

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«НОВОСИБИРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
УНИВЕРСИТЕТ» (НОВОСИБИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ, НГУ)

Факультет естественных наук

Кафедра молекулярной биологии и биотехнологии

Направление подготовки: 04.04.01. Химия

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

Земерова Татьяна Петровна

(Фамилия, Имя, Отчество автора)

Тема работы Оценка статуса системы эксцизионной репарации оснований ДНК в
экстрактах клеток голого землекопа

«К защите допущена»

Зам. зав. кафедрой,

к.х.н., проф.

Мызина С. Д. /.....

(фамилия, И., О.) / (подпись)

«.....».....20...г.

Научный руководитель

к.х.н.

н.с., ИХБФМ СО РАН

Кутузов М.М. /.....

(фамилия, И., О.) / (подпись)

«.....».....20...г.

Новосибирск, 2018

Оглавление:

1. Список сокращений	5
2. Введение.....	6
3. Литературный обзор.....	8
3.1. Продолжительность жизни млекопитающих	8
3.2. Биологические особенности голого землекопа	9
3.3. Грызуны как модели для сравнительных исследований старения	12
3.4. Межвидовые сравнительные исследования, связанные с продолжительностью жизни и механизмами подавления опухолей	13
3.4.1. Теломерное поддержание и репликативное старение	13
3.4.2. Механизмы, контролирующие клеточную пролиферацию	14
3.4.3. Механизмы подавления опухолей	14
3.4.4. Стабильность генома	15
3.5. Репарация ДНК.....	16
3.5.1. Основные типы повреждений ДНК и пути репарации	16
3.5.2. Репарация ДНК и продолжительность жизни млекопитающих.....	19
3.5.3. Эксцизионная репарация оснований	21
4. Материалы и методы	26
4.1. Список материалов.....	26
4.2. Сравнение уровня мРНК в генах <i>Parp1</i> , <i>Parp2</i> , <i>Apex1</i> , <i>Xrcc1</i> , <i>Lig3</i> и <i>Polβ</i> в клетках голого землекопа и доменной мыши методом кПЦР.....	26
4.2.1. Приготовление растворов для ПЦР	28
4.2.2. Построение стандартных кривых	28
4.2.3. Определение относительного уровня экспрессии генов в клетках голого землекопа и доменной мыши	29
4.3. Функциональные тесты на определение активности ферментов репарации ДНК с использованием в качестве субстратов ДНК-дуплексы содержащие dUMP.....	30
4.3.1. [³² P]-мечение олигонуклеотидов по 5'-концу	30
4.3.2. Приготовление ДНК-дуплексов, содержащих dUMP.....	30

4.3.3. Выделение цельноклеточных экстрактов из фибробластов голого землекопа и домовой мыши	31
4.3.4. Определение урацил-ДНК-гликозилазной активности клеточных экстрактов голого землекопа и домовой мыши.....	31
4.3.5. Получение ДНК-дуплексов, содержащих АП-сайт	31
4.3.6. Определение АП-эндонуклеазной активности клеточных экстрактов голого землекопа и домовой мыши	32
4.3.7. Приготовление ДНК-дуплекса, содержащего одноцепочечный разрыв с 5'-dRP и 3'-ОН	32
4.3.8. Определение активности ДНК-полимеразы β в экстрактах клеток голого землекопа и домовой мыши	32
4.3.9. Определение флэп-эндонуклеазной активности в экстрактах клеток голого землекопа и домовой мыши	33
4.3.10. Определение ДНК-лигазной активности экстрактов клеток голого землекопа и домовой мыши	33
4.3.11. Синтез [32 P]-меченого NAD ⁺	33
4.3.12. Определение активности PARP в экстрактах клеток голого землекопа и домовой мыши	34
5. Результаты и их обсуждение	35
5.1. Сравнение относительного уровня экспрессии генов <i>Apex1</i> , <i>Xrcc1</i> , <i>Lig3</i> , <i>Polβ</i> , <i>Parp1</i> , <i>Parp2</i> в клетках голого землекопа и домовой мыши	35
5.2. Определение активности ферментов эксцизионной репарации ДНК с использованием экстрактов клеток голого землекопа и домовой мыши, облученных УФ	38
5.2.1. Сравнение урацил-ДНК-гликозилазной активности экстрактов клеток голого землекопа и домовой мыши	38
5.2.2. Сравнение АП-эндонуклеазной активности экстрактов клеток голого землекопа и домовой мыши	39
5.3. Определение активности ферментов эксцизионной репарации ДНК с использованием дуплексов, имитирующих кластерные повреждения	40

5.3.1. Эффективность выщепления урацила из ДНК-дуплексов в клеточных экстрактах голого землекопа и домовой мыши в моделях кластерных повреждений..	41
5.3.2. Эффективность расщепления АП-сайтов в экстрактах клеток голого землекопа и домовой мыши	42
5.3.3. ДНК-полимеразная активность клеточных экстрактов голого землекопа и домовой мыши	44
5.3.4. Флэп-эндонуклеазная активность клеточных экстрактов голого землекопа и домовой мыши	45
5.3.5. ДНК-лигазная активность экстрактов клеток голого землекопа и домовой мыши	47
5.3.6. Эффективность поли(АДФ-рибозил)ирования клеточных экстрактов голого землекопа и домовой мыши	48
6. Выводы.....	50
7. Список литературы.....	51

1. Список сокращений

5'dRP – 5'-дезоксирибофосфат
Act β – β -актин
APC – антипротеазный коктейль
APE1 – АП-эндонуклеаза 1
BER – эксцизионная репарация оснований (base excision repair)
DEAE – диэтиламиноэтил
dUMP – дезоксирибоурацилмонофосфат
FEN1 – флэп-эндонуклеаза 1
GAPDH – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа
Lig3 – ДНК-лигаза III
LigI – ДНК-лигаза I
NAD⁺ - никотинамиддинуклеотид
NER – эксцизионная репарация нуклеотидов
NMAT - никотинмононуклеотидаденилинтрансфераза
NMN – никотинамидмононуклеотид
PARP1 – поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1
PARP2 – поли(АДФ-рибоза)-полимераза 2
PCNA – ядерный антиген пролиферирующей клетки
Pol β – ДНК-полимераза β
Tub β – β -тубулин
UDG – урацил-ДНК-гликозилаза
XRCC1 – белок комплементарности к рентгеновскому излучению группы 1
АП-сайты – апуриновые-апиримидиновые сайты
АТФ – аденозинтрифосфат
БСА – бычий сывороточный альбумин
КПЖ – коэффициент продолжительности жизни
кПЦР – количественная ПЦР
ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией
ПААГ – полиакриламидный гель
ПЦР – полимеразная цепная реакция
ТХУ – трихлоруксусная кислота
ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

2. Введение

Вопрос о том, какие процессы в живых организмах ведут к старению и последующей смерти, волнует человечество долгое время. Некоторые виды животных эволюционировали таким образом, что в результате имеют высокую продолжительность жизни и замедленное старение. Одним из таких видов является голый землекоп (*Heterocephalus glaber*), который представляет огромный интерес для научного сообщества ввиду того, что имеет продолжительность жизни, превышающую продолжительность жизни других грызунов аналогичного размера примерно в 8 раз. При этом эти животные показывают низкую предрасположенность к раку и менее выраженные признаки старения, которые наблюдаются у других животных с увеличением возраста.

Так как одной из наиболее естественных причин старения и возникновения рака являются повреждения ДНК и мутации, которые являются результатом этих повреждений, поддержание целостности генома является одним из важнейших факторов, определяющих продолжительность жизни. Геном в клетках живых организмов поддерживается в целостности с помощью репарации ДНК, поэтому эти процессы являются значимыми для высокой продолжительности жизни, а гены, кодирующие белки, участвующие в репарации ДНК, являются объектами повышенного интереса для исследований в этой области.

В данной работе мы сфокусировали свое внимание на изменении уровня экспрессии генов, кодирующих ряд ключевых белков эксцизионной репарации оснований ДНК, в клетках голого землекопа, а также на эффективности функционирования белков этой системы в сравнении с клетками домовой мыши.

Цель работы:

провести сравнительный анализ статуса системы эксцизионной репарации оснований ДНК в клетках голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) и домовой мыши (*Mus musculus*).

Задачи:

1. Оценить уровень мРНК генов *Parp1*, *Parp2*, *Apex1*, *Xrcc1*, *Lig3* и *Polβ* в клетках голого землекопа и домовой мыши после обработки УФ-излучением;
2. При помощи функциональных тестов сравнить активность ключевых ферментов, участвующих в эксцизионной репарации оснований, в экстрактах клеток голого землекопа и домовой мыши.

Дипломником была проведена вся экспериментальная часть, описанная в работе, с обработкой результатов. Используемые в работе тотальные РНК из фибробластов голубого землекопа и домовый мышьяк были предоставлены сотрудниками лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН, культуры клеток были выращены в ИМКБ СО РАН, там же были проведены операции по их облучению УФ. Все олигонуклеотиды, использованные в работе, были синтезированы в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН. $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ для радиоактивного мечения олигонуклеотидов и NAD^+ были синтезированы в лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН. Ферменты, использованные в работе, вместе с буферными компонентами, были предоставлены сотрудниками лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН. Обсуждение результатов работы проводилось с Кутузовым М. М.

3. Литературный обзор

У разных млекопитающих продолжительность жизни различается более чем в 100 раз, и механизмы, которые ведут к таким различиям в продолжительности жизни, еще продолжают изучать. В ходе эволюции у животных выработались механизмы, которые позволили им выживать в различных условиях. Эти генетические адаптации также могли случайно создать фенотипы, которые позволили животным иметь большую продолжительность жизни. Одним из примеров такого явления является крайне долгоживущий подземный грызун – голый землекоп (*Heterocephalus glaber*), который отлично переносит недостаток кислорода и избыток углекислого газа [1] и устойчив ко многим видам токсинов [2]. Также его организм не предрасположен к образованию раковых опухолей и с увеличением возраста почти не показывает видимых признаков старения: у него сохраняется мышечная масса и костная структура [3], а также сердечная функциональность [4]. Выяснение механизмов, которые порождают такие фенотипы, может привести к лучшему пониманию экофизиологии и биологии старения подземных животных, поэтому голые землекопы представляют огромный интерес для исследований в выяснении механизмов, определяющих продолжительность жизни.

3.1. Продолжительность жизни млекопитающих

Максимальная продолжительность жизни млекопитающих варьируется от 2 лет у короткохвостой землеройки до 211 лет у гренландского кита [5]. Было выяснено, что максимальная продолжительность жизни животных положительно коррелирует с их массой тела и величиной периода взросления и негативно коррелирует со скоростью их размножения, масс-специфичной степенью метаболизма и количеством потомства [6].

Подобно скорости метаболизма, аллометрическая взаимосвязь между разными видами млекопитающих может быть определена таким образом, что максимальная продолжительность жизни изменяется в зависимости от размера тела. На основании нескольких тысяч наземных млекопитающих, живущих в неволе, при каждом удвоении средней массы у вида потенциально максимальная продолжительности жизни увеличивается на 16%. Эти аллометрические данные могут быть дополнительно обработаны для определения коэффициента продолжительности жизни (КПЖ) или зависимости между продолжительностью жизни, которая предсказывается по размеру тела, и фактически наблюдаемой продолжительности жизни вида. Организм считается долгоживущим, если у него КПЖ больше, чем 2. Основываясь на этом определении долгоживущих организмов, несколько видов в результате эволюции независимо друг от

друга выработали высокую продолжительность жизни, в их число входят человек, ехидны и голый землекоп, у которых КПЖ равно 4, так как их продолжительность жизни примерно в 4 раза выше рассчитанной [7].

Ранее в исследованиях предполагалось, что долгоживущие виды обычно имеют повышенную способность к репарации ДНК [8], повышенную поли(АДФ-рибоза)-полимеразную активность [9], повышенный уровень экспрессии генов эксцизионной репарации оснований и супероксидных метаболических процессов [10], равно как и пониженный уровень производимых свободных радикалов и окислителей [11],[12] и меньший уровень окислительного стресса ядерной и митохондриальной ДНК [13],[14]. В клетках долгоживущих видов наблюдался повышенный уровень экспрессии генов, вовлеченных в репарацию ДНК и метаболизм глюкозы, тогда как активность протеолиза и переноса белков была подавлена [15].

3.2. Биологические особенности голого землекопа

Голый землекоп (Рис.1.) является строго подземным и крайне долгоживущим эусоциальным млекопитающим [16]. Несмотря на размер, сравнимый с размером мыши, его максимальная продолжительность жизни превышает 30 лет, таким образом делая его

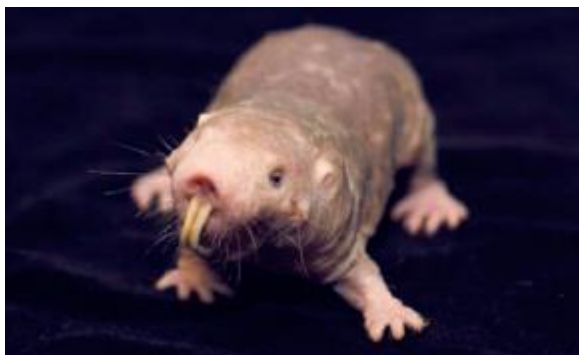


Рис. 1. Голый землекоп.

наиболее долгоживущим грызуном. Голый землекоп показывает почти полное отсутствие видимого процесса старения, отсутствие роста смертности с возрастом и высокую плодовитость на протяжении всей жизни [17]. В дополнение к задержанному старению, голые землекопы проявляют повышенную устойчивость как к спонтанному раку, так и к экспериментально индуцированному онкогенезу [18,19]. Несмотря на значительный окислительный стресс в неволе [20], протеом голого землекопа не показывает возрастной восприимчивости ни к окислительным повреждениям, ни к повышенному убиквитинированию [21]. В геноме голого землекопа наблюдается повышенная экспрессия генов, связанных с эндоплазматическим ретикуломом и митохондриальным матриксом, что также дает высокую защиту от активных форм кислорода и сопутствующих повреждений ДНК [22]. Также у голых землекопов наблюдается более высокий уровень сигнальной активности NRF2, которая играет роль в защите клеток, протеостазе и ксенобиотическом метаболизме

и также инициирует транскрипцию антиокислительных элементов (антиоксиданты, молекулярные шапероны и протеосомные субъединицы) [23].

Голые землекопы в природе обитают в крупных колониях с единственной размножающейся самкой, «королевой» [24]. Они живут в полной темноте, при низком содержании кислорода и высоких концентрациях углекислого газа, не способны поддерживать термогенез и чувствовать некоторые типы боли [25]. Они также устойчивы к широкому спектру токсинов, включая тяжелые металлы, ДНК-повреждающие агенты и химиотерапевтические средства [2].

У голого землекопа был выявлен низкий уровень общего метаболизма относительно других млекопитающих, который не меняется с возрастом [3], что, предположительно, работает для них как адаптивная стратегия для выживания при ограниченных ресурсах и низком содержании кислорода. В метаболизме млекопитающих важную роль играют тироидные гормоны, уровень которых (триоксин и трийодтиронин) у голого землекопа оказался пониженным [26]. Физически возможным такой уровень метаболизма делает их низкая температура тела (около 32°C), которую голые землекопы не поддерживают постоянной, в отличие от других млекопитающих похожего размера [27].

По результатам секвенирования генома голого землекопа, показан меньший уровень однонуклетидных полиморфизмов из-за CpG мутаций (возможно, благодаря низкой плотности CpG в геноме), что означает меньший уровень метилирования, способствуя меньшему генетическому разнообразию. У него наблюдается пониженная степень замены нуклеотидов в генах, отвечающих за поддержание генома, что тоже рассматривается как стабилизирующий механизм, положительно влияющий на продолжительность жизни и меньшую склонность к образованию раковых опухолей [29]. Повышенная экспрессия генов *SEBRγ* и *TINF2* предполагает лучшую защиту от источников клеточного стресса и специфичный контроль теломеразной активности и передачи сигнала о повреждениях ДНК [28]. Также у голых землекопов предположена возможность параллельной эволюции богатого пролином домена у p53 с добавлением пролинов и RXXR-мотивов для повышенного ответа на повреждения ДНК [29].

При денатурирующем гель-электрофорезе 28S рРНК у голого землекопа было обнаружено, что она распадается на два фрагмента разного размера. Предполагается возможность, что измененная рибосомальная структура влияет на более высокую точность трансляции белков, основываясь на наблюдениях, показывающих, что точность трансляции белков у голых землекопов выше, чем у мышей [30].

При анализе активности ферментов TPI и PPDx1, которые обычно карбонируются при старении, было обнаружено, что у голых землекопов проявляется высокая активность и меньшая склонность к образованию невосстанавливаемых олигомеров высокого порядка по сравнению с мышами. Такая особенность свидетельствует о более защищенной клеточной среде у голых землекопов, что в свою очередь подкрепляет качество функционирования ферментов [31]. Высокая протеасомная активность у голых землекопов отражает то, что у них мгновенно удаляются окисленные и «неправильные» белки, в результате чего у них хорошо поддерживается белковый гомеостаз [21]. У голого землекопа была обнаружена повышенная экспрессия гена $\alpha 2$ -макроглобулина, который предположительно играет важную роль при старении и опухолеобразовании, выступая в качестве пан-протеазного ингибитора [32].

Также в качестве противоракового механизма у голого землекопа наблюдается гиперчувствительное контактное торможение, которое опосредуется тем, что клетки животных при контакте друг с другом тормозят свою пролиферацию. Активатором контактного ингибирования в клетках голого землекопа является гиалуроновая кислота, главный небелковый компонент внеклеточного матрикса [33]. В нормальных тканях присутствует высокомолекулярная гиалуроновая кислота, которая формирует высоковязкую сеть, а в местах воспалений и опухолей она представлена в низкомолекулярной форме. Обе эти формы гиалуроновой кислоты связываются с рецептором CD44, но запускают разные биологические процессы. Высокомолекулярная гиалуроновая кислота, связанная с CD44, тормозит клеточный цикл, подавляя митогенный сигнал. В противовес этому, низкомолекулярная гиалуроновая кислота, связанная с CD44, содействует продвижению клеточного цикла. Высокомолекулярная гиалуроновая кислота проявляет противовоспалительные свойства, а низкомолекулярная – содействует пролиферации и воспалению [34]. Таким образом, высокомолекулярная форма имеет противораковую активность, а низкомолекулярная – может провоцировать образование опухолей. Ткани голого землекопа содержат гиалуроновую кислоту с крайне высокой молекулярной массой (в 5 раз выше, чем у мышей и людей). Известно, что клетки голого землекопа не могут быть злокачественно трансформированы комбинацией онкобелков, которые вызывают формирование опухолей в клетках мышей [18]. Однако, когда ген *Has2*, ответственный за синтез гиалуроновой кислоты, выключается, или, когда ген *Hyal2*, ответственный за разрушение гиалуроновой кислоты, сверхэкспрессируется, опухоли в клетках голого землекопа образуются с большей частотой [33]. Полученные данные свидетельствуют о том, что высокомолекулярная гиалуроновая кислота является ключевым фактором в устойчивости этого вида к образованию раковых опухолей.

3.3. Грызуны как модели для сравнительных исследований старения

Грызуны являются наиболее распространенными млекопитающими на земле (~40% видов млекопитающих относятся к этому отряду). Они являются идеальной группой видов для сравнительных исследований старения. Эти животные являются филогенетически родственными, но их продолжительность жизни чрезвычайно разнообразна и колеблется от 3-4 лет у мышей и крыс, до > 20 лет у палестинских слепышей, бобров, дикобразов и белок и > 30 лет у голых землекопов (Рис.2) [35].

Самые долгоживущие грызуны: голые землекопы, палестинские слепыши, бобры, дикобразы и белки, - принадлежат к различным филогенетическим группам, что указывает на то, что медленное старение независимо развилось, по крайней мере, у четырех видов грызунов [36]. Грызуны также заметно различаются по массе тела. Самые маленькие грызуны, такие как мыши, имеют среднюю массу тела 20-30 г, тогда как самый крупный грызун капибара весит 55 кг. Это разнообразие полезно для сравнительного исследования старения, так как многие признаки, связанные со старением, показывают зависимость от массы тела [37,38].

