

УДК. 602.6

Б.С. Джолдыбаева, Ж.Д. Акишев, М.К. Сапарбаев, А.К. Бисенбаев*
 НИИ проблем биологии и биотехнологии,
 Казахский Национальный университет имени аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан
 *e-mail: amangeldy.bissenbaev@kaznu.kz

Выделение и характеристика кДНК гена апурин/апириимидиновой 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). Впервые выделена кДНК гена АП-эндонуклеазы пшеницы с помощью ОТ-ПЦР. Осуществлена функциональная экспрессия TaAPE1L с гистидиновым концом в *E. coli* и очищена посредством никель-хелатной хроматографии до гомогенного состояния. С помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии установлена принадлежность рекомбинантного белка к АП-эндонуклеазам. С использованием 5'-[P³²] - меченных олигонуклеотидных дуплексов, содержащих единственный тетрагидрофуран – аналог АП сайта, выявлена АП-эндонуклеазная активность TaAPE1L.

Ключевые слова: АП-эндонуклеазы, TaAPE1L, пшеница

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

Triticum aestivum апурин/апириимидиндік эндонуклеаза ферментін (TaApe1L) кодтайтын кДНК генді бөліп алу және сипаттау

NCBI деректер базасының tBLASTn іздеу бағдарламасын пайдалана отырып адам мен арабидопсисің 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. MALDI-TOF масс-спектрометрия көмегімен рекомбинантты белоктың АП-эндонуклеаза ферментіне жататындығы анықталды. АП сайттың жалғыз тетрагидрофуран аналогы бар 5'-[P³²] - таңбаланған олигонуклеотидтік дуплекстерді пайдалана отырып, TaAPE1L рекомбинантты белогының АП-эндонуклеазалық белсенділігі анықталды.

Түйін сөздер: АП-эндонуклеаза, TaAPE1L, бидай.

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

Isolation and characterization of apurinic/apyrimidinic endonuclease gene's cDNA in *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. MALDI-TOF mass-spectrometric analysis showed relativity of the recombinant protein to AP-endonuclease. Through use of 5'-[P³²] - marked oligonucleotide duplexes containing single tetrahydrofuran (analogue of AP-site) AP-endonuclease activity of TaAPE1L was shown.

Keywords: AP-endonuclease, TaAPE1L, wheat.

Окислительное повреждение ДНК, вызванное активными формами кислорода (АФК) считается основным типом эндогенных клеточных повреждений. В настоящее время описано 80 разных типов повреждений ДНК, связанных с радикалами кислорода [1]. Если повреждения не будут устранены и тенденция накопления сохранится, это может привести к преждевременному старению и развитию хронических заболеваний у человека [2]. В настоящее время практически не исследованы механизмы репарации ДНК в растениях.

Наземные растения постоянно подвергаются воздействию ультрафиолетового облучения и других факторов окружающей среды, которые активно повреждают клеточную ДНК. Кроме того, они непрерывно генерируют активные формы кислорода (АФК) в процессе дыхания в митохондриях и в процессе фотосинтеза в хлоропластах. Окислительное повреждение ДНК, вызванные АФК, как полагают, являются основным типом эндогенных клеточных повреждений ДНК [3]. Окислительные повреждения оснований ДНК являются субстратом для двух пересекающихся путей репарации ДНК: эксцизионной репарации оснований (BER) и эксцизионной репарации нуклеотидов (NIR) [4]. В BER механизме репарации ДНК, ДНК-гликозилаза расщепляет N-гликозидную связь между

поврежденным основанием и сахарофосфатным остовом, в результате образуются апуриновые/апиридиновые (АП) сайты и/или одноцепочечные разрывы в ДНК [5, 6]. С другой стороны, в NIR механизме репарации ДНК, АП-эндонуклеазы расщепляют сахарофосфатный остов ДНК с 5'-стороны от АП-сайта в одной цепи с образованием одноцепочечного разрыва и нуклеотида с 5'-модифицированным концом [7].

