

МРНТИ 34.15.25; 31.27.00; 34.15.27

**Куанбай А.К.¹, Сmekенов И.Т.²,
Сапарбаев М.К.³, Ищенко А.А.⁴, Тайпакова С.М.⁵,
Бисенбаев А.К.⁶**

¹младший научный сотрудник, e-mail: kuanbai.aigerim93@gmail.com

²младший научный сотрудник, e-mail: smekenovizat@gmail.com

³PhD, профессор, директор по исследованиям, e-mail: murat.saparbaev@gustaveroussy.fr

⁴PhD., директор по исследованиям, e-mail: alexander.ishchenko@gustaveroussy.fr

⁵PhD, ведущий научный сотрудник, e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

⁶доктор биологических наук, профессор, академик НАН РК, главный научный сотрудник,
e-mail: Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

^{3,4}лаборатория репарации ДНК, Институт Густава Роззи, Франция, г. Вильжюиф

^{1,2,5,6}лаборатория молекулярной генетики Научно-исследовательского института проблем биологии и биотехнологии, Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы

ВЫДЕЛЕНИЕ И ХАРАКТЕРИСТИКА кДНК ГЕНА ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА) ПОЛИМЕРАЗЫ 2 *ARABIDOPSIS THALIANA*

Поли(АДФ-рибоза) полимеразы (PARP) катализируют синтез полимеров АДФ-рибозы, ковалентно-прикрепленные к акцепторным белкам, при этом донором остатков АДФ-рибозы выступает НАД⁺. Геном *Arabidopsis thaliana*, широко используемого модельного растительного организма, кодирует по меньшей мере три предполагаемых PARP фермента: AtPARP1 (At4g02390), AtPARP2 (At2g31320) и AtPARP3 (At5g22470). PARP растений являются структурно гомологичными к PARP белкам млекопитающих. Высокая степень консервативности на уровне аминокислотной последовательности между ферментами арабидопсиса и млекопитающих позволяет предположить, что в растениях PARP выполняет аналогичные функции как в животных системах. Однако в отличие от млекопитающих, значительно мало известно о поли-АДФ-рибозилировании в растениях.

Нами был выделен кДНК ген AtPARP2 с применением реакции обратной транскрипции (РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Осуществлена функциональная экспрессия AtPARP2 гистидиновым концом в *E. coli* и очищена никель аффинной хроматографией до гомогенного состояния. С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии установлена принадлежность рекомбинантного белка к семейству поли(АДФ-рибоза)-полимераз. Выявлено, что продуктом экспрессии гена является глобулярный белок массой 72,2 кДа, состоящий из 637 аминокислот (pI 5,92). На основе очищенного рекомбинантного AtPARP2 были получены поликлональные антитела к AtPARP2. AtPARP2 в присутствии олигонуклеотидного дуплекса с разрывом и НАД⁺ показал авто-поли(АДФ-рибозил)ирующую активность.

Ключевые слова: поли(АДФ-рибоза) полимеразы, PARP2, поли-АДФ-рибозилирование, НАД⁺ радикалы кислорода, *Arabidopsis thaliana*.

Kuanbay A.K.¹, Smekenov I.T.², Saparbayev M.K.³,
Ishchenko A.A.⁴, Taipakova S.M.⁵, Bissenbaev A. K.⁶

¹junior researcher, e-mail: kuanbai.aigerim93@gmail.com

²junior researcher, e-mail: smekenovizat@gmail.com

³PhD, professor, director of research, e-mail: murat.saparbaev@gustaveroussy.fr

⁴PhD, professor, director of research, e-mail: alexander.ishchenko@gustaveroussy.fr

⁵PhD, leading researcher, e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

⁶doctor of biological science, professor, academician of NAS of RK, chief researcher,
e-mail: Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

^{3,4}laboratory of DNA repair, Institute Gustave Roussy, Genomes and cancers Unit (UMR 8200), France, Villejuif Cedex.

^{1,2,5,6}Laboratory of Molecular genetics, Scientific Research Institute of Biology and Biotechnology Problems, Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty

Isolation and characterization of *Arabidopsis thaliana* poly (ADP-ribose) polymerase 2 cDNA

Poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs) catalyse the synthesis of polymers of ADP-ribose (PAR) covalently attached to acceptor proteins using nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) as a substrate. The genome of *Arabidopsis thaliana*, a widely used model plant organism, encodes at least three putative PARPs: AtPARP1 (At4g02390), AtPARP2 (At2g31320) and AtPARP3 (At5g22470). There is evidence that plant PARPs are structurally homologous to mammalian PARP proteins. The high degree of conservation at the amino acid level between *Arabidopsis* and mammalian forms of these enzymes suggests that PARP function is conserved between plants and animals. Plant PARPs also have enzymatic activities that are functionally homologous to mammalian PARPs. In contrast to mammalian systems, surprisingly very little is known about PARPs-catalyzed PARylation in plants.

Here, we isolated the AtPARP2 cDNA gene encoding the *Arabidopsis thaliana* Poly(ADP-ribose) polymerase 2 using the reverse transcription – polymerase chain reaction (RT-PCR). AtPARP2 with a 6xHis end was functionally expressed in *E. coli* and purified by nickel affinity chromatography. Amino acid sequencing of the putative recombinant protein by MALDI-TOF MS and its analysis using NCBI BLAST indicated that the enzyme belongs to poly (ADP-ribose) polymerases family. It was revealed that the product of gene expression is a globular protein with a mass of 72 kDa, consisting of 637 amino acids (pI 5.92). Purified AtPARP2 was used as an immunogen to generate rabbit polyclonal anti- AtPARP2 antibodies. A specific AtPARP2 reaction using an oligonucleotide duplex containing a chain break to activate the poly ADP-ribosylation process in the presence of NAD showed the auto-poly-ADP-ribosylation activity of recombinant proteins.

Key words: Poly(ADP-ribose) polymerase, PARP2, poly-ADP-ribosylation, NAD⁺, reactive oxygen species, *Arabidopsis thaliana*.

Қуанбай А.Қ.¹, Смекеңов И.Т.², Сапарбаев М.Қ.³,
Ищенко А.А.⁴, Тайпақова С.М.⁵, Бисенбаев А.Қ.⁶

¹кіші ғылыми қызметкер, e-mail: kuanbai.aigerim93@gmail.com

²кіші ғылыми қызметкер, e-mail: smekenovizat@gmail.com

³PhD, профессор, ғылыми-зерттеу директоры, e-mail: murat.saparbaev@gustaveroussy.fr

⁴PhD, профессор, ғылыми-зерттеу директоры, e-mail: alexander.ishchenko@gustaveroussy.fr

⁵PhD, жетекші ғылыми қызметкер, e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

⁶биология ғылымдарының докторы, профессор, ҚР ҰҒА академигі, бас ғылыми қызметкер,
e-mail: Amangeldy.Bisenbaev@kaznu.kz

^{3,4}ДНҚ репарациясы лабораториясы, Густав Роззи институты, Франция, Вильжюиф қ.

^{1,2,5,6}Биология және биотехнология мәселелері ғылыми-зерттеу институты молекулалық генетика лабораториясы, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.