Процесс старения у грызунов, аналогично старению людей, связан с увеличением

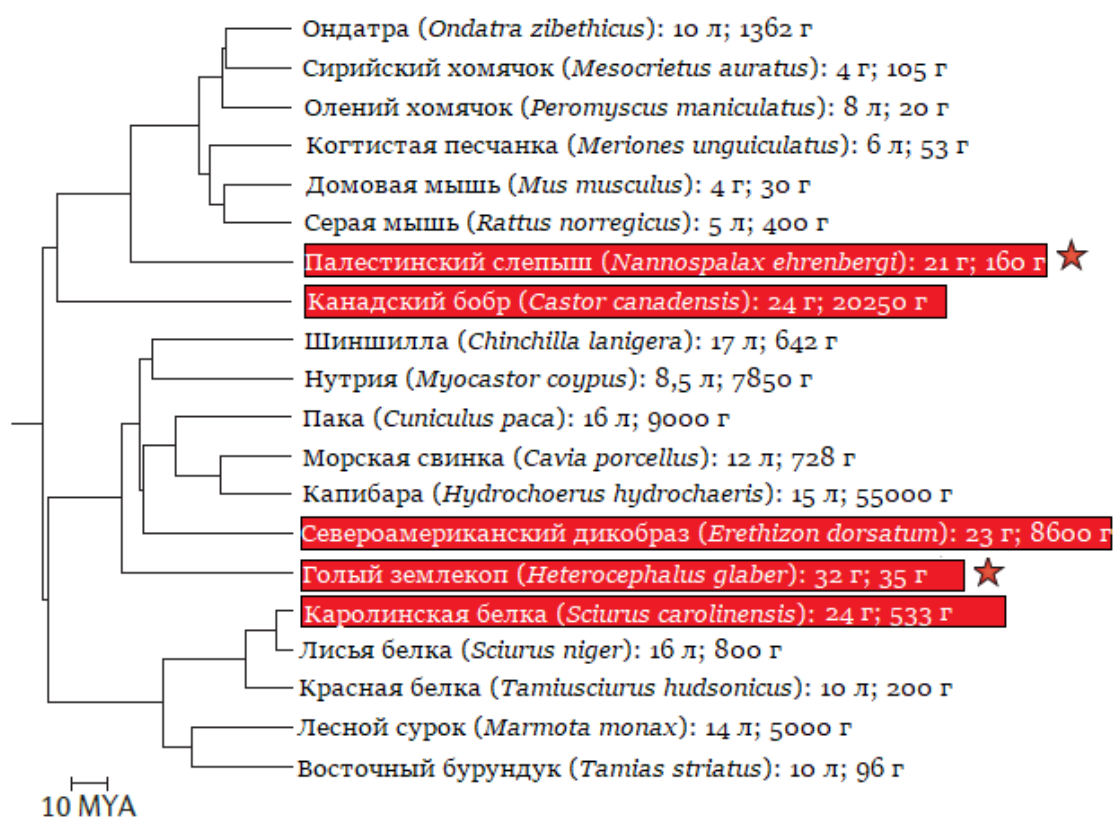


Рис.2. Виды грызунов с максимальной продолжительностью жизни (в годах) и средней массой тела (в граммах). Красным цветом выделены виды с максимальной продолжительностью жизни >20 лет. Звездами выделены виды с низкой предрасположенностью к раку [53].

случаев заболеваемости. Это особенно актуально для онкологических заболеваний, которые являются распространенными среди престарелых животных. Короткоживущие грызуны, такие как мыши и крысы, в отличие от голых землекопов, подвержены онкологическим заболеваниям, у некоторых видов степень заболеваемости может достигать 95% [39]. Это неравенство в показателях заболеваемости раком между видами, которые так тесно связаны филогенетически, предлагает уникальную возможность понять, как устойчивость к раковым заболеваниям может быть достигнута у этих родственных видов и, возможно, у млекопитающих в целом.

3.4. Межвидовые сравнительные исследования, связанные с продолжительностью жизни и механизмами подавления опухолей

3.4.1. Теломерное поддержание и репликативное старение

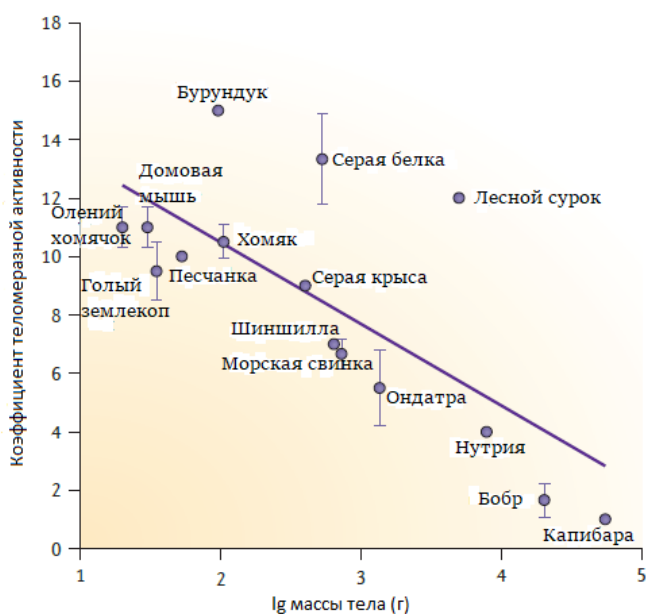


Рис.3. Зависимость теломеразной активности от массы тела грызунов [53].

Постоянное ограничение пролиферации клеток, вызываемое прогрессирующим сокращением теломер, так называемое репликативное старение, является одним из ключевых противораковых механизмов у людей [40]. Теломеразная активность подавлена в соматических тканях человека, но активна у мышей. Было мнение, что долгоживущие виды выработали подавление активности теломеразы, чтобы обеспечить репликативное старение. Эта гипотеза была проверена с использованием сравнительного анализа 15 видов грызунов с разной продолжительностью жизни. Неожиданно, было обнаружено, что активность теломеразы не коррелирует с продолжительностью жизни, но коррелирует с массой тела [38] (Рис.3.). Во время эволюции у более крупных животных (с массой тела > 10 кг), как правило, снижена теломеразная активность в соматических клетках, чтобы уменьшить риск развития рака, вызванный большим числом клеток. В соответствии с репрессированной активностью теломеразы фибробласты крупных грызунов подвергаются репликативному старению при культивировании *in vitro* [41] (Рис.4.).

3.4.2. Механизмы, контролирующие клеточную пролиферацию

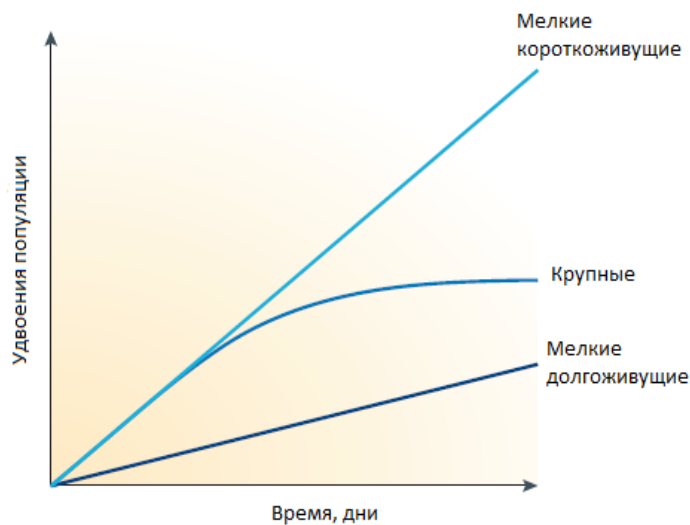


Рис.4. Характеристика клеточной пролиферации у грызунов с разной массой тела и максимальной продолжительностью жизни [53].

Аналогично эволюции репликативного старения как механизма подавления развития опухолей для противодействия повышенному риску рака из-за увеличения массы тела, также ожидается, что будут развиваться механизмы подавления опухолей для противодействия повышенному риску рака у организмов с более высокой продолжительностью жизни. Интересно, что несмотря на

отсутствие репликативного старения, маленькие грызуны с малой и большой продолжительностью жизни показывают поразительное различие между собой: клетки у видов небольшого размера с невысокой продолжительностью жизни демонстрируют большую скорость пролиферации *in vitro*, тогда как клетки из видов небольшого размера с более длинной продолжительностью жизни (> 10 лет) размножаются намного медленнее *in vitro* [41] (Рис.4.). Фибробласты *in vivo* делятся не так часто, как *in vitro*, где избыточная пролиферация индуцируется факторами роста, которые присутствуют в сыворотке в культуральной среде. Таким образом, рост *in vitro* может быть дополнительным тестом на восприимчивость к злокачественной трансформации. Медленный рост фибробластов из долгоживущих видов *in vitro*, вероятно, будет отражать более строгие механизмы контроля клеточного цикла, которые ограничивают сверхпролиферацию клеток. Это свидетельствует о том, что клетки мелких долгоживущих грызунов, у которых отсутствует репликативное старение, разработали альтернативные механизмы подавления опухолей, которые замедляют рост клеток *in vitro* и которые могут предотвратить пролиферацию предварительно злокачественных клеток *in vivo* [36].

3.4.3. Механизмы подавления опухолей

Анализ разнообразных видов грызунов предлагает набор правил, согласно которым увеличение риска возникновения рака, который вызван большой массой тела или высокой продолжительностью жизни, приводит к эволюции механизмов подавления опухолей. И масса тела, и продолжительность жизни вносят вклад в эволюцию механизмов подавления

опухолей, но по-разному. Масса тела более 10 кг совмещена с репликативным старением, тогда как продолжительность жизни более 10 лет связана с эволюцией более жестких механизмов клеточного цикла, которые повышают чувствительность клеток к условиям роста и проявляют медленную клеточную пролиферацию в культуре. Репликативное старение, несмотря на то, что является мощным противораковым механизмом, также способствует старению тканей через накопление стареющих клеток [42]. Таким образом, долгоживущие виды небольших размеров являются свободными от состаривающего эффекта репликативного старения, будучи защищенными от рака через альтернативные механизмы.

3.4.4. Стабильность генома

Поддержание целостности генома относится к числу наиболее важных функций клетки. Накопление повреждений ДНК и мутаций у многоклеточных организмов увеличивает риск развития рака и связано со старением [43]. Основные функции поддержания генома включают контроль клеточного цикла, регуляцию клеточной смерти и старения и передачи сигналов о повреждении ДНК. Пути репарации ДНК высококонсервативны, и из-за критической важности для выживания клеток и целостности генома репарация ДНК давно считается одним из определяющих факторов долголетия [44].

Способность поддержания генома долгое время связывали с эволюцией видоспецифичной максимальной продолжительности жизни [45]. Например, клетки короткоживущих видов, таких как мыши и крысы, в меньшей степени способны восстанавливать повреждения ДНК, индуцированные ультрафиолетовым светом, или двухцепочечные разрывы в ДНК, чем клетки человека [46,47]. Скорость мутаций генов у мышей значительно выше, чем у голых землекопов или человека [28]. Из-за крайне высокой продолжительности жизни и низкой предрасположенности к раку у голых землекопов предполагается, что эти характеристики были обусловлены, по крайней мере частично, на более эффективном поддержании генома, которое могло быть опосредовано более высокими уровнями экспрессии генов, участвующих в репарации ДНК. По результатам секвенирования РНК из клеток печени человека, голого землекопа и мыши, уровень экспрессии генов, кодирующих ферменты репарации ядерной ДНК, действительно значительно выше у человека и голого землекопа, чем у мыши, и таким образом можно сказать, что большинство сигнальных путей репарации ДНК в лучшей степени работают в долгоживущих видах [44].

3.5. Репарация ДНК

3.5.1. Основные типы повреждений ДНК и пути репарации

Целостность генома представляет огромную важность для жизнедеятельности живых организмов. Повреждения в ДНК постоянно наносятся огромным числом экзогенных и эндогенных агентов, и при сохранении в геноме приводят к серьезным последствиям. В частности, повреждения ДНК нарушают комплементарное взаимодействие оснований (Рис.5. А), что вызывает мутации, которые могут привести к образованию раковых опухолей, а при попадании в клеточный цикл приводят к гибели клетки.

Гликозидная связь между азотистым основанием и дезоксирибозой особенно чувствительна к кислотному гидролизу, в результате которого в данном случае образуются АП-сайты (Рис.5. Б, 1). АП-сайты являются одними из самых распространенных повреждений ДНК, в геноме млекопитающих образуется около 10 тысяч таких повреждений в день [48]. Так как азотистые основания содержат в себе генетическую информацию, их потеря может привести либо к синтезу новой цепи ДНК в обход повреждения, что может привести к ошибкам, либо к остановке ДНК- или РНК-полимеразы во время репликации и транскрипции [49,50], поэтому эти повреждения могут вызывать мутации, хромосомную нестабильность и дефекты в экспрессии генов. АП-сайты химически нестабильны, и под действием высокой температуры, нуклеофильной атаки и ионов Mg^{2+} на их месте могут возникать одноцепочечные разрывы [51]. Еще одной гидролитической реакцией является дезаминирование азотистых оснований, что может привести к ошибкам в генетическом коде. Ярким примером здесь является образование урацила (Рис.5. Б, 2) в результате дезаминирования цитозина, в геноме человека случается несколько сотен таких повреждений в день [52]. Повреждающие ДНК агенты также образуются в результате окислительного метаболизма в клетках, такими агентами являются активные формы кислорода (пероксид водорода, кислородные радикалы, супероксиды и т.д.), которые могут окислять азотистые основания и разрушать сахарофосфатый остов, приводя к разрывам в цепи ДНК. Окислительные повреждения ДНК (8-оксогуанин, тимингликоль (Рис.5. Б, 3,4) и т.д.) могут привести к мутациям, а также к блоку репликации и транскрипции [53]. Доноры метильной группы, участвующие в ферментативных процессах (S-аденозилметионин (Рис.5. В)), могут метилировать азотистые основания, в результате чего может образоваться, например, O^6 -метилгуанин (Рис.5. Б, 5) – высоко мутагенное и цитотоксичное повреждение, для исправления которого существует отдельный путь репарации [54], или другие метилированные

основания. Повреждения ДНК также могут образовываться под действием огромного числа экзогенных повреждающих агентов, таких как ультрафиолетовое излучение от солнечного цвета, которое может вызывать фотоаддукты между соседними пиримидиновыми основаниями, в частности, циклобутановые димеры и (6-4)-фотоаддукты (Рис.5. В, 6, 7) [52]. Другие мутагены, например, ароматические амины и противоопухолевые препараты, также могут быть причиной образования объемных аддуктов, блокирующих репликацию и транскрипцию [55], [52].

Под влиянием ионизирующего излучения в ДНК могут формироваться кластерные повреждения с образованием одно- или двуцепочечных разрывов, АП-сайтов или поврежденных азотистых оснований в двух и более местах в пределах 1-2 витков спирали ДНК [56]. Такие повреждения сложнее исправляются эксцизионной репарацией оснований, из-за этого они сохраняются в ДНК продолжительное время (24-72 ч) [57] и таким образом могут попасть в репликативную вилку до репарации и впоследствии вызвать мутации и отклонения в структуре хромосом [58]. Сейчас известно, что степень замедления репарации кластерных повреждений относительно одиночных зависит от типа повреждений в кластере, расстоянии между ними и их ориентации относительно друг друга [59]. С другой стороны, в процессе репарации таких повреждений могут образоваться двуцепочечные разрывы – повреждения, которые являются высоко мутагенными и цитотоксичными [60].

Существует несколько путей, по которым распознаются и удаляются повреждения ДНК. Пути репарации ДНК зависят от типа повреждений. В основном, повреждения ДНК включают в себя продукты алкилирования и окисления оснований, АП-сайты, разрывы в цепях ДНК и неправильно вставленные нуклеотиды [61]. В зависимости от типа исправляемых повреждений, в клетках эукариот существует шесть основных типов репарации ДНК: прямая репарация, гомологичная рекомбинация, мисматч репарация, негомологичное соединение концов, эксцизионная репарация нуклеотидов и эксцизионная репарация оснований [62].

Прямой репарацией в клетках млекопитающих удаляется только O^6 -алкилгуанин при помощи O^6 -алкилгуанинтрансфераз [63], хотя в клетках бактерий и низших эукариот таким путем удаляются еще и пиримидиновые димеры при помощи фотолиаз [64]. O^6 -алкилгуанинтрансфераза превращает O^6 -алкилгуанин обратно в гуанин, убирая метильную группу и ковалентно присоединяя ее к своему остатку цитозина. Такая необратимая реакция инактивирует фермент [52].

Эксцизионная репарация оснований (BER) удаляет повреждения, которые затрагивают один нуклеотид, путем полного замещения поврежденного нуклеотида.

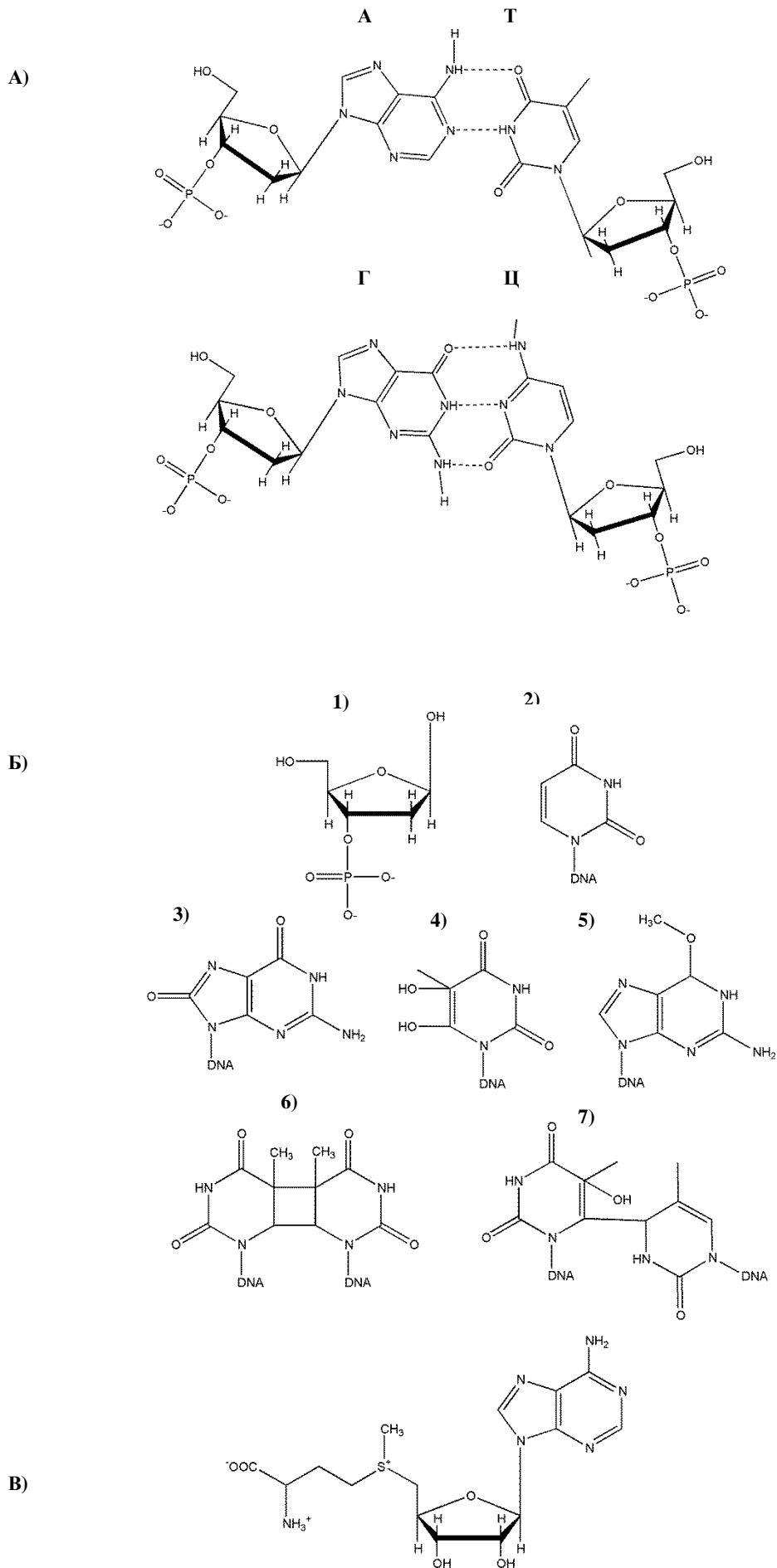


Рис. 5. Комплементарность азотистых оснований ДНК (А), основные типы повреждений ДНК (Б) и структура S-аденозинметионина (В). 1 – АП-сайт, 2 – урацил, 3 – 8-оксогуанин, 4 – тимингликоль, 5 – O⁶-метилгуанин, 6 – тиминовый димер, 7 – (6-4)-фотоаддукт тимина.

