

Голый землекоп демонстрирует повышенную эффективность репарации ДНК и устойчивость к генотоксическим воздействиям

Евдокимов А.¹, Кутузов М.¹, Петрусева И.^{1*}, Попов А.¹, Романенко С.², Перельман П.², Прокопов Д.², Селуанов А.⁴, Горбунова В.⁴, Графодатский А.², Трифонов В.², Ходырева С.¹, Рябчикова Е.¹, Коваль О.¹, Лаврик И.³, Лаврик О.¹

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

² Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия

³ Translational Inflammation Research, Medical Faculty, Center of Dynamic Systems, Otto von Guericke University Magdeburg, Magdeburg 39106, Germany

⁴ Department of Biology, University of Rochester, Rochester, NY 14627, USA

* irapetru@niboch.nsc.ru

Ключевые слова: *Heterocephalus glaber*; репарация ДНК; поли(АДФ-рибоза)полимераза 1; регулируемая гибель клеток

Мотивация и цель: Голый землекоп, *Heterocephalus glaber*, является самым долгоживущим видом грызунов и чрезвычайно устойчив к раку и болезням, связанным со старением. Это животное отличается рекордно высокой для грызунов максимальной продолжительностью жизни, повышенной устойчивостью к раковым заболеваниям и рядом других уникальных фенотипических черт; его геном и протеом отличаются стабильностью и эффективностью функционирования. Все это давало основание предполагать, что молекулярные «машин», противостоящие накоплению повреждений в геноме *H. glaber*, включая механизмы репарации ДНК, функционируют с высокой эффективностью. Механизмы регулируемой гибели клеток могут быть напрямую связаны с устойчивостью к возникновению индуцированных раковых опухолей. Однако вопрос о том, насколько эффективно и какие механизмы регулируемой клеточной гибели и как реагируют на генотоксические воздействия клетки *H. glaber* остается предметом изучения.

Методы и алгоритмы: Культивирование клеток и условия УФ-облучения описаны в [1]. Активность NER *in vitro*, эффективность удаления участка модельной ДНК-субстрата, содержащей объемное повреждение, определяли с использованием 3'-концевого мечения [1] или используя метод количественной ПЦР [2].

Результаты: Как базальная, так и УФ-индуцированная эксцизионная активность NER оказались выше в *H. glaber*, чем в клетках мыши. Более эффективное удаление урацила наблюдалось в экстрактах клеток *H. glaber* по сравнению с мышинными. Базовые уровни расщепления AP-сайта были одинаковыми в экстрактах необработанных клеток *H. glaber* и клеток мыши, но клетки ЯМР продемонстрировали более сильный ответ на обработку УФ-светом, чем клетки мыши. Для экстракта клеток *H. glaber* в моменты времени после облучения наблюдалось четко выраженное увеличение активности элонгации ДНК-полимеразы по сравнению с необлученными клетками. Уровень синтеза ПАР был

выше в экстрактах *H. glaber*, чем в клетках мыши. Изучение влияния метилметансульфоната, 5-фторурацила и этопозиды на оба типа клеток с помощью современных анализов гибели клеток включая проточную цитометрию и электронную микроскопию показало, что фибробласты кожи *H. glaber* более устойчивы к действию, повреждающих ДНК агентов, чем фибробласты *Mus musculus*. Можно также заключить, что клетки *H. glaber* демонстрируют слабо выраженный апоптотический ответ и предположительно подвергаются регулируемому некрозу. В совокупности это исследование дает новое понимание механизмов гибели клеток *H. glaber* и расширяет наше понимание основ долголетия.

Заключение. В совокупности это исследование впервые на примере путей эксционной репарации нуклеотидов и оснований демонстрирует, что удаление повреждений ДНК в клетках долгоживущего *Heterocephalus glaber* протекает более эффективно, чем в клетках коротко живущей *Mus musculus*, а также помогает продвинуться в понимании механизмов гибели клеток *H. glaber*.

Финансирование: Работа выполнена в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300041-4.

