

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК  
СИБИРСКОЕ ОТДЕЛЕНИЕ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ  
ИНСТИТУТ ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ

На правах рукописи

Кургина Татьяна Андреевна

**Влияние фактора модификации гистонов HPF1 на  
активность поли(ADP-рибоза)полимераз 1 и 2 при взаимодействии с нуклеосомами**

1.5.3 – молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата  
биологических наук

Научный руководитель:

д.х.н., акад. РАН Лаврик Ольга Ивановна

Новосибирск 2023

## Оглавление

Список сокращений.....	4
Введение.....	7
1. Классические функции поли(ADP-рибоза)полимераз 1 и 2 и их взаимодействие с HPF1 — новым фактором поли(ADP-рибозилирования) гистонов (Обзор литературы) .....	11
1.1. Ферменты поли(ADP-рибозо)полимеразы 1 и 2: структура и каталитическая активация .....	11
1.1.1. Сравнительная структурная организация PARP1 и PARP2.....	12
1.1.2. Механизм каталитической активации PARP1 и PARP2.....	13
1.1.3. Взаимодействие PARP1 и PARP2 с ДНК и нуклеосомами.....	13
1.2. Реакция PAR-илирования: механизм и клеточные роли .....	20
1.2.1. Механизм реакции PAR-илирования.....	21
1.2.2. Аминокислотная специфичность PAR-илирования.....	22
1.2.3. Функция PAR-илирования в клеточных ответах.....	23
1.2.4. Деградация поли(ADP-рибозы) .....	28
1.3. Фактор PAR-илирования гистонов 1 (HPF1) — новый белок-партнёр PARP1/2.....	32
1.3.1. Образование гибридного активного центра PARP1/2:HPF1 .....	32
1.3.2. Привлечение PARP1, PARP2 и HPF1 на сайты повреждения ДНК.....	36
1.3.3. PAR-илирование гистонов и канонические гистоновые метки .....	38
1.4. Ингибиторы PARP1 и PARP2.....	40
1.5. Заключение .....	42
2. Материалы и методы .....	44
2.1. Материалы .....	44
2.1.1. Реактивы и оборудование .....	44
2.1.2. Ферменты и белки .....	45
2.2. Методы исследования.....	46
2.2.1. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле по методу Леммли .....	46
2.2.2. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в ПААГ в денатурирующих условиях.....	46
2.2.3. Электрофоретическое разделение в ПААГ в неденатурирующих условиях.....	46
2.2.4. Количественная обработка распределения радиоактивности.....	47
2.2.5. Синтез [ <sup>32</sup> P]-меченного NAD <sup>+</sup> .....	47
2.2.6. Получение ДНК с 5'- [ <sup>32</sup> P].....	47
2.2.7. Получение ДНК-активаторов.....	47
2.2.8. Определение ориентации повреждений в NCP методом гидроксильного футпринтинга.....	50
2.2.9. Изучение активности PARP1 и PARP2 на различных ДНК-активаторах методом флуоресцентной спектроскопии .....	51
2.2.10. Анализ активности PARP1 и PARP2 с использованием [ <sup>32</sup> P]-NAD <sup>+</sup> .....	53
2.2.11. Анализ длины синтезированной поли(ADP-рибозы) .....	55
2.2.12. Тестирование NAD <sup>+</sup> -гидролазной активности PARP .....	56
3. Результаты и их обсуждение.....	57
3.1. Анализ активности PARP1 и PARP2 в реальном времени с помощью измерения анизотропии флуоресценции .....	57
3.1.1. Анализ связывания PARP1/2 с ДНК и их диссоциации в процессе PAR-илирования .....	57
3.1.2. Исследование ингибиторного действия 7-метилгуанина и 8-гидрокси-7-метилгуанина на PARP1.....	58

3.1.3. Оптимизация предложенной методики для изучения активности PARP1/2 в присутствии NCP.....	60
3.1.4. Дизайн и получение модельных ДНК-активаторов .....	62
3.1.5. Определение величин EC <sub>50</sub> для ферментов PARP1/2 и ДНК (NCP) с повреждением .....	63
3.1.6. Определение величин IC <sub>50</sub> в анализе конкурентного связывания ферментов PARP1/2 и ДНК.....	67
3.2. HPF1 стимулирует инициацию PAR-илирования PARP1 и PARP2 одновременно с подавлением элонгации PAR-илирования .....	70
3.2.1. HPF1 стимулирует авто-PAR-илирование PARP1 и PARP2 одновременно с переключением PAR-илирования на гистоны .....	70
3.2.2. HPF1 способствует катализируемому PARP1/PARP2 PAR-илированию в отсутствие ДНК .....	73
3.2.3. HPF1 модулирует активность PARP1 и PARP2 на начальной стадии реакций ....	74
3.2.4. Стимулирующее действие HPF1 на PARP зависит от концентрации NAD <sup>+</sup> .....	77
3.2.5. HPF1 приводит к укорочению синтезированного PAR.....	78
3.2.6. Степень вызванного HPF1 переключения субстратной специфичности зависит от относительных концентраций PARP и HPF1 .....	79
3.2.7. NAD <sup>+</sup> -гидролазная активность PARP1 и PARP2 усиливается большим избытком HPF1 .....	81
3.3. Гетеро-PAR-илирование гистонов модулируется интермедиатом эксцизионной репарации оснований ДНК .....	84
3.3.1. Влияние интермедиата эксцизионной репарации оснований ДНК на HPF1-зависимое PAR-илирование гистонов обнаруживается в широком диапазоне концентраций фактора HPF1 .....	84
3.3.2. Интермедиат эксцизионной репарации оснований ДНК влияет на скорость синтеза PAR в присутствии HPF1 .....	87
3.3.3. Присутствие бреши в структуре ДНК и HPF1 влияют на баланс событий инициации и элонгации PAR-илирования. ....	90
3.3.4. Положение повреждения в составе NCP влияет на HPF1-зависимую модификацию гистонов .....	93
Заключение.....	97
Выводы .....	100
Список литературы.....	101

## Список сокращений

- 7mGua — 7-метилгуанин
- 8oh7mGua — 8-гидрокси-7-метилгуанин
- AIF — апоптоз-индуцирующий фактор
- APE1 — apurinic/apyrimidinic endonuclease, апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 человека
- APLF — aprataxin and PNKP like factor, белок репарации ДНК
- AP-сайт — апуриновый/апиримидиновый сайт
- ARN1/2/3 — ADP-ribosylhydrolase 1/2/3, ADP-рибозилгидролазы 1, 2, 3
- ART — (ADP-рибозил)трансферазный домен
- АТР — аденозин-5'-трифосфат
- BER — base excision repair, эксцизионная репарация оснований
- BRCA1/2 — BR — breast, CA — cancer; белок репарации ДНК, ассоциированный с возникновением рака молочной железы
- BRCT — С-концевой домен белка BRCA1
- CAT — каталитический домен PARP1/2
- CG1218 — не охарактеризованный белок *Drosophila melanogaster*
- FEN1 — Flap endonuclease 1, флэп-эндонуклеаза 1
- FUS — Fused in sarcoma, РНК-связывающий белок
- ГТФаза — гуанозинтрифосфат гидролаза
- HD — helical domain, спиральный аутоингибиторный домен PARP1/2
- HPF1 — histone PARylation factor 1, фактор PAR-илирования гистонов 1
- LigI — ДНК-лигаза I
- LigIII $\alpha$  — ДНК-лигаза III $\alpha$
- LLPS — разделение фаз жидкость-жидкость
- MacroD1/2 — ADP-рибозилгликогидролазы, содержащие макродомен
- MAR — mono(ADP-ribose), моно(ADP-рибоза)
- MMS — метилметансульфонат
- MRE11 — нуклеаза репарации двойных разрывов ДНК
- MRN — комплекс MRE11-RAD50-NBS1-CtIP
- MSK1/2 — стресс-активируемые киназы 1 и 2
- NAD<sup>+</sup> — никотинамидадениндинуклеотид
- NBS1 — нибрин, белок репарации двойных разрывов ДНК
- NCP — nucleosome core particle, нуклеосомная коровая частица

NLS — nuclear localization signals, сайт ядерной локализации

NMNAT — никотинамид-мононуклеотид-аденилилтрансфераза

NTR — N-концевая область белка

NUDT — nucleoside diphosphate linked to moiety X, фосфодиэстеразы, связанные с фрагментом-X

PAR — poly(ADP-ribose), поли(ADP-рибоза)

PARG — poly(ADP-ribose)glycohydrolase, поли(ADP-рибоза)-гликогидролаза

PARP1 — poly(ADP-ribose)polymerase 1, поли(ADP-рибоза)полимераза 1

PARP2 — поли(ADP-рибоза)полимераза 2

PARPi — ингибиторы PARP1

PBZ — PAR-связывающий цинковый палец

PCNA — proliferating cell nuclear antigen, ядерный антиген пролиферирующих клеток

PNKP — polynucleotide kinase/3'-phosphatase, полинуклеотидкиназа/3'- фосфатаза

Pol II — РНК-полимераза II

Pol $\beta$  — ДНК-полимераза  $\beta$

SAM-68 — белок сигнальной трансдукции и метаболизма РНК

SDS — додецилсульфат натрия

SELEX — systematic evolution of ligands by exponential enrichment, систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением

SHL — super helical location, координаты витков относительно гистонового ядра в нуклеосоме

TARG1 — terminal ADP-ribose glycohydrolase, терминальная ADP-рибозо-протеингликогидролаза

Tris — трис(гидроксиметил)аминометан

UNG — uracil-DNA N-glycosilase, урацил-ДНК N-гликозилаза

WGR — домен, богатый триптофаном, глицином и аргинином

XRCC1 — X-ray repair cross-complementing protein 1, белок, продукт гена группы перекрёстной комплементации, ответственной за радиочувствительность клеток

XPC — xeroderma pigmentosum, complementation group C, белок системы эксцизионной репарации нуклеотидов

YB-1 — Y-бокс-связывающий белок 1

ZnF1-3 — цинковые пальцы 1-3 фременты PARP1

АСМ — атомно-силовая микроскопия

БСА — бычий сывороточный альбумин

ДТТ — дитиотреитол

мРНК — матричная РНК  
ПААГ — полиакриламидный гель  
ПСА — персульфат аммония  
ПТМ — посттрансляционная модификация белка  
ТЕМЕД — N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин  
ТХУ — трихлоруксусная кислота  
УФ-свет — ультрафиолетовый свет  
ЭДТА — этилендиаминтетрауксусная кислота

## Введение

### Актуальность работы

Ферменты поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARP) катализируют посттрансляционную модификацию белков, называемую поли(ADP-рибозил)ированием или PAR-илированием [1–3]. Эта модификация регулирует различные клеточные процессы, включая репарацию ДНК [4–8]. PARP1 и PARP2 — основные ферменты, ответственные за PAR-илирование белков-мишеней в ядре и синтез полимера PAR [2, 9]. Оба фермента участвуют в эксцизионной репарации оснований (Base excision repair, BER) [10–12], и взаимодействуют с ДНК-полимеразой  $\beta$  (Pol  $\beta$ ), XRCC1 и ДНК-лигазой III $\alpha$  [11, 13–15]. Влияние PARP1 и PARP2 на процесс BER показано с использованием синтетических ДНК-дуплексов, содержащих повреждения, а также нуклеосом [11–13]. Кроме того, PARP1 регулирует процессы репарации двухцепочечных разрывов и удаления объемных повреждений ДНК [16–18].

PARP1 и PARP2, благодаря их ключевой роли в регуляции репарации ДНК и других клеточных процессов, считаются перспективными мишенями для поиска новых противоопухолевых препаратов [19–22]. В настоящее время многие ингибиторы PARP (PARPi) находятся на различных стадиях клинических и доклинических испытаний, а олапариб, рупартиб, нирапариб и талазопариб уже используются в клиниках для лечения рака [23, 24]. Ингибиторы PARP наиболее интенсивно используются в качестве химиотерапевтических средств при лечении рака яичников и молочной железы, прежде всего при мутациях гена *BRCA1/2*. Многие ингибиторы PARP в настоящее время рассматриваются в качестве препаратов для лечения других видов злокачественных новообразований, нейродегенеративных и вирусных заболеваний, а также в качестве противовоспалительной терапии инфаркта миокарда и инсульта [20, 24, 25].

Несмотря на то, что изучение синтеза PAR и ферментов PARP началось еще в 60-е годы XX века, только недавно был обнаружен новый белок-партнёр PARP1 и PARP2 — фактор PAR-илирования гистонов 1 (HPF1) [26], который регулирует активность и специфичность PARP1 и PARP2 и образует с ними временный совместный активный центр [27]. HPF1 переключает специфичность PAR-илирования с остатков аспартата, глутамата и других аминокислот на остатки серина [28] и играет важную роль в катализируемом PARP1 и PARP2 PAR-илировании гистонов [29–31]. В данный момент механизм взаимодействия PARP1/PARP2 с HPF1 и его функции в контексте хроматина только начинают изучать. Это направление исследований ферментов PARP вызывает

большой интерес, особенно учитывая, что HPF1 является первым и пока-что единственным известным фактором, меняющим аминокислотную специфичность PAR-илирования.

**Цель и задачи исследования.** Цель данной работы — исследование механизма действия фактора PAR-илирования гистонов HPF1 в регуляции каталитической активности PARP1 и PARP2 в контексте нуклеосом.

**Задачи:**

1. Оптимизировать методику исследования активности PARP1 и PARP2 *in vitro* в реальном времени в присутствии различных ДНК-активаторов, в том числе нуклеосом, основанную на флуоресцентной спектроскопии.

2. Оценить сродство PARP1 и PARP2 к различным сайтам в структуре свободной ДНК и ДНК в составе нуклеосом, содержащих однонуклеотидную брешь — интермедиат эксцизионной репарации оснований.

3. Исследовать влияние HPF1 на реакции авто- и гетеро- PAR-илирования, катализируемые PARP1 и PARP2, и на кинетику синтеза поли(ADP-рибозы), для выяснения механизма HPF1-зависимой модуляции реакции PAR-илирования.

4. Установить влияние повреждения ДНК — интермедиата BER на уровни PAR-илирования и кинетику синтеза поли(ADP-рибозы), а также на эффективность инициации PAR-илирования в присутствии HPF1.

**Научная новизна полученных результатов.** Данная работа представляет собой первое детальное исследование механизма влияния фактора PAR-илирования гистонов HPF1 на активность ферментов PARP1 и PARP2. Показано, что HPF1 способен стимулировать начальные стадии реакции PAR-илирования. При этом обнаруживается более значительное влияние на активность PARP2. Присутствие гистонов (акцепторов PAR), HPF1, стимулирующего инициацию PAR-илирования, и повреждения-интермедиата BER приводило к многократному увеличению эффективности PARP2 в синтезе PAR и ускорению его диссоциации с повреждения ДНК. Сопоставление полученных в работе результатов с имеющимися литературными данными позволяет предположить специфическую регуляторную роль тандема PARP2-HPF1 в регуляции BER.

**Практическая значимость работы.** На сегодняшний день ферменты PARP1 и PARP2 являются перспективными терапевтическими мишенями при лечении BRCA-ассоциированных злокачественных опухолей. Было показано непосредственное участие HPF1 в переключении аминокислотной специфичности PARP1 и PARP2 и вовлечение данного фактора в клеточный ответ на применение ингибиторов PARP. Результаты, полученные в данной работе, могут иметь важное практическое значение для



понимания развития клеточного ответа на повреждение ДНК, а также для поиска новых специфических ингибиторов PARP1 и PARP2 — мишеней противораковой терапии.

#### **Положения, выносимые на защиту.**

1. PARP1 взаимодействует с наиболее высоким сродством с тупыми концами ДНК, в том числе в составе нуклеосом, но также связывается и с однонуклеотидной брешью, и с неповреждённой ДНК. PARP2 имеет низкое сродство к тупым концам и к неповреждённой ДНК, но эффективно взаимодействует с ДНК, содержащей брешь.

2. HPF1 стимулирует инициацию PAR-илирования, катализируемого PARP1 и PARP2, но подавляет элонгацию синтеза PAR. Это влияет на общее количество PAR, длину синтезируемого полимера и уровень гидролиза  $NAD^+$ .

3. Предпочтительной мишенью PAR-илирования PARP1 является он сам, в том числе в присутствии HPF1. PARP2 преимущественно катализирует модификацию гистонов, которая многократно усиливается при наличии бреши в ДНК. Это свидетельствует о специфической роли PARP2 в ответе на повреждения ДНК в контексте хроматина.

4. Положение повреждения ДНК (интермедиата BER) относительно гистонового кора нуклеосомы влияет на паттерн PAR-илирования гистонов ферментом PARP2.

**Публикации и апробация результатов.** По результатам исследования опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus:

**Kurgina T.A.**, Anarbaev R.O., Sukhanova M.V., Lavrik O.I. A rapid fluorescent method for the real-time measurement of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity // *Anal. Biochem.* – 2018. – V. 545. – P. 91–97.

Kutuzov M.M., **Kurgina T.A.**, Belousova E.A., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Optimization of nucleosome assembling from histones and model DNAs and estimation of the reconstitution efficiency // *Biopolymers and Cell.* – 2019. – V. 35. – No. 2. – P. 91–98.

**Kurgina T.A.**, Moor N.A., Kutuzov M.M., Naumenko K.N., Ukraintsev A.A., Lavrik O.I. Dual function of HPF1 in the modulation of PARP1 and PARP2 activities // *Commun. Biol.* – 2021. – V. 4. – No. 1. – Article No. 1259.

**Кургина Т. А.**, Шрам С. И., Кутузов М. М., Абрамова Т.В., Щербакова Т.А., Мальцева Е.А. Поройков В.В., Лаврик О.И., Швядас В.К., Нилов Д.К. Ингибиторное действие 7-метилгуанина и его метаболита 8-гидрокси-7-метилгуанина на поли(ADP-рибозо)полимеразу 1 человека // *Биохимия.* – 2022. – Т. 87. – No. 6. – С. 794–803.

**Kurgina T.A.**, Moor N.A., Kutuzov M.M., Lavrik O.I. The HPF1-dependent histone PARylation catalyzed by PARP2 is specifically stimulated by an incised AP site-containing BER DNA intermediate // *DNA Repair.* – 2022. – V. 120. – Article No. 103423.

**Кургина Т. А.,** Лаврик О.И., Поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 и 2: классические функции и взаимодействие с HPF1 – новым фактором поли(ADP-рибозил)ирования гистонов // Молекулярная биология. – Т. 57. – No. 11. – С. 254-268.

Результаты работы были представлены на конференциях: V международной конференции Postgenom (Казань, 2018), конференции «Systems Biology and Bioinformatics» (Новосибирск, 2019), IX Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Дагомыс, 2019), 45-ом конгрессе FEBS (онлайн конференция, 2021), VII молодёжной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2021), конференции BGRS-SB (Новосибирск, 2022), III объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, 2023).

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 125 страницах, содержит 33 рисунка и 9 таблиц. Библиография включает 325 литературных источников.

**Вклад автора.** Представленные экспериментальные данные получены самим автором. Автор принимал активное участие в анализе полученных результатов и написании статей. Анализ полученных результатов проводился при участии Моор Н.А. и Шрама С.И. Использование измерения анизотропии флуоресценции в качестве тест-системы предложено Анарбаевым Р. О.

# **1. Классические функции поли(ADP-рибоза)полимераз 1 и 2 и их взаимодействие с HPF1 — новым фактором поли(ADP-рибозилирования) гистонов (Обзор литературы)**

Поли(ADP-рибоза) (PAR) — отрицательно заряженный полимер, состоящий из мономеров ADP-рибозы. В ядре синтез этого полимера катализируют ферменты поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 и 2 (PARP1/2) при активации на повреждениях ДНК, используя в качестве субстрата никотинамидадениндинуклеотид (NAD<sup>+</sup>). PAR-илирование регулирует ключевые клеточные процессы, такие как репарация, репликация ДНК, организация структуры хроматина, экспрессия генов, процессинг РНК, биогенез рибосом и трансляция [9]. Известно, что PAR-илирование может влиять как на функции белков, так и на их внутриклеточную локализацию, а также участвует в формировании немембранных клеточных компартментов [32, 33]. Такое обилие функций, и ведущая роль в репарации ДНК делают PARP1 и PARP2 перспективными мишенями для создания противораковых препаратов [20]. Недавно открыт новый фактор PAR-илирования гистонов — HPF1, который модулирует активность PARP1/2, образуя временный совместный активный центр с данными ферментами и меняя аминокислотную специфичность PAR-илирования на остатки серина [26].

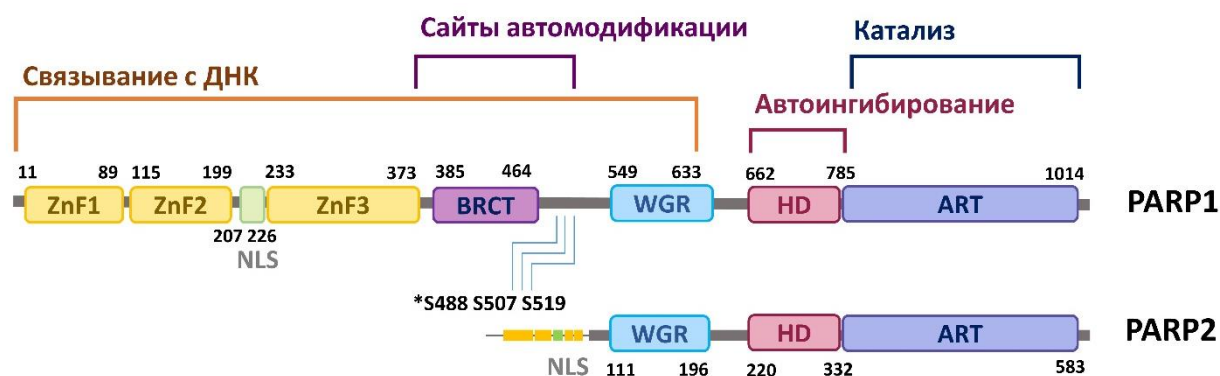
В настоящем обзоре рассмотрены структурные особенности PARP1 и PARP2, детали взаимодействия данных ферментов с ДНК, клеточные роли PAR-илирования, функции HPF1 и применение ингибиторов PARP1 и PARP2 в терапии различных заболеваний.

## **1.1. Ферменты поли(ADP-рибозо)полимеразы 1 и 2: структура и каталитическая активация**

Поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARP), представляют собой семейство ферментов, характеризующихся наличием последовательности из 50 аминокислот, называемой «PARP signature», в составе каталитического домена (CAT) [34, 35]. Этот домен позволяет некоторым членам семейства переносить остатки ADP-рибозы с молекулы NAD<sup>+</sup> на большое количество субстратов, осуществляя регуляцию множества биологических процессов, таких как транскрипция, репарация ДНК, репликация, клеточный цикл и др. [6, 36–38]. Наиболее изученный член семейства PARP — фермент PARP1, впервые описан Пьером Шамбоном с соавторами в 1963 г. [39, 40]. С тех пор многие исследования показали, что он играет ключевую роль в ответе на генотоксический стресс, инициируя рекрутирование соответствующих белков в места повреждения ДНК [41–43]. PARP2 также был обнаружен как фермент, катализирующий синтез PAR в ядре [44], и его роль и кооперация с PARP1 интенсивно исследуются [12, 37, 43, 45, 46].

### 1.1.1. Сравнительная структурная организация PARP1 и PARP2

Каталитические домены PARP1 и PARP2 высокогомологичны, но их N-концевые области существенно различаются. Это накладывает отпечаток на взаимодействие ферментов с ДНК и их последующую активацию.



**Рис. 1.** Доменное строение PARP1 и PARP2: функции доменов обозначены сверху от схемы; звездочкой отмечены три остатка серина, являющиеся преимущественными мишенями PAR-илирования PARP1 *in vivo*.

Белок PARP1 человека имеет молекулярную массу 113 кДа. Структура PARP1 достаточно консервативна, и у различных видов позвоночных около 62% аминокислотной последовательности идентичны [47–49]. PARP1 — мультидоменный фермент, он содержит N-концевой ДНК-связывающий домен, BRCT и WGR домены, а также С-концевой каталитический домен (**Рис.1**) [47]. ДНК-связывающий домен включает так называемые "цинковые пальцы": ZnF1, ZnF2 и ZnF3. Было показано, что ZnF1 и ZnF2 связывается с одноцепочечным разрывом ДНК и индуцируют временное взаимодействие ZnF3 с ДНК [48–50]. В связывании с тупым концом ДНК, по всей видимости, преимущественно задействован ZnF1 [49]. Также было показано, что ZnF3 способен эффективно связывать PAR [51]. В центральной области PARP1 находятся BRCT-мотив, сайты автомодификации: 15 остатков глутамата и три остатка серина, расположенные в линкерной области, и домен WGR, богатый триптофаном, глицином, аргинином [52–54]. Домены WGR и BRCT также участвуют в связывании ДНК и опосредует миграцию PARP1 по ДНК благодаря механизму «перехват» [55, 56]. С-концевой домен включает каталитический домен (CAT), состоящий из двух субдоменов: (ADP-рибозил)трансферазного домена (ART) и спирального регуляторного субдомена (HD) [47].

Фермент PARP2 человека имеет массу 66 кДа. Его С-концевая область высоко гомологична с PARP1 и содержит WGR и CAT домены (**Рис.1**). Однако, PARP2 значительно отличается от PARP1 строением N-концевой области: PARP2 лишен цинковых пальцев и

домена BRCT, его N-концевая область (NTR) значительно короче и содержит неупорядоченные участки [57–59].

### **1.1.2. Механизм каталитической активации PARP1 и PARP2**

Различие в строении ДНК-связывающих областей, в том числе, влияет на каталитическую активацию PARP1 и PARP2. Повреждённая ДНК служит кофактором-активатором для данных ферментов [49, 60–63]. Было показано, что HD-субдомен PARP1 и PARP2 блокирует доступ субстрата данных ферментов —  $\text{NAD}^+$  к активному центру, сохраняя фермент малоактивным вне связывания с повреждённой ДНК [38, 57, 61]. При распознавании разрывов ДНК, ZnF1, ZnF2 и WGR PARP1 собираются на разрыве и образуют платформу для связывания HD-субдомена PARP1 [49]. Эти междоменные перестройки приводят к локальной дестабилизации HD, которая индуцирует возникновение «открытой конформации» активного центра, и приблизительно 1000-кратное увеличение числа актов связывания  $\text{NAD}^+$  в активном центре [38, 64]. Этот механизм активации также характерен и для PARP2, с той лишь разницей, что с повреждённой ДНК данный фермент взаимодействует лишь доменом WGR [57]. Примечательно, что связывание HD-субдомена с доменом WGR, происходящее при взаимодействии PARP1 и PARP2 с повреждённой ДНК, и связывание с активным центром  $\text{NAD}^+$  (или его аналогов), дополнительно изменяет конформацию ДНК-связывающих участков PARP1/2. Это, в свою очередь, приводит к увеличению их сродства к ДНК [64]. Таким образом, и непосредственное взаимодействие с ДНК, и раскрытие HD-субдомена в присутствии  $\text{NAD}^+$  дают свой вклад в связывание PARP1 и PARP2 с повреждением ДНК, и одно событие облегчает осуществление другого.

### **1.1.3. Взаимодействие PARP1 и PARP2 с ДНК и нуклеосомами**

Наличие сложного ДНК-связывающего домена позволяет PARP1 взаимодействовать с широким спектром повреждений ДНК. Цинковые пальцы ZnF1 и ZnF2 PARP1 связываются с повреждённой ДНК с высокой аффинностью, независимо от последовательности и структуры [65], при этом наиболее сильное взаимодействие наблюдается для ZnF2. ZnF3 сам по себе не связывается с ДНК, но необходим для ДНК-зависимой стимуляции активности PARP1 [48, 49, 66].

#### *1.1.3.1. Взаимодействие PARP1 с неповреждённой ДНК*

Было показано в экспериментах *in vitro*, что PARP1 не только эффективно активируется широким спектром повреждений ДНК, (тупые концы ДНК, в том числе не содержащие 5'-фосфат, AP-сайты, однонуклеотидные бреши и др. [12, 46, 67–69], но также взаимодействует с неповреждённой ДНК. Было установлено, что PARP1 связывается с интактным хроматином и ДНК и конденсирует его [55, 56, 70]. Исследования с помощью

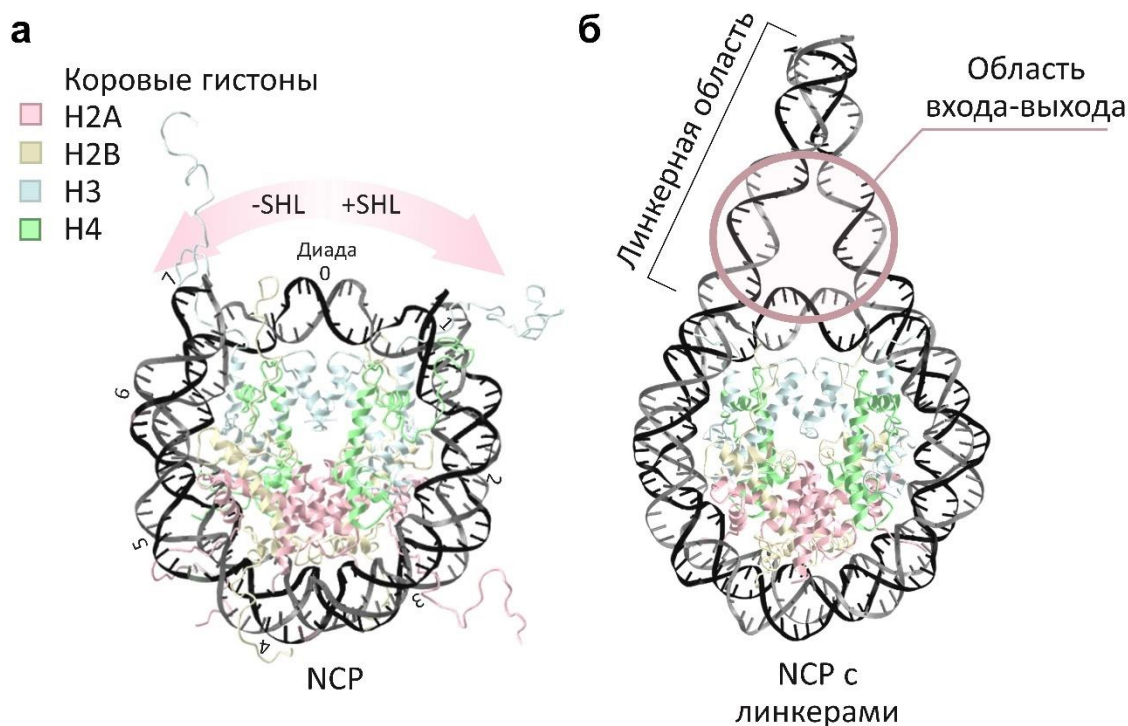
атомно-силовой микроскопии, проведенные с использованием протяженных ДНК, которые содержали повреждения (одноцепочечный разрыв, двухцепочечный разрыв, AP-сайт, одонуклеотидная брешь) показали, что PARP1 связывается не только с концами или с внутренними специфическими разрывами ДНК, но также обладает значительным сродством к неповрежденной ДНК [46, 69]. Ввиду высокого сродства к интактной ДНК при отсутствии значительной каталитической активации в комплексе с неповрежденной ДНК, следует полагать, что PARP1 сталкивается с проблемой поиска целевых сайтов активации (повреждений) при подавляющем избытке «неспецифических» сайтов связывания в геноме и его значительном сродством к миллиардам пар оснований неповрежденной ДНК, которые присутствуют в ядре в концентрациях ~100 мг/мл [55]. При этом, эксперименты по лазерному микрооблучению живых клеток показали, что PARP1 рекрутируется в места повреждения ДНК менее чем за 10 с [71], что выше скорости накопления PARP2 (порядка 1 мин) при том, что PARP2 не проявляет заметного сродства к неповрежденной ДНК [72]. Было показано, что коэффициент диффузии, отражающий скорость перемещения белков в ядре, в 6 раз выше для PARP1, чем для PARP2 [73]. *In vitro* PARP1 связывается с ДНК со скоростью равной или выше скорости диффузии [74], что согласуется с его чрезвычайно быстрым накоплением в местах повреждений ДНК *in vivo* [71, 75]. Кроме того, имеются данные, что в неповрежденных клетках PARP1/2 разделяются по крайней мере на три популяции: связанная с хроматином, медленно диффундирующая, и быстро диффундирующая (высокоподвижная) [76]. Последняя, по-видимому, отвечает за сканирование генома на наличие потенциальных повреждений ДНК. К высокоподвижной фракции (популяции молекул) можно отнести 70% всех молекул PARP1/2. Иными словами, меньше трети ядерных PARP1/2 связаны с хроматином (и могут выполнять, в том числе, архитектурную функцию), но большая часть популяции этих белков быстро диффундирует в пространстве ядра [73, 76]. Таким образом, сродство PARP1 к неповрежденной ДНК парадоксально связано с его мобильностью в хроматине. Это наблюдение позволяет предположить, что PARP1, как и другие ДНК-связывающие белки, такие как факторы транскрипции [77], должен иметь механизм перемещения по геному, не основанный на простой диссоциации и реассоциации. Хотя скольжение белков по ДНК в одном измерении ранее рассматривалось как потенциальный механизм для ускорения поиска специфических сайтов связывания [78, 79], в более поздних публикациях указываются потенциальные трудности в случае такого механизма скольжения на большие расстояния [78, 80]. Эта модель тем более усложняется с учетом организации ДНК в нуклеосомах в эукариотическом геноме. Люгер с соавторами предложили механизм «перехват», описывающий перемещение PARP1 по интактной ДНК. В данной модели, диссоциация PARP1 из комплексов с ДНК

стимулируется наличием конкурентной, свободной ДНК [55, 56]. При этом дополнительная молекула (или участок) ДНК связывается WGR и BRCT доменами, что стимулирует диссоциацию других доменов PARP1 с исходной ДНК. Фермент как бы «перехватывает» один участок ДНК за другим, перемещаясь по хроматину. Мутационный анализ показал, что WGR задействован в связывании ДНК в большей степени: его делеция полностью нарушала описанный механизм перемещения PARP1, в то время как делеция BRCT лишь ослабляла перенос фермента между цепями ДНК. Такая WGR/BRCT-опосредованная ассоциация-диссоциация с ДНК позволяет PARP1 сканировать хроматин со скоростью, превышающей скорость обычной диффузии, что обеспечивало перемещение к свободным от PARP1 участкам ДНК [55, 56]. В отсутствие конкурирующей ДНК, PARP1 оставался бы эффективно связанным в одном сайте или рядом с ним, учитывая его высокую скорость ассоциации, показанную Рудольф с соавторами [55]. Интересно, что неповрежденная ДНК, по-видимому, очень эффективно запускает механизм миграции PARP1. Таким образом, высокое сродство PARP1 к неповрежденной ДНК, как и наличие огромного количества конкурентных сайтов в ядре ускоряет его перемещение по хроматину. Примечательно, что описанный механизм ДНК-зависимой диссоциации с ДНК также дает убедительное объяснение большого разнообразия экспериментально найденных констант диссоциации комплексов PARP1 и ДНК [12, 38, 50, 66]. Измеренные величины кажущихся  $K_D$  сильно зависят от концентрации ДНК, поскольку более высокие её концентрации способствуют высвобождению PARP1 из комплекса с ДНК, что приводит к завышению величин констант диссоциации [55, 56].

#### *1.1.3.2. Взаимодействие PARP1 с нуклеосомами*

Помимо взаимодействия с интактной и поврежденной ДНК, активно изучается связывание PARP1 и PARP2 с нуклеосомами — элементарными единицами хроматина. Центральную часть нуклеосомной укладки хроматина представляет нуклеосомная коровая частица (nucleosome core particle, NCP), состоящая из фрагмента ДНК длиной 145-147 п.о. и коровых гистонов H2A, H2B, H3 и H4 (**Рис.2**). ДНК обернута вокруг октамера гистонов на 1,65 витка левосторонней суперспирали [81]. Структура NCP имеет ось симметрии второго порядка, проходящую через определённую пару оснований. Данную пару называют диадой и часто используют как точку отсчёта координат оснований внутри NCP [82]. Ориентация витков ДНК относительно кора NCP обозначаются как SHL (Super helical location), где 0 SHL представлен диадой. Для каждого последующего витка номер положения увеличивается по часовой стрелке до SHL +7, а против часовой — уменьшается до SHL -7 [81] (**Рис.2а**). Внутри NCP геометрия двойной спирали ДНК сильно отличается

от классической В-конформации, что может распознаваться многими факторами метаболизма нуклеиновых кислот [83, 84].



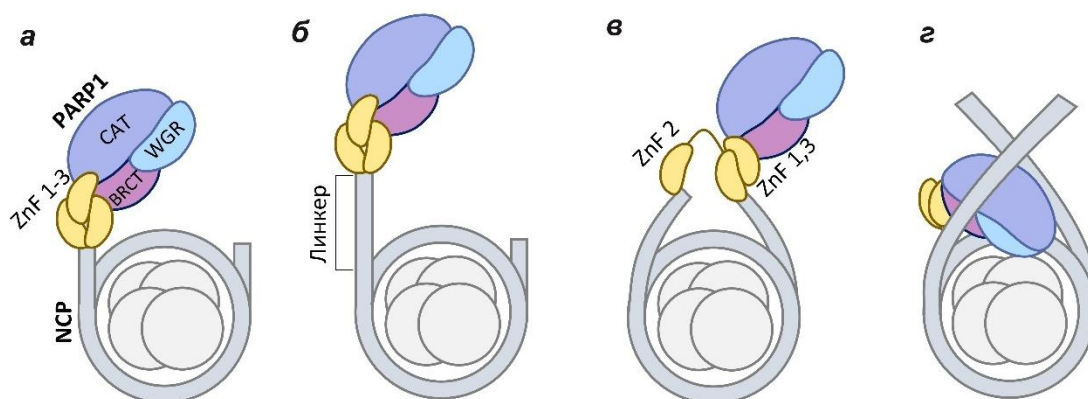
**Рис.2.** Структура NCP: а – NCP без линкерной ДНК, обозначены SHL 0–7 (PDB: 1KX5); б – NCP, содержащая два линкера длиной 26 п.о. (PDB: 5NL0).

Несмотря на высокое сродство гистонов к ДНК и нуклеосомную организацию генома, для успешной реконструкции стабильных NCP *in vitro* требуется последовательность ДНК, имеющая определённую гибкость [85]. В 1998 году Видом с соавторами с помощью технологии SELEX идентифицировали последовательности, обеспечивающие сборку наиболее стабильных нуклеосомных частиц [86]. Последовательности были обозначены как клоны 601, 603 и 605, они до сих пор используются различными научными группами для получения NCP [82, 87]. Клоны представляют собой последовательности ДНК длиной 145-147 п.о. (в зависимости от клона), содержащие в качестве ключевых элементов так называемые АТ-шарниры, однозначно позиционирующие ДНК относительно гистонового ядра. Так как в хроматине нуклеосомы располагаются с периодичностью  $200 \pm 40$  п.о., в биохимических экспериментах часто используют NCP с выступающими участками ДНК. Такие участки, не входящие в «коровую» последовательность 145-147 п.о. обозначаются как линкерная ДНК или просто «линкер» [88, 89] (**Рис.2б**). Область вхождения и выхода спирали ДНК в состав NCP называют в таких случаях областью входа-выхода.

На реконструированных нуклеосомах, не содержащих линкерных участков, PARP1, по всей видимости, испытывает затруднения в связывании тупых концов ДНК (**Рис.3а**) [66].



На NCP имеющих одну линкерную область было показано классическое взаимодействие PARP1 с тупыми концами ДНК с помощью цинковых пальцев ZnF1 и ZnF2 (**Рис.3б**). При наличии двух линкерных областей, PARP1, вероятно, может взаимодействовать с обоими концами ДНК (**Рис.3в**) [66]. Модель структуры полноразмерного PARP1 в комплексе с одиночным фрагментом ДНК, предложенная Лангилье с соавторами, подразумевает взаимодействие ZnF1 с концом ДНК, в то время как ZnF2 может оставаться свободным [48]. Это позволяет предположить, что ZnF2 может взаимодействовать с одним концом линкера ДНК, в то время как ZnF1, ZnF3 и WGR создают платформу для активации CAT-домена при связывании с другим концом ДНК. Показано, что связывание PARP1 с концом нуклеосомной двухцепочечной ДНК приводит к значительному увеличению расстояния между соседними спиралями ДНК, причем этот процесс не сопровождается потерей гистонов и является обратимым после PAR-илирования и диссоциации PARP1 [90, 91]. Таким образом, взаимодействие PARP1 с NCP приводит к реорганизации нуклеосомной частицы.



**Рис.3.** Модели взаимодействия PARP1 с нуклеосомой: а – связывание PARP1 с тупым концом ДНК на нуклеосоме без линкерной области (затруднено); б – связывание PARP1 с тупым концом ДНК на нуклеосоме, содержащей один выступающий линкерный участок; в – взаимодействие PARP1 сразу с двумя тупыми концами на нуклеосоме с двумя линкерами; г – связывание PARP1 с областью входа-выхода, подобно гистону H1.

Помимо взаимодействия с концами ДНК в составе нуклеосомы, было показано, что PARP1 способен связываться с областью входа-выхода, подобно гистону H1 [66, 91–93], и эффективно конкурировать с ним за связывание хроматина (**Рис.3г**) [94]. Эти данные коррелируют с данными, полученными *in vivo* и демонстрирующими, что PARP1 связан с промоторами, транскрибируемыми РНК-полимеразой II (Pol II) [95]. Интересно, что присутствие PARP1 на этих промоторах коррелирует с истощением линкерного гистона H1 в клетках, а высокое содержание PARP1 по сравнению с H1 определяет гены, которые

активно транскрибируются. Это указывает на то, что PARP1 локализуется в местах продолжающейся транскрипции, где он фактически может оказывать стимулирующее или ингибирующее действие и выступать в качестве архитектурного и функционального фактора хроматина [95, 96].

Было показано вовлечение С-концевых областей PARP1 во взаимодействие с нуклеосомами. PARP1 с делетированными С-концевыми доменами (WGR и CAT) показывал значительно более низкое сродство к нуклеосоме, содержащей ДНК с линкерами [66]. Кроме того, было установлена ключевая роль CAT домена в конденсации хроматина при участии PARP1: именно он опосредует связывание нескольких участков хроматина молекулами фермента. В пользу этого говорит тот факт, что уплотнение хроматина, опосредованное именно CAT-доменом, необходимо для максимальной репрессии транскрипции с помощью PARP1 [97].

Таким образом, вне каталитической активации PARP1 может находиться в хроматин-связанном состоянии (30% популяции) и регулировать транскрипцию посредством конденсации/деконденсации хроматина, при этом конкурируя с линкерным гистоном H1. В то же время, большая часть PARP1 (70%) активно перемещается по хроматину, предположительно, с помощью механизма «перехват», и сканирует ДНК на предмет возникших повреждений. Эта ускоренная диффузия способствует быстрому рекрутированию PARP1 на сайты повреждения ДНК и своевременному развёртыванию работы репарационной машины [55, 56, 73, 76]. Связывание повреждённой ДНК с помощью цинковых пальцев открывает активный сайт PARP1, облегчая связывание NAD<sup>+</sup>. Это, в свою очередь, повышает сродство PARP1 к повреждению, предотвращая его дальнейшую миграцию. После этого диссоциация PARP1 происходит только в ходе авто-PAR-илирования.

### *1.1.3.3. Детали взаимодействия PARP2 с ДНК и NCP*

В то время как PARP1 взаимодействует с широким спектром повреждений ДНК и интактной ДНК, PARP2, как предполагается, более специфичен. Он предпочтительно активируется ДНК, содержащей разрывы, фланкированные 2'-дезоксирибозо-5'-фосфатом (включая расщепленные AP-сайты) [46, 57, 58, 98], и наиболее эффективно взаимодействует с одноцепочечным разрывом, субстратом финальной стадии лигирования [12, 44, 58]. В отличие от структуры PARP1, PARP2 не содержит цинковых пальцев и использует домен WGR для связывания с разрывами ДНК. Домены WGR PARP1, PARP2 и PARP3 консервативны, однако аминокислотные остатки PARP2 Asn127, Asn128, Lys130, Gln159, Lys179 и Tyr201 присутствуют в PARP3 (также активируется ДНК и не содержит цинковых пальцев), но не в PARP1 [57]. Любопытно, что замена тирозина Tyr201 PARP2, на

фенилаланин, которым этот остаток представлен у PARP1, приводит к потере его ДНК-зависимой активации и потере специфического связывания ДНК [59]. Остаток Asn127, который представлен глицином в PARP1, является ключевым остатком для зависимой от ДНК активации PARP2, в то время как Gln159, который также представлен глицином в PARP1, частично важен для активации PARP2 с помощью тупых концов ДНК [59]. Иными словами, WGR-домен PARP2 имеет некоторые отличия от такового у PARP1, и именно эти различия позволяют ему эффективно взаимодействовать с фосфат-содержащими повреждениями ДНК в отсутствие цинковых пальцев.

Неупорядоченный N-конец PARP2 необходим для локализации в ядре, но не требуется для локализации фермента в месте повреждения ДНК [58]. Однако, он неспецифически взаимодействует с ДНК [62], и всё же даёт вклад в сродство к ДНК. В совокупности эти факты предполагают существенную разницу в специфичности узнавания и механизме связывания ДНК PARP2 и PARP1. В то время как PARP1 использует разные домены для связывания ДНК, PARP2 использует в основном домен WGR.

Анализ кристаллических структур PARP2 с ДНК показал, что PARP2 может обнаруживать двухцепочечные разрывы ДНК и координировать взаимодействие двух концов ДНК *in vitro*. Было показано, что ДНК в кристаллических структурах взаимодействует встык с двумя мономерами WGR-домена по обе стороны от образовавшегося разрыва. Иными словами, PARP2 способствовал сближению двух концов двухцепочечного разрыва и ориентировал ДНК подходящим для лигирования образом [59].

Было показано, что PARP2 способен соединять концы ДНК, даже если эти концы являются короткими (10 п.н.) линкерными плечами нуклеосомы, имитирующими двухцепочечный разрыв ДНК в хроматине [99]. Стыковка концов модельной ДНК, и димеризация нуклеосом, показанная двумя независимыми исследованиями [59, 99, 100], позволяют предположить, что такое координирование концов ДНК представляет собой физиологически значимую особенность PARP2 в контексте хроматина. Соединение концов ДНК действительно широко распространено среди факторов репарации двухцепочечных разрывов ДНК: MRE11 способствует синапсису ДНК, RAD50 способствует связыванию концов ДНК, CtIP направляет репарацию двухцепочечных разрывов на путь гомологичной рекомбинации [101, 102], большинство белков пути негомологичного соединения концов проявляет активность связывания ДНК [101, 103–106]. Учитывая, что PARP2 рекрутируется к разрывам ДНК быстрее, чем эти факторы, можно предположить, что именно PARP2 наиболее вероятно первым связывает концы двухцепочечного разрыва [75]. Однако PARP2 критически нуждается в терминальной 5'-фосфатной группе для связывания ДНК с максимальной аффинностью, что предполагает, что он не может эффективно связывать

разрывы со сложными концами: дефосфорилированными, с одноцепочечными выступающими концами или с объемными аддуктами [57, 61]. В случае образования разрывов ДНК со сложными концами их репарация будет зависеть от специфических факторов, таких как комплекс MRN. Таким образом, PARP2 более специфичен в отношении связывания поврежденной ДНК, нежели PARP1. Он взаимодействует преимущественно с повреждениями, содержащими 5'-фосфат, включая однонитевые разрывы и расщепленные AP-сайты, и способен координировать два тупых конца ДНК.

