

Б. С. ДЖОЛДЫБАЕВА, Ж. Д. АКИШЕВ, З. Т. ТУСУМХАНОВА,  
М. К. САПАРБАЕВ, А. К. БИСЕНБАЕВ\*

(Казахский национальный университет им. аль-Фараби, Алматы, Казахстан)

## КИНЕТИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ АП-ЭНДОНУКЛЕАЗЫ *Triticum aestivum*

**Аннотация.** Показано, что очищенная рекомбинантная апурин/апиримидиновая эндонуклеаза *Triticum aestivum* (TaApe1L) проявляет АП-эндонуклеазную и 3'→5' экзонуклеазную активность. В отличие от бактериальной и человеческой АП-эндонуклеаз, ионы  $Mg^{2+}$  и  $Ca^{2+}$  ингибируют, тогда как присутствие ионов  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  и  $Fe^{2+}$  сильно стимулирует активность TaApe1L. Оптимальные условия реакции для TaApe1L протекает при низком значении рН(6–7), низкой ионной силе (20 мМ КСl), низкой концентрации двухвалентных катионов (0.1 мМ) и при низкой температуре инкубационной среды (20°С). Изучение кинетических параметров TaApe1L показало что, TaApe1L проявляет слабую АП-эндонуклеазную активность и значительную 3'→5' экзонуклеазную активность.

**Ключевые слова:** АП-эндонуклеаза, Репарация ДНК, *Triticum aestivum*.

**Тірек сөздер:** АП-эндонуклеаза, ДНК репарациясы, *Triticum aestivum*.

**Keywords:** AP-endonuclease, DNA repair, APE1, *Triticum aestivum*.

Окислительное повреждение ДНК, вызванное активными формами кислорода (АФК), считается основным типом эндогенных клеточных повреждений. В настоящее время описано 80 разных типов повреждений ДНК связанных с радикалами кислорода [1]. Если повреждения не будут

устранены, и тенденция накопления сохранится, это может привести к преждевременному старению и развитию хронических заболеваний у человека [2].

Зеленые растения постоянно подвергаются воздействию ультрафиолетового облучения и других факторов окружающей среды, которые активно повреждают клеточную ДНК. Кроме того, растения непрерывно генерируют АФК в ходе дыхания и фотосинтеза. Окислительное повреждение ДНК, вызванные АФК, как полагают, основной тип эндогенных клеточных повреждений ДНК [3]. Окислительное повреждение оснований ДНК являются субстратом для двух пересекающихся путей репарации ДНК: эксцизионная репарация оснований (BER) и эксцизионная репарация нуклеотидов (NIR) [4]. В BER механизме репарации ДНК, ДНК-гликозилаза расщепляет N-гликозидную связь между поврежденным основанием и сахарофосфатным остовом, в результате образуются апуриновые/апириимидиновые (АП) сайты и/или одноцепочечные разрывы в ДНК [5, 6]. С другой стороны, в NIR механизме репарации ДНК, АП-эндонуклеазы расщепляют сахарофосфатный остов ДНК с 5'-стороны от АП-сайта в одной цепи с образованием одноцепочечного разрыва и нуклеотида с 5'-модифицированным концом [7].

В растениях репарация ДНК является не только фундаментальным клеточным процессом для защиты клеток от повреждений, но также имеет важное значение для обеспечения правильной передачи генетической информации от одного поколения к другому. Хотя механизмы репарации ДНК хорошо изучены у бактерий, дрожжей, нематод и клеток млекопитающих, практически неизвестно о механизмах BER и NIR пути в растениях [8], за исключением растений арабидопсиса. Ген АП эндонуклеазы (ARP) растений была клонирована только у арабидопсиса. ARP арабидопсиса частично охарактеризована, и показана редокс-функция этого фермента на транскрипционных факторах человека [9].

