

Российская Академия наук
Сибирское отделение
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины

На правах рукописи

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

Украинцев Александр Андреевич

1.4.9 — биорганическая химия

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научные руководители:
Академик РАН, д.х.н., Лаврик Ольга Ивановна
к.х.н., с.н.с., Кутузов Михаил Михайлович

Оглавление

| | |
|--|-----------|
| Список сокращений..... | 5 |
| 1. ВВЕДЕНИЕ..... | 9 |
| 2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР..... | 14 |
| 2.1. Нуклеосома: структура и функции..... | 14 |
| 2.1.1. Структура нуклеосомы..... | 14 |
| 2.1.2. Динамика нуклеосомного комплекса..... | 17 |
| 2.2. Взаимодействие коровых гистонов с апуриновыми/апиримидиновыми сайтами внутри нуклеосомы..... | 19 |
| 2.2.1. Реакционноспособность и генотоксичность AP-сайтов..... | 20 |
| 2.2.2. AP-сайты в нуклеосомном контексте..... | 20 |
| 2.3. Эксцизионная репарация оснований в контексте нуклеосом..... | 22 |
| 2.3.1. Влияние нуклеосомной организации на ферментативную активность участников эксцизионной репарации оснований..... | 24 |
| 2.3.1.1. ДНК-гликозилазы..... | 24 |
| 2.3.1.2. Апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза I..... | 25 |
| 2.3.1.3. ДНК-полимераза β | 26 |
| 2.3.1.4. ДНК-лигаза III α | 26 |
| 2.4. Белки PARP1, PARP2, PARP3 — сенсоры повреждений ДНК и регуляторы репарации..... | 28 |
| 2.4.1. ДНК-зависимые белки PARP1, PARP2, PARP3..... | 29 |
| 2.4.2. Взаимодействие PARP1, PARP2, PARP3 с NCP..... | 33 |
| 2.5. Атомно-силовая микроскопия как инструмент изучения нуклеосом и их белковых комплексов..... | 36 |
| 2.5.1. Особенности работы АСМ в контексте биологических исследований..... | 36 |
| 2.5.1.1. Зондовые датчики для АСМ в исследовании биологических объектов..... | 36 |
| 2.5.1.2. Режимы работы АСМ в исследовании биологических объектов..... | 37 |
| 2.5.1.3. Поверхности для иммобилизации биологических объектов в методе АСМ..... | 38 |
| 2.5.2. Иммобилизация биологических объектов на поверхности слюды..... | 38 |
| 2.5.2.1. Иммобилизация ионами металлов..... | 39 |
| 2.5.2.2. Иммобилизация органическими поликатионами..... | 39 |
| 2.5.2.3. Модификация поверхности слюды..... | 40 |
| 2.5.3. АСМ в изучении нуклеосом..... | 41 |
| 2.6. Заключение..... | 44 |
| 3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... | 45 |
| 3.1. Материалы..... | 45 |
| 3.2. Методы..... | 49 |
| 3.2.1. Электрофорез белков в ПААГ по Лэммли..... | 49 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 3.2.2. | Электрофорез нуклеиновых кислот в ПААГ в нативных условиях | 50 |
| 3.2.3. | Электрофорез нуклеиновых кислот в ПААГ в денатурирующих условиях..... | 50 |
| 3.2.4. | Введение [³² P]-метки в 5'-конец олигонуклеотида..... | 51 |
| 3.2.5. | Синтез [³² P]-NAD ⁺ | 51 |
| 3.2.6. | Хроматографическое выделение рекомбинантного белка PARP1 | 52 |
| 3.2.7. | Определение активности PARP1/2 с использованием [³² P]-NAD ⁺ и ДНК-активаторов 57 | |
| 3.2.8. | Аmplификация ДНК NCP603_U / L-NCP603 / CLP601-8 | 57 |
| 3.2.9. | Обработка ДНК-экзонуклеазой I..... | 59 |
| 3.2.10. | Препаративная очистка ДНК-субстратов для исследований методом АСМ | 59 |
| 3.2.11. | «Предсорбка» нуклеосом..... | 60 |
| 3.2.12. | Препаративное реконструирование нуклеосом <i>in vitro</i> с помощью диализа..... | 61 |
| 3.2.13. | Получение ДНК/нуклеосом, содержащих AP-сайт | 63 |
| 3.2.14. | Получение субстратов ДНК или нуклеосом, содержащих однонуклеотидную брешь (Gap) 63 | |
| 3.2.15. | Изучение взаимодействия ДНК/нуклеосомы с белками семейства PARP методом задержки в геле | 64 |
| 3.2.16. | Расчёт величин K _D комплексов NCP-PARP | 64 |
| 3.2.17. | Изучение белок-нуклеиновых взаимодействий методом боргидридной сшивки..... | 65 |
| 3.2.18. | Изучение белок-нуклеиновых взаимодействий методом ферментативного футпринтинга..... | 65 |
| 3.2.19. | Влияние PARP1, PARP2 и PARилирования на активность расщепления APE1 | 66 |
| 3.2.20. | Влияние PARP1, PARP2 и PARилирования на активность ДНК-полимеразы Polβ.... | 66 |
| 3.2.21. | Влияние PARP1, PARP2 и PARилирования на активность LigIIIα..... | 67 |
| 3.2.22. | Подготовка нуклеосомных препаратов и их комплексов с белками PARP1, PARP2 и PARP3 к сканированию методом АСМ..... | 68 |
| 3.2.23. | АСМ-сканирование..... | 68 |
| 3.2.24. | Анализ АСМ-изображений | 69 |
| 4. | РЕЗУЛЬТАТЫ | 72 |
| 4.1. | Связывание PARP1 и PARP2 с NCP, содержащей повреждение ДНК; эффективность их активации | 72 |
| 4.2. | Влияние PARP1 и PARP2 на белков-участников BER | 79 |
| 4.3. | Определение величин K _D комплекса PARP3•NCP..... | 86 |
| 4.4. | Взаимодействие PARP3 с AP-сайтом в NCP603_U..... | 89 |
| 4.5. | Изучение локализация PARP1, PARP2, PARP3 на NCP603_U методом ферментативного футпринтинга..... | 95 |
| 4.6. | Локализация белков PARP1, PARP2 и PARP3 на L-NCP603 методом АСМ | 100 |
| 4.7. | Изучение структурных изменений в нуклеосоме, вызванных белками PARP | 102 |

| | |
|---|------------|
| 4.8. Изучение влияния белков PARP на хроматиноподобные структуры | 105 |
| 4.9. Заключение..... | 120 |
| 5. ВЫВОДЫ..... | 123 |
| 6. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 124 |
| Приложение | 147 |

Список сокращений

- 3'-ОН — гидроксильная группа, расположенная на 3'-атоме углерода дезоксирибозы в ДНК;
- 3'-PUA (3'-**P**hospho- α,β -**U**nsaturated **A**ldehyde) — 3'-фосфо- α,β -ненасыщенный альдегид, расположенный на 3'-атоме углерода дезоксирибозы в ДНК;
- 5'-dRP (5'-**d**eoxy**R**ibose **P**hosphate) — 5'-дезоксирибозофосфатная группа, расположенная на 5'-атоме углерода дезоксирибозы в ДНК;
- 5'-³²P — остаток фосфорной кислоты с изотопом «фосфор-32» [³²P], расположенный на 5'-атоме углерода дезоксирибозы в ДНК;
- 5'-P — остаток фосфорной кислоты, расположенный на 5'-атоме углерода дезоксирибозы в ДНК;
- 5S-рДНК — участок ДНК, кодирующий 5S-рибосомальную РНК;
- 8-охоG — 2-амино-7,9-дигидро-1H-пурин-6,8-дион / 8-оксогуанин;
- β -ME (**β** -**M**ercapto**E**thanol) — 2-меркаптоэтанол;
- AP-сайт (**A**Purinic/**A**Pyrimidinic) — апуриновый/апиридиновый сайт;
- APDMES (3-**A**mino**P**ropyl**D**i**M**ethyl**E**thoxy**S**ilane) — 3-(аминопропил)диметилэтоксисилан;
- APE1 (**A**Purinic/**A**Pyrimidinic **E**ndonuclease **1**) — апуриновая/апиридиновая эндонуклеаза 1 человека;
- APS (3-**A**mino**P**ropyltriethoxy**S**ilatrane) — 3-аминопропилтриэтоксисилатран;
- APTES (3-**A**mino**P**ropyl**T**ri**E**thoxy**S**ilane) — 3-аминопропилтриэтоксисилан;
- ARN1/2/3 (**A**DP-**R**ibosyl-acceptor **H**ydrolases **1/2/3**) — ADP-рибозилгидролазы 1/2/3;
- ART (**A**DP-**R**ibosyl**T**ransferase) — ADP-рибозилтрансферазный субдомен;
- ADP (**A**denosine **D**i**P**hosphate) — аденозин 5'-дифосфат;
- ATP (**A**denosine **T**ri**P**hosphate) — аденозин 5'-трифосфат;
- BER (**B**ase **E**xcision **R**epair) — эксцизионная репарация оснований;
- BRCA1/2 (**BR** — breast, **CA** — cancer) — белок репарации ДНК, ассоциированный с возникновением рака молочной железы;
- BRCT — C-концевой домен белка BRCA1;
- CAT — каталитический домен PARP1/2/3;
- CHAPS (3-((3-**C**Holamidopropyl) dimethyl**A**mmonio)-1-**P**ropane**S**ulfonate) — 3-[(3-холамидопропил)диметил-аммоний]-1-пропансульфонат, цвиттерионный детергент;
- CLP (**C**hromatin-**L**ike **P**article) — хроматиноподобная частица;
- DEAE-бумага DE-81 (**D**i**E**thyl**A**mino**E**thyl) — бумага DE81 из целлюлозы с диэтиламиноэтиловыми функциональными группами;
- DHC (**D**NA-**H**istone **C**ross-link) — ДНК-гистоновая сшивка;

DNase I (**D**eoxyribo**N**ucle**ase I**) — дезоксирибонуклеаза I;

DSB (**D**ouble-**S**trand **B**reak) — двуцепочечные разрывы;

DTT (**D**i**T**hio**T**hreitol) — (2S,3S)-1,4-бис(сульфанил)бутан-2,3-диол;

EDTA (**E**thylene**D**iamine**T**etraacetic **A**cid) — этилендиаминтетрауксусная кислота;

EMSA (**E**lectrophoretic **M**obility **S**hift **A**ssay) — анализ сдвига электрофоретической подвижности;

Exo I (**E**xonuclease **I**) — ДНК-экзонуклеаза I;

FEN1 (**F**lap **E**ndo**N**uclease **1**) — флэп-эндонуклеаза 1;

Fpg (**F**ormamidopyrimidine-DNA-**g**lycosylase) — формаמידпиримидин-ДНК-гликозилаза;

FRET (**F**örster **R**esonance **E**nergy **T**ransfer) — резонансный перенос энергии Фёрстера;

Gap — разрыв в одной из цепей ДНК, образованный гидролазной активностью APE1, содержащий 3'-ОН и 5'-dRP группы;

hAAG (**h**uman **A**lky**A**denine-DNA-**G**lycosylase) — алкиладенин-ДНК-гликозилаза человека;

hOGG1 (**h**uman **8-O**xo**G**uanine-DNA-**G**lycosylase **1**) — 8-оксогуанин-ДНК-гликозилаза 1 человека;

HD (**H**elical **D**omain) — спиральный автоингибиторный домен PARP1/2/3;

HPF1 (**H**istone **P**ARylation **F**actor **1**) — фактор PARилирования гистонов 1;

HRD (**H**omologous **R**ecombination repair **D**eficiency) — дефицит репарации гомологичной рекомбинации;

LigI (DNA **L**igase **I**) — ДНК-лигаза I;

LigIII α (DNA **L**igase **III** α) — ДНК-лигаза III α ;

MacroD1/2 — ADP-рибозилгликогидролазы, содержащие макродомен;

MAR (**M**ono(**A**DP-**R**ibose)) — моно(ADP-рибоза);

MARилирование (**M**ono(**A**DP-**R**ibosyl)ation) — моно(ADP-рибозилирование);

NAD⁺ — никотинамидадениндинуклеотид;

NCP (**N**ucleosome **C**ore **P**article) — нуклеосома;

NHEJ (**N**on-**H**omologous **E**nd **J**oining) — путь репарации двунитевых разрывов в ДНК через негомологичное соединение концов;

Nick — разрыв одной 5'-3'-фосфодиэфирной связи в дцДНК с образованием свободных 3'-ОН- и 5'-P-концов;

NMN (**N**icotinamide **M**ono**N**ucleotide) — никотинамидмононуклеотид;

NMNAT (**N**icotinamide-**M**ono**N**ucleotide-**A**denylyl**T**ransferase) — никотинамид-мононуклеотид-аденилилтрансфераза;

NP-40 — неионный детергент;

NPS (**N**ucleosome **P**ositioning DNA **S**equence) — нуклеосом-позиционирующие последовательности ДНК;

PAR (**P**oly(**A**DP-**R**ibose)) — поли(ADP-рибоза);

PARилирование (**P**oly(**A**DP-**R**ibosyl)ation) — поли(ADP-рибозилирование);

PARG (**P**oly(**A**DP-**R**ibose)**G**lycohydrolase) — поли(ADP-рибоза)гликогидролаза;

PARP1 (**P**oly(**A**DP-**R**ibose)**P**olymerase **1**) — поли(ADP-рибоза)полимераза 1;

PARP2 (**P**oly(**A**DP-**R**ibose)**P**olymerase **2**) — поли(ADP-рибоза)полимераза 2;

PARP3 (**P**oly(**A**DP-**R**ibose)**P**olymerase **3**) — поли(ADP-рибоза)полимераза 3;

PARP13 (**P**oly(**A**DP-**R**ibose)**P**olymerase **13**) — поли(ADP-рибоза)полимераза 13;

PARPi (**P**oly(**A**DP-**R**ibose)**P**olymerase **i**nhibitors) — ингибиторы PARP;

PLL (**P**oly-**L**-**L**ysine) — поли-L-лизин;

PMSF (**P**henyl**M**ethyl**S**ulfonyl **F**luoride) — фенилметилсульфонил фторид;

PNKP (**P**oly**N**ucleotide **K**inase/3'-**P**hosphatase) — полинуклеотидкиназа/3'-фосфатаза;

Pol β (DNA **P**olymerase **β**) — ДНК-полимераза β ;

Pol δ (DNA **P**olymerase **δ**) — ДНК-полимераза δ ;

Pol ϵ (DNA **P**olymerase **ϵ**) — ДНК-полимераза ϵ ;

Pu (**P**utrescine) — путресцин, 1,4-диаминобутан, биогенный амин;

ROS (**R**eactive **O**xygen **S**pecies) — активные формы кислорода;

SDS (**S**odium **D**odecyl **S**ulfate) — додецилсульфат натрия;

SELEX (**S**ystematic **E**volution of **L**igands by **E**Xponential enrichment) — систематическая эволюция лигандов экспоненциальным обогащением;

SHL (**S**uper **H**elical **L**ocation) — координаты витков относительно гистонового ядра в нуклеосоме;

smFRET (**s**ingle-**m**olecule **F**örster **R**esonance **E**nergy **T**ransfer) — метод в биофизике и молекулярной биологии, используемый для изучения расстояний и динамических взаимодействий между двумя флуорофорами (люминесцирующими молекулами) на уровне одной молекулы;

Spd (**S**permi**d**ine) — спермидин, алифатический полиамин;

SSB (**S**ingle-**S**trand **B**reak) — одноцепочечный разрыв;

TARG1 (**T**erminal **A**DP-**R**ibose **G**lycohydrolase **1**) — терминальная ADP-рибозогликогидролаза 1;

TEMED (**T**Etra**M**ethyl**E**thylene**D**iamine) — N, N, N', N'-тетраметилэтилен-1,2-диамин;

Tris (**t**ris(hydroxymethyl)aminomethane) — 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол;

Tris-HCl (**t**ris(hydroxymethyl)aminomethane **h**ydro**ch**loride) — 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол гидрохлорид;

Tween 20 — неионный детергент;

UDG (**U**racil-**D**NA-**G**lycosilase) — урацил-ДНК-гликозилаза (бактериальная);
UNG (**U**racil-DNA-**N**-**G**lycosilase) — урацил-ДНК-N-гликозилаза (человека);
WGR — домен, богатый триптофаном, глицином и аргинином;
XRCC1 (**X**-ray **R**epair **C**ross-**C**omplementing protein **1**) — белок, продукт гена группы перекрёстной комплементации, ответственной за радиочувствительность клеток;
Zn1-3 — цинковые пальцы 1-3 фрагмента PARP1;
АСМ — атомно-силовая микроскопия;
б/д Н₂О — бидистиллированная вода;
ВОПГ — высокоориентированный пиролитический графит;
ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота;
кДа — килодальтон;
крио-ЭМ — криоэлектронная микроскопия;
нт — нуклеотид;
оцДНК — одноцепочечная ДНК;
ПААГ — полиакриламидный гель;
пн — пара нуклеотидов;
ПСА — персульфат аммония;
ПТМ — посттрансляционная модификация;
РНК — рибонуклеиновая кислота;
ТХУ — трихлоруксусная кислота;
УФ-свет — ультрафиолетовый свет.

1. ВВЕДЕНИЕ

ДНК-зависимые поли(ADP-рибоза)полимеразы (**P**oly(**A**DP-**R**ibose)**P**olymerase, PARP) PARP1, PARP2, PARP3 являются ключевыми ферментами ядра клетки, катализирующими посттрансляционную модификацию белков — поли(ADP-рибозил)ирование (**P**oly(**A**DP-**R**ibosyl)ation, PARилирование) [1]. Эта модификация играет центральную роль в ответе клетки на повреждения ДНК и регулирует привлечение белков-участников репарации [2]. PARP1 и PARP2 активно изучают как главных регуляторов при образовании одноцепочечных разрывов ДНК (**S**ingle-**S**trand **B**reak, SSB) и участников эксцизионной репарации оснований (**B**ase **E**xcision **R**epair, BER) [3]. Показано, что PARP1 и PARP2 необходимы для поддержания геномной стабильности; дисфункция этих ферментов или их гиперэкспрессия напрямую связаны с повышенной чувствительностью к генотоксическому стрессу, накоплением мутаций и онкогенезом [4, 5]. PARP3 менее изучена, но она также вовлечена в процессы репарации ДНК, а именно в устранение двуцепочечных разрывов (**D**ouble-**S**trand **B**reak, DSB) и поддержание стабильности теломер [6, 7].

Актуальность работы

Благодаря своей ключевой роли в системах репарации ДНК белки PARP1 и PARP2 признаны высокоперспективными мишенями для противоопухолевой терапии [8]. Ингибиторы PARP (**P**oly(**A**DP-**R**ibose)**P**olymerase **i**nhibitors, 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 путём гомологичной рекомбинации (**H**omologous **R**ecombination repair **D**eficiency, HRD), например в случае мутации генов *BRCA1/2* [9 – 12]. 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. Это может значительно снизить токсичность PARPi 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. Также мало известно и о влиянии PARилирования 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. Знания о том, как эти ферменты функционируют в условиях хроматиновой организации, как их активность обеспечивает регуляцию репарации и как специфические функции PARP3 дополняют или компенсируют PARP1 и/или PARP2, необходимы для:

- понимания фундаментальных механизмов поддержания целостности генома;
- разработки селективных ингибиторов следующего поколения, нацеленных на конкретные белки семейства PARP (включая PARP3) или их комплексы, что потенциально позволит повысить эффективность терапии и снизить 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 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 (**N**ucleosome **C**ore **P**article, NCP). Впервые в рамках единого исследования проведён комплексный анализ влияния трёх 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 трёх белков семейства PARP (PARP1, PARP2 и PARP3) с моноклеосомой и хроматиноподобными (**C**hromatin-**L**ike **P**article, 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.

Публикации и апробация результатов

По результатам исследования опубликовано 3 экспериментальные статьи и 1 обзор в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus.

Kutuzov M.M., Belousova E.A., Kurgina T.A., **Ukrainitsev 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.

Ukrainitsev 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.

Ukrainitsev 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.

Ukrainitsev 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.

Результаты работы 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» (Шерегеш, 2024), BGRS/SB-2024 (Новосибирск, 2024).

Структура и объём 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.

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.

2. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

ДНК в клетках находится преимущественно в форме нуклеопротеидного комплекса — хроматина. Формирование таких комплексов необходимо не только для компактизации длинной молекулы геномной ДНК, но и для частичной регуляции ДНК-зависимых процессов. Базовой структурной единицей хроматина является нуклеосома (Nucleosome Core Particle, NCP) [13, 14].

2.1. Нуклеосома: структура и функции

На заре изучения структуры и функций хроматина сформировалось представление о нём как о преимущественно статичном комплексе. Однако исследования последних десятилетий трансформируют наши взгляды, смещая парадигму в сторону признания его как динамического комплекса ДНК с белками. Особое место в этих исследованиях занимает изучение структуры и свойств нуклеосомы, поскольку во многом именно эта частица определяет свойства комплекса более высокого уровня упаковки ДНК.

2.1.1. Структура нуклеосомы

NCP содержит ядро, состоящее из октамерного белкового комплекса гистонов образующих «катушку», на которую «намотана» ДНК длиной 145–147 пар нуклеотидов (пн) в 1,67 оборота [15] (**Рис. 1 А**). Для структуры NCP характерна симметрия второго порядка — диада, которая проходит через пару оснований, расположенную в середине последовательности ДНК. Соответствующая пара нуклеотидов аналогично называется диадной [15, 16]. Один из вариантов обозначения расположения нуклеотидов ДНК в составе NCP предполагает локализацию по положению витков ДНК (Super Helical Location, SHL) в составе отрицательных супервитков вокруг гистонов. Каждое местоположение SHL определяется как участок, где большая бороздка обращена к поверхности гистона, а SHL нумеруются от диадной области к концам как SHL –1, –2 ... –7 и SHL +1, +2 ... +7 относительно диады (SHL 0) с периодичностью примерно в 10 пар оснований (**Рис. 2**) [17].

Нуклеотиды ДНК в составе NCP отличаются ориентацией гетероциклических оснований относительно гистонового ядра. Все основания можно классифицировать как «out», «in» или «middle» [18], т.е. обращённые к растворителю сахарофосфатным остовом, обращённые к гистонам сахарофосфатным остовом или занимающие промежуточное положение между «out» и «in» соответственно (**Рис. 3**). Различная ориентация оснований накладывает ограничения на функциональную активность ферментов при их взаимодействии с NCP; при этом наименьшие

затруднения вызывает взаимодействие с «out»-ориентированными основаниями, наибольшие — с «in»-ориентированными [19].

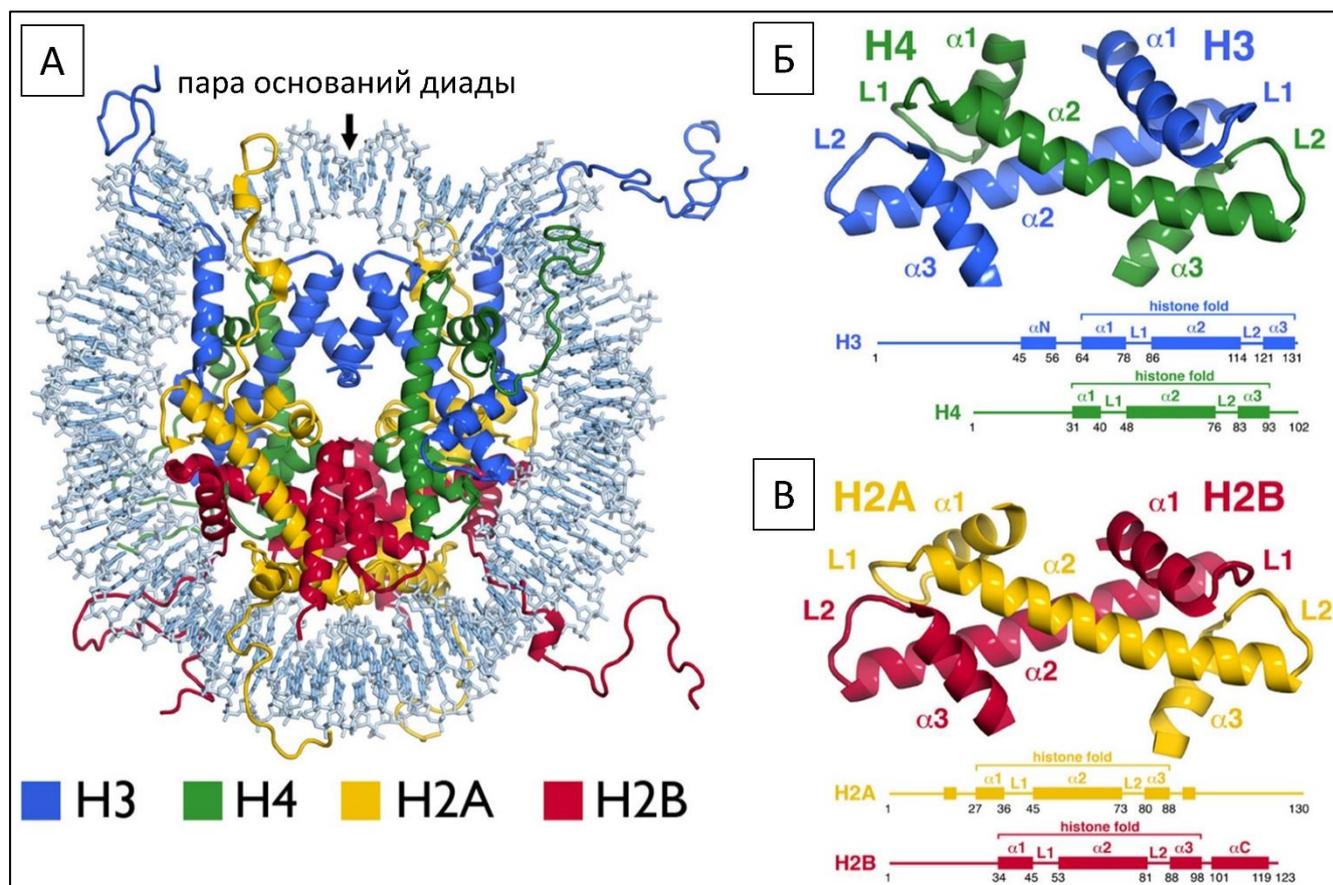


Рис. 1. А — Структура нуклеосомы (NCP) (PDB: ID 1KX5). Б — Схема строения гистонного димера H3-H4 с номерами аминокислот, указывающими границы элементов вторичной структуры. В — Схема строения гистонного димера H2A-H2B с номерами аминокислот, указывающими границы элементов вторичной структуры. Рисунок адаптирован из работы [15].

Ядро NCP состоит из четырёх гетеродимеров гистонов: двух H3-H4 (**Рис. 1 Б**) и двух H2A-H2B (**Рис. 1 В**) [14, 15]. Гистоны являются высококонсервативными белками у эукариот и обладают молекулярной массой $\approx 11-15$ кДа [16]. Гистоны формируют гетеродимеры при помощи водородных связей, электростатических и гидрофобных взаимодействий [14]. Два гетеродимера H3-H4 взаимодействуют друг с другом через четырёхспиральный пучок H3-H3 с образованием тетрамера $(H3-H4)_2$. Гетеродимер H2A-H2B связывается с каждой половиной тетрамера $(H3-H4)_2$ с помощью четырёхспирального пучка H4-H2B [14, 15].

Гистоновый октамер связывает приблизительно 121 пн ДНК, в то время как αN -спираль гистона H3 стабилизирует оставшиеся 13 пн на каждом конце ДНК-дуплекса [20]. Боковые радикалы аргининов гистонов интегрируются в малую бороздку соседних с ними сегментов ДНК. Эти взаимодействия дополнительно стабилизированы электростатическими контактами

между отрицательно заряженными фосфатными группами ДНК и положительно заряженными аминогруппами гистонов [15, 21].

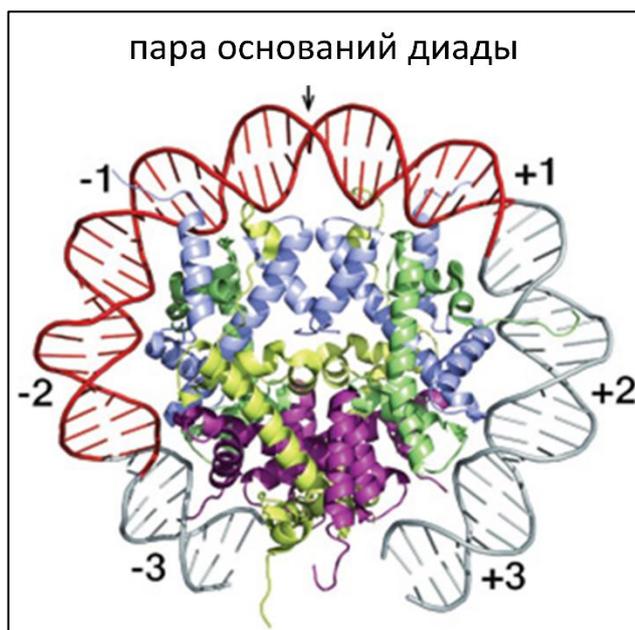


Рис. 2. Структура нуклеосомы (PDB: ID 1KX5) с обозначением SHL.

За пределы NCP выступают 10 гибких «гистоновых хвостов»: по одному N-концевому участку у каждого из восьми коровых гистонов и два С-концевых участка гистонов H2A (**Рис. 1 Б, В**). Удаление этих «хвостов» не нарушает доступность ДНК для гидролиза ферментом дезоксирибонуклеазой I (**DeoxyriboNuclease I**, DNase I) или для воздействия гидроксильных радикалов [22], а кристаллические структуры NCP с такими гистонами не отличаются от структур с полноразмерными вариантами гистонов [23]. В то же время «хвосты» играют ключевую роль в регуляции структуры хроматина [24]. Взаимодействие соседних нуклеосом через «хвосты» гистонов (особенно H4) и кислотную область димеров H2A–H2B («кислый патч») критически важно для формирования структур хроматина более высокого порядка [24, 25]. Например, укорочение «хвоста» гистона H4 нарушает компактизацию, тогда как его наличие стабилизирует укладку хроматина [25]. Посттрансляционные модификации «хвостов» гистонов влияют на компактизацию хроматина [26 – 29], участвуют в привлечении белков-ремоделлеров [30, 31], а также регулируют взаимодействия с эффекторными белками [32 – 34]. Таким образом, несмотря на отсутствие прямого влияния на структуру NCP, «хвосты» критичны для функциональной гибкости хроматина и эпигенетической регуляции [35].

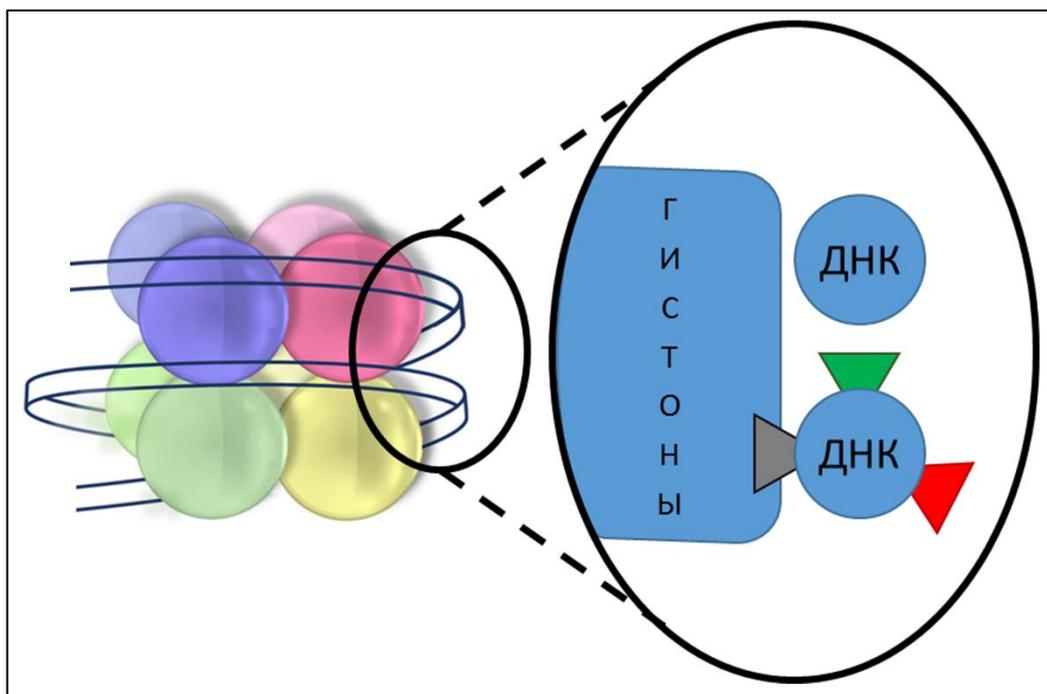


Рис. 3. Схематическое изображение NCP с обозначением ориентации нуклеотидов в молекуле ДНК (область в чёрном овале): красным обозначены «out»-ориентированные азотистые основания; зелёным обозначены «middle»-ориентированные азотистые основания; серым обозначены «in»-ориентированные азотистые основания.

2.1.2. Динамика нуклеосомного комплекса

Традиционные представления об NCP как о статичном комплексе уступили место другой парадигме. Парадигма подчеркивает динамическую природу NCP и напрямую связана с функциональной активностью хроматина. Современные исследования демонстрируют, что нуклеосомы способны ко множеству динамических переходов, включая частичное раскручивание ДНК, скольжение NCP вдоль ДНК и поглощение напряжения суперскрученной ДНК (в процессе транскрипции или репликации), что обеспечивает регуляцию транскрипции, репликации и репарации ДНК [36 – 38].

Известна спонтанная частичная диссоциация (разворачивание/раскручивание) наружных участков ДНК длиной 15–25 пн с каждого конца NCP — «дыхание» ДНК. Этот процесс регулируется взаимодействием гистоновых доменов с ДНК. Например, область H3-«зашелка» (H3-latch) и аргининовые остатки димеров H2A–H2B стабилизируют концы нуклеосомной ДНК, предотвращая её полное раскручивание [39, 40]. При этом раскручивание одного конца ДНК антикооперативно стабилизирует противоположный, что подтверждено методом smFRET [41]. Посттрансляционные модификации белков (ПТМ), такие как ацетилирование гистона H3 по лизину 56 (H3K56), усиливают динамику наружных витков, повышая доступность ДНК для транскрипционных факторов [36].

NCP способны перемещаться вдоль ДНК под действием хроматиновых ремоделеров или внешних сил [42 – 44]. Гистоновый вариант H2A.Z облегчает скольжение, подчеркивая важность состава гистонов в организации хроматина [44]. Наблюдения с помощью метода smFRET [45] свидетельствуют, что нуклеосома может скользить по ДНК благодаря перемещению вдоль неё специфических структурных нарушений — «дефектов скручивания» (twist defects) [46]. Молекулярное моделирование подтверждает, что такие дефекты способствуют выпетливанию ДНК за пределы NCP, облегчая ремоделирование [47, 48].

Динамическая структура NCP компенсирует механическое напряжение ДНК, возникающее при скручивании ДНК во время таких процессов, как транскрипция или репликация. Когда ферменты (например, РНК-полимераза) движутся вдоль ДНК, они могут вызывать её локальную суперспирализацию, что создаёт напряжение. Динамическая структура NCP обеспечивает снижение этого напряжения. Эксперименты с магнитным пинцетом показали, что ДНК, связанная с тетрамером гистонов H3-H4, может временно переходить из канонической левозакрученной вокруг гистонов формы в правозакрученную форму [49, 50]. Это позволяет распределить нагрузку и защитить ДНК от повреждений. Кроме того, длинные массивы нуклеосом демонстрируют повышенную устойчивость к кручению, что поддерживает стабильность хроматина в условиях механического стресса [51]. Таким образом, эти механизмы помогают сохранять целостность генетического материала при активных клеточных процессах.

Было установлено, что на динамику нуклеосом влияют ионный состав окружающего пространства и последовательность нуклеотидов ДНК. Моновалентные катионы, такие как Na^+ , экранируют электростатическое взаимодействие отрицательно заряженной ДНК и гистонов, что приводит к диссоциации ДНК–гистонового комплекса и дестабилизации нуклеосом [52 – 54]. Повышение концентрации ионов K^+ с 10 до 200 мМ снижает силу, необходимую для раскручивания ДНК в составе NCP, с 35 до 24 пН [45]. Двухвалентные катионы, такие как Mg^{2+} , обладают большей аффинностью к фосфатным группам ДНК, усиливая межнуклеосомные взаимодействия и способствуя конденсации хроматиновых фибрилл [55 – 57]. Наличие ионов Mg^{2+} увеличивает жёсткость хроматина и стабилизирует его структуру, что подтверждается исследованиями с использованием магнитного пинцета и smFRET [56 – 59]. Биогенные полиамины (путресцин, спермин и спермидин) в низких концентрациях усиливают компактизацию хроматина, но при избытке вызывают его разрушение за счёт инверсии заряда ДНК [60, 61]. Таким образом, ионный фон регулирует динамику нуклеосом через баланс электростатических взаимодействий между ДНК и гистонами, влияя на доступность ДНК для транскрипционных факторов и ремоделеров [62].

Последовательность ДНК играет ключевую роль в определении стабильности нуклеосом и организации хроматина. Исследования методом систематической эволюции лигандов экспоненциальным обогащением (**S**ystematic **E**volution of **L**igands by **E**Xponential enrichment, SELEX) позволили идентифицировать такие высокоаффинные нуклеосом-позиционирующие последовательности (**N**ucleosome **P**ositioning DNA **S**equences, NPS), как «601», «603» и «605», которые образуют исключительно стабильные комплексы с гистоновыми октамерами *in vitro* [63]. В частности, NPS «601» демонстрирует повышенную устойчивость к механическому раскручиванию, что подтверждено экспериментами с оптическим и магнитным пинцетом: для дестабилизации структуры NCP на базе NPS «601» требуются более высокие силы по сравнению с другими последовательностями ДНК [45, 64]. Стабильность NCP коррелирует с таким физическим свойством ДНК, как гибкость, что способствует формированию контактов с гистонами [64, 65]. Таким образом, последовательность ДНК выступает критическим фактором, модулирующим как локальную стабильность NCP, так и глобальную структуру хроматина.

NCP, будучи основной структурно-функциональной единицей хроматина, играет ключевую роль в компактизации ДНК и регуляции генетических процессов. Её динамическая природа обеспечивает точный контроль доступа к ДНК для процессов транскрипции, репликации и репарации. Стабильность нуклеосом и организация хроматина модулируются последовательностью ДНК, ионным окружением и ПТМ гистонов, что позволяет генетическому материалу адаптироваться к изменяющимся клеточным условиям. Взаимодействия между NCP через гистоновые хвосты и «кислый патч» формируют структуры хроматина более высокого порядка. Нарушение этих процессов может приводить к дисфункции генома, что подчеркивает центральную роль нуклеосомы не только в поддержании целостности ДНК, но и в эпигенетической регуляции клеточной активности.

2.2. Взаимодействие коровых гистонов с апуриновыми/апиримидиновыми сайтами внутри нуклеосомы

Аapurиновые/апиримидиновые (**A**Purinic/**A**Purimidinic, AP) сайты — это участки ДНК, лишённые азотистого основания (пурина или пиримидина). Причины формирования AP-сайтов несколько. Во-первых, из-за химической нестабильности N-гликозидной связи в молекуле ДНК AP-сайты формируются спонтанно: ежедневно в клетке происходит около 2000 – 10000 событий депуринизации и депиримидинизации [66, 67]. Во-вторых, в процессе эксцизионной репарации оснований (**B**ase **E**xcision **R**epair, BER) происходит образование AP-сайтов, как промежуточных продуктов. Это происходит в ходе удаления ферментами неканонических азотистых оснований, например урацила (U) [68, 69].

Окислительный стресс, вызванный активными формами кислорода (**Reactive Oxygen Species, ROS**), значительно усиливает образование AP-сайтов. ROS индуцируют повреждения ДНК, например 8-оксогуанин (8-oxoG), что активирует BER и приводит к накоплению AP-сайтов как промежуточных продуктов репарации. Экспериментальные данные демонстрируют, что AP-сайты чаще локализуются в регионах, подверженных окислительным повреждениям, включая теломеры [70, 71]. В процессе жизнедеятельности клетки ежедневно образуется около 15000 – 30000 AP-сайтов [72, 73]. Однако эти показатели меняются в зависимости от типа ткани, уровня метаболизма и активности репарационных систем. Например, ткани с высоким уровнем метаболизма, такие как печень, могут содержать повышенное количество AP-сайтов в геноме из-за генерации ROS в ходе окислительных процессов [74].

2.2.1. Реакционноспособность и генотоксичность AP-сайтов

AP-сайты представляют серьёзную угрозу для стабильности генома. Во-первых, они нарушают структуру ДНК: дестабилизируют двойную спираль, влияют на формирование G-квадруплексов и препятствуют связыванию транскрипционных факторов [75, 76]. Во-вторых, они блокируют репликацию и транскрипцию: ДНК-полимеразы и РНК-полимеразы останавливаются на AP-сайтах, что приводит к ошибкам репликации и нарушению экспрессии генов [77 – 79]. Кроме того, реакционно-активная альдегидная форма AP-сайта взаимодействует с аминокислотными группами белков, формируя устойчивые ДНК-белковые сшивки, которые сложно репарировать [80]. Наконец, одноцепочечные разрывы (**Single-Strand Break, SSB**), возникающие при обработке AP-сайтов апуриновой/апириимидиновой эндонуклеазой 1 (**APurinic/APyrimidinic Endonuclease 1, APE1**), могут превращаться в двуцепочечные разрывы (**Double-Strand Break, DSB**) при образовании AP-сайтов в двух цепях ДНК (в пределах 1–2 витков спирали), что способствует нарушению стабильности генома [81]. Аналогичный процесс может происходить и без участия ферментов из-за гидролиза AP-сайтов.

2.2.2. AP-сайты в нуклеосомном контексте

AP-сайты не только нарушают структурную целостность двойной спирали, но и оказывают значительное влияние на упаковку ДНК в нуклеосомах, где взаимодействие с гистонами играет ключевую роль в стабильности и репарации этих повреждений. Например, в свободной ДНК AP-сайты более стабильны, тогда как в нуклеосомах их стабильность снижается в 50 раз из-за взаимодействия с ε-аминогруппами лизинов «хвостов» гистонов [80, 82, 83] (**Рис. 4**).

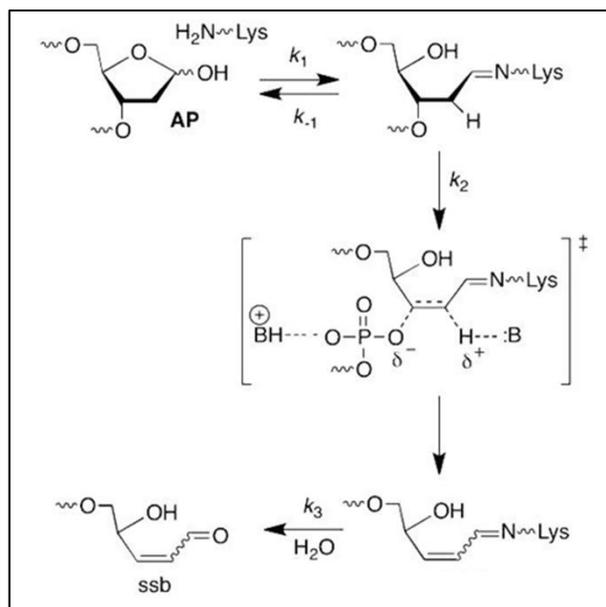


Рис. 4. Схема разрушения AP-сайта по гидролитическому механизму аминогруппой лизина. Рисунок адаптирован из работы [82].

Эффективность этого процесса зависит от локализации AP-сайта относительно диадной оси нуклеосомы. Наибольшая активность наблюдается при расположении этих повреждений вблизи N-концов гистонов H3, H4 и H2B [80, 84, 85]. ПТМ гистонов, такие как ацетилирование, влияют на взаимодействие AP-сайтов с гистонами [86].

AP-сайты могут инициировать образование ДНК-гистоновых сшивок (**D**NA-**H**istone **C**ross-link, DHC) — ковалентных связей между альдегидной группой повреждения и аминогруппами гистонов [87]. DHCs формируются под действием эндогенных (ROS, ацетальдегид, формальдегид и др.) или экзогенных (УФ-свет, цисплатин и др.) факторов [80, 87 – 90]. DHCs нарушают динамику хроматина, блокируя доступ к ДНК для репликационных и репарационных систем [19]. Накопление DHCs вызывает остановку репликативных вилок, ошибки в процессе транскрипции, активацию чек-поинтов клеточного цикла, хромосомные aberrации и накопление DSBs, что угрожает геномной стабильности [89, 91]. В отсутствие репарации DHCs нарушают топологию хроматина, влияя на пространственную организацию генома [91]. Это может приводить к потере целостности теломерных участков, активации онкогенов и инактивации супрессоров опухолей, способствуя канцерогенезу [92].

DHCs относятся к сложнорепарируемым белок-нуклеиновым аддуктам. Их репарация требует кооперации протеолитических систем и путей репарации ДНК [87]. Неясной остаётся роль взаимодействия гистонов с AP-сайтами в процессе привлечения белков репарации к месту повреждения.

2.3. Экцизионная репарация оснований в контексте нуклеосом

Репарация ДНК — это совокупность биохимических процессов, направленных на устранение повреждений, возникающих в результате воздействия эндогенных и экзогенных факторов [93]. Нарушения в этих процессах могут привести к накоплению мутаций, геномной нестабильности и заболеваниям, включая рак, нейродегенеративные расстройства и преждевременное старение [94]. Основная цель функционирования систем репарации — восстановление той последовательности ДНК, которая существовала до её повреждения, или минимизация изменений при невозможности полного восстановления структуры. В настоящее время выделяют пять основных путей репарации ДНК, которые специализированы на исправлении повреждений определенного типа [95 – 99].

Процесс BER обеспечивает удаление наиболее часто образующихся в процессе нормальной жизнедеятельности клетки повреждений, к которым относят небольшие повреждения, не вызывающие значительных искажений структуры двойной спирали ДНК (**Рис. 5**). К ним относятся окисленные основания, дезаминированные основания, алкилированные основания и AP-сайты [95, 100].

В разделе 2.2. подробно описан один из видов повреждений — AP-сайт. Это наиболее распространённый тип повреждений в клетке, возникающий в результате спонтанного гидролиза N-гликозидных связей или действия ДНК-гликозилаз. В процессе жизнедеятельности клетки ежедневно образуется около 10000 – 30000 AP-сайтов, что создаёт значительную угрозу геномной стабильности. Биохимические исследования с использованием синтетических ДНК-субстратов, содержащих специфические повреждения, позволили реконструировать BER *in vitro* и идентифицировать ключевые ферменты. Основные этапы BER приведены на **Рис. 5**:

- 1) удаление повреждённого основания ДНК-гликозилазой (например, урацил-ДНК-N-гликозилаза (**U**racil-DNA-**N**-**G**lycosilase, UNG) для урацила);
- 2) процессинг AP-сайта;
- 3) синтез нового нуклеотида ДНК-полимеразой β (DNA **P**olymerase **β** , Pol β) (короткозаплаточный путь) или ДНК-полимеразой δ/ϵ (DNA **P**olymerase **δ/ϵ** , Pol δ/ϵ) (длиннозаплаточный путь), удлинение цепи;
- 4) лигирование разрыва ДНК-лигазой III α (DNA **L**igase **III α** , LigIII α) в комплексе с XRCC1 (**X**-ray **R**epair **C**ross-**C**omplementing protein **1**) (короткозаплаточный путь) или удаление flap-структуры флэп-эндонуклеазой 1 (**F**lap **E**ndo**N**uclease **1**, FEN1) с последующим лигированием разрыва ДНК-лигазой I (DNA **L**igase **I**, LigI) (длиннозаплаточный путь).

В BER выделяют два основных пути: короткозаплаточный (short-patch BER) и длиннозаплаточный (long-patch BER). Их активация и регуляция зависят от типа повреждения, мутаций, уровня экспрессии ключевых белков BER и стадии клеточного цикла [101, 102]. Различия двух путей проявляются в длине заменяемого участка ДНК, используемых ферментах

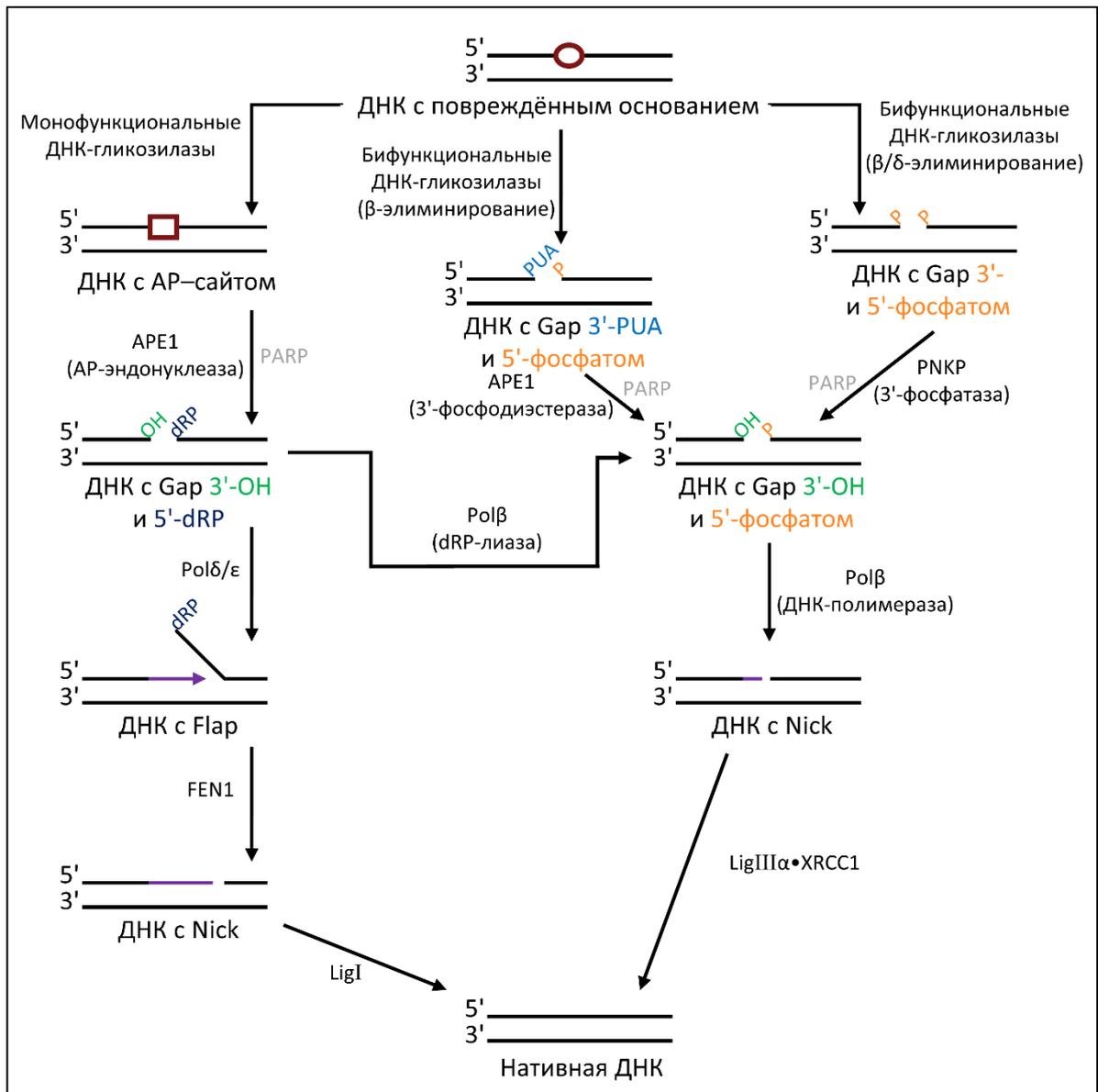


Рис. 5. Схема процесса BER. Овалом с красным контуром обозначено повреждённое азотистое основание. Прямоугольником с красным контуром — AP-сайт. 3'-PUA — 3'-фосфо- α,β -ненасыщенный альдегид (3'-phospho- α,β -unsaturated aldehyde); 5'-dRP — 5'-дезоксирибозофосфатная группа (5'-deoxyRibose Phosphate); APE1 — апуриновая/апиримидиновая (AP) эндонуклеаза 1; PARP — поли(ADP-рибозо)полимераза; PNKP — полинуклеотидкиназа / 3'-фосфатаза; Pol $\beta/\delta/\epsilon$ — ДНК-полимераза $\beta/\delta/\epsilon$; FEN1 — флэп-эндонуклеаза 1; LigI — ДНК-лигаза I; LigIII α — ДНК-лигаза III α .

и условиях их активации. В процессе короткозаплаточного пути встраивается 1 нуклеотид: Pol β встраивает недостающее комплементарное основание и одновременно удаляет 5'-dRP остаток, образованный в процессе гидролиза AP-сайта ферментом APE1, благодаря своей лиазной

активности, после чего LigIII α в комплексе с XRCC1 завершает репарацию. С другой стороны, в результате длиннозаплаточного пути происходит встраивание 2–10 нуклеотидов. Этот путь реализуется, когда dRP-остаток химически модифицирован (например, окислен) и не может быть удален Pol β . В этом случае Pol δ/ϵ (реже Pol β) синтезирует более длинный участок ДНК, вытесняя исходную цепь и формируя одностороннюю «лопастку» (flap). Этот вытесненный фрагмент удаляется эндонуклеазой FEN1, а разрыв запечатывается ДНК-лигазой I. Длиннозаплаточный путь требует участия дополнительных факторов, таких как PCNA, и чаще активен в S-фазе клеточного цикла.

2.3.1. Влияние нуклеосомной организации на ферментативную активность участников эксцизионной репарации оснований

Эукариотическая ДНК в клетке представлена в виде хроматина, структурная организация которого может создавать препятствия при реализации многих ДНК-зависимых процессов, в частности механизмов репарации. Гистоны в составе NCP или линкерные гистоны могут конкурировать за субстрат с ДНК-связывающими факторами. Помимо гистонов, существуют и так называемые негистоновые белки хроматина. Они не только выполняют структурные функции, но и могут принимать опосредованное участие в процессах транскрипции, репарации, ПТМ гистонов и ремоделинге хроматина [103, 104].

Был проведен ряд исследований *in vitro* в попытке оценить влияние нуклеосомной организации на активность ферментов BER [105]. В большинстве этих исследований были использованы мононуклеосомы в качестве субстратов. Была протестирована индивидуальная активность белков системы BER или их совместная активность с другими белками-участниками с использованием реконструированных нуклеосом с различными повреждениями. В рамках данной диссертационной работы рассматривался короткозаплаточный путь BER, поэтому участники длиннозаплаточного пути в литературном обзоре рассматриваться не будут.

