

На правах рукописи

Украинцев Александр Андреевич

Роль белков PARP1, PARP2 и PARP3 в регуляции активности ферментов BER на нуклеосоме и в стабилизации её структуры

1.4.9 – биоорганическая химия

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск 2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научные руководители:

Лаврик Ольга Ивановна, д.х.н., академик РАН, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, зав. лабораторией биоорганической химии ферментов.

Кутузов Михаил Михайлович, к.х.н., с.н.с Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск.

Официальные оппоненты:

Варижук Анна Михайловна, д.х.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства», г. Москва, зав. лабораторией структуры и функций биополимеров.

Мальгин Алексей Аркадьевич, д.х.н., г.н.с., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, зав. лабораторией структуры и функции рибосом.

Шайган Алексей Константинович, д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН, профессор кафедры биоинженерии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, г. Москва.

Защита состоится «16» сентября 2025 г. в 10:00

На заседании диссертационного совета ИХБФМ.02.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, проспект академика Лаврентьева, 8, Новосибирск

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан **мая 2025 г.**

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н., Пестряков П.Е.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Благодаря своей ключевой роли в системах репарации ДНК [Gibson B.A., et al., 2012] белки поли(ADP-рибоза)полимераза 1 и 2 (PARP1 и PARP2) признаны высокоперспективными мишенями для противоопухолевой терапии [Curtin N.J., et al., 2013]. Ингибиторы PARP (PARPi), такие как олапариб, нирапариб, рукапариб и талазапариб, уже одобрены для клинического применения. Они демонстрируют высокую эффективность прежде всего в терапии опухолей с дефицитом репарации ДНК путем гомологичной рекомбинации, например, в случае мутации генов *BRCA1/2* [Fong P.C., et al., 2009]. Эти препараты используются при лечении рака яичников, молочной железы, поджелудочной железы и простаты. Активно ведутся исследования по расширению показаний для PARPi и их комбинациям с другими видами терапии (ДНК-повреждающие агенты, иммунотерапия), а также по повышению селективности их воздействия на различные белки семейства PARP, что может значительно снизить их токсичность и привести к более эффективной терапии различных видов онкозаболеваний. Несмотря на значительный прогресс в понимании роли PARP1 и PARP2 в репарации ДНК и успехи таргетной терапии, остаются неизученными многие аспекты, среди которых можно выделить следующие:

1. Функции PARP3 в поддержании геномной стабильности остаются недостаточно изученными. Понимание роли PARP3 в этих процессах необходимо для прогнозирования механизмов резистентности и разработки более селективных ингибиторов.

2. Подавляющее большинство исследований активности PARP проведено на ДНК-дуплексах вне хроматинового контекста. Однако *in vivo* ДНК существует в виде высокоорганизованного нуклеопротеидного комплекса — хроматина. Крайне мало известно о том, как PARP1, PARP2 и особенно PARP3 взаимодействуют с нуклеосомами и более сложными хроматиновыми структурами и как поли(ADP-рибозил)ирование (PARилирование) влияет на архитектуру хроматина вблизи повреждений в масштабе всего генома. PARилирование гистонов и факторов хроматина — мощный механизм ремоделинга, обеспечивающий доступ репарационным ферментам к повреждению ДНК. Но детали этого процесса требуют дополнительного изучения.

3. Геномная стабильность неразрывно связана с правильной укладкой ДНК в хроматине. Роль ДНК-зависимых белков PARP в организации структуры хроматина изучена лишь частично.

Таким образом, комплексное исследование роли PARP1, PARP2 и PARP3 не только в репарации ДНК, но и в организации и динамике структуры хроматина, является актуальной задачей. Для этого необходимо изучить функционирование ферментов PARP в условиях хроматиновой организации, а также специфические функции PARP3. Это позволит выявить базовые механизмы поддержания целостности генома и разработать селективные

ингибиторы следующего поколения. Такие ингибиторы, нацеленные на конкретные белки семейства PARP (включая PARP3) или их комплексы, потенциально повысят эффективность терапии и снижат ее токсичность.

Данная работа направлена на восполнение этих критических пробелов в знаниях о роли PARP1, PARP2 и PARP3 в поддержании геномной стабильности посредством их взаимодействия с хроматином и влияния на его структуру.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы является исследование взаимодействия белков PARP1, PARP2 и PARP3 с интермедиатами различных этапов эксцизионной репарации оснований (BER) в составе нуклеосом, а также влияния этих белков на активность ферментов BER и на структуру нуклеосомы. В ходе работы решались следующие задачи:

1. Исследовать влияние белков PARP1 и PARP2 на ферментативную активность участников короткозаплаточного пути BER как при дефиците NAD^+ , так и при его высокой концентрации.
2. Определить сродство белков PARP1, PARP2, PARP3 и места их контактов с модельными мононуклеосомными и хроматиноподобными субстратами, выступающими в качестве аналогов природного хроматина.
3. Проанализировать воздействие белков PARP1, PARP2 и PARP3 на структуру нуклеосом и более сложных хроматиноподобных структур.

Научная новизна работы. Данное исследование представляет собой первое детальное изучение влияния ферментов PARP1, PARP2 и реакции PARилирования на каталитическую активность ключевых белков эксцизионной репарации оснований (BER) в контексте нуклеосом. Продемонстрировано, что эффекты воздействия PARP1 и PARP2 на ключевых участников BER, включая условия PARилирования, качественно аналогичны наблюдаемым в реконструированных системах со свободной ДНК, однако количественно изменены в нуклеосоме, являющейся элементарной структурной единицей хроматина. Данное наблюдение позволяет экстраполировать ранее установленные закономерности на более сложные хроматин-организованные системы. Обнаружена способность PARP3 взаимодействовать с AP-сайтами в контексте нуклеосомы (NCP). Впервые в рамках единого исследования проведен комплексный анализ влияния трех ДНК-зависимых регуляторных белков репарации (PARP1, PARP2 и PARP3) на структуру хроматина, в частности на стабильность нуклеосом. Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) установлено, что PARP2 взаимодействует с гистоновыми белками, но не индуцирует значимых изменений в структуре хроматина. В то же время выявлена ранее неизвестная функция PARP3 в компактизации хроматина: показано, что PARP3 компактизует и стабилизирует нуклеосомы.

Практическая значимость работы. В современной клинической практике терапии BRCA1/2-ассоциированных злокачественных новообразований активно применяются ингибиторы ферментов PARP1, PARP2 и PARP3. Полученные в настоящей работе результаты подтверждают релевантность данных, накопленных в ходе многолетних исследований на модельных ДНК-дуплексах в отношении механизмов воздействия PARP1 и

PARP2 на ключевые белки системы BER в контексте нуклеосомы. Кроме того, настоящее исследование позволило выявить специфические особенности взаимодействия всех трех белков семейства PARP (PARP1, PARP2 и PARP3) с мононуклеосомой и хроматиноподобными (CLP) структурами. Эти новые данные способствуют более детальному пониманию ключевых ядерных процессов и открывают перспективы для разработки новых терапевтических стратегий, направленных на лечение различных заболеваний, включая онкологические.

Положения, выносимые на защиту.

1. PARP1, PARP2 и PARP3 взаимодействуют с разными участками нуклеосом. Эти белки связываются как с NCP, содержащими ДНК без повреждений, так и с NCP, содержащими ДНК-интермедиаты BER.
2. PARP1 и PARP2 в нуклеосомном контексте подавляют активность ключевых ферментов BER (APE1, Pol β и LigIII α), а PARилирование PARP1 и PARP2 регулирует величину эффекта.
3. PARP3 стабилизирует и уплотняет структуру NCP, в то время как влияние PARP1 и PARP2 на её структуру незначительно.
4. PARP2 преимущественно локализуется на гистоновом октамере NCP в составе хроматиноподобных частиц, а PARP3 обеспечивает поддержание их нуклеосомной организации.

Вклад автора. Представленные экспериментальные данные, за исключением результатов анизотропии флуоресценции, получены самим автором. Автор принимал активное участие в анализе полученных результатов и написании статей. Анализ полученных результатов проводился при участии Кутузова М.М., Белоусовой Е.А. и Лаврик О.И. Автором выделен рекомбинантный белок PARP1, используемый в работе. Автором отработана методика получения высокоочищенных белок-нуклеиновых комплексов для использования в экспериментах методом АСМ. Лично автором получены и обработаны все АСМ-изображения.

Апробация и публикации результатов. По результатам исследования опубликовано 3 экспериментальные статьи и 1 обзор в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Результаты, изложенные в диссертации, были представлены на конференциях: BGRS/SB-2020 (Новосибирск, 2020), научная конференция с элементами школы молодых ученых «BioTop 2020: актуальные вопросы современной биологии» (Новосибирск, 2020), BGRS/SB-2022 (Новосибирск, 2022), III объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, 2022), CSHL Single Biomolecules (New York, 2022), конференция «Физико-химическая энзимология» (Новосибирск, 2023), научная молодежная школа-конференция «BioTop-2023. Достижения молодых ученых ИХБФМ» (Новосибирск, 2023), всероссийская школа-конференция «Современные вызовы структурной и синтетической биологии» (Шереш, 2024), BGRS/SB-2024 (Новосибирск, 2024).