В растениях репарация ДНК является не только фундаментальным клеточным процессом защиты клеток от повреждений, но также имеет большое значение для обеспечения правильной передачи генетической информации от одного поколения к другому. Хотя механизмы репарации ДНК хорошо изучены у бактерий, дрожжей, нематод и млекопитающих, практически ничего неизвестно о механизмах BER и NIR пути в растениях [8], за исключением арабидопсиса. Ген АР-эндонуклеазы (АРР) растений был клонирован только у арабидопсиса. АРР арабидопсиса был частично охарактеризован, и показана редокс-функция этого фермента на транскрипционных факторах человека [9]. В настоящее время в растениях многие гены, имеющие отношения к репарации ДНК остаются мало изученными. Практически ничего не известно о механизме репарации ДНК пшеницы и других злаков.

В связи с этим целью настоящей работы является клонирование и характеристика АП-эндонуклеазы из пшеницы.

Материалы и методы исследования

Выделение РНК и получение кДНК. На основе предполагаемого гена TaApe1L (каталожный номер - AK333560) сконструированы олигонуклеотиды для получения кДНК: прямой праймер - d(CTGCACTCATATGAAGCGCT TCTTCCAGCC), обратный праймер: d(CCAGGATCCTTAGCCGGAGCTCT TCGATTC). Сайты рестрикции для *NdeI* и *BamHI* подчеркнуты, соответственно. Тотальная РНК была выделена из 100 мг листьев 6-7 дневных проростков пшеницы мягкой сорта Казахстанская 10 при помощи тризол метода [10]. Выделение мРНК проводили путем обогащения мРНК на олиго-dT целлюлозе. Для синтеза кДНК в стерильную пробирку добавляли (в указанной последовательности): РНК (1-500 нг поли-А РНК), праймер (15-20 пмоль ген-специфичного праймера) и стерильную dH₂O. Затем реакционную смесь прогревали при 70°C в течение 5 минут для разворачивания вторичной структуры и охлаждали на льду. Далее, к смеси добавляли (в указанной последовательности): 4 мкл 5x реакционного буфера (250 mM Tris-HCl pH 8.3 при 25°C, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT), 0.5 мкл (20 ед.) RiboLock™ RNase Inhibitor, 2 мкл 10 mM смеси dNTP (конечная концентрация – 1 mM), 1 мкл (200 ед.) RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase. Конечный объем реакционной смеси составлял 20 мкл. Затем осторожно перемешивали и инкубировали смесь в течение 5 мин при 37°C. Реакцию проводили в течение 1.5 часов при 42°C в водяной бане. Реакцию останавливали прогреванием в течение 10 мин при 70°C. Полученный продукт хранили при -20°C. Для ПЦР использовали *Pwo* ДНК полимеразу (Roche Cat. No. 11644955001). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 1 мкл продукта обратной транскрипции, 2 мкл буфера для полимеразы, 4 мкл 25 mM MgCl₂, 0.5 мкл dNTP (10 mM), 0.5 мкл бычий сывороточный альбумин (1 мг/мл), 0.3 мкл *Pwo*-полимеразы, по 1 мкл прямого и обратного праймеров (10 пмоль), 8.7 мкл dH₂O. ПЦР-амплификацию проводили в следующем температурном режиме: денатурация - 94°C - 1 мин, 30 циклов амплификации при 94°C - 1 мин, 61°C - 30 сек, 72°C - 30 сек и заключительная элонгация при 72°C - 2 мин, 4°C 10 мин. Полученные продукты были разделены в 1% агарозном геле, и фрагмент ожидаемого размера был вырезан и элюирован при помощи набора Silica Bead DNA gel extraction kit (Thermo Scientific, Литва). Фрагмент ожидаемого размера клонировали в вектор pBluescriptII SK(+) с использованием Rapid Ligation kit (Thermo Scientific, Литва). Затем продукт лигирования трансформировали в компетентные клетки *E.coli* DH5α. Трансформированные колонии, несущие вектор со вставкой, были выявлены на селективной среде с ампицилином, и плазмидная ДНК была выделена при помощи GeneJET Plasmid Miniprep kit (Thermo Scientific, Литва). Наличие вставки в выделенных плаزمиде было подтверждено посредством ПЦР. Последовательность гена была определена при помощи секвенирования с применением пары праймеров M13 в обоих направлениях.

