

NEWS

OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

SERIES OF BIOLOGICAL AND MEDICAL

ISSN 2224-5308

Volume 1, Number 319 (2017), 81 – 90

S. M. Taipakova¹, Zh. D. Akishev¹, M. Zh. Kulzhan¹,
Zh. N. Akhmetova¹, M. K. Saparbayev², A. K. Bissenbaev²

¹Institute of Biology and Biotechnology Problems, al-Farabi Kazakh National University, Almatu, Kazakhstan,

²Laboratory of “DNA repair”, Institute Gustave Roussy, Paris, France.

E-mail: Amangeldy.Bissenbaev@kaznu.kz

ROLE OF *A. THALIANA* APURINIC/APYRIMIDINIC ENDONUCLEASE ARP IN DNA GLYCOSYLASE-INDEPENDENT NUCLEOTIDE INCISION REPAIR

Abstract. Plants continuously generate reactive oxygen species (ROS) as byproducts of metabolic reactions that take place in chloroplasts, mitochondria and peroxisomes. Oxidative damage to cellular DNA caused by ROS is believed to be a major type of endogenous damage to cell. Oxidative DNA base lesions, DNA strand breaks with non-ligatable dirty ends and apurinic/apyrimidinic (AP) sites are substrates for two overlapping pathways: base excision repair (BER) and nucleotide incision repair (NIR). It is generally thought that BER, initiated by multiple DNA glycosylases, is the main pathway for the removal of majority of oxidized bases. In the BER pathway, AP endonucleases cleave DNA at AP sites and 3'-blocking moieties generated by DNA glycosylases, whereas in NIR, the same AP endonucleases incise DNA 5' to a wide variety of oxidized bases. However, the BER pathway raises theoretical problems for the efficient repair of oxidative DNA damage because it generates intermediates such as AP sites, 2'-deoxyribose-5'-phosphate and/or blocking 3'-termini groups that must be eliminated by additional steps before initiating DNA repair synthesis. Processing of DNA damage in the NIR pathway does not generate genotoxic intermediates since it provides the correct ends for DNA synthesis and ligation.

Arabidopsis thaliana contains three genes encoding homologues of major human AP endonuclease 1 (APE1): *Arp*, *Ape1L* and *Ape2*. However, it was not known whether the plant AP endonucleases contain the NIR activity. Here, we report that ARP proteins from *Arabidopsis* contain NIR activity in addition to their AP endonuclease function. The steady-state kinetic parameters of reactions indicate that *Arabidopsis* ARP cleaves oligonucleotide duplexes containing α -anomeric 2'-deoxyadenosine (α dA) and 5,6-dihydrouridine (DHU) with efficiencies ($k_{cat}/K_M = 134$ and $7.3 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$, respectively) comparable to those of the human counterpart.

Key words: AP endonuclease, *A. thaliana*, DNA glycosylases, reactive oxygen species (ROS).

УДК 577.2.04

С. М. Тайпакова¹, Ж. Д. Акишев¹, М. Ж. Кулжан¹,
Ж. Н. Ахметова¹, М. К. Сапарбаев², А. К. Бисенбаев¹

¹НИИ проблем биологии и биотехнологии, Казахский национальный университет им. аль-Фараби,
Алматы, Казахстан,

²Лаборатория «репарации ДНК», институт Густава Розси, Париж Франция

РОЛЬ АПУРИНОВОЙ/АПИРИМИДИНОВОЙ ЭНДОНУКЛЕАЗЫ ARP *A. THALIANA* В НЕЗАВИСИМОЙ ОТ ДНК-ГЛИКОЗИЛАЗ ИНЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ НУКЛЕОТИДОВ

Аннотация. Растения непрерывно генерируют активные формы кислорода (АФК) в качестве побочных продуктов метаболических реакций, которые в относительно большом количестве синтезируются в митохондриях, хлоропластах и пероксисомах. Всё это, в первую очередь, действует на клеточную ДНК, вызывая

её повреждения. Оксидативное повреждение оснований ДНК, разрывы цепи ДНК и апуриновые/апиримидиновые (АП) сайты являются субстратом для двух пересекающихся путей репарации ДНК: эксцизионная репарация оснований (BER) и инцизионная репарация нуклеотидов (NIR). Известно, что BER, инициируемый ДНК гликозилазами является основным механизмом удаления большинства оксидативно поврежденных оснований. Однако в BER механизме образуется генотоксические промежуточные продукты в виде АП сайтов, 2'-дезоксирибозо-5'-фосфат и 3'-концевых блокирующих групп, которые удаляются на последующих этапах BER. Тогда как, NIR механизм репарации не зависит от ДНК-гликозилаз, следовательно, образование генотоксических промежуточных продуктов не происходит. При этом образуемые разрывы в ДНК имеют правильные концы для последующего синтеза и лигирования. Такая особенность теоретически дает привилегию NIR механизму репарации над ДНК гликозилаза зависимым BER механизмом.

Геном широко используемого модельного организма *A. thaliana* кодирует три предполагаемых гомологов главной человеческой АП-эндонуклеазы 1 (APE1): *Arp*, *Ape1L* и *Ape2*. В настоящее время, не известно какая из АП эндонуклеаз растений обладает NIR активностью.

В настоящей работе впервые показано, что ARP белок содержит NIR активность дополнительно к АП-эндонуклеазной активности. Изучение кинетических параметров ARP показала, что фермент способен напрямую, без участия ДНК гликозилаз, репарировать генотоксические повреждения оснований, такие как альфа-аномерный 2'-дезоксиаденозин и 5,6-дигилроурацил с эффективностью ($k_{cat}/K_M = 134$ и $7.3 \mu M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, соответственно) сравнимой с APE1 человека.

Ключевые слова: АП-эндонуклеаза, *A. thaliana*, ДНК гликозилазы, активные формы кислорода (АФК).

