

УДК 577

ОСОБЕННОСТИ ОТВЕТА КЛЕТОК КАРЦИНОМЫ ЛЁГКИХ ЧЕЛОВЕКА A549 С НОКАУТИРОВАННЫМ ГЕНОМ *PRIMPOL* НА ГЕНОТОКСИЧЕСКИЙ СТРЕСС

© 2023 А.С. Громова^{1,2#}, Е.О. Болдинова^{1,2#}, Д.В. Ким^{3,4}, Р.Н. Чупров-Неточин⁵, С.В. Леонов^{5,6}, М.В. Пустовалова⁵, Д.О. Жарков^{3,4*}, А.В. Макарова^{1,2*}

¹ Институт молекулярной генетики, НИЦ Курчатовский институт, 123182 Москва, Россия; электронная почта: amakarova-img@yandex.ru

² Институт биологии гена РАН, 119334 Москва, Россия

³ Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: dzharkov@niboch.nsc.ru

⁴ Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

⁵ Московский физико-технический институт, школа биологической и медицинской физики, 141701 Долгопрудный, Россия

⁶ Институт биофизики клетки РАН, 142290 Пущино, Россия

Поступила в редакцию 09.12.2022

После доработки 08.08.2023

Принята к публикации 15.09.2023

ДНК-праймаза/ДНК-полимераза человека PrimPol синтезирует ДНК-праймеры *de novo* после остановки репликации в повреждённых участках ДНК, повышая толерантность клеток к повреждениям. Вклад PrimPol в ответ на конкретные типы ДНК-повреждений до конца неясен. В работе были получены клетки карциномы лёгкого A549 с нокаутом гена *PRIMPOL*, и охарактеризован их ответ на повреждения ДНК, вызванные перекисью водорода, метилметансульфонатом, цисплатином, блеомицином и ионизирующим излучением. Нокаут *PRIMPOL* снизил количество ДНК-реплицирующих клеток и клеток в G2-фазе клеточного цикла после обработки метилметансульфонатом, а также вызвал более выраженную, по сравнению с клетками дикого типа, задержку в S-фазе в ответ на воздействие цисплатина. Значимое повышение доли апоптотных клеток отмечалось у *PRIMPOL*^{-/-} клеток в ответ на ионизирующее излучение в дозе 10 Гр, тогда как доля подверженных некроптозу клеток значительно повышалась как в родительских, так и в нокаутных клетках при любой дозе облучения. В условиях окислительного стресса, стимулированного перекисью водорода, нокаут *PRIMPOL* повысил жизнеспособность клеток, измеренную методом метилтетразолиевого теста (MTT). Полученные данные указывают на участие *PRIMPOL* в модулировании стресс-адаптивных реакций на различные типы генотоксического стресса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: репликация, повреждения ДНК, толерантность к повреждениям, апоптоз, PrimPol, праймаза, нокаутные клеточные линии.

DOI: 10.31857/S0320972523110222, **EDN:** MMJMCO

ВВЕДЕНИЕ

ДНК в клетке постоянно подвергается повреждениям со стороны внутриклеточных метаболитов и таких внешних агентов, как лекарственные средства или техногенные загрязнители [1]. Системы репарации клетки успешно

исправляют повреждения ДНК, однако не всегда успевают удалить повреждения до начала репликации. При столкновении высокоточных репликативных ДНК-полимераз (ДНКП) с повреждённым нуклеотидом в лидирующей цепи может происходить остановка репликации. В таких случаях запускаются процессы, обеспечивающие толерантность клетки к повреждениям ДНК, главную роль в которых играет синтез ДНК на повреждённом участке при участии специализированных ДНКП – транслезионный синтез (от англ. translesion – через повреждение). В ходе транслезионного синтеза происходит переключение с высокоточных

Принятые сокращения: ДНКП – ДНК-полимераза; ММС – метилметансульфонат; МТТ – метилтетразолиевый тест; PBS – phosphate-buffered saline, фосфатно-солевой буфер; PI – йодид пропидия; PrimPol – primase-polymerase, праймаза-полимераза.

* Адресат для корреспонденции.

Авторы внесли равный вклад в работу.

репликативных ДНКП на специализированные ДНКП γ -семейства (Pol ι , Pol η , Pol κ , Rev1) и β -семейства (Pol ξ), которые эффективно включают нуклеотиды напротив повреждённых участков ДНК [2–4].

Восстановление движения репликативной вилки также может быть осуществлено за счёт инициации новой репликативной вилки в участке, расположенном далее по ходу от повреждённого участка ДНК, с последующим заполнением оставшейся бреши. На отстающей цепи данную функцию выполняет комплекс Pol α –праймаза, на лидирующей цепи – праймаза-полимераза PrimPol, впервые описанная в 2013 г. [5–7]. PrimPol относится к суперсемейству архейно-эукариотических праймаз, её ортологи обнаружены у многих эукариот [8]. PrimPol обнаружена не только в ядре, но и в митохондриях [5].

PrimPol синтезирует ДНК-праймеры *de novo*, осуществляя перезапуск репликации в ядре и митохондриях после повреждённых участков ДНК или вторичных структур – G-квадруплексов и R-петель [9–16]. Также PrimPol демонстрирует свойства транслезионной ДНКП, эффективно включая нуклеотиды напротив ряда небольших повреждений ДНК, в том числе 8-оксогуанина, O⁶-метилгуанина, 5-формилурацила и апурин-апириимидиновых сайтов *in vitro* [17–19]. *In vitro* PrimPol также достаточно эффективно включает комплементарные dCMP напротив внутрицепочечной цисплатиновой сшивки G⁺G [20].

Делеция гена *PRIMPOL* в клеточной линии мышиных эмбриональных фибробластов приводит к замедлению репликации ядерной и митохондриальной ДНК в физиологических условиях и вызывает чувствительность к ряду генотоксичных агентов: ультрафиолетовому излучению, метилметансульфонату, гидроксимочевине, бенз[*a*]пирену [10, 14, 15, 21–24]. Накапливаются данные о возможном участии PrimPol в репликации ДНК после обработки клеток цисплатином и другими химиотерапевтическими препаратами [9, 13, 20]. PrimPol защищает клетки от митохондриальной цитотоксичности, вызванной антиретровирусной терапией нуклеозидным ингибитором тенофовиром (побочным эффектом препарата является ингибирование митохондриальной ДНКП Pol γ и репликации мтДНК) [25]. Однако конкретные функции PrimPol в клетке и роль фермента в защите клеток от разных типов повреждений ДНК всё ещё остаются неясными. Не исследована роль PrimPol в ответе клеток на окислительный стресс. Получены противоречивые данные о роли PrimPol в репликации ДНК

в физиологических условиях и в ответе клеток на повреждения, индуцированные алкилирующими соединениями или УФ-излучением.

Целью работы является анализ влияния нокаута гена *PRIMPOL* на адаптивные реакции опухолевых клеток в ответ на генотоксический стресс, вызванный ДНК-повреждающими агентами разной природы. Была получена модельная линия клеток карциномы лёгкого A549 с нокаутированным геном *PRIMPOL*, и изучен ответ этих клеток на ионизирующее излучение и повреждающие ДНК соединения с разным механизмом действия: метилметансульфонат, перекись водорода, цисплатин и блеомицин.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточная линия. Клетки линии аденокарциномы лёгких человека A549 культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы GlutaMAX[™] Supplement («Gibco», США) или аналоге (кат. номер C410п) от «ПанЭко» (Россия), 10%-ной (v/v) фетальной бычьей сыворотки («Gibco»), 100 ед./мл пенициллина и 100 ед./мл стрептомицина («ПанЭко») при 37 °С и 5% CO₂.

Получение клеток A549, нокаутных по гену *PRIMPOL*. Нокаут гена *PRIMPOL* производили с помощью системы CRISPR/Cas9 и вектора pSpCas9(BB)-2A-GFP (pX458; плаزمид любезно предоставлена Ф. Чжаном; Addgene #48138; <https://n2t.net/addgene:48138>; RRID: Addgene_48138). Эффективность внесения инсерций и делеций в полученном моноклоне анализировали с помощью методов TIDE (Tracking of Indels by Decomposition) и RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism, полиморфизм длин рестрикционных фрагментов) (рис. П1 Приложения). Экспрессию PrimPol в клетках проверяли методом белкового иммуноблоттинга. Получение нокаутной клеточной линии подробно описано в Приложении.