Arabidopsis thaliana өсімдігінің поли(АДФ-рибоза) полимераза 2 кДНК генін прокариот жүйесінде клондау және сипаттау

Поли(АДФ-рибоза) полимераза (PARP) акцепторлы белоктарға ковалентті байланысқан АДФ-рибоза полимерлерінің синтезін катализдейді. Бұл процесте АДФ-рибоза қалдықтарының доноры ретінде НАД⁺ қолданылады. Кеңінен қолданылатын модельді өсімдік *Arabidopsis thaliana* геномы кем дегенде үш болжамды AtPARP1 (At4g02390), AtPARP2 (At2g31320) және AtPARP3 (At5g22470) PARP ферменттерін кодтайды. Өсімдіктер PARP-ы сүтқоректілердің PARP белогына құрылымы бойынша гомологты болып табылады. Арабидопсис пен сүтқоректілер ферменттері арасындағы аминқышқылдық реттілігі деңгейіндегі жоғары дәрежедегі консерватизмнің негізінде өсімдік PARP белоктары жануарлар Поли(АДФ-рибоза) полимеразаларына ұқсас қасиет көрсетеді деген болжам жасауға болады. Дегенмен сүтқоректілермен салыстырғанда, өсімдіктердің поли-АДФ-рибозилденуі туралы мәліметтер айтарлықтай аз.

Ұсынылып отырған жұмыста кері транскрипция және полимеразды тізбекті реакциялары көмегімен AtPARP2 қДНҚ гені бөлініп алынды. Гистидин соңды AtPARP2 *E. coli* жүйесінде функциональді экспрессияланып, никель аффинді хроматография көмегімен гомогенді күйде бөлініп алынды. MALDI-TOF масс-спектрометрия көмегімен рекомбинантты белоктың поли(АДФ-рибоза)-полимеразалар классына жататындығы анықталды. Геннің экспрессия өнімі 637 амин қышқылынан тұратын молекулалық массасы 72,2 кДа (рІ 5,92) глобулярлы белок екендігі көрсетілді. Тазаланып алынған рекомбинантты AtPARP2 белогының қолданылуымен поликлональді анти-AtPARP2 антиденелері алынды. АДФ субстраты ретінде НАД⁺ және поли-АДФ-рибозилдену процесін белсендіру үшін бір тізбекті үзілімін қамтитын олигонуклеотидтік дуплексі қосылған ортада AtPARP2 белогымен жүргізілген спецификалық реакция рекомбинантты белоктың авто-поли-АДФ-рибозилденуші белсенділігін көрсетті.

Түйін сөздер: Поли(АДФ-рибоза) полимераза, PARP2, поли-АДФ рибозилдеу, НАД⁺, оттегі радикалы, *Arabidopsis thaliana*.

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 генерируют радикалы кислорода (АФК) в качестве побочных продуктов метаболических реакций, которые в относительно большом количестве синтезируются в митохондриях, хлоропластах, пероксисомах и на плазматических мембранах. Всё это, в первую очередь, действует на клеточную ДНК, вызывая её повреждения на уровне изменения азотистых оснований, сахаро-фосфатного остова и разрывов ДНК (Cadet J., 2003: 5-23; Foyer C.H., 2003: 355-364). Если клетки неспособны обнаруживать и восстанавливать разрывы нитей ДНК, то это может привести к пагубным последствиям, таким как хромосомные aberrации, геномная нестабильность и гибель клеток. Сохранение целостности генома посредством восстановления повреждения ДНК имеет важное значение как в зародышевой, так и в соматических клетках (Weitzman M.D., 2014: 283-294; Papamichos-Chronakis M., 2013: 62-75; Ermolaeva M.A., 2014: 95-102; Schreiber V., 2006: 517-528).

Поли(АДФ-рибоза) полимераза (PARP) катализирует синтез полимеров АДФ-рибозы ковалентно прикрепленные к акцепторным белкам. При этом донором остатков АДФ-рибозы выступает НАД⁺ (Kim M.Y., 2005: 1951-1967). Использование биоинформационного подхода, позволило выявить ряд белков человека, имеющих очень высокую степень гомологии с каталитическим доменом PARP1. Все эти белки были объединены в семейство PARP, которое сейчас у млекопитающих насчитывается 18 представителей (Ame' J-C., 2004: 882-893). PARP белки

могут оказывать значительное влияние на различные клеточные процессы, такие как транскрипция, деление клеток, репарация ДНК и целостность теломеров (Schreiber V., 2006: 517-528). И только PARP1 и PARP2 активируются в ответ на повреждения ДНК (Woodhouse B.C., 2008: 1077-1086).

Известно, что PARP-катализируемое поли-АДФ-рибозилирование ядерных белков требуется для регуляции репарации ДНК и транскрипции в контексте хроматина в ядрах эукариотических клеток (Schreiber V., 2006: 517-528; Kraus W.L., 2013: 1109-1123; Caldecott K.W., 2007: 443-453). У млекопитающих на долю PARP1 приходится 80-90% синтеза поли(АДФ-рибозы) в клетке после повреждения ДНК (Shieh W.M., 1998: 30069-30072). В частности, PARP1-катализируемое авто-поли-АДФ-рибозилирование и модификация ядерных белков значительно усиливаются под действием ДНК повреждающих агентов (de Murcia G., 1994: 172-176). Ковалентно прикрепленный полимер АДФ-рибозы со сложной разветвленной структурой дает отрицательный заряд PARP-ферменту и гистонам, что приводит к ослаблению связи с ДНК и электростатическому отталкиванию этих белков от ДНК (Tanaka Y., 1984: 6579-6585, Satoh M.S., 1994: 7099-7106). Было высказано предположение, что при более низких уровнях повреждения клеточной ДНК, PARP регулируют репарацию ДНК путем рекрутирования белков в разрывы нитей и при более сильном повреждении ДНК, способствуют гибели клеток через процессы некроза, апоптоза (Schreiber V., 2006: 517-528; Caldecott K.W., 2014: 108-113).

Геном *Arabidopsis thaliana*, широко используемого модельного растительного организма, кодирует по меньшей мере три предполагаемых PARP фермента: AtPARP1 (At4g02390), AtPARP2 (At2g31320) и AtPARP3 (At5g22470)

(Briggs A.G., 2011: 372-80; Vainonen J.P., 2016: 713-723). Показано, что PARP растений являются структурно гомологичными к PARP белкам млекопитающих (Briggs A.G., 2011: 372-80; Lamb R.S., 2012: 175-89). Высокая степень консервативности на уровне аминокислотной последовательности между ферментами арабидопсиса и млекопитающих позволяет предположить, что в растениях PARP выполняет аналогичные функции как в животных системах. Помимо структурных сходств, PARP растений также обладают ферментативной активностью функционально гомологичными PARP ферментам млекопитающих (Briggs A.G., 2011: 372-80; Lamb R.S., 2012: 175-89). Как AtPARP1, так и AtPARP2 локализован в ядре и в присутствии ДНК с разрывами, прикрепляет остатки ADP-рибоз от NAD⁺ к себе (автомодификация) и к акцепторным белкам в условиях *in vitro* и *in vivo* (Briggs A.G., 2011: 360-1385). Подобно животным PARP ферментам, активность PARP растений ингибируется ингибиторами PARP фермента, такими как 3-аминобензамид (ЗАВ) и 3-метоксибензамид (ЗМВ), которые использовались во многих исследованиях (Briggs A.G., 2011: 360-1385). Интересно что, в противоположность к животным, в AtPARP2 арабидопсиса обладает более высокой ферментативной активностью, чем AtPARP1 (Briggs A.G., 2011: 360-1385). Нокаутные по генам PARP мутанты *Arabidopsis* жизнеспособны и имеют нормальный рост без каких-либо отклонений или аномальных побочных эффектов, которые затрудняли бы их использование для анализа физиологической роли поли-АДФ-рибозилирования в растениях. Это, в дополнение к химическим ингибиторам PARP, предоставляет возможность для понимания механизмов поли-АДФ-рибозилирования белков и их роли в различных биологических процессах на уровне всего организма.

