

**Тайпакова С.М.<sup>1</sup>, Смекемов И.Т.<sup>2</sup>, Куанбай А.К.<sup>3</sup>,  
Сапарбаев М.К.<sup>4</sup>, Бисенбаев А.К.<sup>5</sup>**

<sup>1</sup>PhD, ведущий научный сотрудник, e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

<sup>2</sup>младший научный сотрудник, e-mail: smekenovizat@gmail.com

<sup>3</sup>младший научный сотрудник, e-mail: kuanbai.aigerim93@gmail.com

<sup>5</sup>доктор биологических наук, профессор, академик НАН РК,

главный научный сотрудник, e-mail: Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

лаборатория молекулярной генетики Научно-исследовательского института проблем биологии и биотехнологии, Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

<sup>4</sup>PhD, профессор, заведующий лабораторией репарации ДНК, Институт Густава Роззи, Франция, г. Париж, e-mail: murat.saparbaev@gustaveroussy.fr

**ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ *ARP*<sup>-/-</sup> МУТАНТНЫХ РАСТЕНИЙ  
*ARABIDOPSIS THALIANA* К ГЕНОТОКСИЧЕСКИМ АГЕНТАМ**

Апуриновые/апириимидиновые (AP) эндонуклеазы являются ключевыми ферментами реализации двух пересекающихся путей репарации ДНК: ДНК-гликозилаза инициированной эксцизионной репарации оснований (BER) и инцизионной репарации нуклеотидов (NIR). В процессе BER, AP-эндонуклеазы специфически гидролизуют фосфодиэфирную связь рядом с AP-сайтом и 3'-блокирующими группами, образующимися в ДНК после удаления окисленного основания ДНК-гликозилазой. Тогда как в NIR механизме AP-эндонуклеазы гидролизуют фосфодиэфирную связь ДНК с 5'-конца от повреждения. Геном широко используемого модельного организма *A.thaliana* кодирует три предполагаемых гомолога главной человеческой AP-эндонуклеазы 1 (APE1): *Arp*, *Arp1L* и *Arp2*. *ARP* – это главная AP-эндонуклеаза растений, которая удаляет абазивные сайты. Однако неизвестно, содержат ли AP-эндонуклеазы растений NIR активность. В настоящей работе показано, что гомозиготный *arp*<sup>-/-</sup> мутант *A. thaliana* проявляет высокую чувствительность к метилметансульфонату и трет-бутилгидропероксиду, но не к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, что указывает на то, что ARP-катализируемая NIR активность требуется для восстановления AP-сайтов, генерируемых экзогенными факторами, и специфических окислительных повреждений ДНК, индуцированных t-BuO<sub>2</sub>H в условиях *in vivo*. Экстракты растений нокаутных по гену *Arp* не проявляли NIR активность на *αdA*•T содержащем олигонуклеотидном субстрате. Эти результаты свидетельствуют о том, что ARP является основной AP- и NIR- эндонуклеазой в *A. thaliana*.

**Ключевые слова:** AP-эндонуклеаза, *Arabidopsis thaliana*, ДНК гликозилазы, активные формы кислорода.

Taipakova S.M.<sup>1</sup>, Smekenov I.T.<sup>2</sup>, Kuanbay A.K.<sup>3</sup>, Saparbayev M.K.<sup>4</sup>, Bissenbaev A.K.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>PhD, leading researcher, e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

<sup>2</sup>junior researcher, e-mail: smekenovizat@gmail.com

<sup>3</sup>junior researcher, e-mail: kuanbai.aigerim93@gmail.com

<sup>5</sup>doctor of biological science, professor, academician of NAS of RK, chief researcher, e-mail: Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

laboratory of molecular genetics Scientific Research Institute of Biology and Biotechnology Problems, Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

<sup>4</sup>PhD, professor, head of DNA repair laboratory, Institute Gustave Roussy, France, Paris, e-mail: murat.saparbaev@gustaveroussy.fr

**Sensitivity of *arabidopsis thaliana arp*<sup>-/-</sup> mutants to genotoxic agents**

Apurinic/aprimidinic (AP) endonucleases are important DNA repair enzymes involved in two overlapping pathways: DNA glycosylase-initiated base excision (BER) and AP endonuclease-initiated nucleo-

tide incision repair (NIR). 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. The flowering plant *Arabidopsis thaliana* contains three genes encoding homologues of major human AP endonuclease 1 (APE1): Arp, Ape1L and Ape2. ARP is a major plant AP endonuclease that removes abasic sites. However, it was not known whether the plant AP endonucleases contain the NIR activity. Here, we report that homozygous *A. thaliana* arp<sup>-/-</sup> mutant exhibited high sensitivity to methyl methanesulfonate and tert-butyl hydroperoxide, but not to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suggesting that ARP-catalyzed NIR activity is required to repair AP sites generated by exogenous factors and specific oxidative DNA lesions induced by t-BuO<sub>2</sub>H in vivo. Extracts from arp<sup>-/-</sup> mutants, but not ape1L and ape2 mutants, exhibited no or very low NIR activity on the αdA•T. These results strongly suggest that ARP is a major AP site cleavage and NIR endonuclease in *A. thaliana*.

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

Тайпакова С.М.<sup>1</sup>, Сметенов И.Т.<sup>2</sup>, Қуанбай А.К.<sup>3</sup>, Сапарбаев М.К.<sup>4</sup>, Бисенбаев А.К.<sup>5</sup>

<sup>1</sup>PhD, жетекші ғылыми қызметкер, e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

<sup>2</sup>кіші ғылыми қызметкер, e-mail: smekenovizat@gmail.com

<sup>3</sup>кіші ғылыми қызметкер, e-mail: kuanbai.aigerim93@gmail.com

<sup>5</sup>биология ғылымдарының докторы, профессор, ҚР ҰҒА академигі, бас ғылыми қызметкер, e-mail: Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

Биология және биотехнология мәселелері Ғылыми-зерттеу институты, молекулалық генетика лабораториясы, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

<sup>4</sup>PhD, профессор, ДНҚ репарациясы лабораториясының меңгерушісі, Густав Рози институты, Франция, Париж қ., e-mail: murat.saparbaev@gustaveroussy.fr

### ***Arabidopsis thaliana* arp<sup>-/-</sup> мутантты өсімдіктердің генотоксикалық агенттерге сезімталдығы**

Апуриндік/апиримидиндік (AP) эндонуклеазалар ДНҚ репарациясының өзара қиылысатын екі жолы ДНҚ-гликозилазамен инициализацияланатын негіздердің эксцизиялық репарациясы (BER) және нуклеотидтердің инцизиялық репарациясының (NIR) негізгі ферменті болып табылады. BER процесінде AP-эндонуклеаза тотыға зақымдалған негізді ДНҚ-гликозилаза ферментімен өңдеу нәтижесінде ДНҚ молекуласында түзілетін AP-сайты мен 3'-шектеуші тобы жанындағы фосфодиэфирлік байланысты спецификалық гидролиздейді. Ал NIR механизмінде AP-эндонуклеазалар ДНҚ зақымдануының 5'-соңындағы фосфодиэфирлік байланысты гидролиздейді. Модельді организм *A.thaliana* геномы адам АП-эндонуклеазасының (APE1) үш болжамды гомологтарын кодтайды: Arp, Ape1L және Ape2. ARP – өсімдіктердің апуриндік/апиримидиндік сайттарын ыдырататын негізгі өсімдік AP-эндонуклеазасы болып табылады. Алайда өсімдіктердегі АП эндонуклеазалардың NIR белсенділікке ие екені осы күнге дейін белгісіз. Ұсынылып отырған жұмыста, гомозиготты arp<sup>-/-</sup> мутант *A. thaliana* метилметансульфонат пен трет-бутилгидропероксидке жоғары сезімталдық көрсетеді, алайда H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ке сезімталдығы байқалмайды. Ол ARP-катализденетін NIR белсенділік in vivo жағдайында t-BuO<sub>2</sub>H әсерінен индукцияланатын спецификалық тотыққан ДНҚ зақымданулары мен экзогенді факторлар әсерінен туындайтын AP-сайттарды қалпына келтіру үшін қажет екендігін көрсетеді. arp<sup>-/-</sup> мутантты өсімдіктерінің клеткалық экстрактылары αdA•T олигонуклеотидтік субстратында NIR белсенділігін көрсетпеді. Бұл нәтижелер ARP белогы *A. thaliana* өсімдігінің негізгі AP- және NIR-эндонуклеазасы екендігін дәлелдейді.