Обработка клеток повреждающими ДНК препаратами. Клетки высевали в количестве 5000 на лунку 96-луночного планшета для анализа с помощью МТТ (метилтетразолиевый тест), 1000 на лунку 384-луночного планшета для исследования пролиферации и 400 000 на лунку 6-луночного планшета при оценке распределения по фазам клеточного цикла. Цисплатин («Sigma-Aldrich», США) добавляли в диапазоне концентраций 0,5–20 мкМ и инкубировали в течение 48 ч. Метилметансульфонат (ММС) («Sigma-Aldrich») добавляли в диапазоне концентраций 0,1–1 мМ и инкубировали в течение 24 ч. Блеомицин («VeroPharm», Рос-

сия) добавляли в диапазоне концентраций 0,01–1 мг/мл (7–700 мкМ) и инкубировали в течение 48 ч. H_2O_2 («Самарамедпром», Россия) добавляли в диапазоне концентраций 0,2–30 мМ и инкубировали в течение 60 мин. Для анализа фаз клеточного цикла клетки обрабатывали 10 мМ H_2O_2 в течение 60 мин, 540 мкМ ММС в течение 24 ч, 200 мкг/мл (140 мкМ) блеомицина в течение 48 ч или 10 мкМ цисплатина в течение 48 ч.

Облучение клеток. Клетки, находящиеся в экспоненциальной фазе роста, облучали при комнатной температуре на рентгеновской биологической установке РУБ РУСТ-М1 (Россия) в дозах 2 и 10 Гр при мощности дозы 0,85 Гр/мин. После облучения клетки инкубировали в стандартных условиях при 37 °С и 5% CO_2 .

Оценка жизнеспособности клеток. Жизнеспособность клеток оценивали методом МТТ, который основан на NAD(P)H-зависимом восстановлении 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид и отражает суммарную метаболическую активность клеток. В лунки с клетками вносили раствор МТТ до конечной концентрации 0,5 мг/мл и инкубировали в течение 2,5 ч при 37 °С и 5% CO_2 . Формирование нерастворимых кристаллов формазана контролировали визуально под микроскопом, после чего аккуратно удаляли среду и добавляли ДМСО для растворения кристаллов. Оптическую плотность оценивали при длине волны 540 нм против референсной 620 нм на планшетном ридере CLARIOstar («BMG Labtech», Германия). Жизнеспособность определяли по оптической плотности образца относительно контроля (необработанных клеток), выраженной в процентах. Значение для контрольных необработанных клеток принимали за 100%.

Определение доли ДНК-реплицирующих клеток (пролиферативная активность). В лунки с клетками вносили раствор 5-этинил-2'-дезоксинуридина (EdU) до конечной концентрации 10 мкМ и инкубировали в течение 2,5 ч при 37 °С и 5% CO_2 . Затем клетки промывали фосфатно-солевым буфером (PBS) и вносили фиксирующий раствор, содержащий 2% параформальдегида и 5 мкг/мл красителя Hoechst 33342 в PBS. Клетки инкубировали в течение ночи при 4 °С, промывали PBS и вносили раствор 1 мМ $CuSO_4$, 20 мМ Tris-HCl (pH 8,5), 2 мкМ красителя Alexa Fluor™ 488 azide, 0,5%-ный Triton X-100 и 50 мМ аскорбиновой кислоты для окрашивания EdU, включённого в ДНК. После окрашивания лунки промывали PBS и анализировали на установке ImageXpress Micro XL High-Content Screening

System. Пролиферативную активность считали по отношению флуоресцирующих клеток к общему числу клеток в образце, выраженному в процентах. Значение для контрольных необработанных клеток принимали за 100%.

Анализ клеточного цикла. Распределение популяции клеток по фазам клеточного цикла оценивали с помощью проточной цитометрии после окраски ДНК иодидом пропидия (PI). Клетки снимали с планшета, отмывали в ресуспендирующем буфере (PBS + 2% (v/v) фетальной бычьей сыворотки + 0,1% (v/v) БСА) и фиксировали 70%-ным (v/v) этанолом во льду в течение 2 ч. Далее клетки промывали холодным PBS, добавляли свежеприготовленный окрашивающий раствор (50 мкг/мл PI в PBS + 3,8 мМ цитрат натрия + 5 мкг/мл РНКаза А) и инкубировали в течение ночи при 4 °С. На следующий день клетки анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur («BD Biosciences», США). Полученные данные обрабатывали в программе FlowJo 10.18.1.

Анализ апоптоза. Для анализа апоптотической гибели клеток использовали коммерческий набор «FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit with FITC annexin V and PI, for Flow Cytometry» («Invitrogen», США). Окрашивание клеток проводили в соответствии с протоколом производителя. Через 24 ч после облучения клетки снимали с поверхности и промывали холодным PBS. 5 мкл аннексина V и 1 мкл PI (100 мкг/мл) добавляли в суспензию, содержащую 10^6 клеток. Клетки инкубировали 15 мин при комнатной температуре и анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur («BD Biosciences»). Для каждого образца регистрировали в общей сложности 50 000 событий. Анализ результатов проводился с помощью программного обеспечения BD CellQuest Pro 5.1.

Иммунофлуоресцентный анализ фокусов белков репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Чувствительность к радиации оценивали по количеству радиационно-индуцированных фокусов через 1, 4, 6 и 24 ч после облучения дозой 2 Гр. Клетки высаживали на покровные стёкла и после облучения фиксировали 4%-ным параформальдегидом в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем клетки пермеабелизировали 0,3%-ным Triton X-100 в PBS (pH 7,4), содержащем 2% БСА для блокирования неспецифического связывания антител. Слайды инкубировали с мышиными моноклональными антителами к белку $\gamma H2AX$ (разведение 1 : 200, Anti-phospho Histone H2A.X (Ser139) Antibody, «Merck Millipore», США) и кроличьими поликлональными антителами к белку RAD51

(разведение 1 : 200, «Merck Millipore») в течение 1 ч при 22 °С. После промывания клетки инкубировали при 22 °С в течение 1 ч со вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромом Alexa Fluor 555 (разведение 1 : 1000, Goat Anti-Mouse IgG (H + L), «Merck Millipore») и с Alexa Fluor 488 (разведение 1 : 500, Goat Anti-Rabbit IgG (H + L), «Merck Millipore»). Для окраски ДНК и предотвращения фотовыцветания использовали содержащую DAPI заключающую среду ProLong Gold («Life Technologies», США). Визуализацию, документирование и обработку иммуноцитохимических микроизображений осуществляли при помощи люминесцентного микроскопа Eclipse NiU («Nikon», Япония), оснащённого видеокамерой высокого разрешения ProgRes MFcool («Jenoptik AG», Германия), с использованием наборов светофильтров DAPI (возбуждение 340–380 нм, эмиссия 435–485 нм), B-2E/C (возбуждение 465–495 нм, эмиссия 515–555 нм) и Y-2E/C (возбуждение 540–580 нм, эмиссия 600–660 нм). Анализировали не менее 200 клеток на каждую временную точку. Для подсчёта количества фокусов γ H2AX и RAD51 использовали программу Focicounter (<http://focicounter.sourceforge.net/>).

Статистический анализ. Все эксперименты проводили в нескольких экспериментальных повторностях (выполнены в разные дни с использованием независимых пассажей клеток и разведений ДНК-повреждающих препаратов) и двух-трёх измерительных (дублирующие лунки на одном планшете). Для каждой из точек рассчитывали среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего. Достоверность различий определяли с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Расчёты проводили с помощью Microsoft Excel и GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящей работе была получена и фенотипически охарактеризована клеточная линия карциномы лёгкого человека A549, нокаутная по гену *PRIMPOL*.

