вариантов, возникших в результате мутаций в сайте внесения двуцепочечного разрыва белком Cas9. Измененная последовательность белка после мутации сдвига рамки считывания обозначена штриховкой. АП-эндонуклеазный домен обозначен синим, домен PRK10927 — серым, а домен zf-GRF — красным.

3.1.3. Нокауты по гену *POLB*

Для получения клеточной линии, нокаутной по гену *POLB* использовали ту же стратегию, что и для получения нокаутной линии по гену *APEX1*. Было выбрано две последовательности протоспейсеров в первом экзоне гена с разными PAM: 5'-GGG-3' для первого протоспейсера и 5'-AGG-3' для второго протоспейсера (Рисунок 25). Эффективность работы системы CRISPR/Cas9 с подобранными sgPHEK на основе TIDE составила 29,7% и 8% для первой и второй sgPHEK соответственно (Рисунок 26). Для дальнейшей работы использовали sgPHEK №1.

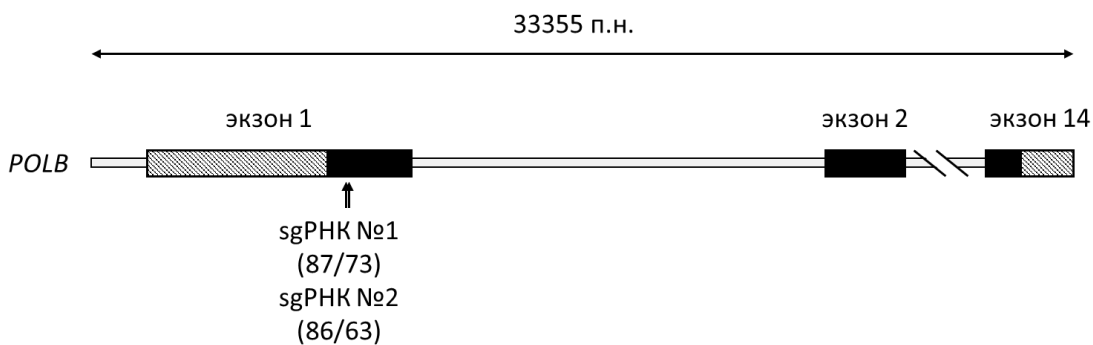


Рисунок 25. Схема гена *POLB*. Отмеченные штриховкой блоки обозначают некодирующие участки экзонов. Стрелками указано расположение подобранных sgRNA, для каждой из них в скобках приведены расчетные значения целевой активности и специфичности.

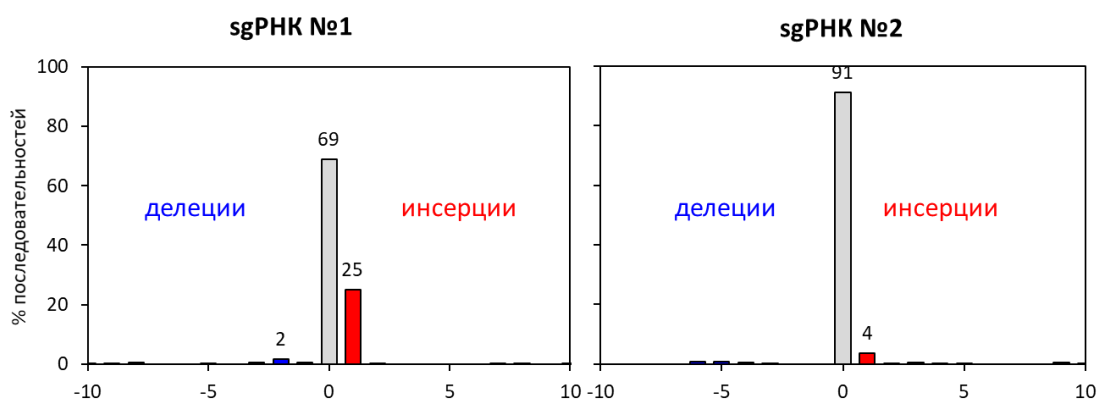


Рисунок 26. Результаты оценки эффективности sgRNA к гену *POLB*, рассчитанные с помощью программы TIDE. Синие столбцы диаграммы представляют процент последовательностей с делецией, красные столбцы представляют последовательности с инсерцией, серый столбец обозначает последовательности без мутации. По оси X указано количество нуклеотидов, обозначающих размер делеции или инсерции.

Для получения клеточной линии 293FT нокаутной по гену *POLB* клетки трансфицировали плазмидой pX458 с первым спейсером sgRNA, затем осуществляли сортировку EGFP-положительных клеток и получали моноклоны. Было получено 36 моноклонов, которые генотипировали с помощью расщепления эндонуклеазой рестрикции *PleI* (Рисунок 27). Всего было проанализировано 27 моноклонов, из которых 4 не содержали сайта узнавания *PleI*. С полученных моноклонов был наработан продукт ПЦР для последующего секвенирования и анализа с помощью TIDE. Моноклон 4D2 содержал инсерцию 1 нуклеотида, моноклон 4H3 — преимущественно инсерцию 1 нуклеотида, моноклон 5G4 содержал в равном количестве инсерцию +1 и делецию -6, моноклон 5B7 содержал инсерцию +1 и делецию -8 в соотношении 2:1 (Рисунок 28). В дальнейшей работе использовали моноклоны 4D2 и 5B7.

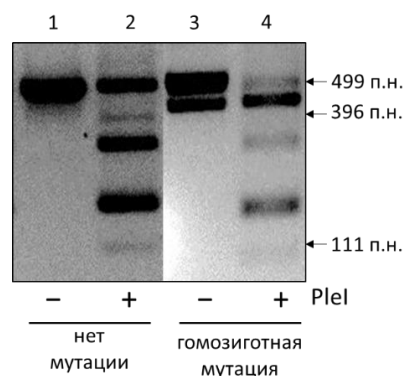


Рисунок 27. Электрофореграмма разделения в 2%-ном агарозном геле продуктов гидролиза ампликонов, наработанных с района модификации гена *POLB*, эндонуклеазой рестрикции PstI для клеток без мутации (дорожки 1 и 2) и для клеток с гомозиготной мутацией (дорожки 3 и 4). Стрелками отмечен исходный продукт ПЦР и продукты гидролиза.

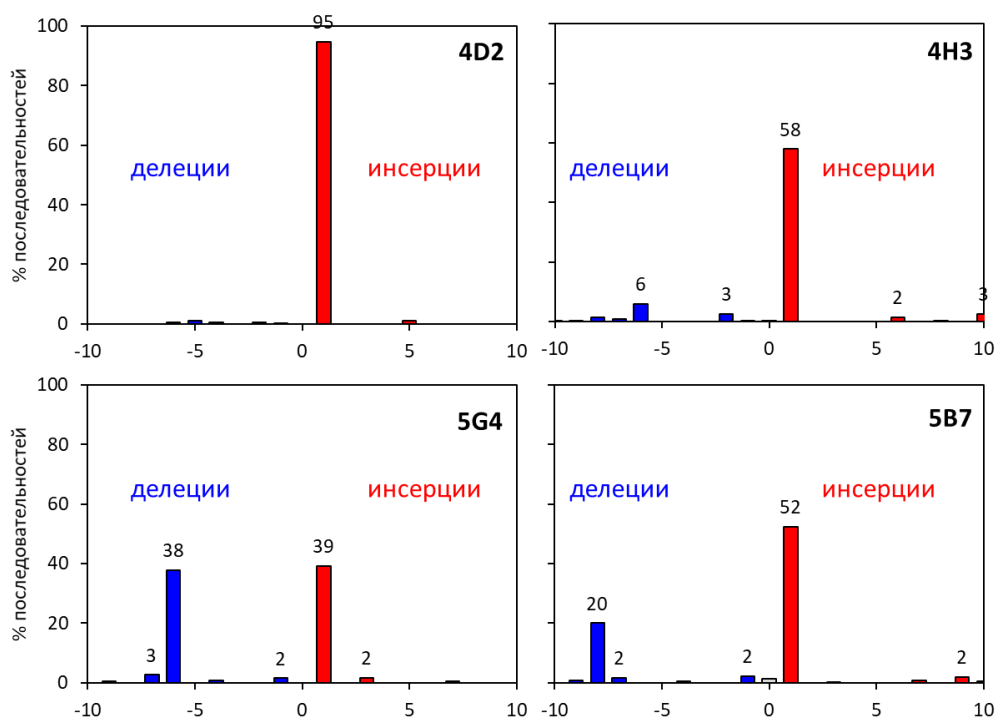


Рисунок 28. Исследование мутаций в гене *POLB* в клонах 4D2, 4H3, 5G4 и 5B7 с помощью TIDE.

Для исследования аллелей гена *POLB* в полученных нокаутных клеточных линиях проводили ТА-клонирование (см. разд. 2.2.2). При получении продукта ПЦР участка модификации гена *POLB* клона 4D2 детектировали два продукта с разной подвижностью, каждый из этих продуктов секвенировали по Сэнгеру. Один продукт ПЦР, наработанный с гена *POLB* моноклона 4D2, был с инсерцией А (с.35dupA), а другой с делецией 361 нт. (с.32_66del). Для 5B7 с помощью ТА-клонирования было получено 14 клонов: три с делецией в 8 нт. (с.35_42del), шесть с инсерцией G (с.34_35insG) и пять с инсерцией А (с.35dupA) (Рисунок 29). Исходя из того, что клеточная линия 293FT имеет гипотриплоидный кариотип и содержит три копии хромосомного района 8p11.21, где расположен ген *POLB*, можно заключить, что генотип

4D2 несет аллель с инсерцией одного нуклеотида с.35dupA и аллель с крупной делецией с.32_66del (соотношение их в генотипе невозможно определить), а генотип 5B7 содержит один аллель с.35_42del и два разных аллеля со вставкой одного нуклеотида с.34_35insG и с.35dupA.

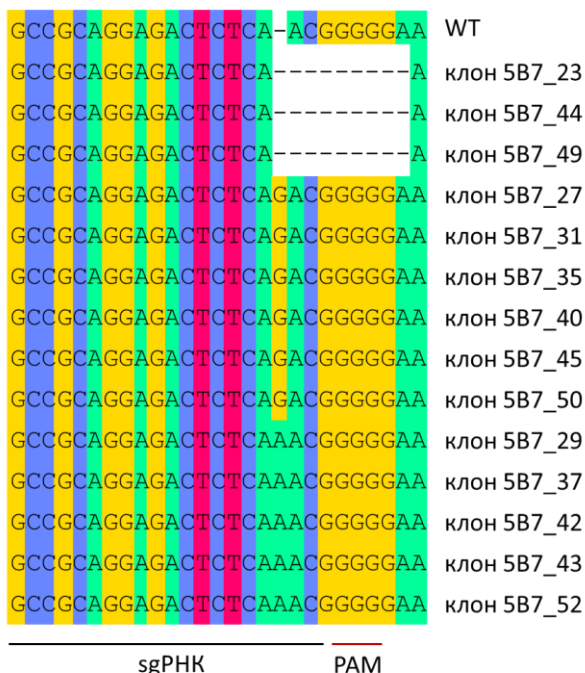


Рисунок 29. Результаты секвенирования района модификации гена *POLB* в клонах после ТА-клонирования нокаута 5B7.

На уровне белка вариант с.35_42del сохраняет первые 12 аминокислотных остатка белка дикого типа, и после сдвига рамки считывания образуется стоп-кодон после 22-го аминокислотного остатка (Рисунок 30). Варианты с.34_35insG и с.35dupA содержат первые 11 аминокислотных остатка белка дикого типа и стоп-кодон образуется после 25-го аминокислотного остатка.

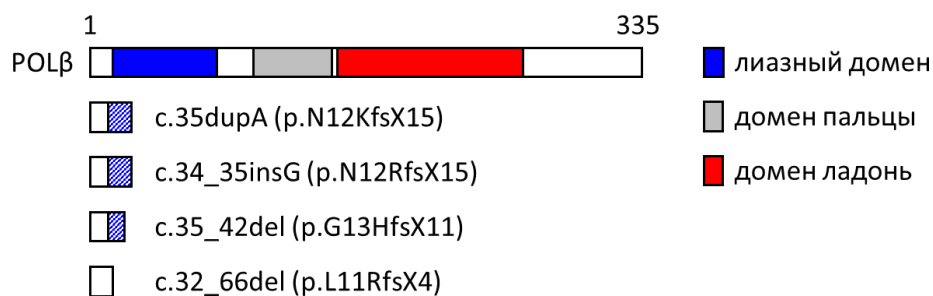


Рисунок 30. Схематичное представление полноразмерного белка *POLβ* и укороченных вариантов, возникших в результате мутаций в сайте внесения двуцепочечного разрыва белком Cas9. Измененная последовательность белка после мутации сдвига рамки считывания обозначена штриховкой. Лиазный домен белка *POLβ* обозначен синим, домен «пальцы» — серым, а домен «ладонь» — красным.

В полученных нокаутных клеточных линиях 4D2 и 5B7 оценивали уровень целевого белка POL β с помощью иммуноблотинга (см. разд. 2.2.5). POL β не детектируется в клетках 293FT *POLB*^{KO} (Рисунок 31).

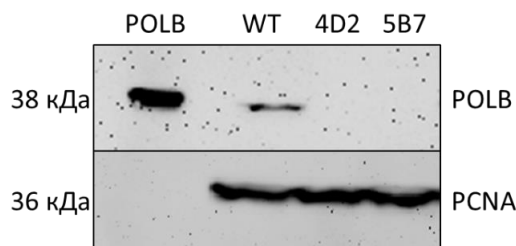


Рисунок 31. Анализ уровня белка POLB методом иммуноблотинга в клеточных экстрактах дикого типа (WT) и двух нокаутных клеточных линиях 4D2 и 5B7.

3.1.4. Нокауты по гену *OGG1*

Для получения нокаутной клеточной линии по гену *OGG1* были подобраны две последовательности протоспейсеров, располагающиеся в первом экзоне гена *OGG1* с разными последовательностями, прилежащими к протоспейсеру (PAM): первый протоспейсер имел последовательность PAM 5'-AGG-3' и находился частично в первом экзоне и частично в прилежащем интроне, второй протоспейсер — PAM 5'-TGG-3' и находился полностью в первом экзоне (Рисунок 32).



Рисунок 32. Схема гена *OGG1*. Отмеченные штриховкой блоки обозначают некодирующие участки. Стрелками указано расположение подобранных sgPHK, для каждой из них в скобках приведены значения целевой активности и специфичности.

Эффективность работы системы CRISPR/Cas9 с первой sgPHK составила 60,9%, а со второй sgPHK — 15,6% (Рисунок 33). Для дальнейшей работы использовали sgPHK №1. Эту же sgPHK использовали для получения нокаута гена *OGG1* в клеточной линии A549.

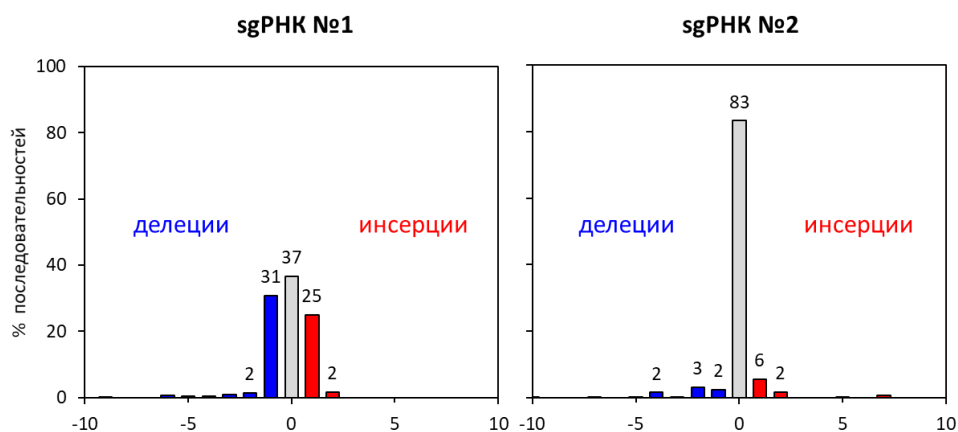


Рисунок 33. Результаты оценки эффективности sgРНК к гену *OGG1*, рассчитанные с помощью программы TIDE. Синие столбцы диаграммы представляют процент последовательностей с делецией, красные столбцы представляют последовательности с инсерцией, серый столбец обозначает последовательности без мутации. По оси X указано количество нуклеотидов, обозначающих размер делеции или инсерции.

Было получено 66 моноклонов, которые генотипировали анализом длин рестриционных фрагментов с использованием эндонуклеазы рестрикции *Hru188III*, сайт узнавания которой перекрывается с 3'-концом протоспейсера (Рисунок 34). Всего было проанализировано 59 моноклонов, 6 из которых не содержали сайта узнавания *Hru188III*. С полученных моноклонов был наработан продукт ПЦР для последующего секвенирования и анализа с помощью TIDE (Рисунок 35). Моноклон 1A3 содержал вставку одного нуклеотида и делецию двух нуклеотидов (2:1), моноклон 4C9 содержал вставку одного и двух нуклеотидов (2:1), моноклон 4D3 содержал в равном количестве вставку одного нуклеотида и делецию 8 нуклеотидов.

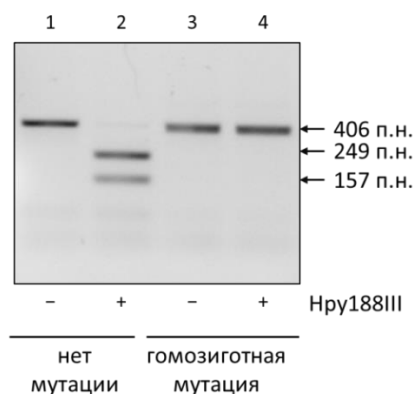


Рисунок 34. Электрофореграмма разделения в 2%-ном агарозном геле продуктов гидролиза ампликонов, наработанных с района модификации гена *OGG1*, эндонуклеазой рестрикции *Hru188III* для клеток без мутации (дорожки 1 и 2) и для клеток с гомозиготной мутацией (дорожки 3 и 4). Стрелками отмечен исходный продукт ПЦР и продукты гидролиза.

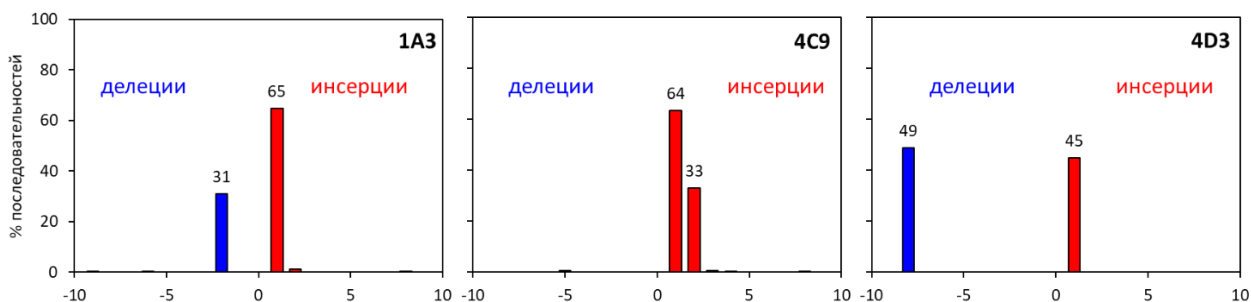


Рисунок 35. Исследование мутаций в гене *OGG1* в клонах 1A3, 4C9, 4D3 с помощью TIDE.

Для характеристики аллелей гена *OGG1* в модифицированных клонах 1A3, 4C9 и 4D3 осуществляли ТА-клонирование (см. разд. 2.2.2) (Рисунок 36). Для клеточной линии 1A3 было получено 15 клонов, для линий 4C9 — 12 клонов, а для линии 4D3 — 14 клонов. Два клона 1A3 содержали делецию двух нуклеотидов в области расщепления нуклеазой Cas9 (с.124_125del), а 13 клонов — инсерцию одного нуклеотида G (с.124dupG). Два клона 4C9 содержали инсерцию двух нуклеотидов с.124_125insAG в сайте внесения двуцепочечного разрыва нуклеазой Cas9, а остальные 10 клонов содержали инсерцию с.124dupG. Пять клонов 4D3 содержали инерцию G с.124dupG, а 9 клонов имели делецию восьми нуклеотидов с.118_125del. Исходя из того, что клеточная линия 293FT имеет гипотриплоидный кариотип и содержит три копии хромосомного района 3p25.3, где расположен ген *OGG1*, можно заключить, что с наибольшей вероятностью 1A3 содержит два аллеля с.124dupG и один с.124_125del, 4C9 — два аллеля с.124dupG и один аллель с.124_125insAG, а 4D3 — один аллель с.124dupG и два аллеля с.118_125del.

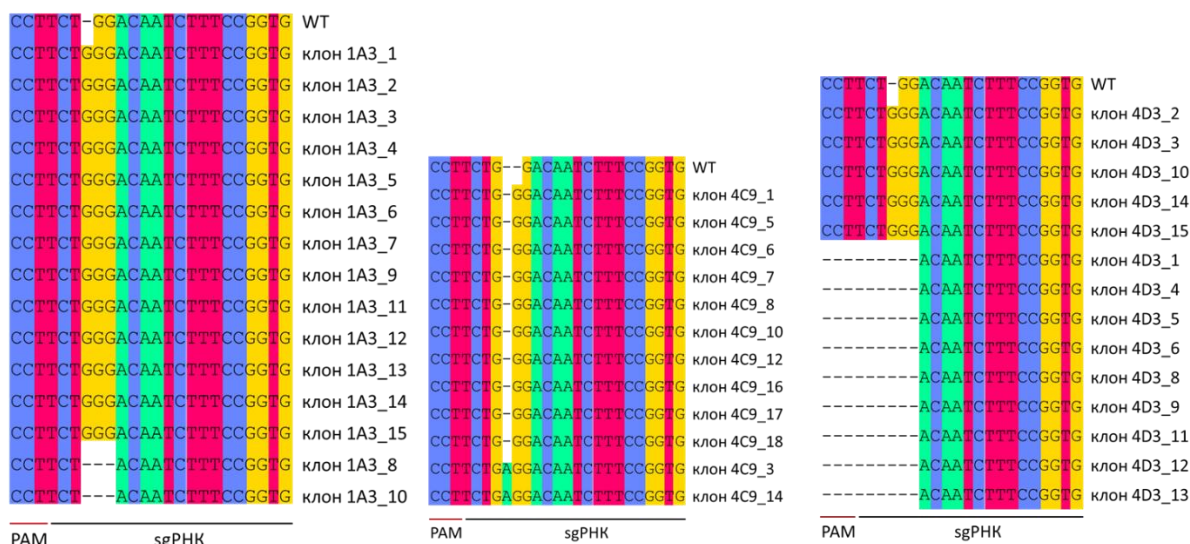


Рисунок 36. Результаты секвенирования района модификации гена *OGG1* в клонах после ТА-клонирования нокауты 1A3, 4C9, 4D3.

На уровне белка вариант с.124dupG сохраняет первые 42 аминокислотных остатка белка дикого типа, и после сдвига рамки считывания образуется стоп-кодон после 69-го

аминокислотного остатка (Рисунок 37). Вариант c.124_125del также содержит первые 41 аминокислотных остатка белка дикого типа и стоп-кодон образуется после 68-го аминокислотного остатка. Вариант c.124_125insAG также содержит первые 41 аминокислотных остатка белка дикого типа и стоп-кодон образуется после 59-го аминокислотного остатка. Вариант c.118_125del также содержит первые 39 аминокислотных остатка белка дикого типа и стоп-кодон образуется после 66-го аминокислотного остатка. Во всех вариантах белка каталитический домен HhH полностью отсутствует.

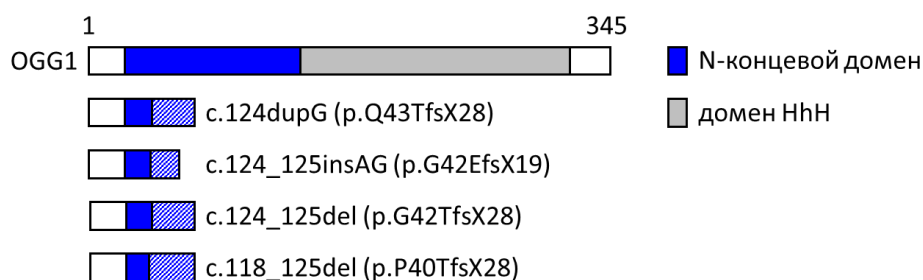


Рисунок 37. Схематичное представление полноразмерного белка OGG1 и укороченных вариантов, возникших в результате мутаций в сайте внесения двуцепочечного разрыва белком Cas9. Измененная последовательность белка после мутации сдвига рамки считывания обозначена штриховкой. N-концевой домен белка OGG1 обозначен синим, домен HhH — серым.

Дополнительно был получен нокаут гена *OGG1* в клеточной линии A549. Было получено 15 моноклонов, которые также генотипировали расщеплением эндонуклеазой Hpy188III. Шесть клонов потеряли все копии сайта Hpy188III. По результатам секвенирования по Сэнгеру было показано, что 4 из них, по всей видимости, не были моноклонами, так как при секвенировании наблюдалось наложение нескольких пиков; 1 моноклон содержал делецию 9 н, которая не приводила к сдвигу рамки считывания, и 1 моноклон содержал вставку одного нуклеотида. Для дальнейшей работы использовали клеточную линию, полученную из этого последнего моноклона 2F5.

При выполнении ТА-клонирования для исследования аллелей гена *OGG1* в клеточной линии A549 *OGG1*^{KO} было получено 14 клонов (Рисунок 38). Все клоны содержали инсерцию c.124dupG в сайте внесения двуцепочечного разрыва нуклеазой Cas9. Таким образом, в геноме гипотриплоидной нокаутной линии все аллели *OGG1* несут мутацию c.124dupG. На уровне белка сохраняются первые 42 аминокислотных остатка белка дикого типа и после сдвига рамки считывания образуется стоп-кодон после 69-го аминокислотного остатка (Рисунок 37).

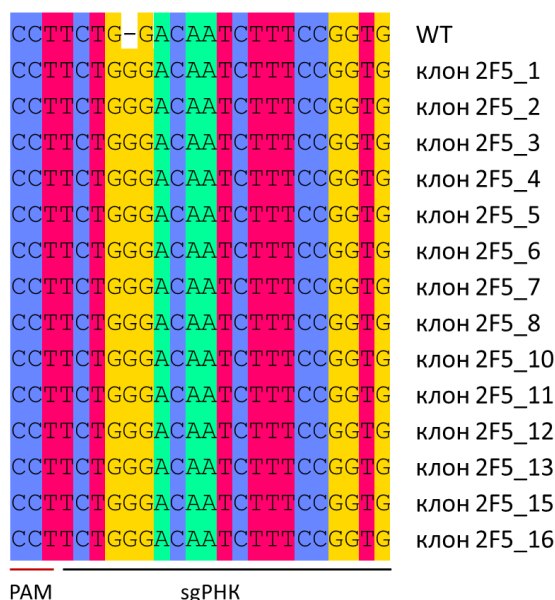


Рисунок 38. Результаты секвенирования района модификации гена *OGGI* в клонах после ТА-клонирования нокаута 2F5.

3.1.5. Нокауты по гену *MUTYH*

Для получения нокаутной клеточной линии по гену *MUTYH* были подобраны две последовательности протоспейсеров, располагающиеся в пятом и седьмом экзоне гена *MUTYH* с разными последовательностями PAM: первый протоспейсер имел последовательность PAM 5'-TGG-3' и находился полностью в экзоне 5, второй протоспейсер — PAM 5'-CGG-3' и находился полностью в экзоне 7 (Рисунок 39).

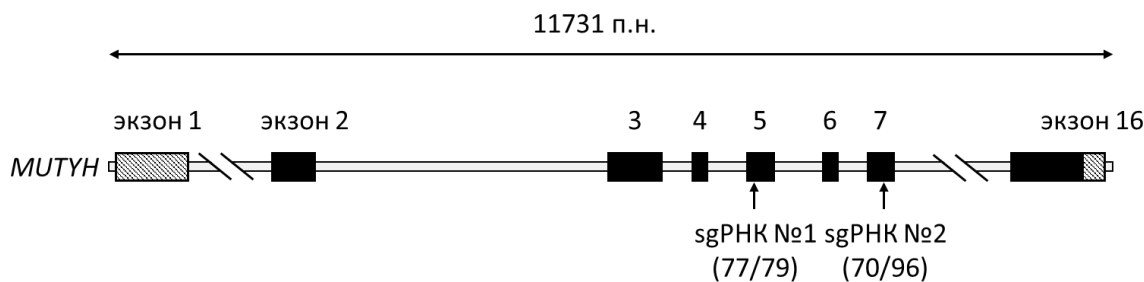


Рисунок 39. Схема гена *MUTYH*. Отмеченные штриховкой блоки обозначают некодирующие участки экзонов. Стрелками указано расположение подобранных sgPНК, для каждой из них в скобках приведены значения целевой активности и специфичности.

Эффективность работы системы CRISPR/Cas9 с первой sgPНК составила 30,9%, а со второй sgPНК — 17,4% (Рисунок 40). Для дальнейшей работы использовали sgPНК №1.

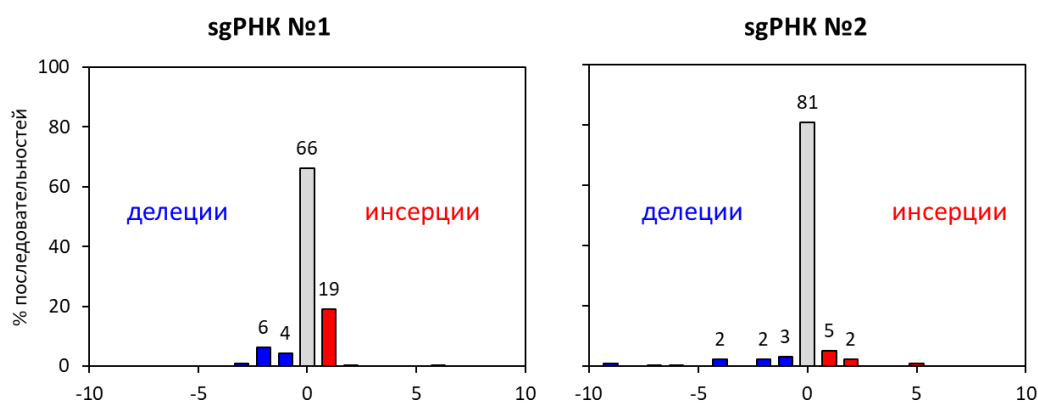


Рисунок 40. Результаты оценки эффективности sgРНК к гену *MUTYH*, рассчитанные с помощью программы TIDE. Синие столбцы диаграммы представляют процент последовательностей с делецией, красные столбцы представляют последовательности с инсерцией, серый столбец обозначает последовательности без мутации. По оси X указано количество нуклеотидов, обозначающих размер делеции или инсерции.

Было получено 15 моноклонов, которые генотипировали анализом длин рестрикционных фрагментов с использованием эндонуклеазы *BclI*, сайт узнавания которой перекрывается с 3'-концом протоспейсера. Среди полученных моноклонов ни один не содержал мутаций в сайте внесения двуцепочечного разрыва белком Cas9. В связи с этим клетки 293FT трансфицировали плазмидой pX458, кодирующей вторую sgРНК, которая обладает меньшей целевой эффективностью. Было получено 10 моноклонов, 6 из которых не имели сайта узнавания *NgoMIV* — эндонуклеазы рестрикции, использованной для скрининга (Рисунок 41). С 5 из полученных моноклонов был наработан продукт ПЦР для последующего секвенирования и анализа с помощью TIDE. Три моноклона 3A2, 3B4, 5G11 содержали делецию 6 нуклеотидов, моноклон 5F7 нес набор различных мутаций, моноклон 4H1 содержал делецию 1 нуклеотида (Рисунок 42).

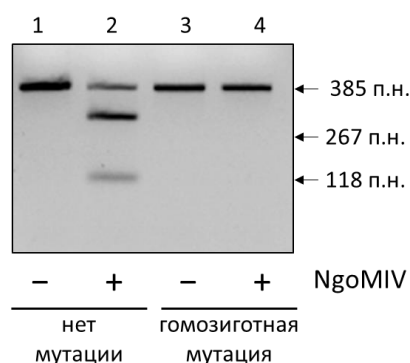


Рисунок 41. Электрофореграмма разделения в 2%-ном агарозном геле продуктов гидролиза ампликонов, наработанных с района модификации гена *MUTYH*, эндонуклеазой рестрикции *NgoMIV* для клеток без мутации (дорожки 1 и 2) и для клеток с гомозиготной мутацией (дорожки 3 и 4). Стрелками отмечен исходный продукт ПЦР и продукты гидролиза.

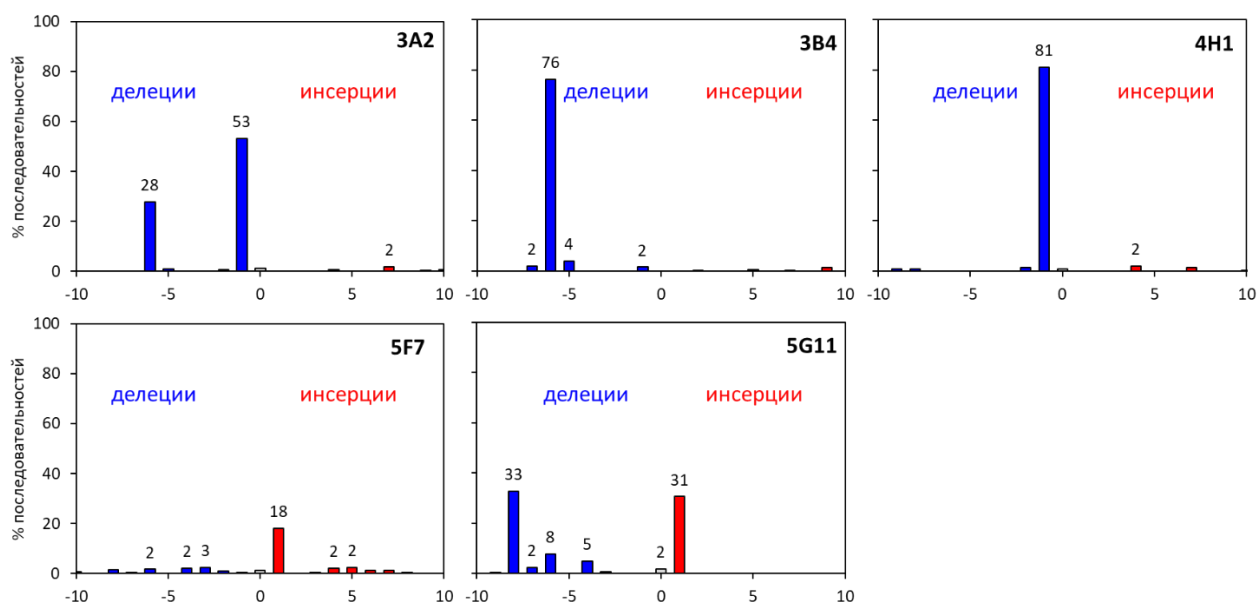


Рисунок 42. Исследование мутаций в гене *MUTYH* в клонах 3A2, 3B4, 5G11, 4N1 и 5F7 с помощью TIDE.