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из Введения, Обзора литературы, Экспериментальной части, Результаты и их

обсуждения, Заключение, Выводов и Списка литературы. Работа (без приложения) изложена на 146 страницах, содержит 55 рисунков и 8 таблиц. Список литературы содержит 286 литературных источника. Приложение на 17 страницах включает 15 рисунков и 7 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Влияние PARP1 и PARP2 на активность ключевых белков-участников процесса BER

1.1. Оценка сродства PARP1 и PARP2 к структурам NCP, содержащим повреждения в ДНК начальных стадий процесса BER

На сегодняшний день основные этапы BER изучены достаточно детально с использованием ДНК-дуплексов, содержащих повреждения, — интермедиатов BER. Большой интерес представляет исследование процесса BER в контексте хроматина, базовой структурной единицей которого является нуклеосома (NCP). В литературе представлено множество данных, характеризующих эффективность отдельных этапов BER в контексте NCP, но роль ядерных PARP и их активность в этом процессе остаются малоизученными [Kutuzov M.M., et al., 2020]. Известно, что PARP1 и PARP2 принимают участие в регуляции системы BER. В первую очередь предполагалось изучить их роль в этом процессе с использованием модельных NCP.

Нуклеотиды в NCP неэквивалентны друг другу ввиду взаимодействия части ДНК в NCP с гистонами. Общепринятой считается следующая классификация нуклеотидов ДНК в NCP: «out» — нуклеотид обращен сахарофосфатным остовом к растворителю; «in» — нуклеотид обращен сахарофосфатным остовом к гистонам; «middle» — занимает промежуточное положение между «in» и «out». Репарация в позиции «in» существенно затруднена [Hinz J.M., et al., 2010]. Мы использовали NCP с азотистым основанием урацилом (dU) на месте «out»- и «middle»-ориентированных нуклеотидов (Рис. 1 А). В нашем случае dU необходим для ферментативного получения ДНК-интермедиатов BER как в составе свободных ДНК-дуплексов, так и в составе NCP (Рис. 1 Б).

PARP1 и PARP2 способны распознавать интермедиаты BER [Sukhanova M.V., et al., 2016; Sukhanova M.V., et al., 2019]. Методом анизотропии флуоресценции мы оценили сродство этих двух белков к интермедиатам начальных стадий процесса BER (Таблица 1). Согласно полученным величинам K_D , PARP1 и PARP2 проявляют повышенное сродство к NCP из-за белок-белковых взаимодействий с гистонами. PARP1 демонстрирует высокое сродство как к NCP603_U, так и к свободной ДНК с минимальной разницей в аффинности между ними. Такой результат можно объяснить особенностью используемой в работе конструкции ДНК. В двух случаях («out» и «middle») повреждения расположены близко к тупому концу ДНК, аналогу двуцепочечного разрыва (DSB), что, с учетом размера белков, позволяет рассматривать нашу конструкцию как аналог кластерного повреждения. Метод анизотропии флуоресценции регистрирует изменения вращательной диффузии

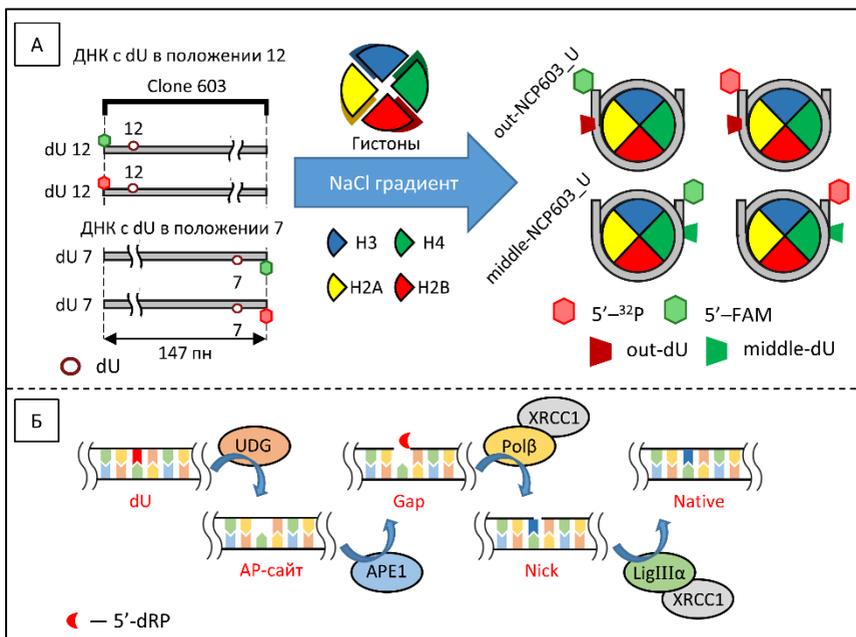


Рис. 1. **А** — Схематичное изображение процесса реконструирования нуклеосом NCP603_U. Изображены используемые в работе ДНК на основе нуклеосом-позиционирующей последовательности (NPS) «Clone 603» и нуклеосомы «NCP603_U», содержащие dU в положении 12 и 7. Положение 12 в нуклеосоме соответствует «out»-ориентированному нуклеотиду; положение 7 — «middle»-ориентированному нуклеотиду. Условное расположение нуклеотидов в нуклеосоме обозначено трапециями красного и зеленого цвета для «out»- и «middle»-ориентации соответственно. **Б** — Упрощенная схема короткозаплаточного процесса BER с основными белками-участниками.

молекул флуорофора, возникающие при образовании комплексов, причем основной вклад в сигнал вносят молекулы белка, находящиеся в непосредственной близости от флуоресцентной метки. Поскольку в нашем случае флуоресцентная метка находится непосредственно на 5'-конце ДНК, а PARP1 связывает тупые концы ДНК [Sukhanova M.V., et al., 2016], то вклад такого взаимодействия оказался выше, чем от потенциального взаимодействия PARP1 с другими сайтами связывания.

Таблица 1. Величины констант диссоциации комплексов PARP1 и PARP2 с ДНК и NCP, детектированные в канале FAM (K_D , нМ).

| Структура | ДНК | | NCP603_U | |
|---------------|--------|----------|----------|----------|
| | PARP1 | PARP2 | PARP1 | PARP2 |
| Native-out | 14 ± 3 | 840 ± 90 | 14 ± 2 | 160 ± 10 |
| AP-out | 23 ± 3 | 810 ± 80 | 7 ± 3 | 160 ± 10 |
| Gap-out | 29 ± 5 | 58 ± 6 | 10 ± 2 | 14 ± 2 |
| Native-middle | 14 ± 3 | 600 ± 50 | 11 ± 1 | 150 ± 10 |
| AP-middle | 23 ± 3 | 690 ± 70 | 12 ± 1 | 160 ± 10 |
| Gap-middle | 25 ± 3 | 140 ± 10 | 14 ± 1 | 128 ± 7 |

Значения K_D измерены регистрацией анизотропии флуоресценции FAM и представлены как среднее значение (\pm SD) для трех независимых экспериментов.

В присутствии PARP2 наблюдается выраженное увеличение анизотропии для структур, содержащих Gap, что свидетельствует о специфическом распознавании данного типа повреждений (Таблица 1). Аффинность PARP2 к данному типу повреждений не зависит от близости к тупому концу в NCP [Kurgina T.A., et al., 2022]. Следует отметить, что в NCP603_U сродство PARP2 к «out»-ориентированному Gap на порядок выше, чем к «middle»-ориентированному, что говорит о важном значении ориентации повреждения в нуклеосоме для взаимодействия с белком PARP2.

1.2. Анализ влияния нуклеосомной организации на активность белков PARP1 и PARP2 в ответ на повреждения ДНК

Эффективность активации PARP и их сродство к ДНК не всегда коррелируют между собой [Sukhanova M.V., et al., 2019]. Существенный вклад в активность белка вносит эффект кооперативного взаимодействия доменов белка при связывании с ДНК [Riccio A.A., et al., 2016; Thomas C., et al., 2019]. Мы определили активность ферментов PARP в присутствии ДНК и NCP. Эффективность активации PARP1 и PARP2 изучалась в присутствии свободной ДНК, или NCP603_U, а также структур, возникающих в процессе репарации «dU» (AP-сайт, Gap, Рис. 1 Б), с использованием $[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ по включению радиоактивной метки в растущую полимерную цепь PAR (Рис. 2).

