

ҚУАНБАЙ ӘЙГЕРІМ ҚҰРМАНБЕКҚЫЗЫ

6D060700 – «Биология» мамандығы бойынша философия докторы (PhD)
ғылыми дәрежесін алу үшін диссертациясына
АНДАТПА

***In vitro* және *in vivo* жағдайында *Arabidopsis thaliana* Поли (АДФ-рибоза) полимеразаларының ДНҚ тізбегі үзілістерінің сондарын ковалентті модификациялаудағы рөлін зерттеу**

Жұмыстың жалпы сипаттамасы. Диссертациялық жұмыс *in vitro* және *in vivo* жағдайында ДНҚ субстраттарының PARP-тәуелді ковалентті поли(АДФ-рибозил)денуін зерттеуге арналған.

Зерттеудің өзектілігі. Өсімдіктер топырақтағы орнын өзгерте алмайды, сондықтан үнемі қоршаған ортаның және генотоксинді агенттердің, соның ішінде ультракүлгін және иондаушы сәулелердің әсеріне ұшырайды. Сонымен қатар, өсімдіктер митохондрияларда, хлоропласттарда, пероксисомаларда және плазмалық мембраналарда салыстырмалы түрде көп мөлшерде синтезделетін метаболикалық реакциялардың қосалқы өнімдері ретінде үздіксіз оттегі радикалдарын (ROS) жасайды. Мұның бәрі, ең алдымен, жасушалық ДНҚ-ға әсер етіп, оның азотты негіздердің, қант-фосфатты қанқаның және ДНҚ-ның үзілуінің өзгеруі деңгейінде зақымдануын тудырады. Егер жасушалар ДНҚ тізбегінің үзілуін анықтай алмаса және түзете алмаса, бұл хромосомалық аберрациялар, геномдық тұрақсыздық және жасуша өлімі сияқты зиянды салдарға әкелуі мүмкін. ДНҚ зақымдануын қалпына келтіру арқылы геномның тұтастығын сақтау ұрық және сонымен қатар соматикалық жасушаларда да маңызды.

Поли(АДФ-рибоза) полимераза (PARP) акцепторлық ақуыздарға ковалентті байланысқан АДФ-рибоза полимерлерінің синтезін катализдейді. Бұл жағдайда НАД⁺ АДФ-рибоза қалдықтарының доноры қызметін атқарады.

Кеңінен қолданылатын модельдік өсімдік организмі *Arabidopsis thaliana* геномы кем дегенде үш болжамды PARP ферментін кодтайды: AtPARP1 (At4g02390), AtPARP2 (At2g31320) және AtPARP3 (At5g22470). Өсімдік PARP құрылымдық жағынан сүтқоректілердің PARP ақуыздарымен гомологты екендігі көрсетілген. Арабидопсис пен сүтқоректілер ферменттері арасындағы аминқышқылдарының реттілік деңгейінде жоғары дәрежедегі консерватизм, PARP өсімдіктерде жануарлар жүйесіндегі сияқты ұқсас функцияларды орындайды деп болжайды. Құрылымдық ұқсастықтардан басқа, өсімдік PARP сонымен қатар функционалды гомологты сүтқоректілердің PARP ферменттерімен ферментативті белсенділікті бөліседі. AtPARP1 және AtPARP2 екеуі де ядрода локализацияланған және никтелген ДНҚ болған жағдайда НАД⁺-дан АДФ-рибоза қалдықтарын өздеріне (өзін-өзі өзгерту) және акцепторлық ақуыздарға *in vitro* және *in vivo* қосады.

Сүтқоректілерден айырмашылығы, өсімдіктердегі PARP-дену туралы аз мәлімет бар. Поли(АДФ-рибоза) және АДФ-рибозамен әрекеттесетін ақуыздардың акцепторлық ақуыздары туралы аз мәлімет бар. Өсімдіктерде

гистондар мен PARP-дан басқа ПАРилденген ақуыздар табылған жоқ. Жаңа акцепторлық ақуыздарды анықтау стресс жауаптарында өсімдік дамуындағы ПАРилденудің реттеуші функциясын түсінуге көмектеседі.

PARP-тің ең танымал рөлдерінің бірі - олардың ДНҚ зақымдануы сенсоры ретіндегі қызметі. PARP1, атап айтқанда, SSB және DSB-ге ПАРилденген түрінде байланысады және ДНҚ зақымдану орындарына ДНҚ репарациялайтын ақуыз аппаратын тартады. Өсімдік PARP-тары генотоксинді стресске жасушалардың жауаптарында ұқсас рөл атқарады. *AtPARP1* және *AtPARP2* мРНҚ гамма-сәулеленуге және реактивті оттегі түрлеріне (ROS) жауап ретінде тез жинақталады.