Для характеристики аллелей гена *MUTYH* в модифицированном клоне 4N1 осуществляли ТА-клонирование (см. разд. 2.2.2). Для клеточной линии 4N1 было получено 13 клонов (Рисунок 43). Все клоны 4N1 содержали делецию одного нуклеотида в области расщепления нуклеазой Cas9 (с.541delC). Исходя из того, что клеточная линия 293FT имеет гипотриплоидный кариотип и содержит три копии хромосомного района 1p34.1, где расположен ген *MUTYH*, можно заключить, что генотип 4N1 несет три аллеля с.541delC.

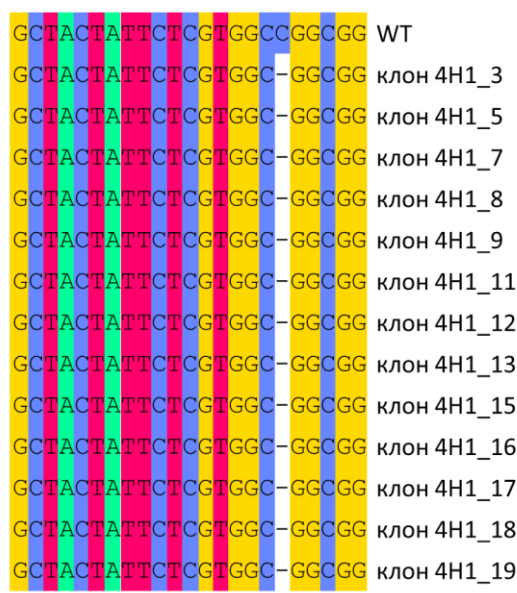


Рисунок 43. Результаты секвенирования района модификации гена *MUTYH* в клонах после ТА-клонирования нокаута 4N1.

На уровне белка вариант с.541delC сохраняет первые 180 аминокислотных остатка белка дикого типа, и после сдвига рамки считывания образуется стоп-кодон после 190-го аминокислотного остатка (Рисунок 44). Такой белок не содержит каталитических остатков и железо-серного кластера (FES), необходимого для связывания ДНК.

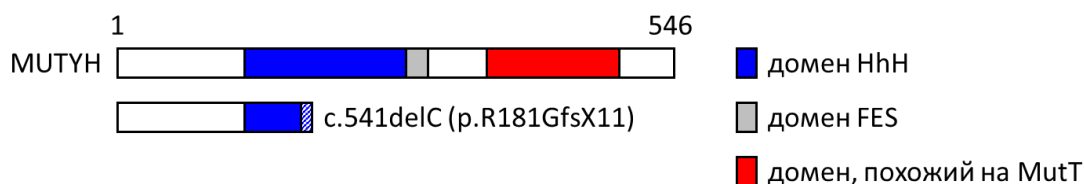


Рисунок 44. Схематичное представление полноразмерного белка MUTYH и укороченного варианта, возникших в результате однонуклеотидной делеции в положении 541. Измененная последовательность белка после мутации сдвига рамки считывания обозначена штриховкой. Домен HhH белка MUTYH обозначен синим, домен FES — серым, домен, похожий на MutT — красным.

В полученной нокаутной клеточной линии 4Н1 оценивали уровень целевого белка MUTYH с помощью иммуноблотинга (см. разд. 2.2.5). В связи с тем, что MUTYH локализуется в ядре, для иммуноблотинга использовали ядерные экстракты (см. разд. 2.2.4) [470]. Было показано, что MUTYH не детектируется в клетках 293FT *MUTYH*^{KO} (Рисунок 45).

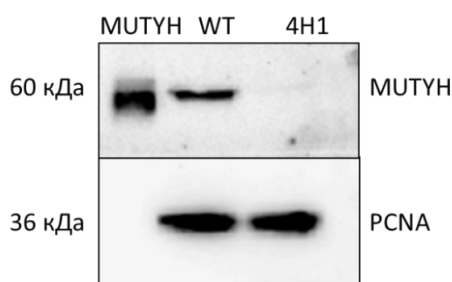


Рисунок 45. Анализ уровня белка MUTYH методом иммуноблотинга в клеточных экстрактах дикого типа (WT) и нокаутной клеточной линии 4Н1.

3.2. Характеристика клеток, дефицитных по гену *APEX1*

3.2.1. 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 ферментом Ung, либо его синтетический аналог ТНФ. Экстракты, полученные из клеток дикого типа, эффективно гидролизуют оба субстрата (Рисунок 46, дорожки 3 и 8), а клеточные экстракты 1С4 и 2А9 были неспособны расщеплять такие субстраты (Рисунок 46, дорожки 4–5 и 9–10). В то же время клеточные экстракты дикого типа, 1С4 и 2А9 были способны выщеплять урацил из двуцепочечных субстратов (Рисунок 47А) и включать dNMP в субстрат, содержащий однонуклеотидную брешь (Рисунок 47Б). 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).

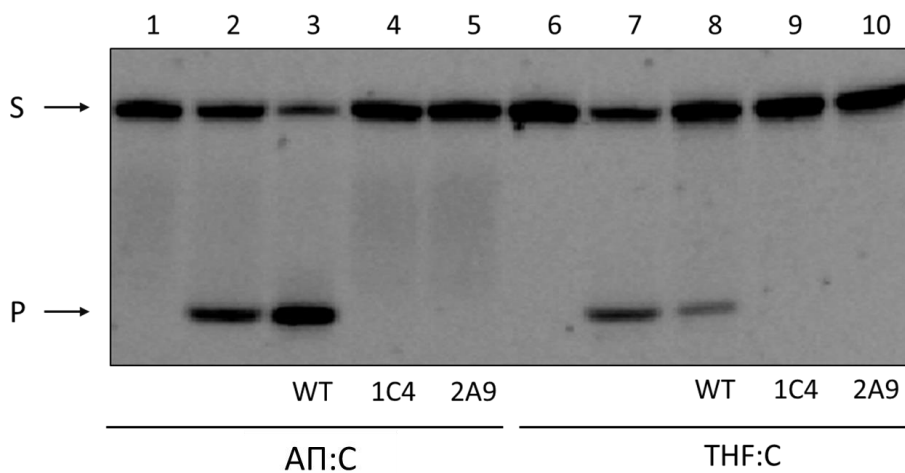


Рисунок 46. Электрофореграмма 20%-ного денатурирующего ПААГ продуктов реакции расщепления двуцепочечного субстрата длиной 23 нт, содержащего пары АП:С (дорожки 1–5) или ТНF:С (дорожки 6–10), экстрактами клеток 293FT дикого типа (дорожки 3 и 8), нокаута 1C4 (дорожки 4 и 9) и 2A9 (дорожки 5 и 10). Контроль 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).

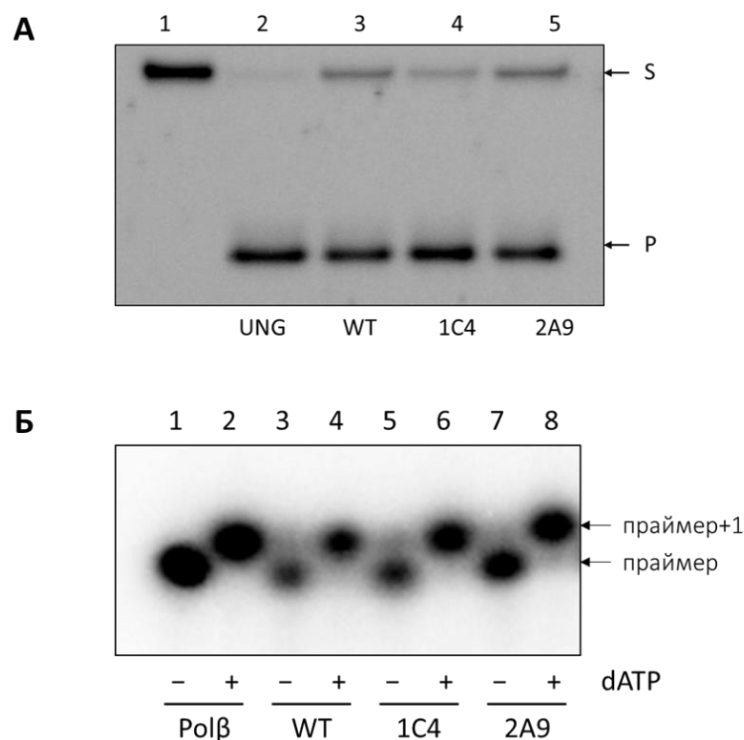


Рисунок 47. Исследование активности UNG и ДНК-полимеразной активности в клеточных экстрактах. **А**, расщепление двуцепочечного олигонуклеотидного субстрата длиной 23 нт, содержащего пару U:C, экстрактами клеток 293FT дикого типа (дорожка 3), нокаута 1C4 (дорожка 4) и 2A9 (дорожка 5). Контроль без фермента и клеточного экстракта приведен в дорожке 1, контроль с рекомбинантным белком Ung — в дорожке 2. Продукт обрабатывали NaOH, чтобы гидролизовать АП-сайт, образовавшийся после удаления урацила. Стрелки указывают на положение субстрата (S) и продукта реакции (P). **Б**, удлинение праймера в субстрате, содержащем однонуклеотидную брешь, экстрактами клеток 293FT дикого типа (дорожки 3–4), нокаута 1C4 (дорожки 5–6) и 2A9 (дорожки 7–8). Контроль реакции с рекомбинантным белком POLβ приведен в дорожках 1–2. Стрелками указана подвижность праймера и удлиненного продукта реакции.

Для оценки эффективности работы всей системы BER в нокаутных клеточных линиях олигонуклеотидные дуплексы, содержащие урацил или THF, обрабатывали клеточными экстрактами в присутствии dNTP *in vitro* (Рисунок 48).

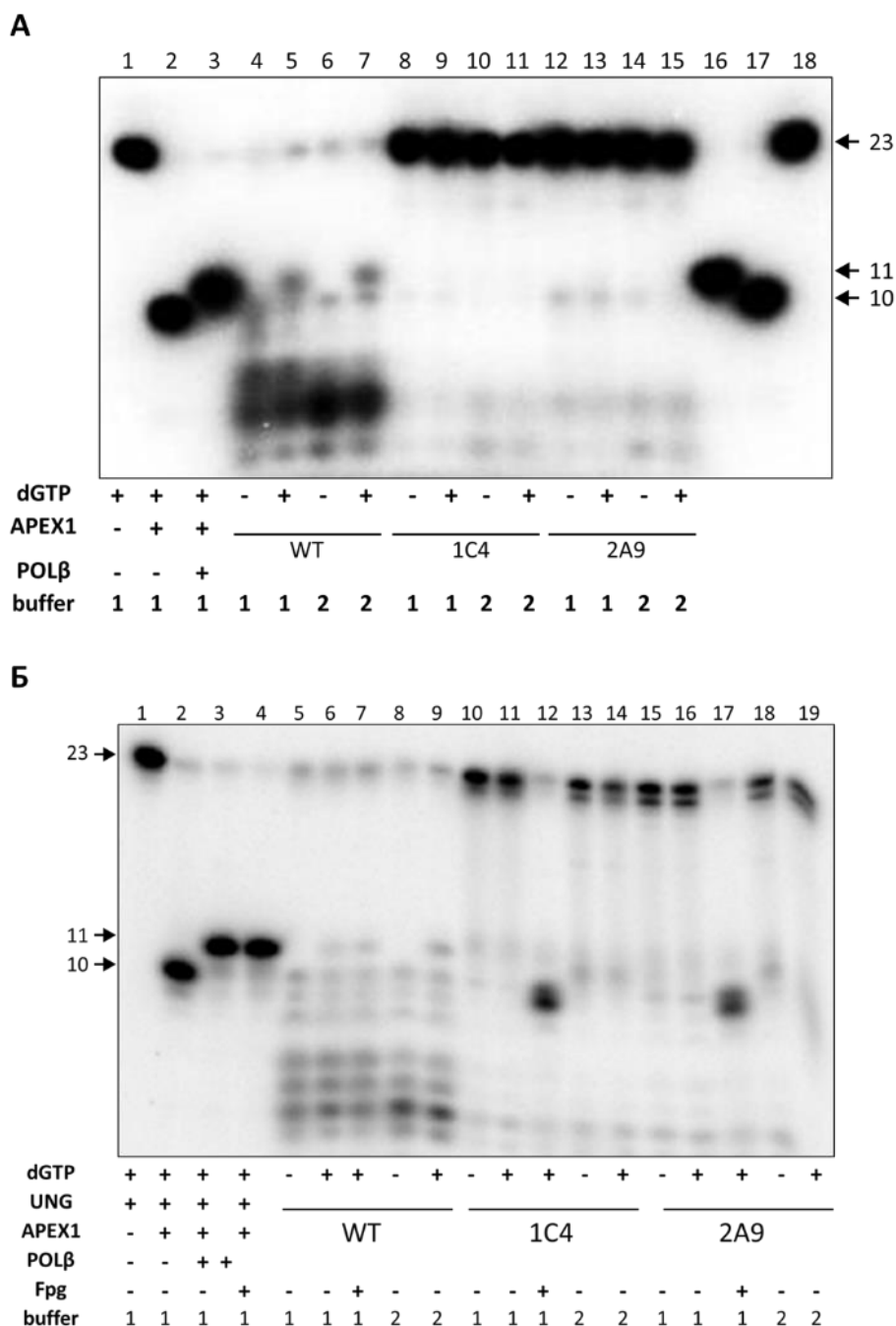


Рисунок 48. Исследование BER в экстрактах клеток 293FT дикого типа и нокаутов APEX1 1C4 и 2A9. **А**, исследование BER на двуцепочечном субстрате, содержащем THF:C, с использованием рекомбинантных белков APEX1 и POLβ (дорожки 1–3). Продукты реакции с экстрактами клеток дикого типа 293FT приведены на дорожках 4–7, с экстрактами клеток 1C4 — на дорожках 8–11, с экстрактами клеток 2A9 — на дорожках 12–15. В качестве буфера 1 использовали буфер BER, в качестве буфера 2 — буфер для POLβ. На дорожки 16–18 нанесены маркеры подвижности, отмеченные стрелками. **Б**, исследование BER на двуцепочечном субстрате, содержащем U:C, с использованием рекомбинантных белков UNG, APEX1 и POLβ (дорожки 1–4). Продукты реакции с экстрактами клеток дикого типа 293FT приведены на дорожках 5–9, с экстрактами клеток 1C4 — на дорожках 10–14, с экстрактами клеток 2A9 — на дорожках 15–19. Буферы идентичны использованным в эксперименте, показанном на панели А. Некоторые реакции после окончания дополнительно обрабатывали белком Fpg для подтверждения формирования АП-сайта.

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. Для увеличения накопления продукта ДНК-полимеразной активности проводили реакцию в буфере, оптимальном для заполнения однонуклеотидной брешли POLβ, однако результаты принципиально не отличались от полученных в буфере BER. В отличие от экстрактов клеток дикого типа, в экстрактах нокаутных клеток было видно лишь незначительное расщепление, несмотря на то, что урацил эффективно выщеплялся из ДНК, как видно из гидролиза продукта реакции белком Fpg — ДНК-гликозилазой с сильной АП-лиазной активностью. Продукты расщепления, присутствующие в незначительных количествах в реакциях с субстратом U:C, 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 1С4 и 2А9 репарация урацила и ТНФ по каноническому пути BER неэффективна в связи с отсутствием функционального белка APEX1.

3.2.2. Фенотипическая характеристика клеток 293FT *APEX1^{KO}*

Клеточные линии 1С4 и 2А9, нокаутные по гену *APEX1*, морфологически ничем не отличались от клеток 293FT дикого типа. Для фенотипической характеристики клеток была исследована продолжительность стадий клеточного цикла (см. разд. 2.2.11). Фиксированные клетки окрашивали раствором пропидия иодида и затем производили оценку количества клеток с разным уровнем флуоресценции с помощью проточного цитофлуориметра. Для клеток *APEX1^{KO}* не наблюдалось изменений в клеточном цикле по сравнению с клетками дикого типа (Рисунок 49). 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, Рисунок 49В).

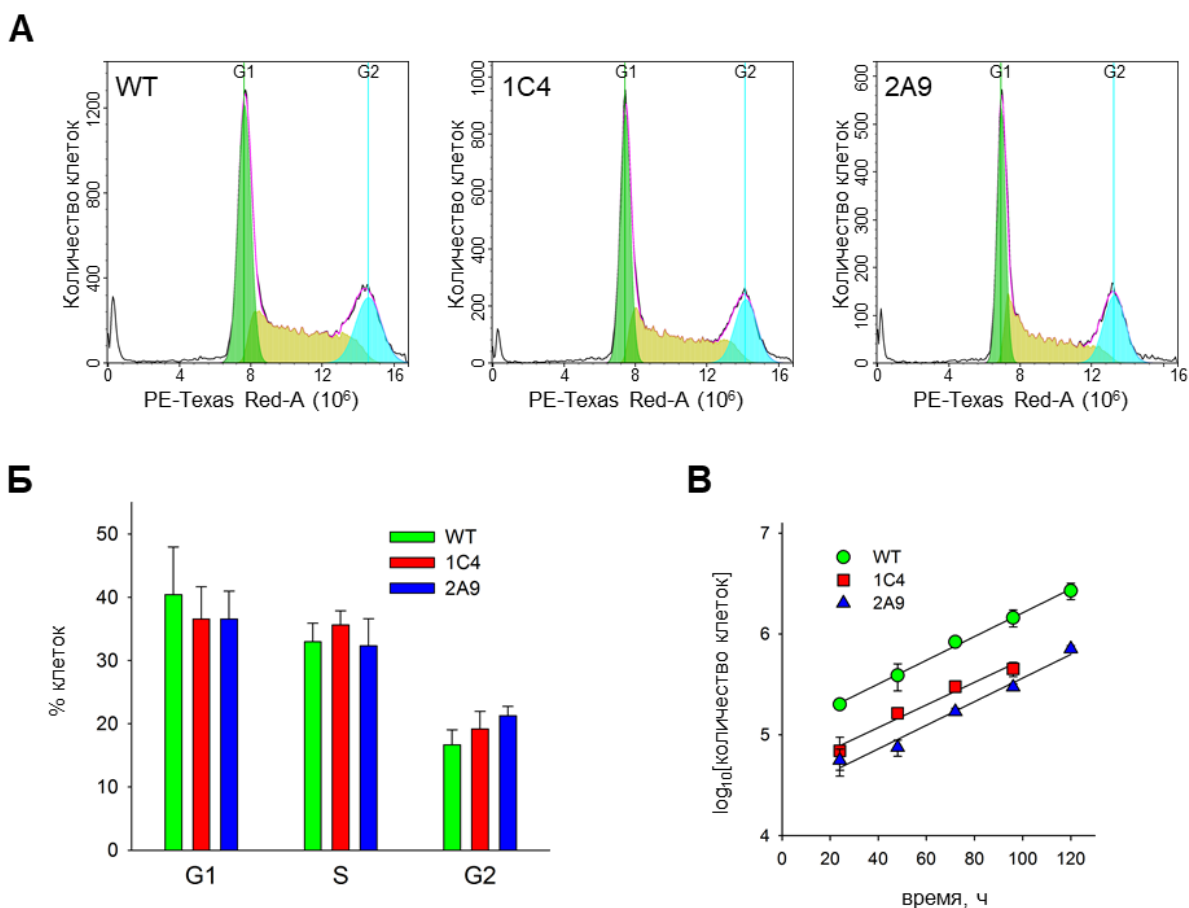


Рисунок 49. Анализ клеточного цикла (**А, Б**) и времени удвоения (**В**) клеток дикого типа 293FT и клеток *APEX1*^{KO}. **А.** Репрезентативные гистограммы распределения популяции клеток по содержанию ДНК. **Б.** Процент клеток, находящихся в фазе G1, S и G2 в несинхронизированной клеточной популяции ($n = 3$, указано среднее и стандартное отклонение). **В.** Кривая роста клеток дикого типа и клеток *APEX1*^{KO}, приведены значения среднего и стандартного отклонения ($n = 2$).

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, основанный на конденсации алкоксиаминов с альдегидной формой АП-сайта (см. разд. 2.2.12) [471]. Нокаут гена *APEX1* привел к росту числа АП-сайтов в $\sim 1,5$ –2 раза по сравнению с клетками дикого типа, что в свою очередь сравнимо с уровнем АП-сайтов в клетках дикого типа после обработки MMS (Рисунок 50). При обработке клеток *APEX1*^{KO} MMS количество АП-сайтов не увеличилось. Вероятно, что 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 [472, 473].

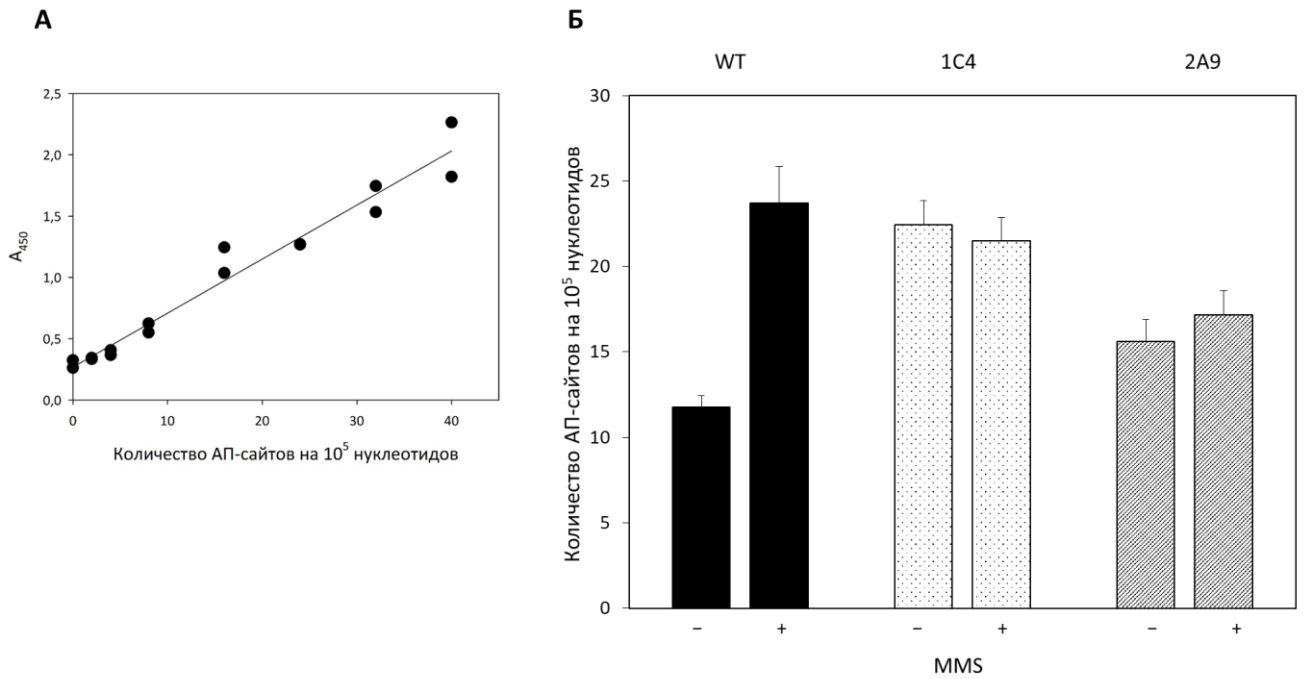


Рисунок 50. Оценка уровня АП-сайтов в клетках дикого типа и *APEX1^{KO}* с помощью альдегидной реактивной пробы. **А.** Калибровочная кривая для оценки количества АП-сайтов. **Б.** Количество АП-сайтов в клетках дикого типа и *APEX1^{KO}* без и с обработкой MMS. Приведены значения среднего и стандартного отклонения ($n = 2$).

Для оценки последствий нокаута гена *APEX1* исследовали выживаемость клеток при обработке генотоксическими агентами — MMS, H_2O_2 и $KBrO_3$ (Рисунок 51) (см. разд. 2.2.13).

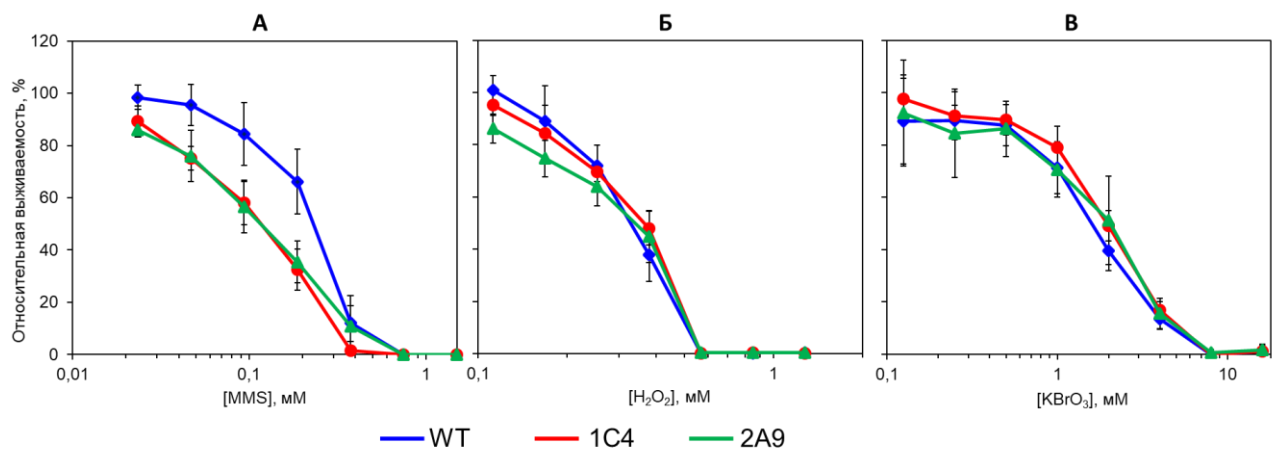


Рисунок 51. Графики зависимости выживаемости клеток *APEX1^{KO}* от концентрации MMS (А, $n = 4$), H_2O_2 (Б, $n = 3$) и $KBrO_3$ (В, $n = 3$). Обозначения клеточных линий указаны под графиками. Приведены значения среднего и стандартного отклонения.

К основным известным типам повреждений, индуцируемых MMS, относятся *N7*-метилпурины, *N3*-метилпурины и *O6*-метилгуанин. H_2O_2 проявляет меньшую специфичность, индуцируя как одноцепочечные разрывы, так и различные окисленные повреждения оснований. $KBrO_3$ в основном дает 8-охоG и в меньшей степени одноцепочечные разрывы. Согласно полученным данным, клетки, дефицитные по *APEX1*, были более чувствительны к MMS, но не к

H_2O_2 и $KBrO_3$ (Рисунок 51). Это может быть связано с разными механизмами репарации повреждений, индуцированных данными агентами. Алкилированные основания ДНК выщепляются 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 PNKP [22, 474]. В этом случае репарацию инициируют ДНК-гликозилазы NEIL1 или NEIL2, которые катализируют β, δ -элиминирование с формированием однонуклеотидной бреши фланкированной двумя фосфатами. PNKP затем удаляет 3'-фосфат, приводя к образованию канонических концов для дальнейшей репарации ДНК-полимеразой. Более того, появляются данные, свидетельствующие о роли NER в репарации окисленных повреждений ДНК в клетках человека [475]. H_2O_2 к тому же приводит к образованию одноцепочечных разрывов с окисленным 3'-концевым остатком сахара, который необходимо удалить для дальнейших стадий репарации. APEX1 обладает такой активностью, но в клетках человека имеется еще несколько 3'-фосфодиэстераз, в том числе APEX2, TDP1 и XPF-ERCC1 [281, 476, 477].

3.3. Характеристика клеток, дефицитных по APEX1 и APEX2

Клетки 293FT *APEX1^{KO}* не обладают повышенной чувствительностью к таким генотоксическим агентам, как H_2O_2 , $KBrO_3$, но их выживаемость снижается при обработке MMS. Рассматривалась возможность, что дополнительный нокаут гена *APEX2* в клетках *APEX1^{KO}* приведет к увеличению чувствительности к генотоксическим агентам, в связи с тем, что APEX2 обладает АП-эндонуклеазной активностью, хотя и гораздо более низкой, чем APEX1 [478]. Однако чувствительность клеток *APEX1^{KO} APEX2^{KO}* при обработке MMS не увеличилась по сравнению с клетками, нокаутными только по *APEX1* (Рисунок 52А). По-видимому, APEX2 вносит незначительный вклад в репарацию повреждений, вызванных MMS, что согласуется с ранее опубликованными данными на клеточной линии CH12F3 [271]. Выживаемость клеток *APEX1^{KO} APEX2^{KO}* при обработке H_2O_2 несколько отличалась между клонами, клон 2A2 демонстрировал некоторое увеличение чувствительности к этому генотоксическому агенту (Рисунок 52Б). Вариабельность в чувствительности к H_2O_2 между клонами 293FT *APEX1^{KO} APEX2^{KO}*, скорее всего, объясняется их разными жизненными траекториями на пути от отдельных клеток до моноклона.

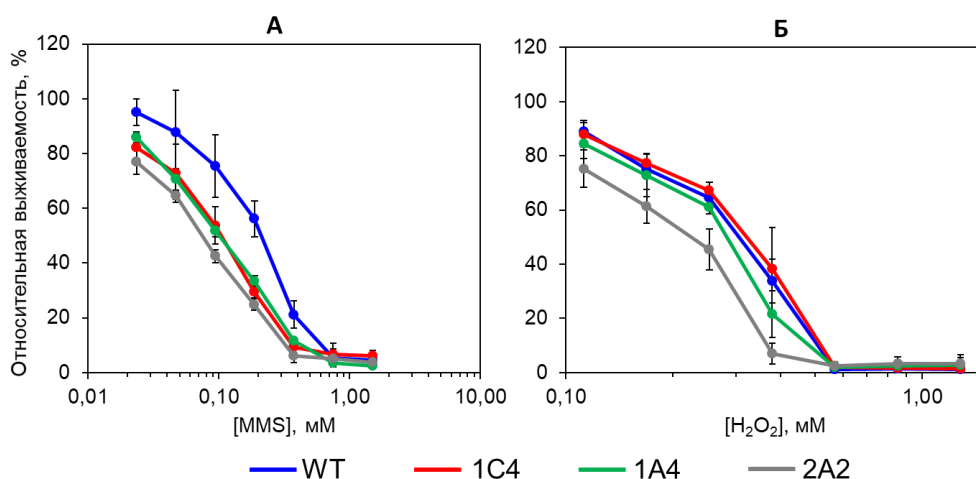


Рисунок 52. Графики зависимости выживаемости клеток *APEX1^{KO} APEX2^{KO}* от концентрации MMS (А, $n = 3$) и H_2O_2 (Б, $n = 3$). Обозначения клеточных линий указаны под графиками. Приведены значения среднего и стандартного отклонения.

3.4. Характеристика клеток, дефицитных по *POLB*

POLB 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 H_2O_2 (см. разд. 2.2.13). Было показано, что выживаемость клеток с нокаутом *POLB* резко снижена при обработке MMS, но не H_2O_2 (Рисунок 53). Эти результаты хорошо согласуются с литературными данными, полученными с ES клетками мышей, нокаутными по гену *Polb* [300].

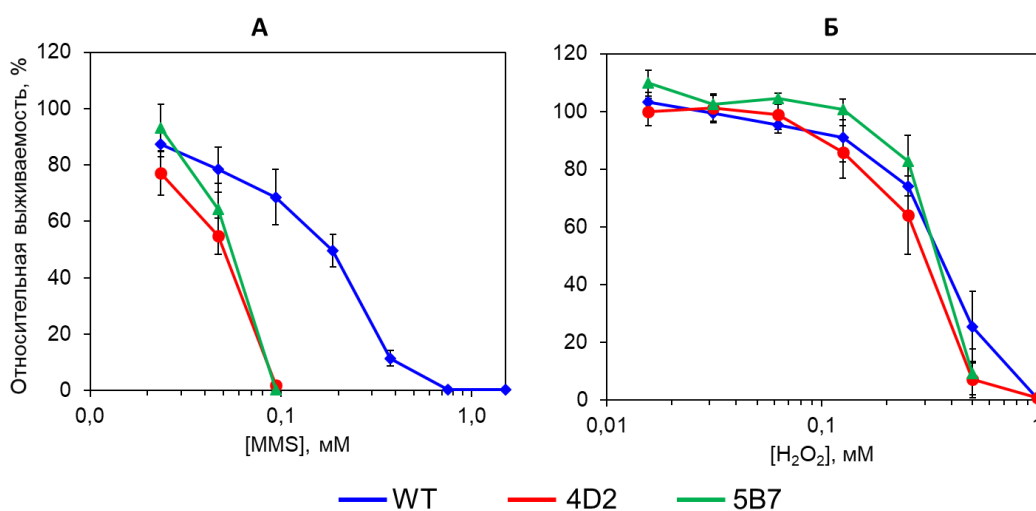


Рисунок 53. Графики зависимости выживаемости клеток *POLB^{KO}* от концентрации MMS (А, $n = 4$) и H_2O_2 (Б, $n = 4$). Обозначения клеточных линий указаны под графиками. Приведены значения среднего и стандартного отклонения.

3.5. Характеристика клеток, дефицитных по *MUTYH*

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 H_2O_2 и $KBrO_3$ (Рисунок 54) (см. разд. 2.2.13). Было показано, что нокаут гена *MUTYH* не увеличивает чувствительность к этим генотоксическим агентам. Эти данные согласуются с ранее полученными результатами обработки H_2O_2 клеточных линий лимфоцитов, полученных от пациентов с *MUTYH*-ассоциированным полипозом [154], и MEF *Mutyh*^{-/-}, обработанных $KBrO_3$ [479].

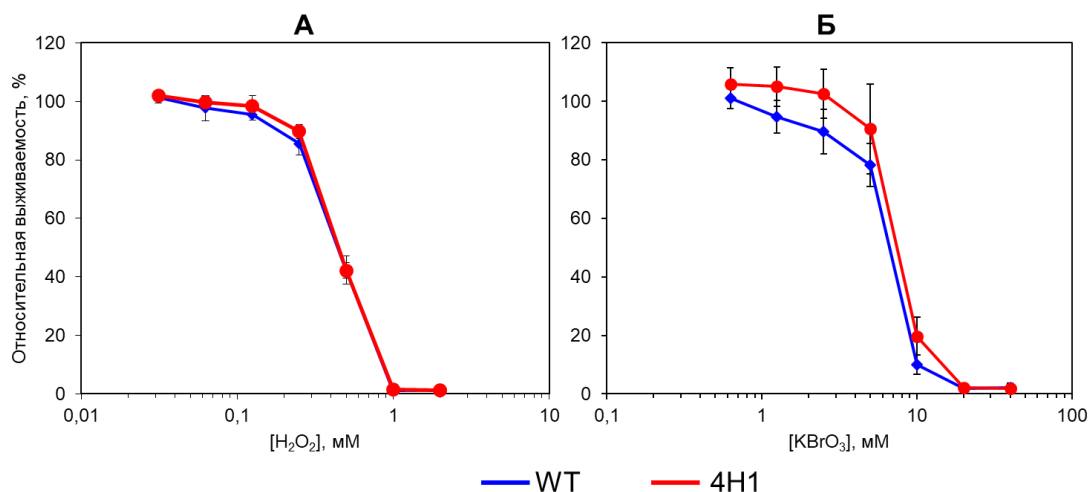


Рисунок 54. Графики зависимости выживаемости клеток *MUTYH*^{KO} от концентрации H_2O_2 (А, $n = 4$) и $KBrO_3$ (Б, $n = 5$). Обозначения клеточных линий указаны под графиками. Приведены значения среднего и стандартного отклонения.