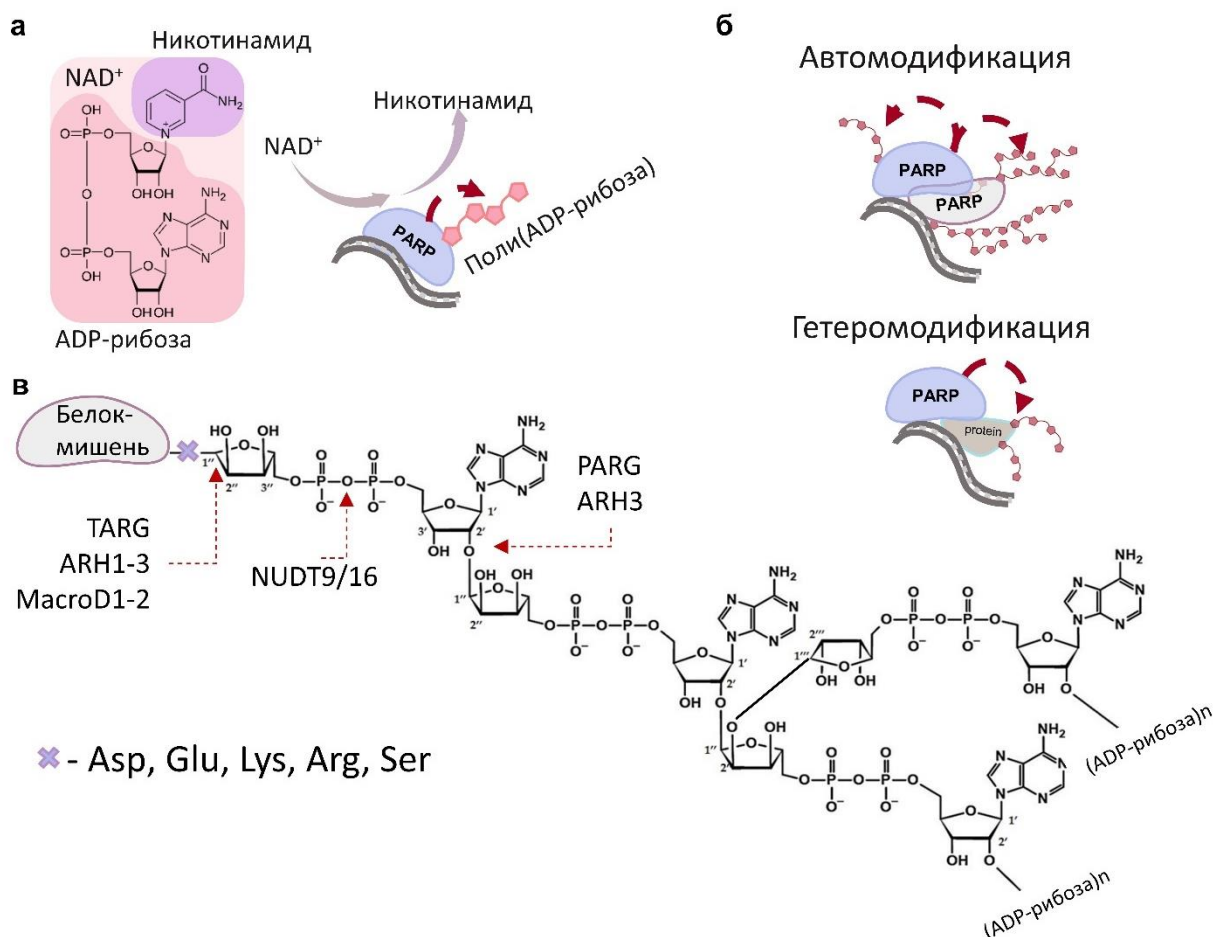
## **1.2. Реакция PAR-илирования: механизм и клеточные роли**

Синтез PAR, осуществляемый ядерными PARP1 и PARP2 в ответ на повреждение ДНК оказывает существенное влияние на функционирование большого числа клеточных систем. Представляет собой посттрансляционную модификацию, ADP-рибозилирование может резко изменить функцию акцепторного белка, что часто связывают с уникальными биохимическими характеристиками этой модификации. Поскольку каждая единица ADP-рибозы содержит два фосфата, PAR-илирование может привести к резкому изменению электростатических свойств белка. В результате он может препятствовать взаимодействию ДНК- или РНК-связывающего белка с его нуклеиновыми кислотами-мишенями [107, 108]. Так, аутомодификация PARP1 приводит к его диссоциации из комплекса ДНК из-за электростатического отталкивания [109]. PAR-илирование часто вносит изменения в локализацию акцепторного белка, что может нарушить важные белок-белковые взаимодействия. Например, модификация p53 во время генотоксического стресса предотвращает его связывание с ядерным экспортным рецептором CRM1, способствуя накоплению p53 в ядре и активации p53-опосредованного ответа [110]. Также, ADP-рибозилирование может функционировать как механизм модуляции биохимической активности акцепторного белка. [111, 112]. Помимо непосредственного влияния на свойства белка-акцептора, PAR может выполнять каркасную функцию и служить платформой для сборки репарационных комплексов [113]. Такие свойства PAR, как высокая плотность заряда, низкая сложность и гибкость делают его подходящим драйвером разделения жидкость-жидкость (LLPS) [33, 114, 115]. Сам PAR токсичен для клетки. Его чрезмерный синтез может сопровождаться выходом цепей PAR из ядра в цитоплазму. Это, в свою очередь, является триггером PAR-зависимой клеточной гибели, именуемой PAR-танатос [116]. В цитоплазме PAR способствует транслокации апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) из митохондрий в ядро, где он обеспечивает фрагментацию геномной ДНК и гибель клетки [117, 118]. В конечном итоге, синтез PAR при обширных повреждениях ДНК может способствовать существенному истощению пула  $NAD^+$ , запуску апоптоза и даже

некрозу [118]. В данной главе описаны детали синтеза и деградации PAR, а также влияние PAR-илирование на некоторые клеточные процессы.

### 1.2.1. Механизм реакции PAR-илирования

Поврежденная ДНК служит кофактором для PARP1 и PARP2 [46, 49, 57–59, 62, 63]. Как было сказано выше, связывание поврежденной ДНК вызывает цепь междоменных перестроек в PARP1 и PARP2, что в конечном итоге приводит к изменению положения аутоингибиторного спирального домена (HD) и каталитической активации ферментов [61, 63, 64]. Активированные PARP1 и PARP2 используют в качестве субстрата  $\text{NAD}^+$ , катализируя перенос остатка ADP-рибозы, синтезируя и присоединяя образующийся PAR к аминокислотным остаткам как самого PARP, так и различных белков-мишеней (Рис.4а,в). В этом контексте рассматриваются реакции авто-PAR-илирования (автомодификация, при которой PAR ковалентно присоединен к PARP) и гетеро-PAR-илирования (модификация, при которой PAR присоединяется к другим белкам-мишеням) (Рис.4б).



**Рис.4.** Реакция PAR-илирования и структура PAR: а – схема переноса ADP-фрагмента молекулы  $\text{NAD}^+$ ; б – модификация самого PARP (автомодификация), модификация белков-мишеней (гетеромодификация); в – структура PAR и ферменты, обеспечивающие его деградацию (Раздел 1.2.4.).

Механизм авто-PAR-илирования остается открытым вопросом. С одной стороны, имеются данные об авто-PAR-илировании PARP1 по цис-механизму, где молекула фермента служит акцептором PAR, который она же и синтезирует [65, 119, 120]. С другой стороны, сообщалось, что PARP1 и PARP2 обладают способностью образовывать димеры, которые ускоряют PAR-илирование благодаря вкладу транс-механизма модификации [120]. Например, по данным светорассеяния PARP1 и PARP2 в растворе преимущественно присутствуют в виде димеров [15, 112]. Предположение, что авто-PAR-илирование PARP1 и PARP2 происходит межмолекулярно в составе димера, состоящего из двух субъединиц, согласуется со способностью PARP1 и PARP2 ковалентно модифицировать другие белки [32, 121–125]. В качестве дополнительного аргумента в пользу бимолекулярного характера реакции авто-PAR-илирования можно привести стехиометрию комплексов PARP1:ДНК и PARP2:ДНК, которая составляет 2:1 для достижения оптимальной ферментативной активности [126, 127].

### 1.2.2. Аминокислотная специфичность PAR-илирования

Как описано выше, PAR-илирование представляет собой обратимую посттрансляционную модификацию, которая возникает в результате переноса фрагмента ADP-рибозы с  $\text{NAD}^+$  на определенные аминокислотные остатки белков-субстратов. Более 30 лет назад было показано, что PAR связан со многими клеточными мишенями [128], однако главный акцептор ADP-рибозы в клетке — сам PARP1 [129]. Большинство ранних биохимических экспериментов и более поздних масс-спектрометрических анализов показывали, что остатки глутамата и аспартата составляют более 70% акцепторов ADP-рибозы [52, 128, 130, 131]. На наличие физиологической функции такой модификации указывает возможность их динамической регуляции *in vivo*: модификации этих остатков могут быть удалены ADP-рибозилгликогидролазами (MacroD1, MacroD2 и TARG1), имеющими соответствующую аминокислотную специфичность (**Раздел 1.2.4**) [132, 133]. Позднее остатки лизина были предложены в качестве основных акцепторов PAR. Однако, дальнейшие исследования показали, что первичная оценка и физиологическая значимость такой модификации оказалась завышенной [28, 134, 135]. Кроме того, некоторые обнаруженные сайты модификации могли содержать ADP-рибозу, которая была связана с остатками лизина неферментативным путём [136].

Недавно, в результате дальнейшего развития масс-спектрометрических методов, было показано неожиданное преобладание остатков серина в качестве физиологических мишеней PARP, а также возможность PAR-илирования цистеина и тирозина [28, 137–139]. Независимые исследования подтвердили, что серин — наиболее часто обнаруживаемый

акцептор ADP-рибозы в клетках млекопитающих, особенно в условиях генотоксического стресса [30, 140–144]. Идентифицированные сериновые сайты обогащены Lys-Ser и, в меньшей степени, Arg-Ser мотивами [141]. Несмотря на сравнительно недавнее открытие, серин-ADP-рибозилирование уже лучше всего изучено с точки зрения механизмов возникновения и деградации, по сравнению с другими формами ADP-рибозилирования. Синтез серин-связанного PAR катализируется PARP1 и PARP2 в присутствии нового фактора, определяющего специфичность PAR-илирования — HPF1 [27, 28]. За удаление ADP-рибозы, связанной с серинами, ответственна ADP-рибозилгликогидролаза ARH3 [145–147]. Открытие HPF1-зависимого серин-ADP-рибозилирования, хотя и резко меняет понимание функций PARP1 и PARP2, не обязательно противоречит предыдущим открытиям. Остатки глутамата и аспартата, вероятно, по-прежнему являются предпочтительной мишенью для PARP1 и PARP2 в отсутствие HPF1 [30, 148]. В структуре PARP1 сериновые сайты, обнаруженные как *in vivo*, так и *in vitro*, расположены в домене аутомодификации, близко к известным глутаматным сайтам: основные сайты модификации включают глутаматы 488 и 491 и серины 499, 507 и 519 [28, 149]. Детали координации между модификацией серина и глутамата, с одной стороны, и моно- и поли(ADP-рибозил)ированием, с другой, все еще неясны. Предполагается, что баланс этих событий будет зависеть от соотношения активных свободных и связанных с HPF1 молекул PARP в данном месте и в данное время.

### **1.2.3. Функция PAR-илирования в клеточных ответах**

#### *1.2.3.1. PAR-илирование в ответе на повреждение ДНК в контексте хроматина*

Синтезируемый PARP1 и PARP2 PAR выполняет множество клеточных функций, многие из которых ещё предстоит описать. Клеточные функции PAR-илирования в основном связаны с репарацией ДНК, так как разрыв ДНК служит классическим триггером продукции PAR. В клетках человека в ответ на повреждение ДНК большая часть активности PARP обеспечивается PARP1 (около 90%), в то время как PARP2 обеспечивает 10–15% активности синтеза PAR [150]. Хотя PARP2 часто считают каталитически менее активным аналогом PARP1 из-за его гораздо более медленной аутомодификации, следует отметить, что нокаут PARP1 или PARP2 не является летальным для клеток, т.е. оба белка могут брать на себя функции друг друга. Однако двойной нокаут обоих ферментов вызывает эмбриональную летальность. Клетки, лишённые PARP1 или PARP2, проявляют более высокую чувствительность к агентам, повреждающим ДНК, из-за генетической нестабильности [44, 151]. При использовании мышиных моделей было показано, что нокаут *PARP2* приводит к дефектам развития Т-клеток, эритропоэза и сперматогенеза, которые не

наблюдаются у мышей, лишенных PARP1, что предполагает уникальные функции PARP2 в данных процессах [152–154]. Предполагается, что PARP2 может компенсировать дефицит PARP1 в ответ на генотоксический стресс, но до сих пор неизвестно, как это достигается при относительно более низкой активности PARP2 и различиях в сродстве к повреждениям ДНК. Вероятно, в этом могут быть задействованы белки-партнёры. Такие «партнёрские» взаимодействия были показаны для PARP1: его активность в значительной степени стимулируется взаимодействием с некоторыми белками, такими как YB-1, SAM-68 и FUS [155–158]. Подобные взаимодействия, модулирующие активность PARP2, только начинают изучаться.

В ходе авто-PAR-илирования PARP1 модифицируется полимерами ADP-рибозы, достигающими размера >200 остатков и длиной до 100 нМ [159–162], которые выглядят как сильно разветвленные «звезды», обнаруживаемые с помощью электронной микроскопии [163] или атомно-силовой микроскопии [46]. Как достигается такая сложная структура, до сих пор полностью не изучено [32]. Одно из предложенных объяснений заключается в том, что разветвление катализируется PARP2, однако хорошо известно, что PARP1 также продуцирует разветвленный PAR [164–166].

Считается, что PAR-илирование представляет собой первую волну передачи сигналов в ответ на повреждение ДНК. Показано, что PAR-илирование может иметь две фазы, первая из которых представлена интенсивной автомодификацией PARP1 — главного клеточного акцептора PAR [167, 168]. Синтезированный PAR распознаётся так называемыми PAR-ридерами, содержащими распознающие PAR домены [169–173]. Они рекрутируются к повреждению ДНК для ремоделирования хроматина и инициации репарации ДНК. Например, во время эксцизионной репарации нуклеотидов привлечение фактора ХРС к УФ-повреждениям опосредуется его связыванием с PAR [174–177]. В случае двухцепочечных разрывов PARP1 важен для раннего и быстрого рекрутирования BRCA1, который контролирует начальные этапы репарации, а также обеспечивает обмен нитей во время гомологичной рекомбинации [178].

Вторая фаза ADP-рибозилирования представляет собой моно(ADP-рибозил)ирование (MAR-илирование), время жизни которого значительно превышает таковое для PAR, синтезированного в первой фазе [167]. Предполагается, что вторая фаза ADP-рибозилирования служит для релаксации хроматина на сайтах повреждения ДНК. Ранее было показано, что PAR-илирование поврежденного УФ-излучением хроматина посредством активности PARP1 важно для рекрутирования ремоделирующего хроматин фермента CHD1L [179]. Первоначальная релаксация хроматина, вызванная PAR-илированием и ремоделирующей активностью связывающих PAR APLF и

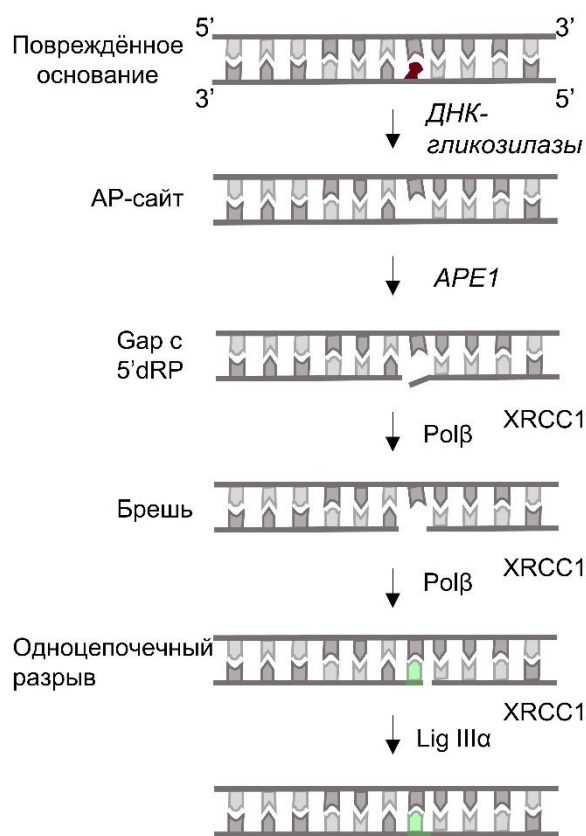


CHD1L [180–182], облегчает последующее привлечение CHD3 и CHD4 для дальнейшего ремоделирования хроматина в местах разрывов ДНК [183]. Недавно было показано, что HPF1-зависимое ADP-рибозилирование гистонов вносит основной вклад во временную релаксацию хроматина, происходящую в ответ на повреждение ДНК [168]. По всей видимости, HPF1 обеспечивает протекание второй фазы PAR-илирования, ограничивая длину продуктов реакции и модулируя модификацию гистонов [167, 168].

### 1.2.3.2. Роль PARP1 и PARP2 в BER

Одноцепочечные разрывы, апуриновые/апиримидиновые сайты (AP-сайты) и повреждения оснований в ДНК репарируются, в том числе, системой эксцизионной репарации оснований (BER) [184–186]. Ферментативное удаление поврежденного основания может происходить двумя путями, инициируемыми ДНК-гликозилазами [187–189] (**Рис.5**). В одном пути специфичная для поражения монофункциональная ДНК-гликозилаза удаляет поврежденное основание, и полученный AP-сайт расщепляется на его 5'-стороне AP-эндонуклеазой 1 (APE1), создавая брешь в один нуклеотид, фланкированную 2'-дезоксирибозо-5'-фосфатом (5'-dRP). Данный фрагмент нестабилен в условиях *in vitro* и, по всей видимости, токсичен для клетки [190]. ДНК-полимераза  $\beta$  (Pol $\beta$ ) осуществляет синтез ДНК с заполнением бреши на 3'-конце и удаляет 5'-dRP, образуя одноцепочечный разрыв, пригодный для лигирования с помощью ДНК-лигазы III $\alpha$  (LigIII $\alpha$ ) в комплексе с XRCC1 [188, 189]. В альтернативном пути фигурируют бифункциональные гликозилазы, специфичные для окислительного повреждения оснований ДНК. Они способны расщеплять сахарофосфатный остов ДНК с 3'-стороны от AP-сайта, в результате чего образуются 3'-PO $_4$ , либо 3'-концевой  $\alpha,\beta$ -ненасыщенный альдегид в зависимости от механизма расщепления AP-сайта:  $\beta/\delta$ - или  $\beta$ -элиминирование, соответственно [191]. BER может протекать по короткозаплаточному пути (Short patch, SP-BER) и длиннозаплаточному пути (Long patch, LP-BER). Эти пути требуют разного набора белков-участников.

Точное функционирование BER сильно зависит от регуляции каждой стадии процесса. Координация этого многоэтапного процесса обеспечивается белок-белковыми взаимодействиями в рамках динамических репаросомных комплексов [11, 14, 192] и регулируется PAR-илированием [1]. Так, быстрое рекрутирование основного каркасного фактора BER, XRCC1, в места повреждения ДНК зависит от активности PARP1 и PARP2 [193–197]. По всей видимости, PARP1, PARP2 и XRCC1 обеспечивают создание динамичной платформы для привлечения факторов репарации ДНК. Так, многие участники BER (XRCC1, Pol $\beta$ , PNKP, LigIII $\alpha$  и LigI), содержат PAR-связывающие мотивы [170, 198]. Кроме того, для XRCC1 и LigIII $\alpha$  было показано более эффективное связывание с PAR, ковалентно связанным с PARP1 [199, 200].



**Рис.5.** Схема протекания SP-BER у человека.

Стоит отметить, что помимо синтеза PAR, PARP1 и PARP2 и способны напрямую взаимодействовать с белками-участниками BER, а также с повреждениями-интермедиатами BER [11, 12, 69, 200]. Было показано, что сродство APE1 к Polβ, XRCC1 и PARP1 модулируется интермедиатами BER и зависит от типа повреждения ДНК [197], а также показано, что PAR-илирование влияет на активность Polβ и других ферментов SP- и LP-BER [10, 67, 68, 201]. Конкуренция PARP1 и PARP2 с белками-эффекторами BER за связывание повреждения ДНК может играть важную роль в регуляции всего процесса. При этом диссоциация данных ферментов из комплекса с ДНК в процессе PAR-илирования будет позитивно регулировать протекание репарации ДНК, освобождая повреждения ДНК для факторов репарации [10, 12]. Так, было продемонстрировано, что связывание PARP1 и PARP2 с повреждениями ДНК-интермедиатами BER подавляет протекание реакций, катализируемых Polβ и LigIIIα [12]. При этом диссоциация ферментов в процессе PAR-илирования приводит к частичному или полному снятию ингибирования. Примечательно, что низкая активность PARP2 в реакции аутомодификации коррелировала с эффектами, оказываемыми им на различные стадии BER: даже в присутствии NAD<sup>+</sup> PARP2 частично оставался связанным с повреждением ДНК, продолжая ингибировать его репарацию [12]

Хотя Ханжиликова с соавторами предположили перекрывающиеся роли PARP1 и PARP2 в реализации BER и/или процессов репарации одноцепочечных разрывов, имеющиеся данные о сродстве к PARP2 и его активации различными ДНК-структурами предполагают вовлечение данного фермента в более поздние стадии BER [37, 57, 69, 71, 98]. Более того, взаимодействия PARP2 с белками BER XRCC1, Pol $\beta$  и LigIII $\alpha$  были продемонстрированы в клетках HeLa [202]. Анализ специфичности взаимодействия PARP1 и PARP2 с различными интермедиатами BER с помощью атомно-силовой микроскопии (АСМ) с использованием длинных дуплексов ДНК, также говорит в пользу вклада PARP2 в более поздние стадии BER [69]. Эксперименты *in vitro* подтверждают эту гипотезу, показывая большее влияние именно PARP2 на стадию включения dNTP и лигирования [12]. Тем не менее окончательная функция PARP2 в этом процессе пока не ясна.

### 1.2.3.3. PAR — драйвер образования немембранных компартментов

Было показано, что повреждение ДНК вызывает сборку временных компартментов, концентрирующих поврежденную ДНК и факторы репарации [203, 204]. Предполагается, что один из механизмов, обеспечивающих повышение концентрации репарационных факторов вблизи повреждения ДНК — разделение жидких фаз (Liquid-Liquid Phase Separation, LLPS) [33, 115]. Все чаще признается, что LLPS обеспечивает молекулярную основу для образования субклеточных безмембранных органелл, таких как тельца Кахаля, параспеклы и стрессовые гранулы [205, 206]. LLPS представляет собой процесс расслоения гомогенного полимерного раствора на две фазы, содержащие разные концентрации макромолекул. Согласно базовой модели LLPS, селективная концентрация нужных молекул может происходить спонтанно в силу законов термодинамики.

Предполагается, что PAR представляет собой необходимый компонент для сборки различных природных жидкостных биомолекулярных конденсатов, благодаря его низкой сложности, мультивалентности и высокому отрицательному заряду [113]. Считается, что PAR привлекает белки, участвующие в LLPS, таких как FUS, EWSR1 и TAF15 в места повреждения ДНК [169, 207–209].

FUS (Fused in sarcoma) — один из основных белков, обеспечивающих LLPS в ответ на повреждение ДНК [210–212]. Этот многофункциональный ДНК/РНК-связывающий белок участвует в сплайсинге, трансляции и транспорте мРНК [213]. Роль FUS в поддержании стабильности генома была показана как *in vivo*, так и *in vitro*. Так, мыши, лишенные FUS, гиперчувствительны к ионизирующему излучению и демонстрируют дефекты сперматогенеза и хромосомную нестабильность [214, 215]. В клетках FUS очень рано рекрутируется в места повреждения ДНК [211, 216]. N-концевая область FUS (остатки 1–165) представляет собой высококонсервативный домен низкой сложности, состоящий в

основном из глутамина, глицина, серина и тирозина. Этот домен обеспечивает белок-белковые взаимодействия и управляет агрегацией FUS в белковые включения [217]. Несколько исследований показали, что N-концевой FUS претерпевает обратимый динамический фазовый переход между дисперсным состоянием, жидкими каплями и гидрогелями [218, 219]. Как показано *in vitro*, продукция PAR в местах разрывов ДНК приводит к связыванию белка FUS и последующей селективной концентрацией поврежденной ДНК в компартментах PAR-FUS [209, 211]. Была также продемонстрирована способность PAR и FUS образовывать конденсаты *in vivo* [207, 219]. Было показано образование структур, содержащих FUS, в местах повреждения ДНК. Структуры напоминали собой капли, и их размер напрямую зависел от уровня экспрессии FUS [207]. Они оказались сферическими, претерпевали частые события слияния и быстро релаксировали в сферическую форму. Значения вязкости в этих структурах оцениваются примерно в 10–100 раз выше, чем у воды [219]. На основании результатов формирования конденсатов при активации PARP1 на повреждениях ДНК было предположено, что FUS своим прямым связыванием с PAR облегчает репарацию ДНК, образуя компартменты, содержащие поврежденную ДНК и факторы репарации. Гидролиз PAR с помощью PARG делает возможным диссоциацию этих компартментов после акта репарации [10, 211].

Помимо репарации ДНК, существуют предпосылки к установлению роли PAR в формировании ядрышек и регуляции транскрипции. Так, до 40% внутриклеточных молекул PARP1 концентрируются в ядрышках, а нарушение ферментативной активности PARP1 приводит к разборке ядрышек [220, 221]. При транскрипции PAR-илирование модулирует ДНК-связывающую активность специфических факторов транскрипции и, следовательно, влияет на их рекрутирование, запуская структурные перестройки хроматина и модулируя стабильность и деградацию специфических мРНК [222]. Однако детали подобных взаимодействий и механизмов ещё предстоит изучить. Таким образом, PAR важен для репарации ДНК и других высокодинамичных внутриклеточных процессов.

#### **1.2.4. Деграция поли(ADP-рибозы)**

Как сказано выше, PAR-илирование — это обратимая посттрансляционная модификация. Её обратимость необходима для восстановления активности модифицированных белков, архитектуры хроматина, гистоновых меток и энергетического баланса в клетке. Наряду с ферментами, синтезирующими PAR, и белками, взаимодействующими с этим полимером есть и ферменты, деградирующие PAR, называемые «эрайзерами» (от английского слова «eraser» — «ластик») [223]. Основной фермент, удаляющий разветвлённый длинный PAR — поли(ADP-рибоза)-гликогидролаза

(PARG). Человеческий PARG представляет собой конститутивно-активный фермент, который обладает как экзогликозидазной, так и эндогликозидазной активностью. PARG в основном функционирует как экзогликозидаза, последовательно расщепляя гликозидные связи с белково-дистального конца полимера, подобно углеводным гликозилгидролазам [224]. Функция PARG критична для клетки, так как нокаут гена PARG приводит к накоплению PAR, раннему апоптозу в клеточных линиях человека и эмбриональной летальности у мышей [147, 225–227]. PARG играет важную роль во время реакции клетки на повреждение ДНК: он поддерживает стабильные уровни PAR и рециркуляцию авто-PAR-илированного PARP1. Стабилизация уровней PAR имеет решающее значение для защиты клетки от PAR-танатоса — независимого от каспаз PAR-опосредованного типа клеточной гибели [169, 228]. Как описано выше, PAR-танатос запускается высвобождением апоптоз-индуцирующего фактора (AIF) из митохондрий в ядро в ответ на проникновение PAR в цитоплазму [229, 230]. После перемещения в ядро AIF приводит к крупномасштабной фрагментации ДНК и конденсации хроматина, за которой следует гибель клеток [117]. Активность PARG, как было показано, защищает от PAR-танатоса, индуцированного окислительным стрессом, путем предотвращения высвобождения AIF из митохондрий [231].

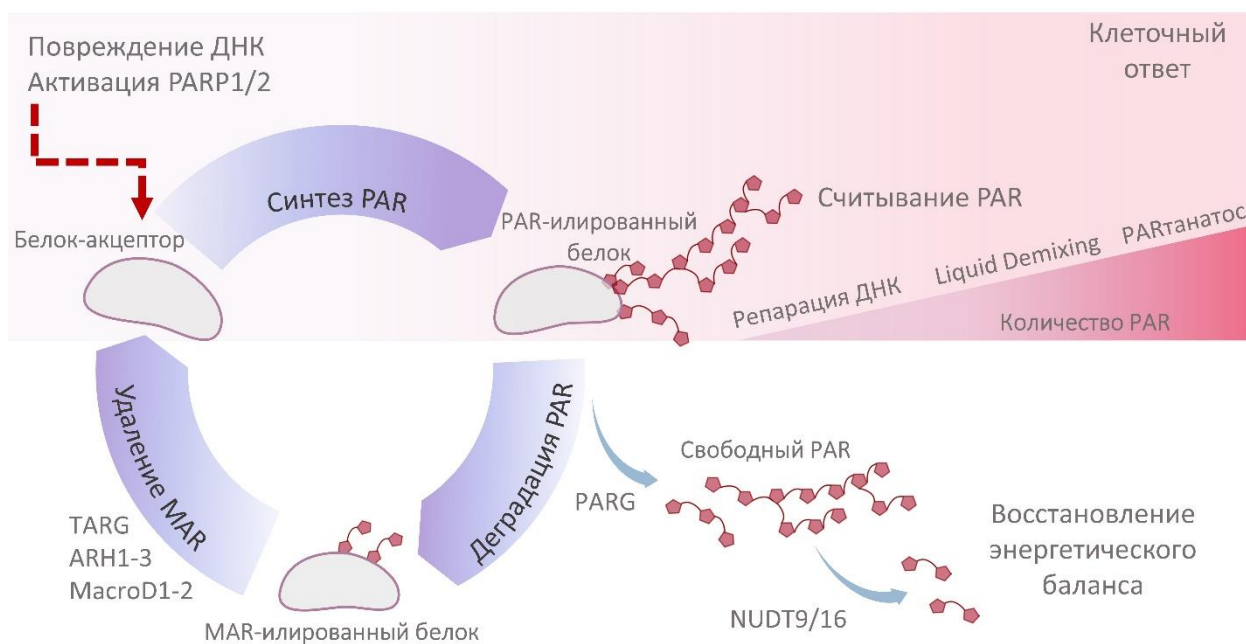
PARG, в силу своего механизма действия, не удаляет первый остаток ADP-рибозы, связанный с аминокислотным остатком белка-мишени, а также имеет плохую процессивность на коротких цепях PAR [232–234]. Тем не менее, полное удаление продуктов PAR-илирования необходимо для восстановления функционирования клеточных систем после репарации ДНК. Продукт реакции, катализируемой PARG — белок, модифицированный моно(ADP-рибозой) (MAR), который служит субстратом ферментов, удаляющих MAR. Предварительная PARG-опосредованная деградация — необходимое условие для полного удаления продуктов PAR-илирования [235]. MAR возникает как продукт MAR-илирования или действия PARG и удаляется несколькими ферментами, принадлежащими к семейству ADP-рибозилгидролаз (ARH1, ARH2 и ARH3), макромоносодержащих ADP-рибозилгидролаз (MacroD1, MacroD2 и TARG1) и некоторыми фосфодиэстеразами (NUDT9 и NUDT16) [236–238].

Семейство ADP-рибозилгидролаз (ARH) состоит из трех родственных белков [236]. Хотя субстратная специфичность ARH2 еще не ясна, ARH1 представляет собой высокоактивную ADP-рибозил-аргинингидролазу, а ARH3 представляет собой ADP-рибозил-серингидролазу [146, 239]. Мыши, у которых отсутствует ARH1, предрасположены к опухолям, имеют повышенную заболеваемость аденокарциномой, лимфомой с метастазами [240]. Эмбриональные фибробласты мышей с дефицитом ARH3

демонстрируют повышенную устойчивую степень серин-ADP-рибозилирования *in vivo* [145]. В отличие от ARH1, ARH3 также обладает активностью в отношении O-гликозидной связи PAR, сходной с экзогликозидазной активностью PARG [237]. Однако ARH3 не спасает *Drosophila* или мышей с генетическим нокаутом *Parg* от гибели клеток или накопления PAR, что указывает на то, что он не может компенсировать потерю PARG [225]. Благодаря своему избытку в цитоплазме, ARH3 участвует во второй стадии гидролиза PAR после высвобождения свободных ответвлений полимера PAR другими «эрайзерами». Это может помочь снизить цитоплазматические уровни PAR, в конечном итоге предотвращая PAR-танатос [237].

В то время как ARH удаляют только MAR-илирование аргинина и серина, ферменты, содержащие макродомены, способны удалять MAR-илирование аспартата и глутамата. Среди них MacroD1 и MacroD2 расщепляют химическую связь между MAR и акцепторным белком, в то время как TARG1 обладает уникальной способностью расщеплять как MAR-илированные, так и PAR-илированные боковые цепи аспартатных и глутаматных остатков [238]. Точная роль TARG1 в деградации PAR остается невыясненной, но наблюдается релокация TARG1 в нуклеоплазму и привлечение к сайтам повреждения ДНК в ответ на PAR-илирование [238]. Каталитический домен TARG1 отличается от PARG и непосредственно гидролизует карбоксиэфирные связи ADP-рибозы [238]. Способность TARG1 удалять целые цепи PAR из самой проксимальной точки прикрепления полимера уникальна среди известных ферментов, удаляющих PAR.

Подобно TARG1, MAR-гидролазная активность MacroD1 и MacroD2 также избирательно направлена на сложноэфирные связи между остатками аспартата и глутамата и ADP-рибозой [169, 234]. Эта активность может играть регулируемую роль *in vivo*. Так, MacroD2, участвует в рециркуляции аутомодифицированного PARP1, восстанавливая его каталитическую активность путём удаления MAR [241]. Ключевая роль в удалении аутоингибиторных остатков MAR с PARP1 с помощью MacroD2 объясняет накопление MAR-илированного PARP1 при делеции гена *MACROD2* в клетках колоректального рака человека [242]. Таким образом, в настоящее время механизм реактивации PARP1 и удаления PAR предполагает две фазы: удаление протяженных цепей PAR с помощью PARG и удаление образовавшегося MAR специфическими рибозилгидролазами, либо макродомен-содержащими ферментами, в зависимости от природы аминокислотного остатка (Рис.6).



**Рис.6.** Возникновение и деградация PAR в ответ на генотоксический стресс: в ответ на повреждение ДНК, PARP1/2 катализируют синтез PAR. В зависимости от обширности повреждений ДНК и количества синтезированного PAR развиваются различные варианты клеточных ответов, от репарации ДНК до гибели клетки. Синтезированный PAR разрушается с образованием MAR-илированного белка и свободного PAR, который затем может служить субстратом для синтеза АТФ. MAR также удаляется специфическими ферментами.

Стоит отметить, что в протеомных исследованиях сайтов PAR-модификации было обнаружено, что модифицированные остатки серина не только преобладали, но и были самыми стабильными *in vivo*. Это подтверждается тем фактом, что рибозилирование по остаткам аспартата и глутамата обнаруживаются только в клетках, нокаутных по *PARG* [243]. В то же время MAR-илирование серина достоверно регистрируют в клетках дикого типа [147]. Как говорилось выше, стабильность этой модификации регулируется преимущественно ARH3 [147]. Иными словами, каталитической активности комплекса HPF1:PARP1/2 противодействуют ферменты, удаляющие PAR: PARG и ARH3 [145, 146, 234].

Недавно была предложена роль фосфодиэстераз в гидролизе PAR. Этому способствовало открытие группы фосфодиэстераз, процессирующих ADP-рибозу, которая включает членов надсемейства NUDIX (нуклеозиддифосфаты, связанные с фрагментом-X) NUDT5, NUDT9 и NUDT16 [149, 244]. Эти ферменты нацелены на фосфодиэфирную связь внутри фрагмента ADP-рибозы. Следовательно, их активность не зависит от аминокислотного остатка, связанного с PAR, и длины полимера. Эти ферменты следует

классифицировать как частичные «эрайзеры» поскольку они оставляют остаток фосфорибозы, присоединенный к целевому белку. Однако, эти ферменты, по всей видимости, играют важную роль в восстановлении уровня АТФ и поддержании энергетического баланса клетки [245].

Синтез PAR из  $\text{NAD}^+$  представляет собой энергозатратный процесс, и важно быстро восстановить клеточный уровень молекул-переносчиков энергии (АТФ и  $\text{NAD}^+$ ) после интенсивной реакции PAR-илирования, которая может приводить к уменьшению внутриклеточного пула  $\text{NAD}^+$  на 90% [246, 247]. Это, в свою очередь, приводит к уменьшению эффективности таких  $\text{NAD}^+$ -зависимых процессов как цикл Кребса и окислительное фосфорилирование, снижению синтеза АТФ, энергетическому истощению клетки и некрозу [247]. Вероятно, именно ферменты NUDT5, NUDT9 и NUDT16 задействованы в восстановлении энергетического баланса клетки после PAR-илирования [248, 249]. Так, было показано, что NUDT5 генерирует АТФ из свободной ADP-рибозы и пирофосфата и пополняет уровень АТФ в ядре [250]. Вероятно, субстратом для него может служить в том числе ADP-рибоза, возникающая при гидролизе  $\text{NAD}^+$  ферментами PARP1 и PARP2. Таким образом, ферменты, гидролизующие PAR играют важную роль не только в восстановлении активности белков-мишеней, но и в поддержании энергетического баланса клетки.

### **1.3. Фактор PAR-илирования гистонов 1 (HPF1) — новый белок-партнёр PARP1/2**

#### **1.3.1. Образование гибридного активного центра PARP1/2:HPF1**

Первоначально было установлено, что PARP1 и PARP2 модифицируют в белках преимущественно остатки глутамата и аспартата, а также лизина и аргинина [243, 251, 252]. Однако недавние исследования, в том числе протеомные, показали, что остатки серина также являются распространенными акцепторами PAR в клетках человека [29, 30, 146]. Связанный с серином PAR возникает в клетке в ответ на повреждение ДНК [30]. Установлено, что PARP1 и PARP2 необходимы, но недостаточны для PAR-илирования остатков серина [31]. Такое расширение аминокислотной специфичности происходит при участии фактора PAR-илирования гистонов 1 (HPF1). Данный белок образует как с PARP1, так и с PARP2 временный непрочный комплекс: значения констант диссоциации комплексов HPF1:(PARP1:NCP) и HPF1:(PARP2:NCP) составляют 790 и 280 нМ соответственно ( $K_D$  комплексов HPF1:PARP1 и HPF1:PARP2 лежат в микромолярном диапазоне) [53, 87, 99]. HPF1 формирует с PARP1 и PARP2 совместный активный центр, в котором и происходит инициация синтеза PAR и последующее PAR-илирование по остаткам



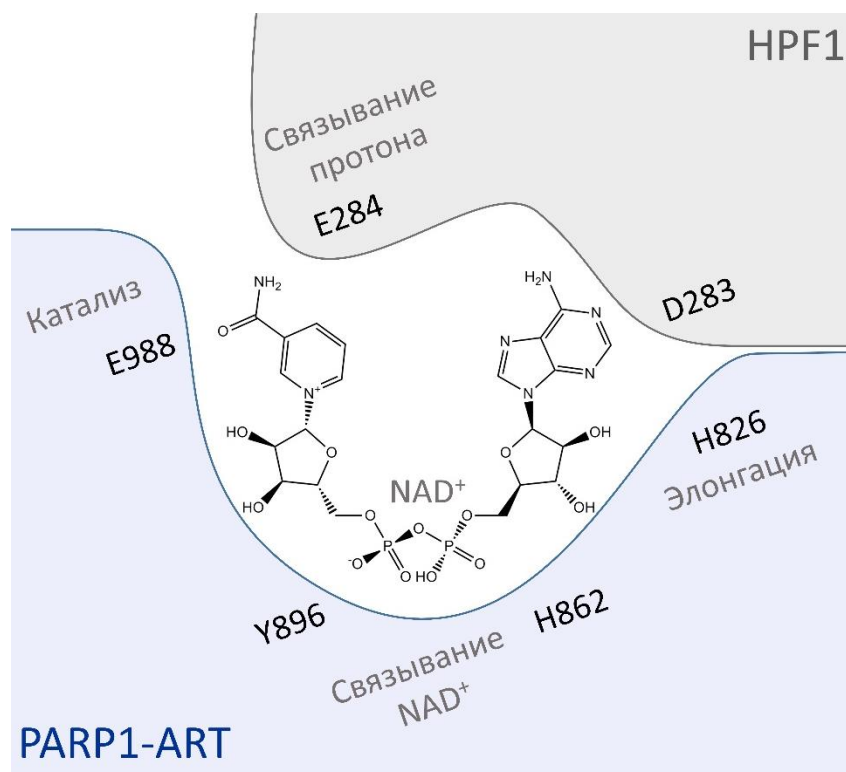
серина [26, 28]. Позже было показано, что специфическое взаимодействие HPF1 с PARP1 и PARP2 облегчает реакцию PAR-илирования коровых гистонов (в отсутствие HPF1 PARP1/2 не модифицируют коровые гистоны *in vitro*) [28, 29, 31].

Белок HPF1 человека имеет молекулярную массу 40 кДа. Изначально было показано, что HPF1 высоко консервативен у многоклеточных животных, но также обнаружен у небольшого числа видов простейших [26]. Он представляет собой гомолог белка CG1218 *D. melanogaster*, имеющего PAR-связывающий домен PBZ. В отличие от CG1218, человеческий HPF1 не содержит N-концевой домен PBZ, и состоит из одного домена DUF2228 с неизвестной функцией. Отсутствие домена PBZ коррелирует с тем, что HPF1 не связывает PAR *in vitro* [26].

Взаимодействие HPF1 с PARP1/2 многократно усиливается присутствием ДНК и NAD<sup>+</sup>. Как описано выше, PARP1 и PARP2 имеют спиральный субдомен HD, который быстро разворачивается при распознавании повреждения ДНК, открывая сайт связывания NAD<sup>+</sup> [61]. Удаление HD усиливает взаимодействие HPF1:PARP1/2 *in vitro*, в то время как с полноразмерными ферментами HPF1 взаимодействует слабо [27]. Предполагается, что этот субдомен ингибирует связывание ферментов с HPF1, а для реализации их взаимодействия необходимо ДНК-индуцированное разворачивание HD и, возможно, связывание NAD<sup>+</sup>. Иными словами, HPF1 образует совместный активный центр только с активированными PARP1 и PARP2.

Методом рентгеноструктурного анализа и криоэлектронной микроскопии разрешена структура HPF1 в комплексе с каталитическим доменом PARP2 (HD-домен deletирован) [27, 100]. Обнаружено, что для взаимодействия HPF1 с PARP1/2 важен консервативный остаток Asp283 C-концевой области HPF1, который контактирует с His826 в PARP1 (His381 в PARP2) (**Рис.7**). Важно отметить, что эти остатки гистидина в PARP1/2 критичны для этапа элонгации в реакции PAR-илирования, то есть для удлинения цепи PAR [53, 87, 253].

Механизм переключения аминокислотной специфичности PARP1/2 был установлен с помощью мутационного анализа и исследования структуры комплекса HPF1:PARP2. Предполагается, что в общий активный центр вводится каталитический остаток Glu284 HPF1 [27]. Каталитические центры PARP1 и PARP2 содержат один остаток глутамата (Glu988 и Glu545 соответственно), каждый из которых, как было установлено, имеет решающее значение для инициации PAR-илирования [254] (**Рис.7**).



**Рис.7.** Схематическое изображение совместного активного центра PARP1 и HPF1 с описанием функций аминокислотных остатков. Триада Н-У-Е (Н826, У896, Е988) задействована в позиционировании  $\text{NAD}^+$  в АDP-рибозилтрансферазном центре (ART) и катализе. HPF1 предоставляет остаток глутамата (Е284), обеспечивающий депротонирование остатка серина, что повышает его нуклеофильность. Остаток Е988 PARP1 участвует в нуклеофильной атаке связи никотинамид-рибоза депротонированным остатком серина, завершая стадию инициации. В гибридном активном центре остаток Н826 PARP1, необходимый для элонгации, экранирован остатком D283 HPF1.

По всей видимости, одного остатка глутамата в активных центрах PARP1 и PARP2 недостаточно для АDP-рибозилирования остатков серина — слабого нуклеофила [28]. Образование гибридного активного центра HPF1 и PARP1/2 располагает Glu284 HPF1 рядом с каталитическим глутаматом PARP1/2 и молекулой  $\text{NAD}^+$ . Мутантный HPF1 с заменой Glu284 на Ala не способен переключать аминокислотную специфичность PARP1/2 в реакции PAR-илирования на остатки серина [27]. Вероятно, депротонированный Glu284 HPF1 действует как основание в реакции инициации синтеза PAR, оттягивая протон от акцепторного остатка серина и тем самым повышая его нуклеофильность. Иными словами, HPF1 способствует увеличению нуклеофильности серина для эффективного переноса остатка АDP-рибозы на его остаток.

Подобным образом повышение нуклеофильности серина происходит в активных центрах сериновых протеаз, эстераз и липаз, с той разницей, что в случае протеаз этот

процесс обеспечивает каталитическая триада Ser-His-Asp [255]. Внесение каталитического остатка в гибридный активный центр демонстрируют белки, активирующие ГТФазу, — они тоже вводят необходимый для катализа аминокислотный остаток в активный центр фермента [27]. В целом, подобная схема регуляции активности ферментов не является новой, но для белков семейства PARP она показана впервые.

Помимо переключения аминокислотной специфичности, HPF1 приводит к образованию более коротких полимеров PAR [26]. Показано, что Asp283 HPF1 взаимодействует с His381 PARP2 (и аналогичным His826 PARP1) и занимает отрицательно заряженный связывающий карман, который во время реакции удлинения цепи PAR нужен для узнавания пирофосфатной группы акцепторной единицы ADP-рибозы (**Рис.7**) [27]. При этом взаимодействие с этим остатком гистидина критично для образования гибридного активного центра: мутант PARP1 с реверсированием заряда в позиции 826 (His826Glu) терял способность формировать совместный активный центр с HPF1. Этот мутант катализировал PAR-илирование остатков аспартата и глутамата, но синтезировал только короткие полимеры PAR. Таким образом, связывание HPF1 с PARP1/2 блокирует ответственный за удлинение полимера остаток гистидина (His826 и His381 в активных центрах PARP1 и PARP2 соответственно) и исключает тем самым элонгацию в реакции синтеза PAR.

Подавление элонгации синтеза PAR в гибридном активном центре объясняет результаты ранних исследований HPF1, которые показали подавление активности PARP1 [53, 87, 99]. Использование в данных работах высоких концентраций HPF1 приводило к насыщению активных центров PARP1 данным фактором, и затрудняло элонгацию, что выражалось в снижении количества синтезируемого полимера.

С эффектами, оказываемыми HPF1 на синтез PAR, согласуется его влияние на  $\text{NAD}^+$ -гидролазную активность PARP1 и PARP2. Способность PARP1 гидролизовать  $\text{NAD}^+$  без сопутствующего синтеза PAR была обнаружена ранее и в отсутствие HPF1 [256]. В недавних работах было показано, что HPF1 в высоких концентрациях по отношению к PARP1 (20-кратный избыток) стимулирует эту активность [87]. Подобное переключение PARP1 с процессивного синтеза PAR на гидролиз  $\text{NAD}^+$  с образованием свободной ADP-рибозы может быть объяснено действием двух факторов: подавлением элонгации и отсутствием доступных сайтов инициации. Так, при насыщающих концентрациях HPF1, элонгация PAR невозможна, так как заблокирован каталитический остаток гистидина. В то же время, число сайтов инициации PAR-илирования конечно, и когда они “исчерпаны”, PARP использует воду в качестве акцептора ADP-рибозы, гидролизуя  $\text{NAD}^+$ .

### 1.3.2. Привлечение PARP1, PARP2 и HPF1 на сайты повреждения ДНК

Данные, полученные на начальных этапах изучения HPF1, дали основание предполагать, что этот белок вместе с PARP1 и PARP2 вовлечен в репарацию ДНК. Было показано, что HPF1 копреципитирует с PARP1. Филогенетический анализ показал, что почти все организмы, содержащие PARP1, имеют потенциальный гомолог HPF1, что позволяет предположить, что они могли эволюционировать совместно [26]. В совокупности эти факты дали основания для дальнейшего исследования взаимодействия PARP1 и HPF1. Было показано, что HPF1 ограничивает авто-PAR-илирование PARP1 *in vivo* и *in vitro* и рекрутируется к местам повреждения ДНК. Нокаут *HPF1* значительно повышает чувствительность клеток к обработке агентами, алкилирующими ДНК, такими как метилметансульфонат (MMS), и повышает чувствительность клеток к ингибированию PARP. Оказалось, что двойной нокаут *HPF1<sup>-/-</sup>PARP1<sup>-/-</sup>* приводит к некоторому снижению чувствительности клеток к MMS и ингибиторам PARP по сравнению с одиночными нокаутами, то есть частично восстанавливает фенотип дикого типа [26]. Обработка ингибиторами PARP1 приводит к задержке и PARP1 и HPF1 на сайтах повреждений ДНК [26, 71]. Аналогично длительность удержания PARP1 на сайтах повреждения ДНК в случае нокаута гена *HPF1* увеличивается [54].

Недавно было показано, что HPF1 контролирует характеристики синтезируемого PAR, то есть его длину и разветвление, и оказывает влияние на привлечение различных классов PAR-связывающих белков. Так, дефицит HPF1 приводит к заметному снижению рекрутирования макромомен-содержащих белков и гистонового шаперона APLF, а его гиперэкспрессия приводила к синтезу более коротких цепей PAR [168]. Было показано, что HPF1-зависимое PAR-илирование гистонов играет ключевую роль в релаксации хроматина как на сайтах повреждения ДНК, так и в процессе регуляции транскрипции [168].