Повреждения, репарируемые этим путем, образуются в результате внутриклеточных химических реакций дезаминирования, окисления и алкилирования ДНК, а также в результате образования АП-сайтов. Такие эндогенные повреждения являются одними их самых распространенных повреждений в геноме и могут быть потенциально мутагенными и канцерогенными [65].

Более объемные повреждения ДНК, затрагивающие более одного нуклеотида (которые образуются в результате действия УФ излучения, химиотерапевтических агентов и других патогенных факторов внешней среды), удаляются эксцизионной репарацией нуклеотидов (NER) [68]. Здесь участвуют около 30 белков, которые распознают повреждение в ДНК, образуют «пузырь», расплавляя определенный участок вокруг повреждения, вырезают из поврежденной цепи олигонуклеотид длиной 24-32 нуклеотида и достраивают цепь с последующим лигированием [52].

Повреждения, возникающие в результате ошибок в репликации и встройки в цепь ДНК неправильных нуклеотидов, исправляет мисматч репарация (MMR). Отличать материнскую цепь ДНК от дочерней и удалять нужный нуклеотид MMR может из-за того, что работает сразу же после репликации, когда остается метилированной только материнская цепь. Механизм репарации заключается в распознавании повреждения и образовании «петли» с неправильной парой оснований в центре под действием нескольких ферментов, далее поврежденный участок цепи ДНК вырезается, а цепь достраивается [52].

Двцепочечные разрывы в ДНК, которые встречаются реже, но могут привести к пагубным последствиям, можно репарировать гомологичной рекомбинацией или негомологичным соединением концов. Гомологичная рекомбинация является более точным способом исправления этих повреждений, и использует протяженные участки гомологии ДНК для получения генетической информации. В качестве гомологичной ДНК выступают либо сестринская хроматида, либо другая хромосома. В негомологичном соединении концов разорванные цепи ДНК соединяются между собой более просто скоординированным образом, не используя или незначительно используя участки гомологии ДНК [52].

3.5.2. Репарация ДНК и продолжительность жизни млекопитающих

Эффективность репарации ДНК падает с возрастом и репликативным старением [67], что способствует более быстрому появлению мутаций у стареющих животных [68]. Долгоживущие организмы предположительно имеют более эффективные механизмы

поддержания генома. Первые исследования NER, включающие небольшое количество видов, показали строгую корреляцию между эффективностью NER и максимальной продолжительностью жизни [69], однако, более поздние исследования с большим числом видов не нашли подобной зависимости [70]. Что касается BER, сравнительное исследование 15 видов животных показало значительную корреляцию между активностью ферментов Pol β и АП-эндонуклеазы и массой тела, но не с максимальной продолжительностью жизни [71]. В дополнение к различной эффективности репарации ДНК у разных видов, различия могут быть и в их ответе на повреждения ДНК. Предполагается, что у долгоживущих видов может быть более строгий порог для активации клеточной смерти или прекращения клеточного роста по причине повреждений ДНК [72].

Чтобы достигнуть более эффективной репарации ДНК, живые организмы могут развить в процессе эволюции более эффективные ферменты и/или их более высокое количество. Сравнение транскриптомов печени у мыши, голубого землекопа и человека показало, что у более долгоживущих видов наблюдается повышенная экспрессия генов репарации ДНК и сигнальных путей повреждений, чем у короткоживущих видов [44]. Исследование транскриптомов у фибробластов из 16 видов млекопитающих показало, что экспрессия некоторых генов репарации ДНК положительно коррелирует с максимальной продолжительностью жизни [15]. Еще некоторые гены репарации ДНК с повышенной экспрессией у долгоживущих видов были найдены в исследовании транскриптомов в печени, почках и мозге у 33 видов млекопитающих [73]. Следует заметить, что у разных долгоживущих видов наблюдается повышенная экспрессия генов, участвующих в разных типах репарации ДНК [74].

Долгоживущие виды могут вырабатывать более эффективные ферменты репарации ДНК в процессе эволюции с помощью изменений в нуклеотидной последовательности генов и положительного отбора. Например, анализ генома двух видов летучих мышей показал, что множественные гены репарации ДНК и гены распознавания повреждений ДНК находятся под положительным отбором, включая ATM, PRKDC, RAD50, XRCC5, TP53 и т.д. [75]. Таким образом, гены репарации ДНК широко распространены среди генов, подверженных положительному отбору у долгоживущих видов, из чего может следовать то, как поддержание генома важно для продолжительности жизни. Некоторые гены геномного поддержания, включая SEBRG, GTF2H2C, RPA4 и TINF2, были найдены с повышенным числом копий у голубого землекопа и человека по сравнению с более короткоживущими видами млекопитающих [28].

3.5.3. Эксцизионная репарация оснований

Модификации оснований являются одними из самых распространенных типов повреждений, учитывая то, что в геноме каждой клетки млекопитающих случаются тысячи таких повреждений в день [76]. Эксцизионная репарация оснований (BER) преимущественно имеет дело с небольшими повреждениями в азотистых основаниях, вырезая и заменяя поврежденные (напр., 8-оксогуанин) или неправильные основания (напр. урацил), образующиеся в результате дезаминирования, алкилирования или окисления [65].

Система BER инициируется ДНК-гликозилазой (моно- или бифункциональной), специфичной к повреждению, и завершается по одному из двух путей: короткозаплаточному с заменой одного нуклеотида или длиннозаплаточному с заменой 2 – 13 нуклеотидов. Считается, что большинство репарационных процессов протекает по короткозаплаточному пути, инициируемому как моно-, так и бифункциональными гликозилазами.

Короткозаплаточный путь BER инициируется монофункциональной гликозилазой с последующим удалением поврежденного основания, расщеплением АП-сайта АП-эндонуклеазой 1 (APE1) и внесением разрыва в поврежденную цепь ДНК с образованием 3'ОН и остатка 5'-дезоксирибозофосфата (5'dRP) по краям разрыва. Затем ДНК полимеразы β (Pol β) удаляет остаток 5'dRP и застраивает однонуклеотидную брешь, подготавливая цепь ДНК к лигированию ДНК-лигазой I (LigI) или комплексом ДНК лигаза III (LigIII) и XRCC1 (рис 6) [62].

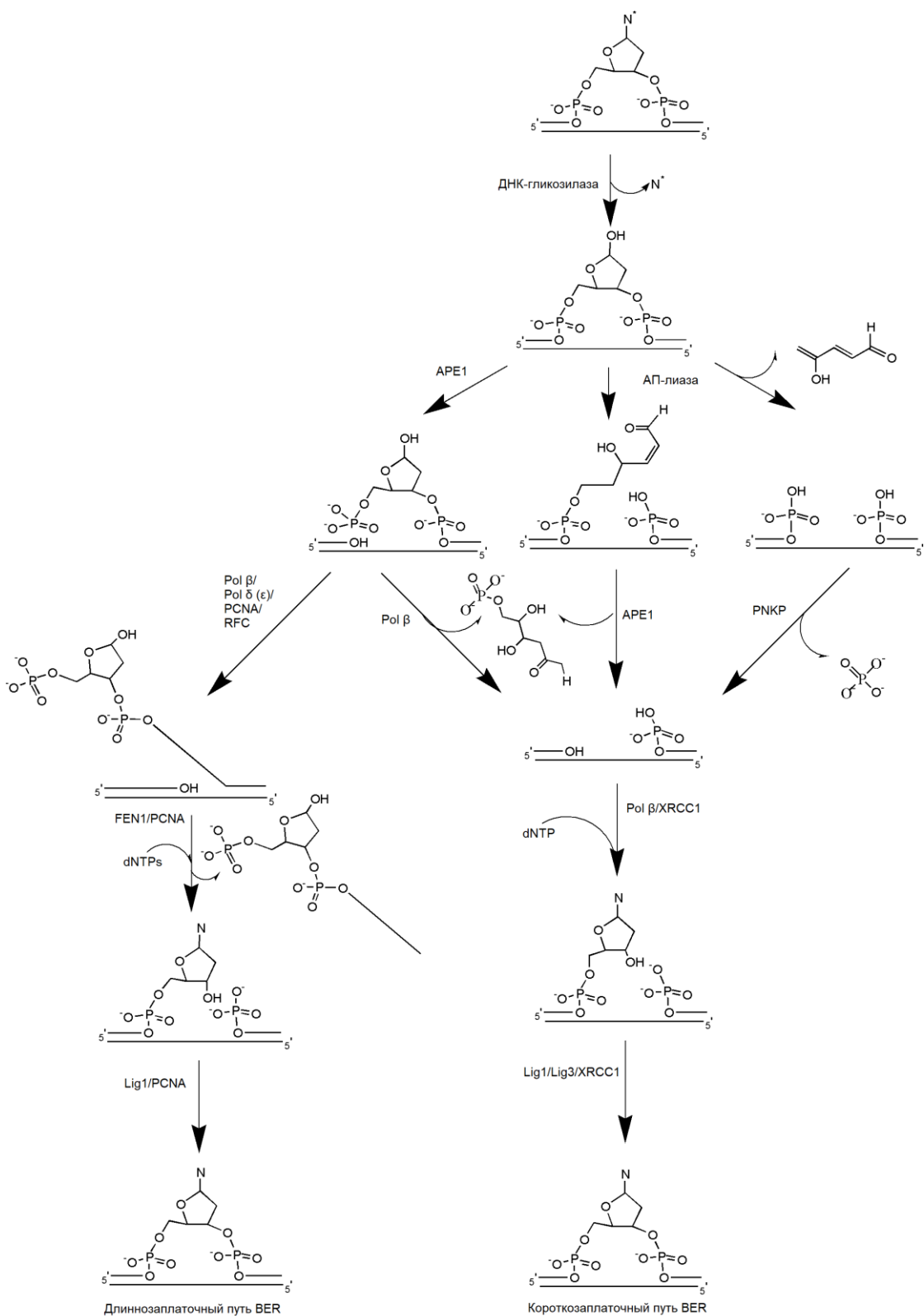


Рис.6. Схема эксцизионной репарации оснований [89].

Окисленные основания в основном удаляются бифункциональными ДНК-гликозилазами, обладающими дополнительно 3'-АП-лиазной активностью. При распознавании повреждения бифункциональная ДНК-гликозилаза выщепляет из цепи ДНК модифицированное основание по механизму, схожему с механизмом действия

монофункциональных ДНК-гликозилаз. Однако, за счет лиазной активности, в сахарофосфатный остов ДНК с 3'-стороны от повреждения может быть внесен разрыв с образованием 3'- α,β -ненасыщенного альдегида (после β -элиминирования) и 5'-фосфата. APE1 проявляет 3'-фосфодиэстеразную активность и удаляет этот конец, подготавливая для достройки ДНК-полимеразой β и лигирования ДНК-лигазой I или XRCC1/LigIII [77].

Длиннозаплаточный путь реализуется в тех случаях, когда 5'-dRP фрагмент модифицирован и не может быть удален Pol β . Удаление dRP с помощью Pol β происходит по механизму β -элиминирования, и этот процесс чувствителен к химической модификации dRP, поэтому репарация окисленных или восстановленных АП-сайтов, устойчивых к β -элиминированию, осуществляется через длиннозаплаточный путь. В то же время, было показано, что репарация нормальных АП-сайтов или окисленных оснований также может происходить путем встраивания нескольких нуклеотидных звеньев [78]. Согласно литературным данным, в этом пути BER синтез ДНК проводят репликативные ДНК-полимеразы δ или ϵ с участием PCNA [79]. Кроме того, существуют данные об участии Pol β в длиннозаплаточном пути BER [80]. Существование двух альтернативных путей BER было выявлено при исследовании репарации плазмидной ДНК или ДНК-дуплексов, содержащих обычные, восстановленные АП-сайты или различные типы модифицированных оснований, как в клеточных экстрактах, так и в системах, реконструированных из рекомбинантных белков BER.

В результате синтеза ДНК с вытеснением цепи образуется флэп длиной 2-13 нуклеотидов [79]. Синтез ДНК-полимеразой β с вытеснением цепи стимулируется совместным присутствием FEN1 и PARP1 [81,82]. Затем FEN1 удаляет образующийся флэп, оставляя разрыв со смещением на 2-13 нуклеотидов к 3'-концу относительно исходного положения повреждения. На заключительном этапе исправленная ДНК лигируется LigI (рис 6). В реконструированной системе были получены данные, являющиеся дополнительным свидетельством возможной роли Pol β в длиннозаплаточном пути BER [81]. В этой работе было показано, что Pol β в присутствии FEN1 может вести синтез ДНК на ДНК-субстратах, характерных для длиннозаплаточного пути BER. Эффективное функционирование такой пары ферментов обусловлено тем, что FEN1 за счет своей экзонуклеазной активности создает однонуклеотидные бреши в ДНК, которые являются оптимальными субстратами Pol β .

Важную регуляторную функцию в BER выполняет поли(АДФ-рибозил)ирование. Это посттрансляционная модификация белков, катализируемая ферментами семейства PARP [83]. Процесс этой модификации заключается в том, что NAD⁺ (Рис.7.) распадается на АДФ-рибозу и никотинамид, а АДФ-рибоза присоединяется к остатку глутамата в

ферменте, образуя разветвленный полимер, содержащий около 200 остатков АДФ-рибозы (Рис.8.). Поли-АДФ-рибозилирование – это временная модификация, которая впоследствии удаляется поли(АДФ-рибоза)гликогидролазой (PARG) [84]. На данный момент известно о существовании 18 белков семейства PARP, но было показано, что в ответе на повреждения ДНК участвуют ферменты PARP1, PARP2 и PARP3. Среди них ключевую регуляторную функцию в репарации ДНК выполняет PARP1, который отвечает за образование 90% поли(АДФ-рибозы) при повреждениях ДНК. В основном, белком-акцептором в реакции поли(АДФ-рибозил)ирования является сама PARP, а также гистоны, другие ферменты репарации ДНК и транскрипционные факторы [85]. Долгое время полагали, что этот процесс инициируется только в присутствии одно- или

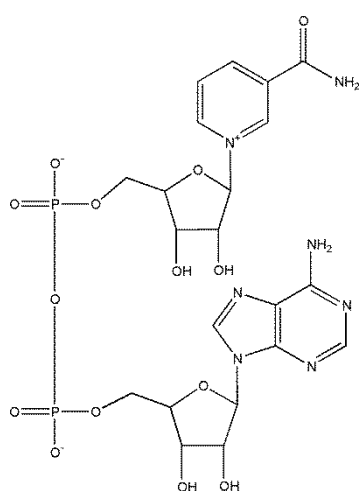


Рис. 7. Структура NAD⁺

двучепочечных разрывов, но более поздние исследования показали, что PARP1 активируется еще и при пространственной деформации спирали ДНК, что наблюдается, например, при образовании АП-сайтов, в присутствии неспаренных нуклеотидов в ДНК и т. д. [86]. Важность процесса поли(АДФ-рибозил)ирования в BER и для жизнедеятельности живых организмов в целом была ранее показана в исследованиях. Например, при выключении генов PARP1 или PARP2 у мышей обнаруживалась пониженная активность BER и повышенная смертность при обработке ионизирующим излучением и

алкилирующими агентами [87,88].

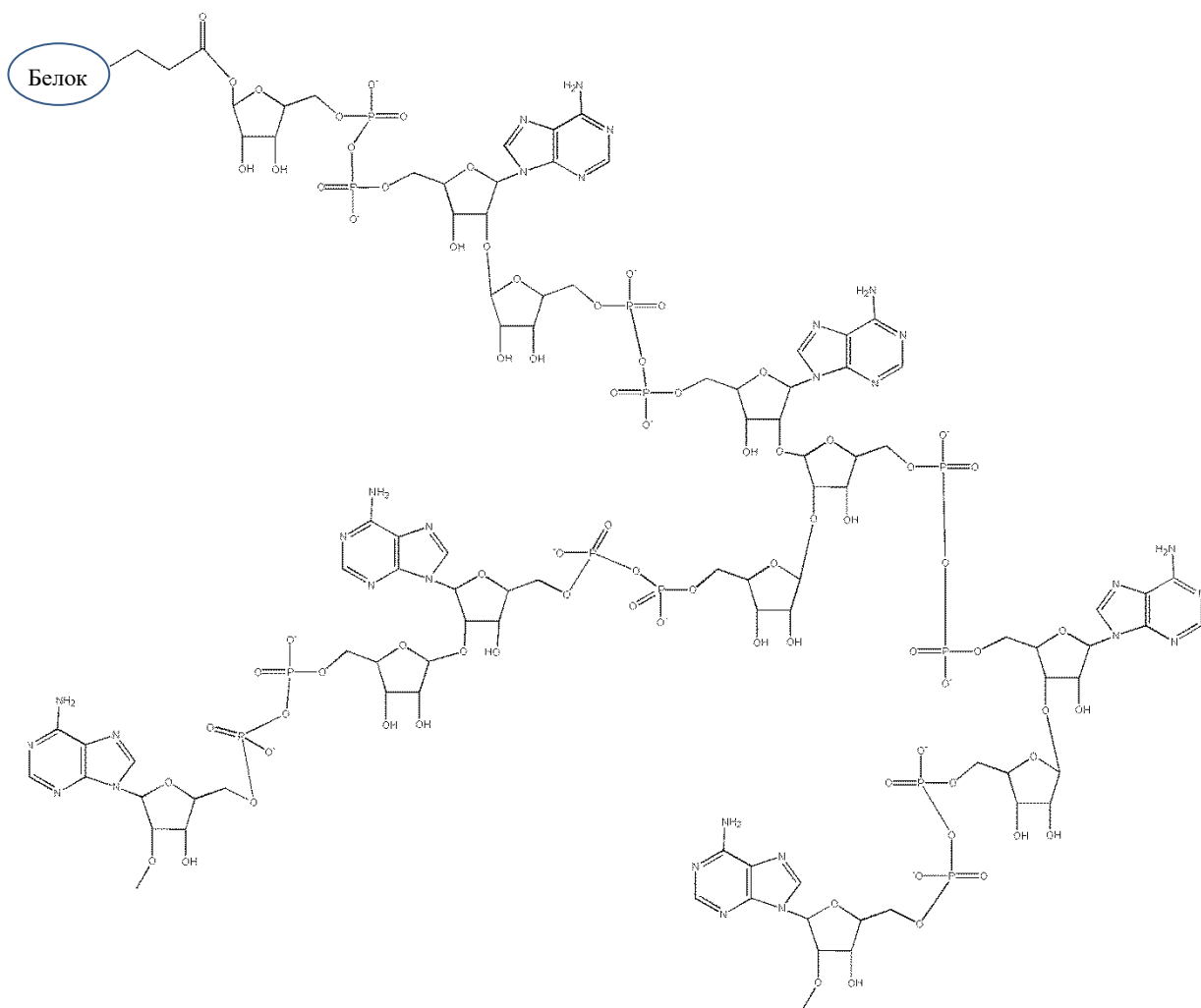


Рис. 8. Структура поли(АДФ-рибозы).