3.6. Исследование эффективности BER в клетках человека, нокаутных по генам BER

3.6.1. Расширение репертуара репортерных конструкций 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 ТМ (см. разд. 1.4.2). В частности, было показано, что замена в гене *EGFP* с.613C>T 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 ТМ. Таким образом, эффективность репарации того или иного типа повреждения обратно пропорциональна уровню ТМ [422]. 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 [421], 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 конструкции, 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 (TS) ДНК в позиции с.607 и с.625 (Рисунок 55.1). При добавлении и гибридизации конкурентного олигонуклеотида, комплементарного выщепленному, образуется брешь размером 18 нт (Рисунок 55.2). Для получения конструкта с измененной последовательностью в эту брешь лигировали олигонуклеотид с нужной заменой (Рисунок 55.3).

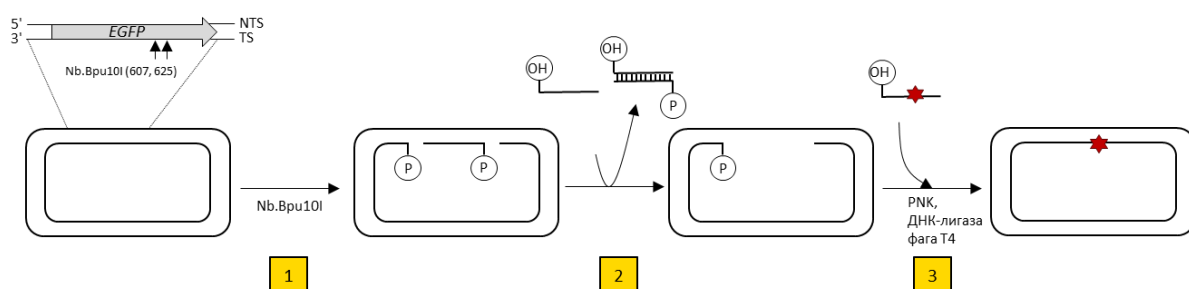


Рисунок 55. Общая схема получения плазмидных конструкций с заменами или повреждениями. **1**, гидролиз плазмиды ферментом *Nb.Bpu10I*. **2**, добавление олигонуклеотида, комплементарного выщепленному, приводит к образованию бреши длиной 18 нт. **3**, встраивание олигонуклеотида с измененной последовательностью или повреждением. Красной звездой обозначен измененный нуклеотид.

В связи с тем, что процесс получения плазмидных конструкций с модификациями содержит несколько стадий, после каждого этапа проводили реакцию аналитического лигирования для подтверждения полноты протекания реакции. Плазмиду, обработанную ферментом *Nb.Bpu10I*, инкубировали в присутствии 180-кратного молярного избытка олигонуклеотида, идентичного выщепленному, но без фосфатной группы на 5'-конце. Это приводило к полному замещению выщепленного олигонуклеотида и отсутствию ковалентно замкнутой (cc) формы плазмиды при добавлении ДНК-лигазы фага Т4 (Рисунок 56А, дорожка 3), что свидетельствует об эффективном внесении двух одноцепочечных разрывов. В качестве контроля использовали никированную

плазмиду без добавления конкурентного олигонуклеотида, которая в отсутствие ДНК-лигазы существовала только в релаксированной форме (ос) (Рисунок 56А дорожка 1), а в присутствии лигазы — в виде смеси релаксированной и ковалентно замкнутой форм (сс) (Рисунок 56А, дорожка 2). Для подтверждения получения бреши использовали ту же схему аналитического лигирования. В этом случае при добавлении конкурентного олигонуклеотида также не образуется сс форма плазмиды (Рисунок 56В дорожка 3). В контролях без добавления олигонуклеотида не появлялась сс форма плазмиды при инкубации с ДНК-лигазой фага Т4 (Рисунок 56В дорожка 2), что свидетельствует об эффективном получении конструктора с брешью.

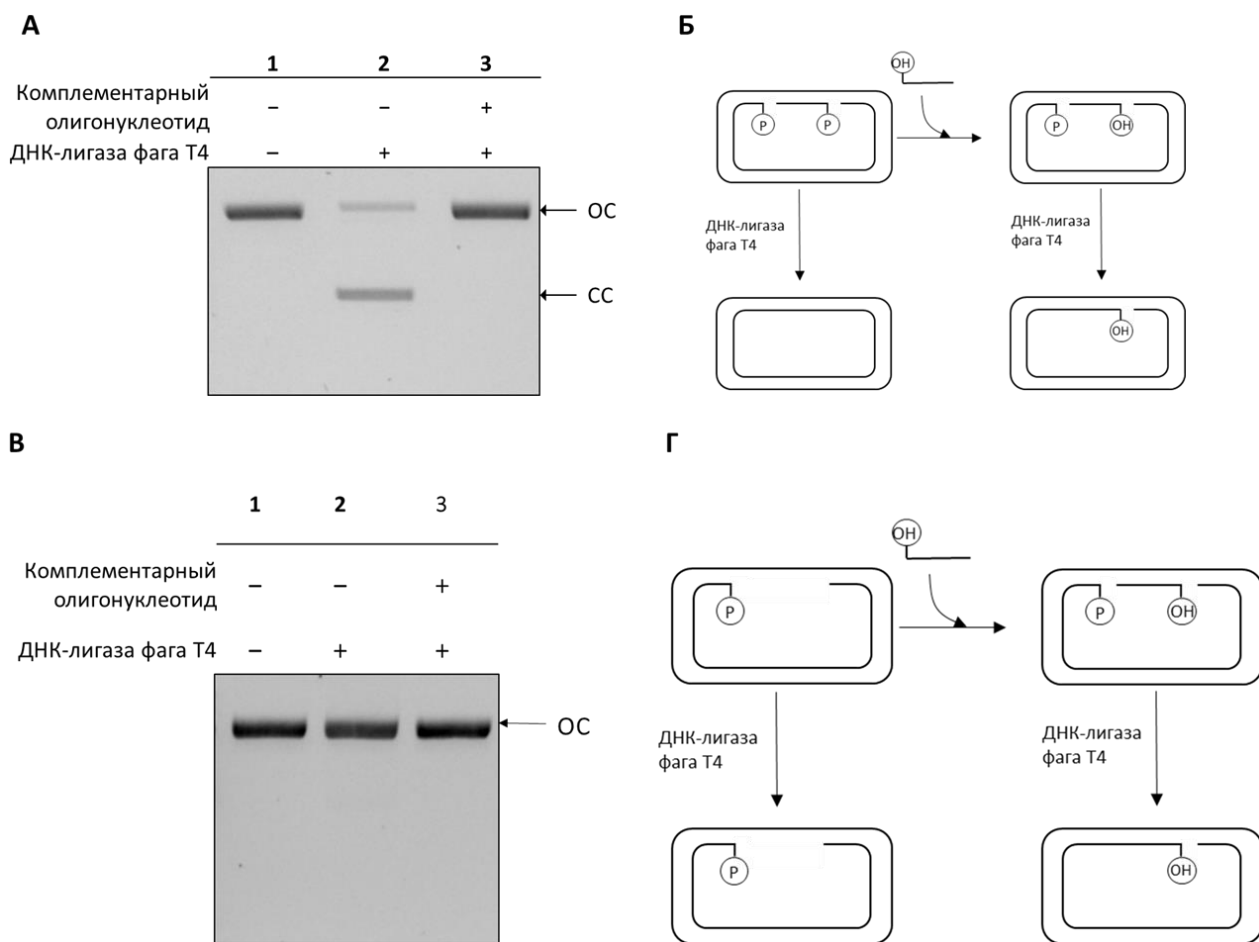


Рисунок 56. Аналитическое лигирование плазмиды, обработанной Nb.Vpu10I, для исследования эффективности внесения одноцепочечных разрывов (А, Б) и получения бреши (В, Г). А, электрофореграмма 0,8%-ного агарозного геля с продуктами реакции аналитического лигирования для проверки эффективности внесения одноцепочечных разрывов. Б, схема аналитического лигирования для проверки эффективности внесения одноцепочечных разрывов. В, электрофореграмма 0,8%-ного агарозного геля с продуктами реакции аналитического лигирования для проверки получения бреши. Г, схема аналитического лигирования для проверки получения бреши. Релаксированная форма плазмиды обозначена «ос», ковалентно замкнутая — «сс».

Затем к полученным конструкторам с брешью добавляли олигонуклеотид либо с исследуемой измененной последовательностью *EGFP*, либо идентичный выщепленному в качестве контроля. В связи с тем, что олигонуклеотиды не содержали фосфатной группы на 5'-конце, в реакционную смесь также добавляли РНК и затем ДНК-лигазу фага Т4. Эффективность встраивания

синтетического олигонуклеотида оценивали по процентному соотношению *сс* и *ос* форм плазмиды (Рисунок 57).

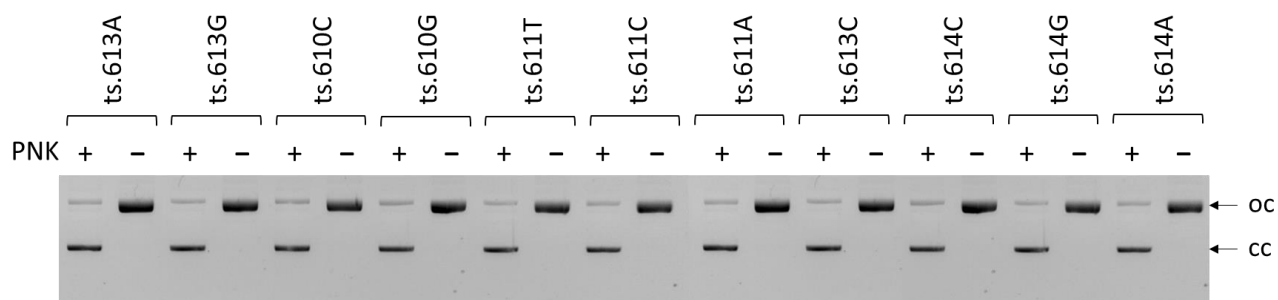


Рисунок 57. Электрофореграмма 0,8%-ного агарозного геля с продуктами препаративного лигирования олигонуклеотидов с заменами в плазмиду *rZAJ_5c*, содержащую брешь размером 18 нт. Релаксированная форма плазмиды обозначена «ос», ковалентно замкнутая — «сс».

Использование плазмид с мисматчами обусловлено тем, что такие конструкции получить легче и быстрее, чем клонировать плазмиды с заменами. Для оценки влияния мисматча использовали клеточную линию DLD-1, полученную из колоректального рака и дефицитную по мисматч-репарации [480]. 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 неизменной последовательностью EGFP (Рисунок 58). Все исследуемые мисматчи можно разделить на три группы по эффекту на уровень флуоресценции EGFP: 1) уровень флуоресценции примерно равен (>80%) уровню флуоресценции белка дикого типа; 2) уровень флуоресценции составляет 20–60% от уровня флуоресценции белка дикого типа; 3) уровень флуоресценции <20% от уровня флуоресценции белка дикого типа. К первой группе относятся мисматчи 613C:T, 614A:C, 615G:G, 615G:A, 616T:T, 619G:T, 619G:A, ко второй группе – замены 610A:C, 611C:T, 611C:C, 611C:A, 613C:C, 614A:A, 617C:C, 620C:T, 620C:C, 620C:A, к третьей группе – 610A:G, 613C:A, 614A:G, 616T:C, 616T:G, 617C:T, 617C:A, 619G:G. 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 либо раннего стоп-кодона или пролина в составе β -складок, что в конечном итоге приводит к потере флуоресценции.

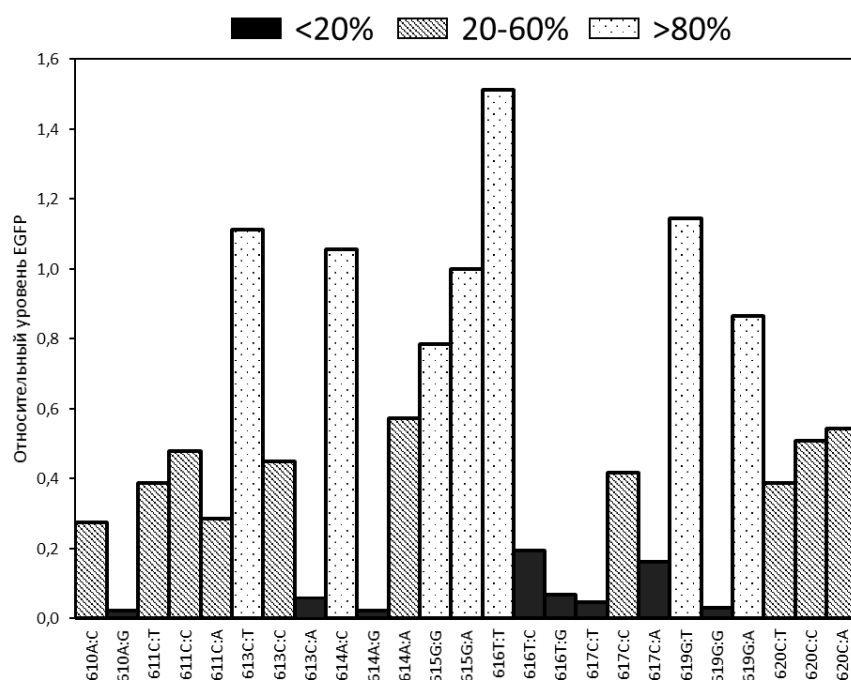


Рисунок 58. Влияние мисматчей в кодирующей части EGFP на уровень флуоресценции клеток. Тип штриховки обозначает различный относительный уровень флуоресценции EGFP популяции клеток, трансфицированных конструктами на основе pZAJ_5c и DsRed.

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 (Рисунок 59) [464]. Плазмида pZAJ_Q205* содержит ген *EGFP* с заменой с.613C>T, которая приводит к образованию стоп-кодона на месте остатка Gln205. Плазмида pMR_Q205P содержит ген *EGFP* с заменой с.614A>C, которая приводит к аминокислотной замене Gln205Pro. Плазмида pMR_S206Y содержит ген *EGFP* с заменой с.617C>A, которая приводит к аминокислотной замене Ser206Tyr. Плазмида pMR_A207P содержит ген *EGFP* с заменой с.619G>C, которая приводит к аминокислотной замене Ala207Pro. Стоит отметить, что другие замены нуклеотидов в позициях с.613, с.614, с.617 и с.619 не приводят к потере флуоресценции.

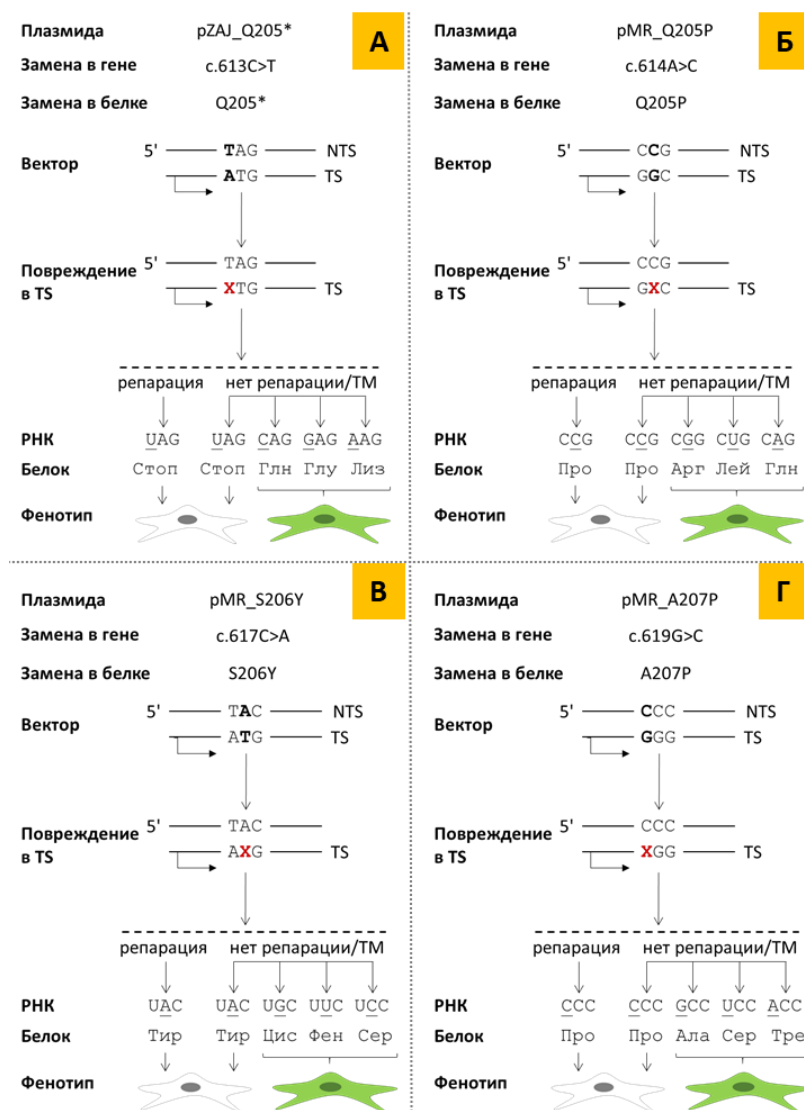


Рисунок 59. Концептуальная схема системы детекции событий ТМ в клетках. **А**, система на основе плазмиды pZAJ_Q205*. **Б**, система на основе плазмиды pMR_Q205P. **В**, система на основе плазмиды pMR_S206Y. **Г**, система на основе плазмиды pMR_A207P [464].

3.6.2. Получение плазмидных конструкторов с повреждениями

Для исследования репаративного потенциала клеток с нокаутом генов BER использовали репортерные конструкции с различными повреждениями. В качестве повреждений использовали остаток ТНФ, ТНФ с 5'-фосфотиоатной связью (sF), 2'-дезоксинуридин, 2'-дезоксинуридин с 5'-фосфотиоатной связью (sU), 2'-дезоксинуридин с 5'- и 3'-фосфотиоатными связями (sUs), 8-охоG, 8-охоG с 5'-фосфотиоатной связью (s8-охоG) и аддукт АП-сайта с метоксиамином с 5'- и/или 3'-фосфотиоатными связями. Наличие 5'-фосфотиоатной связи блокирует гидролиз АП-эндонуклеазой [218], а 3'-фосфотиоатная связь — действие АП-лиаз [481, 482]. Фосфотиоатная межнуклеозидная связь энантиомерна, причем R-изомер расщепляется АРЕХ1 примерно в 20 раз хуже, чем фосфат, а S-изомер не расщепляется вовсе [218, 483]. При стандартном химическом синтезе образуется рацемическая смесь, которая затем обычно используется без разделения, например, если фосфотиоатные группы вводятся для защиты от

нуклеаз [484]. В данном исследовании также использовали рацемическую смесь энантиомеров, поэтому активность фермента АРЕХ1 по отношению к субстратам, содержащим фосфоротиоатную связь с 5'-стороны от повреждения, можно оценить как ~1/40 от его активности по отношению к субстратам с фосфатной группой.

Для подтверждения присутствия повреждения в полученном конструкторе проводили реакцию расщепления с ферментом, специфичным к этому типу повреждения. Для конструкторов на основе pZAJ_Q205*, содержащих А, ТНФ и sF, проводили реакцию с избытком АРЕХ1 (Рисунок 60А). Конструкторы с ТНФ полностью подвергались гидролизу АРЕХ1, а конструкторы с sF, несмотря на наличие 5'-фосфоротиоатной связи, тоже частично процессировались ферментом при его избытке. Присутствие U, sU и sUs в конструкторах на основе pZAJ_Q205* подтверждали расщеплением монофункциональной ДНК-гликозилазой UNG и последующей обработкой эндонуклеазой IV (EndoIV). Плазмидные конструкторы с урацилом эффективно расщеплялись при такой обработке. Наличие фосфоротиоатной связи с 5'-стороны от повреждения блокирует активность эндонуклеазы IV (Рисунок 60Б). Для подтверждения наличия 8-охоG и s8-охоG в конструкторах на основе pMR_A207P проводили реакцию с бифункциональной ДНК-гликозилазой Fpg, которая представляет аналог фермента OGG1 у бактерий. Конструкторы с 8-охоG эффективно гидролизировались Fpg (Рисунок 60В). Успешное получение АП-сайта и аддукта метоксиамины с АП-сайтом подтверждали гидролизом эндонуклеазой АРЕХ1 (Рисунок 60Г).

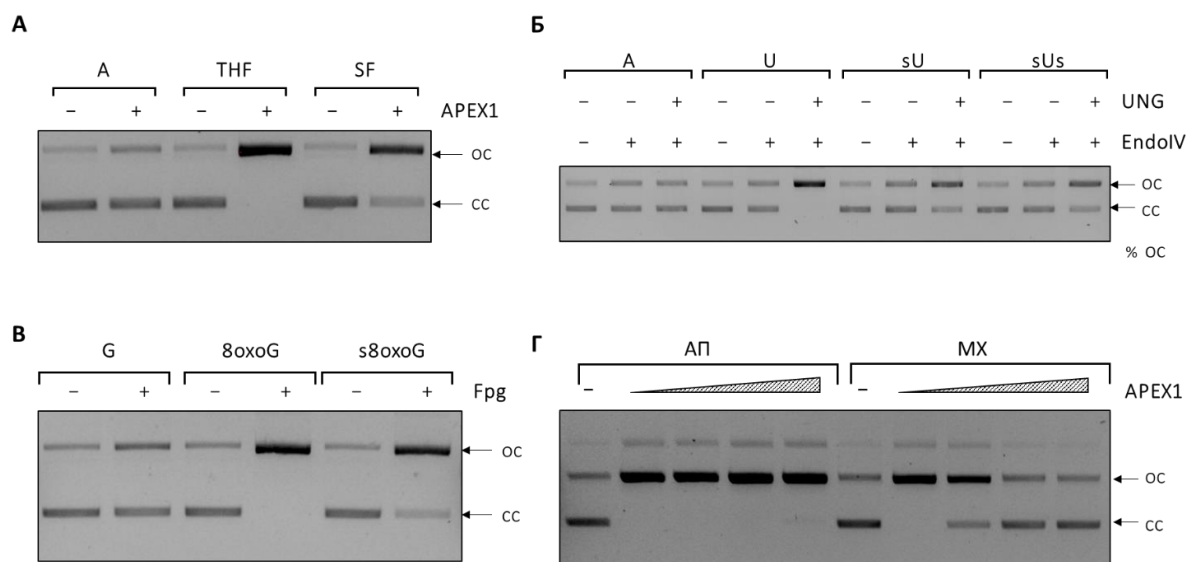


Рисунок 60. Исследование наличия повреждений в полученных плазмидных конструкторах путем ферментативного расщепления. **А**, расщепление плазмид на основе вектора pZAJ_Q205* с А, ТНФ и SF эндонуклеазой АРЕХ1. **Б**, расщепление плазмид на основе вектора pZAJ_Q205* с А, U, sU, sUs ДНК-гликозилазой UNG и EndoIV. **В**, расщепление плазмид на основе вектора pMR_A207P с G, 8-охоG и s8-охоG ДНК-гликозилазой Fpg. **Г**, расщепление плазмид на основе вектора pZAJ_Q205* с АП-сайтом и аддуктом метоксиамины с АП-сайтом (MX) эндонуклеазой АРЕХ1. Релаксированная форма плазмиды обозначена как oc, а ковалентно-замкнутая — как cc.

3.6.3. Оценка эффективности репарации повреждений в клетках 293FT *APEX1*^{KO}

В связи с тем, что *APEX1* — это основная АП-эндонуклеаза в клетках человека, сначала исследовали репарацию АП-сайтов. Учитывая, что альдегидная форма АП-сайта нестабильна [485], использовали конструкции на основе плазмидного вектора pZAJ_Q205*, содержащие синтетический аналог АП-сайта — THF, sF и контрольный конструкт с А (Рисунок 61).

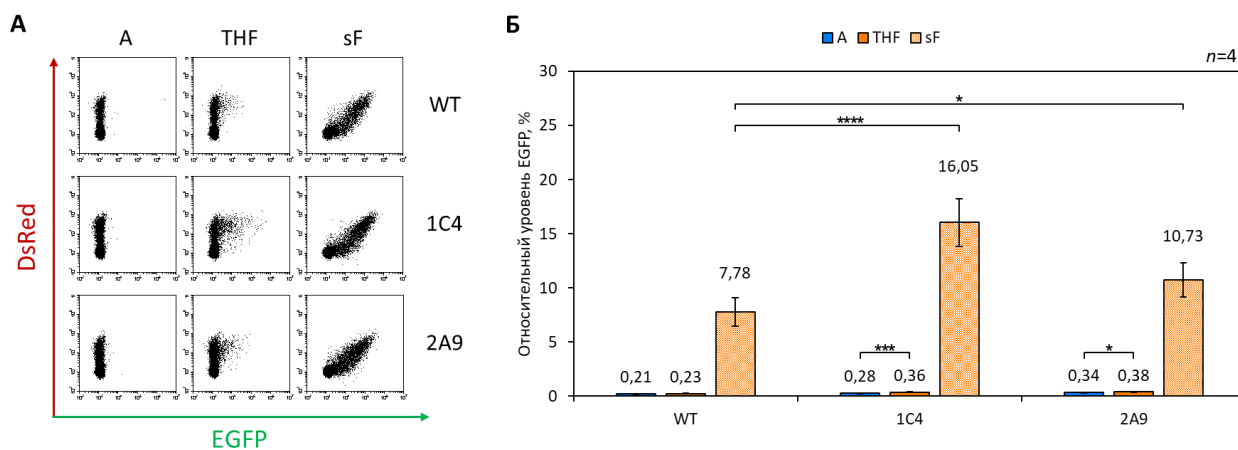


Рисунок 61. Исследование репарации THF и sF в клетках дикого типа и нокаутах по *APEX1* с использованием конструкций на основе pZAJ_Q205*. **А**, распределение клеток по флуоресценции EGFP и DsRed, где DsRed использовали в качестве контроля трансфекции. По оси X в логарифмической шкале указана флуоресценция EGFP, по оси Y в логарифмической шкале указана флуоресценция DsRed. **Б**, столбчатая диаграмма с данными анализа уровня ТМ для конструкций, содержащих А, THF и sF. Данные 4 независимых экспериментов представлены как среднее и стандартное отклонение.

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 нокаутах по *APEX1* был несколько выше, чем в клетках дикого типа, что можно объяснить остаточной активностью *APEX1* по отношению к субстратам с R-изомером фосфоротиоатной группы [218].

Синтетический аналог АП-сайта не подвергается β-элиминированию, поэтому АП-лиазы не могут процессировать конструкции 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* [281], апратаксин- и РНКР-подобного фактора (APLF) [486], системы NER [422], тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 [487–489] и человеческих гомологов бактериальной экзонуклеазы TatD — TATDN1 и TATDN3 [490]. На основании того, что введение фосфоротиоатной связи с 5'-стороны от АП-сайта значительно

увеличивает уровень ТМ, логично предположить, что в репарации ТНФ в клетке участвует фермент, гидролизующий АП-сайт с 5'-стороны. Для APEX2 показана минорная АП-эндонуклеазная активность [281, 478]. Для того, чтобы проверить возможность участия этого фермента в репарации ТНФ, с помощью системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 была получена клеточная линия 293FT с двойным нокаутом генов *APEX1* и *APEX2*, в качестве исходной клеточной линии использовали клон 1C4 (см. разд. 3.1.2). Полученные клеточные линии 1A4 и 2A2 с двойным нокаутом трансфицировали конструктами на основе плазмиды pZAJ_Q205*, содержащими А, ТНФ или sF (Рисунок 62). Уровень ТМ ТНФ в клетках с двойным нокаутом генов *APEX1* и *APEX2* незначительно отличался от уровня ТМ контрольного отрицательного конструкта, а также от уровня ТМ ТНФ в клетках с нокаутом *APEX1*. Исходя из этого, можно заключить, что APEX2 не вносит заметного вклада в репарацию АП-сайтов в клетке.

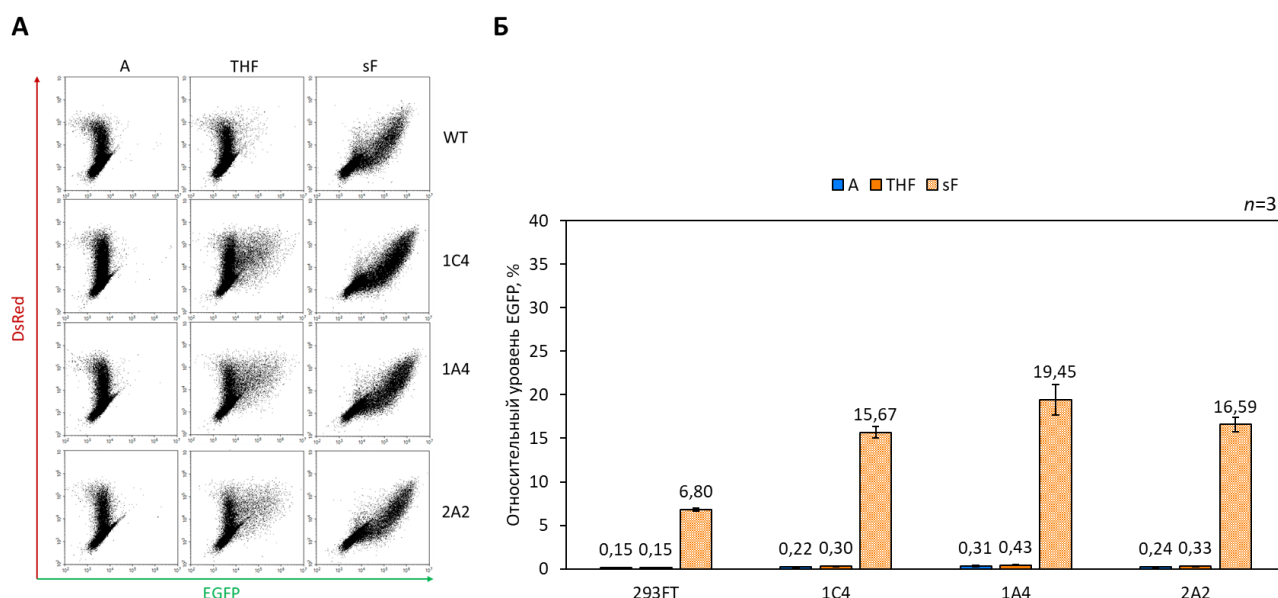


Рисунок 62. Исследование репарации ТНФ и sF в клетках дикого типа и нокаутов по *APEX1* и *APEX2* с использованием конструктов на основе pZAJ_Q205*. **А**, распределение клеток по флуоресценции EGFP и DsRed, где DsRed использовали в качестве контроля трансфекции. По оси X в логарифмической шкале указана флуоресценция EGFP, по оси Y в логарифмической шкале указана флуоресценция DsRed. **Б**, столбчатая диаграмма с данными анализа уровня ТМ для конструктов, содержащих А, ТНФ и sF. Данные 3 независимых экспериментов представлены как среднее и стандартное отклонение.

Далее исследовали репарацию конструктов на основе pZAJ_Q205*, содержащих урацил с замещенными фосфодиэфирными связями (sU, sUs) (Рисунок 63В, Г). Использование урацила для исследования активности APEX1 связано с тем, что это повреждение ДНК в основном удаляют монофункциональные ДНК-гликозилазы UNG и SMUG1, и образовавшийся АП-сайт процессируется ферментом APEX1 [66]. 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 (Рисунок 63А, Б).

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. 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 [59, 225], 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 [491].

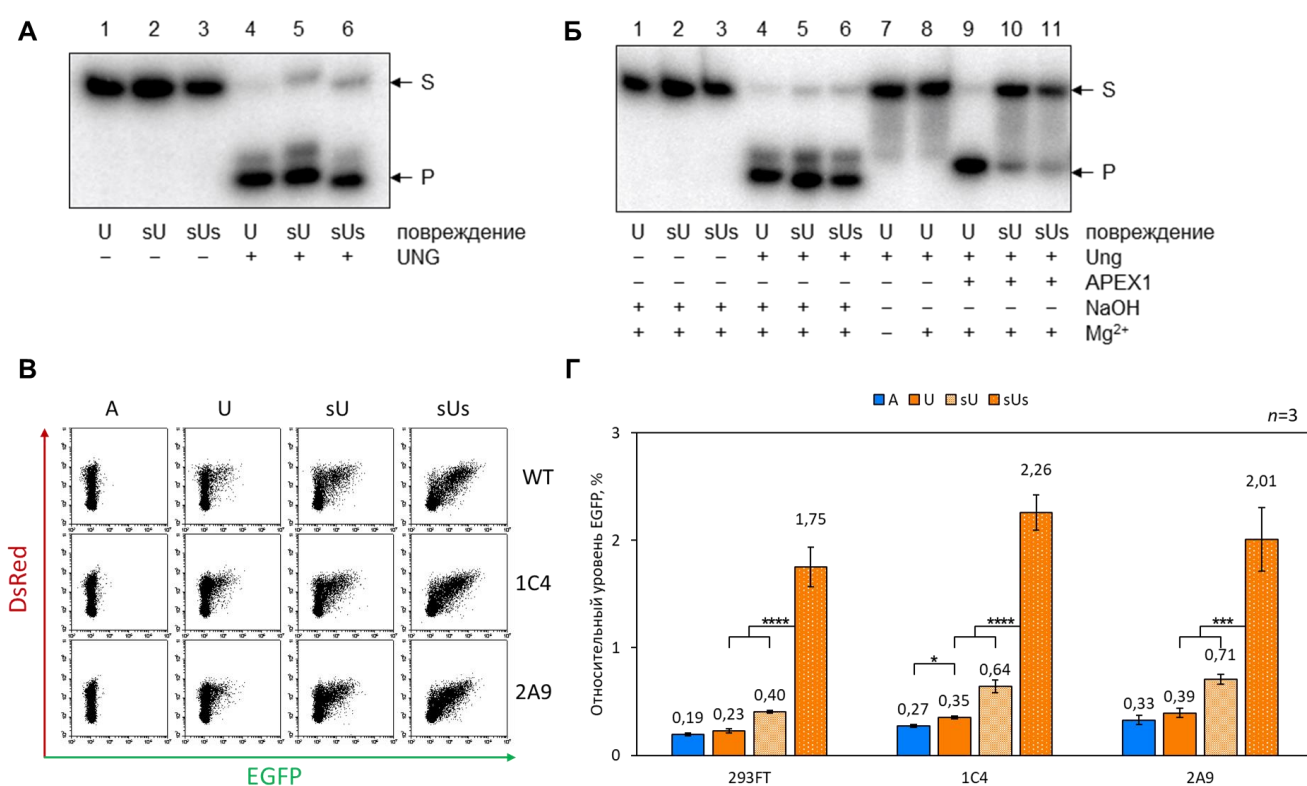


Рисунок 63. Исследование репарации U, sU и sUs в клетках дикого типа и нокаута по *APEX1*. **А**, расщепление олигонуклеотидных субстратов, содержащих U, sU, sUs белком UNG. **Б**, расщепление олигонуклеотидных субстратов с АП-сайтом, полученным из U, sU, sUs, белком APEX1. На дорожках 7 и 8 видно, что ионы Mg²⁺, присутствующие в реакции с APEX1, не влияют на расщепление АП-сайта. **В**, 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. **Г**, столбчатая диаграмма с данными анализа уровня ТМ для конструкторов, содержащих А, U, sU, sUs. Данные 3 независимых экспериментов представлены как среднее и стандартное отклонение.