Ранее нами впервые выделен кДНК ген АП-эндонуклеазы пшеницы (TaApe1L) с применением реакции обратной транскрипции (РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР) [10, 11]. Показано, что TaApe1L представляет собой мономерный белок, состоящий из 368 аминокислотных остатков (а.о.) с молекулярной массой 41,3 кДа. TaApe1L, как и человеческая АП-эндонуклеаза (Ape1), принадлежит ко второму классу АП-эндонуклеаз. Их действие заключается в разрезании поврежденной цепи ДНК с 5'-стороны от АП-сайта. Вследствие чего образуется субстрат для 3'-фосфодиастеразы - последующего фермента в BER. К настоящему времени изучены кинетические особенности катализа АП-эндонуклеазы 1 человека, но для TaApe1L таких данных нет.

Целью настоящей работы явилось исследование кинетических особенностей TaApe1L и сравнение с имеющимися в литературе данными относительно катализа ферментом из клеток человека.

### Материалы и методы исследования

**Экспрессия и очистка рекомбинантного белка.** кДНК гена TaApe1L была переклонирована в вектор pET28c по сайтам NdeI-BamHI, в результате чего был получен экспрессионный вектор pET28c-TaApe1L с His-tag последовательностью на С-конце. Данный вектор был трансформирован в E.coli (DE3) штамм Rosetta и канамицин устойчивые трансформанты были выращены при 37°C до  $OD_{600nm} = 0,6$ . Экспрессия белка была индуцирована 0,1 mM изопропил- $\beta$ -D-1-тиоглуктопиранозидом (ИПТГ) в течение ночи при 30°C. Клетки были осаждены и лизированы в Френч-прессе при 18000 psi в лизирующем буфере (20 mM HEPES-KOH pH 7.6, 50 mM KCl, ингибиторы протеаз Complete<sup>TM</sup> (Roche Diagnostics, Швейцария)). Лизат был очищен центрифугированием в течение 30 мин при 40,000 x g, 4°C. Концентрацию NaCl и имидазола в супернатанте была доведена до 500 и 10 mM, соответственно. Затем супернатант ввели в колонку HiTrap Chelating HP колонку (Amersham Biosciences, GE Health), заряженную ионами  $Ni^{2+}$ . Связанные белки были элюированы в градиенте 50-600 mM KCl. Очищенный белок хранился в 50% глицероле при 20°C. Чистота белковых образцов была проверена посредством ДСН-ПААГ электрофореза.

**Олигонуклеотиды.** Олигодезоксирибонуклеотиды содержащие модифицированные участки и их комплементарные олигонуклеотиды были заказаны из Eurogentec (таблица 1, где X – тетрагидрофуран). 5'-конец олигонуклеотидов помечены T4 полинуклеотидкиназой без 3'-фосфатазной активностью (New England Biolabs, OZYME, Франция), 5 мкл 10 x киназного буфера, в присутствии  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  (3,000 Ci·mmol<sup>-1</sup>) (PerkinElmer SAS, Франция). Смесь инкубировали в течение 1 ч

Таблица 1 – Субстраты для определения активности TaApe1L

Субстраты	Олигонуклеотидная последовательность субстратов
ТНФ·Т 30мер	5'-[γ] <sup>32</sup> P-TGACTGCATA <del>X</del> GCATGTAGACGATGTGCAT-3' 3'-ACTGACGTATTCGTACATCTGCTACACGTA-5'
Ехo20·G 20мер	5'-[γ] <sup>32</sup> P-GTGGCGCGGAGACTTAGAGA-OH-3' 3'-CACCGCGCCTCTGAATCTCTTTAAACCGCGCCCCCTTAAGG - 5'

при 37°C. Отжиг меченых олигонуклеотидов с комплементарной цепью проводили в 10 мМ Нерес-КОН (рН 7.5) буфере, содержащем 50 мМ NaCl, при температуре 65°C в течение 5 минут, затем медленно охлаждали до комнатной температуры.