Экспрессия и очистка рекомбинантного белка. Для функциональной экспрессии кДНК TaApe1L была переклонирована в вектор pET28c с His•Tag последовательностью по сайтам *NdeI* и *BamHI*. В результате получили рекомбинантный вектор pET28c-*taape* с His•Tag

последовательностью на С-конце. Затем вектор рЕТ28с-*taape*-His•Tag был трансформирован в *E. coli* (DE3) Rosetta и канамицин-устойчивые колонии выращивали до $OD_{600nm} = 0.6$ при 37°C. Клетки собирали центрифугированием и ресуспендировали в 30 мл буфера, содержащего 20 mM HEPES-KOH pH 7.6, 1 mM ЭДТА и 1 mM фенилметилсульфонилфторида, а затем обрабатывали лизоцимом (0.5 мг/мл) 30 мин при комнатной температуре. После этого добавляли NaCl до концентрации 0.4 М. Затем проводили обработку ультразвуком (22 кГц) на приборе Sonopuls HD3100 (Bandelin, Германия) при температуре 0° в буфере 20 mM HEPES-KOH pH 7.6, 50 mM KCl. Время обработки составляло 30 сек, импульсы повторяли 10 раз. После обработки ультразвуком раствор центрифугировали 30 мин с ускорением 40 000xg при 4°C. Полученный супернатант разбавляли до 500 mM NaCl и 20 mM имидазола и наносили на хелатирующую колонку HiTrap Chelating HP column (Amersham Biosciences, GE Health). Собирали фракцию, не связанную с сорбентом, так как она содержала целевой белок. Элюированную фракцию затем наносили на колонку Hi Trap Heparin HP («GE Healthcare»), уравновешенную буфером 20 mM HEPES-KOH pH 7.6, 5%-ный глицерин, 40 mM NaCl. Белок элюировали в линейном градиенте 50-600 mM KCl, промывая буфером состава: 20 mM HEPES-KOH pH 7.6, 5%-ный глицерин, 0.6 М KCl. На каждом этапе выделения и очистки отбирали аликвоты для электрофоретического анализа присутствия фермента. Концентрацию фермента определяли на спектрофотометре.

Определение активности ДНК гликозилаз с помощью синтетических ДНК дуплексов. Стандартная реакционная смесь объемом 20 мкл для определения АП-эндонуклеазной активности содержала 10 nM of [³²P]-меченого ТНФ•Т олигонуклеотидного дуплекса ДНК, 20 mM HEPES-KOH pH 7.6, 50 mM KCl, 1 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 100 мкг/мл BSA, 0.1% NP-40 (неионный детергент) и 5 нМ TaApe1L белка. Реакционную смесь инкубировали в течение 5 минут при 23°C. Реакцию останавливали добавлением раствора содержащего 0.5% ДСН и 20 mM EDTA и обессоливали на колонке с Sephadex G25 (Amersham Biosciences, Швеция), уравновешенную буфером в 7М мочеvine. Обессоленные аликвоты анализировали с помощью 20%-ного денатурирующего ПААГ (7 М мочеvine, 0.5 X TBE). Гель сканировали с использованием Fuji FLA-3000 Phosphor Screen и анализировали с использованием программы Gauge V3.12.

