

Применение qPCR для оценки эффективности удаления объемных повреждений ДНК *in vitro*

Попов А.*, Петрусева И., Лаврик О.

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

* depolice@mail.ru

Ключевые слова: репарация ДНК; объемные повреждения; PCR; эксцизионная репарация нуклеотидов; долголетие

Мотивация и цель: Белки эксцизионной репарации нуклеотидов (nucleotide excision repair, NER) удаляют из ДНК широкий спектр объемных повреждений, в том числе аддукты, формирующиеся под действием УФ-света и вредных полициклических соединений из окружающей среды. Оценка функционального статуса NER в клетках имеет важное значение как для фундаментальных исследований, так и при диагностике различных патологических состояний. В большинстве работ по изучению NER оценивали специфическую эксцизионную активность белков прямой детекцией продуктов эксцизии модельных ДНК либо путем постэксцизионного радиоактивного мечения 3'-концов этих продуктов [1–4]. Существенным недостатком этих методов, ограничивающим их применение в клинике, является необходимость использования радиоактивной метки при создании модельной ДНК либо детекции продуктов эксцизии. В связи с этим особую значимость для определения активности NER *in vitro* приобретают методы, основанные на количественной ПЦР (quantitative polymerase chain reaction, qPCR). Возможность оценки эффективности протекания репарации путем измерения флуоресценции в сочетании с простой и быстрой процедурой выполнения делает методы, основанные на qPCR, перспективными инструментами для применения не только в исследовательских целях, но и в медицине. Целью настоящей работы стала разработка метода оценки эффективности удаления объемных повреждений *in vitro* с использованием qPCR.

Методы и алгоритмы: С использованием процедуры, описанной в работе [1], были синтезированы модельные ДНК (160 п.н.), содержащие в своем составе ненуклеозидную вставку на основе N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиола (nFlu) либо N-[6-(9-антраценилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиола (nAnt). Комплементарные цепи обоих типов ДНК-дуплексов содержали вставку на основе тетраэтиленгликоля (TEG), с 5'-стороны которой была введена фосфотиоатная группа (PS). Также была синтезирована немодифицированная ДНК (nm/TEG-ДНК), имитирующая продукт репарации. NER-компетентные экстракты клеток голого землекопа (*Heterocephalus glaber*) и мыши (*Mus musculus*) были приготовлены по протоколу, представленному в работе [5].

Результаты: Результаты проведенной сравнительной оценки амплификации nFlu/TEG-ДНК и nm/TEG-ДНК подтвердили возможность использования ДНК-субстрата, сконструированного нами; значение порогового цикла $C(t)$ для nm/TEG- и nFlu/TEG-ДНК составило 12.12 ± 0.29 и 19.28 ± 0.52 цикла соответственно; разница в значениях порогового цикла между nFlu/TEG- и nm/TEG-ДНК

(dC(t)) составила 7.17 ± 0.43 цикла. Таким образом, субстрат и продукт реакции специфической эксцизии различимы в ходе проведения PCR.

Используя сконструированный субстрат nFlu/TEG-ДНК, мы провели оценку эффективности удаления объемных повреждений ДНК *in vitro* белками клеток долгоживущего голого землекопа и короткоживущей мыши с помощью qPCR. Эффективность репарации nFlu/TEG-ДНК была более высокой на всем временном промежутке инкубации с белками экстракта клеток *H. glaber* и после 30 минут составила 55.67 ± 0.42 %, тогда как после 30 минут инкубации с белками экстракта клеток *M. musculus* эффективность репарации была значительно ниже и составила 35.17 ± 1.42 %. Инкубация nm/TEG-ДНК с белками экстрактов в течение 30 минут не приводила к заметному изменению в значениях C(t), что говорит об отсутствии значимого влияния неспецифического воздействия белков экстрактов в обоих случаях. Белки экстракта клеток *H. glaber* практически в 1.5 раза более эффективно удаляли объемное повреждение nFlu из модельного ДНК-субстрата, чем белки экстракта клеток *M. musculus*, что согласуется с ранее описанными результатами, полученными альтернативным методом [6].

Дополнительно оценена эффективность репарации pAnt/TEG-ДНК и nFlu/TEG-ДНК в реакции NER, катализируемой белками экстракта клеток CHO. Для этого 160-звенные pAnt/TEG- и nFlu/TEG-ДНК (16 нМ) выдерживали с белками экстракта клеток CHO (1.6 мг/мл) в течение 30 минут, после чего проводили анализ восстановленной ДНК с помощью qPCR. Эффективность репарации pAnt/TEG-ДНК была несколько ниже и после 30 минут инкубации с белками составила 28.72 ± 1.92 %, в то время как для nFlu/TEG-ДНК этот показатель составил 36.77 ± 1.68 %.

Выводы: Представленные результаты демонстрируют, что разработанный способ позволяет детектировать различия в эффективности удаления белками клеточных экстрактов объемных повреждений, отличающихся по своей химической структуре и субстратным свойствам. Таким образом, разработанный метод открывает перспективы для дальнейшего использования в исследованиях, направленных не только на изучение репарации ДНК в клетках долгоживущих млекопитающих, но и на поиск функциональной взаимосвязи различных систем репарации ДНК, участвующих в удалении объемных повреждений.

Финансирование: Исследование поддержано РНФ (№ 22-14-00112).

The use of qPCR to assess the efficiency of removal of bulky DNA damages *in vitro*

Popov A.*, Petrusheva I., Lavrik O.

Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* depolice@mail.ru

Key words: DNA repair; bulky damages; PCR; nucleotide excision repair; longevity

Motivation and Aim: Nucleotide excision repair (NER) proteins remove a wide range of bulky damages from DNA, including adducts formed by UV light and harmful polycyclic compounds from the environment. The assessment of the functional status of NER in cells is important both for fundamental research and for the diagnosis of various diseases. In most studies of NER, the specific excision activity of proteins was evaluated

by direct detection of excision products of model DNA or by postexcision radioactive labeling of the 3' ends of these products [1–4]. A significant disadvantage of these methods, which limits their use in the clinic, is the need to use a radioactive label when creating model DNA, or detecting excision products. In this regard, methods based on quantitative PCR (quantitative polymerase chain reaction, qPCR) are of particular importance for determining the activity of NER *in vitro*. The ability to evaluate the efficiency of repair by measuring fluorescence, combined with a simple and fast procedure, makes qPCR-based methods promising tools for use not only for research purposes, but also in medicine. The purpose of this work was to develop a method for assessing the efficiency of bulky damage removal *in vitro* using qPCR.

Methods and Algorithms: Using the procedure described in [1], model DNA (160 bp) containing a non-nucleoside insert based on N-[6-(5(6)- fluoresceinyl carbamoyl)-hexanoyl]-3-amino-1,2-propanediol (nFlu), or N-[6-(9-anthracenylcarbamoyl)-hexanoyl]-3-amino-1,2-propanediol (nAnt) were synthesized. The complementary chains of both types of DNA duplexes contained tetraethylene glycol (TEG) insert, from the 5' side of which a phosphothioate group (PS) was introduced. Unmodified DNA (nm/TEG-DNA) was also synthesized, simulating the repair product. NER-competent extracts of naked mole rat (*Heterocephalus glaber*) and mouse (*Mus musculus*) cells were prepared according to the protocol presented in [5].

Results: The results of a comparative assessment of the amplification of nFlu/TEG-DNA and nm/TEG-DNA confirmed the possibility of using the DNA substrate designed by us; the value of the threshold cycle $C(t)$ for nm/TEG- and nFlu/TEG-DNA was 12.12 ± 0.29 and 19.28 ± 0.52 cycles, respectively; the difference in the values of the threshold cycle. The difference between nFlu/TEG- and nm/TEG-DNA ($dC(t)$) was 7.17 ± 0.43 cycles. Thus, the substrate and the product of the specific excision reaction are distinguishable during PCR.

Using the constructed nFlu/TEG-DNA substrate, we evaluated the efficiency of removal of bulky DNA damage *in vitro* by proteins from cells of a long-lived naked mole rat and a short-lived mouse using qPCR. The efficiency of nFlu/TEG DNA repair was higher during the entire incubation period with *H. glaber* cell extract proteins and after 30 minutes was 55.67 ± 0.42 %, while after 30 minutes of incubation with *M. musculus* cell extract proteins, the repair efficiency was significantly lower and amounted to 35.17 ± 1.42 %. Incubation of nm/TEG DNA with extract proteins for 30 minutes did not lead to a noticeable change in $C(t)$ values, which indicates that there was no significant effect of the nonspecific effect of extract proteins in both cases. The proteins of the *H. glaber* cell extract were almost 1.5 times more effective at removing bulky nFlu damage from the model DNA substrate than the proteins of the *M. musculus* cell extract, which is consistent with the previously described results obtained by an alternative method [6].

The efficiency of nAnt/TEG-DNA and nFlu/TEG-DNA repair in the NER reaction catalyzed by proteins of the CHO cell extract was additionally evaluated. To do this, 160-link nAnt/TEG and nFlu/TEG DNA (16 nM) were incubated with CHO cell extract proteins (1.6 mg/ml) for 30 minutes, after which the recovered DNA was analyzed using qPCR. The efficiency of nAnt/TEG DNA repair was slightly lower, and after 30 minutes of incubation with proteins was 28.72 ± 1.92 %, while for nFlu/TEG DNA this indicator was 36.77 ± 1.68 %.

Conclusion: The presented results demonstrate that the developed method makes it possible to detect differences in the efficiency of removing bulky damages by proteins

of cellular extracts that differ in their chemical structure and substrate properties. Thus, the developed method opens up prospects for further use in research aimed not only at studying DNA repair in long-lived mammalian cells, but also at searching for the functional relationship of various DNA repair systems involved in the removal of bulky damages.

Funding: The study is supported RSF (No. 22-14-00112).

Список литературы/References

1. Evdokimov A. et al. New synthetic substrates of mammalian nucleotide excision repair system. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:e123. doi 10.1093/nar/gkt301
2. Liu Z. et al. Resistance to nucleotide excision repair of bulky guanine adducts opposite abasic sites in DNA duplexes and relationships between structure and function. *PLoS One.* 2015;10:e0142068. doi 10.1371/journal.pone.0137124
3. Lukyanchikova N.V. et al. DNA with damage in both strands as affinity probes and nucleotide excision repair substrates. *Biochemistry (Moscow).* 2016;81:263-274. doi 10.1134/S0006297916030093
4. Naumenko N., Petruseva I., Lomzov A., Lavrik O. Recognition and removal of clustered DNA lesions via nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst).* 2021;108:103225. doi 10.1016/j.dnarep.2021.103225
5. Reardon J.T., Sancar A. Purification and characterization of Escherichia coli and human nucleotide excision repair enzyme systems. *Methods Enzymol.* 2006;408:189-213. doi 10.1016/S0076-6879(06)08012-8
6. Evdokimov A. et al. Naked mole rat cells display more efficient excision repair than mouse cells. *Aging (Albany NY).* 2018;10:1454-1473. doi 10.18632/aging.101482