

## ОКИСЛИТЕЛЬНАЯ МОДИФИКАЦИЯ ДНК ПЛАЗМИД СПОСОБСТВУЕТ ИХ ПРОНИКНОВЕНИЮ В ЦИТОПЛАЗМУ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Конькова М.С.<sup>1</sup>, Ершова Е.С.<sup>1</sup>, Вейко Н.Н.<sup>1</sup>, Кальянов А.А.<sup>1</sup>, Малиновская Е.М.<sup>1</sup>,  
Каменева Л.В.<sup>1</sup>, Вейко В.П.<sup>1,2</sup>, Костюк С.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Медико-генетический научный центр имени академика Н.П. Бочкова  
ул. Москворечье, 1, г. Москва, 115522, РФ; e-mail: mkonkova@med-gen.ru

<sup>2</sup>Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН

Ленинский просп., 33, к. 2, г. Москва, 119071, РФ; e-mail: vladveiko@yahoo.com

Поступила в редакцию 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbpс.2022.0548

**Аннотация.** Хорошо известно, что действие ионизирующей радиации вызывает окислительный стресс в клетках организма и приводит к синтезу активных форм кислорода, которые приводят к множественным поражениям клеточной ДНК, в числе которых - образование окисленных оснований. В данной работе рассматривается влияние радиационно-индуцированной окислительной модификации ДНК плазмид на их проникновение в мезенхимные стволовые клетки человека. Для исследования роли окислительной модификации ДНК в проникновении в клетки была создана генетическая конструкция на основе вектора pEGFP-C1 (pC1), GenBankAccession: U55763, содержащая в качестве вставки искусственно синтезированный фрагмент ДНК, имеющий в своем составе поли-G участок (p12G), служащий мишенью для эффективного окисления клонированного фрагмента ДНК. В качестве «маркера» в составе выбранного вектора содержится ген флуоресцирующего белка EGFP (GFP). Методами проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии было показано, что рекомбинантные конструкции на основе вектора pEGFP, содержащие дублированные участки поли-G и повторы Gp намного эффективнее проникают в клетки, чем исходный вектор pEGFP. Воздействие радиации в дозе 50 сГр, вызывающее повышение уровня 8-oxodG в плаزمидах после облучения, приводит к более интенсивному проникновению окисленных плазмид по сравнению с аналогичным экспериментом без облучения.

**Ключевые слова:** мезенхимные стволовые клетки человека, ионизирующее излучение, рекомбинантные конструкции, окисленная ДНК, 8-oxodG, окислительный стресс.

### ВВЕДЕНИЕ

Стволовые клетки являются недифференцированными клетками, обладающими потенциалом для неограниченного деления и дифференцировки во многие типы клеток. Поскольку стволовые клетки являются резервным пулом для пополнения разных типов клеток организма, проводятся эксперименты *in vitro* по перетрансформации стволовых клеток в соматические клетки и исследуются эффективные способы трансфекции плазмид в цитоплазму стволовых клеток.

Действие ионизирующей радиации вызывает окислительный стресс в клетках организма и приводит к синтезу активных форм кислорода (АФК); процесс формирования АФК после облучения занимает от нескольких секунд до 2-5 минут от начала экспозиции в различных типах клеток [1]. АФК приводят к множественным поражениям клеточной ДНК, в числе которых - образование окисленных оснований [2].

Ранее мы показали, что окислительная модификация внеклеточной ДНК при добавлении в среду культивирования раковых клеток линии MCF7 способствует ее проникновению в цитоплазму клеток [3]. Облучение рентгеновским излучением в дозе 10 сГр раковых клеток MCF7 после добавления ГЦ-обогащённых плазмид в среду их культивирования приводило к повышению уровня 8-oxodG в плазмидах через 30 минут после облучения и к более интенсивному проникновению окисленных плазмид по сравнению с аналогичным экспериментом без облучения [4].