Ответ клеток A549 *PRIMPOL*^{-/-} на генотоксический стресс. В работе впервые изучено действие нокаута *PRIMPOL* в ответе клеток на окислительный стресс. Для исследования ответа нокаутных клеток на повреждения ДНК в условиях генотоксического стресса клетки обрабатывали алкилирующим агентом MMC или перекисью водорода. В отсутствие повреждающих агентов нокаут *PRIMPOL* существенно не влиял на распределение клеток в культуре

по фазам клеточного цикла (рис. 1). Нокаут *PRIMPOL* также не влиял на жизнеспособность клеток, измеренную методом МТТ, и долю ДНК-реплицирующих клеток. Однако были отмечены статистически значимые эффекты влияния нокаута *PRIMPOL* на жизнеспособность клеток после обработки перекисью водорода и долю ДНК-реплицирующих клеток после обработки MMC (рис. 2, а).

Перекись водорода вызывала небольшое (в 1,4 раза) сокращение фракции *PRIMPOL*^{-/-} клеток в фазе G2 ($p < 0,05$), а также тенденцию к повышению количества клеток в фазе G1 и падению количества клеток в фазе S клеточного цикла (рис. 1). Однако изменения в G1- и S-фазах не достигли статистической достоверности. Наблюдалось связанное с дозой снижение количества ДНК-реплицирующих клеток (включения EdU), более выраженное в клетках с нокаутом гена *PRIMPOL*, но также не достигшее статистической достоверности ($p = 0,09$ при 0,25 мМ H₂O₂) (рис. 2, б). При этом жизнеспособность клеток *PRIMPOL*^{-/-}, измеренная методом МТТ, оказалась достоверно дозозависимо выше по сравнению с родительскими клетками (рис. 2, а).

MMC вызвал практически равное снижение фракции родительских клеток в фазе G1 и повышение фракций клеток в S- и G2-фазах клеточного цикла (рис. 1). При этом нокаут *PRIMPOL* почти в два раза снизил процент клеток в фазе G2 после обработки 540 мкМ MMC ($p < 0,05$) и привёл к появлению выраженной субпопуляции G1-клеток, содержащей фрагментированную ДНК и соответствующей клеткам, подвергшимся апоптотической гибели (рост с 2,4 до 5,5%, $p < 0,05$) (рис. 1).

Нокаут *PRIMPOL* не влиял на жизнеспособность клеток, обработанных MMC, по данным МТТ-теста (рис. 2, а), значительно снижая долю ДНК-реплицирующих клеток в диапазоне концентраций свыше 400 мкМ (рис. 2, б). По сравнению с родительскими клетками при низких концентрациях (200–300 мкМ) MMC наблюдалось значительное увеличение количества ДНК-реплицирующих клеток *PRIMPOL*^{-/-}. Это может быть связано с запуском альтернативных механизмов толерантности к повреждениям, восстанавливающих скорость репликации (транслезионного синтеза, репарации), но ростом доли клеток с не завершённой полностью репликацией в фазе S. При большом количестве повреждений в отсутствии PrimPol-зависимого репрайминга альтернативные механизмы, вероятно, не справляются, что приводит к тотальному подавлению репликации.

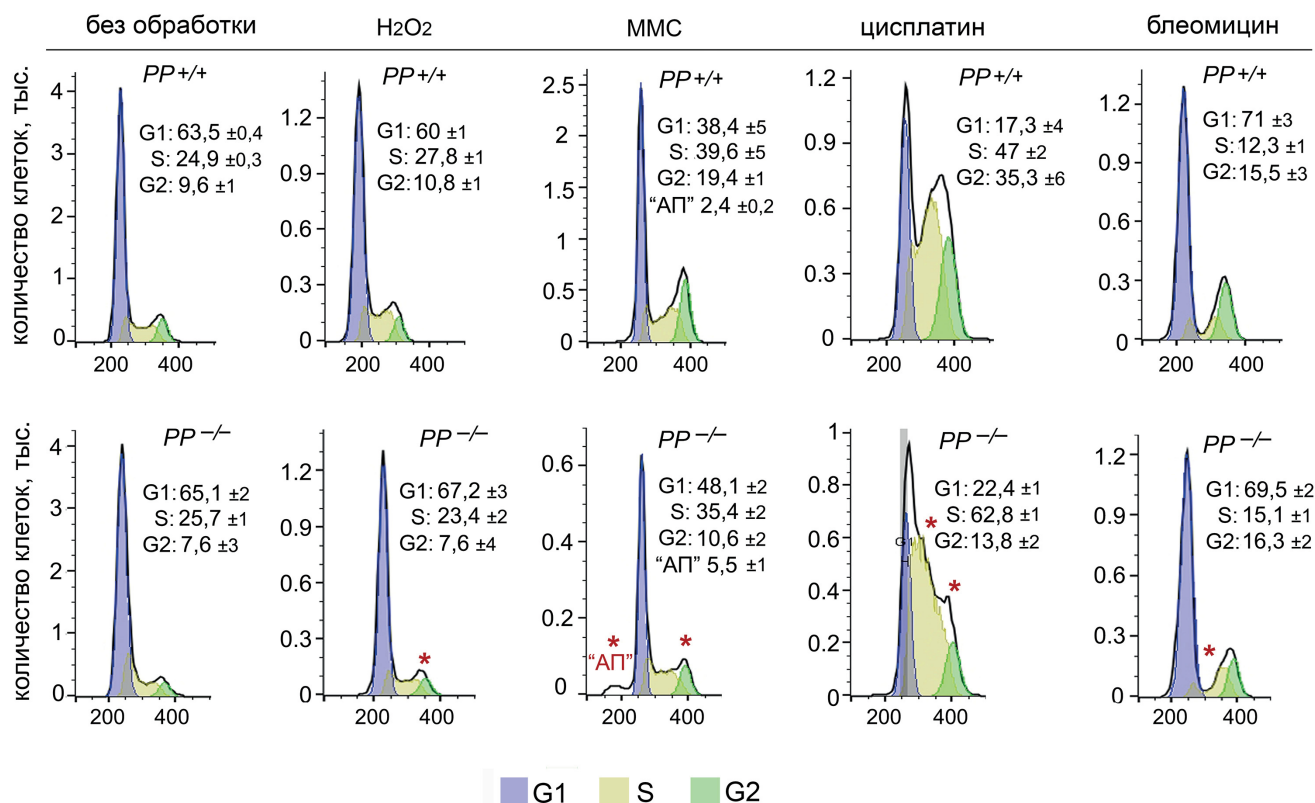


Рис. 1. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла с помощью проточной цитометрии. Указаны проценты клеток, находящихся в G1-, S- и G2-фазах клеточного цикла. G1-, S- и G2-фазы показаны фиолетовым, жёлтым и зелёным соответственно. Субпопуляция G1-клеток, соответствующая фрагментированной ДНК и апоптотическим клеткам, отмечена «АП». *PP^{+/+}* и *PP^{-/-}* — клетки дикого типа и клетки *PRIMPOL^{-/-}* соответственно. Для обработки использовали концентрации ДНК-повреждающих агентов, при которых погибало 40–60% клеток. Эксперименты выполнены в трёх экспериментальных и двух измерительных повторностях

Чувствительность клеток A549 *PRIMPOL^{-/-}* к химиотерапевтическим препаратам. В качестве химиотерапевтических препаратов были выбраны цисплатин, вызывающий внутри- и межцепочечные сшивки ДНК [26, 27], и блеомицин, стимулирующий образование двуцепочечных разрывов ДНК [28]. Нокаут *PRIMPOL* не оказал значительного влияния на жизнеспособность клеток (рис. 2, а) и распределение клеток в фазах клеточного цикла (рис. 1) при однократных обработках блеомицином. Наблюдалась лишь незначительная задержка клеток в фазе S (с 12,3 до 15,1%, $p < 0,05$) (рис. 1).

Нокаут *PRIMPOL* также существенно не повлиял на жизнеспособность и количество ДНК-реплицирующих клеток, однократно обработанных цисплатином (рис. 2, а, б), однако оказал более существенное влияние на клеточный цикл (рис. 1). Обработка цисплатином ожидаемо привела к аресту клеток дикого типа в S- и G2-фазах клеточного цикла, что объясняется подавлением репликации. При этом задержка *PRIMPOL^{-/-}* клеток в S-фазе была более выражена по сравнению с клетками дикого типа (соотношение S/G2 возросло с 1,3

до 4,6, $p < 0,05$). Таким образом, цисплатин одинаково резко подавлял ДНК-синтетическую активность родительских и нокаутных клеток, но отсутствие PrimPol дополнительно препятствовало завершению репликации.