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

### **Введение**

Наземные растения постоянно подвергаются воздействию различных факторов окружающей среды, включая ультрафиолетовые и экстремально высокие температуры, которые вызывают обширное повреждение в клеточной ДНК. Кроме того, растения продуцируют активные формы кислорода (АФК), во время дыхания в митохондриях и фотосинтеза в хлоропластах. Предполагается, что окислительное повреждение ДНК, вызванное АФК, является основным источником

эндогенного повреждения клеток (Cadet J., 2003: 5-23; Foyer C.H., 2003: 355-364). Окислительное повреждение оснований ДНК является субстратом для двух пересекающихся путей репарации ДНК: эксцизионной репарации оснований (BER) и инцизионной репарации нуклеотидов (NIR) (Krokan H.E., 2013: a012583; Ischenko A.A., 2002: 183-87; Jaruga P., 2008: 1413-1425; Brooks P.J., 2008: 1168-1179). В классическом BER механизме репарации ДНК, ДНК-гликозилаза расщепляет N-гликозидную связь между поврежденным основанием и сахарофосфатным остовом, в ре-

зультате образуются апуриновые/апириимидиновые сайты (АП-сайт) (монофункциональные ДНК-гликозилазы) или одноцепочечный разрыв ДНК с 3'-фосфо- $\alpha,\beta$ -ненасыщенным альдегидом (3'-PUA, бифункциональные ДНК гликозилазы/АР-лиазы, катализирующие  $\beta$ -элиминацию) или однонуклеотидный зазор, фланкированный двумя остатками фосфата (бифункциональные гликозилазы/АР-лиазы, катализирующие  $\beta/\delta$ -элиминацию) (Hitomi K., 2007: 410-28). Альтернативно, в NIR механизме репарации АП-эндонуклеаза делает разрез с 5'-стороны поврежденного нуклеотида и генерирует односторонний разрыв с 3'-гидроксильной группой, подходящей для работы ДНК-полимеразы (Gros L., 2004: 73-81).

В настоящее время молекулярная характеристика механизмов репарации ДНК в основном сосредоточена на клетках бактерий, дрожжей и млекопитающих (Friedberg E.C., 2006), причем гораздо меньше внимания уделяется механизмам, поддерживающим стабильность генома в растениях. Важно отметить, что помимо экзогенных факторов, в геноме растений постоянно происходит ДНК-гликозилаза-опосредованное удаление оснований для активного деметилирования цитозина во время развития и в ответ на действие факторов окружающей среды (Vanyushin V.F., 2011: 360-68; He X.J., 2011: 442-65). Растения содержат несколько ДНК-гликозилаз, которые специфически распознают и удаляют 5-метилцитозин (5mC), инициируя его замену цитозином через BER механизм (Zhu J.K., 2009: 143-66). В *Arabidopsis thaliana* 5mC-ДНК гликозилазы (ROS1, DME, DML2 и DML3) участвуют в регуляции импринтинга и сайленсинга генов (Zhu J.K., 2009: 143-66). Эти ферменты являются бифункциональными ДНК-гликозилазами, которые расщепляют АП-сайт, образуемый после удаления 5mC путем  $\beta$ - и  $\beta/\delta$ -элиминации (Morales-Ruiz T., 2006: 6853-58). Таким образом, инициируемая ДНК-гликозилазой деметилирование ДНК в растениях генерирует высокогенотоксические разрывы нитей ДНК, не содержащие на 3'-конце гидроксильные группы и, следовательно, не могут быть использованы ДНК-полимеразами и ДНК-лигазами, и поэтому должны быть удалены до инициации пострепарационного синтеза ДНК.

Геном широко используемого модельного организма *A. thaliana* кодирует три предполагаемых гомолога главной человеческой АП-эндонуклеазы 1 (APE1): *Arp*, *Ape1L* и *Ape2* (Murphy T.M., 2009: e4297). Ранее было показано, что

белок ARP представляет собой АП-эндонуклеазу класса II, которая расщепляет дуплексную ДНК с 5'-стороны АП-сайта и генерирует односторонний разрыв, фланкированный с 3'-гидроксильной группой (3'-OH) и 5'- дезоксирибоза-фосфат (5'-dRp) (Babiychuk E., 1994: 3299-303; Cordoba-Canero D., 2011: 693-702). ARP также содержит редокс-функцию, аналогичную редокс-функции APE1 человека, которая может стимулировать связывание с ДНК с помощью транскрипционного фактора человека AP-1 (Babiychuk E., 1994: 3299-303).

В настоящее время ДНК-гликозилазы и АП-эндонуклеазы пшеницы только частично охарактеризованы (Joldybayeva B., 2014: e92963; Bissenbaev A.K., 2011: 1155-64). Ранее мы впервые показали, существование АП-эндонуклеазной активности, которая способна расщеплять олигонуклеотидные дуплексы, содержащие АП-сайт и  $\alpha$ -аномерный остаток 2'-дезоксиаденозина (*adA*) в экстрактах клеток алейронового слоя зерна пшеницы, что указывает на наличие BER и NIR механизма в пшенице (Babiychuk E., 1994: 3299-303). Мы также клонировали и охарактеризовали предполагаемую АП-эндонуклеазу *Triticum aestivum*, TaApe1L, гомолога APE1 человека и AtApe1L *A. thaliana* (Cordoba-Canero D., 2011: 693-702). Очищенная TaApe1L показала значительную 3'-фосфодиэстеразную и 3'-фосфатазную активность, но очень слабую АП-эндонуклеазную активность, однако у TaApe1L отсутствовала NIR активность. На основе этих данных мы предположили, что другие АП-эндонуклеазы растений могут содержать NIR функцию.

Целью представленной работы является изучение роли АП эндонуклеаз арабидопсиса в репарации повреждений ДНК *in vivo*

## Материалы и методы исследования

Для приготовления буферных растворов использовали реактивы марок х.ч., ч.д.а., и о.с.ч., производимых фирмами «Sigma», «Amresco», «Serva» и «Реахим». В ходе работы использовали ферменты модификации ДНК и белков производства фирм «Sigma-Aldrich» (США), «New England Biolabs» (Франция), «Thermo Fisher Scientific» (США), «Promega» (США), «Roche» (США).