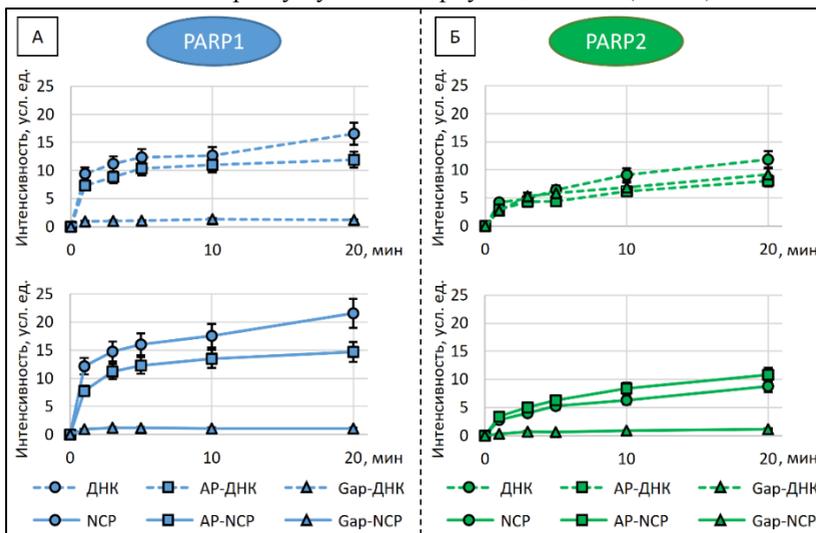


Рис. 2. Активация PARP1 и PARP2 на ДНК и NCP, включая интермедиаты BER в положении «out» (Рис. 1). **А** — Кинетические кривые синтеза поли(ADP-рибозы) ферментом PARP1. **Б** — Кинетические кривые синтеза поли(ADP-рибозы) ферментом PARP2. Каждая точка на графиках отражает среднее значение синтезированного продукта (\pm SD) для трех независимых экспериментов. Реакционная смесь содержала 50 нМ PARP1 или 100 нМ PARP2; 50 нМ dU, AP- или Gap-ДНК или NCP603_U в буфере состава: 10 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 0,1 % NP-40; 0,2 мМ EDTA; 5 мМ β -МЕ; 10 мМ NaCl; 5 мМ MgCl_2 . Реакцию запускали добавлением 400 мкМ NAD^+ содержащим 1 мкМ $[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$. Реакцию проводили при 37 °C в течение 0, 1, 3, 5, 10 и 20 мин и останавливали, помещая аликвоты реакционной смеси на бумажные фильтры (Whatman-1), пропитанные 5 % ТХУ. Фильтры четыре раза промывали 5 % ТХУ, затем 90 % этанолом и высушивали. Продукт реакции детектировали радиолуминесцентным сканированием экрана Image Screen K («Kodak», США) на длине волны 635 нм. Полученные данные анализировали с использованием программы «Quantity One» («Bio-Rad», США).

Выход продукта реакции PARилирования белком PARP1 был выше при активации на NCP603_U в отсутствие повреждения, то есть активация PARP1 преимущественно обусловлена её взаимодействием с тупыми концами ДНК (**Рис. 2 А**). Наличие внутреннего повреждения ДНК в случае близкого расположения к тупым концам, в особенности Gap, снижало общий уровень синтеза PAR, катализируемого PARP1, независимо от нуклеосомной упаковки ДНК. Это снижение, вероятно, связано со специфическими конформационными изменениями PARP1 при связывании с поврежденной ДНК и NAD⁺ [Rudolph J., et al., 2020] или конкуренцией PARP1 за связывание с двумя близкорасположенными типами повреждений. Активация PARP2 на NCP603_U в целом сопоставима с активацией на свободной ДНК, кроме случая Gap-NCP603_U. Только в нуклеосомном контексте Gap вызывает значительное снижение общего синтеза PAR, катализируемого PARP2, в отличие от свободного ДНК-дуплекса (**Рис. 2 Б**). Это указывает на чувствительность активации PARP2 к повреждению типа Gap именно в условиях нуклеосомной упаковки. Вероятно, в случае нуклеосомной организации функция PARP2 заключается не в авто-PARилировании белка PARP2 в составе комплекса PARP2•Gap-NCP603_U. Эта гипотеза подтверждается работой, опубликованной в нашей лаборатории после этого исследования, в которой белок PARP2 изучался в комплексе с HPF1 и в этом случае была продемонстрирована преимущественная трансмодификация гистонов белком PARP2 вблизи Gap-повреждения [Kurgina T.A., et al., 2022; Kurgina T.A., et al., 2025]. Данные для «middle»-ориентированного нуклеотида согласуются с результатами для «out»-ориентированного нуклеотида и не приведены.

1.3. Влияние PARP1 и PARP2 на активность фермента APE1

APE1 — основной фермент, расщепляющий AP-сайты ДНК у высших эукариот в процессе их репарации. Её активность сильно зависит от оснований, окружающих AP-сайт, и от вторичной структуры ДНК-субстрата [Whitaker A.M., et al., 2018; Hoitsma N.M., et al., 2020]. В случае NCP ориентация AP-сайта по отношению к гистоновому ядру важна для реализации активности APE1 [Hinz J.M., et al., 2014]. Для PARP1 продемонстрировано выраженное подавление активности APE1 на обоих типах кофакторов (**Рис. 3**). В условиях PARилирования PARP1 активность APE1 восстанавливалась независимо от ориентации повреждения. Стоит отметить, что результаты согласуются с данными, полученными для свободной ДНК [Khodyreva S.N., et al., 2010]. Наблюдаемые эффекты можно объяснить конкуренцией PARP1 и APE1 за связывание с AP-сайтом [Khodyreva S.N., et al., 2010]. PAR, ковалентно присоединенный к PARP1, способствует диссоциации PARP1 из комплекса с ДНК за счет электростатического отталкивания, освобождая AP-сайт для доступа APE1. PARP2 не оказывала существенного влияния на расщепление AP-сайта APE1 ни в отсутствие, ни в присутствии NAD⁺ (**Рис. 3**). Такой эффект можно объяснить низким сродством PARP2 к ДНК, содержащей AP-сайты (**Таблица 1**), а также низким уровнем PARилирования PARP2 [Sukhanova M.V., et al., 2019]. Следует отметить, что закономерности влияния PARP1, PARP2 и

PARилирования на активность APE1 на AP-ДНК были схожи с закономерностями на AP-NCP603_U, хотя эффекты на AP-ДНК были выражены сильнее (Рис. 3). Такой результат можно объяснить повышенным сродством белков PARP1 и PARP2 к NCP.

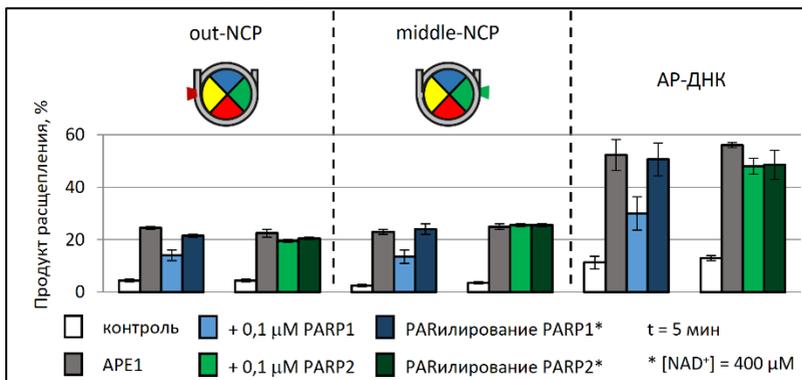


Рис. 3. Влияние PARP1 и PARP2 на активность APE1 в присутствии различных ДНК-структур. На рисунке приведены средние значения уровня расщепления AP-сайта (\pm SD) для трех независимых экспериментов. Реакционные смеси во всех случаях содержали буфер состава: 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5; 0,1 % NP-40; 0,2 mM EDTA; 5 mM β -ME; 10 mM NaCl; 5 mM MgCl₂. Дополнительно реакционные смеси содержали: белый бар — 100 нМ AP-сайт содержащий субстрат; серый бар — 100 нМ AP-сайт содержащий субстрат и 0,03 мкМ APE1 для out-NCP / 1 мкМ APE1 для middle-NCP / 0,001 мкМ APE1 для ДНК; синий и зеленый бары содержали компоненты серого бара и дополнительно 100 нМ PARP1 или PARP2; темные синий и зеленый бары содержали компоненты из синего и зеленого соответственно, а также 400 мкМ NAD⁺. Реакционные смеси инкубировали в течение 5 мин при 37 °С.