Чувствительность клеток A549 *PRIMPOL^{-/-}* к ионизирующему излучению. Среди повреждений ДНК, вызываемых ионизирующим излучением, основную опасность представляют двуцепочечные разрывы. Один из наиболее чувствительных и широко используемых маркеров двуцепочечных разрывов ДНК — число фокусов корового гистона H2AX, фосфорилированного по остатку Ser139 (γ H2AX). Оценка числа двуцепочечных разрывов ДНК проводилась с помощью иммуноцитохимического анализа фокусов γ H2AX в течение 24 ч после облучения в дозе 2 Гр (рис. 3, а, б). Максимальное число фокусов наблюдалось через 1 ч после облучения, и через 24 ч их количество возвращалось к исходному уровню (вследствие репарации двуцепочечных разрывов). Нокаут *PRIMPOL* вызвал небольшое (на ~14%), но статистически значимое увеличение числа фокусов γ H2AX, по сравнению с клетками

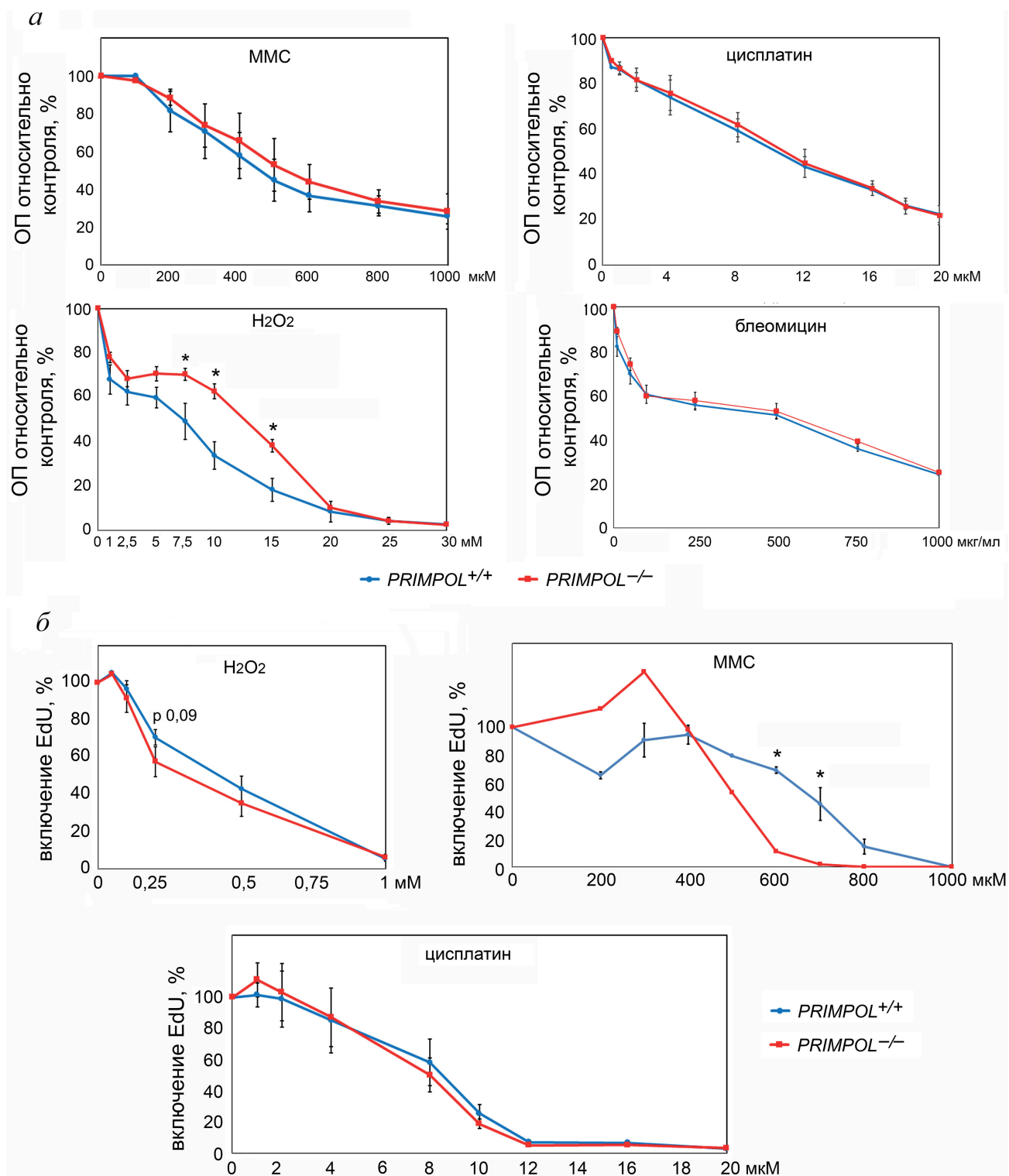


Рис. 2. Анализ жизнеспособности клеток. *а* — Жизнеспособность клеток, определённая методом МТТ. ОП — оптическая плотность. *б* — Доля ДНК-реплицирующих клеток, определённая по включению EdU в *de novo* синтезированную цепь ДНК. * $p < 0,05$. Значения стандартных ошибок данных при анализе включения EdU в нокаутных клетках после обработки MMC составляют менее 2% и не отображаются на графике. Анализ жизнеспособности проводили в четырёх экспериментальных и трёх измерительных повторностях. Определение доли ДНК-реплицирующих клеток проводили в двух экспериментальных и трёх измерительных повторностях

дикого типа ($p < 0,05$), через 1 ч после воздействия ионизирующим излучением (рис. 3, *а, б*). Однако в клетках дикого типа и нокаутных

клетках наблюдалась сходная кинетика деградации фокусов γ H2AX. Важно отметить, что клетки *PRIMPOL*^{-/-} демонстрировали более