В качестве субстратов для определения биохимической активности были использованы олигонуклеотиды, содержащие модифицированные основания, и комплементарные

к ним олигонуклеотиды (Eurogentec, Seraing, Belgium). Последовательность олигонуклеотидов длиной 30 нуклеотидов (30-mer) следующая – d(TGACTGCATAXGCATGTAGACGATGTGCAT). Где X указывает место тетрогидрофурана (THF, аналог апуринового или апиридинового сайта), альфа-2'-дезоксаденозина (*αdA*). В комплементарной цепи напротив поврежденного основания содержится А, G, С или Т. Комплементарная цепь длиной 40 нуклеотидов (Rex-T) была следующего состава d(GGAA TTCCCGCGCCAAATGTCTCTAAGTCTCCGCGCCAC).

5'-конец олигонуклеотидов метили с T4 полинуклеотид киназой в присутствии  $\gamma$ (<sup>32</sup>P)-АТФ. Отжиг меченых олигонуклеотидов с комплементарной цепью проводили в буфере содержащей 50 mM KCl и 20 mM HEPES-KOH (pH 7.5) при температуре 70°C в течение 3 минут и охлаждали до комнатной температуры в течение 2 часов. Полученные олигонуклеотиды обозначили как X•C (G, A, T), соответственно. Где X обозначает модифицированное основание.

Объектом исследования являлись семена арабидопсиса (*A. thaliana*) линии Col0 (растения дикого типа) и линии SALK\_021478 (*arp<sup>-/-</sup>*), относящейся к коллекции инсерционных мутантов SALK, полученные из Биологического ресурсного центра (Arabidopsis Biological Resource Center, <http://www.arabidopsis.org>).

Для выращивания растений *A. thaliana* линии Col0 (растения дикого типа) и линии SALK\_021478 (*arp<sup>-/-</sup>*), на твердых питательных средах использовали чашки Петри, содержавшие соли *Мурациге-Скуга* (MS) в концентрации 0.5 нормы, 1% сахарозы и 1% агар. Первые 2 суток культивирование проводилось в темноте при 4°C, после чего растения выращивали в условиях длинного светового дня ( $\geq 14$  ч) при 22°C. Через 18 дней растения с чашек Петри переносили в почву для сбора семян. Генотипирование с целью отбора гомозигот проводили с помощью ПЦР. Присутствие Т-ДНК вставки в мутантных растениях SALK\_021478 (*arp<sup>-/-</sup>*) проверяли с помощью ПЦР с использованием следующей комбинации праймеров (таблица 1): “RP” (прямой, комплементарный к гену ARP), “LP” (обратный, комплементарный к гену ARP) и “BP\_salk” (комплементарный к левому краю Т-ДНК). Ожидаемая длина ПЦР продукта для дикого типа аллеля – 2259 пн., а для мутантного аллеля – 2254 пн. Кроме этого мутантные линии арабидопсиса проверяли с помощью RT-PCR с гено-специфическими праймерами LP/RT

(ожидаемая длина ампликона 577 пн) и иммуноблотингом с анти-ARP поликлональными антителами. Потомство отобранных гомозиготных растений использовали в последующих экспериментах.

**Таблица 1** – Праймеры для характеристики мутантов *A. thaliana* с Т-ДНК вставкой

Название	Последовательность
RP	d (AAGAGCTAAGAGAAGCCGGTG)
BP_SALK	d (ATTTTGCCGATTTCCGGAAC)
LP	d ( AGCTTTCAGTCTCTCTGAGG )
RT	d ( CCAGGAGCAGCTATGATCAG)

#### *Выделение тотальной РНК из листьев A. thaliana*

Для выделения РНК брали 100 мг листьев *A. thaliana*. Гомогенизировали в заранее охлажденной фарфоровой ступке в присутствии 1,3 мл TRI реагента (Sigma-Aldrich, США) и продолжали растирать. Гомогенат перенесли в микропробирку и центрифугировали при 12000 об/мин в течение 5 минут при 4°C. Супернатант перенесли в стерильную пробирку и добавили 300 мкл холодного хлороформа перемешивали путем инвертирования пробирки 25 раз и инкубировали на льду в течение 3 минут. Далее центрифугировали при 12000 об/мин в течение 15 минут при 4°C. Верхнюю водную фазу осторожно перенесли в новую пробирку и добавили 0,5 мл холодного изопропилового спирта. После перемешивания раствор инкубировали 10 минут на льду и центрифугировали при 12000 об/мин 10 минут при 4°C. Супернатант удаляли пипеткой и осадок промывали в 1 мл 75% этанола. Образец осаждали при 12000 об/мин в течение 5 минут при 4°C и сушили при комнатной температуре 10 минут. Осадок растворяли в 30 мкл dH<sub>2</sub>O. Концентрацию и качество выделенной РНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, США), 1% агарозного гель-электрофореза. Образец хранился при -70°C.

#### *Выделение мРНК*

Выделение мРНК объем полученного нами препарата тотальной РНК довели до 600 мкл dH<sub>2</sub>O. Препарат инкубировали в течении 5 мин при 65°C в водяной бане, затем к препарату добавили 500 мкл двукратного связывающего бу-

фера (1М NaCl, 20мМ Tris pH 7.5, 2мМ EDTA, 0.1% ДСН). Полученную смесь переносили в пробирку с промытой олиго-dT целлюлозой и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре на качалке. Смесь центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 минут, удаляли супернатант. Осадок промывали два раза однократным связывающим буфером и два раза промыточным буфером (0.2М NaCl, 10мМ Tris pH 7.5, 1мМ EDTA, 0.05% ДСН). мРНК элюировали с помощью олиго-dT целлюлозы, добавлением 250 мкл буфера для элюции и инкубированием при 37°C в течении 5 мин. Далее смесь центрифугировали и осторожно отбирали супернатант в чистую пробирку. Повторяли элюцию. Объединяли элюаты и доводили объем водой до 200 мкл. Для осаждения поли-А РНК к раствору добавляли 40 мкл 5М ацетата аммония, 2.5 объема этанола и поместили на 30 мин -70°C, или на ночь на -20°C. Осадок собирали центрифугированием и растворяли в 50 мкл dH<sub>2</sub>O.

#### *Реакция обратной транскрипции*

Для синтеза кДНК на основе мРНК, в стерильную пробирку добавляли в указанной последовательности: РНК (1-500 нг поли-А РНК), праймер (15-20 пмоль ген-специфичного праймера) и затем объем довели до 12,5 мкл стерильной dH<sub>2</sub>O. Реакционную смесь прогревали при 70°C в течение 5 минут и охлаждали на льду. Далее, к смеси добавляли (в указанной последовательности): 4 мкл пятикратного реакционного буфера (250 мМ Tris-HCl pH 8.3 при 25°C, 250 мМ KCl, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 мМ DTT), 0.5 мкл (или 20 ед.) RiboLock™ RNase Inhibitor, 2 мкл 10 мМ смеси dNTP (конечная концентрация 1мМ), 1 мкл (или 200 ед.) RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Латвия). Конечный объем реакционной смеси составлял 20 мкл. Затем смесь осторожно перемешивали и инкубировали в течение 5 мин при 37°C. Реакцию проводили в течение 1.5 часов при 42°C в водяной бане. Реакцию останавливали прогреванием в течении 10 мин при 70°C. Полученный продукт хранили при -20°C.