Несмотря на большое количество накопленных данных, полная картина и динамика привлечения PARP1, PARP2 и HPF1 на сайты повреждения ДНК остаётся не до конца понятной. Было показано, что в течение первых 10 с с момента повреждения ДНК PARP1 рекрутируется в места повреждения ДНК в клетках. PARP2 рекрутируется на сайты повреждения ДНК позже PARP1. Показано, что каталитическая активация PARP1 ускоряет привлечение PARP2, однако не является обязательным условием. В отсутствие PARP1, PARP2 все же привлекается на сайты повреждения ДНК, хотя и с некоторой задержкой по времени [72].

HPF1 привлекается на сайты повреждения вместе с PARP1, при этом динамика привлечения HPF1 не зависит от PAR-илирования [71, 72]. Было предложено, что рекрутирование HPF1 опосредовано, по всей видимости, белок-белковыми

взаимодействиями с PARP1, а именно с его С-концевым доменом [26]. Хотя Махадеван с соавторами показали, что HPF1 в ядре диффундирует медленнее, чем PARP1, но все же быстрее, чем PARP2 [73], было продемонстрировано, что нокаут PARP1 полностью подавляет привлечение HPF1 на сайты повреждения ДНК. При этом присутствие PARP2, по всей видимости, не может компенсировать потерю PARP1. Дополнительно было показано, что PARP1, имеющий мутации остатков Leu1013 и Trp1014 (Leu1013Ala/ Trp1014Ala) не способен рекрутировать HPF1. Эти данные указывают на то, что взаимодействие HPF1 с этими двумя последними остатками PARP1 имеет решающее значение для накопления HPF1 в местах повреждения [168].

После рекрутирования PARP1 и HPF1 к участкам повреждений ДНК, последний остается на поврежденных сайтах дольше, чем сам PARP1 [26, 27, 54, 148, 168]. В течение 2 мин после индукции повреждений ДНК, PARP1 покидает сайты повреждения, в то время как HPF1 находится там до 5 мин [26, 148]. Эта разница в скоростях высвобождения PARP1 и HPF1 объясняет более медленную волну ADP-рибозилирования гистонов по сравнению с аутомодификацией PARP1, наблюдаемую в клетках, обработанных H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Кроме того, модификация PARP1 оказывается более короткоживущей, по сравнению с модификацией гистонов [168]. По всей видимости, после быстрого привлечения, PAR-илирования и высвобождения PARP1, HPF1 задерживается на сайтах повреждения ДНК и обеспечивает (вероятно, совместно с PARP2) пролонгированную модификацию гистонов и существование как минимум двух волн PAR-илирования [168]. Этот факт может указывать на то, что PARP2 играет специфическую роль в модификации гистонов.

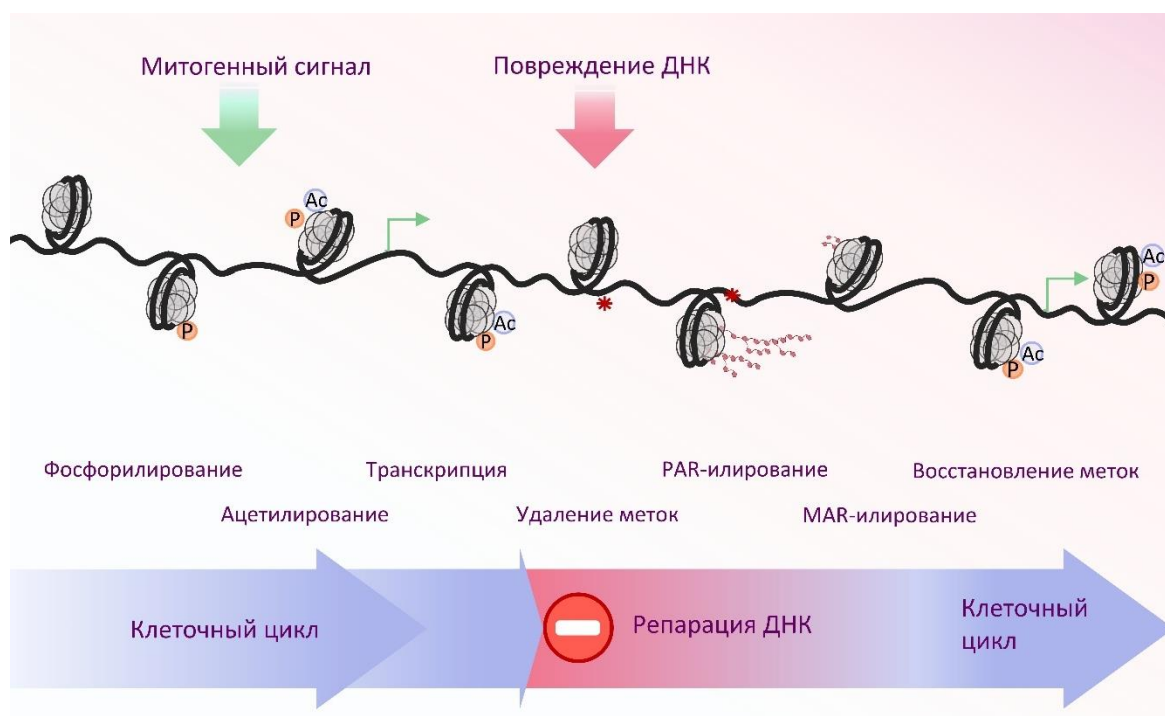
Примечательно, что доля привлеченного на сайты повреждений HPF1 намного ниже, чем PARP1 или PARP2 [73, 76, 168]. Эти результаты, по-видимому, отражают внутриклеточные концентрации этих белков: концентрация HPF1 (0,1 мкМ) намного ниже концентрации PARP1 (2 мкМ) [30]. Учитывая более низкую скорость диффузии HPF1 и гораздо более низкий уровень накопления в местах повреждения ДНК по сравнению с PARP1, существует потенциальная дилемма, заключающаяся в том, что HPF1 не может физически «посетить» все сайты достаточно быстро, чтобы модифицировать при связывании активность PARP1 и гарантировать, что все PAR-илирование будет происходить по остаткам серина [73]. Однако, в свете данных об изменении характера синтезированного PAR в клетках с гиперэкспрессией HPF1, стоит отметить, что именно его практически 20–50-кратный недостаток по отношению к PARP1 обеспечивает надлежащую передачу сигнала о повреждении ДНК, а его избыток нарушает этот процесс [168]. Таким образом, PARP1, HPF1 и затем PARP2 совместно локализуются в местах повреждения ДНК в составе хроматина, а локальная концентрация PARP1 значительно превосходит таковую для HPF1.

Следовательно, в клетках PARP1 находится не только в комплексе с HPF1, но и в свободном состоянии .

### **1.3.3. PAR-илирование гистонов и канонические гистоновые метки**

По всей видимости, одна из функций PAR-илирования гистонов представляет собой контроль состояния хроматина во время и после повреждения ДНК. Было показано, что наиболее предпочтительными субстратами модификации PARP1/2:HPF1 являются гистоны H2B и H3, а именно их аминокислотные остатки H2BS6, H3S28 и H3S10 [28]. При этом H3S10 — более эффективный акцептор ADP-рибозы по сравнению H3S28 [30]. Примечательно, что данные сайты PAR-илирования гистонов являются в то же время сайтами фосфорилирования, что наталкивает на мысль о реципрокном характере возникновения данных пострепликационных модификаций [29, 257]. Остаток H2BS6 фосфорилируется в начале митоза, после его завершения фосфорилирование полностью исчезает. Данная ПТМ выражена в центромерных и прицентромерных областях, а блокирование её возникновения приводит к нарушению анафазы и неполному цитокинезу [258]. Фосфорилирование H3S10 инициируется в прицентромерном гетерохроматине в клетках поздней интерфазы G2. Фосфорилирование H3, по-видимому, распространяется по всему хроматину в процессе его конденсации. В целом, существует точная пространственная и временная корреляция между фосфорилированием H3 и начальными стадиями конденсации хроматина [259]. PAR-илирование H2BS6 и H3S10 может иметь регуляторный эффект и вызывать остановку клеточного цикла в случае повреждения ДНК (**Рис.8**). В пользу этого говорят исследования, показавшие, что PAR-илирование H2BS6 ингибирует конденсацию хроматина и организацию структур более высокого порядка до завершения репарации [260].

Фосфорилирование остатков гистона H3 (H3S28 и H3S10) также вовлечено в регуляцию транскрипции [261]. По всей видимости, в контексте регуляции транскрипции важную роль играет сочетание фосфорилирования H3S10 с ацетилизацией остатков лизина H3K9 или H3K14 [262–264]. В частности, быстрое и временное фосфорилирование гистона H3 в S10 и S28 с помощью митоген- и стресс-зависимых киназ MSK1 и MSK2 наблюдается при транскрипционной активации генов раннего ответа [263]. Было показано, что MSK1/2-опосредованное фосфорилирование H3S28 на стресс-чувствительных промоторах способствует диссоциации корепрессорных комплексов HDAC и, таким образом, усилению локального ацетилирования гистонов и последующей активации транскрипции стресс-индуцированных генов [261].



**Рис.8.** Изменение паттерна посттрансляционной модификации гистонов при продвижении по клеточному циклу и повреждении ДНК.

На данный момент показано, что PAR-илирование гистона H3 по серинам препятствует его ацетилированию, и наоборот, ацетилирование H3K9 достаточно для блокирования PAR-илирования H3S10 [265]. Иными словами, фосфорилирование и ацетилирование негативно влияет на HPF1-зависимое PAR-илирование гистонов. Это объясняет вклад гистоновых деацетилаз в регуляцию репарации ДНК [266, 267]. Было показано быстрое деацетилирование H3K9 и H3K14 в ответ на повреждение ДНК, которое, вероятно, открывает возможность для PAR-илирования H3 [268, 269]. В то же время, ацетилирование ограничивает распространение PAR-илирования гистонов, препятствуя чрезмерному расширению сигнала о повреждении, а восстановление ацетилирования происходит при окончании процесса репарации ДНК. Было установлено, что клетки, нокаутные по ARH3, показывают более продолжительное снижение уровня ацетилирования H3K9, в ответ на повреждение ДНК, по сравнению с клетками дикого типа. По всей видимости, стабильное ADP-рибозилирование гистонов препятствует восстановлению уровня их ацетилирования [147]. Это может приводить к взаимному исключению ацетилирования H3K9 и H3K14 и PAR-илирования гистонов (**Рис.8**).

Таким образом, баланс между PAR-илированием и фосфорилированием серинов регулируется киназами, деацетилазами и ферментами, удаляющими PAR (в первую очередь PARG, и затем ARH3). В то время как фосфорилирование и ацетилирование являются маркерами транскрипции и продвижения клетки по клеточному циклу, PAR-илирование, по

всей видимости, регулирует остановку данных процессов для того, чтобы предоставить клетке время для восстановления структуры ДНК в случае её повреждения.

#### 1.4. Ингибиторы PARP1 и PARP2

Понимание функций PARP1 и PARP2 в репарации разрывов ДНК привело к длительным усилиям по разработке низкомолекулярных ингибиторов PARP1/2 (PARPi) [270, 271]. Первоначальное обоснование разработки PARPi основывалось не предположении, что их использование может повысить чувствительность опухолевых клеток к традиционным методам лечения: химио- и радиотерапии. Ингибирование активности PARP впервые было продемонстрировано в 1971 г. после обработки клеток HeLa тимидином и никотинамидом [272]. В нескольких более поздних исследованиях было установлено, что бензамиды ингибируют активность PARP посредством конкуренции с  $\text{NAD}^+$ . Однако, эти соединения считались клинически непригодными из-за их низкой активности и специфичности [273–275]. Хотя PARP1 обычно считается основной мишенью PARPi, из-за структурного сходства  $\text{NAD}^+$ -связывающего домена некоторых членов семейства PARP, некоторые PARPi также ингибируют активность других PARP, включая PARP2, а также некоторых других нецелевых ферментов, в том числе киназ [276, 277]. Учитывая то, что химио- и радиотерапия в лечении опухолевых заболеваний действуют посредством повреждения ДНК, ингибиторы PARP действуют как химио- и радиосенсибилизаторы. В ряде случаев ингибиторы PARP повышают эффективность действия ДНК-алкилирующих агентов (например, темозоламида) и ингибиторов топоизомеразы I (например, топотекана), а также ионизирующего излучения [278].

Было показано, что PARPi эффективны при лечении опухолей с дефицитом гомологичной рекомбинации в подходе, именуемом синтетической летальностью. Синтетическая летальность — понятие, введенное генетиками почти столетие назад для описания ситуации, при которой дефект одного из двух генов мало влияет на жизнедеятельность клетки или организма, но сочетание дефектов обоих генов приводит к смерти [279]. В 2005 году две группы описали подобное взаимодействие между ингибированием PARP и мутацией в генах *BRCA1* или *BRCA2*, что привело к появлению новой стратегии лечения пациентов с BRCA-мутантными опухолями [280, 281].

В настоящее время несколько ингибиторов PARP одобрены для лечения рака молочных желёз, яичников, поджелудочной железы и предстательной железы с мутациями *BRCA1/2*: рукапариб, олапариб, нирапариб и талазопариб. Из-за относительно низкой частоты мутаций в генах *BRCA1/2* данные препараты применимы для лечения 10-15% опухолей молочной железы и яичников, 4-7% опухолей поджелудочной железы и 1,5%



карциномы предстательной железы [281–283]. Однако более поздние исследования показывают, что ингибиторы PARP могут иметь гораздо более широкое применение, включая лечение опухолей с альтернативным дефицитом гомологичной рекомбинации или мутациями в других генах ответа на повреждение ДНК [281, 284]. Опухоли с высоким уровнем окислительного и репликативного стресса также могут быть чувствительны к ингибиторам PARP, применяемым в качестве монотерапии [285, 286]. Кроме того, в настоящее время проходит около 300 клинических испытаний ингибиторов PARP в качестве противоопухолевой терапии при химиорезистентном наследственном или соматическом раке молочной железы, яичников, легких и поджелудочной железы с мутацией *BRCA1/2* [287].

Механизм действия ингибиторов PARP продолжает изучаться. Изначально предполагалось, что эффект PARPi будет связан с нарушением репарации одноцепочечных разрывов ДНК и накоплением повреждений [281]. Однако было показано, что нарушение репарации ДНК — не единственное последствие действия PARPi. В пользу наличия дополнительного механизма цитотоксичности PARPi говорит тот факт, что использование PARPi оказалось значительно более цитотоксично, чем подавление экспрессии PARP [276]. Позже было показано, что некоторые PARPi (особенно рукапариб, олапариб, нирапариб и талазопариб) стабилизируют комплекс PARP1 с ДНК, предотвращая авто-PAR-илирование и высвобождение PARP1 из комплекса с повреждением ДНК [276, 288]. Было высказано предположение, что PARP1, связанный с повреждением ДНК, сам по себе имеет высокую цитотоксичность, т.к. он препятствует протеканию репарации ДНК. Особенно токсичным такой комплекс будет для делящихся клеток, ведь в ходе репликации невозстановленные одноцепочечные разрывы могут превратиться в двухцепочечные. Эта гипотеза подтверждается наблюдением, согласно которому комплексы PARP1-ДНК, предварительно подвергнутые воздействию PARPi, имели меньшую способность диссоциировать после индуцированной  $NAD^+$  аутомодификации PARP1 [289]. Кроме того, дефектные по PARP1 клетки, по-видимому, устойчивы к воздействию PARPi [290]. Используемые в клинике PARPi отличаются своей способностью стабилизировать комплекс PARP1 с ДНК; в этом отношении талазопариб примерно в 100 раз более эффективен, чем нирапариб, который, в свою очередь, стабилизирует PARP1 с ДНК более эффективно, чем олапариб и рукапариб [291]. Эти различия в способности стабилизировать комплекс PARP1, а не просто ингибировать PAR-илирование, могут иметь прогностическое значение цитотоксичности в клетках с мутацией *BRCA1/2*, так как талазопариб обладает наиболее выраженными цитотоксическими эффектами [291].

Недавно PARPi также были протестированы на многочисленных моделях воспалительных заболеваний [292]. Было показано, что PARPi предотвращают PAR-опосредованную гибель клеток, возникающую в очагах воспаления, тем самым снижая повреждение тканей и контролируя экспрессию провоспалительных цитокинов [293, 294]. Имеющиеся исследования противовоспалительного эффекта PARPi открывают возможность применения данных препаратов для терапии нейродегенеративных заболеваний, диабета, артрита, а также для уменьшения очагов поражения при инфарктах и инсультах [294–297]. Кроме того, сейчас широко рассматривается возможность применения PARPi для терапии вирусных заболеваний [298].

В настоящее время разработка PARPi остается очень активной областью исследований. Потенциал терапии PARPi был подчеркнут значительным количеством доклинических исследований и клинических испытаний, демонстрирующих их превосходящую эффективность по сравнению с традиционной химиотерапией при некоторых видах рака [299], а также применимость для терапии неонкологических заболеваний [292]. Исследования также установили существенные противоопухолевые преимущества использования PARPi в сочетании с другими противораковыми агентами [278]. Однако, хотя клиническая значимость PARPi очевидна, основные механизмы воздействия PARPi остаются неясными. В особенности любопытными являются отличия эффектов, оказываемых ингибиторами *in vivo* и *in vitro* [300]. Это может говорить о наличии дополнительных факторов воздействия ингибиторов в условиях *in vivo*. Таким образом, требуются дальнейшие исследования механизма действия PARPi, которые могли бы обеспечить наибольший терапевтический эффект и снизить побочные эффекты.

### 1.5. Заключение

ADP-рибозилирование представляет собой посттрансляционную модификацию белков, которая реализуется как в мономерной (MAR-илирование), так и в полимерной (PAR-илирование) формах. Несмотря на то, что исследования PAR делятся уже 60 лет, продолжается выяснение всё новых деталей механизма этой ПТМ. Вслед за открытием ферментов, ответственных за синтез и деградацию PAR, было обнаружено множество белков, взаимодействующих с данным полимером. С каждым годом возрастает число клеточных процессов, для которых было показано участие PAR-илирования, среди которых основным процессом является репарация ДНК.

Биохимические исследования механизма действия PARP ведётся как на модельных ДНК, так и в системе нуклеосом. Последнее позволяет обнаружить взаимодействие PARP с гистонами и его влияние на структуру нуклеосомы — элементарной единицы

хроматина [12, 90, 91, 93, 301]. Открытие PAR-илирования остатков серина, и вместе с ним кофактора этого процесса HPF1, ознаменовало новый виток в исследованиях данной реакции. Поэтому вряд ли возможно развивать далее исследование функций ферментов PARP в составе хроматина в отсутствие этого фактора.

На сегодняшний день уже известны многие закономерности взаимодействия HPF1 с PARP1 и PARP2, и многие результаты, полученные *in vitro* нами [302, 303] и другими научными группами [26, 87] нашли своё подтверждение в экспериментах *in vivo*. Так, было показано укорочение цепей PAR в клетках с гиперэкспрессией HPF1, что иной раз повреждает его влияние на элонгацию синтеза PAR. Показанное недавно Матик с соавторами двухфазное PAR-илирование PARP1 и гистонов, вместе с динамикой накопления и высвобождения PARP1 и HPF1 на сайтах повреждения ДНК оставляет открытым вопрос участия PARP2 в PAR-илировании хроматина [167, 168]. Однако, ряд сделанных выводов весьма противоречив и нуждается в дальнейших исследованиях для понимания механизма действия HPF1. Так, в противоречии с ранними работами [30], было установлено, что делеция HPF1 в клетках не отменяет PAR-илирования остатков серина [147]. Это даёт основание предположить существование других, ещё неизвестных кофакторов PARP1/2, меняющих специфичность PAR-илирования, подобно HPF1. Влияние HPF1 на активность PARP1/2, показанное *in vivo* и *in vitro*, закономерно вызвало интерес в контексте исследования ингибиторов PARP1/2 [53]. Обнаружено вовлечение HPF1 в клеточный ответ на повреждение ДНК и на действие PARPi, что привело к созданию новых возможностей для разработки ингибиторов PARP1/2, как потенциальных антираковых препаратов.

Изменение аминокислотной специфичности PAR-илирования, влияние на длину синтезируемого полимера вместе с ключевой ролью HPF1 в модификации гистонов и релаксации хроматина оставляют открытым вопрос физико-химических механизмов, лежащих в основе наблюдаемых феноменов. Поэтому дальнейшие исследования механизма реакций, катализируемых PARP1/2 в присутствии HPF1 и нуклеосом представляет особый интерес. Показанное ранее влияние PARP1/2 на процесс BER *in vitro* в контексте нуклеосом также требует уточнения в свете открытия HPF1.

## 2. Материалы и методы

### 2.1. Материалы

#### 2.1.1. Реактивы и оборудование

В работе были использованы следующие материалы и реактивы: мочевиная формамида, N,N'-метиленбисакриламид, трис(гидроксиэтил)аминометан (Tris) («Amresco», США); персульфат аммония (ПСА) («PanReac», Испания); тетраметилэтилендиамид (ТЕМЕД) («Helicon», Россия); акриламид, NP-40 («AppliChem», Германия); додецилсульфат натрия (SDS) («Fluka», Швейцария), NH<sub>2</sub>OH, ДТТ, β-никотинамид мононуклеотид («Sigma-Aldrich», США); Coomassie Plus, аденозинтрифосфорная кислота (АТФ) («The Thermo Fisher Scientific», США); глицин («MP Biomedicals», США); бумага для хроматографии Whatman («GE Healthcare», США); NaCl, MgCl<sub>2</sub>, ЭДТА, β-меркаптоэтанол, глицерин, HCl, буфер Леммли, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, ацетат натрия, аскорбиновая кислота, трихлоруксусная кислота (ТХУ), Fe(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, LiClO<sub>4</sub> (отечественного производства, о.с.ч. и ч.д.а.). Также в работе использовали [α-<sup>32</sup>P]АТФ и [γ-<sup>32</sup>P]АТФ с удельной активностью 1000 и 3000 Ки/ммоль, соответственно, производства Лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН, Россия. Для осаждения олигонуклеотидного материала использовался перегнанный этанол. Для приготовления всех буферных растворов и реакционных проб использовали дважды дистиллированную воду.

В работе были использованы ДНК и олигонуклеотиды: плазмидная ДНК pBR322 («СибЭнзим», Новосибирск), плазмидная ДНК pGEM-3Z/603 (любезно предоставлена к.х.н. М.М. Кутузовым, ИХБФМ СО РАН) и синтетические олигодезоксирибонуклеотиды производства «Genterra» или «Lumiprobe» (Москва, Россия). Для получения ДНК-активаторов были использованы следующие модифицированные праймеры:

**Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных в работе**

Название	Последовательность
For	5'- ACCCCAGGGACTTGAAGTAATAAGG-3'
For_Tamra	5'-TAMRA-ACCCAGGGACTTGAAGTAATAAGG-3'
For+10	5'-TAMRA-CGAAACGGGTACCCAGGG-3'
Rev	5'- CCCAGTTCGCGTGCCACCTACCGTGTGAAG-3'
Rev_12U	5'- CCC AGTTCGCG[dU]GCCACCTACCG[dT-FAM]GTGAAG-3'
Rev_35U	5'-CCCAGTTCGCGCGCCACCTACCG[dT-FAM]GTGAAGTCG[dU]CACTCGG-3'

Обозначения: dT-FAM — флуорофор 5(6)-карбоксихлорофлуоресцеин, связанный с тимидином, TAMRA — флуорофор TAMRA, dU — дезоксирибоурацил.

Также для получения мегапраймеров использовали олигонуклеотиды:

**Таблица 2. Последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе**

Название	Последовательность
12U-p	5'- p-CCCAGTTCGCG[dU]GCCACCTACCG[dT-FAM]GTGAAG-3'
35U-p	5'-p-CCCAGTTCGCGCGCCACCTACCG[dT-FAM]GTGAAGTCG[dU]CACTCGG-3'
Antisense	5'-GGGCGCGCGAACTGGGCACCCGAGAGTGTTCG-3'
Rev+10	5'-CTCTCGGGTG-3'
Rev+20	5'-ATAATCGACACTCTCGGGTG-3'
Обозначения: dT-FAM — флуорофор 5(6)-карбоксифлуоресцеин, связанный с тимидином, dU — дезоксирибоурацил, p — концевой фосфат.	

В работе использовали следующее оборудование: система гель-документирования Amersham Imager 600, лазерный сканер Typhoon FLA9500, спектрофотометр SimpliNano («General Electric Healthcare», США), планшетный флуориметр CLARIOstar («GMB Labtech», Германия), программное обеспечение «QuantityOne» («Bio-Rad Laboratories», США).

### 2.1.2. Ферменты и белки

В работе были использованы бычий сывороточный альбумин (БСА) («Sigma», США); ДНКаза I, («The Thermo Fisher Scientific», США), протеиназа К («СибЭнзим», Новосибирск), экзонуклеаза ExoI («New England Biolabs», Великобритания).

Препараты белков апуриновой/апириμιдиновой эндонуклеазы 1 (APE1), полинуклеотидкиназы фага T4 (PNKP), никотинамид мононуклеотид аденилилтрансфераза (NMNAT) были любезно предоставлены д.х.н. Н.А. Моор, к.х.н. И.О. Петрусевой (ИХБФМ СО РАН) и к.х.н. С.И. Шрам (Институт молекулярной генетики РАН), соответственно. Белковый препарат коровых гистонов (H2A, H2B, H3, H4) полученный из эритроцитов *Gallus gallus*, рекомбинантные ферменты PARP1 и PARP2 были любезно предоставлены к.х.н. М.М. Кутузовым (ИХБФМ СО РАН). Рекомбинантные урацил-ДНК-гликозилаза *E.coli* (UNG), ДНК-полимераза Taq и ДНК-лигаза фага T4 были любезно предоставлены д.б.н. С.Н. Ходыревой (ИХБФМ СО РАН). Рекомбинантный фермент PARC любезно предоставлен к.х.н. Ильиной К.С. (ИХБФМ СО РАН). Рекомбинантный HPF1 любезно предоставлен К.Н. Науменко (ИХБФМ СО РАН).

## **2.2. Методы исследования**

### **2.2.1. Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле по методу Леммли**

Гель-электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях проводили по методу Леммли [304]. В анализируемые фракции добавляли 1/3 объема денатурирующего буфера Леммли (5% SDS, 5% β-меркаптоэтанол, 50% глицерин, 0,02% бромфеноловый синий). Фракции прогревали в течение 5 мин при 97°C. В качестве разделяющего геля использовали 10-20% ПААГ (при соотношении акриламида к бисакриламиду 30:1), содержащий 0,377 М Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS, 0,1% ПСА, 0,1% ТЕМЕД. Концентрирующий 5% ПААГ (соотношение акриламид:бисакриламид 75:1) содержал 0,124 М Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,1% ПСА, 0,1% ТЕМЕД. Электродный буфер содержал 25 мМ Tris-HCl, 0,92 М глицин и 0,1 % SDS. Электрофорез проводили в вертикальных пластинах 11,5×8,5×0,1 см при силе тока 25 мА. За ходом электрофореза следили по миграции красителя бромфенолового синего. Гели окрашивали кумасси G-250, либо анализировали автордиографией.

### **2.2.2. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в ПААГ в денатурирующих условиях**

Гель-электрофорез нуклеиновых кислот (РАР или ДНК) в денатурирующих условиях проводили в 10-20% ПААГ при соотношении акриламида к бисакриламиду, равном 19:1, содержащим 7 М мочевины, буфер ТБЕ (89 мМ трис, 89 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА), pH 8,0, ПСА (0,1%) и ТЕМЕД (0,1%). В анализируемые фракции добавляли 1/5 объема денатурирующего буфера, содержащего 95% формамид, 25 мМ ЭДТА, 0,01% ксиленцианол и 0,01% бромфеноловый синий. Перед нанесением пробы прогревали при 97°C в течение 2 мин. Электрофорез проводили в вертикально расположенных пластинах при 40 W. При проведении электрофореза использовали ТБЕ буфер. Гель высушивали и анализировали с помощью радиоавтографии.

### **2.2.3. Электрофоретическое разделение в ПААГ в неденатурирующих условиях**

Электрофорез проводили в предварительно охлаждённых вертикальных пластинах 11,5×8,5×0,1 см. Перед нанесением в пробы добавляли 1/5 объема 40% глицерина. Гель содержал буфер ТБЕ, 4% акриламид (соотношение акриламид:бис-акриламид – 19:1), 0,05% ПСА, 0,1% ТЕМЕД. Электродным буфером служил буфер ТБЕ. Электрофорез проводили при силе тока 4 мА. Детекцию флуоресцентной метки проводили на сканере «Turphoon FLA 7000» («General Electric Healthcare»).

## 2.2.4. Количественная обработка распределения радиоактивности

Гели с радиоактивно мечеными продуктами сушили в системе Gel Dryer («Cole-Parmer», США) и экспонировали в кассете с экраном для радиографии. Для количественной обработки данных распределение радиоактивности в гелях анализировали с помощью системы «Typhoon FLA 7000» («General Electric Healthcare», США). Для анализа данных использовали программное обеспечение «Quantity One software» («Bio-Rad Laboratories», США). Сигналы радиоактивно модифицированных белков количественно определяли следующим образом: определяли общий сигнал полосы модифицированного белка (область указана для каждого белка на автордиограммах) и вычитали фоновый сигнал геля того же размера на соответствующей дорожке.

## 2.2.5. Синтез [<sup>32</sup>P]-меченного NAD<sup>+</sup>

Для визуализации синтезированной ADP-рибозы использовали радиоактивно меченный NAD<sup>+</sup>. Реакционные смеси содержали 25 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2 мМ β-никотинамидмононуклеотид, 300 мМ АТФ, 0,5 мКи [α-<sup>32</sup>P]-АТФ и 5 мг/мл никотинамидмононуклеотидаденилилтрансферазы (NMNAT). После инкубации смеси в течение 1 ч при 37°C фермент NMNAT инактивировали нагреванием в течение 10 мин при 65°C, денатурированный фермент осаждали центрифугированием (12000 g, 10 мин, 4°C).

## 2.2.6. Получение ДНК с 5'- [<sup>32</sup>P]

Для анализа методом футпринтинга праймеры для ПЦР радиоактивно метили по 5'-концу с использованием полинуклеотидкиназы Т4 в присутствии [γ-<sup>32</sup>P]-АТФ (3000 Ки·ммоль<sup>-1</sup>). Реакционные смеси содержали 50 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 пмоль праймера, 50 пмоль γ-[<sup>32</sup>P]-АТФ и 20 ед. Т4 полинуклеотидкиназы. Реакцию проводили в течение 40 мин при 37°C. Фермент инактивировали нагреванием в течение 10 мин при 65°C, денатурированный фермент осаждали центрифугированием (12000 g, 10 мин, 4°C).

## 2.2.7 Получение ДНК-активаторов

### 2.2.7.1. Получение модифицированных праймеров

Создание некоторых модельных ДНК-активаторов требовало использование модифицированных праймеров длиной 50–60 н.о. Получение таких протяжённых структур стандартным олигонуклеотидным синтезом сопряжено с крайне низкими выходами. В связи с этим, некоторые праймеры были получены из двух олигонуклеотидов-предшественников путём лигирования. Для этого олигонуклеотид «12U-р» (либо «35U-р»), «Rev+10» (либо

«Rev+20») и комплементарный им «Antisense» смешивали в соотношении 1,0:1,2:1,2. Реакционную смесь инкубировали в течение 5 мин при 95°C, а затем медленно охлаждали до комнатной температуры. При этом образовывался ДНК-дуплекс, в котором 5'-конец «12U-p» (либо «35U-p») и 3'-конец «Rev+10» (либо «Rev+20») располагались «встык», подходящим для лигирования образом. Имеющийся одноцепочечный разрыв лигировали ДНК-лигазой T4. Реакционная смесь содержала 50 мМ Tris-HCl pH 7.5, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ДТТ, 1 мМ АТР, 1 ед./мкл ДНК-лигазы T4 и 50 мкМ дуплекс. Реакционную смесь инкубировали в течение часа при 16°C, после чего осаждали добавлением этанола до 70% и ацетата натрия до 0,3 М с последующей инкубацией при -20°C в течение ночи. Осадок, отделенный центрифугированием, растворяли в воде. Для очистки полученных мегапраймеров («12U-p +10», «12U-p +20», «35U-p +10», «35U-p +20») от нелигированных фрагментов и фрагмента «Antisense», полученный препарат подвергали электрофорезу в денатурирующих условиях (Раздел 2.2.2). Участок геля, содержащий целевой олигонуклеотид, вырезали и осуществляли электроперенос на DEAE-бумагу при напряженности поля ≈20 В/см. В качестве электродного буфера использовали 0,5-х TBE. С DEAE-бумаги олигонуклеотид элюировали горячим 3 М LiClO<sub>4</sub>, после чего осаждали 2 мл ацетона (инкубация при -20°C в течение ночи). После центрифугирования осадок растворяли в воде.

#### *2.2.7.2. Определения концентрации ДНК и нуклеотидов*

Для определения концентрации полученных праймеров или синтезированной методом ПЦР ДНК использовали спектрофотометрический метод. Определяли поглощение раствора на длине волны 260 нм. Концентрацию определяли на основании расчётов, проведённых в программном обеспечении «OligoCalc» на основании последовательности и модификации олигонуклеотидов. Определение концентрации ДНК проводили на приборе SimpliNano («General Electric Healthcare», США).

#### *2.2.7.3. Получение ДНК-603 методом ПЦР*

ДНК-603 получали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя в качестве матрицы плазмиду pGEM-3Z/603. Реакционные смеси объёмом 50 мкл содержали MasterMix (3мМ MgCl<sub>2</sub>, 150 мМ Tris-HCl, pH 8.8, 40 мМ, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,02% Tween 20), 0,5 мкМ праймеры, 1 нг плазмидной ДНК, 0,2 мМ dNTP и 1 единицу Taq-полимеразы. ПЦР производили на амплификаторе «Mastercycler personal» («Eppendorf», Германия) по протоколу:

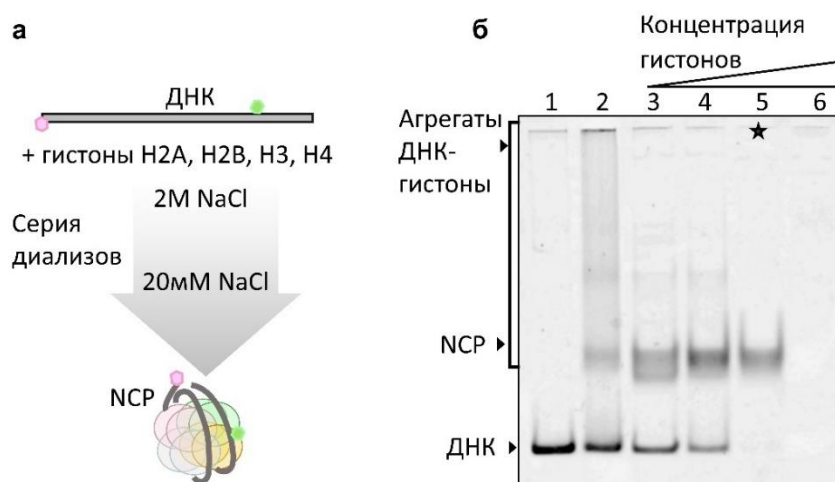


1. Полная денатурация 95°C, 3 мин
  2. Стандартная денатурация 94°C, 15 с
  3. Отжиг праймеров 57°C, 15 с
  4. Элонгация 72°C, 5 с
  5. Достройка 72°C, 7 мин
  6. Завершение 4°C
- } x35

После ПЦР ДНК осаждали с помощью ацетата натрия (рН 5,2) в этиловом спирте. Образовавшийся осадок ресуспендировали в воде. Результат ПЦР проверяли с помощью электрофореза в ПААГ в неденатурирующих условиях (**Раздел 2.2.3.**). Концентрацию определяли измерением оптической плотности на 260 нм и последующим пересчётом с учётом последовательности ДНК и наличия флуоресцентной метки (данные с онлайн-ресурса «OligoCal»).

#### *2.2.7.4. Реконструкция нуклеосом с помощью последовательных диализов*

Согласно [86], ДНК-603 и октамеры реконструируются в нуклеосомы при плавном снижении концентрации NaCl (ионной силы) в растворе. В рамках данной работы методы был оптимизирован [305]. Для получения правильно реконструированных нуклеосом проводили диализ в градиенте концентрации NaCl. 50 мкл пробы диализовали против 30–60 мл буферного раствора. Буферы для диализа содержали 10мМ Tris-HCl, рН 7,5, 0,1% NP-40, 0,2 мМ ЭДТА, 5мМ β-меркаптоэтанол и NaCl 2 М либо 20 мМ. Также готовили буфер, не содержащий NaCl. Пробы содержали буфер (2 М NaCl, 10мМ Tris-HCl, рН 8,0, 0,1% NP-40, 0,2 мМ ЭДТА), ДНК-603 и гистоны. Пробы диализовали против буфера с 2 М NaCl в течение 30 минут, затем с помощью перистальтического насоса плавно добавляли буфер без NaCl. После увеличения объема в два раза (и уменьшения концентрации NaCl в два раза) половину объема сливали. Процедуру повторяли 6 раз до снижения концентрации NaCl до 30 мМ. После пробы переносили в буфер, содержащий 20мМ NaCl и выдерживали в течение ночи. Для определения оптимального соотношения ДНК и гистонов были проведены реконструкции с разным молярным соотношением данных компонентов. После серии диализов смеси анализировали с помощью ПААГ-электрофореза в неденатурирующих условиях. Результаты представлены на **Рис.9**. Оптимальным считается соотношение, позволяющее получить гомогенную фракцию нуклеосом с минимальным количеством свободной ДНК. При меньшей концентрации гистонов в препаратах присутствует как свободная ДНК, так и промежуточные комплексы. При избытке гистонов продукт сборки не детектируется. Простое смешивание октамеров и ДНК ведет к образованию продуктов неизвестного состава. Таким образом, нами в работе были подобраны оптимальные соотношения для реконструкции нуклеосом с использованием всех препаратов ДНК.



**Рис.9.** Реконструкция NCP: а – схема реконструкции NCP *in vitro*; б – электрофореграмма, отражающая реконструкцию NCP при разном соотношении ДНК:гистоны: 1 – ДНК-603 (147 п.о.); 2 – смесь ДНК + гистоны (соотношение ДНК:гистоны 1:0,5), не подвергнутая диализу; 3-6 – смеси ДНК + гистоны (соотношения ДНК:гистоны 1:0,5, 1:0,8, 1:1,1 и 1:1,4 соответственно), содержащие возрастающую концентрацию гистонов, подвергнутые серии диализов (звездой отмечена дорожка, содержащая пробу с оптимальным соотношением ДНК:гистоны, приводящем к образованию гомогенной фракции NCP).

#### 2.2.7.5. Получение ДНК-активаторов, содержащих однонуклеотидную брешь

ДНК, содержащую однонуклеотидную брешь (Gap ДНК-603 и Gap NCP), получали двухэтапной процедурой. В первую очередь, AP-сайт получали путем инкубации dU-содержащей ДНК (или нуклеосом) с UNG (1 единица активности на 0,6 пмоль ДНК) в течение 30 мин при 37°C в буфере для реакционных смесей (50 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0 и 5 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>). Далее полученный субстрат, содержащий AP-сайт (3,5 мкМ), инкубировали с 0,01 мкМ APE1 в течение 15 мин при 37°C. Дополнительно все препараты ДНК обрабатывали ферментом Eho I для удаления оставшихся праймеров.

#### 2.2.8. Определение ориентации повреждений в NCP методом гидроксильного футпринтинга

Положения оснований, экранированных в структуре NCP гистоновым ядром, определяли методом футпринтинга. Для этого праймер «Rev» метили [<sup>32</sup>P] на 5'-конце (Раздел 2.2.6). С использованием данного праймера методом ПЦР (Раздел 2.2.7.3.) получали ДНК-603 (147 п.о.). Препарат ДНК очищали разделением в ПААГ в неденатурирующих условиях. Из фрагмента геля ДНК пассивно элюировали в TE-буфере (10 мМ Tris-HCl pH 7,8, 1 мМ ЭДТА), затем повторно осаждали этанолом. Очищенную ДНК использовали для реконструкции нуклеосом по стандартному протоколу (Раздел 2.2.7.4). ДНК и реконструированные NCP подвергали действию реактива Фентона [306]. Для этого

готовили 4 раствора реагентов:  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$  (0,01 М), ЭДТА (0,02 М), аскорбиновая кислота (0,005 М) и  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,165%). В реакционные смеси, объемом 30 мкл, содержащие 500 нМ ДНК/НСР одновременно вносили по 1,5 мкл каждого реагента. Через 2 минуты реакцию останавливали добавлением 500 мкл этанола. Продукты реакции осаждали добавлением ацетата натрия, анализировали электрофорезом в 20% ПААГ в денатурирующих условиях и визуализировали автордиографией.

### **2.2.9. Изучение активности PARP1 и PARP2 на различных ДНК-активаторах методом флуоресцентной спектроскопии**

Связывание PARP1/PARP2 с флуоресцентномечеными ДНК и НСР, а также их диссоциацию в процессе PAR-илирования анализировали путём измерения анизотропии флуоресценции. Измеряли анизотропию флуоресценции флуорофора, соединенного с ДНК. Уровень анизотропии отражает связывание фермента с ДНК-активатором в непосредственной близости от флуорофора [307]. Все изменения проводились на планшетном флуориметре «CLARIOstar» («BMG LABTECH», Германия). Длины волн возбуждения и эмиссии для детекции флуоресценции FAM составляли соответственно 495 и 520 нм., для TAMRA – 541 и 560 нм.

Анизотропию рассчитывали по формуле (1) в сопутствующем программном обеспечении «MARS Data Analysis» («BMG LABTECH», Германия).

$$A = \frac{I_{\text{parallel}} - I_{\text{perpendicular}}}{I_{\text{parallel}} + 2I_{\text{perpendicular}}} \quad (1)$$

где  $A$  — анизотропия флуоресценции,  $I_{\text{parallel}}$  — интенсивность флуоресценции параллельно поляризованного испускаемого света,  $I_{\text{perpendicular}}$  — интенсивность флуоресценции перпендикулярно поляризованного испускаемого света.

Реакционные смеси готовили на льду в 384-луночной планшете, после чего инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин. Все измерения проводились при 25°C. Каждая лунка содержала одну реакционную смесь. Калибровку прибора проводили по 3 нМ ДНК/НСР. Значение анизотропии данной смеси принималось за 5%. Измерение проводили в режиме кинетического сканирования. Длительность цикла и количество циклов определяли индивидуально в зависимости от количества сканируемых лунок. Все опыты проводили в трёх повторях. Все расчёты проводили в программе «MARS Data Analysis» («BMG LABTECH», Германия).

### 2.2.9.1. Определение величин $IC_{50}$ ингибиторов PARP1

Для оценки активности PARP1 в присутствии потенциальных ингибиторов использовали методику, описанную выше. Реакционная смесь содержала 50 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 5 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 нМ ДНК-603, 100 нМ PARP1, а также возрастающую концентрацию исследуемого ингибитора. Реакцию инициировали добавлением раствора NAD<sup>+</sup>. Измерение флуоресценции проводили при 25°C в режиме кинетического анализа.

При расчете начальной скорости реакции делали допущение, что в начальный период реакции изменение анизотропии прямо пропорционально изменению концентрации каталитически активного комплекса PARP1-ДНК, и что после диссоциации PARP1 каталитически неактивен. Кинетические данные анизотропия-время аппроксимировались уравнением (2):

$$y = A_{max} + e^{-kt} \quad (2)$$

где  $A_{max}$  — значение анизотропии до добавления NAD<sup>+</sup>,  $k$  — кажущаяся константа скорости диссоциации,  $t$  — время.

Для расчета  $IC_{50}$  (концентрация ингибитора, при которой начальная скорость реакции снижается на 50%) определяли значения скорости реакции при разных концентрациях потенциального ингибитора, для этого полученные экспериментальные данные аппроксимировали двухпараметрическим уравнением логистической кривой:

$$\frac{k_i}{k} = \frac{1}{1 + \frac{[I]}{IC_{50}}} \quad (3)$$

где  $k_i$  — начальная скорость реакции в присутствии тестируемого ингибитора,  $k$  — скорость реакции без ингибитора;  $[I]$  — концентрация ингибитора.

### 2.2.9.2. Определение величин $EC_{50}$ PARP1 и PARP2 с различными ДНК-активаторами

Для изучения связывания PARP1 и PARP2 с ДНК (NCP) измеряли уровни анизотропии флуоресценции в присутствии возрастающих концентраций PARP1/2 на ДНК-активаторах различной структуры. Реакционные смеси содержали 50 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 5 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 3 нМ ДНК (NCP) и PARP1/2 концентрацией 250–0,1 нМ. Измерения каждой лунки проводили 3 раза с интервалом в 10 с. Каждое измерение состояло из 50 вспышек, полученные значения автоматически усредняли. Значения, полученные в результате 3 измерений, также усредняли. Расчёт констант диссоциации для каждого ДНК-субстрата проводили по формуле (4):

$$A = A_{\min} + \frac{A - A_{\min}}{1 + \frac{EC_{50}}{[E]}} \quad (4)$$

где  $A$  — значение анизотропии реакционной смеси,  $A_{\min}$  — значение анизотропии в ячейках со свободной ДНК (NCP),  $[E]$  — концентрация фермента PARP1/PARP2.

#### 2.2.8.3. Определение величин $IC_{50}$ в экспериментах по конкурентному связыванию PARP1 и PARP2 с различными ДНК-активаторами

Для уточнения относительного сродства PARP1/2 к ДНК в зависимости наличия от положения повреждения, дополнительно к оценке величин  $EC_{50}$  проводили оценку величин  $IC_{50}$  в экспериментах по конкурентному связыванию. Реакционные смеси содержали 50 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 5 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 нМ ДНК (NCP), 5 нМ PARP1/2 и возрастающие концентрации ДНК-603 без флуоресцентных меток (полученной с праймеров Rev и For) или плазмидной ДНК «pBR322». Величину  $IC_{50}$ , соответствующую концентрации конкурентной ДНК, при которой 50% фермента покидает комплекс с меченой ДНК, рассчитывали по формуле (5):

$$A = A_{\min} + \frac{A - A_{\min}}{1 + \frac{IC_{50}}{[ДНК_c]}} \quad (5)$$

где  $A$  — значение анизотропии реакционной смеси,  $A_{\min}$  — значение анизотропии в ячейках со свободной ДНК (NCP),  $A_{\max}$  — значение анизотропии в ячейках с комплексом ДНК-фермент;  $[ДНК_c]$  – концентрация конкурентной ДНК.

#### 2.2.9.4. Изучение диссоциации PARP1/PARP2 с NCP в процессе поли(ADP-рибозил)ирования методом флуоресцентной спектроскопии

Предложенный метод использовали для определения скорости диссоциации PARP1/PARP2 с ДНК (NCP), в том числе в присутствии HPF1. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 5 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 50 нМ Gap NCP, 100 нМ PARP1/PARP2, и 100 нМ HPF1 (если указано). Реакцию запускали добавлением 100 мкМ NAD<sup>+</sup>. Измерения каждой лунки проводили интервалом в 20 с в течение получаса.

#### 2.2.10. Анализ активности PARP1 и PARP2 с использованием [<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup>

Количество и распределение синтезированного PAR анализировали количественным определением [<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup>, включённого в состав поли(ADP-рибозы). Реакционные смеси содержали 50 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 5 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, ДНК-активатор (ДНК, Gap ДНК, NCP или Gap NCP), PARP1/PARP2 (500 нМ, или другой, если указано) и

HPF1 (если указано). Реакцию запускали добавлением  $[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$  до конечной концентрации 1 мкМ (или другой, если указано). Реакционные смеси инкубировали при 37°C, реакцию останавливали добавлением 1/3 объема денатурирующего буфера Леммли и прогреванием в течение 5 мин при 97°C. Реакционные смеси разделяли электрофорезом в полиакриламидном геле в денатурирующих условиях согласно **2.2.1**), после чего гели сушили. При этом  $[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ , не включённый ферментом в состав поли(ADP-рибозы), движется с фронтом бромфенолового синего, а включенный – в составе модифицированных белков. Полосы белков, меченных  $[^{32}\text{P}]\text{-ADP}$ -рибозой, анализировали с использованием системы визуализации «Typhoon FLA 7000» («GE», США) и программного обеспечения «Quantity One Basic» («Bio-Rad», США). Количественные данные, представленные в виде графиков, были получены не менее чем в трех независимых экспериментах.

#### *2.2.10.1. Тестирование PARP1, PARP2 и HPF1 на загрязнение ДНК*

Чтобы исключить возможную контаминацию препаратов PARP1, PARP2 и HPF1 ДНК, исследовали реакцию PAR-илирования, катализируемую PARP1/PARP2, в отсутствие и в присутствии двух концентраций HPF1 с предварительной обработкой реакционной смеси ДНКазой I и без нее. Реакционные смеси содержали 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 5 мМ ДТТ, 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, PARP1 или PARP2 (500 нМ),  $[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$  (1 мкМ) HPF1 (1 мкМ или 16 мкМ); контрольные образцы преинкубировали в течение 30 мин с 2 ед. ДНКазы I («Thermo Scientific», США). Продукты реакции анализировали согласно **2.2.1** и **2.2.4**.