**Определение активности АП эндонуклеаз с помощью синтетических ДНК дуплексов.** Стандартная реакционная смесь объемом 20 мкл для определения АП-эндонуклеазной активности содержала 10 нМ [<sup>32</sup>P]-меченого ТНФ·Т олигонуклеотидного дуплекса ДНК, 20 мМ Нерес-КОН (рН 7.6), 50 мМ KCl, 1 мМ MnCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT, 100 мкг/мл БСА, 0.1% NP-40 (неионный детергент) и 5 нМ TaApe1L белок. Реакционную смесь инкубировали в течение 5 минут при 23°C. Реакцию останавливали добавлением раствора содержащего 0.5% ДСН и 20 мМ ЭДТА и обессоливали на колонке с Sephadex G25 (Amersham Biosciences) уравновешенную буфером с 7М мочевиной. Обессоленные аликвоты анализировали с помощью 20%-ного денатурирующего ПААГ, в присутствии 7 М мочевины, 0.5хТВЕ. Реакционная смесь (20 мкл) для АРЕ1 человека содержала: 10 нМ [<sup>32</sup>P]-меченый олигонуклеотидный дуплекс ТНФ·Т, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ KCl, 20 мМ Нерес-КОН (рН 7.6), 100 мкг/мл БСА и 1 нМ фермента. Реакцию проводили при 37°C в течение 5 мин.

После электрофореза гель сканировали с использованием Fuji FLA-3000 Phosphor Screen и анализировали с использованием программы Gauge V3.12.

Для определения К<sub>м</sub> и k<sub>cat</sub> линейная скорость реакции и константы определены из графика Лайнвевера-Бурка. Кинетические параметры для экзонуклеазной активности, когда появляются множественные ДНК фрагменты деградации, были определены путем измерения интенсивности продуктов реакции (фрагментов ДНК) и выражены как сумма интенсивности фрагментов (в процентах от общего субстрата).

### Результаты и их обсуждение

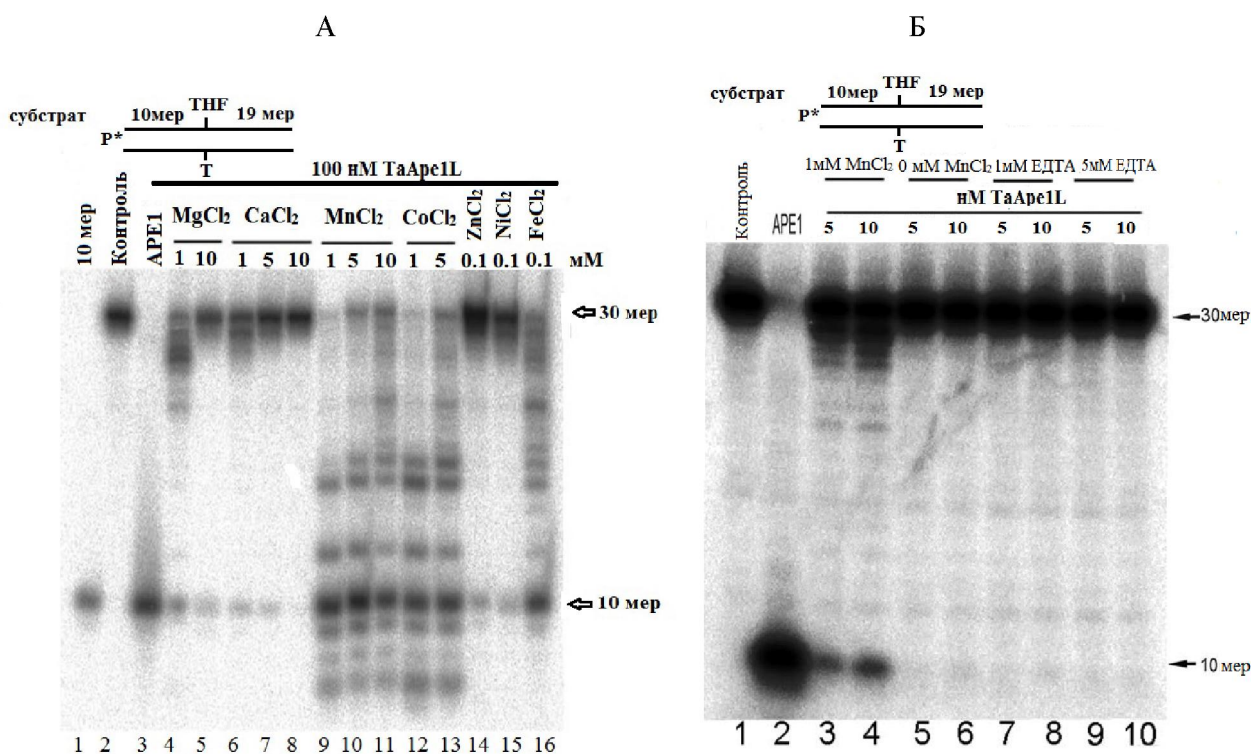
Преыдушие исследования показали, что АП-эндонуклеазы семейства ЕхoIII *E.coli* (Xth), человека (АРЕ1) и растений (*A. thaliana*, Agr) для проявления каталитической активности нуждаются в присутствии двухвалентных катионов в виде ионов Mg<sup>2+</sup> [12,13,14]. В связи с этим, в первоначальных экспериментах мы изучали АП-эндонуклеазную активность очищенного рекомбинантного TaApe1L в условиях оптимальных для Xth и АРЕ1 человека в присутствии различных двухвалентных катионов (MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub> и FeCl<sub>2</sub>). При этом в качестве субстрата для TaApe1L использовали 5'-[<sup>32</sup>P]-меченный олигонуклеотидный дуплекс, содержащий единственный тетрагидрофуран (ТНФ, стабильный аналог апуринового сайта).