Введение. Растения не могут изменять своё положение в грунте, и поэтому постоянно подвергаются воздействию экологических и генотоксических агентов, в том числе ультрафиолетовому и ионизирующему излучению. Кроме этого, растения непрерывно генерирует радикалы кислорода (АФК) в качестве побочных продуктов метаболических реакций, которые в относительно большом количестве синтезируются в митохондриях, хлоропластах, пероксисомах и на плазматических мембранах [1]. Всё это, в первую очередь, действует на клеточную ДНК, вызывая её повреждения.

Для поддержания целостности генома и обеспечения точности переноса генетической информации в период деления клеток, живые организмы развили несколько различных систем репараций ДНК которые удаляют и/или обеспечивают устойчивость к повреждениям ДНК.

В настоящее время механизмы репарации таких повреждений ДНК является объектом интенсивных исследований у бактерий, дрожжей и клеток млекопитающих [2], малопонятными и практически не изученными остаются эти проблемы в растениях, пренебрегая при этом особым статусом растений среди живых существ и их сельскохозяйственной ценностью.

Оксидативное повреждение ДНК, вызванное активными формами кислорода (АФК) считается основным типом эндогенных клеточных повреждений, и в настоящее время описано свыше 100 разных типов модификаций оснований ДНК и его сахарофосфатного остова [1, 2]. Кроме этого в результате атаки АФК дезоксирибоз и их остатков в составе ДНК могут привести к генерации одноцепочечных разрывов с 3'-блокирующими группами. Эти 3'-блокирующие группы включают 3'-фосфат, 3'-фосфогликоальдегид, и 3'-фосфогликолат. 5'-конец цепи ДНК обычно содержит 5'-фосфат, но после воздействия АФК, образованные не лигируемые концы могут содержать 5'-ОН и производные 5'-фосфодезоксирибоз, такие как 2-дезоксирибонлактон [3]. Одной из наиболее распространенной форм повреждения ДНК является потеря части оснований от интактного сахарофосфатного остова. Показано, что более чем 10,000 пуринов и пиримидинов исчезают каждый день в обычной клетке человека.

Окислительное повреждение оснований ДНК, разрывы цепи ДНК с нелигируемыми концами и апуриновые/апиримидиновые (АП) сайты являются субстратом для двух пересекающихся путей репарации ДНК: эксцизионной репарации оснований (BER) и инцизионной репарации нуклеотидов (NIR) [4, 5].

Известно, что BER, инициированный несколькими ДНК-гликозилазами является основным механизмом удаления большинства оксидативно поврежденных оснований [6, 7]. Реализация BER требует последовательного действия двух ферментов: ДНК-гликозилаз и АП-эндонуклеаз, для точного вырезания, поврежденного ДНК. Кроме этого в BER механизме образуются промежуточные продукты в виде АП-сайтов, 2'-дезоксирибозо-5'-фосфатов и 3'-концевых блокирующих групп, которые должны быть удалены на последующих этапах перед началом репаративного синтеза ДНК, что ставить перед нами вопрос относительно эффективности репарации по BER механизму.

NIR механизм репарации не сопровождается образованием генотоксичных промежуточных продуктов, так как образуемые разрывы в ДНК имеют правильные концы для последующего синтеза и лигирования [8]. Такая особенность теоретически дает привилегию NIR механизму репарации над ДНК-гликозилаза зависимым BER механизмом.

NIR механизм репарации окислительного повреждения ДНК это эволюционно консервативный путь репарации ДНК и обнаружен во всех трёх царствах живых существ: археи, бактерии и эукариоты. NIR эндонуклеазы, включая Archaea, Mth212 *Methanothermobacter thermoautotrophicus*, Nfo *E. coli*, Apr1 *Saccharomyces cerevisiae* и человеческий APE1 способны напрямую расщеплять дуплексную ДНК содержащую альфа-аномеры 2'-дезоксинуклеозидов (α dN), а также различные окисленные пиримидины (5,6-дигидропиримидины и 5-гидроксипиримидины) [9,10,11]. При этом эти АП-эндонуклеазы разрезает фосфодиэфирную связь на 5'-конце повреждённого дезоксинуклеотида с образованием на 3'-конце разрыва гидроксильной группы, на 5'-конце – фосфатной. Образование 3'-гидроксильной группы делает возможным дальнейший репарационный синтез ДНК. При этом повреждённый свисающий нуклеотид может быть удалён с помощью флэп-эндонуклеазы.

Нами впервые показано, существование АП эндонуклеазной активности, которая способна расщеплять олигонуклеотидные дуплексы, содержащие альфа-аномерный 2'дезоксаденозин (α dA) остаток в клетках алейрона пшеницы [12]. Интересно, что ДНК-гликозилазы и АП-эндонуклеазы сильно индуцируются в присутствии фитогормона – гиббереллиновой кислоты (ГК). На основании этих данных мы предположили, что растения обладают АП-эндонуклеазами имеющими NIR активность, способные удалять определенные типы окислительных повреждений ДНК, которые не могут быть вырезаны ДНК гликозилазами.

Геном широко используемого модельного организма *A.thaliana* кодирует три предполагаемых гомологов главной человеческой АП-эндонуклеазы 1 (APE1): *Arp*, *Ape1L* и *Ape2*. В настоящее время, не известно какая из АП эндонуклеаз растений обладает NIR активностью.

В настоящей работе нами впервые показано, что фермент at-*Arp* *A.thaliana* способен напрямую, без участия ДНК гликозилаз, репарировать генотоксичные повреждения оснований, такие как альфа-аномерный 2'-дезоксаденозин и 5,6-дигидроурацил.