В отличие от млекопитающих, значительно мало известно о поли-АДФ-рибозилировании

в растениях. Практически не известно о акцепторных белках поли-ADP-рибозы и белках, взаимодействующих с ADP-рибозой. В растениях не обнаружены поли-АДФ-рибозилированные белки, кроме гистонов и PARP фермента. Идентификация новых акцепторных белков поможет понять регуляторную функцию поли-АДФ-рибозилирования в развитии растений и стрессовых реакциях. Целью представленной работы является выделение и характеристика кДНК генов поли(АДФ-рибоза) полимеразы 2 *A. thaliana* и изучение авто-поли(АДФ-рибозил)ирующей активности полученного нами рекомбинантного белка.

Материалы и методы исследования

Объектом исследования явились нуклеиновые кислоты, выделенные из *A. thaliana* линии Col0 (растения дикого типа), относящейся к коллекции инсерционных мутантов SALK, полученные из Биологического ресурсного центра (*Arabidopsis* Biological Resource Center, <http://www.arabidopsis.org>, Огайо, США).

В ходе работы использовали клеточные линии: NovaXG Zappers (*F- mcrA Δ(mcrC-mrr) endA1 recA1 φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL nupG λ- tonA*) для наработки плазмидной ДНК и экспрессионный штамм Rosetta(DE3) (*F-ompT hDCN_B(r_Bm_B)gal dcm(DE3) pRARE (Cam^R)*) фирмы «Novagen» (Германия).

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

Таблица 1 – Последовательность олигонуклеотидов использованных в ходе работы

Название	Последовательность
ExoA	d (GTGGCGCGGAGACTTAGAGAA)
pExo19	d (pATTTGGCGCGGGGAATTCC)
RexT	d (CACCGCGCCTCTGAATCTCTTTAAACCGCGCCCTTAAGG)
AtPARP2 Dir	d (CAGCCATATGGCAAACAAGCTGAAGG)
AtPARP2 Rev	d (AGGCGGATCCTTAATGTTTGTAGTTG)

Олигонуклеотиды EhoA и pEho19 и комплементарная к ним цепь длиной 40 нуклеотидов Rex-T (таблица 1), использованные в качестве субстрата для активации активности приобретены из фирмы Eurogentec (Seraing, Бельгия).

5'-конец олигонуклеотидов метили с T4 полинуклеотид киназой в присутствии γ [³²P]-АТР. Отжиг меченых олигонуклеотидов с комплементарной цепью проводили в буфере содержащей 50 мМ KCl и 20 мМ HEPES-KOH (pH 7.5) при температуре 70°C в течение 3 минут и охлаждали до комнатной температуры в течение 2 часов. Полученный дуплекс обозначили как 5'-[³²P] EhoA•RexT^{Nick}.

Выделение тотальной РНК из листьев A. thaliana

Для выращивания растений *A. thaliana* линии Col0 (растения дикого типа) на твердых питательных средах использовали чашки Петри, содержащие питательную среду Мурасиге-Скуга с половинным содержанием солей (1/2 MS), 1% сахарозу и 1% агар. После раскладки семян чашки выдерживали 2 суток в темноте при +4°C. Затем растения выращивали в условиях длинного светового дня (≥ 14 ч) при 22°C. Через 14 дней растения использовали для выделения нуклеиновых кислот. 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 d H₂O. Концентрацию и качество выделенной РНК определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, США), агарозного гель-электрофореза. Образец хранился при -70°C.

Выделение мРНК

Объем полученного нами препарата тотальной РНК довели до 600 мкл dH₂O. Препарат инкубировали в течении 5 мин при 65°C в водяной бане, затем к препарату добавили 500 мкл двухкратного связывающего буфера (1 М NaCl, 20 мМ Tris pH 7.5, 2 мМ 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 (0.2 М NaCl, 10 мМ Tris pH 7.5, 1 мМ 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 довели объем водой до 200 мкл. Для осаждения поли-А РНК к раствору добавляли 40 мкл 5 М 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 dH₂O.

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 dH₂O. 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 MgCl₂, 50 мМ DTT), 0.5 мкл (или 20 ед.) RiboLock™ RNase Inhibitor, 2 мкл 10 мМ смеси dNTP (конечная концентрация 1 мМ), 1 мкл (или 200ед.) 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 на водяной бане. Реакцию останавливали прогреванием в течении 10 мин при 70°C. Полученный продукт хранили при -20°C.

Полимеразная цепная реакция

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 2XPCR Master mix (Fermentas, Латвия), содержавшие 0,625 единиц Taq ДНК полимеразы в буфере (750 мМ Tris HCl, pH 8,8, 200 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 % Tween 20), 50 мМ MgCl_2 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.

Индукция экспрессии *AtPARP2* гена под контролем T7 промотора в *E.coli* и очистка рекомбинантного белка

Для индукции экспрессии рекомбинантного белка под контролем T7 промотора в клетках *E. coli* несколько колоний трансформированных клеток выросших на чашках Петри с селективной средой инокулировали в 20 мл LB-среды с канамицином в концентрации 50 мкг/мл и культивировали при 37°C и интенсивной аэрации (180 об/мин на качалке) в течение ночи. Затем ночную культуру ресуспензировали в 1 л жидкой LB с канамицином. Рост бактериальной культуры проводили при 30°C до достижений оптической плотности $\text{OD}_{600} \sim 0,6$. При достижении необходимой плотности индукцию проводили в присутствии ИПТГ в конечной концентрации 0,2 мМ. Отбор проб для анализа проводили до и после индукции с ИПТГ в течение 12 часов (ночная культура) центрифугированием при 6000 об/мин в течении 7 мин при 4°C. Осажденные клетки ресуспензировали в зависимости от объема клеток в 10-15 мл буфера для хранения (20 мМ HEPES (pH-7,6) с 40 мМ NaCl) и хранили при -20°C.

Рекомбинантный белок с His-концом был очищен металлоаффинной хроматографией на ионах никеля (Ni^{2+}) с использованием NiTгар Chelating колонки объемом 1 мл и после элюирован из колонки с помощью имидазола в градиенте 20-500 мМ с регистрацией оптической плотности на длине волны 280 нм. Фракции, содержащие белок *AtPARP2* вносили в колонку NiTгар-Nerapin объемом 1 мл и элюировали в градиенте 50-600 мМ NaCl. Электрофорез белков, приготовленных кипячением образцов в 2х образцовом буфере, проводили в полиакриламидном геле по методу Лэммли (Laemmli U.K., 1970:680-5) в денатурирующих условиях.