Как показано на рисунке 1, в присутствии различных концентраций Mg<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup>, TaApe1L (100 нМ) проявляла слабую АР-эндонуклеазную активность (рисунок 1А). Интересно отметить, что высокие концентрации Mg<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup> (5-10мМ) значительно тормозили АР-эндонуклеазную активность TaApe1L.

При этом АРЕ1 человека в присутствии 5 мМ MgCl<sub>2</sub> полностью расщепил ТНФ·Т-содержащую дуплексную ДНК. При более низких концентрациях ионов Mg<sup>2+</sup> и Ca<sup>2+</sup>, TaApe1L показал высокую 3' → 5' экзонуклеазную активность (рисунок 1). Однако увеличение концентрации MgCl<sub>2</sub> и CaCl<sub>2</sub> до 10 мМ значительно тормозило активность фермента TaApe1L.

Исследования эффекта других двухвалентных катионов на активность TaApe1L выявили, что ионы Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> или 0,1 ммоль Fe<sup>2+</sup> значительно стимулирует расщепление АР-сайта в ТНФ·Т-содержащей дуплексной ДНК (рисунок 1). Напротив, присутствие 0,1 мМ ZnCl<sub>2</sub> и NiCl<sub>2</sub> в реакционном буфере не стимулируют АП эндонуклеазную активность. Необходимо отметить, что TaApe1L проявляет более высокую активность в присутствии 1 мМ Mn<sup>2+</sup> и Co<sup>2+</sup>, по сравнению с

более высокими (5-10 мМ) концентрациями этих катионов. В последующих экспериментах, мы исследовали влияние хелатора двухвалентных ионов – ЭДТА на АП эндонуклеазную активность TaApe1L. Как видно из рисунка 1Б, в присутствии ионов  $Mn^{2+}$  TaApe1L проявлял АП эндонуклеазную активность. При этом внесение в реакционную смесь 1 и 5 мМ ЭДТА полностью подавляла активность TaApe1L. Для дальнейшего объяснения эффекта двухвалентных катионов на активность TaApe1L, мы инкубировали 5'-меченый ТНФ·Т содержащий дуплексную ДНК с ферментом (5 и 10 нМ) в присутствии детергента 0,1% Nonidet P-40 в течение 5 мин при 23 °С. Полученные результаты показали, что TaApe1L проявляет главным образом 3'→5' экзонуклеазную и очень слабую АП эндонуклеазную активность.