Материалы и методы исследования

Экспрессия и очистка рекомбинантного белка. Экспрессионный вектор pET28c- at-*Arp* с His-tag последовательностью на С-конце трансформировали в *E.coli* (DE3) штамм Rosetta. Kan^r устойчивые трансформанты были выращены при 37°C до OD_{600nm} = 0,6. Экспрессия белка была индуцирована 0,1 мМ изопротил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ) в течение ночи при 30°C. Клетки были осаждены и лизированы в Френч-прессе при 18 000 psi в лизирующем буфере (20 мМ HEPES-КОН pH 7,6, 40 мМ NaCl, ингибиторы протеаз CompleteTM (Roche Diagnostics, Швейцария). Лизат был очищен центрифугированием 30 мин при 40,000 x g, 4°C; полученный супернатант был доведен до 500 мМ NaCl и 20 мМ имидазола и загружен в колонку HiTrap Chelating HP column (Amersham Biosciences, GE Health), заряженную ионами Ni²⁺. Связанные белки были элюированы в градиенте 50-600 мМ имидазола. Очищенный белок хранился в 50% глицероле при 20°C. Чистота белковых образцов была проверена посредством ДСН-ПААГ электрофореза.

Кинирование олигонуклеотидов. Реакцию фосфорилирования проводили в реакционной смеси объемом 50 мкл, которая содержала: 5 мкл 10 x киназного буфера, [γ -³²P]-АТФ (3000 Ci/mmol), 20 единиц Т4-полинуклеотидкиназы и 20 нМ олигонуклеотида. Смесь инкубировали 20 минут при 37°C. Реакцию останавливали добавлением 2 мкл 0,5 М Na-ЭДТА. Затем дважды проводили депротенизацию смесью фенола и хлороформа (1:1) и пересаждали холодным этанолом. Отжиг олигонуклеотидов с комплементарной цепью проводили в буфере содержащей 50 мМ NaCl, 10мМ HEPES – КОН (pH 7,5) при 65°C в течение 3 минут и медленно охлаждали до комнатной температуры.

Определение АП-эндонуклеазной и NIR активности at-*Arp* с помощью синтетических олигонуклеотидных дуплексов. Стандартная реакционная смесь (20 мкл) которая использовалась для определения АП-эндонуклеазной активности at-*Arp* содержала: 10 нМ [³²P]-меченого олигонук-

леотидного дуплекса THF·T, 5 нМ MgCl₂, 100 нМ KCl, 20 нМ Hepes-KOH pH 7.6, 0.1 мкг·мл⁻¹ BSA, 0.1 нМ APE1. Условия реакции для APE1 человека отличалась в зависимости от механизма восстановления повреждений ДНК. Стандартная реакционная смесь (20 μл) для APE1 человека содержала: 10 нМ [³²P]-меченого олигонуклеотидного дуплекса THF·T, 5 мМ MgCl₂, 50 мМ KCl, 20 мМ Hepes-KOH (pH 7.6), 0.1 мкг·мл⁻¹ BSA и 10 пМ фермента инкубировали при 37°C 5 минут.

Стандартная реакционная смесь (20 мкл) которая использовалась для определения NIR активности atArp содержала: 5 нМ [³²P]-меченый αdA·T содержащий дуплекс, 0.1 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 20 мМ Hepes-KOH (pH 6.8), 0.05 мМ DTT, 0.01% NP-40, 0.1 мг·мл⁻¹ BSA и 0.5 нМ APE1 или 5 нМ ARP. Реакция была остановлена добавлением в реакционную смесь 10 мкл раствора содержащего 0.5% ДСН и 20 мМ EDTA и затем олигонуклеотиды обессоливали на колонке с Sephadex G25 (Amersham Biosciences) уравновешенную в 7М мочеvine. Очищенные реакционные продукты нагревали при 65°C в течение 3 минут и анализировали с помощью 20% ПААГ электрофореза (20:1, 7М мочеvина, 0,53хТВЕ). Гель сканировали с использованием Fuji FLA-3000 Phosphor Screen и анализировали с использованием программы Image Jauge V3.12 software.

Результаты и их обсуждение

В первоначальных экспериментах мы изучали AP-эндонуклеазную активность (BER активность) и NIR активность очищенного рекомбинантного at-ARP в условиях оптимальных для Xth и APE1 человека. При этом для определения BER и NIR активности в качестве субстрата использовали 5'-[³²P]-меченный олигонуклеотидный дуплекс, содержащий единственный тетрагидрофуран (THF, стабильный аналог апуринового сайта) или альфа-2'-дезоксиаденозин (αdA, субстрат для NIR активности), соответственно. Последовательность дуплекса (без указания комплементарной неповрежденной цепи): 5'-[γ]³²P-TGACTGCATAXGCATGTAGACGA TGTGCAT-3', где буквой X обозначено место THF или альфа-2'-дезоксиаденозин A (αdA). Под действием AP-эндонуклеаз вблизи поврежденного основания (THF или αdA) образуется однонитевой разрыв, который при ПААГ электрофорезе в денатурирующих условиях с последующим автордиографированием образует 5'-[γ]³²P-меченый первичный продукт расщепления длиной 10 нуклеотидов (10-мер). Следовательно, BER и NIR активность фермента будет сопровождаться накоплением 10-мерного 5'-[γ]³²P-меченого первичного продукта и уменьшением 5'-[γ]³²P-меченого 30-мерного исходного дуплекса ДНК. В качестве положительного контроля использовали очищенный препарат AP-эндонуклеазы человека (APE1). В качестве источника фермента использовали очищенный рекомбинантный at-ARP.