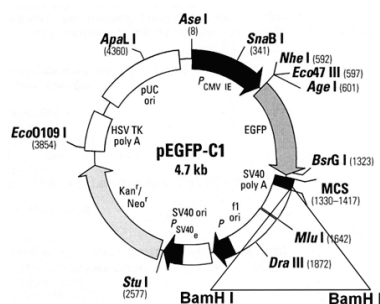
Кроме того, нами было обнаружено, что при облучении дозами радиации 10-50 сГр в результате гибели части клеток в среде культивирования мезенхимных стволовых клеток (МСК) накапливаются окисленные фрагменты внеклеточной ДНК, которые проникают в цитоплазму МСК [5,6]. Предположили, что окислительная модификация ДНК вследствие воздействия радиации может приводить к эффективному проникновению ДНК из среды культивирования МСК внутрь клетки.

Задачей данного исследования являлось изучение роли окислительной модификации ДНК в процессе проникновения ДНК в виде плазмид через цитоплазматическую мембрану МСК.

### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследования роли окислительной модификации ДНК в проникновении в клетки была создана генетическая конструкция на основе «базового» вектора pEGFP-C1 (pC1), GenBankAccession: U55763 (рис. 1А).

А



Б

Плазмида p12G

```

N S A V D G T A G P G S T G S R &
5' cgaattctgcagtcgacgggtaccgcccgggatccaccggatctagataatcgccgt
      ^BamHI
ccgcccgcgccttgggggggggggatccaccggatctagataaactgatcataatcag
      ^BamHI

```

Плазмида p13G-11G

```

A V D G T A G P G S T G S R
5' tgcagtcgacgggtaccgcccgggatccaccggatctagataatcgccgtccgcccgcgc
      ^BamHI
gccccttgggggggggggatccaccggatctagataatcgccgtccgcccgcgcgc
      ^BamHI
ttgggggggggggatccaccggatctagataaactgatcataatcagcc
      ^BamHI

```

**Рисунок 1.** А. Структура «базового» вектора. Обозначено положение вводимого в состав плазмиды «модифицирующего» фрагмента ДНК (BamH I - BamH I). Б. Структуры «модифицирующих» вставок ДНК, клонированных в составе «базовой» плазмиды pEGFP-C1. Приведена трансляция 3'-концевой части гена GFP, жирным шрифтом выделены сайты BamHI, курсивом – поли-Г участки в структуре «модифицирующих» вставок ДНК

Следует отметить, что G/C-состав плазмиды pC1 составляет 53,4% и она содержит в своей структуре 141 участок повтора GGG и 15 участков GGGG (как наиболее легко окисляемые участки ДНК [7]). В качестве «маркера» в составе данного вектора содержится ген белка EGFP (GFP), который сайт-направленным мутагенезом (замена аминокислотных остатков Phe-64-Leu и Ser65-Thr) оптимизирован для более высокого уровня флуоресценции со сдвигом в красную область (волна возбуждения 488 нм, а волна эмиссии – 507 нм). Структура гена EGFP оптимизирована для эффективной его экспрессии в клетках эукариот, что важно для выявления трансфицированных клеток даже при низком уровне трансфекции.

