

УДК: 577.24; 575.633.11

^{1,2}Б.С. Джолдыбаева, ^{1,2}З.Т. Тусумханова, ^{1,2}Ж.Д. Акишев,
^{1,2}М.К. Сапарбаев, ^{1,2}А.К. Бисенбаев*

¹НИИ проблем биологии и биотехнологии, Алматы, Казахстан

²Казахский Национальный университет имени аль-Фараби, Алматы, Казахстан

*e-mail: amangeldy.bissenbaev@kaznu.kz

Биохимическая характеристика АП-эндонуклеазы *Triticum aestivum*

С использованием tBLASTn поисковой системы базы данных NCBI по гомологии к АП-эндонуклеазе человека и арабидопсиса идентифицирован ген, кодирующий предполагаемую АП-эндонуклеазу *Triticum aestivum* (TaApe1L). Осуществлена функциональная экспрессия TaAPE1L с гистидиновым концом в *E. coli* и очищена. С использованием 5'-[P³²] – меченных олигонуклеотидных дуплексов, содержащих единственный тетрагидрофуран – аналог АП сайта, показано TaApe1L проявляет слабую АП-эндонуклеазную и 3' → 5' экзонуклеазную активность и предпочитает Mn²⁺ в качестве кофактора. Также показано, что увеличение времени инкубации сопровождается повышением активности фермента и добавление в реакционную смесь хелатора двухвалентных ионов – ЭДТА полностью подавляет АП-эндонуклеазную активность TaApe1L.

Ключевые слова: АП-эндонуклеазы, TaAPE1L, APE1, пшеница.

Б.С. Джолдыбаева, З.Т. Тусумханова, Ж.Д. Акишев, М.К. Сапарбаев, А.К. Бисенбаев

Triticum aestivum апури́н/апи́римиди́ндік эндонуклеаза ферментінің биохимиялық қасиеттерін талдау

NCBI деректер базасының tBLASTn іздеу бағдарламасын пайдалана отырып адам мен арабидопсисінің АП-эндонуклеазасына гомологиясы бойынша *Triticum aestivum* АП-эндонуклеаза ферментін (TaApe1L) кодтайтын ген анықталды. Бидай АП-эндонуклеаза ферментін кодтайтын кДНК ген КТ-ПТР көмегімен бөліп алынды. 6xHis соңды TaAPE1L *E. coli* жүйесінде экспрессияланып, никель-хелаттық хроматография көмегімен гомогенді күйде тазартылып алынды. АП сайттың жалғыз тетрагидрофуран аналогы бар 5'-[P³²] – таңбаланған олигонуклеотидтік дуплекстерді пайдалана отырып, TaAPE1L рекомбинантты белогының АП-эндонуклеазалық белсенділігі анықталып, металлдық кофактор ретінде (Mn²⁺) қажет екені анықталды. Сонымен қатар, инкубация уақыты өсуімен байланысты фермент активтілігін жоғарылап, эквивалентті иондар хелаторы ЭДТА TaApe1L белсенділігін толық тежейтіні көрсетілді.

Түйін сөздер: АП-эндонуклеаза, TaAPE1L, бидай.

B. Zholdybaeva, Z. Tsumkhanova, Z. Akishev, M. Saparbaev, A. Bissenbaev

Biochemical characterization of apurinic/aprimidinic endonuclease *Triticum aestivum*

The gene encoding putative AP-endonuclease of *Triticum aestivum* was identified by homology to human and Arabidopsis AP-endonucleases by application of tBLASTn NCBI database search tool. For the first time cDNA of the wheat AP-endonuclease gene was isolated by reverse transcription-PCR. Functional expression of TaAPE1L in *E. coli* was performed and the protein was purified with nickel-based affinity chromatography to homogenous state. Through use of 5'-[P³²] – marked oligonucleotide duplexes containing single tetrahydrofuran (analogue of AP-site) AP-endonuclease activity of TaAPE1L was shown. TaApe1L-catalyzed AP endonuclease activity increases depending on incubation time and that addition of EDTA in the reaction mixture completely blocks AP endonuclease activity of TaApe1L.

Keywords: AP-endonuclease, TaAPE1L, wheat.

Известно, что одним из ключевых и самым универсальным путем репарации повреждению отдельных нуклеотидов является эксцизионная репарация оснований (BER), которая инициру-

ется совместным действием ДНК – гликозилаз и АП – эндонуклеаз [1].

ДНК – гликозилазы катализируют N-гликозилазную реакцию. В результате реакции воз-

никает АП – сайт, которая на следующем этапе эксцизионной репарации служит субстратом для одной из АП – эндонуклеаз клетки. Их действие заключается в разрезании поврежденной цепи ДНК с 5'-стороны от АП-сайта. Вследствие чего образуется субстрат для 3'-фосфодиэстеразы, последующего фермента в эксцизионной репарации оснований [2].