Как видно из рисунка 1 меченый 5'-[γ]³²P 30 мерный THF·T и αdA·T содержащий дуплекс, в присутствии APE1 человека генерирует 10 мерный первичный продукт, который быстрее движется, чем исходный 30 мерный исходный субстрат (дорожка 2). Инкубация THF·T и αdA·T содержащих субстратов в присутствии разных концентрации at-ARP в течение 2-10 минут при 37°C привело также к накоплению 10 мерного первичного продукта (рисунок 1 А и В, дорожки 3-8 и 3-11). Эти данные указывают на то, что at-ARP проявляет как BER, так и NIR активность. Интересно отметить, что at-ARP, в отличие от APE1 человека, при инкубации с αdA·T содержащим дуплексом генерирует одинаковое количество 9 и 10 мерного продукта расщепления (дорожки 3-11). Кроме этого, по мере увеличения количества белка и времени инкубации генерировался дополнительно 8 и 7 мерные продукты расщепления (дорожки 9-11). Появление 9 мерного продукта расщепления наблюдалась при инкубации с THF·T содержащим субстратом (дорожки 5-8). Эти результаты указывают на то, что ARP проявляет сопряженную сильную 3'→5' экзонуклеазную по отношению к αdA·T повреждениям ДНК. При этом, 3'→5' экзонуклеазная активность по отношению к THF·T субстрату значительно низкий. Полученные результаты указывают на то, что ARP AP-эндонуклеаза *A.thaliana* проявляет значительную NIR функцию в экспериментальных условиях, указанных выше.

Как отмечалось выше, AP-эндонуклеазы семейства ExoIII Xth и APE1 для проявления каталитической активности нуждаются в присутствии двухвалентных катионов в виде ионов Mg²⁺ [13]. Интересно отметить, что ранее нами было показано, что очищенная рекомбинантная

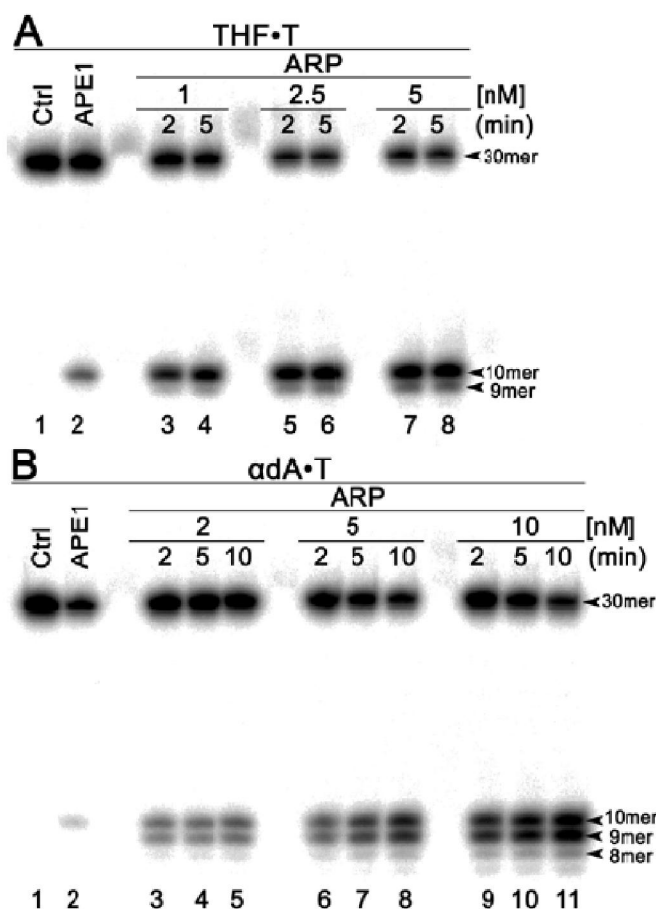


Рисунок 1 – at-ARP специфический распознает и расщепляет олигонуклеотидный дуплекс ДНК содержащий синтетический AP-сайт (THF·T) и α -аномерный нуклеотид (ada·T).

Примечание: 10 nM 5'-32P-меченый THF·T и ada·T содержащий 30-мерный дуплекс инкубировали в BER и NIR реакционном буфере в течение 2-10 минут при 37°C, соответственно. Концентрация ARP белка указано на рисунке. В качестве контроля использовали AP-эндонуклеазу человека (0.1 nM APE1, 5 минут при 37°C). (A) Анализ продуктов AP-эндонуклеазной активности ARP с помощью ПАГЭ в денатурирующих условиях. (B) Анализ продуктов NIR активности ARP с помощью ПАГЭ в денатурирующих условиях. Размер исходного субстрата и продукта первичного расщепления указаны с левой стороны рисунка. "Ctrl"-указывает на контрольную реакцию без участия фермента.

апурин/апириимидиновая эндонуклеаза *Triticum aestivum* (TaApe1L) проявляет AP-эндонуклеазную и 3'→5' экзонуклеазную активность. Однако, в отличие от бактериальной и человеческой AP-эндонуклеаз, ионы Mg²⁺ и Ca²⁺ ингибируют, тогда как присутствие ионов Mn²⁺, Co²⁺ и Fe²⁺ сильно стимулирует активность TaApe1L [14].

Катион металла может играть существенную роль в процессах катализа и в поддержании структуры белковой молекулы. Для выяснения роли катионов металлов в обеспечении функционирования at-ARP мы исследовали влияние катионов двухвалентных металлов (MgCl₂, MnCl₂, CaCl₂, CoCl₂ и ZnCl₂ и NiCl₂) на активность at-ARP. Стоит отметить, что препараты at-ARP не содержали примесных белков (это было подтверждено электрофоретическим методом). Определение AP-эндонуклеазной активности очищенного рекомбинантного at-ARP проводили в условиях оптимальных для Xth и APE1 человека в присутствии различных двухвалентных катионов. В качестве субстрата для at-ARP использовали 5'-[γ]³²P-меченный олигонуклеотидный дуплекс, содержащий единственный THF. На рисунке 2 приведены результаты зависимости активности at-ARP от концентрации двухвалентных металлов.