#### *Полимеразная цепная реакция atARP*

Для получения в достаточном количестве кДНК использовали метод ПЦР. К 2 мкл реакционной смеси обратной транскрипции добавляли олигонуклеотиды, являющиеся прямым и обратным праймерами до конечной концентрации 0,2 мМ. Далее в смесь добавляли 12,5 мкл 2X PCR Master mix (Fermentas, Латвия), содержащие 0,625 единиц Taq ДНК полимеразы в буфере (750 мМ Tris HCl, pH 8.8, 200 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.1 %

Tween 20), 50 мМ MgCl<sub>2</sub> и 5 мМ каждого dNTP, а также 15,5 мкл деонизированной стерильной воды на 25 мкл реакции. Продукты ПЦР анализировали в 1% агарозном геле и затем очищали методом элюции из геля.

#### *Получение экстрактов растений*

Для иммуноблотинга приблизительно 50 мг свежей ткани листа или корня из 15-дневных проростков замораживали в жидком азоте и гомогенизировали в 250 мкл ледяном буфере для экстракции белков, содержащего 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 100 мМ KCl, 15% глицерина, 1 мМ DTT, 0,01% NP-40, 1 мМ фенолметилсульфонилфторида, 5 мкг•мл<sup>-1</sup> лейпептина и 1 мкг•мл<sup>-1</sup> антипаина. Полученный лизат центрифугировали при 13000 g в течение 1 часа при 4°C для осаждения клеточных остатков. Супернатант переносили в новую пробирку и концентрацию белка в каждом образце определяли методом Брэдфорда (Bradford M.M., 1976:248-254) перед нанесением на гель.

Для анализа активности ферментов 15-дневные проростки замораживали в жидком азоте. Затем полученный порошок ресуспендировали в 3 объемах (масса/объем) в буфера для гомогенизации, содержащего 25 мМ HEPES-KOH (pH 7,8), 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 250 мМ сахарозы, 10% глицерина, 1 мМ DTT и 1×полный миксингибиторов протеаз без EDTA. Все дальнейшие шаги проводили при 0-4°C. Гомогенат инкубировали в течение 30 мин при 4°C и центрифугировали при 13000 g в течение 1 часа. Супернатант фильтровали через нейлоновую сетку диаметром 20 мкм, затем образцы подвергали диализу против буфера с 25 мМ HEPES-KOH (pH 7,8), 100 мМ KCl, 17% глицерина и 2 мМ DTT. Полученные экстракты концентрировали, используя центрифужное фильтрующее устройство Amicon Ultra 30 000 NMWL (Millipore, Германия), и концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда. Экстракты хранили в небольших объемах при -80 °С.

#### *Анализ активности фермента*

Стандартная реакционная смесь (20 мкл) содержала 5 нМ 32P-меченный дуплексный олигонуклеотидный субстрат и указанное количество фермента в оптимизированном фермент-специфическом буфере. Условия анализа расщепления для ARP, wARP и APE1 человека варьировали в зависимости от исследуемой реакции восстановления ДНК. Стандартные АП-эндонуклеазный анализ проводился при высокой концентрации ионов Mg<sup>2+</sup> (≥5 мМ) и слегка щелочном значении pH («BER условия»): 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 100 мМ KCl,

20 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 0.1 мг•мл<sup>-1</sup> BSA, 0.1 nM APE1 или 1.0 nM ARP, или 5 nM wARP и 5 nM THF•T или Eho20•RexT, или Eho20<sup>THF</sup>•RexT, или Eho20<sup>P</sup>•RexT дуплексы. Стандартные исследования NIR-активности выполнялись при низкой концентрации Mg<sup>2+</sup> ( $\leq 1$  mM) и кислото/нейтральном значении pH ( $\leq 7$ ) («NIR условия»): 5 nM  $\alpha$ dA•T или дуплексы содержащие другое повреждение, 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl, 20 mM HEPES-KOH (pH 6,8), 0,05 mM DTT, 0,01% NP-40, 0,1 мг•мл<sup>-1</sup> BSA и либо 0,5 nM APE1, либо 5 nM ARP, или 20 nM wARP. Все анализы проводили при 37°C в течение 0-30 минут. Реакции останавливали добавлением 10 мкл раствора, содержащего 0,5% SDS и 20 mM ЭДТА, затем обессаливали в колонках, заполненном Sephadex G25 (Amersham Biosciences), уравновешенном в 7 M мочеvine. Обессоленные продукты реакции нагревали при 95°C в течение 3 минут и затем разделяли методом электрофореза 20% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (7 M мочеvine, 0,5×TBE). Гель сканировали с использованием Typhoon FLA-9500 Phosphor Screen (GE Healthcare, США) и анализировали с использованием программы Image Gauge v4.0 software.

*Получение антител к белку ARP и иммуноблотинг*

Анти-ARP поликлональное антитела были получены против полноразмерного рекомбинантного His-меченного ARP белка. Около 1 мг очищенного рекомбинантного ARP эмульгировали в равном объеме полным адьювантом Фрейнда и вводили подкожно кроликам. Вспомогательные инъекции антигена в неполном адьюванте Фрейнда проводились каждые две недели. У кролика брали образец крови до первой инъекции, а затем через 7 дней после последней четвертой инъекции для получения иммунной сыворотки. Через неделю после последней инъекции кровь собирали и иммунную сыворотку очищали иммуноаффинно посредством набора Protein A agarose Fast Flow resin (Sigma). В качестве первичных антител использовали очищенное поликлональное антитела к ARP, а в качестве вторичных антител – конъюгированный с пероксидазой хрена козлиные анти-кроличье иммуноглобулины.

Экстракты растений (12 мкг белка) фракционировали в 10%-ном ДСН-полиакриламидном геле и затем белки переносились из полиакриламидного геля на PVDF мембрану (Pierce) с использованием Bio-Rad Mini-transblot Cell (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкциями

производителя. После переноса белка, мембрану осторожно встряхивали в блокирующем растворе, содержащем 5% молока и 0,1% Tween-20 в 1x TBS (трис-буферный солевой раствор: 50 mM Трис-HCl (pH 7,5), 20 mM NaCl) в течение 1 часа при комнатной температуре. После удаления блокирующего раствора мембрану инкубировали в 10 мл аффинно-очищенном анти-ARP поликлональном антителе (разведение 1: 10000 в блокирующем растворе 0,1% Твин-20) в течение ночи при 4°C. Мембрану промывали пять раз в 10 мл буфере для промывки (1×TBS, 0,1% Tween-20) в течение 5 мин, каждый раз. После промывки, мембрану инкубировали в 10 мл растворе вторичных антител (разведение 1:20000 в блокирующем растворе с 0,1% Твин-20) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем мембрану промывали пять раз в 10 мл растворе для промывки в течение 5 мин каждый раз. Раствор субстрата готовилась путем смешивания равного объема раствора пероксида и раствора люминала/усилителя. Мембрану инкубировали в растворе субстрата в течение 2 мин в темноте и белковые полосы проявляли на пленке Kodak X-Omat.

*Определение чувствительности дикого типа и  $arp^{-}$  мутантных растений к ДНК повреждающим агентам*

Семена Col-0 дикого типа и  $arp^{-}$  мутантных растений высевали на среду MS, содержащей 1% сахарозы и 1% агара, затем стратифицировали в течение 48 ч при 4°C и проращивали в условиях длинного дня при 22°C. Для изучения чувствительности дикой и мутантных растений к действию ДНК повреждающих агентов в ходе прорастания семян, мы инкубировали 6-дневные проростки дикого и  $arp^{-}$  мутантного растения в среде, содержащей различные концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MMS и t-BuO<sub>2</sub>H. Рост растения оценивали через 6-7 дней инкубации в условиях нормального роста, как описано выше.