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,

NEIL3. OGG1 обладает слабой лиазной активностью [108, 220, 221, 492]. NEIL1 и NEIL2 способны процессировать АП-сайты [22, 474]. Однако эти ферменты катализируют согласованное элиминирование 3'- и 5'-фосфатов [493, 494], 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 [495, 496]. Исследований возможного вклада NTHL1 в репарацию АП-сайтов *in vivo* ранее не проводилось. В связи с этим плазмидные конструкции с U, sU и sUs трансфицировали в клетки HeLa дикого типа и нокаута по *NTHL1* (Рисунок 64). Не было обнаружено статистически значимой разницы в уровне ТМ U и sUs между клетками дикого типа и нокаутом по гену *NTHL1*. 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.

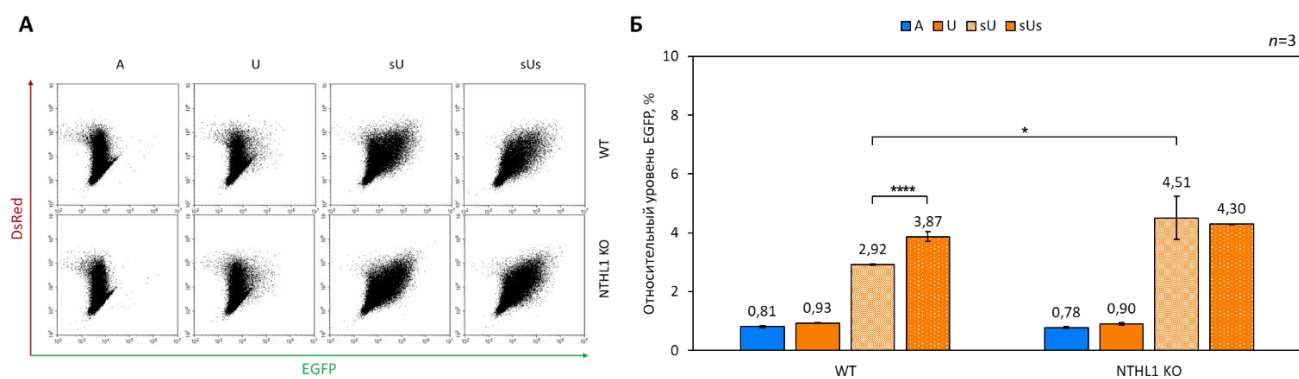


Рисунок 64. Исследование репарации U, sU и sUs в клетках дикого типа и нокаутах по *NTHL1* с использованием конструкций на основе pZAJ_Q205*. **А**, распределение клеток по флуоресценции EGFP и DsRed, где DsRed использовали в качестве контроля трансфекции. По оси X в логарифмической шкале указана флуоресценция EGFP, по оси Y в логарифмической шкале указана флуоресценция DsRed. **Б**, столбчатая диаграмма с данными анализа уровня ТМ для конструкций, содержащих A, U, sU и sUs. Данные 3 независимых экспериментов представлены как среднее и стандартное отклонение.

Вопрос о том, как осуществляется дальнейший процессинг 3'-концевого PUA с фосфотиоатной группой после β -элиминирования, остается открытым. Поскольку гидролиз и элиминирование фосфотиоатных групп затруднены, наилучшим кандидатом на эту роль представляется недавно открытая ветвь BER, протекающая с образованием бреши с 5'-стороны от повреждения [497]. 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. Таким образом, проблемы удаления модифицированного 3'-концевого фрагмента в этом пути вообще не возникает.

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-охоG и расщеплять его гидролитически [220, 222, 498]. Для исследования эффективности репарации 8-охоG в клетках, дефицитных по APEX1, были использованы конструкторы на основе pMR_Q205P (Рисунок 65) и pMR_A207P (Рисунок 66), содержащие 8-охоG и s8-охоG. Использование двух конструкторов с этими повреждениями связано с разным контекстом: в pMR_Q205P 8-охоG находится в контексте 5'-CXG-3', а в pMR_A207P — в контексте 5'-GXG-3'.

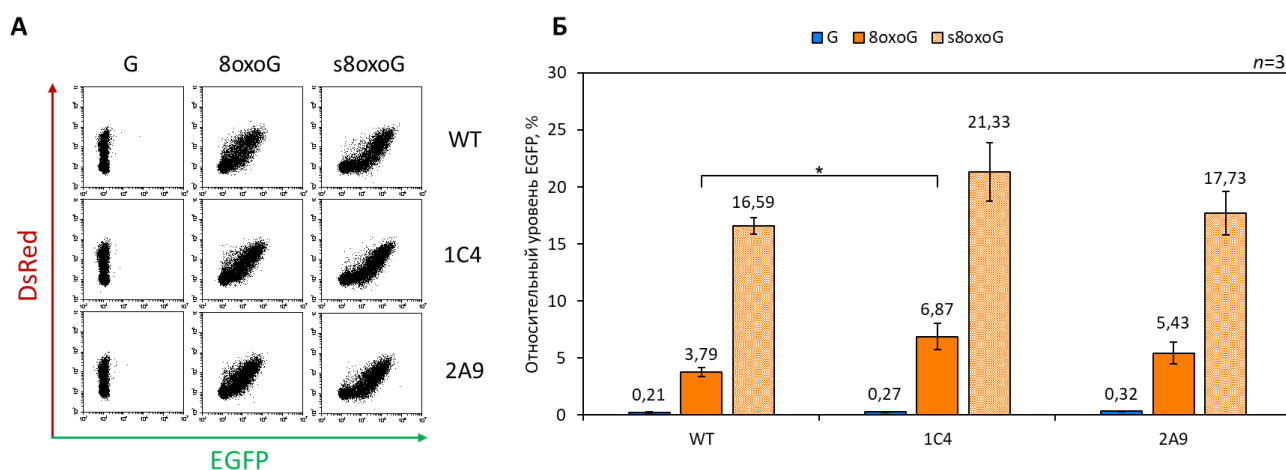


Рисунок 65. Исследование репарации G, 8-охоG и s8-охоG в клетках дикого типа и нокауты по APEX1 с использованием конструкторов на основе pMR_Q205P. А, распределение клеток по флуоресценции EGFP и DsRed, где DsRed использовали в качестве контроля трансфекции. По оси X в логарифмической шкале указана флуоресценция EGFP, по оси Y в логарифмической шкале указана флуоресценция DsRed. Б, столбчатая диаграмма с данными анализа уровня ТМ для конструкторов, содержащих G, 8-охоG и s8-охоG. Данные 3 независимых экспериментов представлены как среднее и стандартное отклонение.

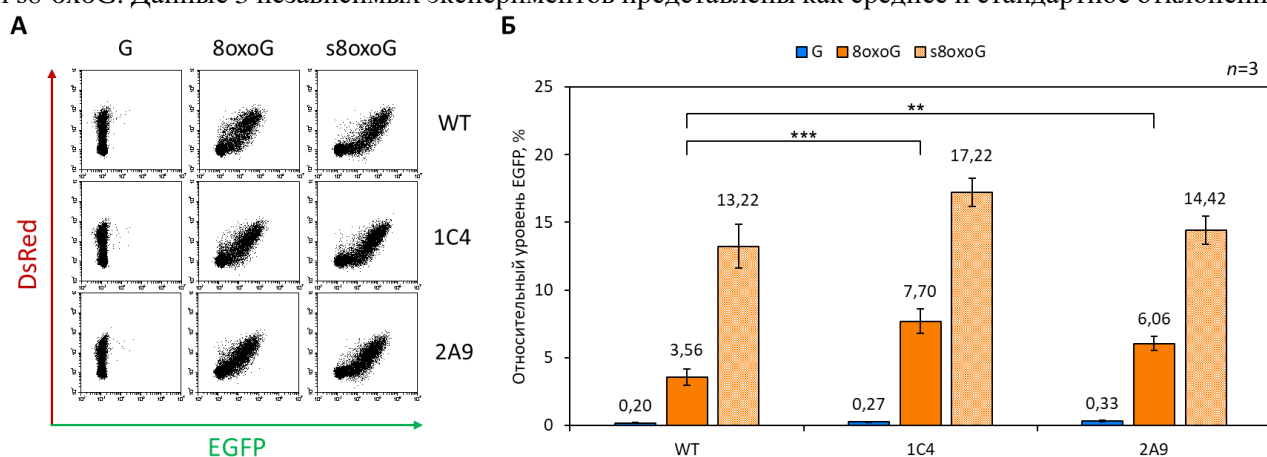


Рисунок 66. Исследование репарации G, 8-охоG и s8-охоG в клетках дикого типа и нокауты по APEX1 с использованием конструкторов на основе pMR_A207P. А, распределение клеток по флуоресценции EGFP и DsRed, где DsRed использовали в качестве контроля трансфекции. По оси X в логарифмической шкале указана флуоресценция EGFP, по оси Y в логарифмической шкале указана флуоресценция DsRed. Б, столбчатая диаграмма с данными анализа уровня ТМ для конструкторов, содержащих G, 8-охоG и s8-охоG. Данные 3 независимых экспериментов представлены как среднее и стандартное отклонение.

У нокаута 1С4 уровень ТМ 8-охоG был в 1,7 раза выше, чем у клеток дикого типа для конструктов на основе pMR_Q205P и в 2,3 раза выше — для конструктов на основе pMR_A207P. Нокаут 2А9 показывал статистически значимую разницу в уровне ТМ для 8-охоG по сравнению с клетками дикого типа лишь при использовании конструкта на основе pMR_A207P. Стоит отметить, что в клетках с нокаутом *APEX1* наблюдается статистически значимое увеличение уровня экспрессии *OGG1* (см. разд. 3.1.1). 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 (время полураспада комплекса фермент–продукт ~18 мин [108]).

3.6.4. Оценка эффективности репарации повреждений в клетках A549 *OGG1^{KO}*

Для исследования эффективности репарации 8-охоG в клетках, дефицитных по *OGG1*, использовали плазмидные конструкты на основе pMR_Q205P и pMR_A207P, содержащие 8-охоG, s8-охоG и G (см. разд. 3.6.1). Уровень ТМ 8-охоG в нокауте 2F5 оказался в четыре раза выше, чем в клетках дикого типа для обоих плазмидных конструктов (Рисунок 67 и Рисунок 68).

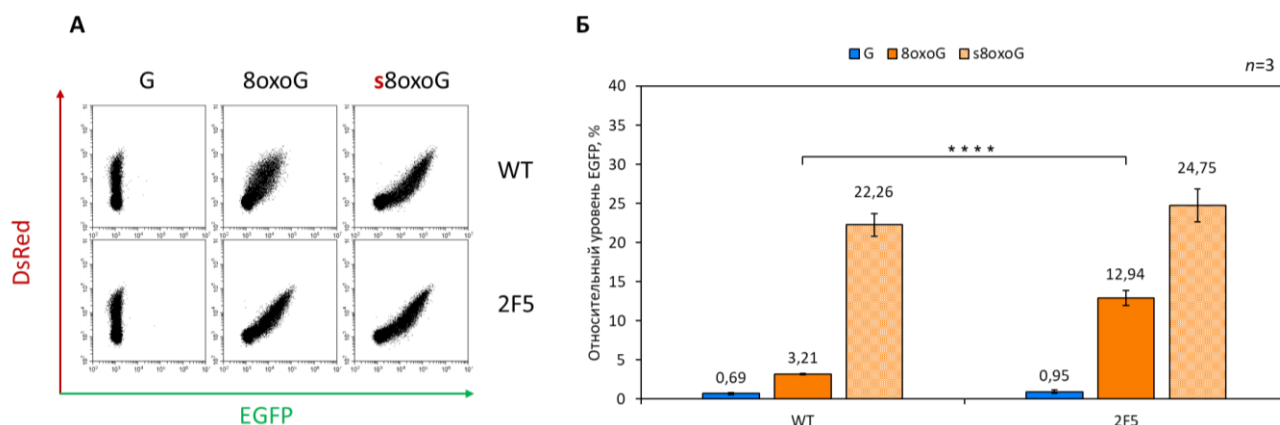


Рисунок 67. Исследование репарации G, 8-охоG и s8-охоG в клетках дикого типа и нокауте по *OGG1* с использованием конструкций на основе pMR_Q205P. **А**, распределение клеток по флуоресценции EGFP и DsRed, где DsRed использовали в качестве контроля трансфекции. По оси X в логарифмической шкале указана флуоресценция EGFP, по оси Y в логарифмической шкале указана флуоресценция DsRed. **Б**, столбчатая диаграмма с данными анализа уровня ТМ для конструкций, содержащих G, 8-охоG и s8-охоG. Данные 3 независимых экспериментов представлены как среднее и стандартное отклонение.

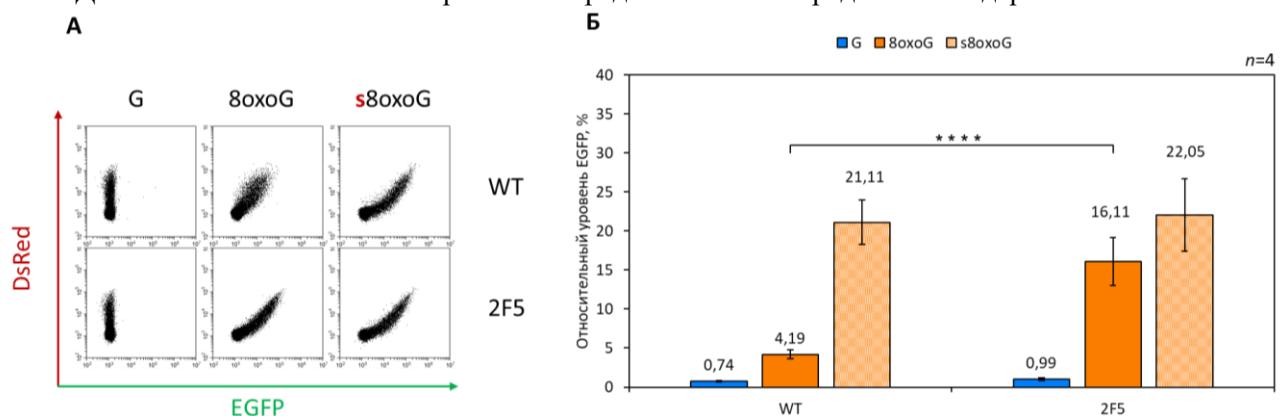


Рисунок 68. Исследование репарации G, 8-охоG и s8-охоG в клетках дикого типа и нокауте по *OGG1* с использованием конструкций на основе вектора pZAJ_5с. **А**, распределение клеток по флуоресценции EGFP и DsRed, где DsRed использовали в качестве контроля трансфекции. По оси X в логарифмической шкале указана флуоресценция EGFP, по оси Y в логарифмической шкале указана флуоресценция DsRed. **Б**, столбчатая диаграмма с данными анализа уровня ТМ для конструкций, содержащих G, 8-охоG и s8-охоG. Данные 4 независимых экспериментов представлены как среднее и стандартное отклонение.

3.6.5. Оценка эффективности репарации повреждений в клетках 293FT *MUTYH*^{KO}

Для исследования эффективности репарации аденина напротив 8-охоG в клетках 293FT *MUTYH*^{KO} использовали плазмидные конструкции на основе вектора pZAJ_5с. Олигонуклеотид с 8-охоG или контрольный с G вводили в кодирующую цепь, на следующем этапе вводили в транскрибируемую цепь олигонуклеотид с 2'-дезоксиаденозином, олигонуклеотид с 2'-дезоксидезокси-2'-фтораденозином (fA) и контрольный олигонуклеотид с C. Введение атома F в положение 2' дезоксирибозы приводит к блокированию активности всех ДНК-гликозилаз, включая *MUTYH* [499], в связи с этим конструкции, содержащие 8-охоG:fA, выступают в качестве нерепарируемого контроля. Уровень ТМ для конструкций с парой 8-охоG:A в клетках дикого типа был примерно в три раза больше, чем для нокаутов по *MUTYH* (Рисунок 69). Это связано с тем, что в клетках дикого типа функциональный *MUTYH* выщепляет А, и ДНК-полимераза включает dCMP

напротив 8-охоG, что приводит к реактивации флуоресценции. В свою очередь уровень ТМ конструкций с 8-охоG:A и 8-охоG:fA в клетках 293FT *MUTYH*^{KO} достигает сходных значений, что свидетельствует об отсутствии *MUTYH*-зависимой эксцизионной репарации.

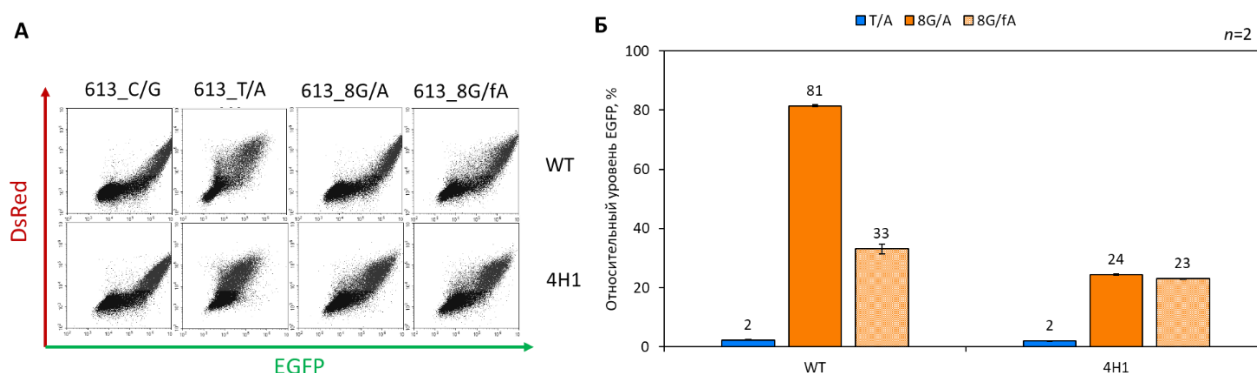


Рисунок 69. Исследование репарации пар 8-охоG:A и 8-охоG:fA в клетках дикого типа и нокауте по *MUTYH* с использованием конструкций на основе pZAJ_Q205*. **А**, распределение клеток по флуоресценции EGFP и DsRed, где DsRed использовали в качестве контроля трансфекции. По оси X в логарифмической шкале указана флуоресценция EGFP, по оси Y в логарифмической шкале указана флуоресценция DsRed. **Б**, столбчатая диаграмма с данными анализа уровня ТМ для конструкций, содержащих пары Т:А, 8-охоG:А и 8-охоG:fА. Данные 2 независимых экспериментов представлены как среднее и стандартное отклонение.

3.7. 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 [500]. 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 [501–503]. Было показано, что как прокариотические, так и эукариотические ДНК-полимеразы способны включать dNMP напротив аддуктов МХ с АП-сайтами [504]. Однако 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 конструкции на основе плазмиды pZAJ_Q205*. Протокол получения таких конструкций включал несколько стадий: 1) в транскрибируемую цепь вводили олигонуклеотиды с U, sU, sUs, 2) обрабатывали UNG для получения АП-сайта, 3) инкубировали с МХ. Полученные конструкции трансфицировали в клетки HeLa дикого типа и HeLa с нокаутом гена *NTHL1*. В качестве контролей использовали плазмидные конструкции с исходной последовательностью нефлуоресцирующего варианта EGFP, и конструкции с THF и sF. Уровень ТМ аддуктов МХ оказался примерно равным ТМ

отрицательного контроля в клетках дикого типа (Рисунок 70). Таким образом, аддукты МХ эффективно подвергаются репарации, несмотря на ингибирование APEX1. 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.

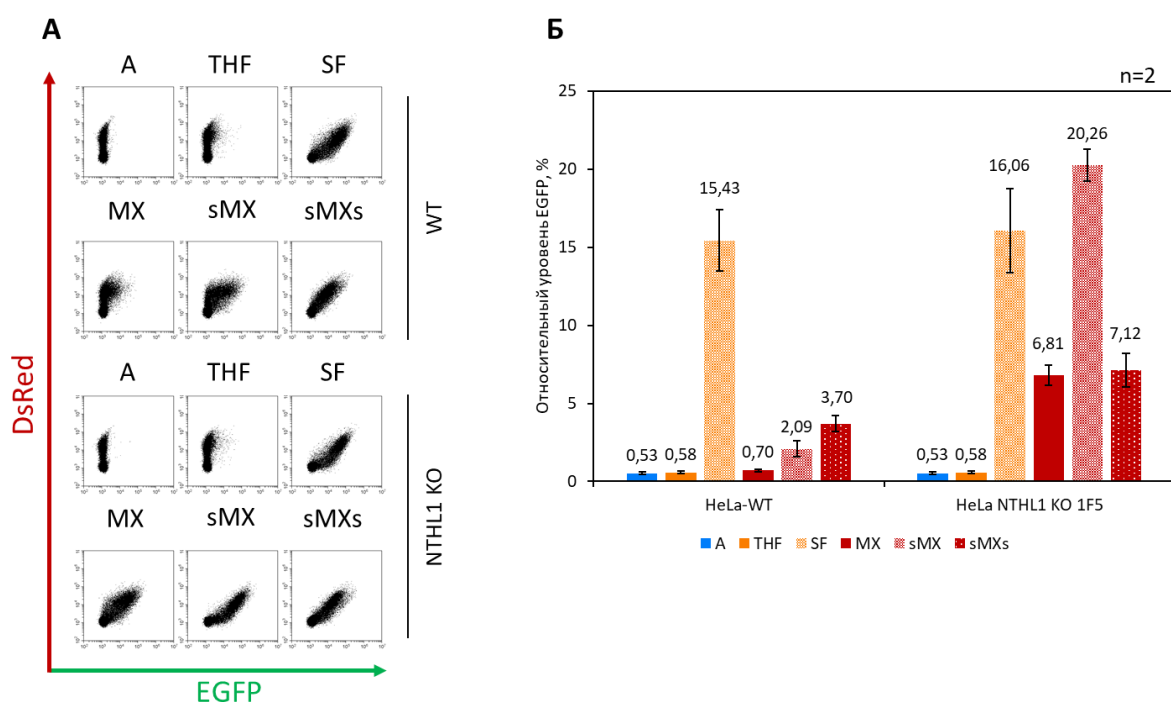


Рисунок 70. Исследование репарации THF, sF, MX, sMX и sMXs в клетках дикого типа и нокауте по *NTHL1* с использованием конструкций на основе pZAJ_Q205*. **А**, распределение клеток по флуоресценции EGFP и DsRed, где DsRed использовали в качестве контроля трансфекции. По оси X в логарифмической шкале указана флуоресценция EGFP, по оси Y в логарифмической шкале указана флуоресценция DsRed. **Б**, столбчатая диаграмма с данными анализа уровня ТМ для конструкций, содержащих А, THF, SF, MX, sMX, sMXs. Данные 2 независимых экспериментов представлены как среднее и стандартное отклонение.

Заключение

Экцизионная репарация оснований ДНК (BER) — жизненно важная система, которая защищает геном клетки от многих видов повреждения, в том числе окисления, дезаминирования и гидролиза. Процесс BER включает несколько тесно скоординированных стадий: удаление поврежденного основания, расщепление цепи ДНК, включение неповрежденного нуклеотида и лигирование ДНК. Функциональный дефицит BER часто приводит к летальному исходу на стадии эмбриона или вызывает такие серьезные заболевания, как рак, нейродегенерация или тяжелые иммунные патологии. После того, как в начале 1980-х гг. путем спонтанного мутагенеза были получены первые клеточные линии млекопитающих с дефектами BER, с их помощью был получен огромный объем ценной информации о механизмах репарации и открыты неожиданные связи BER с другими клеточными процессами, в частности, созреванием антител и эпигенетическим деметилированием. Кроме того, эти клеточные линии находят все более широкое применение в тестах на генотоксичность, где они обеспечивают повышенную чувствительность и репрезентативность в аналитических клеточных панелях.

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 *APEX1* и ДНК-полимеразы β , а также двойной нокаут по генам основной и минорной АП-эндонуклеаз *APEX1* и *APEX2*. Генные нокауты *APEX1* 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*, и до сих пор полученные в работе нокаутные линии *APEX1* и *POLB* остаются единственными, сделанными на основе человеческих клеток не ракового происхождения. 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. Набор разработанных мутаций позволяет детекцию включения любого из канонических рибонуклеотидов. Учитывая широкое использование EGFP в качестве флуоресцентного репортера, а также простоту, надежность и универсальность разработанной системы, она может найти применение для характеристики неправильного кодирования разными типами повреждений ДНК при транскрипции и репликации. 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 фосфороксиантные 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 методом транскрипционного мутагенеза 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 APX1 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 APX1. 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 неопухолевого 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 BER, не зависящих от фермента *APEX1*. Белок *APEX2* 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 *APEX1* 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.

Список сокращений и условных обозначений

8-охоG	8-оксогуанин
АП	апурин-апиримидиновый (сайт), остаток дезоксирибозы без азотистого основания в составе молекулы ДНК
миРНК	малые интерферирующие РНК
APEX1	апурин-апиримидиновая эндонуклеаза 1 (англ. apurinic/apyrimidinic endodeoxyribonuclease 1)
BER	эксцизионная репарация оснований (англ. base excision repair)
сс	ковалентно-замкнутая форма плазмиды
CHO	клетки яичников китайского хомячка (англ. Chinese hamster ovary)
DMSO	диметилсульфоксид (англ. dimethyl sulfoxide)
dRP	2'-дезоксирибозо-5'-фосфат (англ. 2'-deoxyribose-5'-phosphate)
DsRed	красный флуоресцентный белок
DTT	дитиотреитол (англ. dithiothreitol)
EDTA	этилендиаминтетрауксусная кислота (англ. ethylenediaminetetraacetic acid)
ES	эмбриональные стволовые клетки (англ. embryonic stem cells)
FACS	активируемая флуоресценцией сортировка клеток (англ. fluorescence-activated cell sorting)
FEN1	флэп-эндонуклеаза 1 (англ. flap endonuclease 1)
FES	железо-серный кластер
Fpg	формаидопиримидин-ДНК-гликозилазы (англ. formamidopyrimidine-DNA glycosylase)
HR	гомологичная рекомбинация (англ. homologous recombination)
LIG I	ДНК-лигаза I
mC	5-метилцитозин
MBD4	СрG-специфичная T/U:G-ДНК-гликозилаза (англ. methyl-CpG binding domain 4)
MEF	мышинные эмбриональные фибробласты (англ. mouse embryonic fibroblasts)
MMS	метилметансульфонат (англ. methylmethane sulfonate)
MPG	N-метилпурин ДНК-гликозилаза (англ. N-methylpurine-DNA glycosylase)
MTT	3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолийбромид
MUTYH	гомолог MutY (англ. MutY homolog)
NEIL1	белок, подобный эндонуклеазе VIII 1 (англ. endonuclease VIII-like protein 1)
NER	эксцизионная репарация нуклеотидов (англ. nucleotide excision repair)
NHEJ	репарационный путь негомологичного соединения концов (англ. non-homologous end joining)
NTHL1	белок, подобный эндонуклеазе III 1 (англ. endonuclease III-like protein 1)
ос	релаксированная форма плазмиды
OGG1	8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза 1 (англ. 8-oxoguanine-DNA glycosylase 1)
PARP1	поли(АДФ-рибоза) полимеразы 1 (англ. poly(ADP-ribose) polymerase 1)
PAM	мотив, прилежащий к протоспейсеру (англ. protospacer adjacent motif)
PAR	поли(АДФ-рибоза) (англ. poly(ADP-ribose))
PBS	фосфатно-солевой буфер (англ. phosphate buffered saline)
POL β	ДНК-полимераза β
RFLP	полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (англ. restriction fragment length polymorphism)
s8-охоG	8-оксогуанин с 5'-фосфоротиоатной связью
SF	THF с 5'-фосфоротиоатной связью
sgРНК	единая направляющая РНК (англ. single guide)
SMUG1	монофункциональная урацил ДНК-гликозилаза 1, специфичная к одноцепочечной ДНК (англ. single-strand-selective monofunctional uracil-DNA glycosylase 1)
sU	урацил с 5'-фосфоротиоатной связью
sUs	урацил с 5'- и 3'-фосфоротиоатной связью
TDG	T:G-специфичная тимин-ДНК-гликозилаза (англ. G/T mismatch-specific thymine DNA-glycosylase)
TDP1	тирозил-ДНК фосфодиэстераза 1 (англ. tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1)
THF	(3-гидрокситетрагидрофуран-2-ил)метилфосфат
TIDE	отслеживание инсерций/делений путем декомпозиции (англ. tracking of indels by decomposition)
TM	транскрипционный мутагенез (англ. transcriptional mutagenesis)
UNG	урацил-ДНК-гликозилаза (англ. uracil-DNA glycosylase)
XRCC1	(англ. X-ray cross-complementation group 1)

Список литературы

1. Barnes D.E., Lindahl T. Repair and genetic consequences of endogenous DNA base damage in mammalian cells // *Annu. Rev. Genet.* – 2004. – V. 38. – P.445–476.
2. Dianov G.L., Hubscher U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – V. 41. – No. 6. – P.3483–3490.
3. Ravanat J.-L., Douki T., Duez P., Gremaud E., Herbert K., Hofer T., Lasserre L., Saint-Pierre C., Favier A., Cadet J. Cellular background level of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine: an isotope based method to evaluate artefactual oxidation of DNA during its extraction and subsequent work-up // *Carcinogenesis.* – 2002. – V. 23. – No. 11. – P.1911–1918.
4. Krokan H.E., Bjørås M. Base excision repair // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2013. – V. 5. – No. 4. – Article No. a012583.
5. Zhou P.T., Li B., Ji J., Wang M.M., Gao C.F. A systematic review and meta-analysis of the association between OGG1 Ser326Cys polymorphism and cancers // *Med. Oncol.* – 2015. – V. 32. – No. 2. – Article No. 472.
6. Friedberg E.C., Meira L.B. Database of mouse strains carrying targeted mutations in genes affecting biological responses to DNA damage Version 7 // *DNA Repair.* – 2006. – V. 5. – No. 2. – P.189–209.
7. Hoy C.A., Salazar E.P., Thompson L.H. Rapid detection of DNA-damaging agents using repair-deficient CHO cells // *Mutat. Res.* – 1984. – V. 130. – No. 5. – P.321–332.
8. Lin Y.C., Boone M., Meuris L., Lemmens I., Van Roy N., Soete A., Reumers J., Moisse M., Plaisance S., Drmanac R., Chen J., Speleman F., Lambrechts D., Van De Peer Y., Tavernier J., Callewaert N. Genome dynamics of the human embryonic kidney 293 lineage in response to cell biology manipulations // *Nat. Commun.* – 2014. – V. 5. – Article No. 4767.
9. Foster K.A., Oster C.G., Mayer M.M., Avery M.L., Audus K.L. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism // *Exp. Cell Res.* – 1998. – V. 243. – No. 2. – P.359–366.
10. De Bont R., van Larebeke N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data // *Mutagenesis.* – 2004. – V. 19. – No. 3. – P.169–185.
11. Jackson S.P., Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease // *Nature.* – 2009. – V. 461. – No. 7267. – P.1071–1078.
12. Ciccia A., Elledge S.J. The DNA damage response: making it safe to play with knives // *Mol. Cell.* – 2010. – V. 40. – No. 2. – P.179–204.
13. Tubbs A., Nussenzweig A. Endogenous DNA damage as a source of genomic instability in cancer // *Cell.* – 2017. – V. 168. – No. 4. – P.644–656.
14. O'Driscoll M. Diseases associated with defective responses to DNA damage // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2012. – V. 4. – No. 12. – Article No. a012773.
15. Keijzers G., Bakula D., Scheibye-Knudsen M. Monogenic diseases of DNA repair // *N. Engl. J. Med.* – 2017. – V. 377. – No. 19. – P.1868–1876.
16. Lindahl T. Suppression of spontaneous mutagenesis in human cells by DNA base excision-repair // *Mutat. Res.* – 2000. – V. 462. – No. 2–3. – P.129–135.
17. Zharkov D.O. Base excision DNA repair // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2008. – V. 65. – No. 10. – P.1544–1565.
18. Podlutzky A.J., Dianova I.I., Podust V.N., Bohr V.A., Dianov G.L. Human DNA polymerase β initiates DNA synthesis during long-patch repair of reduced AP sites in DNA // *EMBO J.* – 2001. – V. 20. – No. 6. – P.1477–1482.

19. Fortini P., Dogliotti E. Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways // *DNA Repair*. – 2007. – V. 6. – No. 4. – P.398–409.
20. Robertson A.B., Klungland A., Rognes T., Leiros I. Base excision repair: the long and short of it // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2009. – V. 66. – No. 6. – P.981–993.
21. Ischenko A.A., Saparbaev M.K. Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage // *Nature*. – 2002. – V. 415. – No. 6868. – P.183–187.
22. Wiederhold L., Leppard J.B., Kedar P., Karimi-Busheri F., Rasouli-Nia A., Weinfeld M., Tomkinson A.E., Izumi T., Prasad R., Wilson S.H., Mitra S., Hazra T.K. AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells // *Mol. Cell*. – 2004. – V. 15. – No. 2. – P.209–220.
23. Franchini D.M., Schmitz K.M., Petersen-Mahrt S.K. 5-methylcytosine DNA demethylation: more than losing a methyl group // *Annu. Rev. Genet.* – 2012. – V. 46. – P.419–441.
24. Wu X., Zhang Y. TET-mediated active DNA demethylation: mechanism, function and beyond // *Nat. Rev. Genet.* – 2017. – V. 18. – No. 9. – P.517–534.
25. Di Noia J.M., Neuberger M.S. Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation // *Annu. Rev. Biochem.* – 2007. – V. 76. – P.1–22.
26. Matthews A.J., Zheng S., DiMenna L.J., Chaudhuri J. Regulation of immunoglobulin class-switch recombination: choreography of noncoding transcription, targeted DNA deamination, and long-range DNA repair // *Adv. Immunol.* – 2014. – V. 122. – P.1–57.
27. Wood R.D., Coverley D. DNA excision repair in mammalian cell extracts // *BioEssays*. – 2004. – V. 13. – No. 9. – P.447–453.
28. Cleaver J.E., Thompson L.H., Richardson A.S., States J.C. A summary of mutations in the UV-sensitive disorders: xeroderma pigmentosum, Cockayne syndrome, and trichothiodystrophy // *Hum. Mutat.* – 1999. – V. 14. – No. 1. – P.9–22.
29. Carette J.E., Raaben M., Wong A.C., Herbert A.S., Obernosterer G., Mulherkar N., Kuehne A.I., Kranzusch P.J., Griffin A.M., Ruthel G., Cin P.D., Dye J.M., Whelan S.P., Chandran K., Brummelkamp T.R. Ebola virus entry requires the cholesterol transporter Niemann-Pick C1 // *Nature*. – 2011. – V. 477. – No. 7364. – P.340–343.
30. Biard D.S.F. Untangling the relationships between DNA repair pathways by silencing more than 20 DNA repair genes in human stable clones // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – V. 35. – No. 11. – P.3535–3550.
31. Krokan H.E., Drabløs F., Slupphaug G. Uracil in DNA - occurrence, consequences and repair // *Oncogene*. – 2002. – V. 21. – No. 58. – P.8935–8948.
32. Kavli B., Otterlei M., Slupphaug G., Krokan H.E. Uracil in DNA-general mutagen, but normal intermediate in acquired immunity // *DNA Repair*. – 2007. – V. 6. – No. 4. – P.505–516.
33. Nilsen H., Otterlei M., Haug T., Solum K., Nagelhus T.A., Skorpen F., Krokan H.E. Nuclear and mitochondrial uracil-DNA glycosylases are generated by alternative splicing and transcription from different positions in the UNG gene // *Nucleic Acids Res.* – 1997. – V. 25. – No. 4. – P.750–755.
34. Haug T., Skorpen F., Aas P.A., Malm V., Skjelbred C., Krokan H.E. Regulation of expression of nuclear and mitochondrial forms of human uracil-DNA glycosylase // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – V. 26. – No. 6. – P.1449–1457.
35. Otterlei M., Haug T., Nagelhus T.A., Slupphaug G., Lindmo T., Krokan H.E. Nuclear and mitochondrial splice forms of human uracil-DNA glycosylase contain a complex nuclear localisation signal and a strong classical mitochondrial localisation signal, respectively // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – V. 26. – No. 20. – P.4611–4617.