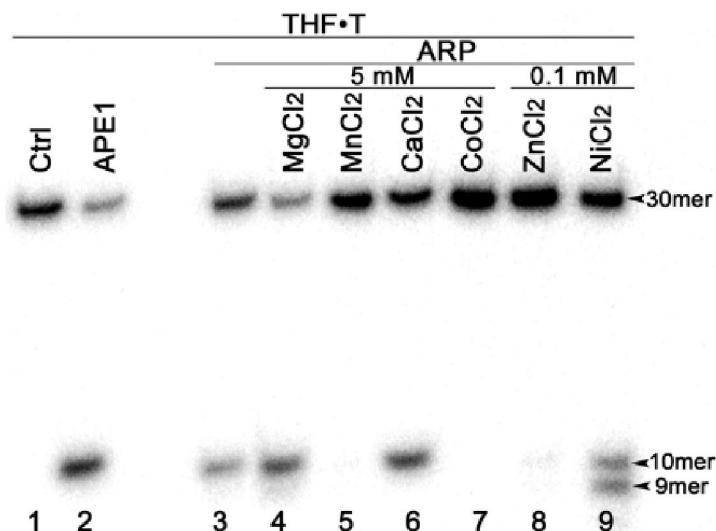


Рисунок 2 – Зависимость AP-эндонуклеазной активности at-ARP от двухвалентных катионов.

Примечание: Анализ продуктов AP-эндонуклеазной активности ARP с помощью ПАГЭ в денатурирующих условиях. 10 нМ 5'-32P-меченый THF·T 30-мер дуплекс с 2 нМ ARP инкубировали в BER реакционном буфере с и без двухвалентных катионов в течение 10 минут при 37°C. В качестве контроля использовали AP-эндонуклеазу человека (0.1 нМ APE1, 5 минут при 37°C). Размер исходного субстрата и продукта первичного расщепления указаны с левой стороны рисунка. "Ctrl" - указывает на контрольную реакцию без участия фермента.

Как видно из рисунка 2 ионы Mg^{2+} при концентрации 5 мМ значительно стимулирует ARP-катализируемое расщепление AP-сайта (дорожка 4), тогда как присутствие 5 мМ Mn^{2+} и Co^{2+} , а также 0.1 мМ Zn^{2+} ингибирует активность (дорожки 5 и 7,8). Необходимо отметить, что ARP может расщепить THF·T дуплекс в отсутствие двухвалентных катионов (дорожка 3) и присутствии 5 мМ Ca^{2+} и 0.1 мМ Ni^{2+} (дорожки 6 и 9), с низкой эффективностью по сравнению с 5 мМ Mg^{2+} (дорожка 4). Эти результаты указывают на то, что для эффективной работы фермента ARP, как и APE1 человека требуется ионы Mg^{2+} . Однако в противоположность к APE1 человека, ARP-катализируемая расщепление AP-сайта стимулируется ионами Ca^{2+} и сильно ингибируется 5 мМ Mn^{2+} и Co^{2+} , а также 0.1 мМ Zn^{2+} . При этом эффект ионов Mg^{2+} и Ca^{2+} на ARP катализируемый гидролиз AP-сайта отличались, что свидетельствует в пользу специфичности действия ионов Mg^{2+} на параметры ферментативной реакции. Возможно, ввиду близости значений радиусов катионов Ca^{2+} и Mg^{2+} процесс активации фермента ионами Ca^{2+} происходит не селективно.

Таким образом, перечисленные выше экспериментальные факты являются доказательством того, что ARP является Mg^{2+} -зависимым ферментом.

Ранее нами было показано сигмовидный характер эффекта ионов Mg^{2+} на AP-эндонуклеазную активность APE1 человека. При этом ионы Mg^{2+} по мере увеличения концентрации (от 0,1 до 10 мМ) значительно стимулировала BER активность и наоборот существенно тормозила NIR активность на $\alpha dA\cdot T$ содержащем субстрате [15, 16]. В связи с этим представляет интерес сравнительный анализ эффекта разной концентрации $MgCl_2$ на BER и NIR активность ARP. Результаты этих исследований представлены на рисунке 3. Результаты показали, что ARP катализируемая реакция расщепления двух потенциальных субстратов содержащих THF·T или $\alpha dA\cdot T$, строго зависит от содержания ионов Mg^{2+} в реакционной среде. При этом, метал зависимый профиль активации фермента была более близким с таковыми APE1 человека. Действительно, ARP проявлял высокую NIR активность при низких концентрациях $MgCl_2$ (≤ 1 мМ) и наоборот низкую активность при высоких концентрациях 10 мМ $MgCl_2$ (рисунок 3).

ARP катализируемая реакция расщепления апуринового сайта THF·T была высокой при 10 мМ $MgCl_2$ и постепенно снижалась со снижением концентрации $MgCl_2$. Следовательно, ARP проявляет существенную NIR активность при низких концентрациях $MgCl_2$, тогда как реакция расщепления AP-сайта эффективнее, наоборот, при высоких концентрациях $MgCl_2$. Mg^{2+} -зависимый профиль AP-эндонуклеазы растений и человека почти одинаковы, что позволяет предположить,

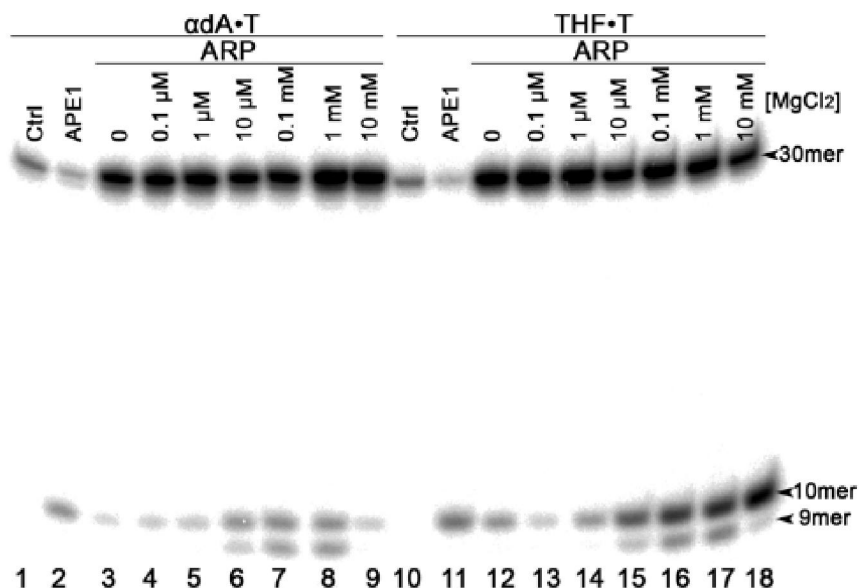


Рисунок 3 – AP-эндонуклеазная и NIR активность фермента ARP в зависимости от концентрации магния.