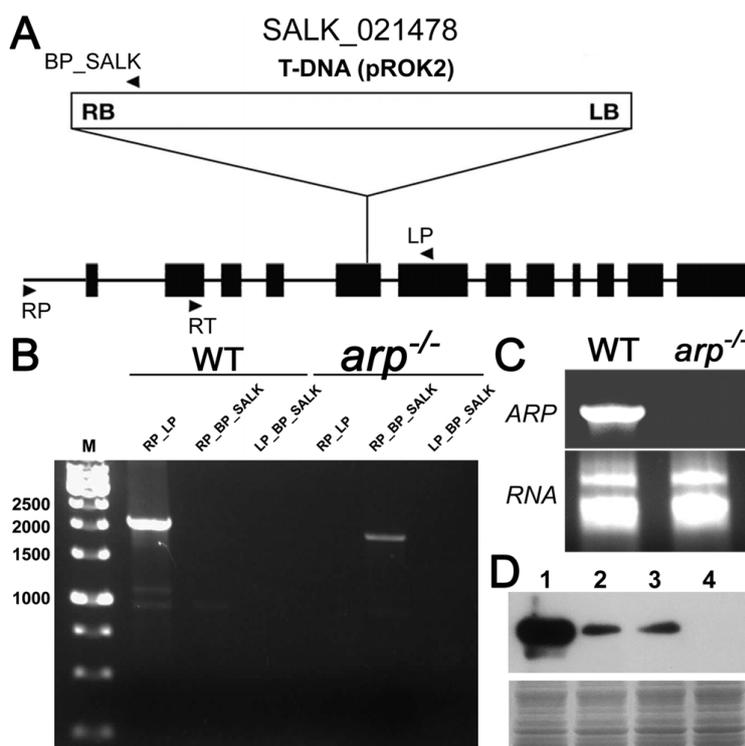
Чувствительность семян Col-0 дикого типа и  $arp^{-}$  мутантов к ДНК повреждающим агентам также измерялась в условиях непосредственного воздействия препаратов. Для этого семена высевали на чашки с 1/2 MS, содержащие 1% сахарозы и 1% агара с или без 25 ppm MMS или 18 ppm t-BuO<sub>2</sub>H или H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,1 и 1 mM), стратифицировали в течение 48 часов при 4°C и проращивали в условиях длинного дня при 22°C. Влияние агентов, на прорастание семян оценивали путем измерения скорости прорастания на среде с 1/2 MS, содержащей MMS, t-BuO<sub>2</sub>H или H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Перед посевом поверхность семян стерили-

лизовали 70% этанолом в течение 1 мин, затем 2% гипохлоритом в течение 5 мин и промывали пять раз стерильной деионизированной водой. Пятьдесят семян из растения дикого типа (C 1-0) и *arp*<sup>-/-</sup> мутантов были стратифицированы в течение 48 ч при 4°C и выращены в MS среде, содержащей 1% сахарозы и 1% агара с или без 25 ppm MMS, 18 ppm *t*-BuO<sub>2</sub>H и 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Рост растения оценивали через 17 дней инкубации в условиях нормального роста, как описано выше.

### Результаты исследования и их обсуждение

Известно, что *A. thaliana* с инактивированными генами *arp* (*arp*<sup>-/-</sup>), не отличаются от растений дикого типа и, в конечном счете, обеспечивают продукцию существенного количества жизнеспособных семян (Ishchenko A.A., 2006:

2564-69). Чтобы изучить возможную роль ARP в BER механизме растений, мы из имеющихся в коллекциях инсерционных мутантов арабидопсиса Института Salk выбрали несколько линий (SIGnAL database: <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>) (Рисунок 1А). Геномную ДНК и тотальную РНК от нескольких *arp*<sup>-/-</sup> мутантов анализировали с помощью ПЦР и ОТ-ПЦР с использованием праймеров специфичных к Т-ДНК и гену ARP. В результате были выявлены четыре растения гомозиготные по мутантному гену *arp*<sup>-/-</sup> (Рисунок 1В и С). Вестерн-блот-анализ общего белка из листьев и корней 15-дневных проростков из растений дикого типа и *arp*<sup>-/-</sup> с использованием кроличьих анти-ARP-поликлональных антител подтвердил отсутствие белка ARP у мутантных растений (Рисунок 1D, дорожка 4).



А – Схема гена ARP и место интеграции Т-ДНК;  
 В – Схема ПЦР геномной ДНК с праймерами специфичных к Т-ДНК вставки (BP\_salk), промоторному участку гена ARP (RP) и 6-му экзону гена ARP (LP);  
 С – RT-PCR с геноспецифическими праймерами (RT и LP);  
 D – Иммуноблотинг белковых экстрактов с анти-ARP поликлональными антителами.

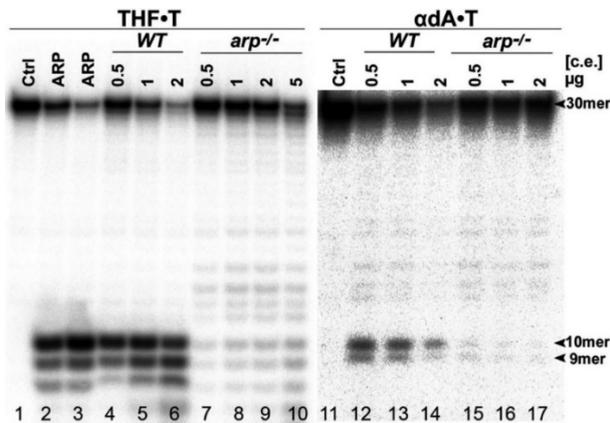
**Рисунок 1** – Анализ мутантных по гену ARP линий *A. thaliana* с Т-ДНК вставкой

Чтобы выяснить роль ARP в репарации АП-сайта и поврежденных оснований, мы определили ДНК-восстанавливающую активность в

бесклеточных экстрактах гомозиготного *arp*<sup>-/-</sup> мутантного растения. В соответствии с предыдущими наблюдениями бесклеточные экстрак-

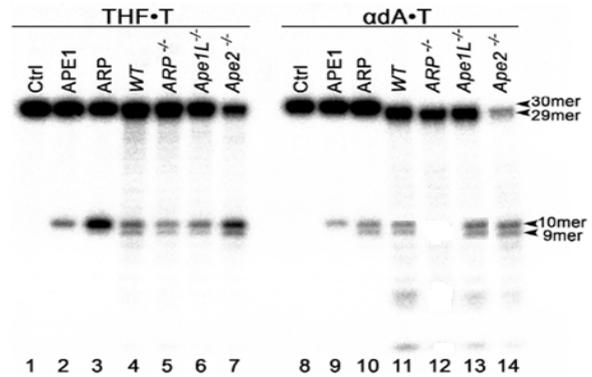
ты из *Arabidopsis* дикого типа (WT) эффективно расщепляли 30-мерный THF•T-дуплекс (Рисунок 2, дорожки 4-6). Напротив, экстракты из *arp*<sup>-/-</sup> растений не показали или проявляли очень низкую АП-эндонуклеазную активность (дорожки 7-9). Следует отметить, что увеличение концентрации белка в присутствии двухвалентных катионов приводит к обширной деградации ДНК неспецифическими 3'-5'-экзонуклеазами. Поэтому для определения NIR активности в растительных экстрактах мы использовали 10 мМ EGTA, хелатирующий агент избирательный для ионов Ca<sup>2+</sup>, для ингибирования неспецифической деградации ДНК. Инкубация 30-мерного αdA•T-дуплекса с различными концентрациями бесклеточных экстрактов из *Arabidopsis* дикого типа привела к устойчивому расщеплению ДНК и получению 10- и 9-мерных продуктов расщепления (дорожки 12-14).

