

УДК 57.085.23

Метод оценки эффективности работы системы эксцизионной репарации нуклеотидов *ex vivo*

А. А. Попов¹, К. Е. Орищенко^{2,3}, К. Н. Науменко¹, А. Н. Евдокимов¹, И. О. Петрусева¹,
О. И. Лаврик^{1,3*}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

³Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

*E-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 06.02.2021

Принята к печати 23.04.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11430

РЕФЕРАТ Эксцизионная репарация нуклеотидов (ЭРН) – одна из основных систем репарации, которая отвечает за удаление широкого спектра объемных повреждений ДНК. Разработан метод анализа эффективности ЭРН в клетке (*ex vivo*), основанный на восстановлении продукции флуоресцентного белка TagRFP в результате репарации повреждений, блокирующих экспрессию соответствующего гена. Показано, что сконструированные плазмиды, содержащие объемные повреждения nFlu или nAnt вблизи промотора гена *tagrfp*, подвергаются репарации в эукариотических клетках (НЕК 293Т) и могут быть использованы для анализа эффективности ЭРН *ex vivo*. Сравнительный анализ временной зависимости накопления флуоресцентных клеток после трансфекции nFlu- и nAnt-ДНК выявил различия в эффективности их репарации системой ЭРН клеток НЕК 293Т. Разработанный метод может быть использован для сравнения репаративного статуса клеток и эффективности репарации повреждений разной структуры.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА эксцизионная репарация нуклеотидов, методы *ex vivo*, повреждения ДНК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭРН – эксцизионная репарация нуклеотидов; ОДН – олигодезоксирибонуклеотид; АТФ – аденозинтрифосфат; nFlu – N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол; nAnt – N-[6-(9-антраценилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол; MCS – сайт множественного клонирования.

ВВЕДЕНИЕ

Система эксцизионной репарации нуклеотидов (ЭРН) с высокой эффективностью удаляет из ДНК объемные повреждения, возникающие в результате воздействия различных факторов – химически активных соединений, УФ- и рентгеновского излучения. Существуют два типа ЭРН. Общегеномная ЭРН отвечает за поиск и удаление объемных повреждений во всем геноме, независимо от его функционального состояния, используя для первичного распознавания места повреждения комплексы фактора ХРС [1]. ЭРН, связанная с транскрипцией, активируется при блокировании продвижения транскрипционного комплекса РНК-полимеразы II объемным повреждением в транскрибируемой цепи ДНК [2]. Примерно 30 белковых факторов и ферментов, одинаковых для обоих типов ЭРН, формируют затем на ДНК ряд комплексов, осуществляющих удаление повреждения, репаративный синтез и лигирование.

Использование подходов, ориентированных на изучение структуры и функций белков-участников ЭРН, позволило выяснить механизм процесса, определить основные этапы, влияющие на эффективность его протекания, а также состав и структуру мультибелковых комплексов, возникающих и функционирующих на разных этапах ЭРН [1, 3]. Активность эукариотической системы ЭРН *in vitro* в большинстве работ оценивают с использованием протяженных ДНК, содержащих в заданной позиции природные объемные повреждения, либо их синтетические аналоги, а также фракционированные экстракты клеток, содержащие набор белков ЭРН (ЭРН-компетентные экстракты) [4, 5]. Тем не менее, актуальной как для фундаментальных, так и для прикладных исследований остается разработка подходов, нацеленных на исследование и сравнение эффективности протекания репарации объемных повреждений в живых клетках (*ex vivo*).