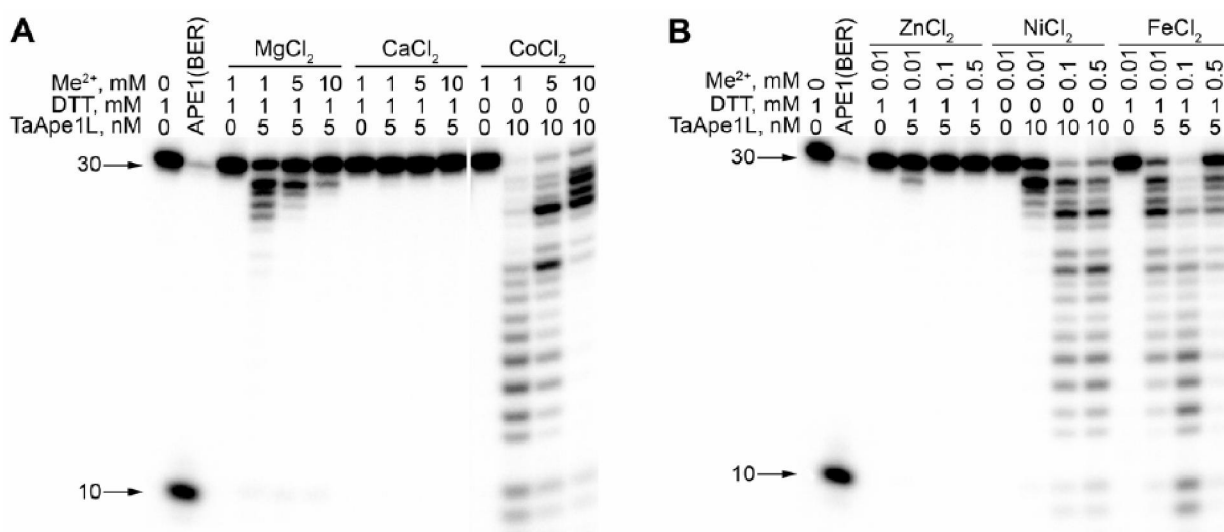


А – Влияние двухвалентных ионов металла на АП эндонуклеазную активность TaApe1L.  
Б – Изучение металлосвязывающих свойств TaApe1L в присутствии ЭДТА.

Рисунок 1 – Определение АП эндонуклеазной активности TaApe1L в присутствии разных ионов металла

Активность фермента значительно стимулировали ионы  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  и  $Fe^{2+}$ , но сильно ингибирует ионы  $Ca^{2+}$  и  $Zn^{2+}$  (рисунок 2). Следует отметить, что при изучении эффекта  $CoCl_2$  и  $NiCl_2$ , DTT была исключена из реакционной среды, чтобы избежать восстановления и осаждения этих солей. А также, в этих условиях были использованы более высокие концентрации TaApe1L (10 нМ), чтобы компенсировать отсутствие восстанавливающего агента. Эти результаты свидетельствуют о том, что TaApe1L обладает сильной 3'→5' экзонуклеазной и слабой АП эндонуклеазной активностями и предпочитает ионы  $Mn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  и  $Fe^{2+}$  в качестве кофакторов.

Для того чтобы исследовать зависимость активности TaApe1L от общей ионной силы, значения pH, концентрации  $MnCl_2$  и температуры, была проведена серия экспериментов, в которой все эти факторы варьировали (рисунок 3). Анализ активности ферментов по отношению к ТНФ·Т содержащему субстрату, в таких факториальных экспериментах вели по расщеплению субстрата в одной временной точке. Важно отметить, что мы обнаружили значительное снижение активности при 5-10-кратном разбавлении рекомбинантного белка в реакционном буфере, однако, когда в буфер внесли 0,1% NP40, TaApe1L проявил устойчивую активность даже при разбавлении белка до концентрации 1 нМ.



А – Эффекты MgCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub> и CoCl<sub>2</sub> на активность фермента в присутствии ДТТ.  
 В – Влияние ZnCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub> на активность фермента в присутствии ДТТ.