4. Материалы и методы

4.1. Список материалов

В работе были использованы тотальные РНК из фибробластов голого землекопа и домовый мышши, предоставленные сотрудниками лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН, культуры клеток были выращены в ИМКБ СО РАН. Праймеры к генам *Xrcc1*, *Apex1*, *Parp1*, *Parp2*, *Lig3*, *Polβ* и референсным генам *Gapdh*, *Tubβ*, *Actβ* голого землекопа и домовый мышши были подобраны с использованием ресурсов NCBI и синтезированы в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН. Олигонуклеотиды для функциональных тестов были синтезированы в лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН. $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ и $\alpha\text{[}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ для радиоактивного мечения олигонуклеотидов был синтезирован в лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН. Ферменты APE1, UDG, T4 полинуклеотидкиназа, ДНК-полимераза β , PARP1, FEN1, ДНК-лигаза T4, ДНК-полимераза Taq, обратная транскриптаза и активированная ДНК тимуса теленка (2 о.е.260/мл, степень активации 25%) были предоставлены сотрудниками лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН. В работе использовали 2-амино-2-(гидроксиметил)-1,3-пропандиол (Трис), N,N'-метиленабисакриламид, мочеви́на ("Amresco", США); акриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (TEMED), Tween 20 ("Helicon", Россия); этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), дитиотреитол (DTT), метоксиамин, глицерин ("Sigma", США); персульфат аммония ("Merck", Германия); формамид, 2-меркаптоэтанол (β мкэ), бромфеноловый синий, ксиленцианол, додецилсульфат натрия (SDS), детергент NP-40, MgCl_2 , NaBH_4 ("Fluka", Швейцария); смесь ингибиторов протеаз в таблетках "Complete mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail" ("Roche", Германия); DEAE-бумага DE-81 ("Whatman", Великобритания); нитроцеллюлозную мембрану "Hybond-ECL" ("Amersham Biosciences", Германия); остальные реактивы и растворители квалификации х.ч. и ос.ч. отечественного производства.

4.2. Сравнение уровня мРНК в генах *Parp1*, *Parp2*, *Apex1*, *Xrcc1*, *Lig3* и *Polβ* в клетках голого землекопа и домовый мышши методом кПЦР

Сравнение уровня экспрессии генов у голого землекопа и домовый мышши проводилось методом ОТ-ПЦР с последующей детекцией в реальном времени. Реакцию проводили в амплификаторе LigthCycler 96 (с обработкой результатом в сопутствующем ПО LigthCycler 96) по заданной температурной программе по стадиям реакции (Табл.1.)

Табл.1. Стадии ПЦР в реальном времени (LightCycler 96).

Стадия	Температура, °С	Время, с
1.Обратная транскрипция	45	1800
2.Преинкубация	95	300
3. а) Плавление ДНК	95	10
б) Гибридизация праймеров	61	10
в) Элонгация	72	10
г) Детекция	83-85	5
4. Плавление (измерение T _m)	95	10
	от 65 до 97	60

Табл.2. Последовательности прямых и обратных праймеров для генов голубого землекопа и домовый мыш.

Организм	Ген		Последовательность
Голый землекоп	β-actin	Прямой	TCGCTCTCCACCTTCCAGCA
		Обратный	AGGGTCAAAGGCAGCGAAGTA
	tubulin-β	Прямой	TCCTCGCGCTATTTTGGTGGA
		Обратный	GTTGTTGCCTGCCCCAGACT
	GAPDH	Прямой	TGTTCAACCACCATGGAAAAGGC
		Обратный	CAAACATGGGGGCATCCGC
	APE1	Прямой	CTGGTCAGCGCCTTCTGACA
		Обратный	CCGGCCTTCTGGTTCATGTT
	PARP1	Прямой	AGGCAGCGGACAAGCTCTAC
		Обратный	ATGGGTGACTGCACCATGAG
	PARP2	Прямой	AGAAGATGATGCCCGGAGAA
		Обратный	GATTCCTTGGCCTTGGTGA
	Pol-β	Прямой	ATGAGCAAACGGAAGGCGCCGAGG
		Обратный	GTTCTACTCCAGGCAATTTCTTAGCTT
XRCC1	Прямой	AGCTGGGTGCCAAGTATCGG	
	Обратный	ACCCACTCTTTGCGCACGAT	
Lig3	Прямой	CCCCTGTGAAACTGGGAGAG	
	Обратный	CAGCAGCACCTTCACCTTTG	
Домовая мыш	β-actin	Прямой	CACTGTTCGAGTCGCGTCC
		Обратный	ACGACCAGCGCAGCGATA
	tubulin-β	Прямой	TTGGGAGTCTCTTTTCAGCC
		Обратный	ACATTTTCGATCAGCTCCGC
	GAPDH	Прямой	CCTGCACCACCAACTGCTTA
		Обратный	AGTGATGGCATGGACTGTGG
	APE1	Прямой	GGAGCCTAAGGGCTTTCGTC
		Обратный	CTTTGCTGCCCCCTTACTCT
	PARP1	Прямой	ATGGTGCAGTCACCCATGTTT
		Обратный	CAGAGAAGCCATCCACCTCA
	PARP2	Прямой	CAGGCTGAGTAACTGGGTGG
		Обратный	TTTAGGCGAGAGGCAAAGCA
	Pol-β	Прямой	TCCCAGCGAGAAGGATGGAAA
		Обратный	GGGCGGATGGTGTACTCATTTG
	XRCC1	Прямой	CCCAACCGTTCGCAATTTT
		Обратный	TGGCGAGTCTTGTCTGTATG
	Lig3	Прямой	TCACTGGGGTGGGCTCTAC
		Обратный	GTGGCTGAGCCCATGTCAAAT

При подборе праймеров (Табл.2) учитывали значения эффективности амплификации, полученные из стандартных кривых. В дальнейшей работе использовали праймеры с эффективностью амплификации в пределах 90-110%. Контроль за чистотой продуктов, полученных с использованием подобранных праймеров, проводился путем определения T_m продуктов в реакционном растворе после последнего цикла реакции в ПО LigthCycler 96.

4.2.1. Приготовление растворов для ПЦР

Растворы праймеров ($C = 2$ мкМ) к генам голого землекопа и домовой мыши были приготовлены из их стоковых растворов путем разбавления стерильной водой.

Кроме растворов тотальной РНК и праймеров в реакционный раствор добавляли смесь ферментов обратной транскриптазы и ДНК-полимеразы Taq в буфере ОТ-ПЦР, содержащем смесь нуклеотидов dNTP, Mg^{2+} и флуоресцентный краситель SYBR-Green (Табл.3.).

Табл.3. Приготовление смеси ферментов в буфере ОТ-ПЦР для реакции (Master mix).

	Обратная транскриптаза	ДНК-полимераза Taq
$C_{нач}$, ед/мкл	3000	2400
Промежуточные разбавления:		
C , ед/мкл	300	24
$V_{р-ра}$ с $C_{нач}$, мкл	5,2 (на 50 мкл раствора)	2,5 (на 250 мкл раствора)
V буфера хранения, мкл	44,8	247,5
C в смеси ферментов, ед/мкл	75	4

На 40 мкл раствора смеси ферментов брали: 10 мкл обратной транскриптазы (300 ед/мкл) + 7 мкл ДНК-полимеразы Taq (24 ед/мкл) + 23 мкл буфера хранения обратной транскриптазы.

На 500 мкл Master mix брали: 40 мкл смеси ферментов + 460 мкл буфера 2x ОТ-ПЦР.

4.2.2. Построение стандартных кривых

Для построения стандартных кривых для генов голого землекопа на 10 мкл реакционного раствора брали 2,5 мкл тотальной РНК с концентрациями 0,2; 0,6; 2; 6; 20 нг/мкл, 2,5 мкл 2мкМ раствора праймеров для каждого гена и 5 мкл раствора Master mix. Для каждой реакции в эксперименте проводились 3 повтора.

Для построения стандартных кривых для генов домовой мыши на 15 мкл реакционного раствора брали 3,75 мкл тотальной РНК с концентрациями 0,2; 0,6; 2; 6

нг/мкл, 3,75 мкл 2мкМ раствора праймеров для каждого гена и 7,5 мкл раствора Master mix. Для каждой реакции в эксперименте проводилось 3 повтора.

По наклону стандартных кривых по уравнению $E = 10^{(-1/\text{tg}(\alpha)) - 1}$ для каждого рассматриваемого гена определили эффективность ПЦР для генов голого землекопа и домово́й мыши (Табл.4.).

Табл.4. Эффективность ПЦР в реальном времени у генов голого землекопа и домово́й мыши.

Гены	Эффективность ПЦР	
	Голый землекоп	Домовая мышь
<i>Parp1</i>	1,91	1,92
<i>Parp2</i>	2,05	1,81
<i>Lig3</i>	1,93	2,00
<i>Gapdh</i>	2,06	2,11
<i>Tubβ</i>	2,05	1,93
<i>Xrcc1</i>	2,07	1,98
<i>Apex1</i>	2,01	1,98
<i>Actβ</i>	1,79	1,99
<i>Polβ</i>	1,89	2,01

4.2.3. Определение относительного уровня экспрессии генов в клетках голого землекопа и домово́й мыши

Линии клеток голого землекопа и домово́й мыши – были разделены на три порции каждая. После этого каждая из порций была разделена еще на две части, одна из которых подвергалась воздействию УФ излучения, а другая – нет, и выступала в качестве контрольного образца. Затем из части, которая была облучена УФ излучением, собирали клетки для анализа через определенные промежутки времени – 1 ч, 3 ч, 9 ч и 24 ч. Обработка УФ излучением проводилась бактерицидной лампой в течение 10 с. Данные процедуры проводились сотрудниками ИМКБ СО РАН.

Для определения относительного уровня экспрессии генов в клетках голого землекопа и домово́й мыши брали 3,75 мкл total RNA с концентрацией 2 нг/мкл, 3,75 мкл 2мкМ раствора праймеров для каждого гена и 7,5 мкл раствора Master mix. Для каждой реакции в эксперименте проводилось 3 повтора. Эксперименты проводились для 3 независимых серий облученных УФ излучением клеток.

4.3. Функциональные тесты на определение активности ферментов репарации ДНК с использованием в качестве субстратов ДНК-дуплексы содержащие dUMP

Использованные олигонуклеотиды:

1a	5'-GGCGATTAAGTTGGG-U-AACGTCAGGGTCTTCC-3'
1б	5'-GGAAGACCCTGACGTTTCCCAACTTAATCGCC-3'
2a	5'-GGGAGGCCCTGGCGTT-U-CCCGGCTTAGTCGCC-3'
2б	5'-GGCGACTAAGCCGGGGAACGCCAGGGCCTCCC-3'
2в	5'-GGCGACTAAGCCGGG-U-AACGTCAGGGCCTCCC-3'
2г	5'-GGCGACTAAGCCGGGGAA-U-GCCAGGGCCTCCC-3'
2д	5'-AAGCCGGGGAACGCCA-3'
3	5'-TGTTCTCCAGGAAGTTCGTTTTTCGAACCTCCGCGAAGCT- TCTGCSTTTTGGCAGAAGCTTCGC-3'

4.3.1. [³²P]-мечение олигонуклеотидов по 5'-концу

Реакцию проводили в буфере, содержащем 70 мМ трис-НСl (рН 7,6), 10 мМ MgCl₂, 5 мМ дитиотрейтол. Кроме того, реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 100 пмоль олигонуклеотида 1a (2a), 25 мкМ [γ -³²P]-АТР и 10 ед. Т4 полинуклеотидкиназы. Реакцию проводили при 37°C в течение 30 мин, после чего Т4 полинуклеотидкиназу инактивировали нагреванием при 95°C в течение 5 мин. Олигонуклеотид выделяли из реакционной смеси электрофорезом в 20% ПААГ в присутствии 7 М мочевины с последующей радиоавтографией. Участок геля, содержащий радиоактивный олигонуклеотид, вырезали и осуществляли электроперенос олигонуклеотида на ДЕАЕ-бумагу ДЕ-81 в ячейке для электроэлюции (электродный буфер для электропереноса – ТВЕ, рН 8,3 0,5-кратный, напряжённость поля \approx 25 В/см). С ДЕАЕ-бумаги олигонуклеотид элюировали тремя порциями по 25 мкл горячего 2 М раствора LiClO₄ в Н₂О и осаждали 1,5 мл ацетона (выдерживали при –40°C в течение 40 мин). Осадок промывали ацетоном, высушивали на воздухе при комнатной температуре и растворяли в ТЕ-буфере (10 мМ трис-НСl (рН 7,8), 1 мМ ЭДТА).

4.3.2. Приготовление ДНК-дуплексов, содержащих dUMP

Для получения ДНК-дуплексов, [³²P]-меченый олигонуклеотид 1a смешивали в молярном соотношении 1:1,5 с олигонуклеотидом 1б (2a смешивали с 2б, 2в, 2г, 2д) в ТЕ-буфере (10 мМ трис-НСl (рН 7,8), 1 мМ ЭДТА). Концентрация олигонуклеотида 1a (2a)

составляла 1 мкМ. Пробу помещали в термостат, нагретый до 95°C, и давали медленно остыть до комнатной температуры.

4.3.3. Выделение цельноклеточных экстрактов из фибробластов голого землекопа и домовой мыши

Замороженные клетки голого землекопа и домовой мыши (1,7 мл) суспендировали в 1,7 мл буфера 1 (25 мМ Tris-HCl, 2% глюкоза, 10 мМ ЭДТА), затем добавили 3,4 мл буфера 2 (0,2% Tween20, 0,2% NP-40, 1М NaCl) и 340 мкл антипротеазного коктейля (750 мкл воды + 1 таблетка APC compl. mini). Суспензию перемешивали при 4°C 1 ч, центрифугировали при 14000 об/мин при 4°C 10 мин, после чего собирали супернатант. Концентрацию белка в клеточных экстрактах измеряли по методу Брэдфорд с калибровкой по БСА. Экстракты хранили при -70°C в виде аликвот по 50 мкл.

4.3.4. Определение урацил-ДНК-гликозилазной активности клеточных экстрактов голого землекопа и домовой мыши

Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 0,1 мкМ [³²P]-меченую U-ДНК (2а-2б, 2а-2в, 2а-2г и 2а-2д в разных пробах), 1 мг/мл цельноклеточного экстракта, 0,1 мкМ UDG человека в разных пробах, 50 мМ Tris-HCl (рН=8,0), 40 мМ NaCl, 1 мМ дитиотрейтол, 0,1 мг/мл БСА, 5 мМ ЭДТА. Реакцию проводили при температуре 37°C в течение 15 мин, после чего реакционную смесь прогревали при температуре 97°C в присутствии 0,1М NaOH в течение 10 мин для расщепления AP-сайтов. Аликвоты анализировали электрофоретическим разделением в 20% ПААГ в присутствии 7 М мочевины с последующей радиоавтографией. В эксперименте клетками, обработанных УФ-излучением (см. раздел 4.2.3.) использовали ДНК-дуплекс 1а-1б в такой же концентрации и экстракты в концентрации 0,5 мг/мл. На электрофорез в качестве отрицательного контроля наносили пробу, содержащую интактный ДНК-дуплекс в указанной концентрации и буферные компоненты, а в качестве положительного контроля - пробу, содержащую ДНК-дуплекс, обработанный 1 ед UDG *E.coli* в описанных выше условиях.

4.3.5. Получение ДНК-дуплексов, содержащих AP-сайт

Реакционная смесь объемом 5 мкл содержала 0,1 мкМ [³²P]-меченую U-ДНК, 20 ед. UDG, а также следующие стандартные компоненты: 50 мМ трис-HCl (рН 8,0), 50 мМ NaCl. Реакцию проводили в течение 30 мин при температуре 37 С.

4.3.6. Определение АП-эндонуклеазной активности клеточных экстрактов голого землякопа и домовой мыши

Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 0,1 мкМ [³²P]-меченный АП-ДНК-дуплекс 1а-1б, (в другом эксперименте - 2а-2б, 2а-2в, 2а-2г и 2а-2д в разных пробах), 0,5 мг/мл клеточного экстракта в разных пробах (в другом эксперименте - 0,01 мг/мл клеточного экстракта, и 2 нМ АРЕ1 для контроля в разных пробах), 5 мМ Mg²⁺, а также стандартные компоненты 50 мМ трис-НСl (рН 7,8), 40 мМ NaCl, 1 мМ дитиотрейтол, 0,1 мг/мл БСА. Реакцию проводили при температуре 37°С в течение 15 минут (в другом эксперименте 10 мин). Реакцию останавливали добавлением 2 мкл смеси растворов NaBH₄ (20 мМ) и ЭДТА (20 мМ) с последующей инкубацией при температуре 0°С в течение 30 мин. Аликвоты анализировали электрофоретическим разделением в 20% ПААГ в присутствии 7 М мочевины с последующей радиоавтографией. В эксперименте с ДНК-дуплексом 1а-1б клеточные экстракты голого землякопа и домовой мыши были выделены из клеток, облученных УФ излучением (см. раздел 4.2.3.). На электрофорез также наносили пробу, содержащую только ДНК-дуплекс с буферными компонентами, в качестве отрицательного контроля, и ДНК-дуплекс, обработанный 0,1М NaOH, в качестве положительного контроля.

4.3.7. Приготовление ДНК-дуплекса, содержащего одноцепочечный разрыв с 5'-dRP и 3'-ОН

Реакционная смесь содержала 0,1 мкМ [³²P]-меченный АП-ДНК-дуплекс 1а-1б (см. раздел 4.4.5.), 0,1 мкМ АП-эндонуклеазу 1, 8 мМ Mg²⁺, а также стандартные буферные компоненты: 50 мМ трис-НСl (рН 7,8), 40 мМ NaCl, 1 мМ дитиотрейтол, 0,1 мг/мл БСА. Реакцию проводили в течение 10 мин при 37°С.

4.3.8. Определение активности ДНК-полимеразы β в экстрактах клеток голого землякопа и домовой мыши

Реакционная смесь содержала 0,1 мкМ [³²P]-меченный ДНК-дуплекс с одноцепочечным разрывом (см. раздел 4.3.6.), 0,5 и 1 мг/мл клеточного экстракта и 7 нМ Polβ в разных пробах, смесь нуклеотидов АТР, СТР, GTP, TTP концентрацией 0,1 мМ каждый, 8 мМ Mg²⁺, а также стандартные компоненты: 50 мМ трис-НСl (рН 7,8), 40 мМ NaCl, 1 мМ дитиотрейтол, 0,1 мг/мл БСА. Реакцию проводили 10 мин при 37°С, останавливали добавлением 20 мМ ЭДТА. В других пробах перед добавлением клеточных

экстрактов и Pol β реакционную смесь инкубировали с метоксиамином при 0°C в течение 30 мин. Аликвоты анализировали электрофоретическим разделением в 20% ПААГ в присутствии 7 М мочевины с последующей радиоавтографией.

4.3.9. Определение флэп-эндонуклеазной активности в экстрактах клеток голого землякопа и домовой мыши

Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 0,1 мкМ FAM-меченую ДНК (3), содержащую флэп в 9 нуклеотидов, 0,5, 1, 2 мг/мл клеточного экстракта и 0,5 мкМ FEN1 в разных пробах, 5 мМ Mg²⁺, а также стандартные компоненты 50 мМ трис-НСl (рН 7,8), 40 мМ NaCl, 1 мМ дитиотрейтол, 0,1 мг/мл БСА. Аликвоты анализировали электрофоретическим разделением в 20% ПААГ в присутствии 7 М мочевины с последующей радиоавтографией.

4.3.10. Определение ДНК-лигазной активности экстрактов клеток голого землякопа и домовой мыши

Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 0,1 мкМ [³²P]-меченого ДНК-дуплекса с одноцепочечным разрывом (см. раздел 4.4.5.), 2 и 3 мг/мл клеточных экстрактов голого землякопа и домовой мыши и 7 нМ pol β в разных пробах, смесь нуклеотидов АТР, СТР, GTP, TTP концентрацией 0,1 мМ каждый, 8 мМ Mg²⁺, а также стандартные компоненты: 50 мМ трис-НСl (рН 7,8), 40 мМ NaCl, 1 мМ дитиотрейтол, 0,1 мг/мл БСА. Реакцию проводили 10 мин при 37°C. Затем во все пробы добавили АТР до 1 мМ, а в пробу с Pol β добавили 40 ед ДНК-лигазы фага Т4, и инкубировали еще 10 мин при 37°C. Аликвоты анализировали электрофоретическим разделением в 20% ПААГ в присутствии 7 М мочевины с последующей радиоавтографией.