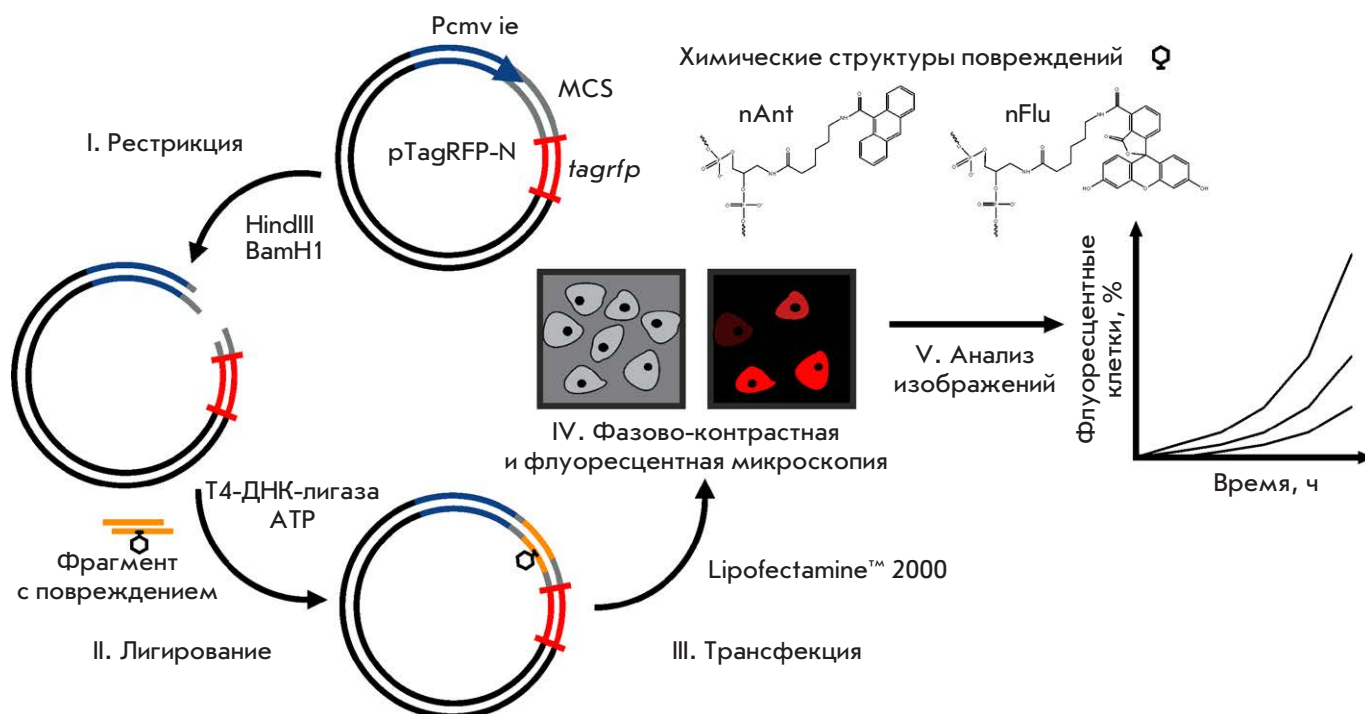


Рис. 1. Схема метода оценки эффективности работы системы ЭРН *ex vivo*

В данной работе приведено описание разработанного нами метода, который позволяет проводить такие оценки с использованием модельных плазмид с объемным повреждением вблизи промоторной области гена, кодирующего флуоресцентный белок TagRFP. Схема создания модельных плазмид с объемным повреждением и оценки эффективности ЭРН *ex vivo* путем наблюдения за результатом восстановления репаративным аппаратом эукариотических клеток экспрессии репортерного флуоресцентного белка, нарушенной присутствием объемного повреждения в ДНК, представлена на рис. 1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки НЕК 293Т культивировали в среде IMDM (Gibco) с добавлением 10% FBS (Gibco), 1% GlutaMAX™ Supplement (Gibco), 10⁵ ед./л пенициллина, 100 мг/л стрептомицина, 2,5 мг/л амфотерицина β, при температуре 37°C и 5% CO₂.

ОДН для создания вставок синтезированы в лаборатории биомедицинской химии (ИХБФМ СО РАН) по методике, описанной в работе [5]. Последовательности ОДН приведены в таблице.

Из плазмиды pTagRFP-N с помощью эндонуклеаз рестрикции HindIII и BamHI («СибЭнзим») вырезали участок длиной 38 п.н. (622–660 п.н., MCS) путем инкубации 1 мкг плазмиды с 1 ед. HindIII и 1 ед. BamHI в буфере W («СибЭнзим») в течение 1 ч при 37°C. После инактивации ферментов (70°C, 20 мин) и осаждения ДНК по стандартной методике [6], линейари-