Получение антител к белку *AtPARP2* и иммуноблоттинг

Анти-*AtPARP2* поликлональные антитела были получены против полноразмерного реком-

бинантного His-меченного PARP белка. Около 1 мг очищенного рекомбинантного PARP 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, США). В качестве первичных антител использовали очищенное поликлональные антитела к PARP, а в качестве вторичных антител – козлиные антикроличьи иммуноглобулины, конъюгированные с пероксидазой хрена. Для иммуноблоттинга приблизительно 50 мг свежей ткани листа или корня из 14-дневных проростков *A. thaliana* замораживали в жидком азоте и гомогенизировали в 250 мкл ледяном буфере для экстракции белков, содержащего 10 мМ Трис-НСl (pH 8,0), 100 мМ KCl, 15% глицерина, 1 мМ DTT, 0,01% NP-40, 1 мМ фенилметилсульфонилфторида, 5 мкг•мл⁻¹ лейпептина и 1 мкг•мл⁻¹ 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., 1976:248-254) перед нанесением на гель.

Экстракты растений (12 мкг белка) фракционировали в 10%-ном ДСН-полиакриламидном геле и затем белки переносились из полиакриламидного геля на PVDF мембрану (Pierce, США) 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 мМ Трис-НСl (pH 7,5), 20 мМ NaCl) в течение 1 часа при комнатной температуре. После удаления блокирующего раствора мембрану инкубировали в 10 мл аффинно-очищенном анти-*AtPARP* 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 (1xTBS, 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.

Результаты исследования и их обсуждение

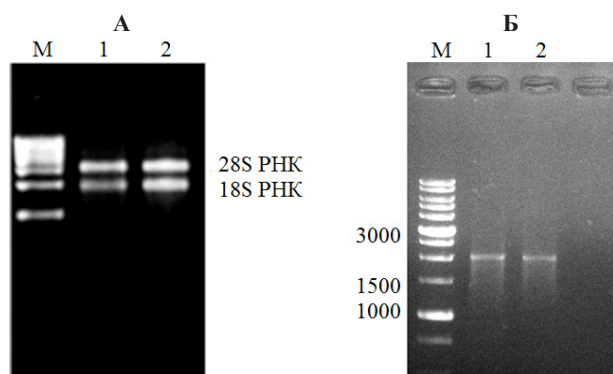
Нами был проведен компьютерный анализ нуклеотидной последовательности кДНК гена *AtPARP2* длиной 1914 пар нуклеотидов (номер NM_116472.4 в GenBank), кодирующего поли (АДФ-рибоза) полимеразу 2 *A. thaliana* – белок длиной 637 аминокислот с расчетной молекулярной массой 72,2 кДа и изоэлектрической точкой (ИЭТ) около 5,92.

1	ATGGCGAACAAGCTCAAAGTCGACGAACTCCGTTTAAACTCGCCGAGCGTGGACTCAGTACTACTGGAGTCAAAGCCGTTCTGGTGGAG M A N K L K V D E L R L K L A E R G L S T T G V K A V L V E	30
91	AGGCTTGAAGAGGCTATCGCAGAAGACACSTAAGAAGGAAGAAATCAAAGAGCAAGAGGAAAAGAAATCTTCTAATGATACTTATGAATCG R L E E A I A E D T K K E E S K S K R K R N S S N D T Y E S	60
181	AACAAATGATTGCAATTTGGCGAATTTCTGGGATGATTGTGAAGGAATTCGCTGAGGAAGCTATTAAGAGAGGCTTAGATACAACAGGA N K L I A I G E F R G M I V K E L R E E A I K R G L D T T G	90
271	ACCAAAAAGGATCTTCTTGAGAGGCTTTGCAATGATGCTAATAACGTTTCCAATGCACCAGTCAAATCCAGTAATGGGACAGATGAAGCT T K K D L L E R L C N D A N N V S N A P V K S S N G T D E A	120
361	GAAGATGACAACAATGGCTTTGAAGAAGAAAAGAAAGAGAAAATCGTAACCCGCGACAAAGAAGGGTGCAGCGGTGTTAGATCAGTGG E D D N N G F E E E K K E E K I V T A T K K G A A V L D Q W	150
451	ATTCCTGATGAGATAAAGAGTCACTACCATGTTTACAAAGGGGTGATGATGTTTATGATGCTATCTTAAATCAGACAAATGTGAGGGAT I P D E I K S Q Y H V L Q R G D D V Y D A I L N Q T N V R D	180
541	AATAATAACAAGTCTTTGTCTACAAAGTCTTAGAGTTCGGATAGTAAAAAGACATACATGTTTACACCAGATGGGGAAGAGTGGTGTG N N N K F F V L Q V L E S D S K K T Y M V Y T R W G R V G V	210
631	AAAGGACAAAGTAAGCTAGATGGCCTTATGACTCATGGGATCGTGGATAGAGATATTTACCAATAAGTTCAATGACAAGACAAGAAT K G Q S K L D G P Y D S W D R A I E I F T N K F N D K T K N	240
721	TATTGGTCTGACAGAAAAGGAGTTTATCCACATCCCAAGTCTTATACATGGCTCGAAATGGATTACGGAAAAGAGGAAAATGATTCACCG Y W S D R K E F I P H P K S Y T W L E M D Y G K E E N D S P	270
811	GTCATAATGATAATCCGAGTTCATCTCCGAAGTTAAACQTGAACAATCAAACATAGATACTCGGGTTCGCAAGTTCATCTCTCTTATA V N N D I P S S S E V K P E Q S K L D T R V A A K F I S L I	300
901	TGTAATGTCAGCATGATGGCACAGCATATGATGAAAATAGGATATAACGCTAACAAAATGCCACTCGGCAAGATAAGCAAGTCCACAATT C N V S M M A Q H M M E I G Y N A N K L P L G K I S K S T I	330
991	TCAAAGGGTTATGAAGTCTGAAGAGAATATCGGAGGTGATTGATCGGTATGATAGAACGAGGCTTGAGGAACTGAGTGGAGAGTCTTAC S K G Y E V L K R I S E V I D R Y D R T R L E E L S G E F Y	360
1081	ACAGTGATACCTCATGATTTTGGTTTAAAGAAAATGAGCCAGTTTGTATAGACACTCCTCAAAGTTGAAACAGAAAATGAAATGGTT T V I P H D F G F K K M S Q F V I D T P Q K L K Q K I E M V	390
1171	GAAGCATTAGGTGAGATTGAACTCGCAACAAAGTTGTTGTCGCTCGACCCGGGATTGCAGGATGATCSTTTATATTACTACCAGCAA E A L G E I E L A T K L L S V D P G L Q D D P L Y Y H Y Q Q	420
1261	CTAATGTGGTTTGACGCCAGTAGGAAATGATTCAGAGGAGTCTCTATGGTTGCTAATACATGGAGAACACTCATGCAAAAGACGCAT L N C G L T P V G N D S E E F S M V A N Y M E N T H A K T H	450
1351	TCGGGATATACGGTTGAGATTGCTCAACTATTTAGAGTTCGAGAGCTGTTGAAGCTGATCGATTCCAACAGTTTCAAGTTCGAAGAAC S G Y T V E I A Q L F R A S R A V E A D R F Q Q F S S S K N	480
1441	AGGATGCTACTCTGGCACGGTTCACGTCTCACTAACTGGGCTGGTATTTTATCTCAAGGTCTGCGAATAGCTCCTCCTGAAGCGCCTGTA R M L L W H G S R L T N W A G I L S Q G L R I A P P E A P V	510
1531	ACTGGTACATGTTTGGAAAAGGGTTTACTTTGCGGATATGTTCTCCAAGAGTGCAGAACTATGCTATGCCAACACTGGCGCTAATGAT T G Y M F G K G V Y F A D M F S K S A N Y C Y A N T G A N D	540
1621	GGCGTCTGCTCCTCTGCGAGGTTGCTTTGGGAGACATGAATGAACCTCTGTATTGAGATTATAACGCGGATAATCTACCCCGGGGAAAG G V L L L C E V A L G D M N E L L Y S D Y N A D N L P P G K	570
1711	CTAAGCASAAGGTGTGGGAAAACAGCACCAACCCATCAGAGGCTCAAACACTAGAGAGCGGTGTTGTTGTTCCACTTGGCAAACCA L S T K G V G K T A P N P S E A Q T L E D G V V V P L G K P	600
1801	GTGGAACGTTTCATGCTCCAAGGGATGTTGTTGTACAACGAATATATAGTCTACAATGTGGAACAAATCAAGATGCGTTTATGTGATCCAA V E R S C S K G M L L Y N E Y I V Y N V E Q I K M R Y V I Q	630
1891	GTCAAATTCAACTACAAGCACTAA V K F N Y K H #	637