2.3.1.1. ДНК-гликозилазы

В целом, для всех ферментов BER критично расположение их сайта связывания с ДНК в NCP как по удалённости от пары оснований диады, так и по ротационной ориентации («out», «in», «middle»; п. 2.1.1.; Рис. 3). Основания, расположенные в «out» ориентации, наиболее доступны [106]. Например, урацил-ДНК-гликозилаза (Uracil-DNA-Glycosylase, UDG) удаляет урацил в позиции «out» с эффективностью 99 %, а в позиции «middle» и «in» выход продукта падает до 19 % и 15 %, соответственно. Малые ферменты UDG и hAAG (25 и 24 кДа соответственно) имеют компактную структуру и создают умеренный изгиб ДНК (45° и 22° соответственно), что не является препятствием для взаимодействия этих ферментов с ДНК в нуклеосомном контексте [106]. С другой стороны, более крупные ферменты hOGG1 и Fpg (38 и

30 кДа, соответственно) обладают большим размером и способствуют сильному изгибу ДНК (до 70°). Их активность в нуклеосомах подавлена (выход продукта ферментативной реакции $\leq 10\%$ для любой ориентации основания), так как гистоновое ядро блокирует доступ к повреждению. Большой размер белков и их значительное влияние на геометрию ДНК-дуплекса в процессе гидролиза повреждённого основания коррелирует с механизмом их работы: монофункциональные (UDG, hAAG) — удаляют только повреждённое основание, а бифункциональные (hOGG1, Fpg) — дополнительно расщепляют сахаро-фосфатный остов. В зависимости от типа повреждения работа ДНК-гликозилаз определяется геометрией ДНК-субстрата. Например, hAAG эффективно удаляет 1,N⁶-этенoadенин, но не гипоксантин в нуклеосомах. Это связано с тем, что распознавание гипоксантина требует определённой геометрии ДНК-дуплекса [106]. Действие некоторых гликозилаз, например hOGG1, зависит от комплементарного основания. В нуклеосомах взаимодействие с противоположным основанием может блокироваться гистонами [106]. В работе [106] авторы использовали модельные нуклеосомные субстраты с повреждениями, расположенными вблизи пары оснований диады SHL 0 — самой стабильной части NCP. Динамика структуры нуклеосомы предполагает высвобождение концов молекулы ДНК за пределы NCP в диапазоне 18-28 пн (SHL $\pm 7 - \pm 4$) [39]. Таким образом, ещё одним лимитирующим фактором является положение повреждения относительно пары оснований диады: чем это расстояние меньше, тем ниже скорость протекания ферментативной реакции [19, 107, 108].

2.3.1.2. Апуриновая/апириимидиновая эндонуклеаза I

Для APE1 наблюдаются схожие закономерности с ДНК-гликозилазами по отношению к ориентации и расположению AP-сайта в NCP. AP-сайты в «out» ориентации гидролизуются с эффективностью, сравнимой с таковой для свободной ДНК [109]. Для распознавания AP-сайта APE1 создаёт изгиб ДНК ($\sim 20^\circ$), что позволяет вывести повреждение за пределы спирали ДНК. С использованием крио-ЭМ показано, что APE1 изгибает нуклеосомную ДНК, «выталкивая» AP-сайт из спирали в активный центр. Этот процесс требует минимальных структурных изменений гистонового октамера. Такой механизм взаимодействия APE1 с AP-сайтом ДНК объясняет снижение активности для «middle»- и «in»-ориентированных AP-сайтов [109, 110]. Однако возможность взаимодействия аминокислотных групп белков с AP-сайтом (п. 2.2.) накладывает существенное ограничение на активность APE1. Константа скорости гидролиза «out»-ориентированного AP-сайта $\sim 500 \text{ с}^{-1}$, а «in»-ориентированного AP-сайта $\sim 0.12 \text{ с}^{-1}$. Повреждения располагались на равном расстоянии от области диады — SHL -6 [109, 110]. Учитывая динамичную структуру нуклеосомного комплекса [39], такое существенное различие в активности APE1 свидетельствует о взаимодействии гистонов с AP-сайтом, что не позволяет

диссоциировать концы молекулы ДНК в пределах NCP и тем самым нарушается взаимодействие APE1 с субстратом.

2.3.1.3. ДНК-полимераза β

Для Pol β ротационная ориентация не играет роли: её активность подавлена полностью, независимо от положения повреждения в области SHL 0 [18]. Это связано с природой взаимодействия активного центра Pol β с ДНК. В процессе синтеза комплементарной цепи ДНК Pol β значительно изгибает ДНК-дуплекс ($\sim 90^\circ$), что невозможно в нуклеосомном контексте. Однако в другом исследовании авторы продемонстрировали ферментативную активность Pol β в области от SHL -6 до SHL -2 , которая снижалась при приближении к области SHL 0 [84]. В целом существенные различия между этими работами связаны как с расположением урацила по отношению к парам оснований диады, так и с используемым в работах ДНК-сиквенсом: в работе Beard В.С. и соавторов применяли ДНК с TG-мотивом, который жестко фиксирует ДНК на гистоновом октамере, минимизируя подвижность ДНК, а в работе Nilsen Н. и соавторов использовали более динамичную 5S-рДНК [18, 84]. Белок XRCC1 взаимодействует с Pol β и усиливает её ферментативную активность [111]. Однако авторы статьи [84] не выявили влияния XRCC1 на эффективность Pol β в контексте нуклеосом. Возможно, это обусловлено структурными особенностями используемых в работе нуклеосом.

2.3.1.4. ДНК-лигаза III α

Для фермента LigIII α существенное влияние оказывает расположение азотистого основания относительно пары оснований диады, тогда как ротационная ориентация не оказывала влияния [112, 113]. Caldecott К. W. с соавторами впервые сообщили о взаимодействии между LigIII α и XRCC1 и показали, что оно имеет большое значение для осуществления активности LigIII α , поскольку отсутствие XRCC1 приводит к существенному снижению активности LigIII α в короткозаплаточном пути BER [114, 115]. Активность комплекса LigIII α •XRCC1 исследовали с использованием различных nick-содержащих NCP [84, 112, 113]. LigIII α без XRCC1 проявляла ограниченную активность независимо от положения разрыва. Наличие XRCC1 приводило к увеличению лигирующей активности LigIII α [112]. Эффективность реакции лигирования возрастала приблизительно в 2,5 раза при перемещении сайта повреждения из положения SHL -3 в SHL -5 [113]. Это указывает на зависимость каталитической активности LigIII α •XRCC1 от расположения повреждения относительно диады нуклеосомы — наиболее стабильного региона, где ДНК максимально контактирует с гистоновым октамером. Увеличение концентрации комплекса LigIII α •XRCC1 приводило к большей эффективности лигирования [112]. При этом повышение концентрации способствовало и нарушению стабильности нуклеосомы с последующим разрушением нуклеосомного комплекса [112]. Такое разрушение не являлось

необратимым для нуклеосомного комплекса [113]. Напротив, авторами работы [84] не было зафиксировано каких-либо значимых изменений активности LigIII α после добавления белка XRCC1. Возможно, это обусловлено структурными особенностями используемых нуклеосом.

Несмотря на значительный прогресс в изучении отдельных стадий BER в контексте нуклеосом, молекулярные механизмы, регулирующие координацию и эффективность этого процесса в условиях хроматиновой упаковки, остаются недостаточно раскрытыми. В частности, структурные ограничения нуклеосомы, такие как позиционирование повреждения относительно диады и ротационная ориентация ДНК, драматически влияют на доступность субстрата для ферментов BER. Эти ограничения усугубляются для некоторых ферментов, например Pol β , требующих значительной деформации ДНК, что может полностью подавлять их активность в нуклеосомах. Важную роль в преодолении хроматиновых барьеров играют белки-координаторы, такие как XRCC1. Взаимодействие XRCC1 с Pol β и LigIII α усиливает их активность *in vitro*, однако в нуклеосомных системах эффективность этого взаимодействия зависит от динамики ДНК. Например, в нуклеосомах с последовательностью 5S-рДНК ДНК частично высвобождается из гистонового октамера, и при добавлении XRCC1 повышается эффективность лигирования разрывов [113]. Это подчеркивает, что XRCC1 действует не изолированно, а функционирует в комплексе с другими факторами, включая APE1, Pol β , LigIII α , PARP1 и PARP2 [111, 116, 117]. Белки поли(ADP-рибоза)полимеразы (**P**oly(**A**DP-**R**ibose)**P**olymerase, PARP): PARP1 и PARP2, — активируемые при обнаружении разрывов ДНК, играют ключевую роль в привлечении репарационных ферментов. Через синтез поли(ADP-рибозы) (**P**oly(**A**DP-**R**ibose), PAR) PARP1 и PARP2 формируют репарасому — динамичный белковый комплекс, включающий белки XRCC1, APE1, LigIII α и Pol β [111, 118]. Домен BRCT1 белка XRCC1 специфически связывается с PAR, что обеспечивает направленную сборку репарационного комплекса вблизи повреждения. Такая координация критична для эффективной репарации, особенно в условиях хроматиновой компактизации, где доступ к повреждениям ограничен.

Учитывая центральную роль PARP1, PARP2 и PARP3 в обнаружении повреждений ДНК и координации репарационных и других процессов в хроматине, их изучение становится ключевым для понимания механизмов адаптации BER к хроматиновой структуре. Эти белки выступают не только первичными сенсорами повреждений, но и модулируют ремоделирование нуклеосом через синтез PAR [119], облегчая доступ репарационных ферментов к повреждениям [120]. Более того, PARP-зависимая активация XRCC1 и последующее привлечение компонентов BER подчеркивают функцию PARP в сборке репарасомы. Углубленный анализ структурных и функциональных особенностей PARP1, PARP2 и PARP3 позволит раскрыть, как эти белки

преодолевают барьеры хроматиновой упаковки и обеспечивают эффективное восстановление ДНК в различных клеточных контекстах.

2.4. Белки PARP1, PARP2, PARP3 — сенсоры повреждений ДНК и регуляторы репарации

ADP-рибозилирование — одна из ПТМ, происходящих в клетке, обеспечивающая функционирование многих клеточных процессов, таких как репарация, репликация, транскрипция, регуляция клеточного цикла, апоптоз. Катализируют эту реакцию преимущественно белки семейства ARTD — ADP-RibosylTransferase Diphtheria toxin-like. Первым открытым белком была поли(ADP-рибоза)полимераза 1 с сокращением PARP1, положившая начало новому семейству с названием PARP. В данной работе мы будем придерживаться устоявшихся названий белков PARP. Белки PARP образуют обширное семейство, насчитывающее 17 представителей, содержащих общий консервативный каталитический домен [3]. На сегодняшний день лишь для PARP13 отсутствуют данные о каталитической активности. Остальные белки этого семейства при реализации своей каталитической функции осуществляют перенос одного или нескольких остатков ADP-рибозы на молекулы-мишени (гистоны, ДНК, различные ферменты систем репарации и сами белки PARP), используя в качестве субстрата молекулы NAD^+ [121 – 127].

Эти белки играют важную роль во многих ядерных процессах, включая ремоделинг хроматина, транскрипцию, репарацию ДНК, репликацию, транспорт, поддержание целостности теломер и трансляцию [128 – 130]. На сегодняшний день известно, что в клеточном ответе на повреждения ДНК участвуют только три представителя семейства: PARP1, PARP2, PARP3, — которые в основном локализованы в ядре и являются ДНК-зависимыми белками, т.е. для активации их каталитической функции необходимо взаимодействие с молекулой ДНК [3, 131, 132]. Хотя эти три белка относятся к одному семейству, они отличаются по своему строению (**Рис. 6**), структуре продукта каталитической реакции и принимают участие в различных клеточных процессах. PARP1, PARP2 и PARP3 — это ферменты, которые обладают высоким сродством к поврежденной ДНК [130, 133]. Активируясь на повреждениях ДНК, PARP1 и PARP2 катализируют синтез PAR с использованием NAD^+ [1], тем самым осуществляя ковалентную аутомодификацию PARP, а также трансмодификацию других белков-акцепторов. PARP3 присоединяет мономер ADP-рибозы к своим мишеням [126, 134].

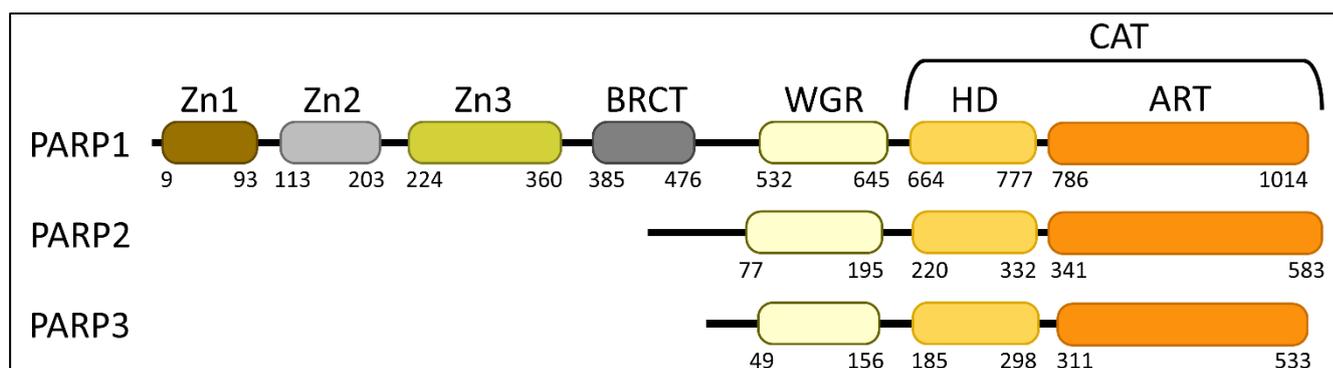


Рис. 6. Схема доменной организации белков PARP1, PARP2 и PARP3 с номерами аминокислот, указывающими границы доменов (в соответствии с записями Uniprot P09874, Q9UGN5 и Q9Y6F1). Zn1/2/3 — домены цинковых пальцев; BRCT — семейство доменов названных по С-концевому домену белка BRCA1; WGR — домен, названный по входящим в его состав аминокислотным остаткам триптофана (W), глицина (G), аргинина (R); CAT — каталитический домен, в который входят следующие субдомены: HD (спиральный субдомен) и ART (ADP-рибозатрансферазный субдомен). Рисунок адаптирован из работы [135].

2.4.1. ДНК-зависимые белки PARP1, PARP2, PARP3

PARP1 — наиболее изученный член семейства PARP, играющая ключевую роль в репарации ДНК. Белок имеет молекулярную массу около 116 кДа и состоит из шести доменов: трёх цинковых пальцев (Zn1, Zn2, Zn3), BRCT, WGR и CAT [136]. Цинковые пальцы Zn1, Zn2, Zn3 отвечающих за связывание с ДНК [137, 138]. Домен BRCT опосредует белок-белковые контакты и способствует связыванию с ДНК, а также содержит сайты авто-поли(ADP-рибозил)ирования (**P**oly(**A**DP-**R**ibosyl)ation, ПАРилирование) [139]. Домен WGR, названный по входящим в его состав аминокислотным остаткам триптофана (W), глицина (G) и аргинина (R), играет важную роль в ДНК-зависимой активации PARP1, поскольку делеция этого домена приводит к образованию неактивной формы фермента [140]. Домен CAT — каталитический домен, является наиболее консервативным среди представителей семейства PARP и состоит из спирального субдомена (**H**elical **D**omain, HD) и субдомена ADP-рибозилтрансферазы (**A**DP-**R**ibosyl**T**ransferase, ART) с консервативным триадным мотивом HYE (гистидин, H862; тирозин, Y896; глутамат, E988), ответственным за перенос ADP-рибозы [3, 141, 142]. Было обнаружено, что домены Zn1, Zn2, Zn3, BRCT и WGR участвуют во взаимодействии с ДНК [136, 139, 143 – 145]. Автоингибиторный HD мотив в каталитическом домене участвует в регуляции сродства белка к NAD^+ . Свободный фермент PARP1 обладает низким сродством к молекуле NAD^+ , однако при связывании с поврежденной ДНК цинковых пальцев и WGR в каталитическом домене фермента происходят конформационные перестройки, автоингибиторный субдомен перестраивается, в результате чего происходит более эффективное связывание NAD^+ в каталитическом домене, и это ускоряет протекание реакции ПАРилирования [142, 146, 147]. Домен ART обеспечивает (ADP-рибоза)трансферазную активность фермента на аминокислоты белков-акцепторов PAR [148].

PARP2, в отличие от PARP1, не содержит цинковых пальцев и BRCT-домена, но сохраняет WGR и CAT домены (**Рис. 6**). Её активация зависит от связывания с ДНК через домен WGR, распознающий 5'-фосфатные группы DSB и SSB [149]. При помощи Крио-ЭМ показан комплекс PARP2 с нуклеосомой, в котором PARP2 демонстрирует способность связывать две нуклеосомы через WGR-домен по тупым концам ДНК при условии, что тупые концы содержат 5'-фосфатные группы [150]. Кроме того, N-конец содержит SAP-мотив, предположительно участвующий в связывании ДНК/РНК. У человека SAP-мотив, вероятно, находится в неупорядоченной конформации [151]. Каталитический домен PARP2 включает уникальную акцепторную петлю, способствующую синтезу более разветвлённого продукта PAR по сравнению с PARP1 [152].

Белок PARP3 — наименьший из трёх белков (**Рис. 6**). Структура PARP3 включает WGR-домен, взаимодействующий с 5'- и 3'-фосфатными группами разрывов ДНК [126, 127]. Существенное отличие этого белка от белков PARP1 и PARP2 заключается в отсутствии D-петли CAT-домена, что ограничивает активность PARP3 до моно(ADP-рибозил)ирования (Моно(ADP-Рибосил)ация, MARилирования) — присоединяет мономер ADP-рибозы к своим мишеням [135].

Все три белка содержат WGR-домен, необходимый для связывания с повреждённой ДНК, и CAT-домен с консервативным HYE-мотивом [149, 153]. Активация происходит через аллостерические изменения HD-субдомена при связывании с ДНК [146]. При этом три белка отличаются как по доменной организации, так и по строению функционально-равнозначных доменов. Таким образом, структурные различия определяют специализацию белков PARP в поддержании геномной стабильности, что делает их важными мишенями для терапии рака [154].

PARP1 синтезирует до 90 % всего клеточного PAR в ответ на повреждение ДНК. Также этот белок считается одним из ключевых регуляторов репарации ДНК и целого ряда других клеточных процессов: транскрипции [155], формировании веретена деления [156] и формировании ядрышек [157]. Белок PARP1 способен распознавать различные повреждения ДНК, в том числе интермедиаты процесса BER. PARP1 активируется при взаимодействии с повреждениями и катализирует реакцию PARилирования в ответ на их появление [158 – 162]. PARилирование — это обратимая ПТМ белков полимерной цепью, состоящей из остатков ADP-рибозы, осуществляемая белками PARP (**Рис. 7**). Звенья ADP-рибозы в линейном полимере соединены гликозидными связями, которые образуются между 2'-О атомом рибозы, несущей

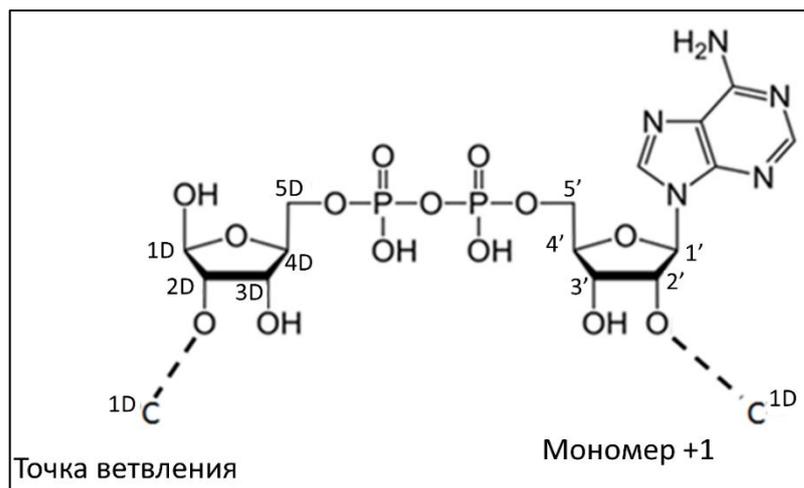


Рис. 7. Строение мономера ADP-рибозы

аденин, и C-1D атомом остатка рибозы следующего мономера. В точках ветвления та же самая связь образуется между O-2D и C-1D атомами двух остатков рибозы [163, 164]. PARилирование является динамическим процессом — время полужизни полимера в клетке составляет менее одной минуты. Деградация полимера или мономера ADP-рибозы осуществляется представителями двух эволюционно различных семейств гидролаз ADP-рибозы (**Рис. 8**): макродоменами и гидролазами ADP-рибозил-акцепторов (**A**DP-**R**ibosyl-**a**ccептор **H**ydroлаzes, ARH) [165]. Члены семейства макродоменов включают макродоменные белки (MacroD1 и MacroD2), терминальную ADP-рибозагликогидролазу (**T**erminal **A**DP-**R**ibose **G**lycohydroлаze **1**, TARG1) и поли(ADP-рибоза)гликогидролазу (**P**oly(**A**DP-**R**ibose)**G**lycohydroлаze, PARG). Семейство ARH состоит из трех членов (ARH1, ARH2 и ARH3), хотя ARH2 не обладает очевидной ферментативной активностью [166]. Гидролиз цепей PAR выполняется в основном PARG, тогда как гораздо менее активная ARH3, предположительно, служит в качестве резервного аналога PARG в этом процессе и способна удалять MAR по остаткам серина. При этом PARG не способна гидролизовать терминальные остатки MAR [167]. Белок ARH1 гидролизует только MAR, опосредуя высвобождение ADP-рибозы из остатков аргинина целевого белка. MacroD1, MacroD2 и TARG1 гидролизуют MAR по остаткам глутамата и аспартата субстрата. Также TARG1 способна расщеплять цепи PAR.

PARP2 также катализирует синтез PAR, и её функции частично перекрываются с функциями PARP1. Белок PARP2 активируется при взаимодействии с одноцепочечными разрывами, частичными ДНК-дуплексами с одно- и двунуклеотидными брешами и флэп-структурами [133, 149, 161, 162, 168 – 170]. PARP3 способна катализировать присоединение

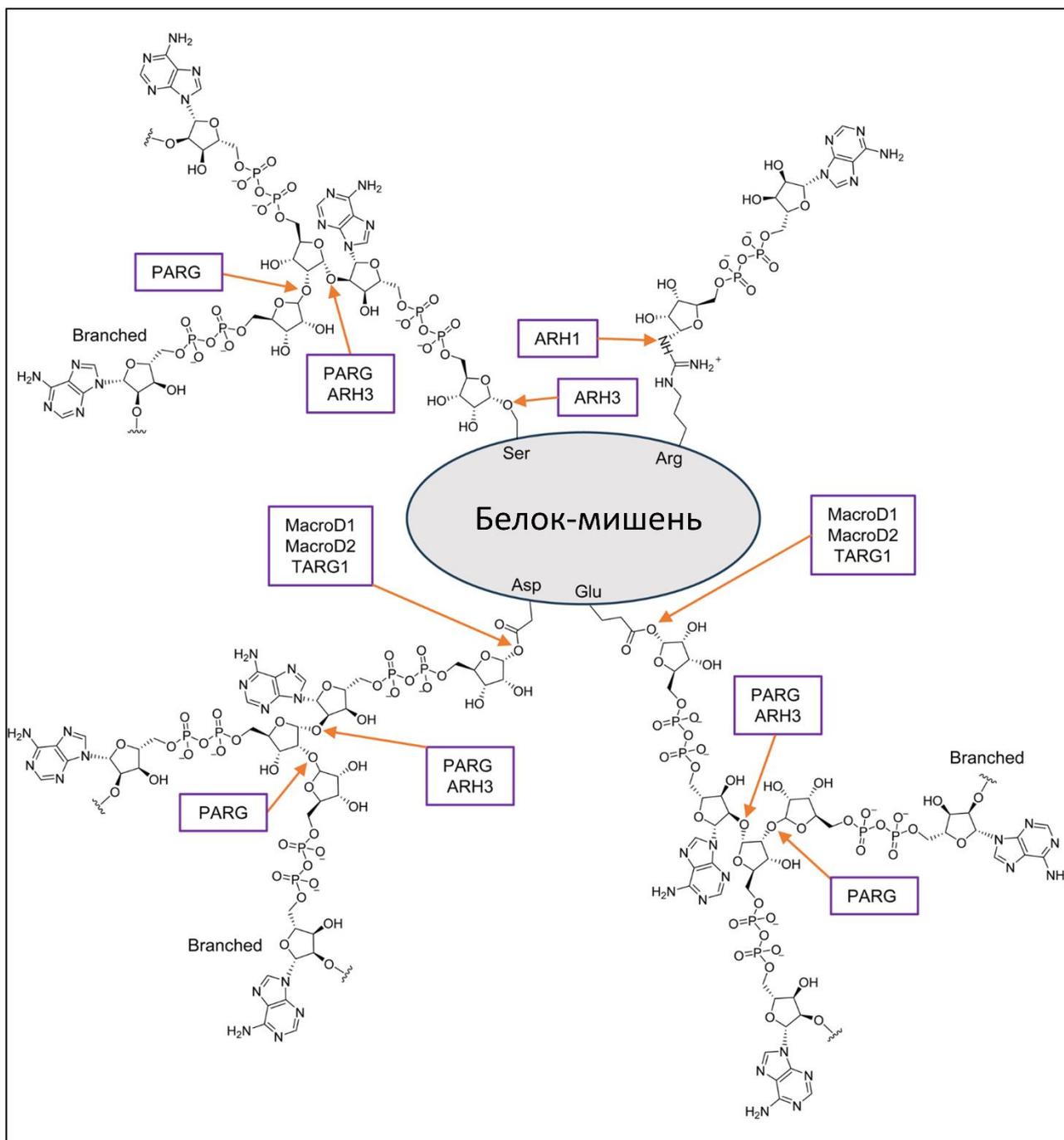


Рис. 8. Катаболизм ADP-рибозилирования. ADP-рибозилированные белки со специфическими сайтами расщепления для каждой ADP-рибозогидролазы. PARG является основным ферментом, разрушающим PAR, катализируя гидролиз гликозидной связи цепи PAR как в точках ветвления, так и в точках удлинения цепи. Однако он не способен расщеплять терминальную ADP-рибозу из моно(ADP-рибозил)ированных белков. ARH3 катализирует гликозидный гидролиз цепей PAR, образуя свободную ADP-рибозу и короткие цепи PAR. Он также обладает гидролизующей активностью моно(ADP-рибозил)ирования, в частности по остаткам серина. ARH1 расщепляет моно(ADP-рибозил)ированные субстраты, модифицированные по остаткам аргинина. MacroD1, MacroD2 и TARG1 гидролизуют моно(ADP-рибозу) на остатках аспартата и глутамата целевых белков, а TARG1 также может расщеплять цепи PAR. Рисунок адаптирован из работы [165].

только одного остатка ADP-рибозы. Было показано, что PARG обеспечивает селективное распознавание дунитевых разрывов и может выступать в роли сенсора одноцепочечных

разрывов, но, в отличие от PARP1, PARP3 активируется *in vitro* только в том случае, если 5'-конец разрыва содержит фосфатную группу (5'-P) [6, 149, 171, 172]. Кроме того, было показано, что PARP1, PARP2 и PARP3 катализируют ADP-рибозилирование ДНК и что реакция идет наиболее эффективно при взаимодействии с ДНК-дуплексами, содержащими однонуклеотидный Gap с каноническими 5'-P и 3'-ОН группами [124, 126, 127].

2.4.2. Взаимодействие PARP1, PARP2, PARP3 с NCP

Несмотря на значительный прогресс в изучении роли PARP1, PARP2 и PARP3 в репарации ДНК, большинство исследований их ферментативной активности и взаимодействия с ДНК проведено *in vitro* на моделях свободной ДНК. Однако механизмы их функционирования в условиях хроматиновой упаковки, где ДНК организована в нуклеосомы, остаются недостаточно изученными. Большая часть белка PARP1 связана с хроматином и накапливается в ядрышках [173]. Значительное количество данных свидетельствует о том, что PARP1 напрямую взаимодействует с коровыми гистонами [122, 173]. PARP1 способна модифицировать белки по нескольким аминокислотным остаткам, таким как Lys, Arg, Glu, Asp, Cys, Ser, Thr, Ser, His и Tyr [142]. PARP1 может влиять на структуру хроматина посредством реакции PARилирования: PARP1 модифицирует гистон H1, вызывая его диссоциацию с последующим разрыхлением хроматиновой организации [174]. Гистоны H3 и H4 являются предпочтительными мишенями для PARP1 *in vitro* и могут влиять на ферментативную активность PARP1 [173, 175]. Авторами работы [176] было показано, что PARP1 способна катализировать реакцию PARилирования по N-концевым остаткам лизинов коровых гистонов H2A, H2B, H3 и H4. Недавно авторы работы [177] показали, что в присутствии фактора PARилирования гистонов 1 (**H**istone **P**ARylation **F**actor **1**, HPF1) PARP1 преимущественно модифицирует гистон H3 по остаткам серина (Ser10 и Ser28). Эти модификации приводят к деконденсации хроматина [178].

Используя мононуклеосомные субстраты, авторы работы [179] установили область связывания PARP1 с NCP. Ими были получены константы диссоциации комплексов PARP1•нуклеосома с использованием разных структур нативной ДНК на основе последовательности NPS «601» в составе NCP (**Таблица 1; Рис. 9**). Полученные результаты говорят о преимущественном взаимодействии PARP1 со свободной частью ДНК, чем непосредственно с NCP. Чем длиннее линкерные участки ДНК, тем эффективнее PARP1 образует комплекс с ДНК. Однако полученные данные не позволяют сделать вывод о точной локализации PARP1 в комплексе с NCP и её влиянии на структуру нуклеосомного комплекса.

Таблица 1. Значения констант диссоциации комплексов PARP1 с различными ДНК-структурами в составе нуклеосомы [179]. Численные значения в названии (Nuc147) обозначают общую длину цепи ДНК в парах нуклеотидов.

| Название | K_D , нМ |
|----------|----------------|
| Nuc147 | — |
| Nuc165 | $2,2 \pm 1,5$ |
| Nuc207 | $1,0 \pm 0,2$ |
| Nuc178 | $84,6 \pm 7,7$ |

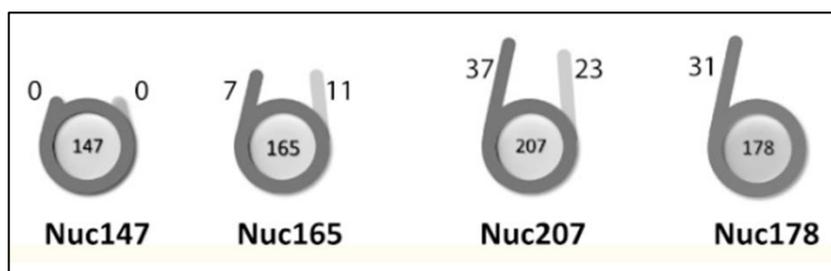


Рис. 9. Структуры исследуемых нуклеосом на основе последовательности ДНК NPS «601». Численные значения в названии (Nuc147) обозначают общую длину цепи ДНК в парах нуклеотидов; значения по обе стороны от структуры обозначают длину линкерных участков ДНК. Рисунок адаптирован из работы [179].

Используя smFRET микроскопию, авторы работы [180] выяснили, что PARP1 влияет на стабильность нуклеосомного комплекса. Показано, что взаимодействие PARP1 с NCP приводит к значительному увеличению расстояния между соседними ДНК-дуплексами в контексте нуклеосомной укладки ДНК. Эта частичная дестабилизация всей структуры нуклеосомы происходит без видимой потери гистонов. Добавление к системе NAD^+ — субстрата PARP1 в реакции PARилирования — приводит к обратной конденсации структуры нуклеосомы. Таким образом, взаимодействие PARP1 с нуклеосомой приводит к частичной обратимой дестабилизации всей структуры.

Авторами статьи [177] было показано, что PARP2 в комплексе с HPF1 способна ADP-рибозилировать коровые гистоны по остаткам серина. В недавнем исследовании было показано, что наличие повреждения в ДНК NCP стимулирует модификацию гистонов PARP2 в комплексе с HPF1 вблизи повреждения, что является отличительной чертой этого белка по сравнению с PARP1 [181]. Это демонстрирует способность белка PARP2 взаимодействовать с коровыми гистонами, PARилировать коровые гистоны в ответ на повреждение ДНК и стимулировать процесс репарации, что может свидетельствовать о его особой регуляторной роли в различных клеточных процессах. Однако в отсутствие HPF1 для PARP2 не выявлено способности модифицировать гистоны. В отличие от PARP1, взаимодействие между PARP2 и NCP не было описано подробно. Было показано, что при взаимодействии с линкерными ДНК

длиной 9 пн в составе NCP PARP2 в виде димера способна соединять две NCP в местах двуцепочечных разрывов, содержащих 5'-фосфатную группу [182].

Результаты работы [172] показали, что белок PARP3 является сенсором одноцепочечных разрывов (nick) в контексте нуклеосом. Работая в паре с белком PARP1, PARP3 ускоряет репарацию SSB в нуклеосомах. Это было продемонстрировано на клетках DT40. Авторы статьи осуществили нокаут по гену PARP3, после чего экспонировали клетки под γ -излучением. Было обнаружено замедление активности репарации SSB в мутантных клетках по сравнению с диким типом. Кроме того, было показано, что PARP3 способна метилировать гистон H2B по второму остатку глутаминовой кислоты (Glu2) в ответ на формирование одноцепочечных разрывов в контексте мононуклеосомы. Таким образом, полученные данные указывают на то, что PARP3 является nick-сенсором в нуклеосомной ДНК и способна модифицировать коровый гистон H2B. Кроме того, показано, что PARP3 взаимодействует с PARP1 и несколькими белками, участвующими в репарации повреждений ДНК [134, 171, 183]. Сообщается, что в клетке PARP3 связана с несколькими белками группы Polysomb [134]. Эти данные позволяют предположить, что PARP3 участвует в эпигенетической регуляции транскрипции. Примечательно, что у PARP3 нет структурно обособленного ДНК-связывающего домена. За эту функцию в PARP3 отвечает неструктурированный N-конец и домен WGR. Тем не менее PARP3 сильно активируется на ДНК с разрывом *in vitro* и может способствовать негомологичному соединению концов [134, 149, 171, 184].

Белки PARP1, PARP2 и PARP3 играют ключевую роль в поддержании геномной стабильности, выступая первичными сенсорами повреждений ДНК и инициаторами репарации. Несмотря на значительный прогресс в изучении функционирования этих белков в клетке, многие аспекты остаются нераскрытыми в контексте нуклеосомы и хроматина. К настоящему времени достаточно детально изучены основные характеристики состава и структуры нуклеосомы, а также ее молекулярная динамика. Во многом эти знания были получены с использованием современных физико-химических методов исследования, включая одномолекулярные инструменты, такие как оптический и магнитный пинцеты, «ДНК-шторы» (DNA curtains), оптический подход, основанный на резонансном переносе энергии Ферстера (FRET) и др. [185 – 187]. Эти методы позволяют измерять широкий спектр параметров поведения биомолекул и их комплексов, в том числе хроматина и нуклеосом с высоким пространственным и временным разрешением. Наряду с перечисленными методами активно применяется метод атомно-силовой микроскопии (АСМ).

2.5. Атомно-силовая микроскопия как инструмент изучения нуклеосом и их белковых комплексов

В основе работы АСМ лежит силовое взаимодействие между зондом и поверхностью, для регистрации которого используются специальные зондовые датчики, кантилеверы, представляющие собой упругую консоль с острым зондом на конце (**Рис. 10**). Сила, действующая на зонд со стороны поверхности, приводит к изгибу консоли. Регистрируя величину изгиба, можно контролировать силу взаимодействия зонда с поверхностью. Система детекции реализована в виде отклонения луча лазера от центра фотодиода при изгибании консоли вследствие изменения топографии сканируемой поверхности. Четыре независимых области фотодиода регистрируют суммарную интенсивность луча лазера. По сигналу от фотодетектора можно судить о силе взаимодействия кантилевера с поверхностью. В зависимости от режима сканирования эти данные явным образом или опосредованно через систему обратной связи позволяют получить информацию о вертикальной координате поверхности образца.

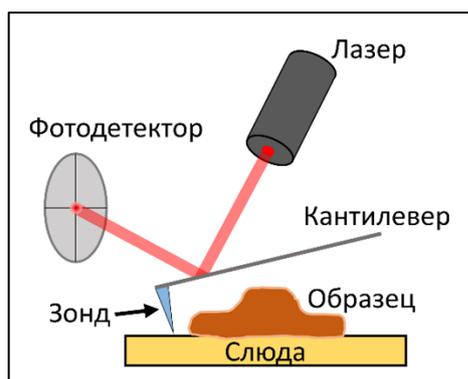


Рис. 10. Упрощённая схема работы атомно-силового микроскопа.

2.5.1. Особенности работы АСМ в контексте биологических исследований

Визуализация биомолекул методом АСМ требует учета их исключительной мягкости и хрупкости. Качество получаемых изображений критически зависит от трех взаимосвязанных факторов: характеристик зондовых датчиков (жесткость, радиус кривизны иглы), выбора режима сканирования (контактный, полуконтактный, бесконтактный) и свойств подложки для иммобилизации. Оптимизация этих факторов необходима для минимизации артефактов и сохранения нативной структуры молекул.

2.5.1.1. Зондовые датчики для АСМ в исследовании биологических объектов

Кантилеверы изготавливаются методами фотолитографии и травления из кремниевых пластин. Упругие консоли формируются, в основном, из тонких слоев легированного кремния, SiO_2 или Si_3N_4 . Также применяются зонды из углерода. Важнейшими характеристиками кантилеверов являются — радиус кривизны зонда, жёсткость консоли и частота колебаний

консоли-зонда. Радиус кривизны зонда определяется радиусом описанной окружности на конце зонда по краю самого острия. Этот радиус определяет ограничения в получаемой ширине исследуемых объектов на поверхности, т.е. чем больше радиус кривизны, тем шире будет сканируемый объект. Например, из данных рентгеноструктурного анализа молекула ДНК В-формы имеет диаметр 2 нм. При сканировании этой молекулы зондом с радиусом кривизны 10 нм диаметр ДНК будет составлять $\sim 5,7$ нм [188]. Жёсткость кантилевера определяет силу, с которой зонд будет воздействовать на поверхность и на объекты, которые расположены на поверхности. Биологические объекты сравнительно мягкие, поэтому требуются кантилеверы с низкими значениями константы жёсткости, чтобы не повредить образцы [188, 189]. Частота зонда важна для колебательных режимов работы зонда. Подробнее о режимах работы АСМ будет рассмотрено ниже. Частотная характеристика позволяет находить резонансную частоту кантилевера в зависимости от условий окружающей среды, и в момент контакта зонда с поверхностью позволяет накапливать сигнал. Погрешности при производстве кантилеверов могут образовывать многорезонансные частотные пики при определении резонансной частоты, что влияет на детекцию сигнала при сканировании. Суммируя всё вышесказанное, характеристики кантилевера являются одними из главных ограничивающих факторов при исследовании биологических объектов.

2.5.1.2. Режимы работы АСМ в исследовании биологических объектов

Существует три базовых режима работы АСМ: контактный, полуконтактный и бесконтактный. Для исследования биологических объектов применяют полуконтактный режим работы. Контактный и бесконтактный режимы, как правило, не применяют в биологии для изучения структур комплексов из-за существенных технических ограничений [190, 191].

В полуконтактном режиме АСМ кантилевер колеблется: в нижнем полупериоде колебаний кантилевер находится в области отталкивающих сил, т.е. наконечник зонда соприкасается с поверхностью; в верхнем полупериоде колебаний кантилевер находится в области притягивающих сил, т.е. наконечник зонда притягивается к поверхности. Поэтому этот метод занимает промежуточное положение между контактным и бесконтактным методами. Среди достоинств метода можно выделить: 1) универсальность (по сравнению с другими методами АСМ позволяет на большинстве исследуемых образцов получать разрешение 1-5 нм); 2) минимизацию действия латеральных сил на зонд со стороны поверхности (упрощает интерпретацию результатов). К недостаткам метода можно отнести: 1) максимальную скорость сканирования, которая уступает контактному режиму; 2) влияние капиллярных сил, которые возникают в момент отведения зонда от поверхности, в его верхнем полупериоде колебаний, что приводит к искажению получаемых данных. На сегодняшний день полуконтактный метод

работы АСМ — наиболее пригодный способ для исследования структуры биологических объектов [192].

2.5.1.3. Поверхности для иммобилизации биологических объектов в методе АСМ

Какими бы физическими характеристиками ни обладал кантилевер и какими бы методиками сканирования ни был оборудован прибор, важнейшим элементом в методе АСМ является подложка для нанесения исследуемых объектов. Чем ровнее поверхность, тем ниже шум она создаёт и тем точнее получается сканировать образцы. Это важно для исследования биологических молекул, т.к. характерная величина белков/нуклеиновых кислот лежит в диапазоне 1-20 нм.

В научно-исследовательской практике применяют разные материалы в качестве поверхностей для иммобилизации биологических молекул: предметные стёкла [193], минерал мусковит [194 – 196], золотые подложки [197], силиконовые подложки [198], высокоориентированный пиролитический графит (ВОПГ) [199], сапфир [200] и другие. Наиболее распространённым материалом для исследования биологических молекул методом АСМ является минерал мусковит, калиевая слюда (далее — слюда). Слюда обладает рядом неоспоримых преимуществ: 1) свежесколотая поверхность слюды является чистой (без необходимости в дополнительной стадии очистки поверхности), атомарно-гладкой, со средним значением шероховатости поверхности $R_a = 0,071$ нм [200]; 2) получение свежесколотой поверхности не требует специализированных приборов (например, микротом) и осуществляется за счёт клейкой ленты; 3) поверхность слюды образована силанольными группами ($---Si-OH$) [201], что формирует отрицательный заряд и позволяет использовать катионы для иммобилизации биологических молекул или модифицировать поверхность различными соединениями по силанольным группам. При приготовлении свежего скола образуются области с нейтральным зарядом из-за наличия ионов калия [201, 202]. Наличие ионов калия является главным недостатком использования слюды в биологических исследованиях, поскольку при контакте свежесколотой поверхности слюды с воздухом образуется карбонат калия, обладающий высокой ионной силой в растворе [203], что может приводить к затруднению сорбции биомолекул или даже к их последующей десорбции с поверхности [204].

2.5.2. Иммобилизация биологических объектов на поверхности слюды

Исследование структуры биомолекул и их комплексов методом АСМ требует надёжной фиксации образцов на поверхности носителя. Слюда, благодаря своей атомарной гладкости и химической инертности, стала одним из ключевых субстратов для таких исследований. Однако отрицательный заряд её поверхности, обусловленный наличием силанольных групп, создаёт

проблему: молекулы ДНК и их комплексы также несут отрицательный заряд, что приводит к электростатическому отталкиванию. Для преодоления этого барьера ещё в ранних работах с использованием АСМ начали применять катионы, выступающие посредниками между слюдой и биомолекулами [205, 206].

2.5.2.1. *Иммобилизация ионами металлов*

Исторически первыми для иммобилизации ДНК применяли ионы металлов. Одновалентные катионы, такие как Na^+ или K^+ , оказались неэффективны: слабое электростатическое связывание не удерживает молекулы на поверхности при сканировании, а также влияет на структуру молекул и приводит к формированию кристаллов соли на поверхности сканируемого изображения [207]. Трёхвалентные и выше ионы металлов, напротив, демонстрируют высокую адсорбционную способность, но их использование сопровождается серьёзными артефактами: они индуцируют конденсацию ДНК в плотные тороиды или агрегаты, что делает невозможным изучение отдельных молекул [208 – 210].

Сравнение двухвалентных катионов (Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} и Zn^{2+}) выявило тонкий баланс между силой связывания со слюдой и сохранением нативной структуры ДНК. Ионы щёлочноземельных металлов (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}), несмотря на эффективную адсорбцию, изменяют конформацию ДНК: Sr^{2+} провоцирует переход из В- в А-форму ДНК-дуплекса, а Ba^{2+} вызывает суперскручивание ДНК, что искажает результаты изучения белок-нуклеиновых взаимодействий [211]. При этом среди Mg^{2+} и Ca^{2+} предпочтительным ионом для иммобилизации на поверхности слюды является магний, т.к. он оказывает меньшее влияние на структуру ДНК-дуплекса [194, 211]. На этом фоне выделяются переходные металлы: Ni^{2+} , Co^{2+} и Zn^{2+} . Их большой атомный радиус позволяет заполнять полости слюдяной поверхности, а высокая энтальпия гидратации способствует десорбции водной оболочки с молекул при связывании, что усиливает адсорбцию ДНК [194, 212]. Никель, в частности, стал «золотым стандартом» для жидкостной АСМ, так как обеспечивает стабильную фиксацию молекул на поверхности слюды без значительных структурных искажений [213].

2.5.2.2. *Иммобилизация органическими поликатионами*

Однако ионы металлов, подходящие для использования в изучении биологических объектов, не лишены недостатков. Кристаллизация солей на поверхности, особенно при использовании Mg^{2+} , создаёт артефакты, маскирующие структурные особенности молекул [214]. Кроме того, металлы могут нарушать стабильность нуклеопротеидных комплексов. Например, Mg^{2+} индуцирует агрегацию нуклеосом, что может затруднять их изучение АСМ [215]. Эти ограничения стимулировали поиск альтернативных соединений для иммобилизации биологических объектов на поверхность слюды. Ими стали органические поликатионы:

поли-L-лизин (**P**oly-**L**-**L**ysine, PLL), спермидин (**S**permi**d**ine, Spd) и путресцин (**P**utrescine, Pu). Их главное преимущество — отсутствие кристаллизации и «мягкое» связывание, сохраняющее нативную структуру биомолекул. PLL, благодаря длинной полимерной цепи, равномерно распределяется по поверхности, обеспечивая адсорбцию нуклеосом [196] и таких объектов, как ДНК-оригами [214]. Спермидин и путресцин, обладая меньшим зарядом, подходят для динамических исследований. Например, с их помощью удалось визуализировать взаимодействие PARP1/2 с разрывами в структуре ДНК [161]. Ключевым аспектом при работе с поликатионами является точный подбор концентрации поликатиона для модификации поверхности. Их избыток и недостаток влияет на доступность молекулы ДНК на поверхности слюды [216]. Кроме того, в отличие от металлов, органические катионы менее стабильны в физиологических условиях (спонтанная десорбция), что требует дополнительной оптимизации буферных систем.

2.5.2.3. Модификация поверхности слюды

Альтернативным подходом является химическая модификация поверхности слюды. Одним из первых методов химической модификаций поверхности слюды является обработка 3-аминопропилтриэтоксисилан (3-**A**mino**P**ropyl**T**ri**E**thoxy**S**ilane, APTES) [217, 218]. Преимуществами такого метода являются: 1) ковалентное присоединение молекул APTES к гидроксильным группам слюды через образование силоксановых связей, что обеспечивает стабильность модифицированной поверхности в различных буферных условиях (в т.ч. и при работе в жидкой среде); 2) более надёжная фиксация ДНК на поверхности слюды за счёт электростатических взаимодействий по сравнению с катионами металлов или органических поликатионов; 3) возможность проводить иные модификации слюдяной поверхности за счёт наличия аминогрупп [217 – 219]. Аминосиланы захватывают ДНК из раствора и надёжно фиксируют на поверхности слюды в нативной конформации (т.е. в той, в которой молекулы находились в растворе) [220], при этом в случае иммобилизации ионами металлов может наблюдаться дрейф молекул по поверхности слюды [221, 222]. Этот факт позволяет утверждать, что при исследованиях на модифицированных аminosиланами подложках визуализируют ДНК или ДНК-белковые комплексы в том состоянии, в котором молекулы находились в растворе. Использование APTES позволило получать профили ДНК высотой около 2 нм, что соответствует диаметру дцДНК В-формы [218].

Модификация поверхности APTES является достаточно трудоёмкой и в водных растворах может вызывать олигополимеризацию молекул силана, что приводит к многослойной модификации поверхности [223]. Альтернативным методом может служить обработка поверхности 3-(аминопропил)диметилэтоксисиланом (3-**A**mino**P**ropyl**D**i**M**ethyl**E**thoxy**S**ilane,

APDMES). При проведении щелочного катализа с использованием триэтиламина модификация APDMES позволила получить подложку, пригодную для детальной визуализации ДНК [223].

В лаборатории Ю. Л. Любченко разработали метод силанизации поверхности слюды с помощью 3-аминопропилтриэтоксисилатрана (3-AminoPropyltriethoxySilatrane, APS) [224, 225]. Молекулы силатрана способны предотвращать образование крупных полимерных кластеров на поверхности благодаря низкой скорости гидролиза и молекулярному донорно-акцепторному взаимодействию между атомами азота и кремния. Это позволяет надежно и воспроизводимо функционализировать поверхность слюды органическими молекулами. Новый метод также приводит к снижению шероховатости поверхности по сравнению с предыдущими методами. Новая поверхность (APS-слюда) позволяет надежно отображать ДНК-белковые комплексы и ДНК в различных условиях. Таким образом, методика обработки слюды раствором APS пригодна для изучения биомолекул с помощью АСМ на воздухе и в жидкости [224]. Было показано, что поверхность, модифицированная APS, подходит для съёмки нуклеопротеидных комплексов, в частности нуклеосом, на воздухе и в жидкости [224 – 226].

2.5.3. АСМ в изучении нуклеосом

Как уже было сказано ранее, для сканирования биологических объектов применяют полуконтактный режим работы АСМ. С его помощью, учитывая радиус кривизны зонда, удалось впервые получить изображения нуклеосом, приближенным по размерам к значениям, полученным методом рентгеноструктурного анализа: высота и диаметр нуклеосомного диска составили $4,3 \pm 1,2$ нм и $23,2 \pm 4,5$ нм соответственно [227]. Кроме того, с использованием такого подхода удалось визуализировать ДНК в линкерной области хроматина, что было невозможно при сканировании в контактном режиме, а также экспериментально подтвердить структуру нуклеосомы, рассчитанную при помощи математического моделирования [228].

С появлением NPS ДНК [63], характеризующихся однозначным расположением нуклеосомного ядра на молекуле ДНК и высокой прочностью формируемых комплексов, стало возможным создание модельных структур с прогнозируемым расположением нуклеосом. Использование таких нуклеосом-позиционирующих последовательностей ДНК позволило показать стохастичность расположения нуклеосом в природном хроматине на примере теломерных участков. Эти результаты подтвердили соответствующую теоретическую модель позиционирования нуклеосом [229].

АСМ активно применяется для изучения влияния различных вариантов гистонов, их ПТМ и эпигенетических модификаций ДНК на структуру нуклеосом. Модификации хвостов гистонов являются ключевым фактором в регуляции динамики хроматина и клеточного гомеостаза.

Отличительной чертой активного хроматина является гиперацетилирование гистонов, что, по-видимому, приводит к более открытой структуре хроматина. В работе Hizume K. [230] методом АСМ с использованием фибрилл хроматина из клеток HeLa было обнаружено, что гиперацетилирование гистонов приводит к уменьшению толщины хроматиновых фибрилл. Этот результат позволил подтвердить модель деконденсации хроматина, основанную на электростатических взаимодействиях. Биотинилирование, напротив, способствует конденсации хроматина. В двух других работах [231, 232] методом АСМ удалось показать, что биотинилирование гистона H4 по лизинам 12 или 16 приводит к уплотнению структуры нуклеосомы, выраженному в увеличении количества оборотов ДНК вокруг гистонного октамера.

Замена гистонов вариантами и перемещение нуклеосом по молекуле ДНК — базовые механизмы регуляции компактизации хроматина, которые, как правило, обусловлены работой белков-ремоделеров. RSC — АТФ-зависимый белковый комплекс ремоделеров структуры хроматина, гомологичный человеческому SWI/SNF, осуществляющий сдвиг нуклеосомы. Некоторые детали его работы были показаны с использованием полуконтактного режима АСМ. В частности, оказалось, что RSC перемещает нуклеосому по ДНК до тех пор, пока не будет встречена другая нуклеосома или не встретится обрыв цепи ДНК [233].

Сравнительный анализ работ по изучению структуры нуклеосомного комплекса с вариантом гистона H3 (CENP-A), выполненных с использованием АСМ, позволил предложить альтернативную модель укладки ДНК в центромерной области хромосом. Эта модель предполагает укладку ДНК в центромерной области в виде массива параллельных участков в форме «змейки» вместо характерной для канонических нуклеосом зигзагообразной укладки [234]. При изучении особенностей структуры нуклеосом с заменой корового гистона H2A на его недавно открытый вариант мышинового гистона H2AL2, экспрессия которого ассоциирована со сперматогенезом, методом АСМ было показано, что длина ДНК в составе нуклеосомы уменьшается с 147 до 130 пн [235]. Укорочение ДНК, находящейся в составе нуклеосомы, обусловлено релаксацией ее структуры посредством частичного разворачивания. В этой же работе с использованием криоэлектронной микроскопии дополнительно показано, что нуклеосомы с H2AL2 характеризуются более релаксированной структурой с большим значением угла между линкерными областями ДНК, что согласуется с данными, полученными методом АСМ. Привлекает внимание тот факт, что нуклеосома при этом становится устойчивой к действию белков-ремоделеров, таких как RSC и SWI/SNF. Биологическое значение такой модуляции свойств нуклеосомы остается предметом исследований.

Структура нуклеосомы может модулироваться связыванием белка или белкового комплекса. Одним из наиболее наглядных примеров может служить работа, в которой исследовано влияние линкерного гистона H1 на компактизацию нуклеосомы. С использованием возможностей АСМ было показано, что H1 не оказывает влияния на степень компактизации нуклеосом, однако в значительной степени стабилизирует ее, уменьшая флуктуации структуры [236].

2.6. Заключение

Белки семейства PARP играют ключевую роль в многочисленных биохимических процессах, происходящих в клетке. Одним из немедленных клеточных ответов на повреждение ДНК является ПТМ ядерных белков с помощью PAR, что запускает процессы репарации поврежденной ДНК. В этом процессе ДНК-зависимый катализ переноса ADP-рибозы осуществляется белками PARP1, PARP2 и PARP3, использующими молекулу NAD⁺ в качестве субстрата. До недавнего времени исследования механизмов действия белков PARP проводились преимущественно на свободной ДНК. Однако в клетке ДНК существует в виде сложного белок-нуклеинового комплекса — хроматина, который имеет несколько уровней компактизации. Первым уровнем компактизации является нуклеосомный, где часть ДНК оказывается недоступной для взаимодействия с различными биополимерами. В последние годы всё больше внимания уделяется изучению PARилирования с использованием нуклеосом, что позволяет приблизить исследования к условиям *in vivo*.