Последовательности ОДН

№	ОДН
1	5'-P- <i>agctgctgctcatctc</i> gagatctgagtagtacattggattgccattctccgagtgattaccgtagc-3'
2	5'-P- <i>gatccgtcacggtaatacactcggagaatggcaatccaatM1</i> tactcagatctcagatgagcagc-3', где M1 – nFlu
3	5'-P- <i>gatccgtcacggtaatacactcggagaatggcaatccaatM2</i> tactcagatctcagatgagcagc-3', где M2 – nAnt

зованную плазмиду растворяли в воде и добавляли 40-кратный молярный избыток ДНК-вставки, 2 ед. Т4-ДНК-лигазы («СибЭнзим») в SE-буфере и 5 мМ АТФ. Лигирование плазмиды проводили при температуре 12°C в течение 16 ч, затем реакционную смесь прогревали (65°C, 20 мин), а ДНК, содержащуюся в реакционной смеси после лигирования, разделяли в 0.8% агарозном геле. Кольцевую плазмиду с введенными вставками элюировали из агарозного геля с использованием набора для элюции ДНК (diaGene) согласно протоколу производителя.

Трансфекцию клеток плазмидой проводили с помощью Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) согласно протоколу производителя. Клетки рассаживали на 24-луночный планшет в количестве 2.5 × 10⁴ клеток на лунку в 500 мкл культуральной среды, не содержащей антибиотиков. По достижению 50–70% конfluence среды удаляли и добавляли к клеткам комплекс плазмиды (150 нг) с реагентом Lipofectamine™ 2000 в среде, не содержащей сыворотки. Флуоресценцию регистрировали с исполь-

зованием системы для длительного прижизненно-го наблюдения за клетками Cell-IQ MLF (Chip-Man Technologies, Финляндия) в ЦКП клеточных технологий ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Съемку клеток проводили с интервалом 10 мин в режимах фазового контраста и флуоресценции с использованием $\times 10$ объектива Nikon CFI Plan Fluorescence DL. Полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ и программного обеспечения Cell-IQ Analyser.

Статистический анализ осуществляли с помощью программы Statistica 10. Все эксперименты проведены минимум 3 раза, а статистическую значимость определяли, используя *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подход, основанный на реактивации экспрессии флуоресцентных белков после удаления повреждения из ДНК, блокирующего их экспрессию, ранее успешно применяли в исследованиях ЭРН [7, 8]. Мы решили модифицировать этот подход и регистрировать флуоресцентный сигнал в живых клетках с помощью оборудования для прижизненных исследований Cell-IQ MLF, которое сочетает в себе микроскоп с фазово-контрастным и флуоресцентным режимами съемки, а также систему для подачи CO₂ и поддержания температуры, обеспечивающую создание оптимальных для клеток условий при достаточно длительном процессе съемки. Прилагаемое к оборудованию программное обеспечение позволяет анализировать изображения и извлекать информацию об общем количестве и количестве клеток, экспрессирующих флуоресцентные белки, интенсивности флуоресцентного сигнала, подвижности клеток, а также анализировать другие параметры.

Для создания ДНК с объемными повреждениями использовали вектор pTagRFP-N (4.7 т.п.н.), ко-

торый содержит ген *tagrfp*, кодирующий мономерный флуоресцентный белок RFP морских актиний *Entactmaea quadricolor* [9]. Преимущества использования TagRFP заключаются в генерируемом ярком флуоресцентном сигнале, стабильности белка при высоких значениях pH, быстром созревании, а также в отсутствии токсического влияния на клетки. Ген *tagrfp* находится под контролем раннего промотора цитомегаловируса (Pcmv ie), вблизи которого находится сайт множественного клонирования (MCS) с участками узнавания различных эндонуклеаз рестрикции, что дает возможность клонирования необходимой ДНК-вставки в данную область.

Синтезированы рекомбинантные плазмиды, содержащие объемные повреждения nFlu и nAnt (далее nFlu- и nAnt-ДНК соответственно). Выраженные субстратные свойства данных повреждений, выявленные в реакции специфической эксцизии, катализируемой белками ЭРН различных клеточных экстрактов *in vitro* [5, 10], учитывали при использовании nFlu и nAnt для создания модельных плазмид.