#### *2.2.10.2. Анализ влияния HPF1 на авто- и гетеромодификацию PARP1/PARP2 и гистонов*

Реакцию PAR-илирования PARP1, PARP2 и гистонов проводили в стандартной 10 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 5 мМ ДТТ, 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мкМ  $[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ , 250 нМ ДНК/NCP (или Gap ДНК/Gap NCP), 500 нМ PARP1 (PARP2) и 0,06-16 мкМ HPF1. Реакцию инициировали добавлением  $[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ . После инкубации смесей при 37°C в течение 30 мин для PARP1 и 50 мин для PARP2 реакции останавливали добавлением буфера Лэммли и нагреванием в течение 3 мин при 95°C. Там, где указано, реакции обрабатывали 1 М гидроксиламином (NH<sub>2</sub>OH, pH 7,5), для определения количества PAR, связанного с серинами. Продукты реакции разделяли с помощью 20% SDS-ПААГ согласно **2.2.1**.

#### *2.2.10.3. Кинетические измерения активности PARP1/PARP2*

Реакцию, катализируемую PARP1/PARP2, проводили в 70 мкл реакционной смеси, содержащей 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 5 мМ ДТТ, 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мкМ или

10 мкМ [ $^{32}\text{P}$ ]-NAD<sup>+</sup>, 250 нМ ДНК или NCP (Gap ДНК/Gap NCP), 500 нМ PARP1 (PARP2) и 1 мкМ HPF1. Реакции инициировали добавлением NAD<sup>+</sup> (5 мкл) и останавливали путем добавления аликвоты 5 мкл смеси в буфер Леммли с использованием автоматического программируемого дозатора «Multipette E3» («Eppendorf», Германия) каждые 10 с (до первых 60 с реакции); аликвоты более длительной инкубации добавляли вручную. Продукты реакции разделяли с помощью SDS-электрофореза согласно 2.2.1, и анализировали согласно 2.2.4.

#### 2.2.10.4. Анализ влияния HPF1 на количество синтезированного PAR

Для оценки общего количества синтезированного PAR готовили реакционные смеси, содержащие 50 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 5 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, PARP1/PARP2 (500 нМ), ДНК-активатор (ДНК/NCP или Gap ДНК/Gap NCP) и HPF1 (если указано). Реакцию запускали добавлением [ $^{32}\text{P}$ ]-NAD<sup>+</sup> до конечной концентрации 1 мкМ (или другой, если указано) и останавливали нанесением реакционной смеси на бумажный фильтр Whatman (1 см x 1 см), пропитанный 10%-ой трихлоруксусной кислотой. Бумажные фильтры отмывали для удаления молекул неизрасходованного NAD<sup>+</sup> в 5% растворе трихлоруксусной кислоты (ТХУ), затем однократно в 90% этаноле. Фильтры высушивали на воздухе, количество радиоактивной метки определяли согласно 2.2.4.

#### 2.2.10.5. Исследование влияния HPF1 на эффективность инициации PAR-илирования и распределение PAR

Для проведения гидролиза PAR и определения относительного числа событий инициации PAR-илирования реакцию ADP-рибозилирования, проведённую согласно 2.2.10.1 останавливали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 20 мМ, после чего смесь инкубировали с 1 мкМ PARG в течение 2 ч при 37°C и в течение ночи при 4°C. Для определения распределения ADP-рибозы среди белков-мишеней использовали 100 нМ PARG для неполного гидролиза полимера. Реакции останавливали добавлением буфера Леммли и нагреванием в течение 3 мин при 95°C. Продукты реакции анализировали согласно 2.2.1 и 2.2.4.

#### 2.2.11. Анализ длины синтезированной поли(ADP-рибозы)

Анализировали длину поли(ADP-рибозы) (PAR), синтезируемой PARP в отсутствие или в присутствии трех различных концентраций HPF1. Реакцию PAR-илирования, катализируемую PARP1 или PARP2, проводили в 50 мкл смеси, содержащей 50 мМ NaCl, 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 5 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl<sub>2</sub> PARP1 (200 нМ) или PARP2 (500 нМ), ДНК/NCP (100 нМ) и HPF1 (0,1, 0,5 или 2,5 мкМ). Реакцию запускали добавлением [ $^{32}\text{P}$ ]-NAD<sup>+</sup> до конечной концентрации до конечной концентрации 300 мкМ. После

инкубации при 37°C в течение 45 мин реакцию останавливали добавлением олапариба до 4 мкМ. Избыток [<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> удаляли ультрафильтрацией и диализом (против 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl) с использованием микроконцентратора «Viva-spin» («Sartorius Stedim. Biotech», Германия), мембрана с порами 10 кДа. Пробу помещали в концентратор и центрифугировали при 2700 g и 4°C в течение 10 мин. После в пробу добавляли 200 мкл буфера и повторяли центрифугирование. Очищенные образцы подвергали щелочному гидролизу путем инкубации с 40 мМ NaOH при 37°C в течение 15 мин с последующим добавлением HCl для остановки реакции (изменение pH до 7,5). Затем к реакционным смесям добавляли 20 мкг протеиназы К и инкубировали дополнительно 30 мин при 37°C. Полученный PAR выделяли осаждением этанолом. Длину цепи PAR анализировали с помощью электрофореза в 20% денатурирующем ПААГ согласно 2.2.2 и 2.2.4.

#### **2.2.12. Тестирование NAD<sup>+</sup>-гидролазной активности PARP**

Реакцию гидролиза NAD<sup>+</sup>, катализируемую PARP1 и PARP2, проводили в стандартной реакционной смеси объемом 10 мкл, содержащей 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0, 5 мМ ДТТ, 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мкМ [<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup>, 250 нМ NCP, 500 нМ PARP1 (PARP2) и HPF1 (1 мкМ и 16 мкМ). После инкубации смесей при 37°C в течение 20 мин для PARP1 и 50 мин для PARP2 реакции останавливали добавлением буфера Лэммли и нагреванием в течение 3 мин при 95°C. Продукты реакции (ADP-рибоза, ковалентно связанная с PARP1/2, неизрасходованный NAD<sup>+</sup> и свободная ADP-рибоза) анализировали согласно 2.2.1 и 2.2.4.



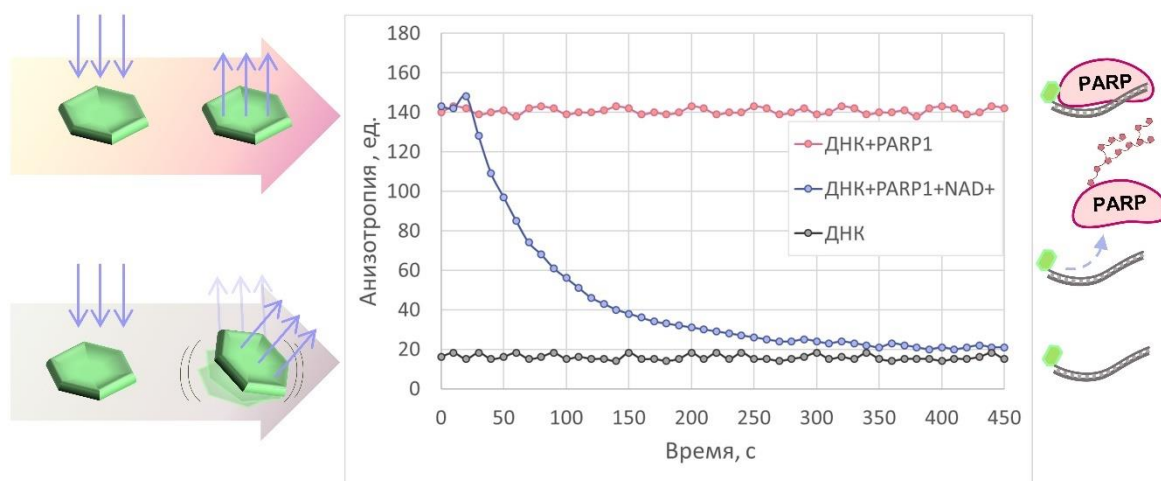
### 3. Результаты и их обсуждение

#### 3.1. Анализ активности PARP1 и PARP2 в реальном времени с помощью измерения анизотропии флуоресценции

К моменту начала данной работы не существовало метода, позволяющего изучать активность PARP1 и PARP2 *in vitro* в реальном времени (Real-time). Поэтому для определения основных кинетических параметров реакций, катализируемых этими ферментами, было необходимо предложить методику, позволяющую быстро и эффективно проводить исследования активности PARP1 и PARP2 в реальном времени, с определением количественных параметров, не прибегая к использованию радиоактивных меток. С этой целью была разработана и опубликована методика, основанная на измерении анизотропии флуоресценции [308].

##### 3.1.1. Анализ связывания PARP1/2 с ДНК и их диссоциации в процессе PAR-илирования

Суть предложенной нами методики заключается в измерении анизотропии флуоресценции реакционных смесей. Анизотропия флуоресценции определяется разницей интенсивности света, испускаемого флуорофором вдоль различных осей поляризации. При облучении флуорофора плоскополяризованным светом в возбуждённое состояние переходят преимущественно молекулы, ориентированные определённым образом относительно оси поляризации. Если флуорофор будет неподвижен, то и испускаемый им свет окажется поляризованным в той же плоскости, что и поглощенный, и уровень анизотропии будет максимальным. Будучи подвижным, флуорофор за время пребывания в возбуждённом состоянии изменит своё положение, и испускаемый им свет будет поляризован в других плоскостях. С увеличением подвижности флуорофора уровень анизотропии будет уменьшаться, так как всё большее число молекул будет испускать частично деполаризованный свет [309]. Таким образом, уровень анизотропии отражает размер комплекса, в состав которого включён флуорофор, и его подвижность в составе этого комплекса. Анизотропия флуоресценции реакционных смесей, содержащих свободную ДНК, минимальна, так как флуорофор связан только с молекулой ДНК и вращается относительно быстро (Рис.10).



**Рис.10.** Детектирование активности PARP1 путём измерения анизотропии. Анизотропия FAM-меченой ДНК минимальна (серый). При добавлении PARP1 происходит образование комплекса PARP1-ДНК (красный). В присутствии  $NAD^+$  происходит PAR-илирование PARP1 и его диссоциация с ДНК, что приводит к уменьшению анизотропии (синий).

При добавлении PARP1/PARP2 происходит увеличение уровня анизотропии, отражающее комплексообразование фермента с ДНК и, как следствие, уменьшение подвижности флуорофора. При добавлении к данной смеси  $NAD^+$  происходит поли(ADP-рибозил)ирование фермента, его диссоциация с ДНК и уменьшение анизотропии. Через некоторый промежуток времени уровень анизотропии приближается к значениям, соответствующим свободному ДНК-активатору. Таким образом, предложенная методика даёт возможность наблюдать связывание PARP1/PARP2 с ДНК и его диссоциацию из комплекса с ДНК после PAR-илирования. Метод зарекомендовал себя как инструмент для определения параметров ингибирования PARP1 [310–312] и выяснения деталей белок-белковых взаимодействий [12, 156, 157, 313].

### 3.1.2. Исследование ингибиторного действия 7-метилгуанина и 8-гидрокси-7-метилгуанина на PARP1

Ранее было обнаружено, что образующийся в организме метаболит нуклеиновых кислот 7-метилгуанин (7mGua) способен оказывать ингибиторное действие на PARP1 — важную фармакологическую мишень в противораковой терапии [311]. В данной работе с использованием разработанной методики исследованы ингибиторные свойства 7mGua, а также его метаболита — 8-гидрокси-7-метилгуанина (8oh7mGua).

Разработка ингибиторов PARP1 представляет собой приоритетное направление в медицинской химии и фармакологии. К сожалению, применение существующих ингибиторов PARP1 всё ещё связано с возникновением серьезных побочных эффектов, в частности, развития у некоторых пациентов миелодиспластического синдрома [314, 315].

Естественные метаболиты, такие как 7mGua и его производные, могут иметь более благоприятный токсикологический профиль по сравнению с синтетическими ингибиторами PARP1, что подтверждается данными QSAR-моделирования свойств 7mGua [316].

По результатам измерений оказалось, что 8oh7mGua, подобно метаболитическому предшественнику 7mGua, оказывает выраженное ингибиторное действие на ферментативную активность PARP1 (Таблица 3).

**Таблица 3. Расчетные значения IC<sub>50</sub> для ингибиторного действия 7mGua и 8oh7mGua в отношении PARP1 при разных концентрациях NAD<sup>+</sup>**

Исследуемое соединение	[NAD <sup>+</sup> ], мкМ			
	10	30	50	100
7mGua	8,0±0,3	23,1±3,1	29,4±4,2	78,1±14,1
8oh7mGua	3,6 ± 0,3	7,3 ± 0,6	7,6 ± 0,5	11,0 ± 1,1

Представлены значения IC<sub>50</sub>, измеренные регистрацией анизотропии флуоресценции FAM (средние значения трёх независимых экспериментов и их стандартные отклонения).

Оба соединения дозозависимым образом подавляют активность PARP1 в широком диапазоне концентраций NAD<sup>+</sup>. При этом 8oh7mGua — более сильный ингибитор PARP1, о чём свидетельствуют более низкие значения IC<sub>50</sub>. Величина IC<sub>50</sub> 7mGua и 8oh7mGua прямо пропорционально зависит от концентрации субстрата NAD<sup>+</sup>, что указывает на конкурентный характер их действия. Приблизительная концентрация NAD<sup>+</sup> в ядре клетки составляет 100 мкМ [317]. При такой концентрации субстрата полученные нами значения IC<sub>50</sub> для 7mGua и 8oh7mGua составили 78 и 11 мкМ соответственно. В аналогичных условиях IC<sub>50</sub> ингибитора олапариба, применяемого в клинике для лечения рака молочной железы, составляет 300 нМ [308].

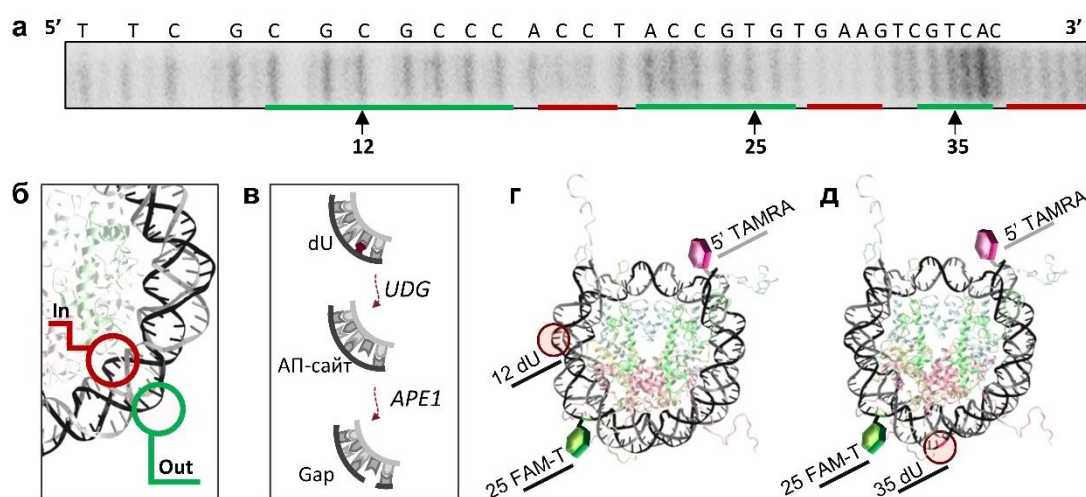
Полученные результаты согласуются с результатами молекулярного моделирования, проведённого Ниловым с соавторами. Для выяснения молекулярного механизма действия 7mGua и 8oh7mGua были сконструированы соответствующие модели комплексов с PARP1. В случае 7mGua наблюдали взаимодействия с остатками активного центра: Gly863, Ser904, Ala898 и Tyr907 [311, 316]. В случае 8oh7mGua наблюдали вышеперечисленные взаимодействия, а также дополнительный контакт с каталитическим остатком Glu988 [312]. Гидроксильная группа 8oh7mGua ориентируется в сторону боковой цепи Glu988 и способна формировать водородную связь, что может обуславливать более эффективное ингибирование по сравнению с 7mGua.

Таким образом, использование методики, основанной на измерении анизотропии флуоресценции, позволило охарактеризовать и сравнить ингибиторные свойства 7mGua и

его метаболита 8oh7mGua в отношении PARP1 человека. Показано, что оба соединения подавляют активность PARP1, но при этом 8oh7mGua обладает более выраженным ингибиторным эффектом. По-видимому, это обусловлено дополнительным взаимодействием 8oh7mGua с каталитическим остатком Glu988.

### 3.1.3. Оптимизация предложенной методики для изучения активности PARP1/2 в присутствии NCP

Ранее данная методика была опробована для определения величин  $EC_{50}$  для ферментов PARP1/2 и коротких модельных ДНК-дуплексов (30 п.о.) [308]. Затем данный протокол был оптимизирован для ДНК длиной 147–177 п.о. и NCP, в том числе содержащих повреждение-интермедиат BER. В данной работе в структуры ДНК были введены две избирательно регистрируемые флуоресцентные метки. В качестве меток были выбраны флуоресцеин (FAM, максимумы поглощения/испускания 495/520 нм соответственно) и TAMRA (максимумы поглощения/испускания 541/560 нм соответственно). Использование двух меток продиктовано наличием нескольких независимых сайтов связывания (тупые концы ДНК, неповреждённая ДНК и интермедиат BER) в структурах ДНК-активаторов, в том числе NCP. Все структуры содержали урацил (dU), необходимый для последующего ферментативного получения вариантов ДНК, содержащих брешь (Gap, интермедиат BER). Для этого ДНК и NCP обрабатывали ферментами UNG (Урацил-ДНК-гликозилаза, удаляет урацил с образованием AP-сайта) и APE1 (AP-эндонуклеаза 1, расщепляет AP-сайт), что приводило к образованию однонуклеотидной брешы (Рис.11в).



**Рис.11.** Выбор положений dU и FAM: а – определение ориентации оснований ДНК клона 603 в NCP методом футпринтинга; б – различия в ориентации «In» и «Out»; в – схема получения брешы, путём ферментативного удаления dU ферментами UNG и APE1 с образованием вначале AP-сайта, затем брешы; г, д – структуры NCP с отмеченными положениями dU, FAM и TAMRA (PDB: 1KX5).

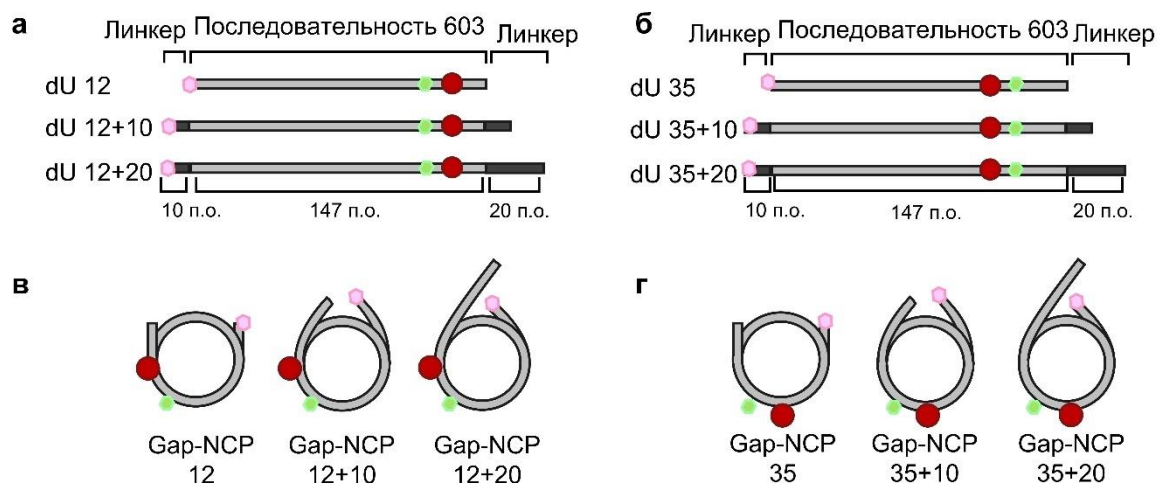
В наших структурах TAMRA расположена на 5'-конце ДНК. Предполагается, что она будет отражать преимущественно связывание ферментов с тупыми концами ДНК. Флуоресцеин связан с основанием ДНК [dT-FAM] на расстоянии 10–15 п.о. от dU. Принимая во внимание данные о том, что PARP1 при взаимодействии с односторонним разрывом ДНК покрывает приблизительно 20 п.о. [66], расположенный таким образом FAM предположительно будет отражать неспецифическое связывание PARP1/PARP2 с неповрежденной ДНК или связывание с брешью при её наличии в структуре. При этом связывание с тупыми концами ДНК не будет оказывать влияние на FAM. Иными словами, две флуоресцентные метки будут независимо отражать связывание ферментов в непосредственной близости от них.

Масштабирование описанного выше подхода для работы с NCP накладывает существенные ограничения на положение dU (и, в последствии, повреждения) и [dT-FAM], в связи с экранированием некоторых оснований ДНК гистоновым ядром NCP. Существует специальная номенклатура пространственной ориентации оснований: «In», если основание обращено к гистоновому ядру, и «Out», если основание обращено наружу (**Рис.11б**) [318, 319]. Ориентация основания напрямую влияет на взаимодействие с ДНК и, следовательно, на функциональную активность ферментов. Основания, ориентированные наружу, наиболее доступны для ферментов репарации. В то же время, азотистые основания, ориентированные внутрь, наименее доступны для взаимодействий. В анализе ДНК-белкового взаимодействия использование субстратов с внутренней ориентацией повреждения усложнит оценку потенциального вклада позиционного эффекта из-за стерических затруднений. Так, ранее мы показали, что «In» конформация затрудняет связывание PARP2 с брешью [12]. По этим причинам в данной работе важно было определить ориентацию оснований используемой ДНК в составе NCP. Оценка ориентации каждого основания проводилась методом футпринтинга (**Рис.11а**). При обработке NCP реактивом Фентона происходило расщепление ДНК в случайных положениях. При этом области, экранированные гистонами, были защищены от воздействия реактива. Это приводило к появлению «отпечатков» при разделении реакционных смесей в ПААГ. Таким образом, области, содержащие полосы с меньшей интенсивностью сигнала соответствуют основаниям, находящимся в ориентации «In», а области высокой интенсивности — «Out». Результаты, полученные методом футпринтинга согласуются с имеющимися X-Ray структурами [81, 320]. Нами были выбраны следующие положения относительно 5'-конца последовательности 603: 12 и 35 для размещения dU, и 25 для [dT-FAM] (**Рис.11г,д**). При таком расположении в NCP повреждения будут находиться в разном гистоновом контексте, в то время как FAM в обоих структурах будет расположен в одинаковом окружении.

### 3.1.4. Дизайн и получение модельных ДНК-активаторов

Для изучения взаимодействия PARP1 и PARP2 с ДНК были использованы модельные ДНК-активаторы PARP1/2, содержащие флуоресцентные метки: TAMRA на 5'-конце одной цепи и FAM в 25-ом положении другой цепи (относительно 5'-конца последовательности 603, в непосредственной близости к dU) (Рис.11г,д). Для введения dU и флуоресцентных меток для ПЦР использовали модифицированные праймеры (Раздел 2.2.7). Были получены ампликоны длиной 147, 167 и 177 п.о. (Раздел 2.2.7.3). Нуклеосомы реконструировали согласно 2.2.7.4. Реконструкцию проводили с использованием гистонов H2A, H2B, H3 и H4, и всех вариантов ДНК-603. В процессе реконструкции образуется прочный комплекс гистоновых октамеров и ДНК, намотанной на них в 1,67 оборота.

Было сконструировано две группы ДНК-активаторов: свободная ДНК 147–177 п.о. (клон ДНК-603 с линкерами и без) и нуклеосомные коровые частицы (NCP), реконструированные с использованием всех вариантов ДНК (Рис.12).



**Рис.12.** Дизайн используемых ДНК-активаторов: а, б – схематичное изображения ДНК, содержащих dU (обозначен красным) в положении 12 и 35 соответственно (относительно конца последовательности 603, выделена серым); в, г – популяции NCP, содержащие брешь в положениях 12 и 35, а также линкеры разной длины.

Все ДНК-активаторы содержали либо тупые концы без 5'-концевого фосфата (имитирующие двухцепочечный разрыв ДНК), либо тупые концы в комбинации с однонуклеотидной брешью. Активаторы с соответствующими повреждениями далее обозначены как ДНК, Gap ДНК, NCP и Gap NCP. В работе использовали ДНК клон 603, способный образовывать стабильные нуклеосомные частицы с октамерами гистонов без использования хроматиновых шаперонов [86]. Последовательность клона 603 длиной 147 п.о. обеспечивает однозначное позиционирование ДНК в нуклеосоме, что позволяет использовать её как в исходном варианте (ДНК 147 п.о.), так и в вариантах с

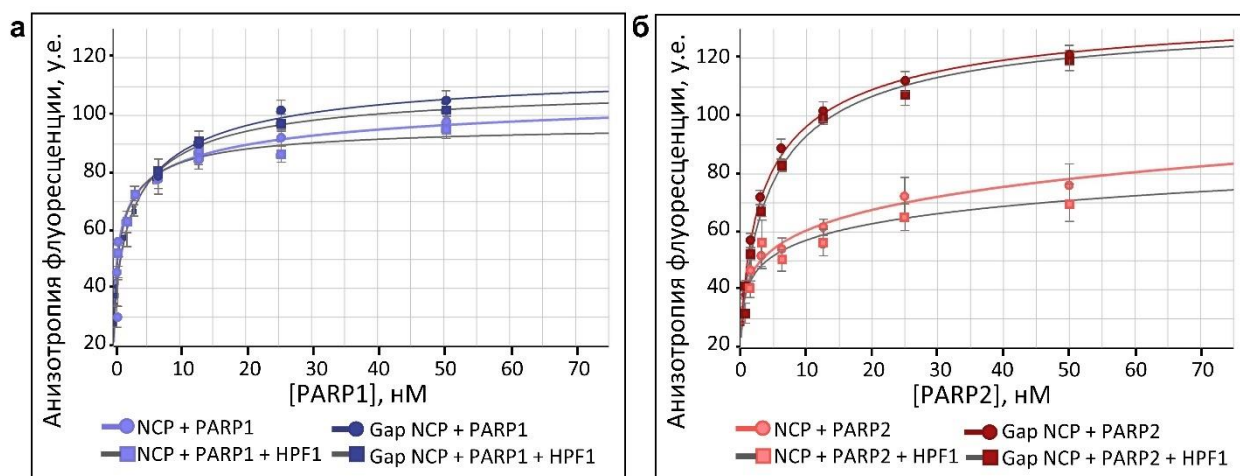
дополнительными линкерами с обоих концов ДНК-дуплекса, выступающими за пределы реконструированных NCP. Всего было сконструировано две группы ДНК-активаторов, содержащих dU либо в положении 12 (**Рис.12а,в**), либо в положении 35 (**Рис.12б,г**) относительно 5'-конца последовательности клона 603 (147 п.о.). Группы содержали исходную ДНК-603 (147 п.о.), ДНК с линкерами по 10 п.о. с каждого конца и с линкерами 10 п.о. с одного конца и 20 п.о. с другого. При этом положение dU менялось с 12 на 22 и 32, и с 35 на 45 и 55 относительно 5'-конца ДНК.

Таким образом, всего было сконструировано 6 вариантов ДНК, содержащих dU в различных положениях относительно 5'-конца (положения 12, 22, 32, 35, 45, 55). После реконструкции NCP с данными ДНК получали две популяции нуклеосом, содержащих dU в положении 12 (**Рис.12д**) либо 35 (**Рис.12е**) относительно 5'-конца последовательности 603 (положение в NCP соответствует SHL 5,5 и 3,5 соответственно). Каждая популяция содержала 3 вида NCP: NCP без линкеров, NCP с двумя линкерами по 10 п.о., и NCP с линкерами 10 и 20 п.о. (**Рис.12в,г**). Положение повреждения внутри каждой популяции NCP оставалось постоянным относительно гистонового октамера, но удалялось от 5'-конца ДНК на 10 и 20 п.о. Такой сложный дизайн был необходим для одинакового (в рамках одного набора структур) позиционирования бреши относительно гистонового октамера в составе NCP, что обеспечивает одинаковый гистоновый контекст повреждения и флуоресцентной метки в NCP и позволяет более объективно интерпретировать результаты, получаемые на разных структурах ДНК.

### **3.1.5. Определение величин $EC_{50}$ для ферментов PARP1/2 и ДНК (NCP) с повреждением**

Не смотря на большое количество работ, посвященных изучению сродства PARP1 и PARP2 к различным повреждениям ДНК, работы по детальному изучению связывания данных ферментов с однонуклеотидной брешью в контексте NCP, в том числе в зависимости от удалённости повреждения от 5'-конца ДНК, не проводилось. В данной работе для определения величин  $EC_{50}$ , отражающих сродство PARP1 и PARP2 к различным ДНК-активаторам использовали измерение анизотропии флуоресценции. Сродство ферментов к ДНК может определять (но необязательно прямо) долю каталитически активного комплекса PARP-ДНК (NCP), который может эффективно PAR-илировать PARP и гистоны. Для сравнения сродства PARP1 и PARP2 к ДНК и NCP использовали все варианты ДНК и NCP, с брешью и без бреши. Кажущиеся константы равновесия комплексов PARP1/PARP2 с ДНК и NCP ( $EC_{50}$ ) определяли путем измерения анизотропии

флуоресценции ДНК (NCP) в присутствии возрастающей концентрации PARP согласно 2.2.9.2 (Таблицы 4-6). Типичные кривые насыщения приведены на Рис.13



**Рис.13.** Типичные кривые титрования, отражающие связывание NCP/Gap NCP (положение 35) с PARP1(а) и PARP2 (б) в присутствии и отсутствии 200нМ HPF1, полученные путем измерения поляризации флуоресценции FAM.

Величины  $EC_{50}$ , определённые в канале TAMRA для PARP1 и всех вариантов ДНК статистически не отличались и составили  $2\pm 1$  нМ для ДНК и  $3\pm 1$  нМ для Gap ДНК, независимо от положения этого повреждения (Таблица 4).

**Таблица 4. Кажущиеся равновесные константы диссоциации комплексов PARP1 с ДНК и NCP ( $EC_{50}$ , нМ).**

Флуоресцентная метка	ДНК-активаторы	Положение dU относительно 5'-конца ДНК					
		12	12+10	12+20	35	35+10	35+20
TAMRA	ДНК	$2\pm 1$	$3\pm 2$	$2\pm 1$	$2\pm 2$	$2\pm 1$	$3\pm 2$
	Gap ДНК	$3\pm 1$	$3\pm 1$	$3\pm 1$	$4\pm 1$	$4\pm 1$	$3\pm 1$
	NCP	$8\pm 2$	$1\pm 0,5$	$1\pm 0,5$	$9\pm 3$	$1\pm 0,5$	$1\pm 0,5$
	Gap NCP	$6\pm 2$	$1\pm 0,5$	$1\pm 0,5$	$7\pm 3$	$1\pm 0,5$	$1\pm 0,5$
FAM	ДНК	$4\pm 1$	$5\pm 2$	$3\pm 1$	$4\pm 1$	$3\pm 1$	$3\pm 1$
	Gap ДНК	$2\pm 0,5$	$2\pm 0,5$	$2\pm 0,5$	$2\pm 0,5$	$2\pm 0,5$	$2\pm 0,5$
	NCP	$4\pm 1$	$5\pm 2$	$4\pm 2$	$4\pm 1$	$3\pm 1$	$4\pm 1$
	Gap NCP	$20\pm 5$	$14\pm 2$	$9\pm 2$	$8\pm 2$	$5\pm 1$	$4\pm 1$

Представлены значения  $EC_{50}$ , измеренные регистрацией анисотропии флуоресценции TAMRA и FAM (средние значения трёх независимых экспериментов и их стандартные отклонения).

Вероятнее всего, как мы и предполагали на стадии получения ДНК-структур, TAMRA преимущественно отражает связывание фермента с тупыми концами ДНК: этому способствует ориентация метки, связанной с 5' концом ДНК. Отсутствие ожидаемого влияния бреши на связывание PARP1 с тупым концом объясняется тем, что TAMRA



находится на другом конце ДНК, нежели FAM и dU, и брешь располагается от метки на расстоянии 122-135 п.о. Иными словами, связывание фермента с брешью на анизотропию в канале TAMRA не влияет; взаимодействие фермента с тупыми концами и брешью детектируется независимо. В случае NCP, мы детектировали увеличение значений  $EC_{50}$  для обеих структур без линкеров (Таблица 4., выделено цветом). Это хорошо согласуется с данными Кларк с соавторами, показавшими существенные затруднения в связывании PARP1 с тупыми концами в составе NCP без линкеров [66]. Появление даже небольших (10 п.о.) линкеров приводило к значительному увеличению сродства PARP1 к NCP, что мы и наблюдаем в данной работе.

Значения  $EC_{50}$ , определённые в канале FAM для комплексов PARP1 с ДНК и Gap ДНК, практически одинаковы. В наших экспериментах нижний предел  $EC_{50}$  определяется концентрацией ДНК. Минимальная концентрация ДНК и NCP, которая может быть использована для достоверного измерения анизотропии флуоресценции — 3 нМ. Вероятнее всего, определённые нами величины превышают реальные значения констант диссоциации ( $K_D$ ) для комплексов PARP1. Так, в работе Д’Сильва, величины  $K_D$  для PARP1, полученные из кинетических параметров, были определены как 0,1 и 0,4 нМ при связывании с тупыми концами и односторонним разрывом соответственно [321]. Иными словами, истинные величины  $K_D$  лежат уже в пикомолярном диапазоне концентраций, и не могут быть достоверно измерены ввиду методических ограничений метода поляризации флуоресценции.

В случае NCP, мы наблюдаем увеличение значений  $EC_{50}$  для PARP1 при приближении бреши к 5' концу ДНК. Величины  $EC_{50}$  для NCP с брешью в положениях 32 и 35, находящихся в разном положении относительно октамера гистонов (12 и 35 от конца последовательности 603), одинаковы. Это даёт нам основания предполагать, что обнаруженная динамика связана именно с положением повреждения относительно тупых концов ДНК, а не с различиями контекста гистонов или наличия линкеров. Такое уменьшение сродства может быть связано с конкуренцией молекул PARP1 за связывание с двумя близкорасположенными повреждениями: тупым концом и брешью. То есть данная структура содержит кластер повреждений, затрудняющий связывание фермента с брешью, либо приводящий к образованию комплекса с другой архитектурой. Возможно, наблюдаемое изменение величин  $EC_{50}$  связано с образованием иных типов комплексов PARP1 с NCP в присутствии кластера повреждений, когда брешь расположена в непосредственной близости от тупых концов ДНК.

Мы не детектировали связывание PARP2 в канале TAMRA. Это наблюдение согласуется с литературными данными, описывающими критическую роль фосфата в

распознавании повреждения ферментом PARP2 [46, 57, 69, 98] и вновь подтверждает нашу гипотезу о преимущественном влиянии связывания с тупыми концами на сигнал, получаемый от флуорофора TAMRA. Далее приведены величины  $EC_{50}$ , определённые с использованием сигнала FAM для комплексов PARP2 с ДНК и NCP (Таблица 5).

**Таблица 5. Кажущиеся равновесные константы диссоциации комплексов PARP2 с ДНК и NCP, детектированные в канале FAM ( $EC_{50}$ , нМ).**

ДНК-активаторы	Положение dU относительно 5'-конца ДНК					
	12	12+10	12+20	35	35+10	35+20
ДНК	700±50	700±50	600±50	800±50	700±50	700±50
Gap ДНК	2±1	3±1	4±2	3±1	3±1	2±1
NCP	600±50	700±50	500±50	600±50	600±50	600±50
Gap NCP	3±1	4±1	3±2	5±2	6±2	7±3

Представлены значения  $EC_{50}$ , измеренные регистрацией анизотропии флуоресценции FAM (средние значения трёх независимых экспериментов и их стандартные отклонения).

Исходя из величин  $EC_{50}$  для NCP и ДНК без бреши, мы можем заключить, что PARP2 имеет низкое сродство к неповреждённой ДНК. Учитывая тот факт, что BRCT и WGR домены PARP1 были определены как домены, обеспечивающие его связывание с неповреждённой ДНК [55, 56], отсутствие домена BRCT и некоторые отличия WGR в структуре PARP2 могут играть критическую роль в его взаимодействии с ДНК, не содержащей повреждения. В случае PARP1 высокое сродство к неповреждённой ДНК обеспечивает быструю миграцию фермента в хроматине, в то время как PARP2 мигрирует значительно медленнее [76], что также согласуется с высокими значениями  $EC_{50}$  PARP2 для ДНК и NCP без бреши. При этом PARP2 специфически взаимодействует с брешью с высоким сродством. В случае PARP2 не наблюдается зависимости сродства к бреши от удалённости этого повреждения от тупого конца. Это согласуется с тем фактом, что мы не детектировали какого-либо связывания PARP2 с ДНК по сигналу TAMRA, который вероятнее всего отражает связывание с тупыми концами ДНК. Иными словами, для PARP2 брешь во всех положениях являлся единственным сайтом специфического взаимодействия.

Мы не детектировали какого-либо влияния HPF1 на связывание PARP1/2 с ДНК и NCP (Таблица 6). По всей видимости, отсутствие эффектов объясняется низким сродством HPF1 к PARP1/2 в отсутствие  $NAD^+$  [53, 87, 99]. Иными словами, HPF1 может связываться с активным центром PARP1/2 в присутствии  $NAD^+$ , когда HD-домен максимально раскрыт.

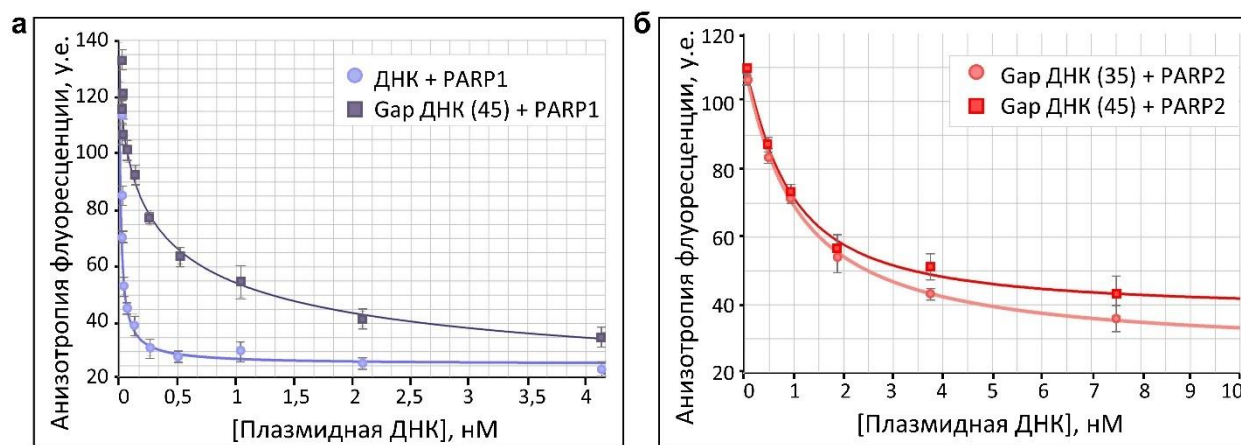
**Таблица 6. Кажущиеся равновесные константы диссоциации комплексов PARP1/2 с NCP, детектированные в канале FAM в присутствии и отсутствии HPF1 (EC<sub>50</sub>, нМ).**

Фермент	ДНК-активаторы			
	NCP	NCP (+HPF1)	Gap NCP	Gap NCP (+HPF1)
PARP1	4±1	4±1	8±2	7±2
PARP2	600±50	500±50	5±2	4±2

Представлены значения EC<sub>50</sub>, измеренные регистрацией анизотропии флуоресценции FAM (средние значения трёх независимых экспериментов и их стандартные отклонения).

### 3.1.6. Определение величин IC<sub>50</sub> в анализе конкурентного связывания ферментов PARP1/2 и ДНК

Ввиду невозможности достоверного определения величин EC<sub>50</sub> для PARP1 и использованных в работе структур ДНК, мы провели эксперименты по конкурентному связыванию. В качестве ДНК-конкурентов была применена плазмидная ДНК (суперскрученная pBR322) и ДНК-603 длиной 147 п.о. (без флуоресцентных меток). К предформированному комплексу PARP1/2-ДНК (при соотношении 0,5:1, в соответствии с полученными величинами EC<sub>50</sub>) добавляли возрастающие концентрации конкурентной ДНК. При этом меченная ДНК постепенно вытесняется из комплекса с ферментом, что приводит к её высвобождению и уменьшению анизотропии флуоресценции (**Рис.14**).



**Рис.14.** Типичные кривые титрования, представляющие диссоциацию PARP1 (а) и PARP2 (б) с флуоресцентномечеными ДНК/Gap ДНК (положение бреши указано на легенде) в присутствии возрастающей концентрации конкурентной ДНК (плазида pBR322), полученные путем измерения поляризации флуоресценции FAM.

Предполагается, что чем ниже сродство PARP1/2 к исходной ДНК, тем меньше требуется конкурентной ДНК для полного высвобождения FAM-ДНК из комплекса с ферментом. Из кривых титрования получали величины IC<sub>50</sub>, которые представлены в **Таблице 7**. Для PARP1, мы наблюдали уменьшение значений IC<sub>50</sub> при приближении бреши

к 5'-концу ДНК. Это, вероятно, отражает уменьшение сродства PARP1 к повреждению, находящемуся в непосредственной близости от тупого конца ДНК, либо иную архитектуру комплекса PARP1 с кластерным повреждением.

**Таблица 7. Кажущиеся равновесные константы ингибирования связывания PARP1 и PARP2 с ДНК, детектированные в канале FAM и TAMRA (IC<sub>50</sub>, нМ).**

Фермент	ДНК-активаторы	TAMRA	FAM						
			Без бреш	Положение бреш относительно 5'-конца ДНК					
				12	12+10	12+20	35	35+10	35+20
PARP1	147 п.о. ДНК-FAM vs pBR322	5±1	0,07 ±0,01	0,12 ±0,02	0,16 ±0,02	0,21 ±0,02	0,24 ±0,02	0,43 ±0,05	0,43 ±0,07
	147 п.о. ДНК-FAM vs 147 п.о. ДНК	-	4±2	5±2	12±1	16±3	18±1	20±2	19±1
PARP2	147 п.о. ДНК-FAM vs pBR322	-	-	0,6 ±0,2	0,6 ±0,1	0,5 ±0,1	0,8 ±0,1	0,9 ±0,2	0,9 ±0,2
	147 п.о. ДНК-FAM vs 147 п.о. ДНК	-	-	28±7	31±8	43±5	42±7	23±8	27±7

Представлены значения IC<sub>50</sub>, измеренные регистрацией анизотропии флуоресценции FAM (средние значения трёх независимых экспериментов и их стандартные отклонения).

По сути, мы наблюдаем ту же картину, что и при непосредственном измерении EC<sub>50</sub> для PARP1 и NCP с брешью в различном положении. Подобная динамика наблюдается как при использовании плазмидной ДНК, так и ДНК-603 в качестве конкурента. Стоит отметить, что, несмотря на существенную разницу величин IC<sub>50</sub> для ДНК, содержащей и не содержащей бреш, сродство PARP1 ко всем вариантам ДНК-активаторов высоко (EC<sub>50</sub> < 2 нМ).

Величины IC<sub>50</sub>, полученные для PARP1 и плазмидной ДНК в канале TAMRA, статистически не различались независимо от присутствия бреш и её удалённости от тупых концов. Величина IC<sub>50</sub>, отражающая ингибирование связывания PARP1 с тупыми концами, составляет 5±1 нМ, что в 10 раз выше соответствующей величины для бреш в положениях 45–55 и в 70 раз выше IC<sub>50</sub> для неповреждённой ДНК. Это даёт нам основание предположить, что сродство PARP1 к тупым концам ДНК многократно выше сродства к бреш и неповреждённой ДНК, и именно связывание с концами определяет взаимодействие PARP1 с используемыми ДНК-активаторами в целом.

Величины IC<sub>50</sub> для PARP2 статистически не различаются. Мы не наблюдаем какой-либо выраженной динамики изменения величин IC<sub>50</sub>, что согласуется с отсутствием таковой для значений EC<sub>50</sub>. При этом значения IC<sub>50</sub> для PARP2 выше (до 5 раз), чем для PARP1 для обоих ДНК-конкурентов. Это вероятнее всего отражает более низкое сродство PARP2 к

неповреждённой ДНК и тупым концам ДНК, лишенным фосфатов. Величины  $IC_{50}$  для комплексов PARP2 с неповреждённой ДНК не определяли ввиду изначально низкого сродства фермента к данной структуре.

Таким образом, в рамках данной работы, мы оптимизировали представленную методику изучения активности PARP1/PARP2 *in vitro* в реальном времени для использования NCP и ДНК длиной 147–177 п.о. в качестве активаторов ферментов. Увеличение размеров ДНК активаторов, по сравнению с модельными ДНК-дуплексами (30 п.о.) потребовало введения дополнительной флуоресцентной метки для детекции связывания с разными сайтами NCP и ДНК. На основании величин  $EC_{50}$ , полученных для комплексов ДНК/NCP с PARP1 (Таблица 4) и PARP2 (Таблица 5), а также данные по конкурентному связыванию (Таблица 7), мы можем предположить, что в используемых ДНК-активаторах действительно присутствуют несколько сайтов взаимодействия, а именно тупые концы ДНК, неповреждённая ДНК и брешь (при наличии). Присутствие двух конкурирующих сайтов связывания (тупых концов и бреши) на расстоянии до 30 п.о. влияет на связывание PARP1 с брешью. Однако, эта вероятная разница в сродстве к бреши в зависимости от её положения оказывается незначительной на фоне общего высокого ( $K_D < 2$  нМ) сродства PARP1 к ДНК. Опираясь на количественные характеристики связывания ДНК и NCP (величины  $EC_{50}$ , полученные здесь с использованием двух флуоресцентных меток, и полученные нами ранее в работе [12], а также результаты группы Студитского [91]), мы предполагаем, что PARP1 преимущественно связывается с тупыми концами ДНК, в т.ч. и в составе NCP. Вероятнее всего, PARP1 образует комплексы и с брешью, и с неповреждённой ДНК, но их доля существенно ниже доли комплексов с тупыми концами.

В отличие от PARP1, PARP2 эффективно связывается только с брешью, но не с тупым концом ДНК. При этом сродство PARP2 к бреши не зависит от ее удалённости от тупых концов, что согласуется с отсутствием связывания данного фермента с тупыми концами, лишенными фосфата [46, 57]. PARP2 также имеет низкое сродство к неповреждённой ДНК. Данные, полученные здесь с помощью измерения анизотропии флуоресценции, согласуются с данными, полученными ранее с помощью АСМ [46, 69]. В экспериментах с протяжённой ДНК, содержащей одноцепочечный разрыв, было показано, что PARP1 связывается как с неповреждённой ДНК, так и с разрывом, при этом величины  $K_D$  составляют 1,6 и 0,8 нМ соответственно (что ниже доступного нам предела в 2 нМ). В то же время PARP2 обнаруживался преимущественно в комплексе с разрывом ДНК, практически не взаимодействовал с тупыми концами, лишёнными фосфатов, и имел низкое сродство к неповреждённой ДНК.