1.4. Влияние PARP1 и PARP2 на активность фермента Pol β

Мы оценили способность Pol β встраивать dNMP в структуре Gap-NCP603_U (Рис. 4 А, Б). В системе BER белок Pol β образует наиболее стабильный комплекс с XRCC1. В нашей работе исследована способность Pol β осуществлять включение dNMP как в отсутствие, так и в присутствии XRCC1, а также влияние PARP1, PARP2 и PARилирования на эту активность. PARP1 влияла на активность Pol β , приводя к почти полному подавлению синтеза ДНК (Рис. 4 А). PARилирование PARP1 ослабляло этот эффект, но не восстанавливало исходную активность Pol β (Рис. 4 Б). Наблюдаемое подавление активности Pol β PARP1 и последующее частичное восстановление активности при PARилировании объясняется несколькими взаимосвязанными механизмами. Связывание PARP1 с нуклеосомой может вызывать локальную декомпактизацию ДНК, потенциально увеличивая доступность поврежденного участка для Pol β [Sultanov D.C., et al., 2017], а также эффективность Pol β возрастает при локализации повреждений вблизи тупых концов ДНК [Moor N.A., et al., 2020]. Одновременно возникает конкуренция между Pol β и PARP1 за связывание с ДНК в области повреждения, особенно вблизи тупых концов. Уменьшение влияния со стороны PARP1 на активность Pol β в условиях PARилирования, как и в случае APE1, объясняется электростатическим отталкиванием PARилированного PARP1 с последующей диссоциацией комплекса PARP1•ДНК, что освобождает сайт-связывания для Pol β [Sukhanova M., et al., 2010]. XRCC1 умеренно снижал негативное влияние

PARP1 на Pol β , особенно для out-Gap-NCP603_U (Рис. 4 А, Б). PARP2 также подавляла активность Pol β для обоих типов повреждений (Рис. 4 А, Б). PARилирование PARP2 не оказывало влияния на эффект подавления активности Pol β , особенно для out-Gap-NCP603_U (Рис. 4 Б). XRCC1 восстанавливал активность Pol β в присутствии PARP2 для двух типов повреждений. Для нашей модельной системы в контексте данного этапа BER механизм действия PARP2 связан с преимущественным взаимодействием с самим разрывом Gap или гистонами в области повреждения, а не с тупыми концами. Недостаточный уровень синтеза PAR не обеспечивает диссоциацию комплекса PARP2 с NCP, что препятствует работе Pol β . XRCC1, формируя комплекс с Pol β , эффективно конкурирует с PARP2 за сайт повреждения, что способствует устранению негативного влияния на активность Pol β со стороны PARP2.

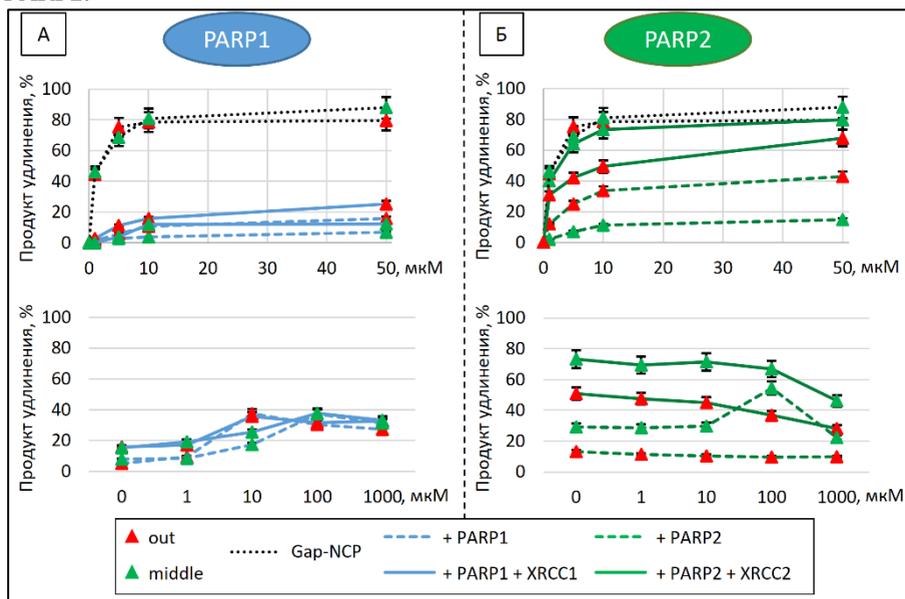


Рис. 4. Влияние PARP1 (А) и PARP2 (Б) на активность Pol β в Gap-NCP: верхний график — в отсутствие NAD⁺; нижний график — в присутствии NAD⁺. На рисунке приведены средние значения уровня удлинения (\pm SD) для трех независимых экспериментов. Реакционные смеси во всех случаях содержали: 100 нМ Gap-NCP; 2,5 нМ или 50 нМ Pol β (для «out»- или «middle»-ориентации соответственно); 50 мкМ dTTP (для нижнего графика). В соответствии с легендой пробы содержали: 50 нМ PARP1 или PARP2; 4 нМ или 50 нМ XRCC1 (для «out»- или «middle»-ориентации соответственно); буфер состава: 10 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 0,1 % NP-40; 0,2 мМ EDTA; 5 мМ β -ME; 10 мМ NaCl; 5 мМ MgCl₂. По оси Y указана концентрация: верхний график — [dTTP]; нижний график — [NAD⁺]. Реакционные смеси инкубировали в течение 3 мин при 37 °С.

1.5. Влияние PARP1 и PARP2 на активность фермента LigIII α

Заключительный этап BER — лигирование одноцепочечного разрыва ДНК-лигазой III α (LigIII α) в комплексе с XRCC1. В литературе показано формирование специфического комплекса между LigIII α и XRCC1 [Caldecott K.W., et al., 1994; Mortusewicz O., et al., 2006]. Наши эксперименты были выполнены на структуре с «out»-ориентированным повреждением.

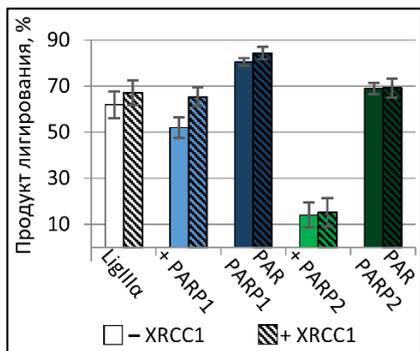


Рис. 5. Влияние PARP1 и PARP2 на активность LigIIIa в присутствии NCP с Nick-повреждением. На рисунке приведены средние значения уровня лигирования (\pm SD) для трех независимых экспериментов. Реакционные смеси содержали 20 нМ $5'$ - 32 P-меченый субстрата NCP603_U и 1 мМ АТФ в буфере 100 мМ NaCl; 50 мМ Tris-HCl, pH = 8,0; 5 мМ DTT; 10 мМ MgCl₂. Пробы инкубировали в течение 30 мин при 37 °С со смесями 0,5 мкМ LigIIIa и 100 мкМ NAD⁺; 0,5 мкМ LigIIIa и 0,1 мкМ PARP1 или PARP2; или LigIIIa, 100 мкМ NAD⁺ и 0,1 мкМ PARP1 или PARP2. Все реакционные смеси готовили в отсутствие или в присутствии эквимольной концентрации XRCC1 по отношению к LigIIIa.

включает конкуренцию с LigIIIa за связывание вблизи тупых концов ДНК (сайтов входа-выхода). В случае PARP2 такой результат обусловлен прямым связыванием с самим одноцепочечным разрывом, что блокирует доступ LigIIIa к месту повреждения. Наблюдаемое восстановление активности LigIIIa при PARилировании (Рис. 5) можно объяснить несколькими взаимосвязанными процессами. С одной стороны, эффект от влияния PARилирования объясняется диссоциацией PARP1 и PARP2 из комплекса PARP•ДНК в результате электростатического отталкивания полимера PAR, ковалентно присоединенного к PARP, от ДНК. С другой стороны, как показали исследования, PAR служит сигналом для привлечения комплекса XRCC1•LigIIIa к месту разрыва [Leppard J.B., et al., 2003; Hanzlikova H., et al., 2018]. Таким образом, умеренный уровень PAR, синтезируемый PARP2, стимулирует формирование активного репарационного комплекса в месте повреждения ДНК в составе NCP.