Talhaoui мен оның әріптестері ДНҚ үзілістерінің ұштарын ПАРилдену арқылы ДНҚ-ның пострепликативті модификациясының бұрын белгісіз кұбылысын ашты. Бұл реакция *in vitro* жағдайында сүтқоректілердің PARP1 және PARP2 ферменттерімен катализденеді. Сүтқоректілердің PARP ферменттері ДНҚ олигонуклеотидтерінің 5' және 3' ұштарын тікелей АДФ-рибозилдей алатыны анықталды.

Қазіргі уақытта *in vivo* ПАРилденген ДНҚ аддуктілерінің болуы туралы тікелей дәлелдер жоқ. Дегенмен, ДНҚ-ның тазартылған рекомбинантты PARP ақуыздарымен тиімді *in vitro* ПАРилденуі ДНҚ-ның репликациядан кейінгі модификациясының бұл түрі тірі жасушаларда да болуы мүмкін екенін көрсетеді. *A. thaliana* мен сүтқоректілердің PARP арасындағы гомологияның жоғары дәрежесін ескере отырып, өсімдік PARP, сондай-ақ жануарлар гомологтары ДНҚ субстраттарына қатысты каталитикалық белсенділік көрсетеді деп болжауға болады. Сонымен қатар, *PARP1* және *PARP2* гендерінде жетіспейтін арабидопсис генетикалық мутанттарының болуы *PARP1* және *PARP2* тәуелді геномдық ДНҚ ПАРилденуін *in vivo* зерттеуге мүмкіндік береді.

Ұсынылған диссертациялық жұмыста ДНҚ субстраттарының PARP1 және PARP2 тәуелді ковалентті поли(АДФ-рибозил) түзілуі алғаш рет *Arabidopsis thaliana in vitro* және *in vivo* жағдайында зерттелді.

Зерттеу мақсаты. *Arabidopsis thaliana* поли(АДФ-рибоза) полимеразалары үшін кДНҚ гендерін оқшаулау және сипаттау және *in vitro* және *in vivo* жағдайында рекомбинантты ферменттердің субстрат ерекшелігін және ДНҚ тізбегін ковалентті модификациялаудағы рөлін егжей-тегжейлі зерттеу.

Зерттеу мақсаттары:

1. *Arabidopsis thaliana* Поли (АДФ-рибоза) полимераза 1, 2 және 3 кодтайтын кДНҚ гендерінің *E. coli*-де оқшаулануы және функционалды экспрессиясы.

2. *Arabidopsis thaliana* AtPARP1, AtPARP2 және AtPARP3 ферменттерінің 5' және 3' ұштарының әртүрлі конфигурациялары мен құрылымдары бар олигонуклеотидті субстраттар ерекшелігінің сипаттамасы.

3. Ферменттің АДФ-рибозилдену белсенділігіндегі AtPARP каталитикалық доменіндегі консервленген «гистидин-тирозин-глутамин қышқылы (H-Y-E)» триадасының рөлін зерттеу.

4. *Arabidopsis thaliana* AtPARP2-нің авто (АДФ)-рибозилдейтін белсенділігін зерттеу.

5. MALDI-TOF MS көмегімен әртүрлі ферменттермен өңдеу арқылы ПАР–ДНҚ қосындыларының құрылымы мен құрамын талдау және олардың табиғатын анықтау.

6. Генотоксінді агент – блеомицин әсерінен өсімдік геномдық ДНҚ-ның поли-(АДФ-рибоза) түзілуін зерттеу.

Зерттеу объектісі. AtPARP, *Arabidopsis thaliana*.

Зерттеу пәні. *Arabidopsis thaliana* PARP ақуыздарымен катализделген ДНҚ үзілістерінің ковалентті поли(АДФ-рибозил)денуін *in vitro* және *in vivo* зерттеу.

Зерттеу әдістері. Арабидопсистен жалпы нуклеин қышқылдарын бөліп алу; мРНҚ изоляциясы; Кері транскрипция реакциясы (ROТ) және полимеразды тізбекті реакция (ПТР) арқылы кДНҚ генін алу; Жинақталған ДНҚ мен векторды рестрикциялау; Натрий додецилсульфатының қатысуымен денатурациялау жағдайында ақуыз электрофорезі; Поликлоналды антиденелермен иммуноблотинг; аффинді хроматографиясы; Өсімдіктерді генотоксінді агенттермен өңдеу.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы.