36. Sarno A., Lundbæk M., Liabakk N.B., Arne Aas P., Mjelle R., Hagen L., Sousa M.M.L., Krokan H.E., Kavli B. Uracil-DNA glycosylase UNG1 isoform variant supports class switch recombination and repairs nuclear genomic uracil // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – V. 47. – No. 9. – P.4569–4589.
37. Imai K., Slupphaug G., Lee W.I., Revy P., Nonoyama S., Catalan N., Yel L., Forveille M., Kavli B., Krokan H.E., Ochs H.D., Fischer A., Durandy A. Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination // *Nat. Immunol.* – 2003. – V. 4. – No. 10. – P.1023–1028.
38. Kavli B., Andersen S., Otterlei M., Liabakk N.B., Imai K., Fischer A., Durandy A., Krokan H.E., Slupphaug G. B cells from hyper-IgM patients carrying UNG mutations lack ability to remove uracil from ssDNA and have elevated genomic uracil // *J. Exp. Med.* – 2005. – V. 201. – No. 12. – P.2011–2021.
39. Nilsen H., Rosewell I., Robins P., Skjelbred C.F., Andersen S., Slupphaug G., Daly G., Krokan H.E., Lindahl T., Barnes D.E., Kyrresgate O. Uracil-DNA glycosylase (UNG) -deficient mice reveal a primary role of the enzyme during DNA replication // *Mol. Cell.* – 2000. – V. 5. – No. 6. – P.1059–1065.
40. Endres M., Meisel A., Jaenisch R., Endres M., Biniszkiwicz D., Sobol R.W., Harms C., Ahmadi M., Lipski A., Katchanov J., Mergenthaler P., Dirnagl U., Wilson S.H., Meisel A., Jaenisch R. Increased postischemic brain injury in mice deficient in uracil-DNA glycosylase // *J. Clin. Invest.* – 2004. – V. 113. – No. 12. – P.1711–1721.
41. Rada C., Williams G.T., Nilsen H., Barnes D.E., Lindahl T., Neuberger M.S. Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice // *Curr. Biol.* – 2002. – V. 12. – No. 20. – P.1748–1755.
42. Nilsen H., Stamp G., Andersen S., Hrivnak G., Krokan H.E., Lindahl T., Barnes D.E. Gene-targeted mice lacking the Ung uracil-DNA glycosylase develop B-cell lymphomas // *Oncogene.* – 2003. – V. 22. – No. 35. – P.5381–5386.
43. Andersen S., Ericsson M., Dai H.Y., Peña-Díaz J., Slupphaug G., Nilsen H., Aarset H., Krokan H.E. Monoclonal B-cell hyperplasia and leukocyte imbalance precede development of B-cell malignancies in uracil-DNA glycosylase deficient mice // *DNA Repair.* – 2005. – V. 4. – No. 12. – P.1432–1441.
44. Kronenberg G., Harms C., Sobol R.W., Cardozo-pelaez F., Linhart H., Winter B., Balkaya M., Gertz K., Gay S.B., Cox D., Eckart S., Ahmadi M., Juckel G., Kempermann G., Hellweg R., Sohr R., Ho H., Wilson S.H., Jaenisch R., et al. Folate deficiency induces neurodegeneration and brain dysfunction in mice lacking uracil DNA glycosylase // *J. Neurosci.* – 2008. – V. 28. – No. 28. – P.7219–7230.
45. Delgado P., Álvarez-Prado Á.F., Marina-Zárate E., Sernandez I. V., Mur S.M., de la Barrera J., Sanchez-Cabo F., Cañamero M., de Molina A., Berver L., de Yébenes V.G., Ramiro A.R. Interplay between UNG and AID governs intratumoral heterogeneity in mature B cell lymphoma // *PLoS Genet.* – 2020. – V. 16. – No. 12. – P.1–23.
46. Nilsen H., Haushalter K.A., Robins P., Barnes D.E., Verdine G.L., Lindahl T. Excision of deaminated cytosine from the vertebrate genome: role of the SMUG1 uracil-DNA glycosylase // *EMBO J.* – 2001. – V. 20. – No. 15. – P.4278–4286.
47. Begum N.A., Izumi N., Nishikori M., Nagaoka H., Shinkura R., Honjo T. Requirement of non-canonical activity of uracil DNA glycosylase for class switch recombination // *J. Biol. Chem.* – 2007. – V. 282. – No. 1. – P.731–742.
48. Di Noia J., Neuberger M.S. Altering the pathway of immunoglobulin hypermutation by inhibiting uracil-DNA glycosylase // *Nature.* – 2002. – V. 419. – No. 6902. – P.43–48.
49. Saribasak H., Saribasak N.N., Ipek F.M., Ellwart J.W., Arakawa H., Buerstedde J.-M. Uracil DNA glycosylase disruption blocks Ig gene conversion and induces transition mutations // *J. Immunol.* – 2006. – V. 176. – No. 1. – P.365–371.
50. Begum N.A., Kinoshita K., Kakazu N., Muramatsu M., Nagaoka H., Shinkura R., Biniszkiwicz D.,

- Boyer L., Jaenisch R., Honjo T. Uracil DNA glycosylase activity is dispensable for immunoglobulin class switch // *Science*. – 2004. – V. 305. – No. 5687. – P.1160–1163.
51. Serebrenik A.A., Starrett G.J., Leenen S., Jarvis M.C., Shaban N.M., Salamango D.J., Nilsen H., Brown W.L., Harris R.S. The deaminase APOBEC3B triggers the death of cells lacking uracil DNA glycosylase // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 2019. – V. 116. – No. 44. – P.22158–22163.
 52. Bochtler M., Kolano A., Xu G.L. DNA demethylation pathways: additional players and regulators // *BioEssays*. – 2017. – V. 39. – No. 1. – P.1–13.
 53. Cortázar D., Kunz C., Selfridge J., Lettieri T., Saito Y., MacDougall E., Wirz A., Schuermann D., Jacobs A.L., Siegrist F., Steinacher R., Jiricny J., Bird A., Schär P. Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability // *Nature*. – 2011. – V. 470. – No. 7334. – P.419–423.
 54. Kunz C., Focke F., Saito Y., Schuermann D., Lettieri T., Selfridge J., Schär P. Base excision by thymine DNA glycosylase mediates DNA-directed cytotoxicity of 5-Fluorouracil // *PLoS Biol.* – 2009. – V. 7. – No. 4. – P.0967–0979.
 55. Hassan H.M., Iovic M., Kolendowski B., Bauer-Maison N., Onabote O., Cecchini M., Haig A., Maleki Vareki S., Underhill T.M., Torchia J. Loss of thymine DNA glycosylase causes dysregulation of bile acid homeostasis and hepatocellular carcinoma // *Cell Rep.* – 2020. – V. 31. – No. 1. – Article No. 107475.
 56. Kolendowski B., Hassan H., Krstic M., Iovic M., Thillainadesan G., Chambers A.F., Tuck A.B., Torchia J. Genome-wide analysis reveals a role for TDG in estrogen receptor-mediated enhancer RNA transcription and 3-dimensional reorganization // *Epigenetics and Chromatin*. – 2018. – V. 11. – Article No. 5.
 57. Mancuso P., Tricarico R., Bhattacharjee V., Cosentino L., Kadariya Y., Jelinek J., Nicolas E., Einarson M., Beeharry N., Devarajan K., Katz R.A., Dorjsuren D.G., Sun H., Simeonov A., Giordano A., Testa J.R., Davidson G., Davidson I., Larue L., et al. Thymine DNA glycosylase as a novel target for melanoma // *Oncogene*. – 2019. – V. 38. – No. 19. – P.3710–3728.
 58. Haushalter K.A., Stukenberg P.T., Kirschner M.W., Verdine G.L. Identification of a new uracil-DNA glycosylase family by expression cloning using synthetic inhibitors // *Curr. Biol.* – 1999. – V. 9. – No. 4. – P.174–185.
 59. Kavli B., Sundheim O., Akbari M., Otterlei M., Nilsen H., Skorpen F., Aas P.A., Hagen L., Krokan H.E., Slupphaug G. hUNG2 is the major repair enzyme for removal of uracil from U:A matches, U:G mismatches, and U in single-stranded DNA, with hSMUG1 as a broad specificity backup // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – No. 42. – P.39926–39936.
 60. Olinski R., Starczak M., Gackowski D. Enigmatic 5-hydroxymethyluracil: oxidatively modified base, epigenetic mark or both? // *Mutat. Res.* – 2016. – V. 767. – P.59–66.
 61. Kemmerich K., Dingler F.A., Rada C., Neuberger M.S. Germline ablation of SMUG1 DNA glycosylase causes loss of 5-hydroxymethyluracil-and UNG-backup uracil-excision activities and increases cancer predisposition of Ung^{-/-}Msh2^{-/-} mice // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – V. 40. – No. 13. – P.6016–6025.
 62. Alsøe L., Sarno A., Carracedo S., Domanska D., Dingler F., Lirussi L., Sengupta T., Tekin N.B., Jobert L., Alexandrov L.B., Galashevskaya A., Rada C., Sandve G.K., Rognes T., Krokan H.E., Nilsen H. Uracil accumulation and mutagenesis dominated by cytosine deamination in CpG dinucleotides in mice lacking UNG and SMUG1 // *Sci. Rep.* – 2017. – V. 7. – Article No. 7199.
 63. An M.-J., Shin G.-S., Lee H.-M., Kim J.-W. Ablation of SMUG1 reduces cell viability and increases UVC-mediated apoptosis in hepatocarcinoma HepG2 cells // *Genes*. – 2021. – V. 12. – No. 2. – Article No. 201.
 64. Kroustallaki P., Lirussi L., Carracedo S., You P., Esbensen Q.Y., Götz A., Jobert L., Alsøe L., Sætrum P., Gagos S., Nilsen H. SMUG1 promotes telomere maintenance through telomerase RNA processing // *Cell Rep.* – 2019. – V. 28. – No. 7. – P.1690-1702.e10.

65. Jang S., Raja S.J., Roginskaya V., Schaich M.A., Watkins S.C., Houten B. Van. UV-DDB stimulates the activity of SMUG1 during base excision repair of 5-hydroxymethyl-2'-deoxyuridine moieties // *Nucleic Acids Res.* – 2023. – V. 3. – No. 27. – P.1–18.
66. Visnes T., Doseth B., Pettersen H.S., Hagen L., Sousa M.M.L., Akbari M., Otterlei M., Kavli B., Slupphaug G., Krokan H.E. Uracil in DNA and its processing by different DNA glycosylases // *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* – 2009. – V. 364. – No. 1517. – P.563–568.
67. Bellacosa A., Drohat A.C. Role of base excision repair in maintaining the genetic and epigenetic integrity of CpG sites // *DNA Repair.* – 2015. – V. 32. – P.33–42.
68. Millar C.B., Guy J., Sansom O.J., Selfridge J., MacDougall E., Hendrich B., Keightley P.D., Bishop S.M., Clarke A.R., Bird A. Enhanced CpG mutability and tumorigenesis in MBD4-deficient mice // *Science.* – 2002. – V. 297. – No. 5580. – P.403–405.
69. Cortellino S., Turner D., Masciullo V., Schepis F., Albino D., Daniel R., Skalka A.M., Meropol N.J., Alberti C., Larue L., Bellacosa A. The base excision repair enzyme MED1 mediates DNA damage response to antitumor drugs and is associated with mismatch repair system integrity. // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2003. – V. 100. – No. 25. – P.15071–15076.
70. Cortellino S., Wang C., Wang B., Bassi M.R., Caretti E., Champeval D., Calmont A., Jarnik M., Burch J., Zaret K.S., Larue L., Bellacosa A. Defective ciliogenesis, embryonic lethality and severe impairment of the Sonic Hedgehog pathway caused by inactivation of the mouse complex A intraflagellar transport gene *Ift122/Wdr10*, partially overlapping with the DNA repair gene *Med1/Mbd4* // *Dev. Biol.* – 2009. – V. 325. – No. 1. – P.225–237.
71. Wong E., Yang K., Kuraguchi M., Werling U., Avdievich E., Fan K., Fazzari M., Jin B., Brown A.M.C., Lipkin M., Edelmann W. *Mbd4* inactivation increases C→T transition mutations and promotes gastrointestinal tumor formation // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99. – No. 23. – P.14937–14942.
72. Tricarico R., Cortellino S., Riccio A., Jagmohan-Changur S., Van der Klift H., Wijnen J., Turner D., Ventura A., Rovella V., Percesepe A., Lucci-Cordisco E., Radice P., Bertario L., Pedroni M., de Leon M.P., Mancuso P., Devarajan K., Cai K.Q., Klein-Szanto A.J.P., et al. Involvement of MBD4 inactivation in mismatch repair-deficient tumorigenesis // *Oncotarget.* – 2015. – V. 6. – No. 40. – P.42892–42904.
73. Sanders M.A., Chew E., Flensburg C., Zeilemaker A., Miller S.E., Al Hinai A.S., Bajel A., Luiken B., Rijken M., McLennan T., Hoogenboezem R.M., Kavelaars F.G., Fröhling S., Blewitt M.E., Bindels E.M., Alexander W.S., Löwenberg B., Roberts A.W., Valk P.J.M., et al. MBD4 guards against methylation damage and germ line deficiency predisposes to clonal hematopoiesis and early-onset AML // *Blood.* – 2018. – V. 132. – No. 14. – P.1526–1534.
74. Tanakaya K., Kumamoto K., Tada Y., Eguchi H., Ishibashi K., Idani H., Tachikawa T., Akagi K., Okazaki Y., Ishida H. A germline MBD4 mutation was identified in a patient with colorectal oligopolyposis and early-onset cancer: a case report // *Oncol. Rep.* – 2019. – V. 42. – No. 3. – P.1133–1140.
75. Palles C., West H.D., Chew E., Galavotti S., Flensburg C., Grolleman J.E., Jansen E.A.M., Curley H., Chegwidden L., Arbe-Barnes E.H., Lander N., Truscott R., Pagan J., Bajel A., Sherwood K., Martin L., Thomas H., Georgiou D., Fostira F., et al. Germline MBD4 deficiency causes a multi-tumor predisposition syndrome // *Am. J. Hum. Genet.* – 2022. – V. 109. – No. 5. – P.953–960.
76. Grigera F., Wuerffel R., Kenter A.L. MBD4 facilitates immunoglobulin class switch recombination // *Mol. Cell. Biol.* – 2017. – V. 37. – No. 2. – Article No. e00316-16.
77. Chabot T., Nemati F., Herbet A., Demeyer A., Dayot S., Ganier O., Alsafadi S., Gardrat S., Mariani P., Luporsi M., Corbé M., Servois V., Cassoux N., Decaudin D., Roman S.R., Del Nery E., Piperno-Neumann S., Stern M.H., Rodrigues M. Cytidine analogs are synthetic lethal with base excision repair

- default due to MBD4 deficiency // *NPJ Precis. Oncol.* – 2022. – V. 6. – No. 1. – Article No. 81.
78. Hilbert T.P., Chaung W., Boorstein R.J., Cunningham R.P., Teebor G.W. Cloning and expression of the cDNA encoding the human homologue of the DNA repair enzyme, *Escherichia coli* endonuclease III // *J. Biol. Chem.* – 1997. – V. 272. – No. 10. – P.6733–6740.
 79. Dizdaroglu M., Karahalil B., Sentürker S., Buckley T.J., Roldán-Arjona T. Excision of products of oxidative DNA base damage by human NTH1 protein // *Biochemistry.* – 1999. – V. 38. – No. 1. – P.243–246.
 80. Weren R.D.A., Ligtenberg M.J.L., Kets C.M., De Voer R.M., Verwiel E.T.P., Spruijt L., Van Zelst-Stams W.A.G., Jongmans M.C., Gilissen C., Hehir-Kwa J.Y., Hoischen A., Shendure J., Boyle E.A., Kamping E.J., Nagtegaal I.D., Tops B.B.J., Nagengast F.M., Geurts Van Kessel A., Van Krieken J.H.J.M., et al. A germline homozygous mutation in the base-excision repair gene NTHL1 causes adenomatous polyposis and colorectal cancer // *Nat. Genet.* – 2015. – V. 47. – No. 6. – P.668–671.
 81. Rivera B., Castellsagué E., Bah I., van Kempen L.C., Foulkes W.D. Biallelic NTHL1 mutations in a woman with multiple primary tumors // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – V. 373. – No. 20. – P.1985–1986.
 82. Valle L., de Voer R.M., Goldberg Y., Sjursen W., Försti A., Ruiz-Ponte C., Caldés T., Garré P., Olsen M.F., Nordling M., Castellvi-Bel S., Hemminki K. Update on genetic predisposition to colorectal cancer and polyposis // *Mol. Aspects Med.* – 2019. – V. 69. – No. 3. – P.10–26.
 83. Grolleman J.E., de Voer R.M., Elsayed F.A., Nielsen M., Weren R.D.A., Palles C., Ligtenberg M.J.L., Vos J.R., ten Broeke S.W., de Miranda N.F.C.C., Kuiper R.A., Kamping E.J., Jansen E.A.M., Vink-Börger M.E., Popp I., Lang A., Spier I., Hüneburg R., James P.A., et al. Mutational signature analysis reveals NTHL1 deficiency to cause a multi-tumor phenotype // *Cancer Cell.* – 2019. – V. 35. – No. 2. – P.256-266.e5.
 84. Takao M., Kanno S.I., Kobayashi K., Zhang Q.M., Yonei S., Van Der Horst G.T.J., Yasui A. A back-up glycosylase in Nth1 knock-out mice is a functional Nei (endonuclease VIII) homologue // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – No. 44. – P.42205–42213.
 85. Takao M., Kanno S. ichiro, Shiromoto T., Hasegawa R., Ide H., Ikeda S., Sarker A.H., Seki S., Xing J.Z., Le X.C., Weinfeld M., Kobayashi K., Miyazaki J. ichi, Muijtjens M., Hoeijmakers J.H.J., Van Der Horst G., Yasui A. Novel nuclear and mitochondrial glycosylases revealed by disruption of the mouse Nth1 gene encoding an endonuclease III homolog for repair of thymine glycols // *EMBO J.* – 2002. – V. 21. – No. 16. – Article No. 4391.
 86. Ocampo M.T.A., Chaung W., Marenstein D.R., Chan M.K., Altamirano A., Basu A.K., Boorstein R.J., Cunningham R.P., Teebor G.W. Targeted deletion of mNth1 reveals a novel DNA repair enzyme activity // *Mol. Cell. Biol.* – 2002. – V. 22. – No. 17. – P.6111–6121.
 87. Chan M.K., Ocampo-Hafalla M.T., Vartanian V., Jaruga P., Kirkali G., Koenig K.L., Brown S., Lloyd R.S., Dizdaroglu M., Teebor G.W. Targeted deletion of the genes encoding NTH1 and NEIL1 DNA N-glycosylases reveals the existence of novel carcinogenic oxidative damage to DNA // *DNA Repair.* – 2009. – V. 8. – No. 7. – P.786–794.
 88. Marsden C.G., Das L., Nottoli T.P., Kathe S.D., Doublé S., Wallace S.S., Sweasy J.B. Mouse embryonic fibroblasts isolated from Nth1 D227Y knockin mice exhibit defective DNA repair and increased genome instability // *DNA Repair.* – 2022. – V. 109. – Article No. 103247.
 89. Sarmini L., Meabed M., Emmanouil E., Atsaves G., Robeska E., Karwowski B.T., Campalans A., Gimisis T., Khobta A. Requirement of transcription-coupled nucleotide excision repair for the removal of a specific type of oxidatively induced DNA damage // *Nucleic Acids Res.* – 2023. – V. 51. – No. 10. – P.4982–4994.
 90. Shibutani S., Takeshita M., Grollman A.P. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG // *Nature.* – 1991. – V. 349. – No. 6308. – P.431–434.

91. Grollman A.P., Moriya M. Mutagenesis by 8-oxoguanine: an enemy within // *Trends Genet.* – 1993. – V. 9. – No. 7. – P.246–249.
92. Auffret van der Kemp P., Thomas D., Barbey R., de Oliveira R., Boiteux S. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which codes for a DNA glycosylase that excises 7,8-dihydro-8-oxoguanine and 2,6-diamino-4-hydroxy-5-N-methylformamidopyrimidine // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1996. – V. 93. – No. 11. – P.5197–5202.
93. Nash H.M., Bruner S.D., Schärer O.D., Kawate T., Addona T.A., Spooner E., Lane W.S., Verdine G.L. Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily // *Curr. Biol.* – 1996. – V. 6. – No. 8. – P.968–980.
94. Lu R., Nash H.M., Verdine G.L. A mammalian DNA repair enzyme that excises oxidatively damaged guanines maps to a locus frequently lost in lung cancer // *Curr. Biol.* – 1997. – V. 7. – No. 6. – P.397–407.
95. Aburatani H., Hippo Y., Ishida T., Takashima R., Matsuba C., Kodama T., Takao M., Yasui A., Yamamoto K., Asano M. Cloning and characterization of mammalian 8-hydroxyguanine-specific DNA glycosylase/apurinic, apyrimidinic lyase, a functional mutM homologue // *Cancer Res.* – 1997. – V. 57. – No. 11. – P.2151–2156.
96. Rosenquist T.A., Zharkov D.O., Grollman A.P. Cloning and characterization of a mammalian 8-oxoguanine DNA glycosylase // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1997. – V. 94. – No. 14. – P.7429–7434.
97. Radicella J.P., Dherin C., Desmazes C., Fox M.S., Boiteux S. Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1997. – V. 94. – No. 15. – P.8010–8015.
98. Roldán-Arjona T., Wei Y.F., Carter K.C., Klungland A., Anselmino C., Wang R.P., Augustus M., Lindahl T. Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1997. – V. 94. – No. 15. – P.8016–8020.
99. Bjørås M., Luna L., Johnson B., Hoff E., Haug T., Rognes T., Seeberg E. Opposite base-dependent reactions of a human base excision repair enzyme on DNA containing 7,8-dihydro-8-oxoguanine and abasic sites // *EMBO J.* – 1997. – V. 16. – No. 20. – P.6314–6322.
100. Arai K., Morishita K., Shinmura K., Kohno T., Kim S.R., Nohmi T., Taniwaki M., Ohwada S., Yokota J. Cloning of a human homolog of the yeast OGG1 gene that is involved in the repair of oxidative DNA damage // *Oncogene.* – 1997. – V. 14. – No. 23. – P.2857–2861.
101. Kohno T., Shinmura K., Tosaka M., Tani M., Kim S.R., Sugimura H., Nohmi T., Kasai H., Yokota J. Genetic polymorphisms and alternative splicing of the hOGG1 gene, that is involved in the repair of 8-hydroxyguanine in damaged DNA // *Oncogene.* – 1998. – V. 16. – No. 25. – P.3219–3225.
102. Ishida T., Hippo Y., Nakahori Y., Matsushita I., Kodama T., Nishimura S., Aburatani H. Structure and chromosome location of human OGG1 // *Cytogenet. Cell Genet.* – 1999. – V. 85. – No. 3–4. – P.232–236.
103. Dhénaut A., Boiteux S., Radicella J.P. Characterization of the hOGG1 promoter and its expression during the cell cycle // *Mutat. Res.* – 2000. – V. 461. – No. 2. – P.109–118.
104. Nishioka K., Ohtsubo T., Oda H., Fujiwara T., Kang D., Sugimachi K., Nakabeppu Y. Expression and differential intracellular localization of two major forms of human 8-oxoguanine DNA glycosylase encoded by alternatively spliced OGG1 mRNAs // *Mol. Biol. Cell.* – 1999. – V. 10. – No. 5. – P.1637–1652.
105. Takao M., Aburatani H., Kobayashi K., Yasui A. Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage // *Nucleic Acids Res.* – 1998. – V. 26. – No. 12. – P.2917–2922.
106. Lia D., Reyes A., Araújo de Melo Campos J.T., Piolot T., Baijler J., Radicella J.P., Campalans A. Mitochondrial maintenance under oxidative stress depends on mitochondrial but not nuclear α isoform of

107. Bruner S.D., Norman D.P.G., Verdine G.L. Structural basis for recognition and repair of the endogenous mutagen 8-oxoguanine in DNA // *Nature*. – 2000. – V. 403. – No. 6772. – P.859–866.
108. Zharkov D.O., Rosenquist T.A., Gerchman S.E., Grollman A.P. Substrate specificity and reaction mechanism of murine 8-oxoguanine-DNA glycosylase // *J. Biol. Chem.* – 2000. – V. 275. – No. 37. – P.28607–28617.
109. Dherin C., Radicella J.P., Dizdaroglu M., Boiteux S. Excision of oxidatively damaged DNA bases by the human α -hOgg1 protein and the polymorphic α -hOgg1(Ser326Cys) protein which is frequently found in human populations // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – V. 27. – No. 20. – P.4001–4007.
110. Krishnamurthy N., Haraguchi K., Greenberg M.M., David S.S. Efficient removal of formamidopyrimidines by 8-oxoguanine glycosylases // *Biochemistry*. – 2008. – V. 47. – No. 3. – P.1043–1050.
111. Perillo B., Ombra M.N., Bertoni A., Cuozzo C., Sacchetti S., Sasso A., Chiariotti L., Malorni A., Abbondanza C., Avvedimento E. V. DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression // *Science*. – 2008. – V. 319. – No. 5860. – P.202–206.
112. Amente S., Bertoni A., Morano A., Lania L., Avvedimento E. V., Majello B. LSD1-mediated demethylation of histone H3 lysine 4 triggers Myc-induced transcription // *Oncogene*. – 2010. – V. 29. – No. 25. – P.3691–3702.
113. Zuchegna C., Aceto F., Bertoni A., Romano A., Perillo B., Laccetti P., Gottesman M.E., Avvedimento E. V., Porcellini A. Mechanism of retinoic acid-induced transcription: Histone code, DNA oxidation and formation of chromatin loops // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42. – No. 17. – P.11040–11055.
114. Fleming A.M., Ding Y., Burrows C.J. Oxidative DNA damage is epigenetic by regulating gene transcription via base excision repair // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2017. – V. 114. – No. 10. – P.2604–2609.
115. Hung R.J., Hall J., Brennan P., Boffetta P. Genetic polymorphisms in the base excision repair pathway and cancer risk: a huge review // *Am. J. Epidemiol.* – 2005. – V. 162. – No. 10. – P.925–942.
116. Hill J.W., Evans M.K. Dimerization and opposite base-dependent catalytic impairment of polymorphic S326C OGG1 glycosylase // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – V. 34. – No. 5. – P.1620–1632.
117. Bravard A., Vacher M., Moritz E., Vaslin L., Hall J., Epe B., Radicella J.P. Oxidation status of human OGG1-S326C polymorphic variant determines cellular DNA repair capacity // *Cancer Res.* – 2009. – V. 69. – No. 8. – P.3642–3650.
118. Choi J.-Y., Kim H.-S., Kang H.-K., Lee D.-W., Choi E.-M., Chung M.-H. Thermolabile 8-hydroxyguanine DNA glycosylase with low activity in senescence-accelerated mice due to a single-base mutation // *Free Radic. Biol. Med.* – 1999. – V. 27. – No. 99. – P.848–854.
119. Mori M., Toyokuni S., Kondo S., Kasai H., Naiki H., Toichi E., Hosokawa M., Higuchi K. Spontaneous loss-of-function mutations of the 8-oxoguanine DNA glycosylase gene in mice and exploration of the possible implication of the gene in senescence // *Free Radic. Biol. Med.* – 2001. – V. 30. – No. 10. – P.1130–1136.
120. Klungland A., Rosewell I., Hollenbach S., Larsen E., Daly G., Epe B., Seeberg E., Lindahl T., Barnes D.E. Accumulation of premutagenic DNA lesions in mice defective in removal of oxidative base damage // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1999. – V. 96. – No. 23. – P.13300–13305.
121. Minowa O., Arai T., Hirano M., Monden Y., Nakai S., Fukuda M., Itoh M., Takano H., Hippou Y., Aburatani H., Masumura K.I., Nohmi T., Nishimura S., Noda T. Mmh/Ogg1 gene inactivation results in accumulation of 8-hydroxyguanine in mice // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2000. – V. 97. – No. 8. – P.4156–4161.

122. Sakumi K., Tominaga Y., Furuichi M., Xu P., Tsuzuki T., Sekiguchi M., Nakabeppu Y. Ogg1 knockout-associated lung tumorigenesis and its suppression by Mth1 gene disruption // *Cancer Res.* – 2003. – V. 63. – No. 5. – P.902–905.
123. Xie Y., Yang H., Cunanan C., Xie Y., Yang H., Cunanan C., Okamoto K., Shibata D., Pan J., Barnes D.E., Lindahl T., Mcilhatton M., Fishel R., Miller J.H. Deficiencies in mouse Myh and Ogg1 result in tumor predisposition and G to T mutations in codon 12 of the K-ras oncogene in lung tumors // *Cance Res.* – 2004. – V. 64. – No. 9. – P.3096–3102.
124. Trapp C., Schwarz M., Epe B. The peroxisome proliferator WY-14,643 promotes hepatocarcinogenesis caused by endogenously generated oxidative DNA base modifications in repair-deficient Csbm/m/Ogg1-/- mice // *Cancer Res.* – 2007. – V. 67. – No. 11. – P.5156–5161.
125. Oka S., Ohno M., Tsuchimoto D., Sakumi K., Furuichi M., Nakabeppu Y. Two distinct pathways of cell death triggered by oxidative damage to nuclear and mitochondrial DNAs // *EMBO J.* – 2008. – V. 27. – No. 2. – P.421–432.
126. Ondovcik S.L., Tamblyn L., McPherson J.P., Wells P.G. Sensitivity to methylmercury toxicity is enhanced in oxoguanine glycosylase 1 knockout murine embryonic fibroblasts and is dependent on cellular proliferation capacity // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2013. – V. 270. – No. 1. – P.23–30.
127. Anene-Nzeli C.G., Li P.Y., Luu T.D.A., Ng S.L., Tiang Z., Pan B., Tan W.L.W., Ackers-Johnson M., Chen C.K., Lim Y.P., Qin R.W.M., Chua W.W., Yi L.X., Foo R.S.Y., Nakabeppu Y. 8-oxoguanine DNA glycosylase (OGG1) deficiency exacerbates doxorubicin-induced cardiac dysfunction // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2022. – V. 2022. – Article No. 9180267.
128. Komakula S.S.B., Tumova J., Kumaraswamy D., Burchat N., Vartanian V., Ye H., Dobrzyn A., Lloyd R.S., Sampath H. The DNA repair protein OGG1 protects against obesity by altering mitochondrial energetics in white adipose tissue // *Sci. Rep.* – 2018. – V. 8. – Article No. 14886.
129. Simon H., Vartanian V., Wong M.H., Nakabeppu Y., Sharma P., Stephen Lloyd R., Sampath H. OGG1 deficiency alters the intestinal microbiome and increases intestinal inflammation in a mouse model // *PLoS One.* – 2020. – V. 15. – No. 1. – P.1–23.
130. Tajai P., Fedeles B.I., Suriyo T., Navasumrit P., Kanitwithayanun J., Essigmann J.M., Satayavivad J. An engineered cell line lacking OGG1 and MUTYH glycosylases implicates the accumulation of genomic 8-oxoguanine as the basis for paraquat mutagenicity // *Free Radic. Biol. Med.* – 2018. – V. 116. – No. 2. – P.64–72.
131. Kauppila J.H.K., Bonekamp N.A., Mourier A., Isokallio M.A., Just A., Kauppila T.E.S., Stewart J.B., Larsson N.G. Base-excision repair deficiency alone or combined with increased oxidative stress does not increase mtDNA point mutations in mice // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – V. 46. – No. 13. – P.6642–6649.
132. Ba X., Boldogh L. 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: beyond repair of the oxidatively modified base lesions // *Redox Biol.* – 2018. – V. 14. – P.669–678.
133. Wang Y., Chen T., Pan Z., Lin Z., Yang L., Zou B., Yao W., Feng D., Huangfu C., Lin C., Wu G., Ling H., Liu G. 8-Oxoguanine DNA glycosylase modulates the cell transformation process in pulmonary fibrosis by inhibiting Smad2/3 and interacting with Smad7 // *FASEB J.* – 2020. – V. 34. – No. 10. – P.13461–13473.
134. Oka S., Leon J., Sakumi K., Abolhassani N., Sheng Z., Tsuchimoto D., LaFerla F.M., Nakabeppu Y. MTH1 and OGG1 maintain a low level of 8-oxoguanine in Alzheimer's brain, and prevent the progression of Alzheimer's pathogenesis // *Sci. Rep.* – 2021. – V. 11. – Article No. 5819.
135. Fouquerel E., Barnes R.P., Uttam S., Watkins S.C., Bruchez M.P., Opresko P.L. Targeted and persistent 8-oxoguanine base damage at telomeres promotes telomere loss and crisis // *Mol. Cell.* – 2019. – V. 75. – No. 1. – P.117-130.e6.
136. Baquero J.M., Benítez-Buelga C., Rajagopal V., Zhenjun Z., Torres-Ruiz R., Müller S., Hanna B.M.F.,