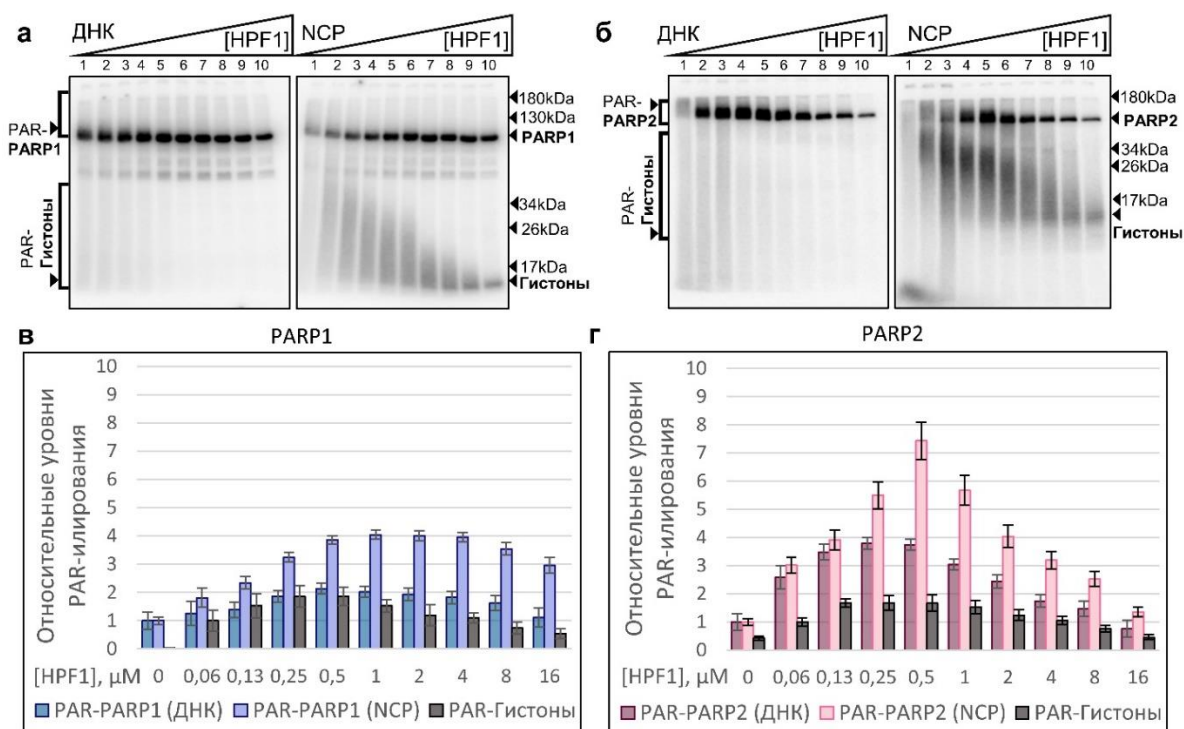
### **3.2. HPF1 стимулирует инициацию PAR-илирования PARP1 и PARP2 одновременно с подавлением элонгации PAR-илирования**

Следующий раздел работы посвящен изучению влияния фактора PAR-илирования гистонов HPF1 на активность PARP1 и PARP2. Данный фактор образует гибридный активный центр с PARP1 и PARP2 [26]. В ранних работах, посвященных HPF1, было показано ингибирование PAR-илирования PARP1 и PARP2 и стимуляция их NAD<sup>+</sup>-гидролазной активности в присутствии высоких концентраций HPF1, которые были использованы в связи с его низким сродством к PARP1 *in vitro* [87]. В то же время концентрация PARP1 в клетках в 20-50 раз выше, чем концентрация HPF1 [26]. Поэтому было целесообразно исследовать влияние различных концентраций данного фактора на активность PARP1 и PARP2 в реакции авто-PAR-илировании и модификации гистонов. В нашей работе мы изучили эффекты HPF1 в различных экспериментальных условиях, и показали, что HPF1 может стимулировать стадию инициации PAR-илирования, вместе с подавлением элонгации.

#### **3.2.1. HPF1 стимулирует авто-PAR-илирование PARP1 и PARP2 одновременно с переключением PAR-илирования на гистоны**

В первую очередь, нами было изучено влияние различных концентраций HPF1 на активность PARP1 и PARP2. Для активации PARP1 и PARP2 использовали ДНК-603 (147 п.о.) и NCP без линкеров и без бреши. Продукты реакции PAR-илирования анализировали с помощью разделения в SDS-ПААГ и количественного определения количества поли (ADP-рибозы) с использованием [<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> (**Рис.15а,б**). Было обнаружено, что даже низкие концентрации HPF1 (60 нМ по сравнению с 500 нМ PARP1/2, образец 2) стимулируют PAR-илирование гистонов. Повышение концентрации HPF1 влияло на общий уровень ADP-рибозилирования PARP и гистонов, а также на длину полимера ADP-рибозы, присоединенного к белкам. Так, гетерогенные смеси модифицированных белков с совершенно разной электрофоретической подвижностью (визуализируемой как размытие полосы) становились более однородными в присутствии высоких концентраций HPF1. Это свидетельствует об укорочении синтезируемого PAR в присутствии возрастающих концентраций HPF1, что согласуется с предполагаемым подавлением элонгации в совместном активном центре PARP:HPF1 за счёт экранирования остатка гистидина, ответственного за удлинение цепи PAR (His826 и His381 в PARP1 и PARP2 соответственно) [27]. При этом наличие модифицированных гистонов с разной электрофоретической подвижностью свидетельствует о гетерогенности длины синтезированного PAR. Невозможность элонгации в совместном активном центре и модификация гистонов (строго

HPF1-зависимая *in vitro*) полимерами разной длины дают нам основание предположить, что после опосредованной HPF1 инициации PAR-илирования остатков серина дальнейший синтез протяжённого PAR осуществляется свободным PARP. Увеличение концентрации HPF1 закономерно уменьшает долю свободного PARP, что приводит к снижению доли гистонов, модифицированных длинным PAR. Так, в присутствии 8-кратного избытка HPF1 по отношению к PARP, по всей видимости, весь PARP находится в комплексе с HPF1, и элонгация PAR при этом сильно подавлена.

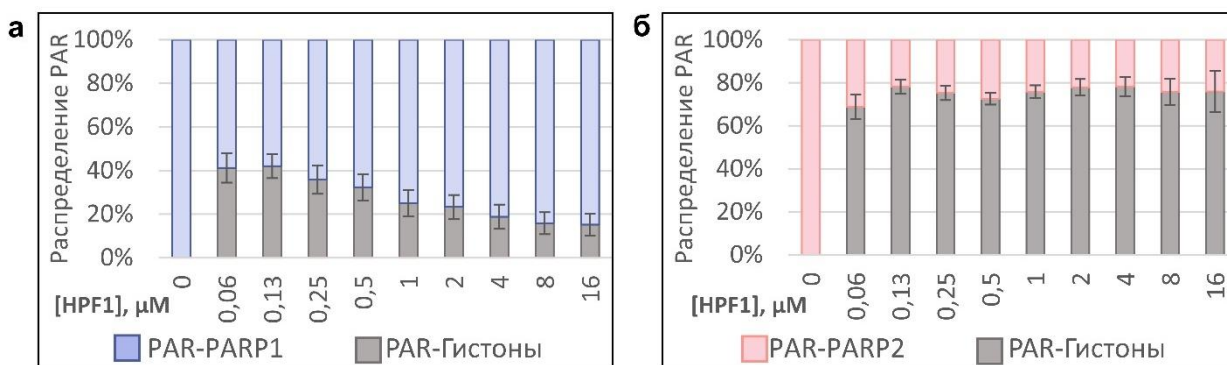


**Рис.15.** HPF1 стимулирует авто-PAR-илирование PARP1 и PARP2 и гетеро-PAR-илирование гистонов: а, б – автордиограммы показывают ковалентное связывание [<sup>32</sup>P]-меченой ADP-рибозы с белками после инкубации 500 нМ PARP1 (PARP2) с 1 мкМ [<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> в присутствии 250 нМ ДНК/NCP и HPF1 возрастающей концентрации (60 нМ–16 мкМ), продукты разделяли в SDS-ПААГ; в, г – на графиках представлены относительные уровни мечения (среднее значение ± стандартное отклонение трех независимых измерений) PARP1, PARP2 и гистонов, определенные путем нормализации количеств ADP-рибозы, ковалентно связанных с данным белком в присутствии HPF1 (образцы 2–10 для PARP1/PARP2 и образцы 3–10 для гистонов) до соответствующего количества в отсутствие HPF1 или его минимальной концентрации (образец 1 для PARP1/PARP2 и образец 2 для гистонов).

Стимулирующее влияние HPF1 на автомодификацию PARP1/PARP2 было более выражено, когда для активации PARP использовали нуклеосомы вместо ДНК (**Рис.15в,г**). Максимальные эффекты HPF1 на катализируемую PARP1 и PARP2 автомодификацию в присутствии нуклеосомы (увеличение в 6 и 8 раз, соответственно) и ДНК (увеличение в 3 и

5 раза) наблюдались при концентрации HPF1 1 и 0,5 мкМ для PARP1 и PARP2. При дальнейшем увеличении концентрации HPF1 его стимулирующий эффект на аутомодификацию как PARP1, так и PARP2 снижался. Ранее было показано, что HPF1 взаимодействует в бинарном комплексе с CAT-доменом PARP1, лишенным аутоингибиторного домена HD [31], что указывает на необходимость открытия активного центра ферментов для взаимной аккомодации HPF1 и NAD<sup>+</sup> в тройном комплексе с PARP. При этом связывание ДНК и NAD<sup>+</sup> способствует перестройке HD и открытию активного центра PARP1 (PARP2) (Рис.1) [27, 64]. Мы предполагаем, что индуцированная нуклеосомами перестройка CAT лучше подходит для связывания HPF1 и NAD<sup>+</sup>. В результате активация NCP способствует образованию большего числа каталитически активных комплексов HPF1:PARP, что приводит к большему проявлению эффектов в присутствии нуклеосомы по сравнению с ДНК.

Влияние различных концентраций HPF1 на PAR-илирование гистонов, катализируемое PARP1 и PARP2, было похожем (Рис.15в,г). В то же время между PARP1 и PARP2 наблюдалась достоверная разница в относительных уровнях авто- и гетеро-PAR-илирования, определяемых как процент от общего количества ADP-рибозы, ковалентно связанной с PARP и гистонами (Рис.16а,б).



**Рис.16.** Относительные уровни авто- и гетеро-PAR-илирования PARP1, PARP2 и гистонов: а, б – графики показывают распределение (%) общего количества ковалентно связанной [<sup>32</sup>P]ADP-рибозы в каждом образце между модифицированным PARP1 (PARP2) и гистонами.

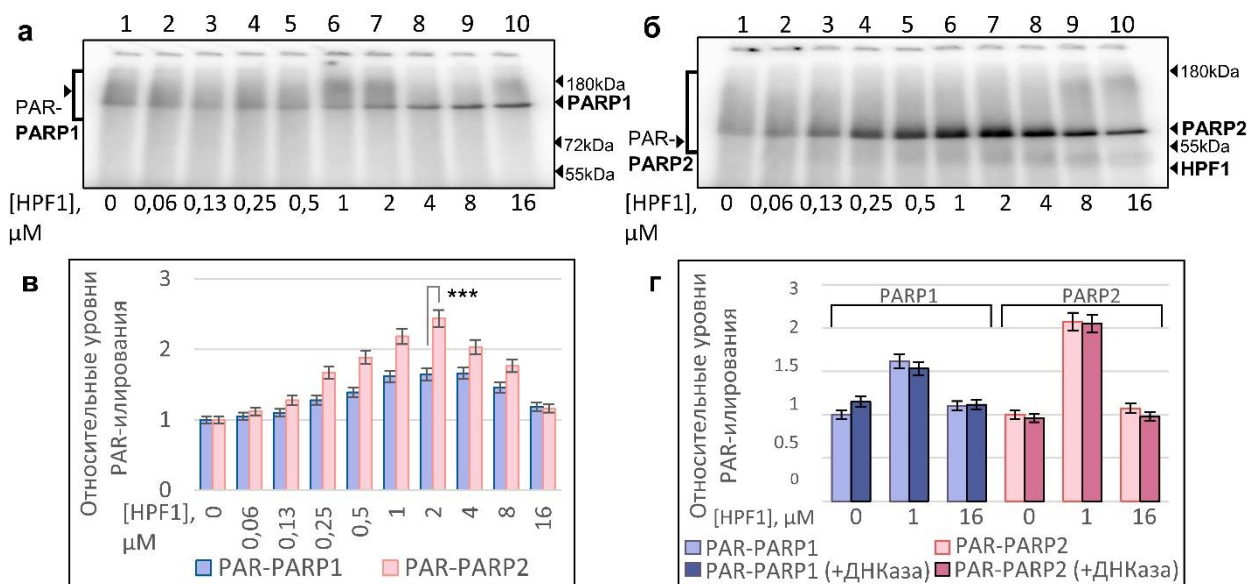
В то время как предпочтительной мишенью для PARP1 при различных концентрациях HPF1 был сам PARP1, большая часть PAR, синтезируемого PARP2, была связана с гистонами. Кроме того, соотношение уровней модификации гистонов и PARP1 уменьшалось с увеличением концентрации HPF1, в то время как соответствующее значение в случае PARP2 оставалось стабильным, достигая ~75%. Такая разница в распределении уровней PAR-илирования может объясняться разницей во взаимодействии PARP1 и PARP2



с ДНК-активаторами (Раздел 3.1.5), а также отсутствием у PARP2 основных сайтов PAR-илирования, характерных для PARP1 и располагающихся в BRCT-домене и линкерной области между BRCT и WGR [54].

### 3.2.2. HPF1 способствует катализируемому PARP1/PARP2 PAR-илированию в отсутствие ДНК

Временное (низкоаффинное) прямое взаимодействие PARP1 с HPF1, предложенное ранее [27, 31, 99], побудило нас предположить возможную стимуляцию авто-PAR-илирования PARP1 и PARP2 в присутствии HPF1 в отсутствие какого-либо активатора (NCP или ДНК). Для проверки этой гипотезы была протестирована ДНК-независимая активность (т.е. в отсутствие NCP или ДНК) PARP1 и PARP2 в присутствии возрастающих концентраций HPF1 (Рис.17а-в).



**Рис.17.** HPF1 стимулирует катализируемое PARP1/2 авто-PAR-илирование в отсутствие ДНК: а, б – авторадииограммы показывают ковалентное связывание [<sup>32</sup>P]-меченой ADP-рибозы с PARP1/2 после инкубации PARP (500 нМ) с [<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> (1 мкМ) в отсутствие (образец 1) и в присутствии возрастающих концентраций HPF1 (разделение продуктов в SDS-ПААГ); в – на графиках представлены относительные уровни мечения (среднее ± стандартное отклонение трех независимых измерений) PARP1/2, определенные путем нормализации количества ADP-рибозы, ковалентно связанной с данным белком в присутствии HPF1, к соответствующему количеству в его отсутствие. Статистически значимые различия отмечены p < 0,001 (\*\*\*) ; г – на графиках представлены относительные уровни мечения (среднее ± стандартное отклонение трех независимых измерений и отдельные точки данных) PARP1 и PARP2 в отсутствие и в присутствии HPF1 до и после обработки ДНКазой I.

Предварительные эксперименты, проведенные с обработкой ДНКазой I и без нее, показали, что препараты PARP1, PARP2 и HPF1 не содержат примесей ДНК (Рис.17г). Тем не менее низкие уровни базальной активности, обнаруженные для обоих ферментов в отсутствие ДНК, в разной степени возрастали в присутствии HPF1. Максимальный эффект на уровень авто-PAR-илирования PARP2 был несколько выше (увеличение в 2,4 раза) по сравнению с таковым у PARP1 (увеличение в 1,6 раза). Интересно, что максимальный эффект, обнаруженный для PARP2, вызывал четырехкратный избыток HPF1, тогда как в присутствии ДНК или нуклеосом максимальная стимуляция наблюдалась при эквимолярном соотношении HPF1 и PARP2. Зависимость оптимальной концентрации HPF1 от наличия PARP1/2 в связанном с ДНК или свободном от ДНК состоянии может быть следствием более высокой стабильности тройного комплекса ДНК-PARP-HPF1 [27]. Тот факт, что максимальный стимулирующий эффект наблюдался при более высоких (относительно ДНК-зависимой активации) концентрациях HPF1 свидетельствует о более низком сродстве данного фактора к PARP1 и PARP2 в отсутствие ДНК. Это ещё раз подтверждает необходимость каталитической активации PARP для связывания с HPF1.

### 3.2.3. HPF1 модулирует активность PARP1 и PARP2 на начальной стадии реакций

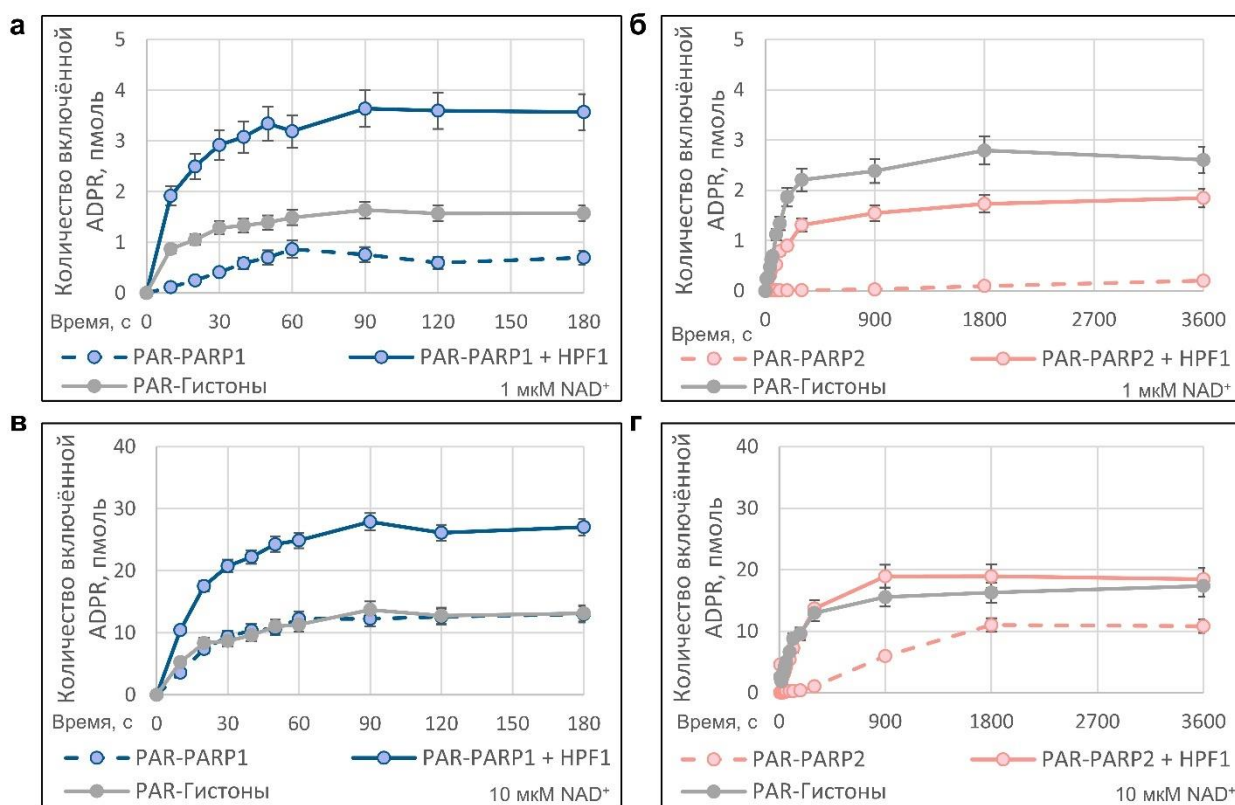
Стимуляция активности PARP1 и PARP2 в присутствии HPF1, вместе с подавлением элонгации PAR-илирования, оставляют открытым вопрос о механизме наблюдаемой стимуляции. Для более точного понимания данного феномена мы исследовали кинетику реакций авто- и гетеромодификации, катализируемых PARP1/2. Кинетические измерения ДНК-зависимой активности (в присутствии NCP) в отсутствие или в присутствии HPF1 (в оптимальной концентрации) проводили при концентрациях  $\text{NAD}^+$  1 мкМ (Таблица 8, Рис.18а,б) и 10 мкМ (Таблица 8, Рис.18в,г).

**Таблица 8. Начальные скорости катализируемой PARP1 (PARP2) авто- и гетеромодификации (фмоль/с).**

PARP	ДНК-зависимая реакция						ДНК-независимая модификация	
	Автомодификация				Модификация гистонов		Без HPF1	+ HPF1
	Без HPF1		+ HPF1					
	1 $\mu\text{M}$ $\text{NAD}^+$	10 $\mu\text{M}$ $\text{NAD}^+$	1 $\mu\text{M}$ $\text{NAD}^+$	10 $\mu\text{M}$ $\text{NAD}^+$	1 $\mu\text{M}$ $\text{NAD}^+$	10 $\mu\text{M}$ $\text{NAD}^+$		
PARP1	13 ± 5	350 ± 20	120 ± 15	760 ± 30	70 ± 20	400 ± 50	0,3±0.1	0,8±0.3
PARP2	1 ± 0.2	5 ± 1	11 ± 2	90 ± 10	18 ± 4	100 ± 20	0,2±0.1	1±0,4

Начальные скорости (фмоль/с), определенные по линейному участку кинетических кривых (Рис.18, 19), представляют собой среднее ± стандартное отклонение трех независимых измерений.

Установлено, что начальная скорость автомодификации значительно выше для PARP1, чем для PARP2 (в 13 раз и 70 раз при концентрации  $\text{NAD}^+$  1 мкМ и 10 мкМ соответственно), (Таблица 8). Разница между PARP1 и PARP2 в начальных скоростях автомодификации в присутствии HPF1 составляла один порядок при низкой и более высокой концентрации  $\text{NAD}^+$ .

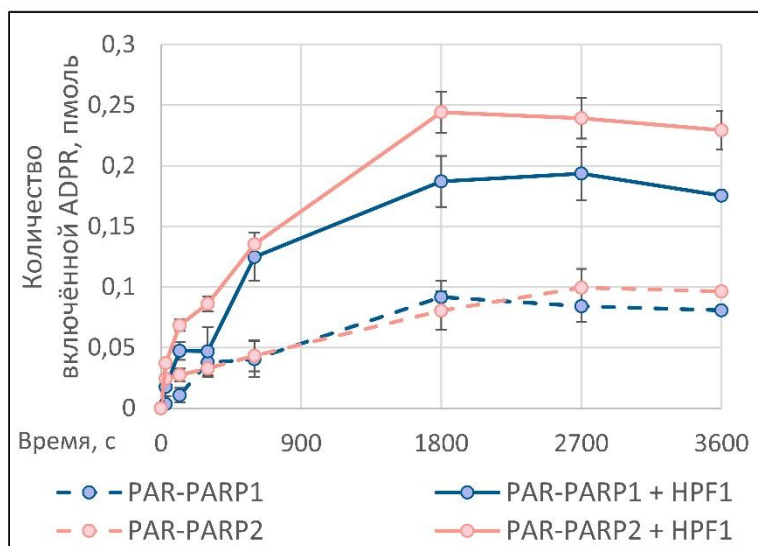


**Рис.18.** HPF1 модулирует автомодификацию и PARP1 и PARP2 и модификацию гистонов на начальной стадии реакций: а, б – типичные кинетические кривые катализируемых PARP1 (а) и PARP2 (б) реакций ковалентного присоединения ADP-рибозы к PARP и гистонам при инкубации PARP (500 нМ) с  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$  (1 мкМ) в отсутствие и присутствии HPF1 (1 мкМ), в присутствии 250 нМ NCP; в, г – аналогичные кинетические кривые, полученные при 10 мкМ  $[\text{}^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ .

Начальная скорость катализируемой PARP2 модификации гистонов превышает (в 1,6 раза) или сравнима со скоростью автомодификации. Напротив, реакция гетеромодификации, катализируемая PARP1, протекает медленнее, чем автомодификация (разница в скоростях примерно в 1,8 раза).

Кинетические измерения ДНК-независимой активности PARP1 и PARP2 проводили в отсутствие или в присутствии HPF1 при концентрации  $\text{NAD}^+$  1 мкМ (Рис.19). Различия между PARP1 и PARP2 в начальных скоростях ДНК-независимой автомодификации в отсутствие и в присутствии HPF1 находились в пределах ошибки эксперимента

(Таблица 8). Отсутствие статистически значимой разницы между начальными скоростями ДНК-независимой автомодификации PARP1 и PARP2 в отсутствие и в присутствии HPF1 (Рис.19, Таблица 8) дает первое свидетельство того, что их базовая активность непосредственно связана с консервативным каталитическим доменом, и может быть до некоторой степени усилена его прямым взаимодействием с HPF1.



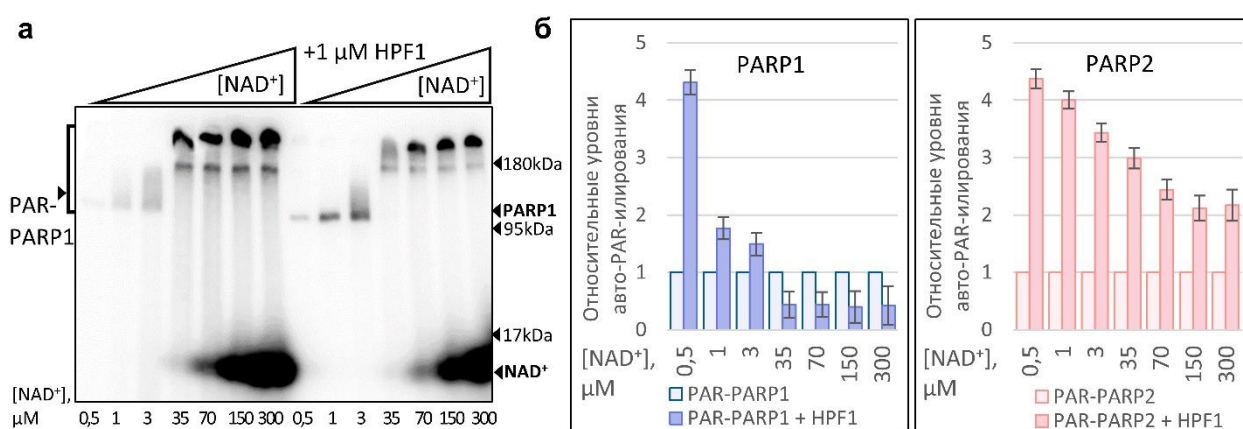
**Рис.19.** HPF1 модулирует ДНК-независимую автомодификацию и PARP1 и PARP2 на начальной стадии реакций: представлены типичные кинетические кривые катализируемых PARP1 и PARP2 реакций автомодификации при инкубации PARP (500 нМ) с  $[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$  (1 мкМ) в отсутствие и присутствии HPF1 (1 мкМ).

Сравнение начальных скоростей ДНК-независимой и ДНК-зависимой модификации показывает, что ДНК-индуцированная активация более значительна для PARP1 (в 43 раза), чем для PARP2 (в 5 раз). Примечательно, что начальная скорость автомодификации в отсутствие HPF1 сильнее зависит от концентрации  $\text{NAD}^+$  для реакции, катализируемой PARP1, чем PARP2. Это различие, которое можно объяснить более высокой активностью PARP1 на этапе элонгации [46, 164, 253], исчезало в присутствии HPF1. Эти данные свидетельствуют о том, что HPF1 контролирует баланс между событиями инициации и элонгации в реакции ADP-рибозилирования. Мы предполагаем, что HPF1 стимулирует начальные стадии реакций авто- и гетеро-PAR-илирования, катализируемые PARP1 и PARP2. При этом мы наблюдаем более значительную модуляцию активности PARP2, индуцированную HPF1, по сравнению с PARP1. Так, максимальный уровень и начальная скорость автомодификации PARP2 в присутствии NCP/ДНК и HPF1 повышались более интенсивно по сравнению с таковыми для PARP1 (Рис.15, Рис18, Таблица 8). Примечательно, что в выбранных нами условиях комплекс HPF1-PARP2 был более активен в гетеро-PAR-илировании, чем в автомодификации: около 80% всего PAR связывалось с

гистонами, а максимальный относительный уровень катализируемого PARP1 PAR-илирования гистонов не превышал 40% (Рис.16). Специфическая функция PARP2 в модификации гистонов была дополнительно подтверждена сравнением начальных скоростей реакций авто- и гетеромодификации, катализируемых PARP1/PARP2: скорость автомодификации PARP2 ниже скорости, катализируемой им в присутствии HPF1 гетеромодификации гистонов (Таблица 8).

### 3.2.4. Стимулирующее действие HPF1 на PARP зависит от концентрации $NAD^+$

Для более глубокого понимания механизма стимуляции PAR-илирования в присутствии HPF1 мы оценили его влияние на автомодификацию PARP1 и PARP2 в присутствии возрастающей концентрации  $NAD^+$ . Результаты представлены на Рис.20.



**Рис. 20.** Зависимость стимулирующего действия HPF1 на PARP1 и PARP2 от концентрации  $NAD^+$ : а – ковалентное связывание ADP-рибозы с белками осуществляли путем инкубации PARP1 (500 нМ) с  $[^{32}P]$ - $NAD^+$  (0,5–300 мкМ), в присутствии ДНК (250 нМ) и HPF1 (500 нМ); продукты разделяли в 10 % SDS-ПААГ; б – на графиках представлены относительные уровни мечения (среднее  $\pm$  стандартное отклонение трех независимых измерений) PARP1 и PARP2 при различных концентрациях  $NAD^+$ , определенные путем нормализации количеств ADP-рибозы, ковалентно связанных с PARP1/PARP2 в присутствии HPF1, до соответствующего количества в отсутствие HPF1.

Для обоих ферментов наблюдается уменьшение стимулирующего эффекта HPF1 при повышении концентрации  $NAD^+$ . В случае PARP1 уровень автомодификации повышался при низких (0,5 – 3 мкМ) и подавлялся при высоких (35 – 300 мкМ) концентрациях  $NAD^+$ . В то же время, автомодификация PARP2 во всех случаях была выше в присутствии HPF1, нежели в его отсутствие, хотя также снижалась при повышении концентрации  $NAD^+$ . Мы предполагаем, что такое «обращение» эффектов, наблюдаемых в присутствии эквимольных (по отношению к PARP1/2) концентраций HPF1 связано с противоположным

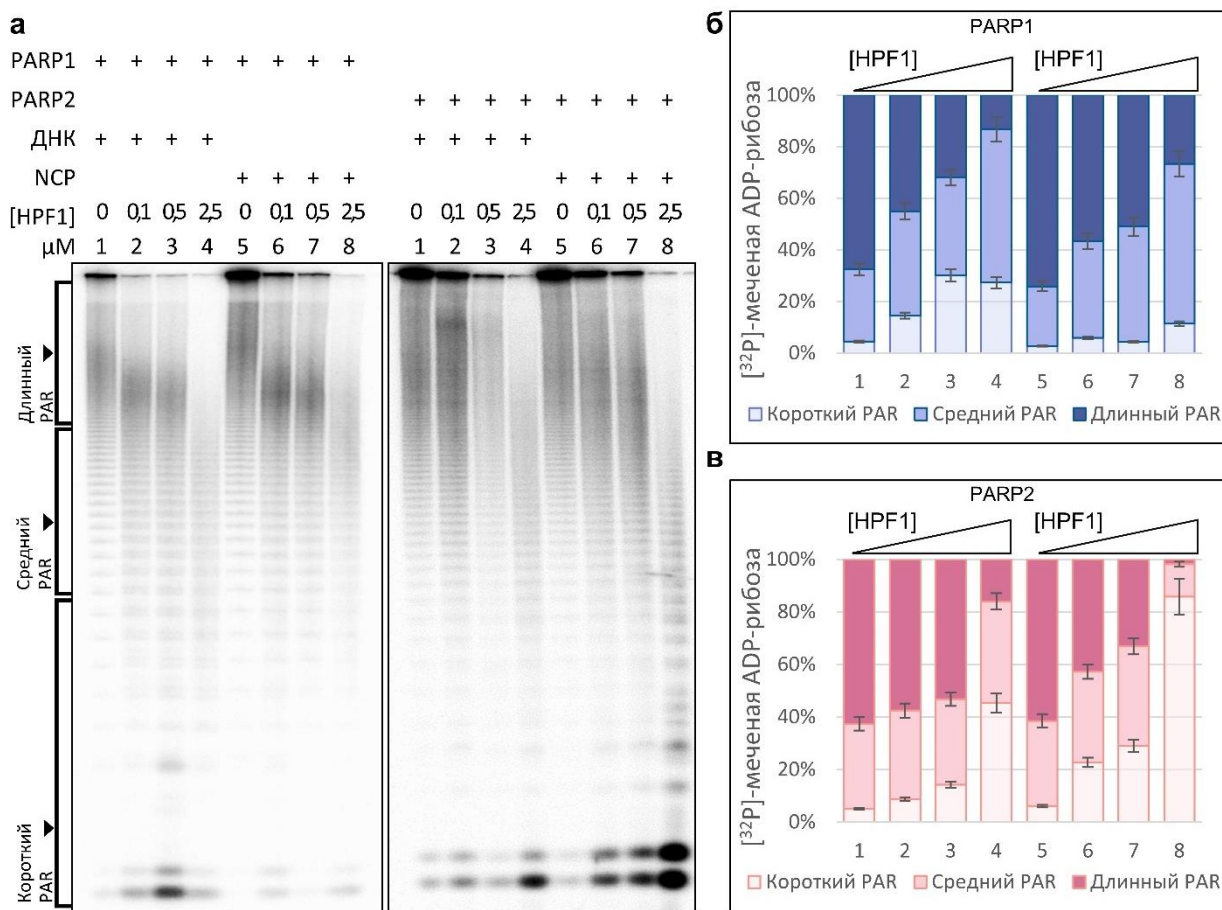
действием, оказываемым HPF1 на стадию инициации и элонгации. Так, при низких концентрациях  $NAD^+$ , когда большая часть синтезированного PAR представлено продуктами инициации, мы наблюдаем увеличение количества синтезированного полимера.

Вместе с данными, показывающими увеличение начальных скоростей PAR-илирования в присутствии HPF1, эти результаты дают нам основание предположить, что данный фактор стимулирует стадию инициации PAR-илирования. В то же время, HPF1 подавляет элонгацию, способствуя укорочению синтезируемого PAR за счет взаимодействия с остатком гистидина в активном центре ферментов (Рис.7) [27]. Это приводит к уменьшению количества PAR, синтезируемого при высоких концентрациях  $NAD^+$ , когда большая часть синтезированных продуктов представлено результатом элонгации (Рис.20). При этом, в случае PARP2, отсутствие наблюдаемого для PARP1 подавления синтеза PAR при высоких концентрациях  $NAD^+$  можно объяснить упомянутой выше разницей в эффективности элонгации PARP1 и PARP2 [46, 164, 253]. Иными словами, подавление элонгации PARP2 не является критичным ввиду его изначально низкого уровня.

### **3.2.5. HPF1 приводит к укорочению синтезированного PAR**

Мы проанализировали длину полимера PAR, синтезированного в отсутствие или в присутствии трех разных концентраций HPF1, чтобы подтвердить тенденцию к их укорочению, как было показано ранее [27] и здесь (Рис.15а,б). Результаты автордиографического анализа длины синтезированного PAR (Рис.21) показывают, что распределение PAR, синтезируемого как PARP1, так и PARP2, по размерам, подвергалось влиянию HPF1 в зависимости от концентрации: увеличение концентрации HPF1 увеличивало относительное количество фракции «короткого» PAR (1–10-звеньев ADP-рибозы).

Концентрационная зависимость эффекта была более выражена в случае PARP2, особенно при использовании NCP для активации реакции PAR-илирования: присутствие HPF1 в максимальной концентрации усиливало переключение активности PARP2 на реакцию моно(ADP-рибозил)ирования. Представленные данные в очередной раз подтверждают подавление элонгации синтеза PAR в присутствии избытка HPF1, которое объясняется стерическим блокированием центра элонгации PARP1/PARP2 [27, 87].

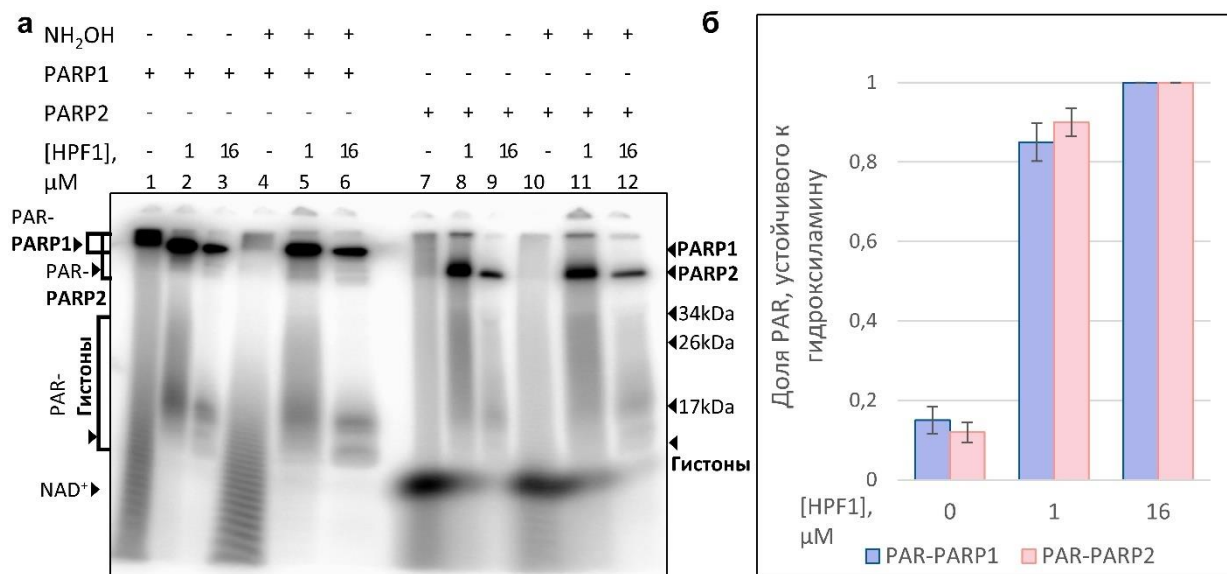


**Рис.21.** PARP1 и PARP 2 синтезируют более короткие цепи PAR в присутствии HPF1: а – автордиограммы денатурирующих гелей после разделения цепей PAR, синтезированных PARP1 (200 нМ) или PARP2 (500 нМ) в присутствии 100 нМ ДНК-603 или NCP, в отсутствие и в присутствии возрастающих концентраций HPF1 (0,1, 0,5 или 2,5 мкМ); б, в – графики показывают распределение PAR по размеру в соответствующих выборках для PARP1 и PARP2 (среднее ± стандартное отклонение трех независимых измерений). Показано количество  $[^{32}\text{P}]$ -радиометки (%) в трех размерных группах полимеров, определенных как короткий PAR (1–10 звеньев ADP-рибозы), средний PAR (10–30 звеньев) и длинный PAR (более 30 звеньев).

### 3.2.6. Степень вызванного HPF1 переключения субстратной специфичности зависит от относительных концентраций PARP и HPF1

Чтобы изучить, как HPF1-индуцированная стимуляция активности PARP связана с переключением аминокислотной специфичности ADP-рибозилирования, мы исследовали устойчивость модификации к гидроксилламину, который специфически удаляет ADP-рибозу, связанную с остатками Asp/Glu [30]. При этом PAR, связанный с серинами, не удаляется. Авторадиографический анализ (**Рис.22**) показывает, что большая часть ADP-рибозы, включенной в PARP1/PARP2 в отсутствие HPF1, удалялась гидроксилламином, а потеря

модификации в присутствии оптимальной концентрации HPF1 не превышала 12–20%. Полная устойчивость к гидроксилламину была обнаружена для модификации в присутствии большого избытка HPF1 по отношению к PARP1/2.



**Рис.22.** Индуцированное HPF1 переключение аминокислотной специфичности ADP-рибозилирования зависит от концентрации HPF1: а – автордиограмма показывает ковалентное связывание ADP-рибозы с PARP1/2 после инкубации PARP (500 нМ) с [<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> (1 мкМ) в отсутствие и в присутствии HPF1 с обработкой и без обработки 1 М гидроксилламином (разделение продуктов в SDS-ПААГ); б – на графиках представлена часть модификации, устойчивой к гидроксилламину (среднее значение ± стандартное отклонение трех независимых измерений и отдельных точек данных), определяемая путем нормализации количества ADP-рибозы, включенной в белок, в образце, обработанном гидроксилламином, по отношению к соответствующему необработанному образцу.

Учитывая данные, полученные здесь, и ранее [27], о том, что происходит подавление элонгации в присутствии больших избытков HPF1, мы предполагаем, что наличие свободных от HPF1 молекул PARP1/PARP2 необходимо для эффективной элонгации. При субэквимольном соотношении PARP:HPF1 наблюдается стимуляция инициации PAR-илирования, но, при этом, не все молекулы ферментов связаны с HPF1 (ввиду относительно низкого сродства данного фактора к PARP1/PARP2). Наличие свободных молекул PARP1/PARP2 обеспечивает временный характер взаимодействия HPF1 с ферментами и более эффективную элонгацию. Избытки HPF1, приводящие к насыщению всех активных центров PARP1/PARP2 молекулами кофактора, приводит к полному переключению аминокислотной специфичности в комплексах с HPF1 и снижению уровня PAR-илирования за счёт полного подавления элонгации.



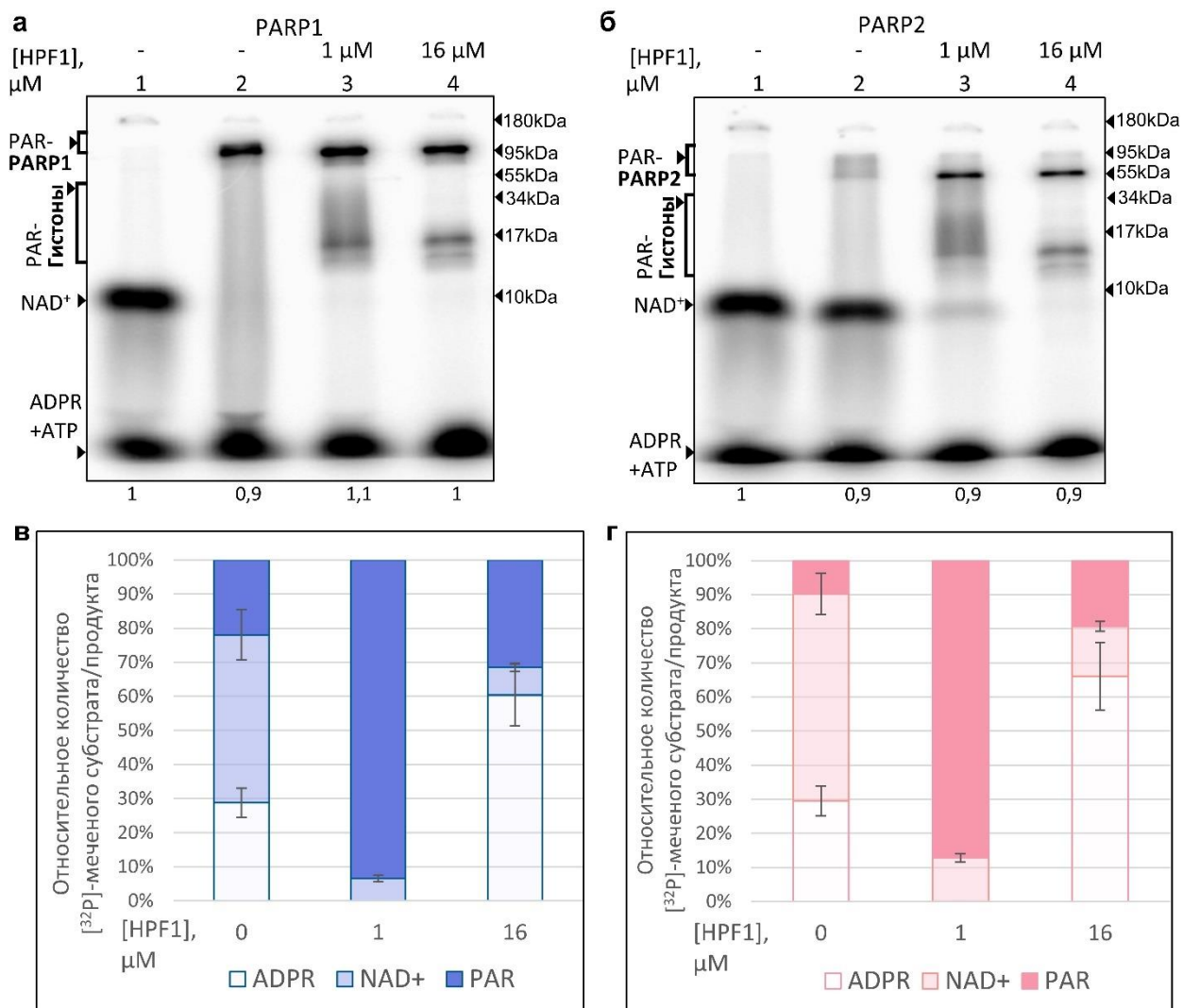
### 3.2.7. NAD<sup>+</sup>-гидролазная активность PARP1 и PARP2 усиливается большим избытком HPF1

Недавно было показано, что активность NAD<sup>+</sup>-гидролазы, обнаруженная для PARP1 в раннем исследовании [256], значительно стимулируется в присутствии HPF1 [87]. Индуцированное HPF1 переключение активности PARP1 с синтеза PAR на гидролиз NAD<sup>+</sup> с образованием свободной ADP-рибозы (до 90% метаболизируемого NAD<sup>+</sup>) наблюдалось в присутствии 20-кратного избытка HPF1 по сравнению с PARP1 [87]. Нас интересовало сравнение уровней гидролиза NAD<sup>+</sup> при разных концентрациях HPF1: концентрации, оптимальной для стимуляции реакции PAR-илирования и при большом избытке HPF1. Реакции, катализируемые PARP1 и PARP2, проводились без HPF1 и в его присутствии в двух разных концентрациях: 1 мкМ и 16 мкМ. Определяли относительные количества [<sup>32</sup>P]-меченой ADP-рибозы, связанной с PARP и гистонами и высвобождаемой в свободной форме за счет гидролиза NAD<sup>+</sup> (**Рис.23**).

В присутствии концентрации HPF1, оптимальной для стимуляции, относительное количество свободной ADP-рибозы было ниже, чем в его отсутствие (~5 раз для PARP1 и ~2 раза для PARP2) или при большом избытке (~6 раз для PARP1 и ~4 раза для PARP2). Таким образом, NAD<sup>+</sup>-гидролазная активность как PARP1, так и PARP2 усиливается при значительном избытке HPF1 по отношению к концентрации этих ферментов, но уменьшается при эквимолярной концентрации.

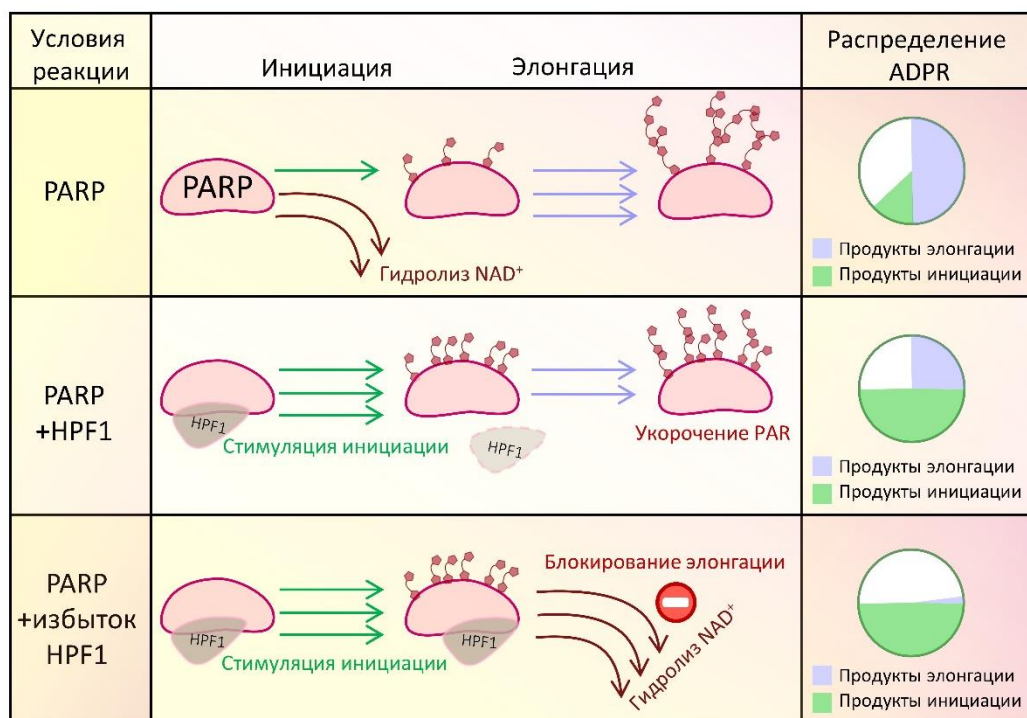
Авторы работы [87] предполагают, что ингибирующее действие HPF1 на синтез PAR связано с переключением активности PARP1 на гидролиз NAD<sup>+</sup>. Этот эффект — результат экранирования центра элонгации PARP1 в комплексе с HPF1. В результате PARP1, все еще связанный с активирующей ДНК, быстро исчерпывает подходящие сайты PAR-илирования и вместо этого использует воду в качестве нуклеофила. Мы предполагаем, что только полное связывание PARP с HPF1, которое достигается при большом избытке кофактора, может способствовать переключению на NAD<sup>+</sup>-гидролазную активность.

В наших экспериментах не было обнаружено усиления NAD<sup>+</sup>-гидролазной активности при низкой концентрации HPF1, оптимальной для стимуляции активности PARP в реакции аутомодификации (**Рис.23в,г**). Напротив, наблюдалось значительное снижение уровня гидролиза NAD<sup>+</sup>. Вероятно, как и в случае подавления PAR-илирования, наличие свободных от HPF1 молекул PARP обеспечивает достаточный уровень элонгации, препятствуя, таким образом, переключению на гидролиз NAD<sup>+</sup>.