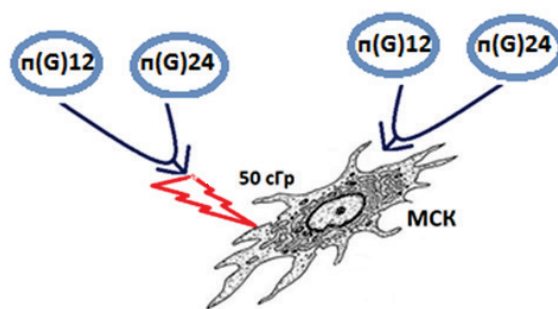
Для исследования функциональной роли легкоокисляемой структуры, дополнительно вводимой в состав плазмиды pEGFP-C1, был выбран искусственно синтезированный фрагмент ДНК, содержащий поли-Г участок (как мишень для эффективного окисления клонированного фрагмента ДНК). Искусственно получаемый фрагмент ДНК, содержащий участки поли-Г структур, имеет длину 121 нуклеотидных пар и его G/C-содержание составляет 73,6%. Кроме того, в его структуре имеется участок поли-Г, роль которого (в окисленной форме) в эффективности трансфекции ДНК выявлялась в данном исследовании. При получении целевых фрагментов ДНК, предназначенных для специфической модификации «базовой» плазмиды pEGFP-C1, использовался метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для этого были разработаны и синтезированы олигонуклеотидные праймеры GF\_601 (gggcccgggatccaccggatctagataatcgccgtcccgcgcgcctt) и C10 (tttttgatcccccccccaaggcggcggcgggacggcgca). Синтезируемые с их использованием фрагменты ДНК фланкированы сайтами эндонуклеазы рестрикции BamHI. Этот сайт является уникальным в плазмиде pEGFP-C1, что обеспечивает точную адресную «модификацию» исходного вектора клонируемым фрагментом ДНК. Сайт эндонуклеазы рестрикции BamHI входит в плазмиде pEGFP-C1 в состав мультиклонального участка (рис. 1А, MCS), кодирующего одновременно С-концевой фрагмент белка GFP, нарушать структуру которого было нежелательно. В связи с этим в структуру праймера GF\_601 был введен участок нуклеотидной последовательности, копирующей таковую в исходной «базовой» плазмиде pEGFP-C1. Разработанная тактика позволяла не только точно клонировать «модифицирующий» фрагмент ДНК в составе вектора pEGFP-C1, но и не нарушить структуру функционально важных участков. После взаимной достройки с применением ПЦР, полученный фрагмент был клонирован. Во время скрининга клонов и определения нуклеотидной последовательности клонированной «модифицирующей» вставки, кроме целевой плазмиды (p12G) был дополнительно найден вариант плазмиды (p13G-11G), содержащий в своем составе дублирование поли-Г последовательности. Этот вариант был также выбран для исследований. Нуклеотидные последовательности «модифицирующих» вставок в «базовую» плазмиду приведены на рисунке 1Б.

В работе использован вектор pEGFP-C1 (pC1) и производные плазмиды pEGFP-C1:

1. p12G, содержащая участок поли-Г;
2. p13G-11G, содержащая дублированные участки поли-Г

Эксперименты проводились на культивируемых *in vitro* МСК, полученных из пяти образцов жировой ткани, из коллекции клеточных культур ФГБНУ «МГНЦ». Исследование экспрессии клетками поверхностных белков проводили методом проточной цитофлуориметрии с использованием соответствующих антител на приборе CyFlow (PartecCyFlow® ML, Германия). МСК были типированы по поверхностным антигенам: HLA-ABC +, CD44 +, CD54 (low), CD90 +, CD106 +, CD29 +, CD49b (low), CD105 (low). Клетки центрифугировали (200g, 10 мин), перенесли во флаконы и культивировали при 37°C в среде AmnioMax C-100 BasalMedium ("Gibco"), содержащей AmnioMaxSupplement C-100, 20 мкмоль/л NEPEP ("ПанЭко") и антибиотики.

В МСК плазмиды вводили двумя способами: путем введения плазмид, содержащих ген флуоресцирующего белка, в среду культивирования в концентрации 100 нг/мл с последующим инкубированием



**Рисунок 2.** Схема эксперимента: в МСК плазмиды вводили двумя способами: путем введения плазмид, содержащих ген флуоресцирующего белка, в среду культивирования в концентрации 100 нг/мл с последующим инкубированием 24 часа в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37 °С и путем введения плазмид в концентрации 100 нг/мл с последующим облучением через 2-3 минуты рентгеновским излучением в дозе 50 сГр с инкубированием 24 часа в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37 °С

24 часа в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37 °С и путем введения плазмид в концентрации 100 нг/мл с последующим облучением через 2-3 минуты рентгеновским излучением в дозе 50 сГр при помощи импульсного рентгеновского аппарата «АРИНА-2» (ООО «Спектрофлэш, С.-Пб.) и с инкубированием 24 часа в CO<sub>2</sub> инкубаторе при 37 °С. Схема эксперимента приведена на рис. 2. В качестве контрольного эксперимента по трансфекции плазмид в клетки и для иллюстрации способности плазмид транскрибироваться в клетках применили стандартный подход с использованием реагента для трансфекции фирмы Thermo – Turbo Fect набор, согласно протоколу.