указывает на стоп – кодон

Рисунок 1 – Нуклеотидная и предполагаемая аминокислотная последовательность поли (АДФ-рибоза) полимеразы 2 *A. thaliana*

На основании анализа нуклеотидной последовательностей мРНК (кДНК) – гена *AtPARP2* проведен расчет и осуществлен синтез олигонуклеотидных праймеров (таблица 1) для амплификации вышеуказанного гена *A. thaliana*. Тотальный препарат РНК выделяли из 14-дневных проростков растений тризол методом, как описано в разделе методы исследования. Электрофоретический анализ РНК на 0,8% агарозном геле показал наличие 28S рРНК и 18S рРНК (рисунок 2А). Отношения A260/A280 и A260/A230 были 1,9 и 2,0, соответственно. Это свидетельствует о высоком качестве препарата и низкой загрязненности изолированных образцов белковыми компонентами и вторичными метаболитами. Далее препарат РНК использовали для амплификации кДНК *AtPARP2* с применением сайт-специфических праймеров с помощью реакции обратной транскрипции (РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Условия проведения этих реакций указаны в разделе «Материалы и методы», а результаты приведены на рисунке 2Б. Из приведенной электрофореграммы видно, что главным продуктом амплификации является кДНК с ожидаемым размером около 1900 пар нуклеотидов, соответствующий длине кДНК гена *AtPARP2*, соответственно.



А – Препараты тотальной РНК: М – GeneRuler™ RNA Ladder. 1-2- суммарный препарат рибонуклеиновых кислот. Справа указано положение 28S рРНК, 18S рРНК.
Б – РТ-ПЦР продукты: М – маркерные ДНК, размеры которых указаны в нуклеотидах слева. 1 и 2 – продукты последовательных реакций РОТ и ПЦР.

Рисунок 2 – Препараты нуклеиновых кислот, выделенных из проростков *A. thaliana* и РОТ-ПЦР продукты

В следующих экспериментах, для функциональной экспрессии кДНК *AtPARP2* в прока-

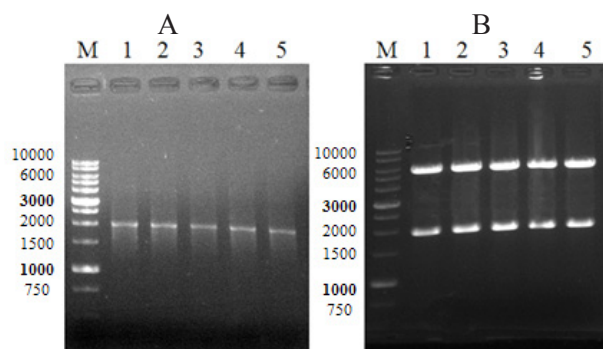
риотической системе нами был выбран вектор рЕТ28с (Novagen, Германия), который обладает необходимыми для экспрессии генов качествами: сильным, *lac* индуцибельным промотором бактериофага Т7, с 6хHis•tag последовательностью на С – конце, что позволяет аффинной очистке белкового продукта на основе никель-основанной хроматографии и подходящей для вставки емкостью, и простотой селекции. Для создания рекомбинантной ДНК-конструкции продукт ОТ – ПЦР *AtPARP2* кДНК клонировали в плазмиду рЕТ28с по сайтам рестрикции *NdeI* и *BamHI*. Полученную конструкцию рЕТ28с/*AtPARP2* трансформировали в *E.coli* штамма NovaXG Zappers для наработки рекомбинантной плазмиды. Селекцию клонов проводили на агаризованной среде LB с канамицином (50 мкг/мл). Далее плазмидная ДНК, выделенная в соответствии с протоколом набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific #K0503), была использована для тестирования клонов на наличие рекомбинантных плазмид, содержащих в своем составе ген *AtPARP2* с помощью рестриционного и ПЦР анализа. Результаты рестриционного анализа плазмиды представлены на рисунке 3А. Как видно из рисунка клоны, содержащие плазмиды рЕТ28с/*AtPARP2* при обработке эндонуклеазами рестрикции *NdeI* и *BamHI* на 1% агарозном геле дают четко выраженные две полосы с длиной около 5,4 т.п.н. и 1,9 т.п.н. По размеру первая полоса соответствовала длине плазмиды рЕТ28с без вставки, а вторая длине гена *AtPARP2*. При проведении ПЦР анализа с использованием ген-специфических праймеров и плазмидной ДНК, выделенных из трансформантов, фрагменты, обнаруженные в результате агарозного геля – электрофореза полностью соответствовали длине клонированного гена *AtPARP2* (рисунок 3Б).

В результате скрининга удалось идентифицировать 5 колоний, содержащих рекомбинантные плазмиды. Клоны были секвенированы в обоих направлениях. Определение нуклеотидной последовательности показало полное соответствие первичной структуры гена ранее опубликованной нуклеотидной последовательности гена *AtPARP2*.