2. Изучение локализации ДНК-зависимых белков PARP (PARP1, PARP2 и PARP3) в комплексе с NCP

2.1. Определение величин K_D комплекса PARP3•NCP

PARP3 наряду с PARP1 и PARP2 является ДНК-зависимым ферментом и активируется в ответ на повреждения ДНК. К настоящему времени PARP3 среди ДНК-зависимых PARP является наименее охарактеризованной. Систематического исследования её роли в репарации ДНК, в частности в BER, не проводилось. Методом EMSA мы определили значения K_D комплексов

Исследование влияния PARP1 и PARP2 на активность LigIIIa показало, что оба белка оказывают подавляющее действие на лигазную активность LigIIIa (Рис. 5). Однако PARилирование ослабляло этот эффект. Присутствие ключевого партнера LigIIIa, белка XRCC1, не оказывало выраженного влияния на базовую активность LigIIIa. Это, вероятно, связано с расположением разрыва в области NCP, где возможна диссоциация концевых участков ДНК из нуклеосомного комплекса [Chereji R.V., et al., 2015; Cannan W.J., et al., 2017]. XRCC1 умеренно ослаблял подавляющее действие PARP1, что согласуется с известной способностью XRCC1 снижать активность PARP1 [Masson M., et al., 1998]. Механизм подавления активности LigIIIa со стороны PARP1

PARP1, PARP2 и PARP3 с ДНК и NCP603_U, повреждение находилось в положении «out» (**Таблица 2**). Полученные методом EMSA результаты для PARP1 и PARP2 согласуются с данными, полученными методом аннотации флуоресценции (**Таблица 1**). При этом метод EMSA позволил уточнить характер взаимодействия PARP1 и PARP2 с NCP: оба белка взаимодействуют с гистонами; PARP1 распознает Gap-повреждение в составе NCP. Для PARP3 наблюдается следующая зависимость его эффективности во взаимодействии с исследуемыми структурами: Gap \ll Native \approx AP-сайт (**Таблица 2**). В работах [Langelier M.F., et al., 2014; Grundy G.J., et al., 2016] было установлено, что PARP3 взаимодействует и активируется ДНК с одноцепочечным разрывом, содержащим 5'-концевую фосфатную группу. В нашем случае PARP3 взаимодействует с использованным в работе Gap-повреждением менее эффективно, чем с нативной и AP-содержащей ДНК. Такой результат можно объяснить структурой используемого в работе ДНК-дуплекса с одноцепочечной брешью (Gap с 5'-dRP-фрагментом; Рис. 1 Б). Такое повреждение, по-видимому, не является каноническим для PARP3. При этом значительная разница в значениях K_D между PARP2 и PARP3 в случае использованного Gap-повреждения может свидетельствовать о различиях в механизмах их взаимодействия с ДНК-дуплексами, содержащими повреждения.

Таблица 2. Величины констант диссоциации комплексов PARP1, PARP2 и PARP3 с ДНК и NCP, полученные методом EMSA (K_D , нМ).

| Структура | ДНК | | | NCP603_U | | |
|------------|---------|-----------|----------|----------|----------|------------|
| | PARP1 | PARP2 | PARP3 | PARP1 | PARP2 | PARP3 |
| Native-out | 113 ± 5 | 300 ± 100 | 461 ± 9 | 52 ± 8 | 190 ± 20 | 287 ± 5 |
| AP-out | 92 ± 3 | 330 ± 80 | 426 ± 8 | 65 ± 3 | 130 ± 4 | 250 ± 30 |
| Gap-out | 48 ± 3 | 240 ± 80 | 750 ± 20 | 38 ± 3 | 57 ± 8 | 4400 ± 300 |

Значения K_D были определены из данных по связыванию трех белков PARP с [32 P]-меченой ДНК как в свободной форме, так и в составе NCP методом задержки в геле и соответствуют концентрации белка, при которой 50 % молекул ДНК или NCP находится в комплексе. Значения K_D представлены как среднее значение (\pm SD) для трех независимых экспериментов. Обозначение «out» указывает на ориентацию повреждения в структуре NCP согласно **Рис. 1**.

2.2. Определение мест контакта ДНК-зависимых белков PARP с NCP

2.2.1. Метод боргидридной сшивки и ферментативного футпринтинга

В ходе BER после удаления поврежденного азотистого основания образуется ДНК-интермедиат, содержащий AP-сайт. Известно, что PARP1 и PARP2 взаимодействуют с AP-сайтами и могут участвовать в их расщеплении в составе ДНК-дуплексов по лиазному механизму [Khodyreva S.N., et al., 2010; Kutuzov M.M., et al., 2015]. Для PARP3 такие данные отсутствуют. Мы оценили способность трех белков PARP взаимодействовать с AP-сайтом в NCP. Для этого мы воспользовались свойством альдегидных групп AP-сайтов формировать основания Шиффа с первичными аминогруппами белка в случае их близкого расположения [Khodyreva S.N., et al., 2011] (**Рис. 6 А**). Основания Шиффа восстанавливали боргидридом натрия, NaBH₄. Из-за возможного взаимодействия белков с разными участками ДНК в NCP, мы дополнительно

сконструировали ДНК, содержащие множество AP-сайтов (Рис. 6 Б), чтобы зарегистрировать такие взаимодействия.

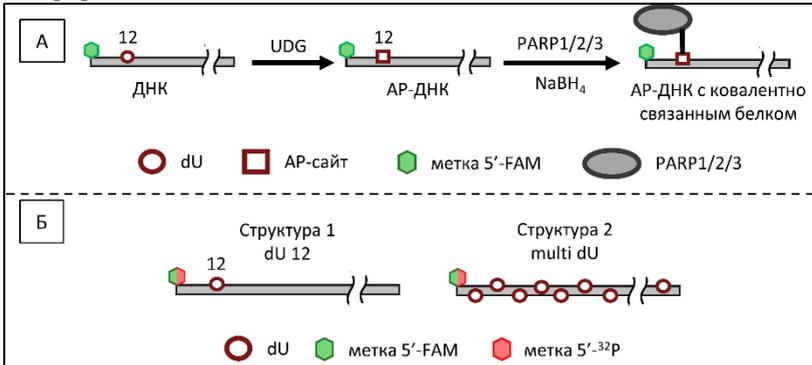


Рис. 6. А — Схематичное изображение метода боргидридной сшивки, использованного в работе. Б — Схематичное изображение структур ДНК, использованных в методах боргидридной сшивки и ферментативного футпринтинга.

Мы получили автографы гелей после разделения продуктов реакции боргидридной сшивки как для структуры, содержащей AP-сайт в «out»-ориентации 12-ом положении, так и для структуры, содержащей множество AP-сайтов (Рис. 7). Чтобы локализовать удаленность AP-сайта, который обеспечивает сшивку с белками PARP, от меченого 5'-конца, пробы дополнительно подвергли обработке ферментом DNase I в условиях частичного гидролиза. Все ДНК-зависимые PARP взаимодействуют с AP-сайтами

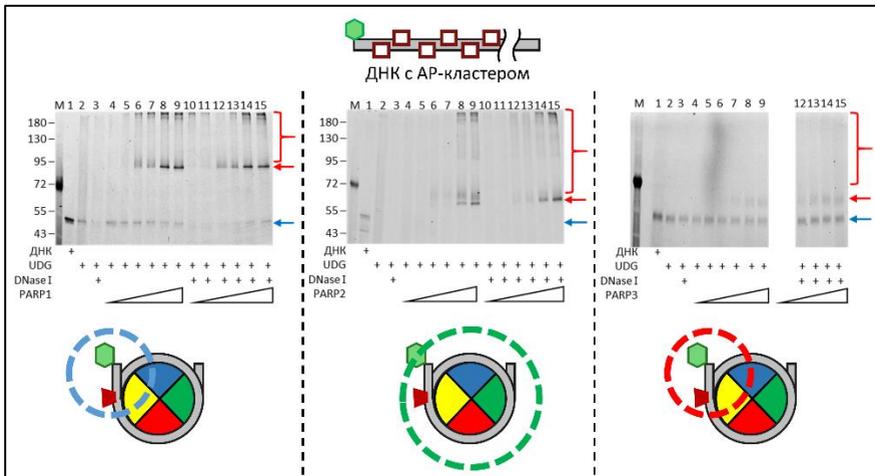


Рис. 7. Взаимодействие белков PARP1, PARP2 и PARP3 с AP-кластером в составе NCP. Автографы гелей после разделения продуктов реакции в 10 % ПААГ по Лэммли. Реакционные смеси содержали 0,2 мкМ NCP и 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 мкМ PARP1, PARP2 или PARP3 в буфере состава: 10 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 0,1 % NP-40; 0,2 мМ EDTA; 5 мМ β-МЕ4 10 мМ NaCl. Пробы инкубировали при 37 °C в течение 20 мин. Далее к смеси добавляли NaBH₄ до конечной концентрации 20 мМ и инкубировали во льду в течение 30 мин. После чего к смеси добавляли 1 е.а. DNase I и инкубировали при 37 °C в течение 15 мин. Синей стрелкой обозначена электрофоретическая подвижность нерасщепленной цепи ДНК с AP-кластером, красной стрелкой и фигурной скобкой — белок-нуклеиновые аддукты. Под автографами гелей схематично приведены структуры нуклеосом с обозначением локализации соответствующих PARP пунктирной линией: PARP1 — синяя; PARP2 — зеленая; PARP3 — красная.

в составе NCP. Результаты показали, что PARP1 преимущественно взаимодействует с AP-сайтами вблизи тупого конца ДНК, что говорит о её локализации в области входа-выхода в NCP (**Рис. 7**). Для PARP2 наблюдается увеличение доли продуктов реакции боргидридной сшивки при переходе от структуры NCP603_U к NCP603_multiU. Такой эффект связан со взаимодействием PARP2 с разными участками NCP (**Рис. 7**). Для PARP3 показано, что интенсивность сшивки между PARP3 и NCP возрастает при переходе от NCP603_U к NCP603_multiU. При этом не наблюдается формирования продуктов с низкой электрофоретической подвижностью. Такой эффект можно объяснить локализацией белка PARP3 в области входа-выхода NCP (**Рис. 7**). Дополнительно эти результаты были подтверждены при помощи метода ферментативного футпринтинга (данные не приведены).