Интересно, что увеличение количества WT экстрактов не привело к увеличению эффективности расщепления αdA•T дуплекса, наоборот, вместо этого привело к увеличению неспецифической деградации ДНК (дорожка 14). Как и ожидалось, экстракты из *arp*<sup>-/-</sup> мутантов не проявляли NIR активность на αdA•T дуплексе (дорожки 15-17). Тем не менее, инкубация THF•T и αdA•T дуплексов с экстрактами из *arp*<sup>-/-</sup> мутантов вызывала генерацию малого количества 10- и 9-мерных продуктов расщепления, что может быть связано либо с неспецифической 3'→5' экзонуклеазной активностью или наличием белков Ape1L и Ape2. В совокупности эти результаты свидетельствуют о том, что ARP является основной АП- и NIR- эндонуклеазой в *A. thaliana*.



**Рисунок 2** – Характеристика АП- и NIR-активности в бесклеточных экстрактах дикого и *arp*<sup>-/-</sup> мутантных растений *A. thaliana*

В последующих экспериментах мы определили ДНК-восстанавливающую активность в бесклеточных экстрактах гомозиготного WT, *arp*<sup>-/-</sup>, *ape1L*<sup>-/-</sup> и *ape2*<sup>-/-</sup> мутантных растениях.

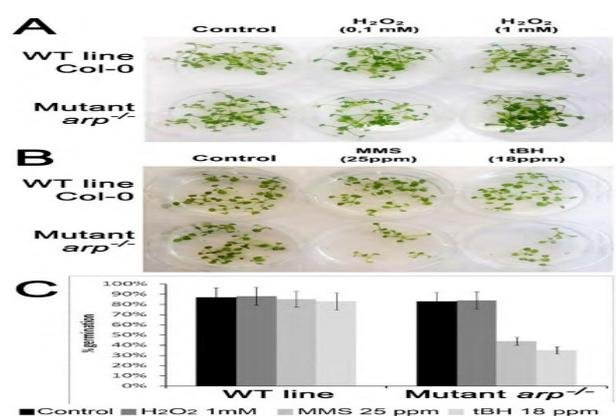
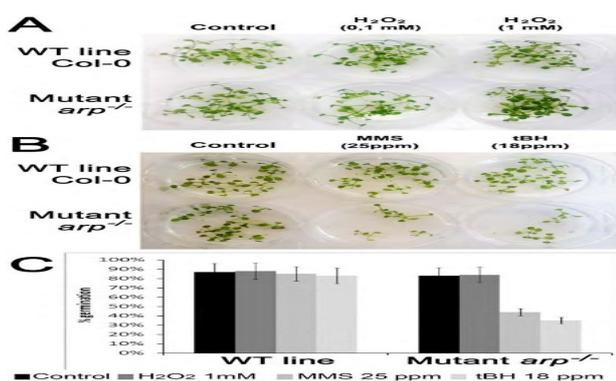
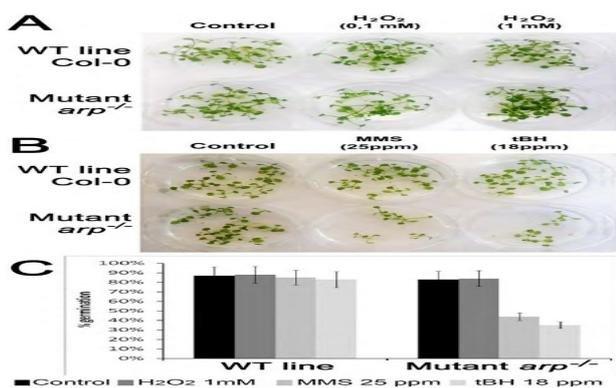


**Рисунок 3** – Характеристика АП- и NIR активности в бесклеточных экстрактах из WT, *arp*<sup>-/-</sup>, *ape1L*<sup>-/-</sup> и *ape2*<sup>-/-</sup> мутантных растений *A. thaliana*

Как видно из рисунка 3, бесклеточные экстракты WT, *arp*<sup>-/-</sup>, *ape1L*<sup>-/-</sup> и *ape2*<sup>-/-</sup> мутантных растений проявили АП-эндонуклеазную активность на 5'-<sup>(32)P</sup>-меченном 30 мерном THF•T дуплексе (Дорожки 4-7). Интересно отметить, что экстракты из *arp*<sup>-/-</sup> и *ape2*<sup>-/-</sup> мутантных растений показали низкую и высокую АП-эндонуклеазную активность (дорожки 5 и 7), соответственно, по сравнению с экстрактами из WT и *ape1L*<sup>-/-</sup> растений (дорожки 4 и 6). Кроме этого, экстракты из *arp*<sup>-/-</sup> мутантных растений не показали активность на αdA•T дуплексе (дорожка 12), по сравнению с другими экстрактами (дорожки 11, 13-14). Необходимо отметить, что *ape2*<sup>-/-</sup> экстракт проявлял значительный уровень АП-эндонуклеазной и NIR активности по сравнению с экстрактами из WT растений (дорожки 7 и 14), что указывает на возможную компенсационную сверх экспрессию ARP в *ape2*<sup>-/-</sup> мутантных растениях. В последующих экспериментах решили использовать гомозиготный мутант *A. thaliana arp*<sup>-/-</sup> для изучения роли ARP в обеспечении устойчивости растений к ДНК-повреждающим агентам.

Семена из WT и *arp*<sup>-/-</sup> растений высевали в агаризованную МС среду, содержащей ДНК-повреждающие агенты. Как показано на рисунке 4А и 4С, когда семена выращивали в среде содержащей H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, не наблюдалось существенная

разница в скоростях прорастания между растениями дикого типа и *arp*<sup>-/-</sup> растениями. Однако прорастание *arp*<sup>-/-</sup> растений было гораздо более чувствительным к MMS и t-BuO<sub>2</sub>H по сравнению с растениями дикого типа (Рисунок 4B и 4C). Эти результаты свидетельствуют о том, что дефицит ARP значительно повышает чувствительность растений *A. thaliana* к повреждениям ДНК, генерируемым MMS и t-BuO<sub>2</sub>H, но не к тем, которые генерируются H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Агаризованные среды MS содержали разные концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A), MMS и t-BuO<sub>2</sub>H (B). Эффективность прорастания семян на 17 день (C)

Рисунок 4 – Чувствительность гомозиготного *arp*<sup>-/-</sup> мутантного растения *A. thaliana* к действию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MMS и t-BuO<sub>2</sub>H

Для изучения чувствительности мутантных растений к повреждению ДНК в ходе прорастания семян, мы инкубировали 6-дневные проростки дикого и *arp*<sup>-/-</sup> мутантного растения в среде, содержащей различные концентрации H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MMS и t-BuO<sub>2</sub>H. Через 5-6 дней в среде с возрастающей концентрацией H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> не наблюдалась существенная разница в чувствительности к повреждению ДНК, вызванному H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, между растениями дикого типа и мутантом (Рисунок 5), хотя оба показали умеренное ингибирование роста при максимальной дозе H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 мМ).

