

АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на соискание степени доктор философии (PhD)

по специальности 6D060700 - «Биология»

ҚУАНБАЙ ӘЙГЕРІМ ҚҰРМАНБЕКҚЫЗЫ

Изучение роли Поли (АДФ-рибоза) полимераз *Arabidopsis thaliana* в ковалентной модификации концов разрывов в цепи ДНК *in vitro* и *in vivo*

Общая характеристика работы. Диссертационная работа посвящена исследованиям PARP зависимого ковалентного поли (АДФ-рибозил)ирования ДНК субстратов в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Актуальность исследования. 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 генерирует 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. Если клетки неспособны обнаруживать и восстанавливать разрывы нитей ДНК, то это может привести к пагубным последствиям, таким как хромосомные аберрации, геномная нестабильность и гибель клеток. Сохранение целостности генома посредством восстановления повреждения ДНК имеет важное значение как в зародышевой, так и в соматических клетках.

Поли (АДФ-рибоза) полимеразы (PARP) катализирует 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). Показано, что 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. Помимо структурных сходств, PARP растений также обладают ферментативной активностью функционально гомологичными PARP ферментам млекопитающих. Как AtPARP1, так и AtPARP2 локализован в ядре и в присутствии ДНК с разрывами, прикрепляет остатки АДФ-рибоз от НАД⁺ к себе (автомодификация) и к акцепторным белкам в условиях *in vitro* и *in vivo*.

В отличие от млекопитающих, значительно мало известно о ПАРилировании в растениях. Практически не известно об акцепторных белках поли(АДФ-рибозы) и белках, взаимодействующих с АДФ-рибозой. В растениях не обнаружены ПАРилированные белки, кроме гистонов и PARP. Идентификация новых акцепторных белков поможет понять регуляторную функцию ПАРилирования в развитии растений в стрессовых реакциях.

Одной из наиболее известных ролей PARP является их функция в качестве сенсора повреждения ДНК. PARP1, в частности, связывается в ПАРилированной форме с одноцепочечными разрывами (SSB) и двуцепочечными разрывами ДНК (DSB), и привлекает белковую машину репарации ДНК в места повреждения ДНК. PARP растений играют аналогичную роль в реакциях клеток на генотоксический стресс. *AtPARP1* и *AtPARP2* мРНК мгновенно накапливаются в ответ воздействию гамма-излучения и активных форм кислорода (АФК).

Talhaoui и коллеги обнаружили ранее неизвестное явление пост-репликативной модификации ДНК с помощью ПАРилирования концов разрывов ДНК. Эта реакция катализируется PARP1 и PARP2 ферментами млекопитающих в условиях *in vitro*. Было обнаружено, что PARP ферменты млекопитающих могут непосредственно АДФ-рибозилировать 5'- и 3'-концы ДНК-олигонуклеотидов.

В настоящее время нет прямых доказательств наличия ПАРилированных ДНК-аддуктов в условиях *in vivo*. Тем не менее, эффективное ПАРилирование разрывов ДНК в условиях *in vitro* очищенными рекомбинантными белками PARP указывает на то, что этот тип пост-репликативной модификации ДНК может также происходить в живых клетках.

Учитывая высокую степень гомологии между PARP *A. thaliana* и млекопитающих, можно предположить, что PARP растений, так же как животные гомологи проявляют каталитическую активность по отношению к ДНК субстратам. Кроме этого, доступность генетических мутантов арабидопсиса дефицитных по генам *PARP1* и *PARP2* предоставляет возможность исследовать PARP1 и PARP2 зависимое ПАРилирование геномной ДНК в условиях *in vivo*.

В представленной диссертационной работе впервые исследованы PARP1 и PARP2 зависимое ковалентное Поли(АДФ-рибози)лирование ДНК субстратов в условиях *in vitro* и *in vivo* у *Arabidopsis thaliana*.

Цель исследования. Выделение и характеристика кДНК генов поли(АДФ-рибоза) полимераз *Arabidopsis thaliana* и детальное изучение субстратной специфичности и роли в ковалентной модификации разрывов цепей ДНК рекомбинантных ферментов в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Задачи исследования:

1. Выделение и функциональная экспрессия кДНК генов, кодирующих *AtPARP1*, *AtPARP2* и *AtPARP3 Arabidopsis thaliana* в *E. coli*.
2. Характеристика субстратной специфичности *AtPARP1*, *AtPARP2* и *AtPARP3 A. thaliana* к олигонуклеотидным субстратам с разными конфигурациями и структурой 5' и 3'-концов.