Примечание: Анализ продуктов NIR и AP-эндонуклеазной активности ARP с помощью ПАГЭ в денатурирующих условиях. Для определения NIR активности в зависимости от ионов Mg^{2+} 10 nM 5'-32P-меченый 30-mer αA -T содержащий дуплекс инкубировали с 2 nM ARP в NIR реакционном буфере содержащей разные концентрации ионов Mg^{2+} в течение 5 минут при 37°C. Для определения AP-эндонуклеазной активности в зависимости от ионов Mg^{2+} 10 nM 5'-32P-меченый 30-mer THF-T содержащий дуплекс инкубировали с 1 nM ARP в BER реакционном буфере содержащей разные концентрации ионов Mg^{2+} в течение 5 минут при 37°C. В качестве контроля использовали AP-эндонуклеазу человека (0.1 nM APE1, 5 минут при 37°C). Размер исходного субстрата и продукта первичного расщепления указаны с левой стороны рисунка. "Ctrl" - указывает на контрольную реакцию без участия фермента.

что в условиях *in vivo* ДНК субстратная специфичность обоих ферментов координируются внутриклеточной концентрацией двухвалентных ионов металлов.

Как отмечалось выше, кроме альфа-аномерного 2'-дезоксаденозина (αA), 5,6-дигидроуридин (DHU) является частью ДНК аддуктов, которые репарируются без участия ДНК-гликозилаз, т.е. с помощью NIR механизма репарации ДНК.

Обладает ли рекомбинантный *at*-Atp субстратной специфичностью к DHU? Для выяснения этого вопроса исследовали субстратную специфичность *at*-Atp к дуплексным ДНК, содержащим DHU с выступающей матричной цепью (рисунок 4). Результаты показали, что 31 мерные 5'-[γ]P³²-меченый ДНК субстраты, содержащие DHU, эффективно расщепляется под действием *at*-Atp. При этом по мере увеличения времени инкубации, возрастала NIR активность по отношению к DHU. Зависимость NIR активности от концентрации фермента показала, что за 30 минут 10 nM *at*-Atp на 50 % расщепляет исходный субстрат, содержащий DHU (рисунок 4). Следует отметить, что *at*-ARP, в отличие от APE1 человека, при инкубации с DHU-G, как и в случае с αA -T содержащим дуплексом (рисунок 3), генерирует одинаковое количество 21 и 20 мерного продукта расщепления. Эти результаты указывают на то, что ARP проявляет сопряженную сильную 3'→5' по отношению к DHU-G и αA -T повреждениям ДНК.

Для характеристики субстратной специфичности рекомбинантного белка *at*-ARP, в последующих экспериментах мы измерили значения констант K_m , k_{cat} и k_{cat}/K_m для реакции расщепления AP-сайта и NIR активности (таблица). Подсчет отношения констант специфичностей (k_{cat}/K_m) позволяет оценить, во сколько раз фермент более эффективен на одном из этих субстратов.

Результаты этих экспериментов показали, что ARP обладает AP-эндонуклеазной и NIR-эндонуклеазной активностями. Однако, ARP, по сравнению с APE1 человека содержит 60 раз меньше AP-эндонуклеазной активностью. Тогда как NIR-эндонуклеазная активность ARP проявлялась со сходной каталитической эффективностью с APE1 человека.

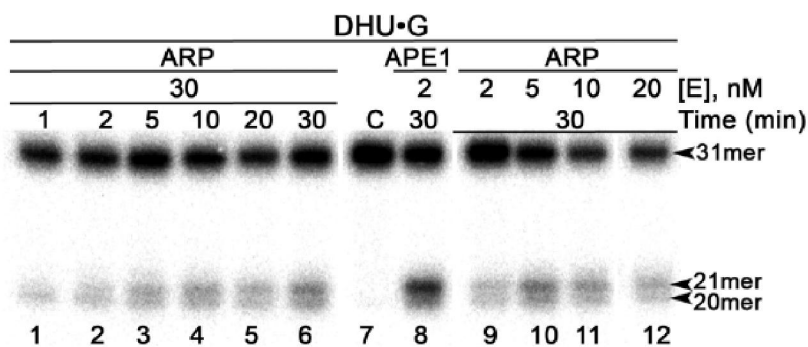


Рисунок 4 – at-ARP белок арабидопсиса специфический распознает и расщепляет олигонуклеотидный дуплекс ДНК содержащий DHU-G.

Примечание: 10 nM 5'-32P-меченый DHU-G содержащий 31-мер дуплекс инкубировали в NIR реакционном буфере в течение 1-30 минут при 37°C. Концентрация ARP белка указано на рисунке. В качестве контроля использовали AP-эндонуклеазу человека (0.1 nM APE1, 5 минут при 37°C). Размер исходного субстрата и продукта первичного расщепления указаны с левой стороны рисунка.