Проанализирована эффективность протекания ЭРН nFlu- и nAnt-ДНК в клетках эмбриональной почки человека НЕК 293Т. Оценено время появления клеток, флуоресценция которых свидетельствовала о восстановлении экспрессии белка TagRFP (рис. 2). В качестве контроля использовали плазмиду, содержащую ДНК-вставку без объемного повреждения. Оценка количества флуоресцентных клеток в общей популяции клеток с помощью Cell-IQ Analyser и ImageJ выявила различия в эффективности репарации nAnt- и nFlu-ДНК. В случае клеток, для трансфекции которых использовали nAnt-ДНК, первые флуоресцентные клетки можно было наблюдать через 10 ч после трансфекции, в то время как в случае nFlu-ДНК время появления первых флуоресцент-

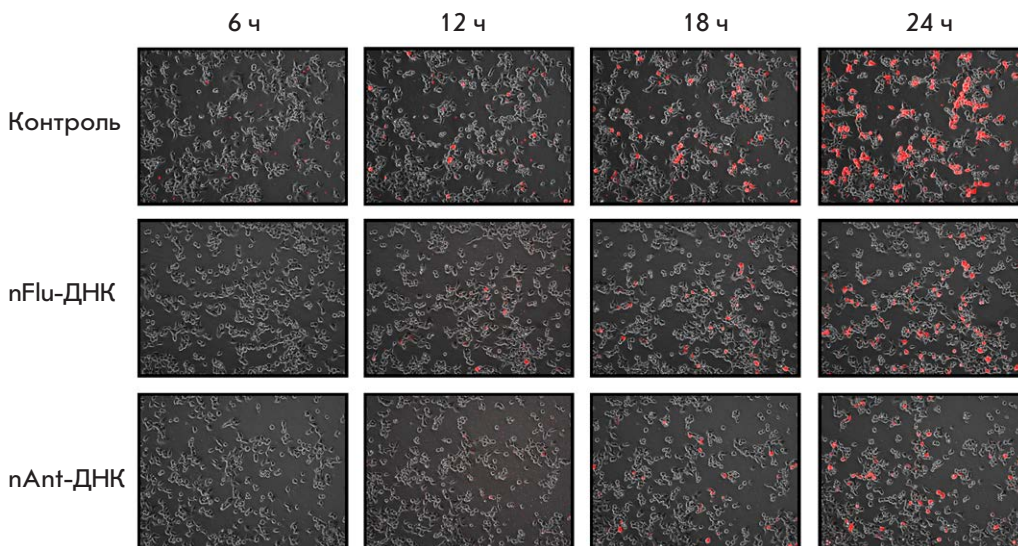


Рис. 2. Экспрессия TagRFP в клетках НЕК 293Т, трансфицированных плазмидными ДНК. Представленные изображения получены путем наложения флуоресцентных и фазово-контрастных снимков с помощью ImageJ. Слева указаны типы плазмидных ДНК-субстратов; сверху – время после трансфекции клеток