Настоящая работа посвящена исследованию взаимодействия ДНК-зависимых белков семейства PARP с нуклеосомными субстратами, имитирующими интермедиаты стадий процесса BER. Важным преимуществом данного исследования является применение атомно-силовой микроскопии (АСМ), позволяющей визуализировать и анализировать структурные изменения ДНК и нуклеосом на нанометровом уровне. Использование АСМ открывает новые возможности для изучения динамики взаимодействия белков PARP с хроматином, а также для оценки потенциального влияния этих процессов на структуру хроматина. Полученные данные могут иметь важное значение для понимания механизмов регуляции репарации ДНК в контексте хроматина и могут способствовать разработке новых терапевтических стратегий, направленных на модуляцию активности PARP в условиях различных патологий, включая онкологические заболевания.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

3.1. Материалы

В данной работе были использованы три ДНК-сиквенса для реконструирования нуклеосомных субстратов: 1) NCP603_U (Рис. 11); 2) L-NCP603 (Рис. 12); 3) CLP601-8 (Chromatin-Like Particle, CLP, хроматиноподобная частица) (Рис. 13).

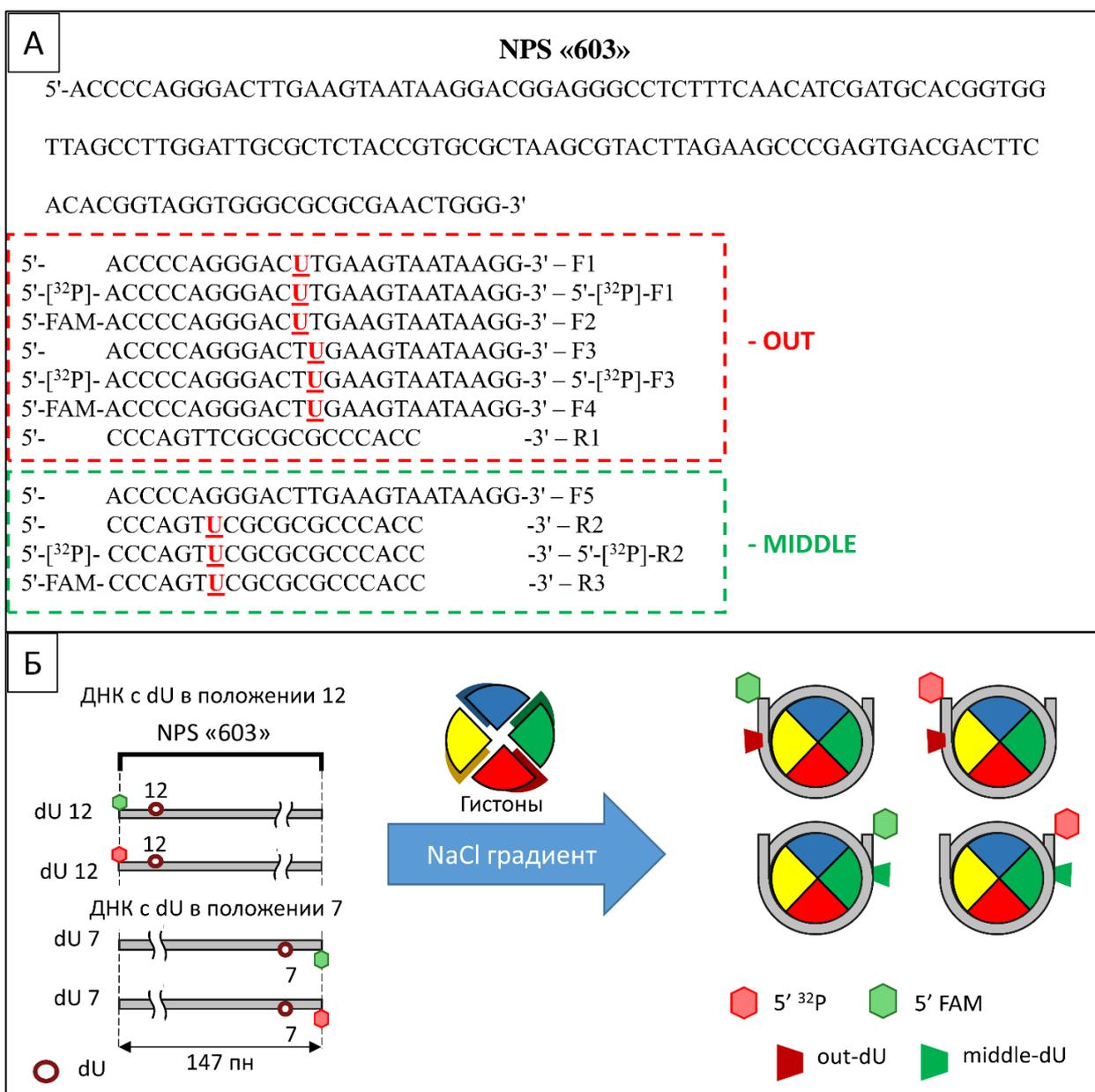


Рис. 11. А — ДНК-сиквенс NCP603_U длиной 147 пн, состоящий из 147 пн NPS «603» [63]. Приведён список олигонуклеотидных праймеров, используемых для амплификации ДНК-дуплекса, позволяющих получать конструкции с «out»- и «middle»-ориентированным нуклеотидом урацилом (dU) (праймеры выделены в рамку пунктирной линии красного цвета для «out»-, зелёным — для «middle»-ориентированного dU). Б — Схематичное изображение процесса реконструирования нуклеосомы NCP603_U. Методология эксперимента описана ниже (п. 3.2.12.).

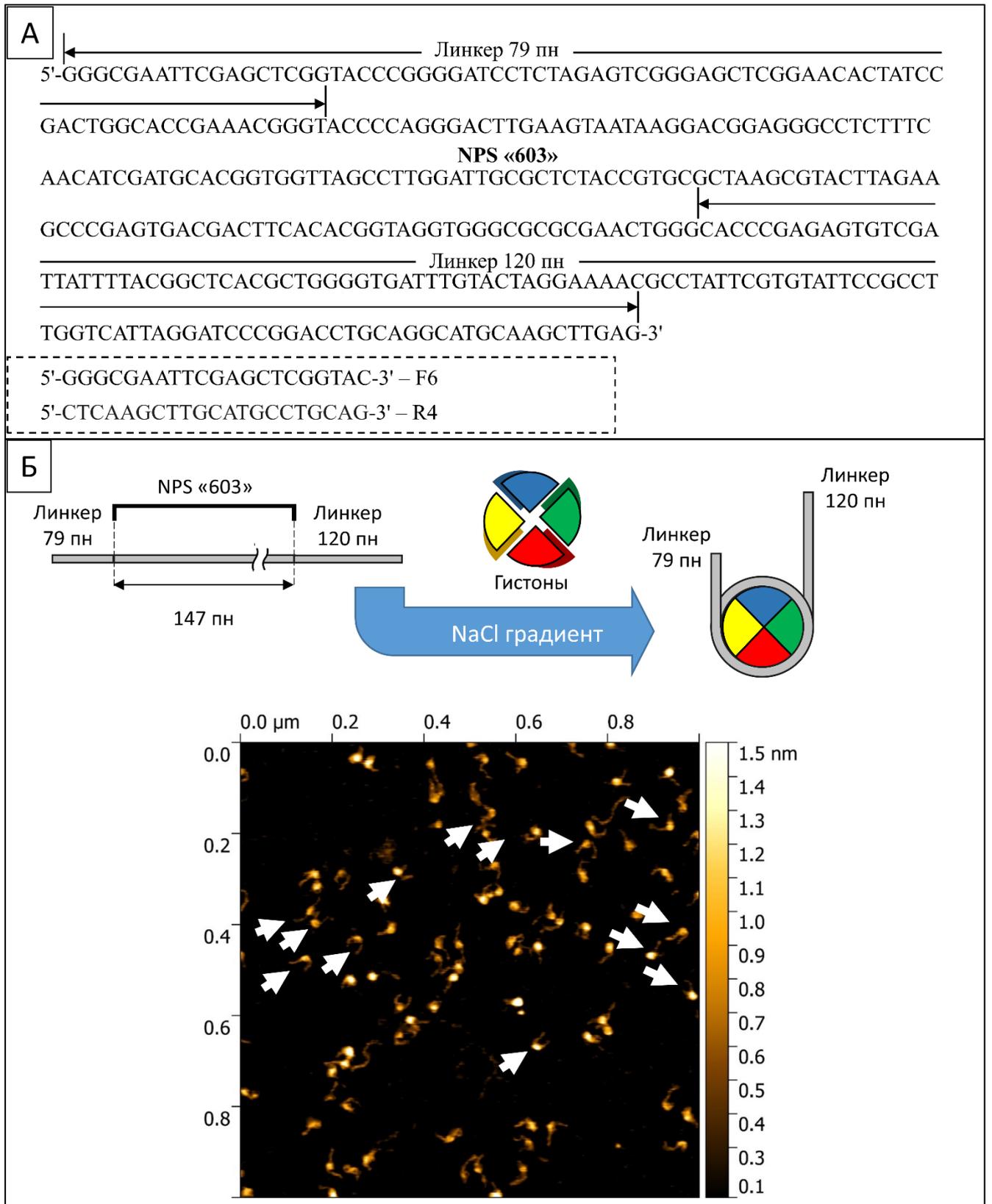


Рис. 12. А — ДНК-сиквенс L-NCP603 длиной 346 пн, состоящий из 147 пн NPS «603» [63] с двумя линкерными последовательностями длиной 79 и 120 пн. Приведён список олигонуклеотидных праймеров, используемых для амплификации ДНК-дуплекса. Б — Схематичное изображение процесса реконструирования нуклеосомы L-NCP603. Методология эксперимента описана ниже (п. 3.2.12.). Приведено типичное АСМ-изображение сканируемой поверхности слюды, модифицированной APS, с иммобилизованными молекулами нуклеосом L-NCP603, отмеченные белыми стрелками.

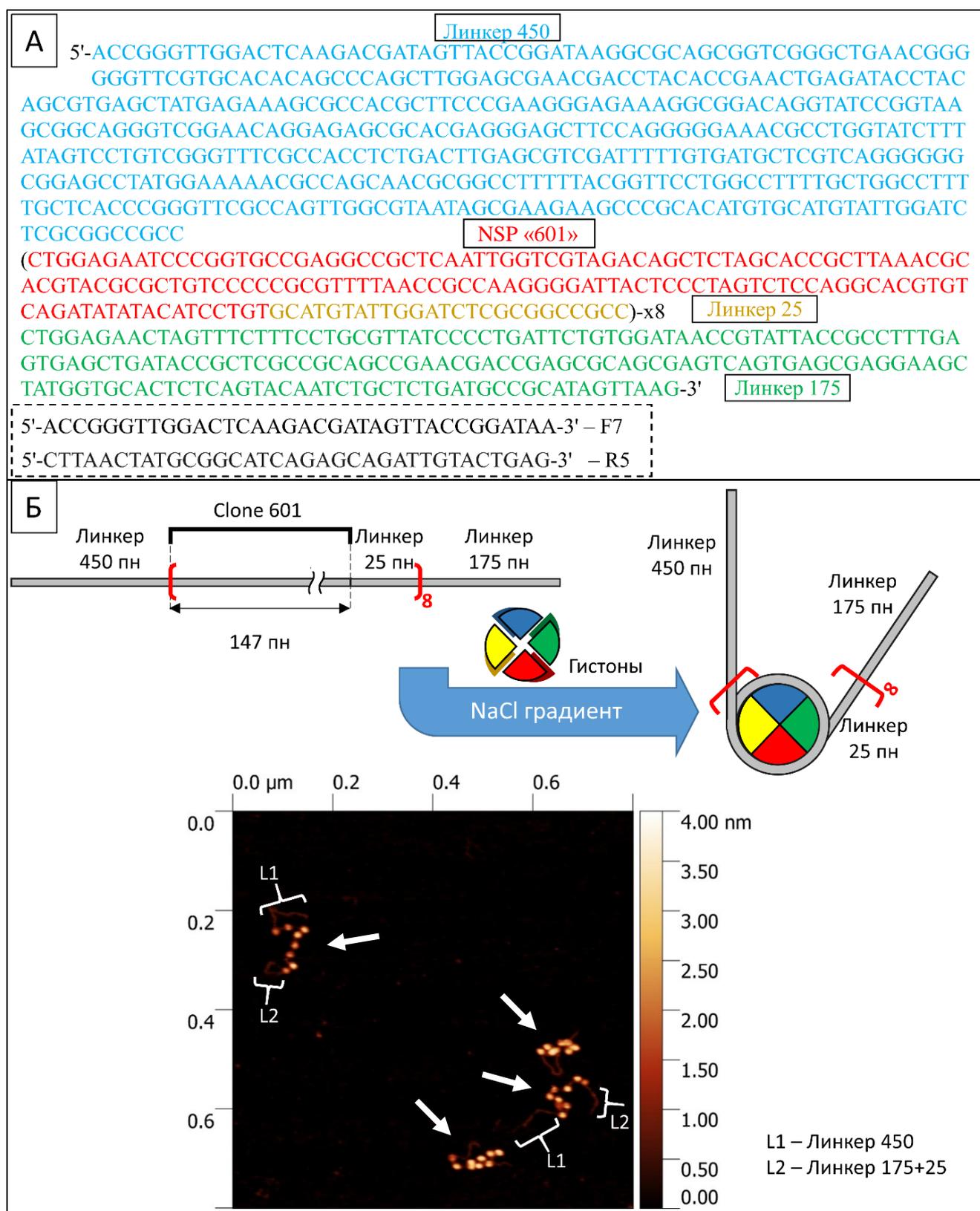


Рис. 13. А — ДНК-сиквенс CLP601-8 длиной 2001 пн, состоящий из восьми 147 пн NPS «601» [63], разделённых между собой линкерными последовательностями длиной 25 пн, и двух линкерных последовательностей длиной 450 и 200 пн на концах сиквенса. Приведён список олигонуклеотидных праймеров, используемых для амплификации ДНК-дуплекса. Б — Схематичное изображение процесса реконструирования CLP601-8. Методология эксперимента описана ниже (п. 3.2.12.). Приведено типичное АСМ-изображение сканируемой поверхности слюды. Иммуобилизацию молекул CLP601-8 проводили в присутствии ионов Ni^{2+} . Типичные молекулы CLP отмечены белыми стрелками. Фигурными скобками обозначены линкерные участки ДНК.

Для наработки целевой ДНК NCP603_U и L-NCP603 была использована плаزمида, содержащая последовательность ДНК NPS «603», — pGEM-3z/603 («AddGene», США). Для наработки целевой ДНК CLP601-8 была использована плазмида «8-nucleosome», содержащая восемь NPS «601», разделённых между собой 25 пн. Плазмида любезно предоставленная Ходорковским М.А. (СПбПУ им. Петра Великого, Россия).

Олигонуклеотиды, использованные в качестве праймеров при амплификации ДНК-последовательностей, были синтезированы в ЛБМХ ИХБФМ СО РАН (Таблица 2).

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе.

| Название | Нуклеотидная последовательность |
|----------------|--|
| Forward 1 (F1) | 5'-ACCCAGGGACUTGAAGTAATAAGG-3' |
| Forward 2 (F2) | 5'-FAM-ACCCAGGGACUTGAAGTAATAAGG-3' |
| Forward 3 (F3) | 5'-ACCCAGGGACTUGAAGTAATAAGG-3' |
| Forward 4 (F4) | 5'-FAM-ACCCAGGGACTUGAAGTAATAAGG-3' |
| Forward 5 (F5) | 5'-ACCCAGGGACTTGAAGTAATAAGG-3' |
| Forward 6 (F6) | 5'-GGGCGAATTCGAGCTCGGTAC-3' |
| Forward 7 (F7) | 5'-ACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA-3' |
| Reverse 1 (R1) | 5'-CCCAGTTCGCGCGCCCACC-3' |
| Reverse 2 (R2) | 5'-CCCAGTUCGCGCGCCCACC-3' |
| Reverse 3 (R3) | 5'- FAM-CCCAGTUCGCGCGCCCACC-3' |
| Reverse 4 (R4) | 5'-CTCAAGCTTGCATGCCTGCAG-3' |
| Reverse 5 (R5) | 5'-CTTAACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTA CTGAG-3' |

В работе были использованы следующие материалы и реактивы: акриламид («AppliChem», Германия), бисакриламид («Fluka», Швейцария), мочеви́на («Amresco», США), глицерин («Sigma», США), TEMED («Sigma», США), ПСА («Merck», Германия), Tris («Sigma», США), Tris-HCl («Sigma», США), αD-глюкоза («Sigma», США), NP-40 («AppliChem», Германия), Tween 20 («Helicon», Россия), EDTA («Amresco», США), β-МЕ («Serva», Германия), CHAPS («Sigma», США), DTT («Sigma», США), NaBH₄ («Fluka», Швейцария), PMSF («Merck», Германия), смесь ингибиторов протеаз в таблетках «Complete mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail» («Roche», Германия), протаминсульфат («Эллара», Россия), 3-метоксибензамид («Sigma», США), бензамидин («MP Biomedicals LLC», Франция), лизоцим («Sigma», США), диализные мембраны 3,5 кДа («Spectrum Laboratories», Inc.), DEAE-бумага DE-81 («Whatman», Великобритания), Coomassie R-250 («Sigma», США), бромфеноловый синий («Fluka»,

Швейцария), ксиленцианол («Fluka», Швейцария), $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ с удельной активностью 185 ТБк/ммоль и $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ с удельной активностью 111 ТБк/ммоль (Лаборатория биотехнологии ИХБФМ СО РАН), фермент Taq-полимераза («БИОСАН», Россия), DNase I (деоксирибонуклеаза) («New England Biolabs», США), хлорид никеля (II) (NiCl_2) («Fluka», Швейцария), набор для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup Standard («Евроген», Россия), слюдяные подложки (слюда) («TipsNano», Эстония), зонды АСМ (кантилеверы) серии NSG01_DLC и NSG30_SS («TipsNano», Эстония).

Остальные реактивы были отечественного производства и имели квалификацию о.с.ч.: MeOH, EtOH, H_3BO_3 , NaOAc, NaCl, CaCl_2 , MgCl_2 , HCl, NaOH, SDS, ТХУ.

Сотрудниками ЛБХФ ИХБФМ были любезно предоставлены: рекомбинантные белки PARP2 — Кутузовым М.М., PARP3 — Белоусовой Е.А., APE1, урацил-ДНК-гликозилаза *E.coli* (UDG), Pol β — Ходыревой С.Н., LigIII α , XRCC1 — Васильевой И.А., Моор Н.А., полинуклеотидкиназа фага T4 — Петрусевой И.О.; гистоновые октамеры H2A, H2B, H3, H4, выделенные из эритроцитов *Galus Galus*, — Кутузовым М. М.

3.2. Методы

3.2.1. Электрофорез белков в ПААГ по Лэммли

Анализ белков проводили с помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) в денатурирующих условиях по методу Лэммли [237]. В реакционную смесь объемом 10 мкл добавляли 1/5 объема денатурирующего буфера Лэммли, содержащего 5 % додецилсульфат натрия (**S**odium **D**odecyl **S**ulfate, SDS); 50 mM 2-меркаптоэтанол (**β**-**M**ercapto**E**thanol, β -ME); 130 mM 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол гидрохлорид (**t**ris(hydroxymethyl)aminomethane **h**ydroch**l**oride, Tris-HCl), pH = 6,8; 25 % глицерин; 0,02 % бромфеноловый синий. Пробы прогревали в течение 5 мин при 97 °C, после чего наносили на гель. В качестве разделяющего геля использовали 10 % ПААГ при соотношении акриламида к N,N'-метиленабисакриламиду 60:1, содержащий 0,1 % SDS и 0,37 M Tris-HCl, pH = 8,8. Концентрирующий 5 % ПААГ при соотношении акриламида к N,N'-метиленабисакриламиду 75:1 содержал 0,1 % SDS и 0,12 M Tris-HCl, pH = 6,8. Для полимеризации геля использовали ПСА в конечной концентрации 0,1 % и N,N,N',N'-тетраметилэтилен-1,2-диамин (**T**Etra**M**ethyl**E**thylene**D**iamine, TEMED) в конечной концентрации 0,1 %. Электродный буфер содержал 0,02 M 2-амино-2-гидроксиметил-пропан-1,3-диол (**t**ris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris), 0,19 M глицин и 0,1 % SDS. Электрофорез проводили в вертикальных пластинах 11,5 × 8,5 × 0,075 см или 16 × 20 × 0,075 см. Силу тока фиксировали на уровне 10 или 15 мА до вхождения образца в разделяющий гель и далее при 25 или 35 мА до миграции лидирующего

красителя белкового маркера «Prism Ultra (10 – 180 кДа)» («Abcam», Великобритания) 10 кДа на 95 % пути. Гели высушивали или окрашивали с помощью коллоидного красителя Coomassie R-250 [238].

При использовании флуоресцентных компонентов смесей после разделения продуктов реакции в геле детекцию проводили с использованием системы «Typhoon FLA 9500» («GE Healthcare Life Science», США) на длине волны 473 нм. При использовании радиоактивных препаратов детекцию проводили с помощью радиолюминесцентного сканирования экрана Image Screen K («Kodak», США) с помощью «Typhoon FLA 9500» («GE Healthcare», США) на длине волны 635 нм. Во всех случаях полученные электрофореграммы анализировали с использованием программы «Quantity One» («Bio-Rad», США).

3.2.2. Электрофорез нуклеиновых кислот в ПААГ в нативных условиях

Для разделения белок-нуклеиновых комплексов использовали гель-электрофорез в 4 % ПААГ при соотношении акриламида к N,N'-метиленбисакриламиду равном 19:1, содержащий 90 мМ Tris; 90 мМ H₃BO₃; 7 мМ этилендиаминтетрауксусная кислота (**E**thylene**D**iamine**T**etraacetic **A**cid, EDTA), pH = 8,0. Для полимеризации геля использовали ПСА в конечной концентрации 0,1 % и TEMED в конечной концентрации 0,1 %. Электрофорез проводили в вертикально расположенных пластинах 11,5 × 8,5 × 0,075 см в течение 30 мин при напряжённости электрического поля ≈ 10 В/см и стабилизации по напряжению. При проведении электрофореза использовали 1-кратный TBE-буфер следующего состава: 90 мМ Tris; 90 мМ H₃BO₃; 7 мМ EDTA, pH = 8,0. Перед нанесением проб на гель добавляли 1/5 объёма 25 % глицерина в буфере, содержащем 10 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 0,1 % неионный детергент (NP-40); 0,2 мМ EDTA, 5 мМ β-ME, 10 мМ NaCl. Степень разделения продуктов реакции отслеживали по миграции красителя бромфенолового синего в дорожке, не содержащей аналита. Далее проводили детекцию и обработку результатов (п. 3.2.1.).

3.2.3. Электрофорез нуклеиновых кислот в ПААГ в денатурирующих условиях

Нуклеиновые кислоты разделяли с помощью гель-электрофореза в 10 %, 15 % или 20 % ПААГ при соотношении акриламида к N,N'-метиленбисакриламиду 19:1, содержащим 7 М мочевины; 90 мМ Tris; 90 мМ H₃BO₃; 7 мМ EDTA, pH = 8,0. Для полимеризации геля использовали ПСА в конечной концентрации 0,1 % и TEMED в конечной концентрации 0,1 %. Электрофорез проводили в вертикально расположенных пластинах в течение 1-2 ч при напряжённости электрического поля 50 В/см и стабилизации по мощности. При проведении электрофореза использовали 1-кратный TBE-буфер следующего состава: 90 мМ Tris; 90 мМ

H_3BO_3 ; 7 мМ EDTA, pH = 8,0. Перед нанесением проб на гель к образцам добавляли 1/5 объёма раствора следующего состава: 90 % формамид, 50 мМ EDTA, 0,025 % бромфеноловый синий и ксиленцианол. Реакционную смесь прогревали при 97 °С в течение 5 мин. Далее проводили детекцию и обработку результатов (п. 3.2.1.).

3.2.4. Введение [^{32}P]-метки в 5'-конец олигонуклеотида

Реакционная смесь объёмом 15 мкл содержала 600 пмоль олигонуклеотида F1/F3/R2 (п. 3.1.; Таблица 2), 20 е.а. киназы и 2 МБк γ -[^{32}P]-АТФ в буфере с 70 мМ Tris-HCl, pH = 7,6; 10 мМ MgCl_2 ; 0,5 мМ (2S,3S)-1,4-бис(сульфанил)бутан-2,3-диол (**DiThioThreitol**, DTT). Смесь инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Далее добавляли 15 ммоль «холодного» АТФ и 10 е.а. киназы и оставляли на ночь при 4 °С. Олигонуклеотид очищали от компонентов реакционной смеси при помощи колоночной хроматографии «Illustra MicroSpin™ G-25 Columns» (GE Healthcare Life Science, США) по протоколу производителя. Состав элюата анализировали с помощью гель-электрофореза в 20 % ПААГ в денатурирующих условиях (п. 3.2.3.). Электрофорез проводили до миграции лидирующего красителя бромфенолового синего на 1/2 пути. Из данных радиоавтографа определяли концентрацию меченного олигонуклеотида. Меченый олигонуклеотид очищали переосаждением. Для этого к элюату добавляли LiClO_4 до концентрации 0,1 М и высаживали ДНК 10-кратным объёмом ацетона. Осадок формировали при температуре -20 °С в течение 12 ч, собирали центрифугированием при 12000 g в течение 15 мин при 4 °С. Осадок дважды промывали охлажденным до 4 °С ацетоном объёмом 200 мл. Сушили осадок от следов ацетона на воздухе, после чего растворяли в бидистиллированной воде (б/д) H_2O до нужной концентрации. В результате были получены праймеры: 5'-[^{32}P]-F1; 5'-[^{32}P]-F3; 5'-[^{32}P]-R2.

3.2.5. Синтез [^{32}P]-NAD⁺

Реакционную смесь объёмом 50 мкл, содержащую 20 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 20 мМ MgCl_2 ; 1 мМ аденозинтрифосфат (**Adenosine TriPhosphate**, АТФ); 2 мМ никотинамидмононуклеотид (**Nicotinamide MonoNucleotide**, NMN); 2,5 мг/мл никотинамид-мононуклеотид-аденилилтрансфераза (**Nicotinamide-MonoNucleotide-AdenylylTransferase**, NMNAT); 10 МБк [α - ^{32}P]-АТФ, инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. После реакцию смесь прогревали в течение 10 мин при 65 °С. Раствор центрифугировали 10 мин при 12000 g, отбирали супернатант и использовали как конечный препарат [^{32}P]-NAD⁺. Степень превращения NMN оценивали нуклеиновым электрофорезом 20 % ПААГ в денатурирующих условиях (п. 3.2.3.).

3.2.6. Хроматографическое выделение рекомбинантного белка PARP1

Рекомбинантный белок PARP1 получали из клеток насекомых с использованием бакуловирусной системы экспрессии. Суспензию клеток Hi5 в бессывороточной среде инфицировали бакуловирусом, содержащим кодирующую ДНК PARP1. Биомасса любезно предоставлена Кутузовым М.М.

Хроматографическое выделение рекомбинантного белка PARP1 проводили согласно протоколу, описанному Amé J.C. в работе [239] с некоторыми изменениями.

Биомассу размораживали на льду в течение 30 мин и ресуспендировали буфером, содержащим 25 мМ Tris-HCl, pH = 8,0; 50 мМ α D-глюкозу; 10 мМ EDTA; 1 мМ фенилметилсульфонил фторид (**PhenylMethylSulfonyl Fluoride**, PMSF); 15 таблеток Antiprotease Cocktail Mini, в соотношении 5 мл буфера на 0,1 млрд клеток биомассы. Инкубировали полученный раствор в течение 20 мин при 4 °C и слабом перемешивании. Для лизиса клеток в раствор биомассы добавляли NaCl до конечной концентрации 1 М; неионный детергент (Tween 20) и NP-40 — до 0,2 %. Биомассу инкубировали в течение 30 мин при 4 °C и слабом перемешивании. Клеточный лизат подвергали ультразвуковой обработке при 4 °C на УЗ-дезинтеграторе «Sonoplus Ultrasonic Homogenizer HD3100» («Bandelin», Германия) с сонородом VS-70T. Обработку производили в 2 цикла со следующими параметрами: амплитуда — 70 %, обработка — 10 с, пауза — 50 с. Полученную смесь центрифугировали при 4 °C и 50000 g в течение 45 мин. Далее к супернатанту добавляли протаминсульфат до конечной концентрации 1 мг/мл. Смесь инкубировали в течение 15 мин при 4 °C и слабом перемешивании. Полученную смесь центрифугировали при 4 °C и 50000 g в течение 20 мин. После этого супернатант разбавляли бессолевым буфером, содержащим 100 мМ Tris-HCl, pH = 7,5, 7 мМ β -МЕ, 0,5 мМ EDTA, 1 мМ PMSF, до конечной концентрации NaCl в растворе 100 мМ. Инкубировали полученную смесь в течение 10 мин при 4 °C и слабом перемешивании, после чего центрифугировали при 4 °C и 30000 g в течение 15 мин. Осветлённый лизат наносили на колонку HiPrep™ Heparin FF 16/10 («GE Healthcare Life Sciences», США; **Рис. 14**), уравновешенную буфером А (состав всех буферов приведён списком в конце протокола выделения, **п. 3.2.6.**).

После нанесения смолу промывали буфером А до стабилизации базовой линии по оптической плотности раствора. Элюцию белков проводили линейным градиентом буфера В. При появлении пика поглощения в линии оптической плотности элюат собирали в пробирки и фракционировали по 10 мл. Полученные фракции анализировали с помощью электрофореза по Лэммли (**Рис. 15**) в 10 % ПААГ (**п. 3.2.1.**). Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и наносили на колонку с 3-аминобензамид-сефарозой (**Рис. 16**), предварительно уравновешенную буфером С. После нанесения смолу последовательно промывали буферами С, А и D до

стабилизации базовой линии по оптической плотности раствора. Белки элюировали буфером E. При появлении пика поглощения в линии оптической плотности элюат собирали в пробирки и фракционировали по 10 мл.

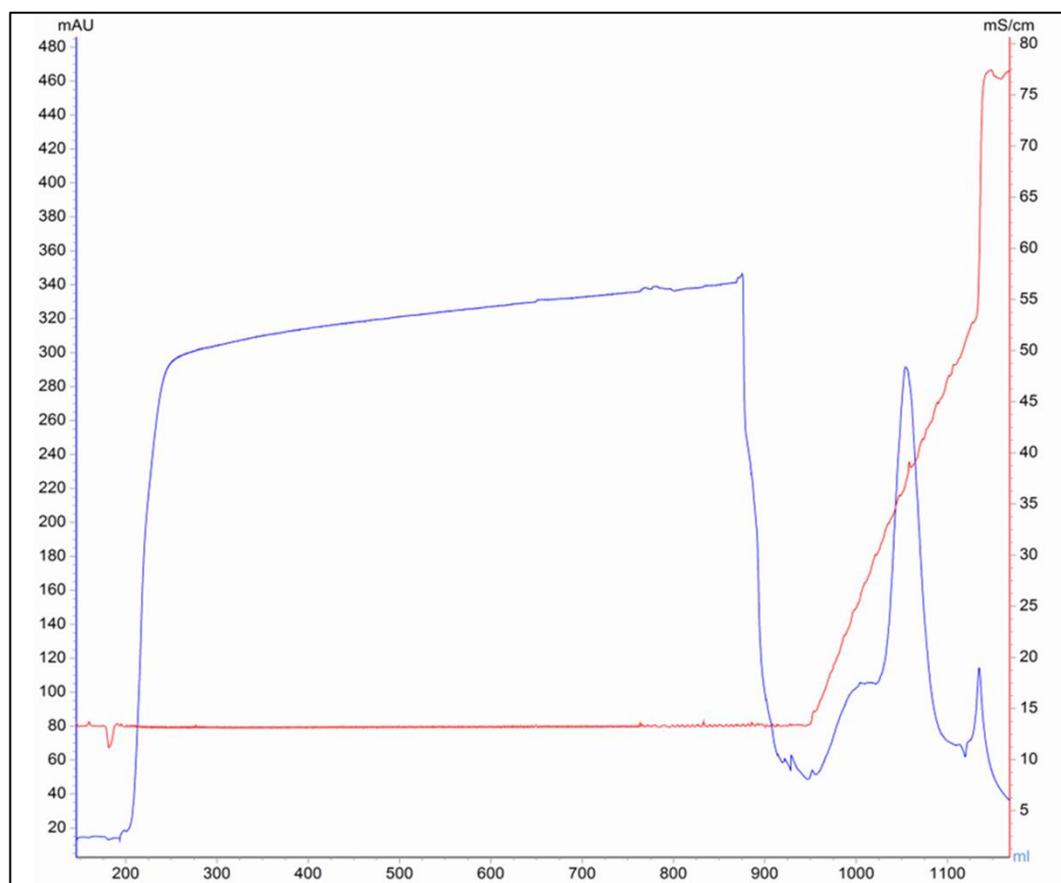


Рис. 14. Хроматография на гепарин-сефарозе. Хроматографический профиль оптической плотности (синий) и электропроводности (красный) при элюции PARP1. По оси X отложен объем буфера (мл), по оси Y — синим оптическая плотность (ед.опт.пл. $\times 10^{-3}$) и красным электропроводность (мСм/см).

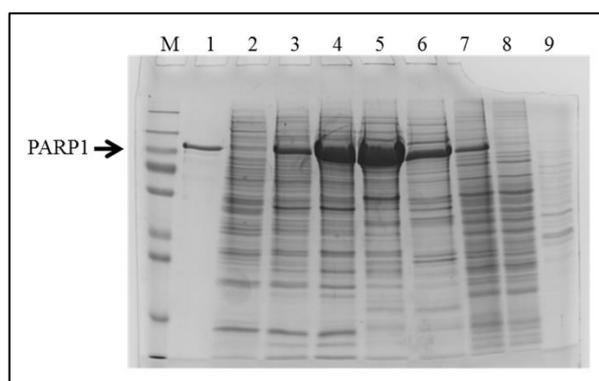


Рис. 15. Электрофоретический анализ препаратов при очистке PARP1 в 10 % ПААГ по Лэммли. М — маркёры («Thermo scientific», USA); 1 — контрольный препарат PARP1 (1 мкг); 2–6 — элюция с гепарин-сефарозы; 7 — нанесение на гепарин-сефарозу; 8 — проскок при нанесении на гепарин-сефарозу; 9 — проскок градиента при элюции PARP1.

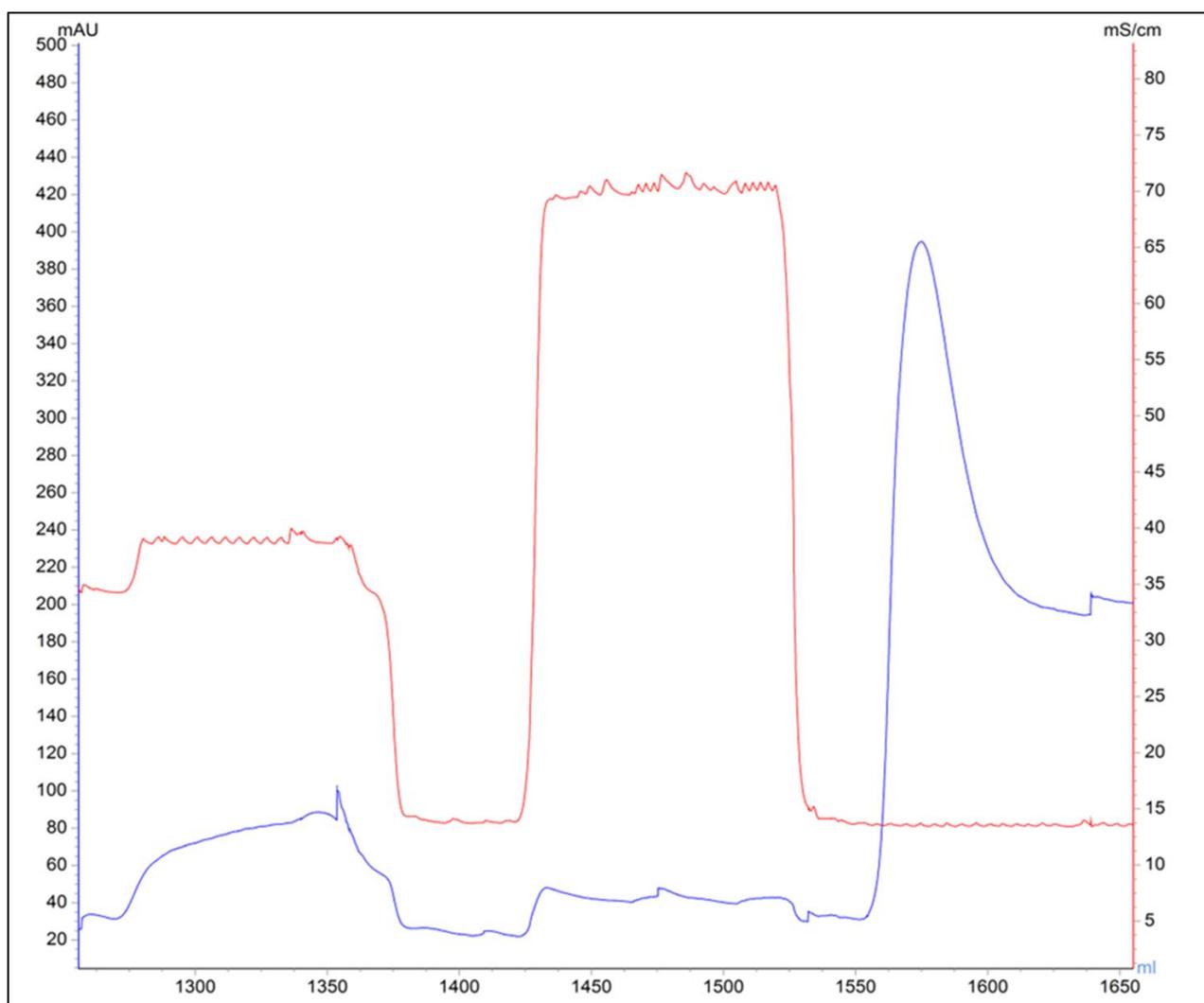


Рис. 16. Хроматография на 3-аминобензамид-сефарозе. Хроматографический профиль оптической плотности (синий) и электропроводности (красный) при элюции PARP1. По оси X отложен объем буфера (мл), по оси Y — синим оптическая плотность (ед.опт.пл. $\times 10^{-3}$) и красным электропроводность (мСм/см).

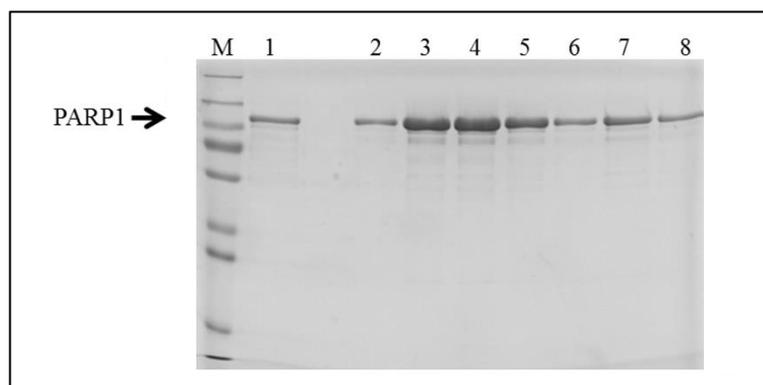


Рис. 17. Электрофоретический анализ препаратов при очистке PARP1 в 10 % ПААГ по Лэммли. М — маркёры («Thermo scientific», USA); 1 — контрольный препарат PARP1 (1 мкг); 2–8 — элюция с 3-аминобензамид-сефарозы.

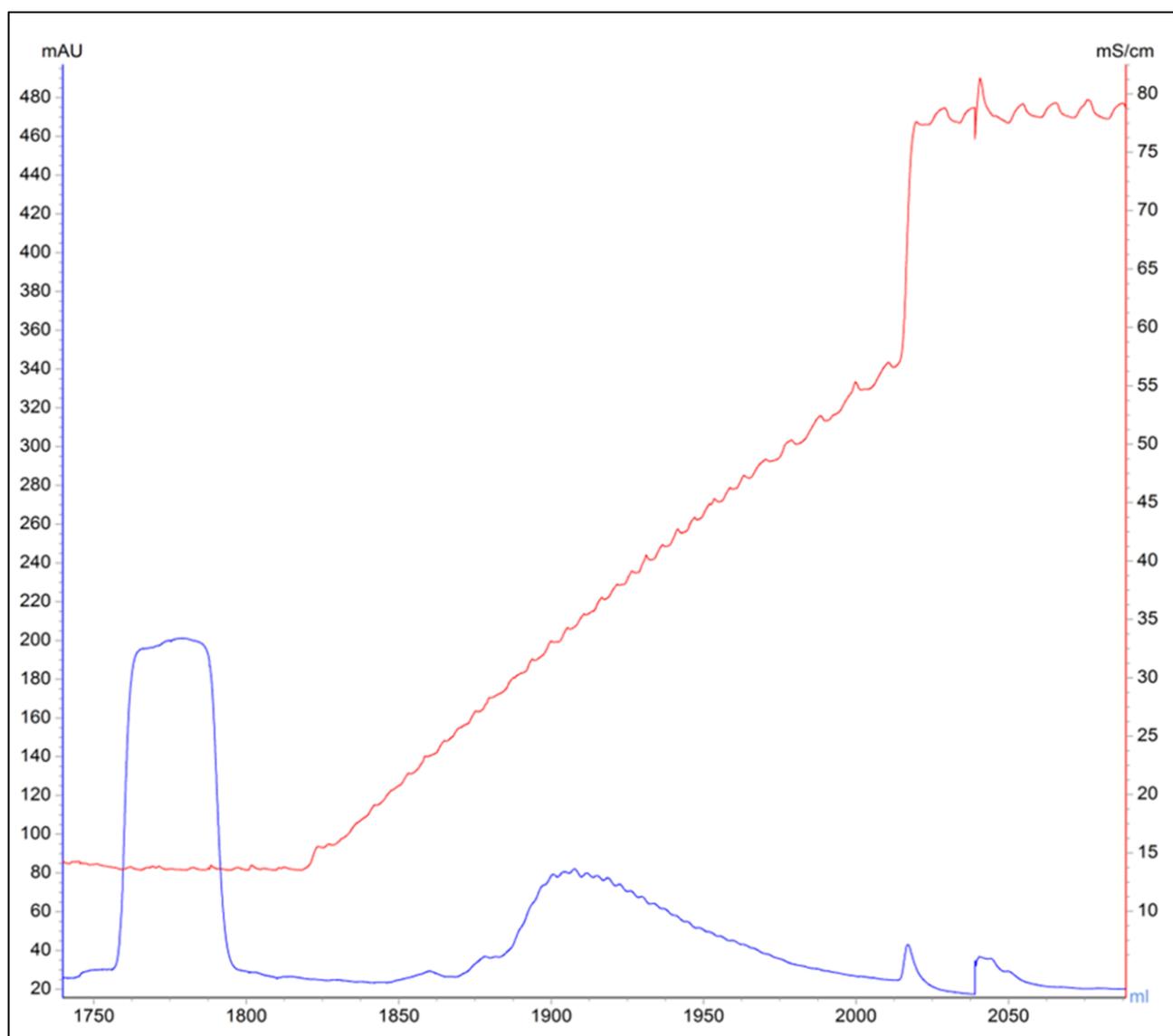


Рис. 18. Хроматография на оцДНК-целлюлозе. Хроматографический профиль оптической плотности (синий) и электропроводности (красный) при элюции PARP1. По оси X отложен объем буфера (мл), по оси Y — синим оптическая плотность (ед.опт.пл. $\times 10^{-3}$) и красным электропроводность (мСм/см).

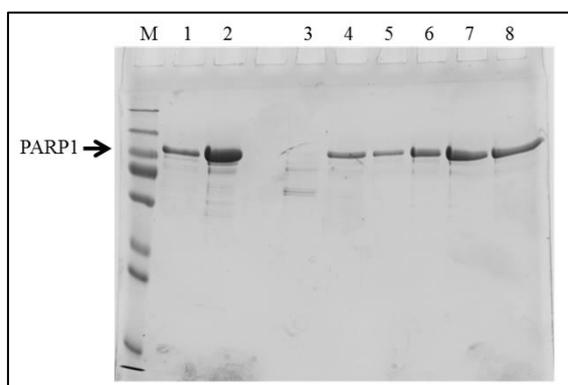


Рис. 19. Электрофоретический анализ препаратов при очистке PARP1 в 10 % ПААГ по Лэммли. М — маркёры («Thermo scientific», USA); 1 — контрольный препарат PARP1 (1 мкг); 2 — нанесение на оцДНК-целлюлозу; 3 — пропуск нанесения; 4–8 — элюция с оцДНК-целлюлозы.

Полученные фракции анализировали с помощью электрофореза по Лэммли (**Рис. 17**) в 10 % ПААГ (**п. 3.2.1.**). Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и наносили на колонку ХК 16/20 («GE Healthcare Life Sciences», США) с оцДНК-целлюлозой («USB», США; **Рис. 18**), предварительно уравновешенную буфером А. Элюцию белков проводили линейным градиентом буфера В. При появлении пика поглощения в линии оптической плотности элюат собирали в пробирки и фракционировали по 10 мл.

Полученные фракции анализировали с помощью электрофореза по Лэммли (**Рис. 19**) в 10 % ПААГ (**п. 3.2.1.**). Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и концентрировали на центрифугах («Amicon» 10K MWCO, USA) при 4 °С и 4000 g в течение 15 мин. Замену буфера Е в сконцентрированном белковом препарате проводили разбавлением буфером хранения, содержащем 200 мМ Tris-HCl, pH = 8,0, 100 мМ NaCl, 4 мМ DTT. Полученный раствор разбавляли в 2 раза 100 % глицерином. Концентрацию белка рассчитывали согласно закону Бугера-Ламберта-Бэра после определения оптической плотности раствора на длине волны 280 нм: $OD^{280} = \varepsilon Cl$, где $\varepsilon = 120055 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $l = 1 \text{ см}$. Оптическую плотность полученного белка определяли на спектрофотометре «NanoDrop» («GE Healthcare Life Science», США).

Хроматографическое выделение белка осуществляли на хроматографе «Äkta Start» («GE Healthcare Life Sciences», США). Процесс хроматографии отслеживали датчиком оптической плотности, детектирующего поглощение на длине волны 280 нм, соответствующей максимуму поглощения ароматических аминокислот в белках.

В процессе хроматографического выделения белка использовали буферы следующего состава:

А (400 мл): 100 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 100 мМ NaCl; 7 мМ β -ME; 0,5 мМ EDTA; 1 мМ PMSF;

В (300 мл): 100 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 1 М NaCl; 7 мМ β -ME; 0,5 мМ EDTA; 1 мМ PMSF;

С (150 мл): 100 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 400 мМ NaCl; 7 мМ β -ME; 0,5 мМ EDTA; 1 мМ PMSF;

Д (150 мл): 100 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 900 мМ NaCl; 7 мМ β -ME; 0,5 мМ EDTA; 1 мМ PMSF;

Е (250 мл): 100 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 400 мМ NaCl; 7 мМ β -ME; 0,5 мМ EDTA; 1 мМ PMSF; 0,5 мМ 3-метоксибензамид.

3.2.7. Определение активности PARP1/2 с использованием [³²P]-NAD⁺ и ДНК-активаторов

Эффективность PARP при активации различными структурами ДНК оценивалась по количеству PAR, синтезированной PARP1 или PARP2 с использованием [³²P]-NAD⁺ в качестве предшественника. Реакционная смесь объемом 60 мкл содержала 50 нМ PARP1 или 100 нМ PARP2, 50 нМ 5'-FAM-меченой нативной, AP- или Gap-ДНК NCP603_U или NCP603_U в реакционном буфере, имеющем следующий состав: 50 мМ Tris-HCl, pH = 8,0; 100 мМ NaCl; 0,1 мг/мл BSA; 1 мМ DTT; 5 мМ MgCl₂ и 0–4000 мкМ NAD⁺, содержащем 1 мкМ [³²P]-NAD⁺. Реакцию проводили при температуре 37 °С в течение 0; 1; 3; 5; 10; 20 мин и останавливали, помещая аликвоты реакционной смеси на бумажные фильтры (Whatman-1), пропитанные 5 % раствором ТХУ. Фильтры четыре раза промывали 5 % трихлоруксусной кислотой, затем 90 % этанолом и высушивали на воздухе. Для количественной оценки радиоактивной метки, включенной в нерастворимый в кислоте продукт, детектировали радиолуминесцентным сканированием экрана Image Screen К («Kodak», США) с помощью «Typhoon FLA 9500» («GE Healthcare Life Science», США) на длине волны 635 нм. Полученные данные анализировали с использованием программы «Quantity One» («Bio-Rad», США). Количественные данные анализировали в Microsoft Excel 2010 и представляли в виде гистограмм со средним значением ± стандартное отклонение.

3.2.8. Амплификация ДНК NCP603_U / L-NCP603 / CLP601-8

Реакционная смесь для амплификации участка плазмидной ДНК, содержащей последовательность NCP603_U, объемом 50 мкл содержала 25 мкл мастер-микс (3 мМ MgCl₂; 150 мМ Tris-HCl, pH = 8,8; 40 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,02 % Twin-20); 1 нг плазмидной ДНК pGEM-3z/603; 0,05 U/мкл Taq-полимеразы и 800 мкМ dNTP (суммарно). Использовали следующие комбинации 0,5 мМ праймеров в зависимости от эксперимента: 1) 5' [³²P]-F1 + R1; 2) F2 + R1; 3) 5'-[³²P]-F3 + R1; 4) F4 + R1; 5) F5 + 5'-[³²P]-R2; 6) F5 + R3. ПЦР проводили в амплификаторе «Mastercycler personal» (Eppendorf, Германия) по протоколу (Таблица 3):

Таблица 3. Программа ПЦР для амплификации ДНК «NCP603_U»

| Температура, °C | Длительность стадии, с | Кол-во повторов |
|---|------------------------|-----------------|
| 95 | 180 | 1 |
| 94 | 15 | 5 |
| 65 (снижение на 1 °C за цикл от 65 °C до 61 °C) | 15 | |
| 72 | 10 | |
| 94 | 15 | |
| 60 | 15 | 25 |
| 72 | 10 | |
| 4 | ∞ | |

Реакционная смесь для амплификации участка плазмидной ДНК, содержащей последовательность L-NCP603, объемом 50 мкл содержала 25 мкл мастер-микс (3 мМ MgCl₂; 150 мМ Tris-HCl, pH = 8,8; 40 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,02 % Twin-20); 1 нг плазмидной ДНК pGEM-3z/603; 0,5 мМ F6; 0,5 мМ R4; 0,05 U/мкл Taq-полимеразы и 800 мкМ dNTP (суммарно). ПЦР проводили в амплификаторе «Mastercycler personal» (Eppendorf, Германия) по протоколу (Таблица 4):

Таблица 4. Программа ПЦР для амплификации ДНК «L-NCP603»

| Температура, °C | Длительность стадии, с | Кол-во повторов |
|-----------------|------------------------|-----------------|
| 94 | 180 | 1 |
| 94 | 30 | 30 |
| 65 | 20 | |
| 72 | 60 | |
| 72 | 180 | 1 |
| 4 | ∞ | |

Реакционная смесь для амплификации участка плазмидной ДНК, содержащей последовательность CLP601-8, объемом 50 мкл содержала 25 мкл мастер-микс (3 мМ MgCl₂; 150 мМ Tris-HCl, pH = 8,8; 40 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,02 % Twin-20), 1 нг плазмидной ДНК «8-nucleosome»; 0,25 мМ F4; 0,25 мМ R3; 0,05 U/мкл Taq-полимеразы и 800 мкМ dNTP (суммарно). ПЦР проводили в амплификаторе «Mastercycler personal» (Eppendorf) по протоколу (Таблица 5):

Таблица 5. Программа ПЦР для амплификации ДНК «CLP601-8»

| Температура, °С | Длительность стадии, с | Кол-во повторов |
|---|------------------------|-----------------|
| 95 | 180 | 1 |
| 94 | 20 | 5 |
| 78,3 (снижение на 1 °С за цикл от 78,3 °С до 74,3 °С) | 20 | |
| 72 | 180 | |
| 94 | 20 | 25 |
| 73,3 | 20 | |
| 72 | 180 | |
| 4 | ∞ | |

3.2.9. Обработка ДНК-экзонуклеазой I

Неамплифицированные остатки праймеров удаляли обработкой ДНК-экзонуклеазой I (**Exonuclease I**, Eho I). Реакционная смесь объёмом 250 мкл содержала 50 мкл смеси после проведения ПЦР (п. 3.2.8.) и 1 е.а. Eho I в буфере следующего состава: 67 мМ глицин-КОН, pH = 9,5; 6,7 мМ MgCl₂; 1 мМ DTT. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 45 мин. ДНК очищали переосаждением. Для этого к реакционной смеси добавляли 3 М NaOAc, pH = 5,2, до конечной концентрации 0,3 М и высаживали ДНК 75 % этанолом. Осадок формировали при охлаждении до –20 °С в течение 8-12 ч с последующим центрифугированием со скоростью 14000 g при 4 °С в течение 15 мин. Осадок промывали дважды холодным 75 % этанолом и сушили на воздухе при комнатной температуре до полного высыхания. Осадок растворяли в воде. Концентрацию ДНК в конечном растворе определяли спектрофотометрически по поглощению света на длине волны 260 нм с использованием спектрофотометра «SimpliNano» («GE Healthcare», США).

3.2.10. Препаративная очистка ДНК-субстратов для исследований методом АСМ

Препарат ДНК L-NCP603 после обработки Eho I (п. 3.2.9.) разделяли при помощи нативного гель-электрофореза в 4 % ПААГ (п. 3.2.2.). Детекцию целевого продукта осуществляли облучением геля УФ-светом с длиной волны 254 нм в трансиллюминаторе «ТСР-20-МС» («Vilber Lourmat», Франция). Фрагменты геля с ДНК L-NCP603 вырезали и подвергали дроблению. Дробление осуществляли методом пропускания фрагмента ПААГ через отверстие диаметром 0,5 мм на дне пробирки типа Eppendorf объёмом 0,6 мл, помещённой в пробирку типа Eppendorf объёмом 2 мл, с последующим центрифугированием при 14000 g в течение 5 с. К полученным мелкодисперсным фрагментам геля добавляли 1 мл элюирующего буфера

(100 мМ NaCl; 10 мМ Tris-HCl pH = 8,0; 0,1 мМ EDTA pH = 8,0). Далее суспензию инкубировали при 45 °С в течение 60 мин. Супернатант переносили в чистую пробирку. К гелю повторно добавляли буфер для элюции и повторяли процедуру ещё 3 раза с последующим объединением супернатантов. Полученный супернатант ДНК L-NCP603 очищали от компонентов ПААГ и элюирующего буфера переосаждением в этаноле (п. 3.2.9.). Концентрацию ДНК в конечном растворе определяли спектрофотометрически по поглощению света на длине волны 260 нм с использованием спектрофотометра «SimpliNano» («GE Healthcare», США).