- Loseva O., Wallner O., Michel M., Rodríguez-Perales S., Gad H., Visnes T., Helleday T., Benítez J., Osorio A. Small molecule inhibitor of OGG1 blocks oxidative DNA damage repair at telomeres and potentiates methotrexate anticancer effects // *Sci. Rep.* – 2021. – V. 11. – Article No. 3490.
137. Endutkin A. V., Zharkov D.O. GO system: a DNA repair pathway to cope with oxidative damage // *Mol. Biol. (Mosk).* – 2021. – V. 55. – No. 2. – P.223–242.
138. Bulychev N. V., Varaprasad C. V., Dormán G., Miller J.H., Eisenberg M., Grollman A.P., Johnson F. Substrate specificity of *Escherichia coli* MutY protein // *Biochemistry.* – 1996. – V. 35. – No. 40. – P.13147–13156.
139. Porello S.L., Leyes A.E., David S.S. Single-turnover and pre-steady-state kinetics of the reaction of the adenine glycosylase MutY with mismatch-containing DNA substrates // *Biochemistry.* – 1998. – V. 37. – No. 42. – P.14756–14764.
140. McGoldrick J.P., Yeh Y.-C., Solomon M., Essigmann J.M., Lu A.-L. Characterization of a mammalian homolog of the *Escherichia coli* MutY mismatch repair protein // *Mol. Cell. Biol.* – 1995. – V. 15. – No. 2. – P.989–996.
141. Slupska M.M., Baikalov C., Luther W.M., Chiang J.H., Wei Y.F., Miller J.H. Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the *Escherichia coli* mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage // *J. Bacteriol.* – 1996. – V. 178. – No. 13. – P.3885–3892.
142. Yamaguchi S., Shinmura K., Saitoh T., Takenoshita S., Kuwano H., Yokota J. A single nucleotide polymorphism at the splice donor site of the human MYH base excision repair gene results in reduced translation efficiency of its transcripts // *Genes to Cells.* – 2002. – V. 7. – No. 5. – P.461–474.
143. De Belle I., Wu J.X., Sperandio S., Mercola D., Adamson E.D. In vivo cloning and characterization of a new growth suppressor protein TOE1 as a direct target gene of Egr1 // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – No. 16. – P.14306–14312.
144. Parker A., Gu Y., Mahoney W., Lee S.H., Singh K.K., Lu A.L. Human homolog of the MutY repair protein (hMYH) physically interacts with proteins involved in long patch DNA base excision repair // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – No. 8. – P.5547–5555.
145. Takao M., Zhang Q.M., Yonei S., Yasui A. Differential subcellular localization of human MutY homolog (hMYH) and the functional activity of adenine:8-oxoguanine DNA glycosylase // *Nucleic Acids Res.* – 1999. – V. 27. – No. 18. – P.3638–3644.
146. Ohtsubo T., Nishioka K., Imaiso Y., Iwai S., Shimokawa H., Oda H., Fujiwara T., Nakabeppu Y. Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria // *Nucleic Acids Res.* – 2000. – V. 28. – No. 6. – P.1355–1364.
147. Chmiel N.H., Livingston A.L., David S.S. Insight into the functional consequences of inherited variants of the hMYH adenine glycosylase associated with colorectal cancer: Complementation assays with hMYH variants and pre-steady-state kinetics of the corresponding mutated *E. coli* enzymes // *J. Mol. Biol.* – 2003. – V. 327. – No. 2. – P.431–443.
148. Yang H., Clendenin W.M., Wong D., Demple B., Slupska M.M., Chiang J.H., Miller J.H. Enhanced activity of adenine-DNA glycosylase (Myh) by apurinic/apyrimidinic endonuclease (Ape1) in mammalian base excision repair of an A/GO mismatch // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29. – No. 3. – P.743–752.
149. Pope M.A., Chmiel N.H., David S.S. Insight into the functional consequences of hMYH variants associated with colorectal cancer: distinct differences in the adenine glycosylase activity and the response to AP endonucleases of Y150C and G365D murine MYH // *DNA Repair.* – 2005. – V. 4. – No. 3. – P.315–325.
150. Luncsford P.J., Manvilla B.A., Patterson D.N., Malik S.S., Jin J., Hwang B.J., Gunther R., Kalvakolanu S., Lipinski L.J., Yuan W., Lu W., Drohat A.C., Lu A.L., Toth E.A. Coordination of MYH DNA glycosylase

- and APE1 endonuclease activities via physical interactions // *DNA Repair*. – 2013. – V. 12. – No. 12. – P.1043–1052.
151. Luncsford P.J., Chang D.Y., Shi G., Bernstein J., Madabushi A., Patterson D.N., Lu A.L., Toth E.A. A structural hinge in eukaryotic MutY homologues mediates catalytic activity and Rad9-Rad1-Hus1 checkpoint complex interactions // *J. Mol. Biol.* – 2010. – V. 403. – No. 3. – P.351–370.
 152. Al-Tassan N., Chmiel N.H., Maynard J., Fleming N., Livingston A.L., Williams G.T., Hodges A.K., Davies D.R., David S.S., Sampson J.R., Cheadle J.P. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors // *Nat. Genet.* – 2002. – V. 30. – No. 2. – P.227–232.
 153. Sieber O.M., Lipton L., Crabtree M., Heinemann K., Fidalgo P., Phillips R.K.S., Bisgaard M.-L., Orntoft T.F., Aaltonen L.A., Hodgson S. V., Thomas H.J.W., Tomlinson I.P.M. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH // *N. Engl. J. Med.* – 2003. – V. 348. – No. 9. – P.791–799.
 154. Parker A.R., Sieber O.M., Shi C., Hua L., Takao M., Tomlinson I.P., Eshleman J.R. Cells with pathogenic biallelic mutations in the human MUTYH gene are defective in DNA damage binding and repair // *Carcinogenesis*. – 2005. – V. 26. – No. 11. – P.2010–2018.
 155. Ruggieri V., Pin E., Russo M.T., Barone F., Degan P., Sanchez M., Quaia M., Minoprio A., Turco E., Mazzei F., Viel A., Bignami M. Loss of MUTYH function in human cells leads to accumulation of oxidative damage and genetic instability // *Oncogene*. – 2013. – V. 32. – No. 38. – P.4500–4508.
 156. Hirano S., Tominaga Y., Ichinoe A., Ushijima Y., Tsuchimoto D., Honda-Ohnishi Y., Ohtsubo T., Sakumi K., Nakabeppu Y. Mutator phenotype of MUTYH-null mouse embryonic stem cells // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – No. 40. – P.38121–38124.
 157. Russo M.T., De Luca G., Degan P., Parlanti E., Dogliotti E., Barnes D.E., Lindahl T., Yang H., Miller J.H., Bignami M. Accumulation of the oxidative base lesion 8-hydroxyguanine in DNA of tumor-prone mice defective in both the Myh and Ogg1 DNA glycosylases // *Cancer Res.* – 2004. – V. 64. – No. 13. – P.4411–4414.
 158. Sakamoto K., Tominaga Y., Yamauchi K., Nakatsu Y., Sakumi K., Yoshiyama K., Egashira A., Kura S., Yao T., Tsuneyoshi M., Maki H., Nakabeppu Y., Tsuzuki T. MUTYH-null mice are susceptible to spontaneous and oxidative stress-induced intestinal tumorigenesis // *Cancer Res.* – 2007. – V. 67. – No. 14. – P.6599–6604.
 159. Xie Y., Yang H., Miller J.H., Shih D.M., Hicks G.G., Xie J., Shiu R.P. Cells deficient in oxidative DNA damage repair genes Myh and Ogg1 are sensitive to oxidants with increased G2/M arrest and multinucleation // *Carcinogenesis*. – 2008. – V. 29. – No. 4. – P.722–728.
 160. Molatore S., Russo M.T., D’Agostino V.G., Barone F., Matsumoto Y., Albertini A.M., Minoprio A., Degan P., Mazzei F., Bignami M., Ranzani G.N. MUTYH mutations associated with familial adenomatous polyposis: functional characterization by a mammalian cell-based assay // *Hum. Mutat.* – 2010. – V. 31. – No. 2. – P.159–166.
 161. Sakurada A., Miyanishi K., Tanaka S., Sato M., Sakamoto H., Kawano Y., Takada K., Nakabeppu Y., Kobune M., Kato J. An intronic single nucleotide polymorphism in the MUTYH gene is associated with increased risk for HCV-induced hepatocellular carcinoma // *Free Radic. Biol. Med.* – 2018. – V. 129. – No. 12. – P.88–96.
 162. Sakamoto H., Miyanishi K., Tanaka S., Ito R., Hamaguchi K., Sakurada A., Sato M., Kubo T., Osuga T., Murase K., Takada K., Nakabeppu Y., Kobune M., Kato J. MUTYH is associated with hepatocarcinogenesis in a non-alcoholic steatohepatitis mouse model // *Sci. Rep.* – 2021. – V. 11. – Article No. 3599.
 163. Chen J., Huang Z., Wu X., Kang J., Ren Y., Gao W., Lu X., Wang J., Ding W., Nakabeppu Y., Fan Y., Wang Y. Oxidative stress induces different tissue dependent effects on Mutyh-deficient mice // *Free Radic.*

164. Mizuno Y., Abolhassani N., Mazzei G., Sakumi K., Saito T., Saido T.C., Ninomiya T., Iwaki T., Yamasaki R., Kira J.I., Nakabeppu Y. MUTYH actively contributes to microglial activation and impaired neurogenesis in the pathogenesis of Alzheimer's disease // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2021. – V. 2021. – Article No. 8635088.
165. Sun Q., Chen J., Xu L., Kang J., Wu X., Ren Y., Nakabeppu Y., Wang Y. MUTYH deficiency is associated with attenuated pulmonary fibrosis in a bleomycin-induced model // *Oxid. Med. Cell. Longev.* – 2020. – V. 2020. – Article No. 4828256.
166. van den Boogaard M.L., Oka R., Hakkert A., Schild L., Ebus M.E., van Gerven M.R., Zwijnenburg D.A., Molenaar P., Hoyng L.L., Dolman E.M.M., Essing A.H.W., Koopmans B., Helleday T., Drost J., van Boxtel R., Versteeg R., Koster J., Molenaar J.J. Defects in 8-oxo-guanine repair pathway cause high frequency of C > A substitutions in neuroblastoma // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2021. – V. 118. – No. 36. – P.1–9.
167. Gupta A., Hwang B.-J., Benyamien-Roufaeil D., Jain S., Liu S., Gonzales R., Brown R.A., Zalzman M., Lu A.-L. Mammalian MutY homolog (MYH or MUTYH) is critical for telomere integrity under oxidative stress // *OBM Geriatr.* – 2022. – V. 6. – No. 2. – Article No. 196.
168. Kaina B., Ochs K., Grösch S., Frizz G., Lips J., Tomicic M., Dunkern T., Christmann M. BER, MGMT, and MMR in defense against alkylation-induced genotoxicity and apoptosis // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 2001. – V. 68. – P.41–54.
169. Kaplanis J., Ide B., Sanghvi R., Neville M., Danecek P., Coorens T., Prigmore E., Short P., Gallone G., McRae J., Moutsianas L., Odhams C., Carmichael J., Barnicoat A., Firth H., O'Brien P., Rahbari R., Hurles M. Genetic and chemotherapeutic influences on germline hypermutation // *Nature.* – 2022. – V. 605. – No. 7910. – P.503–508.
170. Forbes S.A., Beare D., Boutselakis H., Bamford S., Bindal N., Tate J., Cole C.G., Ward S., Dawson E., Ponting L., Stefancsik R., Harsha B., YinKok C., Jia M., Jubb H., Sondka Z., Thompson S., De T., Campbell P.J. COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45. – No. D1. – P.D777–D783.
171. Hang B., Singer B., Margison G.P., Elder R.H. Targeted deletion of alkylpurine-DNA-N-glycosylase in mice eliminates repair of 1,N6-ethenoadenine and hypoxanthine but not of 3,N4-ethenocytosine or 8-oxoguanine // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1997. – V. 94. – No. 24. – P.12869–12874.
172. Engelward B.P., Weeda G., Wyatt M.D., Broekhof J.L.M., De Wit J., Donker I., Allan J.M., Gold B., Hoeijmakers J.H.J., Samson L.D. Base excision repair deficient mice lacking the Aag alkyladenine DNA glycosylase // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1997. – V. 94. – No. 24. – P.13087–13092.
173. Engelward B.P., Dreslin A., Christensen J., Huszar D., Kurahara C., Samson L. Repair-deficient 3-methyladenine DNA glycosylase homozygous mutant mouse cells have increased sensitivity to alkylation-induced chromosome damage and cell killing // *EMBO J.* – 1996. – V. 15. – No. 4. – P.945–952.
174. Roth R.B., Samson L.D. 3-Methyladenine DNA glycosylase-deficient Aag null mice display unexpected bone marrow alkylation resistance // *Cancer Res.* – 2002. – V. 62. – No. 3. – P.656–660.
175. Meira L.B., Moroski-Erkul C.A., Green S.L., Calvo J.A., Bronson R.T., Shah D., Samson L.D. Aag-initiated base excision repair drives alkylation-induced retinal degeneration in mice // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2009. – V. 106. – No. 3. – P.888–893.
176. Margulies C.M., Chaim I.A., Mazumder A., Criscione J., Samson L.D. Alkylation induced cerebellar degeneration dependent on Aag and Parp1 does not occur via previously established cell death mechanisms // *PLoS One.* – 2017. – V. 12. – No. 9. – P.1–19.
177. Allocca M., Corrigan J.J., Mazumder A., Fake K.R., Samson L.D. Inflammation, necrosis, and the kinase RIP3 are key mediators of AAG-dependent alkylation-induced retinal degeneration // *Sci. Signal.* – 2019.

– V. 12. – No. 568. – Article No. 9216.

178. Tang S., Stokasimov E., Cui Y., Pellman D. Breakage of cytoplasmic chromosomes by pathological DNA base excision repair // *Nature*. – 2022. – V. 606. – No. 7916. – P.930–936.
179. Kay J.E., Corrigan J.J., Armijo A.L., Nazari I.S., Kohale I.N., Torous D.K., Avlasevich S.L., Croy R.G., Wadduwage D.N., Carrasco S.E., Dertinger S.D., White F.M., Essigmann J.M., Samson L.D., Engelward B.P. Excision of mutagenic replication-blocking lesions suppresses cancer but promotes cytotoxicity and lethality in nitrosamine-exposed mice // *Cell Rep*. – 2021. – V. 34. – No. 11. – Article No. 108864.
180. Grin I.R., Zharkov D.O. Eukaryotic endonuclease VIII-Like proteins: new components of the base excision DNA repair system // *Biochem*. – 2011. – V. 76. – P.80–93.
181. Fleming A.M., Burrows C.J. Formation and processing of DNA damage substrates for the hNEIL enzymes // *Free Radic. Biol. Med*. – 2017. – V. 107. – P.35–52.
182. Couvé-Privat S., Macé G., Rosselli F., Saparbaev M.K. Psoralen-induced DNA adducts are substrates for the base excision repair pathway in human cells // *Nucleic Acids Res*. – 2007. – V. 35. – No. 17. – P.5672–5682.
183. Talhaoui I., Shafirovich V., Liu Z., Saint-Pierre C., Akishev Z., Matkarimov B.T., Gasparutto D., Geacintov N.E., Saparbaev M. Oxidatively generated guanine(C8)-Thymine(N3) intrastrand cross-links in double-stranded DNA are repaired by base excision repair pathways // *J. Biol. Chem*. – 2015. – V. 290. – No. 23. – P.14610–14617.
184. Martin P.R., Couvé S., Zutterling C., Albelazi M.S., Groisman R., Matkarimov B.T., Parsons J.L., Elder R.H., Saparbaev M.K. The human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL3 excise psoralen-induced DNA-DNA cross-links in a four-stranded DNA structure // *Sci. Rep*. – 2017. – V. 7. – Article No. 17438.
185. Chaisaingmongkol J., Popanda O., Warta R., Dyckhoff G., Herpel E., Geiselhart L., Claus R., Lasitschka F., Campos B., Oakes C.C., Bermejo J.L., Herold-Mende C., Plass C., Schmezer P. Epigenetic screen of human DNA repair genes identifies aberrant promoter methylation of NEIL1 in head and neck squamous cell carcinoma // *Oncogene*. – 2012. – V. 31. – No. 49. – P.5108–5116.
186. Do H., Wong N.C., Murone C., John T., Solomon B., Mitchell P.L., Dobrovic A. A critical re-assessment of DNA repair gene promoter methylation in non-small cell lung carcinoma // *Sci. Rep*. – 2014. – V. 4. – No. 2. – P.1–8.
187. Farkas S.A., Vymetalkova V., Vodickova L., Vodicka P., Nilsson T.K. DNA methylation changes in genes frequently mutated in sporadic colorectal cancer and in the DNA repair and Wnt/ β -catenin signaling pathway genes // *Epigenomics*. – 2014. – V. 6. – No. 2. – P.179–191.
188. Vartanian V., Lowell B., Minko I.G., Wood T.G., Ceci J.D., George S., Ballinger S.W., Corless C.L., McCullough A.K., Lloyd R.S. The metabolic syndrome resulting from a knockout of the NEIL1 DNA glycosylase // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 2006. – V. 103. – No. 6. – P.1864–1869.
189. Sampath H., Batra A.K., Vartanian V., Carmical J.R., Prusak D., King I.B., Lowell B., Earley L.F., Wood T.G., Marks D.L., McCullough A.K., R. Stephen L. Variable penetrance of metabolic phenotypes and development of high-fat diet-induced adiposity in NEIL1-deficient mice // *AJP Endocrinol. Metab*. – 2011. – V. 300. – No. 4. – P.E724–E734.
190. Jaruga P., Xiao Y., Vartanian V., Lloyd R.S., Dizdaroglu M. Evidence for the involvement of DNA repair enzyme NEIL1 in nucleotide excision repair of (5'R)- and (5'S)-8,5'-Cyclo-2'- deoxyadenosines // *Biochemistry*. – 2010. – V. 49. – No. 6. – P.1053–1055.
191. Vartanian V., Minko I.G., Chawanthayatham S., Egner P.A., Lin Y.-C., Earley L.F., Makar R., Eng J.R., Camp M.T., Li L., Stone M.P., Lasarev M.R., Groopman J.D., Croy R.G., Essigmann J.M., McCullough A.K., Lloyd R.S. NEIL1 protects against aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma in mice // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 2017. – V. 114. – No. 16. – P.4207–4212.

192. Mori H., Ouchida R., Hijikata A., Kitamura H., Ohara O., Li Y., Gao X., Yasui A., Lloyd R.S., Wang J.Y. Deficiency of the oxidative damage-specific DNA glycosylase NEIL1 leads to reduced germinal center B cell expansion // *DNA Repair*. – 2009. – V. 8. – No. 11. – P.1328–1332.
193. Canugovi C., Yoon J.S., Feldman N.H., Croteau D.L., Mattson M.P., Bohr V.A. Endonuclease VIII-like 1 (NEIL1) promotes short-term spatial memory retention and protects from ischemic stroke-induced brain dysfunction and death in mice // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 2012. – V. 109. – No. 37. – P.14948–14953.
194. Canugovi C., Misiak M., Scheibye-Knudsen M., Croteau D.L., Mattson M.P., Bohr V.A. Loss of NEIL1 causes defects in olfactory function in mice // *Neurobiol. Aging*. – 2015. – V. 36. – No. 2. – P.1007–1012.
195. Yang B., Figueroa D.M., Hou Y., Babbar M., Baringer S.L., Croteau D.L., Bohr V.A. NEIL1 stimulates neurogenesis and suppresses neuroinflammation after stress // *Free Radic. Biol. Med.* – 2019. – V. 141. – No. 9. – P.47–58.
196. Hildrestrand G.A., Rolseth V., Kunath N., Suganthan R., Jensen V., Bugaj A.M., Fernandez-Berrocal M.S., Sikko S.B., Vetlesen S., Kuśnierczyk A., Olsen A.K., Gützkow K.B., Rowe A.D., Wang W., Moldestad O., Syrstad M.D., Slupphaug G., Eide L., Klungland A., et al. NEIL1 and NEIL2 DNA glycosylases modulate anxiety and learning in a cooperative manner in mice // *Commun. Biol.* – 2021. – V. 4. – Article No. 1354.
197. Rosenquist T.A., Zaika E., Fernandes A.S., Zharkov D.O., Miller H., Grollman A.P. The novel DNA glycosylase, NEIL1, protects mammalian cells from radiation-mediated cell death // *DNA Repair*. – 2003. – V. 2. – No. 5. – P.581–591.
198. Carmell M.A., Zhang L., Conklin D.S., Hannon G.J., Rosenquist T.A. Germline transmission of RNAi in mice // *Nat. Struct. Biol.* – 2003. – V. 10. – No. 2. – P.91–92.
199. Hooten N.N., Fitzpatrick M., Kompaniez K., Jacob K.D., Moore B.R., Nagle J., Barnes J., Lohani A., Evans M.K. Coordination of DNA repair by NEIL1 and PARP-1: a possible link to aging // *Aging*. – 2012. – V. 4. – No. 10. – P.674–685.
200. Zou X., Owusu M., Harris R., Jackson S.P., Loizou J.I., Nik-Zainal S. Validating the concept of mutational signatures with isogenic cell models // *Nat. Commun.* – 2018. – V. 9. – Article No. 1744.
201. Dou H., Mitra S., Hazra T.K. Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2 // *J. Biol. Chem.* – 2003. – V. 278. – No. 50. – P.49679–49684.
202. Chakraborty A., Wakamiya M., Venkova-Canova T., Pandita R.K., Aguilera-Aguirre L., Sarker A.H., Singh D.K., Hosoki K., Wood T.G., Sharma G., Cardenas V., Sarker P.S., Sur S., Pandita T.K., Boldogh I., Hazra T.K. Neil2-null mice accumulate oxidized DNA bases in the transcriptionally active sequences of the genome and are susceptible to innate inflammation // *J. Biol. Chem.* – 2015. – V. 290. – No. 41. – P.24636–24648.
203. Han D., Schomacher L., Schüle K.M., Mallick M., Musheev M.U., Karaulanov E., Krebs L., Von Seggern A., Niehrs C. NEIL1 and NEIL2 DNA glycosylases protect neural crest development against mitochondrial oxidative stress // *Elife*. – 2019. – V. 8. – No. 9. – P.1–38.
204. Aliyaskarova U., Baiken Y., Renaud F., Couve S., Kisselev A.F., Saparbaev M., Groisman R. NEIL3-mediated proteasomal degradation facilitates the repair of cisplatin-induced DNA damage in human cells // *Sci. Rep.* – 2023. – V. 13. – Article No. 5174.
205. Li N., Wang J., Wallace S.S., Chen J., Zhou J., D’Andrea A.D. Cooperation of the NEIL3 and Fanconi anemia/BRCA pathways in interstrand crosslink repair // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – V. 48. – No. 6. – P.3014–3028.
206. Liu M., Doublé S., Wallace S.S. Neil3, the final frontier for the DNA glycosylases that recognize oxidative damage // *Mutat. Res.* – 2013. – V. 743–744. – P.4–11.
207. Massaad M.J., Zhou J., Tsuchimoto D., Chou J., Jabara H., Janssen E., Glauzy S., Olson B.G., Morbach H.,

- Ohsumi T.K., Schmitz K., Kyriacos M., Kane J., Torisu K., Nakabeppu Y., Notarangelo L.D., Chouery E., Megarbane A., Kang P.B., et al. Deficiency of base excision repair enzyme NEIL3 drives increased predisposition to autoimmunity // *J. Clin. Invest.* – 2016. – V. 126. – No. 11. – P.4219–4236.
208. Torisu K., Tsuchimoto D., Ohnishi Y., Nakabeppu Y. Hematopoietic tissue-specific expression of mouse Neil3 for endonuclease VIII-like protein // *J. Biochem.* – 2005. – V. 138. – No. 6. – P.763–772.
209. Sejersted Y., Hildrestrand G.A., Kunke D., Rolseth V., Krokeide S.Z., Neurauter C.G., Suganthan R., Atneosen-Åsegg M., Fleming A.M., Saugstad O.D., Burrows C.J., Luna L., Bjørås M. Endonuclease VIII-like 3 (Neil3) DNA glycosylase promotes neurogenesis induced by hypoxia-ischemia // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2011. – V. 108. – No. 46. – P.18802–18807.
210. Regnell C.E., Hildrestrand G.A., Sejersted Y., Medin T., Moldestad O., Rolseth V., Krokeide S.Z., Suganthan R., Luna L., Bjørås M., Bergersen L.H. Hippocampal adult neurogenesis is maintained by Neil3-dependent repair of oxidative DNA lesions in neural progenitor cells // *Cell Rep.* – 2012. – V. 2. – No. 3. – P.503–510.
211. Rolseth V., Krokeide S.Z., Kunke D., Neurauter C.G., Suganthan R., Sejersted Y., Hildrestrand G.A., Bjørås M., Luna L. Loss of Neil3, the major DNA glycosylase activity for removal of hydantoins in single stranded DNA, Reduces cellular proliferation and sensitizes cells to genotoxic stress // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2013. – V. 1833. – No. 5. – P.1157–1164.
212. Kunath N., Bugaj A.M., Bigonah P., Fernandez-Berrocal M.S., Bjørås M., Ye J. DNA repair enzyme NEIL3 enables a stable neural representation of space by shaping transcription in hippocampal neurons // *iScience.* – 2021. – V. 24. – No. 12. – Article No. 103470.
213. Demple B., Herman T., Chen D.S. Cloning and expression of APE, the cDNA encoding the major human apurinic endonuclease: definition of a family of DNA repair enzymes // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1991. – V. 88. – No. 24. – P.11450–11454.
214. Robson C.N., Hickson I.D. Isolation of cDNA clones encoding a human apurinic/aprimidinic endonuclease that corrects DNA repair and mutagenesis defects in *E. coli* xth (exonuclease III) mutants. // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – V. 19. – No. 20. – P.5519–5523.
215. Cheng X., Bunville J., Patterson T.A. Nucleotide sequence of a cDNA for an apurinic/aprimidinic endonuclease from HeLa cells // *Nucleic Acids Res.* – 1992. – V. 20. – No. 2. – Article No. 370.
216. Dlakić M. Functionally unrelated signalling proteins contain a fold similar to Mg²⁺-dependent endonucleases // *Trends Biochem. Sci.* – 2000. – V. 25. – No. 6. – P.272–273.
217. Miroshnikova A.D., Kuznetsova A.A., Vorobjev Y.N., Kuznetsov N.A., Fedorova O.S. Effects of mono- and divalent metal ions on DNA binding and catalysis of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 // *Mol. Biosyst.* – 2016. – V. 12. – No. 5. – P.1527–1539.
218. Wilson D.M., Takeshita M., Grollman A.P., Demple B. Incision activity of human apurinic endonuclease (Ape) at abasic site analogs in DNA // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – No. 27. – P.16002–16007.
219. Seki S., Akiyama K., Watanabe S., Hatsushika M., Ikeda S., Tsutsui K. cDNA and deduced amino acid sequence of a mouse DNA repair enzyme (APEX nuclease) with significant homology to *Escherichia coli* exonuclease III // *J. Biol. Chem.* – 1991. – V. 266. – No. 31. – P.20797–20802.
220. Hill J.W., Hazra T.K., Izumi T., Mitra S. Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29. – No. 2. – P.430–438.
221. Vidal A.E., Hickson I.D., Boiteux S., Radicella J.P. Mechanism of stimulation of the DNA glycosylase activity of hOGG1 by the major human AP endonuclease: bypass of the AP lyase activity step // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29. – No. 6. – P.1285–1292.
222. Sidorenko V.S., Nevinsky G.A., Zharkov D.O. Mechanism of interaction between human 8-oxoguanine-

- DNA glycosylase and AP endonuclease // DNA Repair. – 2007. – V. 6. – No. 3. – P.317–328.
223. Kuznetsova A.A., Kuznetsov N.A., Ishchenko A.A., Saparbaev M.K., Fedorova O.S. Pre-steady-state fluorescence analysis of damaged DNA transfer from human DNA glycosylases to AP endonuclease APE1 // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – V. 1840. – No. 10. – P.3042–3051.
224. Esadze A., Rodriguez G., Cravens S.L., Stivers J.T. AP-endonuclease 1 accelerates turnover of human 8-oxoguanine DNA glycosylase by preventing retrograde binding to the abasic-site product // Biochemistry. – 2017. – V. 56. – No. 14. – P.1974–1986.
225. Parikh S.S., Mol C.D., Slupphaug G., Bharati S., Krokan H.E., Tainer J.A. Base excision repair initiation revealed by crystal structures and binding kinetics of human uracil-DNA glycosylase with DNA // EMBO J. – 1998. – V. 17. – No. 17. – P.5214–5226.
226. Bharati S., Krokan H.E., Kristiansen L., Otterlei M., Slupphaug G. Human mitochondrial uracil-DNA glycosylase preform (UNG1) is processed to two forms one of which is resistant to inhibition by AP sites // Nucleic Acids Res. – 1998. – V. 26. – No. 21. – P.4953–4959.
227. Waters T.R., Gallinari P., Jiricnyl J., Swann P.F. Human thymine DNA glycosylase binds to apurinic sites in DNA but is displaced by human apurinic endonuclease 1 // J. Biol. Chem. – 1999. – V. 274. – No. 1. – P.67–74.
228. Fitzgerald M.E., Drohat A.C. Coordinating the initial steps of base excision repair: apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 actively stimulates thymine DNA glycosylase by disrupting the product complex // J. Biol. Chem. – 2008. – V. 283. – No. 47. – P.32680–32690.
229. Xia L., Zheng L., Lee H.W., Bates S.E., Federico L., Shen B., O'Connor T.R. Human 3-methyladenine-DNA glycosylase: effect of sequence context on excision, association with PCNA, and stimulation by AP endonuclease // J. Mol. Biol. – 2005. – V. 346. – No. 5. – P.1259–1274.
230. Baldwin M.R., O'Brien P.J. Human AP endonuclease 1 stimulates multiple-turnover base excision by alkyladenine DNA glycosylase // Biochemistry. – 2009. – V. 48. – No. 25. – P.6022–6033.
231. Marenstein D.R., Chan M.K., Altamirano A., Basu A.K., Boorstein R.J., Cunningham R.P., Teebor G.W. Substrate specificity of human endonuclease III (hNTH1). Effect of human APE1 on hNTH1 activity // J. Biol. Chem. – 2003. – V. 278. – No. 11. – P.9005–9012.
232. Luncsford P.J., Manvilla B.A., Patterson D.N., Malik S.S., Jin J., Hwang B.J., Gunther R., Kalvakolanu S., Lipinski L.J., Yuan W., Lu W., Drohat A.C., Lu A.L., Toth E.A. Coordination of MYH DNA glycosylase and APE1 endonuclease activities via physical interactions // DNA Repair. – 2013. – V. 12. – No. 12. – P.1043–1052.
233. Bennett R.A.O., Wilson D.M., Wong D., Demple B. Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase β in the base excision repair pathway // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. – V. 94. – No. 14. – P.7166–7169.
234. Vidal A.E., Boiteux S., Hickson I.D., Radicella J.P. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions // EMBO J. – 2001. – V. 20. – No. 22. – P.6530–6539.
235. Moor N.A., Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O., Antson A.A., Lavrik O.I. Quantitative characterization of protein-protein complexes involved in base excision DNA repair // Nucleic Acids Res. – 2015. – V. 43. – No. 12. – P.6009–6022.
236. Xanthoudakis S., Miao G., Wang F., Pan Y.C., Curran T. Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme // EMBO J. – 1992. – V. 11. – No. 9. – P.3323–3335.
237. Xanthoudakis S., Miao G.G., Curran T. The redox and DNA-repair activities of Ref-1 are encoded by nonoverlapping domains // Proc. Natl Acad. Sci. USA. – 1994. – V. 91. – No. 1. – P.23–27.

238. Popov A. V., Grin I.R., Dvornikova A.P., Matkarimov B.T., Groisman R., Saparbaev M., Zharkov D.O. Reading targeted DNA damage in the active demethylation pathway: role of accessory domains of eukaryotic AP endonucleases and thymine-DNA glycosylases // *J. Mol. Biol.* – 2020. – V. 432. – No. 6. – P.1747–1768.
239. Chou K.M., Cheng Y.C. An exonucleolytic activity of human apurinic/apyrimidinic endonuclease on 3' mispaired DNA // *Nature.* – 2002. – V. 415. – No. 6872. – P.655–659.
240. Lam W., Park S.-Y., Leung C.-H., Cheng Y.-C. Apurinic/apyrimidinic endonuclease-1 protein level is associated with the cytotoxicity of L-configuration deoxycytidine analogs (troxacitabine and beta-L-2',3'-dideoxy-2',3'-didehydro-5-fluorocytidine) but not D-configuration deoxycytidine analogs (gemcit // *Mol. Pharmacol.* – 2006. – V. 69. – No. 5. – P.1607–1614.
241. Hajkova P., Jeffries S.J., Lee C., Miller N., Jackson S.P., Surani M.A. Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway // *Science.* – 2010. – V. 329. – No. 5987. – P.78–82.
242. Weber A.R., Krawczyk C., Robertson A.B., Kusnierczyk A., Vågbø C.B., Schuermann D., Klungland A., Schar P. Biochemical reconstitution of TET1-TDG-BER-dependent active DNA demethylation reveals a highly coordinated mechanism // *Nat. Commun.* – 2016. – V. 7. – Article No. 10806.
243. Yamamori T., DeRicco J., Naqvi A., Hoffman T.A., Mattagajasingh I., Kasuno K., Jung S.B., Kim C.S., Irani K. SIRT1 deacetylates APE1 and regulates cellular base excision repair // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – V. 38. – No. 3. – P.832–845.
244. Hwang B.J., Jin J., Gao Y., Shi G., Madabushi A., Yan A., Guan X., Zalzman M., Nakajima S., Lan L., Lu A.L. SIRT6 protein deacetylase interacts with MYH DNA glycosylase, APE1 endonuclease, and Rad9-Rad1-Hus1 checkpoint clamp // *BMC Mol. Biol.* – 2015. – V. 16. – Article No. 12.
245. Madlener S., Ströbel T., Vose S., Saydam O., Price B.D., Demple B., Saydam N. Essential role for mammalian apurinic/apyrimidinic (AP) endonuclease Ape1/Ref-1 in telomere maintenance // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2013. – V. 110. – No. 44. – P.17844–17849.
246. Li M., Yang X., Lu X., Dai N., Zhang S., Cheng Y., Zhang L., Yang Y., Liu Y., Yang Z., Wang D., Wilson D.M. APE1 deficiency promotes cellular senescence and premature aging features // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – V. 46. – No. 11. – P.5664–5677.
247. Vascotto C., Fantini D., Romanello M., Cesaratto L., Deganuto M., Leonardi A., Radicella J.P., Kelley M.R., D'Ambrosio C., Scaloni A., Quadrioglio F., Tell G. APE1/Ref-1 interacts with NPM1 within nucleoli and plays a role in the rRNA quality control process // *Mol. Cell. Biol.* – 2009. – V. 29. – No. 7. – P.1834–1854.
248. Malfatti M.C., Balachander S., Antoniali G., Koh K.D., Saint-Pierre C., Gasparutto D., Chon H., Crouch R.J., Storici F., Tell G. Abasic and oxidized ribonucleotides embedded in DNA are processed by human APE1 and not by RNase H2 // *Nucleic Acids Res.* – 2017. – V. 45. – No. 19. – P.11193–11212.
249. Barnes T., Kim W.C., Mantha A.K., Kim S.E., Izumi T., Mitra S., Lee C.H. Identification of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) as the endoribonuclease that cleaves c-myc mRNA // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – V. 37. – No. 12. – P.3946–3958.
250. Antoniali G., Serra F., Lirussi L., Tanaka M., D'Ambrosio C., Zhang S., Radovic S., Dalla E., Ciani Y., Scaloni A., Li M., Piazza S., Tell G. Mammalian APE1 controls miRNA processing and its interactome is linked to cancer RNA metabolism // *Nat. Commun.* – 2017. – V. 8. – Article No. 797.
251. Fan Z., Beresford P.J., Zhang D., Xu Z., Novina C.D., Yoshida A., Pommier Y., Lieberman J. Cleaving the oxidative repair protein Ape I enhances cell death mediated by granzyme A // *Nat. Immunol.* – 2003. – V. 4. – No. 2. – P.145–153.
252. Xanthoudakis S., Smeyne R.J., Wallace J.D., Curran T. The redox/DNA repair protein, Ref-1, is essential for early embryonic development in mice // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1996. – V. 93. – No. 8. – P.8919–

253. Ludwig D.L., MacInnes M.A., Takiguchi Y., Purtymun P.E., Henrie M., Flannery M., Meneses J., Pedersen R.A., Chen D.J. A murine AP-endonuclease gene-targeted deficiency with post-implantation embryonic progression and ionizing radiation sensitivity // *Mutat. Res.* – 1998. – V. 409. – No. 1. – P.17–29.
254. Meira L.B., Devaraj S., Kisby G.E., Burns D.K., Daniel R.L., Hammer R.E., Grundy S., Jialal I., Friedberg E.C. Heterozygosity for the mouse Apex gene results in phenotypes associated with oxidative stress // *Cancer Res.* – 2001. – V. 61. – No. 14. – P.5552–5557.
255. Wang Y., Shupenko C.C., Melo L.F., Strauss P.R. DNA repair protein involved in heart and blood development // *Mol. Cell. Biol.* – 2006. – V. 26. – No. 23. – P.9083–9093.
256. Dumitrache L.C., Shimada M., Downing S.M., Kwak Y.D., Li Y., Illuzzi J.L., Russell H.R., Wilson D.M., McKinnon P.J. Apurinic endonuclease-1 preserves neural genome integrity to maintain homeostasis and thermoregulation and prevent brain tumors // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2018. – V. 115. – No. 52. – P.E12285–E12294.
257. Zhu L., Hassan S.H., Gao X., Johnson J.Q., Wang Y., Bregy M.V., Wei Z., Chen J., Li P., Stetler R.A. Neuron-targeted knockout of APE1 forces premature cognitive impairment and synaptic dysfunction in adult mice // *Aging Dis.* – 2022. – V. 13. – No. 6. – P.1862–1874.
258. Stetler R.A., Gao Y., Leak R.K., Weng Z., Shi Y., Zhang L., Pu H. APE1 / Ref-1 facilitates recovery of gray and white matter and neurological function after mild stroke injury // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2016. – V. 113. – No. 25. – P.3558–3567.
259. Ordway J.M., Eberhart D., Curran T. Cysteine 64 of Ref-1 is not essential for redox regulation of AP-1 DNA binding // *Mol. Cell. Biol.* – 2003. – V. 23. – No. 12. – P.4257–4266.
260. Rios-Covian D., Butcher L.D., Ablack A.L., den Hartog G., Matsubara M.T., Ly H., Oates A.W., Xu G., Fisch K.M., Ahrens E.T., Toden S., Brown C.C., Kim K., Le D., Eckmann L., Dhar B., Izumi T., Ernst P.B., Crowe S.E. A novel hypomorphic Apex1 mouse model implicates apurinic/aprimidinic endonuclease 1 in oxidative DNA damage repair in gastric epithelial cells // *Antioxid. Redox Signal.* – 2023. – V. 38. – No. 1–3. – P.183–197.
261. Raffoul J.J., Cabelof D.C., Nakamura J., Meira L.B., Friedberg E.C., Heydari A.R. Apurinic/aprimidinic endonuclease (APE/REF-1) haploinsufficient mice display tissue-specific differences in DNA polymerase β -dependent base excision repair // *J. Biol. Chem.* – 2004. – V. 279. – No. 18. – P.18425–18433.
262. Huamani J., McMahan C.A., Herbert D.C., Reddick R., Mccarrey J.R., Macinnes M.I., Chen D.J., Walter C.A. Spontaneous mutagenesis is enhanced in Apex heterozygous mice // *Mol. Cell. Biol.* – 2004. – V. 24. – No. 18. – P.8145–8153.
263. Unnikrishnan A., Raffoul J.J., Patel H. V., Prychitko T.M., Anyangwe N., Meira L.B., Friedberg E.C., Cabelof D.C., Heydari A.R. Oxidative stress alters base excision repair pathway and increases apoptotic response in apurinic/aprimidinic endonuclease 1/redox factor-1 haploinsufficient mice // *Free Radic. Biol. Med.* – 2009. – V. 46. – No. 11. – P.1488–1499.
264. Vogel K.S., Perez M., Momand J.R., Acevedo-Torres K., Hildreth K., Garcia R.A., Torres-Ramos C.A., Ayala-Torres S., Prihoda T.J., McMahan C.A., Walter C.A. Age-related instability in spermatogenic cell nuclear and mitochondrial DNA obtained from Apex1 heterozygous mice // *Mol. Reprod. Dev.* – 2011. – V. 78. – No. 12. – P.906–919.
265. Ballista-Hernandez J., Martínez-ferrer M., Roman V., Torres C., Climent C., Maria M.S. Mitochondrial DNA integrity is maintained by APE1 in carcinogen-induced colorectal cancer // *Mol. Cancer Res.* – 2017. – V. 15. – No. 7. – P.831–842.
266. Meira L.B., Cheo D.L., Hammer R.E., Burns D.K., Reis A., Friedberg E.C. Genetic interaction between hap1/ref-1 and p53 // *Nat. Genet.* – 1997. – V. 17. – No. 2. – Article No. 145.