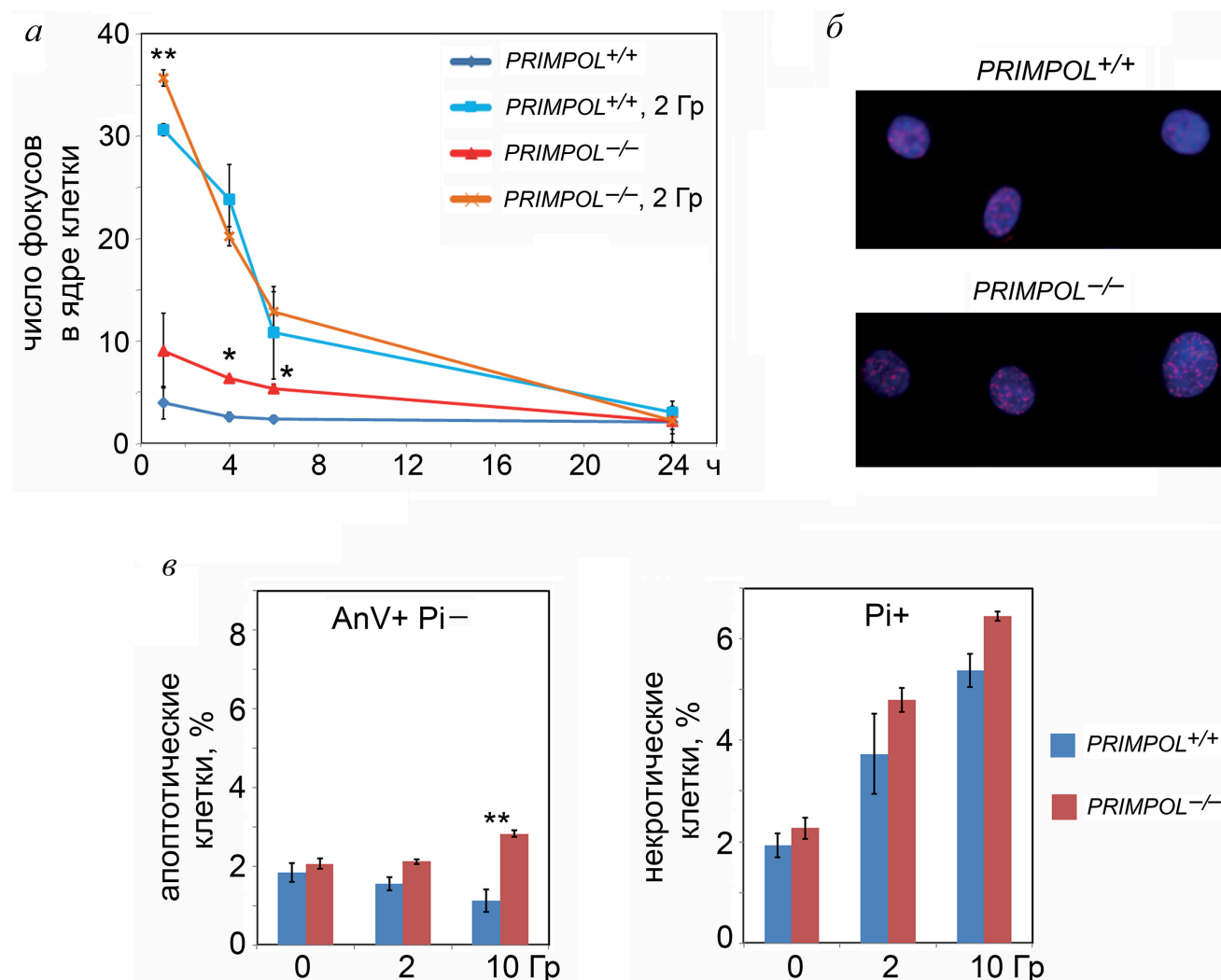


Рис. 3. Оценка чувствительности клеток A549 к ионизирующему излучению. *а* – Оценка количества двуцепочечных разрывов ДНК после облучения в дозе 2 Гр с помощью иммуофлуоресцентного анализа радиационно-индуцированных фокусов, содержащих гистон γ H2AX. *б* – Репрезентативная фотография иммуоцитохимического анализа фокусов γ H2AX через 1 ч после облучения в дозе 2 Гр. Ядра, окрашенные DAPI, – синий, фокусы γ H2AX – красный. *в* – Апоптотическая гибель клеток. Способность ионизирующего излучения стимулировать клеточную гибель определяли по способности аннексина V и PI проникать через мембраны апоптотических клеток. Выделяли клетки на раннем этапе апоптоза (AnV+ PI–) и некротические клетки (PI+). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. Анализ проводили в трёх экспериментальных и трёх измерительных повторностях

высокий фоновый уровень числа фокусов γ H2AX (отражающий уровень спонтанных двуцепочечных разрывов) по сравнению с клетками *PRIMPOL*^{+/+} ($p < 0,01$). При этом нокаут *PRIMPOL* не повлиял на количество фокусов, содержащих ключевой белок гомологичной рекомбинации RAD51, как в облучённых, так и в необлучённых клетках (рис. П2 Приложения).

После воздействия на клетки ионизирующим излучением был также проведён анализ клеточной гибели. Полученные результаты свидетельствуют о связанном с дозой увеличении доли некротических клеток (PI+) после облучения как в клетках дикого типа, так и в нокаутных клетках (рис. 3, в). При этом нокаут

гена *PRIMPOL* вызвал более чем двукратное ($p < 0,05$) увеличение доли клеток на ранней стадии апоптоза (PI–/Annexin V+) через 24 ч после облучения в дозе 10 Гр (рис. 3, в).

ОБСУЖДЕНИЕ

В литературе описано несколько линий клеток человека и млекопитающих с нокаутом гена *PRIMPOL*, полученных на основе клеток U2OS (остеосаркома) [29, 30], эмбриональных фибробластов мыши (MEF) [14, 21, 29], MRC5 (фибробласты лёгкого) [24], фибробластов пациента с пигментной ксеродермой группы комплемента V (XP-V) [24]

и пре-В-лимфоцитов [31]. Опубликовано также несколько работ с нокадаун *PRIMPOL* в культурах клеток HeLa [7, 21], U2OS и 143B [10, 13, 21], нормальных фибробластах человека (HDF) [21], MRC5 [6, 32], фибробластах XP30RO пациента с XP-V и клетках с нокаутом гена *XPA* с нарушением системы эксцизионной репарации нуклеотидов [6], HEK293 [5] и в *BRCA1*-дефицитных клетках рака яичника UWB1.289 [13]. Результаты, полученные в разных исследованиях на разных культурах клеток, заметно отличаются. В отсутствие экзогенных повреждений нокаут и нокадаун *PRIMPOL* снижал скорость пролиферации и продвижение репликативной вилки в опухолевых клетках HeLa, U2OS, 43B и фибробластах HDF и MEF в работах Wan et al., Mourón et al. и Bailey et al. [7, 21, 24], но не влиял на скорость репликации и пролиферацию в фибробластах MRC5, MEF и XP30RO в работах Torregrosa-Muñumer et al. и Bailey et al. [14, 24]. В ряде публикаций сообщалось о повышении чувствительности клеток лимфомы курицы DT40, клеток MRC5, HeLa и MEF к ультрафиолетовому излучению при нокауте *PRIMPOL* [6, 14, 15, 21, 32, 33], но в других работах этого не наблюдалось [24, 31].

Мутации *PRIMPOL* обнаружены в культурах клеток карциномы лёгких [29, 34]. В настоящей работе была получена и охарактеризована (с использованием большого набора ДНК-повреждающих агентов) линия клеток карциномы лёгкого A549 с нокаутом гена *PRIMPOL*.

Известно, что нокаут *PRIMPOL* приводит к нарушению клеточного цикла в некоторых клеточных линиях. В частности, фибробласты лёгкого MRC5 и фибробласты XP30RO с дополнительным дефектом Pol η задерживаются в фазе G2 [24]. Нокаут *PRIMPOL* в линии A549 не оказал существенного влияния на клеточный цикл (рис. 1) и пролиферативную активность (рис. 2, б) в отсутствие экзогенных повреждений. Однако нокаутные клетки демонстрировали более высокое число фоновых фокусов гистона γH2AX по сравнению с клетками дикого типа (рис. 3, а), что свидетельствует об образовании двуцепочечных разрывов в отсутствие повреждающих ДНК агентов и может быть связано с участием PrimPol в репликации ДНК, содержащей спонтанные повреждения, R-петли или G-квадруплексы.

По сравнению с родительскими клетками A549 влияние нокаута *PRIMPOL* на жизнеспособность клеток, долю ДНК-реплицирующих клеток и клеточный цикл было более выражено при обработке повреждающими ДНК аген-

тами. ММС вызывал дозозависимое снижение доли ДНК-реплицирующих клеток (рис. 2, б), а в высоких концентрациях — и арест как родительских, так и *PRIMPOL*^{-/-} клеток в S- и G2-фазах (рис. 1). Нокаут *PRIMPOL* ещё больше снижал долю ДНК-реплицирующих клеток и привёл к сокращению доли клеток в G2-фазе и появлению популяции клеток с фрагментированной ДНК (популяция «АП» на рис. 1), соответствующей апоптотическим. Полученные результаты можно объяснить замедлением репликации, повышением чувствительности клеток в G2-фазе к ММС и гибели клеток в G2-фазе из-за неспособности пройти G2/M-чекпойнт.

Чувствительность к ММС была описана ранее для культуры клеток лимфомы курицы DT40 с нокаутом *PRIMPOL* [15], но не при деплеции PrimPol в клетках остеосаркомы человека U2OS [30]. Разные результаты можно объяснить как отличиями в ответе клеток курицы на повреждения ДНК (например, нет фермента транслезионного синтеза Pol ι), так и остаточной активностью PrimPol при деплеции в клетках остеосаркомы или разными методиками оценки. Наши данные подтверждают роль PrimPol в ответе клеток человека на алкилированные повреждения с помощью нокаутной модели.