Для анализа проникновения плазмид в клетки применили два метода: флуоресцентной микроскопии (AxioVert, «Carl Zeiss Microscopy», Германия) и проточной цитофлуориметрии (PartecCyFlow® ML, Германия), перед проведением анализа контрольные или обработанные плазмидами клетки промывали раствором Versene, далее раствором трипсина (0, 25 %). Клетки промывали стандартным соевым буферным раствором (PBS) и ресуспендировали в 1 мл PBS.

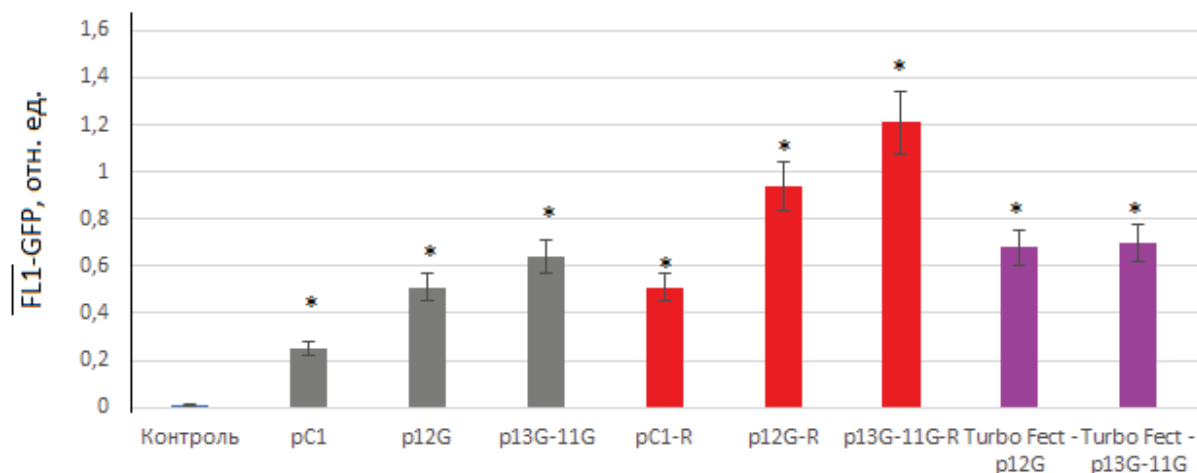
Анализ изображений проводили с использованием программного обеспечения Carl Zeiss Microscopy, различия проверяли с помощью расчета U-критерия Манна-Уитни и считали достоверными при  $p < 0,01$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

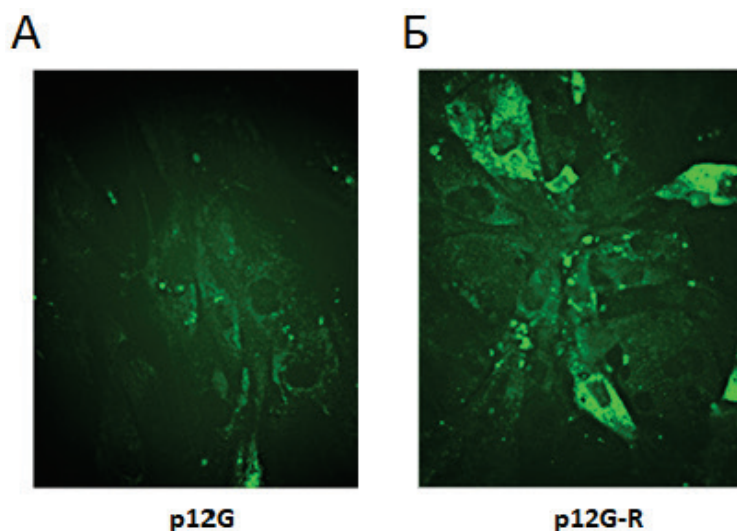
Все использованные в работе плазмиды содержат ген флуоресцирующего белка. Если плазида проникает в клетки и происходит экспрессия белка, то интенсивность флуоресценции клеток должна возрастать пропорционально уровню экспрессии белка. Результаты анализа приведены на рисунке 3.

Средняя интенсивность флуоресценции клеток относительно интактных клеток (контроль) возрастает после их инкубирования в присутствии интактных (неокисленных) плазмид в ряду (серые и фиолетовые столбики на рис. 3):

Контроль <pC1 <pG12 <pG13-11 ≈ pG12 (Turbo Fect) ≈ pG13-11(Turbo Fect).