2.2.2. Метод атомно-силовой микроскопии

Мы изучили взаимодействие белков PARP1, PARP2 и PARP3 с нуклеосомой как базовой структурной единицей хроматина при помощи атомно-силовой микроскопии (АСМ) (**Рис. 8**). Особенность этого подхода заключается в отсутствии необходимости разрушать комплекс для его изучения и вносить специфические метки в структуру комплекса. Используя АСМ можно изучать геометрические параметры биологических молекул и их комплексов в контексте одной молекулы в её нативной форме, не искаженной дополнительными модификациями. В качестве модели мы использовали структуру L-NCP603 на основе NPS «Clone 603» с линкерными участками 120 и 79 пн (**Рис. 8 А**). При анализе полученных изображений для дальнейшей характеристики выбирали только нуклеосомы, связанные с белками PARP. В соответствии с расположением белков PARP на L-NCP603 комплексы разделяли на две категории: 1) PARP располагается близко к ядру (**Рис. 8 Б**); 2) PARP располагается на линкерной ДНК (**Рис. 8 В**). Мы обнаружили, что каждая из трех PARP связывается вблизи ядра нуклеосомы: в 76,5 % комплексов для PARP1, в 74,0 % комплексов для PARP2 и в 79,0 % комплексов для PARP3 (**Рис. 8 Г**).

PARP1 действительно способен локализоваться на линкерной ДНК. Наши результаты согласуются с ранее опубликованными данными: PARP1 проявляет повышенное сродство к модельным нуклеосомным субстратам при удлинении линкерной ДНК [Clark N.J., et al., 2012]; PARP1 взаимодействует с нуклеосомой в области входа-выхода линкерной ДНК через домены цинковых пальцев и BRCT [Rudolph J., et al., 2021]. Детальный механизм взаимодействия белков PARP2 и PARP3 с линкерной ДНК нуклеосомы неизвестен, т.к. PARP2 и PARP3 не содержат известных ДНК-связывающих доменов, таких как цинковые пальцы и BRCT. Можно предположить, что в этом процессе играет роль домен WGR. В целом взаимодействие белков PARP с нуклеосомой, вероятно, способно оказывать влияние на структуру нуклеосомного комплекса.

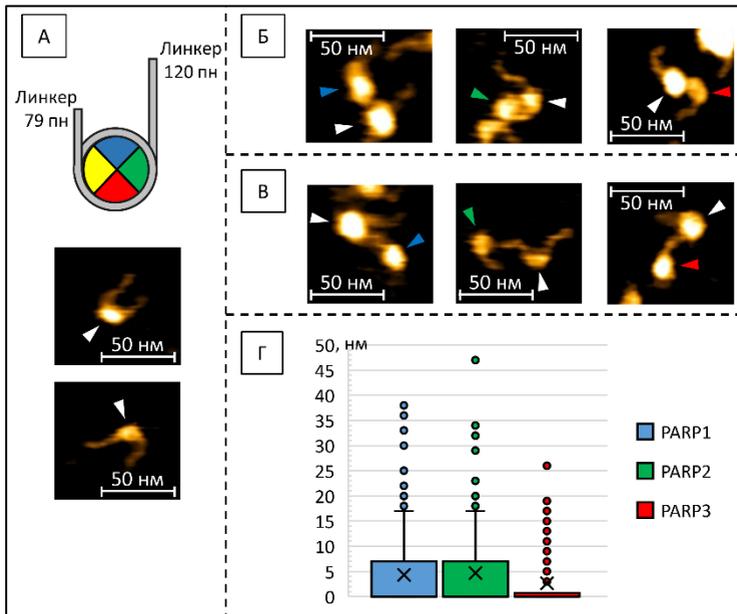


Рис. 8. Изучение локализации белков PARP1, PARP2 и PARP3 на нуклеосоме. **А** — Схематичное изображение структуры нуклеосомы L-NCP603, содержащей в составе NCP «Clone603» с ДНК-линкерами длиной 79 и 120 пн. Приведены снимки ACM исследуемых молекул. Белой стрелкой указано ядро L-NCP603 ($Z = 4$ нм). **Б** — Локализация ДНК-зависимых PARP вблизи ядра NCP ($Z = 4$ нм). **В** — Локализация ДНК-зависимых PARP на линкерной ДНК ($Z = 4$ нм). Белой стрелкой указано ядро L-NCP603, синей — PARP1, зеленой — PARP2, красной — PARP3 (**Б, В**). **Г** — Блочная диаграмма с ограничителями выбросов распределения расстояний (нм) белков PARP1, PARP2 и PARP3 относительно ядра нуклеосомы. Крестик — среднее арифметическое по выборке; линия выше или ниже крестика — медиана (находится в нуле); нижняя и верхняя грань ящика — первый и третий квартиль значений; расстояние между границами — межквартильный размах; верхняя и нижняя граница «усов» — максимальное и минимальное значение в выборке; точки — выбросы. Метод Краскела-Уоллиса с пост-тестом Манна-Уитни (поправка Бонферрони) показал отсутствие статистически значимых различий между группами (p -value > 0,05). Число проанализированных молекул в выборке для каждой группы составляло $N = 200$.

3. Изучение структурных изменений NCP, вызванных ДНК-зависимыми белками PARP, методом ACM

Одним из параметров, отражающих степень компактизации ДНК в составе нуклеосомы, является угол раскрытия α между линкерными ДНК [Stumme-Diers M.P., et al., 2018; Konrad S.F., et al., 2022] (Рис. 9 А). Мы определили соответствующий угол для ранее выявленных комплексов PARP•L-NCP603. Нуклеосомы без добавления какого-либо PARP использовали в качестве контроля. Средний угол между плечами ДНК в контрольных L-NCP603 составил $120^\circ \pm 5^\circ$ (Рис. 9 Б). Наш результат согласуется с ранее опубликованными данными другой исследовательской группы [Konrad S.F., et al., 2022].

Связывание PARP1 с L-NCP603 вызвало незначительное сужение распределения угла раскрытия α без существенного влияния на уплотнение нуклеосомы ($115^\circ \pm 4^\circ$) (Рис. 9 Б). Разница в измеренных значениях угла в нуклеосоме в присутствии и в отсутствие PARP1 не была существенной

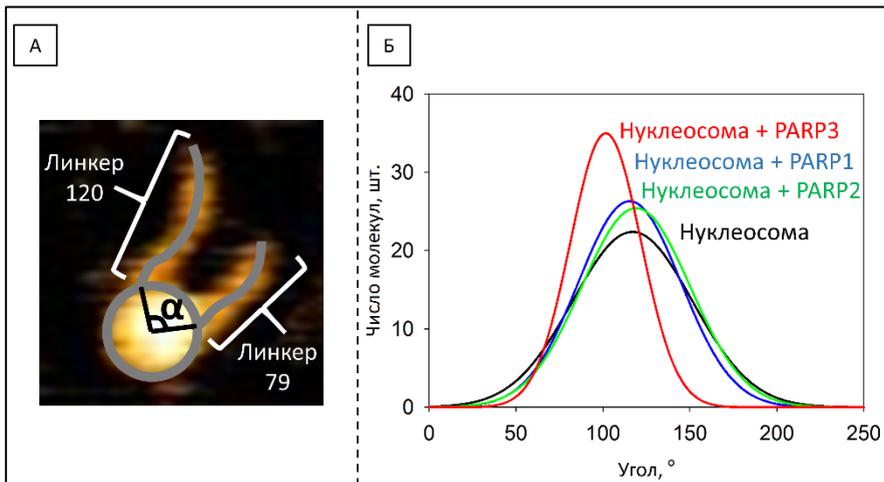


Рис. 9. А — обозначение угла α (черным) между точками входа-выхода в исследуемой молекуле L-NCP603. Серым кругом обозначены границы ядра NCP. Серыми линиями обозначены контуры линкерных ДНК. Б — Гауссова интерполяция распределения значений угла α . Число проанализированных молекул в выборке для каждой группы составляло $N = 200$.

(p -value > 0,05). В нашем случае оказалось, что в присутствии PARP1 ширина Гауссова пика на полувысоте уменьшилась на 30 % по сравнению с контрольным препаратом. Это свидетельствует о стабилизации комплекса NCP. Как упоминалось выше, PARP1 может связывать нуклеосому вблизи сайта входа-выхода. По результатам АСМ можно утверждать о способности PARP1 взаимодействовать с каждой линкерной ДНК вблизи входа-выхода. Это взаимодействие может влиять на структурное функционирование хроматина аналогично линкерному гистону H1. Присутствие H1 сужает распределение по углу раскрытия, что означает стабилизацию нуклеосомы, и не изменяет степень уплотнения (среднее значение угла α) [Würtz M., et al., 2019]. Кроме того, подобно гистону H1, PARP1 проявляет хроматин-конденсирующую активность, которая нивелируется в результате авто-PARилирования этого фермента [Wacker D.A., et al., 2007]. Этот эффект, вероятно, обусловлен образованием петли, вызванной контактами PARP1–PARP1 [Bell N.A., et al., 2021].