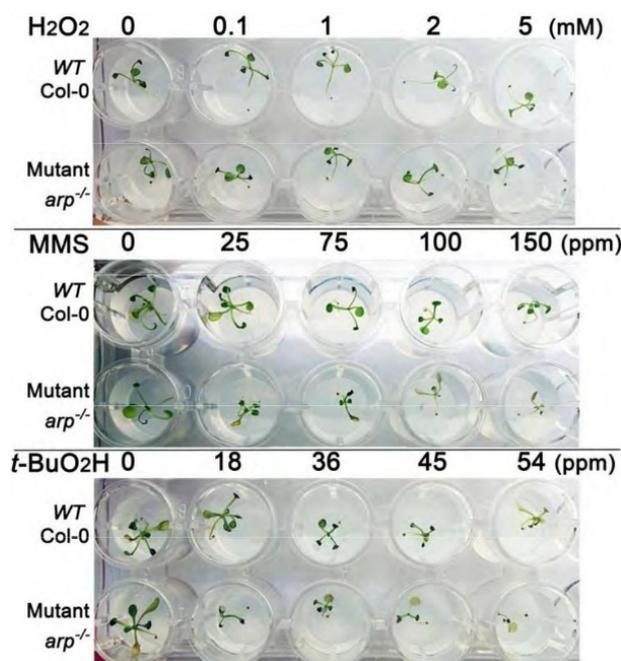


Рисунок 5 – Чувствительность гомозиготного *arp*<sup>-/-</sup> мутантного растения *A. thaliana* к действию H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MMS и t-BuO<sub>2</sub>H

С другой стороны, растения дикого типа и *arp*<sup>-/-</sup> растения проявили дифференциальную чувствительность к MMS и t-BuO<sub>2</sub>H, при этом мутантные растения оказались более чувствительными, чем растения дикого типа в указанном диапазоне концентрации ДНК-повреждающих агентов: 25-150 ppm для MMS и 18-54 ppm для t-BuO<sub>2</sub>H (Рисунок 5).

### Заключение

В данной работе мы исследовали роль ARP в обеспечении устойчивости растений к действию генотоксических агентов. Мы показали, что гомозиготный *arp*<sup>-/-</sup> мутант более чувстви-

телен к воздействию MMS и t-BuO<sub>2</sub>H, но не к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, по сравнению с растениями дикого типа, что указывает на то, что ARP-катализируемая NIR активность требуется для репарации АП-сайтов, генерируемых экзогенными факторами и специфическими окислительными повреждениями ДНК, индуцированными t-BuO<sub>2</sub>H в условиях *in vivo*. В этом отношении ARP напоминает бактериальную AP-эндонуклеазу Nfo, делеция которой также придает дифференциальную чувствительность мутантным по гену Nfo *E. coli* к ДНК-повреждающим агентам (Ishchenko A.A., 2006: 2564-69). Мы можем предположить, что ARP может индуцироваться в ответ на повреждение ДНК, вызванное экзогенными факторами. Так как NIR-дефицитные клетки чувствительны к воздействию t-BuO<sub>2</sub>H, но не к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, можно предположить, что органический гидропероксид индуцирует специфические типы повреждения ДНК, которые удаляются по NIR механизму. При восстановлении t-BuO<sub>2</sub>H переходными металлами образуются алкоксильные радикалы (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>CO•, которые, в свою очередь, инициируют перекисное окисление липидов (LPO). Интересно, что в отличие от H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, t-BuO<sub>2</sub>H продуцирует одноцепочечные разрывы ДНК в интактных клетках, но не в лизированных клетках, что указывает на то, что реакция с мембранными липидами участвует в формировании разрыва цепи ДНК. Действительно, высвобождение малонового диальдегида, продукта LPO, было обнаружено в клетках, инкубированных с t-BuO<sub>2</sub>H, но не с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Baker M.A., 1991: 563-72). Реактивные альдегиды, образуемые из LPO, генерируют множество высокотоксичных экзоциклических аддуктов ДНК (Gros L., 2003: 219-29). Кроме того, распад t-BuO<sub>2</sub>H приводит к образованию трет-бутоксильных и углеродсодержащих метильных радикалов. Последний радикал может атаковать

ДНК и продуцировать 8-метилгуанин (8meG) (Hix S., 1995:293-301). Остатки 8meG могут быть обнаружены *in vivo* в ДНК, выделенной из печени и желудка крыс, обработанных t-BuO<sub>2</sub>H (Hix S., 2000: P. 1056-4). *E.coli* 3-метиладенин ДНК-гликозилаза AlkA вырезает 8meG из дуплексной ДНК с высокой эффективностью из пар с аденином или тиминном, но делает это очень плохо, когда 8meG находится в естественном контексте против цитозина (Gasparutto D., 2002: 437-47). В клетках млекопитающих обнаружена активность 8meG-ДНК гликозилазы, что свидетельствует о существовании альтернативных путей восстановления t-BuO<sub>2</sub>H индуцированных поражений ДНК. Исходя из этих наблюдений, мы выдвигаем гипотезу о том, что повреждения ДНК, образующиеся органическим пероксидом в растениях, являются субстратами для ARP-катализируемого NIR-пути.

Ранее было показано, что AP-эндонуклеаза инициированный NIR механизм работает совместно с BER механизмом в репарации геномной ДНК от потенциально мутагенных и летальных повреждений (Ishchenko A.A., 2006: 2564-69). В настоящем исследовании мы показали, что NIR функция сохраняется у двудольных растений, которые содержат гены кодирующие гомологи ARP белка. Биохимические и генетические данные показывают, что NIR механизм является универсальным и сохраняется у всех эукариот, включая дрожжи, нематоды, млекопитающие и цветковые растения. В заключение мы предполагаем, что катализируемый AP-эндонуклеазой NIR-механизм играет существенную роль в поддержании целостности генома, несмотря на наличие множества универсальных ДНК гликозилаз, которые способны устранить широкий спектр поврежденных оснований ДНК.

### Литература

- 1 Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Ravanat J.L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features // *Mutat. Res.* – 2003. – Vol. 531. – P. 5-23.
- 2 Krokan H.E., Bjoras M. Base excision repair // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* – 2013. – Vol. 5. – P. a012583.
- 3 Ischenko A.A., Saparbaev M.K. Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage // *Nature.* – 2002. – Vol. 415. – P. 183-187.
- 4 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.
- 5 Gros L., Ishchenko A.A., Ide H., Elder R.H., Saparbaev M.K. The major human AP endonuclease (Ape1) is involved in the nucleotide incision repair pathway // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – Vol. 32. – P. 73-81.
- 6 Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A., Ellenberger T. DNA repair and mutagenesis // *ASM Press.* – 2006.