3. Исследование роли консервативной триады «гистидин-тирозин-глутаминовая кислота (H-Y-E)» в каталитическом домене AtPARP в АДФ-рибозилирующей активности фермента.

4. Изучение ауто (АДФ)-рибозилирующей активности AtPARP2.

5. Анализ структуры и состава ПАР–ДНК аддуктов обработкой разными ферментами и идентификация их природы с помощью MALDI-TOF MS

6. Исследование Поли-(АДФ-рибозил)ирования геномной ДНК растений под действием генотоксического агента – блеомицина.

Объект исследования. AtPARP, *Arabidopsis thaliana*.

Предмет исследования. Изучение ковалентного поли (АДФ-рибозил)ирования концов разрывов ДНК катализируемое PARP белками *Arabidopsis thaliana* в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Методы исследования. Выделение тотальных нуклеиновых кислот из арабидопсиса; Выделение мРНК; Получения кДНК гена с помощью реакции обратной транскрипции (РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР); Рестрикция наработанной ДНК и вектора; Электрофорез белков в денатурирующих условиях в присутствии натрий додецилсульфата; Иммуноблоттинг с поликлональными антителами; Аффинная хроматография; Обработка растений генотоксичными агентами.

Научная новизна исследования.

Выделена и дана характеристика кДНК генам *AtPARP1*, *AtPARP2* и *AtPARP3*. Проведена функциональная экспрессия *AtPARP1*, *AtPARP2* и *AtPARP3* с гистидиновым концом в *E. coli* и очистка рекомбинантного белка. Впервые показано, что очищенные рекомбинантные *AtPARP1* и *AtPARP2* *A. thaliana* превращают дуплексы олигонуклеотидов ДНК в высокомолекулярные продукты в присутствии НАД⁺ за счет АДФ-рибозил трансферазной активности. Показано, что *AtPARP2* обладает высокой активностью АДФ-рибозилирования ДНК по сравнению с *AtPARP1*, но образует более короткие цепи, содержащие до 20 единиц АДФ-рибозы. Впервые показано, что *AtPARP3* не проявляет типичный для PARP ферментов АДФ-рибозилирующую активность, несмотря на его структурное сходство с PARP3 и PARP1 млекопитающих. Впервые показано, что *AtPARP1* предпочтительно модифицирует дуплексы с выступающей цепью, в меньшей степени, ДНК дуплексы с разрывом и брешью, тогда как *AtPARP2* предпочитает дуплексы с разрывом и брешью по сравнению с ДНК субстратом с выступающей цепью. Установлено, что высококонсервативный остаток глутаминовой кислоты в каталитической триаде *AtPARP1* и *AtPARP2* необходим для проявления поли (АДФ-рибозил)ирующей ДНК активности. Биохимический анализ структуры и состава аддуктов ПАР-ДНК, генерируемых *AtPARP1* и *AtPARP2*, показал, что, как и их аналоги у млекопитающих, *AtPARP* ферменты используют 5'-концевые фосфаты ДНК в качестве акцепторного остатка для ковалентного присоединения звена АДФ-рибозы для синтеза поли(АДФ-рибозы). Выявлен молекулярный механизм *AtPARP* катализируемого АДФ-рибозилирования ДНК, путем идентификации

продуктов деградации ПАР-ДНК с помощью Nudix, NUDT16 гидролазы человека. Предполагаемая молекулярная структура аддукта АДФ-рибоза-р-ДНК была дополнительно подтверждена с помощью MALDI-TOF MS-анализа АДФ-рибозилированных фрагментов ДНК.

Теоретическое и практическое значение работы.

Выделение и характеристика кДНК генов поли (АДФ-рибоза) полимераз растения *Arabidopsis thaliana* и изучение роли поли (АДФ-рибоза) полимераз *A. thaliana* в ковалентной модификации разрывов цепей ДНК *in vitro* и *in vivo* имеет огромное теоретическое значение для понимания механизмов репарации и пострепликативной модификации геномной ДНК растений.

Полученные результаты носят фундаментальный характер и могут служить основой для разработки молекулярной технологии для улучшения устойчивости растений к различным абиотическим и биотическим стрессам. Результаты могут быть использованы при тестировании семян важных сельскохозяйственных культур на устойчивость к экологическим неблагоприятным факторам.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Поли (АДФ-рибоза) полимеразы AtPARP1 и AtPARP2 *Arabidopsis thaliana* осуществляют АДФ-рибозилирование концевых фосфатных остатков разрывов цепи ДНК.