Несмотря на то, что аффинность PARP2 к нуклеосоме превышает таковую к свободной ДНК в ~ 7 раз (Таблица 1), PARP2, подобно PARP1, не оказывала существенного влияния на степень компактизации нуклеосомы L-NCP603. В нашем случае ни распределение значений угла раскрытия, ни степень уплотнения L-NCP603 не изменялись в присутствии PARP2 ($121^\circ \pm 4^\circ$) (Рис. 9 Б). Принимая во внимание стандартное отклонение, разница в измеренных значениях угла в нуклеосоме в присутствии и в отсутствие PARP2 не была существенной (p -value > 0,05).

Между тем, PARP3 оказывала особое влияние на уплотнение ядра нуклеосомы L-NCP603. Мы наблюдали повышенную степень уплотнения нуклеосомы в присутствии PARP3 ($104^\circ \pm 4^\circ$) (Рис. 9 Б). Принимая во внимание

стандартное отклонение, разница в измеренных значениях угла в нуклеосоме в присутствии и в отсутствие PARP3 была статистически значимой (p -value < 0,001). Более того, присутствие PARP3 индуцировало сужение распределения углов раскрытия. Белок PARP3 широко распространен в ядре как часть белковых комплексов группы Polysomb [Rouleau M., et al. 2007]. Белки группы Polysomb играют ключевую роль в подавлении гомеозисных генов во время клеточной дифференцировки, переводя их в репрессированное состояние, характерное для факультативного гетерохроматина. Таким образом, влияние PARP3 на уплотнение L-NCP603 может быть необходимо для регулирования доступа других белков к неповрежденной ДНК посредством регуляции уплотнения ДНК.

4. Изучение влияния PARP1, PARP2 и PARP3 на хроматиноподобные структуры методом ACM

На первом этапе для однозначной интерпретации результатов методом ACM мы получили хроматиноподобные частицы (CLP), в которых присутствовал кластер из восьми NPS «Clone 601», CLP601-8 (Рис. 10 А). Анализ полученного препарата CLP601-8 с помощью ACM выявил его гетерогенность со средним значением 8 NCP на одну молекулу ДНК (Рис. 10 Б). Эти данные согласуются с результатами работы [Rogge R.A., et al., 2013].

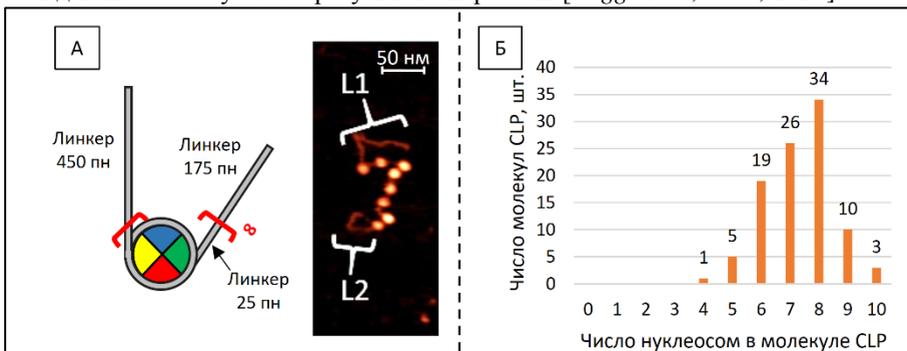


Рис. 10. Реконструированный препарат хроматиноподобных частиц — CLP601-8. А — Схематичное изображение структуры CLP601-8. Структура состоит из 8 NCP «Clone 601», соединенных между собой ДНК-линкерами длиной 25 пн (красные скобки; цифра означает число повторений). По краям полинуклеосомной структуры присутствуют ДНК-линкеры длиной 450 и 200 пн. Приведено типичное изображение ACM исследуемой молекулы ($Z = 4$ нм). Белыми фигурными скобками обозначены ДНК-линкеры: L1 — 450 пн; L2 — 200 пн. Б — Распределение числа NCP на одну молекулу ДНК в модельном препарате CLP601-8. Выборка составила $N = 98$.

Мы получили изображения ACM комплексов CLP601-8 с ДНК-зависимыми белками PARP (Рис. 11 А). Определены ключевые морфометрические характеристики CLP601-8, на которые могут влиять белки PARP1, PARP2 и PARP3: площадь проекции CLP на сканируемую плоскость (S , нм^2) и объем молекулы CLP (V , нм^3) (Рис. 11 Б, В). Анализ ACM-изображений комплексов CLP с PARP1, PARP2 и PARP3 выявил существенные различия от воздействия этих белков на морфометрические параметры комплексов: PARP1

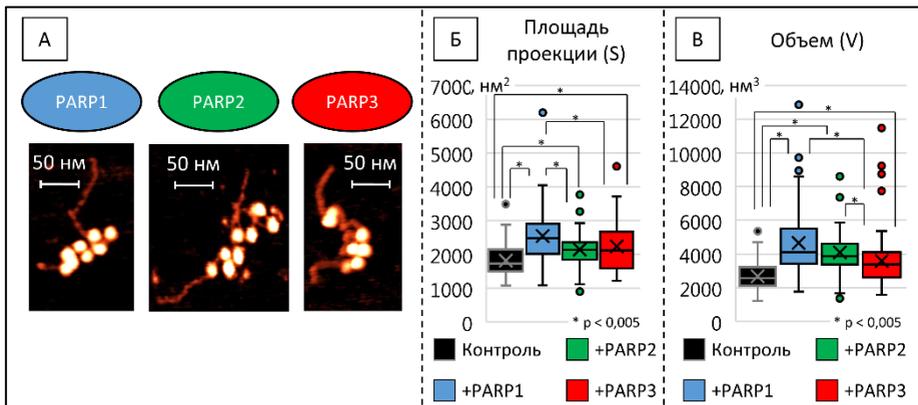


Рис. 11. А — типичные АСМ-изображения комплексов CLP с ДНК-зависимыми белками PARP ($Z = 4$ нм). Б — Блочная диаграмма с ограничителями выбросов площади проекции CLP и их комплексов с белками PARP1, PARP2 и PARP3. В — Блочная диаграмма с ограничителями выбросов объема по Лапласу CLP и их комплексов с белками PARP1, PARP2 и PARP3. Крестик — среднее арифметическое по выборке; линия выше или ниже крестика — медиана; нижняя и верхняя грань ящика — первый и третий квартиль значений; расстояние между границами — межквартильный размах; верхняя и нижняя граница (кусов) — максимальное и минимальное значение в выборке; точки — выбросы. Тест Краскела-Уоллиса с пост-тестом Манна Уитни (поправка Бонферрони) показал статистически значимые различия между группами (отмечены *). Число проанализированных молекул в выборке для группы «Контроль» составляло $N = 98$, для комплексов с белками PARP — $N = 100$.

вызывала увеличение средней площади проекции на 40 % (с 1813 nm^2 до 2545 nm^2) и объема на 74 % (с 2670 nm^3 до 4654 nm^3); для PARP2 эти показатели возрастали на 18 % (с 1813 nm^2 до 2139 nm^2) и 53 % (с 2670 nm^3 до 4092 nm^3) соответственно; для PARP3 аналогичные показатели увеличились на 23 % (с 1813 nm^2 до 2236 nm^2) и 34 % (с 2670 nm^3 до 3591 nm^3) соответственно (Рис. 11 Б, В).

Анализ данных (Рис. 12) демонстрирует выраженное связывание PARP1 с CLP601-8, что согласуется с предыдущими результатами (п. 3), и результатами других научных групп, показывающими локализацию PARP1 в области сайта входа-выхода ДНК и области пары оснований диады нуклеосома аналогично гистону H1 [Kim M.Y., et al., 2004; Wacker D.A., et al., 2007]. Также увеличение объема комплексов можно объяснить взаимодействием PARP1 с гистоновыми октамерами. Анализ комплексов PARP2•CLP601-8 выявил увеличение объема по сравнению с занимаемой площадью (Рис. 12), что указывает на преимущественное взаимодействие PARP2 с гистоновым октамером нуклеосом. PARP2 не уплотняет структуру CLP601-8. Полученные данные впервые демонстрируют специфическую локализацию PARP2 на гистоновом октамере в составе хроматиновых комплексов, что может указывать на роль этого белка в регуляции структуры хроматина через модификацию гистонов в комплексе с белком HPF1 [Kurgina T.A., et al., 2022; Kurgina T.A., et al., 2025]. В присутствии PARP3 увеличение площади и объема комплексов (Рис. 12), вероятно, свидетельствует о способности PARP3 стабилизировать нуклеосомную организацию. Распределение комплексов по площади и объему соответствует контрольному препарату CLP601-8. Однако в присутствии PARP3 возникает популяция точек с увеличенными значениями площади и

объема, которая свидетельствует о стабилизации CLP с числом нуклеосом 8–10. Эти данные согласуются с результатами, демонстрирующими связь PARP3 с белками группы Polycomb [Rouleau M., et al. 2007]. Однако точный механизм воздействия PARP3 на CLP и структуры более высокого порядка требует дальнейшего изучения.