Препарат ДНК CLP601-8 после обработки Echo I (п. 3.2.9.) разделяли при помощи гель-электрофореза в 0,7 % агарозе, растворённой в буфере 1xTAE (40 мМ Tris; 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА). Электродный буфер содержал 1xTAE. Буфер для нанесения проб (5-кратный) содержал 50 % глицерин. Электрофорез проводили при напряжении в 150 В (10 В/см). Степень разделения продуктов реакции отслеживали по миграции красителя бромфенолового синего в дорожке, не содержащей анализата. Детекцию целевого продукта осуществляли облучением геля УФ-светом с длиной волны 254 нм в трансиллюминаторе «ТСР-20-МС» («Vilber Lourmat», Франция). Фрагменты геля с ДНК CLP601-8 вырезали. Продукт выделяли из агарозного геля, используя коммерческий набор для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей «Cleanup Standard» («Евроген», Россия). Концентрацию ДНК в конечном растворе определяли спектрофотометрически по поглощению света на длине волны 260 нм с использованием спектрофотометра «SimpliNano» («GE Healthcare», США).

3.2.11. «Предсборка» нуклеосом

Метод «предсборки» проводили согласно ранее опубликованному протоколу в нашей лаборатории [240]. Кратко: реакционная смесь объёмом 10 мкл содержала 0,1 мкМ ДНК NCP603_U или L-NCP603 и гистоны в диапазоне концентраций 10^{-8} – 10^{-7} М в нуклеосомном буфере, имеющем следующий состав: 10 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 0,1 % NP-40; 0,2 мМ EDTA; 5 мМ β-МЕ; 10 мМ NaCl. Реакционную смесь инкубировали 15 мин при 37 °С. Компоненты реакционной смеси разделяли в 4 % ПААГ в нативных условиях (п. 3.2.2.). Минимальное соотношение ДНК к гистоновым октамерам, при котором формировался белок-нуклеиновый комплекс без свободной ДНК, использовали для препаративного реконструирования нуклеосом (Рис. 20).

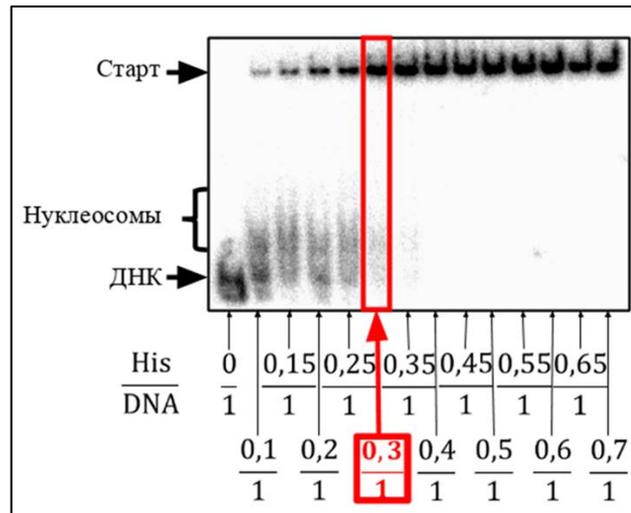


Рис. 20. Радиоавтограф 4 % ПААГ в нативных условиях после разделения проб по методу «предсборки» нуклеосом с разным соотношением ДНК:гистоны. По данным электрофоретического разделения компонентов реакционных смесей было выбрано мольное соотношение ДНК:гистоны, равное 1 к 0,3.

3.2.12. Препаративное реконструирование нуклеосом *in vitro* с помощью диализа

Согласно статьям [63; 241; 242], ДНК и октамеры формируют гомогенный препарат нуклеосомных частиц при понижении концентрации NaCl в растворе. Для получения правильно реконструированных нуклеосом проводили диализ в градиенте NaCl от 2 М до 20 мМ. Делали следующее: 100 мкл пробы в диализной ячейке (**Рис. 21**) помещали против 20 мл стартового буфера для диализа следующего состава: 10 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 0,1 % NP-40; 0,2 мМ EDTA; 5 мМ β-МЕ и 2 М NaCl. Стартовый буфер разбавляли буфером для диализа следующего состава:

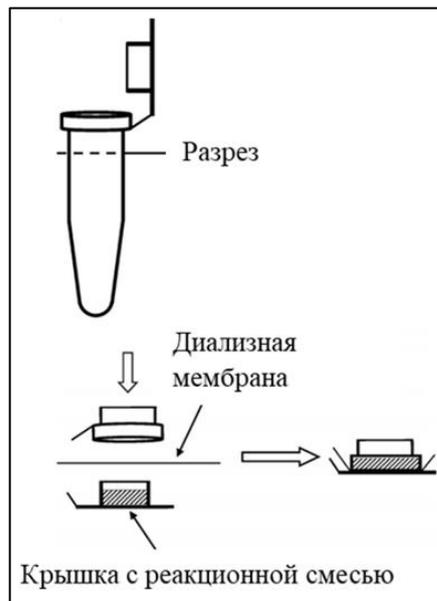


Рис. 21. Схема изготовления и вид диализной ячейки. Рисунок адаптирован из [243].

10 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 0,1 % NP-40; 0,2 мМ EDTA; 5 мМ β-МЕ. Разбавление стартового буфера проводили до 20 мМ NaCl. После достижения заданной концентрации пробу оставляли при 4 °С

на 8-12 ч. Проба в диализной ячейке содержала 2 мкМ ДНК NCP603_U и количество октамеров, определённое методом «предсборки» (п. 3.2.11.), в буфере состава: 2 М NaCl; 10 мМ Tris-HCl, pH = 8,0; 0,1 % NP-40; 0,2 мМ EDTA; 5 мМ β-ME. После проведения процедуры диализа пробы собирали, гомогенность препарата анализировали в 4 % ПААГ в нативных условиях (п. 3.2.2.; Рис. 22).

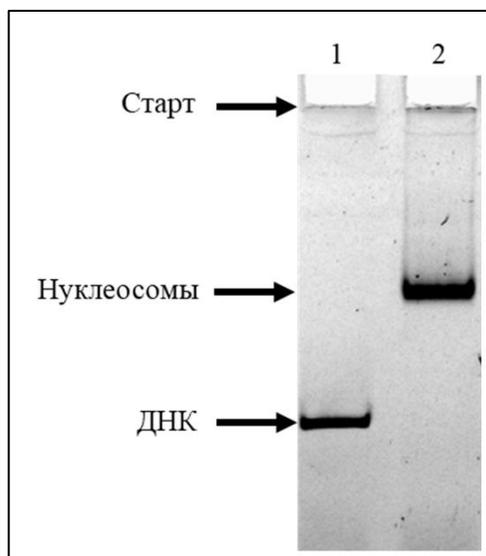


Рис. 22. Автограф 4 % ПААГ в нативных условиях после разделения продуктов реакции препаративного реконструирования нуклеосом. Дорожка 1 — контрольная 5'-FAM-ДНК NCP603_U; дорожка 2 — реконструированная 5'-FAM-NCP603_U.

Для получения правильно реконструированных и пригодных для использования в методе АСМ нуклеосом L-NCP603 проводили диализ в градиенте NaCl от 2 М до 20 мМ: 100 мкл пробы в диализной ячейке против 20 мл стартового буфера для диализа следующего состава: 10 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 1,6 мМ CHAPS; 0,2 мМ EDTA; 5 мМ β-ME и 2 М NaCl. Стартовый буфер разбавляли буфером для диализа следующего состава: 10 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 1,6 мМ CHAPS; 0,2 мМ EDTA; 5 мМ β-ME. Разбавление стартового буфера проводили до 20 мМ NaCl. После достижения заданной концентрации пробу оставляли при 4 °С на 8-12 ч. Проба в диализной ячейке содержала 0,2 мкМ ДНК L-NCP603 и количество октамеров, определённое методом «предсборки» (п. 3.2.11.), в буфере следующего состава: 2 М NaCl; 10 мМ Tris-HCl, pH = 8,0; 1,6 мМ CHAPS; 0,2 мМ EDTA; 5 мМ β-ME. После проведения процедуры диализа пробы собирали, гомогенность препарата анализировали в 4 % ПААГ в нативных условиях (п. 3.2.2.). Далее гомогенный препарат (Рис. 12 Б) анализировали методом АСМ (п.3.2.22.; п.3.2.23.) и использовали в дальнейшей работе.

В случае с субстратом CLP601-8 метод «предсборки» не удаётся осуществить из-за высокой молекулярной массы комплексов и их высокой гетерогенности в связи с наличием большого числа NPS в ДНК-сиквенсе CLP601-8. Для получения CLP601-8 необходимо брать

мольное соотношение гистоновых октамеров к одному сиквенсу NPS «601» в составе CLP, равное 0,9; 1; 1,1 [244]. В нашем случае для получения правильно реконструированных и пригодных для использования в методе ACM CLP проводили диализ в градиенте NaCl от 2 М до 20 мМ: 100 мкл пробы в диализной ячейке против 20 мл стартового буфера для диализа следующего состава: 10 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 1,6 мМ CHAPS; 0,2 мМ EDTA; 5 мМ β-ME и 2 М NaCl. Стартовый буфер разбавляли буфером для диализа следующего состава: 10 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 1,6 мМ CHAPS; 0,2 мМ EDTA; 5 мМ β-ME. Разбавление стартового буфера проводили до 20 мМ NaCl. После достижения заданной концентрации NaCl пробу оставляли при 4 °С на 8-12 ч. Проба в диализной ячейке содержала 0,02 мкМ ДНК CLP601-8 и 0,16 мкМ октамеров гистонов (отношение NPS «601» к гистонам = 1 к 1) в буфере следующего состава: 2 М NaCl; 10 мМ Tris-HCl, pH = 8,0; 1,6 мМ CHAPS; 0,2 мМ EDTA; 5 мМ β-ME. После проведения процедуры диализа пробы (**Рис. 13 Б**) собирали и анализировали методом ACM (**п. 3.2.22.; п.3.2.23.**) и использовали в дальнейшей работе.

3.2.13. Получение ДНК/нуклеосом, содержащих AP-сайт

AP-сайт получали непосредственно перед реакцией с помощью активности UDG. Условия формирования AP-сайтов в случае «middle»- и «out»-ориентированных нуклеотидов были идентичны. Для этого реакционную смесь, содержащую 0,1 мкМ ДНК NCP603_U или нуклеосому NCP603_U и 4 мкМ UDG (1 е.а. UDG на 0,6 пмоль ДНК NCP603_U или NCP603_U) в буфере состава: 10 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 0,1 % NP-40; 0,2 мМ EDTA; 5 мМ β-ME; 10 мМ NaCl, инкубировали при 37 °С в течение 30 мин. Реакционную смесь использовали для дальнейших превращений.

3.2.14. Получение субстратов ДНК или нуклеосом, содержащих однонуклеотидную брешь (Gap)

Реакционная смесь содержала 0,1 мкМ AP-ДНК NCP603_U или AP-NCP603_U и 0,1 мкМ APE1 (для «out»-ориентированных субстратов) или 1 мкМ APE1 (для «middle»-ориентированных субстратов) в буфере 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. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 15 мин. Реакционную смесь использовали для дальнейших превращений.

3.2.15. Изучение взаимодействия ДНК/нуклеосомы с белками семейства PARP методом задержки в геле

Реакционная смесь объёмом 10 мкл содержала 0,1 мкМ нативную AP- или Gap-содержащую 5'-[³²P]-ДНК NCP603_U или 5'-[³²P]- NCP603_U и 0,001; 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-ME; 10 мМ NaCl. Реакционную смесь инкубировали при 37 °С в течение 15 мин. Компоненты реакционной смеси разделяли и анализировали в 4 % ПААГ в нативных условиях (п. 3.2.2.).

3.2.16. Расчёт величин K_D комплексов NCP-PARP

С помощью программного обеспечения «Quantity One» («Bio-Rad Laboratories», США) проводили обработку радиоавтографов гелей. Значения констант диссоциации комплексов определяли из графиков зависимости доли несвязанного в комплекс ДНК-субстрата (координата y) от десятичного логарифма концентрации белка PARP (координата x) с использованием программного обеспечения «SigmaPlot v. 11.0» (США). Зависимость задавали формулой (1):

$$y = \frac{a}{1 + \frac{x - x_0}{b}}, \quad (1)$$

где a , b — аппроксимирующие коэффициенты;

x_0 — значение координаты по оси x в точке графика $(x_0; y_0)$, где $y_0 = (y_{max} + y_{min})/2$.

Константа диссоциации комплекса численно равняется концентрации белка, при которой половина субстрата находится в комплексе с белком. Такая концентрация белка определяется значением координаты x_0 . Таким образом,

$$K_D = 10^{x_0}. \quad (2)$$

В качестве альтернативы значения K_D были оценены с помощью измерений анизотропии флуоресценции в соответствии с работой [245]. Кратко, реакционную смесь, содержащую 0,03 мкМ 5'-FAM-ДНК NCP603_U или 5'-FAM-NCP603_U без повреждений или содержащую AP-сайт или Gap-повреждение и 1,6–400,0 нМ PARP1 или 1,6–2000 нМ PARP2 в реакционном буфере (50 мМ NaCl; 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0 и 5 мМ DTT) с 5 мМ MgCl₂, готовили на льду в планшете с 384 лунками и инкубировали при комнатной температуре в течение 10 мин. Возбуждение флуоресцентных зондов проводили с помощью флюориметра «CLARIOstar» («BMG LABTECH», Германия) на длине волны 482 нм (фильтр 482–16 плюс дихроичный фильтр LP504), а интенсивность флуоресценции регистрировали на длине волны 530 нм (фильтр 530–

40). Каждое измерение состояло из 50 вспышек в каждой лунке, а полученные значения флуоресценции автоматически усреднялись. Для итоговых графиков были использованы средние значения, а значения K_D были рассчитаны с помощью программного обеспечения «MARS Data Analysis» («BMG LABTECH», Германия).

3.2.17. Изучение белок-нуклеиновых взаимодействий методом боргидридной сшивки

Реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 0,2 мкМ 5'-[FAM]-AP-ДНК NCP603_U или 5'-[FAM]-AP-NCP603_U 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 -ME; 10 мМ NaCl, инкубировали при 37 °С в течение 20 мин. Далее к смеси добавляли NaBH_4 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 °С в течение 15 мин. Компоненты реакционной смеси разделяли при помощи белкового гель-электрофореза по Лэммли (п. 3.2.1.).

В случае субстратов, содержащих AP-кластер, реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 0,2 мкМ 5'-[FAM]-AP-ДНК NCP603_multiU или 5'-[FAM]-AP-NCP603_multiU 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 -ME; 10 мМ NaCl. Пробы инкубировали при 37 °С в течение 20 мин. Далее к смеси добавляли NaBH_4 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 °С в течение 15 мин. Компоненты реакционной смеси разделяли при помощи белкового гель-электрофореза по Лэммли (п. 3.2.1.).

Структуру 5'-[FAM]-ДНК NCP603_multiU получали аналогично ДНК NCP603_U (п. 3.2.8.) с небольшим отличием. В реакционной смеси заменили суммарную концентрацию dNTP 800 мкМ на 200 мкМ dATP / dGTP / dCTP, 180 мкМ dTTP и 20 мкМ dUTP. Все последующие манипуляции не отличались от субстрата с одиночным dU.

3.2.18. Изучение белок-нуклеиновых взаимодействий методом ферментативного футпринтинга

Реакционная смесь объемом 10 мкл содержала 0,2 мкМ 5'-[^{32}P]-меченой ДНК или NCP603_U и 0,1 мкМ PARP1, PARP2 или PARP3 в буфере следующего 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 MgCl_2 . Реакционную смесь инкубировали при 37 °С в течение 15 мин. Для реакции РАрирования в реакционную смесь дополнительно вносили 400 мкМ NAD^+ . Далее пробы с ДНК обрабатывали 0,002 е.а. DNase I, пробы с NCP603_U — 0,007 е.а. DNase I при 37 °С в течение 15 мин. Концентрации всех белковых компонентов были подобраны экспериментально для получения оптимальной картины при

анализе продуктов расщепления белок-нуклеиновых комплексов. Для стабилизации AP-сайтов реакционную смесь обрабатывали метоксиамином в конечной концентрации 30 мМ во льду в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 1/5 объёма раствора, содержащего 90 % формамида, 50 мМ EDTA, 0,025 % бромфенолового синего и 0,025 % ксиленианола. Пробы разделяли в 20 % ПААГ в денатурирующих условиях (п. 3.2.3.). Далее проводили детекцию и обработку результатов (п. 3.2.1.).

3.2.19. Влияние PARP1, PARP2 и PARилирования на активность расщепления APE1

Для оценки активности APE1 в отношении ДНК во всех экспериментах использовался ДНК-дуплекс вне нуклеосомного контекста, содержащий AP-сайт в 12-ом положении от 5'-меченого конца. Для оценки эффективности APE1 в присутствии PARP была выбрана концентрация фермента, при которой расщепление субстрата, содержащего AP-сайт, в концентрации 0,1 мкМ составляло 40–50 % за 15 мин. Было установлено, что такая концентрация составляет 0,03 мкМ APE1 для субстратов с «out»-ориентированным повреждением, 1 мкМ APE1 для субстратов с «middle»-ориентированным повреждением, и 0,001 мкМ APE1 для ДНК вне нуклеосомного контекста. В соответствии с той же экспериментальной схемой для дальнейших экспериментов в соответствии с той же экспериментальной схемой концентрация PARP1 или PARP2 варьировалась от 10 до 1000 нМ. На последнем этапе эксперименты с 0,1 мкМ PARP1 или PARP2 проводили в присутствии 400 мкМ NAD⁺. Реакционные смеси во всех случаях содержали 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. Все продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 10 % ПААГ в денатурирующих условиях (п. 3.2.3.).

3.2.20. Влияние PARP1, PARP2 и PARилирования на активность ДНК-полимеразы

Polβ

На первом этапе была определена концентрация Polβ, необходимая для эффективного заполнения однонуклеотидной брешы в контексте NCP603_U. Для этого реакцию инициировали добавлением 1–1000 нМ Polβ и 100 мкМ dTTP к 0,1 мкМ раствору 5'-[³²P]-Gap-субстрата в буфере: 50 мМ NaCl; 50 мМ Tris-HCl, pH 8,0; 5 мМ DTT и 5 мМ MgCl₂. Объём реакционной смеси 10 мкл. Реакцию проводили при температуре 37 °С в течение 1; 3; 5; 10 мин и останавливали добавлением буфера, состоящего из 7 М мочевины и 50 мМ ЭДТА. Продукты разделяли с помощью электрофореза в 15 % полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (п. 3.2.3.). Детекцию проводили с помощью радиолуминесцентного сканирования экрана Image Screen K («Kodak», США) с помощью «Typhoon FLA 9500» («GE Healthcare», США) на длине волны

635 нм. Во всех случаях полученные электрофореграммы анализировали с использованием программы «Quantity One» («Bio-Rad», США). Эффективность синтеза ДНК оценивали по количеству продукта включения dTMP по отношению к начальной концентрации NCP603_U, содержащей разрыв, и выражали в процентах. Для оценки эффективности Pol β в присутствии PARP был выбран интервал в 3 мин, затем концентрация фермента была скорректирована для обеспечения линейного диапазона кинетики для субстратов с повреждениями, ориентированными «out» или «middle»; таким образом, в качестве подходящих концентраций Pol β были выбраны 2,5 и 50 нМ соответственно. Для дальнейшего анализа были оценены кинетические параметры включения dTMP в отсутствие или в присутствии 1; 5; 10; 25; 50; 100; 500 нМ PARP1 или 20; 50; 100; 500 нМ PARP2. Кроме того, степень включения dTMP оценивали в присутствии 1; 10; 100; 1000 мкМ NAD⁺ для каждой концентрации PARP. Влияние XRCC1 на активность Pol β оценивали по той же экспериментальной схеме. Концентрацию XRCC1 выбрали на первом этапе эксперимента, чтобы обеспечить включение dTMP на одном и том же уровне, и она составила 4 и 50 нМ для субстратов с повреждением, ориентированным «out» или «middle» соответственно. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 15 % ПААГ в денатурирующих условиях (п. 3.2.3.) и анализировали, как описано выше.

3.2.21. Влияние PARP1, PARP2 и PARилирования на активность LigIII α

На первом этапе реакции проводились при различных концентрациях LigIII α — 0,01, 0,1, 0,5 или 1 мкМ, без XRCC1 или с XRCC1 в эквимольном соотношении к LigIII α , чтобы найти оптимальные условия реакции. Таким образом, была выбрана концентрация LigIII α 0,5 мкМ. Субстраты Gap-NCP603_U обрабатывали Pol β в присутствии dTTP (п. 3.2.20.) для получения субстрата LigIII α . Реакционные смеси (конечный объем 10 или 30 мкл) содержали 0,02 мкМ 5'-[³²P]- или 0,1 мкМ 5'-меченого FAM 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 LigIII α и 100 мкМ NAD⁺; LigIII α и 0,01, 0,1 или 1 мкМ PARP1 или PARP2; или LigIII α , 100 мкМ NAD⁺ и 0,01, 0,1 или 1 мкМ PARP1 или PARP2 при отсутствии или в присутствии XRCC1. Все субстраты были проанализированы, как описано выше (п. 3.2.20.). Кроме того, 5'-FAM-меченые нуклеосомные субстраты были проанализированы методом электрофоретического разделения по Лэммли в 12 % ПААГ при соотношении акриламида и бис-акриламида 40:1 с последующим окрашиванием Кумасси R-250 (п. 3.2.1.). При необходимости перед электрофорезом аликвоты реакционной смеси (10 мкл) обрабатывали 0,001 ед. протеиназы К или 0,5 мкМ PARG в течение дополнительных 30 мин при 37 °С.

3.2.22. Подготовка нуклеосомных препаратов и их комплексов с белками PARP1, PARP2 и PARP3 к сканированию методом АСМ

Для изучения нуклеосом L-NCP603 и их комплексов с белками PARP методом АСМ использовали модифицированную поверхность слюды 1-(3-аминопропил)силатраном (APS). Синтез APS и метод обработки поверхности слюды проводили согласно ранее опубликованному протоколу [226]. Реакционная смесь состояла из 10 нМ нуклеосом L-NCP603, буфера (20 мМ NaCl; 0,2 мМ ЭДТА; 1,6 мМ CHAPS; 10 мМ Tris-HCl, pH = 7,5, и 5 мМ β -ME) и одного из PARP в концентрации 10 нМ (PARP1), 35 нМ (PARP2) или 66 нМ (PARP3). Реакционную смесь инкубировали в течение 15 мин при температуре 37 °С. Затем образцы разбавляли в 10 раз водой Milli-Q и сразу же наносили на поверхность слюды. Через 2 мин после нанесения поверхность слюды трижды промывали 1 мл воды Milli-Q и высушивали в слабом потоке аргона. Перед получением изображений образцы хранили в эксикаторе с влагопоглотителем NaOH_{тв}.

Для изучения CLP601-8 и их комплексов с белками PARP методом АСМ использовали метод иммобилизации на поверхности слюды хлоридом никеля (II) (NiCl₂) [213, 223]. Реакционная смесь состояла из 10 нМ CLP601-8, буфера (20 мМ NaCl; 0,2 мМ ЭДТА; 1,6 мМ CHAPS; 10 мМ Tris-HCl, pH = 7,5, и 5 мМ β -ME) и одного из PARP в концентрации 66 нМ. Реакционную смесь инкубировали в течение 15 мин при температуре 37 °С. Затем образцы разбавляли в 10 раз водой Milli-Q с добавлением 5 мМ NiCl₂, и сразу же наносили на поверхность слюды. После нанесения поверхность слюды трижды промывали 1 мл воды Milli-Q и высушивали в слабом потоке аргона. Перед получением изображений образцы хранили в эксикаторе с влагопоглотителем NaOH_{тв}.

3.2.23. АСМ-сканирование

Сканирование проводили на приборе «Multimode 8» («Bruker», США) в режиме постукивания (TappingMode) на воздухе. Для сканирования нуклеосом L-NCP603 использовали кремниевые кантилеверы «NSG30_SS» («TipsNano», Эстония) с резонансной частотой наконечника 240–440 кГц. Для сканирования CLP601-8 использовали углеродные кантилеверы «NSG01_DLC» («TipsNano», Эстония) с резонансной частотой наконечника 90–180 кГц. Типичное полученное изображение имело размер 2 мкм × 2 мкм при 1024 пикселях на строку, 4 мкм × 4 мкм при 2048 пикселях на строку или 8 мкм × 8 мкм при 4096 пикселях на строку. Частота сканирования составляла 1,0, 0,5 или 0,25 Гц соответственно.

3.2.24. Анализ АСМ-изображений

Все изображения были сначала обработаны в программе Gwyddion (<http://gwyddion.net/>, по состоянию на 01 апреля 2025 г.). Программа ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>, по состоянию на 01 апреля 2025 г.) использовалась для измерения параметров диска ядра нуклеосомы L-NCP603 и ядра нуклеосомы L-NCP603 в комплексе с PARP, длины плеч линкерных ДНК нуклеосомы L-NCP603 и угла между плечами ДНК (Рис. 23). Длину плеча оценивали, измеряя ДНК от

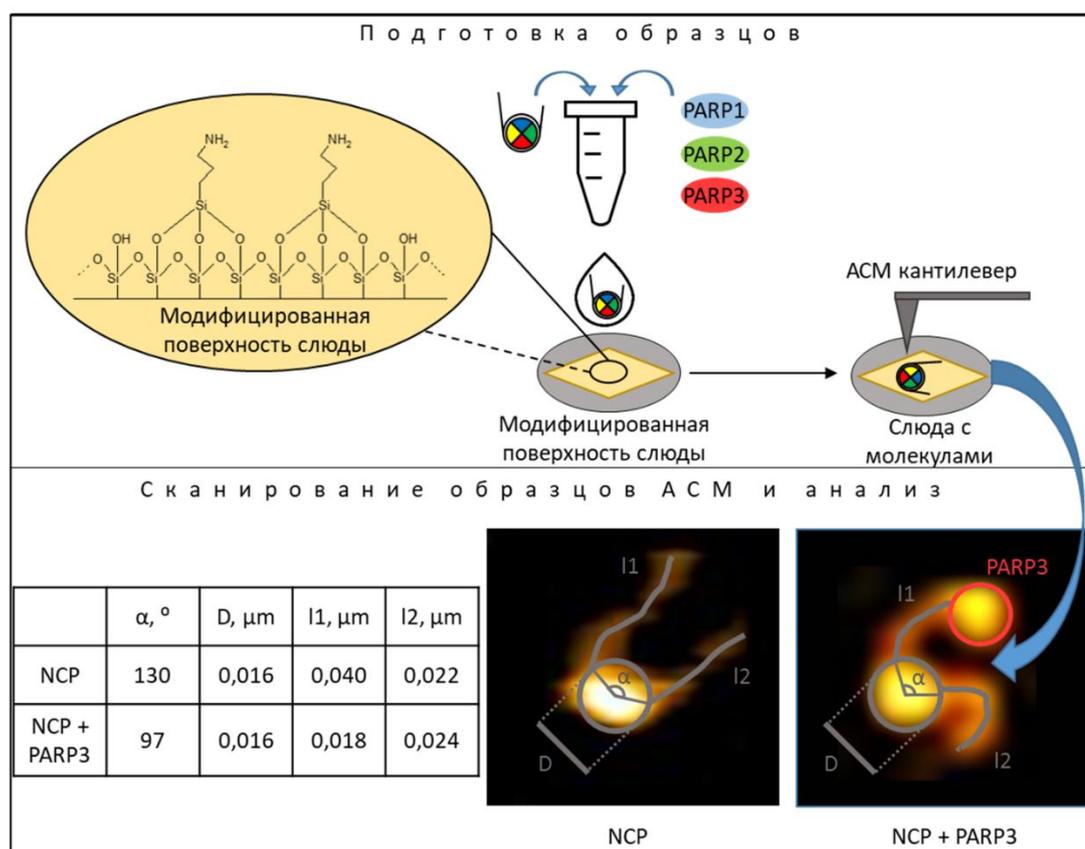


Рис. 23. Рабочий процесс подготовки и изучения образцов L-NCP603 и комплексов L-NCP603•PARP с помощью АСМ.

конечной точки до точки «входа/выхода» в диск NCP. Диаметры ядра L-NCP603 и ядра PARP оценивали как максимальное расстояние между двумя параллельными касательными к диску. Угол α между плечами ДНК нуклеосомы L-NCP603 определяли как угол, образованный двумя лучами, идущими от центра диска ядра к точкам «входа-выхода» ДНК. На основе полученных данных были построены гистограммы и графики с помощью программного обеспечения «SigmaPlot v.11.0» («Systat Software Inc.», США). Разброс измеренных значений был рассчитан с помощью t-распределения Стьюдента с 95 % доверительными интервалами. При сортировке комплексов PARP•L-NCP603 мы выбрали расстояние 3 нм между ядром L-NCP603 и PARP в качестве пограничной точки. Радиус кривизны кантилевера NSG30_SS (~2 нм) позволил нам

однозначно идентифицировать PARP, отделённый от ядра L-NCP603, когда расстояние между ними превышало 3 нм. Поэтому, когда белки располагались ближе к ядру L-NCP603, мы предполагали, что они напрямую взаимодействуют.

Программу Gwyddion (<http://gwyddion.net/>, по состоянию на 01 апреля 2025 г.) использовали для измерения следующих параметров: площадь проекции на плоскость (S) и объём между поверхностью и фоном, вычисленным по Лапласу (V), CLP601-8 и их комплексов с белками PARP (Рис. 24). Для контрольных молекул CLP601-8 было вручную подсчитано число

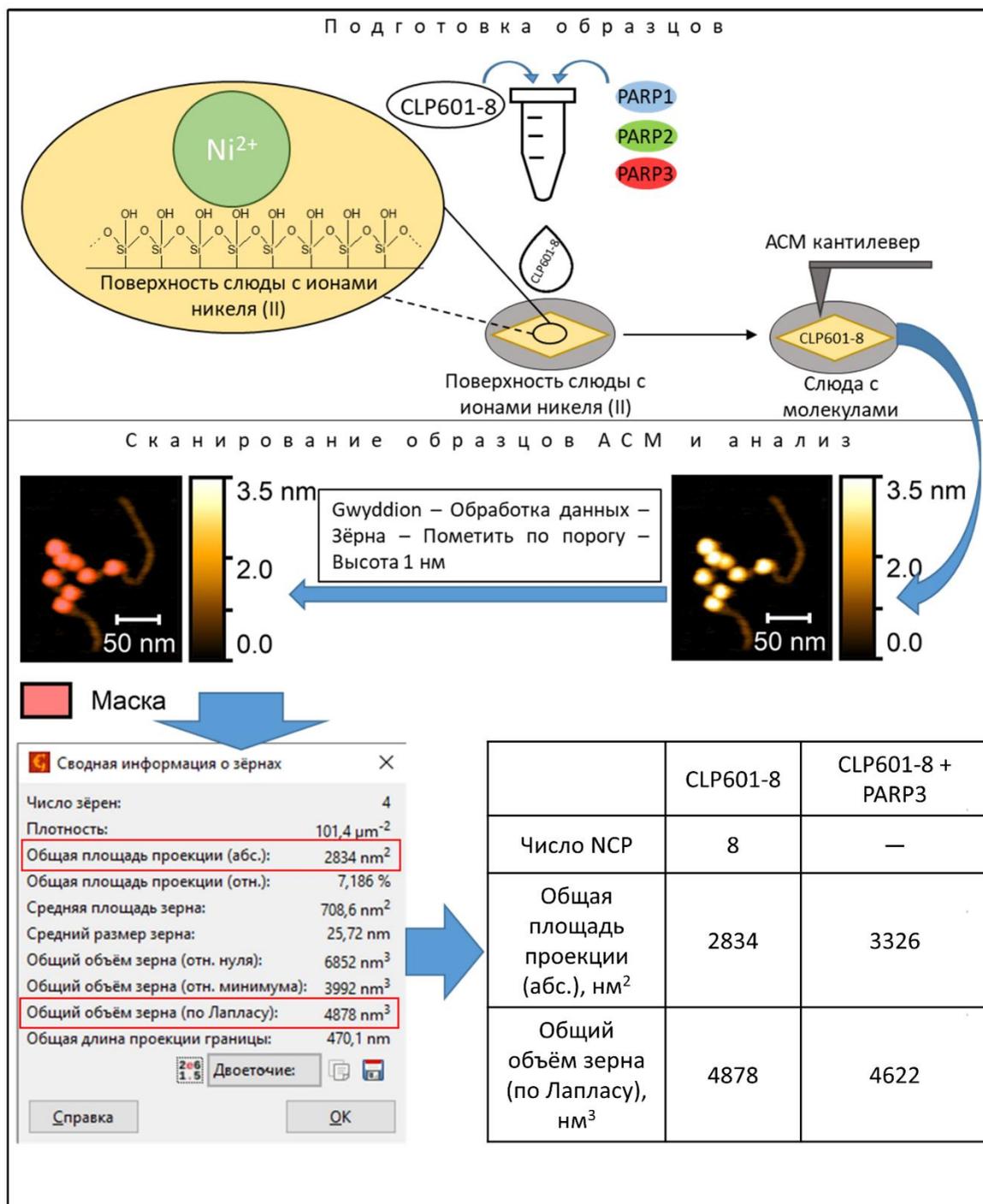


Рис. 24. Рабочий процесс подготовки и изучения CLP601-8 и комплексов CLP601-8•PARP с помощью АСМ.

NCP в составе одной молекулы ДНК CLP601-8. Все полученные данные анализировали в Microsoft Excel 2010. Результаты представляли в виде точечных 2D-графиков зависимости площади от объема исследуемых частиц. Для статистической обработки полученных результатов были построены блочные диаграммы с ограничителями выбросов, а данные проанализированы тестом Краскела-Уоллиса с постобработкой тестом Манна-Уитни с поправкой Бонферрони (Приложение).

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

На сегодняшний день основные этапы BER изучены достаточно детально. Тем не менее основная часть экспериментальных данных об активности белков BER получена с использованием ДНК-дуплексов, содержащих повреждения — интермедиаты BER. В тоже время большой интерес представляет исследование процесса BER в контексте хроматина, базовой структурной единицей которого является нуклеосома. В литературе представлено довольно много данных, характеризующих эффективность отдельных этапов BER в контексте NCP, но роль ядерных PARP и их активность в этом процессе остается малоизученной [105, 246]. Известно, что PARP1 и PARP2 принимают участие в регуляции системы BER. В первую очередь предполагалось изучить их роль в этом процессе с использованием NCP603_U, а также оценить возможность экстраполировать многочисленные данные, полученные с использованием модельных ДНК-дуплексов, на систему с NCP. Для этого мы определили влияние этих белков на активность ключевых ферментов системы BER в контексте NCP, содержащих в своем составе ДНК-интермедиаты основных стадий BER.

Нуклеотиды в NCP неэквивалентны друг другу и отличаются как удаленностью от области входа-выхода, так и ротационной ориентацией относительно ядра NCP. Поскольку исправление повреждений в «in»-ориентированной позиции существенно затруднено, то в данной работе мы использовали модельные NCP с повреждением на месте «out»- и «middle»-ориентированных нуклеотидов. Схематично структуры ДНК, используемые в этой части работы, представлены на **Рис. 11**.

4.1. Связывание PARP1 и PARP2 с NCP, содержащей повреждение ДНК; эффективность их активации

Для того, чтобы оценить вклад взаимодействия PARP1 и PARP2 со свободной нуклеосомной ДНК и компонентами нуклеосомы NCP603_U, сродство PARP1 и PARP2 к нативной NCP603_U, AP-NCP603_U и Gap-NCP603_U оценивали методами анизотропии флуоресценции [245] и EMSA (п. 3.2.15.). Величины найденных констант диссоциации для комплексов PARP1/2•ДНК/NCP представлены в **Таблицах 6 и 7**. Схема получения повреждений в ДНК и NCP приведена на **Рис. 25**.

Таблица 6. Величины констант диссоциации комплексов PARP1 и PARP2 с ДНК и NCP без повреждений, или содержащих AP-сайт или Gap. Константы найдены с помощью измерений анизотропии флуоресценции. Обозначения «out» и «middle» указывают на ориентацию повреждения в структуре NCP. Данные представлены как среднее значение $K_D \pm (SD)$ минимум для трёх независимых экспериментов. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.16.).

| Структура | ДНК, нМ | | NCP603_U, нМ | |
|---------------|---------|----------|--------------|----------|
| | 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 |

Таблица 7. Величины констант диссоциации комплексов PARP1 и PARP2 с ДНК и NCP без повреждений, или содержащих AP-сайт или Gap. Константы найдены с помощью метода EMSA. В качестве метки, введённой по 5'-концу ДНК-дуплекса, использовали изотоп фосфора ^{32}P . Обозначения «out» указывают на ориентацию повреждения в структуре NCP. Данные представлены как среднее значение $K_D \pm (SD)$ минимум для трёх независимых экспериментов. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.15.; п. 3.2.16.).

| Структура | ДНК, нМ | | NCP603_U, нМ | |
|------------|---------|-----------|--------------|----------|
| | PARP1 | PARP2 | PARP1 | PARP2 |
| Native-out | 113 ± 5 | 300 ± 100 | 52 ± 8 | 190 ± 20 |
| AP-out | 92 ± 3 | 330 ± 80 | 65 ± 3 | 130 ± 4 |
| Gap-out | 48 ± 3 | 240 ± 80 | 38 ± 3 | 57 ± 8 |

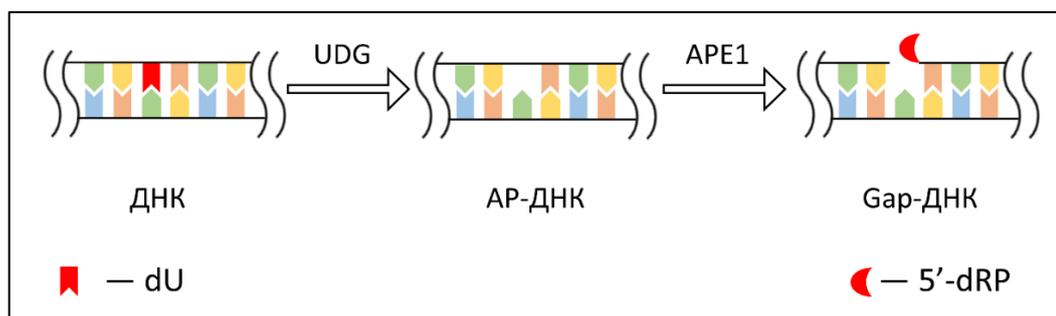


Рис. 25. Схема получения интермедиатов первых этапов процесса BER.

Согласно полученным величинам K_D , PARP1 и PARP2 проявляют повышенное сродство к нуклеосомам из-за дополнительных белок-белковых взаимодействий с гистонами. Анизотропией флуоресценции установлено, что PARP1 демонстрирует высокое сродство как к

NCP603_U, так и к свободной ДНК с минимальной разницей в аффинности между этими субстратами (**Таблица 6**). Для PARP1 методом EMSA (**Таблица 7**) показано повышенное сродство к субстратам, содержащим одноцепочечные разрывы (Gap), что не наблюдалось при измерениях анизотропии флуоресценции. Такое расхождение в полученных данных объясняется принципиальными различиями двух методов. Метод анизотропии флуоресценции регистрирует изменения вращательной диффузии молекул флуорофора, возникающие при образовании комплексов, причем основной вклад в сигнал вносят молекулы белка, находящиеся в непосредственной близости от флуоресцентной метки (например, 5'-FAM). Поскольку в нашем случае флуоресцентная метка находится непосредственно на конце ДНК, а PARP1 связывает тупые концы ДНК, то, вероятно, вклад такого взаимодействия в данном эксперименте оказался выше, чем от потенциального взаимодействия PARP1 с другими сайтами связывания [161, 181, 247] (**Рис. 26 А**). Метод EMSA детектирует изменение электрофоретической подвижности молекулы ДНК из-за формирования белок-нуклеиновых комплексов, но несёт минимальную информацию о месте связывания белка с субстратом (**Рис. 27**).

Особенностью структуры ДНК, используемой в наших экспериментах, является расположение повреждения ДНК (например, AP-сайт или Gap) в относительной близости к тупому концу ДНК — аналог кластерного повреждения. Как правило, при моделировании кластеризованных повреждений ДНК одиночные повреждения располагают в пределах 1 витка спирали ДНК. В нашем случае для «out»-ориентированного нуклеотида расстояние от разрыва до конца ДНК составляет 12 нуклеотидов, что формально позволяет рассматривать такие повреждения как одиночные. Однако, если учитывать размер PARP1, не исключено, что в силу стерического эффекта молекулы PARP1 могут взаимно влиять на взаимодействие с соседними сайтами связывания. При этом нельзя также исключить взаимодействие PARP1 с другими участками в исследуемых структурах из-за ограничений используемых методов детекции. В последующих работах нашей лаборатории методом анизотропии флуоресценции было обнаружено, что сродство PARP1 к Gap-повреждению сильно зависит от расположения повреждения относительно тупых концов ДНК в структуре как свободной ДНК, так и NCP [248]. При большем удалении повреждения от тупого конца сродство PARP1 к Gap-повреждению увеличивалось.

В присутствии PARP2 наблюдается выраженное увеличение анизотропии для ДНК-кофакторов, содержащих Gap, что свидетельствует о специфическом распознавании данного типа повреждений (**Рис. 26 Б**). При этом аффинность PARP2 к данному типу повреждений не зависит от близости к тупому концу в NCP [181]. Следует отметить, что в случае NCP603_U аффинность 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 (Таблица 6). PARP2 также обладает повышенным сродством к NCP603_U по сравнению со свободной ДНК (Таблица 6). Вероятно, существенный вклад в это взаимодействие вносят белок-белковые контакты с гистонами.

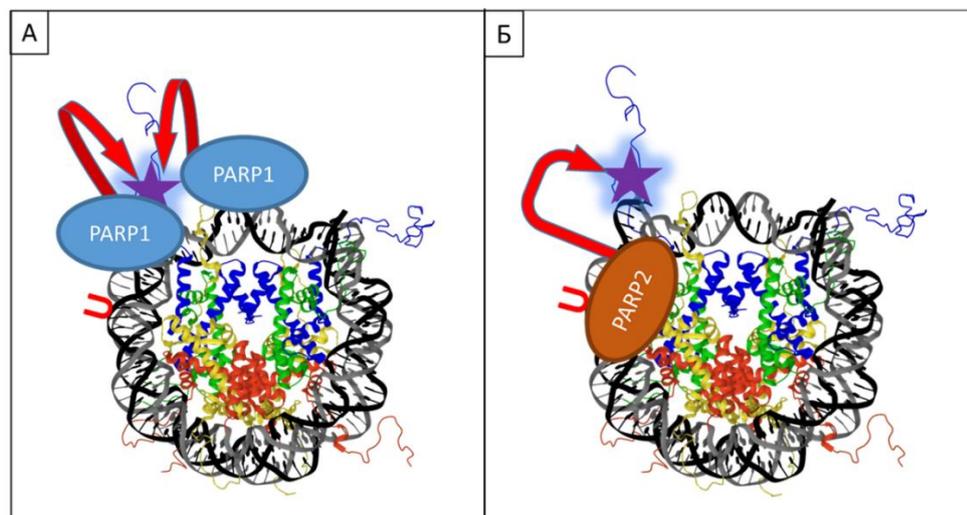


Рис. 26. Схематическое изображение эффекта влияния белков PARP1 и PARP2 на уровень анизотропии флуоресценции. **А** — Влияние белка PARP1 на флуорофор из-за локализации PARP1 в диадной области и/или тупых концах ДНК, и/или месте повреждения ДНК. **Б** — Влияние белка PARP2 на флуорофор из-за локализации в месте повреждения ДНК. Красной буквой U обозначено повреждение в цепи ДНК, расположенное в 12-ом положении нуклеотидной цепи. Расстояние от флуорофора до повреждения составляет ~3,7 нм. Флуорофор схематично обозначен фиолетовой звездочкой с синим свечением.

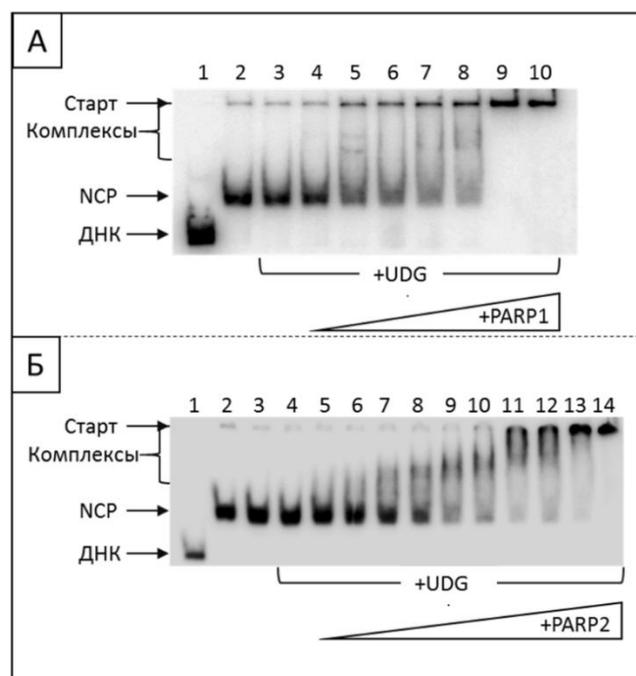


Рис. 27. **А** — EMSA-анализ комплексов белка PARP1 с меченым 5'-[³²P]-AP-NCP603_U. Дорожка 1 — 147 нт ДНК; дорожка 2 — нативная NCP603_U; дорожка 3 — AP-NCP603_U; дорожки 4–10 — комплексы PARP1 с AP-NCP603_U. **Б** — EMSA-анализ комплексов белка PARP2 с меченым 5'-[³²P]-AP-NCP603_U. Дорожка 1 — 147 нт ДНК; дорожка 2 — нативный NCP603_U; дорожка 3 — AP-NCP603_U; дорожки 4–14 — комплексы PARP2 с AP-NCP603_U. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.15.).

Наши результаты хорошо согласуются с данными, полученными с использованием свободных ДНК-дуплексов. В работе Сухановой М.В. и других с помощью метода АСМ и с использованием двуцепочечных ДНК длиной 1200 пн, в которых повреждение располагалось равноудалённо от тупых концов (600 пн), показано, что PARP1 обладает высокой аффинностью к одноцепочечным разрывам и тупым концам; PARP2 обладает высокой аффинностью к разрывам, но низкой — к тупым концам [161]. Важно отметить, что в литературе показано увеличивающееся сродство PARP2 к структурам ДНК и NCP, содержащим 5'-фосфатную группу, включая наличие этой группы на тупых концах ДНК-дуплекса [149, 248]. Исследования, проведенные с использованием модельных структур ДНК, имитирующими интермедиаты BER, показывают, что PARP1 предпочитает интермедиаты ранних этапов процесса BER (AP-сайты, разрывы с 5'-dRP), тогда как PARP2 эффективнее связывается с 5'-фосфорилированными разрывами, в том числе на этапе лигирования разрыва [159, 161, 162, 249].

В нуклеосомном контексте ключевым вопросом является роль HPF1, поскольку данный белок участвует как кофермент в катализируемой PARP1 и PARP2 реакции транс-PARилирования гистонов [181, 248]. Было продемонстрировано, что комплекс PARP2•HPF1 эффективно катализирует PARилирование гистонов вблизи Gap-повреждения ДНК в нуклеосоме. Это наблюдение свидетельствует о пространственной близости комплекса PARP2•HPF1 с гистонами в области повреждения, что является необходимым условием для их модификации, хотя прямого доказательства белок-белковых контактов между PARP2 и гистонами в этих работах пока не показано. Для PARP1 такого эффекта обнаружено не было.

Известно, что эффективность активации PARP и её сродство к ДНК не всегда коррелируют [162]. Существенный вклад в активность белка вносит эффект кооперативного взаимодействия доменов белка при связывании с ДНК [151, 250]. В связи с этим мы провели серию сравнительных экспериментов по определению активности PARP в присутствии ДНК и NCP. В настоящей работе эффективность активации PARP1 и PARP2 изучалась в присутствии ДНК, или NCP603_U, с использованием [³²P]-NAD⁺ по включению радиоактивной метки в растущую полимерную цепь PAR. Далее радиоактивный полимер детектировали (п. 3.2.7.). Результаты представлены на **Рис. 28**.

Данные по активации PARP1 и PARP2 на NCP603_U с повреждениями в разных ориентациях («middle» или «out») и на соответствующей свободной ДНК хорошо согласуются между собой. Выход продукта реакции PARилирования белком PARP1 был выше при активации на NCP603_U при отсутствии повреждения, то есть активация PARP1 преимущественно обусловлена её взаимодействием с тупыми концами ДНК (**Рис. 28 А, В**).

Наличие внутреннего повреждения ДНК в случае близкого расположения к тупым концам, особенно Gap, снижало общий синтез PAR PARP1 при высоких концентрациях NAD^+ (1000 мкМ), независимо от нуклеосомной упаковки ДНК (**Рис. 28 Б, Г**). Это снижение, вероятно, связано со специфическими конформационными изменениями PARP1 при связывании с поврежденной ДНК и NAD^+ [147, 251, 252] или с конкуренцией за связывание с двумя близкорасположенными типами повреждений. Кроме того, PARP1 проявляет дополнительную специфичность к структуре нуклеосомы: связывание белка PARP1 вызывает индуцированное PARилированием разворачивание ДНК в NCP [180]. Наши результаты указывают, что PARP1 наиболее эффективно активируется нативной NCP и AP-NCP, но не Gap-NCP (**Рис. 28 В, Г**). Такой эффект, вызванный Gap в NCP603_U, можно объяснить геометрией комплекса. Близость повреждения к тупому концу (аналогу повреждения DSB) в нашей структуре, возможно, способствует образованию непродуктивного комплекса, где несколько молекул PARP1 конкурируют за связывание с двумя близкорасположенными сайтами связывания в ДНК — тупым концом и Gap-повреждением, — что изменяет уровень синтеза PAR. Это контрастирует с данными на ДНК-дуплексах длиной 70 пн с Gap в 35-ом положении: уровень синтеза PAR PARP1 на Gap превышал таковой для нативной ДНК, что подчеркивает важность пространственного расположения сайтов связывания относительно тупых концов [168].

Активация PARP2 на NCP603_U в целом сопоставима с активацией на свободной ДНК, кроме случая Gap-NCP603_U (**Рис. 28 Д, Ж**). Только в нуклеосомном контексте Gap вызывает значительное снижение общего синтеза PAR, катализируемого PARP2 (**Рис. 28 Е, З**), тогда как на свободной ДНК наличие повреждений не влияло на уровень синтезируемого PAR. Это указывает на особую чувствительность активации PARP2 к повреждению типа Gap именно в условиях нуклеосомной упаковки. Интересно, что такой результат может свидетельствовать или об изменении каталитической активности PARP2 из-за искажения пространственной геометрии Gap в составе нуклеосомной ДНК при сохранении высокого сродства к этому субстрату, или из-за изменения самого сайта связывания за счёт дополнительных белок-белковых взаимодействий с гистонами. Вероятно, в случае нуклеосомной организации функция PARP2 заключается не в авто-PARилировании белка PARP2 в составе комплекса PARP2•Gap-NCP603_U. В какой-то мере эта гипотеза подтверждается работой, опубликованной после этого исследования, в которой белок PARP2 изучался в комплексе с HPF1 [181, 248]. В этом случае была продемонстрирована преимущественная трансмодификация гистонов белком PARP2 вблизи Gap. Для PARP1 существенного изменения эффекта транс-PARилирования гистонов в комплексе с HPF1 обнаружено не было, хотя на структурах с Gap-повреждением уменьшался уровень

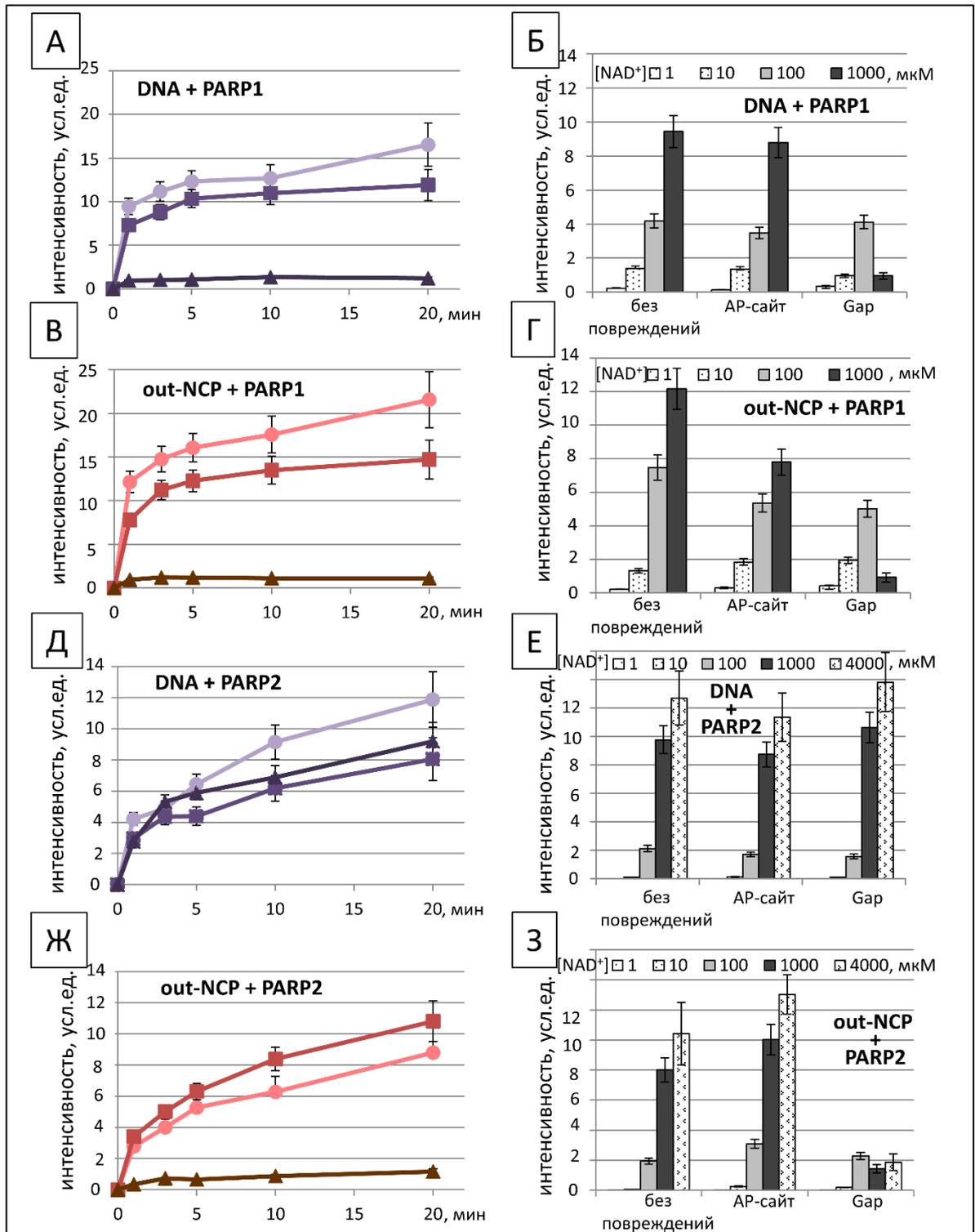


Рис. 28. Изучение активности белков PARP1 и PARP2 в присутствии различных ДНК-активаторов. Активацию PARP1 и PARP2 на ДНК, или NCP603_U, детектировали количеством PAR, синтезируемого PARP1 или PARP2 с использованием $[^{32}\text{P}]\text{-NAD}^+$ в качестве предшественника. Графики на панелях (А–Г) относятся к активации PARP1; (Д–З) — PARP2. На всех графиках данные, полученные с использованием нативного субстрата обозначены — кружком, с использованием AP-сайта — квадратом, с использованием Gar-повреждения — треугольником. Графики на панелях в левой части представляют собой кинетику накопления PAR при 1000 мкМ NAD^+ ; гистограммы на панелях в правой части представляют собой общее количество PAR, синтезированного PARP1 за 1 мин или PARP2 за 3 мин при концентрациях NAD^+ 1–1000 мкМ или 1–4000 мкМ соответственно. На всех графиках экспериментальные данные с использованием свободной ДНК представлены фиолетовыми кривыми; NCP603_U представлены красными кривыми. Данные представлены как среднее значение \pm (SD) минимум для трёх независимых экспериментов. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.7).