Сравнительный анализ кинетических параметров AP-эндонуклеаз человека и *Arabidopsis thaliana*

Белок	APE1 человека			ARP <i>Arabidopsis thaliana</i>			$\frac{k_{cat}/K_M, APE1}{ARP}$
	K_M, nM	$k_{cat}, \text{мин}^{-1}$	$k_{cat}/K_M, \text{мин}^{-1} \cdot \mu M^{-1}$	K_M, nM	$k_{cat}, \text{мин}^{-1}$	$k_{cat}/K_M, \text{мин}^{-1} \cdot \mu M^{-1}$	
ДНК субстрат							
THF·T	0.87	15	17200	524±150	151±21	289	60
αdA·T	1.6	1.5	940	55±12	7.4±0.4	134	7
DHU-G	29	0.31	11	120±70	0.9±0.3	7.3	1.5

Как отмечалось выше геном *A.thaliana* кодирует три предполагаемых гомологов главной человеческой AP-эндонуклеазы 1 (APE1): *Arp*, *Ape1L* и *Ape2*. Ранее нами выделена и охарактеризована кДНК ген, кодирующий AP-эндонуклеазу пшеницы, которая из-за высокой гомологии к AtApe1L арабидопсиса (68% идентичность) обозначена как TaApe1L. Выявлено, что TaApe1L проявляет слабую AP-эндонуклеазную активность, но существенную 3'→5' экзонуклеазную, 3'-диэстеразную и 3'-фосфатазную активности по сравнению с AP-эндонуклеазой человека. Однако было показано, что TaApe1L не проявляет заметную активность по отношению к субстратам, содержащим αdA и DHU [17]. Высказано предположение о важной роли TaAPE1L в модификации 3'-концевых блокирующих групп.

Инцизионная репарация нуклеотидов обнаружена у архей, бактерий, в том числе у эукариот, включая дрожжей, нематод и млекопитающих [15, 18-20]. До настоящего времени не было известно, характерно ли NIR функция AP-эндонуклеазам растений принадлежащим к семейству Xth. В настоящей работе нами впервые показано, что фермент at-Arp способен напрямую, без участия ДНК гликозилаз, репарировать генотоксичные повреждения оснований, такие как альфа-аномерный 2'-дезоксаденозин и 5,6-дигилроурацил. Как и APE1 человека, субстратная специфичность at-Arp зависит от условия реакции. ARP-катализируемая NIR активность максимальна при низкой концентрации ионов Mg^{2+} (≤ 1 mM), в то время как расщепления AP-сайта достигала максимума при высоких концентрациях ионов Mg^{2+} (≥ 5 mM).

Для NIR функции at-Arp выявлены значительные различия в оптимальных условиях реакции по сравнению с AP-эндонуклеазной. Эндонуклеазная активность была максимальной при pH 7.0-9.0, а NIR активность при pH 6.0, оптимальным для связывания ДНК с AP-сайтом. Более того, эндонуклеазная активность at-Arp была значительной в широком диапазоне концентрации KCl, 0-250 mM, в то время как NIR активность существенно снижалась при концентрации KCl выше 50 mM.

REFERENCES

- [1] Foyer, C.H., Noctor, G. (2003). Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant*, 119, 355–364. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2003.00223.
- [2] Hoeijmakers, J.H. (2009). DNA damage, aging, and cancer, *N. Engl. J. Med.*, 361, 1475-1485. DOI: 10.1056/NEJMra0804615.
- [3] Hegde, M.L., Hazra, T.K., Mitra, S. (2008). Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Research*, 18, 27–47. DOI: 10.1038/cr.2008.8.
- [4] Jaruga, P., Dizdaroglu, M. (2008). 8,5'-Cyclopurine-2'-deoxynucleosides in DNA: mechanisms of formation, measurement, repair and biological effects. *DNA Repair (Amst)*, 7, 1413-1425. DOI: 10.1016/j.dnarep.2008.06.005.
- [5] Brooks, P.J. (2008). The 8,5'-cyclopurine-2'-deoxynucleosides: candidate neurodegenerative DNA lesions in xeroderma pigmentosum, and unique probes of transcription and nucleotide excision repair. *DNA Repair (Amst)*, 7, 1168-1179.
- [6] DOI:10.1016/j.dnarep.2008.03.016
- [7] Zharkov, D.O. (2008). Base excision DNA repair. *Cell. Mol. Life Sci.*, 65 1544-1565. DOI: 10.1007/s00018-008-7543-2.
- [8] Krokan, H.E., Bjoras, M. (2013). Base excision repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5, a012583, DOI: 10.1101/cshperspect.a012583.
- [9] Ischenko, A.A., Sapparbaev, M.K., (2002). Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage. *Nature*, 415, 183-187. DOI:10.1038/415183a
- [10] Gros, L., Ishchenko, A.A., Ide, H., Elder, R.H., Sapparbaev, M.K. (2004). The major human AP endonuclease (Ape1) is involved in the nucleotide incision repair pathway. *Nucleic Acids Res.*, 32, 73-81. DOI:10.1093/nar/gkh165.
- [11] Ide, H., Tedzuka, K., Shimzu, H., Kimura, Y., Purnal, A.A., Wallace, S.S., Kow, Y.W. (1994). Alpha-deoxy-adenosine, a major anoxic radiolysis product of adenine in DNA, is a substrate for *Escherichia coli* endonuclease IV. *Biochemistry*, 33, 7842-7847.
- [12] Ishchenko, A.A., Ide, H., Ramotar, D., Nevinsky, G., Sapparbaev, M. (2004). Alpha-anomeric deoxynucleotides, anoxic products of ionizing radiation, are substrates for the endonuclease IV-type AP endonucleases. *Biochemistry*, 43, 15210-15216. DOI:10.1021/bi049214+.
- [13] Bissenbaev, A.K., Ishchenko, A.A., Taipakova, S.M., Sapparbaev, M.K. (2011). Presence of base excision repair enzymes in the wheat aleurone and their activation in cells undergoing programmed cell death. *Plant Physiol. Biochem.*, 49, 1155-1164. DOI:10.1016/j.plaphy.2011.07.017.
- [14] Levin J.D., Johnson A.W., Demple B. Homogeneous *Escherichia coli* endonuclease IV. Characterization of an enzyme that recognizes oxidative damage in DNA // *J. Biol. Chem.* - 1988. - Vol. 263, № 17. - P.8066-8071.
- [15] 14 Ishchenko A.A., Sanz G., Privezentzev C.V., Maksimenko A.V., Sapparbaev M. Characterisation of new substrate specificities of *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* AP endonucleases // *Nucleic Acids Res.* - 2003. - Vol. 31, № 21. - P.6344-6353.
- [16] 15 Gros, L., Ishchenko, A.A., Ide, H., Elder, R.H., Sapparbaev, M.K. (2004). The major human AP endonuclease (Ape1) is involved in the nucleotide incision repair pathway. *Nucleic Acids Res.*, 32, 73-81. DOI:10.1093/nar/gkh165.
- [17] 16 S.E. Tsutakawa, D.S. Shin, C.D. Mol, T. Izumi, A.S. Arvai, A.K. Mantha, B. Szczesny, I.N. Ivanov, D.J. Hosfield, B. Maiti, M.E. Pique, K.A. Frankel, K. Hitomi, R.P. Cunningham, S. Mitra, J.A. Tainer, Conserved structural chemistry for incision activity in structurally non-homologous apurinic/apyrimidinic endonuclease APE1 and endonuclease IV DNA repair enzymes, *J Biol Chem*, 288 (2013) 8445-8455. DOI:10.1074/jbc.M112.422774.
- [18] 17 B. Joldybayeva, P. Prorok, I.R. Grin, D.O. Zharkov, A.A. Ishenko, B. Tudek, A.K. Bissenbaev, M. Sapparbaev, Cloning and Characterization of a Wheat Homologue of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Ape1L, *PLoS One*, 9 (2014). DOI:10.1371/journal.pone.0092963.
- [19] 18 Ischenko, A.A., Sapparbaev, M.K. (2002). Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage. *Nature*, 415, 183-187. DOI:10.1038/415183a.
- [20] 19 J. Laval, Two enzymes are required from strand incision in repair of alkylated DNA, *Nature*, 269 (1977) 829-832. DOI:10.1038/269829A0.
- [21] 20 M. Redrejo-Rodriguez, C. Saint-Pierre, S. Couve, A. Mazouzi, A.A. Ishchenko, D. Gasparutto, M. Sapparbaev, New Insights in the Removal of the Hydantoins, Oxidation Product of Pyrimidines, via the Base Excision and Nucleotide Incision Repair Pathways, *PLoS One*, 6 (2011) e21039. DOI:10.1371/journal.pone.0021039.