**Рисунок 3.** Анализ флуоресценции клеток МСК методом проточной цитофлуориметрии. Приведены медианы флуоресценции клеток в различных условиях. Условия культивирования показаны на рисунке 2. R – воздействие радиации, 50 сГр. \* – достоверное увеличение флуоресценции относительно контроля ( $p < 0,001$ )



**Рисунок 4.** Метод флуоресцентной микроскопии: А – В среду культивирования МСК вносили генетическую конструкцию, содержащую ген флуоресцирующего белка, в концентрации 100 нг/мл, клетки инкубировали 24 часа в  $\text{CO}_2$  инкубаторе при  $37^\circ\text{C}$ ; Б – после внесения в среду культивирования МСК генетической конструкции клетки облучали радиацией в дозе 50 сГр. (увеличение  $\times 40$ )

Можно предположить, что небольшой окислительный стресс в культуре клеток привел к увеличению проникновения плазмид, обогащенных поли-G, в клетки МСК. При этом промоторные области плазмид остаются не поврежденными и транскрибируются с последующей экспрессией флуоресцирующего белка.

При воздействии на клетки окислительного стресса, вызываемого ионизирующим излучением, обнаружили усиление проникновения плазмид в клетки (рис. 3, красные столбики) с последующей экспрессией флуоресцирующего белка по сравнению с плазмидами в отсутствие радиации. Предполагаемый механизм проникновения плазмид pG12 и pG13-11 в клетки при действии радиации включает окисление dG (в составе поли-dG участков) на поверхности клеток. В случае умеренного окисления часть молекул плазмиды содержит неизменный промоторный участок, позволяющий осуществить транскрипцию гена флуоресцентного белка. Средняя интенсивность флуоресценции при действии радиации и без нее изменяется в ряду:

Контроль < pC1 < pG12  $\approx$  pG1-R < pG13-11  $\approx$  pG12 (Turbo Fect)  $\approx$  pG13-11 (Turbo Fect) < pG12 << pG13-11.

При этом можно отметить, что уровень флуоресценции белка при добавлении к клеткам плазмид с легкоокисляемой вставкой при действии радиации, вызывающей окислительные модификации – повышение уровня 8-oxodG в плазмидах – выше, чем при добавлении этих же неокисленных плазмид в присутствии реагента Turbo Fect (рис. 3).

Данные, полученные с использованием метода проточной цитофлуориметрии, были подтверждены методом флуоресцентной микроскопии. В присутствии плазмид (pC1, p12G, pG13-11) в клетках появляются слабые сигналы в области цитоплазмы (рис. 4А). Облучение дозой 50 сГр с последующим культивированием 24 часа в присутствии плазмид pC1, p12G и pG13-11 приводило к повышению уровня флуоресценции в МСК, регистрируемой методом флуоресцентной микроскопии, в 2, 6 (рис. 4Б) и 8 раз, соответственно ( $p < 0,001$ ), что является свидетельством более активного проникновения плазмид в клетки и экспрессии флуоресцирующего белка в условиях окисления ДНК.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, методами проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии мы показали, что введение в плазмиды поли-G вставки, способной к быстрому окислению в условиях окислительного стресса, приводит к эффективному проникновению плазмид в стволовые клетки. Ионизирующее излучение вызывает изменение окислительного гомеостаза в среде культивирования клеток, приводит к окислительной модификации фрагментов ДНК и способствует проникновению фрагментов ДНК в клетки.

#### Список литературы / References:

1. Leach, J.K., Van Tuyle G., Lin P.S., Schmidt-Ullrich R., Mikkelsen R.B. Ionizing radiation-induced, mitochondria-dependent generation of reactive oxygen/nitrogen. *Cancer Research*, 2001, vol. 61, no. 10, pp. 3894-3901.
2. Ermakov A.V., Konkova M.S., Kostyuk S.V., Izevskaya V.L., Baranova A., Veiko N.N. Oxidized extracellular DNA as a stress signal in human cells. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, vol. 2013, pp. 649-747.