авто-РАрилирования с одновременным увеличением транс-РАрилирования гистонов. Данные, полученные в этой работе и в последующих исследованиях нашей лаборатории, могут указывать на различные места локализации двух белков на NCP. Дополнительное изучение структурной локализации PARP1 и PARP2 в NCP позволит более детально понять функции этих ферментов в хроматине.

Таким образом, наши данные указывают на способность белков PARP1 и PARP2 эффективно взаимодействовать с ДНК-интермедиатами BER в составе NCP. С учетом известной регуляторной роли этих белков в BER, которая показана в реконструированных системах со свободными ДНК-дуплексами, представляет интерес изучить возможное модулирующее влияние нуклеосомной структуры на этот процесс. Далее мы последовательно реконструировали ключевые стадии BER в двух вариантах: на свободной ДНК и на NCP.

4.2. Влияние PARP1 и PARP2 на белков-участников BER

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 [253, 254]. В случае NCP ориентация AP-сайта по отношению к гистоновому ядру важна для реализации активности APE1. Многочисленные исследования APE1, включающие как ДНК, так и NCP, указывают на то, что нуклеосомная организация ДНК создает препятствие для доступа к AP-сайту [110, 255, 256]. В нашей работе мы изучили влияние белков PARP1 и PARP2 на активность APE1 с использованием NCP (**Рис. 29**).

PARP1 продемонстрировала выраженное подавление активности APE1 на двух типах субстратов (middle-AP-NCP603_U и out-AP-NCP603_U; **Рис. 29 А, Б**). Однако в условиях РАрилирования PARP1 активность APE1 восстанавливалась до уровня контрольного препарата (**Рис. 29 Д**). Восстановление эффективности расщепления APE1 наблюдалось независимо от ориентации повреждения и согласуется с данными, полученными для свободной ДНК [257]. Наблюдаемые эффекты можно объяснить конкуренцией PARP1 и APE1 за связывание с AP-сайтом [257]. При активации фермента PARP1 PAR, ковалентно присоединенный к PARP1, способствует диссоциации PARP1 из комплекса с ДНК за счёт электростатического отталкивания, тем самым освобождая AP-сайт для доступа APE1. Эти результаты соответствуют ранее опубликованным данным для ДНК вне нуклеосомного контекста, однако в нуклеосомном контексте такой эффект продемонстрирован впервые. В отличие от PARP1, PARP2 не оказывала существенного влияния на расщепление AP-сайта APE1 ни в отсутствие, ни в присутствии NAD^+ (**Рис. 29 В, Г, Д**). Такой эффект можно объяснить низким сродством PARP2 к ДНК, содержащей AP-сайты (**п. 4.1.; Таблица 6**), а также низким уровнем РАрилирования PARP2 [162, 258].

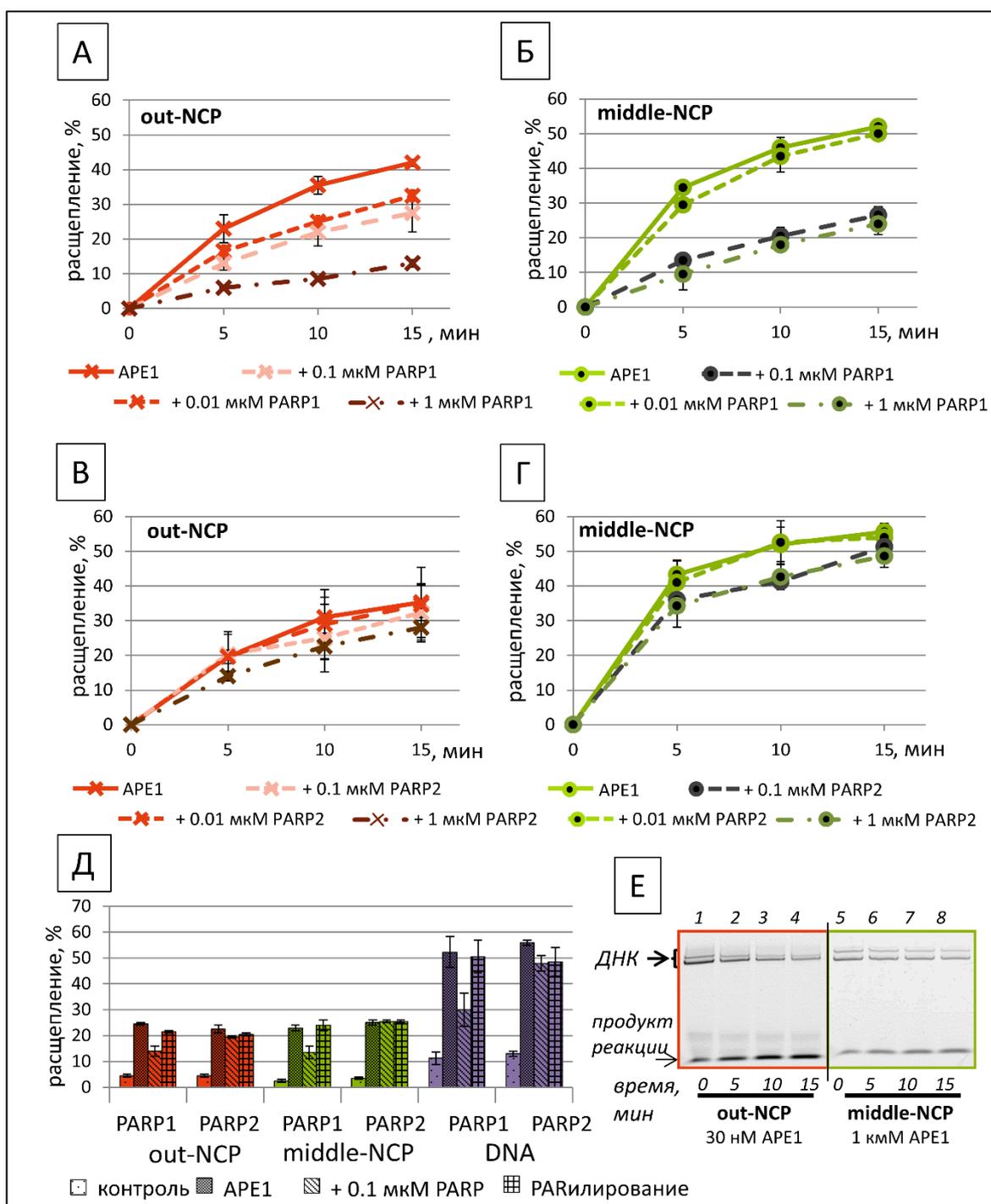


Рис. 29. Кинетический анализ активности APE1 по отношению к «out»-ориентированному или «middle»-ориентированному AP-сайту в контексте NCP603_U в присутствии PARP1 или PARP2. **А** — Кинетика для out-NCP603_U и PARP1. **Б** — Кинетика для middle-NCP603_U и PARP1. **В** — Кинетика для out-NCP603_U и PARP2. **Г** — Кинетика для middle-NCP603_U и PARP2. **Д** — Влияние PARилирования, катализируемого PARP1 или PARP2, на активность APE1 по отношению к ДНК, содержащей AP-сайт, или субстратам на основе NCP603_U. «Контроль» соответствует спонтанному расщеплению AP-сайта; «APE1» указывает на специфическое расщепление APE1 в условиях реакции; «+ 0,1 мкМ PARP» обозначает специфическое расщепление в присутствии указанного белка; и «PARилирование» представляет собой специфическое расщепление в присутствии указанного белка и 400 мкМ NAD⁺. Данные (А–Д) представлены как среднее значение ± (SD) минимум для трёх независимых экспериментов. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.7.). Все графики нормализованы относительно спонтанного расщепления AP-сайта в экспериментальных условиях. **Е** — Разделение продуктов реакции 0,1 мкМ 5'-FAM-меченого AP-NCP603_U с APE1 в 10 % ПААГ в денатурирующих условиях (п. 3.2.3.). Во всех случаях концентрации APE1 были выбраны для условий реакции с участием субстратов out-NCP603_U и middle-NCP603_U, и составили 0,03 и 1 мкМ соответственно.

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 ДНК были выражены сильнее (**Рис. 29 Д**). Такой результат можно объяснить повышенным сродством белков к месту повреждения в структуре NCP.

На следующем этапе мы оценили способность Pol β встраивать dNMP в структуре Gap-NCP603_U (**Рис. 30 А, Б** и **Рис. 31**). В процессе BER Pol β осуществляет два ключевых этапа восстановления Gap-разрыва с 3'-гидроксильной и 5'-dRP-группами: удаление 5'-dRP-фрагмента с помощью её dRP-лиазной активности и встраивание dNMP для восстановления целостности ДНК. В системе BER белок Pol β образует наиболее стабильный комплекс с XRCC1. Мы исследовали способность Pol β осуществлять включение dNMP как в присутствии, так и в отсутствие XRCC1, а также исследовано влияние PARP1, PARP2 и PARилирования на эту активность с использованием конструкций middle-NCP603_U и out-NCP603_U (**Рис. 30** и **Рис. 31**).

PARP1 влияла на активность Pol β , приводя к почти полному подавлению синтеза ДНК при концентрациях ≥ 50 нМ (**Рис. 31 А, Б**). PARилирование PARP1 ослабляло этот эффект, но не восстанавливало исходную активность Pol β полностью (**Рис. 30 В**). 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 [180]. Ранее в нашей лаборатории было показано, что эффективность Pol β возрастает при локализации повреждений вблизи тупых концов ДНК [259]. Однако одновременно возникает конкуренция между Pol β и PARP1 за связывание с ДНК, 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 [160]. Само по себе наличие XRCC1 существенно не изменяло кинетические параметры Pol β (**Рис. 31 А, Б**). Однако XRCC1 умеренно снижал негативное влияние PARP1 на Pol β , особенно для out-Gap-NCP603_U (**Рис. 30 В, Г** и **Рис. 31 А, Б**). Вероятно, образование стабильного комплекса Pol β •XRCC1 повышает эффективность диссоциации PARP1 из комплекса PARP1•NCP [116, 260].

PARP2 также подавляла активность Pol β для обоих типов повреждений (**Рис. 30 Б** и **Рис. 31 В, Г**). PARилирование PARP2 не оказывало влияния на эффект подавления активности Pol β в широком диапазоне концентраций NAD⁺, особенно для out-Gap-NCP603_U (**Рис. 30 Д**).

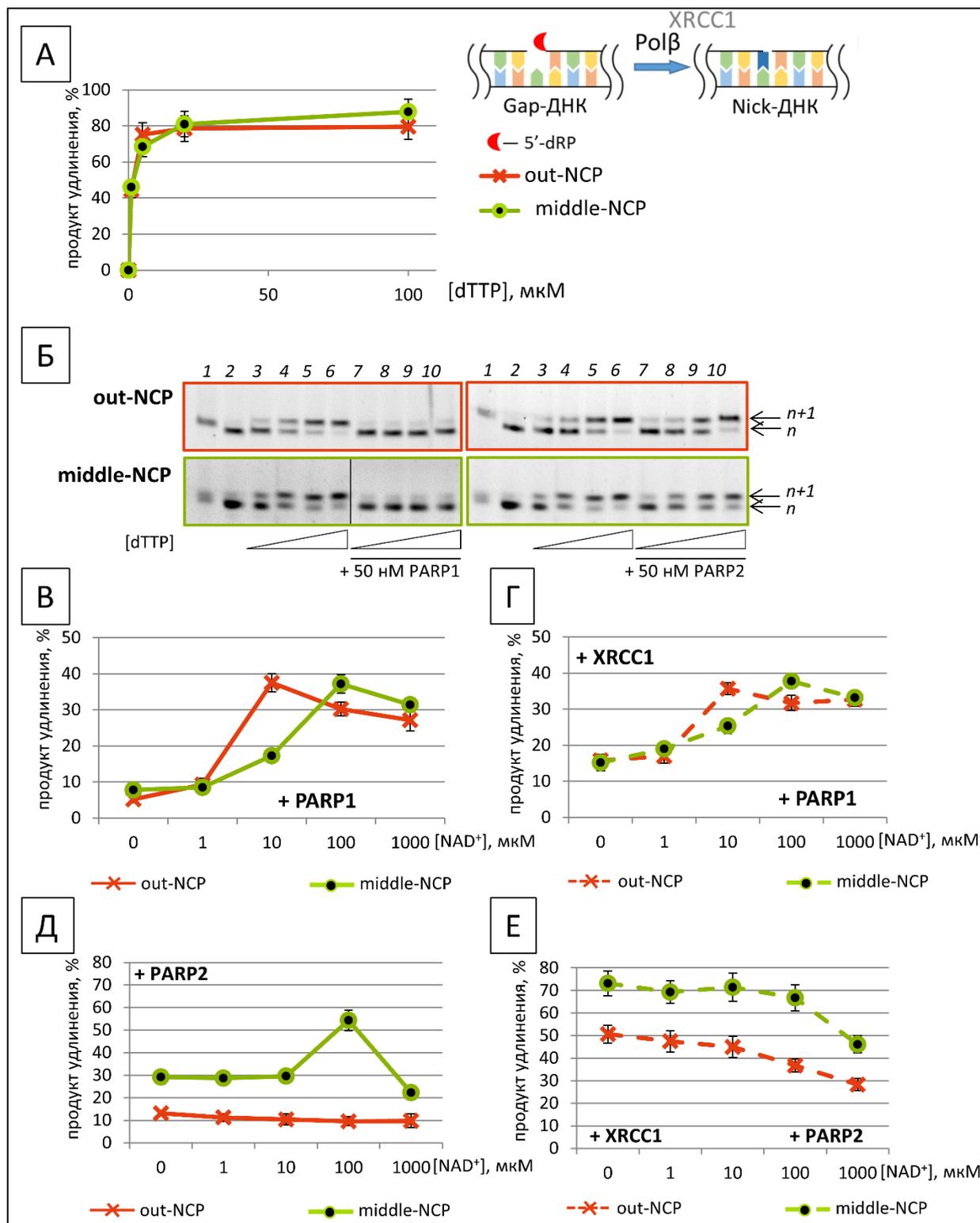


Рис. 30. Активность Polβ по отношению к субстратам Gap-NCP603_U (А, Б) и в процессе PARилирования, катализируемого PARP1 (В, Г) или PARP2 (Д, Е) в отсутствие (А–В, Д) или в присутствии XRCC1 (Г, Е). Графики на панелях (В–Е) представляют данные, полученные при 10 мкМ dTTP и 50 нМ PARP1 или PARP2. Данные (А, В–Е) представлены как среднее значение ± (SD) минимум для трёх независимых экспериментов. (Б) Продукты реакции включения dTMP Polβ (дорожки 3–6) в присутствии PARP1 (левая часть, дорожки 7–10) или PARP2 (правая часть, дорожки 7–10), когда использовался Gap-NCP603_U, «out» (верхняя панель) или «middle» (нижняя панель). Дорожка 1 — субстрат AP-NCP603_U; дорожка 2 — субстрат Gap-NCP603_U. Во всех случаях в качестве условий реакции для субстратов out-NCP603_U и middle-NCP603_U были выбраны концентрации Polβ 2,5 и 50 нМ соответственно. Продукты реакции разделяли в 15 % денатурирующем ПААГ (п. 3.2.3.). Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.20.).

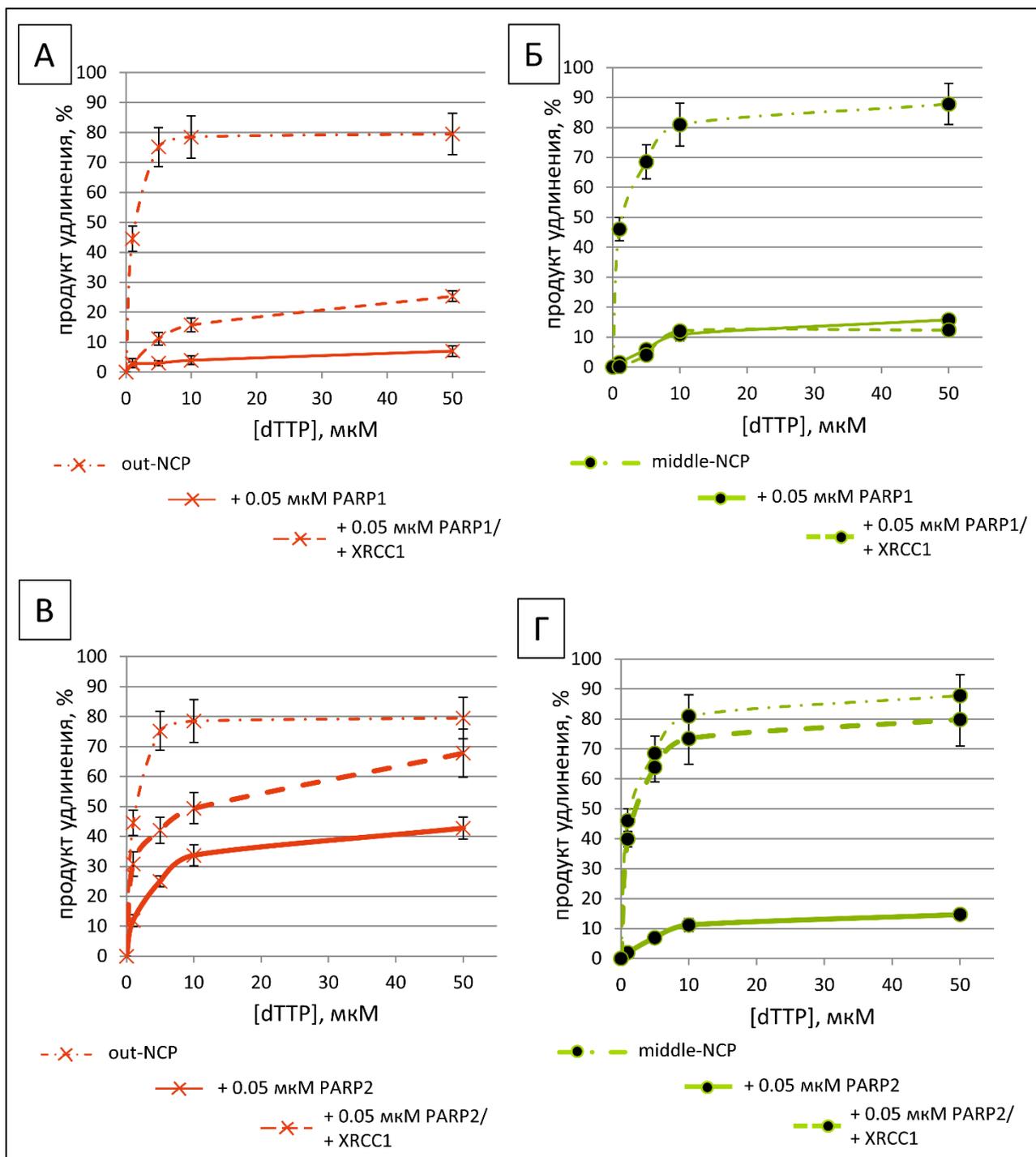


Рис. 31. Активность Pol β по отношению к субстратам Gap-NCP603_U в отсутствие (красные или зелёные кривые с точками и штрихами) и в присутствии PARP1 или PARP2 и XRCC1. Кинетические кривые включения dTMP были получены с использованием «out»-ориентированного (А, В) или «middle»-ориентированного (Б, Г) Gap-NCP603_U в присутствии PARP1 (сплошные красные или зелёные кривые), PARP1 и XRCC1 (пунктирные красные или зелёные кривые), PARP2 (сплошные красные или зелёные кривые) или PARP2 и XRCC1 (пунктирные красные или зелёные кривые). Данные представлены как среднее значение \pm (SD) минимум для трёх независимых экспериментов. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.20.).

XRCC1 играл здесь иную роль: его наличие в реакционной смеси восстанавливало активность Pol β в присутствии PARP2 для двух типов повреждений: «out» или «middle» (Рис. 30 Д, Е и Рис. 31 В, Г). 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 ДНК. 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.

Полученные результаты согласуются с целым рядом работ, в которых использовали модельные ДНК-дуплексы вне нуклеосомного контекста [158, 161, 162, 249, 258, 261]. Однако на нуклеосомном субстрате такие эффекты продемонстрированы впервые.

Исследование заключительного этапа BER — лигирования одноцепочечного разрыва ДНК-лигазой III α (LigIII α) в комплексе с XRCC1 — включало оценку влияния PARP1, PARP2 и реакции PARилирования на этот процесс, а также роли самого XRCC1. В литературе существует много данных, которые указывают на формирование специфического комплекса между LigIII α и XRCC1; активность LigIII α в NCP была исследована в отсутствие или в присутствии XRCC1, взятого в эквимоллярной концентрации с LigIII α [114, 262].

Наши эксперименты были выполнены с использованием субстрата out-nick-NCP603_U. Для повышения чувствительности детекции вместо флуоресцентной метки использовали радиоактивную метку ^{32}P , введённую по 5'-концу ДНК-дуплекса (**Рис. 32**). Исследование влияния PARP1 и PARP2 на активность ДНК-лигазы III α при лигировании разрыва в out-nick-NCP603_U показало, что оба белка оказывают подавляющее действие на лигазную активность LigIII α . Однако PARилирование, инициируемое добавлением NAD^+ , ослабляло этот эффект и возвращало выход продукта лигирования к исходным показателям (**Рис. 33**).

Наличие в реакционной смеси ключевого партнера LigIII α , белка XRCC1, не оказывало выраженного влияния на базовую активность лигазы. Это, вероятно, связано с расположением разрыва в относительно доступной области нуклеосомы [113, 263]. Однако XRCC1 умеренно ослаблял подавляющее действие PARP1, что согласуется с известной способностью XRCC1 снижать активность PARP1 [264]. Механизм подавления активности LigIII α со стороны PARP1, по-видимому, включает конкуренцию с LigIII α за связывание вблизи тупых концов ДНК (сайтов входа-выхода). В случае PARP2 такой результат, вероятно, обусловлен прямым связыванием с самим одноцепочечным разрывом, что блокирует доступ LigIII α к месту повреждения.

Наблюдаемое восстановление активности LigIII α при PARилировании можно объяснить несколькими взаимосвязанными процессами. PARилированию подвергаются не только PARP1/2, но и XRCC1, и, возможно, сама LigIII α . С одной стороны, эффект от влияния PARилирования

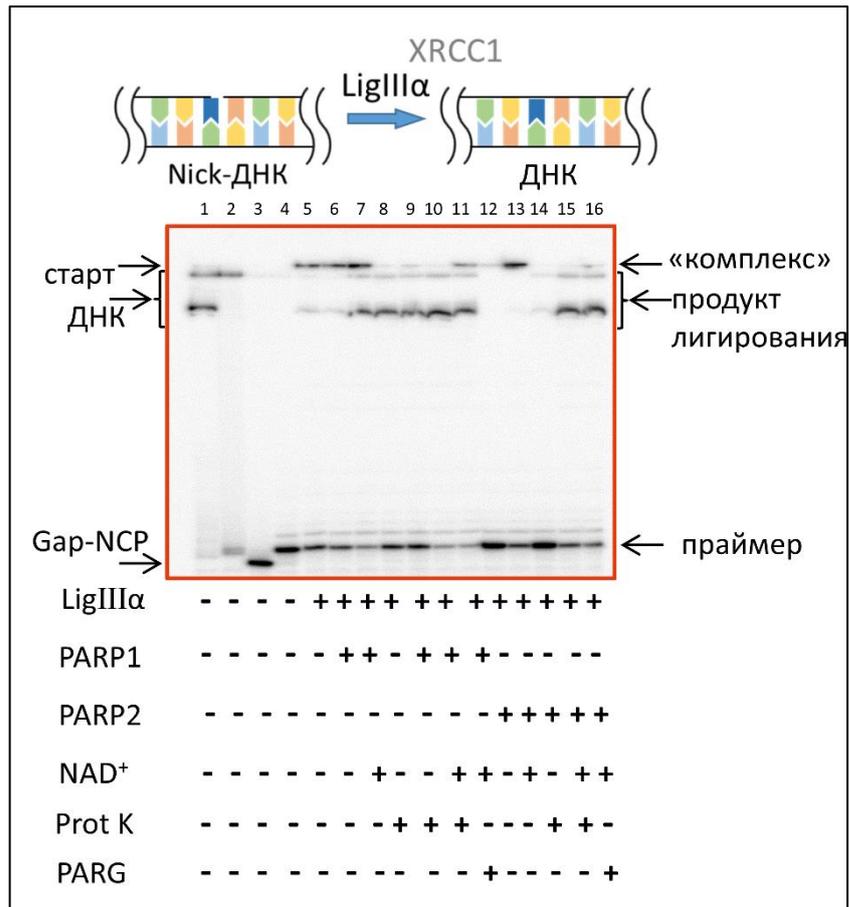


Рис. 32. Активность LigIIIα на субстрате 5'-[³²P]-out-NCP603_U. Дорожка 1 — нативный out-NCP603_U; дорожка 2 — out-NCP603_U после инкубации с UDG; дорожка 3 — out-NCP603_U после последовательной обработки UDG и APE1; дорожка 4 — out-NCP603_U после полного цикла BER (UDG+APE1+Polβ+dTTP), приводящего к образованию out-NCP603_U с SSB, Nick; дорожки 5-16 — демонстрируют результаты лигирования в присутствии: LigIIIα (дорожки 5, 8), PARP1 (дорожки 6, 9) или PARP2 (дорожки 12, 14) без/с добавлением NAD⁺ (дорожки 7, 10, 11 и 13, 15, 16 соответственно). Дорожки 8-10 и 14-15 соответствуют образцам из дорожек 5-7 и 12-13 после дополнительной обработки протеиназой К (Prot K). Дорожки 11 и 16 показывают результаты обработки PARG образцов из дорожек 7 и 13. Эксперименты проводили при следующих концентрациях: 20 нМ NCP603_U, 500 нМ LigIIIα, 500 нМ XRCC1, 100 нМ PARP1 или PARP2 и 100 мкМ NAD⁺. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.21.).

объясняется диссоциацией PARP1 и PARP2 из комплекса PARP•ДНК в результате электростатического отталкивания полимера PAR, ковалентно присоединённого к PARP, от ДНК; с другой стороны, как показали исследования, PAR служит сигналом для привлечения комплекса XRCC1•LigIIIα к месту разрыва [265, 266]. Таким образом, умеренный уровень PAR, синтезируемый PARP2, стимулирует формирование активного репарационного комплекса в месте повреждения ДНК в составе NCP. Специфика взаимодействия PARP2 с NCP, по-видимому, позволяет ему более эффективно модулировать активность комплекса LigIIIα•XRCC1 через механизмы, зависящие от PAR, потенциально усиливая процесс лигирования при оптимальных условиях.

Результаты, описываемые в настоящем разделе, демонстрируют специфическое влияние PARP1, PARP2 и PARG на активность основных ферментов BER (APE1, Polβ и LigIIIα)

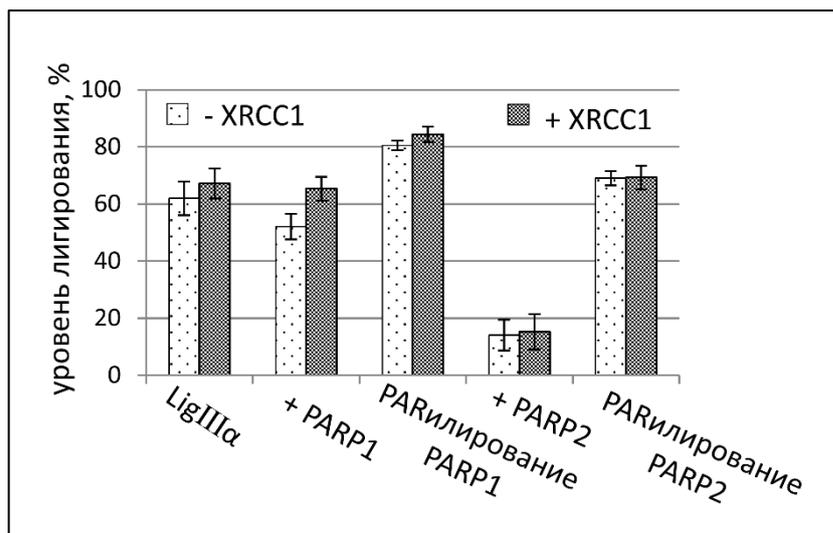


Рис. 33. Влияние PARP1 или PARP2 и PARилирования на активность LigIIIα в отсутствие или в присутствии XRCC1. На величину лигирования 5'-[³²P]-меченого никированного субстрата NCP603_U под действием LigIIIα влияли PARP1 или PARP2 и PARилирование в отсутствие или в присутствии XRCC1. Величина лигирования рассчитывалась как: 100 % минус процент непрореагировавшего праймера. Данные получены в ходе экспериментов с использованием 20 нМ NCP603_U, 500 нМ LigIIIα, 100 нМ PARP1 или PARP2 и 100 мкМ NAD⁺. Данные представлены как среднее значение ± (SD) минимум для трёх независимых экспериментов. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.21.).

в нуклеосомном контексте. Было обнаружено, что PARP1 подавляет активность APE1, Polβ и в меньшей степени LigIIIα в структурах NCP. PARP2 оказывает значительное влияние на активность только LigIIIα в структуре NCP. Наблюдаемые эффекты на ферментативные активности APE1 и Polβ ослабевают в условиях PARилирования, катализируемого PARP1 и в меньшей степени PARP2. В то же время, XRCC1 защищает dNMP-трансферазную активность Polβ от влияния со стороны PARP1 и PARP2. Примечательно, что лигирование стимулируется PARилированием, катализируемым PARP2. В целом полученные в работе результаты с использованием нуклеосомных структур полностью сопоставимы с данными предыдущих исследований, выполненных на модельных ДНК-дуплексах. Результаты, полученные для PARP2, указывают на её взаимодействие с гистонами в исследуемых процессах. Такое предположение можно подтвердить с помощью методов, позволяющих определить места локализации этого белка на нуклеосоме.

4.3. 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. Есть данные об участии этого белка в репарации двуцепочечных разрывов [171, 267]. С использованием куриных клеток DT40 показано, что

PARP3, вероятно, участвует в SSBR, ускоряя репарацию одноцепочечных разрывов ДНК, вызванных γ -облучением [172]. Прямых данных, указывающих на участие PARP3 в BER нет, но ряд ферментов, которые осуществляют SSBR, также участвуют в BER [93]. Более того, одноцепочечный разрыв ДНК является интермедиатом в ходе BER. Поэтому мы предприняли попытку определить возможную вовлеченность этого белка в регуляцию системы BER.

Данная часть работы посвящена исследованию термодинамических характеристик взаимодействия PARP3 с нуклеосомами NCP603_U и NCP603_multiU (Рис. 34 структура 1 и 2 соответственно) в сравнении с PARP1 и PARP2. Методом EMSA мы определили значения констант диссоциации комплексов PARP3 с ДНК и NCP603_U (Таблица 8), аналогично PARP1 и PARP2 (п. 4.1.; Таблица 7). Типичные изображения радиоавтографов приведены на Рис. 35.

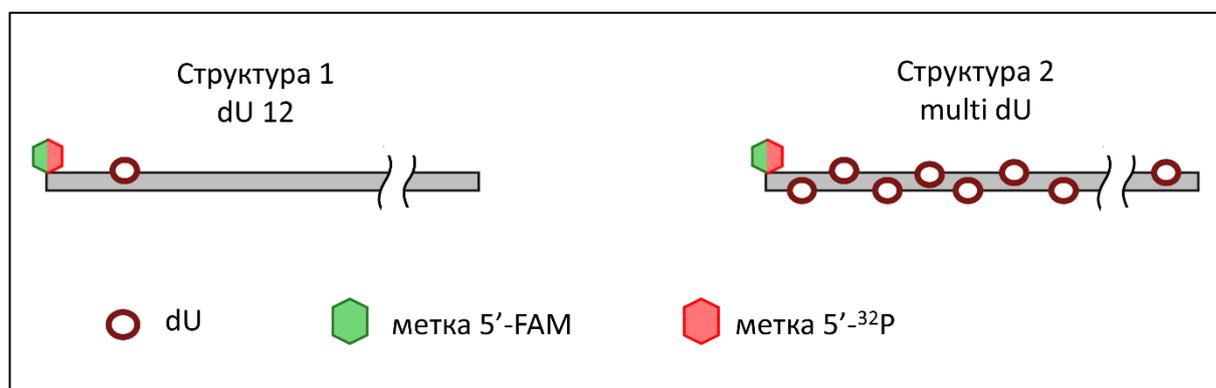


Рис. 34. Схематическое изображение структур ДНК NPS «Clone 603» с одиночным повреждением в 12-ом положении NCP603_U (структура 1) или кластеризованными AP-сайтами NCP603_multiU (структура 2).

Для белка PARP3 наблюдается следующая зависимость во взаимодействии с исследуемыми структурами: Gap \ll Native \sim AP-сайт (Таблица 8). С использованием модельных структур ДНК было установлено, что PARP3 взаимодействует и активируется ДНК с одноцепочечным разрывом, содержащим 5'-концевую фосфатную группу, — классическим интермедиатом поздних этапов BER [149, 172]. Тем не менее оказалось, что PARP3 взаимодействует с использованным в работе Gap-повреждением менее эффективно, чем с нативной и AP-содержащей ДНК. С одной стороны, полученные результаты можно объяснить тем, что используемый в работе классический интермедиат более ранних стадий BER — ДНК-дуплекс с одноцепочечной брешью с 5'-dRP-фрагментом (Gap) — не является каноническим субстратом для PARP3. Кроме того, наличие одноцепочечного разрыва может приводить к структурным изменениям NCP603_U, что, вероятно, является критическим фактором при взаимодействии PARP3 с нуклеосомой. С другой стороны, в конструкции NCP603_U тупой конец содержит метку 5'-[³²P], что может обеспечивать распознавание PARP2 и PARP3 тупых концов ДНК, аналогов DSB [149]. При этом значительная разница в значениях

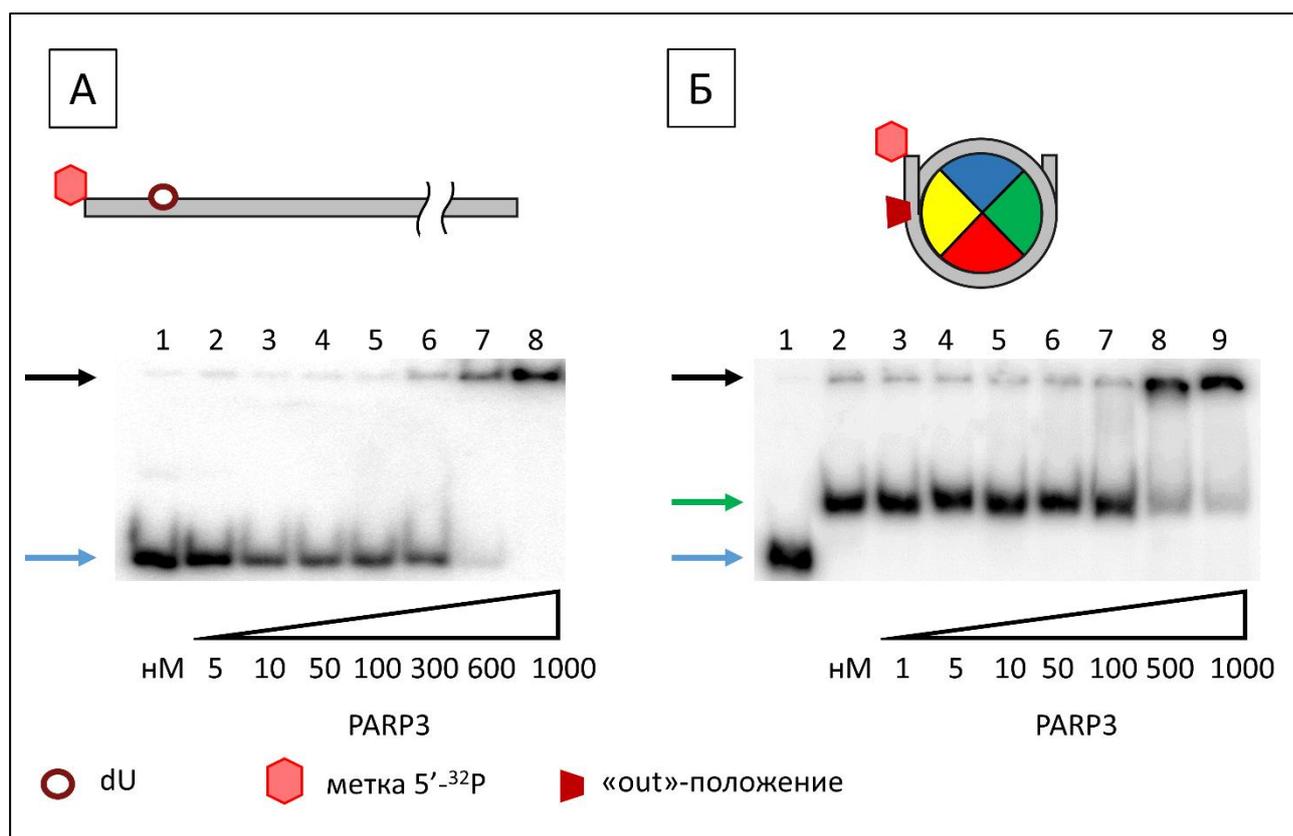


Рис. 35. Радиоавтографы 4 % ПААГ в нативных условиях (п.3.2.2.) после разделения продуктов реакции комплексообразования PARP3: **А** — с ДНК; **Б** — NCP603_U. (**А**): дорожка 1 — свободная нативная ДНК; дорожки 2–8 — ДНК с PARP3; (**Б**): дорожка 1 — свободная нативная ДНК, дорожка 2 — NCP603_U, дорожки 3–9 — NCP603_U с PARP3. Стрелками обозначена подвижность: синей — свободной ДНК, зеленой — NCP603_U. Чёрной стрелкой обозначен «старт». Концентрация ДНК или NCP603_U составляла 100 нМ; концентрация PARP3: 1-1000 нМ. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.15.).

Таблица 8. Дополненная **Таблица 7** (п. 4.1.). Величины констант диссоциации комплексов PARP1, PARP2 и PARP3 с ДНК и NCP без повреждений, или содержащих AP-сайт или Gap, найденные методом EMSA. В качестве метки, введённой по 5'-концу ДНК-дуплекса, использовали изотоп фосфора ³²P. Обозначения «out» указывают на ориентацию повреждения в структуре NCP. Данные представлены как среднее значение $K_D \pm (SD)$ минимум для трёх независимых экспериментов. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.15.; п. 3.2.16.).

| Структура | ДНК, нМ | | | NCP603_U, нМ | | |
|------------|---------|-----------|-----------------|--------------|----------|-------------------|
| | 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 |

констант диссоциации между двумя белками в случае Gap-повреждения может свидетельствовать о различиях в механизмах взаимодействия PARP2 и PARP3 с ДНК-дуплексами. Подробнее ответить на этот вопрос помогут методы изучения локализации белков

на структурах ДНК и NCP. Аномально высокое значение константы диссоциации комплекса PARP3•Gap-NCP603_U, вероятно, можно объяснить существованием пространственной структуры NCP, не позволяющей PARP3 эффективно взаимодействовать с повреждением в цепи ДНК. Таким образом, аффинность PARP3 к ДНК с разрывом в составе NCP603_U может определяться как размером бреши, так и модификацией 5'-концевого фрагмента.

4.4. Взаимодействие PARP3 с AP-сайтом в NCP603 U

В ходе BER после удаления поврежденного азотистого основания образуется ДНК-интермедиат, содержащий AP-сайт. Известно, что PARP1 и PARP2 взаимодействуют с AP-сайтами [158, 159, 258] и могут участвовать в расщеплении AP-сайтов в составе ДНК-дуплексов по лиазному механизму [159, 258]. Мы оценили способность PARP3 взаимодействовать с AP-сайтом в NCP603_U. Для этого мы воспользовались свойством альдегидных групп AP-сайтов формировать основания Шиффа с первичными аминогруппами белка в случае их близкого расположения [268, 269]. Чтобы зарегистрировать комплексы PARP•AP-сайт, достаточно было стабилизировать основания Шиффа восстановлением боргидридом натрия, NaBH₄ (**Рис. 36 А**) [270].

Эффективность взаимодействия ДНК-связывающих белков с ДНК в составе NCP зависит как от удаленности соответствующего участка ДНК от SHL 0 (пар оснований диады; **п. 2.3.1.**), так и от ориентации нуклеотидов в ДНК (**п. 2.1.1.**). Поэтому в данной части работы мы сконструировали ДНК-конструкции, содержащие как одиночный AP-сайт, так и множество AP-сайтов, которые распределены стохастически по всей длине NPS «603» ДНК-дуплекса (**п. 3.2.17.**). Множественное введение AP-сайтов в состав ДНК достигается стохастическим включением dUMP на стадии амплификации с последующей ферментативной обработкой такой ДНК ферментом UDG (**п. 3.2.13.**).

Следует отметить, что в силу стохастического включения dUMP в ДНК на месте dTMP наряду со множественными одиночными AP-сайтами могут встречаться кластеризованные AP-сайты (AP-сайты, расположенные в пределах одного витка спирали ДНК-дуплекса), которые могут связываться белками иначе. Тем не менее такой подход со стохастическим распределением AP-сайтов по ДНК-субстрату позволяет локализовать участки взаимодействия белков семейства PARP по всей поверхности NCP. Для контрольных экспериментов были использованы свободные AP-ДНК субстраты аналогичной структуры. Структуры представлены на **Рис. 34**.

В структуре 1 урацил локализован в 12 положении одной из цепей ДНК-дуплекса. Структура 2 представляет собой ДНК-дуплекс со стохастическим набором остатков dUMP,

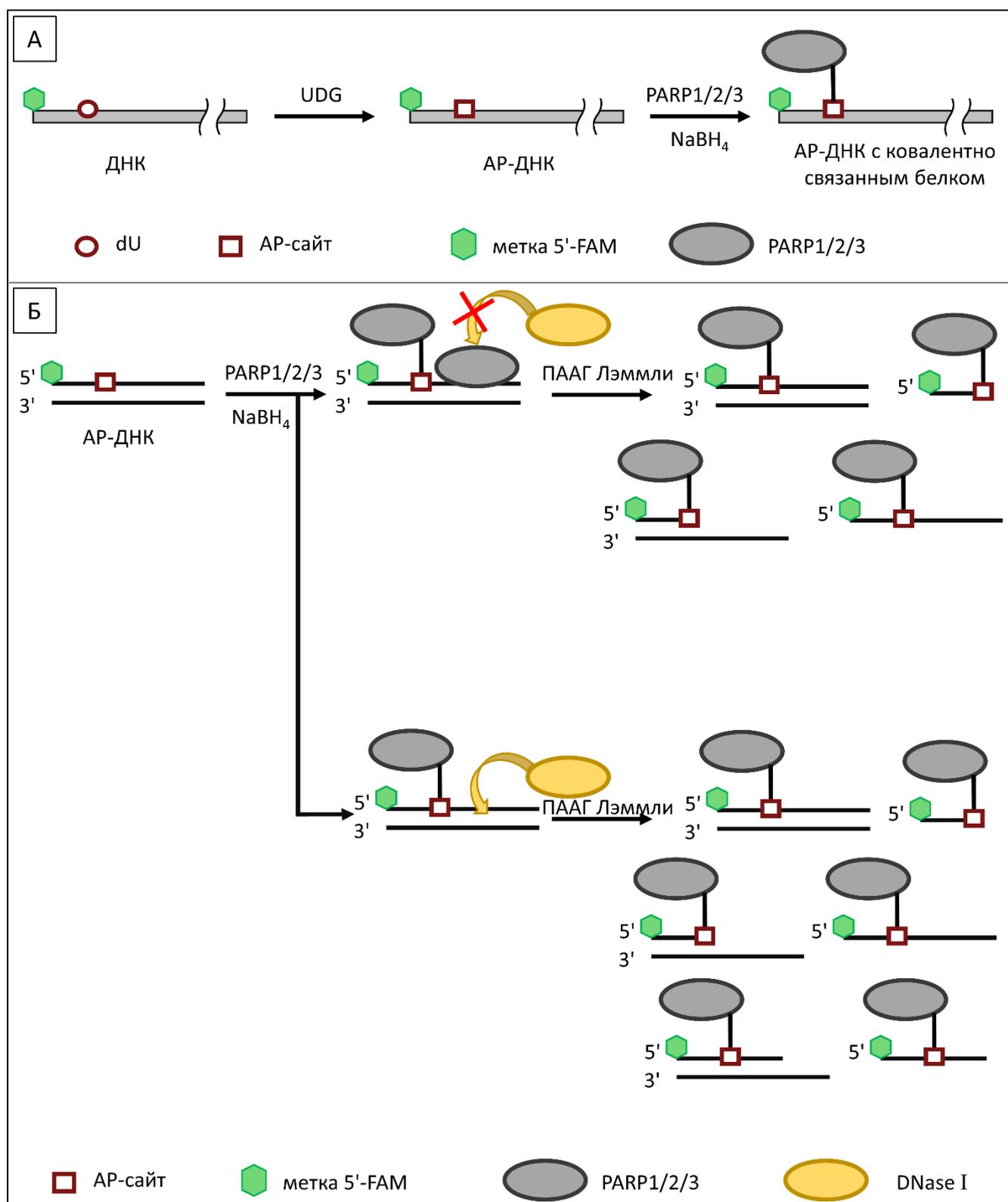


Рис. 36. А — Схематичное представление проведения эксперимента с использованием метода боргидридной сшивки. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.17.). Б — Типы возможных белок-нуклеиновых аддуктов при разделении продуктов реакции гель-электрофорезом по Лэммли (п. 3.2.1.).

распределенных в двух цепях ДНК-дуплекса. С помощью гель-электрофореза по Лэммли (п. 3.2.1.) выявляли белок-нуклеиновые аддукты. Следует отметить, что при анализе продуктов

реакции могут наблюдаться аддукты, соответствующие пришивке белка к целой цепи ДНК, что может позволить выявить способность белков PARP связываться с AP-сайтом без привязки к определенному положению AP-сайта в составе NCP. Также возможно образование более низкомолекулярных продуктов из-за спонтанного гидролиза части AP-сайтов или расщепления их по лиазному механизму за счет AP-лиазной активности PARP (**Рис. 36 Б**).

На **Рис. 37** и **38** представлены автографы гелей после разделения продуктов реакции боргидридной сшивки с помощью гель-электрофореза по Лэммли (**п. 3.2.1**). Наличие высокомолекулярных продуктов в присутствии белков PARP указывает на способность всех трех PARP формировать сшивки с AP-сайтами (**Рис. 37**, панели **I А, Б, В** и **II А, Б, В**, дорожки 4-15; **Рис. 38**, панели **I А, Б** и **II А, Б**, дорожки 4-15, панель **I В**, дорожки 5-9, 11-15 и панель **II В**, дорожки 5-9, 12-15). Примечательно, что на электрофореграммах наблюдаются продукты, по молекулярной массе соответствующие самим белкам PARP: PARP1 (113 кДа), PARP2 (66 кДа) и PARP3 (60 кДа), что указывает на расщепление AP-сайта, близко расположенного к меченому 5'-концу (**Рис. 37**, панели **I А, Б, В** и **II А, Б, В**, дорожки 4-9; **Рис. 38**, панели **I А, Б** и **II А, Б**, дорожки 4-9, панель **I В**, дорожки 5-9 и панель **II В**, дорожки 5-9; продукт отмечен красной стрелкой).

Для того, чтобы локализовать удаленность от меченого 5'-конца AP-сайта, который обеспечивает сшивку с PARP, приготовили пробы аналогичным образом, но дополнительно подвергли обработке DNase I в условиях частичного гидролиза (**Рис. 37**, панели **I А, Б, В** и **II А, Б, В**, дорожки 10-15; **Рис. 38**, панели **I А, Б** и **II А, Б**, дорожки 10-15, панель **I В**, дорожки 11-15 и панель **II В**, дорожки 12-15). В этом случае также наблюдались продукты с высокой молекулярной массой, что, вероятно, связано с отсутствием полного гидролиза молекул ДНК ферментом DNase I в условиях эксперимента. Не исключены также множественные сшивки молекул PARP с ДНК в случае кластеризованных AP-сайтов с образованием неразделяемых методом гель-электрофореза высокомолекулярных продуктов. Кроме того, использование денатурирующих условий при проведении эксперимента не всегда гарантирует полную денатурацию двух цепей ДНК-дуплекса, особенно в составе белок-нуклеинового аддукта (**Рис. 36 Б**). Все эти факты могут оказывать влияние на электрофоретическую подвижность аддуктов.

Примечательно, что в условиях проведения эксперимента взаимодействие гистонов с AP-сайтом выявлено не было. Низкая эффективность формирования оснований Шиффа между AP-сайтами и гистонами NCP603_U, вероятно, связана с отсутствием близлежащих аминокислотных групп гистонов с альдегидными группами AP-сайтов. Этот факт позволяет исключить вклад

конкретного типа повреждения в формирование одноцепочечных разрывов в нуклеосомной ДНК за счёт октамера гистонов.

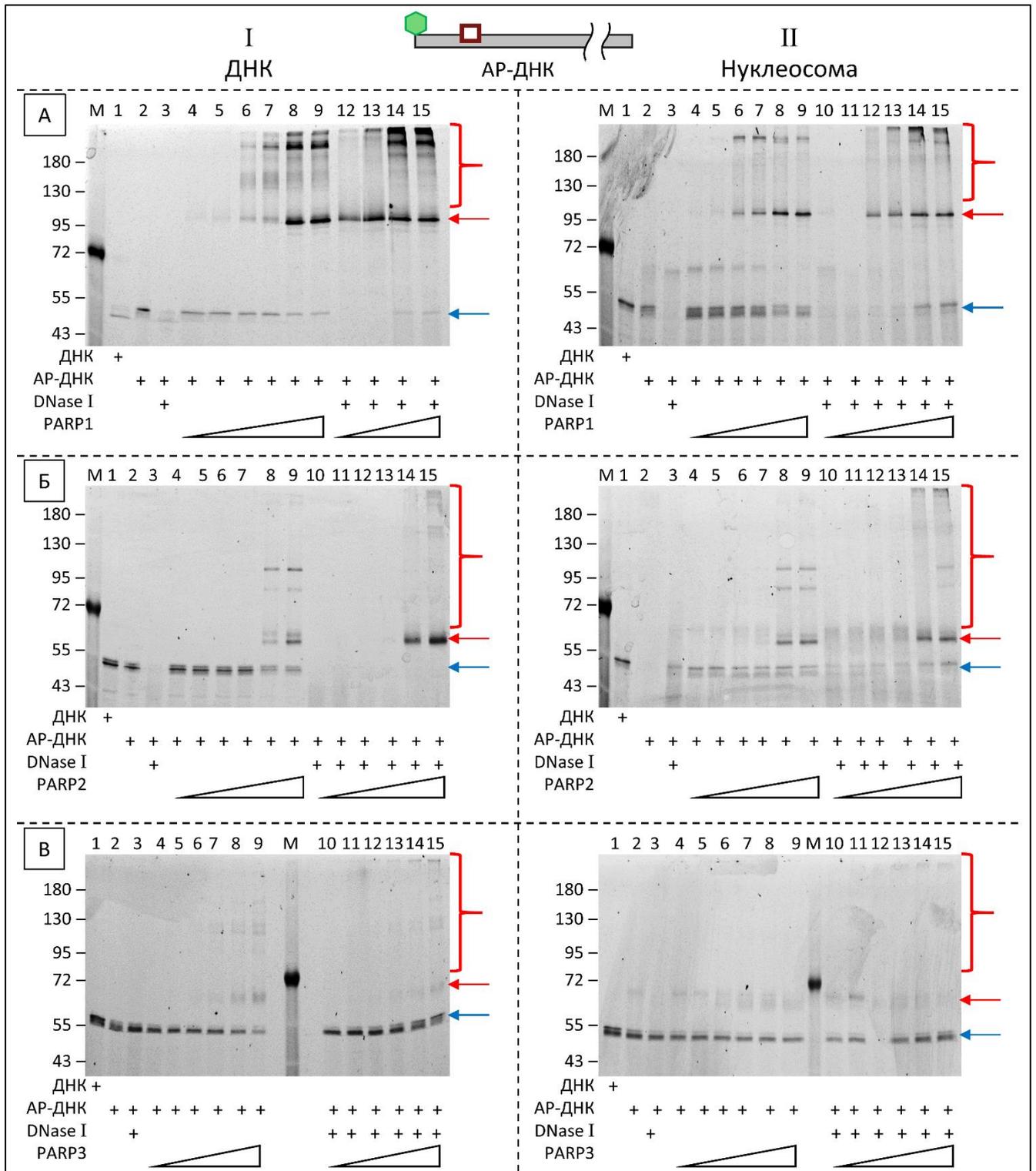


Рис. 37. Взаимодействие белков PARP1 (А), PARP2 (Б) и PARP3 (В) с AP-сайтом в составе ДНК (I) и нуклеосомы (II). Автографы гелей после разделения продуктов реакции в 10 % ПААГ по Лэммли. Слева указаны положения маркёров молекулярных масс (кДа). М — маркёры молекулярных масс; дорожка 1 — нативная ДНК / NCP603_U; дорожка 2 — ДНК / NCP603_U, обработанная UDG; дорожка 3 — ДНК / NCP603_U, обработанная UDG и DNase I. Концентрация PARP в дорожках 4–9 и 10–15 составляла 5; 10; 50; 100; 500; 1000 нМ соответственно. Синей стрелкой обозначена электрофоретическая подвижность нерасщеплённой цепи AP-ДНК, красной стрелкой и фигурной скобкой — белок-нуклеиновые аддукты. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.17.).