- 7 Vanyushin B.F., Ashapkin V.V. DNA methylation in higher plants: past, present and future // *Biochim Biophys Acta*. – 2011. – Vol. 1809. – P. 360-368.
- 8 He X.J., Chen T., Zhu J.K. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals // *Cell Res*. – 2011. – Vol. 21. – P. 442-465.
- 9 Zhu J.K. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases // *Annu. Rev. Genet.* – 2009. – Vol. 43. – P. 143-166.
- 10 Morales-Ruiz T., Ortega-Galisteo A.P., Ponferrada-Marin M.I., Martinez-Macias M.I., Ariza R.R., Roldan-Arjona T. Demeter and repressor of silencing 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2006. – Vol. 103. – P. 6853-6858.
- 11 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. U. S. A.* – 1994. – Vol. 91. – P. 3299-3303.
- 12 Cordoba-Canero D., Roldan-Arjona T., Ariza R.R. *Arabidopsis* ARP endonuclease functions in a branched base excision DNA repair pathway completed by LIG1 // *Plant J.* – 2011. – Vol. 68. – P. 693-702.
- 13 Joldybayeva B., Prorok P., Grin I.R., Zharkov D.O., Ishenko A.A., Tudek B., Bissenbaev A.K., Saparbaev M. Cloning and Characterization of a Wheat Homologue of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Ape1L // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – P. e92963.
- 14 Bissenbaev A.K., Ishchenko A.A., Taipakova S.M., Saparbaev M.K. Presence of base excision repair enzymes in the wheat aleurone and their activation in cells undergoing programmed cell death // *Plant Physiol. Biochem.* – 2011. – Vol. 49. – P. 1155-1164.
- 15 Ishchenko A.A., Deprez E., Maksimenko A., Brochon J.C., Tauc P., Saparbaev M.K. Uncoupling of the base excision and nucleotide incision repair pathways reveals their respective biological roles // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* – 2006. – Vol. 103. P. 2564-2569.
- 16 Baker M.A., He S.Q. Elaboration of cellular DNA breaks by hydroperoxides // *Free Radic Biol Med.* – 1991. – Vol. 11. – P. 563-572.
- 17 Gros L., Ishchenko A.A., Saparbaev M. Enzymology of repair of etheno-adducts // *Mutat. Res.* – 2003. – Vol. 531. – P. 219-229.
- 18 Hix S., Morais Mda S., Augusto O. DNA methylation by tert-butyl hydroperoxide-iron (II) // *Free Radic Biol Med.* – 1995. – Vol. 19. – P. 293-301.
- 19 Hix S., Kadiiska M.B., Mason R.P., Augusto O. In vivo metabolism of tert-butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin trapping and DNA methylation studies // *Chem Res Toxicol.* – 2000. – Vol. 13. – P. 1056-1054.
- 20 Gasparutto D., Dherin C., Boiteux S., Cadet J. Excision of 8-methylguanine site-specifically incorporated into oligonucleotide substrates by the AlkA protein of *Escherichia coli* // *DNA Repair (Amst)*. – 2002. – Vol. 1. P. 437-447.
- 21 Bradford M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding // *Anal. Biochem.* – 1976. – Vol. 72. – P. 248-254.
- 22 Murphy T.M., Belmonte M., Shu S., Britt A.B., Hatteroth J. Requirement for abasic endonuclease gene homologues in *Arabidopsis* seed development // *PLoS One*. – 2009. – Vol. 4. – P. e4297.
- 23 Foyer C.H., Noctor G. Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria // *Physiol. Plant.* – 2003. – Vol. 119. – P. 355-364.
- 24 Jaruga P., Dizdaroglu M. 8,5'-Cyclopurine-2'-deoxynucleosides in DNA: mechanisms of formation, measurement, repair and biological effects // *DNA Repair (Amst)*. – 2008. – Vol. 7. – P. 1413-1425.
- 25 Brooks P.J. 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)*. – 2008. – Vol. 7. – P. 1168-1179.

## References

- 1 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.*, vol. 91, pp. 3299-3303.
- 2 Baker M.A., He S.Q. (1991) Elaboration of cellular DNA breaks by hydroperoxides. *Free Radic Biol Med.*, vol. 11, pp. 563-72.
- 3 Bissenbaev A.K., Ishchenko A.A., Taipakova S.M., Saparbaev 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.*, vol. 49, pp. 1155-64.
- 4 Bradford M. M. (1976) A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.*, vol. 72, pp. 248-54.
- 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)*, vol. 7, pp. 1168-79.
- 6 Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Ravanat J.L. (2003) Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features. *Mutat. Res.*, vol. 531, pp. 5-23.
- 7 Cordoba-Canero D., Roldan-Arjona T., Ariza R.R. (2011) *Arabidopsis* ARP endonuclease functions in a branched base excision DNA repair pathway completed by LIG1. *Plant J.*, vol. 68, pp. 693-702.
- 8 Foyer C.H., Noctor G. (2003) Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant.*, vol. 119, pp. 355-64.
- 9 Friedberg E.C., Walker G.C., Siede W., Wood R.D., Schultz R.A., Ellenberger T. (2006) DNA repair and mutagenesis. ASM Press.
- 10 Gasparutto D., Dherin C., Boiteux S., Cadet J. (2002) Excision of 8-methylguanine site-specifically incorporated into oligonucleotide substrates by the AlkA protein of *Escherichia coli*. *DNA Repair (Amst)*, vol. 1, pp. 437-47.

- 11 Gros L., Ishchenko A.A., Ide H., Elder R.H., Saparbaev M.K. (2004) The major human AP endonuclease (Ape1) is involved in the nucleotide incision repair pathway. *Nucleic Acids Res.*, vol. 32, pp. 73-81.
- 12 Gros L., Ishchenko A.A., Saparbaev M. (2003) Enzymology of repair of etheno-adducts. *Mutat. Res.* vol. 531, pp. 219-29.
- 13 He X.J., Chen T., Zhu J.K. (2011) Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res.*, vol. 21, pp. 442-65.
- 14 Hitomi K., Iwai S., Tainer J.A. (2007) The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: implications for DNA damage recognition, removal, and repair. *DNA Repair (Amst)*, vol. 6, pp. 410-28.
- 15 Hix S., Kadiiska M.B., Mason R.P., Augusto O. (2000) In vivo metabolism of tert-butyl hydroperoxide to methyl radicals. EPR spin trapping and DNA methylation studies. *Chem Res Toxicol.*, vol. 13, pp. 1056-54.
- 16 Hix S., Morais Mda S., Augusto O. (1995) DNA methylation by tert-butyl hydroperoxide-iron (II). *Free Radic Biol Med.* vol. 19, pp. 293-301.
- 17 Ischenko A.A., Saparbaev M.K. (2002) Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage. *Nature*, vol. 415, pp. 183-87.
- 18 Ishchenko A.A., Deprez E., Maksimenko A., Brochon J.C., Tauc P., Saparbaev M.K. (2006) Uncoupling of the base excision and nucleotide incision repair pathways reveals their respective biological roles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, pp. 2564-69.
- 19 Jaruga P., Dizdaroglu M. (2008) 8,5'-Cyclopurine-2'-deoxynucleosides in DNA: mechanisms of formation, measurement, repair and biological effects. *DNA Repair (Amst)*, vol. 7, pp. 1413-25.
- 20 Joldybayeva B., Prorok P., Grin I.R., Zharkov D.O., Ishenko A.A., Tudek B., Bissenbaev A.K., Saparbaev M. (2014) Cloning and Characterization of a Wheat Homologue of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease Ape1L. *PLoS One*, vol. 9, pp. e92963.
- 21 Krokan H.E., Bjoras M. (2013) Base excision repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, pp. a012583.
- 22 Morales-Ruiz T., Ortega-Galisteo A.P., Ponferrada-Marin M.I., Martinez-Macias M.I., Ariza R.R., Roldan-Arjona T. (2006) Demeter and repressor of silencing 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 103, pp. 6853-58.
- 23 Murphy T.M., Belmonte M., Shu S., Britt A.B., Hatteroth J. (2009) Requirement for abasic endonuclease gene homologues in Arabidopsis seed development. *PLoS One*, vol. 4, pp. e4297.
- 24 Vanyushin B.F., Ashapkin V.V. (2011) DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochim Biophys Acta.*, vol. 1809, pp. 360-68.
- 25 Zhu J.K. (2009) Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu. Rev. Genet.*, vol. 43, pp. 143-66.