Результаты и их обсуждение

С использованием поисковой системы tBLASTn в базе данных NCBI по гомологии к АП-эндонуклеазе человека (Ape1, каталожный номер - AAN02338) и арабидопсиса (AtApe1L, каталожный номер - At3g48425) идентифицировали кДНК гена, кодирующего предполагаемую АП-эндонуклеазу *Triticum aestivum* (TaApe1L, каталожный номер - AK333560).

```

APE1  ---MPKRGKKCAVAEDGDELRTPEAKKS-----KTAAKKNDKKAAGEGPALEDYEDPPDQKTSPPSKPATLKKICSWNV 70
AtApe1L MKRFFRFTEKENSFAKKEFLSPEKRDGDC-----DGVEEKNQNEESKREMTWNANSFLLRMRKNDWSQESKRFVSDFD 74
TaApe1L MKRFFRFVLRKDGSPAKRPAAGVATSDCAQCPAPTAADAGGDDGPPCEEPRRVTWNANSLLLRMRKNDWSAFCCQFVARVDP 80
      *..* * ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..*
APE1  GLRAWIKKGLDWVVEEAPDILCTQETKCS---ENKTPAEFOELEGLSHQYVSAFSDKKEGYSVGVLLSRQ--CFKRVSY 144
AtApe1L VITAEQVVRMPAAGCKGAPKKNHELSDDTKVLREEKQILRALSSPPFGNYGVWWSLADSK-YAGTALLVKKCKRPRKRVY 153
TaApe1L VTCVQEVVRMPAAGCKGAPKKNPELKDITSSREEKQTVLRALSSPFKDYRVWWSLSDSK-YAGTAVFMKK-BEERKRVSF 158
      * ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..*
APE1  CIG--EEEHQEGRVTVAEEDSEVLVTAIVPNAARG--LVRLEYRQRWDEAFRKEPLKGLASRKLPLVCGDLNVAAHEEID 220
AtApe1L NLDKLAASKHEEDGRVTVAEFEDELLNTYSPNNGWDEENAFQRRRKWDKRIVVEFLNKTSDKPLIWCGLNVSHHEIDV 232
TaApe1L NLDRTSSKHDADCRVTVVEFESFLLNTYVAPNNCKWKEENSFORRRKWDKRMLEEFVQQV--DKPLIWCGLNVSHHEIDV 236
      * ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..*
APE1  RNF-----KGNKNAGFTFOERQCFCEILOAVPLADSRHLYPNTPYAYTE-WTYMMNARSKNVGWRDDY 284
AtApe1L SHEPFFATAKLNQYVPPNKEDCGQPGFTFSERCRFGATIKKCRLVDAVRYLHKEQEMESCFWSGNGPIGKRYGKRMRIDY 312
TaApe1L SHEPFFSDAKLNQYVPPNKEDSGQPGFTLAERQRFGNILSQCKLVDAVRYLHKEQEMESCFWSGNGPIGKRYGKRMRIDY 316
      * ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..*
APE1  FLLSHSLLPALCDSKIRSK-----ALGSDHCFVTLTYLAL----- 318
AtApe1L FLVSEDLKDRIVSCKMHGRGIELEGFHSGDHCFVTLLELSKPSSEMEQNOVSN 364
TaApe1L FVWSEGLKDRIVSCEMHGFGIELEGFVSGSDHCFVLELSKFAAPEKSSG 368
      *..* * ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..* ..*

```

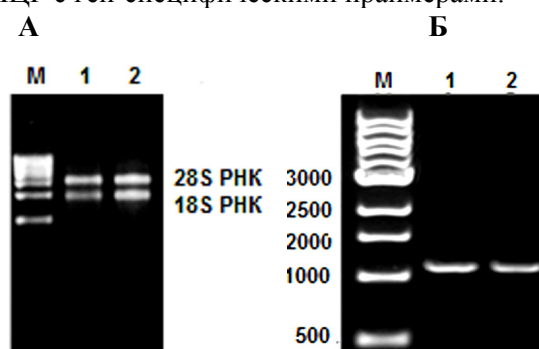
Звездочки (*), двоеточия (:) и точки (.) указывают на идентичные, консервативные и полуконсервативные аминокислотные участки, соответственно

Рисунок 1 – Сравнительное выравнивание аминокислотной последовательности TaApe1L с hApe1 человека и AtApe1L.

кДНК TaApe1L содержит одну рамку считывания из 368 аминокислот (рис. 1). Расчетная молекулярная масса составляет 41.3 кДа. Выравнивание аминокислотной последовательности

TaApe1L показало высокую гомологию с Ape1 человека (31% идентичность) и AtApe1L арабидопсиса (68% идентичность) (рис. 1). Эти результаты указывают на то, что TaApe1L принадлежит к семейству ExoIII апуриновых/апиримидиновых эндонуклеаз. В последующих экспериментах мы выделяли кДНК TaApe1L с помощью ОТ-ПЦР (см. раздел «Материалы и методы исследования»).