4.3.11. Синтез [³²P]-меченого NAD⁺

Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 1 мМ АТР, 2 мМ NMN, 10 МБК α [³²P]-АТР, 5 мг/мл NMAT, 50 мМ MgCl₂ и 25 мМ Tris-НСl (рН = 7,5). Смесь инкубировали в течение 1 ч при 37°C, затем инкубировали 15 мин при 65°C для денатурации белка, центрифугировали 10 мин при скорости 14000 об/мин, после чего отобрали супернатант.

4.3.12. Определение активности PARP в экстрактах клеток голого землекопа и домовой мыши

Реакционная смесь объемом 30 мкл содержала 0,6 о.е./мкл активированной ДНК, 400 мкМ NAD^+ ($[^{32}\text{P}]\text{NAD}^+ : \text{NAD}^+ = 1:9$), 4 мг/мл клеточного экстракта либо 10 нМ PARP1 для контроля, 5 мМ Mg^{2+} , а также стандартные компоненты 50 мМ трис-НСl (рН 7,8), 40 мМ NaCl, 1 мМ дитиотрейтол, 0,1 мг/мл БСА. Через определенные промежутки времени (0,5; 1; 2; 3 мин) из реакционной смеси отбирали 5 мкл пробы и наносили на ТХУ-бумагу, останавливая реакцию. Бумагу 4 раза промывали 10% раствором трихлоруксусной кислоты и 1 раз 70% раствором этилового спирта, затем высушивали и анализировали методом радиоавтографии.

5. Результаты и их обсуждение

Экцизионная репарация оснований является одной из репарационных систем, защищающих клеточную ДНК от повреждений эндогенными реагентами, такими как побочные продукты внутриклеточного метаболизма: активные формы кислорода ($\text{OH}\cdot$, $\text{O}_2\cdot^-$, H_2O_2), активные формы азота ($\text{NO}\cdot$, $\text{NO}_2\cdot$, ONOO^-), продукты окисления липидов, алкилирующие реагенты. BER также исправляет повреждения, вызванные ионизирующей радиацией и экзогенными окисляющими и алкилирующими агентами, механизм действия которых схожен с механизмом действия эндогенных факторов [89].

В нашей работе в качестве источника повреждений использовалось УФ-излучение. Под действием УФ в ДНК образуются фотопродукты, которые, в основном, представляют собой пиримидин-пиримидиновые (преимущественно, тимин-тиминовые) димеры, формирующие в цепи ДНК циклобутановые кольца. В эукариотических клетках такие повреждения удаляются системой репарации NER. Но также УФ-излучение индуцирует повреждения в ДНК косвенным путем, вызывая образование свободных радикалов и перекисей, которые вызывают повреждения, исправляемые системой репарации BER [55].

5.1. Сравнение относительного уровня экспрессии генов *Apx1*, *Xrcc1*, *Lig3*, *Polβ*, *Parp1*, *Parp2* в клетках голого землекопа и доменной мыши

В ходе работы была исследована динамика изменений в уровне экспрессии генов экцизионной репарации оснований в клетках голого землекопа и доменной мыши на обработку УФ-излучением. Клетки для анализа собирали через 1 ч, 3 ч, 9 ч и 24 ч после облучения.

Для исследования были выбраны ключевые функциональные и регуляторные белки BER, определяющие эффективность функционирования всей системы, в частности, такие как APE1, $\text{pol}\beta$, *lig3*, PARP1, PARP2 и XRCC1. В качестве референсных генов были выбраны три гена домашнего хозяйства: *Gapdh*, *Tubβ*, *Actβ*.

По результатам ОТ-ПЦР в режиме реального времени для каждого гена были получены значения уровня экспрессии в клетках обработанных УФ и в клетках, не подвергавшихся такой обработке. Данные относительного уровня экспрессии всех генов в точках 1 ч, 3 ч, 9 ч и 24 ч после УФ-облучения получены из трех независимых экспериментов с тремя техническими повторами.

Ниже приведено графическое представление соотношения R_i/R_{ki} , где R_{ki} и R_i – уровень экспрессии целевых генов относительно референсных в контрольных и обработанных УФ излучением клетках соответственно, в зависимости от времени, которое прошло после облучения.

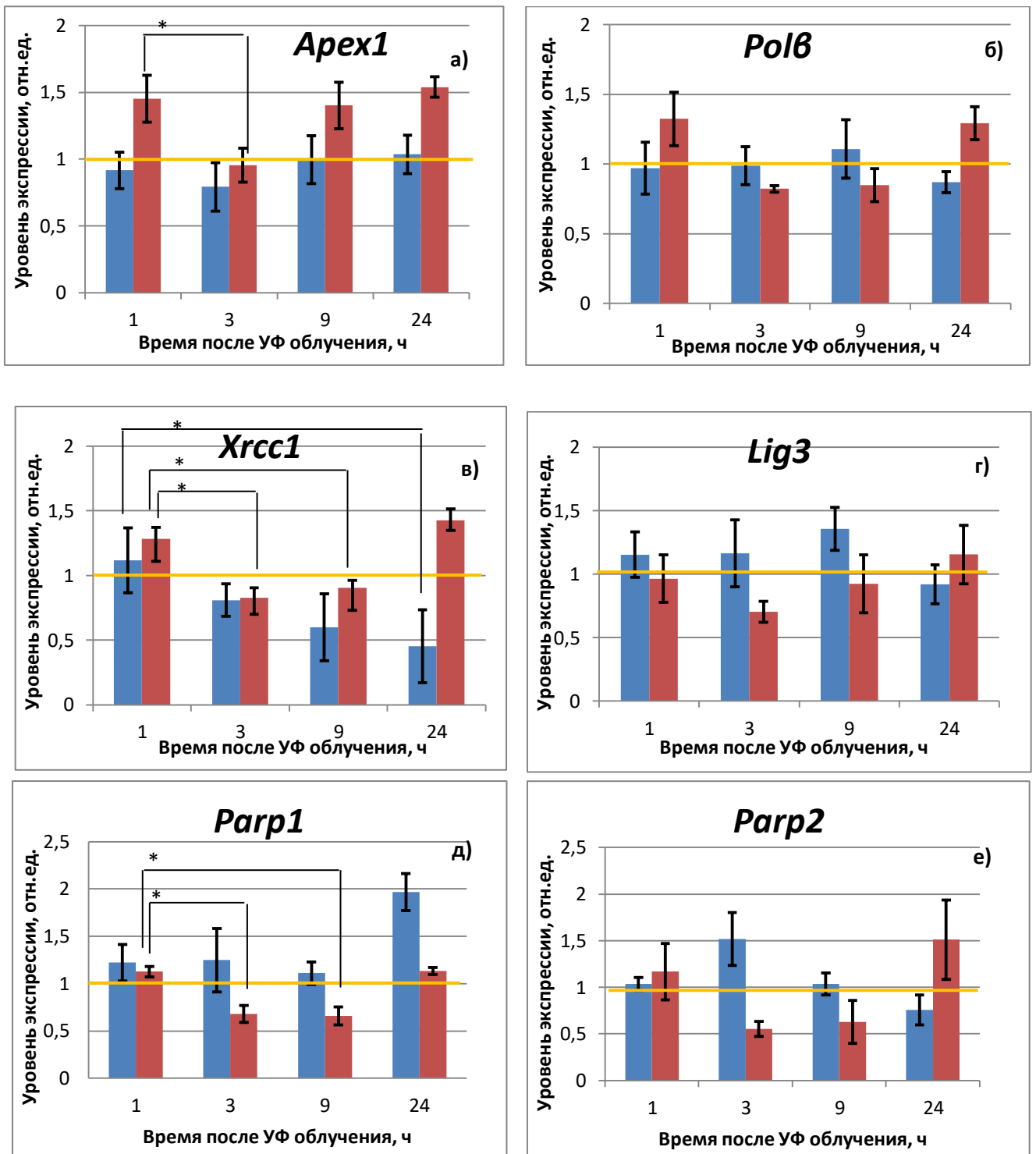


Рис.9. Относительный уровень экспрессии генов *Apex1* (а), *Polβ* (б), *Xrcc1* (в), *Lig3* (г), *Parp1* (д) и *Parp2* (е) у голого землекопа (HGI, синие столбцы) и домовой мыши (ММу, красные столбцы), в зависимости от времени, которое прошло после облучения клеток УФ излучением, по результатам ОТ-ПЦР. Звездочкой отмечено $p < 0,05$.

Как видно из Рис. 9, для большинства рассмотренных нами генов (*Polβ*, *Xrcc1*, *Parp1*, *Parp2*) в клетках домовой мыши наблюдается небольшое снижение уровня экспрессии относительно базового в точках 3 и 9 ч после облучения УФ, для гена *Lig3* наблюдается снижение только в точке 3 ч после УФ-облучения. Для гена *Apex1* в точке 3 ч

после УФ-облучения наблюдается базовый уровень мРНК, в то время как в остальных временных точках он немного повышен. При анализе уровней мРНК в клетках голого землекопа подобных колебаний уровней мРНК не наблюдается. Уровень экспрессии генов *Apx1*, *Polβ*, *Lig3* после УФ-облучения остается полностью неизменным. Однако в случае с *Xrcc1* проявляется тенденция к плавному снижению уровня соответствующей мРНК от точки 1 ч к точке 24 ч, а уровень экспрессии *Parp1* в точке 24 ч повышается относительно базового уровня, в то время как в остальных временных точках уровень мРНК не отличается от базового. Для всех рассмотренных нами генов эффект от УФ-облучения не превышал двух раз либо изменения не являлись статистически значимыми ($p > 0,05$), поэтому обнаруженные эффекты не могут считаться в полной мере достоверными. Для подтверждения таких минорных изменений в уровне мРНК и повышения статистической достоверности требуется проведение дополнительных экспериментов, но в рамках выполняемой работы это не представляет большого интереса. В результате, можно сказать, что в условиях генотоксического стресса, инициированного УФ облучением, не происходит значительного изменения в уровне мРНК генов белков BER ни в клетках домовой мыши, ни в клетках голого землекопа.

Ранее, сравнительные исследования эффективности экспрессии широкого спектра генов в клетках, не подвергавшихся генотоксическому воздействию, методом направленного секвенирования проводились с использованием клеток голого землекопа. Было обнаружено, что в клетках голого землекопа относительно клеток домовой мыши был повышен уровень экспрессии генов, кодирующих белки, которые ответственны за формирование клеточного ответа на повреждения ДНК. В частности показан повышенный уровень экспрессии генов, которые кодируют белки, участвующие в гомологичной рекомбинации и мисматч репарации. Кроме того, был показан повышенный уровень экспрессии генов, кодирующих ряд ДНК-гликозилаз [44]. Распознавание и выщепление поврежденных оснований ДНК является первым этапом в процессе BER, который обеспечивает инициацию всего процесса. Таким образом, высокая эффективность протекания первого этапа может способствовать повышенной производительности системы в целом. Поскольку для клеток голого землекопа наблюдается повышенный уровень экспрессии генов, кодирующих ДНК-гликозилазы, то можно ожидать, что в его клетках инициация системы BER осуществляется с высокой эффективностью. Однако, значительных отклонений в эффективности экспрессии генов других белков-участников BER авторами статьи не было выявлено. Во многом эффективность протекания того или иного этапа в процессе репарации ДНК определяется не только гомеостатическим

уровнем экспрессии генов соответствующих белков, но и регуляторными механизмами, которые могут влиять на активность работы ферментов репарации ДНК.

5.2. Определение активности ферментов эксцизионной репарации ДНК с использованием экстрактов клеток голого землекопа и домовой мыши, облученных УФ

5.2.1. Сравнение урацил-ДНК-гликозилазной активности экстрактов клеток голого землекопа и домовой мыши

Кроме сравнения уровня мРНК в поврежденных клетках голого землекопа и домовой мыши, мы провели несколько функциональных тестов для сравнения ферментативных активностей, участвующих в первых стадиях BER. Урацил является довольно распространенным повреждением ДНК, и исправление этого повреждения идет по пути BER. Основным ферментом, удаляющим урацил из цепи ДНК, является урацил-ДНК-гликозилаза (UDG). В нашем эксперименте в качестве модельной ДНК мы использовали ДНК-дуплекс длиной 32 п.о., содержащий U в середине цепи.

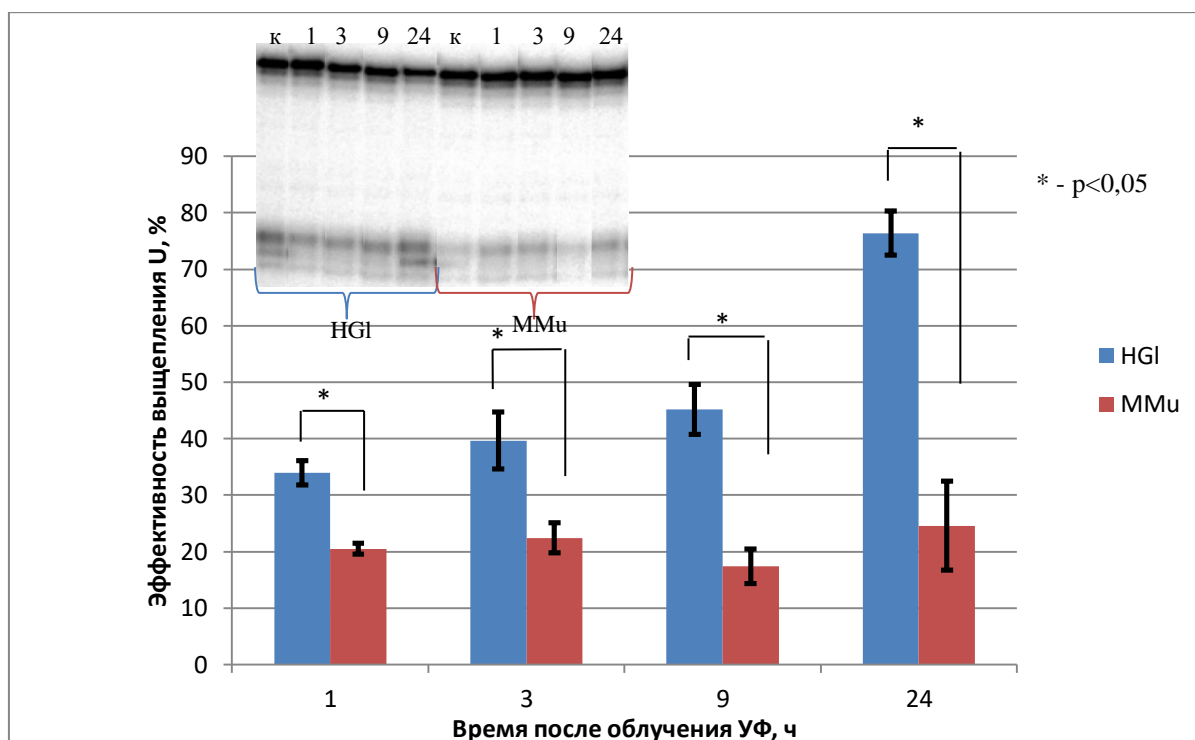


Рис. 10. Сравнение урацил-ДНК-гликозилазной активности экстрактов клеток голого землекопа и домовой мыши. ДНК-дуплекс в концентрации 0,1 мкМ, содержащий в одной из цепей 5'-[³²P] и U в середине цепи, инкубировали в присутствии экстрактов с концентрацией 0,5 мг/мл в течение 10 мин при 37⁰С. Затем инкубировали с 0,1М NaOH в течение 10 мин при 97⁰С. Эффективность выщепления U рассчитывали как долю радиоактивности в пятне, соответствующем расщепленному олигонуклеотиду от общего содержания радиоактивности в дорожке.

По результатам эксперимента (Рис.10), в экстрактах клеток голого землекопа наблюдается более высокий уровень выщепления U в сравнении с экстрактами клеток

домовой мыши. Ранее, методом направленного секвенирования РНК было показано, что в клетках печени голубого землекопа в сравнении с клетками печени домовой мыши был повышен уровень экспрессии ряда ДНК гликозилаз, которые могут удалять U из цепи ДНК [44], что согласуется с полученными нами данными. С течением времени, прошедшего после УФ облучения, для экстрактов клеток голубого землекопа наблюдается постепенное нарастание эффективности выщепления U, тогда как в случае с экстрактом клеток домовой мыши изменений в эффективности не наблюдается.

5.2.2. Сравнение АП-эндонуклеазной активности экстрактов клеток голубого землекопа и домовой мыши

В силу того, что АП-сайт является основным ДНК-интермедиатом BER, мы проверили способность экстрактов клеток голубого землекопа и домовой мыши расщеплять его. Для клеток человека и мыши известно, что APE1 – основной фермент, процессирующий АП-сайты. Можно предположить, что и у голубого землекопа АП-сайты преимущественно расщепляет APE1. Поэтому частично эффективность расщепления АП-сайта экстрактами характеризует, насколько представлен соответствующий белок в исследуемых экстрактах. АП-эндонуклеазная активность экстрактов клеток голубого

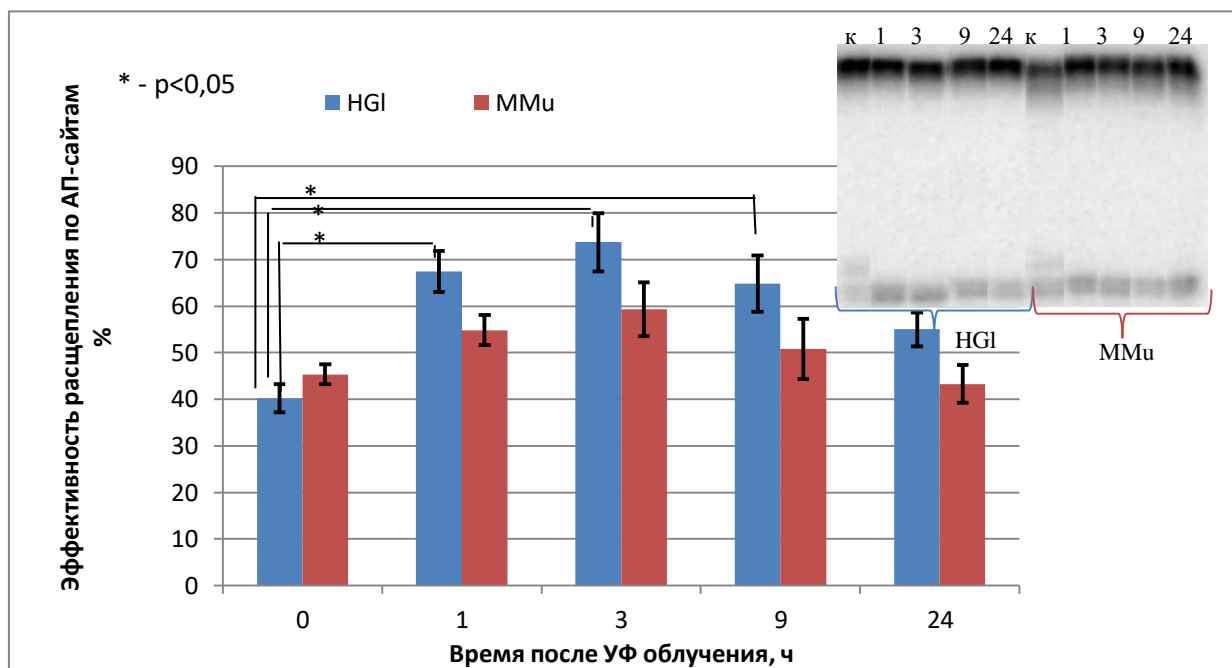


Рис. 11. Сравнение АП-эндонуклеазной активности экстрактов клеток голубого землекопа (HGI) и домовой мыши (MMu). ДНК-дуплекс в концентрации 0,1 мкМ, содержащий 5'-[³²P] метку и U в середине цепи, инкубировали с 10 ед. UDG в течение 30 мин при 37°C, затем инкубировали с экстрактами клеток HGI и MMu в концентрации 0,5 мг/мл в течение 15 мин. Точка 0 – использовались экстракты, не облученные УФ клеток. Продукты разделены электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии 7М мочевины. Эффективность расщепления АП-сайта рассчитывали как долю радиоактивности в пятне, соответствующем расщепленному олигонуклеотиду от общего содержания радиоактивности в дорожке.