Arabidopsis thaliana AtPARP1, AtPARP2 және AtPARP3 гендерінің кДНҚ-сы оқшауланған және сипатталған. AtPARP1, AtPARP2 және AtPARP3 функционалды экспрессиясы гистидинді терминалы бар рекомбинантты ақуыздар *E. coli* жүйесінде тазартылды. Тазартылған рекомбинантты *A. thaliana* AtPARP1 және AtPARP2 ДНҚ олигонуклеотидті дуплекстерін АДФ-рибозилтрансфераза белсенділігі арқылы НАД⁺ қатысуымен жоғары молекулалық салмақ өнімдеріне түрлендіретіні алғаш рет көрсетілді. AtPARP1-ге қарағанда AtPARP2 жоғары ДНҚ АДФ-рибозилдену белсенділігіне ие, бірақ 20-ға дейін АДФ-рибоза бірліктерін қамтитын қысқарақ тізбектер түзетіні көрсетілген. Сүтқоректілердің PARP3 және PARP1-ге құрылымдық ұқсастығына қарамастан, AtPARP3 PARP ферменттеріне тән АДФ-рибозилдейтін белсенділікті көрсетпейтіні алғаш рет көрсетілді. AtPARP1 басқалардан гөрі ілулі тізбекті дуплекстерді көбірек, ал, үзіліс және саңылау ДНҚ дуплекстерін аз дәрежеде өзгертетіні бірінші рет көрсетілді, ал AtPARP2 ілулі тізбекті ДНҚ субстратына қарағанда үзіліс және саңылау дуплекстерін артық көреді. Поли(АДФ-рибозил)дену ДНҚ белсенділігінің көрінісі үшін AtPARP1 және AtPARP2 каталитикалық триадасындағы жоғары сақталған глютамин қышқылының қалдығы қажет екені анықталды. AtPARP1 және AtPARP2 арқылы генерацияланған ПАР-ДНҚ қосындыларының құрылымы мен құрамын биохимиялық талдау сүтқоректілердің аналогтары сияқты, AtPARP ферменттері АДФ-рибоза бірлігінің ковалентті қосылуы үшін акцепторлық қалдық ретінде 5'-терминалды ДНҚ фосфаттарын поли(АДФ-рибоза) синтезіне пайдаланатынын көрсетті. ДНҚ-ның АДФ-рибозилденуі арқылы катализделген AtPARP молекулалық механизмі адамның NUDT16 гидролазасы Nudix көмегімен ПАР-ДНҚ-ның ыдырау өнімдерін анықтау арқылы анықталды. АДФ-рибоза-

p-ДНК қосымшасының болжамды молекулалық құрылымы АДФ-рибозилденген ДНК фрагменттерінің MALDI-TOF MS талдауымен қосымша расталды.

Жұмыстың теориялық және практикалық маңызы.

Arabidopsis thaliana өсімдігінен поли(АДФ-рибоза) полимеразаларының кДНК гендерін оқшаулау және сипаттау және *in vitro* мен *in vivo* жағдайында ДНК тізбектерінің ковалентті модификациясындағы *A. thaliana* поли(АДФ-рибоза) полимеразаларының рөлін зерттеу өсімдік геномдық ДНК-ның репликация және пострепликативті модификация механизмдерін түсіну үшін үлкен теориялық маңызы бар.

Алынған нәтижелер іргелі ғылым болып табылады және өсімдіктердің әртүрлі абиотикалық және биотикалық стресстерге төзімділігін арттырудың молекулалық технологиясын әзірлеуге негіз бола алады. Нәтижелер маңызды ауыл шаруашылығы дақылдарының тұқымдарын қоршаған ортаның қолайсыз факторларына төзімділігіне сынауда қолдануға болады.

Қорғауға шығарылатын негізгі ережелері:

- *Arabidopsis thaliana* AtPARP1 және AtPARP2 поли (АДФ-рибоза) полимеразалары ДНК тізбегінің үзілуінің терминалдық фосфат қалдықтарының АДФ-рибозилденуін жүзеге асырады.

- Поли(АДФ-рибоза) полимераз 1, Rec>Nick>Gap дуплекстеріне артықшылық бере отырып, терең ДНК дуплексін ПАРилдейді, ал Поли(АДФ-рибоза) полимераз 2 Nick>Gap>Rec артықшылығы бар саңылаулар арасындағы дуплекстерді тиімдірек ПАРилдейді.

- Поли(АДФ-рибоза) полимераз 1 және Поли(АДФ-рибоза) полимераз 2 ферменттері ДНК-ның 5'-терминалды фосфаттарын АДФ-рибоза бірлігінің ковалентті қосылуы үшін акцепторлық қалдық ретінде ДНК-ның 5'Р және С1' арасында фосфодиэфирлік байланыс түзе отырып, ПАР полимерін синтездеу үшін пайдаланады.

- *Arabidopsis thaliana* AtPARP ақуыздары құрылымдық жағынан PARP отбасының басқа мүшелеріне ұқсас және ДНК ПАРилденуі үшін глутамин қышқылының қалдығы қажет болатын ART домендерінде жоғары сақталған "Н-У-Е" каталитикалық триадасын қамтиды.