Анализ нокаута *PRIMPOL* на чувствительность клеток к окислительному стрессу был проведён впервые. При обработке клеток A549 *PRIMPOL*^{-/-} перекисью водорода наблюдалось существенное повышение жизнеспособности клеток (рис. 2, а), сопровождавшееся снижением доли ДНК-реплицирующих клеток в узком диапазоне концентраций (хотя и статистически незначимым) (рис. 2, б). Похожие результаты были получены в другом исследовании при облучении *PRIMPOL*^{-/-} клеток ультрафиолетом [22]. Несмотря на то что нокаутные клетки медленнее пролиферировали, они оказались жизнеспособнее клеток дикого типа. Полученные нами результаты, предположительно, можно объяснить влиянием нокаута на клеточный цикл и большей чувствительностью клеток к окислительному стрессу в момент репликации. Действительно, в условиях окислительного стресса нокаут *PRIMPOL* показывал сокращение количества клеток в G2-фазе ($p < 0,05$), а также тенденцию к сокращению количества клеток в фазе S и росту количества клеток в фазе G1 (хотя и не достигших статистической значимости), что указывает на возможное замедление перехода G1/S. Чувствительность клеток A549 *PRIMPOL*^{-/-} к H₂O₂ согласуется с участием PrimPol в репликации

ДНК с повреждениями, вызванными активными радикалами кислорода. Замедление перехода G1/S может быть обусловлено нарушением роста нокаутных клеток в G1-фазе вследствие замедления репликации митохондриальной ДНК. Актуальными представляются дальнейшие исследования роли PrimPol в окислительном стрессе с использованием других индукторов и протекторов окислительного стресса.

Потеря PrimPol не оказала существенного влияния на чувствительность клеток A549 к химиотерапевтическому препарату цисплатину при однократной обработке: наблюдалось только замедление клеток в S-фазе клеточного цикла (рис. 1). Недостаток *PRIMPOL* в клетках может быть компенсирован другими механизмами защиты от повреждений ДНК: системами репарации и транслезионными ДНКП. Полученные результаты по цисплатину согласуются с литературными данными. В частности, нокаут и нокадаун *PRIMPOL* не повышают чувствительность к цисплатину фибробластов лёгкого MRC5 [24] и клеток остеосаркомы U2OS [30], но вызывают чувствительность к этому агенту у клеток линии XP30RO, полученной от пациента с XP-V — вариантом пигментной ксеродермы, вызванным дефектом гена *POLH* [24]. Pol η ведёт эффективный и точный транслезионный синтез напротив внутрицепочечных цисплатиновых сшивок [35]. Таким образом, транслезионный синтез с участием Pol η и ре-инициация репликации с участием PrimPol могут представлять два независимых и дополняющих друг друга пути толерантности к цисплатину. В другой работе подавление экспрессии *PRIMPOL* повысило чувствительность клеток UW и U2OS к цисплатину только при одновременном нокауте гена *BRCA1* (*B*Reast *C*ancer gene 1) и многократных обработках препаратом (воспроизводящих режим химиотерапии) [13], что указывает на роль PrimPol в адаптации к повторному генотоксическому стрессу.

Важно также отметить, что опухолевые клетки часто демонстрируют повышенную способность адаптации к повреждениям ДНК, связанную с эффективной работой систем репарации и других механизмов устойчивости к препаратам химиотерапии, поэтому эффекты нокаута генов отдельных ферментов толерантности к повреждениям ДНК в опухолевых клетках могут быть выражены слабее. Для клеток линии A549 характерна мутация онкогена *KRAS* (замена G12S), на долю которой приходится около 1,8% случаев мутаций *KRAS* немелкоклеточных опухолей лёгких [36, 37].

Разные мутации *KRAS* могут оказывать очень разное (иногда даже противоположное) влияние на чувствительность к цисплатину [36, 38, 39]. Вклад замены G12S в чувствительность к ДНК-повреждающим агентам и химиотерапии отдельно не исследовался. Известно, что линия аденокарциномы A549 может быстро адаптироваться к цисплатину за счёт изменения контрольных точек клеточного цикла [40] либо, возможно, содержит устойчивую к цисплатину субпопуляцию клеток [41]. Однако наблюдаемое в работе значение IC₅₀ (~10 мкМ) соответствует литературным данным для A549 [42].

В настоящей работе мы также проанализировали влияние нокаута *PRIMPOL* на чувствительность клеток аденокарциномы лёгких человека к ионизирующему излучению и блеомицину. Оба этих агента преимущественно вызывают двуцепочечные разрывы ДНК за счёт локализованной генерации радикалов [•]ОН. Однако, как и в случае с цисплатином, нокаут *PRIMPOL* не оказал существенного влияния на жизнеспособность клеток, однократно обработанных блеомицином (рис. 2, а). *PRIMPOL*^{-/-} клетки оказались немного более чувствительны к ионизирующему излучению и чаще подвергались апоптозу. Репарация двуцепочечных разрывов ДНК в клетках млекопитающих осуществляется с помощью гомологичной рекомбинации и негомологичного соединения концов. Нокаут *PRIMPOL* мог привести к запуску программы апоптоза (апоптотические (PI-/Annexin V+) клетки на рис. 3, в) и активации системы репарации ДНК (фокусы γH2AX на рис. 3, а) в ответ на ионизирующее излучение. В целом, отсутствие выраженной чувствительности клеток A549 *PRIMPOL*^{-/-} к ионизирующему излучению и блеомицину согласуется с данными, полученными для культуры клеток лимфомы курицы (DT40) (ионизирующее излучение) [6, 15] и клеток U2OS (ионизирующее излучение и блеомицин) [30].

Представляется также вполне вероятным, что нокаут *PRIMPOL* может оказывать более выраженное влияние на стресс-адаптивную реакцию на ионизирующее излучение и блеомицин в клетках с дефектами репарации. В пользу такого предположения говорят данные о том, что деплеция *PRIMPOL* не оказала влияния на скорость движения репликативной вилки после обработки ионизирующим излучением и блеомицином в клетках U2OS дикого типа, но нивелировала повышение скорости репликации при совместной деплеции с *BRCA2* (*B*Reast *C*ancer gene 2) [30]. При этом одновременная деплеция *PRIMPOL* и *BRCA2*

Влияние нокаута и нокдауна *PRIMPOL* на ответ клеток к повреждениям ДНК

ДНК-повреждающий агент	Линия клеток	Эффект	Ссылки
Физиологические условия	HeLa нокдаун U2OS нокдаун 143B нокдаун HDF нокдаун MEF нокаут	снижает скорость пролиферации и продвижение репликативной вилки	[6, 21, 24]
	MRC5 нокаут MEF нокаут XP30RO нокаут пре-В-лимфоциты нокаут	не влияет на скорость пролиферации и репликации	[14, 24, 31]
	MRC5 нокаут, XP30RO нокаут	вызывает задержку в G2	[24]
	A549 нокаут	повышает количество двуцепочечных разрывов, существенно не влияет на клеточный цикл и пролиферативную активность	настоящая работа
Перекись водорода	A549 нокаут	повышает жизнеспособность	настоящая работа
ММС	DT40 нокаут A549 нокаут	повышает чувствительность	[15], настоящая работа
	U2OS нокдаун	не влияет	[30]
Цисплатин	XP30RO нокаут	повышает чувствительность при дефиците Pol η	[24]
	MRC5 нокаут U2OS нокдаун A549 нокаут	не влияет; предположительно, замедляет скорость репликации в A549	[24, 30], настоящая работа
	UW нокдаун U2OS нокдаун	повышает чувствительность при многократных обработках и нокауте <i>BRCA</i>	[13]
Ионизирующее излучение	DT40 нокаут U2OS нокдаун A549 нокаут	не влияет или незначительно повышает чувствительность	[6, 15, 30], настоящая работа
Блеомицин	U2OS нокдаун A549 нокаут	не влияет или влияет незначительно	[30], настоящая работа
УФ	DT40 нокаут и нокдаун MRC5 нокдаун HeLa нокдаун MEF нокаут	повышает чувствительность	[6, 14, 21, 24, 32, 33]
	пре-В-лимфоциты, нокаут	не влияет на чувствительность, но замедляет скорость репликации	[24, 31]
	DT40 нокаут	повышает жизнеспособность	[22]

стимулировала меньшее количество хроматидных разрывов, чем деплеция только *BRCA2*. Литературные данные указывают на роль *BRCA2* в сдерживании прогрессии репликативной вилки в результате PrimPol-опосредованного репрайминга, который сопровождается образованием чувствительных к разрывам одноцепочечных брешей.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные указывают на участие *PRIMPOL* в модулировании адаптивных реакций на различные типы генотоксического стресса и расширяют представления о биологических функциях *PRIMPOL*. Данные настоящей работы для линии A549 в сравнении

с известными литературными данными суммированы в таблице. Актуальным представляется дальнейшее изучение культур клеток с двойным нокаутом *PRIMPOL* в комбинациях с другими ферментами репарации и ДНКП транслезионного синтеза.