Для идентификации продукта гена *AtPARP2* в клетках *E. coli* использовали систему экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7. Для синтеза поли (АДФ-рибоза) полимеразы 2 *A. thaliana* в бактериальных клетках нами был выбран экспрессионный штамм *E. coli* Rosetta (DE3), разновидность штамма К-12. Этот штамм содержал

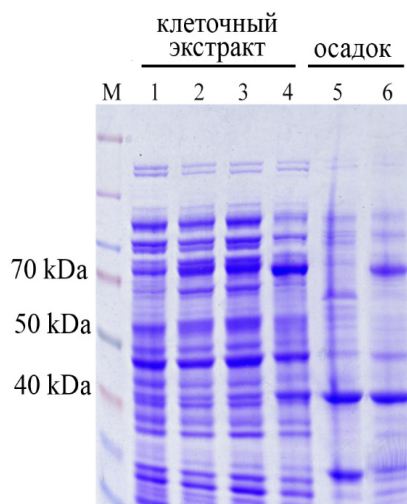
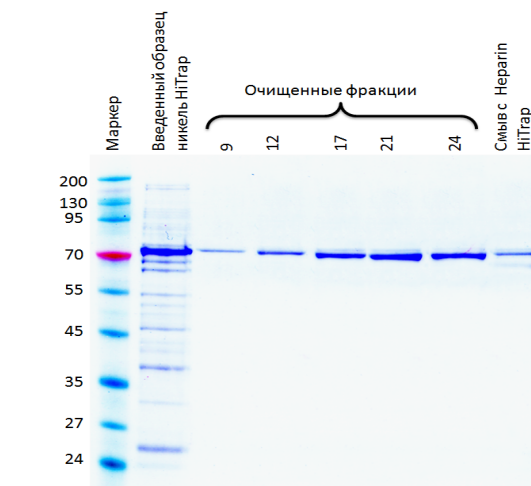
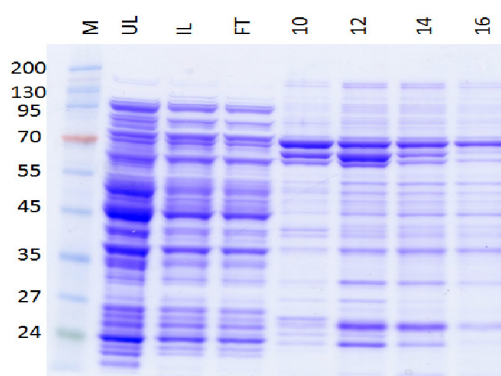
в хромосоме копию гена, кодирующий T7 РНК полимеразу под контролем *lacUV5*-промотора. Rosetta (DE3) создан на основе штамма BL21 *lacZY* для увеличения экспрессии эукариотических белков, содержащих редко используемые в *E. coli* кодоны. Этот штамм содержит гены тРНК к следующим кодонам: AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA в, устойчивой к хлорамфениколу, плазмиде.

Экспрессию гена *AtPARP2*, в трансформированных клетках *E. coli* штамма Rosetta (DE3), выявляли с помощью ДСН-ПААГ электрофореза и определения ферментативной активности. По результатам ДСН-ПААГ электрофореза удалось установить, что рекомбинантный штамм продуцирует белок с молекулярной массой 72 кДа, что соответствует молекулярной массе, предсказанной для *AtPARP2*. В отсутствии индуктора накопление белка с соответствующей молекулярной массой не происходило (рисунок 4), что свидетельствует об эффективной экспрессии данных генов.



А – ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды рЕТ28с/*AtPARP2*; Б – Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды рЕТ28с/*AtPARP2*; М: ДНК маркер; 1-4 клоны.

Рисунок 3 – Анализ клонов, трансформированных рЕТ28с/*AtPARP2* штаммов *E. coli* на наличие рекомбинантной плазмиды



М – Маркер; 1 – клеточный экстракт *E. coli*, несущий пустой вектор рЕТ28с; 2-4- клеточный экстракт *E. coli* несущий рЕТ28с/*AtPARP2* после 12 часов индукции с ИПТГ

Рисунок 4 – Экспрессия кДНК гена *AtPARP2* в *E. coli*

А – Очистка на Ni-NTA матрице для белков, содержащих гистидиновую метку. М – белковый маркер, размеры которых указаны в кДа слева. UL – Неиндуцированный клеточный лизат. IL – Индуцированный клеточный лизат. FT – Проскок через колонку NiTгар; 10-16 – Очищенные фракции белка. Б – Дополнительная очистка на гепариновой колонке для ДНК-связывающихся белков.

Рисунок 5 – Аффинная хроматография экстракта клеток *E. coli*, экспрессирующих *AtPARP2*-His₆ белок

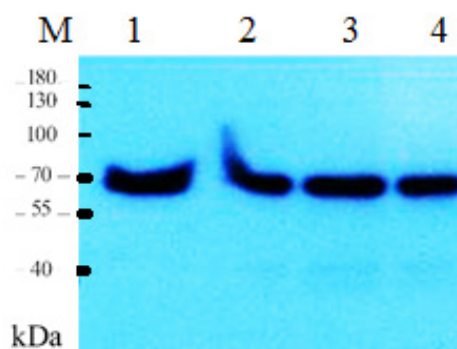
Так как для экспрессии кДНК поли (АДФ-рибоза) полимеразы 2 *A. thaliana* в *E.coli* был выбран вектор рЕТ28с с 6хHis•tag последовательностью на С-конце, экспрессированный рекомбинантный белок содержал шесть идентичных гистидиновых остатков на С-конце, которые действовали как сайт связывания металлов для очистки экспрессированных белков. В связи с этим, рекомбинантный белок с His-концом был очищен металлоаффинной хроматографией. Степень очистки полученного белка определяли с ДСН-ПААГЭ (Рисунок 4). Как видно из представленных данных (рисунок 4А и Б) рекомбинантный AtPARP2 белок очищен до гомогенного состояния и не содержал примесей других белков.

На следующем этапе для установления природы детектируемых белков мы провели масс-спектрометрический анализ (MS). Для этого очищенный с помощью аффинной хроматографии рекомбинантный белок разделили при помощи ДСН-ПААГ электрофореза. После окрашивания гелей кумасси G-250 полосы, располагавшиеся в зоне предполагаемого нахождения AtPARP2, вырезали и отправили на анализ. Данные MS подтвердили, что рекомбинантный белок с высокой долей вероятности действительно является AtPARP2.

Для обнаружения белка AtPARP2 в растениях требуется получение специфических антител к данному ферменту. Для этого очищенный рекомбинантный белок AtPARP2 совместно с адьювантом Фрейнда ввели в кровотоки кролика. После серии иммунизации было отобрано необходимое количество крови, из которой выделена сыворотка, содержащая антитела к AtPARP2.

В последующих экспериментах для выявления AtPARP2 в корнях и листьях проростка арабидопсиса, семена выращивали 14 дней после стратификации и отделяли корень и листья. Затем экстрагировали белок и белки фракционировали с помощью ДСН-ПААГЭ. Далее переносили белки из полиакриламидного геля на PVDF мембрану и инкубировали ее с поликлональными антителами к AtPARP2. При этом хроматографически очищенные рекомбинантные AtPARP2 использовали в качестве контроля (рисунок 6, дорожка 1).

Как видно из рисунка 6, анти- AtPARP2 антитела выявили AtPARP2, как белковую полосу с молекулярной массой приблизительно 70 кДа. Эти данные свидетельствуют о том, что AtPARP2 присутствует в тканях растений арабидопсиса.