землекопа и домовой мыши измерялась путем инкубирования экстрактов с ДНК-дуплексом, содержащим АП-сайт в середине цепи.

Из результатов эксперимента (Рис.11) видно, что активность клеточных экстрактов у голого землекопа и домовой мыши аналогична друг другу в точке 0 ч (здесь использовались клетки, не облученные УФ), что находится в соответствии с литературными данными, которые говорят о том, что уровни экспрессии гена *Apx1* у голого землекопа и домовой мыши схожи друг с другом [44]. С течением времени ответ этих клеточных линий тоже похож. АП-эндонуклеазная активность возрастает, достигая максимума в точке 3 ч, а затем снижается почти до начального значения. При этом для клеток голого землекопа наблюдается более выраженное повышение АП-эндонуклеазной активности, в то время как по данным кПЦР (Рис. 9) мы не наблюдаем значимых изменений в уровне мРНК с течением времени после УФ облучения. Здесь следует упомянуть, что АРЕ1 не является единственным белком, который может расщеплять АП-сайты, и АП-эндонуклеазная активность в экстрактах может быть обусловлена функционированием других белков, обладающих такой активностью. Кроме того, нельзя исключать других клеточных белков, которые могут оказывать эффект на активность АРЕ1 и могут быть вовлечены в клеточный ответ на генотоксическое воздействие.

В итоге, по результатам проведенных экспериментов по относительной оценке уровня мРНК генов эксцизионной репарации оснований, можно сказать, что наблюдаемые изменения уровня экспрессии генов не превышали 2 раз, что мы посчитали незначительным отклонением. Результаты функциональных тестов показывают повышенный уровень как урацил-ДНК-гликозилазной, так и АП-эндонуклеазной активности в экстрактах клеток голого землекопа в сравнении с экстрактами клеток домовой мыши. Эти наблюдения указывают на то, что при генотоксическом стрессе начальная стадия BER (выщепление урацила) в клетках голого землекопа осуществляется эффективнее, чем в клетках домовой мыши.

5.3. Определение активности ферментов эксцизионной репарации ДНК с использованием дуплексов, имитирующих кластерные повреждения

Комплексные повреждения ДНК в двух и более местах в пределах 1-2 витков спирали ДНК называются кластерными повреждениями [56]. Такие повреждения являются довольно губительными для клетки, потому что обычно они репарируются медленнее, чем одиночные повреждения [57], также в процессе репарации есть высокий риск образования двуцепочечных разрывов, которые являются высоко мутагенными и цитотоксичными [60]. Кластерные повреждения могут включать в себя одноцепочечные

или двуцепочечные разрывы, АП-сайты и поврежденные основания, находящиеся на одной или обеих цепях ДНК. Дуплексы, используемые в качестве субстратов для определения активности ферментов в экстрактах на разных стадиях ВЕР в нашей работе, имитируют ДНК, где U расположены в противоположных цепях напротив друг друга или со смещением на 3 нуклеотида к 3'-концу цепи ДНК, а также ДНК со свисающими 5'- и 3'-концами, содержащей U в середине более длинной цепи.

5.3.1. Эффективность выщепления урацила из ДНК-дуплексов в клеточных экстрактах голого землянока и домовой мыши в моделях кластерных повреждений

Первым этапом эксцизионной репарации оснований является удаление азотистого основания из цепи ДНК с помощью ДНК-гликозилаз, ферментов, которые катализируют разрыв N-гликозидной связи между азотистым основанием и дезоксирибозой [90], в результате чего образуется АП-сайт. Всего существует несколько ДНК-гликозилаз, которые удаляют окисленные, алкилированные и ошибочно встроенные основания. Урацил-ДНК-гликозилаза (UDG) является семейством гликозилаз [48], которые удаляют из цепи ДНК урацил, образующийся в цепи в результате дезаминирования цитозина (с образованием пары U:G) [91] или ошибочной вставки во время репликации (с образованием пары U:A) [92]. Дезаминирование цитозина и образование пары U:G могут привести к мутациям в последующих раундах репликации из-за того, что на месте G:C в молекуле ДНК может образоваться другая комплементарная пара A:T.

В данной работе эффективность работы этого фермента в клеточных экстрактах голого землянока и домовой мыши определялась с помощью функциональных тестов с использованием трех видов [³²P]-меченых ДНК-дуплексов, моделирующих кластерные повреждения, и дуплекса с одиночным повреждением в качестве контроля.

Результаты функционального теста на активность выщепления урацила из ДНК-дуплексов (Рис. 12) экстрактами клеток голого землянока и домовой мыши показывают, что урацил-ДНК-гликозилазная активность экстрактов клеток голого землянока и домовой мыши значительно не различается между собой, но зависит от типа субстрата. Статистически значимое различие в урацил-ДНК-гликозилазной активности наблюдается только в случае субстрата, где U находится в противоположных цепях напротив друг друга. Профиль активности экстрактов в зависимости от типа субстрата сохраняется и по отношению друг к другу, и по отношению к урацил-ДНК-гликозилазе, с некоторыми отклонениями. Это говорит о том, что на повреждениях, которые моделируют ДНК-

дуплексы, используемые в работе, инициация репарации вероятно происходит по пути BER, и основную роль на этой стадии играет фермент урацил-ДНК-гликозилаза.

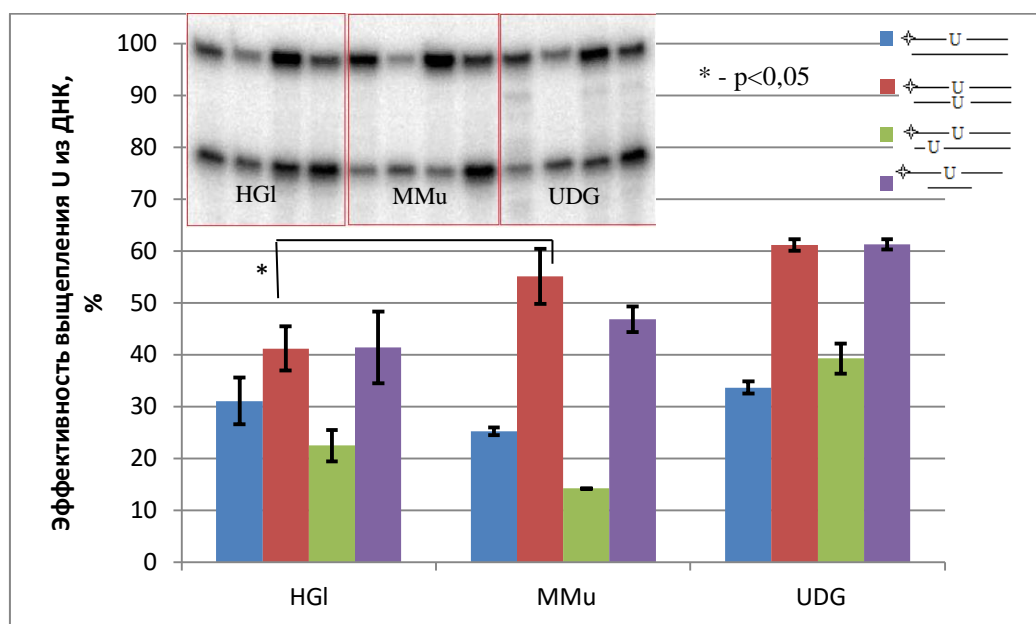


Рис. 12. Урацил-ДНК-гликозилазная активность экстрактов клеток голого землекопа (HGI) и домовой мыши (MMu). ДНК-дуплексы в концентрации 0,1 мкМ, содержащие в одной из цепей 5'-[³²P] и U в середине цепи, инкубировали в присутствии экстрактов с концентрацией 1 мг/мл (и 0,1 нМ UDG человека) в течение 15 мин при 37⁰С. Затем добавляли NaOH до концентрации 10 мМ и инкубировали в течение 10 мин при 97⁰С. Продукты анализировали электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии 7М мочевины. Эффективность выщепления U рассчитывали по результатам электрофоретического разделения продуктов реакции как долю радиоактивности в пятне, соответствующем расщепленному олигонуклеотиду, от общего содержания радиоактивности в дорожке.

5.3.2. Эффективность расщепления АП-сайтов в экстрактах клеток голого землекопа и домовой мыши

После выщепления азотистого основания АП-эндонуклеаза катализирует гидролиз фосфодиэфирной связи с 5'-конца от АП-сайта с образованием 3'-ОН группы и 5'-дезоксирибофосфата (5'-dRP). Основной АП-эндонуклеазой у млекопитающих является АРЕ1, которая расщепляет около 95% АП-сайтов, образующихся в клетке [93]. АРЕ1 является Mg²⁺-зависимым ферментом, полагают, что Mg²⁺ стабилизирует заряд на атомах кислорода в фосфате, размещая их подходящим образом для нуклеофильной атаки сайт-генерируемым гидроксильным радикалом [48].

В работе [94] на примере АП-эндонуклеазы 1 человека было показано, что в случае повреждений, где напротив одного АП-сайта находится другой АП-сайт со смещением на 1 или 3 нуклеотида в сторону 3'-конца, расщепления АП-сайтов практически не наблюдается, что согласуется и с результатами нашей работы. Из рентгеноструктурного анализа комплекса АРЕ1-ДНК известно, что АРЕ1 взаимодействует с фосфатными группами с 3' и 5'-конца от нуклеотида, находящегося в противоположной от АП-сайта

цепи ДНК со смещением на 3 нуклеотида в сторону 3'-конца цепи, и, вероятнее всего, АП-сайт на месте этого нуклеотида мешает связыванию АРЕ1 с ДНК [93].

Эксперименты с использованием четырех модельных дуплексов с АП-сайтами (Рис. 13) показали, что эффективность расщепления АП-сайтов экстрактами зависит от типа субстрата, но остается схожей между экстрактами голого землякопа и домовой мыши (статистически значимых различий ($p < 0,05$) нет). Профиль активности экстрактов во многом схож с профилем активности чистой рекомбинантной АРЕ1. Эффективность расщепления АП-сайтов 2 нМ АРЕ1 соответствует эффективности расщепления АП-сайтов экстрактами с небольшими отклонениями. Такое же явление наблюдается и для урацил-ДНК-гликозилазной активности клеточных экстрактов (Рис.12.). Отсюда можно сделать вывод, что комплексные повреждения, которые моделируют ДНК-дуплексы, используемые нами в работе, начинают исправляться по пути BER, и первые стадии в случае всех используемых ДНК-дуплексов главным образом осуществляют ферменты урацил-ДНК-гликозилаза и АП-эндонуклеаза 1 как в экстрактах клеток голого землякопа, так и в экстрактах клеток домовой мыши.

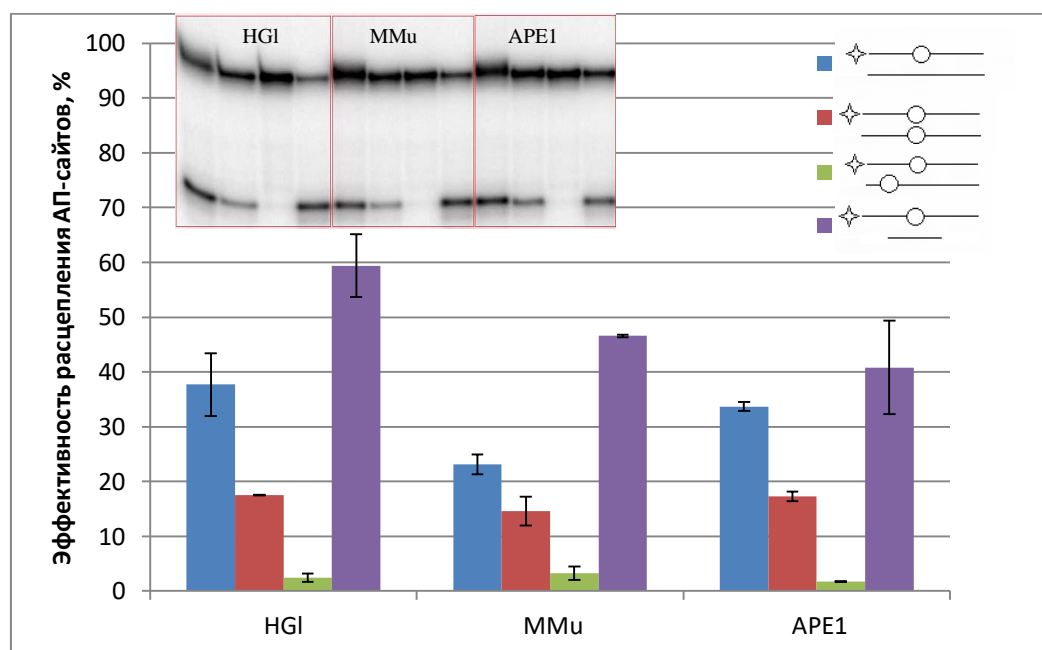


Рис. 13. АП-эндонуклеазная активность экстрактов клеток голого землякопа (HGI) и домовой мыши (MMu). ДНК-дуплекс в концентрации 0,1 мкМ, содержащий 5'-[³²P] метку и U в середине цепи, инкубировали с 20 ед. UDG в течение 30 мин при 37°C, затем инкубировали с экстрактами клеток HGI и MMu в концентрации 0,01 мг/мл (или с 2 нМ АРЕ1) в течение 10 мин. Продукты разделены электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии 7М мочевины. Эффективность расщепления АП-сайта рассчитывали по результатам электрофоретического разделения продуктов реакции как долю радиоактивности в пятне, соответствующем расщепленному олигонуклеотиду, от общего содержания радиоактивности в дорожке.

5.3.3. ДНК-полимеразная активность клеточных экстрактов голого землякопа и домовой мыши

После образования АП-сайтов, следующей стадией BER является достройка одного нуклеотида с удалением 5'-dRP (короткозаплаточный путь) или нескольких нуклеотидов (длиннозаплаточный путь). Восстановление цепи ДНК осуществляется ДНК-полимеразой β , которая также обладает dRP-лиазной активностью. В длиннозаплаточном пути кроме ДНК-полимеразы β цепь ДНК может достраиваться репликативными ДНК-полимеразами с замещением цепи, а образующийся флэп удаляет фермент FEN1. Из-за того, что стадия восстановления цепи ДНК является одной из ключевых стадий BER, работа ДНК-полимераз, работающих на этой стадии, оказывает значительное влияние на жизнедеятельность живых организмов.

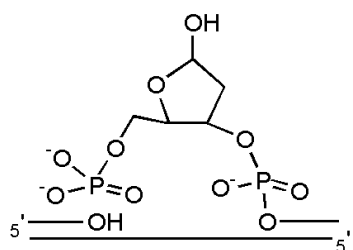
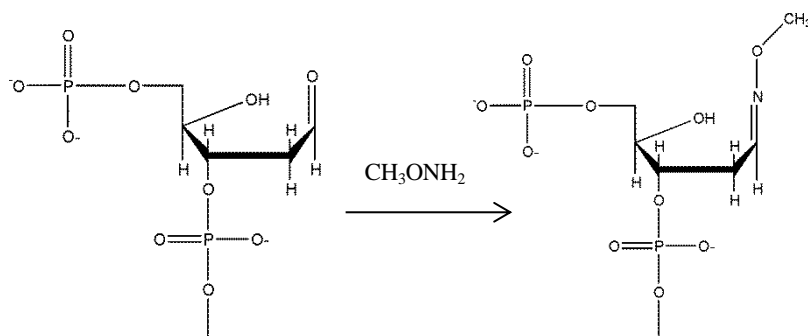


Рис. 14. Структура субстрата для определения эффективности синтеза цепи экстрактами клеток.

В нашей работе мы сравнивали эффективность восстановления цепи ДНК в экстрактах голого землякопа и домовой мыши, используя ДНК-дуплекс с одноцепочечным разрывом (Рис.14). Вначале в этом дуплексе был образован и расщеплен АП-сайт, а затем его обработали экстрактами клеток голого землякопа и домовой мыши в концентрации 0,5 и 1 мг/мл. Также мы провели эксперимент, где после образования и расщепления АП-сайта 5'-dRP был модифицирован метоксиамином, для того, чтобы ДНК-полимераза β не могла его отщепить по механизму β -элиминирования, тем самым заставляя ее вести синтез ДНК с вытеснением цепи (Рис.15). По результатам экспериментов на электрофореграмме (Рис.16) видно, что экстракты клеток домовой мыши ведут синтез ДНК с вытеснением цепи эффективнее, чем экстракты клеток голого землякопа. Отсюда можно предположить, что в экстрактах клеток домовой мыши длиннозаплаточный путь BER более предпочтителен, чем в экстрактах клеток голого землякопа. Стоит заметить, что по результатам эксперимента наблюдались также продукты меньшей молекулярной массы,



чем исходный олигонуклеотид. Причем, при использовании экстрактов клеток домовой мыши они образуются в большем количестве, чем при

Рис. 15. Реакция модификации 5'-dRP метоксиамином.

использовании экстрактов клеток голого землекопа. Это может свидетельствовать о работе клеточных нуклеаз в экстрактах, и их активность в экстрактах клеток доменной мышцы выше, чем в экстрактах клеток голого землекопа. Отщепление нуклеотидов нуклеазами может влиять и на эффективность синтеза цепи ДНК-полимеразой β .

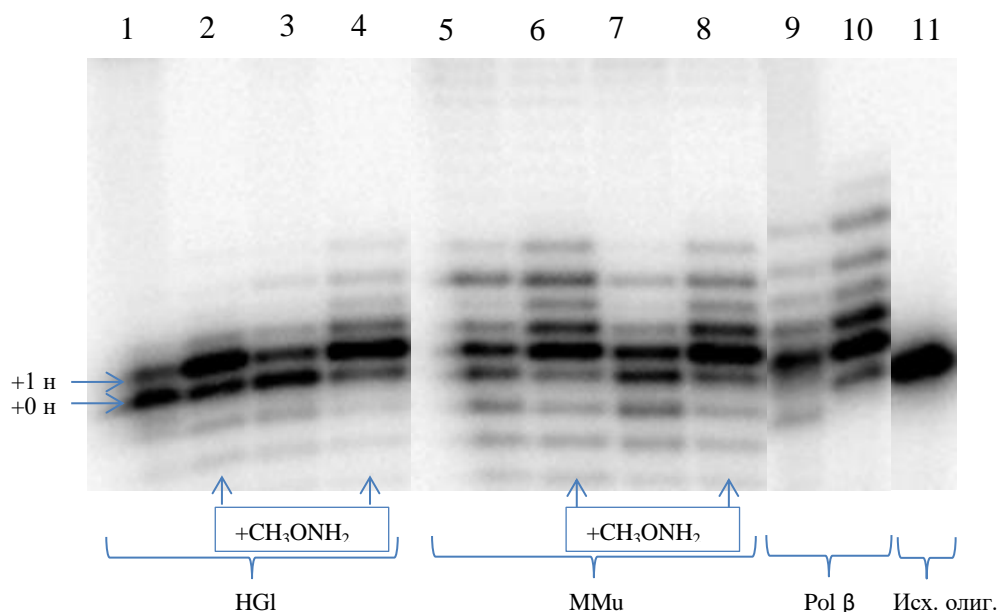


Рис. 16. Результаты электрофоретического разделения продуктов реакции экстрактов клеток голого землекопа (HGI) и доменной мышцы (MMu) с дуплексом с одноцепочечным разрывом. ДНК-дуплекс в концентрации 0,1 мкМ, содержащий 5'-[³²P] и U в середине цепи, инкубировали с 10 ед UDG в течение 30 мин при 37°C, затем инкубировали с 0,1 мкМ APE1 в присутствии Mg²⁺ в течение 10 мин при 37°C. Затем инкубировали с экстрактами клеток HGI и MMu в концентрациях 0,5 и 1 мг/мл или 7 нМ Polβ в присутствии 0,1 мМ dNTP и Mg²⁺ в течение 10 мин при 37°C. Продукты разделены электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии 7М мочевины. На рисунке: 1,3 – расщепленная АП-ДНК в присутствии экстракта клеток HGI (C = 0,5 и 1 мг/мл соответственно), 5,7 - расщепленная АП-ДНК в присутствии экстракта клеток MMu (C = 0,5 и 1 мг/мл соответственно), 2,4 – расщепленная АП-ДНК, модифицированная метоксиамином, в присутствии экстракта клеток HGI (C = 0,5 и 1 мг/мл соответственно), 6,8 - расщепленная АП-ДНК, модифицированная метоксиамином, в присутствии экстракта клеток MMu (C = 0,5 и 1 мг/мл соответственно), 9 – расщепленная АП-ДНК в присутствии 7 нМ Polβ, 10 - расщепленная АП-ДНК, модифицированная метоксиамином, в присутствии 7 нМ Polβ, 11 – проба содержит только расщепленную АП-ДНК с буферными компонентами.

