

## Краткая информация о проекте

Наименование	ИРН АР13067762 «Исследование инициированного мисматч-специфической тимин-ДНК-гликозилазой aberrантного пути эксцизионной репарации сложных повреждений ДНК <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> » 0122РК00080
Актуальность	В настоящем проекте мы предлагаем изучить aberrантный путь BER, инициируемый монофункциональной ДНК-гликозилазой TDG человека при сложных повреждениях ДНК <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> . Для расшифровки механизмов aberrантной репарации и ее регуляции мы проведем анализ восстановления репарации ДНК <i>in vitro</i> с использованием очищенной ДНК-гликозилазы и исследования <i>in vivo</i> на клетках <i>Escherichia coli</i> и <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , чтобы установить роль aberrантной репарации в закреплении мутаций и охарактеризовать спектр мутаций, индуцируемых мисматч-специфическими монофункциональными ДНК-гликозилазами.
Цель	Охарактеризовать на молекулярном уровне механизмы, вовлеченные в aberrантный путь эксцизионной репарации оснований (BER), инициируемый мисматч-специфической тимин-ДНК гликозилазой в условиях <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> , и оценить физиологическую роль aberrантного BER в накоплении индуцированных повреждениями ДНК и спонтанных мутаций в живых клетках.
Задачи	<b>Задача № 1: Создание синтетических ДНК-субстратов, содержащих различные модификации оснований ДНК, и очистка гомогенной ДНК-гликозилазы человека TDG;</b> <b>Первая задача</b> - провести подробную биохимическую характеристику монофункциональной ДНК-гликозилазы человека TDG, инициирующей aberrантный путь BER к ДНК-дуплексам, содержащим сложные повреждения ДНК <i>in vitro</i> . Для этого мы сконструируем: (i) синтетические олигонуклеотидные субстраты с различными химическими повреждениями, имитирующие широкий спектр окислительных повреждений оснований ДНК, включая сложные повреждения ДНК (окислительные повреждения оснований ДНК, этенобазы, межнитевые сшивки ДНК, G-T и G-G внутринитевые сшивки ДНК, УФ-продукты, аддукты аристолактама) и с различными конфигурациями; и (ii) рекомбинантные очищенные белки TDG человека из <i>E. coli</i> . Мы будем клонировать кДНК, кодирующие TDG человека, и экспрессировать их в <i>E. coli</i> . Очищенные белки будут охарактеризованы с использованием синтетических ДНК-субстратов.  <b>Задача № 2: Биохимические исследования: восстановление <i>in vitro</i> путей aberrантной репарации с помощью очищенных белков и синтетических субстратов ДНК;</b> <b>Вторая задача</b> - восстановить <i>in vitro</i> анализ aberrантной репарации ДНК с помощью очищенной ДНК-гликозилазы.

	<p>Мы будем использовать радиомеченый синтетический субстрат ДНК и электрофоретический анализ денатурирующего геля для детального изучения молекулярного механизма действия ферментов репарации ДНК. Перед проведением экспериментов активность каждого белка будет проверена с использованием его классического субстрата ДНК. Эффективность восстановления ДНК будет измерена путем анализа продуктов ДНК на денатурирующем ПААГ электрофорезе с последующей фосфорной визуализацией с помощью системы Turphoon FLA 9500. Наши французские коллеги обладают многолетним опытом в проведении анализа такого рода.</p> <p><b>Задача № 3: Характеристика aberrантного BER, инициированного TDG, в живых клетках</b></p> <p><b>Третья задача</b> - охарактеризовать клеточные ответы на генотоксический стресс штаммов <i>S. cerevisiae</i> и <i>E. coli</i>, сверхэкспрессирующих человеческую монофункциональную ДНК-гликозилазу TDG. В рамках этой задачи мы подвергнем дрожжевые и бактериальные клетки различным процедурам повреждения ДНК, включая аристоклохивовую кислоту (для образования dA-Ali I&amp;II), хлороацетоальдегид (для образования этенобазы), метилметансульфонат, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ультрафиолетовый свет и агенты для сшивания ДНК. После воздействия мы измерим скорость мутаций и охарактеризуем мутационные профили, а также сравним их с клетками дикого типа и контрольными необработанными клетками. Различия между частотой и характером мутаций позволят нам установить роль aberrантной репарации в закреплении мутаций и охарактеризовать спектр мутаций, индуцированных мисматч-специфическими монофункциональными ДНК-гликозилазами <i>in vivo</i>.</p> <p>В заключение, используя биохимические и генетические подходы, мы стремимся расшифровать и охарактеризовать на молекулярном уровне механизмы, вовлеченные в инициированный ДНК-гликозилазами aberrантный путь BER. Кроме того, идентификация критических повреждений ДНК, которые могут вызывать aberrантную репарацию в клетках, обеспечит механистическое понимание экологических и генетических факторов, связанных со старением и дегенеративными заболеваниями, и, следовательно, поможет разработать новые стратегии профилактики и терапии.</p>
<p>Ожидаемые и достигнутые результаты</p>	<p>Задачи, которые планируется решить в данном проекте, являются первой попыткой лучшего понимания молекулярного механизма инициированного мисматч-специфической TDG-гликозилазой пути aberrантной эксцизионной репарации сложных повреждений ДНК <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>. Получение поставленных задач обеспечит уникальный угол зрения на проблемы механизмов и лечения возрастных заболеваний человека. В частности, успешным можно считать достижение следующих результатов:</p>