Рекомбинантный очищенный белок AtPARP2. 2- Клеточный экстракт выделенный с корневой системы *A. thaliana*. 3- Клеточный экстракт выделенный с листьев *A. thaliana*. 4- Клеточный экстракт выделенный с целого растения *A. thaliana*

Рисунок 6 – Анализ специфичности анти-AtPARP2 поликлональных антител

PARP является мультифункциональным ферментом, состоящим из трех доменов: ДНК-связывающего, аутомодифицирующего и каталитического (Zhang F., 2013: 11348–11357). Структура домена аутомодификации не очень хорошо изучена. Анализ его первичной структуры показал, что этот домен содержит несколько остатков глутаминовой кислоты, которые вовлекаются в процесс аутомодификации, т.е. поли-АДФ-рибозилирования самого PARP фермента. Известно, что PARP в поли-АДФ-рибозилированной форме связывается с разрывами ДНК и привлекает белковую машину репарации ДНК в места повреждения ДНК (Hinz J.M., 2010: 4646–4651; Odell I.D., 2011: 4623–4632). Обладает ли очищенный нами рекомбинантный AtPARP2 аутомодифицирующей активностью? Для ответа на этот вопрос нами были проведены специальные эксперименты с использованием олигонуклеотидного дуплекса, содержащий разрыв цепи (активирующая ДНК) необходимый для активации поли-АДФ-рибозилирования. Для этого 40 нМ олигонуклеотидного дуплекса инкубировали в присутствии 5 мкМ AtPARP2 с добавлением 1 мкМ НАД+ в качестве субстрата в течение 30 мин и реакцию остановили добавлением стоп буфера (7,5 М мочевины, 0,33% ДСН, 10 мМ ЭДТА, бромфеноловый синий) в соотношении 1:1. Продукты реакции были фракционированы с помощью ДСН-ПААГ электрофореза. Далее белки из полиакриламидного геля перенесли на PVDF мембрану и инкубировали ее с поликлональными антителами к AtPARP2.

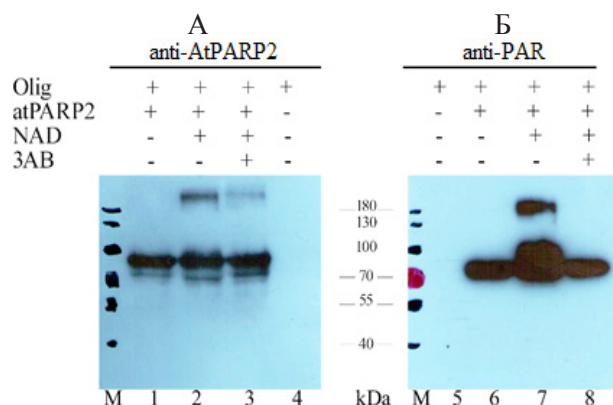


Рисунок 7 – Анализ авто поли(АДФ-рибозил)ирующей активности AtPARP2

Как видно из рисунка 7А, анти- AtPARP2 антитела выявили рекомбинантный AtPARP2, как белковую полосу с молекулярной массой приблизительно 70 кДа как в присутствии, так и в отсутствии активирующей ДНК. Однако, в присутствии активирующей ДНК и НАД⁺ на электрофореграмме появляется высокомолекулярный белок, что очевидно является поли-АДФ-рибозилированной формой фермента. В присутствии ингибитора PARP фермента – 3-аминобензамида (3-АВ) количество высокомолекулярного белка значительно снижается. Эти данные свидетельствует о том, что AtPARP2 аутомодифицируется в присутствии активирующей ДНК и НАД⁺. В последующих экспериментах проверили наличие поли-АДФ-рибозы в составе AtPARP2 с помощью Вестерн блоттинга с применением коммерчески доступных моноклональных антител к поли-АДФ-рибозе (PAR) (#ALX-804-220-R100 Enzo Life Sciences, США) (рисунок 7Б).

Как видно из рисунка 7Б в присутствии активированной ДНК AtPARP2 может катализировать реакцию авто-поли-АДФ-рибозилирования путем многократного переноса ADP-рибозных групп из НАД⁺ на себя, на что указывает дополнительные бэнды с высокомолекулярными белками в Вестерн блоттинге с моноклональными анти-PAR антителами. В присутствие

ингибитора PARP 3-АВ в дозе 5 мкМ, АДФ-рибозилирование atPARP2 значительно блокируется.

Необходимо отметить, хроматографически очищенный AtPARP2 частично АДФ-рибозилирован и в отсутствии, и в присутствии активирующей ДНК и 3-АВ, так как распознается анти-PAR антителами. Можно предположить, что очищенные AtPARP2 ауто-АДФ-рибозилированы до хроматографической очистки, т.е. во время экспрессии в *E. coli*.

Заключение

В результате проведенных работ нами был выделен *AtPARP2* кДНК ген методом ОТ-ПЦР и успешно экспрессирован в *E. coli* под контролем T7 промотора. Анализ ДСН-ПААГ показал, что AtPARP2 представляет собой основной белок, продуцируемый в *E. coli* с молекулярной массой 72,2 кДа, что соответствует массе белка предсказанной на основе аминокислотной последовательности. MALDI-TOF масс-спектрометрия предполагаемого рекомбинантного белка и его анализ с использованием NCBI BLAST показали, что фермент содержит предполагаемые консервативные домены присущие PARP2 *A. thaliana*. Для обнаружения белка AtPARP2 в растениях на основе очищенного рекомбинантного AtPARP2 были получены поликлональные антитела к AtPARP2.

Определение аутомодифицирующей активности рекомбинантный AtPARP2 с применением полученных нами поликлональных анти-AtPARP2 и коммерчески доступных моноклональных анти-PAR антител показало что AtPARP2 в присутствии активирующей ДНК может катализировать реакцию авто-поли-АДФ-рибозилирования. Ингибитор PARP фермента 3-АВ значительно ингибировал количество высокомолекулярных поли АДФ-рибозилированных белковых продуктов. Высказано предположение, о том что, AtPARP2 ауто-АДФ-рибозилируется во время экспрессии в *E. coli*.

Литература

- 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.
- Foyer C.H., Noctor G. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria // *Physiol. Plant.* – 2003. – Vol. 119. – P.355–364.
- Weitzman M.D., Weitzman J.B. What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity // *Cell Host Microbe.* –2014. -Vol.15. – №3. -P.283-294.