**Рис.23.**  $\text{NAD}^+$ -гидролазная активность PARP стимулируется большим избытком HPF1: а, б – автордиограммы разделения  $\text{NAD}^+$ , ковалентно-связанной с PARP1, PARP2 и гистонами и свободной ADP-рибозы (ADPR) после инкубации PARP1/PARP2 (500 нМ) в присутствии NCP (250 нМ) и  $[\text{32P}]\text{-NAD}^+$  (1 мкМ) и HPF1 (1 мкМ, образец 3, и 16 мкМ, образец 4) Снизу от радиограмм указано относительное общее количество радиоактивного материала в каждой пробе; в, г – на графиках представлены относительные количества (%)  $[\text{32P}]\text{-NAD}^+$  и  $[\text{32P}]\text{-}$ меченой ADP-рибозы, ковалентно связанных с PARP и гистонами и высвобождаемых в свободной форме (ADPR) в результате гидролиза  $\text{NAD}^+$  в соответствующих образцах. Исходный препарат  $[\text{32P}]\text{-NAD}^+$  (контрольный образец 1 без PARP) был загрязнен ATP; его количество вычитали из количества свободной ADP-рибозы (вместе с ATP) в пробах 2 – 4.

Таким образом, вместе с показанной ранее взаимосвязью между увеличением уровня гидролиза  $\text{NAD}^+$  и подавлением элонгации синтеза PAR, мы показали взаимосвязь стимуляции инициации синтеза PAR с уменьшением его гидролиза (**Рис.24**).



**Рис.24.** Эффекты, оказываемые HPF1 на реакцию PAR-илирования в зависимости от условий эксперимента: в отсутствие HPF1 инициация PAR-илирования представляет собой лимитирующую стадию и, вероятно, сопряжена с высоким уровнем гидролиза  $NAD^+$ . Оптимальные концентрации HPF1 приводят к стимуляции инициации PAR-илирования, после которой HPF1 покидает активный центр PARP1. Может наблюдаться укорочение синтезируемого PAR, гидролиз  $NAD^+$  практически не происходит. Избытки фактора приводят к полному подавлению элонгации и увеличению гидролиза  $NAD^+$ .

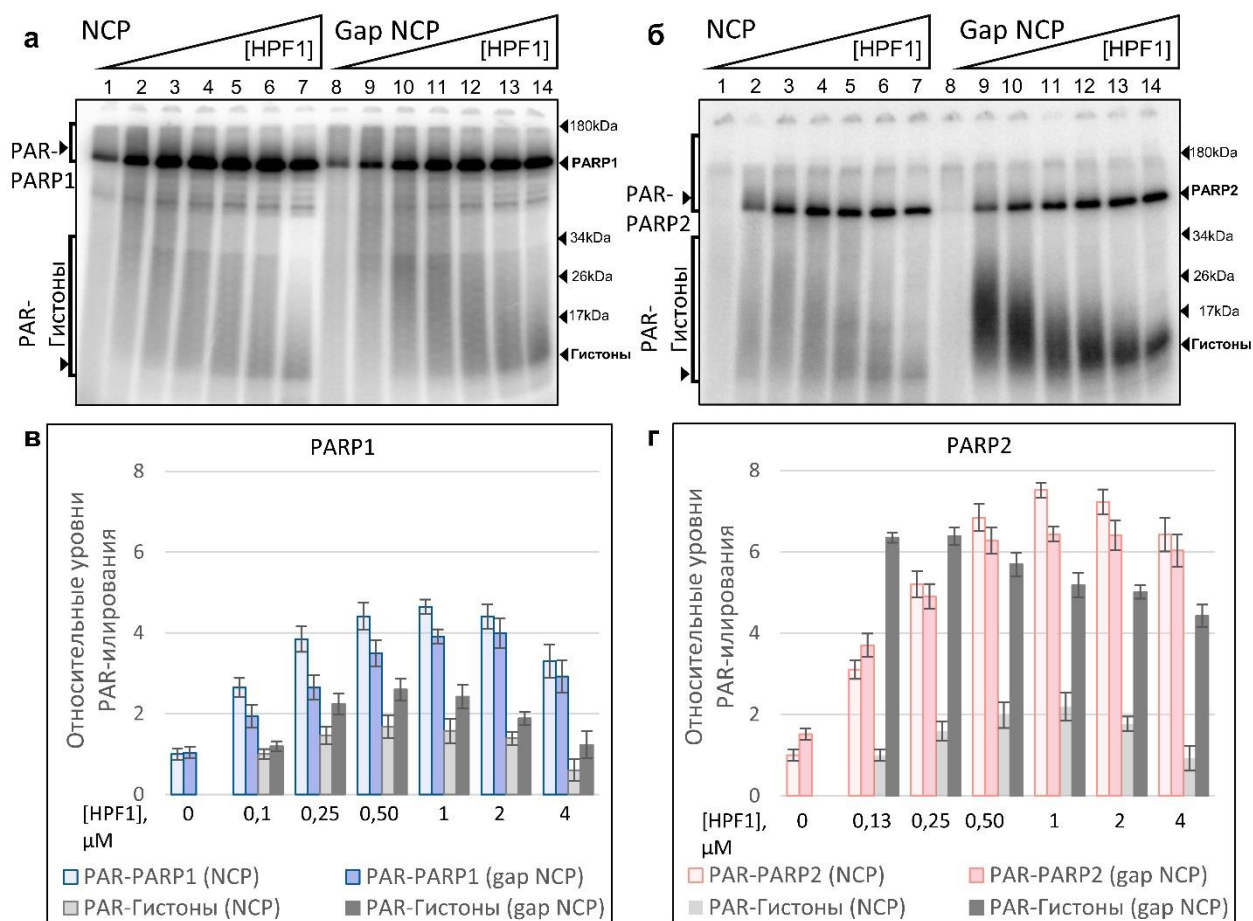
Таким образом, полученные нами данные позволяют предположить, что образование гибридного активного центра PARP:HPF1 способствует ускорению стадии инициации PAR-илирования, а также переключению PAR-илирования на гистоны (в присутствии NCP). При этом подавляется стадия элонгации синтеза PAR. Баланс между стимуляцией инициации и подавлением элонгации, как и между уровнями гидролиза  $NAD^+$ , определяется равновесием в системе  $PARP + HPF1 \leftrightarrow PARP:HPF1$  (Рис.24). Смещение равновесия в сторону образования гибридного активного центра приводит к подавлению элонгации, увеличению уровня гидролиза  $NAD^+$  и снижению уровня PAR-илирования. Наличие же свободных молекул PARP обеспечивает высвобождение HPF1 из совместного активного центра после эффективной инициации и позволяет ферментам катализировать удлинение цепей PAR. Так как элонгация не затруднена, а инициация протекает с высокой скоростью, гидролиза  $NAD^+$  в таких условиях практически не происходит.

### **3.3. Гетеро-PAR-илирование гистонов модулируется интермедиатом эксцизионной репарации оснований ДНК**

Ранее было показано вовлечение PARP1 и PARP2 в процесс BER начиная с самых ранних этапов [10, 14, 68]. Было показано взаимодействие PARP1 и PARP2 с AP-сайтами, расщеплёнными AP-сайтами, брешами и белками-участниками BER как с использованием модельных ДНК [15, 68, 322], в том числе методами АСМ [46, 69], так и в клетках [202]. Здесь и ранее нами было показано взаимодействие PARP1 и PARP2 с процессированным ферментом APE1 AP-сайтом в нуклеосомном контексте, а также влияние данных ферментов на стадии BER [12]. При этом всё больше становится очевидным, что именно PAR-илирование, катализируемое PARP1 и PARP2 обеспечивает доступ ферментов BER к повреждению и обеспечивает позитивную регуляцию всего процесса [12]. В связи с этим, мы далее исследовали, зависит ли влияние HPF1 на активность ферментов при аутомодификации и гетеромодификации гистонов от наличия специфического одноцепочечного повреждения в активирующей ДНК. В данной работе мы использовали ДНК и NCP без линкеров, содержащие однонуклеотидную брешь (Gap) в положении 35. Это повреждение ДНК представляет собой центральный интермедиат эксцизионной репарации оснований (BER) (Раздел 1.2.3.2.) и представляет собой расщеплённый AP-сайт.

#### **3.3.1. Влияние интермедиата эксцизионной репарации оснований ДНК на HPF1-зависимое PAR-илирование гистонов обнаруживается в широком диапазоне концентраций фактора HPF1**

Показанное нами влияние различных концентраций HPF1 на активность PARP1/2 побудило нас изучить влияние повреждения-интермедиата BER на HPF1-зависимую активность данных ферментов. Для этого мы оценили влияние различных концентраций HPF1 на активность PARP1 и PARP2 в присутствии NCP и Gap NCP (Рис 25). Интересно, что в случае PARP1 эффекты HPF1 на авто- и гетеро-PAR-илирование мало зависят от наличия бреши в ДНК: замена NCP на Gap NCP приводит к незначительному уменьшению аутомодификации и увеличению гетеромодификации в присутствии HPF1 (Рис.25в). Это согласуется с определёнными ранее величинами  $EC_{50}$ , отражающими преимущественное связывание PARP1 с тупыми концами ДНК. Вероятно, доля каталитически активных комплексов PARP1 с брешью меньше по сравнению с таковыми для тупых концов. Из-за этого мы наблюдаем лишь небольшое увеличение модификации гистонов при наличии бреши.

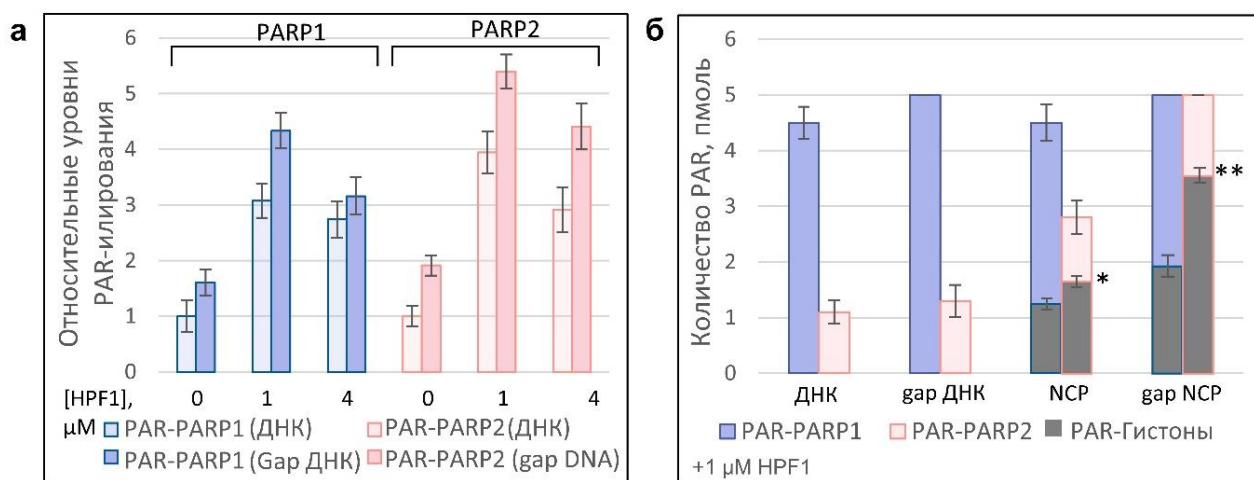


**Рис.25.** Зависимость уровней авто- и гетеро-PAR-илирования, катализируемого PARP1 и PARP2, от присутствия бреши в ДНК: а, б – автордиограммы показывают ковалентное связывание  $[^{32}\text{P}]$ -меченой ADP-рибозы с PARP1 и PARP2 после инкубации PARP (500 нМ) с  $[^{32}\text{P}]$ -NAD<sup>+</sup> (1 мкМ) и NCP или Gap NCP (250 нМ) в отсутствие (образцы 1 и 8) и в присутствии возрастающих концентраций HPF1 (от 125 нМ до 4 мкМ, образцы 2–7 и 9–14) (разделение продуктов в 20% SDS-ПААГ); в, г – графики представляют относительные уровни модификации (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение трех независимых измерений) PARP1, PARP2 и гистонов, определенные путем нормализации количества ADP-рибозы, ковалентно связанной с данными белками (за единицу принято количество ADP-рибозы, синтезированной в отсутствие HPF1 или при его минимальной концентрации в присутствии NCP без бреши (образец 1 для PARP1/PARP2 и образец 2 для гистонов)).

Стимулирующий эффект HPF1 на аутомодификацию PARP2 также несколько снижался при замене NCP на Gap NCP. Однако эффекты, оказываемые HPF1 на модификацию гистонов, в этом случае многократно усиливались: наибольшее увеличение (в 6,5 раза) наблюдалось при минимальной используемой концентрации HPF1 (125 нМ); при эквимольных концентрациях HPF1 и PARP2 (500 нМ) стимулирующий эффект возрастал в 3 раза (**Рис.25,г**).

Мы дополнительно оценили влияние бреши при активации PARP1/PARP2 в присутствии ДНК, а не NCP, в присутствии HPF1 (Рис.26). Уровни автомодификации PARP1 и PARP2 в присутствии Gap ДНК превышали соответствующие уровни в присутствии ДНК без бреши в 1,5 и 2 раза соответственно (Рис.26а). Во всех случаях автомодификация ферментов на ДНК была увеличена в присутствии HPF1.

Для лучшего понимания влияния бреши в ДНК на модуляцию фактором HPF1 авто- и гетеромодификации PARP1/2 и гистонов, мы провели сравнения количества ADP-рибозы, ковалентно связанной с данными белками при активации на разных структурах в присутствии 1 мкМ HPF1 (Рис.26б).



**Рис.26.** Зависимость эффектов HPF1 на активность PARP1/2 от структуры ДНК-активатора: а – графики показывают относительные уровни модификации (среднее значение ± стандартное отклонение трех независимых измерений) PARP1/PARP2 на ДНК и Gap ДНК, определенные путем нормализации количества синтезируемой ADP-рибозы в присутствии HPF1 до соответствующего количества в отсутствие HPF1; б – графики показывают общее количество PAR, синтезированного PARP1/PARP2 в присутствии ДНК/Gap ДНК или NCP/Gap NCP в присутствии 1 мкМ HPF1. Показано общее количество PAR и его распределение между PARP1/PARP2 и гистонами. Для уровней PAR-илирования гистонов отмечены статистически значимые различия:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*).

Уровни автомодификации PARP1 в присутствии как NCP, так и Gap NCP превышают уровни гетеро-PAR-илирования. Эти результаты, в сочетании с данными экспериментов по связыванию свидетельствуют о том, что наибольшая аффинность PARP1 к тупым концам ДНК обеспечивает ее преимущественную активацию в реакции автомодификации. PARP2, в свою очередь, преимущественно катализирует PAR-илирование гистонов. Примечательно, что в отсутствие гистонов не наблюдалось значительного увеличения синтеза PAR,

катализируемого PARP2, в присутствии Gap ДНК. Так, выход PAR, синтезируемого PARP2, в присутствии Gap NCP был в 4 раза выше, чем в присутствии Gap ДНК (Рис.266). Скорее всего, для эффективного синтеза PAR этим ферментом необходимо наличие акцепторных белков (в данном случае гистонов), а также наличие в качестве активатора Gap NCP, которой PARP2 проявляет высокое сродство. В отсутствие акцепторных белков, уровень аутомодификации PARP2 увеличивается одновременно с увеличением числа активных комплексов PARP2 с поврежденной ДНК, но в этом случае PAR-илирование всё ещё происходит малоэффективно.

Таким образом, мы в очередной раз подтверждаем, что PARP2 в присутствии HPF1 эффективнее катализирует модификацию гистонов, нежели аутомодификацию. При этом одновременное присутствие гистонов (акцепторов PAR), HPF1 (делающего возможным модификацию гистонов) и интермедиата BER (с которым PARP2 взаимодействует с высоким сродством) обеспечивают многократное увеличение количества PAR, синтезируемого PARP2. Все эти факторы вместе приводят к увеличению эффективности реакции синтеза PAR катализируемого этим ферментом, что важно для объяснения открытого ранее сохранения активности систем репарации в клетках *PARP1*<sup>-/-</sup> [151].

### 3.3.2. Интермедиат эксцизионной репарации оснований ДНК влияет на скорость синтеза PAR в присутствии HPF1

Для более детального сравнения PARP1 и PARP2 в реакциях авто- и гетеро-PAR-илирования, катализируемых в присутствии HPF1 и разных по структуре ДНК, были выполнены кинетические исследования. Измерение начальных скоростей реакций авто- и гетеро-модификации проводили в присутствии NCP или Gap NCP и 1 мкМ HPF1 при концентрации NAD<sup>+</sup> 1 мкМ (Рис.27, Таблица 9).

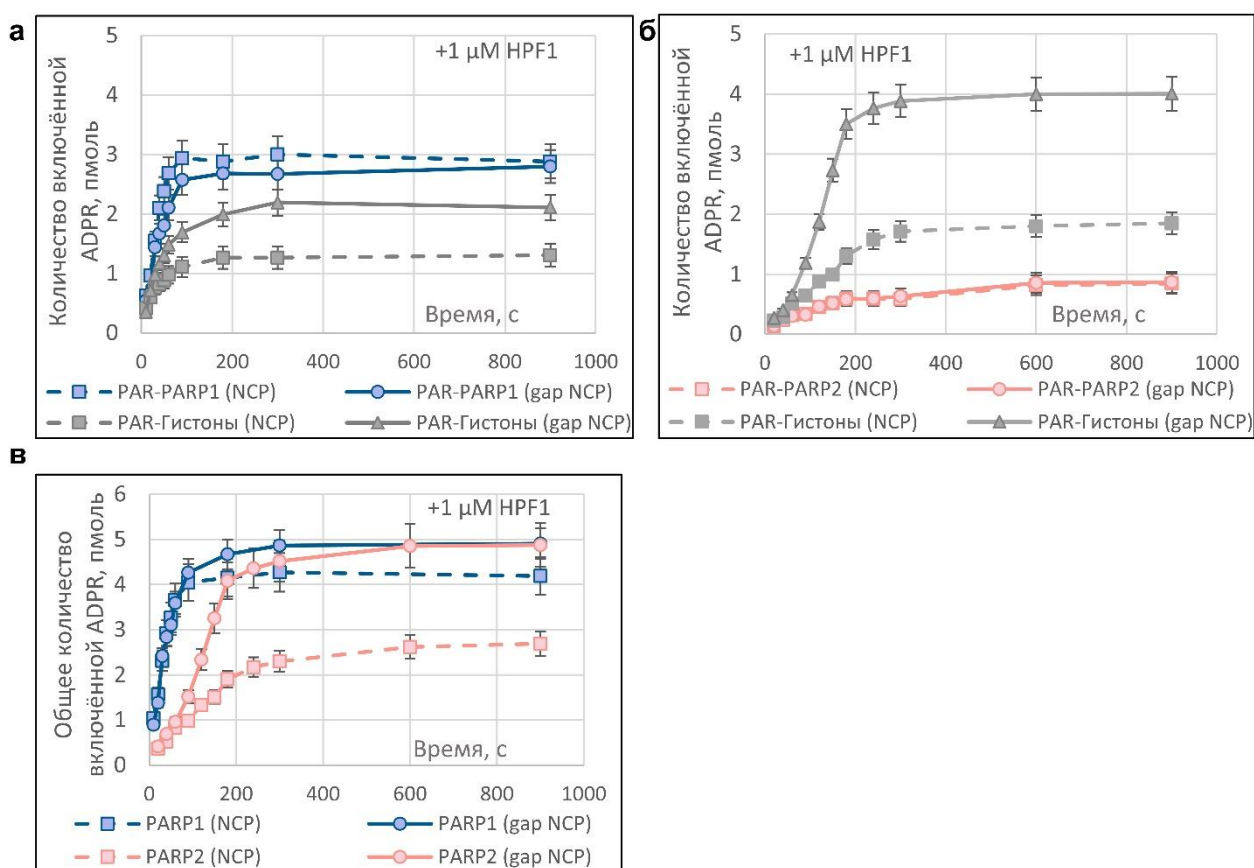
**Таблица 9. Начальные скорости реакций, катализируемых PARP1 и PARP2 в присутствии 1 мкМ HPF1 (фмоль/с).**

Фермент	Аутомодификация		Гетеромодификация гистонов	
	NCP	Gap NCP	NCP	Gap NCP
PARP1	53±3	49±4	21±2	35±3
PARP2	5±0,4	5±0,7	8±0,6	18±1,2

Начальную скорость (фмоль/с) определяли как скорость присоединения ADP-рибозы к белкам на линейном участке кинетической кривой реакции (Рис.27); представлены средние значения трех независимых измерений (±SD).

Обнаружено, что наличие бреши в ДНК не влияет на начальную скорость автомодификации обоих ферментов. Скорость автомодификации PARP1 значительно (в 10 раз) выше скорости автомодификации PARP2. В то же время, начальная скорость PAR-илирования гистонов, катализируемого PARP1, в обоих случаях (в присутствии NCP или Gap NCP) ниже, чем скорость автомодификации этого фермента (в 2,3 и 1,4 раза соответственно). Тем не менее, наличие бреши в ДНК приводит к увеличению начальной скорости HPF1-зависимой модификации гистонов ферментом PARP1 в 1,6 раза, что в очередной раз подтверждает наличие небольшого числа комплексов PARP1 с брешью.

Начальная скорость катализируемой PARP2 модификации гистонов превышает скорость автомодификации в 1,6 и 3,6 раза в отсутствие и присутствии бреши соответственно (Рис.27б). Таким образом, наличие бреши в ДНК способствовало увеличению начальной скорости модификации гистонов ферментом PARP2 в 2,3 раза.

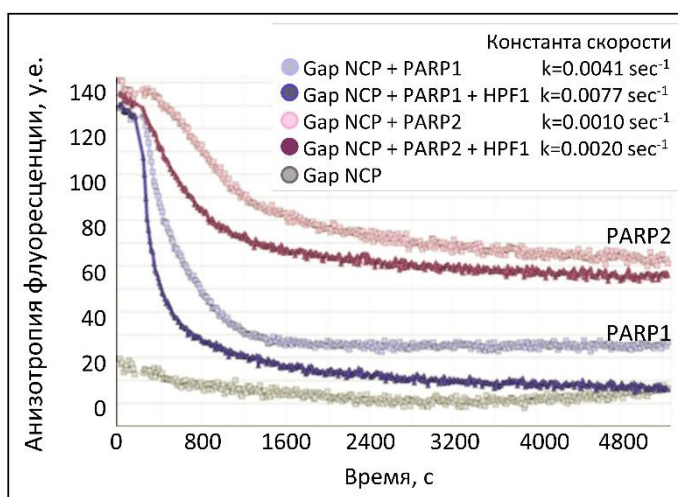


**Рис.27.** Типичные кинетические кривые катализируемых PARP1 и PARP2 реакций присоединения ADP-рибозы к PARP и гистонам: а, б – кинетики авто- и гетеро-PAR-илирования гистонов, катализируемые PARP1 и PARP2; в – кинетические кривые общего PAR-илирования (как авто, так и гетеро) при инкубации PARP1/PARP2 (500 нМ) с  $[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$  (1 мкМ) и HPF1 (500 нМ) в присутствии 250 нМ NCP (Gap NCP).



Различие между PARP1 и PARP2 в HPF1-зависимой модификации гистонов не ограничивается только разницей величин начальных скоростей. В случае PARP1 наличие бреши в NCP увеличивало предельный уровень модификации гистонов при незначительном снижении уровня аутомодификации (Рис.27а), и при этом общее количество синтезированного PAR увеличивалось на 20% (Рис.27в). Однако несмотря на некоторое «перераспределение» продуктов, уровень аутомодификации PARP1 (60% от общего количества PAR) всё-таки превосходил уровень модификации гистонов.

Дополнительно мы оценили влияние HPF1 на скорость диссоциации комплекса PARP1/PARP2 с NCP в условиях реакции PAR-илирования. Для этого были проведены кинетические измерения анизотропии флуоресценции. Реакционные смеси содержали Gap NCP и PARP1/2 и HPF1 в эквимольной по отношению к PARP концентрации (Рис.28). Реакцию запускали добавлением  $\text{NAD}^+$ , что приводило к PAR-илированию ферментов, их диссоциации из комплекса с NCP и последующему падению анизотропии флуоресценции.



**Рис.28.** Кинетические кривые диссоциации комплексов PARP1 и PARP2 (100 нМ) с Gap NCP (50 нМ) при PAR-илировании (в присутствии 300 мкМ  $\text{NAD}^+$ ), в присутствии и в отсутствие HPF1 (200 нМ), полученные путем измерения анизотропии флуоресценции FAM. Кажущиеся константы скорости диссоциации для комплексов указаны в легенде.

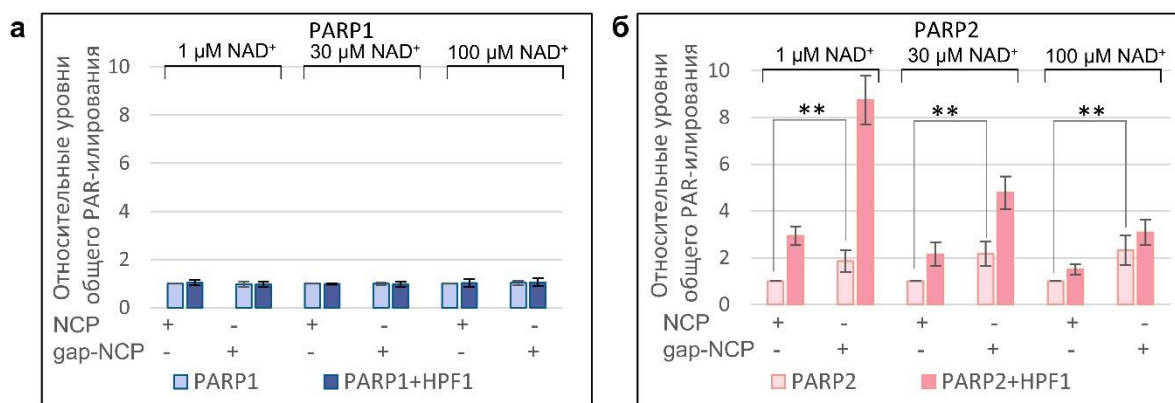
Результаты измерений показывают, что в присутствии HPF1 диссоциация происходит со скоростью вдвое большей, чем в его отсутствие (в случае обоих ферментов), что позволяет рассматривать вклад HPF1 в увеличение числа оборотов ферментативной реакции. При этом присутствие HPF1 не влияло на уровень анизотропии комплекса PARP-NCP. Эти данные, вместе с данными по влиянию HPF1 на синтез PAR (Раздел 3.3) и отсутствию влияния на связывание PARP1/2 с ДНК (Раздел 3.1.5), дают основания предположить ключевую роль связывания  $\text{NAD}^+$  в активном центре ферментов для эффективного взаимодействия HPF1 с PARP1/2.

Таким образом, мы показали, что присутствие бреши в ДНК, моделирующего интермедиат BER, после расщепления AP-сайта AP-эндонуклеазой 1, оказывает влияние на HPF1-зависимую и HPF1-независимую активацию PARP1 и PARP2. С одной стороны, наличие бреши в ДНК незначительно влияло на аутомодификацию ферментов в присутствии и отсутствии HPF1. В случае PARP1 мы наблюдали незначительное уменьшение уровня аутомодификации, вместе с эквивалентным увеличением гетеромодификации гистонов при наличии бреши. По всей видимости, доля комплексов PARP1 с брешью в ДНК ниже, чем доля фермента, связанного в данной структуре ДНК с тупыми концами. Но именно связывание с брешью способствует гетеромодификации гистонов. Наличие однонуклеотидной бреши в ДНК наиболее существенно влияло на HPF1-зависимую гетеромодификацию гистонов ферментом PARP2. По всей видимости, увеличение активности PARP2 опосредуется не только сродством к брешу и количеством активных комплексов PARP2:ДНК, но и влиянием гистонов – акцепторов PAR. Вероятно, гистоны являются для PARP2 более предпочтительным акцептором, чем он сам. Подобная специфичность PARP2 в отношении ДНК-повреждений и белков-акцепторов ещё раз указывает на его специфическую регуляторную роль в процессе репарации оснований ДНК в контексте хроматина. Мы предполагаем, что HPF1 увеличивает число оборотов реакции PAR-илирования, и способствует ускорению диссоциации PARP2 (как и PARP1) из комплекса с повреждением ДНК, что способствует репарации данного повреждения [323].

### **3.3.3. Присутствие бреши в структуре ДНК и HPF1 влияют на баланс событий инициации и элонгации PAR-илирования.**

Для более детального понимания влияния HPF1 на баланс событий инициации и элонгации PAR-илирования, было интересно исследовать, как модуляция активности PARP1/PARP2 структурой ДНК и HPF1 зависит от концентрации  $NAD^+$ . Для этого мы определили общее количество ADP-рибозы, синтезированной в присутствии и в отсутствие HPF1 и бреши (**Рис.29**). Эксперименты проводились при трех различных концентрациях  $NAD^+$  (1, 30 и 100 мкМ); концентрации PARP1/PARP2 и NCP/Gap NCP составляли 500 и 250 нМ соответственно. Концентрация HPF1 (30 нМ) была выбрана как минимальная концентрация, которая модулирует активность PARP/PARP2, чтобы избежать ингибирующего эффекта HPF1, обнаруженного ранее при высоких концентрациях  $NAD^+$ .

В первую очередь обращает на себя внимание отсутствие значимого влияния HPF1 и бреши на количество PAR, синтезируемого PARP1 (**Рис.29,а**). Это объясняется высокой активностью данного фермента, которая по большей степени регулируется концентрацией  $NAD^+$ , а также его высоким сродством к тупым концам ДНК.



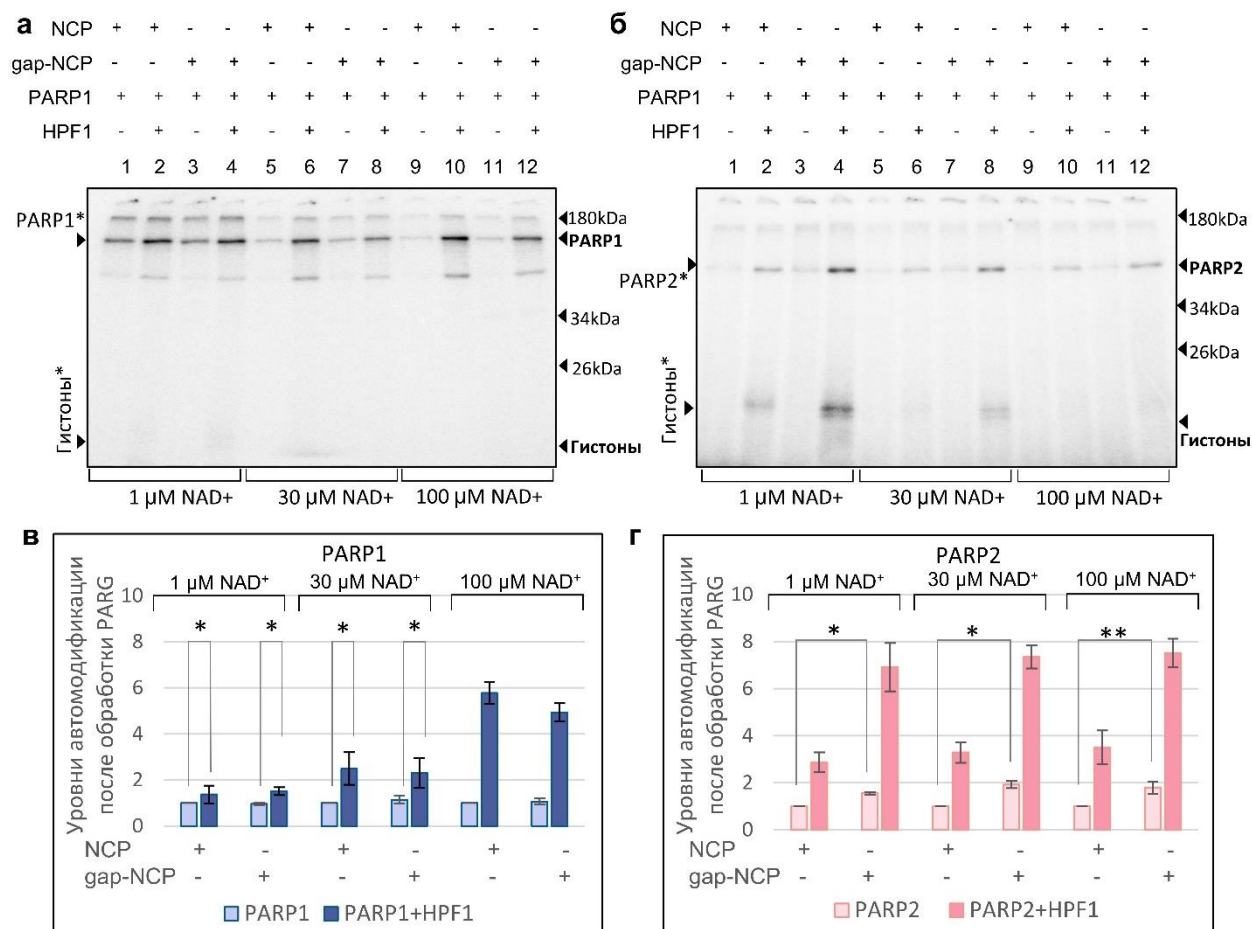
**Рис.29.** Зависимость эффектов HPF1 и Gap NCP от концентрации NAD<sup>+</sup>: а, б – на графиках представлены относительные выходы реакции ADP-рибозилирования, измеренные методом преципитации ТХУ (среднее ± стандартное отклонение трех независимых измерений), определенные путем нормализации количества ADP-рибозы, ковалентно связанной с белками до соответствующего количества, полученного в отсутствие HPF1 и в присутствии NCP (без Gap) при каждой концентрации NAD<sup>+</sup> (образцы 1, 5, 9); Отмечены статистически значимые различия между сравниваемыми величинами,  $p < 0,01$  (\*\*).

В случае PARP2 было обнаружено увеличение общего выхода ADP-рибозилирования, индуцированное присутствием либо HPF1, либо Gap в NCP (**Рис.29б**). При всех концентрациях NAD<sup>+</sup> наибольший выход был детектирован при проведении реакции в присутствии как HPF1, так и Gap NCP. Эффект присутствия бреши в NCP практически не зависел от концентрации NAD<sup>+</sup>, в то время как стимулирующее действие HPF1 как в присутствии NCP, так и в присутствии Gap NCP уменьшалось с увеличением концентрации NAD<sup>+</sup>, что в очередной раз подтверждает вовлечение HPF1 в ранние стадии PAR-илирования и подавление элонгации.

Также, для сравнения количества событий инициации определяли относительный уровень аутомодификации PARP после катализируемого PARG гидролиза цепи PAR. Уровни модификации гистонов не определяли количественно из-за невозможности обнаружить их в условиях реакции (**Рис.30**).

В случае PARP1, количество событий инициации увеличивалось в присутствии HPF1 в разной степени в зависимости от концентрации NAD<sup>+</sup>, при этом эффекты были похожими для реакций в присутствии NCP и Gap NCP (**Рис.30в**). В то же время и HPF1, и присутствие бреши в NCP способствовали реакции инициации, катализируемой PARP2, при этом наблюдаемые эффекты практически не зависели от концентрации NAD<sup>+</sup> (**Рис.30г**). Стимулирующее действие обоих факторов на гетеромодификацию гистонов было видно только для реакции, катализируемой PARP2, при концентрации NAD<sup>+</sup> 1–30 мкМ (**Рис.30б**),

однако количественная оценка не проводилась в связи с высоким уровнем фонового сигнала и погрешностью эксперимента.



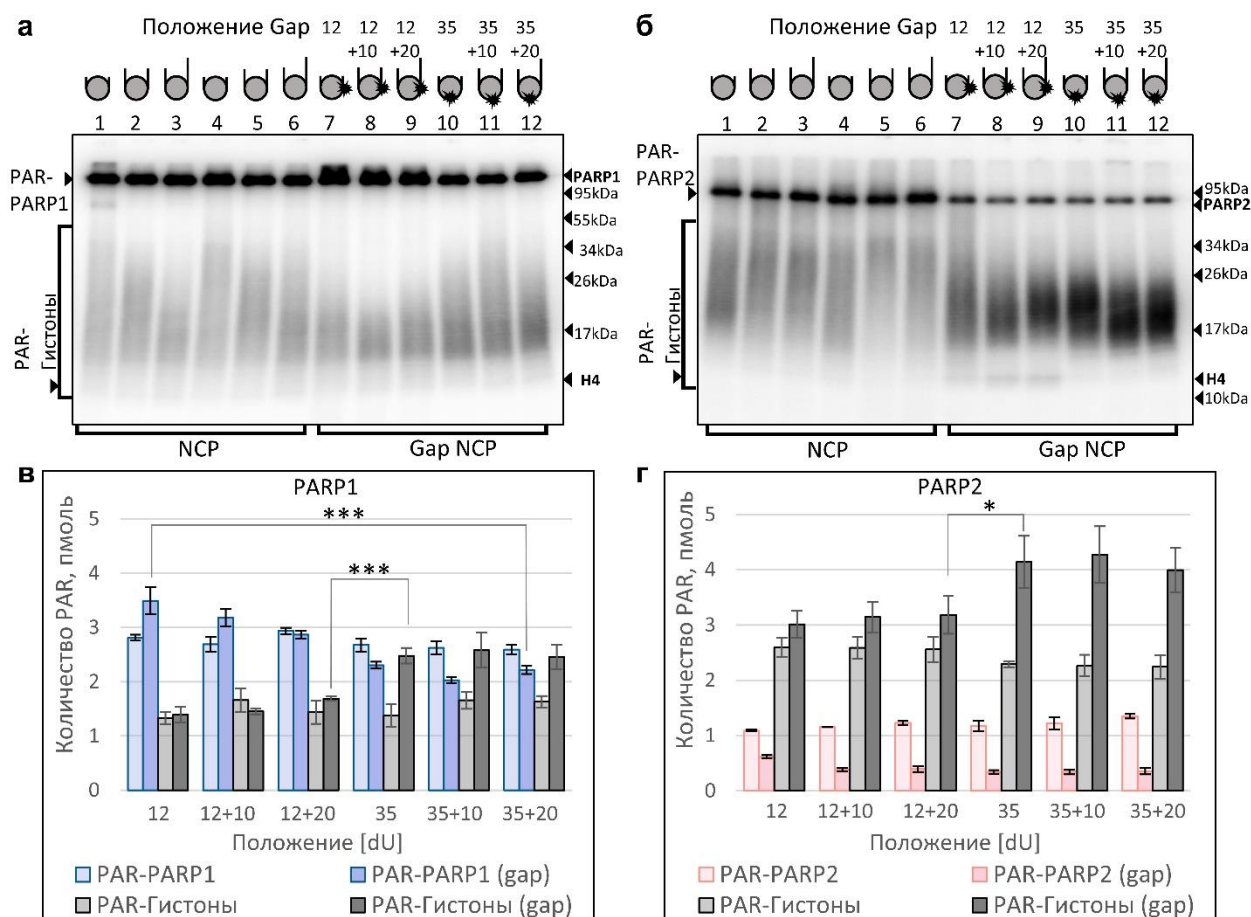
**Рис.30.** Влияние HPF1, Gap NCP и концентрации  $NAD^+$  на эффективность инициации PAR-илирования: а, б – автордиограммы показывают ковалентное связывание  $[^{32}P]$ -меченой ADP-рибозы с PARP1/2 после инкубации PARP (500 нМ) с  $[^{32}P]$ - $NAD^+$  (1/30/100 мкМ) и NCP или Gap NCP (250 нМ) в отсутствие и присутствии HPF1 (30 нМ) с последующим катализируемым PARG гидролизом и разделением продуктов в 20% SDS-ПААГ. Полоса ~65 кДа на автордиограмме соответствует протеолитическому фрагменту PARP1. в, г – графики показывают относительные уровни автомодификации (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение трех независимых измерений) PARP1/2 после гидролиза, катализируемого PARG, определённые путем нормализации количества ADP-рибозы, ковалентно связанной с белками до соответствующего количества, полученного в отсутствие HPF1 и в присутствии NCP (без Gap) при каждой концентрации  $NAD^+$ . Отмечены статистически значимые различия между сравниваемыми величинами:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*).

Таким образом, мы в очередной раз подтвердили нашу гипотезу о стимуляции инициации PAR-илирования фактором HPF1, а также показали значительный вклад присутствия повреждённой ДНК (интермедиата BER) в каталитическую активацию PARP2.

### **3.3.4. Положение повреждения в составе NCP влияет на HPF1-зависимую модификацию гистонов**

В связи с нашими данными о вкладе бреши в PAR-илирование гистонов ферментом PARP1 и, в особенности, PARP2, мы задались целью проанализировать влияние линкерных областей и положения повреждения (как относительно тупых концов, так и относительно гистонового ядра NCP) на активность данных ферментов (**Рис.31**). В первую очередь, было проанализировано количество и распределение PAR, синтезированного PARP1 и PARP2 в присутствии HPF1 на всех вариантах NCP, представленных в **3.1.4**. Все NCP использовали как в вариантах без Gap (для выявления влияния линкеров, **Рис 31а,б**, дорожки 1–6), так и с повреждением (для выявления влияния положения повреждения и гистонового контекста, **Рис 31а,б**, дорожки 7–12).

В случае PARP1, мы не наблюдали достоверной разницы уровней авто- и гетеро-PAR-илирования в присутствии NCP без бреши, независимо от наличия линкеров. Несмотря на некоторое укорочение PAR, связанного с гистонами, при появлении линкеров, общее количество связанной с ними ADP-рибозы было одинаковым. В присутствии Gap NCP, уровень автомодификации PARP1 незначительно снижался при удалении повреждения от 5'-конца ДНК. В то же время, PAR-илирование гистонов, по всей видимости, зависит скорее от положения повреждения относительно гистонового кора, нежели от удалённости повреждения от 5'-конца ДНК. Так, уровень модификации гистонов в структурах, содержащих брешь в положении 12, (относительно последовательности 603, **Рис.31а**, дорожки 7-9) был достоверно ниже, чем в структурах, содержащих брешь в положении 35 (**Рис.31а**, дорожки 10-12), и практически не отличался от уровня модификации для NCP без бреши. С учётом лимитирующих концентраций  $\text{NAD}^+$ , используемых в данных экспериментах, можно предположить, что наблюдаемое уменьшение автомодификации связано с перераспределением синтезируемого PAR в пользу гистонов в присутствии повреждения в положении 35. Иными словами, гистоновое окружение повреждения может оказывать влияние на баланс авто- и гетеро-PAR-илирования.

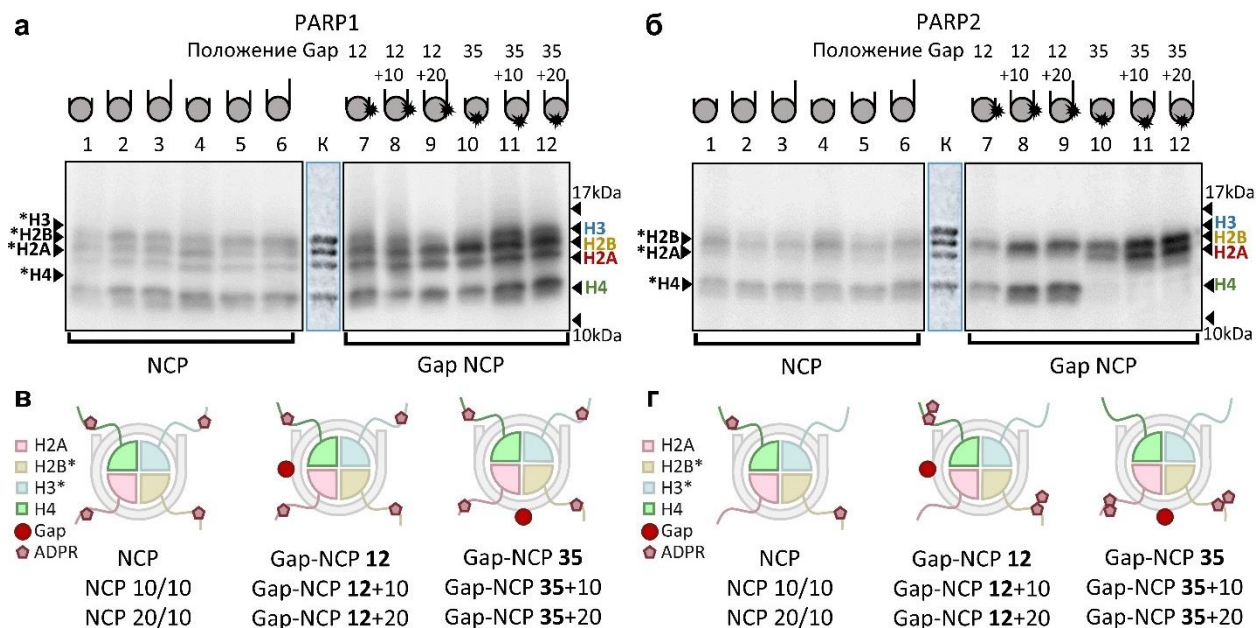


**Рис.31.** Влияние структуры NCP на HPF1-зависимое PAR-илирование: а, б – автордиограммы показывают ковалентное связывание [ $^{32}$ P]-меченой ADP-рибозы с PARP1 и PARP2 после инкубации PARP (500 нМ) с [ $^{32}$ P]-NAD $^{+}$  (1 мкМ) и 250 нМ NCP (дорожки 1-6) или Gap NCP (дорожки 7-12) в присутствии 1 мкМ HPF1 (разделение продуктов в 20% SDS-ПААГ). Сверху обозначено положение повреждения относительно 5'-конца ДНК и схематично изображены структуры NCP; в, г – графики отражают количество PAR, связанного с PARP1, PARP2 и гистонами. Отмечены статистически значимые различия между сравниваемыми величинами:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*)

В случае PARP2 мы также наблюдали увеличение количества ADP-рибозы, связанной с гистонами, в присутствии брешы в 35-м положении, что также подтверждает нашу гипотезу о первостепенной роли гистонового окружения повреждения. Однако, мы не наблюдали какого-либо влияния положения повреждения и наличия линкеров на аутомодификацию PARP2, что опять же подтверждает предпочтительную гетеромодификацию гистонов данным ферментом.

Для подтверждения предположения о ключевой роли влияния расположения повреждения относительно гистонов на их модификацию, было проанализировано распределение PAR между гистонами. Для этого реакционные смеси дополнительно были

обработаны PARG, взятого в низкой концентрации, что обеспечивало удаление протяжённых цепей PAR, но оставляло некоторое количество олиго-ADP-рибозы, позволяющей надёжно детектировать положение модифицированных белков (**Рис.32**).



**Рис.32.** Зависимость распределения PAR между гистонами от структуры NCP: а, б – автордиограммы показывают ковалентное связывание [<sup>32</sup>P]-меченой ADP-рибозы с гистонами после инкубации PARP (500 нМ) с [<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> (1 мкМ), HPF1 (1 мкМ) и NCP или Gap NCP (250 нМ) с последующим катализируемым PARG гидролизом PAR и разделением продуктов в 20%-м SDS-ПААГ. Положение гистонов визуализировали окрашиванием кумасси (К); в, г – схематическое отображение паттерна PAR-илирования гистонов, возникающее на NCP без Gap и структурах, содержащих Gap в 12-м и 35-м положениях. Звездочками отмечены гистоны, для которых ранее показано PAR-илирование остатков серина [29, 30].

В случае PARP1, PAR оказался связанным со всеми четырьмя коровыми гистонами (**Рис.32а**). Присутствие бреши, по всей видимости, увеличивает число событий инициации PAR-илирования гистонов. В наших экспериментах PARP2 модифицировал гистоны H2B, H2A и H4, но модификация H3 не была детектирована (**Рис.32б**). Присутствие бреши, закономерно, приводило к увеличению числа актов инициации PAR-илирования гистонов. При этом, в отличие от PARP1, мы наблюдали различия в распределении PAR между гистонами в зависимости от расположения бреши относительно гистонов. Так, в структуре Gap NCP с повреждением в положении 12 (относительно конца последовательности 603, дорожки 8-10), были модифицированы преимущественно гистоны H2B и H4. Основными мишенями модификации в структуре Gap NCP с повреждением в положении 35 были

гистоны H2B и H2A. Таким образом, катализируемая PARP2 модификация гистонов зависит от гистонового окружения повреждения в большей степени, нежели катализируемая PARP1, что может указывать на специфические особенности PARP2 в реакции PAR-илирования гистонов.

Примечательно, что протеомные исследования сообщают о серин-зависимом ADP-рибозилировании гистонов H2B и H3, в то время как для H2A и H4 аминокислотные остатки, несущие PAR не были достоверно определены [29, 30]. Таким образом мы в нашей работе мы впервые показали HPF1-зависимую модификацию данных гистонов.