Финансирование. Работа (получение *PRIMPOL*^{-/-} клеток, анализ жизнеспособности клеток, доли ДНК-пролиферирующих клеток и анализ клеточного цикла) поддержана грантом Российского научного фонда № 18-14-00354 (АВМ). Д.В. Ким (участие в получении

моноклональных клеточных линий) поддержана грантом РФФИ 20-34-90092-Аспиранты. Эксперименты с ионизирующим излучением выполнены М.В. Пустоваловой при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Госзадание 075-03-2023-106, проект № FSMG-2023-0015).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Игнатов А. В., Бондаренко К. А., Макарова А. В. (2017) Необъемные повреждения ДНК у человека: пути образования, репарации и репликации, *Acta Naturae*, **9**, 13-28, doi: 10.32607/20758251-2017-9-3-12-26.
- Vaisman, A., and Woodgate, R. (2017) Translesion DNA polymerases in eukaryotes: what makes them tick? *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **52**, 274-303, doi: 10.1080/10409238.2017.1291576.
- Jain, R., Aggarwal, A. K., and Rechkoblit, O. (2018) Eukaryotic DNA polymerases, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **53**, 77-87, doi: 10.1016/j.sbi.2018.06.003.
- Dash, R. C., and Hadden, K. (2021) Protein-protein interactions in translesion synthesis, *Molecules*, **26**, 5544, doi: 10.3390/molecules26185544.
- García-Gómez, S., Reyes, A., Martínez-Jiménez, M. I., Chocrón, S., Mourón, S., et al. (2013) PrimPol, an archaic primase/polymerase operating in human cells, *Mol. Cell*, **52**, 541-553, doi: 10.1016/j.molcel.2013.09.025.
- Bianchi, J., Rudd, S. G., Jozwiakowski, S. K., Bailey, L. J., Soura, V., et al. (2013) PrimPol bypasses UV photoproducts during eukaryotic chromosomal DNA replication, *Mol. Cell*, **52**, 566-573, doi: 10.1016/j.molcel.2013.10.035.
- Wan, L., Lou, J., Xia, Y., Su, B., Liu, T., et al. (2013) HPrimpol1/CCDC111 is a human DNA primase-polymerase required for the maintenance of genome integrity, *EMBO Rep.*, **14**, 1104-1112, doi: 10.1038/embor.2013.159.
- Iyer, L. M., Koonin, E. V., Leipe, D. D., and Aravind, L. (2005) Origin and evolution of the archaeo-eukaryotic primase superfamily and related palm-domain proteins: Structural insights and new members, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 3875-3896, doi: 10.1093/nar/gki702.
- González-Acosta, D., Blanco-Romero, E., Ubieto-Capella, P., Mutreja, K., Míguez, S., et al. (2021) PrimPol-mediated repriming facilitates replication traverse of DNA interstrand crosslinks, *EMBO J.*, **40**, e106355, doi: 10.15252/embj.2020106355.
- Piberger, A. L., Bowry, A., Kelly, R., Walker, A. K., Gonzalez, D., Bailey, L. J., et al. (2020) PrimPol-dependent single-stranded gap formation mediates homologous recombination at bulky DNA adducts, *Nat. Commun.*, **11**, 5863, doi: 10.1038/s41467-020-19570-7.
- Butler, T. J., Estep, K. N., Sommers, J. A., Maul, R. W., Moore, A. Z., Bandinelli, S., et al. (2020) Mitochondrial genetic variation is enriched in G-quadruplex regions that stall DNA synthesis *in vitro*, *Hum. Mol. Genet.*, **29**, 1292-1309, doi: 10.1093/hmg/ddaa043.
- Šviković, S., Crisp, A., Tan-Wong, S. M., Guillian, T. A., Doherty, A. J., Proudfoot, N. J., Guilbaud, G., and Sale, J. E. (2019) R-loop formation during S phase is restricted by PrimPol-mediated repriming, *EMBO J.*, **38**, e99793, doi: 10.15252/embj.201899793.
- Quinet, A., Tirman, S., Jackson, J., Šviković, S., Lemaçon, D., et al. (2019) PRIMPOL-mediated adaptive response suppresses replication fork reversal in BRCA-deficient cells, *Mol. Cell*, **77**, 461-474.e9, doi: 10.1016/j.molcel.2019.10.008.
- Torregrosa-Muñumer, R., Forslund, J., Goffart, S., Pfeiffer, A., Stojkovic, G., et al. (2017) PrimPol is required for replication reinitiation after mtDNA damage, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 11398-11403, doi: 10.1073/pnas.1705367114.
- Kobayashi, K., Guillian, T. A., Tsuda, M., Yamamoto, J., Bailey, L. J., Iwai, S., Takeda, S., Doherty, A. J., and Hirota, K. (2016) Repriming by PrimPol is critical for DNA replication restart downstream of lesions and chain-terminating nucleosides, *Cell Cycle*, **15**, 1997-2008, doi: 10.1080/15384101.2016.1191711.
- Taglialatela, A., Leuzzi, G., Sannino, V., Cuella-Martin, R., Huang, J. W., et al. (2021) REV1-Pol ζ maintains the viability of homologous recombination-deficient cancer cells through mutagenic repair of PRIMPOL-dependent ssDNA gaps, *Mol. Cell*, **81**, 4008-4025.e7, doi: 10.1016/j.molcel.2021.08.016.