Ранее нами впервые выделен кДНК ген АП-эндонуклеазы пшеницы с применением реакции обратной транскрипции (РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Показано, что кДНК АП-эндонуклеазы пшеницы (**TaAPE1L**) содержит одну рамку считывания из 368 аминокислот. Расчетная молекулярная масса составляет 41,3 кДа. Анализ аминокислотной последовательности показало, что **TaAPE1L богат основным аминокислотам** (Arg/Lys, 14.4%; pI = 7.47) [3].

Известно, что АП эндонуклеазы семейства Xth из *E.coli*, APE1 человека и АП-эндонуклеаза *Arabidopsis thaliana* (Arg) для их проявления каталитической активности требуют двухвалентные катионы в виде ионов Mg^{2+} [4]. Для изучения субстратной специфичности и кинетических характеристик нами проведена функциональная экспрессия гена **TaAPE1L** с гистидиновым концом в *E. coli* и очистка рекомбинантного фермента с помощью никель основанной аффинной хроматографии до го-

могенного состояния. При определении зависимости активности очищенной TaAPE1L от двухвалентных катионов использовали 5'-[P^{32}] – меченный олигонуклеотидный дуплекс содержащий единственный тетрагидрофуран (THF, стабильный аналог апуринового сайта). Как видно из рисунка 1, десятый нуклеотид начиная с 5'-[P^{32}] – меченого конца олигонуклеотидного дуплекса представлен виде THF. Под действием АП-эндонуклеаз вблизи поврежденного основания образуется односторонний разрыв, который при ПААГ электрофорезе в денатурирующих условиях с последующим автордиографированием образует 5'-[P^{32}] – меченый первичный продукт расщепления длиной 10 нуклеотидов (10-мер). Следовательно, активность АП-эндонуклеаз будут сопровождаться накоплением 10 – мерного 5'-[P^{32}] – меченого первичного продукта и уменьшением 5'-[P^{32}]-меченого исходного дуплекса ДНК. В качестве положительного контроля использовали очищенный препарат АП-эндонуклеазы человека (APE 1). Активность АП-эндонуклеаз регистрировали по появлению на автордиограмме ПААГ 10 – мерных 5'-[P^{32}]-меченых первичных продуктов расщепления.

Как видно из рисунка 1, 30 мерный THF•T содержащий 5'-[P^{32}]-меченый олигонуклеотид эффективно расщеплялся APE 1, приводя к об-

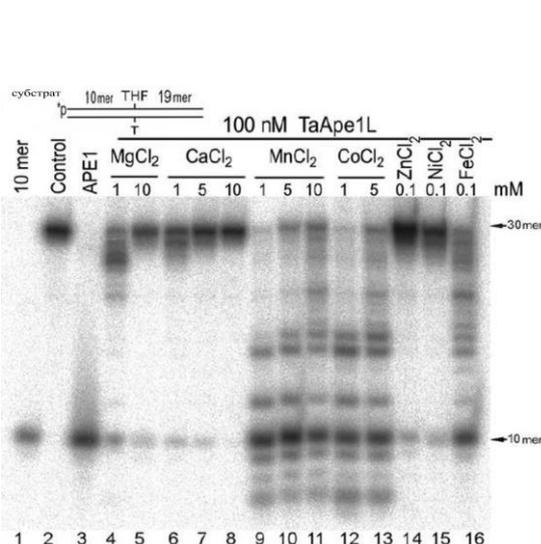


Рисунок 1 – Катионозависимая АП эндонуклеазная активность *TaAPE1L* пшеницы

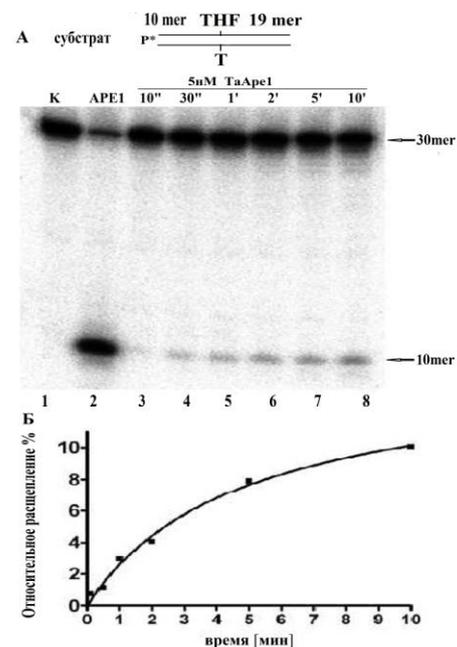


Рисунок 2 –Время зависимая АП эндонуклеазная активность *TaAPE1L* пшеницы

разованию 5'-[P³²]-меченого 10-мерного продукта (рисунок 1). В присутствии различных концентраций ионов Mg²⁺ и Ca²⁺, TaApe1L (100 nM) показала слабую АП-эндонуклеазную активность (дорожка 4-8). При этом более высокие концентрации Mg²⁺ и Ca²⁺ (5-10 мМ) сильно ингибировала активность TaApe1L (дорожка 5 и 8).