- Papamichos-Chronakis M., Peterson C.L. Chromatin and the genome integrity network // *Nat Rev Genet.* – 2013. – Vol. 14. – № 1. – P. 62–75.
- Ermolaeva M.A., Schumacher B. Systemic DNA damage responses: organismal adaptations to genome instability // *Trends Genet.* – 2014. – Vol. 30. – № 3. – P. 95–102.
- Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C., de Murcia G. Poly (ADP-ribose): novel functions for an old molecule // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2006. – Vol 7. – P. 517–528.
- Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal // *Genes Dev.* – 2005. – Vol. 19. – P. 1951–1967.
- Ame J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. The PARP superfamily // *BioEssays.* – 2004. – Vol. 26. – P.882–893
- Woodhouse B.C., Dianov G.L. Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery // *DNA Repair.* – 2008. – Vol. 7. – P. 1077–1086.
- Kraus W.L., Hottiger M.O. PARP-1 and gene regulation: progress and puzzles // *Mol. Aspects Med.* – 2013. – Vol. 34. – P. 1109–1123.
- Caldecott K.W. Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin // *DNA Repair.* – 2007. – Vol. 6. – P. 443–453.
- Shieh W.M., Ame J.C., Wilson M.V., Wang Z.Q., Koh D.W., Jacobson M.K., Jacobson E.L. Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers // *J.Biol.Chem.* – 1998. – Vol. 273. – P. 30069–30072.
- de Murcia G., Menissier de Murcia J. Poly(ADP-ribose)polymerase: a molecular nick-sensor // *Trends Biochem. Sci.* – 1994. – Vol. 19. – P. 172–176.
- Tanaka Y., Yoshihara K., Itaya A., Kamiya T., Koide S.S. Mechanism of the inhibition of Ca²⁺, Mg²⁺-dependent endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation // *J.Biol. Chem.* – 1984. – Vol. 259. – P. 6579–6585.
- Satoh M.S., Poirier G.G. and Lindahl T. Dual function for poly(ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage // *Biochemistry.* – 1994. – Vol. 33. – P. 7099–7106.
- Caldecott K.W. Protein ADP-ribosylation and the cellular response to DNA strand breaks // *DNA Repair.* – 2014. – Vol. 19. – P.108–113.
- Briggs A.G., Bent A.F. Poly(ADP-ribosyl)ation in plants // *Trends Plant Sci.* – 2011. – Vol. 16. – № 7. – P.372–80.
- Lamb R.S., Citarelli M., Teotia S. Functions of the poly(ADP-ribose) polymerase superfamily in plants // *Cell Mol Life Sci.* – 2012. – Vol. 69. – № 2. – P. 175–89.
- Briggs A.G., Bent A.F. Poly(ADP-ribosyl)ation in plants // *Trends in Plant Science.* – 2011. – Vol. 16. – № 7. – P.360-1385.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – № 5259. – P. 680-685.
- 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. 248-302.
- Vainonen J.P., Shapiguzov A., Vaattovaara A., Kangasjärvi J. Plant PARPs, PARGs and PARP-like Proteins // *Current Protein and Peptide Science.* – 2016. – Vol. 17. – P. 713-723
- Hinz J.M., Rodriguez Y., Smerdon M.J. Rotational dynamics of DNA on the nucleosome surface markedly impact accessibility to a DNA repair enzyme // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2010. – Vol. 107. – P. 4646–4651.
- Odell I.D., Barbour J.E., Murphy D.L., Della-Maria J.A., Sweasy J.B., Tomkinson A.E., Wallace S.S., Pederson D.S. Nucleosome disruption by DNA ligase III-XRCC1 promotes efficient base excision repair // *Mol. Cell. Biol.* – 2011. – Vol. 31. – P. 4623–4632.
- Zhang F., Wang Y., Wang L., Luo X., Huang K., Wang C., Du M., Liu F., Luo T., Huang D., Huang K. Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 Is a Key Regulator of Estrogen Receptor α -dependent Gene Transcription // *J. Biol. Chem.* – 2013. – Vol. 288. – № 16. – P. 11348–11357.

References

- Ame J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. (2004) The PARP superfamily. *BioEssays*, vol. 26, pp. 882–893.
- Briggs A.G, Bent A.F. (2011) Poly(ADP-ribosyl)ation in plants. *Trends Plant Sci.*, vol. 16 (7), pp.372–80.
- Briggs A.G., Bent A.F. (2011) Poly(ADP-ribosyl)ation in plants. *Trends in Plant Science.*, vol. 16 (7), pp.360-1385.
- 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.
- 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.
- Caldecott K.W. (2007) Mammalian single-strand break repair: mechanisms and links with chromatin. *DNA Repair.*, vol. 6, pp.443–453.
- Caldecott K.W. (2014) Protein ADP-ribosylation and the cellular response to DNA strand breaks. *DNA Repair*, vol. 19, pp. 108–113.
- de Murcia G., Menissier de Murcia J. (1994) Poly(ADP-ribose)polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem. Sci.*, vol. 19, pp. 172–176.
- Ermolaeva M.A., Schumacher B. (2014) Systemic DNA damage responses: organismal adaptations to genome instability. *Trends Genet.*, vol. 30 (3), pp. 95–102.

- Foyer C.H., Noctor G. (2003) Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiol. Plant*, vol. 119, pp. 355–364.
- Hinz J.M., Rodriguez Y., Smerdon M.J. (2010) Rotational dynamics of DNA on the nucleosome surface markedly impact accessibility to a DNA repair enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 107, pp. 4646–4651.
- Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L. (2005) Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal. *Genes Dev.*, vol. 19, pp. 1951–1967.
- Kraus W.L., Hottiger M.O. (2013) PARP-1 and gene regulation: progress and puzzles. *Mol. Aspects Med.*, vol. 34, pp. 1109–1123.
- Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, vol. 227 (5259), pp. 680–685.
- Lamb R.S., Citarelli M., Teotia S. (2012) Functions of the poly(ADP-ribose) polymerase superfamily in plants. *Cell Mol Life Sci.*, vol. 69 (2). – P.175–89.
- Odell I.D., Barbour J.E., Murphy D.L., Della-Maria J.A., Sweasy J.B., Tomkinson A.E., Wallace S.S., Pederson D.S. (2011) Nucleosome disruption by DNA ligase III-XRCC1 promotes efficient base excision repair. *Mol. Cell. Biol.*, vol. 31, pp. 4623–4632.
- Papamichos-Chronakis M., Peterson C.L. (2013) Chromatin and the genome integrity network. *Nat Rev Genet.*, vol. 14 (1), pp. 62–75.
- Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C., de Murcia, G. (2006) Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, vol 7, pp. 517–528.
- Shieh W.M., Ame J.C., Wilson M.V., Wang Z.Q., Koh D.W., Jacobson M.K., Jacobson E.L. (1998) Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J. Biol. Chem.*, vol. 273, pp. 30069–30072.
- Satoh, M.S., Poirier, G.G. and Lindahl, T. (1994) Dual function for poly(ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage. *Biochemistry*, vol. 33, pp. 7099–7106.
- Tanaka Y., Yoshihara K., Itaya A., Kamiya T., Koide S.S. (1984) Mechanism of the inhibition of Ca²⁺, Mg²⁺-dependent endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation. *J. Biol. Chem.*, vol. 259, pp. 6579–6585.
- Vainonen J.P., Shapiguzov A., Vaattovaara A., Kangasjärvi J. (2016) Plant PARPs, PARGs and PARP-like Proteins. *Current Protein and Peptide Science.*, vol. 17, pp. 713–723
- Weitzman M.D., Weitzman J.B. (2014) What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity. *Cell Host Microbe*, vol. 15 (3), pp. 283–294.
- Woodhouse B.C., Dianov G.L. (2008) Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery. *DNA Repair.*, vol. 7, pp. 1077–1086.
- Zhang F., Wang Y., Wang L., Luo X., Huang K., Wang C., Du M., Liu F., Luo T., Huang D., Huang K. (2013) Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 Is a Key Regulator of Estrogen Receptor α -dependent Gene Transcription. *J. Biol. Chem.*, vol. 288 (16), pp. 11348–11357.