3. Kostyuk S.V., Konkova M.S., Ershova E.S., Alekseeva A.J., Smirnova T.D., Stukalov S.V., Kozhina E.A., Shilova N.V., Zolotukhina T.V., Markova Z.G., Izhevskaya V.L., Baranova A., Veiko N.N. An exposure to the oxidized DNA enhances both instability of genome and survival in cancer cells. *PLoS ONE*, 2013, vol. 8, no. 10, p. e77469.
4. Kozhina E.A., Ershova E.S., Okorokova N.A., Veiko V.P., Malinovskaya E.M., Sergeeva V.A., Konkova M.S., Kutsev S.I., Veiko N.N., Kostyuk S.V. Extracellular DNA containing (dG)n motifs penetrates into MCF7 breast cancer cells, induces the adaptive response, and can be expressed. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, p. 16.
5. Konkova M., Abramova M., Kalianov A., Ershova E., Dolgikh O., Umriukhin P., Izhevskaya V., Kutsev S., Veiko N., Kostyuk S. Mesenchymal Stem Cells Early Response to Low-Dose Ionizing Radiation. *Frontiers in cell and developmental biology*, 2020, vol. 8, p. 584497.
6. Sergeeva V., Ershova E., Veiko N., Malinovskaya E., Kalyanov A., Kameneva L., Stukalov S., Dolgikh O., Konkova M., Ermakov A., Veiko V., Izhevskaya V., Kutsev S., Kostyuk S. Low-Dose Ionizing Radiation Affects Mesenchymal Stem Cells via Extracellular Oxidized Cell-Free DNA: A Possible Mediator of Bystander Effect and Adaptive Response. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, p. 9515809.
7. Midorikawa K., Hirakawa K., Kawanishi S. Hydroxylation of deoxyguanosine at 5' site of GG and GGG sequences in double-stranded DNA induced by carbamoyl radicals. *Free radical research*, 2002, vol. 6, no. 6, pp. 667-675.

### OXIDATIVE MODIFICATION OF PLASMID DNA PROMOTES THEIR PENETRATION INTO THE CYTOPLASMA OF HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS

Konkova M.S.<sup>1</sup>, Ershova E.S.<sup>1</sup>, Veiko N.N.<sup>1</sup>, Kalyanov A.A.<sup>1</sup>, Malinovskaya E.M.<sup>1</sup>, Kameneva L.V.<sup>1</sup>,  
Veiko V.P.<sup>1,2</sup>, Kostyuk S.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Research Centre for Medical Genetics

Moskvorechie St., 1, Moscow, 115522, Russia; e-mail: mkonkova@med-gen.ru

<sup>2</sup> A.N. Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre of Biotechnology of the Russian Academy of Science  
Leninsky Prosp. 33, Build. 2, Moscow, 119071, Russia; e-mail: vladveiko@yahoo.com

Received 25.07.2022. DOI: 10.29039/rusjbp.2022.0548

**Abstract.** It is well known that the action of ionizing radiation causes oxidative stress in the cells of the body and leads to the synthesis of reactive oxygen species, which lead to multiple damage to cellular DNA, including the formation of oxidized bases. In this paper, we consider the effect of radiation-induced oxidative modification of plasmid DNA on their penetration into human mesenchymal stem cells. To study the role of oxidative DNA modification in cell penetration, a genetic construct was created based on the pEGFP-C1 (pC1) vector, GenBankAccession: U55763, containing as an insert an artificially synthesized DNA fragment containing a poly-G region (p12G) serving as target for efficient oxidation of the cloned DNA fragment. As a "marker", the selected vector contains the EGFP fluorescent protein (GFP) gene. Flow cytometry and fluorescence microscopy showed that recombinant constructs based on the pEGFP vector containing duplicated poly-G regions and Gn repeats penetrate cells much more efficiently than the original pEGFP vector. Exposure to radiation at a dose of 50 cGy, which causes an increase in the level of 8-oxodG in plasmids after irradiation, leads to a more intense penetration of oxidized plasmids compared to a similar experiment without irradiation.

**Key words:** human mesenchymal stem cells, ionizing radiation, recombinant constructs, oxidized DNA, 8-oxodG, oxidative stress.