Рисунок 2 – Определение 3'→5' экзонуклеазной и АП эндонуклеазной активности TaApe1L в присутствии разных ионов металла

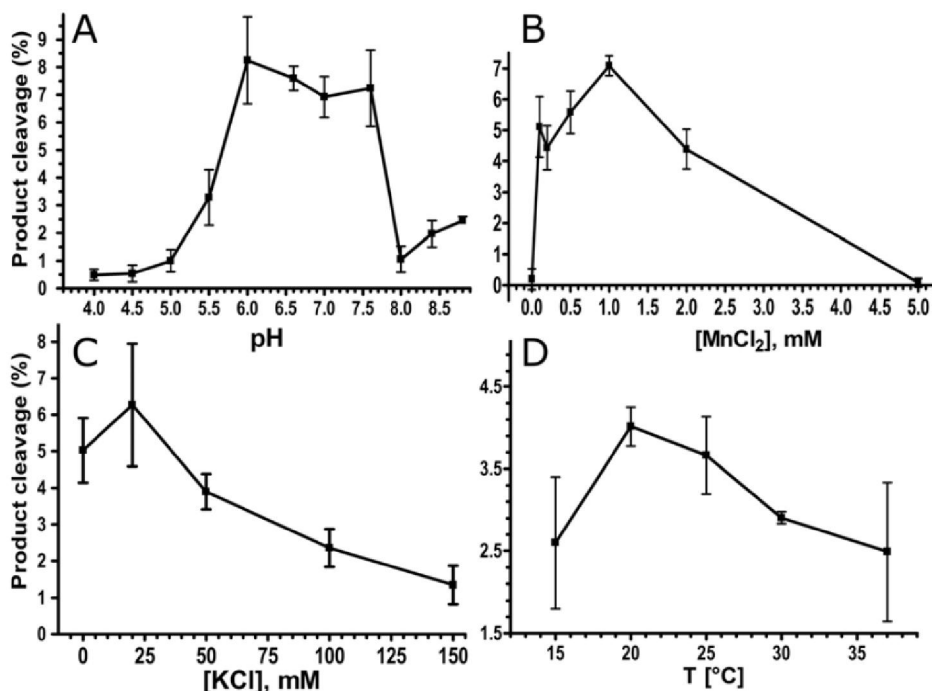


Рисунок 3 – Влияние разных (А) рН, разных концентраций Mn<sup>2+</sup> (В), ионных сил (С) и разных условия температур (Д) на АП- эндонуклеазную активность TaApe1L

Как показано на рисунке 4 А-Д, рН, ионная сила и Mn<sup>2+</sup> - зависимость TaApe1L проявляет колоколообразную кривую в зависимости от условий реакции.

Интересно отметить, мы наблюдали более высокую АП эндонуклеазную активность фермента при инкубации реакционной смеси при 20 °С по сравнению с более высокими значениями температуры (25°-37 °С, рис 4D). На основании этих наблюдений, мы установили оптимальные стан-

дартные условия реакции для TaApe1L, а именно 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 7,0, и температура – 23 °C.

Для характеристики субстратной специфичности рекомбинантного белка TaApe1L, в последующих экспериментах мы измерили значения констант  $K_M$ ,  $k_{cat}$  и  $k_{cat}/K_M$  для реакции расщепления двух разных субстратов: ДНК-дуплекса с ТНФ·Т (ТНФ·Т) для Аp эндонуклеазной активности и ДНК-дуплекса с выступающей матричной цепью (Ехo20·G) для 3'→5' экзонуклеазной активности TaApe1L. Подсчет отношения констант специфичностей ( $k_{cat}/K_M$ ) позволяет оценить, во сколько раз фермент более эффективен на одном из этих субстратов. Показано, что TaApe1L обладает слабой АП эндонуклеазной активностью по сравнению с АРЕ1 человека. При оптимальных условиях реакции и концентрации фермента, TaApe1L расщепляет всего 4-8% АР-сайтов в составе дуплексной ДНК. Однако увеличение времени инкубации и концентрации фермента приводит к резкому усилению 3'→5' экзонуклеазной активности. В отличие от Аp эндонуклеазной активности, TaApe1L проявляет значительную 3'→5' экзонуклеазную активность, которая сопоставима с активностью АРЕ1 человека (Таблица 2).