- AtPARP3 АДФ-рибозилдейтін белсенділікті көрсетпейді

Негізгі зерттеу нәтижелері мен қорытындылары:

1. *Arabidopsis thaliana* AtPARP1, AtPARP2 және AtPARP3 генінің экспрессиясының өнімі, сәйкесінше, молекулалық салмағы 111,2 кДа, 70,2 кДа және 91,5 кДа болатын глобулярлы белоктар екені анықталды.

2. Алғаш рет тазартылған рекомбинантты *A. thaliana* AtPARP1 және AtPARP2 ДНК олигонуклеотидті дуплекстерін АДФ-рибозилтрансфераза белсенділігі арқылы НАД⁺ қатысуымен жоғары молекулалық өнімдерге түрлендіретіні көрсетілді; AtPARP2 AtPARP1-ге қарағанда АДФ-рибозилдену белсенділігі жоғары;

3. Сүтқоректілердің PARP3 және PARP1-ге құрылымдық ұқсастығына қарамастан, AtPARP3 PARP ферменттеріне тән АДФ-рибозилдейтін белсенділікті көрсетпейтіні алғаш рет көрсетілді.

4. *Arabidopsis thaliana* AtPARP1 және AtPARP2 катализдейтін ПАР-ДНҚ өнімдерінің түзілу тиімділігі ДНҚ дуплексінің құрылымына қатты тәуелді екені алғаш рет көрсетілді.

5. Адам және өсімдік PARP сақталған Н-Ү-Е каталитикалық триадасын бөлісетіні анықталды: адамның PARP1 (H862-Y896-E988) каталитикалық триадасы *Arabidopsis thaliana* AtPARP1 (H833-Y867-E960) және AtPARP2 (H486-Y520-E614). Орынға бағытталған мутагенез арқылы алынған AtPARP1^{E960K, E960Q} және AtPARP2^{E614K} ферменттерінің мутантты формалары ДНҚ МАРилдеу белсенділігін көрсетті, бұл поли(АДФ)-рибозилдейтін ДНҚ белсенділігі үшін AtPARP1 және AtPARP2 каталитикалық триадаларында жоғары сақталған глутамин қышқылы қалдығының қажеттілігін көрсетеді.

6. *Arabidopsis thaliana* AtPARP1 және AtPARP2 арқылы генерацияланған ПАР-ДНҚ қосындыларының құрылымы мен құрамын биохимиялық талдау сүтқоректілердің аналогтары сияқты, AtPARP ферменттері АДФ-рибозаның ковалентті қосылуы үшін акцепторлық қалдық ретінде 5'-терминалды ДНҚ фосфаттарын пайдаланатынын көрсетті. Адамның NUDT16 гидролазасы Nudix көмегімен ПАР-ДНҚ-ның ыдырау өнімдерін анықтау арқылы ДНҚ-ның АДФ-рибозилденуімен катализделген AtPARP молекулалық механизмі анықталды.

Негізгі ғылыми жұмыстардың жоспарымен байланысы.

Диссертациялық жұмыс Қазақстан Республикасының білім және ғылым Министрлігінің AP05131478 «*In vitro* және *in vivo* жағдайында *Arabidopsis thaliana* поли(АДФ-рибоза) полимеразаларының ДНҚ тізбегіндегі үзілу ұштарының коваленттік модификациясындағы рөлін зерттеу» ғылыми жобасы аясында орындалды.

Жұмысты апробациялау. Диссертациялық жұмыстың материалдары хабарланады: «Фараби әлемі» студенттер мен жас ғалымдардың халықаралық ғылыми конференцияларында, ҚазҰУ. әл-Фараби, Алматы, 2018-2020; «Еуропалық биотехнологиялық конгресс» халықаралық конференциясында (2018 ж., Афины, Греция); «THE PARP FAMILY & ADP-RIBOSYLATION (Cold Spring Harbor Laboratory)» халықаралық виртуалды конференциясында (2020 жыл, Нью-Йорк, АҚШ).

Жарияланымдар. Диссертацияның негізгі мазмұны 10 баспа жұмысында, оның ішінде Web of Science немесе Scopus деректер қорына енгізілген нөлдік емес импакт-факторы бар журналдарда 1 мақала және 2 тезис, ҚР БҒМ ҚКСОН ұсынған республикалық ғылыми басылымдарда 4 мақала және халықаралық конференциялар материалдарында 3 тезистер көрсетілген.

Диссертация құрылымы. Диссертация 141 беттен тұрады және белгілеулер мен қысқартулардан, кіріспеден, әдебиеттерге шолудан, материалдар мен әдістерден, нәтижелер мен талқылаудан, қорытындыдан, 464 атаудан тұратын әдебиеттер тізімінен тұрады, оның 464-ы ағылшын тілінде; 5 кестеден, 37 суреттен тұрады.