В качестве источника мРНК для реакции RT-PCR были выбраны листья 6-7-дневных проростков пшеницы. Для этого тотальный препарат РНК выделяли при помощи тризол метода, как описано в разделе методы исследования. Электрофоретический анализ РНК на 0.8% агарозном геле показал наличие 28S рРНК и 18S рРНК (рис. 2, А). Спектрофотометрический анализ концентрации РНК показал, что отношения A260/A280 и A260/A230 составляет 1,9 и 2,0, соответственно. Это свидетельствует о высоком качестве препарата РНК и низкой загрязненности изолированных образцов белковыми компонентами и вторичными метаболитами. Далее препарат РНК использовали в качестве матрицы для синтеза первой цепи кДНК с помощью ОТ-ПЦР с использованием 3'-праймера, содержащего олиго(dT18) последовательность. В последующем первую цепь кДНК амплифицировали с помощью ПЦР с ген-специфическими праймерами.

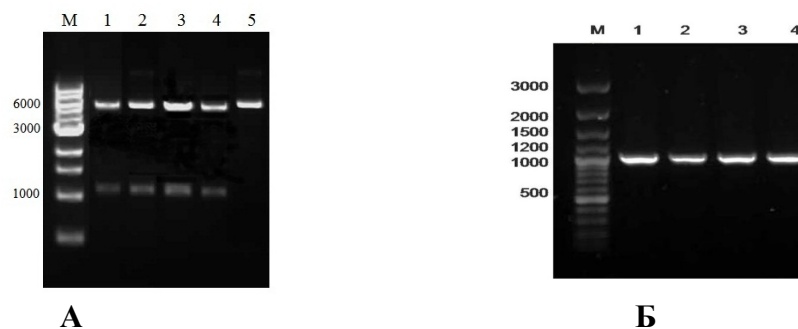


М – маркерные ДНК, А – препараты тотальной РНК, Б - амплификация кДНК TaApe1L.

Рисунок 2 – Амплификация кДНК TaApe1L с помощью ОТ-PCR

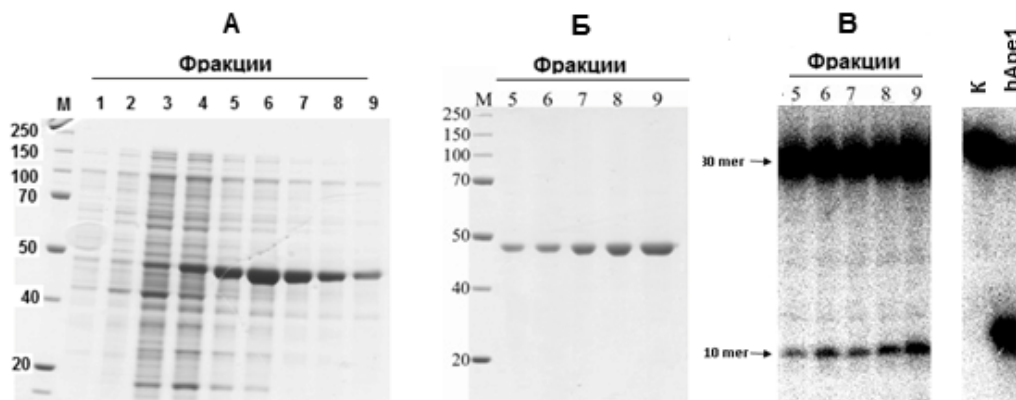
Из приведенной электрофореграммы (рис. 2, Б) видно, что главным продуктом амплификации является кДНК с ожидаемым размером около 1200 пар нуклеотидов, что соответствующий длине кДНК гена TaApe1L. Далее фрагмент кДНК лигировали с линейаризованным вектором pBluescriptII SK(+). Продукты лигирования pBluescriptII SK (+)/*taape* трансформировали в компетентные клетки *E.coli* DH5a, плазмиды выделенные из ампициллин устойчивых колоний секвенировали. В результате была получена полная нуклеотидная последовательность кДНК предполагаемого гена TaApe1L длиной 1116 пн, что полностью соответствует к предполагаемой открытой рамке считывания TaApe1L. Показано, что кДНК TaApe1L содержит одну рамку считывания из 368 аминокислот. Расчетная молекулярная масса составляет 41.3 кДа. Анализ аминокислотной последовательности показал, что белок TaApe1L богат основными аминокислотами (Arg/Lys, 14.4%; pI = 7.47).