5.3.4. Флэп-эндонуклеазная активность клеточных экстрактов голого землекопа и доменной мышцы

Фермент флэп-эндонуклеаза 1 (FEN1) участвует в длиннозаплаточном пути BER. Этот путь реализуется тогда, когда остаток 5'-дезоксирибофосфата после расщепления

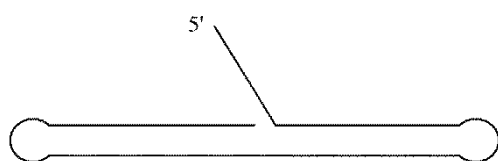


Рис. 17. Структура ДНК-субстрата для определения флэп-эндонуклеазной активности.

АП-сайта не может удалиться ДНК-полимеразой β при синтезе цепи ДНК. В этом случае идет замещение цепи ДНК-полимеразой β или репликативными ДНК-полимеразами δ или ϵ с образованием флэпа длиной в несколько

нуклеотидов, который удаляется с помощью фермента FEN1. FEN1 работает только в присутствии ионов Mg^{2+} и Mn^{2+} и его работа не зависит от последовательности нуклеотидов [95].

В нашей работе для проверки флэп-эндонуклеазной активности в экстрактах клеток голого землекопа и домовой мыши мы использовали в качестве субстрата флуоресцентно меченую (5'-FAM) ДНК-структуру, содержащую флэп в 9 нуклеотидов на 5'-конце (Рис.18). По результатам электрофоретического разделения продуктов реакции клеточных экстрактов и FEN1 с данным субстратом (Рис.19, использовались маркеры на 10 и 5 нуклеотидов) видно, что с использованием клеточных экстрактов с 5'-конца выщепляется 3 фрагмента длиной 5, 6 и 8 нуклеотидов, а ферментом FEN1 (0,5 мкМ) выщепляется 6 фрагментов длиной 7, 8-12 нуклеотидов. В целом, у экстрактов клеток домовой мыши флэп-эндонуклеазная активность (активность выщепления всех фрагментов в сумме) выше, чем у экстрактов клеток голого землекопа, на 15-20% (Рис.19), что также говорит о вероятности того, что в клетках домовой мыши BER имеет более высокую склонность к длиннозаплаточному пути, чем в клетках голого землекопа. В экспериментах, где мы анализировали эффективность синтеза цепи у клеточных экстрактов (раздел 5.3.4.), было показано, что экстракты клеток домовой мыши более склонны к синтезу ДНК с вытеснением цепи, чем экстракты клеток голого землекопа, что подтверждает данную гипотезу.

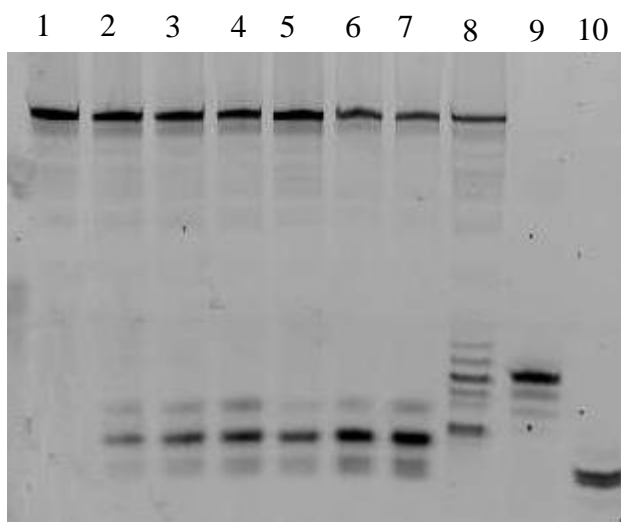


Рис. 18. Результаты электрофоретического разделения продуктов реакции ДНК, содержащей флэп, с клеточными экстрактами голого землекопа (NGI) и домовой мыши (ММу). ДНК, содержащая флэп длиной 9 нуклеотидов с 5'-FAM, инкубировали с экстрактами клеток NGI и ММу в концентрациях 0,5, 1 и 2 мг/мл (и 0,5 мкМ FEN1) в течение 10 мин при 37°C. Продукты разделены электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии 7М мочевины. На рисунке: 1 – проба, содержащая только ДНК с буферными компонентами; 2-4 – продукты реакции ДНК с экстрактом клеток NGI (C=0,5;1;2 мг/мл соответственно); 5-7 - продукты реакции ДНК с экстрактом клеток ММу (C=0,5;1;2 мг/мл соответственно); 8 - продукты реакции ДНК с 0,5 мкМ FEN1; 9 – фрагмент ДНК длиной 10 нуклеотидов; 10 – фрагмент ДНК длиной 5 нуклеотидов

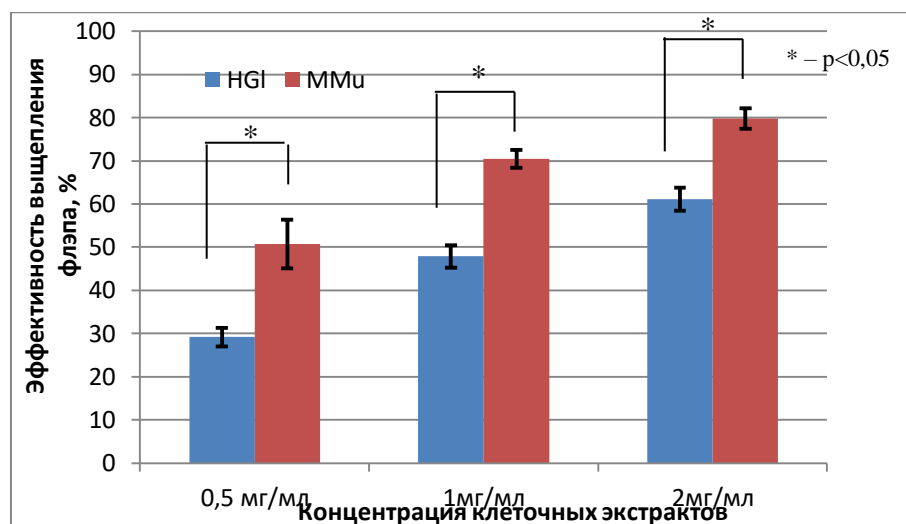


Рис. 19. Флэп-эндонуклеазная активность экстрактов клеток голого землякопа (HGI) и домовой мыши (MMu). Эффективность выщепления флэпа рассчитывалась по результатам электрофореза в полиакриламидном геле (Рис.23) как доля флуоресценции, соответствующая всем выщепленным фрагментам ДНК, к общей флуоресценции дорожки.

Методом секвенирования мРНК было показано, что уровень экспрессии гена *Fen1* не различается у голого землякопа и домовой мыши [44], но не исключено, что различие, которое мы наблюдаем в нашей работе, может быть обусловлено действием других клеточных нуклеаз. Разные продукты реакции с использованием клеточных экстрактов и фермента FEN1 и то, что при действии фермента получаются продукты длиннее 9 нуклеотидов (Рис.18, дорожка 8), можно объяснить тем, что в присутствии FEN1 и буферных компонентов двуцепочечная ДНК около разрыва в данной структуре может подвергаться плавлению, в то время как в экстрактах могут находиться дополнительные белки, которые стабилизируют ДНК.

5.3.5. ДНК-лигазная активность экстрактов клеток голого землякопа и домовой мыши

Лигирование цепи ДНК является последней стадией BER. В клетках млекопитающих существуют 3 различные ДНК-лигазы. Долгое время считалось, что в короткозаплаточном пути участвует только Lig3 в комплексе с XRCC1, но впоследствии в экспериментах *in vitro* было показано, что Lig1 может успешно заменять этот белковый комплекс при лигировании цепи ДНК. В длиннозаплаточном пути ключевым белком на стадии лигирования является Lig1 [96].

В нашей работе мы сравнивали ДНК-лигазную активность между экстрактами клеток голого землякопа и домовой мыши с использованием ДНК-дуплекса с одноцепочечным разрывом с 5'-dRP и 3'-ОН в качестве субстрата. Сначала этот ДНК-

дуплекс инкубировали с экстрактами клеток голого землякопа и домовой мыши в присутствии 7 нМ Pol β для синтеза цепи и удаления 5'-dRP, затем инкубировали в присутствии АТФ для лигирования. По результатам эксперимента (Рис.20), экстракты клеток голого землякопа и домовой мыши не проявляли ДНК-лигазной активности.

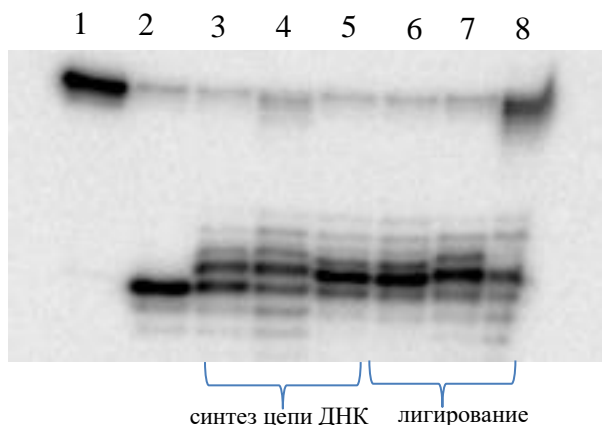


Рис. 20. Результаты электрофоретического разделения продуктов реакции, содержащей одноцепочечный разрыв, с экстрактами клеток голого землякопа (НГ1) и домовой мыши (ММу). ДНК-дуплекс в концентрации 0,1 мкМ, содержащий 5'-[32 P] и U в середине цепи, инкубировали с 10 ед UDG в течение 30 мин при 37°C, затем инкубировали с 0,1 мкМ APE1 в присутствии Mg $^{2+}$ в течение 10 мин при 37°C. Затем инкубировали с экстрактами клеток НГ1 и ММу в концентрациях 1 мг/мл или 7 нМ Pol β в присутствии 0,1 мМ dNTP и Mg $^{2+}$ в течение 10 мин при 37°C. Затем добавили АТФ до концентрации 1 мМ (в пробу с Pol β добавили еще 40 ед. T4 ДНК-лигазы) и инкубировали еще 10 мин. Продукты разделены электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии 7М мочевины. На рисунке: 1 – ДНК-дуплекс в присутствии UDG, 2 – ДНК-дуплекс в присутствии UDG и APE1, 3-5 – расщепленная АП-ДНК в присутствии НГ1, ММу и Pol β соответственно, 6,7 – расщепленная АП-ДНК в присутствии НГ1 и ММу соответственно с добавлением 1 мМ АТФ, 8 – расщепленная АП-ДНК в присутствии T4 ДНК-лигазы.

5.3.6. Эффективность поли(АДФ-рибозил)ирования клеточных экстрактов голого землякопа и домовой мыши

Поли(АДФ-рибозил)ирование – это посттрансляционная ковалентная модификация белков, катализируемая семейством ферментов PARP [83]. Субстратом для этой реакции является NAD $^{+}$, который расщепляется на никотинамид и АДФ-рибозу, АДФ-рибоза присоединяется к белку-акцептору и к ней присоединяются другие остатки АДФ-рибозы, образуя линейную или ветвистую структуру, состоящую из около 200 остатков АДФ-рибозы. Поли(АДФ-рибозил)ирование является быстрым клеточным ответом на повреждения ДНК, вызванные ионизирующим излучением, алкилирующими агентами или окислительным стрессом, и играет важную роль в эксцизионной репарации оснований.

В нашей работе мы провели сравнение скорости поли(АДФ-рибозил)ирования клеточных экстрактов голого землякопа и домовой мыши с использованием

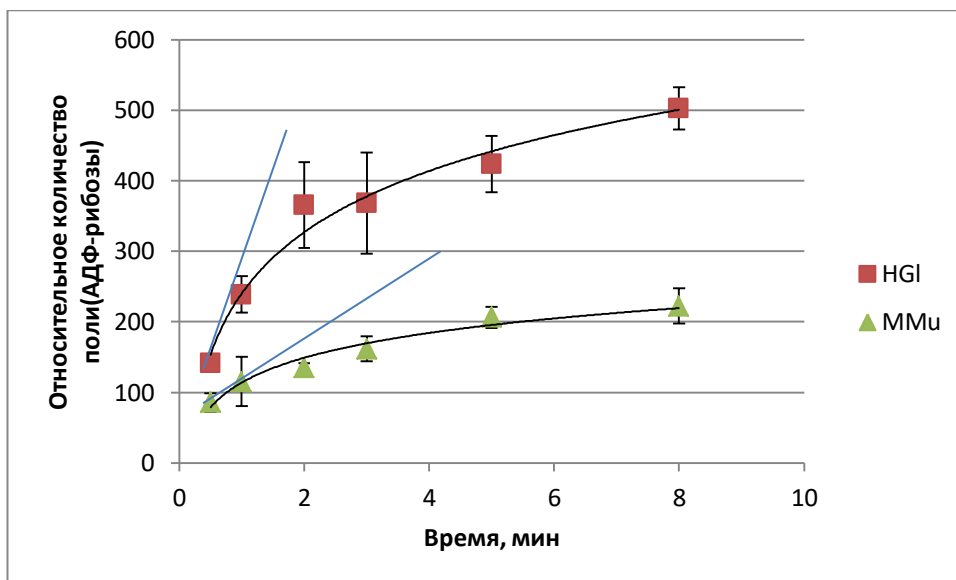


Рис.21. Поли(АДФ-рибоза)полимеразная активность экстрактов клеток голого землекопа (HGI) и домовой мыши (MMu). 400 мкМ NAD^+ (^{32}P - $\text{NAD}^+ : \text{NAD}^+ = 1:9$) инкубировали с экстрактами клеток HGI и MMu в концентрации 4 мг/мл в присутствии 0,6 ед/мкл активированной ДНК и Mg^{2+} и через промежутки времени - 0,5, 1, 2, 3, 5 и 8 мин останавливали реакцию, нанося равные объемы пробы на ТХУ-бумагу. Количество продукта анализировали радиоавтографией. На графике представлена зависимость уровня радиоактивности в каждой пробе от времени реакции.

^{32}P -меченого NAD^+ . Для этого мы останавливали реакцию, через определенные промежутки времени нанося равные аликвоты на ТХУ-бумагу, с последующей радиоавтографией.

Скорость реакции определялась по наклону прямой, касательной к кривой, отражающей зависимость синтеза поли(АДФ-рибозы) от времени на начальном участке кинетики поли(АДФ-рибоз)илирования (Рис.21). По графику видно, что зависимость сохраняется линейной в первые две минуты реакции с дальнейшим выходом на плато. По наклону касательной на линейном участке было определено, что скорость этой реакции в экстрактах голого землекопа выше, чем в экстрактах домовой мыши, в 3,5-4 раза. Ранее, в исследовании поли(АДФ-рибоза)полимеразной активности моноядерных лейкоцитов у 13 видов млекопитающих уже была показана прямая корреляция этой активности с продолжительностью жизни (у человека активность PARP была примерно в 5 раз больше, чем у крысы) [9]. В литературных данных описано, что PARP1 ингибирует синтез цепи ДНК-полимеразой β по длиннозаплаточному пути [97]. В нашей работе было показано, что синтез с вытеснением цепи более эффективно проходил в экстрактах клеток домовой мыши, где активность PARP1 была меньше, чем в экстрактах клеток голого землекопа. Совокупность этих данных позволяет предположить, что повышенное содержание PARP1 может быть причиной склонности экстрактов клеток голого землекопа к реализации короткозаплаточного пути репарации в ходе BER.

6. Выводы

1. Методом ОТ-ПЦР показано, что уровень мРНК генов ряда ключевых белков системы эксцизионной репарации оснований ДНК (*Parp1*, *Parp2*, *Apx1*, *Xrcc1*, *Lig3* и *Polβ*) меняется незначительно в ответ на УФ-облучение клеток голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) и домашней мыши (*Mus musculus*).

2. С использованием функциональных тестов установлено, что:

- урацил-ДНК-гликозилазная активность после УФ-облучения в экстрактах клеток голого землекопа выше в сравнении с экстрактами клеток домашней мыши;
- в экстрактах клеток голого землекопа эксцизионная репарация оснований протекает преимущественно по короткозаплаточному пути, в то время как в экстрактах клеток домашней мыши преимущественно реализуется длиннозаплаточный путь;
- поли(АДФ-рибозил)ирование протекает в $4,0 \pm 0,5$ раза эффективнее в экстрактах клеток голого землекопа, чем в экстрактах клеток домашней мыши.