При более низкой концентрации Mg²⁺ и Ca²⁺, TaApe1L проявляет 3'→5' экзонуклеазную активность (дорожка 4 и 6). Высокие концентрации Mg²⁺ и Ca²⁺ значительно ингибирует 3'→5' экзонуклеазную активность фермента. Присутствие 0.1 мМ ZnCl₂ и NiCl₂ в реакционной среде не влияли на активность TaApe1L.

Эти данные указывают на то, что TaApe1L проявляет АП-эндонуклеазную и 3'→5' экзонуклеазную активность и предпочитает Mn²⁺, Co²⁺ и Fe²⁺ в качестве кофактора.

В последующих экспериментах, мы исследовали влияние хелатора двухвалентных ионов – ЭДТА на АП-эндонуклеазную активность

TaApe1L (рисунок 2). Как видно из рисунка 2, в присутствии ионов Mn²⁺ TaApe1L проявлял АП-эндонуклеазную активность. При этом внесение в реакционную смесь 1 и 5 мМ ЭДТА полностью подавляла активность TaApe1L.

Совокупность полученных нами результатов указывает на то, что TaApe1L представляет собой Mn²⁺-зависимую АП-эндонуклеазу, необходимой для репараций поврежденных азотистых оснований вызванных радикалами кислорода.

Изучение активности TaApe1L в зависимости от продолжительности времени инкубации, показала, что увеличения времени инкубации сопровождается повышением активности фермента (рисунок 3).

Для измерения кинетических параметров TaApe1, олигонуклеотидные дуплексы (0,1-100 нм) инкубировали с TaApe1 в стандартных условиях реакции. Мы измерили стационарные кинетические параметры репарационной реакции и рассчитали K_M, k_{cat} и k_{cat}/K_M. Как показано в таблице 1, TaApe1L проявляет слабую

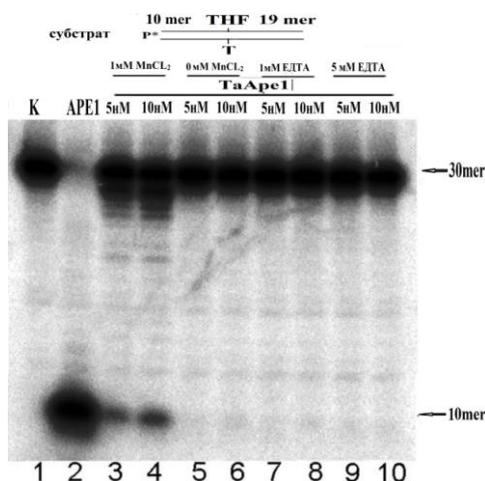


Рисунок 3 – Изучение металлосвязывающих свойств TaApe1L в присутствии ЭДТА

Таблица 1 – Сравнение кинетического параметра по отношению к ТНФ АП эндонуклеаз человека и пшеницы

Белки	APE1 человека			TaApe1L пшеницы			Разница k_{cat}/K_M TaApe1L по сравнению с APE1 человека
	K_M , нМ	k_{cat} , мин ⁻¹	k_{cat}/K_M , мин ⁻¹ ·М ⁻⁶	K_M , нМ	k_{cat} , мин ⁻¹	k_{cat}/K_M , мин ⁻¹ ·М ⁻⁶	
ДНК субстрат							24000
ТНФ•Т	0.87	15	17200	29	0.018	0.73	

АП-эндонуклеазную активность по сравнению с АРЕ1 человека. Значение K_{cat} / K_m ТаАРЕ1L в 4 раза меньше, по сравнению с АРЕ1 человека (таблица 1).

Возможно, ТаАРЕ1L кроме АП-эндонуклеазной активностью обладает одним или несколь-

кими вышеперечисленными каталитическими активностями в клетке. Изучение субстратной специфичности и кинетических характеристик по определению вышеперечисленные каталитические активности ТаАРЕ1L является предметом наших дальнейших исследований.

Литература

- 1 Джолдыбаева Б.С., Акишев Ж.Д., Сапарбаев М.К., Бисенбаев А.К. Выделение и характеристика кДНК гена апурин/апириимидиновой эндонуклеазы *Triticum aestivum*// Вестник КазНУ, серия биологическая. – 2013. – С. 268-271.
- 2 Saparbaev M., Laval J. 3,N4-ethenocytosine, a highly mutagenic adduct, is a primary substrate for E. coli double-stranded uracil-DNA glycosylase and human mismatch-specific thymine-DNA glycosylase // Proc. Natl. Acad. Sci. – 1998. – Vol. 95. – P. 8508-8513.
- 3 Ischenko A.A., Saparbaev M.K. Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage // Nature. – 2002. – Vol. 415. – P. 183-187.
- 4 Cordoba-Canero D., Roldan-Arjona T., Ariza R. Arabidopsis ARP endonuclease functions in a branched base excision DNA repair pathway completed by LIG1 // Plant J. – 2011. – №68. – P.693-702.
- 5 Zharkov D.O. Base excision DNA repair // Cell Mol. Life Sci. – 2008. – №65. -P.1544-1565
- 6 Sancar A., Lindsey-Boltz L., Unsal-Kacmaz K., Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints // Annu. Rev. Biochem. – 2004. – №73. – P.39-85.