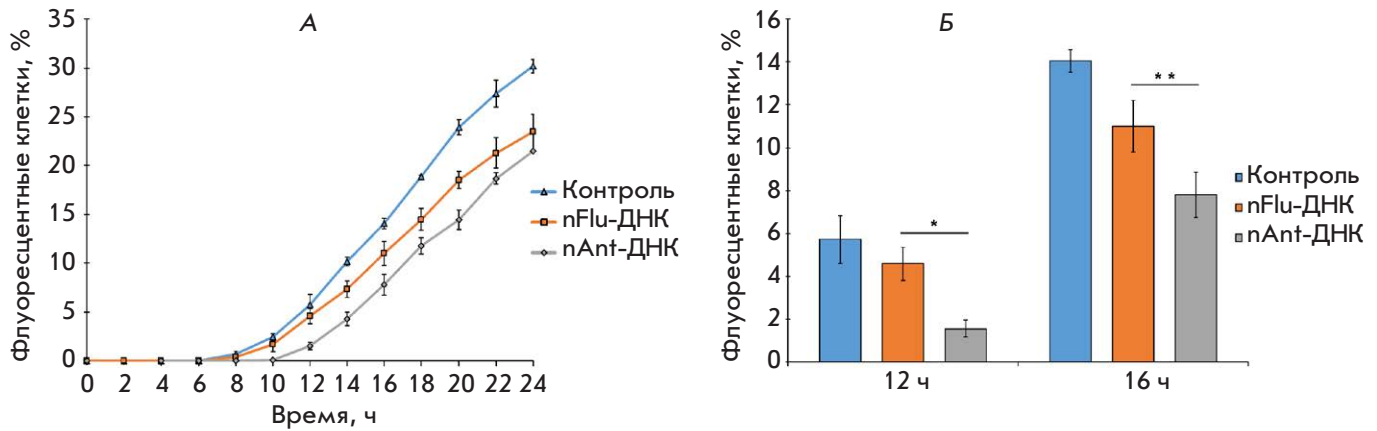


Рис. 3. Анализ эффективности ЭРН плазмидных ДНК *ex vivo* в клетках НЕК 293Т. А – график изменения количества флуоресцентных клеток (%) во времени после трансфекции плазмидными ДНК; Б – репрезентативная диаграмма, демонстрирующая различия в количестве флуоресцентных клеток, трансфицированных nFlu- или nAnt-ДНК, через 12 и 16 ч после трансфекции. Статистические уровни значимости соответствуют * $p < 0.01$ и ** $p < 0.05$

ных клеток составило 8 ч (рис. 3А). Через 12 ч после трансфекции клеток nAnt-ДНК количество флуоресцентных клеток составило $1.56 \pm 0.39\%$, в то время как в случае nFlu-ДНК количество флуоресцентных клеток составило $4.59 \pm 0.76\%$ (рис. 3Б). Для достижения близкого количества флуоресцентных клеток, трансфицированных nAnt-ДНК, потребовалось еще 2 ч, и через 14 ч оно составило $4.27 \pm 0.67\%$.

Репарация nFlu-ДНК проходит быстрее, чем nAnt-ДНК, что согласуется с результатами изучения репарации nAnt- и nFlu-содержащих ДНК-дуплексов *in vitro* в присутствии белков ЭРН-компетентных экстрактов различных линий раковых клеток (HeLa, SiHa, С33А) [5].

Существует много факторов, определяющих разницу в эффективности удаления объемных повреждений системой ЭРН. Это могут быть структурные различия повреждений, определяющие характер первичного узнавания поврежденного участка и эффективность последующей верификации повреждения белками комплекса ТРПН [11], а также скорость и эффективность ответа системы ЭРН различных

клеток на повреждающее воздействие. Дальнейшее изучение ЭРН с использованием комбинации методов *in vitro* и *ex vivo* может способствовать значительному прогрессу в понимании функционирования данного процесса в клетках эукариот.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-10056), получение и анализ изображений частично выполнены в рамках бюджетного проекта № 0259-2021-0011.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schärer O.D. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013. V. 5. № 10. P. 1–20.
- Svejstrup J.Q. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2002. V. 3. № 1. P. 21–29.
- Luijsterburg M.S., von Bornstaedt G., Gourdin A.M., Politi A.Z., Moné M.J., Warmerdam D.O., Goedhart J., Vermeulen W., van Driel R., Höfer T. // J. Cell Biol. 2010. V. 189. № 3. P. 445–463.
- Reardon J.T., Sancar A. // Methods Enzymol. 2006. V. 408. P. 189–213.
- Evdokimov A., Petrusheva I., Tsidulko A., Koroleva L., Serpokylova I., Silnikov V., Lavrik O. // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41. № 12. P. 1–10.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor University Press, 2001. 2231 p.
- Kitsera N., Gasteiger K., Lühnsdorf B., Allgayer J., Epe B., Carell T., Khobta A. // PLoS One. 2014. V. 9. № 4. P. 1–6.
- Kitsera N., Rodriguez-Alvarez M., Emmert S., Carell T., Khobta A. // Nucl. Acids Res. 2019. V. 47. № 16. P. 8537–8547.
- Merzlyak E., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M., Shcheglov A., Fradkov A., Gaintzeva A., Lukyanov K., Lukyanov S., Gadella T.W.J., et al. // Nat. Methods. 2007. V. 4. № 7. P. 555–557.
- Lukyanchikova N., Petrusheva I., Evdokimov A., Silnikov V., Lavrik O. // Biochem. 2016. V. 81. № 3. P. 263–274.
- Batty D.P., Wood R.D. // Gene. 2000. V. 241. № 2. P. 193–204.