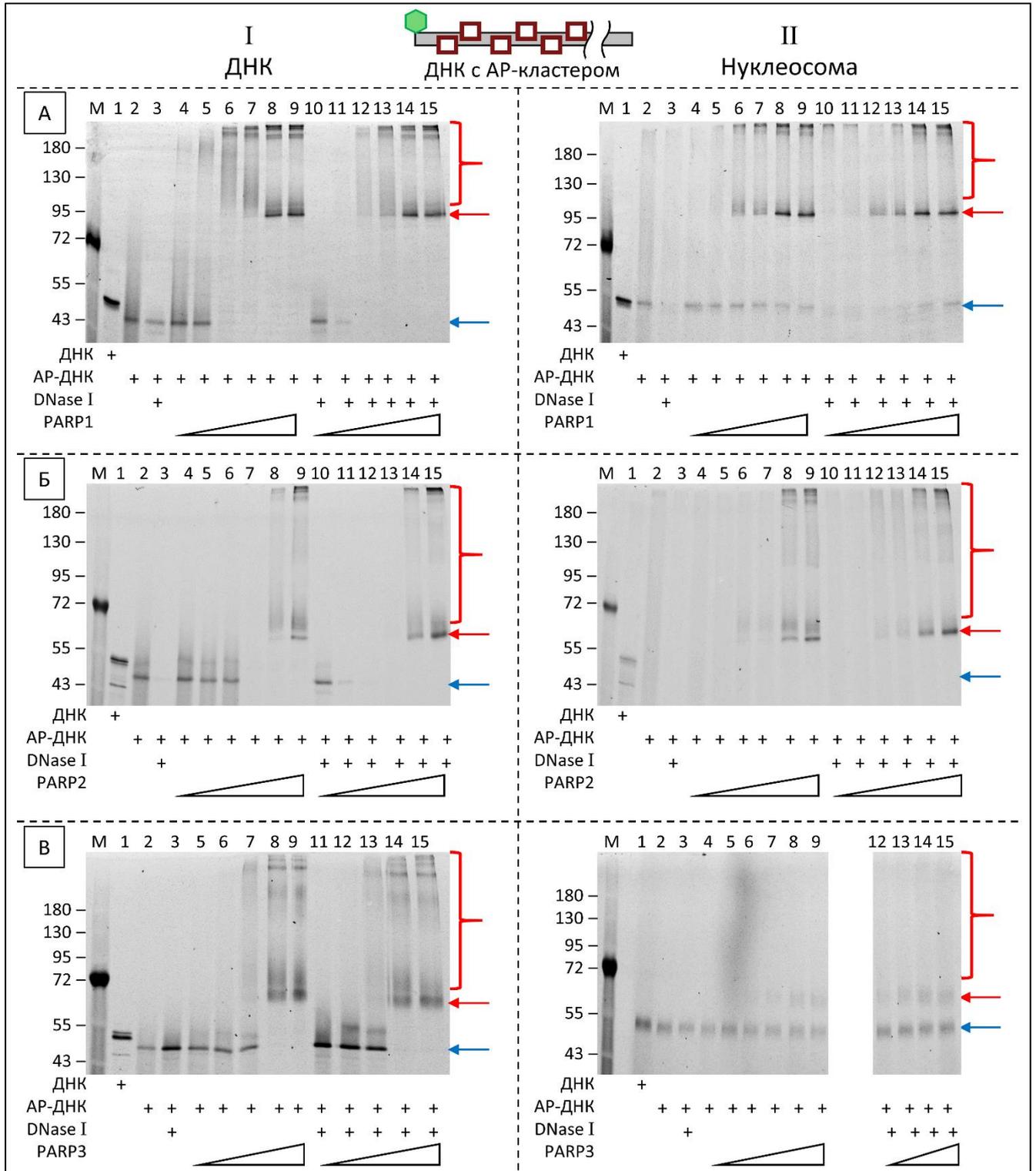


Рис. 38. Взаимодействие белков PARP1 (А), PARP2 (Б) и PARP3 (В) с AP-кластером в составе ДНК (I) и нуклеосомы (II). Автографы гелей после разделения продуктов реакции в 10 % ПААГ по Лэммли. Слева указаны положения маркёров молекулярных масс (кДа). М — маркёры молекулярных масс; дорожка 1 — нативная ДНК / NCP603_multiU; дорожка 2 — ДНК / NCP603_multiU, обработанная UDG; дорожка 3 — ДНК / NCP603_multiU, обработанная UDG и DNase I. Концентрация PARP1 и PARP2 в дорожках 4–9 и 10–15 составляла 5; 10; 50; 100; 500; 1000 нМ соответственно. Концентрация PARP3 в дорожках 5–9 I В и 11–15 I В составляла 10; 50; 100; 500; 1000 нМ соответственно; концентрация PARP3 в дорожках 5–9 II В и 12–15 II В составляла 10; 50; 100; 500; 1000 нМ и 50; 100; 500; 1000 нМ соответственно. Синей стрелкой обозначена электрофоретическая подвижность нерасщеплённой цепи ДНК с AP-кластером, красной стрелкой и фигурной скобкой — белок-нуклеиновые аддукты. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.17.).

В совокупности эти результаты указывают на то, что PARP1, PARP2 и PARP3 способны взаимодействовать с одиночными AP-сайтами как в составе кластеров на ДНК, так и NCP. Учитывая результаты проведенных экспериментов и данные о сродстве белков к NCP603_U можно сказать, что PARP1 взаимодействует с AP-сайтом в составе нуклеосомы более эффективно, чем PARP2 и PARP3. При добавлении PARP1 в реакционную смесь наблюдается образование ковалентных аддуктов с AP-сайтом, расположенным вблизи тупого конца свободной или нуклеосомной ДНК NCP603_U, с молекулярной массой выше 95 кДа (**Рис. 37 А**, дорожки 4–15). Кроме того, наблюдается формирование аддуктов с большей молекулярной массой, которые можно отнести к продуктам ковалентного присоединения PARP1 к нерасщепленной по AP-сайту цепи ДНК, а также к белок-нуклеиновым аддуктам, содержащим неденатурированную двуцепочечную форму ДНК. При взаимодействии PARP1 с AP-кластером как в составе свободной ДНК NCP603_multiU (**Рис. 38 А**, дорожки 4-15), так и в нуклеосомном контексте, происходило образование высокомолекулярных аддуктов, вероятно, являющихся следствием посадки нескольких молекул PARP1 на AP-кластер. В целом наличие AP-кластера существенно не повлияло на характер взаимодействия PARP1 с нуклеосомой, что может быть следствием преимущественного взаимодействия PARP1 с тупыми концами ДНК-дуплекса или AP-сайтом, расположенным в непосредственной близости от тупого конца.

При формировании оснований Шиффа между PARP2 и AP-сайтом происходит перераспределение доли аддуктов с низкой и высокой молекулярными массами: при увеличении количества AP-сайтов доля высокомолекулярных продуктов увеличивается с 45 % до 59 % (дорожка 15 на **Рис. 37 I Б** и **38 I Б**) при использовании свободной ДНК и с 53 % до 64 % (дорожка 15 на **Рис. 37 II Б** и **38 II Б**) при использовании ДНК в составе NCP. Подобные изменения могут быть следствием взаимодействия PARP2 с разными участками NCP603_multiU. Увеличение количества AP-сайтов приводит к увеличению эффективности образования оснований Шиффа между PARP2 и NCP603_multiU, что, вероятно, отражает более специфическое взаимодействие белка непосредственно с повреждениями.

Сродство PARP3 к AP-содержащим субстратам существенно ниже, чем у PARP1 и PARP2, что выражается, в том числе, в количестве непрореагировавшей с PARP3 AP-содержащей ДНК (отмечена синей стрелкой на **Рис. 37 В**; ср. дорожки 1 и 10–15 на панелях I и II). Интересно, что интенсивность сшивки между PARP3 и NCP-субстратом возрастает при переходе от одиночного AP-сайту к AP-кластеру: доля комплекса с молекулярной массой выше 55 кДа по отношению к непрореагировавшей ДНК увеличивается с 22 % до 38 % (дорожка 15 на **Рис. 37 II В** и **38 II В**). Однако образование аддуктов, соответствующих одновременному взаимодействию нескольких молекул PARP3 с несколькими AP-сайтами в составе NCP603_multiU, не наблюдается

(Рис. 38 II B), что может быть обусловлено взаимодействием PARP3 с AP-сайтом, расположенным вблизи тупого конца ДНК-дуплекса или наличием структурных изменений AP-NCP603_multiU в присутствии большого количества AP-сайтов, что препятствует взаимодействию PARP3 с разными участками AP-NCP_multiU.

4.5. Изучение локализация PARP1, PARP2, PARP3 на NCP603 U методом ферментативного футпринтинга

Другой подход, позволяющий локализовать белки на молекуле ДНК, — метод футпринтинга [271]. Сам метод состоит в следующем: при формировании специфического белок-нуклеинового комплекса белок связывается с определенными участками ДНК-субстрата, таким образом экранирует их от внешнего воздействия. Если подвергнуть ДНК-субстрат неспецифической деградации с помощью химических или ферментативных инструментов, полученный набор продуктов в присутствии и в отсутствие белкового компонента будет отличаться. При этом условия деградации подбирают таким образом, чтобы расщепление шло статистически из следующего расчета: один разрыв сахарофосфатного остова на одну молекулу ДНК. Таким образом, фрагменты ДНК-субстрата, с которыми не был связан белок, будут разрезаны статистически в случайных местах и при разделении в ПААГ в денатурирующих условиях распределятся в виде равномерной «лестницы», а фрагменты ДНК, связанные белком, будут защищены от разрезания и сформируют определенный «отпечаток», пробел, внутри «лестницы». В отличие от ранее использованного метода, футпринтинг не требует «удачного» взаимного позиционирования альдегидной группы AP-сайта и первичной аминокислотной группы белка. В представленной работе для изучения локализации PARP1, PARP2 и PARP3 на свободной ДНК и нуклеосоме использовали ДНК-субстраты NCP603_U как в нативной форме, так и с одиночным AP-сайтом в 12 положениях (Рис. 34, структура 1). В качестве метки для слежения был использован изотоп фосфора ^{32}P , интегрированный на 5'-конец ДНК. Мы изучили локализацию PARP1, PARP2 и PARP3 на свободной ДНК и нуклеосоме методом футпринтинга с использованием фермента DNase I (Рис. 39) как с ДНК без повреждений (Рис. 39 дорожки 1–5, 17, 18, 25, 26 для ДНК и 9–13, 21, 22, 29, 30 для NCP), так и с ДНК с AP-сайтом в 12 положениях цепи (Рис. 39 дорожки 6–8, 19, 20, 27, 28 для ДНК и 14–16, 23, 24, 31, 32 для NCP).

Как видно из представленных данных, присутствие PARP1 практически полностью подавляет реакцию ферментативного расщепления нативной формы свободной ДНК (Рис. 39, дорожка 4). Такая ситуация возможна только в том случае, когда молекулы белка в составе

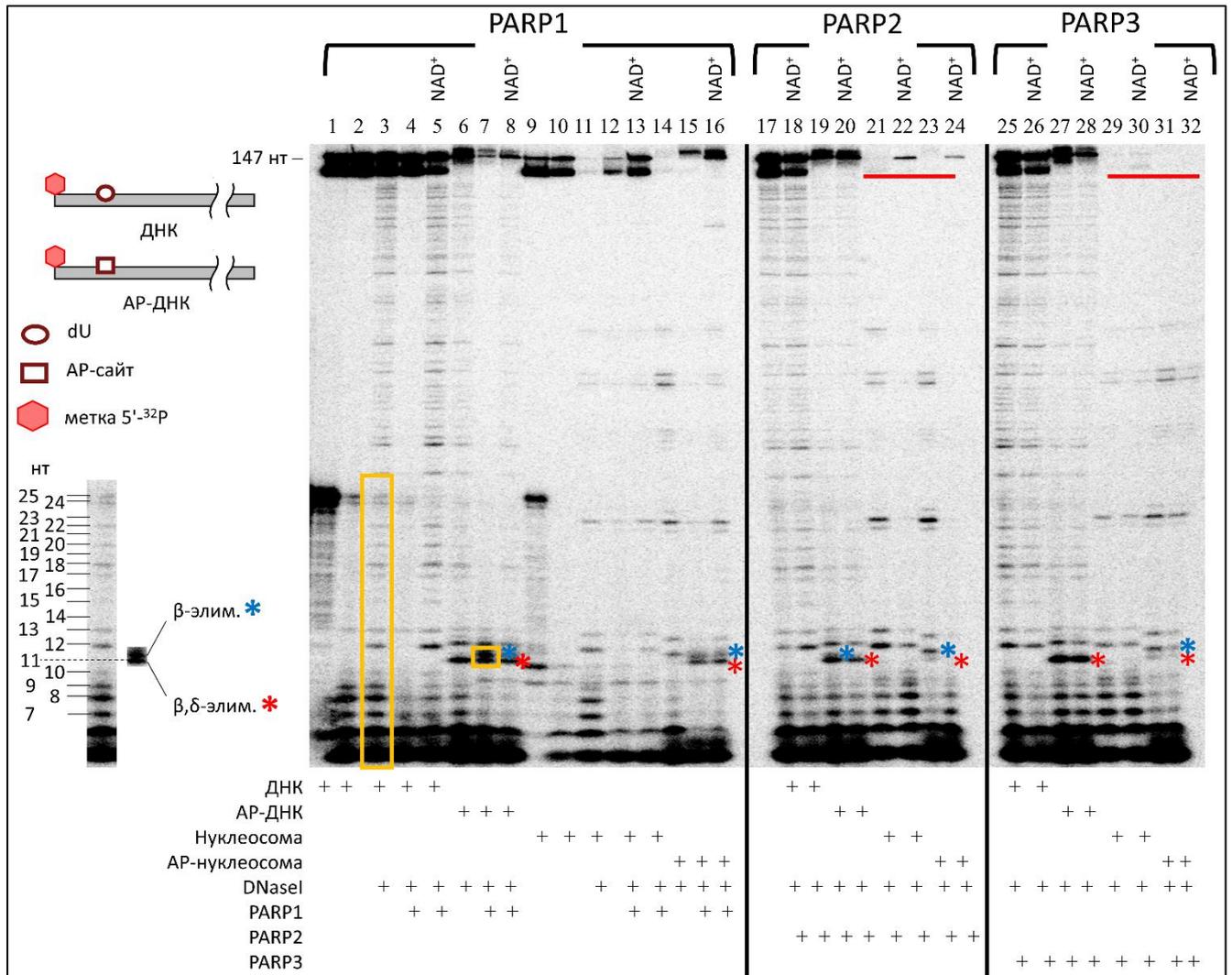


Рис. 39. Исследование структуры белок-нуклеиновых комплексов PARP1, PARP2 и PARP3 со свободной ДНК и с нуклеосомой методом ферментативного футпринтинга с использованием фермента DNase I. Дорожка 1 — смесь 5'-[³²P]-меченых компонентов системы: 147 пн ампликон и 25 нт праймер; дорожка 2 — компоненты из дорожки 1, обработанные EcoI; дорожка 9 — смесь 5'-[³²P]-меченых компонентов системы: NCP и 25 нт праймер с урацилом в положении 12; дорожка 10 — компоненты из дорожки 9 обработанные EcoI; дорожки 3, 11 — контрольная ДНК / NCP после обработки DNase I; дорожки 6, 14 — контрольная АР-ДНК / АР-NCP после обработки DNase I; дорожки 4, 7, 12, 15 — продукты расщепления ферментом DNase I комплексов PARP1 с ДНК, АР-ДНК, NCP и АР-NCP; дорожки 5, 8, 13, 16 — продукты расщепления ферментом DNase I комплексов PARP1 с ДНК, АР-ДНК, NCP и АР-NCP в присутствии NAD⁺; дорожки 17, 19, 21, 23 — продукты расщепления ферментом DNase I комплексов PARP2 с ДНК, АР-ДНК, NCP и АР-NCP; дорожки 18, 20, 22, 24 — продукты расщепления ферментом DNase I комплексов PARP2 с ДНК, АР-ДНК, NCP и АР-NCP в присутствии NAD⁺; дорожки 25, 27, 29, 31 — продукты расщепления ферментом DNase I комплексов PARP3 с ДНК, АР-ДНК, NCP и АР-NCP; дорожки 26, 28, 30, 32 — продукты расщепления ферментом DNase I комплексов PARP3 с ДНК, АР-ДНК, NCP и АР-NCP в присутствии NAD⁺. Синей звёздочкой отмечены продукты β-элиминирования, красной звёздочкой — продукты β,δ-элиминирования, красной линией отмечено положение полноразмерной 5'-[³²P]-ДНК. Зоны в жёлтой рамке вынесены за пределы электрофореграммы. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.18.).

комплекса равномерно распределены по всей длине ДНК-субстрата, включая 5'-концевой участок дуплекса. Добавление NAD⁺ в реакционную смесь запускает реакцию PARилирования (Рис. 39, дорожка 5). Из представленных на электрофореграмме данных видно, что характер распределения полос ферментативного расщепления после PARилирования совпадает с

характером распределения полос свободной ДНК, но не комплекса PARP1•ДНК. Следовательно, после PARилирования одноимённый заряд ДНК и PAR способствует диссоциации PARP1 из комплекса PARилированная-PARP1•ДНК. Из представленных данных видно, что доступ к ДНК в составе нуклеосомы ограничен по сравнению со свободной ДНК (**Рис. 39**, ср. дорожки 3 и 11). Сохранение сигнала полноразмерной ДНК в присутствии PARP1 свидетельствует о преимущественной локализации белка вблизи 5'-концевого участка ДНК-дуплекса в составе NCP603_U (**Рис. 39**, ср. дорожки 11 и 12).

Формирование комплекса между PARP1 и свободной ДНК, содержащей AP-сайт, практически полностью подавляет реакцию ферментативного расщепления (**Рис. 39**, ср. дорожку 6 с 7 и 8), что говорит о равномерном распределении молекул белка по всей длине ДНК-субстрата. Однако появление продуктов β-элиминирования говорит о специфическом взаимодействии PARP1 с AP-сайтом (**Рис. 39**, ср. дорожку 6 с 7 и 8; продукт β-элиминирования отмечен синей звёздочкой) [159]. При взаимодействии PARP1 и AP-содержащей NCP603_U на электрофореграмме пропадает один из сигналов, соответствующий полноразмерной 5'-[³²P]-ДНК в составе NCP603_U без повреждений (**Рис. 39**, ср. дорожки 11, 12 с 14, 15). Этот факт говорит о формировании разного типа комплексов PARP1•NCP603_U с 5'-концевым участком ДНК-дуплекса при появлении AP-сайта. Кроме того, появляется продукт реакции β-элиминирования, т.е. специфического взаимодействия PARP1 с AP-сайтом в составе нуклеосомной ДНК.

Равномерный характер распределения полос и наличие интенсивного сигнала, соответствующего полноразмерной ДНК, при разделении продуктов расщепления комплексов свободной ДНК с PARP2 и PARP3 указывает на преимущественное связывание белков с 5'-концами ДНК-субстрата (**Рис. 39**, дорожка 17 — для PARP2, дорожка 25 — для PARP3). Действительно, в нашем случае молекула ДНК была мечена с 5'-конца ДНК-дуплекса изотопом фосфора ³²P. Такой тупой конец является классическим аналогом DSB, который могут распознавать белки PARP2 и PARP3 [149]. Наличие NAD⁺ в реакционной смеси существенно не влияет на изменение распределения полос после реакции расщепления ферментом DNase I (**Рис. 39**, ср. дорожки 17 и 18 — для PARP2, дорожки 25 и 26 — для PARP3). В случае PARP2 этот факт можно объяснить её пониженным сродством к повреждению и более низкой каталитической активностью по сравнению с PARP1. PARP3 имеет ещё более низкое сродство к ДНК и катализирует перенос лишь одного остатка ADP-рибозы, что может не приводить к диссоциации PARP3 из белок-нуклеинового комплекса за счёт электростатического отталкивания.

Наличие AP-сайта в составе свободной ДНК приводит к изменению типа взаимодействия белков PARP2 и PARP3 с 5'-концевой частью ДНК-субстрата (**Рис. 39**, ср. дорожки 17 с 19 — для PARP2, дорожки 25 с 27 — для PARP3). Наличие продуктов β,δ -элиминирования говорит о спонтанном разрушении AP-сайта в процессе гель-электрофореза, т.е. об отсутствии взаимодействия аминокетильных групп PARP3 с альдегидной формой AP-сайта (**Рис. 39**, ср. дорожки 6 с 27, 28; продукт β,δ -элиминирования отмечен красной звездочкой). PARP2 способен проявлять AP-лиазную активность в отношении AP-сайта, хотя и в существенно меньшей степени, чем PARP1, что выражается в появлении продукта реакции β -элиминирования (**Рис. 39**, ср. дорожки 6 с 19, 20; продукт β -элиминирования отмечен синей звездочкой) [258].

Характер продуктов расщепления белок-нуклеиновых комплексов указывает на отсутствие взаимодействий белков PARP2 и PARP3 с 5'-концевой частью ДНК-субстрата в составе нуклеосомы, независимо от наличия AP-сайта (**Рис. 39**, ср. дорожки 11, 12, 15 с 21–24 (для PARP2) и с 29–32 (для PARP3); полноразмерная ДНК отмечена красной линией). Тем не менее продукт спонтанного распада AP-сайта также отсутствует, но наблюдается продукт β -элиминирования, что говорит о специфическом взаимодействии PARP2 и PARP3 с AP-сайтом и/или гистонами вблизи повреждения ДНК в составе NCP603_U (**Рис. 39**, ср. дорожку 19 с 23 (для PARP2) и 27 с 31 (для PARP3); продукт β -элиминирования отмечен синей звездочкой, продукт β,δ -элиминирования отмечен красной звездочкой).

Таким образом, совокупность всех полученных данных говорит о преимущественном взаимодействии белка PARP1 с концами ДНК, в то время как PARP2 и PARP3 преимущественно взаимодействуют с повреждением ДНК и/или октамерами гистонов. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными в литературе [172, 179].

В данной части работы проведён комплексный анализ взаимодействия ДНК-зависимых белков PARP1, PARP2 и PARP3 с нуклеосомами, содержащими ДНК-интермедиаты начальных стадий процесса BER. Использованный ДНК-субстрат содержал повреждение на расстоянии $\sim 1,2$ (SHL +6) витка спирали от тупого конца ДНК-дуплекса. Полученные результаты позволяют сделать следующие ключевые выводы:

1) PARP1:

- демонстрирует высокое сродство к тупым концам ДНК, аналогам DSB [179, 180];
- аффинность белка к ДНК в составе нуклеосомы превышает таковую для свободной ДНК, что указывает на дополнительные взаимодействия с гистоновым октамером NCP;

- данные боргидридной сшивки не выявили существенных различий в характере взаимодействия между свободной ДНК и ДНК в составе NCP, что указывает на преимущественное взаимодействие PARP1 с тупыми концами;
- близость повреждения к тупому концу может маскировать взаимодействие с расположенным поблизости AP-сайтом или Gap-повреждением, влияя на характер взаимодействия PARP1 с такими типами повреждений в процессе репарации.

2) PARP2:

- демонстрирует более высокое сродство к повреждениям в ДНК (AP-сайты, Gap), чем к тупым концам;
- не проявляет сродства к тупым концам, аналогам DSB, в нашей модельной системе, при этом исследования, выполненные с использованием крио-ЭМ, показали взаимодействие с NCP через тупые концы [182];
- связывается с AP-сайтами вблизи тупых концов нуклеосомной ДНК;
- проявляет более эффективное распознавание повреждений в нуклеосомном контексте по сравнению со свободным ДНК-дуплексом.

3) PARP3:

- проявляет низкую аффинность к 5'-dRP-содержащим Gap-структурам (ранние стадии BER), хотя показано взаимодействие с 5'-фосфорилированными разрывами (поздние стадии BER) [172];
- взаимодействует с AP-сайтами в NCP, расположенными вблизи тупого конца.

Таким образом, наблюдаются принципиальные различия в механизмах взаимодействия ДНК-зависимых PARP с повреждениями ДНК в нуклеосомном контексте:

- PARP1 — преимущественное связывание с тупыми концами ДНК в нуклеосоме, расположенными в области входа-выхода;
- PARP2 — эффективное распознавание повреждений (AP-сайт и Gap) и взаимодействие с гистоновым октамером;
- PARP3 — ограниченное взаимодействие с AP-сайтами и гистонами.

Полученные данные важны для понимания регуляции начальных стадий процесса BER в контексте хроматина и механизмов работы трёх ядерных ДНК-зависимых белков PARP в процессах репарации ДНК. Детальное понимание конформационных изменений NCP, индуцированных взаимодействием с ДНК-зависимыми белками PARP, а также точное пространственное расположение этих белков в комплексе с NCP, остаются недостаточно изученными. Комплексный анализ взаимодействия PARP1, PARP2 и PARP3 с нуклеосомными

структурами методом АСМ представляет особую научную значимость из-за выявленных в настоящем исследовании принципиальных различий в механизмах связывания этих белков с NCP. Метод АСМ предоставляет уникальные возможности для решения этих вопросов, позволяя непосредственно визуализировать конформационные изменения нуклеосом с нанометровым разрешением без необходимости использования маркёров. Важным преимуществом является возможность количественной оценки ключевых морфометрических параметров: локализации белков, структуры NCP, высоты комплексов, объема комплексов, площади комплексов и др. Особую ценность представляют сравнительные данные по всем трем исследуемым белкам, которые позволят выявить как общие закономерности, так и специфические особенности их взаимодействия с нуклеосомными структурами.

4.6. Локализация белков PARP1, PARP2 и PARP3 на L-NCP603 методом АСМ

Белки PARP1 и PARP2 задействованы в большинстве ДНК-зависимых процессов, в том числе выполняют регуляторную функцию в ходе транскрипции и репарации ДНК. Значительное число данных указывают на возможную роль PARP1 в организации структуры хроматина [272 – 274]. Кроме того, недавнее открытие фактора PARилирования гистонов 1 (HPF1) дополнительно указывает на вклад в регуляцию структуры хроматина не только PARP1, но и PARP2 [178, 181, 248]. Вовлеченность этих белков одновременно в регуляцию транскрипции, репарации, репликации и компактизации ДНК может быть важным связующим звеном в обеспечении взаимодействия между этими процессами посредством их взаимной регуляции. В этом контексте мы предприняли попытку более подробно изучить взаимодействие белков PARP1, PARP2 и PARP3 с нуклеосомой как базовой структурной единицей хроматина при помощи АСМ. Особенность этого подхода заключается в отсутствии необходимости разрушать комплекс для его изучения и вносить специфические метки в структуру комплекса. С использованием АСМ можно изучать геометрические параметры биологических молекул и их комплексов в контексте одной молекулы в её нативной форме, не искажённой дополнительными модификациями.

В качестве модели мы использовали структуру L-NCP603 на основе NPS «603» с линкерными участками 120 и 79 пн (**Рис. 12**). При анализе полученных изображений для дальнейшей характеристики выбирали только нуклеосомы, связанные белками PARP. В соответствии с расположением белков PARP на L-NCP603, комплексы разделяли на две категории: 1) PARP располагается близко к ядру; 2) PARP располагается на линкерной ДНК. На **Рис. 40** показаны типичные изображения нуклеосом L-NCP603 в комплексе с белками PARP1, PARP2 и PARP3. 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. 41).

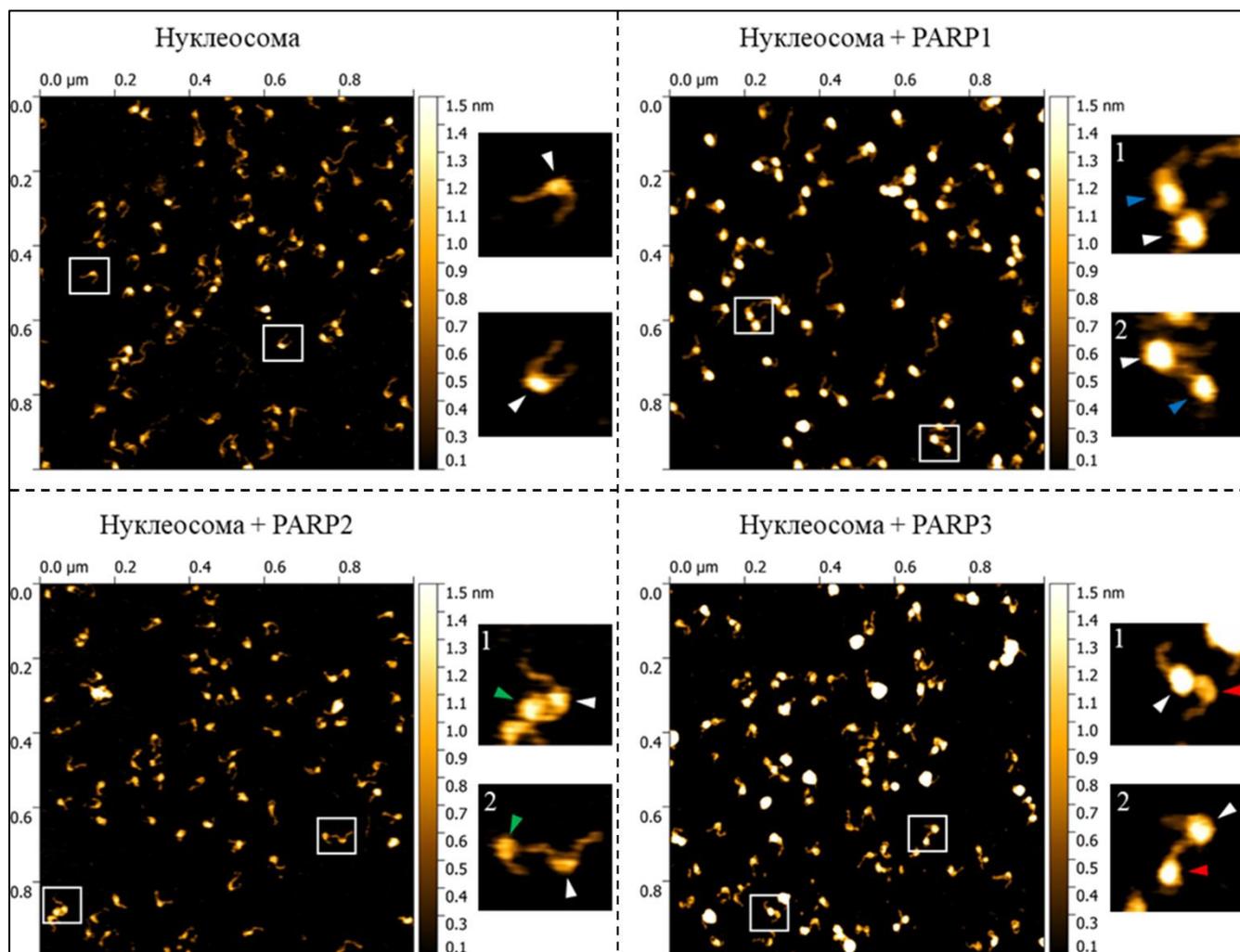


Рис. 40. Типичные изображения АСМ нуклеосом L-NCP603 и комплексов PARP•L-NCP603. Ядра нуклеосом обозначены белыми стрелками. Белки PARP1, PARP2 и PARP3 отмечены синей, зелёной и красной стрелками соответственно. 1 — PARP, расположенная близко к ядру нуклеосомы; 2 — PARP, расположенная в линкерной области ДНК. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.22.; п. 3.2.23.; п. 3.2.24.).

Оказалось, что белок 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 [179]; PARP1 взаимодействует с нуклеосомой в области входа-выхода линкерной ДНК через домены цинковых пальцев и BRCT [139]. 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 (п. 2.4.; Рис. 6). Можно предположить, что в этом процессе играет роль домен WGR. Вероятно, взаимодействие белков PARP с нуклеосомой способно оказывать влияние на структуру нуклеосомного комплекса.

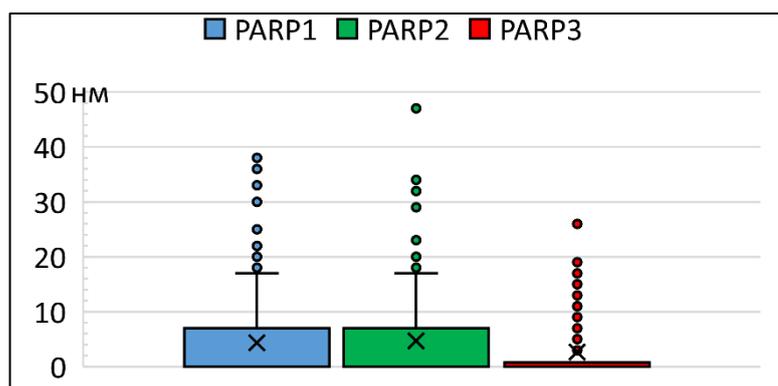


Рис. 41. Блочная диаграмма с ограничителями выбросов распределения расстояний (нм) белков PARP1, PARP2 и PARP3 относительно ядра нуклеосомы. Крестик — среднее арифметическое по выборке; линия выше или ниже крестика — медиана (находится в нуле); нижняя и верхняя грань бара — первый и третий квартиль значений; расстояние между границами — межквартильный размах; верхняя и нижняя граница «усов» — максимальное и минимальное значение в выборке; точки — выбросы. Тест Краскела-Уоллиса с пост-тестом Манна-Уитни (поправка Бонферрони) показал отсутствие статистически значимых различий между группами (p -value > 0,05). График построен в Microsoft Excel.

4.7. Изучение структурных изменений в нуклеосоме, вызванных белками PARP

Одним из параметров, отражающих степень компактизации ДНК в составе нуклеосомы, является угол раскрытия α между линкерными ДНК [196, 275] (**Рис. 42 А**). Мы определили соответствующий угол для ранее выявленных комплексов PARP•L-NCP603. Нуклеосомы без добавления какого-либо PARP использовались в качестве контроля. Графическое представление результатов приведено на **Рис. 42 Б, В**.

Средний угол между плечами ДНК в контрольных L-NCP603 составил $120^\circ \pm 5^\circ$. Наш результат согласуется с данными, полученными другой исследовательской группой [196]. В работе [196] авторы выявили две популяции нуклеосом, которые отображали корреляцию между длиной развернутой ДНК и распределением по углу раскрытия. Мы не наблюдали такого распределения. Это несоответствие может быть объяснено различием в нуклеотидных последовательностях используемой ДНК. В нашей работе мы использовали NPS «603», которая обладает меньшим сродством при связывании с ядерными гистонами по сравнению с NPS «601» [63], которую использовали Konrad S.F. с соавторами в своей работе [196]. Основное различие между этими двумя NPS заключается в стабильности ядра нуклеосомы: нуклеосома на основе NPS «601» более стабильна и, следовательно, имеет менее лабильные концы ДНК. Вероятно, что наши модельные нуклеосомы на основе NPS «603» имеют недостаточные различия в значениях угла раскрытия, чтобы четко различать эти два распределения. При этом нуклеосома на основе NPS «603», вероятно, более предпочтительна для изучения возможного влияния со стороны белков PARP на структуру NCP, т.к. обеспечивает возможность структурных изменений в нуклеосомном комплексе из-за своей динамики.

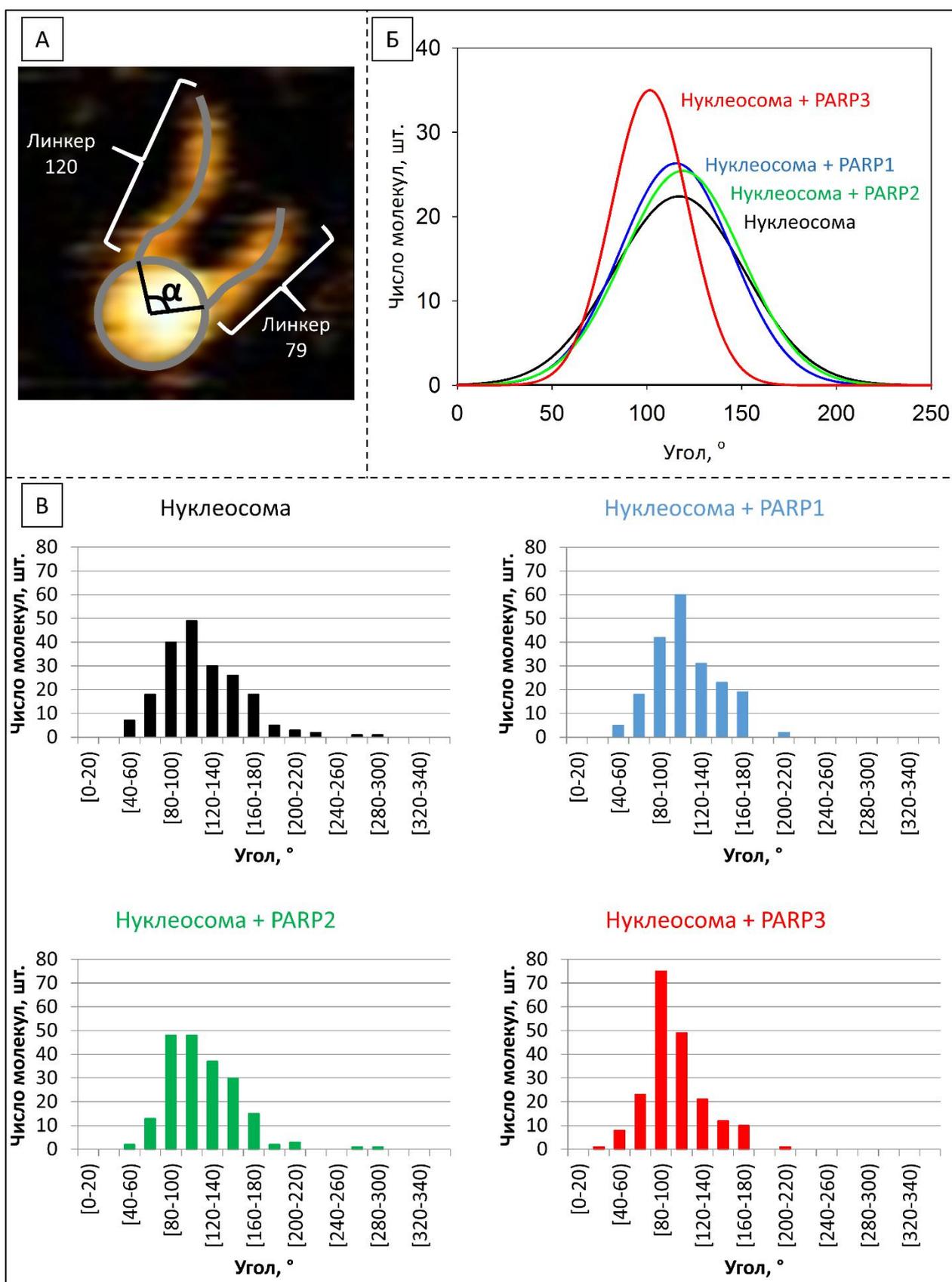


Рис. 42. Компактизация нуклеосомы L-NCP603 в зависимости от присутствия белка PARP. **А** — Схематическое изображение определяемых параметров L-NCP603, α — угол между линкерными ДНК. **Б** — Гауссова интерполяция распределения значений угла α . **В** — распределение значений угла α .

Связывание PARP1 с L-NCP603 вызвало незначительное сужение распределения угла раскрытия α без существенного влияния на уплотнение нуклеосомы ($115^\circ \pm 4^\circ$). Разница в измеренных значениях угла в нуклеосоме в присутствии и в отсутствие PARP1 не была существенной ($p\text{-value} > 0,05$). Как упоминалось выше, PARP1 может связывать нуклеосому вблизи сайта входа-выхода и взаимодействовать с каждой линкерной ДНК. Это взаимодействие может влиять на структурное функционирование хроматина аналогично линкерному гистону H1. Сообщалось, что присутствие H1 сужает распределение по углу раскрытия, что означает стабилизацию нуклеосомы, и не изменяет степень уплотнения [236]. Кроме того, подобно гистону H1, PARP1 проявляет хроматин-конденсирующую активность, которая нивелируется в результате авто-PARилирования этого фермента [273]. Авторы работы [273] предполагают, что уплотнение достигается за счет объединения соседних нуклеосом молекулами PARP1 аналогично процессу, наблюдаемому в белковом комплексе группы Polycomb [276]. С другой стороны, этот эффект, вероятно, обусловлен образованием петли, вызванной контактами PARP1•PARP1 [277]. Есть данные о том, что связывание PARP1 с ДНК вблизи сайта входа-выхода в нуклеосоме приводит к дистанцированию двух спиралей ДНК [180]. Таким образом, PARP1 дестабилизирует структуру нуклеосомы. Тем не менее в этой работе авторы продемонстрировали, что связывание PARP1 с нуклеосомой вызывает пространственное разделение флуоресцентных меток, локализованных на противоположных спиралах ДНК, контактирующих с гистоновым октамером. Эти данные были получены с использованием микроскопии smFRET, которая не различает направления деформации в нуклеосоме. Изменения в структуре нуклеосомы могут происходить в одном из двух направлений: радиальном или аксиальном, относительно оси нуклеосомного диска. Поскольку мы не обнаружили существенных изменений в степени уплотнения L-NCP603 в присутствии PARP1, изменения, вероятно, происходят в аксиальном направлении. В этом случае влияние не может быть определено с помощью АСМ. Мы также не можем исключить, что ранее описанные искажения структуры нуклеосомы, вызванные PARP1, могут влиять только на область ДНК, которая находится в непосредственном контакте с ядром гистонов. В этом контексте геометрия сайта входа-выхода ДНК может оставаться неизменной.

Несмотря на то что аффинность PARP2 к нуклеосоме превышает таковую к свободной ДНК в ~ 7 раз (п. 4.1.; Таблица 6), 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 ($121^\circ \pm 4^\circ$). Принимая во внимание стандартное отклонение, разница в измеренных значениях угла в нуклеосоме в присутствии и в отсутствие PARP2 не была существенной ($p\text{-value} > 0,05$).

Между тем, PARP3 оказывала особое влияние на уплотнение ядра нуклеосомы L-NCP603. Мы наблюдали повышенную степень уплотнения нуклеосомы в присутствии PARP3 ($104^{\circ} \pm 4^{\circ}$). Принимая во внимание стандартное отклонение, разница в измеренных значениях угла в нуклеосоме в присутствии и в отсутствие PARP3 была статистически значимой ($p\text{-value} < 0,001$). Более того, присутствие PARP3 индуцировало сужение распределения углов раскрытия. В литературном обзоре упоминалось (п. 2.4.2.), что белок PARP3 широко распространен в ядре как часть белковых комплексов группы Polysomb. 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.

В нашей работе мы исследовали изменения в архитектуре L-NCP603 при взаимодействии с PARP1, PARP2 или PARP3 в отсутствие NAD^+ . Наблюдаемые эффекты могут быть существенно изменены наличием повреждений в ДНК и NAD^+ . Эти изменения также могут быть важны, особенно из-за различных способностей белков PARP синтезировать различные цепи PAR на молекуле-акцепторе, начиная с переноса одной ADP-рибозы, как это делает PARP3. Более того, вклад сопутствующих факторов, таких как HPF1, может быть существенным во время PARирования и последующей реорганизации уплотнения NCP. Тем не менее наше исследование моделирует сценарий, при котором ДНК не повреждена, а основная активность белков PARP по переносу ADP-рибозы слаба. Подводя итог, можно сказать, что PARP3 является новым вероятным игроком в регуляции уплотнения хроматина. Для более детального понимания этого явления необходимо изучить способность PARP3 уплотнять хроматиноподобные структуры более высокого порядка.

4.8. Изучение влияния белков PARP на хроматиноподобные структуры

На первом этапе для однозначной интерпретации результатов методом АСМ, мы получили хроматиноподобные частицы (Chromatin-Like Particle, CLP), в которых присутствовал кластер из восьми нуклеосом, CLP601-8. Понимание структурных изменений в модельном хроматине позволяет выявить ранее неизвестные функции белков или подтвердить выдвигаемые гипотезы об их работе [278]. Структурные изменения в хроматине играют ключевую роль в регуляции генетической активности и ответах клетки на стрессовые факторы. Белки PARP известны своими функциями в репарации ДНК, регуляции транскрипции и поддержании целостности генома. Ранее показана способность белков PARP вызывать изменения в

компактизации хроматина, что может приводить к активации или репрессии определённых генов [279, 280].

Анализ полученного препарата CLP601-8 с помощью АСМ выявил его гетерогенность, со средним значением 8 NCP на одну молекулу ДНК (**Рис. 43**). Эти данные согласуются с



Рис. 43. Распределение числа NCP на одну молекулу ДНК в модельном препарате CLP601-8.

результатами работы [244], где при реконструировании CLP также наблюдается гетерогенность популяции исследуемых частиц. В нашем случае преобладающим продуктом оказалась окта-нуклеосомная структура, что обусловлено наличием высокоаффинных NPS «601» в ДНК CLP601-8 [63] (**п. 3.1.**; **Рис. 13**). Примечательно, что в препарате также обнаружены CLP с 9 и 10 NCP. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными данными [281]. Формирование таких структур объясняется наличием в нашей конструкции дополнительных линкерных участков длиной 450 и 200 пн, не содержащих NPS [281, 282]. Таким образом, асимметричное гауссово распределение молекул CLP601-8 по числу NCP может быть связано с пониженной стабильностью комплексов, содержащих более 8 нуклеосом. Оптимальное мольное соотношение ДНК к гистоновым октамерам при реконструировании CLP601-8 было подобрано экспериментально: при дефиците гистонов (отношение одной NPS «601» к гистонам = 1:0,9) образуются CLP преимущественно с 6 нуклеосомами, а избыток гистонов приводит либо к формированию полинуклеосомных структур (>8 NCP) со случайным позиционированием NCP на ДНК, либо к образованию неструктурированных агрегатов (данные не приведены). В нашем случае мы использовали мольное соотношение гистонов на одну NPS «601» = 1:1.

Для оценки влияния PARP1, PARP2 и PARP3 на структуру препаратов CLP601-8 требуется разработать специализированные методы обработки АСМ-изображений. В литературе

описан подход, основанный на анализе пространственного распределения нуклеосомных частиц, включающий в себя измерение межнуклеосомных расстояний, определение длины линкерных участков, количественную оценку степени компактизации ДНК на нуклеосомах [278]. Однако данный метод применим лишь для систем, где исключено появление артефактов, имитирующих нуклеосомные частицы. В нашем случае анализ АСМ-изображений (**Рис. 40**) выявил принципиальное ограничение: все три исследуемых белка PARP при формировании комплексов с нуклеосомами не отличались по морфометрическим характеристикам от нуклеосомных ядер. Этот факт делает невозможным достоверно различать истинные нуклеосомные частицы и комплексы PARP•нуклеосома. Таким образом, описанный в работе [278] подход к анализу нуклеосомной организации требует существенной модификации для изучения высокомолекулярных хроматин-ассоциированных белков, таких как ДНК-зависимые белки PARP.

Мы определили ключевые морфометрические характеристики CLP601-8, на которые могут влиять белки PARP1, PARP2 и PARP3: площадь проекции CLP на сканируемую плоскость и объем молекулы CLP. Анализ проводили с использованием программного обеспечения Gwyddion v2.65 (**п. 3.2.24.**). Для обеспечения точности измерений анализ проводили исключительно для NCP и белков PARP, не учитывая свободные участки ДНК. Такое решение обусловлено следующими техническими ограничениями: с учётом радиуса кривизны кантилевера в используемом режиме сканирования АСМ площадь проекции и объём фрагмента ДНК длиной 147 пн (соответствующего NPS «601») оказались сопоставимы с аналогичными параметрами реконструированной NCP. Такая методика позволила минимизировать погрешности при анализе препаратов CLP601-8.

Анализ морфометрических параметров CLP601-8 выявил линейную зависимость между количеством NCP и размерами частиц: с увеличением числа NCP пропорционально возрастают как площадь проекции, так и объём комплексов. Расчет средних значений площади и объёма отдельных NCP для разных групп CLP показал их сопоставимые значения (**Рис. 44**). Полученные данные свидетельствуют о сохранении структурной организации отдельных нуклеосомных ядер при формировании CLP601-8.

После подтверждения соответствия метода анализа CLP теоретической модели мы исследовали комплексы CLP601-8 с белками PARP. Изучение влияния ДНК-зависимых PARP на структуру мононуклеосом выявило специфический эффект, вызванный белком PARP3: угол

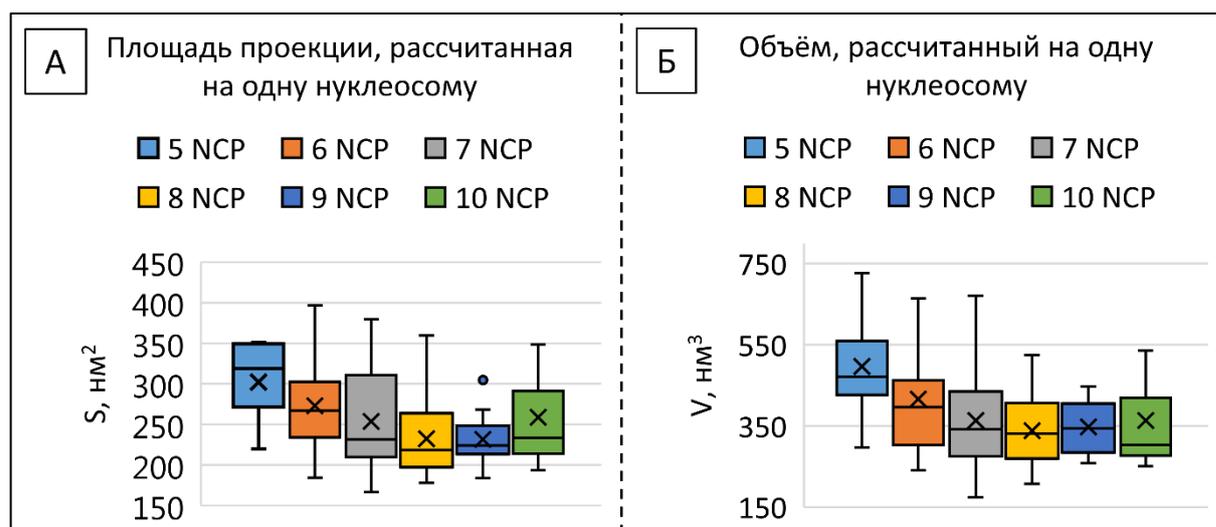


Рис. 44. Блочная диаграмма с ограничителями выбросов: **А** — Средняя площадь проекции ядра нуклеосомы, вычисленная из средней площади проекции частиц CLP601-8, делённой на число NCP в группе; **Б** — Средний объём по Лапласу ядра нуклеосомы, вычисленный из среднего объёма по Лапласу частиц CLP601-8, делённого на число NCP в группе. Объём выборки (N) для каждой группы соответствует числу обработанных частиц (Рис. 43). Крестик — среднее арифметическое по выборке; линия выше или ниже крестика — медиана; нижняя и верхняя грань бара — первый и третий квартиль значений; расстояние между границами — межквартильный размах; верхняя и нижняя граница «усов» — максимальное и минимальное значение в выборке; точки — выбросы. Тест Краскела-Уоллиса с пост-тестом Манна-Уитни (поправка Бонферрони) показал отсутствие статистически значимых различий между группами (p -value > 0,003). Графики построены в Microsoft Excel.

между точками входа-выхода ДНК и центром нуклеосомы уменьшался при связывании PARP3 с L-NCP603, одновременно наблюдалось сужение пика распределения углов (Рис. 42 Б). Эти данные свидетельствуют о стабилизации нуклеосомы и компактизации ДНК под действием PARP3. Полученные результаты позволяют предположить роль PARP3 в организации структуры хроматина через модуляцию динамики нуклеосом. Для проверки данной гипотезы к препарату 10 нМ CLP601-8 (Рис. 45) добавили белок PARP3 в концентрации 66; 250; 500 нМ (Рис. 46, 47, 48 соответственно).

При добавлении к препарату CLP601-8 белка PARP3 в концентрациях 250 нМ и 500 нМ (Рис. 47 и 48 соответственно) методом АСМ обнаружены высокомолекулярные комплексы. Их точную структурную организацию невозможно определить по следующим причинам: 1) формирование агрегатов может происходить как за счёт связывания PARP3 с отдельными CLP, так и вследствие ассоциации нескольких молекул CLP; 2) интенсивное взаимодействие PARP3 с полинуклеосомами приводит к образованию плотноупакованных комплексов, что существенно снижает разрешение получаемых изображений и затрудняет анализ пространственной организации хроматиновых структур. При концентрации PARP3 66 нМ нам удалось получить интерпретируемые АСМ-изображения, анализ которых показал увеличение площади проекции комплексов на ≈ 23 % (с 1813 nm^2 до 2236 nm^2) и объема на ≈ 34 % (с 2670 nm^3 до 3591 nm^3) по

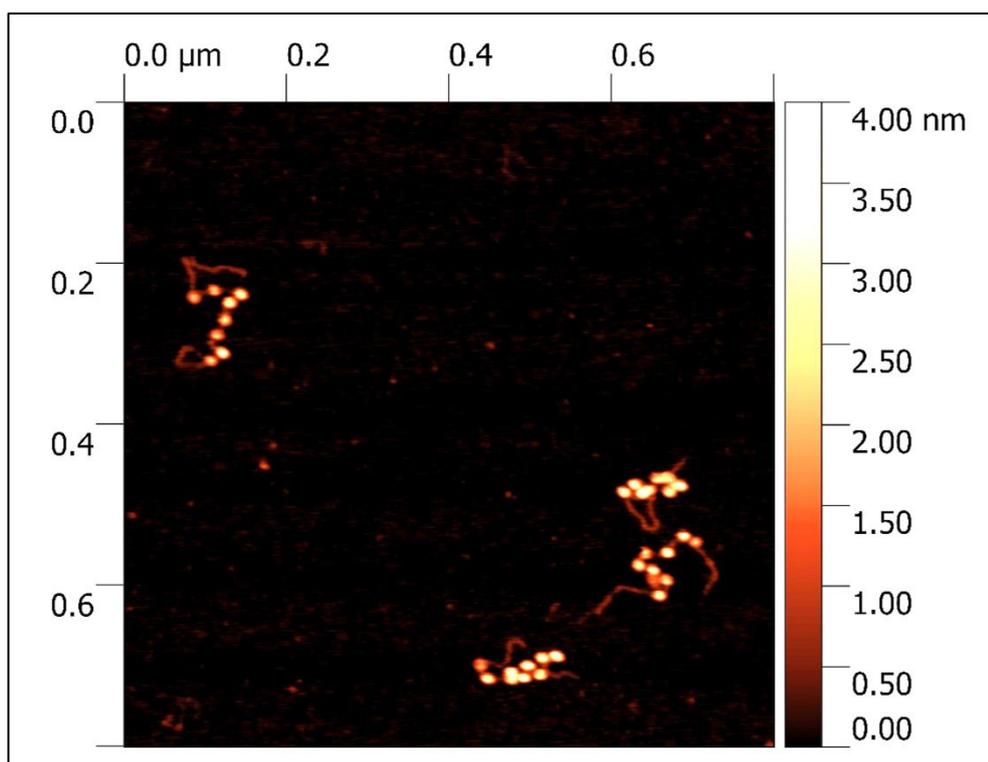


Рис. 45. Типичное изображение АСМ контрольного препарата CLP601-8 в концентрации 10 нМ. Перед нанесением на слюду реакционную смесь разбавляли в 10 раз. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.22.; п. 3.2.23.; п. 3.2.24.).