Naked mole rat demonstrates increased DNA repair efficiency and resistance to genotoxic effects

Evdokimov A.¹, Kutuzov M.¹, Petrusheva I.^{1*}, Popov A.¹, Romanenko S.², Perelman P.², Prokopov D.², Seluanov A.⁴, Gorbunova V.⁴, Graphodatsky A.², Trifonov V.², Khodyreva S.¹, Ryabchikova E.¹, Koval O.¹, Lavrik I.³, Lavrik O.¹

¹ Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Novosibirsk, Russia

² Institute of Molecular and Cellular Biology, Novosibirsk, Russia

³ Translational Inflammation Research, Medical Faculty, Center of Dynamic Systems, Otto von Guericke University Magdeburg, Magdeburg, Germany

⁴ Department of Biology, University of Rochester, Rochester, NY, USA

* irapetru@niboch.nsc.ru

Key words: *Heterocephalus glaber*; DNA repair; poly(ADP-ribose)polymerase 1; regulated cell death

Motivation and Aim: The naked mole rat, *Heterocephalus glaber*, is the longest living rodent species and is extremely resistant to cancer and diseases associated with aging. This animal is distinguished by a record-breaking maximum life expectancy for rodents, increased resistance to cancer, and a number of other unique phenotypic traits; its genome and proteome are characterized by stability and efficient functioning. All this gave reason to assume that the molecular “machines” that resist the accumulation of damage in the *H. glaber* genome, including DNA repair mechanisms, function with high efficiency. Mechanisms of regulated cell death may be directly related to resistance to induced cancer tumors. However, the question of how effective and what mechanisms of regulated cell death and how *H. glaber* cells respond to genotoxic effects remains a subject of study.

Methods and Algorithms: The cells cultivation and UVC-light irradiation conditions described in [1]. The efficiency of removal of model DNA-substrate region containing lesions was determined using the 3'-end-labeling [1] or using qPCR-assay.

The assays of uracil excision activity of cell extracts, AP-site cleavage activity of cell extracts and PARylation with cell extract proteins described in [2].

Metabolic assay, cell death detection and caspase activity detection described in [2].

Results: Both basal and UV-induced NER excision activities were higher in *H. glaber* than in mouse cells. More efficient removal of uracil was observed in *H. glaber* cell extracts compared to mouse extracts. Baseline levels of AP site cleavage were similar in extracts of untreated *H. glaber* and mouse cells, but NMR cells showed a stronger response to UV light treatment than mouse cells. For the *H. glaber* cell extract, a clear increase in DNA polymerase elongation activity was observed at time points after irradiation compared to non-irradiated cells. The level of PAR synthesis was higher in *H. glaber* extracts than in mouse cells. Studying the effects of methylmethanesulfonate, 5-fluorouracil and etoposide on both cell types using modern cell death assays, including flow cytometry and electron microscopy, showed that *H. glaber* skin fibroblasts are more resistant to DNA-damaging agents than *Mus musculus* fibroblasts. It can also be concluded that *H. glaber* cells exhibit a mild apoptotic response and presumably undergo regulated necrosis. Taken together, this study provides new insight into the mechanisms of *H. glaber* cell death and expands our understanding of the basis of longevity.

Conclusion: Taken together, this study demonstrates for the first time, using the example of nucleotide and base excision repair pathways, that the removal of DNA damage in the cells of the long-lived *Heterocephalus glaber* is more efficient than in the cells of the short-lived *Mus musculus*, and also helps to advance the understanding of the mechanisms of cell death *H. glaber*.

Funding: The study is supported by the Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation (project number 121031300041-4).

Список литературы/References

1. Evdokimov A., Kutuzov M., Petruseva I. et al. Naked mole rat cells display more efficient excision repair than mouse cells. *Aging (Albany NY)*. 2018;10(6):1454-1473. doi 10.18632/aging.101482
2. Evdokimov A., Popov A., Ryabchikova E. et al. Uncovering molecular mechanisms of regulated cell death in the naked mole rat. *Aging (Albany NY)*. 2021;13(3):3239-3253. doi 10.18632/aging.202577