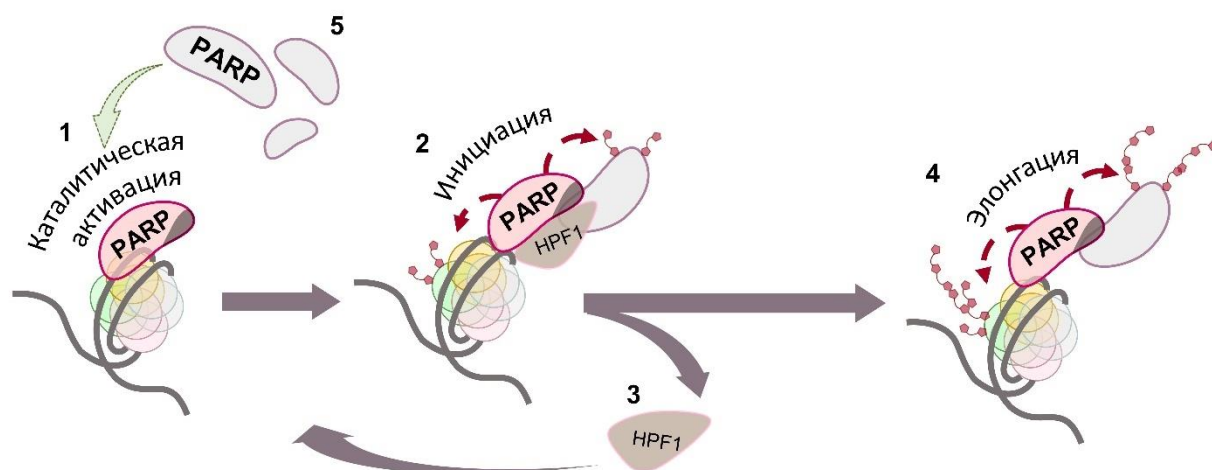


## Заключение

Недавно обнаруженный фактор PAR-илирования гистонов (HPF1) в настоящее время является объектом интенсивных исследований [26–28, 31, 87, 99, 100, 147, 168, 302, 303, 324, 325]. Данный белок модулирует активность ферментов PARP1 и PARP2. Было показано, что HPF1 образует совместный активный центр с данными ферментами, тем самым обеспечивая переключение специфичности PAR-илирования с остатков аспартата и глутамата на остатки серина, что, в свою очередь, играет важную роль в катализируемом PARP1 и PARP2 PAR-илировании гистонов [28–30]. В настоящий момент механизм взаимодействия PARP1/PARP2 с HPF1 активно изучается. Было показано, что HPF1 подавляет элонгацию синтеза PAR, что приводит к синтезу более коротких полимеров и увеличению гидролиза  $\text{NAD}^+$ . В данной работе мы впервые показали стимуляцию PAR-илирования в присутствии HPF1 и предлагаем модель его взаимодействия с PARP1 и PARP2. Образование гибридного активного центра PARP:HPF1 действительно приводит к подавлению элонгации (**Рис.15, 20**) и укорочению синтезируемого PAR (**Рис.21**). Однако, данные эффекты ярко выражены при избытке HPF1, в ситуации, когда все активные центры PARP заняты HPF1, что указывает на участие в стадии элонгации свободных молекул PARP. В то же время, HPF1 стимулирует инициацию PAR-илирования, обеспечивая вклад в увеличение числа оборотов реакции, в пользу чего говорит возрастание начальных скоростей автомодификации в присутствии HPF1 и стимуляция PAR-илирования при низких концентрациях  $\text{NAD}^+$  (когда вклад продуктов инициации в общее количество синтезированного PAR велико) (**Таблица 8, 9, Рис.15, 20, 25**). С учётом низкого сродства HPF1 к PARP1 и PARP2, а также разницы клеточных концентраций PARP1 и HPF1 ( $\sim 2 \mu\text{M}$  (PARP1) относительно  $\sim 0,1 \mu\text{M}$  (HPF1)), мы предполагаем, что для успешной стимуляции PAR-илирования необходима диссоциация HPF1 из комплекса с ферментами после акта инициации PAR-илирования для последующей элонгации синтеза PAR свободными молекулами PARP. Это объясняет наибольшую стимуляцию PAR-илирования, уменьшение гидролиза  $\text{NAD}^+$  и неполное переключение аминокислотной специфичности PAR-илирования в присутствии низких концентраций HPF1, когда не все молекулы PARP связаны с данным фактором (**Рис.22, 23**). Принимая во внимание данные о том, что связывание HPF1 стерически несовместимо с синтезом длинного PAR, вместе с показанной нами модификацией гистонов гетерогенным PAR (**Рис.15, 25**) мы можем предположить, что после опосредованной HPF1 инициации PAR-илирования остатков серина дальнейший синтез длинного PAR осуществляется свободным PARP, что ещё раз подтверждает предложенную нами модель. Примечательно, что новые данные, полученные *in vivo*,

подтверждают некоторые из обнаруженных нами эффектов. Было показано, что гиперэкспрессия HPF1 приводит к увеличению количества ADP-рибозы в ядре, но длина полимеров при этом сокращается [167, 168].

На основании полученных нами данных предполагается следующий механизм PAR-илирования в комплексах HPF1 с PARP1 и PARP2: ДНК-связанная субъединица PARP образует совместный активный центр с HPF1. Ещё одна субъединица PARP взаимодействует с этим комплексом и служит акцептором PAR. Комплекс PARP-HPF1 участвует в инициации серин-специфического PAR-илирования, которое происходит с высокой начальной скоростью. После инициации HPF1 диссоциирует из комплекса с PARP, освобождает сайт элонгации в активном центре и может связаться со следующей молекулой PARP для очередной инициации серинзависимого PAR-илирования. Каталитически активная субъединица PARP продолжает синтез PAR (Рис.33).



**Рис.33.** Предполагаемый механизм PAR-илирования в комплексе PARP:HPF1: молекула PARP связывается с ДНК/NCP (1), комплекс PARP-HPF1 (2) участвует в инициации PAR-илирования. После инициации HPF1 диссоциирует из комплекса с PARP (3). Каталитически активная субъединица PARP продолжает синтез PAR (4), в то время как HPF1 может связаться со следующей молекулой PARP (5) для очередного этапа инициации PAR-илирования.

Равновесие, смещённое в пользу свободного от HPF1 PARP, необходимо для элонгации PAR и предоставления новых сайтов для инициации. Это будет способствовать обмену модифицированных молекул на немодифицированные и увеличивать число оборотов всей системы в условиях быстрой HPF1-зависимой инициации. Наконец, этот процесс приводит к увеличению общего уровня PAR-илирования.

Кроме того, мы предполагаем специфическую роль PARP2 в ответе на повреждения ДНК в контексте хроматина. Так, мы показали, что изначально низкая активность PARP2

может быть многократно усилена присутствием HPF1, специфического для BER повреждения ДНК и гистонов — акцепторов PAR (Рис.25-30, Таблица 9). При этом положение повреждения в структуре NCP может оказывать влияние на распределение PAR между гистонами в процессе их PAR-илирования (Рис.32). Данное открытие хорошо согласуется с недавно обнаруженными волнами PAR-илирования *in vivo*. Первая волна при этом ассоциирована с обширной, но короткоживущей аутомодификацией PARP1, вторая представлена более стабильной модификацией хроматина [167]. Совместная локализация PARP2 и HPF1 на хроматине во время второй волны PAR-илирования, показанная ранее [72], и наши результаты, полученные *in vitro* [302, 303], позволяют предположить, что именно PARP2 ответственен за поддержание модификации гистонов при ответе на повреждение ДНК. В то же время функция PARP1 может быть связана в первую очередь с быстрым обнаружением повреждения и привлечением факторов репарации, в том числе PARP2 и HPF1. При этом HPF1 также может быть ответственен за своевременную диссоциацию PARP1 и PARP2 из комплексов с ДНК-повреждениями, обеспечивающее завершение репарации ДНК.

Таким образом, в представленной работе предложена модель механизма HPF1-зависимой стимуляции ферментов PARP1 и PARP2 в реакции авто-PAR-илирования и гетеро-PAR-илировании гистонов. Показано влияние HPF1 на этапах инициации и элонгации PAR-илирования.

## Выводы

1. Методика определения сродства и активности PARP1 и PARP2 *in vitro* в реальном времени с помощью флуоресцентной спектроскопии, оптимизирована для количественной оценки величин констант диссоциации комплексов PARP1 и PARP2 с ДНК и ДНК в нуклеосомах, а также скорости диссоциации этих комплексов в процессе PAR-илирования PARP1 и PARP2.

2. PARP1 и PARP2 имеют разное сродство и специфичность к повреждениям ДНК и ДНК в нуклеосомах. Наибольшую аффинность PARP1 проявляет к тупым концам ДНК. PARP2 связывается преимущественно с брешью в ДНК — интермедиатом эксцизионной репарации оснований.

3. HPF1 стимулирует инициацию PAR-илирования PARP1 и PARP2, но подавляет стадию элонгации. Увеличение эффективности и скорости инициации приводит к уменьшению уровня гидролиза  $\text{NAD}^+$  в гибридном активном центре PARP1/2:HPF1. Для процессивного синтеза PAR необходима диссоциация HPF1 из его комплекса с PARP1 и PARP2. Соотношение концентраций PARP1/2:HPF1 на сайтах повреждения ДНК может влиять на длину синтезируемого полимера.

4. PARP1 и PARP2 проявляют различную специфичность в отношении мишеней PAR-илирования. В присутствии HPF1 на нуклеосомах, гистоны становятся основной мишенью модификации PARP2. PARP1 преимущественно катализирует автомодификацию.

5. Присутствие бреши в структуре ДНК в нуклеосоме влияет на HPF1-зависимое гетеро-PAR-илирование гистонов, но не на автомодификацию PARP1 и PARP2. Присутствие повреждения ДНК — интермедиата BER приводит к увеличению как начальных скоростей PAR-илирования гистонов обоими ферментами, так и общего количества связанного с гистонами полимера. Каталитическая активность PARP2 усиливается в присутствии повреждения ДНК — интермедиата BER и HPF1 в большей степени, нежели активность PARP1. Брешь в ДНК приводит к значительному увеличению количества синтезированного PAR ферментом PARP2, преимущественно за счёт существенной стимуляции PAR-илирования гистонов. Таким образом, изначально низкая активность PARP2 стимулируется присутствием бреши в ДНК, HPF1, повышающего эффективность инициации, а также гистонов, выступающих в роли акцепторов PAR.

## Список литературы

1. Gibson B.A., Kraus W.L. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2012. – V. 13. – No. 7. – P. 411–424.
2. Kraus W.L. PARPs and ADP-ribosylation: 50 years... and counting // *Mol. Cell.* – 2015. – V. 58. – No. 6. – P. 902–910.
3. O’Sullivan J., Tedim Ferreira M., Gagné J.P., Sharma A.K., Hendzel M.J., Masson J.Y., Poirier G.G. Emerging roles of eraser enzymes in the dynamic control of protein ADP-ribosylation // *Nat. Comm.* – 2019. – V. 10. – No. 1. – P. 1–14.
4. D’Amours D., Sallmann F.R., Dixit V.M., Poirier G.G. Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis // *J. Cell. Sci.* – 2001. – V. 114. – No. 20. – P. 3771–3778.
5. Žaja R., Mikoč A., Barkauskaite E., Ahel I. Molecular insights into poly(ADP-ribose) recognition and processing // *Biomolecules.* – 2012. – V. 3. – No. 1. – P. 1–17.
6. Hanzlikova H., Kalasova I., Demin A.A., Pennicott L.E., Cihlarova Z., Caldecott K.W. The importance of poly(ADP-Ribose) polymerase as a sensor of unligated Okazaki fragments during DNA replication // *Mol. Cell.* – 2018. – V. 71. – No. 2. – P. 319–331.
7. Cohen M.S., Chang P. Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation // *Nat. Chem. Biol.* – 2018. – V. 14. – No. 3. – P. 236–243.
8. Buch-Larsen S.C., Rebak A.K.L.F.S., Hendriks I.A., Nielsen M.L. Temporal and site-specific ADP-ribosylation dynamics upon different genotoxic stresses. // *Cells.* – 2021. – V. 10. – Article No. 20190075.
9. Kraus W.L. PARPs and ADP-ribosylation: 60 years on // *Genes Dev.* – 2020. – V. 34. – No. 5. – P. 251–253.
10. Lavrik O.I. PARPs’ impact on base excision DNA repair // *DNA Repair (Amst).* – 2020. – V. 93. – Article No. 102911.
11. Vasil’eva I., Moor N., Anarbaev R., Kutuzov M., Lavrik O. Functional roles of PARP2 in assembling protein–protein complexes involved in base excision DNA repair // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – Article No. 4679.
12. Kutuzov M.M., Belousova E.A., Kurgina T.A., Ukraintsev A.A., Vasil’eva I.A., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. The contribution of PARP1, PARP2 and poly(ADP-ribosyl)ation to base excision repair in the nucleosomal context // *Sci. Rep.* – 2021. – V. 11. – Article No. 4849.
13. Ходырева С.Н., Лаврик О.И. Поли(ADP-рибоза)полимераза 1 – ключевой регулятор репарации ДНК // *Молекулярная биология.* – 2016. – Т. 50. – No. 4. – С. 655–673.
14. Моор Н.А., Лаврик О.И. Белок-белковые взаимодействия системы эксцизионной репарации оснований ДНК // *Биохимия.* – 2018. – Т. 83. – No. 4. – С. 564–576.
15. Vasil’eva I.A., Anarbaev R.O., Moor N.A., Lavrik O.I. Dynamic light scattering study of base excision DNA repair proteins and their complexes // *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* – 2019. – V. 1867. – No. 3. – P. 297–305.

16. Maltseva E.A., Rechkunova N.I., Sukhanova M. V., Lavrik O.I. Poly(ADP-ribose)polymerase 1 modulates interaction of the nucleotide excision repair factor XPC-RAD23B with DNA via poly(ADP-ribosylation) // *J. Biol. Chem.* – 2015. – V. 290. – No. 36. – P. 21811–21820.
17. Caron M.C., Sharma A.K., O’Sullivan J., Myler L.R., Ferreira M.T., Rodrigue A., Coulombe Y., Ethier C., Gagné J.P., Langelier M.F., Pascal J.M., Finkelstein I.J., Hendzel M.J., Poirier G.G., Masson J.Y. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 antagonizes DNA resection at double-strand breaks // *Nat. Commun.* – 2019. – V. 10. – Article No. 2954.
18. Krasikova Y., Rechkunova N., Lavrik O. Nucleotide excision repair: from molecular defects to neurological abnormalities // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – Article No. 6220.
19. Dizdar O., Arslan C., Altundag K. Advances in PARP inhibitors for the treatment of breast cancer // *Expert. Opin. Pharmacother.* – 2015. – V. 16. – No. 18. – P. 2751–2758.
20. Curtin N.J., Szabo C. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition: past, present and future // *Nat. Rev. Drug. Discov.* – 2020. – V. 19. – No. 10. – P. 711–736.
21. Spiegel J.O., Van Houten B., Durrant J.D. PARP1: Structural insights and pharmacological targets for inhibition // *DNA Repair (Amst).* – 2021. – V. 103. – P. 103–125.
22. Flippot R., Patrikidou A., Aldea M., Colomba E., Lavaud P., Albigès L., Naoun N., Blanchard P., Terlizzi M., Garcia C., Bernard-Tessier A., Fuerea A., Di Palma M., Escudier B., Loriot Y., Baciarello G., Fizazi K. PARP inhibition, a new therapeutic avenue in patients with prostate cancer. // *Drugs.* – 2022. – V. 82. – P. 719-733.
23. Schreiber V., Illuzzi G., Héberlé E., Dantzer F. From poly(ADP-ribose) discovery to PARP inhibitors in cancer therapy // *Bull. Cancer.* – 2015. – V. 102. – No. 10. – P. 863–873.
24. Sim H.W., Galanis E., Khasraw M. PARP inhibitors in glioma: a review of therapeutic opportunities // *Cancers.* – 2022. – V. 14. – Article No. 1003.
25. Sonnenblick A., De Azambuja E., Azim H.A., Piccart M. An update on PARP inhibitors-moving to the adjuvant setting // *Nat. Rev. Clin. Oncol.* – 2015. – V. 12. – No. 1. – P. 27–41.
26. Gibbs-Seymour I., Fontana P., Rack J.G.M., Ahel I. HPF1/C4orf27 is a PARP-1-interacting protein that regulates PARP-1 ADP-ribosylation activity // *Mol. Cell.* – 2016. – V. 62. – No. 3. – P. 432–442.
27. Suskiewicz M.J., Zobel F., Ogden T.E.H., Fontana P., Ariza A., Yang J.C., Zhu K., Bracken L., Hawthorne W.J., Ahel D., Neuhaus D., Ahel I. HPF1 completes the PARP active site for DNA damage-induced ADP-ribosylation // *Nature.* – 2020. – V. 579. – Article No. 598.
28. Bonfiglio J.J., Fontana P., Zhang Q., Colby T., Gibbs-Seymour I., Atanassov I., Bartlett E., Zaja R., Ahel I., Matic I. Serine ADP-ribosylation depends on HPF1 // *Mol. Cell.* – 2017. – V. 65. – No. 5. – P. 932–940.
29. Leidecker O., Bonfiglio J.J., Colby T., Zhang Q., Atanassov I., Zaja R., Palazzo L., Stockum A., Ahel I., Matic I. Serine is a new target residue for endogenous ADP-ribosylation on histones // *Nat. Chem. Biol.* – 2016. – V. 12. – No. 12. – P. 998–1000.

30. Palazzo L., Leidecker O., Prokhorova E., Dauben H., Matic I., Ahel I. Serine is the major residue for ADP-ribosylation upon DNA damage // *Elife.* – 2018. – V. 7. – Article No. e34334.
31. Sun F.H., Zhao P., Zhang N., Kong L.L., Wong C.C.L., Yun C.H. HPF1 remodels the active site of PARP1 to enable the serine ADP-ribosylation of histones // *Nat. Commun.* – 2021. – V. 12. – Article No. 1028.
32. Alemasova E.E., Lavrik O.I. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins // *Nucleic. Acids. Res.*– 2019. – V. 47. – No. 8. – P. 3811–3827.
33. Alemasova E.E., Lavrik O.I. Poly(ADP-ribose) in condensates: the PARTnership of phase separation and site-specific interactions // *Int. J. Mol. Sci.*– 2022. – V. 23. – No. 22. – Article No. 14075.
34. Otto H., Reche P.A., Bazan F., Dittmar K., Haag F., Koch-Nolte F. In silico characterization of the family of PARP-like poly(ADP-ribosyl)transferases (pARTs) // *BMC Genomics.* – 2005. – V. 6. – Article No.139.
35. Han S., Tainer J.A. The ARTT motif and a unified structural understanding of substrate recognition in ADP-ribosylating bacterial toxins and eukaryotic ADP-ribosyltransferases // *I. J. M. M.* – 2001. – V. 291. – No. 6–7. – P. 523–529.
36. Amé J.C., Spenlehauer C., De Murcia G. The PARP superfamily // *BioEssays.* – 2004. – V. 26. – No. 8. – P. 882–893.
37. Hanzlikova H., Gittens W., Krejciakova K., Zeng Z., Caldecott K.W. Overlapping roles for PARP1 and PARP2 in the recruitment of endogenous XRCC1 and PNKP into oxidized chromatin // *Nucleic. Acids. Res.* – 2017. – V. 45. – No. 5. – P. 2546–2557.
38. Langelier M.F., Eisemann T., Riccio A.A., Pascal J.M. PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly(ADP-ribose) posttranslational modification // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2018. – V. 53. – P. 187–198.
39. Chambon P., Weill J.D., Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1963. – V. 11. – No. 1. – P. 39–43.
40. Chambon P., Weill J.D., Doly J., Strosser M.T., Mandel P. On the formation of a novel adenylic compound by enzymatic extracts of liver nuclei // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1966. – V. 25. – No. 6. – P. 638–643.
41. Schreiber V., Dantzer F., Amé J.C., De Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*– 2006. – V. 7. – No. 7. – P. 517–528.
42. Pascal J.M., Ellenberger T. The rise and fall of poly(ADP-ribose): an enzymatic perspective // *DNA Repair (Amst).* – 2015. – V. 32. – P. 10–16.
43. Eisemann T., Pascal J.M. Poly(ADP-ribose) polymerase enzymes and the maintenance of genome integrity // *Cell. Mol. Life. Sci.* – 2020. – V. 77. – No. 1. – P. 19–33.
44. Amé J.C., Rolli V., Schreiber V., Niedergang C., Apiou F., Decker P., Muller S., Höger T., Ménissier-de Murcia J., De Murcia G. PARP-2, a novel mammalian DNA damage-

dependent poly(ADP-ribose) polymerase // *J. Biol. Chem.* – 1999. – V. 274. – No. 25. – P. 17860–17868.

45. Ghosh R., Roy S., Kamyab J., Dantzer F., Franco S. Common and unique genetic interactions of the poly(ADP-ribose) polymerases PARP1 and PARP2 with DNA double-strand break repair pathways // *DNA Repair (Amst)*. – 2016. – V. 45. – P. 56–62.

46. Sukhanova M. V., Abrakhi S., Joshi V., Pastre D., Kutuzov M.M., Anarbaev R.O., Curmi P.A., Hamon L., Lavrik O.I. Single molecule detection of PARP1 and PARP2 interaction with DNA strand breaks and their poly(ADP-ribosylation) using high-resolution AFM imaging // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 44. – Article No. 60.

47. Ruf A., De Murcia J.M., De Murcia G.M., Schulz G.E. Structure of the catalytic fragment of poly(ADP-ribose) polymerase from chicken // *Proc. Nat. Acad. Sci. U S A.* – 1996. – V. 93. – No. 15. – P. 7481–7485.

48. Langelier M.F., Planck J.L., Roy S., Pascal J.M. Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity // *J. Biol. Chem.* – 2011. – V. 286. – No. 12. – P. 10690–10701.

49. Langelier M.F., Planck J.L., Roy S., Pascal J.M. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1 // *Science*. – 2012. – V. 336. – No. 6082. – P. 728–732.

50. Langelier M.F., Ruhl D.D., Planck J.L., Kraus W.L., Pascal J.M. The Zn<sup>3</sup> domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – No. 24. – P. 18877–18887.

51. Deeksha W., Abhishek S., Rajakumara E. PAR recognition by PARP1 regulates DNA-dependent activities and independently stimulates catalytic activity of PARP1 // *FEBS J.* – 2022. – V. 18. – Article No. 16907.

52. Tao Z., Gao P., Liu H.W. Identification of the ADP-ribosylation sites in the PARP-1 automodification domain: Analysis and implications // *J. Am. Chem. Soc.* – 2009. – V. 131. – No. 40. – P. 14258–14260.

53. Rudolph J., Roberts G., Luger K. Histone Parylation factor 1 contributes to the inhibition of PARP1 by cancer drugs // *Nat. Commun.* – 2021. – V. 12. – Article No. 736.

54. Prokhorova E., Zobel F., Smith R., Zentout S., Gibbs-Seymour I., Schützenhofer K., Peters A., Gros Lambert J., Zorzini V., Agnew T., Brognard J., Nielsen M.L., Ahel D., Huet S., Suskiewicz M.J., Ahel I. Serine-linked PARP1 auto-modification controls PARP inhibitor response // *Nat. Commun.* – 2021. – V. 12. – Article No. 4055.

55. Rudolph J., Mahadevan J., Dyer P., Luger K. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 searches DNA via a “monkey bar” mechanism // *Elife*. – 2018. – V. 7. – Article No. e37818.

56. Rudolph J., Muthurajan U.M., Palacio M., Mahadevan J., Roberts G., Erbse A.H., Dyer P.N., Luger K. The BRCT domain of PARP1 binds intact DNA and mediates intrastrand transfer // *Mol. Cell*. – 2021. – V. 81. – No. 24. – P. 4994–5006.



57. Langelier M.F., Riccio A.A., Pascal J.M. PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1 // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42. – No. 12. – P. 7762–7775.
58. Riccio A.A., Cingolani G., Pascal J.M. PARP-2 domain requirements for DNA damage-dependent activation and localization to sites of DNA damage // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44. – No. 4. – P. 1691–1702.
59. Obaji E., Haikarainen T., Lehtiö L. Structural basis for DNA break recognition by ARTD2/PARP2 // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – V. 46. – No. 22. – P. 12154–12165.
60. Langelier M.F., Pascal J.M. PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis // *Curr. Opin. Struct. Biol.* – 2013. – V. 23. – No. 1. – P. 134–143.
61. Dawicki-McKenna J.M., Langelier M.F., DeNizio J.E., Riccio A.A., Cao C.D., Karch K.R., McCauley M., Steffen J.D., Black B.E., Pascal J.M. PARP-1 activation requires local unfolding of an autoinhibitory domain // *Mol. Cell.* – 2015. – V. 60. – No. 5. – P. 755–768.
62. Obaji E., Haikarainen T., Lehtiö L. Characterization of the DNA dependent activation of human ARTD2/PARP2 // *Sci. Rep.* – 2016. – V. 6. – Article No. 34487.
63. Obaji E., Maksimainen M.M., Galera-Prat A., Lehtiö L. Activation of PARP2/ARTD2 by DNA damage induces conformational changes relieving enzyme autoinhibition // *Nat. Commun.* – 2021. – V. 12. – Article No. 3479.
64. Ogden T.E.H., Yang J.C., Schimpl M., Easton L.E., Underwood E., Rawlins P.B., McCauley M.M., Langelier M.F., Pascal J.M., Embrey K.J., Neuhaus D. Dynamics of the HD regulatory subdomain of PARP-1; substrate access and allostery in PARP activation and inhibition // *Nucleic Acids Res.* – 2021. – V. 49. – No. 4. – P. 2266–2288.
65. Eustermann S., Videler H., Yang J.C., Cole P.T., Gruszka D., Veprintsev D., Neuhaus D. The DNA-binding domain of human PARP-1 interacts with DNA single-strand breaks as a monomer through its second zinc finger // *J. Mol. Biol.* – 2011. – V. 407. – No. 1. – P. 149–170.
66. Clark N.J., Kramer M., Muthurajan U.M., Luger K. Alternative modes of binding of poly(ADP-ribose) polymerase 1 to free DNA and nucleosomes // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287. – No. 39. – P. 32430–32439.
67. Cistulli C., Lavrik O.I., Prasad R., Hou E., Wilson S.H. AP endonuclease and poly(ADP-ribose) polymerase-1 interact with the same base excision repair intermediate // *DNA Repair (Amst.)* – 2004. – V. 3. – No. 6. – P. 581–591.
68. Khodyreva S.N., Prasad R., Ilina E.S., Sukhanova M. V., Kutuzov M.M., Liu Y., Hou E.W., Wilson S.H., Lavrik O.I. Apurinic/aprimidinic (AP) site recognition by the 5'-dRP/AP lyase in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) // *Proc. Natl. Acad.* – 2010. – V. 107. – No. 51. – P. 22090–22095.
69. Sukhanova M. V., Hamon L., Kutuzov M.M., Joshi V., Abrakhi S., Dobra I., Curmi P.A., Pastre D., Lavrik O.I. A single-molecule atomic force microscopy study of PARP1 and PARP2 recognition of base excision repair DNA intermediates // *J. Mol. Biol.* – 2019. – V. 431. – No. 15. – P. 2655–2673.

70. Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: “PAR-laying” NAD<sup>+</sup> into a nuclear signal // *Genes Dev.* – 2005. – V. 19. – No. 17. – P. 1951–1967.
71. Mortusewicz O., Amé J.C., Schreiber V., Leonhardt H. Feedback-regulated poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells // *Nucleic. Acids. Res.* – 2007. – V. 35. – No. 22. – P. 7665–7675.
72. Lin X., Jiang W., Rudolph J., Lee B.J., Luger K., Zha S. PARP inhibitors trap PARP2 and alter the mode of recruitment of PARP2 at DNA damage sites // *Nucleic. Acids. Res.* – 2022. – V. 50. – No. 7. – P. 3958–3973.
73. Mahadevan J., Rudolph J., Jha A., Tay J.W., Dragavon J., Grumstrup E.M., Luger K. Q-FADD: a mechanistic approach for modeling the accumulation of proteins at sites of DNA damage // *Biophys. J.* – 2019. – V. 116. – No. 11. – P. 2224.
74. Record M.T., Ha J.H., Fisher M.A. Analysis of equilibrium and kinetic measurements to determine thermodynamic origins of stability and specificity and mechanism of formation of site-specific complexes between proteins and helical DNA // *Methods. Enzymol.* – 1991. – V. 208. – No. – P. 291–343.
75. Aleksandrov R., Dotchev A., Poser I., Krastev D., Georgiev G., Panova G., Babukov Y., Danovski G., Dyankova T., Hubatsch L., Ivanova A., Ategin A., Nedelcheva-Velva M.N., Hasse S., Sarov M., Buchholz F., Hyman A.A., Grill S.W., Stoyanov S.S. Protein dynamics in complex DNA lesions // *Mol. Cell.* – 2018. – V. 69. – No. 6. – P. 1046-1061.
76. Mahadevan J., Jha A., Rudolph J., Bowerman S., Narducci D., Hansen A.S., Luger K. Dynamics of endogenous PARP1 and PARP2 during DNA damage revealed by live-cell single-molecule imaging // *iScience.* – 2022. – V. 26. – Article No. 105779.
77. Mirny L., Slutsky M., Wunderlich Z., Tafvizi A., Leith J., Kosmrlj A. How a protein searches for its site on DNA: the mechanism of facilitated diffusion // *J. Phys. A. Math. Theor.* – 2009. – V. 42. – No. 43. – Article No.434013.
78. Berg O.G., Winter R.B., von Hippel P.H. Diffusion-driven mechanisms of protein translocation on nucleic acids. 1. Models and theory // *Biochemistry.* – 1981. – V. 20. – No. 24. – P. 6929–6948.
79. Lee A.J., Warshaw D.M., Wallace S.S. Insights into the glycosylase search for damage from single-molecule fluorescence microscopy // *DNA Repair (Amst).* – 2014. – V. 20. – P. 23–31.
80. Halford S.E. An end to 40 years of mistakes in DNA-protein association kinetics? // *Biochem. Soc. Trans.* – 2009. – V. 37. – No. 2. – P. 343–348.
81. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution // *Nature.* – 1997. – V. 389. – No. 6648. – P. 251–260.
82. McGinty R.K., Tan S. Nucleosome structure and function // *Chem. Rev.* – 2015. – V. 115. – No. 6. – P. 2255–2273.
83. Imbalzano A.N., Kwon H., Green M.R., Kingston R.E. Facilitated binding of TATA-binding protein to nucleosomal DNA // *Nature.* – 1994. – V. 370. – No. 6489. – P. 481–485.

84. Wechsler D.S., Papoulas O., Dang C. V, Kingston R.E. Differential binding of c-Myc and Max to nucleosomal DNA // *Mol. Cell. Biol.* – 1994. – V. 14. – No. 6. – P. 4097–4107.
85. Widom J. Role of DNA sequence in nucleosome stability and dynamics // *Q. Rev. Biophys.* – 2001. – V. 34. – No. 3. – P. 269–324.
86. Lowary P.T., Widom J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning // *J. Mol. Biol.* – 1998. – V. 276. – No. 1. – P. 19–42.
87. Rudolph J., Roberts G., Muthurajan U.M., Luger K. HPF1 and nucleosomes mediate a dramatic switch in activity of PARP1 from polymerase to hydrolase // *Elife.* – 2021. – V. 10. – Article No. 65773.
88. Brower-Toland B.D., Smith C.L., Yeh R.C., Lis J.T., Peterson C.L., Wang M.D. Mechanical disruption of individual nucleosomes reveals a reversible multistage release of DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci.* – 2002. – V. 99. – No. 4. – P. 1960–1965.
89. Korolev N., Lyubartsev A.P., Nordenskiöld L. A systematic analysis of nucleosome core particle and nucleosome-nucleosome stacking structure // *Sci. Rep.* – 2018. – V. 8. – Article No. 1543.
90. Sultanov D., Gerasimova N., Kudryashova K., Maluchenko N., Kotova E., Langelier M.-F., Pascal J., Kirpichnikov M., Feofanov A., Studitsky V. Unfolding of core nucleosomes by PARP-1 revealed by spFRET microscopy // *AIMS Genet.* – 2017. – V. 4. – No. 1. – P. 21–31.
91. Maluchenko N. V., Nilov D.K., Pushkarev S. V., Kotova E.Y., Gerasimova N.S., Kirpichnikov M.P., Langelier M.F., Pascal J.M., Akhtar M.S., Feofanov A. V., Studitsky V.M. Mechanisms of nucleosome reorganization by PARP1 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2021. – V. 22. – Article No. 12127.
92. Muthurajan U.M., Hepler M.R.D., Hieb A.R., Clark N.J., Kramer M., Yao T., Luger K. Automodification switches PARP-1 function from chromatin architectural protein to histone chaperone // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* – 2014. – V. 111. – No. 35. – P. 12752–12757.
93. Украинцев А.А., Белоусова Е.А., Кутузов М.М., Лаврик О.И. Изучение взаимодействия ДНК-зависимых белков семейства PARP с нуклеосомными частицами, содержащими интермедиаты начальных стадий процесса BER // *Биохимия* – 2022. – Т. 87. – No. 4. – С. 331–345.
94. Kim M.Y., Mauro S., Gévry N., Lis J.T., Kraus W.L. NAD<sup>+</sup>-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1 // *Cell.* – 2004. – V. 119. – No. 6. – P. 803–814.
95. Krishnakumar R., Gamble M.J., Frizzell K.M., Berrocal J.G., Kininis M., Kraus W.L. Reciprocal binding of PARP-1 and histone H1 at promoters specifies transcriptional outcomes // *Science.* – 2008. – V. 319. – No. 5864. – P. 819–821.
96. Kraus W.L., Lis J.T. PARP goes transcription // *Cell.* – 2003. – V. 113. – No. 6. – P. 677–683.

97. Wacker D.A., Frizzell K.M., Zhang T., Kraus W.L. Regulation of chromatin structure and chromatin-dependent transcription by poly(ADP-ribose) polymerase-1: possible targets for drug-based therapies // *Subcell. Biochem.* – 2007. – V. 41. – P. 45–69.
98. Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Amé J.C., Ilina E.S., Sukhanova M. V., Schreiber V., Lavrik O.I. Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins // *Biochimie.* – 2013. – V. 95. – No. 6. – P. 1208–1215.
99. Gaullier G., Roberts G., Muthurajan U.M., Bowerman S., Rudolph J., Mahadevan J., Jha A., Rae P.S., Luger K. Bridging of nucleosome-proximal DNA double-strand breaks by PARP2 enhances its interaction with HPF1 // *PLoS One.* – 2020. – V. 15. – Article No. e0240932.
100. Bilokapic S., Suskiewicz M.J., Ahel I., Halic M. Bridging of DNA breaks activates PARP2-HPF1 to modify chromatin // *Nature.* – 2020. – V. 585. – No. 7826. – P. 609–613.
101. Wilkinson O.J., Martín-González A., Kang H., Northall S.J., Wigley D.B., Moreno-Herrero F., Dillingham M.S. CtIP forms a tetrameric dumbbell-shaped particle which bridges complex DNA end structures for double-strand break repair // *Elife.* – 2019. – V. 8. – Article No. e42129.
102. Andres S.N., Li Z.M., Erie D.A., Williams R.S. Ctp1 protein-DNA filaments promote DNA bridging and DNA double-strand break repair // *J. Biol. Chem.* – 2019. – V. 294. – No. 9. – P. 3312–3320.
103. Williams R.S., Moncalian G., Williams J.S., Yamada Y., Limbo O., Shin D.S., Grocock L.M., Cahill D., Hitomi C., Guenther G., Moiani D., Carney J.P., Russell P., Tainer J.A. Mre11 dimers coordinate DNA end bridging and nuclease processing in double-strand-break repair // *Cell.* – 2008. – V. 135. – No. 1. – P. 97–109.
104. Lammens K., Bemeleit D.J., Möckel C., Clausing E., Schele A., Hartung S., Schiller C.B., Lucas M., Angermüller C., Söding J., Sträßer K., Hopfner K.P. The Mre11:Rad50 structure shows an ATP-dependent molecular clamp in DNA double-strand break repair // *Cell.* – 2011. – V. 145. – No. 1. – P. 54–66.
105. Seifert F.U., Lammens K., Stoehr G., Kessler B., Hopfner K. Structural mechanism of ATP-dependent DNA binding and DNA end bridging by eukaryotic Rad50 // *EMBO J.* – 2016. – V. 35. – No. 7. – P. 759–772.
106. Graham T.G.W., Carney S.M., Walter J.C., Loparo J.J. A single XLF dimer bridges DNA ends during nonhomologous end joining // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2018. – V. 25. – No. 9. – P. 877–884.
107. Ferro A.M., Olivera B.M. Poly(ADP-ribosylation) in vitro. Reaction parameters and enzyme mechanism. // *J.Biol. Chem.* – 1982. – V. 257. – No. 13. – P. 7808–7813.
108. Gibson B.A., Zhang Y., Jiang H., Hussey K.M., Shrimp J.H., Lin H., Schwede F., Yu Y., Kraus W.L. Chemical genetic discovery of PARP targets reveals a role for PARP-1 in transcription elongation // *Science* – 2016. – V. 353. – No. 6294. – P. 45–50.
109. Mendoza-Alvarez H., Alvarez-Gonzalez R. Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular. // *J.Biol. Chem.* 1993. – V. 268. – No. 30. – P. 22575–22580.

110. Kanai M., Hanashiro K., Kim S.H., Hanai S., Boulares A.H., Miwa M., Fukasawa K. Inhibition of Crm1-p53 interaction and nuclear export of p53 by poly(ADP-ribosyl)ation // *Nat. Cell. Biol.* – 2007. – V. 9. – No. 10. – P. 1175–1183.
111. Collier R.J. Understanding the mode of action of diphtheria toxin: A perspective on progress during the 20th century // *Toxicon.* – 2001. – V. 39. – No. 11. – P. 1793–1803.
112. Cohen M.S., Chang P. Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation // *Nat. Chem. Biol.* – 2018. – V. 14. – No. 3. – P. 236–243.
113. Leung A.K.L. Poly(ADP-ribose): a dynamic trigger for biomolecular condensate formation // *Trends. Cell. Biol.* – 2020. – V. 30. – No. 5. – P. 370–383.
114. Dutagaci B., Nawrocki G., Goodluck J., Ashkarran A.A., Hoogstraten C.G., Lapidus L.J., Feig M. Charge-driven condensation of RNA and proteins suggests broad role of phase separation in cytoplasmic environments // *Elife.* – 2021. – V. 10. – P. 1–103.
115. Alemasova E.E., Lavrik O.I. A sePARate phase? Poly(ADP-ribose) versus RNA in the organization of biomolecular condensates // *Nucleic. Acids. Res.* – 2022. – V. 50. – No. 19. – P. 10817–10838.
116. David K.K., Andrabi S.A., Dawson T.M., Dawson V.L. Parthanatos, a messenger of death // *Front. Biosci.* – 2009. – V. 14. – No. 3. – P. 1116–1128.
117. Fatokun A.A., Dawson V.L., Dawson T.M. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities // *Br. J. Pharmacol.* – 2014. – V. 171. – No. 8. – P. 2000–2016.
118. Affar E.B., Shah R.G., Dallaire A.K., Castonguay V., Shah G.M. Role of poly(ADP-ribose) polymerase in rapid intracellular acidification induced by alkylating DNA damage // *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* – 2002. – V. 99. – No. 1. – P. 245–250.
119. Bauer P.I., Buki K.G., Hakam A., Kun E. Macromolecular association of ADP-ribosyltransferase and its correlation with enzymic activity // *Biochem J.* – 1990. – V. 270. – No. 1. – P. 17–26.
120. Buki K.G., Bauer P.I., Hakam A., Kun E. Identification of domains of poly(ADP-ribose) polymerase for protein binding and self-association // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – No. 7. – P. 3370–3377.
121. Wei H., Yu X. Functions of PARylation in DNA damage repair pathways. // *Gen. Prot. Bioinf.* – 2016. – V. 14. – No. 3. – P. 131–139.
122. Kirsten E., Jackowski G., McLick J., Hakam A., Decker K., Kun E. Cellular regulation of poly(ADP) ribosylation of proteins. I. Comparison of hepatocytes, cultured cells and liver nuclei and the influence of varying concentrations of NAD // *Exp. Cell. Res.* – 1985. – V. 161. – No. 1. – P. 41–52.
123. Estève P.O., Sen S., Vishnu U.S., Ruse C., Chin H.G., Pradhan S. Poly ADP-ribosylation of SET8 leads to aberrant H4K20 methylation in mammalian nuclear genome // *Commun. Biol.* – 2022. – V. 5. – Article No. 1292.
124. Zhu T., Zheng J.-Y., Huang L.-L., Wang Y.-H., Yao D.-F., Dai H.-B. Human PARP1 substrates and regulators of its catalytic activity: an updated overview. // *Front. Pharmacol.* – 2023. – V. 14. – Article No. 1137151.

125. Messner S., Hottiger M.O. Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription // *Trends. Cell. Biol.* – 2011. – V. 21. – No. 9. – P. 534–542.
126. Panzeter P.L., Althaus F.R. DNA strand break-mediated partitioning of poly(ADP-ribose) polymerase function // *Biochemistry.* – 1994. – V. 33. – No. 32. – P. 9600–9605.
127. Pion E., Ullmann G.M., Amé J.C., Gérard D., De Murcia G., Bombarda E. DNA-induced dimerization of poly(ADP-ribose) polymerase-1 triggers its activation // *Biochemistry.* – 2005. – V. 44. – No. 44. – P. 14670–14681.
128. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G.G. Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions // *Biochem J.* – 1999. – V. 342 – No.2. – P. 249–268.
129. Ogata N., Ueda K., Kawaichi M., Hayaishi O. Poly(ADP-ribose) synthetase, a main acceptor of poly(ADP-ribose) in isolated nuclei // *J. Biol. Chem.* – 1981. – V. 256. – No. 9. – P. 4135–4137.
130. Bredehorst R., Ferro A.M., Hilz H. Determination of ADP-ribose and poly(ADP-ribose) by a new radioimmunoassay // *Eur. J. Biochem.* – 1978. – V. 82. – No. 1. – P. 115–121.
131. Hilz H., Adamietz P., Bredehorst R., Wielckens K. ADP-ribosylation of nuclear proteins // *Adv. Enzyme. Regul.* – 1978. – V. 17. – P. 195–211.
132. Jankevicius G., Hassler M., Golia B., Rybin V., Zacharias M., Timinszky G., Ladurner A.G. A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-ribosylation // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2013. – V. 20. – No. 4. – P. 508–514.
133. Rosenthal F., Feijs K.L.H., Frugier E., Bonalli M., Forst A.H., Imhof R., Winkler H.C., Fischer D., Caflisch A., Hassa P.O., Lüscher B., Hottiger M.O. Macrodomain-containing proteins are new mono-ADP-ribosylhydrolases // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2013. – V. 20. – No. 4. – P. 502–507.
134. Altmeyer M., Messner S., Hassa P.O., Fey M., Hottiger M.O. Molecular mechanism of poly(ADP-ribosylation) by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites // *Nucleic. Acids. Res.* – 2009. – V. 37. – No. 11. – P. 3723–3738.
135. Messner S., Altmeyer M., Zhao H., Pozivil A., Roschitzki B., Gehrig P., Rutishauser D., Huang D., Caflisch A., Hottiger M.O. PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails // *Nucleic. Acids. Res.* – 2010. – V. 38. – No. 19. – P. 6350–6362.
136. Jacobson E.L., Cervantes-Laurean D., Jacobson M.K. ADP-ribose in glycation and glycoxidation reactions // *Adv. Exp. Med. Biol.* – 1997. – V. 419. – P. 371–379.
137. Leung A.K.L. PARPs // *Curr Biol.* – 2017. – V. 27. – No. 23. – P. 1256–1258.
138. Liu Q., Florea B.I., Filippov D. V. ADP-ribosylation goes normal: serine as the major site of the modification // *Cell. Chem. Biol.* – 2017. – V. 24. – No. 4. – P. 431–432.
139. Leslie Pedrioli D.M., Leutert M., Bilan V., Nowak K., Gunasekera K., Ferrari E., Imhof R., Malmström L., Hottiger M.O. Comprehensive ADP-ribosylome analysis identifies tyrosine as an ADP-ribose acceptor site // *EMBO Rep.* – 2018. – V. 19. – Article No. 45310.
140. Rosenthal F., Hottiger M.O. Identification of ADP-ribosylated peptides and ADP-ribose acceptor sites // *Frontiers in Bioscience* – 2014. – V. 19. – No. 7. – P. 1041–1056.

141. Larsen S.C., Leutert M., Bilan V., Martello R., Jungmichel S., Young C., Hottiger M.O., Nielsen M.L. Proteome-wide identification of in vivo ADP-ribose acceptor sites by liquid chromatography-tandem mass spectrometry // *Methods. Mol. Biol.* – 2017. – V. 1608. – P. 149–162.
142. Leutert M., Bilan V., Gehrig P., Hottiger M.O. Identification of ADP-ribose acceptor sites on in vitro modified proteins by liquid chromatography–tandem mass spectrometry // *Methods. Mol. Biol.* – 2017. – V. 1608. – P. 137–148.
143. Anagho H.A., Elsborg J.D., Hendriks I.A., Buch-Larsen S.C., Nielsen M.L. Characterizing ADP-ribosylation sites using afl521 enrichment coupled to etd-based mass spectrometry // *Methods. Mol. Biol.* – 2023. – V. 2609. – P. 251–270.
144. Bilan V., Selevsek N., Kistemaker H.A.V., Abplanalp J., Feurer R., Filippov D. V., Hottiger M.O. New quantitative mass spectrometry approaches reveal different ADP-ribosylation phases dependent on the levels of oxidative stress // *Mol. Cell Proteomics.* – 2017. – V. 16. – No. 5. – P. 949–958.
145. Abplanalp J., Leutert M., Frugier E., Nowak K., Feurer R., Kato J., Kistemaker H.V.A., Filippov D. V., Moss J., Caflisch A., Hottiger M.O. Proteomic analyses identify ARH3 as a serine mono-ADP-ribosylhydrolase // *Nat. Commun.* – 2017. – V. 8. – Article No. 2055.
146. Fontana P., Bonfiglio J.J., Palazzo L., Bartlett E., Matic I., Ahel I. Serine ADP-ribosylation reversal by the hydrolase ARH3 // *Elife* – 2017. – V. 6. – Article No. 28533.
147. Hendriks I.A., Buch-Larsen S.C., Prokhorova E., Elsborg J.D., Rebak A.K.L.F.S., Zhu K., Ahel D., Lukas C., Ahel I., Nielsen M.L. The regulatory landscape of the human HPF1- and ARH3-dependent ADP-ribosylome // *Nat. Commun.* – 2021. – V. 12. – Article No. 5893.
148. Prokhorova E., Agnew T., Wondisford A.R., Tellier M., Kaminski N., Beijer D., Holder J., Gros Lambert J., Suskiewicz M.J., Zhu K., Reber J.M., Krassnig S.C., Palazzo L., Murphy S., Nielsen M.L., Mangerich A., Ahel D., Baets J., O’Sullivan R.J., et al. Unrestrained poly-ADP-ribosylation provides insights into chromatin regulation and human disease // *Mol. Cell.* – 2021. – V. 81. – Article No. 2640-2655.
149. Daniels C.M., Ong S.E., Leung A.K.L. The Promise of Proteomics for the Study of ADP-Ribosylation // *Mol. Cell.* – 2015. – V. 58. – No. 6. – P. 911–924.
150. Hoch N.C., Polo L.M. ADP-ribosylation: from molecular mechanisms to human disease // *Genet. Mol. Biol.* – 2019. – V. 43. – Article No. 20190075.
151. Ménissier de Murcia J., Ricoul M., Tartier L., Niedergang C., Huber A., Dantzer F., Schreiber V., Amé J.C., Dierich A., LeMeur M., Sabatier L., Chambon P., De Murcia G. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse // *EMBO J.* – 2003. – V. 22. – No. 9. – P. 2255–2263.
152. Nicolás L., Martínez C., Baró C., Rodríguez M., Baroja-Mazo A., Sole F., Flores J.M., Ampurdanés C., Dantzer F., Martín-Caballero J., Aparicio P., Yelamos J. Loss of poly(ADP-ribose) polymerase-2 leads to rapid development of spontaneous T-cell lymphomas in p53-deficient mice // *Oncogene.* – 2010. – V. 29. – No. 19. – P. 2877–2883.
153. Farreés J., Martín-Caballero J., Martínez C., Lozano J.J., Llacuna L., Ampurdanés C., Ruiz-Herguido C., Dantzer F., Schreiber V., Villunger A., Bigas A., Yélamos J. Parp-2 is

required to maintain hematopoiesis following sublethal  $\gamma$ -irradiation in mice // *Blood*. – 2013. – V. 122. – No. 1. – P. 44–54.

154. Farrés J., Llacuna L., Martín-Caballero J., Martínez C., Lozano J.J., Ampurdanés C., López-Contreras A.J., Florensa L., Navarro J., Ottina E., Dantzer F., Schreiber V., Villunger A., Fernández-Capetillo O., Yélamos J. PARP-2 sustains erythropoiesis in mice by limiting replicative stress in erythroid progenitors // *Cell. Death. Differ.* – 2015. – V. 22. – No. 7. – P. 1144–1157.