Для функциональной экспрессии кДНК TaApe1L была переклонирована в вектор pET28c с His•Tag последовательностью по сайтам *NdeI* и *BamHI* и трансформирована в *E. coli* (DE3) Rosetta. Тестирование клонов на наличие рекомбинантных плазмид, содержащих в своем составе ген *taape* проводили с помощью рестрикционного и ПЦР анализа с использованием ген-специфических праймеров. Результаты тестирования проверяли электрофорезом в 1% агарозном геле (рис. 3, А). Как видно из рисунка клоны, содержащие плазмиды pET28c- *taape* -His•Tag, при обработке эндонуклеазами рестрикции *NdeI* и *BamHI* на 1% агарозном геле дают четко выраженные две полосы с длиной около 5.7 т.п.н. и 1 т.п.н. По размеру первая полоса соответствовала длине плазмиды pET28c без вставки, а вторая длине гена *taape*. 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 *taape* (рис. 3, Б). В результате скрининга удалось идентифицировать 5 колоний, содержащих рекомбинантные плазмиды.



А - Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды pET28c-*taape* -His•Tag; **Б** - ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды pET28c-*taape* -His•Tag; М: ДНК маркер; 1-5 клоны.
Рисунок 3 – Анализ клонов трансформированных с pET28c- *taape* -His•Tag штаммов *E.coli* на наличие рекомбинантной плазмиды.

Экспрессию гена *taape* в трансформированных клетках *E. coli* Rosetta (DE3) выявляли с помощью ДСН-ПААГ электрофореза. Для индукции синтеза ТаАРЕ1L в среду добавляли 0.1 мМ ИПТГ. Очистка полученного белка проводилась в двух этапах (см. раздел «материалы и методы исследования») Как видно из представленных данных (рис. 4, А и Б) рекомбинантный белок ТаАРЕ1L был очищен с помощью никель-хелатной хроматографии до гомогенного состояния и не содержит примесей других белков. Белок на электрофореграмме движется немного ниже маркерного белка молекулярной массой 50 кДа. В последующих экспериментах для установления природы детектируемых белков мы провели масс-спектрометрический анализ (MS). Для этого очищенный рекомбинантный белок разделили при помощи ДСН-ПААГ электрофореза, и после окрашивания гелей с куммасси полосы, располагавшиеся в зоне предполагаемого нахождения ТаАРЕ1L, вырезали и отправили на анализ. Данные MS подтвердили, что рекомбинантный белок с высокой долей вероятности действительно является ТаАРЕ1L.



А, Б – ДСН-ПААГ электрофорез белковых фракций, **В** – АП-эндонуклеазная активность белковых фракций

Рисунок 4 – Аффинная хроматография экстракта клеток *E.coli*, экспрессирующей белок ТаАРЕ-His₆.

Известно, что одним из ключевых и самым универсальным путем репарации повреждения отдельных нуклеотидов является эксцизионная репарация оснований (BER), которая инициируется совместным действием ДНК - гликозилаз и АП - эндонуклеаз [11].

ДНК - гликозилазы катализируют N-гликозилазную реакцию. В результате реакции возникает АП - сайт, который 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 [11]. Обладает ли очищенный нами рекомбинантный белок АП-эндонуклеазной активностью? Для анализа АП-эндонуклеазной активности ТаАРЕ1L нами были проведены специальные эксперименты с использованием 5'-[P³²] - меченных олигонуклеотидных дуплексов, содержащих единственный тетрагидрофуран (ТНФ, стабильный аналог апуринового сайта). В качестве источника фермента использовали очищенные до гомогенного состояния фракции 5-9. Очищенный препарат АП-эндонуклеазы человека (hАре 1) использовали в качестве положительного контроля. Активность АП-эндонуклеаз регистрировали по появлению на ПААГ 5'-[P³²] - меченых (длина 10 нуклеотидов) первичных продуктов расщепления и исходного 30-мерного субстрата (рис. 4, В).

Как видно из результатов, представленных на рисунке 4 В, все очищенные белковые фракции ТаАРЕ1L обладали АП-эндонуклеазной активностью. Однако по сравнению с hАре 1 активность ТаАРЕ1L была несколько слабей.