267. Cheo D.L., Meira L.B., Burns D.K., Reis A.M., Issac T., Friedberg E.C. Ultraviolet B radiation-induced skin cancer in mice defective in the Xpc, Trp53, and Apex (HAP1) genes: genotype-specific effects on cancer predisposition and pathology of tumors // *Cancer Res.* – 2000. – V. 60. – No. 6. – P.1580–1584.
268. Jeon B.H., Gupta G., Park Y.C., Qi B., Haile A., Khanday F.A., Liu Y.X., Kim J.M., Ozaki M., White A.R., Berkowitz D.E., Irani K. Apurinic/apyrmidinic endonuclease 1 regulates endothelial NO production and vascular tone // *Circ. Res.* – 2004. – V. 95. – No. 9. – P.902–910.
269. Basi D.L., Adhikari N., Mariash A., Li Q., Kao E., Mullegama S. V, Hall J.L., Ji H. Femoral artery neointimal hyperplasia is reduced after wire injury in Ref-1+/- mice // *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* – 2018. – V. 292. – No. 1. – P.516–521.
270. Jung S.B., Kim C.S., Kim Y.R., Naqvi A., Yamamori T., Kumar S., Kumar A., Irani K. Redox factor-1 activates endothelial SIRTUIN1 through reduction of conserved cysteine sulfhydryls in its deacetylase domain // *PLoS One.* – 2013. – V. 8. – No. 6. – Article No. 65415.
271. Masani S., Han L., Yu K. Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 is the essential nuclease during immunoglobulin class switch recombination // *Mol. Cell. Biol.* – 2013. – V. 33. – No. 7. – P.1468–1473.
272. Malfatti M.C., Gerratana L., Dalla E., Isola M., Damante G., Di Loreto C., Puglisi F., Tell G. APE1 and NPM1 protect cancer cells from platinum compounds cytotoxicity and their expression pattern has a prognostic value in TNBC // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* – 2019. – V. 38. – Article No. 309.
273. Chen T., Liu C., Lu H., Yin M., Shao C., Hu X., Wu J., Wang Y. The expression of APE1 in triple-negative breast cancer and its effect on drug sensitivity of olaparib // *Tumor Biol.* – 2017. – V. 39. – No. 10. – P.1–9.
274. Izumi T., Brown D.B., Naidu C. V, Bhakat K.K., Macinnes M.A., Saito H., Chen D.J., Mitra S. Two essential but distinct functions of the mammalian abasic endonuclease // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2005. – V. 102. – No. 16. – P.5739–5743.
275. Silber J.R., Bobola M.S., Blank A., Silber J.R., Bobola M.S., Blank A., Schoeler K.D., Haroldson P.D., Huynh M.B., Kolstoe D.D. The apurinic/apyrimidinic endonuclease activity of Ape1/ Ref-1 contributes to human glioma cell resistance to alkylating agents and is elevated by oxidative stress // *Clin. Cancer Res.* – 2002. – V. 8. – No. 9. – P.3008–3018.
276. Wang D., Luo M., Kelley M.R. Human apurinic endonuclease 1 (APE1) expression and prognostic significance in osteosarcoma: enhanced sensitivity of osteosarcoma to DNA damaging agents using silencing RNA APE1 expression inhibition // *Mol. Cancer Ther.* – 2004. – V. 3. – No. 6. – P.679–686.
277. Fung H., Demple B. Distinct roles of Ape1 protein in the repair of DNA damage induced by ionizing radiation or bleomycin // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286. – No. 7. – P.4968–4977.
278. Naidu M.D., Mason J.M., Pica R. V., Fung H., Peña L.A. Radiation resistance in glioma cells determined by DNA damage repair activity of Ape1/Ref-1 // *J. Radiat. Res.* – 2010. – V. 51. – No. 4. – P.393–404.
279. Tsuchimoto D., Sakai Y., Sakumi K., Nishioka K., Sasaki M., Fujiwara T., Nakabeppu Y. Human APE2 protein is mostly localized in the nuclei and to some extent in the mitochondria, while nuclear APE2 is partly associated with proliferating cell nuclear antigen // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29. – No. 11. – P.2349–2360.
280. Hadi M.Z., Ginalski K., Nguyen L.H., Wilson D.M. Determinants in nuclease specificity of Ape1 and Ape2, human homologues of Escherichia coli exonuclease III // *J. Mol. Biol.* – 2002. – V. 316. – No. 3. – P.853–866.
281. Burkovics P., Szukacsov V., Unk I., Haracska L. Human Ape2 protein has a 3'-5' exonuclease activity that acts preferentially on mismatched base pairs // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – V. 34. – No. 9. – P.2508–2515.
282. Burkovics P., Hajdú I., Szukacsov V., Unk I., Haracska L. Role of PCNA-dependent stimulation of 3'-

- phosphodiesterase and 3'-5' exonuclease activities of human Ape2 in repair of oxidative DNA damage // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – V. 37. – No. 13. – P.4247–4255.
283. Fleury H., MacEachern M.K., Stiefel C.M., Anand R., Sempeck C., Nebenfuehr B., Maurer-Alcalá K., Ball K., Proctor B., Belan O., Taylor E., Ortega R., Dodd B., Weatherly L., Dansoko D., Leung J.W., Boulton S.J., Arnoult N. The APE2 nuclease is essential for DNA double-strand break repair by microhomology-mediated end joining // *Mol. Cell.* – 2023. – V. 83. – No. 9. – P.1429-1445.e8.
284. Ide Y., Tsuchimoto D., Tominaga Y., Nakashima M., Watanabe T., Sakumi K., Ohno M., Nakabeppu Y. Growth retardation and dyslymphopoiesis accompanied by G2/M arrest in APEX2-null mice // *Blood.* – 2004. – V. 104. – No. 13. – P.4097–4103.
285. Bienstock R.J., Beard W.A., Wilson S.H. Phylogenetic analysis and evolutionary origins of DNA polymerase X-family members // *DNA Repair.* – 2014. – V. 22. – P.77–88.
286. Beard W.A., Wilson S.H. DNA polymerase beta and other gap-filling enzymes in mammalian base excision repair // *Enzym.* – 2019. – V. 45. – P.1–26.
287. Beard W.A. DNA polymerase β : closing the gap between structure and function // *DNA Repair.* – 2020. – V. 93. – Article No. 102910.
288. Prasad R., Beard W.A., Wilson S.H. Studies of gapped DNA substrate binding by mammalian DNA polymerase β . Dependence of 5'-phosphate group // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – No. 27. – P.18096–18101.
289. Kumar A., Reed A.J., Zahurancik W.J., Daskalova S.M., Hecht S.M., Suo Z. Interlocking activities of DNA polymerase β in the base excision repair pathway // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2022. – V. 119. – No. 10. – Article No. e2118940119.
290. Kubota Y., Nash R.A., Klungland A., Schar P., Barnes D.E., Lindahl T. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified proteins: interaction between DNA polymerase β and the XRCC1 protein // *EMBO J.* – 1996. – V. 15. – No. 23. – P.6662–6670.
291. Bhattacharyya N., Banerjee S. A novel role of XRCC1 in the functions of a DNA polymerase β variant // *Biochemistry.* – 2001. – V. 40. – No. 30. – P.9005–9013.
292. Kedar P.S., Kim S.J., Robertson A., Hou E., Prasad R., Horton J.K., Wilson S.H. Direct interaction between mammalian DNA polymerase β and proliferating cell nuclear antigen // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – No. 34. – P.31115–31123.
293. Toueille M., El-Andaloussi N., Fouin I., Freire R., Funk D., Shevelev I., Friedrich-Heineken E., Villani G., Hottiger M.O., Hübscher U. The human Rad9/Rad1/Hus1 damage sensor clamp interacts with DNA polymerase β and increases its DNA substrate utilisation efficiency: implications for DNA repair // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32. – No. 11. – P.3316–3324.
294. Belousova E.A., Lavrik O.I. DNA polymerases β and λ and their roles in cell // *DNA Repair.* – 2015. – V. 29. – No. 5. – P.112–126.
295. Mentegari E., Kissova M., Bavagnoli L., Maga G., Crespan E. DNA polymerases λ and β : the double-edged swords of DNA repair // *Genes.* – 2016. – V. 7. – No. 9. – Article No. 57.
296. Starcevic D., Dalal S., Sweasy J.B. Is there a link between DNA polymerase β and cancer? // *Cell Cycle.* – 2004. – V. 3. – No. 8. – P.996–999.
297. Chan K.K.L., Zhang Q.M., Dianov G.L. Base excision repair fidelity in normal and cancer cells // *Mutagenesis.* – 2006. – V. 21. – No. 3. – P.173–178.
298. Senejani A.G., Dalal S., Liu Y., Nottoli T.P., McGrath J.M., Clairmont C.S., Sweasy J.B. Y265C DNA polymerase beta knockin mice survive past birth and accumulate base excision repair intermediate substrates // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2012. – V. 109. – No. 17. – P.6632–6637.

299. Gu H., Marth J.D., Orban P.C., Mossmann H., Rajewsky K. Deletion of a DNA polymerase β gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting type deletion // *Science*. – 1994. – V. 265. – No. 5168. – P.103–106.
300. Sobol R.W., Horton J.K., Kühn R., Gu H., Singhal R.K., Prasad R., Rajewsky K., Wilson S.H. Requirement of mammalian DNA polymerase- β in base-excision repair // *Nature*. – 1996. – V. 379. – No. 6561. – P.183–186.
301. Sugo N., Aratani Y., Nagashima Y., Kubota Y., Koyama H. Neonatal lethality with abnormal neurogenesis in mice deficient in DNA polymerase β // *EMBO J*. – 2000. – V. 19. – No. 6. – P.1397–1404.
302. Sobol R.W., Kartalou M., Almeida K.H., Joyce D.F., Engelward B.P., Horton J.K., Prasad R., Samson L.D., Wilson S.H. Base excision repair intermediates induce p53-independent cytotoxic and genotoxic responses // *J. Biol. Chem*. – 2003. – V. 278. – No. 41. – P.39951–39959.
303. Sobol R.W., Prasad R., Evenski A., Baker A., Yang X.P., Horton J.K., Wilson S.H. The lyase activity of the DNA repair protein β -polymerase protects from DNA-damage-induced cytotoxicity // *Nature*. – 2000. – V. 405. – No. 6788. – P.807–810.
304. Onishi K., Uyeda A., Shida M., Hirayama T., Yagi T., Yamamoto N., Sugo N. Genome stability by DNA polymerase β in neural progenitors contributes to neuronal differentiation in cortical development // *J. Neurosci*. – 2017. – V. 37. – No. 35. – P.8444–8458.
305. Uyeda A., Onishi K., Hirayama T., Hattori S., Miyakawa T., Yagi T., Yamamoto N., Sugo N. Suppression of DNA double-strand break formation by DNA polymerase β in active DNA demethylation is required for development of hippocampal pyramidal neurons // *J. Neurosci*. – 2020. – V. 40. – No. 47. – P.9012–9027.
306. Kim J., Kim J., Lee Y. DNA polymerase β deficiency in the p53 null cerebellum leads to medulloblastoma formation // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. – 2018. – V. 505. – No. 2. – P.548–553.
307. Kim J., Kim K., Mo J.S., Lee Y. Atm deficiency in the DNA polymerase β null cerebellum results in cerebellar ataxia and *Itpr1* reduction associated with alteration of cytosine methylation // *Nucleic Acids Res*. – 2020. – V. 48. – No. 7. – P.3678–3691.
308. Sykora P., Kanno S., Akbari M., Kulikowicz T., Baptiste B.A., Leandro G.S., Lu H., Tian J., May A., Becker K.A., Croteau D.L., Wilson III D.M., Sobol R.W., Yasui A., Bohr V.A. DNA polymerase beta participates in mitochondrial DNA repair // *Mol. Cell. Biol*. – 2017. – V. 37. – No. 16. – P.1–20.
309. Ali R., Alblihy A., Miligy I.M., Alabdullah M.L., Alsaleem M., Toss M.S., Algethami M., Abdel-Fatah T., Moseley P., Chan S., Mongan N.P., Narayan S., Rakha E.A., Madhusudan S. Molecular disruption of DNA polymerase β for platinum sensitisation and synthetic lethality in epithelial ovarian cancers // *Oncogene*. – 2021. – V. 40. – No. 14. – P.2496–2508.
310. Yuhas S.C., Mishra A., Dewese T.L., Greenberg M.M. Suppression of DNA polymerase β activity is synthetically lethal in BRCA1-deficient cells // *ACS Chem. Biol*. – 2021. – V. 16. – No. 8. – P.1339–1343.
311. Yamamoto R., Umetsu M., Yamamoto M., Matsuyama S., Takenaka S., Ide H., Kubo K. AP endonuclease knockdown enhances methyl methanesulfonate hypersensitivity of DNA polymerase β knockout mouse embryonic fibroblasts // *J. Radiat. Res*. – 2015. – V. 56. – No. 3. – P.462–466.
312. Kurosawa A., Kuboshima H., Adachi N. Complex genetic interactions between DNA polymerase β and the NHEJ ligase // *FEBS J*. – 2020. – V. 287. – No. 2. – P.377–385.
313. Tano K., Nakamura J., Asagoshi K., Arakawa H., Sonoda E., Braithwaite E.K., Prasad R., Buerstedde J.M., Takeda S., Watanabe M., Wilson S.H. Interplay between DNA polymerases β and λ in repair of oxidation DNA damage in chicken DT40 cells // *DNA Repair*. – 2007. – V. 6. – No. 6. – P.869–875.
314. Harrington J.J., Lieber M.R. The characterization of a mammalian DNA structure-specific endonuclease

// EMBO J. – 1994. – V. 13. – No. 5. – P.1235–1246.

315. Murante R.S., Huang L., Turchi J.J., Bambara R.A. The calf 5'- to 3'-exonuclease is also an endonuclease with both activities dependent on primers annealed upstream of the point of cleavage // *J. Biol. Chem.* – 1994. – V. 269. – No. 2. – P.1191–1196.
316. Li X., Li J., Harrington J., Lieber M.R., Burgers P.M. Lagging strand DNA synthesis at the eukaryotic replication fork involves binding and stimulation of FEN-1 by proliferating cell nuclear antigen // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – No. 38. – P.22109–22112.
317. Bornarth C.J., Ranalli T.A., Henricksen L.A., Wahl A.F., Bambara R.A. Effect of flap modifications on human FEN1 cleavage // *Biochemistry.* – 1999. – V. 38. – No. 40. – P.13347–13354.
318. Liu Y., Kao H.-I., Bambara R.A. Flap endonuclease 1: a central component of DNA metabolism // *Annu. Rev. Biochem.* – 2004. – V. 73. – P.589–615.
319. Tomlinson C.G., Atack J.M., Chapados B., Tainer J. a, Grasby J. a. Substrate recognition and catalysis by flap endonucleases and related enzymes // *Biochem Soc Trans.* – 2010. – V. 38. – No. 2. – P.433–437.
320. Zheng L., Dai H., Zhou M., Li M., Singh P., Qiu J., Tsark W., Huang Q., Kernstine K., Zhang X., Lin D., Shen B. Fen1 mutations result in autoimmunity , chronic inflammation and cancers // *Nature.* – 2007. – V. 13. – No. 7. – P.812–819.
321. Kucherlapati M., Yang K., Kuraguchi M., Zhao J., Lia M., Heyer J., Kane M.F., Fan K., Russell R., Brown A.M.C., Kneitz B., Edelmann W., Kolodner R.D., Lipkin M., Kucherlapati R. Haploinsufficiency of Flap endonuclease (Fen1) leads to rapid tumor progression // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2002. – V. 99. – No. 15. – P.9924–9929.
322. Larsen E., Gran C., Sæther B.E., Seeberg E., Klungland A. Proliferation failure and gamma radiation sensitivity of Fen1 null mutant mice at the blastocyst stage // *Mol. Cell. Biol.* – 2003. – V. 23. – No. 15. – P.5346–5353.
323. Xu H., Zheng L., Dai H., Zhou M., Hua Y., Shen B. Chemical-induced cancer incidence and underlying mechanisms in Fen1 mutant mice // *Oncogene.* – 2011. – V. 30. – No. 9. – P.1072–1081.
324. Shibata Y., Nakamura T. Defective flap endonuclease 1 activity in mammalian cells is associated with impaired DNA repair and prolonged S phase delay // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – No. 1. – P.746–754.
325. Sun H., He L., Wu H., Pan F., Wu X., Zhao J., Hu Z., Sekhar C., Li H., Zheng L., Chen H., Shen B.H., Guo Z. The FEN1 L209P mutation interferes with long-patch base excision repair and induces cellular transformation // *Oncogene.* – 2017. – V. 36. – P.194–207.
326. Matsuzaki Y., Adachi N., Koyama H. Vertebrate cells lacking FEN-1 endonuclease are viable but hypersensitive to methylating agents and H2O2 // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – V. 30. – No. 14. – P.3273–3277.
327. Urbanucci A., Sahu B., Seppälä J., Larjo A., Latonen L.M., Waltering K.K., Tammela T.L.J., Vessella R.L., Lähdesmäki H., Jänne O.A., Visakorpi T. Overexpression of androgen receptor enhances the binding of the receptor to the chromatin in prostate cancer // *Oncogene.* – 2012. – V. 31. – No. 17. – P.2153–2163.
328. Nikolova T., Christmann M., Kaina B. FEN1 is overexpressed in testis, lung and brain tumors // *Anticancer Res.* – 2009. – V. 29. – No. 7. – P.2453–2459.
329. Guo E., Ishii Y., Mueller J., Srivatsan A., Gahman T., Putnam C.D., Wang J.Y.J., Kolodner R.D. FEN1 endonuclease as a therapeutic target for human cancers with defects in homologous recombination // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2020. – V. 117. – No. 32. – P.19415–19424.
330. Mengwasser K.E., Adeyemi R.O., Leng Y., Choi M.Y., Clairmont C., D'Andrea A.D., Elledge S.J. Genetic

- screens reveal FEN1 and APEX2 as BRCA2 synthetic lethal targets // *Mol. Cell.* – 2019. – V. 73. – No. 5. – P.885-899.e6.
331. Levin D.S., Bai W., Yao N., O'Donnell M., Tomkinson A.E. An interaction between DNA ligase I and proliferating cell nuclear antigen: Implications for Okazaki fragment synthesis and joining // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1997. – V. 94. – No. 24. – P.12863–12868.
332. Levin D.S., McKenna A.E., Motycka T.A., Matsumoto Y., Tomkinson A.E. Interaction between PCNA and DNA ligase I is critical for joining of Okazaki fragments and long-patch base-excision repair // *Curr. Biol.* – 2000. – V. 10. – No. 15. – P.919–922.
333. Ellenberger T., Tomkinson A.E. Eukaryotic DNA ligases: structural and functional insights // *Annu. Rev. Biochem.* – 2008. – V. 77. – P.313–338.
334. Tomkinson A.E., Chen L., Dong Z., Leppard J.B., Levin D.S., Mackey Z.B., Motycka T.A. Completion of base excision repair by mammalian DNA ligases // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 2001. – V. 68. – P.151–164.
335. Barnes D.E., Tomkinson A.E., Lehmann A.R., Webster A.D.B., Lindahl T. Mutations in the DNA ligase I gene of an individual with immunodeficiencies and cellular hypersensitivity to DNA-damaging agents // *Cell.* – 1992. – V. 69. – No. 3. – P.495–503.
336. Webster A.D.B., Barnes D.E., Lindahl T., Arlett C.F., Lehmann A.R. Growth retardation and immunodeficiency in a patient with mutations in the DNA ligase I gene // *Lancet.* – 1992. – V. 339. – No. 8808. – P.1508–1509.
337. Teo I.A., Arlett C.F., Harcourt S.A., Priestley A., Broughton B.C. Multiple hypersensitivity to mutagens in a cell strain (46BR) derived from a patient with immuno-deficiencies // *Mutat. Res.* – 1983. – V. 107. – No. 2. – P.371–386.
338. Teo I.A., Broughton B.C., Day R.S., James M.R., Karren P., Mayne L. V., Lehmann A.R. A biochemical defect in the repair of alkylated DNA in cells from an immunodeficient patient (46BR) // *Carcinogenesis.* – 1983. – V. 4. – No. 5. – P.559–564.
339. Squires S., Johnson R.T. U.V. induces long-lived DNA breaks in cockayne's syndrome and cells from an immunodeficient individual (46BR): defects and disturbance in post incision steps of excision repair // *Carcinogenesis.* – 1983. – V. 4. – No. 5. – P.565–572.
340. Henderson L.M., Arlett C.F., Harcourtt S.A., Lehmann A.R., Broughtont B.C. Cells from an immunodeficient patient (46BR) with a defect in DNA ligation are hypomutable but hypersensitive to the induction of sister chromatid exchanges // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1985. – V. 82. – No. 4. – P.2044–2048.
341. Lehmann A.R., Willis A.E., Broughton B.C., James M.R., Steingrimsdottir H., Harcourt S.A., Arlett C.F., Lindahl T. Relation between the human fibroblast strain 46BR and cell lines representative of Bloom's syndrome // *Cancer Res.* – 1988. – V. 48. – No. 22. – P.6343–6347.
342. Somia N. V., Jessop J.K., Melton D.W. Phenotypic correction of a human cell line (46BR) with aberrant DNA ligase I activity // *Mutat. Res.* – 1993. – V. 294. – No. 1. – P.51–58.
343. Soza S., Leva V., Vago R., Ferrari G., Mazzini G., Biamonti G., Montecucco A. DNA ligase I deficiency leads to replication-dependent DNA damage and impacts cell morphology without blocking cell cycle progression // *Mol. Cell. Biol.* – 2009. – V. 29. – No. 8. – P.2032–2041.
344. Giuliano S., Iadarola P., Leva V., Montecucco A., Camerini S., Crescenzi M., Salvini R., Bardoni A. An insight into the abundant proteome of 46BR.1G1 fibroblasts deficient of DNA ligase I // *Electrophoresis.* – 2012. – V. 33. – No. 2. – P.307–315.
345. Arlett C.F., Priestley A. Defective recovery from potentially lethal damage in some human fibroblast cell strains // *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med.* – 1983. – V. 43. – No. 2. – P.157–167.

346. Fertil B., Deschavanne P.J., Debieu D., Malaise E.P. Correlation between PLD repair capacity and the survival curve of human fibroblasts in exponential growth phase: analysis in terms of several parameters // *Radiat. Res.* – 1988. – V. 116. – No. 1. – P.74–88.
347. Castel A.L., Tomkinson A.E., Pearson C.E. CTG/CAG repeat instability is modulated by the levels of human DNA ligase I and its interaction with proliferating cell nuclear antigen. A distinction between replication and slipped-DNA repair // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284. – No. 39. – P.26631–26645.
348. Harrison C., Ketchen A.-M., Redhead N.J., O’Sullivan M.J., Melton D.W. Replication failure, genome instability, and increased cancer susceptibility in mice with a point mutation in the DNA ligase I gene // *Cancer Res.* – 2002. – V. 62. – No. 14. – P.4065–4074.
349. Maffucci P., Chavez J., Jurkiw T.J., O’Brien P.J., Abbott J.K., Reynolds P.R., Worth A., Notarangelo L.D., Felgentreff K., Cortes P., Boisson B., Radigan L., Cobat A., Dinakar C., Ehlayel M., Ben-Omran T., Gelfand E.W., Casanova J.L., Cunningham-Rundles C. Biallelic mutations in DNA ligase 1 underlie a spectrum of immune deficiencies // *J. Clin. Invest.* – 2018. – V. 128. – No. 12. – P.5505–5516.
350. Bentley D.J., Selfridge J., Millar J.K., Samuel K., Hole N., Ansell J.D., Melton D.W. DNA ligase I is required for fetal liver erythropoiesis but is not essential for mammalian cell viability // *Nat Genet.* – 1996. – V. 13. – No. 4. – P.489–491.
351. Bentley D.J., Harrison C., Ketchen A.M., Redhead N.J., Samuel K., Waterfall M., Ansell J.D., Melton D.W. DNA ligase I null mouse cells show normal DNA repair activity but altered DNA replication and reduced genome stability // *J. Cell Sci.* – 2002. – V. 115. – No. 7. – P.1551–1561.
352. Petrini J.H., Xiao Y., Weaver D.T. DNA ligase I mediates essential functions in mammalian cells // *Mol. Cell. Biol.* – 1995. – V. 15. – No. 8. – P.4303–4308.
353. Han L., Masani S., Hsieh C. lin, Yu K. DNA ligase I is not essential for mammalian cell viability // *Cell Rep.* – 2014. – V. 7. – No. 2. – P.316–320.
354. Arakawa H., Bednar T., Wang M., Paul K., Mladenov E., Bencsik-Theilen A.A., Iliakis G. Functional redundancy between DNA ligases I and III in DNA replication in vertebrate cells // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – V. 40. – No. 6. – P.2599–2610.
355. Le Chalony C., Hoffschir F., Gauthier L.R., Gross J., Biard D.S., Boussin F.D., Pennaneach V. Partial complementation of a DNA ligase I deficiency by DNA ligase III and its impact on cell survival and telomere stability in mammalian cells // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2012. – V. 69. – No. 17. – P.2933–2949.
356. Mackey Z.B., Ramos W., Levin D.S., Walter C.A., McCarrey J.R., Tomkinson A.E. An alternative splicing event which occurs in mouse pachytene spermatocytes generates a form of DNA ligase III with distinct biochemical properties that may function in meiotic recombination // *Mol. Cell. Biol.* – 1997. – V. 17. – No. 2. – P.989–998.
357. Perez-Jannotti R.M., Klein S.M., Bogenhagen D.F. Two forms of mitochondrial DNA ligase III are produced in *Xenopus laevis* oocytes // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – No. 52. – P.48978–48987.
358. Tomkinson A.E., Sallmyr A. Structure and function of the DNA ligases encoded by the mammalian LIG3 gene // *Gene.* – 2013. – V. 531. – No. 2. – P.150–157.
359. Lakshmipathy U., Campbell C. The human DNA ligase III gene encodes nuclear and mitochondrial proteins // *Mol. Cell. Biol.* – 1999. – V. 19. – No. 5. – P.3869–3876.
360. Puebla-osorio N., Lacey D.B., Alt F.W., Zhu C. Early embryonic lethality due to targeted inactivation of DNA ligase III // *Mol. Cell. Biol.* – 2006. – V. 26. – No. 10. – P.3935–3941.
361. Simsek D., Furda A., Gao Y., Artus J., Brunet E., Hadjantonakis A.-K., Houten van B., Shuman S., McKinnon P.J., Jasin M. Crucial role for DNA ligase III in mitochondria but not in Xrcc1-dependent repair // *Nature.* – 2011. – V. 471. – No. 10. – P.5–9.

362. Boboila C., Oksenyich V., Gostissa M., Wang J.H., Zha S., Zhang Y., Chai H., Lee C.S., Jankovic M., Saez L.M.A., Nussenzweig M.C., McKinnon P.J., Alt F.W., Schwer B. Robust chromosomal DNA repair via alternative end-joining in the absence of X-ray repair cross-complementing protein 1 (XRCC1) // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2012. – V. 109. – No. 7. – P.2473–2478.
363. Gao Y., Katyal S., Lee Y., Zhao J., Rehg J.E., Russell H.R., Mckinnon P.J. DNA ligase III is crucial for mtDNA integrity but not Xrcc1-mediated nuclear DNA repair // *Nature.* – 2011. – V. 471. – No. 7337. – P.240–244.
364. Caldecott K.W. XRCC1 and DNA strand break repair // *DNA Repair.* – 2003. – V. 2. – No. 9. – P.955–969.
365. Almeida K.H., Sobol R.W. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification // *DNA Repair.* – 2007. – V. 6. – No. 6. – P.695–711.
366. London R.E. The structural basis of XRCC1-mediated DNA repair // *DNA Repair.* – 2015. – V. 7. – No. 30. – P.90–103.
367. Thompson L.H., Brookman K.W., Dillehay L.E., Carrano A. V, Mooney C.L., Minkler J.L. A CHO-cell strain having hypersensitivity to mutagens, a defect in DNA strand-break repair, and an extraordinary baseline frequency of sister-chromatid exchange // *Mutat. Res.* – 1982. – V. 95. – P.427–440.
368. Thompson L.H., Rubin J.S., Cleaver J.E., Whitmore G.F., Brookman K. A screening method for isolating DNA repair-deficient mutants of CHO cells // *Somatic Cell Genet.* – 1980. – V. 6. – No. 3. – P.391–405.
369. Thompson L.H., Brookman K.W., Jones N.J., Allen S.A., Carrano A. V. Molecular cloning of the human XRCC1 gene, which corrects defective DNA strand break repair and sister chromatid exchange // *Mol. Cell. Biol.* – 1990. – V. 10. – No. 12. – P.6160–6171.
370. Caldecott K.W., Tucker J.D., Thompson L.H. Construction of human XRCC1 minigenes that fully correct the CHO DNA repair mutant EM9 // *Nucleic Acids Res.* – 1992. – V. 20. – No. 17. – P.4575–4579.
371. Zdzienicka M.Z., Van Der Schans G.P., Natarajan A.T., Thompson L.H., Neuteboom I., Simons J.W.I.M. A Chinese hamster ovary cell mutant (EM-C11) with sensitivity to simple alkylating agents and a very high level of sister chromatid exchanges // *Mutagenesis.* – 1992. – V. 7. – No. 4. – P.265–269.
372. Hoch N.C., Hanzlikova H., Rulten S.L., Tétreault M., Komulainen E., Ju L., Hornyak P., Zeng Z., Gittens W., Rey S.A., Staras K., Mancini G.M.S., Mckinnon P.J., Wang Z., Wagner J.D., Consortium C.C., Yoon G., Keith W. XRCC1 mutation is associated with PARP1 hyperactivation and cerebellar ataxia // *Nature.* – 2017. – V. 5. – No. 541. – P.87–91.
373. Tebbs R.S., Flannery M.L., Meneses J.J., Hartmann A., Tucker J.D., Thompson L.H., Cleaver J.E., Pedersen R.A. Requirement for the Xrcc1 DNA base excision repair gene during early mouse development // *Dev. Biol.* – 1999. – V. 208. – No. 2. – P.513–529.
374. Tebbs R.S., Thompson L.H., Cleaver J.E. Rescue of Xrcc1 knockout mouse embryo lethality by transgene-complementation // *DNA Repair.* – 2003. – V. 2. – No. 12. – P.1405–1417.
375. Lee Y., Katyal S., Li Y., El-khamisy S.F., Russell H.R., Caldecott K.W., Mckinnon P.J. The genesis of cerebellar interneurons and the prevention of neural DNA damage require XRCC1 // *Nat. Neurosci.* – 2009. – V. 12. – No. 8. – P.973–980.
376. Xu C., Xu J., Ji G., Liu Q., Shao W., Chen Y., Gu J., Weng Z., Zhang X., Wang Y., Gu A. Deficiency of X-ray repair cross-complementing group 1 in primordial germ cells contributes to male infertility // *FASEB J.* – 2019. – V. 33. – No. 6. – P.7427–7436.
377. Adamowicz M., Hailstone R., Demin A.A., Komulainen E., Hanzlikova H., Brazina J., Gautam A., Wells S.E., Caldecott K.W. XRCC1 protects transcription from toxic PARP1 activity during DNA base excision repair // *Nat. Cell Biol.* – 2021. – V. 23. – No. 12. – P.1287–1298.