- Поли (АДФ-рибоза) полимеразы 1 предпочтительно ПАРилирует углубленный дуплекс ДНК с предпочтением дуплексов Rec> Nick> Gap, в то время как Поли (АДФ-рибоза) полимеразы 2 эффективнее ПАРилирует дуплексы с разрывом и брешью с предпочтением дуплексов Nick> Gap> Rec.

- Ферменты AtPARP1 и AtPARP2 используют 5'-концевые фосфаты ДНК в качестве акцепторного остатка для ковалентного присоединения звена АДФ-рибозы для синтеза полимера ПАР с образованием фосфодиэфирной связи между 5'Р ДНК и С1' АДФ-рибозы.

- Белки AtPARP имеют структурное сходство с другими членами семейства PARP и содержит высококонсервативную каталитическую триаду «Н-У-Е» в своих доменах ART, в которой остаток глутаминовой кислоты необходим для ПАРилирования ДНК.

- AtPARP3 не проявляет АДФ-рибозилирующую активность.

Основные результаты исследований и выводы:

1. Установлено, что продуктом экспрессии генов AtPARP1, AtPARP2 и AtPARP3 являются глобулярные белки с молекулярной массой 111,2 кДа, 70,2 кДа, и 91,5 кДа соответственно.

2. Впервые показано, что очищенные рекомбинантные AtPARP1 и AtPARP2 *A. thaliana* превращают дуплексы олигонуклеотидов ДНК в высокомолекулярные продукты в присутствии НАД⁺ за счет АДФ-рибозил трансферазной активности; AtPARP2 обладает более высокой активностью АДФ-рибозилирования по сравнению с AtPARP1.

3. Впервые показано, что AtPARP3 не проявляет типичный для PARP ферментов АДФ-рибозилирующую активность, несмотря на его структурное сходство с PARP3 и PARP1 млекопитающих.

4. Впервые показано, что эффективность катализируемого AtPARP1 и AtPARP2 образования продуктов ПАР-ДНК сильно зависят от структуры ДНК дуплекса.

5. Установлено, что PARP человека и растений имеют общую консервативную каталитическую триаду Н-У-Е: каталитическая триада PARP1 человека (H862-Y896-E988) соответствует таковой для AtPARP1 (H833-Y867-E960) и AtPARP2 (H486-Y520-E614) *Arabidopsis thaliana*. Полученные с помощью сайт-направленного мутагенеза мутантные формы ферментов AtPARP1^{E960K}, E960Q и AtPARP2^{E614K} проявили активность МАРилирования ДНК, что указывает на необходимость высококонсервативного остатка глутаминовой кислоты в каталитической триаде AtPARP1 и AtPARP2 для проявления поли (АДФ)-рибозилирующей ДНК активности.

6. Биохимический анализ структуры и состава аддуктов ПАР-ДНК, генерируемых AtPARP1 и AtPARP2, показал, что, как и их аналоги у млекопитающих, AtPARP ферменты используют 5'-концевые фосфаты ДНК в качестве акцепторного остатка для ковалентного присоединения звена АДФ-рибозы для синтеза поли(АДФ-рибозы). Выявлен молекулярный механизм AtPARP катализируемого АДФ-рибозилирования ДНК, путем идентификации продуктов деградации ПАР-ДНК с помощью Nudix, NUDT16 гидролазы человека.

Связь с планом основных научных работ. Диссертационная работа выполнена в рамках научного проекта AP05131478 «Изучение роли поли (АДФ-рибоза) полимераз *Arabidopsis thaliana* в ковалентной модификации концов разрывов в цепи днк *in vitro* и *in vivo*» Министерства образования и науки Республики Казахстан.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены: на международных научных конференциях студентов и молодых учёных «Фараби элемеі», КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, 2018-2020 гг.; на международной конференции «European Biotechnology Congress» (2018 г., Афины, Греция); на международной виртуальной конференции «THE PARP FAMILY & ADP-RIBOSYLATION (Cold Spring Harbor Laboratory)» (2020 г. Нью Йорк, США).

Публикации. Основное содержание диссертации отражено в 10 печатных работах, в том числе 1 статья и 2 тезиса в журналах с ненулевым импакт-фактором входящим в базу данных Web of Science или Scopus, 4 статей в республиканских научных изданиях, рекомендуемых ККСОН МОН РК, и 3 тезисов в материалах международных конференций.

Структура диссертации. Диссертация изложена на 141 страницах и состоит из обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, списка использованных источников литературы из 464 наименований из них 464 на английском языке; содержит 5 таблиц, 37 рисунков.