Таблица 2 – Сравнение кинетических параметров АР-эндонуклеазы пшеницы и человека

Белок	АРЕ1 человека			TaApe1L			Отношение $k_{cat}/K_M$ , АРЕ1/TaApe1L
	$K_M$ , нМ	$k_{cat}$ , min <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_M$ , min <sup>-1</sup> ·M <sup>-6</sup>	$K_M$ , нМ	$k_{cat}$ , min <sup>-1</sup>	$k_{cat}/K_M$ , min <sup>-1</sup> ·M <sup>-6</sup>	
ДНК субстрат							
ТНФ·Т	0.87	15	17200	29	0.018	0.73	24000
Ехo20·G	2.4	0.86	360	270	36	132	2.7

На основании полученных данных, необходимо отметить, что TaApe1L требует более специфические условия для катализируемых реакций, в отличие от других известных АП-эндонуклеаз семейства ЕхoIII, включая АР-эндонуклеазы *E.coli*, дрожжей и человека. Для АП эндонуклеазной активности TaApe1L требуется ионы Mn<sup>2+</sup> и активность фермента ингибируется в присутствии ионов Mg<sup>2+</sup>. Кроме того, TaApe1L демонстрирует высокую активность при 20 °C и слегка ингибируется при 37 °C. При этом оптимальные условия реакции для TaApe1L протекает при низком значении pH, низкой ионной силе, низкой концентрации двухвалентных катионов и при низкой температуре инкубационной среды. Следует отметить, что эти условия значительно отличаются от тех, оптимальных для АР-эндонуклеаз *Arabidopsis* (АРP) и хорошо изученных АП эндонуклеаз *E.coli* (ХТН) и человека (АРЕ1).

## REFERENCES

- 1 Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Ravanat J.L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.* 2003. N 531. P. 5-23.
- 2 Hoeijmakers J. DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.* 2009. N 2009361. P. 1475-1485.
- 3 Cordoba-Canero D., Roldan-Arjona T., Ariza R. Arabidopsis ARP endonuclease functions in a branched base excision DNA repair pathway completed by LIG1. *Plant J.* 2011. N 68. P. 693-702.
- 4 Sancar A., Lindsey-Boltz L.A., Unsal-Kacmaz K., Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem.* 2004. Vol. 73. P. 39-85.
- 5 Gros L., Saparbaev M.K., Laval J. Enzymology of the repair of free radicals-induced DNA damage. *Oncogene.* 2002. Vol. 21. P. 8905-8925.
- 6 Hitomi K., Iwai S., Tainer J.A.. The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: implications for DNA damage recognition, removal, and repair. *DNA Repair (Amst).* 2007. Vol. 6. P. 410-428
- 7 Ischenko A.A., Saparbaev M.K. Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage. *Nature.* 2002. Vol. 415. P. 183-187
- 8 Zharkov D.O. Base excision DNA repair. *Cell Mol Life Sci.* 2008. Vol. 65. P. 1544-1565.
- 9 Babiychuk E., Kushnir S., Van Montagu M., Inze D. The Arabidopsis thaliana apurinic endonuclease Arp reduces human transcription factors Fos and Jun. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994. Vol. 91. P. 3299-3303
- 10 Botagoz Joldybayeva, Paulina Prorok, Inga Grin, Dmitry O. Zharkov, Alexander A. Ishchenko, Barbara Tudek, Amangeldy K. Bissenbaev, Murat Saparbaev. Cloning and Characterization of a Wheat Homologue of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Ape1L. *PLoS One.* March 2014. Vol. 9. Issue 3. DOI: 10.1371/journal.pone.0092963

11 Babiychuk E., Kushnir S., Van Montagu M., Inze D. (1994). The Arabidopsis thaliana apurinic endonuclease Arp reduces human transcription factors Fos and Jun. Proc Natl Acad Sci U S A 91: 3299-3303

12 Rogers S.G., Weiss B. (1980) Exonuclease III of *Escherichia coli* K-12, an AP endonuclease. Methods Enzymol 65: 201-211.

13 Kane C.M., Linn S. (1981) Purification and characterization of an apurinic/aprimidinic endonuclease from HeLa cells. J Biol Chem 256: 3405-3414.