155. Sun X., Fu K., Hodgson A., Wier E.M., Wen M.G., Kamenyeva O., Xia X., Koo L.Y., Wan F. Sam68 is required for DNA damage responses via regulating poly(ADP-ribosylation) // *PLoS Biol.* – 2016. – V. 14. – Article No. 1002543.

156. Alemasova E.E., Naumenko K.N., Kurgina T.A., Anarbaev R.O., Lavrik O.I. The multifunctional protein YB-1 potentiates PARP1 activity and decreases the efficiency of PARP1 inhibitors // *Oncotarget*. – 2018. – V. 9. – No. 34. – P.23349-23365.

157. Naumenko K.N., Sukhanova M. V., Hamon L., Kurgina T.A., Alemasova E.E., Kutuzov M.M., Pastré D., Lavrik O.I. Regulation of poly(ADP-Ribose) polymerase 1 activity by Y-box-binding protein 1 // *Biomolecules*. – 2020. – V. 10. – No. 9. – P. 1–26.

158. Sukhanova M. V., Singatulina A.S., Pastré D., Lavrik O.I. Fused in Sarcoma (FUS) in DNA Repair: Tango with Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 and compartmentalisation of damaged dnA // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – No. 19. – P. 1–18.

159. Jacobson M.K., Alvarez-Gonzalez R. Characterization of polymers of adenosine diphosphate ribose generated in vitro and in vivo // *Biochemistry*. – 1987. – V. 26. – No. 11. – P. 3218–3224.

160. Kiehlbauch C.C., Aboul-Ela N., Jacobson E.L., Ringer D.P., Jacobson M.K. High resolution fractionation and characterization of ADP-ribose polymers. // *Anal. Biochem.* – 1993. – V. 208. – No. 1. – P. 26–34.

161. Shieh W.M., Amé J.C., Wilson M. V., Wang Z.Q., Koh D.W., Jacobson M.K., Jacobson E.L. Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers // *J. Biol. Chem.* – 1998. – V. 273. – No. 46. – P. 30069–30072.

162. de Murcia G., Jongstra-Bilen J., Ittel M.E., Mandel P., Delain E. Poly(ADP-ribose) polymerase auto-modification and interaction with DNA: electron microscopic visualization // *EMBO J.* – 1983. – V. 2. – No. 4. – P. 543–548.

163. Hayashi K., Tanaka M., Shimada T., Miwa M., Sugimura T. Size and shape of poly(ADP-ribose): examination by gel filtration, gel electrophoresis and electron microscopy // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1983. – V. 112. – No. 1. – P. 102–107.

164. Chen Q., Kassab M.A., Dantzer F., Yu X. PARP2 mediates branched poly ADP-ribosylation in response to DNA damage // *Nat. Commun.* – 2018. – V. 9. – Article No. 3233.

165. Matkarimov B.T., Zharkov D.O., Sapparbaev M.K. Mechanistic insight into the role of Poly(ADP-ribosylation) in DNA topology modulation and response to DNA damage // *Mutagenesis*. – 2020. – V. 35. – No. 1. – P. 107–118.



166. Löffler T., Krüger A., Zirak P., Winterhalder M.J., Müller A.-L., Fischbach A., Mangerich A., Zumbusch A. Influence of chain length and branching on poly(ADP-ribose)-protein interactions. // *Nucleic Acids Res.* – 2023. – V. 51. – No. 2. – P. 536–552.
167. Longarini E.J., Dauben H., Locatelli C., Wondisford A.R., Smith R., Muench C., Kolvenbach A., Lynskey M.L., Pope A., Bonfiglio J.J., Jurado E.P., Fajka-Boja R., Colby T., Schuller M., Ahel I., Timinszky G., O’Sullivan R.J., Huet S., Matic I. Modular antibodies reveal DNA damage-induced mono-ADP-ribosylation as a second wave of PARP1 signaling // *Mol. Cell.* – 2023. – V. 83. – No. 10. – P. 1743-1760.
168. Smith R., Zentout S., Rother M., Bigot N., Chapuis C., Mihać A., Zobel F.F., Ahel I., van Attikum H., Timinszky G., Huet S. HPF1-dependent histone ADP-ribosylation triggers chromatin relaxation to promote the recruitment of repair factors at sites of DNA damage // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2023. – V. 30. – No. 5. – P. 678–691.
169. Barkauskaite E., Jankevicius G., Ladurner A.G., Ahel I., Timinszky G. The recognition and removal of cellular poly(ADP-ribose) signals // *FEBS Journal.* – 2013. – V. 280. – No. 15. – P. 3491–3507.
170. Teloni F., Altmeyer M. Readers of poly(ADP-ribose): designed to be fit for purpose // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44. – No. 3. – P. 993–1006.
171. Kamaletdinova T., Fanaei-Kahrani Z., Wang Z.Q. The enigmatic function of PARP1: from PARylation activity to PAR readers // *Cells.* – 2019. – V. 8. – Article No. 1625.
172. Maluchenko N. V., Koshkina D.O., Feofanov A. V., Studitsky V.M., Kirpichnikov M.P. Poly(ADP-Ribosyl) code functions // *Acta Naturae.* – 2021. – V. 13. – No. 2. – P. 58–69.
173. Li P., Lei Y., Qi J., Liu W., Yao K. Functional roles of ADP-ribosylation writers, readers and erasers // *Front. Cell. Dev. Biol.* – 2022. – V. 10. – Article No. 941356.
174. King B.S., Cooper K.L., Liu K.J., Hudson L.G. Poly(ADP-ribose) contributes to an association between Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and xeroderma pigmentosum complementation group A in nucleotide excision repair // *J.Biol. Chem.* – 2012. – V. 287. – No. 47. – P. 39824–39833.
175. Robu M., Shah R.G., Petitelerc N., Brind’amour J., Kandan-Kulangara F., Shah G.M. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the removal of UV-induced DNA lesions by nucleotide excision repair // *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* – 2013. – V. 110. – No. 5. – P. 1658–1663.
176. Robu M., Shah R.G., Purohit N.K., Zhou P., Naegeli H., Shah G.M. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 escorts XPC to UV-induced DNA lesions during nucleotide excision repair // *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* – 2017. – V. 114. – No. 33. – P. 6847–6856.
177. Ghodgaonkar M.M., Zagal N., Kassam S., Rainbow A.J., Shah G.M. Depletion of poly(ADP-ribose) polymerase-1 reduces host cell reactivation of a UV-damaged adenovirus-encoded reporter gene in human dermal fibroblasts // *DNA Repair (Amst).* – 2008. – V. 7. – No. 4. – P. 617–632.
178. Ray Chaudhuri A., Nussenzweig A. Thwarting endogenous stress: BRCA protects against aldehyde toxicity // *EMBO Mol. Med.* – 2017. – V. 9. – No. 10. – P. 1331–1333.

179. Pines A., Vrouwe M.G., Martejn J.A., Typas D., Luijsterburg M.S., Cansoy M., Hensbergen P., Deelder A., de Groot A., Matsumoto S., Sugawara K., Thoma N., Vermeulen W., Vrieling H., Mullenders L. PARP1 promotes nucleotide excision repair through DDB2 stabilization and recruitment of ALC1 // *J Cell Biol.* – 2012. – V. 199. – No. 2. – P. 235–249.
180. Sellou H., Lebeauvin T., Chapuis C., Smith R., Hegele A., Singh H.R., Kozlowski M., Bultmann S., Ladurner A.G., Timinszky G., Huet S. The poly(ADP-ribose)-dependent chromatin remodeler Alc1 induces local chromatin relaxation upon DNA damage // *Mol. Cell Biol.* – 2016. – V. 27. – No. 24. – P. 3791–3799.
181. Ahel D., Hořejší Z., Wiechens N., Polo S.E., Garcia-Wilson E., Ahel I., Flynn H., Skehel M., West S.C., Jackson S.P., Owen-Hughes T., Boulton S.J. Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1 // *Science.* – 2009. – V. 325. – No. 5945. – P. 1240–1243.
182. Iles N., Rulten S., El-Khamisy S.F., Caldecott K.W. APLF (C2orf13) is a novel human protein involved in the cellular response to chromosomal DNA strand breaks // *Mol. Cell Biol.* – 2007. – V. 27. – No. 10. – P. 3793–3803.
183. Smith R., Sellou H., Chapuis C., Huet S., Timinszky G. CHD3 and CHD4 recruitment and chromatin remodeling activity at DNA breaks is promoted by early poly(ADP-ribose)-dependent chromatin relaxation // *Nucleic Acids Res.* – 2018. – V. 46. – No. 12. – P. 6087–6098.
184. Krokan H.E., Bjørås M. Base excision repair. // *Cold. Spring. Harb. Perspect. Biol.* – 2013. – V. 5. – Article No. 012583.
185. Lee T.-H., Kang T.-H. DNA Oxidation and Excision Repair Pathways. // *Int. J. Mol. Sci.* – 2019. – V. 20. – No. 23.
186. Beard W.A., Horton J.K., Prasad R., Wilson S.H. Eukaryotic Base Excision Repair: New Approaches Shine Light on Mechanism. // *Annu. Rev. Biochem.* – 2019. – V. 88. – P. 137–162.
187. Dogliotti E., Fortini P., Pascucci B., Parlanti E. The mechanism of switching among multiple BER pathways. // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 2001. – V. 68. – P. 3–27.
188. Robertson A.B., Klungland A., Rognes T., Leiros I. DNA repair in mammalian cells: Base excision repair: the long and short of it. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2009. – V. 66. – No. 6. – P. 981–993.
189. Mullins E.A., Rodriguez A.A., Bradley N.P., Eichman B.F. Emerging roles of DNA glycosylases and the base excision repair pathway. // *Trends. Biochem. Sci.* – 2019. – V. 44. – No. 9. – P. 765–781.
190. Sobol R.W., Wilson S.H. Mammalian DNA beta-polymerase in base excision repair of alkylation damage. // *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* – 2001. – V. 68. – P. 57–74.
191. Jacobs A.C., Kreller C.R., Greenberg M.M. Long patch base excision repair compensates for DNA polymerase  $\beta$  inactivation by the C4'-oxidized abasic site. // *Biochemistry.* – 2011. – V. 50. – No. 1. – P. 136–143.
192. Dutta A., Yang C., Sengupta S., Mitra S., Hegde M.L. New paradigms in the repair of oxidative damage in human genome: mechanisms ensuring repair of mutagenic base lesions

during replication and involvement of accessory proteins. // *Cell. Mol. Life. Sci.* – 2015. – V. 72. – No. 9. – P. 1679–1698.

193. Demin A.A., Hirota K., Tsuda M., Adamowicz M., Hailstone R., Brazina J., Gittens W., Kalasova I., Shao Z., Zha S., Sasanuma H., Hanzlikova H., Takeda S., Caldecott K.W. XRCC1 prevents toxic PARP1 trapping during DNA base excision repair. // *Mol. Cell.* – 2021. – V. 81. – No. 14. – P. 3018-3030.

194. Horton J.K., Stefanick D.F., Gassman N.R., Williams J.G., Gabel S.A., Cuneo M.J., Prasad R., Kedar P.S., Derose E.F., Hou E.W., London R.E., Wilson S.H. Preventing oxidation of cellular XRCC1 affects PARP-mediated DNA damage responses. // *DNA Repair (Amst.)*. – 2013. – V. 12. – No. 9. – P. 774–785.

195. Campalans A., Kortulewski T., Amouroux R., Menoni H., Vermeulen W., Radicella J.P. Distinct spatiotemporal patterns and PARP dependence of XRCC1 recruitment to single-strand break and base excision repair. // *Nucleic. Acids. Res.* – 2013. – V. 41. – No. 5. – P. 3115–3129.

196. Gao Y., Li C., Wei L., Teng Y., Nakajima S., Chen X., Xu J., Leger B., Ma H., Spagnol S.T., Wan Y., Dahl K.N., Liu Y., Levine A.S., Lan L. SSRP1 cooperates with PARP and XRCC1 to facilitate single-strand DNA break repair by chromatin priming. // *Cancer Res.* – 2017. – V. 77. – No. 10. – P. 2674–2685.

197. Moor N.A., Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O., Antson A.A., Lavrik O.I. Quantitative characterization of protein-protein complexes involved in base excision DNA repair. // *Nucleic. Acids. Res.* – 2015. – V. 43. – No. 12. – P. 6009–6022.

198. Gagné J.-P., Isabelle M., Lo K.S., Bourassa S., Hendzel M.J., Dawson V.L., Dawson T.M., Poirier G.G. Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes. // *Nucleic. Acids. Res.* – 2008. – V. 36. – No. 22. – P. 6959–6976.

199. Masson M., Niedergang C., Schreiber V., Muller S., Menissier-de Murcia J., de Murcia G. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage. // *Mol. Cell Biol.* – 1998. – V. 18. – No. 6. – P. 3563–3571.

200. Leppard J.B., Dong Z., Mackey Z.B., Tomkinson A.E. Physical and functional interaction between DNA ligase III $\alpha$  and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair. // *Mol. Cell Biol.* – 2003. – V. 23. – No. 16. – P. 5919–5927.

201. Sukhanova M. V., Khodyreva S.N., Lebedeva N.A., Prasad R., Wilson S.H., Lavrik O.I. Human base excision repair enzymes apurinic/apyrimidinic endonuclease1 (APE1), DNA polymerase  $\beta$  and poly(ADP-ribose) polymerase 1: Interplay between strand-displacement DNA synthesis and proofreading exonuclease activity // *Nucleic. Acids. Res.* – 2005. – V. 33. – No. 4. – P. 1222–1229.

202. Schreiber V., Amé J.-C., Dollé P., Schultz I., Rinaldi B., Fraulob V., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – V. 277. – No. 25. – P. 23028–23036.

203. Chen I. PAR and the organization of the DNA damage response // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2015. – V. 22. – No. 9. – P. 655.

204. Kai M. Roles of RNA-binding proteins in DNA damage response // *Int. J. Mol. Sci.* – 2016. – V. 17. – Article No. 310.
205. Boeynaems S., Tompa P., Van Dan Bosch L. Phasing in on the cell cycle // *Cell. Div.* – 2018. – V. 13. – Article No. 120.
206. Boeynaems S., Alberti S., Fawzi N.L., Mittag T., Polymenidou M., Rousseau F., Schymkowitz J., Shorter J., Wolozin B., Van Den Bosch L., Tompa P., Fuxreiter M. Protein phase separation: a new phase in cell biology // *Trends. Cell Biol.* – 2018. – V. 28. – No. 6. – P. 420–435.
207. Altmeyer M., Neelsen K.J., Teloni F., Pozdnyakova I., Pellegrino S., Grøfte M., Rask M.B.D., Streicher W., Jungmichel S., Nielsen M.L., Lukas J. Liquid demixing of intrinsically disordered proteins is seeded by poly(ADP-ribose) // *Nat. Commun.* – 2015. – V. 6. – Article No. 8088.
208. Rulten S.L., Rotheray A., Green R.L., Grundy G.J., Moore D.A.Q., Gomez-Herreros F., Hafezparast M., Caldecott K.W. PARP-1 dependent recruitment of the amyotrophic lateral sclerosis-associated protein FUS/TLS to sites of oxidative DNA damage // *Nucleic. Acids. Res.* – 2014. – V. 42. – No. 1. – P. 307–314.
209. Singatulina A.S., Sukhanova M. V., Desforges B., Joshi V., Pastré D., Lavrik O.I. PARP1 activation controls stress granule assembly after oxidative stress and dna damage // *Cells.* – 2022. – V. 11. – Article No. 3932.
210. Sukhanova M. V., Anarbaev, R. O., Maltseva, E. A., Pastré D., Lavrik O.I. FUS microphase separation: regulation by nucleic acid polymers and DNA repair proteins // *Int. J. Mol.* – 2022. – V. 23. – Article No. 13200.
211. Singatulina A.S., Hamon L., Sukhanova M. V., Desforges B., Joshi V., Bouhss A., Lavrik O.I., Pastré D. PARP-1 activation directs FUS to DNA damage sites to form PARG-reversible compartments enriched in damaged DNA // *Cell. Rep.* – 2019. – V. 27. – No. 6. – P. 1809-1821.
212. Bertrand E., Demongin C., Dobra I., Rengifo-Gonzalez J.C., Singatulina A.S., Sukhanova M. V, Lavrik O.I., Pastré D., Hamon L. FUS fibrillation occurs through a nucleation-based process below the critical concentration required for liquid-liquid phase separation. // *Sci. Rep.* – 2023. – V. 13. – No. 1. – P. 7772.
213. Dormann D., Haass C. Fused in sarcoma (FUS): an oncogene goes awry in neurodegeneration // *Mol. Cell. Neurosci.* – 2013. – V. 56. – P. 475–486.
214. Kuroda M., Sok J., Webb L., Baechtold H., Urano F., Yin Y., Chung P., De Rooij D.G., Akhmedov A., Ashley T., Ron D. Male sterility and enhanced radiation sensitivity in TLS(−) mice // *EMBO J.* – 2000. – V. 19. – No. 3. – P. 453–462.
215. Hicks G.G., Singh N., Nashabi A., Mai S., Bozek G., Klewes L., Arapovic D., White E.K., Koury M.J., Oltz E.M., Van Kaer L., Ruley H.E. Fus deficiency in mice results in defective B-lymphocyte development and activation, high levels of chromosomal instability and perinatal death // *Nat. Genet.* – 2000. – V. 24. – No. 2. – P. 175–179.
216. Mastrocola A.S., Kim S.H., Trinh A.T., Rodenkirch L.A., Tibbetts R.S. The RNA-binding protein fused in sarcoma (FUS) functions downstream of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in response to DNA damage // *J. Biol. Chem.* – 2013. – V. 288. – No. 34. – P. 24731–24741.

217. Sun Z., Diaz Z., Fang X., Hart M.P., Chesi A., Shorter J., Gitler A.D. Molecular determinants and genetic modifiers of aggregation and toxicity for the ALS disease protein FUS/TLS // *PLoS Biol.* – 2011. – V. 9. – Article No. 1000614.
218. Murakami T., Qamar S., Lin J.Q., Schierle G.S.K., Rees E., Miyashita A., Costa A.R., Dodd R.B., Chan F.T.S., Michel C.H., Kronenberg-Versteeg D., Li Y., Yang S.P., Wakutani Y., Meadows W., Ferry R.R., Dong L., Tartaglia G.G., Favrin G., et al. ALS/FTD mutation-induced phase transition of FUS liquid droplets and reversible hydrogels into irreversible hydrogels impairs RNP granule function // *Neuron.* – 2015. – V. 88. – No. 4. – P. 678–690.
219. Patel A., Lee H.O., Jawerth L., Maharana S., Janel M., Hein M.Y., Stoyanov S., Mahamid J., Saha S., Franzmann T.M., Pozniakovski A., Poser I., Maghelli N., Royer L.A., Weigert M., Myers E.W., Grill S., Drechsel D., Hyman A.A., et al. A Liquid-to-solid phase transition of the ALS protein FUS accelerated by disease mutation // *Cell.* – 2015. – V. 162. – No. 5. – P. 1066–1077.
220. Rancourt A., Satoh M.S. Delocalization of nucleolar poly(ADP-ribose) polymerase-1 to the nucleoplasm and its novel link to cellular sensitivity to DNA damage // *DNA Repair (Amst).* – 2009. – V. 8. – No. 3. – P. 286–297.
221. Boamah E.K., Kotova E., Garabedian M., Jarnik M., Tulin A. V. Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 (PARP-1) regulates ribosomal biogenesis in *Drosophila* nucleoli // *PLoS Genet.* – 2012. – V. 8. – Article No. 1002442.
222. Páhi Z.G., Borsos B.N., Pantazi V., Ujfaludi Z., Pankotai T. PARylation during transcription: insights into the fine-tuning mechanism and regulation // *Cancers.* – 2020. – V. 12. – Article No. 183.
223. O’Sullivan J., Tedim Ferreira M., Gagné J.P., Sharma A.K., Hendzel M.J., Masson J.Y., Poirier G.G. Emerging roles of eraser enzymes in the dynamic control of protein ADP-ribosylation // *Nat. Commun.* – 2019. – V. 10. – Article No. 1182.
224. Davies G., Henrissat B. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases // *Structure.* – 1995. – V. 3. – No. 9. – P. 853–859.
225. Hanai S., Kanai M., Ohashi S., Okamoto K., Yamada M., Takahashi H., Miwa M. Loss of poly(ADP-ribose) glycohydrolase causes progressive neurodegeneration in *Drosophila melanogaster* // *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* – 2004. – V. 101. – No. 1. – P. 82–86.
226. Koh D.W., Lawler A.M., Poitras M.F., Sasaki M., Wattler S., Nehls M.C., Stöger T., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.M. Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality // *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* – 2004. – V. 101. – No. 51. – P. 17699–17704.
227. Gao H., Coyle D.L., Meyer-Ficca M.L., Meyer R.G., Jacobson E.L., Wang Z.Q., Jacobson M.K. Altered poly(ADP-ribose) metabolism impairs cellular responses to genotoxic stress in a hypomorphic mutant of poly(ADP-ribose) glycohydrolase // *Exp. Cell Res.* – 2007. – V. 313. – No. 5. – P. 984–996.
228. Zhou Y., Liu L., Tao S., Yao Y., Wang Y., Wei Q., Shao A., Deng Y. Parthanatos and its associated components: Promising therapeutic targets for cancer // *Pharmacol. Res.* – 2021. – V. 163. – Article No. 105299.

229. Wang Y., Dawson V.L., Dawson T.M. Poly(ADP-ribose) signals to mitochondrial AIF: a key event in parthanatos // *Exp. Neurol.* – 2009. – V. 218. – No. 2. – P. 193–202.
230. Wang Y., Kim N.S., Haince J.F., Kang H.C., David K.K., Andrabi S.A., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.M. Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos) // *Sci. Signal.* – 2011. – V. 4. – Article No. 167.
231. Blenn C., Althaus F.R., Malanga M. Poly(ADP-ribose) glycohydrolase silencing protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death // *Biochem. J.* – 2006. – V. 396. – No. 3. – P. 419–429.
232. Uchida K., Suzukis H., Marutan H., Abell H., Aokiii K., Miwa M., Tanumanii S.-I. Preferential degradation of protein-bound (ADP-ribose), by nuclear poly(ADP-ribose) glycohydrolase from human placenta // *J. Biol. Chem.* – 1993. – V. 268. – No. 5. – P. 3194–3200.
233. Crawford K., Bonfiglio J.J., Mikoč A., Matic I., Ahel I. Specificity of reversible ADP-ribosylation and regulation of cellular processes // *Crit. Rev. Biochem. Mol Biol.* – 2018. – V. 53. – No. 1. – P. 64–82.
234. Slade D., Dunstan M.S., Barkauskaite E., Weston R., Lafite P., Dixon N., Ahel M., Leys D., Ahel I. The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase // *Nature.* – 2011. – V. 477. – No. 7366. – P. 616–622.
235. Hassler M., Jankevicius G., Ladurner A.G. PARG: a macrodomain in disguise // *Structure.* – 2011. – V. 19. – No. 10. – P. 1351–1353.
236. Oka S., Kato J., Moss J. Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase // *J. Biol. Chem.* – 2006. – V. 281. – No. 2. – P. 705–713.
237. Mashimo M., Kato J., Moss J. Structure and function of the ARH family of ADP-ribosyl-acceptor hydrolases // *DNA Repair (Amst).* – 2014. – V. 23. – P. 88–94.
238. Sharifi R., Morra R., Denise Appel C., Tallis M., Chioza B., Jankevicius G., Simpson M.A., Matic I., Ozkan E., Golia B., Schellenberg M.J., Weston R., Williams J.G., Rossi M.N., Galehdari H., Krahn J., Wan A., Trembath R.C., Crosby A.H., et al. Deficiency of terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease // *EMBO J.* – 2013. – V. 32. – No. 9. – P. 1225–1237.
239. Laing S., Unger M., Koch-Nolte F., Haag F. ADP-ribosylation of arginine // *Amino Acids.* – 2011. – V. 41. – No. 2. – P. 257–269.
240. Kato J., Zhu J., Liu C., Stylianou M., Hoffmann V., Lizak M.J., Glasgow C.G., Moss J. ADP-ribosylarginine hydrolase regulates cell proliferation and tumorigenesis // *Cancer Res.* – 2011. – V. 71. – No. 15. – P. 5327–5335.
241. Sakthianandeswaren A., Parsons M.J., Mouradov D., Mackinnon R.N., Catimel B., Liu S., Palmieri M., Love C., Jorissen R.N., Li S., Whitehead L., Putoczki T.L., Preaudet A., Tsui C., Nowell C.J., Ward R.L., Hawkins N.J., Desai J., Gibbs P., et al. MACROD2 haploinsufficiency impairs catalytic activity of PARP1 and promotes chromosome instability and growth of intestinal tumors // *Cancer Discov.* – 2018. – V. 8. – No. 8. – P. 988–1005.
242. Sakthianandeswaren A., Parsons M.J., Mouradov D., Sieber O.M. MACROD2 deletions cause impaired PARP1 activity and chromosome instability in colorectal cancer // *Oncotarget.* – 2018. – V. 9. – No. 69. – P. 33056–33058.

243. Zhang Y., Wang J., Ding M., Yu Y. Site-specific characterization of the Asp- and Glu-ADP-ribosylated proteome // *Nat. Methods*. – 2013. – V. 10. – No. 10. – P. 981–984.
244. Palazzo L., Thomas B., Jemth A.S., Colby T., Leidecker O., Feijs K.L.H., Zaja R., Loseva O., Vert J.C., Matic I., Helleday T., Ahel I. Processing of protein ADP-ribosylation by Nudix hydrolases // *Biochem J*. – 2015. – V. 468. – No. 2. – P. 293–301.
245. Куликова, В. А., Никифоров А.А. Роль гидролаз семейства NUDIX в метаболизме NAD и ADP-рибозы у млекопитающих // *Биохимия*. – 2020. – Т. 85. – No. 8. – С. 883–894.
246. Fouquerel E., Goellner E.M., Yu Z., Gagné J.P., de Moura M.B., Feinstein T., Wheeler D., Redpath P., Li J., Romero G., Migaud M., Van Houten B., Poirier G.G., Sobol R.W. ARTD1/PARP1 negatively regulates glycolysis by inhibiting hexokinase 1 independent of NAD<sup>+</sup> depletion // *Cell Rep*. – 2014. – V. 8. – No. 6. – P. 1819–1831.
247. Hyo C. H., Snyder S.H. Poly(ADP-ribose) polymerase is a mediator of necrotic cell death by ATP depletion // *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*. – 1999. – V. 96. – No. 24. – P. 13978–13982.
248. Bessman M.J., Frick D.N., O’Handley S.F. The MutT proteins or “Nudix” hydrolases, a family of versatile, widely distributed, “housecleaning” enzymes // *J. Biol. Chem.* – 1996. – V. 271. – No. 41. – P. 25059–25062.
249. Formentini L., Macchiarulo A., Cipriani G., Camaioni E., Rapizzi E., Pellicciari R., Moroni F., Chiarugi A. Poly(ADP-ribose) catabolism triggers AMP-dependent mitochondrial energy failure // *J. Biol. Chem.* – 2009. – V. 284. – No. 26. – P. 17668–17676.
250. Wright R.H.G., Lioutas A., Dily F. Le, Soronellas D., Pohl A., Bonet J., Nacht A.S., Samino S., Font-Mateu J., Vicent G.P., Wierer M., Trabado M.A., Schelhorn C., Carolis C., Macias M.J., Yanes O., Oliva B., Beato M. ADP-ribose-derived nuclear ATP synthesis by NUDIX5 is required for chromatin remodeling // *Science*. – 2016. – V. 352. – No. 6290. – P. 1221–1225.
251. Martello R., Leutert M., Jungmichel S., Bilan V., Larsen S.C., Young C., Hottiger M.O., Nielsen M.L. Proteome-wide identification of the endogenous ADP-ribosylome of mammalian cells and tissue // *Nat. Commun.* – 2016. – V. 7. – Article No. 12917.
252. Li P., Zhen Y., Yu Y. Site-specific analysis of the Asp- and Glu-ADP-ribosylated proteome by quantitative mass spectrometry // *Methods Enzymol*. – 2019. – V. 626. – P. 301–321.
253. Ruf A., Rolli V., De Murcia G., Schulz G.E. The mechanism of the elongation and branching reaction of Poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis // *J. Mol. Biol.* – 1998. – V. 278. – No. 1. – P. 57–65.
254. Marsischky G.T., Wilson B.A., Collier R.J. Role of glutamic acid 988 of human poly-ADP-ribose polymerase in polymer formation: Evidence for active site similarities to the ADP-ribosylating toxins // *J. Biol. Chem.* – 1995. – V. 270. – No. 7. – P. 3247–3254.
255. Dodson G., Wlodawer A. Catalytic triads and their relatives // *Trends Biochem. Sci.* – 1998. – V. 23. – No. 9. – P. 347–352.
256. Desmarais Y., Ménard L., Lagueux J., Poirier G.G. Enzymological properties of poly(ADP-ribose)polymerase: characterization of automodification sites and NADase activity // *Biochim. Biophys. Acta*. – 1991. – V. 1078. – No. 2. – P. 179–186.

257. Huang H., Lin S., Garcia B.A., Zhao Y. quantitative proteomic analysis of histone modifications // *Chem. Rev.* – 2015. – V. 115. – Article No. 2376.
258. Seibert M., Krüger M., Watson N.A., Sen O., Daum J.R., Slotman J.A., Braun T., Houtsmuller A.B., Gorbsky G.J., Jacob R., Kracht M., Higgins J.M.G., Schmitz M.L. CDK1-mediated phosphorylation at H2B serine 6 is required for mitotic chromosome segregation // *J. Cell Biol.* – 2019. – V. 218. – Article No. 1164.
259. Hendzel M.J., Wei Y., Mancini M.A., Van Hooser A., Ranalli T., Brinkley B.R., Bazett-Jones D.P., Allis C.D. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation // *Chromosoma.* – 1997. – V. 106. – No. 6. – P. 348–360.
260. Hananya N., Daley S.K., Bagert J.D., Muir T.W. Synthesis of ADP-ribosylated histones reveals site-specific impacts on chromatin structure and function // *J. Am. Chem. Soc.* – 2021. – V. 143. – No. 29. – P. 10847–10852.
261. Sawicka A., Hartl D., Goiser M., Pusch O., Stocsits R.R., Tamir I.M., Mechtler K., Seiser C. H3S28 phosphorylation is a hallmark of the transcriptional response to cellular stress // *Genome Res.* – 2014. – V. 24. – Article No. 1808.
262. Cheung P., Tanner K.G., Cheung W.L., Sassone-Corsi P., Denu J.M., Allis C.D. Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation // *Mol. Cell.* – 2000. – V. 5. – No. 6. – P. 905–915.
263. Clayton A.L., Mahadevan L.C. MAP kinase-mediated phosphoacetylation of histone H3 and inducible gene regulation // *FEBS Lett.* – 2003. – V. 546. – No. 1. – P. 51–58.
264. Simboeck E., Sawicka A., Zupkovitz G., Senese S., Winter S., Dequiedt F., Ogris E., Di Croce L., Chiocca S., Seiser C. A phosphorylation switch regulates the transcriptional activation of cell cycle regulator p21 by histone deacetylase inhibitors // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – No. 52. – P. 41062–41073.
265. Liszczak G., Diehl K.L., Dann G.P., Muir T.W. Acetylation blocks DNA damage-induced chromatin ADP-ribosylation // *Nat. Chem. Biol.* – 2018. – V. 14. – No. 9. – P. 837–840.
266. Miller K.M., Tjeertes J. V., Coates J., Legube G., Polo S.E., Britton S., Jackson S.P. Human HDAC1 and HDAC2 function in the DNA-damage response to promote DNA nonhomologous end-joining // *Nat. Struct. Mol. Biol.* – 2010. – V. 17. – No. 9. – P. 1144–1151.
267. Mao Z., Hine C., Tian X., Van Meter M., Au M., Vaidya A., Seluanov A., Gorbunova V. SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1 // *Science.* – 2011. – V. 332. – No. 6036. – P. 1443–1446.
268. Michishita E., McCord R.A., Berber E., Kioi M., Padilla-Nash H., Damian M., Cheung P., Kusumoto R., Kawahara T.L.A., Barrett J.C., Chang H.Y., Bohr V.A., Ried T., Gozani O., Chua K.F. SIRT6 is a histone H3 lysine 9 deacetylase that modulates telomeric chromatin // *Nature.* – 2008. – V. 452. – Article No. 7186.
269. Tjeertes J. V., Miller K.M., Jackson S.P. Screen for DNA-damage-responsive histone modifications identifies H3K9Ac and H3K56Ac in human cells // *EMBO J.* – 2009. – V. 28. – No. 13. – P. 1878–1889.



270. Durkacz B.W., Irwin J., Shall S. Inhibition of (ADP-ribose) biosynthesis retards DNA repair but does not inhibit DNA repair synthesis // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 1981. – V. 101. – No. 4. – P. 1433–1441.
271. Audeh M.W. Novel treatment strategies in triple-negative breast cancer: specific role of poly(adenosine diphosphate-ribose) polymerase inhibition. // *Pharmgenomics Pers. Med.* – 2014. – V. 7. – P. 307–316.
272. Preiss J., Schlaeger R., Hiltz H. Specific inhibition of poly adribose polymerase by thymidine and nicotinamide in HeLa cells. // *FEBS Lett.* – 1971. – V. 19. – No. 3. – P. 244–246.
273. Purnell M.R., Whish W.J. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) synthetase // *Biochem J.* – 1980. – V. 185. – No. 3. – P. 775–777.
274. Canan Koch S.S., Thoresen L.H., Tikhe J.G., Maegley K.A., Almassy R.J., Li J., Yu X.H., Zook S.E., Kumpf R.A., Zhang C., Boritzki T.J., Mansour R.N., Zhang K.E., Ekker A., Calabrese C.R., Curtin N.J., Kyle S., Thomas H.D., Wang L.Z., et al. Novel tricyclic poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors with potent anticancer chemopotentiating activity: design, synthesis, and X-ray cocrystal structure // *J. Med. Chem.* – 2002. – V. 45. – No. 23. – P. 4961–4974.
275. Skalitzky D.J., Marakovits J.T., Maegley K.A., Ekker A., Yu X.H., Hostomsky Z., Webber S.E., Eastman B.W., Almassy R., Li J., Curtin N.J., Newell D.R., Calvert A.H., Griffin R.J., Golding B.T. Tricyclic benzimidazoles as potent poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibitors // *J. Med. Chem.* – 2003. – V. 46. – No. 2. – P. 210–213.
276. Murai J., Huang S.Y.N., Das B.B., Renaud A., Zhang Y., Doroshow J.H., Ji J., Takeda S., Pommier Y. Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors // *Cancer. Res.* – 2012. – V. 72. – No. 21. – P. 5588–5599.
277. Antolin A.A., Ameratunga M., Banerji U., Clarke P.A., Workman P., Al-Lazikani B. The kinase polypharmacology landscape of clinical PARP inhibitors // *Sci. Rep.* – 2020. – V. 10. – Article No. 2585.
278. Rose M., Burgess J.T., O’Byrne K., Richard D.J., Bolderson E. PARP inhibitors: clinical relevance, mechanisms of action and tumor resistance // *Front. Cell. Dev. Biol.* – 2020. – V. 8. – Article No. 564601.
279. Irshad S., Ashworth A., Tutt A. Therapeutic potential of PARP inhibitors for metastatic breast cancer // *Expert. Rev. Anticancer. Ther.* – 2011. – V. 11. – No. 8. – P. 1243–1251.
280. Farmer H., McCabe H., Lord C.J., Tutt A.H.J., Johnson D.A., Richardson T.B., Santarosa M., Dillon K.J., Hickson I., Knights C., Martin N.M.B., Jackson S.P., Smith G.C.M., Ashworth A. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy // *Nature.* – 2005. – V. 434. – No. 7035. – P. 917–921.
281. Bryant H.E., Schultz N., Thomas H.D., Parker K.M., Flower D., Lopez E., Kyle S., Meuth M., Curtin N.J., Helleday T. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase // *Nature.* – 2005. – V. 434. – No. 7035. – P. 913–917.
282. Iqbal J., Ragone A., Lubinski J., Lynch H.T., Moller P., Ghadirian P., Foulkes W.D., Armel S., Eisen A., Neuhausen S.L., Senter L., Singer C.F., Ainsworth P., Kim-Sing C., Tung N., Friedman E., Llacuachaqui M., Ping S., Narod S.A. The incidence of pancreatic cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers // *Br. J. Cancer.* – 2012. – V. 107. – No. 12. – P. 2005–2009.

283. Oh M., Alkushaym N., Fallatah S., Althagafi A., Aljaded R., Alsowaida Y., Jeter J., Martin J.R., Babiker H.M., McBride A., Abraham I. The association of BRCA1 and BRCA2 mutations with prostate cancer risk, frequency, and mortality: a meta-analysis // *Prostate*. – 2019. – V. 79. – No. 8. – P. 880–895.
284. Sahin I.D., Jönsson J.M., Hedenfalk I. Crizotinib and PARP inhibitors act synergistically by triggering apoptosis in high-grade serous ovarian cancer // *Oncotarget*. – 2019. – V. 10. – No. 65. – P. 6981–6996.
285. Majuelos-Melguizo J., Rodríguez M.I., López-Jiménez L., Rodríguez-Vargas J.M., Martín-Consuegra J.M.M., Serrano-Sáenz S., Gavard J., de Almodóvar J.M.R., Oliver F.J. PARP targeting counteracts gliomagenesis through induction of mitotic catastrophe and aggravation of deficiency in homologous recombination in PTEN-mutant glioma // *Oncotarget*. – 2015. – V. 6. – No. 7. – P. 4790–4803.
286. Schoonen P.M., van Vugt M.A.T.M. Never tear us a-PARP: dealing with DNA lesions during mitosis // *Mol. Cell. Oncol.* – 2017. – V. 5. – Article No. 1382670.
287. Dockery L.E., Gunderson C.C., Moore K.N. Rucaparib: the past, present, and future of a newly approved PARP inhibitor for ovarian cancer // *Onco. Targets. Ther.* – 2017. – V. 10. – P. 3029–3037.
288. Pommier Y., O'Connor M.J., De Bono J. Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action // *Sci. Transl. Med.* – 2016. – V. 8. – Article No. 362.
289. Hopkins T.A., Shi Y., Rodriguez L.E., Solomon L.R., Donawho C.K., Di Giammarino E.L., Panchal S.C., Wilsbacher J.L., Gao W., Olson A.M., Stolarik D.F., Osterling D.J., Johnson E.F., Maag D. Mechanistic dissection of PARP1 trapping and the impact on in vivo tolerability and efficacy of PARP inhibitors // *Mol. Cancer Res.* – 2015. – V. 13. – No. 11. – P. 1465–1477.
290. Pettitt S.J., Rehman F.L., Bajrami I., Brough R., Wallberg F., Kozarewa I., Fenwick K., Assiotis I., Chen L., Campbell J., Lord C.J., Ashworth A. A genetic screen using the PiggyBac transposon in haploid cells identifies Parp1 as a mediator of olaparib toxicity // *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – Article No. 61520.
291. Murai J., Huang S.Y.N., Renaud A., Zhang Y., Ji J., Takeda S., Morris J., Teicher B., Doroshow J.H., Pommier Y. Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib // *Mol. Cancer. Ther.* – 2014. – V. 13. – No. 2. – P. 433–443.
292. Kunze F.A., Hottiger M.O. Regulating immunity via ADP-Ribosylation: therapeutic implications and beyond // *Trends. Immunol.* – 2019. – V. 40. – No. 2. – P. 159–173.
293. Martínez-Morcillo F.J., Cantón-Sandoval J., Martínez-Menchón T., Corbalán-Vélez R., Mesa-del-Castillo P., Pérez-Oliva A.B., García-Moreno D., Mulero V. Non-canonical roles of NAMPT and PARP in inflammation // *Dev. Comp. Immunol.* – 2021. – V. 115. – Article No. 103881.
294. Gonzalez-Rey E., Martínez-Romero R., O'Valle F., Aguilar-Quesada R., Conde C., Delgado M., Oliver F.J. Therapeutic effect of a Poly(ADP-Ribose) polymerase-1 inhibitor on experimental arthritis by downregulating inflammation and Th1 response // *PLoS One*. – 2007. – V. 2. – No. 10. – Article No. 1071.

295. Liaudet L., Szabó É., Timashpolsky L., Virág L., Cziráki A., Szabó C. Suppression of poly (ADP-ribose) polymerase activation by 3-aminobenzamide in a rat model of myocardial infarction: long-term morphological and functional consequences // *Br. J. Pharmacol.* – 2001. – V. 133. – No. 8. – P. 1424–1430.
296. Morrow D.A., Brickman C.M., Murphy S.A., Baran K., Krakover R., Dauerman H., Kumar S., Slomowitz N., Grip L., McCabe C.H., Salzman A.L. A randomized, placebo-controlled trial to evaluate the tolerability, safety, pharmacokinetics, and pharmacodynamics of a potent inhibitor of poly(ADP-ribose) polymerase (INO-1001) in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention: Results of the TIMI 37 trial // *J. Thromb.* – 2009. – V. 27. – No. 4. – P. 359–364.
297. Zingarelli B., O'Connor M., Hake P.W. Inhibitors of poly (ADP-ribose) polymerase modulate signal transduction pathways in colitis // *Eur. J. Pharmacol.* – 2003. – V. 469. – No. 1–3. – P. 183–194.
298. Zheng M., Schultz M.B., Sinclair D.A. NAD<sup>+</sup> in COVID-19 and viral infections // *Trends. Immunol.* – 2022. – V. 43. – No. 4. – P. 283–295.
299. Lord C.J., Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic // *Science.* – 2017. – V. 355. – No. 6330. – P. 1152–1158.
300. Rudolph J., Jung K., Luger K. Inhibitors of PARP: Number crunching and structure gazing // *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* – 2022. – V. 119. – No. 11. – Article No. 2121979119.
301. Kotova E.Y., Hsieh F.K., Chang H.W., Maluchenko N. V., Langelier M.F., Pascal J.M., Luse D.S., Feofanov A. V., Studitsky V.M. Human PARP1 Facilitates transcription through a nucleosome and histone displacement by Pol II in vitro // *Int. J. Mol. Sci.* – 2022. – V. 23. – No. 13.
302. Kurgina T.A., Moor N.A., Kutuzov M.M., Naumenko K.N., Ukraintsev A.A., Lavrik O.I. Dual function of HPF1 in the modulation of PARP1 and PARP2 activities // *Commun. Biol.* – 2021. – V. 4. – Article No. 1259.
303. Kurgina T.A., Moor N.A., Kutuzov M.M., Lavrik O.I. The HPF1-dependent histone PARylation catalyzed by PARP2 is specifically stimulated by an incised AP site-containing BER DNA intermediate // *DNA Repair (Amst).* – 2022. – V. 120. – Article No. 103423
304. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – V. 227. – No. 5259. – P. 680–685.
305. Kutuzov M.M., Kurgina T.A., Belousova E.A., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Optimization of nucleosome assembling from histones and model DNAs and estimation of the reconstitution efficiency. // *Biopolymers and Cell.* – 2019. – V. 35. – No. 2. – P. 91–98.
306. Tullius T.D., Dombroski B.A. Hydroxyl radical “footprinting”: high-resolution information about DNA-protein contacts and application to lambda repressor and Cro protein // *Proc. Natl. Acad. Sci U S A.* – 1986. – V. 83. – No. 15. – P. 5469–5473.
307. Lundblad J.R., Laurance M., Goodman R.H. Fluorescence polarization analysis of protein-DNA and protein-protein interactions // *Mol. Endocrinol.* – 1996. – V.10. – P. 607–612.

308. Kurgina T.A., Anarbaev R.O., Sukhanova M.V., Lavrik O.I. A rapid fluorescent method for the real-time measurement of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity // *Anal. Biochem.* – 2018. – V. 545. – P. 91–97.
309. Weber G., Rotational Brownian motion and polarization of the fluorescence of solutions // *Adv. Protein Chem.* – 1953. – V.8. – P. 415–459.
310. Sherstyuk Y.V., Ivanisenko N.V., Zakharenko A.L., Sukhanova M.V., Peshkov R.Y., Eltsov I.V., Kutuzov M.M., Kurgina T.A., Belousova E.A., Ivanisenko V.A., Lavrik O.I., Silnikov V.N., Abramova T.V. Design, synthesis and molecular modeling study of conjugates of ADP and morpholino nucleosides as a novel class of inhibitors of PARP-1, PARP-2 and PARP-3 // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – No. 1. – P.214-225.
311. Nilov D., Maluchenko N., Kurgina T., Pushkarev S., Lys A., Kutuzov M., Gerasimova N., Feofanov A., Švedas V., Lavrik O., Studitsky V.M. Molecular mechanisms of PARP-1 inhibitor 7-methylguanine // *Int. J. Mol. Sci.* – 2020. – V. 21. – No. 6. – Article No. 2159.
312. Кургина Т. А., Шрам С. И., Кутузов М. М., Абрамова Т.В., Щербакова Т.А., Мальцева Е.А. Поройков В.В., Лаврик О.И., Шведас В.К., Нилов Д.К. Ингибиторное действие 7-метилгуанина и его метаболита 8-гидрокси-7-метилгуанина на поли(ADP-рибозо)полимеразу 1 человека // *Биохимия.* – 2022. – Т. 87. – No. 8. – С. 823–831.
313. Naumenko K.N., Sukhanova M. V., Hamon L., Kurgina T.A., Anarbaev R.O., Mangerich A., Pastré D., Lavrik O.I. The C-terminal domain of Y-box binding protein 1 exhibits structure-specific binding to poly(ADP-Ribose), which regulates PARP1 activity // *Front. Cell. Dev. Biol.* – 2022. – V. 10. – Article No. 831741.
314. Ohmoto A., Yachida S. Current status of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors and future directions // *Oncotargets Ther.* – 2017. – V. 10. – P. 5195–5208.
315. Jain P.G., Patel B.D. Medicinal chemistry approaches of poly ADP-Ribose polymerase 1 (PARP1) inhibitors as anticancer agents - A recent update // *Eur. J. Med. Chem.* – 2019. – V. 165. – P. 198–215.
316. Nilov D.K., Tararov V.I., Kulikov A. V., Zakharenko A.L., Gushchina I. V., Mikhailov S.N., Lavrik O.I., Švedas V.K. Inhibition of poly(ADP-Ribose) polymerase by nucleic acid metabolite 7-methylguanine // *Acta Naturae.* – 2016. – V. 8. – No. 2. – P. 108–115.
317. Koch-Nolte F., Fischer S., Haag F., Ziegler M. Compartmentation of NAD<sup>+</sup>-dependent signalling // *FEBS Lett.* – 2011. – V. 585. – No. 11. – P. 1651–1656.
318. Cole H.A., Tabor-Godwin J.M., Hayes J.J. Uracil DNA glycosylase activity on nucleosomal DNA depends on rotational orientation of targets // *J. Biol. Chem.* – 2010. – V. 285. – No. 4. – P. 2876–2885.
319. Balliano A.J., Hayes J.J. Base excision repair in chromatin: Insights from reconstituted systems // *DNA Repair (Amst).* – 2015. – V. 36. – P. 77–85.
320. Davey C.A., Sargent D.F., Luger K., Maeder A.W., Richmond T.J. Solvent mediated interactions in the structure of the nucleosome core particle at 1.9 a resolution // *J. Mol. Biol.* – 2002. – V. 319. – No. 5. – P. 1097–1113.
321. D'Silva I., Pelletier J.D., Lagueux J., D'Amours D., Chaudhry M.A., Weinfeld M., Lees-Miller S.P., Poirier G.G. Relative affinities of poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-

dependent protein kinase for DNA strand interruptions // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – V. 1430. – No. 1. – P. 119–126.

322. Lavrik O.I., Prasad R., Sobol R.W., Horton J.K., Ackerman E.J., Wilson S.H. Photoaffinity labeling of mouse fibroblast enzymes by a base excision repair intermediate. Evidence for the role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in DNA repair // *J. Biol. Chem.* – 2001. – V. 276. – No. 27. – P. 25541–25548.

323. Sukhanova M., Khodyreva S., Lavrik O. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates activity of DNA polymerase beta in long patch base excision repair // *Mutat. Res.* – 2010. – V. 685. – No. 1–2. – P. 80–89.

324. Kumamoto S., Nishiyama A., Chiba Y., Miyashita R., Konishi C., Azuma Y., Nakanishi M. HPF1-dependent PARP activation promotes LIG3-XRCC1-mediated backup pathway of Okazaki fragment ligation // *Nucleic. Acids. Res.* – 2021. – V. 49. – No. 9. – P. 5003–5016.

325. Langelier M.F., Billur R., Sverzhinsky A., Black B.E., Pascal J.M. HPF1 dynamically controls the PARP1/2 balance between initiating and elongating ADP-ribose modifications // *Nat. Commun.* – 2021. – V. 12. – Article No. 6675.