378. Reber J.M., Božić-Petković J., Lippmann M., Mazzardo M., Dilger A., Warmers R., Bürkle A., Mangerich A. PARP1 and XRCC1 exhibit a reciprocal relationship in genotoxic stress response // *Cell Biol. Toxicol.* – 2022. – V. 39. – P.345–364.
379. Demin A.A., Hirota K., Tsuda M., Adamowicz M., Hailstone R., Brazina J., Gittens W., Kalasova I., Shao Z., Zha S., Sasanuma H., Hanzlikova H., Takeda S., Caldecott K.W. XRCC1 prevents toxic PARP1 trapping during DNA base excision repair // *Mol. Cell.* – 2021. – V. 81. – No. 14. – P.3018-3030.e5.
380. Hirota K., Ooka M., Shimizu N., Yamada K., Tsuda M., Ibrahim M.A., Yamada S., Sasanuma H., Masutani M., Takeda S. XRCC1 counteracts poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) poisons, olaparib and talazoparib, and a clinical alkylating agent, temozolomide, by promoting the removal of trapped PARP1 from broken DNA // *Genes to Cells.* – 2022. – V. 27. – No. 5. – P.331–344.
381. Ali R., Alblihy A., Toss M.S., Algethami M., Al Sunni R., Green A.R., Rakha E.A., Madhusudan S. XRCC1 deficient triple negative breast cancers are sensitive to ATR, ATM and Wee1 inhibitor either alone or in combination with olaparib // *Ther. Adv. Med. Oncol.* – 2020. – V. 12. – P.1–14.
382. Ali R., Alabdullah M., Algethami M., Alblihy A., Miligy I., Shoqafi A., Mesquita K.A., Abdel-Fatah T., Chan S.Y.T., Chiang P.W., Mongan N.P., Rakha E.A., Tomkinson A.E., Madhusudan S. Ligase 1 is a predictor of platinum resistance and its blockade is synthetically lethal in XRCC1 deficient epithelial ovarian cancers // *Theranostics.* – 2021. – V. 11. – No. 17. – P.8350–8361.
383. Hottiger M.O. Nuclear ADP-ribosylation and its role in chromatin plasticity, cell differentiation, and epigenetics // *Annu. Rev. Biochem.* – 2015. – V. 84. – P.227–263.
384. Ray Chaudhuri A., Nussenzweig A. The multifaceted roles of PARP1 in DNA repair and chromatin remodelling // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* – 2017. – V. 18. – No. 10. – P.610–621.
385. Byers L.A., Wang J., Nilsson M.B., Fujimoto J., Saintigny P., Yordy J., Giri U., Peyton M., Fan Y.H., Diao L., Masrourpour F., Shen L., Liu W., Duchemann B., Tumula P., Bhardwaj V., Welsh J., Weber S., Glisson B.S., et al. Proteomic profiling identifies dysregulated pathways in small cell lung cancer and novel therapeutic targets including PARP1 // *Cancer Discov.* – 2012. – V. 2. – No. 9. – P.798–811.
386. Wang Z.Q., Auer B., Stingl L., Berghammer H., Haidacher D., Schweiger M., Wagner E.F. Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosylation) develop normally but are susceptible to skin disease // *Genes Dev.* – 1995. – V. 9. – No. 5. – P.509–520.
387. Ménessier De Murcia J., Niedergang C., Trucco C., Ricoul M., Dutrillaux B., Mark M., Oliver F.J., Masson M., Dierich A., Lemeur M., Walztinger C., Chambon P., De Murcia G. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1997. – V. 94. – No. 14. – P.7303–7307.
388. Masutani M., Suzuki H., Kamada N., Watanabe M., Ueda O., Nozaki T., Jishage K.I., Watanabe T., Sugimoto T., Nakagama H., Ochiya T., Sugimura T. Poly(ADP-ribose) polymerase gene disruption conferred mice resistant to streptozotocin-induced diabetes // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1999. – V. 96. – No. 5. – P.2301–2304.
389. Nelson M.M., Hoff J.D., Zeese M.L., Corfas G. Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1 regulates cajal–retzius cell development and neural precursor cell adhesion // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2021. – V. 9. – No. 10. – P.1–17.
390. Wang Y., Zhang Y., Zhang S., Kim B., Hull V.L., Xu J., Prabhu P., Gregory M., Martinez-Cerdeno V., Zhan X., Deng W., Guo F. PARP1-mediated PARylation activity is essential for oligodendroglial differentiation and CNS myelination // *Cell Rep.* – 2021. – V. 37. – No. 1. – Article No. 109695.
391. Murcia J.M., Mark M., Wendling O., Wynshaw-Boris A., de Murcia G. Early embryonic lethality in PARP-1 Atm double-mutant mice suggests a functional synergy in cell proliferation during development // *Mol. Cell. Biol.* – 2001. – V. 21. – No. 5. – P.1828–1832.
392. Henrie M.S., Kurimasa A., Burma S., Ménessier-de Murcia J., De Murcia G., Li G.C., Chen D.J. Lethality

- in PARP-1/Ku80 double mutant mice reveals physiological synergy during early embryogenesis // *DNA Repair*. – 2003. – V. 2. – No. 2. – P.151–158.
393. Ménessier de Murcia J., Ricoul M., Tartier L., Niedergang C., Huber A., Dantzer F., Schreiber V., Amé J.C., Dierich A., LeMeur M., Sabatier L., Chambon P., De Murcia G. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse // *EMBO J.* – 2003. – V. 22. – No. 9. – P.2255–2263.
394. Chen Q., Kassab M.A., Dantzer F., Yu X. PARP2 mediates branched poly ADP-ribosylation in response to DNA damage // *Nat. Commun.* – 2018. – V. 9. – Article No. 3233.
395. Aberle L., Krüger A., Reber J.M., Lippmann M., Hufnagel M., Schmalz M., Trussina I.R.E.A., Schlesiger S., Zübel T., Schütz K., Marx A., Hartwig A., Ferrando-May E., Bürkle A., Mangerich A. PARP1 catalytic variants reveal branching and chain length-specific functions of poly(ADP-ribose) in cellular physiology and stress response // *Nucleic Acids Res.* – 2020. – V. 48. – No. 18. – P.10015–10033.
396. Zakharenko A.L., Malakhova A.A., Dyrkheeva N.S., Okorokova L.S., Medvedev S.P., Zakian S.M., Kabilov M.R., Tupikin A.A., Lavrik O.I. PARP1 gene knockout suppresses expression of DNA base excision repair genes // *Dokl. Biochem. Biophys.* – 2023. – V. 508. – P.1–6.
397. Bryant H.E., Schultz N., Thomas H.D., Parker K.M., Flower D., Lopez E., Kyle S., Meuth M., Curtin N.J., Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase // *Nature*. – 2005. – V. 434. – No. 7035. – P.913–917.
398. Farmer H., McCabe H., Lord C.J., Tutt A.H.J., Johnson D.A., Richardson T.B., Santarosa M., Dillon K.J., Hickson I., Knights C., Martin N.M.B., Jackson S.P., Smith G.C.M., Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy // *Nature*. – 2005. – V. 434. – No. 7035. – P.917–921.
399. Maya-Mendoza A., Moudry P., Merchut-Maya J.M., Lee M., Strauss R., Bartek J. High speed of fork progression induces DNA replication stress and genomic instability // *Nature*. – 2018. – V. 559. – No. 7713. – P.279–284.
400. Zimmermann M., Murina O., Reijns M.A.M., Agathangelou A., Challis R., Tarnauskaite Ž., Muir M., Fluteau A., Aregger M., McEwan A., Yuan W., Clarke M., Lambros M.B., Paneesha S., Moss P., Chandrashekar M., Angers S., Moffat J., Brunton V.G., et al. CRISPR screens identify genomic ribonucleotides as a source of PARP-trapping lesions // *Nature*. – 2018. – V. 559. – No. 7713. – P.285–289.
401. Paes Dias M., Tripathi V., van der Heijden I., Cong K., Manolika E.M., Bhin J., Gogola E., Galanos P., Annunziato S., Lieftink C., Andújar-Sánchez M., Chakrabarty S., Smith G.C.M., van de Ven M., Beijersbergen R.L., Bartkova J., Rottenberg S., Cantor S., Bartek J., et al. Loss of nuclear DNA ligase III reverts PARP inhibitor resistance in BRCA1/53BP1 double-deficient cells by exposing ssDNA gaps // *Mol. Cell*. – 2021. – V. 81. – No. 22. – P.4692–4708.e9.
402. Cimino M.C. Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purposes // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2006. – V. 47. – No. 51. – P.362–390.
403. Kirkland D., Speit G. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens I. Appropriate follow-up testing in vivo // *Mutat. Res.* – 2008. – V. 654. – No. 2. – P.114–132.
404. Hendriks G., Water B. Van De, Schoonen W., Vrieling H. Cellular-signaling pathways unveil the carcinogenic potential of chemicals // *J. Appl. Toxicol.* – 2013. – V. 33. – No. 6. – P.399–409.
405. Johansson F., Allkvist A., Erixon K., Malmvärn A., Nilsson R., Bergman Å., Helleday T., Jenssen D. Screening for genotoxicity using the DRAG assay: investigation of halogenated environmental contaminants // *Mutat. Res.* – 2004. – V. 563. – No. 1. – P.35–47.

406. Ridpath J.R., Takeda S., Swenberg J.A., Nakamura J. Convenient, multi-well plate-based DNA damage response analysis using DT40 mutants is applicable to a high-throughput genotoxicity assay with characterization of modes of action // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2011. – V. 52. – No. 2. – P.153–160.
407. Saha L.K., Kim S., Kang H., Akter S., Choi K., Sakuma T., Yamamoto T., Sasanuma H., Hirota K., Nakamura J., Honma M., Takeda S., Dertinger S. Differential micronucleus frequency in isogenic human cells deficient in DNA repair pathways is a valuable indicator for evaluating genotoxic agents and their genotoxic mechanisms // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2018. – V. 59. – No. 6. – P.529–538.
408. Sykora P., Witt K.L., Revanna P., Smith-Roe S.L., Dismukes J., Lloyd D.G., Engelward B.P., Sobol R.W. Next generation high throughput DNA damage detection platform for genotoxic compound screening // *Sci. Rep.* – 2018. – V. 8. – Article No. 2771.
409. Lee S., Liu X., Takeda S., Choi K. Genotoxic potentials and related mechanisms of bisphenol A and other bisphenol compounds: a comparison study employing chicken DT40 cells // *Chemosphere.* – 2013. – V. 93. – No. 2. – P.434–440.
410. Liu X., Lee J., Ji K., Takeda S., Choi K. Potentials and mechanisms of genotoxicity of six pharmaceuticals frequently detected in freshwater environment // *Toxicol. Lett.* – 2012. – V. 211. – No. 1. – P.70–76.
411. Smith S., Fox J., Mejia M., Ruangpradit W., Saberi A., Kim S., Choi Y., Oh S., Wang Y., Choi K., Li L., Hendrickson E.A., Takeda S., Muller M., Myung K. Histone deacetylase inhibitors selectively target homology dependent DNA repair defective cells and elevate non-homologous endjoining activity // *PLoS One.* – 2014. – V. 9. – No. 1. – P.1–12.
412. Hu J., Nakamura J., Richardson S.D., Aitken M.D. Evaluating the effects of bioremediation on genotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil using genetically engineered, higher eukaryotic cell lines // *Environ. Sci. Technol.* – 2012. – V. 46. – No. 8. – P.4607–4613.
413. Nishihara K., Huang R., Zhao J., Shahane S.A., Witt K.L., Smith-Roe S.L., Tice R.R., Takeda S., Xia M. Identification of genotoxic compounds using isogenic DNA repair deficient DT40 cell lines on a quantitative high throughput screening platform // *Mutagenesis.* – 2016. – V. 31. – No. 1. – P.69–81.
414. Yamamoto K.N., Hirota K., Kono K., Takeda S., Sakamuru S., Xia M., Huang R., Austin C.P., Witt K.L., Tice R.R. Characterization of environmental chemicals with potential for DNA damage using isogenic DNA repair-deficient chicken DT40 cell lines // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2011. – V. 52. – No. 7. – P.547–561.
415. Nagel Z.D., Chaim I.A., Samson L.D. Inter-individual variation in DNA repair capacity: a need for multi-pathway functional assays to promote translational DNA repair research // *DNA Repair.* – 2014. – V. 19. – P.199–213.
416. Kauffmann A., Rosselli F., Lazar V., Winnepenninckx V., Mansuet-Lupo A., Dessen P., Van Den Oord J.J., Spatz A., Sarasin A. High expression of DNA repair pathways is associated with metastasis in melanoma patients // *Oncogene.* – 2008. – V. 27. – No. 5. – P.565–573.
417. Hopkins J.L., Lan L., Zou L. DNA repair defects in cancer and therapeutic opportunities // *Genes Dev.* – 2022. – V. 34. – No. 5–6. – P.278–293.
418. Bregeon D., Doetsch P.W. Transcriptional mutagenesis: causes and involvement in tumour development // *Nat. Rev. Cancer.* – 2011. – V. 11. – No. 3. – P.218–227.
419. Johnson J., Latimer J. Analysis of DNA repair using transfection-based host cell reactivation // *Methods Mol Biol.* – 2005. – V. 291. – P.321–335.
420. Piett C.G., Pecan T.J., Lavery D.J., Nagel Z.D. Large-scale preparation of fluorescence multiplex host cell reactivation (FM-HCR) reporters // *Nat. Protoc.* – 2021. – V. 16. – No. 9. – P.4265–4298.
421. Lühnsdorf B., Kitsera N., Warken D., Lingg T., Epe B., Khobta A. Generation of reporter plasmids containing defined base modifications in the DNA strand of choice // *Anal. Biochem.* – 2012. – V. 425. –

No. 1. – P.47–53.

422. Kitsera N., Rodriguez-Alvarez M., Emmert S., Carell T., Khobta A. Nucleotide excision repair of abasic DNA lesions // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – V. 47. – No. 16. – P.8537–8547.
423. Raetz A.G., Xie Y., Kundu S., Brinkmeyer M.K., Chang C., David S.S. Cancer-associated variants and a common polymorphism of MUTYH exhibit reduced repair of oxidative DNA damage using a GFP-based assay in mammalian cells // *Carcinogenesis.* – 2012. – V. 33. – No. 11. – P.2301–2309.
424. Pierce A.J., Johnson R.D., Thompson L.H., Jasin M. XRCC3 promotes homology-directed repair of DNA damage in mammalian cells // *Genes Dev.* – 1999. – V. 13. – No. 20. – P.2633–2638.
425. Stark J.M., Pierce A.J., Oh J., Pastink A., Jasin M. Genetic steps of mammalian homologous repair with distinct mutagenic consequences // *Mol. Cell. Biol.* – 2004. – V. 24. – No. 21. – P.9305–9316.
426. Capecchi M.R. Gene targeting in mice: functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century // *Nat. Rev. Genet.* – 2005. – V. 6. – No. 6. – P.507–512.
427. Müller U. Ten years of gene targeting: targeted mouse mutants, from vector design to phenotype analysis // *Mech. Dev.* – 1999. – V. 82. – P.3–21.
428. Capecchi M.R. The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting // *Trends Genet.* – 1989. – V. 5. – No. 3. – P.70–76.
429. Gong W.J., Golic K.G. Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila* // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2003. – V. 100. – No. 5. – P.2556–2561.
430. Mansour S.L., Thomas K.R., Capecchi M.R. Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting to non-selectable genes // *Nature.* – 1988. – V. 336. – No. 11. – P.403–405.
431. Olson E.N., Arnold H.H., Rigby P.W.J., Wold B.J. Know your neighbors: three phenotypes in null mutants of the myogenic bHLH gene *MRF4* // *Cell.* – 1996. – V. 85. – No. 1. – P.1–4.
432. Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 1996. – V. 93. – No. 3. – P.1156–1160.
433. Bibikova M., Golic M., Golic K.G., Carroll D. Targeted chromosomal cleavage and mutagenesis in *Drosophila* using zinc-finger nucleases // *Genetics.* – 2002. – V. 161. – No. 3. – P.1169–1175.
434. Bibikova M., Beumer K., Trautman J.K., Carroll D. Enhancing gene targeting with designed zinc finger nucleases // *Science.* – 2003. – V. 300. – No. 5620. – Article No. 764.
435. Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors // *Science.* – 2009. – V. 326. – No. 12. – P.1509–1512.
436. Moscou M., Bogdanove A. A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors // *Science.* – 2009. – V. 326. – No. 5959. – Article No. 1501.
437. Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases // *Genetics.* – 2010. – V. 186. – No. 2. – P.757–761.
438. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // *Science.* – 2012. – V. 337. – No. 8. – P.816–822.
439. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes // *Science.* – 2007. – V. 315. – No. 3. – P.1709–1712.

440. Mojica F.J.M., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements // *J. Mol. Evol.* – 2005. – V. 60. – No. 2. – P.174–182.
441. Makarova K.S., Wolf Y.I., Iranzo J., Shmakov S.A., Alkhnbashi O.S., Brouns S.J.J., Charpentier E., Cheng D., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Scott D., Shah S.A., Siksnys V., Terns M.P., Venclovas Č., White M.F., Yakunin A.F., et al. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2020. – V. 18. – No. 2. – P.67–83.
442. Brouns S.J., Jore M.M., Lundgren M. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes // *Science.* – 2008. – V. 321. – No. 8. – P.960–964.
443. Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III // *Nature.* – 2011. – V. 471. – No. 3. – P.602–607.
444. Garneau J.E., Dupuis M.E., Villion M., Romero D.A., Barrangou R., Boyaval P., Fremaux C., Horvath P., Magadan A.H., Moineau S. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA // *Nature.* – 2010. – V. 468. – No. 11. – P.67–71.
445. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* – 2012. – V. 109. – No. 4. – P.E2579–86.
446. Mali P., Yang L., Esvelt K.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9 // *Science.* – 2013. – V. 339. – No. 2. – P.823–826.
447. Kim H., Kim J.S. A guide to genome engineering with programmable nucleases // *Nat. Rev. Genet.* – 2014. – V. 15. – No. 5. – P.321–334.
448. Huertas P. DNA resection in eukaryotes: deciding how to fix the break // *Nat. Struct.* – 2010. – V. 17. – P.11–16.
449. Lieber M.R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway // *Annu. Rev. Biochem.* – 2010. – V. 79. – P.181–211.
450. Cong L., Ran F.A., Cox D. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // *Science.* – 2013. – V. 339. – No. 2. – P.819–823.
451. Cho S.W., Kim S., Kim J.M., Kim J.-S. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease // *Nat. Biotechnol.* – 2013. – V. 31. – No. 3. – P.230–232.
452. Lee J.S., Grav L.M., Lewis N.E., Kildegaard H.F. CRISPR/Cas9-mediated genome engineering of CHO cell factories: application and perspectives // *Biotechnol. J.* – 2015. – V. 10. – No. 7. – P.979–994.
453. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nat. Protoc.* – 2013. – V. 8. – No. 11. – P.2281–2308.
454. Graham F.L., Smiley J. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5 // *J Gen Virol.* – 1977. – V. 36. – No. 2977. – P.59–72.
455. Louis N., Eveleigh C., Graham F.L. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line // *Virology.* – 1997. – V. 233. – No. 2. – P.423–429.
456. Sha J., Ghosh M.K., Zhang K., Harter M.L. E1A interacts with two opposing transcriptional pathways to induce quiescent cells into S phase // *J. Virol.* – 2010. – V. 84. – No. 8. – P.4050–4059.
457. Berk A.J. Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus // *Oncogene.* – 2005. – V. 24. – P.7673–7685.
458. Bylund L., Kytölä S., Lui W., Larsson C., Weber G. Analysis of the cytogenetic stability of the human

- embryonal kidney cell line 293 by cytogenetic and STR profiling approaches // *Cytogenet. Genome Res. Genome Res.* – 2004. – V. 32. – P.28–32.
459. DuBridgе R.B., Tang P., Hsia H.C., Leong P.M., Miller J.H., Calos M.P. Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system // *Mol. Cell. Biol.* – 1987. – V. 7. – No. 1. – P.379–387.
460. Lilyestrom W., Klein M.G., Zhang R., Joachimiak A., Chen X.S. Crystal structure of SV40 large T-antigen bound to p53: interplay between a viral oncoprotein and a cellular tumor suppressor // *Genes Dev.* – 2006. – V. 20. – No. 17. – P.2373–2382.
461. Stillman B.W., Gluzman Y. Replication and supercoiling of simian virus 40 DNA in cell extracts from human cells // *Mol. Cell. Biol.* – 1985. – V. 5. – No. 8. – P.2051–2060.
462. Giard D.J., Aaronson S.A., Todaro G.J., Arnstein P., Kersey J.H., Parks W.P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors // *J. Natl. Cancer Inst.* – 1973. – V. 51. – No. 5. – P.1417–1423.
463. Smith C.D., Craft D.W., Shiromoto R.S., Yan P.O. Alternative cell line for virus isolation // *J. Clin. Microbiol.* – 1986. – V. 24. – No. 2. – P.265–268.
464. 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.
465. Brinkman E.K., Chen T., Amendola M., Van Steensel B. Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42. – No. 22. – P.1–8.
466. Matsuzaki Y., Umemoto T., Tanaka Y., Okano T., Yamato M. β 2-microglobulin is an appropriate reference gene for RT-PCR-based gene expression analysis of hematopoietic stem cells // *Regen. Ther.* – 2015. – V. 1. – P.91–97.
467. Tanaka M., Lai J.S., Herr W. Promoter-selective activation domains in Oct-1 and Oct-2 direct differential activation of an snRNA and mRNA promoter // *Cell.* – 1992. – V. 68. – No. 4. – P.755–767.
468. Baldwin A.S.J. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights // *Annu. Rev. Immunol.* – 1996. – V. 14. – P.649–683.
469. Sentmanat M.F., Peters S.T., Florian C.P., Connelly J.P., Shondra M. A survey of validation strategies for CRISPR-Cas9 editing // *Sci. Rep.* – 2018. – V. 8. – Article No. 888.
470. Komine K., Shimodaira H., Takao M., Soeda H., Zhang X., Takahashi M., Ishioka C. Functional complementation assay for 47 MUTYH variants in a MutY -disrupted Escherichia Coli strain // *Hum. Mutat.* – 2015. – V. 36. – No. 7. – P.704–711.
471. Kubo K., Ide H., Wallace S.S., Kow Y.W. A novel, sensitive, and specific assay for abasic sites, the most commonly produced DNA lesion // *Biochemistry.* – 1992. – V. 31. – No. 14. – P.3703–3708.
472. Pachva M.C., Kisselev A.F., Matkarimov B.T., Sapparbaev M., Groisman R. DNA-histone cross-links: formation and repair // *Front. Cell Dev. Biol.* – 2020. – V. 8. – Article No. 607045.
473. Greenberg M.M. Abasic and oxidized abasic site reactivity in DNA: enzyme inhibition, cross-linking, and nucleosome catalyzed reactions // *Acc. Chem. Res.* – 2014. – V. 47. – No. 2. – P.646–655.
474. Das A., Wiederhold L., Leppard J.B., Kedar P., Prasad R., Wang H., Boldogh I., Karimi-Busheri F., Weinfeld M., Tomkinson A.E., Wilson S.H., Mitra S., Hazra T.K. NEIL2-initiated, APE-independent repair of oxidized bases in DNA: evidence for a repair complex in human cells // *DNA Repair.* – 2006. – V. 5. – No. 12. – P.1439–1448.
475. Shafirovich V., Geacintov N.E. Removal of oxidatively generated DNA damage by overlapping repair pathways // *Free Radic. Biol. Med.* – 2017. – V. 107. – P.53–61.

476. Pommier Y., Huang S.N., Gao R., Das B.B., Murai J., Marchand C. Tyrosyl-DNA-phosphodiesterases (TDP1 and TDP2) // *DNA Repair*. – 2014. – V. 19. – P.114–129.
477. Fisher L.A., Samson L., Bessho T. Removal of reactive oxygen species-induced 3'-blocked ends by XPF-ERCC1 // *Chem. Res. Toxicol.* – 2011. – V. 24. – No. 11. – P.1876–1881.
478. Hadi M.Z., Wilson D.M. Second human protein with homology to the Escherichia coli abasic endonuclease exonuclease III // *Environ. Mol. Mutagen.* – 2000. – V. 36. – No. 4. – P.312–324.
479. Turco E., Ventura I., Minoprio A., Russo M.T., Torreri P., Degan P., Molatore S., Ranzani G.N., Bignami M., Mazzei F. Understanding the role of the Q338H MUTYH variant in oxidative damage repair // *Nucleic Acids Res.* – 2013. – V. 41. – No. 7. – P.4093–4103.
480. Branch P., Hampson R., Karran P. DNA mismatch binding defects, DNA damage tolerance, and mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines // *Cancer Res.* – 1995. – V. 55. – No. 11. – P.2304–2309.
481. Allgayer J., Kitsera N., Bartelt S., Epe B., Khobta A. Widespread transcriptional gene inactivation initiated by a repair intermediate of 8-oxoguanine // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44. – No. 15. – P.7267–7280.
482. Li H., Endutkin A. V., Bergonzo C., Fu L., Grollman A., Zharkov D.O., Simmerling C. DNA deformation-coupled recognition of 8-oxoguanine: conformational kinetic gating in human DNA glycosylase // *J. Am. Chem. Soc.* – 2017. – V. 139. – No. 7. – P.2682–2692.
483. Mundle S.T., Delaney J.C., Essigmann J.M., Strauss P.R. Enzymatic mechanism of human apurinic/aprimidinic endonuclease against a THF AP site model substrate // *Biochemistry*. – 2009. – V. 48. – No. 24. – P.19–26.
484. Eckstein F. Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides // *Nucleic Acid Ther.* – 2014. – V. 24. – No. 6. – P.374–387.
485. Wilson D.M., Barsky D. The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA // *Mutat. Res.* – 2001. – V. 485. – No. 4. – P.283–307.
486. Kanno S.I., Kuzuoka H., Sasao S., Hong Z., Lan L., Nakajima S., Yasui A. A novel human AP endonuclease with conserved zinc-finger-like motifs involved in DNA strand break responses // *EMBO J.* – 2007. – V. 26. – No. 8. – P.2094–2103.
487. Lebedeva N.A., Rechkunova N.I., El-Khamisy S.F., Lavrik O.I. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 initiates repair of apurinic/aprimidinic sites // *Biochimie*. – 2012. – V. 94. – No. 8. – P.1749–1753.
488. Lebedeva N.A., Rechkunova N.I., Lavrik O.I. AP-site cleavage activity of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 // *FEBS Lett.* – 2011. – V. 585. – No. 4. – P.683–686.
489. Lebedeva N.A., Rechkunova N.I., Ishchenko A.A., Sapparbaev M., Lavrik O.I. The mechanism of human tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 in the cleavage of AP site and its synthetic analogs // *DNA Repair*. – 2013. – V. 12. – No. 12. – P.1037–1042.
490. Dorival J., Eichman B.F. Human and bacterial TatD enzymes exhibit apurinic/aprimidinic (AP) endonuclease activity // *Nucleic Acids Res.* – 2023. – V. 51. – No. 6. – P.2838–2849.
491. Maher R.L., Wallace S.S., Pederson D.S. The lyase activity of bifunctional DNA glycosylases and the 3'-diesterase activity of APE1 contribute to the repair of oxidized bases in nucleosomes // *Nucleic Acids Res.* – 2019. – V. 47. – No. 6. – P.2922–2931.
492. Saitoh T., Shinmura K., Yamaguchi S., Tani M., Seki S., Murakami H., Nojima Y., Yokota J. Enhancement of OGG1 protein AP lyase activity by increase of APEX protein // *Mutat. Res.* – 2001. – V. 486. – No. 1. – P.31–40.
493. Zharkov D.O., Shoham G., Grollman A.P. Structural characterization of the Fpg family of DNA

- glycosylases // DNA Repair. – 2003. – V. 2. – No. 8. – P.839–862.
494. Kuznetsov N.A., Zharkov D.O., Koval V. V, Buckle M., Fedorova O.S. Reversible chemical step and rate-limiting enzyme regeneration in the reaction catalyzed by formamidopyrimidine-DNA glycosylase // *Biochemistry*. – 2009. – V. 48. – No. 48. – P.11335–11343.
495. Aspinwall R., Rothwell D.G., Roldan-Arjona T., Anselmino C., Ward C.J., Cheadle J.P., Sampson J.R., Lindahl T., Harris P.C., Hickson I.D. Cloning and characterization of a functional human homolog of *Escherichia coli* endonuclease III // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 1997. – V. 94. – No. 1. – P.109–114.
496. Ikeda S., Biswas T., Roy R., Izumi T., Boldogh I., Kurosky A., Sarker A.H., Seki S., Mitra S. Purification and characterization of human NTH1, a homolog of *Escherichia coli* endonuclease III. Direct identification of Lys-212 as the active nucleophilic residue // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – No. 34. – P.21585–21593.
497. Woodrick J., Gupta S., Camacho S., Parvathaneni S., Choudhury S., Cheema A., Bai Y., Khatkar P., Erkizan H.V., Sami F., Su Y., Schärer O.D., Sharma S., Roy R. A new sub-pathway of long-patch base excision repair involving 5' gap formation // *EMBO J.* – 2017. – V. 36. – No. 11. – P.1605–1622.
498. Sidorenko V.S., Nevinsky G.A., Zharkov D.O. Specificity of stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP endonuclease // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2008. – V. 368. – No. 1. – P.175–179.
499. Lee S., Verdine G.L. Atomic substitution reveals the structural basis for substrate adenine recognition and removal by adenine DNA glycosylase // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. – 2009. – V. 106. – No. 44. – P.18497–18502.
500. Rosa S., Fortini P., Karran P., Bignami M., Dogliotti E. Processing in vitro of an abasic site reacted with methoxyamine: a new assay for the detection of abasic sites formed in vivo // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – V. 19. – No. 20. – P.5569–5574.
501. Caimi P.F., Cooper B.W., William B.M., Dowlati A., Barr P.M., Fu P., Pink J., Xu Y., Lazarus H.M., de Lima M., Gerson S.L. Phase I clinical trial of the base excision repair inhibitor methoxyamine in combination with fludarabine for patients with advanced hematologic malignancies // *Oncotarget*. – 2017. – V. 8. – No. 45. – P.79864–79875.
502. Coyne G.O.S., Kummar S., Meehan R.S., Do K., Collins J.M., Anderson L., Ishii K., Takebe N., Zlott J., Juwara L., Piekarz R., Streicher H., Sharon E., Rubinstein L., Voth A.R., Lozier J., Dull A.B., Wilsker D., Hinoue T., et al. Phase I trial of TRC102 (methoxyamine HCl) in combination with temozolomide in patients with relapsed solid tumors and lymphomas // *Oncotarget*. – 2020. – V. 11. – No. 44. – P.3959–3971.
503. Eads J.R., Krishnamurthi S.S., Saltzman J., Bokar J.A., Savvides P., Meropol N.J., Gibbons J., Koon H., Sharma N., Rogers L., Pink J.J., Xu Y., Beumer J.H., Riendeau J., Fu P., Gerson S.L., Dowlati A. Phase I clinical trial of temozolomide and methoxyamine (TRC-102), an inhibitor of base excision repair, in patients with advanced solid tumors // *Invest. New Drugs*. – 2021. – V. 39. – P.142–151.
504. Yudkina A. V, Zharkov D.O. Miscoding and DNA polymerase stalling by methoxyamine-adducted abasic sites // *Chem. Res. Toxicol.* – 2022. – V. 35. – No. 2. – P.303–314.

Приложение 1

Список коммерчески доступных клеточных линий с нокаутом или нокадауном экспрессии генов BER.

Ген	Клеточная линия	Метод получения	Производитель
<i>UNG</i>	ES клетки мыши	Интрон-инсерционный мутагенез (gene trap)	MMRRC (Mutant Mouse Resource and Research Centre)
	HAP1	CRISPR/Cas9	Horizon Discovery
	HeLa	CRISPR/Cas9	Abcam
<i>TDG</i>	ES клетки мыши	Интрон-инсерционный мутагенез	MMRRC
	HAP1	CRISPR/Cas9	Horizon Discovery
<i>SMUG1</i>	HAP1	CRISPR/Cas9	Horizon Discovery
<i>MBD4</i>	HAP1	CRISPR/Cas9	Horizon Discovery
	HeLa	CRISPR/Cas9	Abcam
<i>NTHL1</i>	HAP1	CRISPR/Cas9	Horizon Discovery
<i>OGG1</i>	HAP1	CRISPR/Cas9	Horizon Discovery
	HeLa	Стабильное подавление экспрессии гена с помощью siPHK	Tebu-Bio
<i>MUTYH</i>	HAP1	CRISPR/Cas9	Horizon Discovery
<i>MPG</i>	HAP1	CRISPR/Cas9	Horizon Discovery
<i>NEIL1</i>	293T	CRISPR/Cas9	Abcam
	HAP1	CRISPR/Cas9	Horizon Discovery
	HeLa	Стабильное подавление экспрессии гена с помощью siPHK	Tebu-Bio
<i>NEIL2</i>	HAP1	CRISPR/Cas9	Horizon Discovery
<i>NEIL3</i>	HAP1	CRISPR/Cas9	Horizon Discovery
<i>APEX1</i>	ES клетки мыши	Интрон-инсерционный мутагенез	MMRRC
	A549	CRISPR/Cas9	Abcam
	HAP1	CRISPR/Cas9	Horizon Discovery
	HeLa	Стабильное подавление экспрессии гена с помощью siPHK	Tebu-Bio
<i>POLB</i>	HAP1	CRISPR/Cas9	Horizon Discovery
	HeLa	CRISPR/Cas9	Abcam
	NALM-6	Векторную конструкцию вводили с помощью HR	Horizon Discovery
<i>FEN1</i>	A549	CRISPR/Cas9	Abcam
	HCT116	CRISPR/Cas9	Abcam
	HeLa	Стабильное подавление экспрессии гена с помощью siPHK	Tebu-Bio
	MCF7	CRISPR/Cas9	Abcam
<i>LIG1</i>	HeLa	Стабильное подавление экспрессии гена с помощью siPHK	Tebu-Bio
<i>LIG3</i>	ES клетки мыши	Интрон-инсерционный мутагенез	MMRRC
	HAP1	CRISPR/Cas9	Horizon Discovery
	HeLa	Стабильное подавление экспрессии гена с помощью siPHK	Tebu-Bio
<i>XRCC1</i>	ES клетки мыши	Интрон-инсерционный мутагенез	MMRRC
	HeLa	Стабильное подавление экспрессии гена с помощью siPHK	Tebu-Bio
<i>PARP1</i>	ES клетки мыши	Интрон-инсерционный мутагенез	MMRRC
	293T	CRISPR/Cas9	Abcam
	A549	CRISPR/Cas9	Abcam
	HAP1	CRISPR/Cas9	Horizon Discovery
	HeLa	Стабильное подавление экспрессии гена с помощью siPHK	Tebu-Bio
	MCF7	CRISPR/Cas9	Abcam