## Резюме

Б. С. Жолдыбаева<sup>1</sup>, Ж. Д. Әкішев<sup>1</sup>, З. Т. Түсімханова<sup>1</sup>, М. К. Сапарбаев<sup>2</sup>, А. К. Бисенбаев<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан,  
<sup>2</sup>«ДНҚ репарациясы» лабораториясы, Густав Рози институты, Франция)

### *Triticum aestivum* АПУРИН/АПИРИМИДИНДІК ЭНДОНУКЛЕАЗА ФЕРМЕНТІНІҢ КИНЕТИКАЛЫҚ СИПАТТАМАСЫ

Бүгінгі күнге дейін ДНҚ репарациясының молекулалық механизмдері бактериялық клеткалар, ашытқылар мен сүтқоректілерде көбірек зерттелген, бірақ өсімдіктерде геном тұрақтылығын қамтамасыз ететін механизмдер жайлы мәлімет жоқтың қасы. Осы жұмыста біздің лабораторияда бөлініп және тазаланып алынған ExoIII қатарына жататын *Triticum Aestivum* АП эндонуклеазасына (ТаАреІІ) кинетикалық сипаттама берілді. Алынған нәтижелерге сүйене отырып, ТаАреІІ АП-эндонуклеазалық және 3'→5' экзонуклеазалық белсенділікке ие екені көрсетілді. Реакциялық орта құрамына Mg<sup>2+</sup> және Ca<sup>2+</sup> иондарының қосылуы белок белсенділігін тежесе, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> және Fe<sup>2+</sup> иондары, керісінше, ТаАреІІ белсенділігін едәуір жандандырды. ТаАреІІ ферменті белсенді жұмыс істеуіне қажетті оңтайлы жағдай айқындалды: дивалентті катион-дардың төмен концентрациясы (0.1 мМ), рН-тың орта мәні (6–7), ортаның төмен иондық күші (20 мМ КСІ) және орта температурасы 20°C. Кинетикалық параметрлерін зерттеу барысында ТаАреІІ әлсіз АП-эндо-нуклеазалық белсенділікке және жоғары 3'→5' экзонуклеазалық белсенділікке ие екендігі анықталды.

**Тірек сөздер:** АП-эндонуклеаза, ДНҚ репарациясы, *Triticum aestivum*.

## Summary

B. S. Joldybayeva<sup>1</sup>, Zh. D. Akishev<sup>1</sup>, Z. T. Tusumkhanova, M. K. Saparbaev<sup>2</sup>, A. K. Bissenbaev<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>al-Farabi Kazakh national university, Almaty, Kazakhstan,  
<sup>2</sup>Group «DNA repair», CNRS UMR8200, Institut Gustave Roussy, France)

### KINETIC CHARACTERISTICS OF THE *Triticum aestivum* AP-ENDONUCLEASE

Until now, molecular characterization of the DNA repair mechanisms have been mainly focused on *E. coli*, yeast and mammalian cells, whereas little is known on the mechanisms that maintain genome stability in plants. In this work a *Triticum aestivum* cDNA encoding for a putative homologue of ExoIII family AP endonucleases has been isolated and its protein product purified and characterized. We report that the putative wheat AP endonuclease (TaApeIL), contains AP endonuclease and 3'→5' exonuclease activities. Surprisingly, in contrast to bacterial and human AP endonucleases, addition of Mg<sup>2+</sup> and Ca<sup>2+</sup> to the reaction mixture inhibited TaApeIL whereas the presence of Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> and Fe<sup>2+</sup> cations strongly stimulated all its DNA repair activities. Optimization of the reaction conditions revealed that the wheat enzyme requires low divalent cation concentration (0.1 mM), mildly acidic pH (6–7), low ionic strength (20 mM KCl) and has a temperature optimum at around 20°C. The steady-state kinetic parameters of enzymatic reactions indicate that TaApeIL contains very weak AP endonuclease and effective 3'→5' exonuclease activities.

**Keywords:** AP-endonuclease, DNA repair, APE1, *Triticum aestivum*.

Поступила 12.05.2014 г.