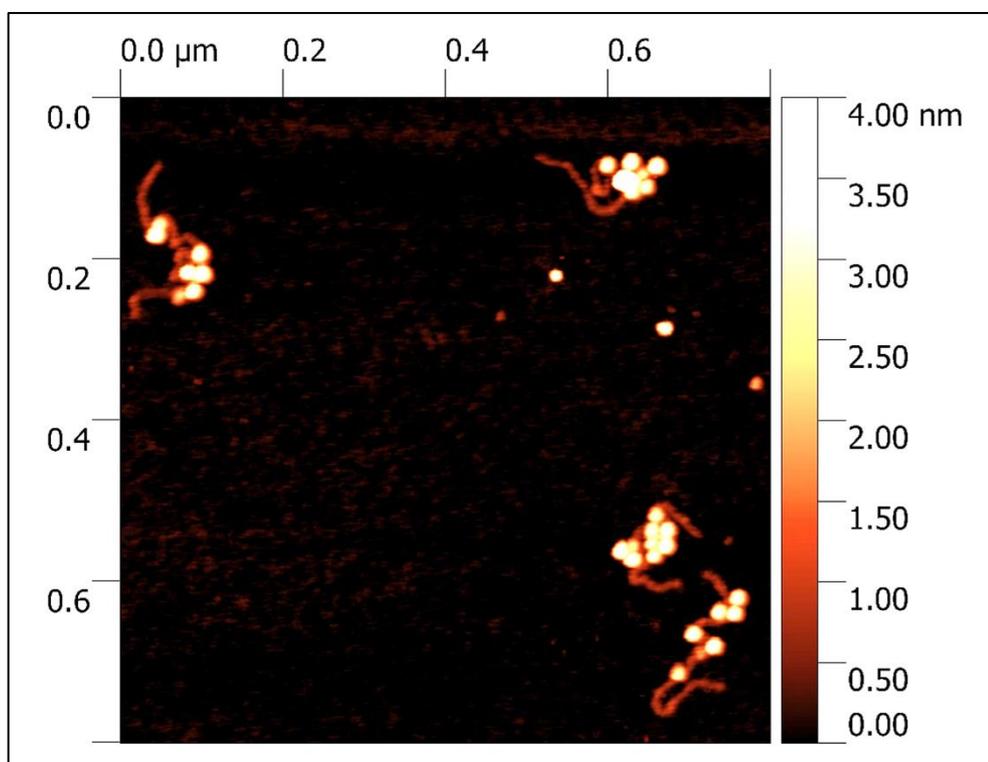


Рис. 46. Типичное изображение АСМ комплексов CLP601-8 (10 нМ) с белками PARP3 (66 нМ). Перед нанесением на слюду реакционную смесь разбавляли в 10 раз. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.22.; п. 3.2.23.; п. 3.2.24.).

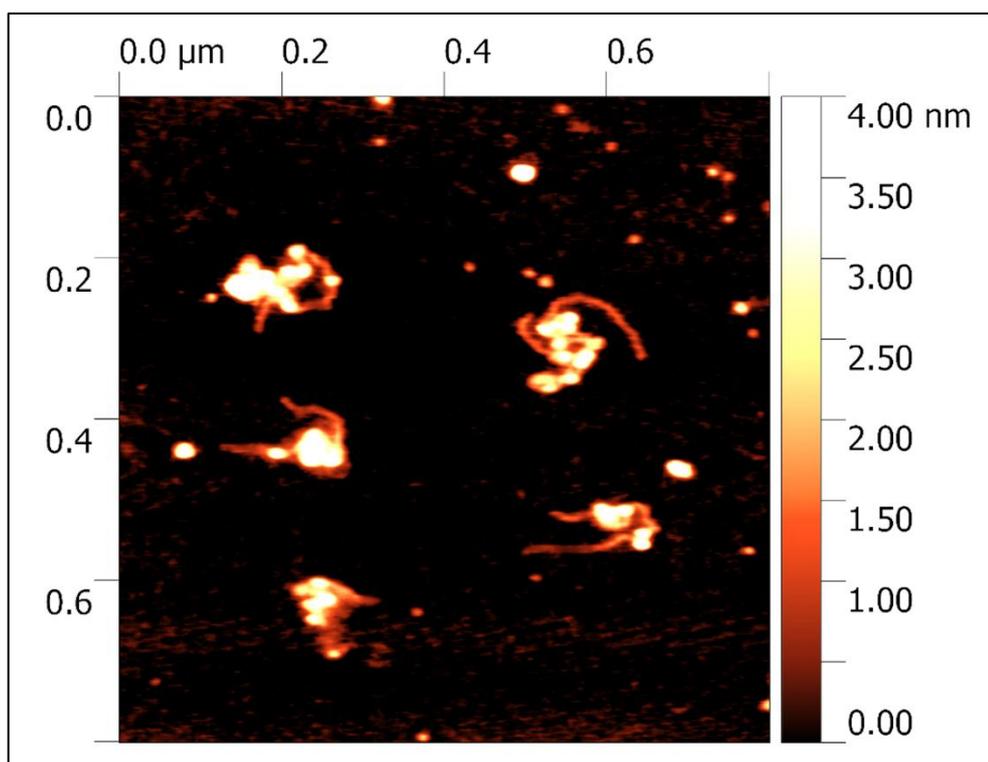


Рис. 47. Типичное изображение АСМ комплексов CLP601-8 (10 нМ) с белками PARP3 (250 нМ). Перед нанесением на слюду реакционную смесь разбавляли в 10 раз. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.22.; п. 3.2.23.; п. 3.2.24.).

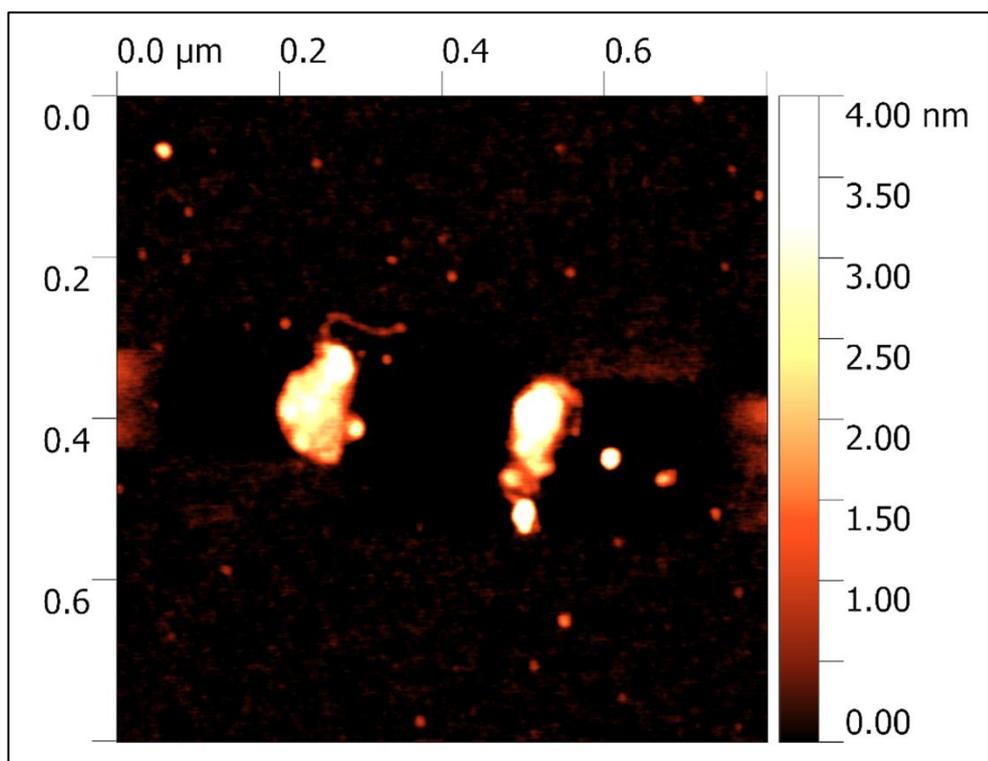


Рис. 48. Типичное изображение АСМ комплексов CLP601-8 (10 нМ) с белками PARP3 (500 нМ). Перед нанесением на слюду реакционную смесь разбавляли в 10 раз. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.22.; п. 3.2.23.; п. 3.2.24.).

сравнению с контрольным препаратом CLP. Эти изменения могут свидетельствовать о взаимодействии PARP3 как с ДНК в области входа-выхода, так и с гистоновым октамером в составе CLP. Анализ графика зависимости объем/площадь для контрольного препарата выявил линейное распределение точек, соответствующее числу NCP на ДНК (**Рис. 49**), причем разброс значений возрастал с увеличением числа нуклеосом, что отражает структурную гетерогенность CLP601-8. Интересно, что для анализируемых комплексов PARP3•CLP601-8 сохранялся линейный тренд, аналогичный контрольному препарату CLP601-8 (**Рис. 50**), однако появлялась новая популяция частиц с параметрами 2000-4000 нм² (площадь) и 4000-6000 нм³ (объем). Новая популяция соответствует CLP, содержащим 9- и 10-NCP. Кроме того, линии тренда для двух препаратов фактически совпадают и накладываются друг на друга, что свидетельствует о продолжении тренда популяции точек в препарате с добавлением PARP3. Таким образом, увеличение площади и объема частиц CLP601-8 в присутствии белка PARP3, вероятно, свидетельствует о способности PARP3 стабилизировать нуклеосомную организацию даже на участках ДНК, не содержащих высокоаффинные NPS «601» [281, 282]. Эти данные согласуются с результатами, демонстрирующими связь PARP3 с белками группы Polysomb [134]. Однако точный механизм воздействия PARP3 на CLP и структуры более высокого порядка требует дальнейшего изучения.

Для исследования структурных изменений CLP601-8 использовали белки PARP1 и PARP2 в концентрации 66 нМ, идентичной для PARP3. Анализ АСМ-изображений комплексов CLP с PARP1 и PARP2 (**Рис. 51** и **52** соответственно) выявил существенные различия от воздействия двух белков на морфометрические параметры комплексов: PARP1 вызывала увеличение средней площади проекции на 40 % (с 1813 нм² до 2545 нм²) и объема на 74 % (с 2670 нм³ до 4654 нм³), тогда как для PARP2 эти показатели возрастали на 18 % и 53 % соответственно. Сравнительная диаграмма (**Рис. 53**) наглядно демонстрирует воздействия на CLP от трёх белков по объёму (PARP1 > PARP2 > PARP3) и площади (PARP1 > PARP3 > PARP2) Это отражает различную способность PARP влиять на морфометрические параметры CLP при одинаковых экспериментальных условиях, что согласуется с их сродством к NCP (**п. 4.3.; Таблица 8**).

Анализ представленных данных (**Рис. 53**) демонстрирует выраженное связывание PARP1 с CLP601-8, что согласуется с ранее опубликованными результатами [283], показывающими локализацию PARP1 в области сайта входа-выхода ДНК и области пары оснований диады нуклеосомы аналогично гистону H1 [272 – 274]. Наблюдаемое значительное увеличение объема комплексов по сравнению с площадью проекции может быть обусловлено особенностями использованной в работе ДНК CLP601-8 с межнуклеосомными линкерами

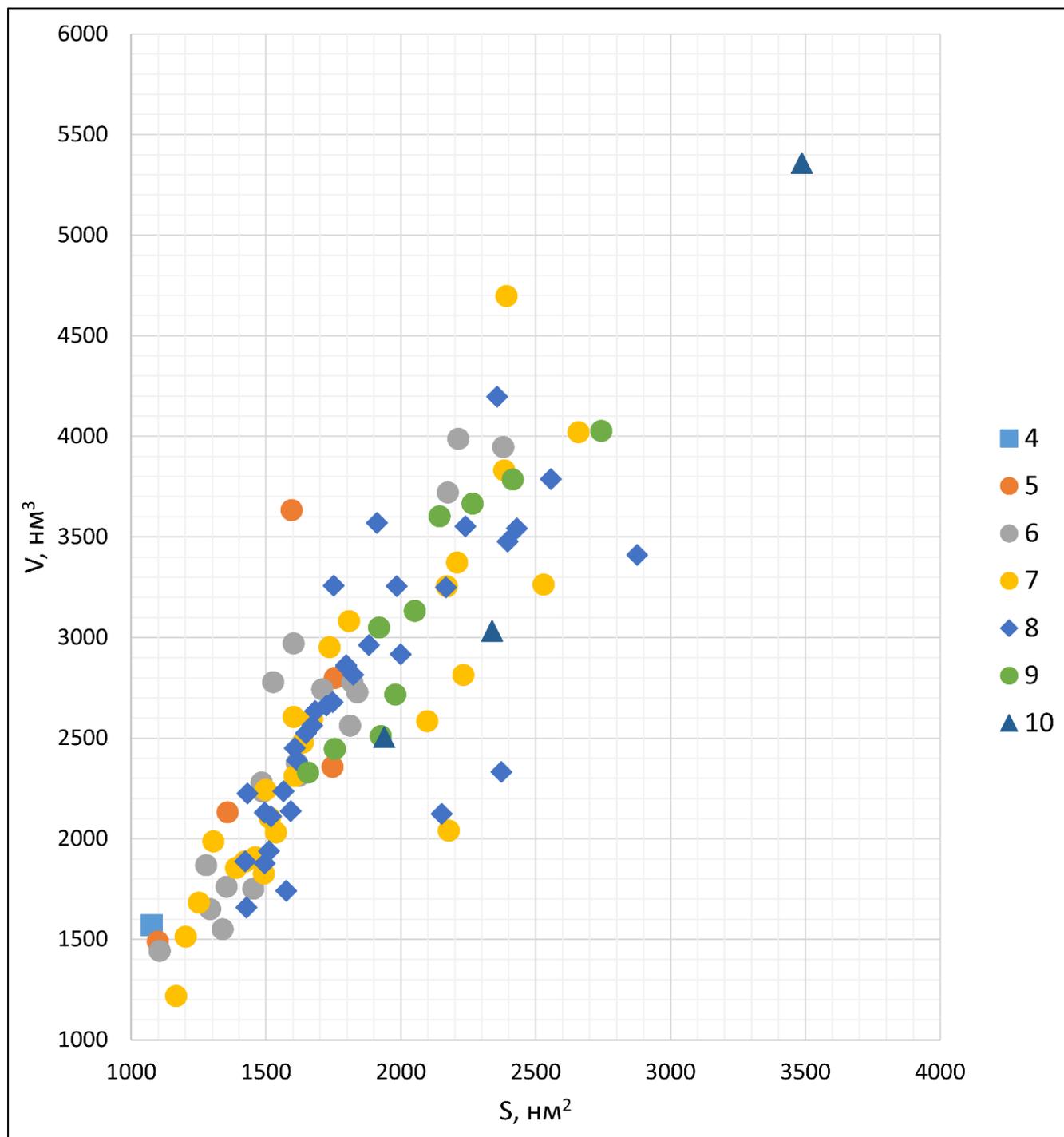


Рис. 49. Диаграмма распределения хроматиноподобных частиц (CLP). По оси Y — объём частиц (nm^3); по оси X — площадь проекции частиц (nm^2). Каждая точка соответствует отдельной частице CLP. Цвет точки отражает количество нуклеосом в составе частицы (численные значения указаны в легенде графика).

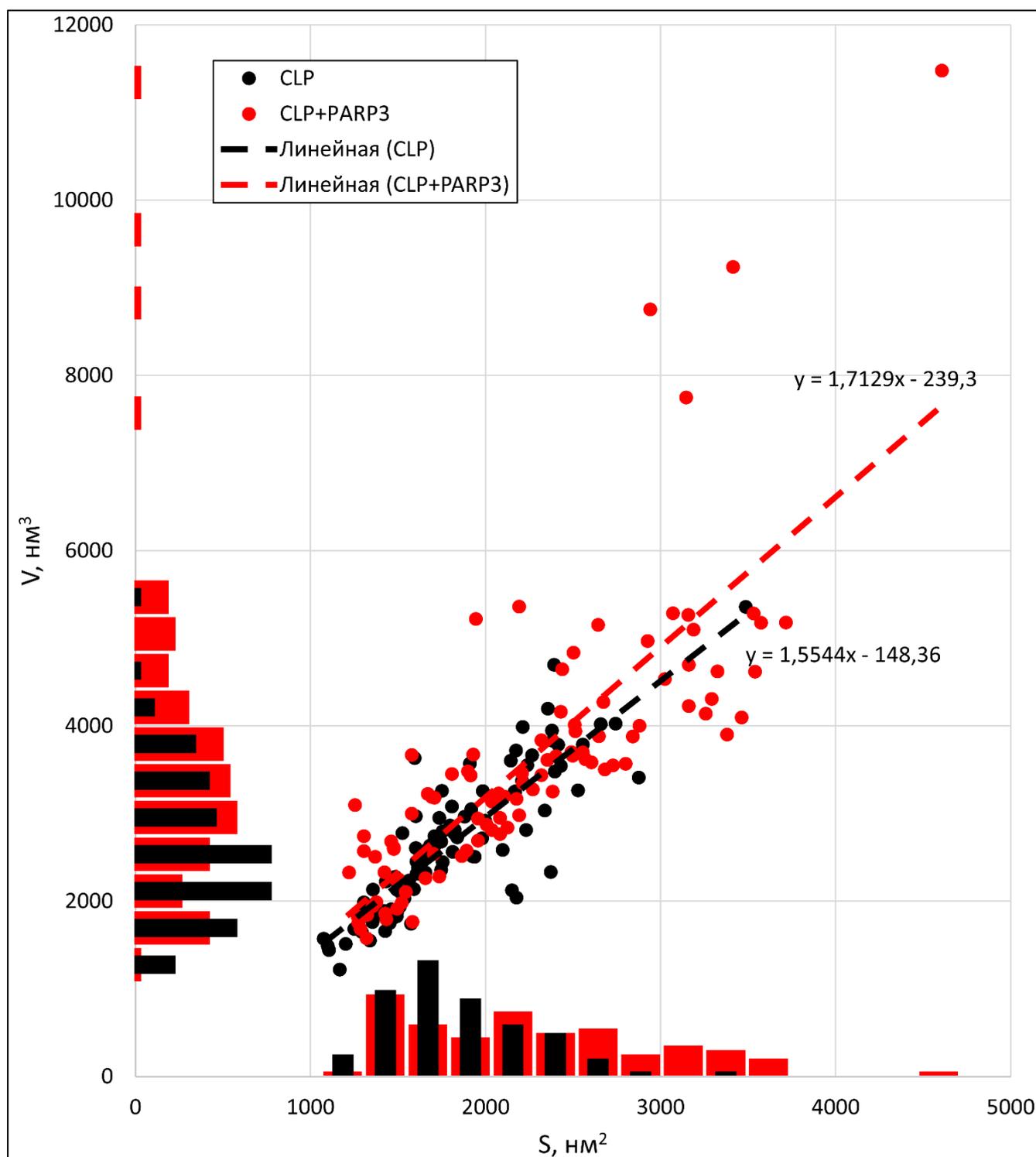


Рис. 50. Диаграмма распределения хроматиноподобных частиц (CLP, чёрные точки) и их комплексов с белком PARP3 (CLP + PARP3, красные точки). По оси Y — объём частиц (нм³); по оси X — площадь проекции частиц (нм²). Каждая точка соответствует отдельной частице CLP или комплексу CLP + PARP3. Пунктирная чёрная линия — аппроксимации данных контрольного препарата CLP. Красная пунктирная линия — аппроксимации данных препарата CLP в комплексе с PARP3. Гистограммы, расположенные на осях графика, отражают плотность точек в данной области диаграммы распределения частиц. Цвета баров соответствуют цветам точек.

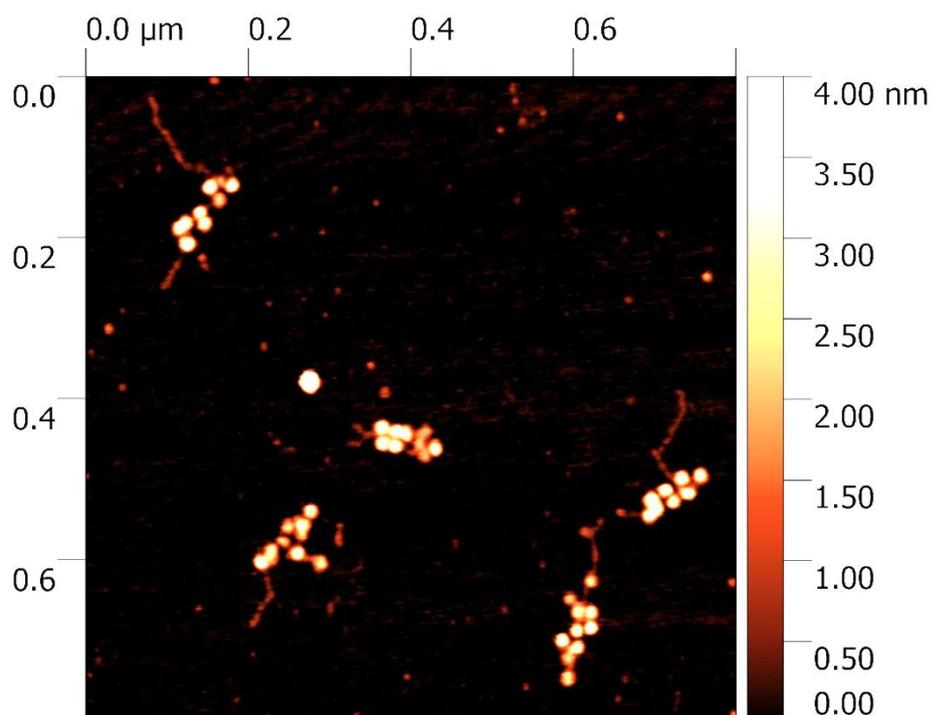


Рис. 51. Типичное изображение комплексов CLP601-8 (10 nM) с белками PARP1 (66 nM). Перед нанесением на слюду реакцию смесь разбавляли в 10 раз. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.22.; п. 3.2.23.; п. 3.2.24.).

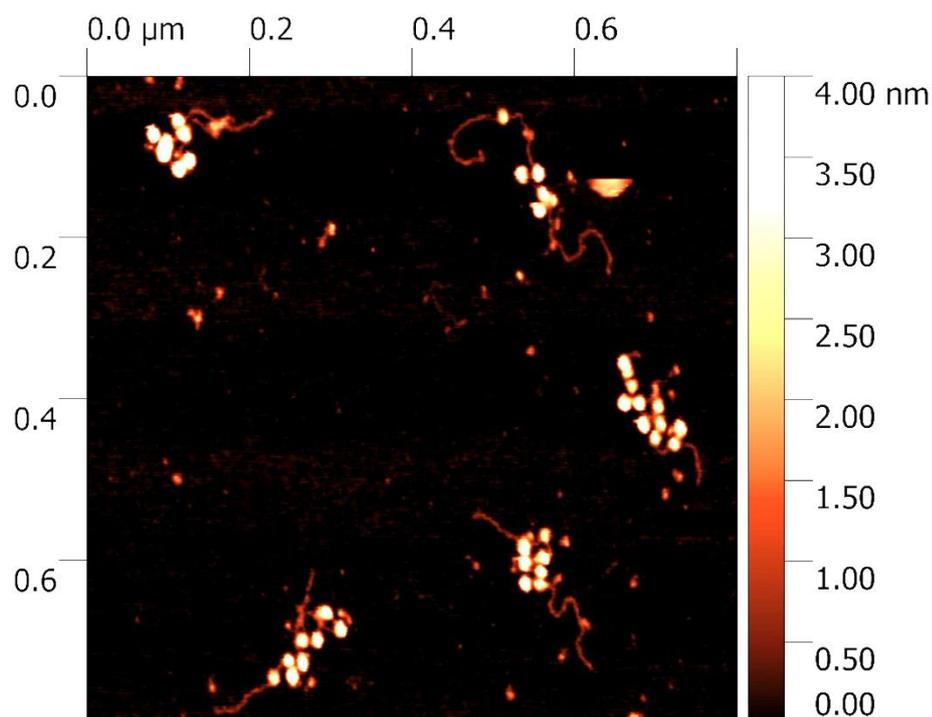


Рис. 52. Типичное изображение комплексов CLP601-8 (10 nM) с белками PARP2 (66 nM). Перед нанесением на слюду реакцию смесь разбавляли в 10 раз. Методология эксперимента описана в главе «Материалы и методы» (п. 3.2.22.; п. 3.2.23.; п. 3.2.24.).

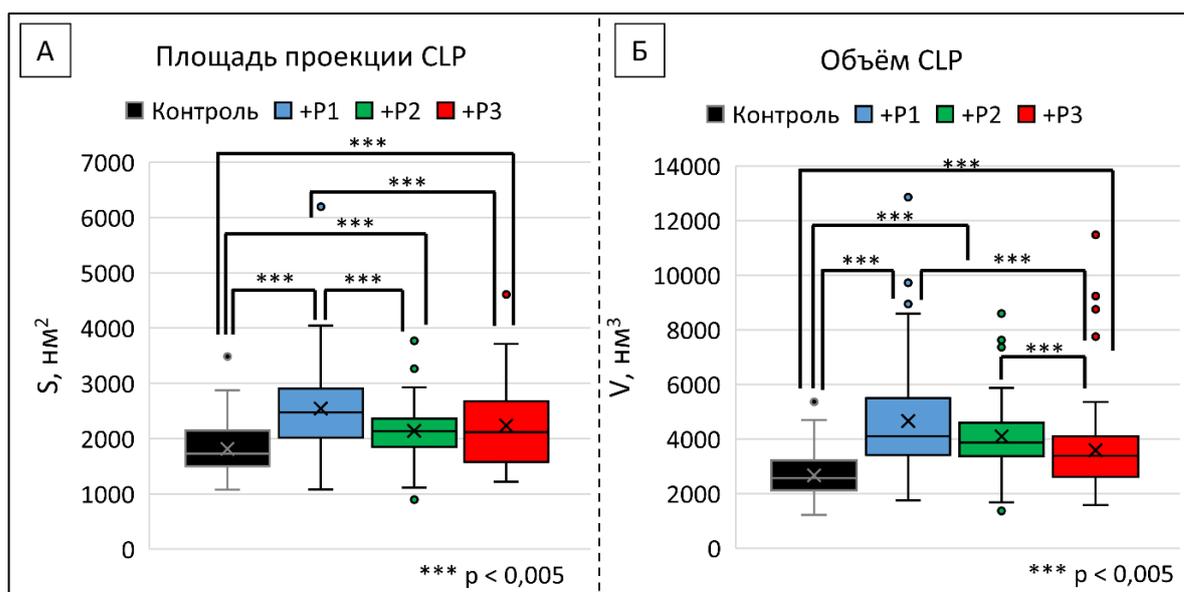


Рис. 53. Блочная диаграмма с ограничителями выбросов: А — площадь проекции CLP и их комплексов с белками PARP1, PARP2 и PARP3; Б — объём по Лапласу CLP и их комплексов с белками PARP1, PARP2 и PARP3. Объём каждой выборки, N = 100. Крестик — среднее арифметическое по выборке; линия выше или ниже крестика — медиана; нижняя и верхняя грань бара — первый и третий квартиль значений; расстояние между границами — межквартильный размах; верхняя и нижняя граница «усов» — 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 ***). Графики построены в Microsoft Excel.

длиной 25 нуклеотидов (~9.6 нм), что при размере молекулы PARP1 около 10 нм создает стерические ограничения для одновременного связывания с соседними нуклеосомами. Это объясняет ограниченное распределение комплексов по площади при заметном увеличении объема, что подтверждается анализом зависимости площади от объема (**Рис. 54**). Полученные данные также позволяют предположить возможное взаимодействие PARP1 с гистоновыми октамерами, что могло бы объяснить наблюдаемое увеличение объема комплексов.

Анализ морфометрических параметров выявил характерное увеличение объема комплексов PARP2•CLP601-8 по сравнению с занимаемой площадью (**Рис. 53**), что указывает на преимущественное взаимодействие PARP2 с гистоновым октамером нуклеосомы. Такой вывод можно сделать при анализе графика зависимости площади от объема исследуемых комплексов по сравнению с контрольным препаратом: значения объемов комплексов возрастают относительно контрольного препарата, при этом не изменяются значения площади проекции (**Рис. 55**). Сравнительный анализ АСМ-изображений комплексов с белками PARP1, PARP2 и PARP3 в концентрации 66 нМ (**Рис. 45, 46, 42** соответственно) показал, что PARP2 не уплотняет структуры CLP601-8 по сравнению с PARP1 и PARP3. Полученные данные впервые демонстрируют специфическую локализацию PARP2 на гистоновом октамере в составе хроматиновых комплексов, что может указывать на её роль в регуляции структуры хроматина.

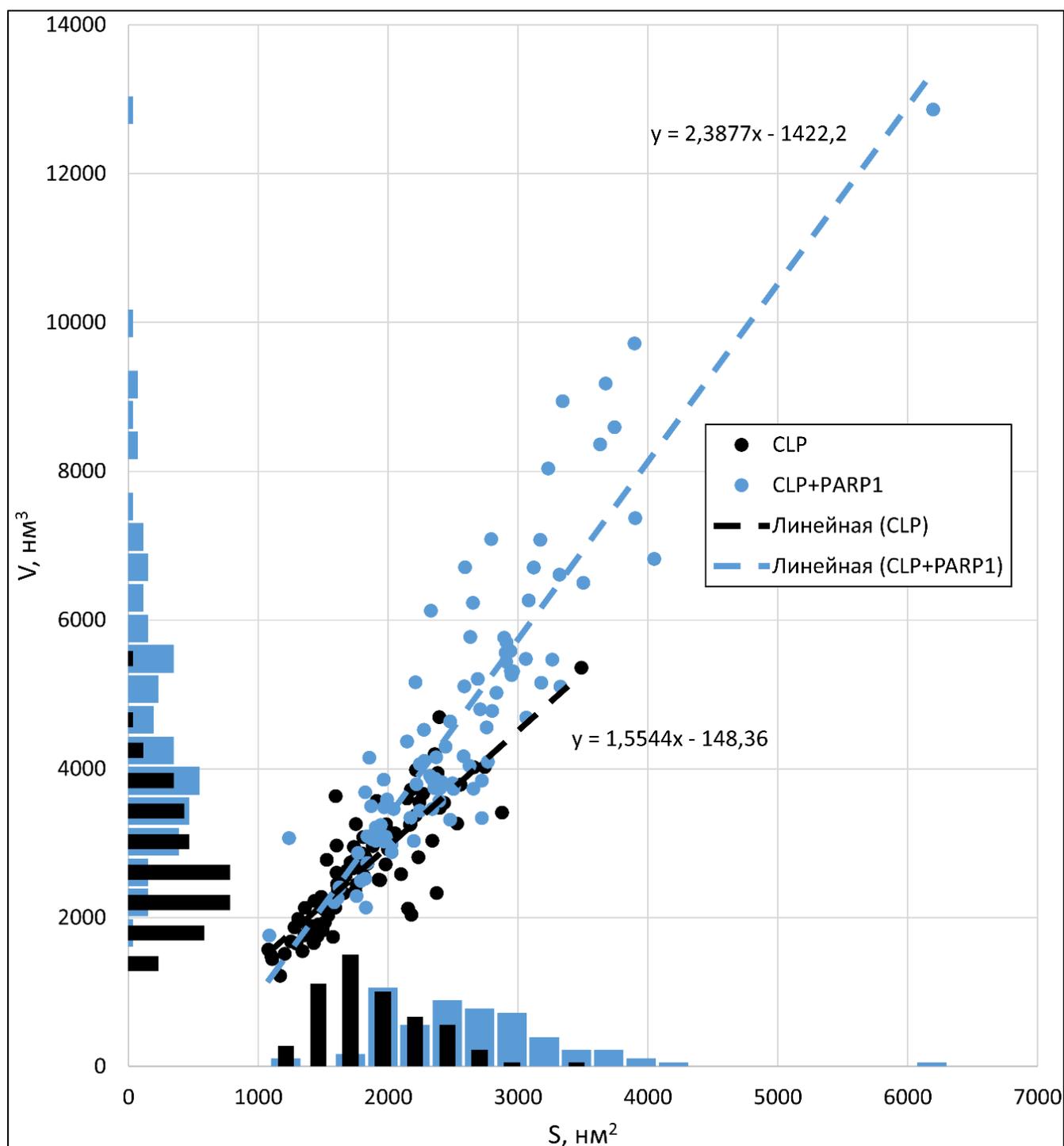


Рис. 54. Диаграмма распределения хроматиноподобных частиц (CLP, чёрные точки) и их комплексов с белком PARP1 (CLP + PARP1, синие точки). По оси Y — объём частиц (nm^3); по оси X — площадь проекции частиц (nm^2). Каждая точка соответствует отдельной частице CLP или комплексу CLP + PARP1. Пунктирная чёрная линия — линейная аппроксимация данных контрольного препарата CLP. Синяя пунктирная линия — линейная аппроксимация данных для препарата CLP в комплексе с PARP1. Гистограммы, расположенные на осях графика, отражают плотность точек в данной области диаграммы распределения частиц. Цвета баров соответствуют цветам точек.

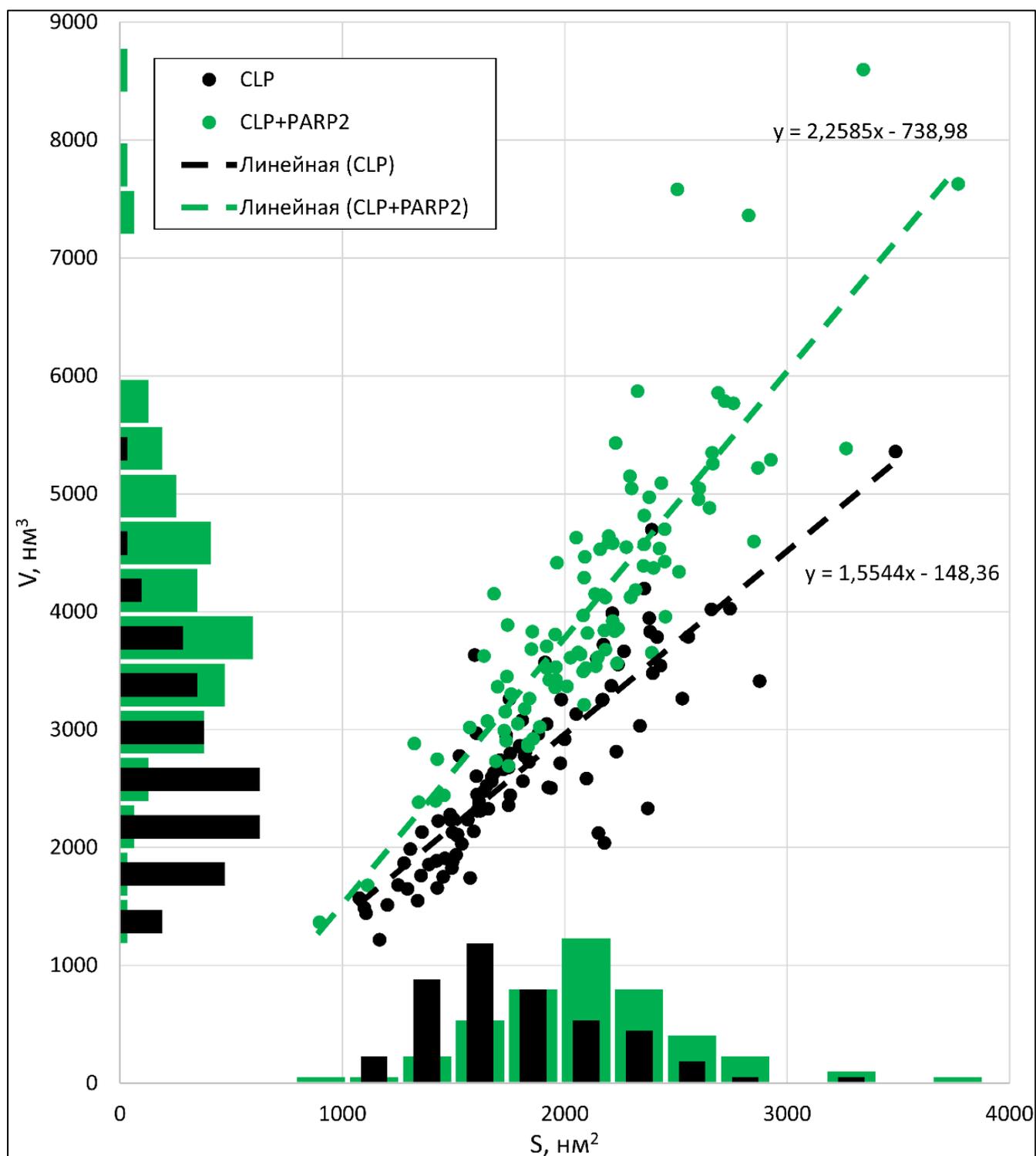


Рис. 55. Диаграмма распределения хроматиноподобных частиц (CLP, чёрные точки) и их комплексов с белком PARP2 (CLP + PARP2, зелёные точки). По оси Y — объём частиц (нм³); по оси X — площадь проекции частиц (нм²). Каждая точка соответствует отдельной частице CLP или комплексу CLP + PARP2. Пунктирная чёрная линия — линейная аппроксимация данных для контрольного препарата CLP. Зелёная пунктирная линия — линейная аппроксимация данных для препарата CLP в комплексе с PARP2. Гистограммы, расположенные на осях графика, отражают плотность точек в данной области диаграммы распределения частиц. Цвета баров соответствуют цветам точек.

В частности, выявленные структурные изменения могут отражать участие PARP2 в процессах репарации ДНК через модификацию гистонов, что особенно актуально в контексте взаимодействия PARP2 с HPF1 [181, 248, 284]. Эти результаты подчеркивают уникальный механизм действия PARP2, отличный от PARP1 и PARP3: PARP2, локализуясь на гистоновом ядре, в комплексе с HPF1 обеспечивает модификацию гистонов вблизи повреждения с последующей релаксацией нуклеосомной организации для доступа репарационных белков. Это согласуется с результатами, полученными в работах нашей лаборатории [181, 248]. Однако детальное понимание этого процесса требует дополнительных исследований.

Дополнительные материалы со статистической обработкой всех данных приведены в приложении.

Проведенное исследование выявило существенные различия во влиянии PARP1, PARP2 и PARP3 на структурную организацию хроматиноподобных частиц. Полученные данные позволяют предположить, что каждый из трёх ДНК-зависимых белков играет уникальную роль в регуляции структуры хроматина:

- 1) PARP1 демонстрирует наиболее выраженное воздействие, вызывая значительное увеличение как площади проекции (40 %), так и объема комплексов (74 %). Это согласуется со сродством белка к NCP и способностью связываться с областями входа-выхода ДНК и областью диады нуклеосомы, подобно гистону H1. Вероятно, такое взаимодействие PARP1 с CLP подтверждает её участие в крупномасштабной реорганизации хроматина для регуляции процессов репарации ДНК, транскрипции и поддержания глобальной структуры хроматина.
- 2) PARP2 вызывает преимущественное увеличение объема комплексов, что указывает на её специфическое взаимодействие с гистоновым октамером. Вероятно, отсутствие влияния на компактизацию ДНК / хроматина и преимущественное взаимодействие с гистоновым ядром NCP обеспечивает PARP2:
 - термодинамически выгодное взаимодействие с повреждением или гистонами вследствие отсутствия стерических ограничений, вызванных конденсацией хроматина;
 - участие в обеспечении доступа факторов репарации к повреждениям через PARилирование гистонов в комплексе с HPF1.
- 3) PARP3 проявляет промежуточные эффекты, стабилизируя нуклеосомную организацию и вызывая умеренное увеличение морфометрических параметров. Это может отражать её роль в:

- поддержании стабильности хроматина;
- точечной регуляции структуры нуклеосом;
- ранних этапах ответа на повреждения ДНК с последующим привлечением PARP1/PARP2 к метилированным участкам ДНК для дальнейшего синтеза PAR [126].

Полученные результаты подчеркивают сложную иерархию взаимодействий ДНК-зависимых PARP с хроматином. В то время как PARP1 действует как глобальный регулятор структуры хроматина, PARP2 и PARP3, вероятно, выполняют более специализированные функции, модулируя локальную организацию нуклеосом. Эти различия могут определять их вклад в различные клеточные процессы, включая репарацию ДНК, регуляцию транскрипции и поддержание эпигенетического ландшафта. Дальнейшие исследования должны быть направлены на уточнение молекулярных механизмов выявленных структурных изменений и их функциональных последствий, в частности при каталитической активности этих трёх белков.

4.9. Заключение

Проведённое исследование позволило охарактеризовать роль белков семейства поли(ADP-рибоза)полимераз (**P**oly(**A**DP-**R**ibose)**P**olymerase, PARP): PARP1, PARP2, PARP3 — в регуляции структуры нуклеосом (**N**ucleosome **C**ore **P**article, NCP) и хроматиноподобных частиц (**C**hromatin-**L**ike **P**article, CLP), а также их участие в процессе эксцизионной репарации оснований (**B**ase **E**xcision **R**epair, BER) в нуклеосомном контексте. Использование комплекса методов, включающих атомно-силовую микроскопию (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 продемонстрировала эффективное взаимодействие с областью входа-выхода ДНК в NCP. АСМ-анализ выявил, что 76,5 % молекул PARP1 связываются вблизи этой области. При этом PARP1 не вызывает значительной компактизации нуклеосом (угол раскрытия ДНК оставался в пределах $115^\circ \pm 4^\circ$ против $120^\circ \pm 5^\circ$ в контроле), но стабилизирует их структуру: ширина пика на полувысоте распределения молекул по углу раскрытия меньше приблизительно на 30 %, в сравнении с контрольным образцом. В полинуклеосомных конструкциях PARP1, вероятно, формирует межнуклеосомные контакты через домен-доменные взаимодействия (PARP1•PARP1), что может способствовать объединению соседних NCP (механизм, аналогичный действию белков Polycomb) [273, 276, 277]. Действительно, в нашем случае комплексы CLP с PARP1 обладали более плотной структурой, однако из-за размера PARP1 невозможно детально изучить морфологию комплексов PARP1•CLP, чтобы выявить межнуклеосомные взаимодействия, опосредованные PARP1. PARP1, по-видимому, выступает ключевым инициатором репарационного ответа в нуклеосомном контексте. Как известно, связывание PARP1 с повреждённой ДНК запускает NAD⁺-зависимое поли(ADP-рибозил)ирование (**P**oly(**A**DP-**R**ibosyl)ation, PARилирование), которое:

- индуцирует локальную декомпактизацию нуклеосом и хроматина в целом, облегчая доступ к повреждениям ферментов репарации ДНК;
- привлекает XRCC1 и APE1 через PAR-зависимые взаимодействия.

В отличие от PARP1, 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 CLP, аналогичной контрольному препарату без PARP2. PARP2 активно участвует в процесс BER после появления одноцепочечного разрыва в цепи ДНК и её функции включают:

- регуляцию активности Pol β путём конкуренции за субстрат;
- стимуляцию лигазной активности LigIII α через взаимодействие с XRCC1 в процессе PARилирования.

Интересно, что PARP2 демонстрирует регуляцию лигирования через авто-PARилирование, чего не обнаружено для PARP1. Это позволяет рассматривать PARP2 в качестве ключевого регулятора завершающей стадии процесса BER. PARP2 в комплексе с фактором парилирования гистонов 1 (**H**istone **P**ARylation **F**actor **1**, HPF1) [181] также может способствовать ремоделингу хроматина через PARилирование гистонов, облегчая доступ к повреждениям в плотно упакованных регионах хроматина.

PARP3 проявляет неожиданную способность индуцировать компактизацию нуклеосом: угол раскрытия ДНК уменьшился до $104^\circ \pm 4$ (против $120^\circ \pm 5^\circ$ в контроле), что указывает на формирование более плотных структур. В целом данные, полученные на субстратах CLP, подтверждают участие PARP3 в компактизации хроматина в клетке. Это согласуется с локализацией PARP3 в составе белков группы Polycomb, участвующих в формировании гетерохроматина. Белок PARP3 стабилизирует нуклеосомную организацию и уплотняет структуру CLP. Несмотря на способность взаимодействовать с AP-сайтами, PARP3 проявляет низкое сродство к интермедиатам BER, а именно AP-сайтам и Gap-повреждениям. Однако способность PARP3 уплотнять и стабилизировать NCP может оказывать существенное влияние на активность репарационных белков, но на данный момент этот вопрос остается не исследованным. При массивных повреждениях, которые формируют двуцепочечные разрывы (**D**ouble-**S**trand **B**reak, DSB), PARP3 может обеспечивать стабилизацию хроматина в местах двуцепочечных разрывов, участвуя в пути репарации DSB через негомологичное соединение концов [126, 134, 171]. Обнаруженные в работе эффекты требуют дальнейшего изучения и создают основу для понимания роли PARP3 в хроматин-ассоциированных процессах, включая его активное участие в регуляции транскрипции.

Проведённое исследование впервые сравнивает влияние взаимодействия ДНК-зависимых белков PARP1, PARP2 и PARP3 на структуру нуклеосом и модельных хроматиноподобных частиц. Также впервые была изучена регуляция белками PARP1, PARP2 и реакции PARилирования процесса BER на нуклеосомной структуре, имитирующей кластерное повреждение в ДНК. Дальнейшие исследования должны быть направлены на:

- изучение влияния белков PARP1 и PARP2 в комплексе с HPF1, а также PARP3 на белков-участников системы BER в нуклеосомном контексте;
- изучение влияния HPF1-зависимого ремоделирования нуклеосом на репарационные процессы в контексте хроматина;

- исследование процессов регуляции транскрипции белком PARP3.

Семейство белков PARP представляет собой многофункциональную 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.

5. 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.

6. 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. — P. 411–424.
- [2] Lüscher B., Bütepage M., Ecker L., Krieg S., Verheugd P., Shilton B.H. ADP-Ribosylation, a Multifaceted Posttranslational Modification Involved in the Control of Cell Physiology in Health and Disease // *Chem. Rev.* — 2018. — V. 118. — P. 1092–1136.
- [3] Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C., de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2006. — V. 7. — P. 517–528.
- [4] De Vos M., Schreiber V., Dantzer F. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art // *Biochem. Pharmacol.* — 2012. — V. 84. — P. 137–146.
- [5] Lord C.J., Ashworth A. PARP inhibitors: Synthetic lethality in the clinic // *Science.* — 2017. — V. 355. — P. 1152–1158.
- [6] Boehler C., Gauthier L.R., Mortusewicz O., Biard D.S., Saliou J.M., Bresson A., Sanglier-Cianferani S., Smith S., Schreiber V., Boussin F., Dantzer F. Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2011. — V. 108. — P. 2783–2788.
- [7] Slade D. Mitotic functions of poly(ADP-ribose) polymerases // *Biochem. Pharmacol.* — 2019. — V. 167. — P. 33–43.
- [8] Curtin N.J., Szabo C. Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond // *Mol. Aspects Med.* — 2013. — V. 34. — P. 1217–1256.
- [9] Fong P.C., Boss D.S., Yap T.A., Tutt A., Wu P., Mergui-Roelvink M., Mortimer P., Swaisland H., Lau A., O'Connor M.J., Ashworth A., Carmichael J., Kaye S.B., Schellens J.H., de Bono J.S. Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers // *N. Engl. J. Med.* — 2009. — V. 361. — P. 123–134.
- [10] Mirza M.R., Monk B.J., Herrstedt J., Oza A.M., Mahner S., Redondo A., Fabbro M., Ledermann J.A., Lorusso D., Vergote I., Ben-Baruch N.E., Marth C., Mądry R., Christensen R.D., Berek J.S., Dørum A., Tinker A.V., du Bois A., González-Martín A., Follana P. et al. Niraparib Maintenance Therapy in Platinum-Sensitive, Recurrent Ovarian Cancer // *N. Engl. J. Med.* — 2016. — V. 375. — P. 2154–2164.
- [11] Coleman R.L., Oza A.M., Lorusso D., Aghajanian C., Oaknin A., Dean A., Colombo N., Weberpals J.I., Clamp A., Scambia G., Leary A., Holloway R.W., Gancedo M.A., Fong P.C., Goh J.C., O'Malley D.M., Armstrong D.K., Garcia-Donas J., Swisher E.M., Floquet A. et al. Rucaparib maintenance treatment for recurrent ovarian carcinoma after response to platinum therapy (ARIEL3): a

randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial // *Lancet*. — 2017. — V. 390. — P. 1949–1961.

[12] de Bono J.S., Mehra N., Scagliotti G.V., Castro E., Dorff T., Stirling A., Stenzl A., Fleming M.T., Higoano C.S., Saad F., Buttiglierio C., van Oort I.M., Laird A.D., Mata M., Chen H.C., Healy C.G., Czubere A., Fizazi K. Talazoparib monotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer with DNA repair alterations (TALAPRO-1): an open-label, phase 2 trial // *Lancet Oncol.* — 2021. — V. 22. — P. 1250–1264.

[13] Oudet P., Gross-Bellard M., Chambon P. Electron microscopic and biochemical evidence that chromatin structure is a repeating unit // *Cell*. — 1975. — V. 4. — P. 281–300.

[14] Koyama M., Kurumizaka H. Structural diversity of the nucleosome // *J. Biochem.* — 2018. — V. 163. — P. 85–95.

[15] McGinty R.K., Tan S. Nucleosome structure and function // *Chem. Rev.* — 2015. — V. 115. — P. 2255–2273.

[16] Cutter A.R., Hayes J.J. A brief review of nucleosome structure // *FEBS Lett.* — 2015. — V. 589. — P. 2914–2922.

[17] Kobayashi W., Kurumizaka H. Structural transition of the nucleosome during chromatin remodeling and transcription // *Curr. Opin. Struct. Biol.* — 2019. — V. 59. — P. 107–114.

[18] Beard B.C., Wilson S.H., Smerdon M.J. Suppressed catalytic activity of base excision repair enzymes on rotationally positioned uracil in nucleosomes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2003. — V. 100. — P. 7465–7470.

[19] Hinz J.M., Rodriguez Y., Smerdon M.J. Rotational dynamics of DNA on the nucleosome surface markedly impact accessibility to a DNA repair enzyme // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2010. — V. 107. — P. 4646–4651.

[20] 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 Å resolution // *J. Mol. Biol.* — 2002. — V. 319. — P. 1097–1113.

[21] 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. — P. 251–260.

[22] Hayes J.J., Clark D.J., Wolffe A.P. Histone contributions to the structure of DNA in the nucleosome // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1991. — V. 88. — P. 6829–6833.

[23] Iwasaki W., Miya Y., Horikoshi N., Osakabe A., Taguchi H., Tachiwana H., Shibata T., Kagawa W., Kurumizaka H. Contribution of histone N-terminal tails to the structure and stability of nucleosomes // *FEBS Open Bio*. — 2013. — V. 3. — P. 363–369.

- [24] Schalch T., Duda S., Sargent D.F., Richmond T.J. X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre // *Nature*. — 2005. — V. 436. — P. 138–141.
- [25] Kaczmarczyk A., Allahverdi A., Brouwer T.B., Nordenskiöld L., Dekker N.H., van Noort J. Single-molecule force spectroscopy on histone H4 tail-cross-linked chromatin reveals fiber folding // *J. Biol. Chem.* — 2017. — V. 292. — P. 17506–17513.
- [26] Wei Y., Mizzen C. A., Cook R. G., Gorovsky M. A., & Allis C. D. Phosphorylation of histone H3 at serine 10 is correlated with chromosome condensation during mitosis and meiosis in *Tetrahymena* // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1998. — V. 95. — P. 7480–7484.
- [27] Shogren-Knaak M., Ishii H., Sun J.M., Pazin M.J., Davie J.R., Peterson C.L. Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions // *Science*. — 2006. — V. 311. — P. 844–847.
- [28] Kouzarides T. Chromatin modifications and their function // *Cell*. — 2007. — V. 128. — P. 693–705.
- [29] Stützer A., Liokatis S., Kiesel A., Schwarzer D., Sprangers R., Söding J., Selenko P., Fischle W. Modulations of DNA Contacts by Linker Histones and Post-translational Modifications Determine the Mobility and Modifiability of Nucleosomal H3 Tails // *Mol. Cell*. — 2016. — V. 61. — P. 247–259.
- [30] Hassan A.H., Prochasson P., Neely K.E., Galasinski S.C., Chandy M., Carrozza M.J., Workman J.L. Function and selectivity of bromodomains in anchoring chromatin-modifying complexes to promoter nucleosomes // *Cell*. — 2002. — V. 111. — P. 369–379.
- [31] Sims R.J. 3rd, Chen C.F., Santos-Rosa H., Kouzarides T., Patel S.S., Reinberg D. Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains // *J. Biol. Chem.* — 2005. — V. 280. — P. 41789–41792.
- [32] Bannister A.J., Zegerman P., Partridge J.F., Miska E.A., Thomas J.O., Allshire R.C., Kouzarides T. Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain // *Nature*. — 2001. — V. 410. — P. 120–124.
- [33] Lachner M., O'Carroll D., Rea S., Mechtler K., Jenuwein T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins // *Nature*. — 2001. — V. 410. — P. 116–120.
- [34] Champagne K.S., Kutateladze T.G. Structural insight into histone recognition by the ING PHD fingers // *Curr. Drug Targets*. — 2009. — V. 10. — P. 432–441.
- [35] Hamiche A., Kang J.G., Dennis C., Xiao H., Wu C. Histone tails modulate nucleosome mobility and regulate ATP-dependent nucleosome sliding by NURF // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2001. — V. 98. — P. 14316–14321.