17. Makarova, A. V., Boldinova, E. O., Belousova, E. A., and Lavrik, O. I. (2018) *In vitro* lesion bypass by human PrimPol, *DNA Rep.*, **70**, 18-24, doi: 10.1016/j.dnarep.2018.07.009.
18. Guillian, T. A., Jozwiakowski, S. K., Ehlinger, A., Barnes, R. P., Rudd, S. G., et al. (2015) Human PrimPol is a highly error-prone polymerase regulated by single-stranded DNA binding proteins, *Nucleic Acids Res.*, **43**, 1056-1068, doi: 10.1093/nar/gku1321.
19. Zafar, M. K., Ketkar, A., Lodeiro, M. F., Cameron, C. E., and Eoff, R. L. (2014) Kinetic analysis of human PrimPol DNA polymerase activity reveals a generally error-prone enzyme capable of accurately bypassing 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine, *Biochemistry*, **53**, 6584-6594, doi: 10.1021/bi501024u.
20. Boldinova, E. O., Yudkina, A. V., Shilkin, E. S., Gagarinskaya, D. I., Baranovskiy, A. G., et al. (2021) Translesion activity of PrimPol on DNA with cisplatin and DNA-protein cross-links, *Sci. Rep.*, **11**, 17588, doi: 10.1038/s41598-021-96692-y.
21. Mourón, S., Rodríguez-Acebes, S., Martínez-Jiménez, M. I., García-Gómez, S., Chocrón, S., Blanco, L., and Méndez, J. (2013) Repriming of DNA synthesis at stalled replication forks by human PrimPol, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **20**, 1383-1389, doi: 10.1038/nsmb.2719.
22. Bailey, L. J., Bianchi, J., Hégarat, N., Hochegger, H., and Doherty, A. J. (2016) PrimPol-deficient cells exhibit a pronounced G2 checkpoint response following UV damage, *Cell Cycle*, **15**, 908-918, doi: 10.1080/15384101.2015.1128597.
23. Schiavone, D., Jozwiakowski, S. K., Romanello, M., Guilbaud, G., Guillian, T. A., et al. (2016) PrimPol is required for replicative tolerance of G quadruplexes in vertebrate cells, *Mol. Cell*, **61**, 161-169, doi: 10.1016/j.molcel.2015.10.038.
24. Bailey, L. J., Bianchi, J., and Doherty, A. J. (2019) PrimPol is required for the maintenance of efficient nuclear and mitochondrial DNA replication in human cells, *Nucleic Acids Res.*, **47**, 4026-4038, doi: 10.1093/nar/gkz056.
25. Duong, V. N., Zhou, L., Martínez-Jiménez, M. I., He, L., Cosme, M., et al. (2020) Identifying the role of PrimPol in TDF-induced toxicity and implications of its loss of function mutation in an HIV+ patient, *Sci. Rep.*, **10**, 9343, doi: 10.1038/s41598-020-66153-z.
26. Jamieson, E. R., and Lippard, S. J. (1999) Structure, recognition, and processing of cisplatin — DNA adducts, *Chem. Rev.*, **99**, 2467-2498, doi: 10.1021/cr980421n.
27. Natile, G., and Cannito, F. (2009) Platinum drugs, nucleotides and DNA: the role of interligand interactions, in *Metal Complex-DNA Interactions*, pp. 135-173, doi: 10.1002/9781444312089.ch5.
28. Hay, J., Shahzeidi, S., and Laurent, G. (1991) Mechanisms of bleomycin-induced lung damage, *Arch. Toxicol.*, **65**, 81-94, doi: 10.1007/BF02034932.
29. Díaz-Talavera, A., Calvo, P. A., González-Acosta, D., Díaz, M., Sastre-Moreno, G., et al. (2019) A cancer-associated point mutation disables the steric gate of human PrimPol, *Sci. Rep.*, **9**, 1121, doi: 10.1038/s41598-018-37439-0.
30. Kang, Z., Fu, P., Alcivar, A. L., Fu, H., Redon, C., et al. (2021) BRCA2 associates with MCM10 to suppress PRIMPOL-mediated repriming and single-stranded gap formation after DNA damage, *Nat. Commun.*, **12**, 5966, doi: 10.1038/s41467-021-26227-6.
31. Pilzecker, B., Buoninfante, O. A., Pritchard, C., Blomberg, O. S., Huijbers, I. J., Van Den Berk, P. C. M., and Jacobs, H. (2016) PrimPol prevents APOBEC/AID family mediated DNA mutagenesis, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 4734-4744, doi: 10.1093/nar/gkw123.
32. Guillian, T. A., Bailey, L. J., Brissett, N. C., and Doherty, A. J. (2016) PolDIP2 interacts with human PrimPol and enhances its DNA polymerase activities, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 3317-3329, doi: 10.1093/nar/gkw175.
33. Keen, B. A., Bailey, L. J., Jozwiakowski, S. K., and Doherty, A. J. (2014) Human PrimPol mutation associated with high myopia has a DNA replication defect, *Nucleic Acids Res.*, **42**, 12102-12111, doi: 10.1093/nar/gku879.
34. Liu, J., Lee, W., Jiang, Z., Chen, Z., Jhunhunwala, S., et al. (2012) Genome and transcriptome sequencing of lung cancers reveal diverse mutational and splicing events, *Genome Res.*, **22**, 2315-2327, doi: 10.1101/gr.140988.112.
35. Vaisman, A., Masutani, C., Hanaoka, F., and Chaney, S. G. (2000) Efficient translesion replication past oxaliplatin and cisplatin GpG adducts by human DNA polymerase η , *Biochemistry*, **39**, 4575-4580, doi: 10.1021/bi000130k.
36. Shen, M., Qi, R., Ren, J., Lv, D., and Yang, H. (2022) Characterization with KRAS mutant is a critical determinant in immunotherapy and other multiple therapies for non-small cell lung cancer, *Front. Oncol.*, **11**, 780655, doi: 10.3389/fonc.2021.780655.
37. Yoon, Y. K., Kim, H. P., Han, S. W., Oh, D. Y., Im, S. A., et al. (2010) KRAS mutant lung cancer cells are differentially responsive to MEK inhibitor due to AKT or STAT3 activation: Implication for combinatorial approach, *Mol. Carcinog.*, **49**, 353-362, doi: 10.1002/mc.20607.
38. Garassino, M. C., Marabese, M., Rusconi, P., Rulli, E., Martelli, O., et al. (2011) Different types of K-Ras mutations could affect drug sensitivity and tumour behaviour in non-small-cell lung cancer, *Ann. Oncol.*, **22**, 235-237, doi: 10.2959/logo.2002.13.2.109.
39. Shepherd, F. A., Domerg, C., Hainaut, P., Jänne, P. A., Pignon, J. P., et al. (2013) Pooled analysis of the prognostic and predictive effects of KRAS mutation status and KRAS mutation subtype in early-stage resected non-small-cell lung cancer in four trials of

- adjuvant chemotherapy, *J. Clin. Oncol.*, **31**, 2173–2181, doi: 10.1200/JCO.2012.48.1390.
40. Sarin, N., Engel, F., Kalayda, G. V., Mannewitz, M., Cinatl, J., et al. (2017) Cisplatin resistance in non-small cell lung cancer cells is associated with an abrogation of cisplatin-induced G2/M cell cycle arrest, *PLoS One*, **12**, e0181081, doi: 10.1371/journal.pone.0181081.
 41. Gao, Y., Dorn, P., Liu, S., Deng, H., Hall, S. R. R., et al. (2019) Cisplatin-resistant A549 non-small cell lung cancer cells can be identified by increased mitochondrial mass and are sensitive to pemetrexed treatment, *Cancer Cell Int.*, **19**, 317, doi: 10.1186/s12935-019-1037-1.
 42. Ray, R., Al Khashali, H., Haddad, B., Wareham, J., Coleman, K. L., et al. (2022) Regulation of cisplatin resistance in lung cancer cells by nicotine, BDNF, and a β -adrenergic receptor blocker, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 12829, doi: 10.3390/ijms232112829.

CHARACTERISTICS OF *PRIMPOL* KNOCKOUT A549 CELL RESPONSE TO GENOTOXIC STRESS

A. S. Gromova^{1,2#}, E. O. Boldinova^{1,2#}, D. V. Kim^{3,4}, R. N. Chuprov-Netochin⁵,
S. V. Leonov^{5,6}, M. V. Pustovalova⁵, D. O. Zharkov^{3,4*}, and A. V. Makarova^{1,2*}

¹ *Institute of Molecular Genetics, National Research Center “Kurchatov Institute”,
123182 Moscow, Russia; e-mail: amakarova-img@yandex.ru*

² *Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia*

³ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: dzharkov@niboch.nsc.ru*

⁴ *Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

⁵ *School of Biological and Medical Physics, Moscow Institute of Physics and Technology,
141700 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia*

⁶ *Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Russia*

Human DNA primase/polymerase PrimPol synthesizes DNA primers *de novo* after replication fork stalling at damaged DNA sites, contributing to DNA damage tolerance. The contribution of PrimPol in response to the various types of DNA damage is not fully understood. We obtained the lung carcinoma cells A549 with *PRIMPOL* knockout and characterized its response to DNA damage caused by hydrogen peroxide, methylmethanesulfonate (MMS), cisplatin, bleomycin and ionizing radiation. Knockout of *PRIMPOL* reduced the number of proliferating cells and cells in G2 phase after treatment with MMS, caused a more pronounced delay of cisplatin-treated cells in S phase. A significant increase in the proportion of apoptotic cells was noted in *PRIMPOL*^{-/-} cells in response to ionizing radiation at a dose of 10 Gy, while the proportion of cells prone to necroptosis increased significantly in both parental and knockout cells at any radiation dose. Under conditions of oxidative stress stimulated by hydrogen peroxide, *PRIMPOL* knockout increased cell viability, measured by the MTT method. The data obtained indicate the involvement of *PRIMPOL* in modulating stress-adaptive responses to various types of genotoxic stress.

Keywords: replication, DNA damage, damage tolerance, apoptosis, PrimPol, primase, knockout cell lines