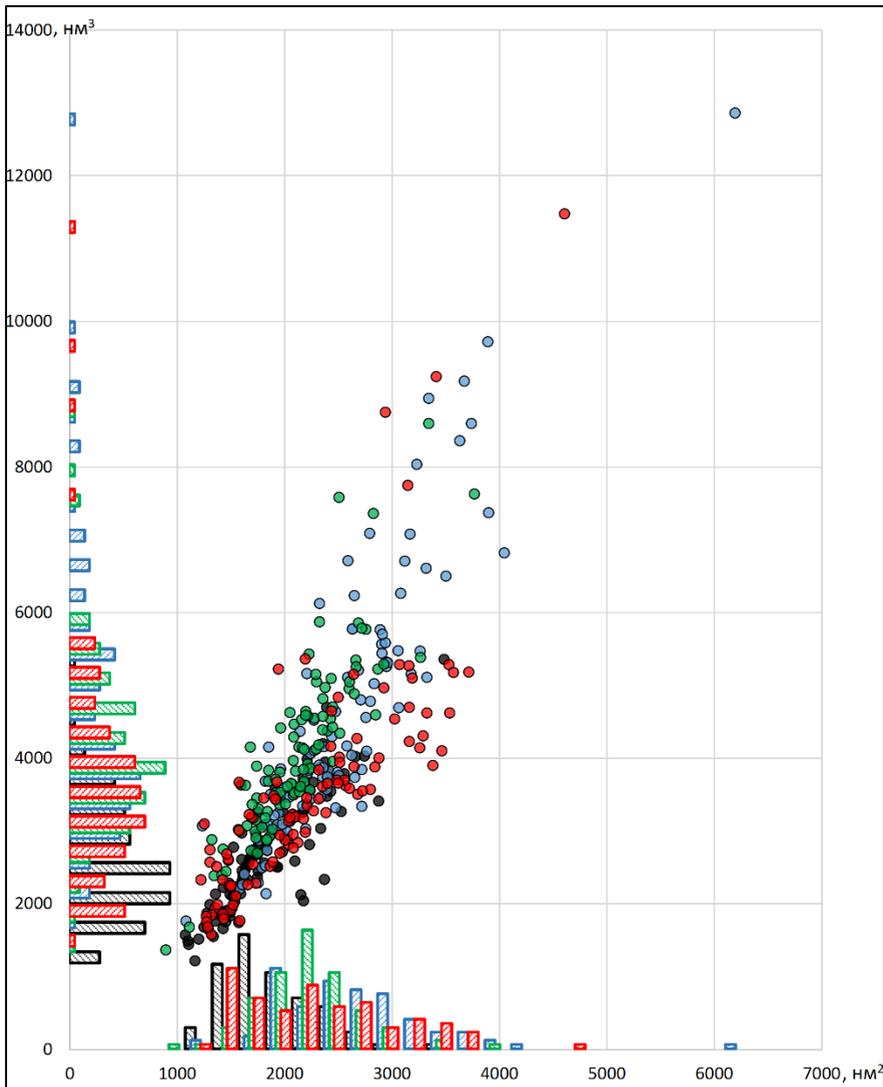


Рис. 12. Диаграмма распределения хроматиноподобных частиц (CLP, черные точки) и их комплексов с белками PARP1 (синие точки); PARP2 (зеленые точки); PARP3 (красные точки). По оси Y — объем частиц (nm^3); по оси X — площадь проекции частиц (nm^2). Каждая точка соответствует отдельной частице CLP или комплексу CLP+PARP. Гистограммы, расположенные на осях графика, отражают плотность точек в данной области диаграммы распределения частиц. Цвета баров соответствуют цветам точек.

Заключение

Проведенное исследование позволило охарактеризовать роль белков семейства PARP (PARP1, PARP2, PARP3) в регуляции структуры NCP и хроматиноподобных частиц, а также их участие в процессе BER в нуклеосомном контексте. Использование комплекса методов, включающих АСМ и анизотропию флуоресценции, позволило выявить принципиальные различия в механизмах взаимодействия этих белков с ДНК и гистоновым октамером в NCP, их влияние на компактизацию нуклеосом и хроматина, а также регуляторные функции в процессе BER.

PARP1 эффективно связывается с областью входа-выхода ДНК в NCP (76,5 % молекул по данным АСМ); не вызывает значительной компактизации NCP (угол раскрытия ДНК $115^{\circ} \pm 4^{\circ}$ против $120^{\circ} \pm 5^{\circ}$ в контрольном препарате), но стабилизирует их структуру. В полинуклеосомных конструкциях, вероятно, формирует межнуклеосомные контакты, уплотняя структуру CLP. PARP1 является ключевым инициатором репарации в нуклеосомном контексте, что подтверждает её ключевую роль в регуляции активности фермента APE1.

PARP2 в CLP проявляет сродство к гистоновым октамерам, но при появлении одноцепочечного разрыва в молекуле ДНК локализуется в области этого повреждения. Белок PARP2 не влияет на структурные характеристики молекул NCP, сохраняя неконденсированное состояние хроматиноподобных субстратов. PARP2 активно участвует в процессе BER после появления одноцепочечного разрыва в цепи ДНК: 1) регулирует активность Pol β ; 2) является ключевым регулятором активности фермента LigIII α .

PARP3 индуцирует компактизацию нуклеосом: угол раскрытия ДНК в NCP составил $104^{\circ} \pm 4^{\circ}$ против $120^{\circ} \pm 5^{\circ}$ в контрольном препарате. Белок PARP3 стабилизирует нуклеосомную организацию и уплотняет структуру CLP. Было обнаружено, что, несмотря на взаимодействие с AP-сайтами, PARP3 проявляет низкое сродство к интермедиатам BER, а именно AP-сайтам и Gap-повреждениям. Новое свойство белка PARP3 — участвовать в компактизации структуры нуклеосом — может влиять на процессы репарации, что требует дополнительного изучения.

Семейство белков PARP представляет собой multifunctionальную систему, объединяющую процессы репарации ДНК, ремоделинга хроматина и эпигенетической регуляции. Их способность адаптироваться к структурным и функциональным требованиям генома делает их ключевыми игроками в поддержании клеточного гомеостаза, а понимание механизмов их действия — важный шаг к разработке прецизионных терапевтических стратегий.

Выводы

1. С использованием реконструированной нуклеосомной системы показаны разные дивергентные роли поли(ADP-рибоза)полимераз 1 и 2 (PARP1 и PARP2) в регуляции активности ключевых ферментов процесса эксцизионной репарации оснований (BER). PARP1 преимущественно регулирует активность APE1, тогда как PARP2 играет ключевую роль в процессах с участием Pol β и LigIII α . Функциональное влияние PARP1 и PARP2, а также самой реакции PARилирования на активность ключевых ферментов BER в нуклеосомной системе согласуется с ранее полученными данными об активности этих белков на модельных ДНК-дуплексах.
2. Показано, что фермент PARP3 способен взаимодействовать с AP-сайтами вблизи области входа-выхода в нуклеосоме (NCP).
3. Установлено, что PARP1, PARP2 и PARP3 преимущественно связываются вблизи ядра NCP, а не с линкерной ДНК, что указывает на их взаимодействие с гистоновым октамером и/или с ДНК в области входа-выхода. В отличие от PARP1 и PARP2, только PARP3 уплотняет и стабилизирует нуклеосому, что предполагает его роль в модуляции структуры хроматина.
4. Выявлено, что PARP2 и PARP3 выполняют разные функции в контексте организации хроматиноподобных частиц (CLP). PARP3 способствует поддержанию нуклеосомной организации CLP. Напротив, взаимодействие PARP2 с CLP не приводит к изменениям пространственной организации NCP в структуре CLP, что связано со взаимодействием PARP2 с гистонами.

Список публикаций по теме диссертации

1. Kutuzov M.M., Belousova E.A., Kurgina T.A., **Ukrainsev 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. — P. 4849.
2. **Ukrainsev A.A.**, Belousova E.A., Kutuzov M.M., Lavrik O.I. Study of Interaction of the PARP Family DNA-Dependent Proteins with Nucleosomes Containing DNA Intermediates of the Initial Stages of BER Process // *Biochemistry (Moscow)*. — 2022. — V. 87. — P. 331–345.
3. **Ukrainsev A.**, Kutuzov M., Belousova E., Joyeau M., Golyshev V., Lomzov A., Lavrik O. PARP3 Affects Nucleosome Compaction Regulation // *Int. J. Mol. Sci.* — 2023. — V. 24. — P. 9042.
4. **Ukrainsev A.A.**, Kutuzov M.M., Lavrik O.I. Studying Structure and Functions of Nucleosomes with Atomic Force Microscopy // *Biochemistry (Moscow)*. — 2024. — V. 89. — P. 674–687.