С. М. Тайпакова¹, Ж. Д. Акишев¹, М. Ж. Құлжан¹,
Ж. Н. Ахметова¹, М. К. Сапарбаев², А. К. Бисенбаев¹

¹Биология және биотехнология мәселелері ҒЗИ,
әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Алматы, Қазақстан,
²«ДНҚ репарациясы» зертханасы, Густав Роззи институты, Париж Франция

ДНҚ-ГЛИКОЗИЛАЗАЛАРҒА ТӘУЕЛСІЗ НУКЛЕОТИДТЕРДІҢ ИНСЦИЗИЯЛЫҚ РЕПАРАЦИЯСЫНДАҒЫ *A. THALIANA*-НЫҢ ARP АПУРИНДІ/АПИРИМИДИНДІ ЭНДОНУКЛЕАЗАСЫНЫҢ РӨЛІ

Аннотация. Өсімдіктер метаболитикалық реакциялардың жанама өнімдері ретінде оттегінің белсенді түрлерін (ОБТ) салыстырмалы түрде көп мөлшерде митохондриялар, хлоропластар, пероксисомаларда үздіксіз түзіп отырады. Мұның бәрі, ең бірінші клетка ДНҚ-сына әсерін тигізіп, әртүрлі зақымданулар тудырады. ДНҚ негіздерінің тотыға зақымдалуы, ДНҚ тізбегінің үзінділері, апурин/апириимидинді (АП) сайттар негіздердің ДНҚ репарациясының екі түрі: эксцизиялық репарация (BER) және нуклеотидтердің инсцизиялық репарациясы (NIR) механизмдерінің субстраты болып табылады. ДНҚ-гликозилазалармен инициацияланатын BER, тотыға зақымдалған негіздердің басым бөлігін қалыпына келтіретін негізгі механизм болып табылады. Бірақ, BER механизмі нәтижесінде АП-сайттар, 2'-дезоксирибоза-5'-фосфат және 3'-соңындағы шектеуші топтар сияқты генотоксикалық аралық өнім пайда болып, олар BER механизмінің келесі сатыларында ғана репарацияланады. Ал NIR механизмі ДНҚ-гликозилазаларға тәуелсіз жүреді, демек генотоксикалық аралық өнімдерді түзбейді. Пайда болатын ДНҚ молекуласындағы үзінділер синтезделу және тігіліуі үшін оңтайлы дұрыс сондарға ие. Осындай ерекше қасиеті NIR механизміне теориялық тұрғыдан ДНҚ-гликозилазаға тәуелді BER механизмімен салыстырғанда көптеген артықшылықтар береді.

Модельді организм *A. thaliana* геномы адам АП-эндонуклеазасының (APE1) үш болжамды гомологтарын кодтайды: Arp, Ape1L және Ape2. Қазіргі уақытта, өсімдіктердің АП-эндонуклеазаларының қайсысы NIR белсенділікке ие екені белгісіз.

Қазіргі жұмыста, алғашқы рет ARP белогы АП-эндонуклеазалық белсенділікпен қатар NIR белсенділікке ие екені көрсетілген. ARP-ның кинетикалық параметрлерін зерттеу нәтижесінде фермент ДНҚ гликозилазалардың қатысынсыз тікелей негіздердің альфа-аномерлі 2'-дезоксиаденозин и 5,6-дигилпроурацил зақымдарын репарациялай алуға қабілетті ($k_{cat}/K_M = 134$ и $7.3 \mu M^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$, сәйкесінше).

Түйін сөздер: АП эндонуклеаза, *A. thaliana*, ДНҚ гликозилазалар, оттегінің белсенді түрлері.