	<p>i. Создание синтетических ДНК-субстратов, содержащих сложные повреждения ДНК;</p> <p>ii. Очистка и характеристика гомогенной гликозилазы TDG человека и мутантов ее активного сайта;</p> <p>iii. Реконструкция репарации ДНК <i>in vitro</i> для получения биохимических доказательств aberrантного опосредованного гликозилазой TDG восстановления неповрежденной нити ДНК, что приводит к фиксации мутаций;</p> <p>iv. Создание генетически модифицированных бактериальных и дрожжевых клеточных линий, сверхэкспрессирующих монофункциональную ДНК-гликозилазу TDG человека;</p> <p>v. Характеристика клеточных ответов модифицированных бактериальных и дрожжевых клеток на генотоксический стресс.</p> <p>vi. Характеристика спектров мутаций, индуцированных aberrантной репарацией сложных повреждений ДНК в живых клетках.</p>
<p>Имена и фамилии членов исследовательской группы с их идентификаторами (Scopus Author ID, Researcher ID, ORCID, при наличии) и ссылками на соответствующие профили</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Тайпакова Сэбира Мыктыбекқызы, Ph.D. доцент. Индекс Хирша-6, <a href="https://orcid.org/0000-0001-9499-1682">https://orcid.org/0000-0001-9499-1682</a>. Scopus ID: 47062012700. WoS ID: AAW-9635-2020</li> <li>2. Жолдыбаева Ботагөз Сердалыевна, Ph.D. Старший научный сотрудник. Индекс Хирша-2. <a href="https://orcid.org/0000-0003-1682-4947">https://orcid.org/0000-0003-1682-4947</a> Scopus ID: 56147051300</li> <li>3. Манапқызы Диана, магистр. Младший научный сотрудник. <a href="https://orcid.org/0000-0003-3371-4459">https://orcid.org/0000-0003-3371-4459</a>.</li> <li>4. Байкен Елдар магистр. Ph.D. кандидат. Научный сотрудник. Индекс Хирша-7. ORCID: <a href="https://orcid.org/0000-0003-1742-2536">https://orcid.org/0000-0003-1742-2536</a>. Scopus ID: 55573387800</li> <li>5. Қуанбай Айгерім Құрманбекқызы. Ph.D. Младший научный сотрудник. Индекс Хирша-1 <a href="https://orcid.org/0000-0001-6509-4085">https://orcid.org/0000-0001-6509-4085</a> Scopus ID: 57222715698</li> </ol>
<p>Список публикаций со ссылками на них</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. <b>Taipakova S.</b>, Kuanbay A., Saint-Pierre C., Gasparutto D., Baiken Y., Groisman R., Ishchenko A.A., Saparbaev M., Bissenbaev A.K., The <i>Arabidopsis thaliana</i> Poly(ADP-Ribose) Polymerases 1 and 2 Modify DNA by ADP-Ribosylating Terminal Phosphate Residues // <i>Frontiers in Cell and Developmental Biology</i>. – 2020. – Vol. 8. 606596. Citation-3, Q1, IF-5.18, Процентиль: 21, SJR-2.572 DOI: 10.3389/fcell.2020.606596</li> <li>2. Baiken, Y., Kanayeva, D. <b>Taipakova, S.</b> Groisman, R. Ishchenko, A.A. Begimbetova, D. Matkarimov, B. Saparbaev, M. Role of Base Excision Repair Pathway in the Processing of Complex DNA Damage Generated by Oxidative Stress and Anticancer Drugs // <i>Frontiers in Cell and Developmental Biology</i>. – 2021. – Vol. 8. 617884. Citation-3, Q1, IF-5.18, Процентиль: 21, SJR-2.572 DOI: 10.3389/fcell.2020.617884 (Соавтор)</li> <li>3. <b>Taipakova S.M.</b>, Smekenov I.T., Saparbaev M.K., Bissenbaev A.K. Characterization of <i>Aspergillus niger</i> endo-<math>\beta</math>-1,4-glucanase ENG1 secreted from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> using two different expression vectors // <i>Genet. Mol. Res.</i> - 2015. - Vol. 14, №2. - P. 6439-6452. Citation-2, Q2 (SJR-1.1), Procentile-16%. DOI: 10.4238/2015.June.11.20</li> <li>4. Akishev Zh., <b>Taipakova S.</b>, Joldybayeva B., Zutterling C., Smekenov I., Ishchenko A., Zharkov D., Bissenbaev A., Saparbaev M. The major <i>Arabidopsis thaliana</i> apurinic-aprimidinic endonuclease, ARP is</li> </ol>

	<p>involved in the plant nucleotide incision repair pathway// DNA repair. - 2016. -Vol.48. -P.30-42. Citation-10, Q1(SJR-2.22), Procentile-71%. DOI:<a href="https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2016.10.009">10.1016/j.dnarep.2016.10.009</a></p> <p>5. Bazlekowa-Karaban M., Prorok P., Bacconnais S., <b><u>Taipakova S.</u></b>, Akishev Z., Zembrzuska D., Popov A.V., Endutkin A.V., Groisman R., Ishchenko A.A., Matkarimov B.T., Bissenbaev A., et al. Mechanism of stimulation of DNA binding of the transcription factors by human apurinic/aprimidinic endonuclease 1, APE1// DNA repair. –2019. – Vol.82. - №102698. Citation-1, Q1(SJR-2.22), Procentile-71%. <a href="https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102698">https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2019.102698</a>.</p>
Информация о патентах	Тайпакова С.М., Смикенов И.Т., Бисенбаев А.К. Патент Республики Казахстан на полезную модель "Интегративный плазмидный вектор для экспрессии генов в дрожжах", регистрационный № 2017/ 0230.2.