Известно, что АП-эндонуклеазы обладают несколькими каталитическими активностями: 1) АР-эндонуклеазной активностью, благодаря которой поврежденная цепь ДНК разрезается с 5'-конца обычного или восстановленного АП-сайта; 2) 3'-фосфодиэстеразной активностью, за счет которой вырезаются 3'-концевые блокирующие группы ДНК такие, как α,β -ненасыщенные альдегиды, 4-гидрокси-2-пентеналь (3'-dRP), 3'-фосфогликолят (3'-pg) или 3'-фосфат (3'-P); 3) 3'-тирозил-ДНК-фосфодиэстеразной активностью, приводящей к удалению ковалентно связанной топоизомеразы 1 (3'-Тор1); 4) эндонуклеазной активностью, благодаря которой фосфодиэфирная связь расщепляется с 5'-стороны от окисленных оснований ДНК, таких как 5,6-дигидроурацил и формамидопиримидины (FаруА и FаруG); 5) 3'→5' экзонуклеазной активностью, которая удаляет 3'-концевой нуклеотид.

Возможно, ТаАРЕ1L кроме АП-эндонуклеазной активности также обладает одним или несколькими вышеперечисленными активностями в клетке. Изучение субстратной специфичности и кинетических характеристик ТаАРЕ1L является предметом наших дальнейших исследований.

Литература

1. Cadet J., Douki T., Gasparutto D., Ravanat J.L. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features // *Mutat. Res.* - 2003. - №531. - P.5-23.
2. Hoeijmakers J. DNA damage, aging, and cancer // *N. Engl. J. Med.* - 2009. - №2009361. - P.1475-1485.
3. Cordoba-Canero D., Roldan-Arjona T., Ariza R. Arabidopsis ARP endonuclease functions in a branched base excision DNA repair pathway completed by LIG1 // *Plant J.* - 2011. - №68. - P.693-702.
4. 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.
5. Gros L., Sapparbaev M.K., Laval J. Enzymology of the repair of free radicals induced DNA damage // *Oncogene.* - 2002. - №21. - P.8905-8925.
6. Hitomi K., Iwai S., Tainer J.A. The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: implications for DNA damage recognition, removal, and repair // *DNA Repair (Amst.)* - 2007. - №6. - P.410-428.
7. Ischenko A.A., Sapparbaev M.K. Alternative nucleotide incision repair pathway for oxidative DNA damage // *Nature.* - 2002. - №415. - P.183-187.
8. Zharkov D.O. Base excision DNA repair // *Cell Mol. Life Sci.* - 2008. - №65. - P.1544-1565.
9. Babiychuk E., Kushnir S., Van Montagu M., Inze D. The Arabidopsis thaliana apurinic endonuclease Arp reduces human transcription factors Fos and Jun // *Proc. Natl. Acad. Sci.* - 1994. - №91. - P.3299-3303.
10. McRae E. Extraction of RNA // *Methods in molecular biology.* - 2007. - №353. - P.15-24.
11. Frosina G., Fortini P., Rossi O., Carrozzino F., Raspaglio G., Cox L.S., Lane D.P., Abbondandolo A., Dogliotti E. Two pathways for base excision repair in mammalian cells // *J. Biol. Chem.* - 1996. - №271. - P.9573-9578.

УДК 577.29

Д.В. Задубенко, О.А. Берилло*

Национальная нанотехнологическая лаборатория КазНУ им. аль-Фараби, г. Алматы, Казахстан *e-mail: devolia18@mail.ru

Особенности сайтов связывания miRNA с mRNA генов, участвующих в апоптозе

Проведен поиск сайтов связывания 18 miRNA в mRNA 41 генов участвующих в апоптозе клеток человека. Используя программу MirTarget отобраны сайты связывания со свободной энергией гибридизации miRNA с mRNA равной 90% и более. Установлено, что miR-566, miR-619-5p, miR-1268a, miR-1268b, miR-1273a, miR-1273c, miR-1273d, miR-1273e, miR-1273f, miR-1273g-3p, miR-1273h-5p, miR-1285-3p, miR-1285-5p, miR-1972, miR-5095, miR-5096, miR-5585-3p и miR-5585-5p имеют от 2 до 21 генов-мишеней. Выявлено упорядоченное