7. Список литературы

1. Larson J., Park T.J. Extreme hypoxia tolerance of naked mole-rat brain // *Neuroreport*. 2009. Vol. 20, № 18. P. 1634–1637.
2. Lewis K.N., Mele J., Hornsby P.J., Buffenstein R. Stress resistance in the naked mole-rat: The bare essentials - A mini-review // *Gerontology*. 2012. Vol. 58, № 5. P. 453–462.
3. O'Connor T.P., Lee A., Jarvis J.U., Buffenstein R. Prolonged longevity in naked mole-rats: age-related changes in metabolism, body composition and gastrointestinal function. // *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 2002. Vol. 133, № 3. P. 835–842.
4. Grimes K.M., Reddy A.K., Lindsey M.L., Buffenstein R. And the beat goes on: maintained cardiovascular function during aging in the longest-lived rodent, the naked mole-rat. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2014. Vol. 307, № 3. P. H284-91.
5. Tacutu R., Craig T., Budovsky A., Wuttke D., Lehmann G., Taranukha D., Costa J., Fraifeld V.E., de Magalhães J.P. Human Ageing Genomic Resources: Integrated databases and tools for the biology and genetics of ageing // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41, № 1. P. 1027–1033.
6. Western D. Size, life-history and ecology in mammals // *Afr. J. Ecol.* 1979. Vol. 17. P. 184–204.
7. de Magalhães J.P., Costa J., Church G.M. An analysis of the relationship between metabolism, developmental schedules, and longevity using phylogenetic independent contrasts. // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2007. Vol. 62, № 2. P. 149–160.
8. Cortopassi G.A., Wang E. There is substantial agreement among interspecies estimates of DNA repair activity. // *Mech. Ageing Dev.* 1996. Vol. 91, № 3. P. 211–218.
9. Grube K., Bürkle A. Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992. Vol. 89, № 24. P. 11759–11763.
10. Fushan A.A., Turanov A.A., Lee S.G., Kim E.B., Lobanov A.V., Yim S.H., Buffenstein R., Lee S.R., Chang K.T., Rhee H., Kim J.S., Yang K.S., Gladyshev V.N. Gene expression defines natural changes in mammalian lifespan // *Aging Cell*. 2015. Vol. 14, № 3. P. 352–365.
11. Perez-Campo R., López-Torres M., Cadenas S., Rojas C., Barja G. The rate of free radical

- production as a determinant of the rate of aging: evidence from the comparative approach. // *J. Comp. Physiol. B*. 1998. Vol. 168, № 3. P. 149–158.
12. Sohal R.S., Sohal B.H., Orr W.C. Mitochondrial superoxide and hydrogen peroxide generation, protein oxidative damage, and longevity in different species of flies. // *Free Radic. Biol. Med.* 1995. Vol. 19, № 4. P. 499–504.
 13. Adelman R., Saul R.L., Ames B.N. Oxidative damage to DNA: relation to species metabolic rate and life span. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1988. Vol. 85, № 8. P. 2706–2708.
 14. Barja G., Herrero A. Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. // *FASEB J.* 2000. Vol. 14, № 2. P. 312–318.
 15. Ma S., Upneja A., Galecki A., Tsai Y.M., Burant C., Raskind S., Zhang Q., Zhang Z., Seluanov A., Gorbunova V., Clish C., Miller R.A., Gladyshev V. Cell culture-based profiling across mammals reveals DNA repair and metabolism as determinants of species longevity. // *Elife*. 2016. Vol. 5.
 16. Edrey Y.H., Park T.J., Kang H., Biney A., Buffenstein R. Endocrine function and neurobiology of the longest-living rodent, the naked mole-rat // *Exp. Gerontol.* Elsevier Inc., 2011. Vol. 46, № 2–3. P. 116–123.
 17. Buffenstein R. Negligible senescence in the longest living rodent, the naked mole-rat: Insights from a successfully aging species // *J. Comp. Physiol. B Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 2008. Vol. 178, № 4. P. 439–445.
 18. Liang S., Mele J., Wu Y., Buffenstein R., Hornsby P.J. Resistance to experimental tumorigenesis in cells of a long-lived mammal, the naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). // *Aging Cell*. 2010. Vol. 9, № 4. P. 626–635.
 19. Seluanov A., Hine C., Azpurua J., Feigenson M., Bozzella M., Mao Z., Catania K.C., Gorbunova V. Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009. Vol. 106, № 46. P. 19352–19357.
 20. Andziak B., O'Connor T.P., Qi W., DeWaal E.M., Pierce A., Chaudhuri A.R., Van Remmen H., Buffenstein R. High oxidative damage levels in the longest-living rodent, the naked mole-rat // *Aging Cell*. 2006. Vol. 5, № 6. P. 463–471.

21. Pérez V.I., Buffenstein R., Masamsetti V., Leonard S., Salmon A.B., Mele J., Andziak B., Yang T., Edrey Y., Friguet B., Ward W., Richardson A., Chaudhuri A. Protein stability and resistance to oxidative stress are determinants of longevity in the longest-living rodent, the naked mole-rat. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2009. Vol. 106, № 9. P. 3059–3064.
22. Krasinski R., Tchórzewski H., Lewkowicz P. Antioxidant effect of hyaluronan on polymorphonuclear leukocyte-derived reactive oxygen species is dependent on its molecular weight and concentration and mainly involves the extracellular space. // Postepy Hig. Med. Dosw. 2009. Vol. 63. P. 205–212.
23. Lewis K.N., Wason E., Edrey Y.H., Kristan D.M., Nevo E., Buffenstein R. Regulation of Nrf2 signaling and longevity in naturally long-lived rodents // Proc. Natl. Acad. Sci. 2015. P. 3722-3727.
24. Jarvis J.U. Eusociality in a mammal: cooperative breeding in naked mole-rat colonies. // Science. 1981. Vol. 212, № 4494. P. 571–573.
25. Park T.J., Lu Y., Jüttner R., Smith E.S., Hu J., Brand A., Wetzel C., Milenkovic N., Erdmann B., Heppenstall P.A., Laurito C.E., Wilson S.P., Lewin G.R. Selective inflammatory pain insensitivity in the African naked mole-rat (*Heterocephalus glaber*). // PLoS Biol. / ed. Basbaum A.I. 2008. Vol. 6, № 1. P. e13.
26. Buffenstein R. Woodley R., Thomadakis C., Daly T.J., Gray D.A. Cold-induced changes in thyroid function in a poikilothermic mammal, the naked mole-rat. // Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol. 2001. Vol. 280, № 1. P. R149-55.
27. Goldman B.D., Goldman S.L., Lanz T., Magaurin A., Maurice A. Factors influencing metabolic rate in naked mole-rats (*Heterocephalus glaber*). // Physiol. Behav. 1999. Vol. 66, № 3. P. 447–459.
28. MacRae S.L., Zhang Q., Lemetre C., Seim I., Calder R.B., Hoeijmakers J., Suh Y., Gladyshev V.N., Seluanov A., Gorbunova V., Vijg J., Zhang Z.D. Comparative analysis of genome maintenance genes in naked mole rat, mouse, and human. // Aging Cell. 2015. Vol. 14, № 2. P. 288–291.
29. Keane M., Craig T., Alföldi J., Berlin A.M., Johnson J., Seluanov A., Gorbunova V., Di Palma F., Lindblad-Toh K., Church G.M., de Magalhães J.P. The Naked Mole Rat Genome Resource: Facilitating analyses of cancer and longevity-related adaptations //

- Bioinformatics. 2014. Vol. 30, № 24. P. 3558–3560.
30. Azpurua J., Ke Z., Chen I.X., Zhang Q., Ermolenko D.N., Zhang Z.D., Gorbunova V., Seluanov A. Naked mole-rat has increased translational fidelity compared with the mouse, as well as a unique 28S ribosomal RNA cleavage // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2013. Vol. 110, № 43. P. 17350–17355.
 31. De Waal E.M., Liang H., Pierce A., Hamilton R.T., Buffenstein R., Chaudhuri A.R. Elevated protein carbonylation and oxidative stress do not affect protein structure and function in the long-living naked-mole rat: A proteomic approach // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. Vol. 434, № 4. P. 815–819.
 32. Thieme R., Kurz S., Kolb M., Debebe T., Holtze S., Morhart M., Huse K., Szafranski K., Platzer M., Hildebrandt T.B., Birkenmeier G. Analysis of Alpha-2 Macroglobulin from the Long-Lived and Cancer-Resistant Naked Mole-Rat and Human Plasma // *PLoS One* / ed. Roemer K. 2015. Vol. 10, № 6. P. e0130470.
 33. Tian X., Azpurua J., Hine C., Vaidya A., Myakishev-Rempel M., Ablaeva J., Mao Z., Nevo E., Gorbunova V., Seluanov A. High-molecular-mass hyaluronan mediates the cancer resistance of the naked mole rat // *Nature.* 2013. Vol. 499, № 7458. P. 346–349.
 34. Puré E., Assoian R.K. Rheostatic signaling by CD44 and hyaluronan. // *Cell. Signal.* 2009. Vol. 21, № 5. P. 651–655.
 35. Gorbunova V., Seluanov A., Zhang Z., Gladyshev V.N., Vijg J. Comparative genetics of longevity and cancer: insights from long-lived rodents. // *Nat. Rev. Genet.* Nature Publishing Group, 2014. Vol. 15, № 8. P. 531–540.
 36. Austad S.N. Diverse aging rates in metazoans: targets for functional genomics. // *Mech. Ageing Dev.* 2005. Vol. 126, № 1. P. 43–49.
 37. Lorenzini A., Tresini M., Austad S.N., Cristofalo V.J. Cellular replicative capacity correlates primarily with species body mass not longevity. // *Mech. Ageing Dev.* 2005. Vol. 126, № 10. P. 1130–1133.
 38. Seluanov A., Chen Z., Hine C., Sasahara T.H., Ribeiro A.A., Catania K.C., Presgraves D.C., Gorbunova V. Telomerase activity coevolves with body mass not lifespan. // *Aging Cell.* 2007. Vol. 6, № 1. P. 45–52.
 39. Lipman R., Galecki A., Burke D.T., Miller R.A. Genetic loci that influence cause of death

- in a heterogeneous mouse stock. // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 2004. Vol. 59, № 10. P. 977–983.
40. Campisi J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. // *Trends Cell Biol.* 2001. Vol. 11, № 11. P. S27-31.
 41. Seluanov A., Hine C., Bozzella M., Hall A., Sasahara T.H., Ribeiro A.A., Catania K.C., Presgraves D.C., Gorbunova V. Distinct tumor suppressor mechanisms evolve in rodent species that differ in size and lifespan. // *Aging Cell.* 2008. Vol. 7, № 6. P. 813–823.
 42. Campisi J. Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. // *Cell.* 2005. Vol. 120, № 4. P. 513–522.
 43. Vijg J., Suh Y. Genome instability and aging. // *Annu. Rev. Physiol.* 2013. Vol. 75, № 1. P. 645–668.
 44. MacRae S.L., Croken M.M., Calder R.B., Aliper A., Milholland B., White R.R., Zhavoronkov A., Gladyshev V.N., Seluanov A., Gorbunova V., Zhang Z.D., Vijg J. DNA repair in species with extreme lifespan differences // *Aging (Albany. NY).* 2015. Vol. 7, № 12. P. 1171–1184.
 45. Hart R.W., Sacher G.A., Hoskins T.L. DNA repair in a short- and a long-lived rodent species. // *J. Gerontol.* 1979. Vol. 34, № 6. P. 808–817.
 46. Hanawalt P.C. Revisiting the rodent repairadox. // *Environ. Mol. Mutagen.* 2001. Vol. 38, № 2–3. P. 89–96.
 47. Lorenzini A., Johnson F.B., Oliver A., Tresini M., Smith J.S., Hdeib M., Sell C., Cristofalo V.J., Stamato T.D. Significant correlation of species longevity with DNA double strand break recognition but not with telomere length. // *Mech. Ageing Dev.* 2009. Vol. 130, № 11–12. P. 784–792.
 48. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature.* Nature Publishing Group, 1993. Vol. 362, № 6422. P. 709–715.
 49. Shearman C.W., Loeb L.A. Depurination decreases fidelity of DNA synthesis in vitro. // *Nature.* 1977. Vol. 270, № 5637. P. 537–538.
 50. Chen Y.H., Bogenhagen D.F. Effects of DNA lesions on transcription elongation by T7 RNA polymerase. // *J. Biol. Chem.* 1993. Vol. 268, № 8. P. 5849–5855.

51. Lindahl T., Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid. // *Biochemistry*. 1972. Vol. 11, № 19. P. 3610–3618.
52. Schärer O.D. Chemistry and biology of DNA repair // *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2003. Vol. 42, № 26. P. 2946–2974.
53. Wang D., Kreutzer D.A., Essigmann J.M. Mutagenicity and repair of oxidative DNA damage: Insights from studies using defined lesions // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 1998. Vol. 400, № 1–2. P. 99–115.
54. Bignami M., O'Driscoll M., Aquilina G., Karran P. Unmasking a killer: DNA O⁶-methylguanine and the cytotoxicity of methylating agents. 2000.
55. Ravanat J.L., Douki T., Cadet J. Direct and indirect effects of UV radiation on DNA and its components. // *J. Photochem. Photobiol. B.* 2001. Vol. 63, № 1–3. P. 88–102.
56. Sutherland B.M., Bennett P.V., Sidorkina O., Laval J. Clustered DNA damages induced in isolated DNA and in human cells by low doses of ionizing radiation. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000. Vol. 97, № 1. P. 103–108.
57. Georgakilas A.G., Bennett P.V., Wilson D.M. 3rd, Sutherland B.M. Processing of bistranded abasic DNA clusters in gamma-irradiated human hematopoietic cells. // *Nucleic Acids Res.* 2004. Vol. 32, № 18. P. 5609–5620.
58. Sedelnikova O.A., Redon C.E., Dickey J.S., Nakamura A.J., Georgakilas A.G., Bonner WM. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis // *Mutat. Res. Mutat. Res.* 2010. Vol. 704, № 1–3. P. 152–159.
59. Eccles L.J., O'Neill P., Lomax M.E. Delayed repair of radiation induced clustered DNA damage: friend or foe? // *Mutat. Res. Elsevier*, 2011. Vol. 711, № 1–2. P. 134–141.
60. Ferguson D.O., Alt F.W. DNA double strand break repair and chromosomal translocation: lessons from animal models. // *Oncogene*. 2001. Vol. 20, № 40. P. 5572–5579.
61. Kim Y.-J., Wilson D.M. Overview of base excision repair biochemistry. // *Curr. Mol. Pharmacol.* 2012. Vol. 5, № 1. P. 3–13.
62. Wood R.D., Mitchell M., Sgouros J., Lindahl T. Human DNA repair genes. // *Science*. 2001. Vol. 291, № 5507. P. 1284–1289.
63. Trewick S.C., Henshaw T.F., Hausinger R.P., Lindahl T., Sedgwick B. Oxidative

- demethylation by *Escherichia coli* AlkB directly reverts DNA base damage. // *Nature*. 2002. Vol. 419, № 6903. P. 174–178.
64. Carell T., Burgdorf L.T., Kundu L.M., Cichon M.. The mechanism of action of DNA photolyases. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2001. Vol. 5, № 5. P. 491–498.
 65. Lindahl T., Wood R.D. Quality control by DNA repair. // *Science*. 1999. Vol. 286, № 5446. P. 1897–1905.
 66. Sancar A. DNA excision repair. // *Annu. Rev. Biochem.* 1996. Vol. 65, № 1. P. 43–81.
 67. Seluanov A., Mittelman D., Pereira-Smith O.M., Wilson J.H., Gorbunova V. DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence // *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2004. Vol. 101, № 20. P. 7624–7629.
 68. Dollé M.E., Snyder W.K., Gossen J.A., Lohman P.H., Vijg J. Distinct spectra of somatic mutations accumulated with age in mouse heart and small intestine. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. National Academy of Sciences*, 2000. Vol. 97, № 15. P. 8403–8408.
 69. Hart R.W., Setlow R.B. Correlation between deoxyribonucleic acid excision-repair and life-span in a number of mammalian species // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1974. Vol. 71, № 6. P. 2169–2173.
 70. Kato H., Harada M., Tsuchiya K. Absence of correlation between DNA repair in ultraviolet irradiated mammalian cells and life span of the donor species // *Japanese J. Genet.* 1980. Vol. 55, № 2. P. 99–108.
 71. Page M.M., Stuart J.A. Activities of DNA base excision repair enzymes in liver and brain correlate with body mass, but not lifespan // *Age (Omaha)*. Springer Netherlands, 2012. Vol. 34, № 5. P. 1195–1209.
 72. Freitas A.A., de Magalhães J.P. A review and appraisal of the DNA damage theory of ageing. // *Mutat. Res.* 2011. Vol. 728, № 1–2. P. 12–22.
 73. Fushan A.A., Turanov A.A., Lee S.G., Kim E.B., Lobanov A.V., Yim S.H., Buffenstein R., Lee S.R., Chang K.T., Rhee H., Kim J.S., Yang K.S., Gladyshev V.N. Gene expression defines natural changes in mammalian lifespan // *Aging Cell*. 2015. Vol. 14, № 3. P. 352–365.
 74. Tian X., Seluanov A., Gorbunova V. Molecular Mechanisms Determining Lifespan in

- Short- and Long-Lived Species // Trends Endocrinol. Metab. Elsevier Ltd, 2017. Vol. 28, № 10. P. 722–734.
75. Zhang G., Cowled C., Shi Z., Huang Z., Bishop-Lilly K.A., Fang X., Wynne J.W., Xiong Z., Baker M.L., Zhao W., Tachedjian M., Zhu Y., Zhou P., Jiang X., Ng J., Yang L., Wu L., Xiao J., Feng Y., Chen Y., Sun X., Zhang Y., Marsh G.A., Cramer G., Broder C.C., Frey K.G., Wang L.F., Wang J. Comparative analysis of bat genomes provides insight into the evolution of flight and immunity. // *Science*. 2013. Vol. 339, № 6118. P. 456–460.
 76. Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA. // *Nature*. 1993. Vol. 362, № 6422. P. 709–715.
 77. Wallace S.S. Enzymatic Processing of Radiation-Induced Free Radical Damage in DNA. // *Radiat. Res.* 2014. Vol. 150, № 5. P. 60–79.
 78. Sattler U., Frit P., Salles B., Calsou P. Long-patch DNA repair synthesis during base excision repair in mammalian cells. // *EMBO Rep.* 2003. Vol. 4, № 4. P. 363–367.
 79. Gary R., Kim K., Cornelius H.L., Park M.S., Matsumoto Y. Proliferating cell nuclear antigen facilitates excision in long-patch base excision repair. // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 7. P. 4354–4363.
 80. Dianov G.L., Prasad R., Wilson S.H., Bohr V.A. Role of DNA polymerase β in the excision step of long patch mammalian base excision repair // *J. Biol. Chem.* 1999. Vol. 274, № 20. P. 13741–13743.
 81. Prasad R., Dianov G.L., Bohr V.A., Wilson S.H. FEN1 stimulation of DNA polymerase β mediates an excision step in mammalian long patch base excision repair // *J. Biol. Chem.* 2000. Vol. 275, № 6. P. 4460–4466.
 82. Prasad R., Lavrik O.I., Kim S.J., Kedar P., Yang X.P., Vande Berg B.J., Wilson S.H. DNA polymerase β -mediated long patch base excision repair: Poly(ADP-ribose) polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis // *J. Biol. Chem.* 2001. Vol. 276, № 35. P. 32411–32414.
 83. Beneke S., Bürkle A. Poly(ADP-Ribosyl)ation, PARP, and Aging // *Sci. Aging Knowl. Environ.* 2004. Vol. 2004, № 49. P. re9-re9.
 84. Davidovic L., Vodenicharov M., Affar E.B., Poirier G.G. Importance of Poly(ADP-Ribose) Glycohydrolase in the Control of Poly(ADP-Ribose) Metabolism // *Exp. Cell Res.*

2001. Vol. 268, № 1. P. 7–13.
85. Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 as a key regulator of DNA repair // *Mol. Biol.* 2016. Vol. 50, № 4. P. 580–595.
 86. Lonskaya I., Potaman V.N., Shlyakhtenko L.S., Oussatcheva E.A., Lyubchenko Y.L., Soldatenkov V.A. Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding // *J. Biol. Chem.* 2005. Vol. 280, № 17. P. 17076–17083.
 87. de Murcia J.M., 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. U. S. A.* 1997. Vol. 94, № 14. P. 7303–7307.
 88. Ménissier 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. Vol. 22, № 9. P. 2255–2263.
 89. Seeberg E., Eide L., Bjørås M. The base excision repair pathway. // *Trends Biochem. Sci.* 1995. Vol. 20, № 10. P. 391–397.
 90. Visnes T., Doseth B., Pettersen H.S., Hagen L., Sousa M.M., 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. Vol. 364, № 1517. P. 563–568.
 91. Ladner R.D. The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy. // *Curr. Protein Pept. Sci.* 2001. Vol. 2, № 4. P. 361–370.
 92. Schormann N., Ricciardi R., Chattopadhyay D. Uracil-DNA glycosylases-structural and functional perspectives on an essential family of DNA repair enzymes. // *Protein Sci.* 2014. Vol. 23, № 12. P. 1667–1685.
 93. Mol C.D., Izumi T., Mitra S., Tainer J.A. DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination. // *Nature.* 2000. Vol. 403, № 6768. P. 451–456.
 94. David-Cordonnier M.-H., Cunniffe S.M., Hickson I.D., O'Neill P. Efficiency of incision of an AP site within clustered DNA damage by the major human AP endonuclease. // *Biochemistry.* 2002. Vol. 41, № 2. P. 634–642.

95. Balakrishnan L., Bambara R.A. Flap Endonuclease 1 // *Annu. Rev. Biochem.* 2013. Vol. 82, № 1. P. 119–138.
96. Seeberg E., Eide L., Bjørås M. The base excision repair pathway // *Trends Biochem. Sci.* 1995. Vol. 20, № 10. P. 391–397.
97. Sukhanova M., Khodyreva S., Lavrik O. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates activity of DNA polymerase β in long patch base excision repair // *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 2010. Vol. 685, № 1–2. P. 80–89.