- [36] Simon M., North J.A., Shimko J.C., Forties R.A., Ferdinand M.B., Manohar M., Zhang M., Fishel R., Ottesen J.J., Poirier M.G. Histone fold modifications control nucleosome unwrapping and disassembly // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2011. — V. 108. — P. 12711–12716.
- [37] Maher R.L., Prasad A., Rizvanova O., Wallace S.S., Pederson D.S. Contribution of DNA unwrapping from histone octamers to the repair of oxidatively damaged DNA in nucleosomes // *DNA Repair*. — 2013. — V. 12. — P. 964–971.
- [38] Peng Y., Li S., Onufriev A., Landsman D., Panchenko A.R. Binding of regulatory proteins to nucleosomes is modulated by dynamic histone tails // *Nat. Commun.* — 2021. — V. 12. — P. 5280.
- [39] Armeev G.A., Kniazeva A.S., Komarova G.A., Kirpichnikov M.P., Shaytan A.K. Histone dynamics mediate DNA unwrapping and sliding in nucleosomes // *Nat. Commun.* — 2021. — V. 12. — P. 2387.
- [40] Kniazeva A.S., Armeev G.A., Shaytan A.K. H2A-H2B Histone Dimer Plasticity and Its Functional Implications // *Cells*. — 2022. — V. 11. — P. 2837.
- [41] Huynh M.T., Yadav S.P., Reese J.C., Lee T.H. Nucleosome Dynamics during Transcription Elongation // *ACS Chem. Biol.* — 2020. — V. 15. — P. 3133–3142.
- [42] Kassabov S.R., Zhang B., Persinger J., Bartholomew B. SWI/SNF unwraps, slides, and rewraps the nucleosome // *Mol. Cell*. — 2003. — V. 11. — P. 391–403.
- [43] Park Y.J., Chodaparambil J.V., Bao Y., McBryant S.J., Luger K. Nucleosome assembly protein 1 exchanges histone H2A-H2B dimers and assists nucleosome sliding // *J. Biol. Chem.* — 2005. — V. 280. — P. 1817–1825.
- [44] Rudnizky S., Khamis H., Malik O., Melamed P., Kaplan A. The base pair-scale diffusion of nucleosomes modulates binding of transcription factors // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2019. — V. 116. — P. 12161–12166.
- [45] Díaz-Celis C., Cañari-Chumpitaz C., Sosa R.P., Castillo J.P., Zhang M., Cheng E., Chen A.Q., Vien M., Kim J., Onoa B., Bustamante C. Assignment of structural transitions during mechanical unwrapping of nucleosomes and their disassembly products // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2022. — V. 119. — P. e2206513119.
- [46] Kulić I.M., Schiessel H. Chromatin dynamics: nucleosomes go mobile through twist defects // *Phys. Rev. Lett.* — 2003. — V. 91. — P. 148103.
- [47] Brandani G.B., Niina T., Tan C., Takada S. DNA sliding in nucleosomes via twist defect propagation revealed by molecular simulations // *Nucleic Acids Res.* — 2018. — V. 46. — P. 2788–2801.
- [48] Winger J., Nodelman I.M., Levandosky R.F., Bowman G.D. A twist defect mechanism for ATP-dependent translocation of nucleosomal DNA // *eLife*. — 2018. — V. 7.

- [49] Vlijm R., Smitshuijzen J.S., Lusser A., Dekker C. NAP1-assisted nucleosome assembly on DNA measured in real time by single-molecule magnetic tweezers // *PLoS ONE*. — 2012. — V. 7. — P. e46306.
- [50] Ordu O., Lusser A., Dekker N.H. DNA Sequence Is a Major Determinant of Tetrasome Dynamics // *Biophys. J.* — 2019. — V. 117. — P. 2217–2227.
- [51] Kaczmarczyk A., Meng H., Ordu O., Noort J.V., Dekker N.H. Chromatin fibers stabilize nucleosomes under torsional stress // *Nat. Commun.* — 2020. — V. 11. — P. 126.
- [52] Koopmans W. J., Buning R., Schmidt T., van Noort J. spFRET using alternating excitation and FCS reveals progressive DNA unwrapping in nucleosomes // *Biophys. J.* — 2009. — V. 97. — P. 195–204.
- [53] Böhm V., Hieb A. R., Andrews A. J., Gansen A., Rocker A., Tóth K., Luger K., Langowski J. Nucleosome accessibility governed by the dimer/tetramer interface // *Nucleic Acids Res.* — 2011. — V. 39. — P. 3093–3102.
- [54] North J. A., Shimko J. C., Javaid S., Mooney A. M., Shoffner M. A., Rose S. D., Bundschuh R., Fishel R., Ottesen J. J., Poirier M. G. Regulation of the nucleosome unwrapping rate controls DNA accessibility // *Nucleic Acids Res.* — 2012. — V. 40. — P. 10215–10227.
- [55] Kruithof M., Chien F. T., Routh A., Logie C., Rhodes D., van Noort J. Single-molecule force spectroscopy reveals a highly compliant helical folding for the 30-nm chromatin fiber // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2009. — V. 16. — P. 534–540.
- [56] Li W., Chen P., Yu J., Dong L., Liang D., Feng J., Yan J., Wang P. Y., Li Q., Zhang Z., Li M., Li G. FACT Remodels the Tetranucleosomal Unit of Chromatin Fibers for Gene Transcription // *Mol. Cell.* — 2016. — V. 64. — P. 120–133.
- [57] Lin X., Zhang B. Explicit ion modeling predicts physicochemical interactions for chromatin organization // *eLife*. — 2024. — V. 12.
- [58] Cui Y., Bustamante, C. Pulling a single chromatin fiber reveals the forces that maintain its higher-order structure // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2000. — V. 97. — P. 127–132.
- [59] Kilic S., Felekyan S., Doroshenko O., Boichenko I., Dimura M., Vardanyan H., Bryan L. C., Arya G., Seidel C. A. M., Fierz B. Single-molecule FRET reveals multiscale chromatin dynamics modulated by HP1 α // *Nat. Commun.* — 2018. — V. 9.
- [60] Imre L., Niaki E.F., Bosire R., Nanasi P., Jr Nagy P., Bacso Z., Hamidova N., Pommier Y., Jordan A., Szabo G. Nucleosome destabilization by polyamines // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2022. — V. 722.
- [61] Benning N.A., Kæstel-Hansen J., Rashid F., Park S., Merino Urteaga R., Liao T.W., Hao J., Berger J.M., Hatzakis N.S., Ha T. Dimensional Reduction for Single-Molecule Imaging of DNA and

Nucleosome Condensation by Polyamines, HP1 α and Ki-67 // *J. Phys. Chem. B.* — 2023. — V. 127. — P. 1922–1931.

[62] Gebala M., Johnson S.L., Narlikar G.J., Herschlag D. Ion counting demonstrates a high electrostatic field generated by the nucleosome // *eLife.* — 2019. — V. 8.

[63] 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. — P. 19–42.

[64] Ngo T.T., Zhang Q., Zhou R., Yodh J.G., Ha T. Asymmetric unwrapping of nucleosomes under tension directed by DNA local flexibility // *Cell.* — 2015. — V. 160. — P. 1135–1144.

[65] Vafabakhsh R., Ha T. Extreme bendability of DNA less than 100 base pairs long revealed by single-molecule cyclization // *Science.* — 2012. — V. 337. — P. 1097–1101.

[66] Lindahl T., Nyberg B. Rate of depurination of native deoxyribonucleic acid // *Biochemistry.* — 1972. — V. 11(19). — P. 3610–3618.

[67] Lindahl T. Instability and decay of the primary structure of DNA // *Nature.* — 1993. — V. 362(6422). — P. 709–715.

[68] Hegde M.L., Hazra T.K., Mitra S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells // *Cell Res.* — 2008. — V. 18(1). — P. 27–47.

[69] Svilar D., Goellner E.M., Almeida K.H., Sobol R.W. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage // *Antioxid. Redox Signal.* — 2011. — V. 14(12). — P. 2491–2507.

[70] Barnes R.P., Fouquerel E., Opresko P.L. The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis // *Mech. Ageing Dev.* — 2019. — V. 177. — P. 37–45.

[71] De Rosa M., Johnson S.A., Opresko P.L. Roles for the 8-Oxoguanine DNA Repair System in Protecting Telomeres From Oxidative Stress // *Front. Cell Dev. Biol.* — 2021. — V. 9.

[72] Swenberg J.A., Lu K., Moeller B.C., Gao L., Upton P.B., Nakamura J., Starr T.B. Endogenous versus exogenous DNA adducts: their role in carcinogenesis, epidemiology, and risk assessment // *Toxicol. Sci.* — 2011. — V. 120(Suppl 1). — P. 130–145.

[73] Rahimoff R., Kosmatchev O., Kirchner A., Pfaffeneder T., Spada F., Brantl V., Müller M., Carell T. 5-Formyl- and 5-Carboxydeoxycytidines Do Not Cause Accumulation of Harmful Repair Intermediates in Stem Cells // *J. Am. Chem. Soc.* — 2017. — V. 139(30). — P. 10359–10364.

[74] Birben E., Sahiner U.M., Sackesen C., Erzurum S., Kalayci O. Oxidative stress and antioxidant defense // *World Allergy Organ. J.* — 2012. — V. 5(1). — P. 9–19.

[75] Boiteux S., Guillet M. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae* // *DNA Repair.* — 2004. — V. 3(1). — P. 1–12.

- [76] Fleming A.M., Zhu J., Ding Y., Burrows C.J. 8-Oxo-7,8-dihydroguanine in the Context of a Gene Promoter G-Quadruplex Is an On-Off Switch for Transcription // *ACS Chem. Biol.* — 2017. — V. 12(9). — P. 2417–2426.
- [77] Hatahet Z., Zhou M., Reha-Krantz L.J., Ide H., Morrical S.W., Wallace S.S. In vitro selection of sequence contexts which enhance bypass of abasic sites and tetrahydrofuran by T4 DNA polymerase holoenzyme // *J. Mol. Biol.* — 1999. — V. 286(4). — P. 1045–1057.
- [78] Tornaletti S., Maeda L.S., Kolodner R.D., Hanawalt P.C. Effect of 8-oxoguanine on transcription elongation by T7 RNA polymerase and mammalian RNA polymerase II // *DNA Repair.* — 2004. — V. 3(5). — P. 483–494.
- [79] Tornaletti S., Maeda L.S., Hanawalt P.C. Transcription arrest at an abasic site in the transcribed strand of template DNA // *Chem. Res. Toxicol.* — 2006. — V. 19(9). — P. 1215–1220.
- [80] Szczepanski J.T., Wong R.S., McKnight J.N., Bowman G.D., Greenberg M.M. Rapid DNA-protein cross-linking and strand scission by an abasic site in a nucleosome core particle // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2010. — V. 107(52). — P. 22475–22480.
- [81] Sedletska Y., Radicella J.P., Sage E. Replication fork collapse is a major cause of the high mutation frequency at three-base lesion clusters // *Nucleic Acids Res.* — 2013. — V. 41(20). — P. 9339–9348.
- [82] Zhou C., Szczepanski J.T., Greenberg M.M. Mechanistic studies on histone catalyzed cleavage of apyrimidinic/apurinic sites in nucleosome core particles // *J. Am. Chem. Soc.* — 2012. — V. 134(40). — P. 16734–16741.
- [83] Ren M., Bai J., Xi Z., Zhou C. DNA damage in nucleosomes // *Sci. China Chem.* — 2019. — V. 62. — P. 561–570.
- [84] Nilsen H., Lindahl T., Verreault A. DNA base excision repair of uracil residues in reconstituted nucleosome core particles // *EMBO J.* — 2002. — V. 21(21). — P. 5943–5952.
- [85] Yang K., Greenberg M.M. Enhanced Cleavage at Abasic Sites within Clustered Lesions in Nucleosome Core Particles // *ChemBioChem.* — 2018. — V. 19(19). — P. 2061–2065.
- [86] Bowman G.D., Poirier M.G. Post-translational modifications of histones that influence nucleosome dynamics // *Chem. Rev.* — 2015. — V. 115(6). — P. 2274–2295.
- [87] Pachva M.C., Kisselev A.F., Matkarimov B.T., Sapparbaev M., Groisman R. DNA-Histone Cross-Links: Formation and Repair // *Front. Cell Dev. Biol.* — 2020. — V. 8. — P. 607045.
- [88] Zhitkovich A., Costa M. A simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and in vivo // *Carcinogenesis.* — 1992. — V. 13(8). — P. 1485–1489.
- [89] Tretyakova N.Y., Groehler A., IVth, Ji S. DNA-Protein Cross-Links: Formation, Structural Identities, and Biological Outcomes // *Acc. Chem. Res.* — 2015. — V. 48(6). — P. 1631–1644.

- [90] Yang K., Greenberg M.M. DNA-Protein Cross-Link Formation in Nucleosome Core Particles Treated with Methyl Methanesulfonate // *Chem. Res. Toxicol.* — 2019. — V. 32(10). — P. 2144–2151.
- [91] Hauer M.H., Gasser S.M. Chromatin and nucleosome dynamics in DNA damage and repair // *Genes Dev.* — 2017. — V. 31(22). — P. 2204–2221.
- [92] Stinglee J., Bellelli R., Boulton S.J. Mechanisms of DNA-protein crosslink repair // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2017. — V. 18(9). — P. 563–573.
- [93] Chatterjee N., Walker G.C. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis // *Environ. Mol. Mutagen.* — 2017. — V. 58(5). — P. 235–263.
- [94] Schumacher B., Pothof J., Vijg J., Hoeijmakers J.H.J. The central role of DNA damage in the ageing process // *Nature.* — 2021. — V. 592(7856). — P. 695–703.
- [95] Krokan H.E., Bjørås M. Base excision repair // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* — 2013. — V. 5(4).
- [96] Marteijn J.A., Lans H., Vermeulen W., Hoeijmakers J.H. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* — 2014. — V. 15(7). — P. 465–481.
- [97] Iyama T., Wilson D.M., IIIrd DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells // *DNA Repair.* — 2013. — V. 12(8). — P. 620–636.
- [98] Caldecott K.W. Single-strand break repair and genetic disease // *Nat. Rev. Genet.* — 2008. — V. 9(8). — P. 619–631.
- [99] Ceccaldi R., Rondinelli B., D'Andrea A.D. Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break // *Trends Cell Biol.* — 2016. — V. 26(1). — P. 52–64.
- [100] Lindahl T. An N-glycosidase from *Escherichia coli* that releases free uracil from DNA containing deaminated cytosine residues // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1974. — V. 71(9). — P. 3649–3653.
- [101] 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.
- [102] Fortini P., Dogliotti E. Base damage and single-strand break repair: mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways // *DNA Repair.* — 2007. — V. 6(4). — P. 398–409.
- [103] McBryant S.J., Adams V.H., Hansen J.C. Chromatin architectural proteins // *Chromosome Res.* — 2006. — V. 14(1). — P. 39–51.
- [104] Zhang P., Torres K., Liu X., Liu C.G., Pollock R.E. An Overview of Chromatin-Regulating Proteins in Cells // *Curr. Protein Pept. Sci.* — 2016. — V. 17(5). — P. 401–410.

- [105] Kutuzov M.M., Belousova E.A., Ilina E.S., Lavrik O.I. Impact of PARP1, PARP2 & PARP3 on the Base Excision Repair of Nucleosomal DNA // *Adv. Exp. Med. Biol.* — 2020. — V. 1241. — P. 47–57.
- [106] Olmon E.D., Delaney S. Differential Ability of Five DNA Glycosylases to Recognize and Repair Damage on Nucleosomal DNA // *ACS Chem. Biol.* — 2017. — V. 12(3). — P. 692–701.
- [107] 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(4). — P. 2876–2885.
- [108] Rodriguez Y., Smerdon M.J. The structural location of DNA lesions in nucleosome core particles determines accessibility by base excision repair enzymes // *J. Biol. Chem.* — 2013. — V. 288(19). — P. 13863–13875.
- [109] Weaver T.M., Hoitsma N.M., Spencer J.J., Gakhar L., Schnicker N.J., Freudenthal B.D. Structural basis for APE1 processing DNA damage in the nucleosome // *Nat. Commun.* — 2022. — V. 13(1). — P. 5390.
- [110] Hinz J.M. Impact of abasic site orientation within nucleosomes on human APE1 endonuclease activity // *Mutat. Res.* — 2014. — V. 766-767. — P. 19–24.
- [111] Caldecott K.W. XRCC1 protein; Form and function // *DNA Repair.* — 2019. — V. 81. — Art. 102664.
- [112] Odell I.D., Barbour J.E., Murphy D.L., Della-Maria J.A., Sweasy J.B., Tomkinson A.E., Wallace S.S., Pederson D.S. Nucleosome disruption by DNA ligase III-XRCC1 promotes efficient base excision repair // *Mol. Cell. Biol.* — 2011. — V. 31(22). — P. 4623–4632.
- [113] Cannan W.J., Rashid I., Tomkinson A.E., Wallace S.S., Pederson D.S. The Human Ligase III α -XRCC1 Protein Complex Performs DNA Nick Repair after Transient Unwrapping of Nucleosomal DNA // *J. Biol. Chem.* — 2017. — V. 292(13). — P. 5227–5238.
- [114] Caldecott K.W., McKeown C.K., Tucker J.D., Ljungquist S., Thompson L.H. An interaction between the mammalian DNA repair protein XRCC1 and DNA ligase III // *Mol. Cell. Biol.* — 1994. — V. 14(1). — P. 68–76.
- [115] Caldecott K.W., Tucker J.D., Stanker L.H., Thompson L.H. Characterization of the XRCC1-DNA ligase III complex in vitro and its absence from mutant hamster cells // *Nucleic Acids Res.* — 1995. — V. 23(23). — P. 4836–4843.
- [116] 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(12). — P. 6009–6022.

- [117] 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(3). — P. 297–305.
- [118] Hanzlikova H., Gittens W., Krejcikova 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(5). — P. 2546–2557.
- [119] Posavec Marjanović M., Crawford K., Ahel I. PARP, transcription and chromatin modeling // *Semin. Cell Dev. Biol.* — 2017. — V. 63. — P. 102–113.
- [120] Andronikou C., Rottenberg S. Studying PAR-Dependent Chromatin Remodeling to Tackle PARPi Resistance // *Trends Mol. Med.* — 2021. — V. 27(7). — P. 630–642.
- [121] Jeggo P.A. DNA repair: PARP - another guardian angel? // *Curr. Biol.* — 1998. — V. 8(2). — P. R49–R51.
- [122] D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G.G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions // *Biochem. J.* — 1999. — V. 342(Pt 2). — P. 249–268.
- [123] Nguewa P.A., Fuertes M.A., Valladares B., Alonso C., Pérez J.M. Poly(ADP-ribose) polymerases: homology, structural domains and functions. Novel therapeutical applications // *Prog. Biophys. Mol. Biol.* — 2005. — V. 88(1). — P. 143–172.
- [124] Talhaoui I., Lebedeva N.A., Zarkovic G., Saint-Pierre C., Kutuzov M.M., Sukhanova M.V., Matkarimov B.T., Gasparutto D., Saparbaev M.K., Lavrik O.I., Ishchenko A.A. Poly(ADP-ribose) polymerases covalently modify strand break termini in DNA fragments in vitro // *Nucleic Acids Res.* — 2016. — V. 44(19). — P. 9279–9295.
- [125] Kumar C., Rani N., Velan Lakshmi P.T., Arunachalam A. A comprehensive look of poly(ADP-ribose) polymerase inhibition strategies and future directions for cancer therapy // *Future Med. Chem.* — 2017. — V. 9(1). — P. 37–60.
- [126] Belousova E.A., Ishchenko A.A., Lavrik O.I. Dna is a New Target of Parp3 // *Sci. Rep.* — 2018. — V. 8(1).
- [127] Zarkovic G., Belousova E.A., Talhaoui I., Saint-Pierre C., Kutuzov M.M., Matkarimov B.T., Biard D., Gasparutto D., Lavrik O.I., Ishchenko A.A. Characterization of DNA ADP-ribosyltransferase activities of PARP2 and PARP3: new insights into DNA ADP-ribosylation // *Nucleic Acids Res.* — 2018. — V. 46(5). — P. 2417–2431.
- [128] 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(25). — P. 23028–23036.

- [129] de Murcia G., Jacobson M., Shall S. Regulation by ADP-ribosylation // *Trends Cell Biol.* — 1995. — V. 5(2). — P. 78–81.
- [130] Isabelle M., Moreel X., Gagné J.P., Rouleau M., Ethier C., Gagné P., Hendzel M.J., Poirier G.G. Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry // *Proteome Sci.* — 2010. — V. 8.
- [131] Vyas S., Chesarone-Cataldo M., Todorova T., Huang Y.H., Chang P. A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology // *Nat. Commun.* — 2013. — V. 4. — Art. 2240.
- [132] Wu H., Lu A., Yuan J., Yu Y., Lv C., Lu J. Mono-ADP-ribosylation, a MARYlationmultifaced modification of protein, DNA and RNA: characterizations, functions and mechanisms // *Cell Death Discov.* — 2024. — V. 10(1).
- [133] Beck C., Robert I., Reina-San-Martin B., Schreiber V., Dantzer F. Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3 // *Exp. Cell Res.* — 2014. — V. 329(1). — P. 18–25.
- [134] Rouleau M., McDonald D., Gagné P., Ouellet M.E., Droit A., Hunter J.M., Dutertre S., Prigent C., Hendzel M.J., Poirier G.G. PARP-3 associates with polycomb group bodies and with components of the DNA damage repair machinery // *J. Cell. Biochem.* — 2007. — V. 100(2). — P. 385–401.
- [135] van Beek L., McClay É., Patel S., Schimpl M., Spagnolo L., Maia de Oliveira T. PARP Power: A Structural Perspective on PARP1, PARP2, and PARP3 in DNA Damage Repair and Nucleosome Remodelling // *Int. J. Mol. Sci.* — 2021. — V. 22(10).
- [136] 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(6082). — P. 728–732.
- [137] Langelier M.F., Servent K.M., Rogers E.E., Pascal J.M. A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation // *J. Biol. Chem.* — 2008. — V. 283(7). — P. 4105–4114.
- [138] Ali A.A.E., Timinszky G., Arribas-Bosacoma R., Kozłowski M., Hassa P.O., Hassler M., Ladurner A.G., Pearl L.H., Oliver A.W. The zinc-finger domains of PARP1 cooperate to recognize DNA strand breaks // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2012. — V. 19(7). — P. 685–692.
- [139] 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(24). — P. 4994–5006.e5.
- [140] 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(11). — P. 3723–3738.

- [141] Hakmé A., Wong H.K., Dantzer F., Schreiber V. The expanding field of poly(ADP-ribosylation) reactions // *EMBO Rep.* — 2008. — V. 9(11). — P. 1094–1100.
- [142] Alesmasova E.E., Lavrik O.I. Poly(ADP-ribosylation) by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins // *Nucleic Acids Res.* — 2019. — V. 47(8). — P. 3811–3827.
- [143] 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 // *J. Biol. Chem.* — 2011. — V. 286(12). — P. 10690–10701.
- [144] 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(1). — P. 149–170.
- [145] Rudolph J., Mahadevan J., Dyer P., Luger K. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 searches DNA via a 'monkey bar' mechanism // *eLife.* — 2018. — V. 7. — Art. e37818.
- [146] 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(5). — P. 755–768.
- [147] Zandarashvili L., Langelier M.F., Velagapudi U.K., Hancock M.A., Steffen J.D., Billur R., Hannan Z.M., Wicks A.J., Krastev D.B., Pettitt S.J., Lord C.J., Talele T.T., Pascal J.M., Black B.E. Structural basis for allosteric PARP-1 retention on DNA breaks // *Science.* — 2020. — V. 368(6486).
- [148] Eustermann S., Wu W.F., Langelier M.F., Yang J.C., Easton L.E., Riccio A.A., Pascal J.M., Neuhaus D. Structural Basis of Detection and Signaling of DNA Single-Strand Breaks by Human PARP-1 // *Mol. Cell.* — 2015. — V. 60(5). — P. 742–754.
- [149] 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(12). — P. 7762–7775.
- [150] Bilokapic S., Suskiewicz M.J., Ahel I., Halic M. Bridging of DNA breaks activates PARP2-HPF1 to modify chromatin // *Nature.* — 2020. — V. 585(7826). — P. 609–613.
- [151] 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(4). — P. 1691–1702.
- [152] 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(1).
- [153] Lehtiö L., Jemth A.S., Collins R., Loseva O., Johansson A., Markova N., Hammarström M., Flores A., Holmberg-Schiavone L., Weigelt J., Helleday T., Schüler H., Karlberg T. Structural basis for

- inhibitor specificity in human poly(ADP-ribose) polymerase-3 // *J. Med. Chem.* — 2009. — V. 52(9). — P. 3108–3111.
- [154] Pommier Y., O'Connor M. J., De Bono J. Laying a trap to kill cancer cells: PARP inhibitors and their mechanisms of action // *Science translational medicine.* — 2016. — V. 8(362).
- [155] Beneke S. Regulation of chromatin structure by poly(ADP-ribosylation) // *Front. Genet.* — 2012. — V. 3.
- [156] Chang P., Jacobson M.K., Mitchison T.J. Poly(ADP-ribose) is required for spindle assembly and structure // *Nature.* — 2004. — V. 432(7017). — P. 645–649.
- [157] 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(1).
- [158] 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.* — 2004. — V. 3(6). — P. 581–591.
- [159] 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. Sci. U.S.A.* — 2010. — V. 107(51). — P. 22090–22095.
- [160] 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(1-2). — P. 80–89.
- [161] 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.* — 2016. — V. 44(6).
- [162] 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(15). — P. 2655–2673.
- [163] Miwa M., Saitô H., Sakura H., Saikawa N., Watanabe F., Matsushima T., Sugimura T. A ¹³C NMR study of poly(adenosine diphosphate ribose) and its monomers // *Nucleic Acids Res.* — 1977. — V. 4(11). — P. 3997–4005.
- [164] Miwa M., Ishihara M., Takishima S., Takasuka N., Maeda M., Yamaizumi Z., Sugimura T., Yokoyama S., Miyazawa T. The branching and linear portions of poly(adenosine diphosphate ribose) have the same alpha(1 leads to 2) ribose-ribose linkage // *J. Biol. Chem.* — 1981. — V. 256(6). — P. 2916–2921.

- [165] Wang J., Wang Z.Q., Zong W. ADP-ribose hydrolases: biological functions and potential therapeutic targets // *Expert Rev. Mol. Med.* — 2024. — V. 26.
- [166] Oka S., Kato J., Moss J. Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase // *J. Biol. Chem.* — 2006. — V. 281(2). — P. 705–713.
- [167] 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(7366). — P. 616–620.
- [168] 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(6). — P. 1208–1215.
- [169] Yélamos J., Schreiber V., Dantzer F. Toward specific functions of poly(ADP-ribose) polymerase-2 // *Trends Mol. Med.* — 2008. — V. 14(4). — P. 169–178.
- [170] Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Schreiber V., Lavrik O.I. The role of PARP2 in DNA repair // *Mol. Biol. (Mosk.)*. — 2014. — V. 48(4). — P. 561–572.
- [171] Rulten S.L., Fisher A.E., Robert I., Zuma M.C., Rouleau M., Ju L., Poirier G., Reina-San-Martin B., Caldecott K.W. PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining // *Mol. Cell*. — 2011. — V. 41(1). — P. 33–45.
- [172] Grundy G.J., Polo L.M., Zeng Z., Rulten S.L., Hoch N.C., Paomephan P., Xu Y., Sweet S.M., Thorne A.W., Oliver A.W., Matthews S.J., Pearl L.H., Caldecott K.W. PARP3 is a sensor of nicked nucleosomes and monoribosylates histone H2B(Glu2) // *Nat. Commun.* — 2016. — V. 7.
- [173] Pinnola A., Naumova N., Shah M., Tulin A.V. Nucleosomal core histones mediate dynamic regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 protein binding to chromatin and induction of its enzymatic activity // *J. Biol. Chem.* — 2007. — V. 282(44). — P. 32511–32519.
- [174] Poirier G. G., de Murcia G., Jongstra-Bilen J., Niedergang C., Mandel P. Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1982. — V. 79(11). — P. 3423–3427.
- [175] Kotova E., Lodhi N., Jarnik M., Pinnola A.D., Ji Y., Tulin A.V. Drosophila histone H2A variant (H2Av) controls poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) activation in chromatin // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2011. — V. 108(15). — P. 6205–6210.
- [176] 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(19). — P. 6350–6362.

- [177] 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(5). — P. 932–940.
- [178] Longarini E. J., Matic I. The fast-growing business of Serine ADP-ribosylation // *DNA Repair.* — 2022. — V. 118.
- [179] 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(39). — P. 32430–32439.
- [180] Sultanov D.C., Gerasimova N.S., Kudryashova K.S., Maluchenko N.V., Kotova E.Y., Langelier M.F., Pascal J.M., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Studitsky V.M. Unfolding of core nucleosomes by PARP-1 revealed by spFRET microscopy // *AIMS Genet.* — 2017. — V. 4(1). — P. 21–31.
- [181] 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.
- [182] 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(11).
- [183] Loseva O., Jemth A. S., Bryant H. E., Schüler H., Lehtiö L., Karlberg T., Helleday T. PARP-3 is a mono-ADP-ribosylase that activates PARP-1 in the absence of DNA // *J. Biol. Chem.* — 2010. — V. 285(11). — P. 8054–8060.
- [184] Augustin A., Spenlehauer C., Dumond H., Ménissier-De Murcia J., Piel M., Schmit A. C., Apiou F., Vonesch J. L., Kock M., Bornens M., De Murcia G. PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression // *J. Cell Sci.* — 2003. — V. 116(Pt 8). — P. 1551–1562.
- [185] Robison A.D., Finkelstein I.J. High-throughput single-molecule studies of protein-DNA interactions // *FEBS Lett.* — 2014. — V. 588(19). — P. 3539–3546.
- [186] Teif V.B., Cherstvy A.G. Chromatin and epigenetics: current biophysical views // *AIMS Biophys.* — 2016. — V. 3(1). — P. 88–98.
- [187] Fierz B., Poirier M.G. Biophysics of chromatin dynamics // *Annu. Rev. Biophys.* — 2019. — V. 48. — P. 321–345.
- [188] Lyubchenko Y.L. Preparation of DNA and nucleoprotein samples for AFM imaging // *Micron.* — 2011. — V. 42(2). — P. 196–206.
- [189] Bustamante C., Vesenka J., Tang C. L., Rees W., Guthold M., Keller R. Circular DNA molecules imaged in air by scanning force microscopy // *Biochemistry.* — 1992. — V. 31. — P. 22–26.

- [190] Hansma H.G., Vesenka J., Siegerist C., Kelderman G., Morrett H., Sinsheimer R. L., Elings V., Bustamante C., Hansma, P. K. Reproducible imaging and dissection of plasmid DNA under liquid with the atomic force microscope // *Science*. — 1992. — V. 256. — P. 1180–1184.
- [191] Davies E., Teng K.S., Conlan R.S., Wilks S.P. Ultra-high resolution imaging of DNA and nucleosomes using non-contact atomic force microscopy // *FEBS Lett.* — 2005. — V. 579(7). — P. 1702–1706.
- [192] Zhong Q., Inness D., Kjoller K., Elings V.B. Fractured polymer/silica fiber surface studied by tapping mode atomic force microscopy // *Surf. Sci. Lett.* — 1993. — V. 290(1-2). — P. 688–692.
- [193] Lindsay S.M., Nagahara L.A., Thundat T., Knipping U., Rill R. L., Drake B., Prater C. B., Weisenhorn A. L., Gould S. A., Hansma P. K. STM and AFM images of nucleosome DNA under water // *J. Biomol. Struct. Dyn.* — 1989. — V. 7(2). — P. 279–287.
- [194] Liu Z., Li Z., Zhou H., Wei G., Song Y., Wang L. Imaging DNA molecules on mica surface by atomic force microscopy in air and in liquid // *Microsc. Res. Tech.* — 2005. — V. 66(4). — P. 179–185.
- [195] Lyubchenko Y.L. Nanoscale Nucleosome Dynamics Assessed with Time-lapse AFM // *Biophys. Rev.* — 2014. — V. 6(2). — P. 181–190.
- [196] Konrad S.F., Vanderlinden W., Lipfert J. Quantifying epigenetic modulation of nucleosome breathing by high-throughput AFM imaging // *Biophys. J.* — 2022. — V. 121(5). — P. 841–851.
- [197] Medalia O., Englander J., Guckenberger R., Sperling J. AFM imaging in solution of protein-DNA complexes formed on DNA anchored to a gold surface // *Ultramicroscopy*. — 2001. — V. 90(2-3). — P. 103–112.
- [198] Cordeiro A.L., Zschoche S., Janke A, Nitschke M., Werner C. Functionalization of poly(dimethylsiloxane) surfaces with maleic anhydride copolymer films // *Langmuir*. — 2009. — V. 25(3). — P. 1509–1517.
- [199] Protopopova A.D., Barinov N.A., Zavyalova E.G., Kopylov A. M., Sergienko V. I., Klinov D. V. Visualization of fibrinogen α C regions and their arrangement during fibrin network formation by high-resolution AFM // *J. Thromb. Haemost.* — 2015. — V. 13(4). — P. 570–579.
- [200] Rahman M., Boggs Z., Neff D., Norton M. The Sapphire (0001) Surface: A Transparent and Ultraflat Substrate for DNA Nanostructure Imaging // *Langmuir*. — 2018. — V. 34(49). — P. 15014–15020.
- [201] Maslova M.V., Gerasimova L.G., Forsling W. Surface Properties of Cleaved Mica // *Colloid J.* — 2004. — V. 66. — P. 322–328.
- [202] Franceschi G., Kocán P., Conti A., Brandstetter S., Balajka J., Sokolović I., Valtiner M., Mittendorfer F., Schmid M., Setvín M., Diebold U. Resolving the intrinsic short-range ordering of K⁺ ions on cleaved muscovite mica // *Nat. Commun.* — 2023. — V. 14. — Art. 208.

- [203] Christenson H.K., Thomson N.H. The nature of the air-cleaved mica surface // *Surf. Sci. Rep.* — 2016. — V. 71(2). — P. 367–390.
- [204] Sorel I., Piétrement O., Hamon L., Bacconnais S., Cam E. L., Pastré D. The EcoRI-DNA complex as a model for investigating protein-DNA interactions by atomic force microscopy // *Biochemistry.* — 2006. — V. 45(49). — P. 14675–14682.
- [205] Thundat T., Allison D.P., Warmack R.J., Brown G. M., Jacobson K. B., Schrick J. J., Ferrell T. L. Atomic force microscopy of DNA on mica and chemically modified mica // *Scanning Microsc.* — 1992. — V. 6(4). — P. 911–918.
- [206] Vesenka J., Guthold M., Tang C.L., Keller D., Delaine E., Bustamante C. Substrate preparation for reliable imaging of DNA molecules with the scanning force microscope // *Ultramicroscopy.* — 1992. — V. 42-44(Pt B). — P. 1243–1249.
- [207] Ellis J.S., Abdelhady H.G., Allen S., Davies M. C., Roberts C. J., Tendler S. J., Williams P. M. Direct atomic force microscopy observations of monovalent ion induced binding of DNA to mica // *J. Microsc.* — 2004. — V. 215(Pt 3). — P. 297–301.
- [208] Pastré D., Hamon L., Landousy F., Sorel I., David M. O., Zozime A., Le Cam E., Piétrement O. Anionic polyelectrolyte adsorption on mica mediated by multivalent cations: a solution to DNA imaging by atomic force microscopy under high ionic strengths. // *Langmuir.* — 2006. — V. 22(15). — P. 6651–6660.
- [209] Arscott P.G., Li A.Z., Bloomfield V.A. Condensation of DNA by trivalent cations. 1. Effects of DNA length and topology on the size and shape of condensed particles // *Biopolymers.* — 1990. — V. 30(5-6). — P. 619–630.
- [210] Bloomfield V.A. DNA condensation by multivalent cations // *Biopolymers.* — 1997. — V. 44(3). — P. 269–282.
- [211] Zheng J., Li Z., Wu A., Zhou H. AFM studies of DNA structures on mica in the presence of alkaline earth metal ions // *Biophys. Chem.* — 2003. — V. 104(1). — P. 37–43.
- [212] Hansma H.G., Laney D.E. DNA binding to mica correlates with cationic radius: assay by atomic force microscopy // *Biophys. J.* — 1996. — V. 70(4). — P. 1933–1939.
- [213] Pyne A.L.B., Hoogenboom B.W. Imaging DNA Structure by Atomic Force Microscopy // *Methods Mol. Biol.* — 2016. — V. 1431. — P. 47–60.
- [214] Xin Y., Zargariantabrizi A.A., Grundmeier G., Keller A. Magnesium-Free Immobilization of DNA Origami Nanostructures at Mica Surfaces for Atomic Force Microscopy // *Molecules.* — 2021. — V. 26(16).
- [215] de Frutos M., Raspaud E., Leforestier A., Livolant F. Aggregation of nucleosomes by divalent cations // *Biophys. J.* — 2001. — V. 81(2). — P. 1127–1132.

- [216] Pastré D., Hamon L., Sorel I., Le Cam E., Curmi P.A., Piétrement O. Specific DNA-protein interactions on mica investigated by atomic force microscopy // *Langmuir*. — 2010. — V. 26(4). — P. 2618–2623.
- [217] Lindsay S.M., Lyubchenko Y.L., Gall A.S., Shlyakhtenko L. S., Harrington R. E. Imaging DNA molecules chemically bound to a mica surface // *SPIE*. — 1992. — V. 1639. — P. 84–90.
- [218] Lyubchenko Y.L., Gall A.A., Shlyakhtenko L.S., Harrington R.E., Harrington R.E., Jacobs B.L., Oden P.I., Lindsay S.M. Atomic force microscopy imaging of double stranded DNA and RNA // *J. Biomol. Struct. Dyn.* — 1992. — V. 10(3). — P. 589–606.
- [219] Shlyakhtenko L.S., Gall A.A., Weimer J.J., Hawn D.D., Lyubchenko Y.L. Atomic force microscopy imaging of DNA covalently immobilized on a functionalized mica substrate // *Biophys. J.* — 1999. — V. 77(1). — P. 568–576.
- [220] Valle F., Favre M., De Los Rios P., Rosa A., Dietler G. Scaling exponents and probability distributions of DNA end-to-end distance // *Phys. Rev. Lett.* — 2005. — V. 95(15).
- [221] Rivetti C., Guthold M., Bustamante C. Scanning force microscopy of DNA deposited onto mica: equilibration versus kinetic trapping studied by statistical polymer chain analysis // *J. Mol. Biol.* — 1996. — V. 264(5). — P. 919–932.
- [222] Vanderlinden W., De Feyter S. Chain relaxation dynamics of DNA adsorbing at a solid-liquid interface // *Nanoscale*. — 2013. — V. 5(6). — P. 2264–2268.
- [223] Horňáková V., Příbyl J., Skládal P. Study of DNA immobilization on mica surface by atomic force microscopy // *Monatsh. Chem.* — 2016. — V. 147(5). — P. 865–871.
- [224] Shlyakhtenko L.S., Gall A.A., Filonov A., Cerovac Z., Lushnikov A., Lyubchenko Y.L. Silatrane-based surface chemistry for immobilization of DNA, protein-DNA complexes and other biological materials // *Ultramicroscopy*. — 2003. — V. 97(1-4). — P. 279–287.
- [225] Shlyakhtenko L.S., Gall A.A., Lyubchenko Y.L. Mica functionalization for imaging of DNA and protein-DNA complexes with atomic force microscopy // *Methods Mol Biol.* — 2013. — V. 931. — P. 295–312
- [226] Lyubchenko Y.L., Shlyakhtenko L.S. Imaging of DNA and Protein-DNA Complexes with Atomic Force Microscopy // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* — 2016. — V. 26(1). — P. 63–96.
- [227] Martin L.D., Vesenka J.P., Henderson E., Dobbs D.L. Visualization of nucleosomal substructure in native chromatin by atomic force microscopy // *Biochemistry*. — 1995. — V. 34. — P. 4610–4616.
- [228] Arents G., Burlingame R.W., Wang B.C., Love W.E., Moudrianakis E.N. The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 1991. — V. 88(22). — P. 10148–10152.

- [229] Pisano S., Pascucci E., Cacchione S., De Santis P., Savino M. AFM imaging and theoretical modeling studies of sequence-dependent nucleosome positioning // *Biophys. Chem.* — 2006. — V. 124. — P. 81–89.
- [230] Hizume K., Araki S., Hata K., Prieto E., Kundu T.K., Yoshikawa K., Takeyasu, K. Nano-scale analyses of the chromatin decompaction induced by histone acetylation // *Arch. Histol. Cytol.* — 2010. — V. 73. — P. 149–163.
- [231] Filenko N.A., Kolar C., West J.T., Smith S.A., Hassan Y.I., Borgstahl G.E., Zemleni J., Lyubchenko Y.L. The role of histone H4 biotinylation in the structure of nucleosomes // *PLoS One.* — 2011. — V. 6.
- [232] Singh M.P., Wijeratne S.S., Zemleni J. Biotinylation of lysine 16 in histone H4 contributes toward nucleosome condensation // *Arch. Biochem. Biophys.* — 2013. — V. 529. — P. 105–111.
- [233] Montel F., Castelnovo M., Menoni H., Angelov D., Dimitrov S., Faivre-Moskalenko C. RSC remodeling of oligo-nucleosomes: an atomic force microscopy study // *Nucleic Acids Res.* — 2011. — V. 39. — P. 2571–2579.
- [234] Lyubchenko Y.L. Centromere chromatin: a loose grip on the nucleosome? // *Nat. Struct. Mol. Biol.* — 2014. — V. 21.
- [235] Syed S.H., Boulard M., Shukla M.S., Gautier T., Travers A., Bednar J., Faivre-Moskalenko C., Dimitrov S., Angelov D. The incorporation of the novel histone variant H2AL2 confers unusual structural and functional properties of the nucleosome // *Nucleic Acids Res.* — 2009. — V. 37. — P. 4684–4695.
- [236] Würtz M., Aumiller D., Gundelwein L., Jung P., Schütz C., Lehmann K., Tóth K., Rohr K. DNA accessibility of chromatosomes quantified by automated image analysis of AFM data // *Sci. Rep.* — 2019. — V. 9(1).
- [237] Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* — 1970. — V. 227(5259). — P. 680–685.
- [238] Brunelle J.L., Green R. Coomassie blue staining // *Methods Enzymol.* — 2014. — V. 541. — P. 161–167.
- [239] Amé J.C., Kalisch T., Dantzer F., Schreiber V. Purification of recombinant poly(ADP-ribose) polymerases // *Methods Mol. Biol.* — 2011. — V. 780. — P. 135–152.
- [240] Kutuzov M.M., Kurgina T.A., Belousova E.A., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Optimization of nucleosome assembly from histones and model DNAs and estimation of the reconstitution efficiency // *Biopolym. Cell.* — 2019. — V. 35. — P. 91–98
- [241] Thåström A., Lowary P.T., Widom J. Measurement of histone-DNA interaction free energy in nucleosomes // *Methods.* — 2004. — V. 33(1). — P. 33–44.

- [242] Thåström A., Bingham L.M., Widom J. Nucleosomal locations of dominant DNA sequence motifs for histone-DNA interactions and nucleosome positioning // *J. Mol. Biol.* — 2004. — V. 338(4). — P. 695–709.
- [243] Peterson C.L., Côté J. Cellular machineries for chromosomal DNA repair // *Genes Dev.* — 2004. — V. 18(6). — P. 602–616.
- [244] Rogge R.A., Kalashnikova A.A., Muthurajan U.M., Porter-Goff M.E., Luger K., Hansen J.C. Assembly of nucleosomal arrays from recombinant core histones and nucleosome positioning DNA // *J. Vis. Exp.* — 2013. — V. 79.
- [245] 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.
- [246] Balliano A.J., Hayes J.J. Base excision repair in chromatin: Insights from reconstituted systems // *DNA Repair (Amst.)*. — 2015. — V. 36. — P. 77–85.
- [247] Lu Y., Fu W., Xing W., Wu H., Zhang C., Xu D. (2024). Transcriptional regulation mechanism of PARP1 and its application in disease treatment // *Epigenetics Chromatin*. — 2024. — V. 17(1).
- [248] Kurgina T.A., Moor N.A., Kutuzov M.M., Endutkin A.V., Lavrik O.I. DECIPHERING THE DARK SIDE OF HISTONE ADP-RIBOSYLATION: WHAT STRUCTURAL FEATURES OF DAMAGED NUCLEOSOME REGULATE THE ACTIVITIES OF PARP1 AND PARP2 // *bioRxiv*. — 2025 (<https://doi.org/10.1101/2025.01.29.635606>, дата обращения 11.06.2025)
- [249] 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(27). — P. 25541–25548.
- [250] Thomas C., Ji Y., Wu C., Datz H., Boyle C., MacLeod B., Patel S., Ampofo M., Currie M., Harbin J., Pechenkina K., Lodhi N., Johnson S. J., Tulin A. V. (2019). Hit and run versus long-term activation of PARP-1 by its different domains fine-tunes nuclear processes // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2019. — V. 116(20). — P. 9941–9946.
- [251] Krüger A., Bürkle A., Hauser K., Mangerich A. Real-time monitoring of PARP1-dependent PARylation by ATR-FTIR spectroscopy // *Nat. Commun.* — 2020. — V. 11(1).
- [252] Rudolph J., Mahadevan J., Luger K. Probing the Conformational Changes Associated with DNA Binding to PARP1 // *Biochemistry*. — 2020. — V. 59(21). — P. 2003–2011.
- [253] Whitaker A.M., Freudenthal B.D. APE1: A skilled nucleic acid surgeon // *DNA Repair*. — 2018. — V. 71. — P. 93–100.

- [254] Hoitsma N.M., Whitaker A.M., Beckwitt E.C., Jang S., Agarwal P.K., Van Houten B., Freudenthal B.D. AP-endonuclease 1 sculpts DNA through an anchoring tyrosine residue on the DNA intercalating loop // *Nucleic Acids Res.* — 2020. — V. 48(13). — P. 7345–7355.
- [255] Hinz J. M., Mao P., McNeill D. R., Wilson, D. M. 3rd. Reduced Nuclease Activity of Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease (APE1) Variants on Nucleosomes: IDENTIFICATION OF ACCESS RESIDUES // *J. Biol. Chem.* — 2015. — V. 290(34). — P. 21067–21075.
- [256] Eccles L. J., Menoni H., Angelov D., Lomax M. E., O'Neill P. Efficient cleavage of single and clustered AP site lesions within mono-nucleosome templates by CHO-K1 nuclear extract contrasts with retardation of incision by purified APE1 // *DNA Repair (Amst.)*. — 2015. — V. 35. — P. 27–36.
- [257] Kutuzov M.M., Ilina E.S., Sukhanova M.V., Pyshnaya I.A., Pyshnyi D.V., Lavrik O.I., Khodyreva S.N. Interaction of poly(ADP-ribose) polymerase 1 with apurinic/apyrimidinic sites within clustered DNA damage // *Biochemistry (Mosc.)*. — 2011. — V. 76(1). — P. 147–156.
- [258] Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Ilina E.S., Sukhanova M.V., Amé J.C., Lavrik O.I. Interaction of PARP-2 with AP site containing DNA // *Biochimie*. — 2015. — V. 112. — P. 10–19.
- [259] Moor N.A., Vasil'eva I.A., Kuznetsov N.A., Lavrik O.I. Human apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 is modified in vitro by poly(ADP-ribose) polymerase 1 under control of the structure of damaged DNA // *Biochimie*. — 2020. — V. 168. — P. 144–155.
- [260] Moor N., Lavrik O. Coordination of DNA base excision repair by protein-protein interactions // *DNA Repair-An Update*. — 2018.
- [261] 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(25). — P. 17860–17868.
- [262] Mortusewicz O., Rothbauer U., Cardoso M.C., Leonhardt H. Differential recruitment of DNA Ligase I and III to DNA repair sites // *Nucleic Acids Res.* — 2006. — V. 34(12). — P. 3523–3532.
- [263] Chereji R.V., Morozov A.V. Functional roles of nucleosome stability and dynamics // *Brief. Funct. Genomics*. — 2015. — V. 14(1). — P. 50–60.
- [264] 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(6). — P. 3563–3571.
- [265] Leppard J.B., Dong Z., Mackey Z.B., Tomkinson A.E. Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair // *Mol. Cell. Biol.* — 2003. — V. 23(16). — P. 5919–5927.

- [266] 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(2). — P. 319–331.
- [267] Beck C., Boehler C., Guirouilh Barbat J., Bonnet M.E., Illuzzi G., Ronde P., Gauthier L.R., Magroun N., Rajendran A., Lopez B.S., Scully R., Boussin F.D., Schreiber V., Dantzer F. PARP3 affects the relative contribution of homologous recombination and nonhomologous end-joining pathways // *Nucleic Acids Res.* — 2014. — V. 42(9). — P. 5616–5632.
- [268] Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Affinity modification in a proteomic study of DNA repair ensembles // *Bioorg Khim.* — 2011. — V. 37(1). — P. 91–107.
- [269] Khodyreva S., Lavrik O. Non-canonical interaction of DNA repair proteins with intact and cleaved AP sites // *DNA Repair (Amst.)*. — 2020. — V. 90.
- [270] Pierson C.E., McCullough A.K., Lloyd R.S. AP lyases and dRPases: commonality of mechanism // *Mutat Res.* — 2000. — V. 459(1). — P. 43–53.
- [271] Galas D.J., Schmitz A. DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity // *Nucleic Acids Res.* — 1978. — V. 5(9). — P. 3157–3170.
- [272] Kim M.Y., Mauro S., Gévry N., Lis J.T., Kraus W.L. NAD⁺-dependent modulation of chromatin structure and transcription by nucleosome binding properties of PARP-1 // *Cell.* — 2004. — V. 119(6). — P. 803–814.
- [273] Wacker D.A., Ruhl D.D., Balagamwala E.H., Hope K.M., Zhang T., Kraus W.L. The DNA binding and catalytic domains of poly(ADP-ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure and transcription // *Mol. Cell. Biol.* — 2007. — V. 27(21). — P. 7475–7485.
- [274] Erener S., Pétrilli V., Kassner I., Minotti R., Castillo R., Santoro R., Hassa P.O., Tschopp J., Hottiger M.O. Inflammasome-activated caspase 7 cleaves PARP1 to enhance the expression of a subset of NF- κ B target genes // *Mol. Cell.* — 2012. — V. 46(2). — P. 200–211.
- [275] Stumme-Diers M.P., Banerjee S., Hashemi M., Sun Z., Lyubchenko Y.L. Nanoscale dynamics of centromere nucleosomes and the critical roles of CENP-A // *Nucleic Acids Res.* — 2018. — V. 46(1). — P. 94–103.
- [276] Francis N.J., Kingston R.E., Woodcock C.L. Chromatin compaction by a polycomb group protein complex // *Science.* — 2004. — V. 306(5701). — P. 1574–1577.
- [277] Bell N.A.W., Haynes P.J., Brunner K., de Oliveira T.M., Flocco M.M., Hoogenboom B.W., Molloy J.E. Single-molecule measurements reveal that PARP1 condenses DNA by loop stabilization // *Sci. Adv.* — 2021. — V. 7(33).

- [278] McCauley M.J., Huo R., Becker N., Holte M.N., Muthurajan U.M., Rouzina I., Luger K., Maher L.J., IIIrd, Israeloff N.E., Williams M.C. Single and double box HMGB proteins differentially destabilize nucleosomes // *Nucleic Acids Res.* — 2019. — V. 47(2). — P. 666–678.
- [279] Isabelle M., Gallouzi I.E., Poirier G.G. PARP1 parylation promotes silent locus transmission in the nucleolus: the suspicion confirmed // *Mol. Cell.* — 2012. — V. 45(6). — P. 706–707.
- [280] Kraus W.L., Hottiger M.O. PARP-1 and gene regulation: progress and puzzles // *Mol. Aspects Med.* — 2013. — V. 34(6). — P. 1109–1123.
- [281] Stormberg T., Stumme-Diers M., Lyubchenko Y.L. Sequence-dependent nucleosome nanoscale structure characterized by atomic force microscopy // *FASEB J.* — 2019. — V. 33(10). — P. 10916–10923.
- [282] Yodh J.G., Lyubchenko Y.L., Shlyakhtenko L.S., Woodbury N., Lohr D. Evidence for nonrandom behavior in 208-12 subsaturated nucleosomal array populations analyzed by AFM // *Biochemistry.* — 1999. — V. 38(48). — P. 15756–15763.
- [283] Ukraintsev 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(10).
- [284] Kutuzov M., Sayfullina D., Belousova E., Lavrik O. HPF1 Regulates Pol β Efficiency in Nucleosomes via the Modulation of Total Poly(ADP-Ribose) Synthesis // *Int. J. Mol. Sci.* — 2025. — V. 26(5). — Art. 1794.
- [285] Chou D. M., Adamson B., Dephoure N. E., Tan X., Nottke A. C., Hurov K. E., Gygi S. P., Colaiácovo M. P., Elledge, S. J. A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* — 2010. — V. 107(43). — P. 18475–18480.
- [286] Campbell S., Ismail I. H., Young L. C., Poirier G. G., Hendzel M. J. Polycomb repressive complex 2 contributes to DNA double-strand break repair // *Cell Cycle.* — 2013. — V. 12(16). — P. 2675–2683.

Российская Академия наук
Сибирское отделение
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины

На правах рукописи

Приложение к работе

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

Украинцев Александр Андреевич

1.4.9 — биорганическая химия

Диссертация
на соискание учёной степени
кандидата химических наук

Научные руководители:
Академик РАН, д.х.н., Лаврик Ольга Ивановна
к.х.н., с.н.с., Кутузов Михаил Михайлович

Новосибирск–2025

Для анализа структурных характеристик контрольного препарата CLP проведена статистическая обработка данных: площади проекции (S) и объёма (V) частиц. Средние значения и стандартные отклонения (SD) площади и объёма были рассчитаны для групп CLP, содержащих от 5 до 10 NCP (**Таблица П1**). Группа с NCP = 4 была исключена из анализа вследствие недостаточного объёма выборки (n=1).

Таблица П1. Сводная таблица средних значений площади (S) и объёма (V) для препаратов CLP с разным числом NCP в составе.

| NCP | N, штук молекул в выборке | S, нм ² | SD (S), нм ² | V, нм ³ | SD (V), нм ³ |
|-----|---------------------------|--------------------|-------------------------|--------------------|-------------------------|
| 5 | 5 | 1511 | 281 | 2481 | 799 |
| 6 | 19 | 1637 | 339 | 2496 | 771 |
| 7 | 26 | 1775 | 441 | 2544 | 831 |
| 8 | 34 | 1859 | 373 | 2706 | 648 |
| 9 | 10 | 2086 | 322 | 3126 | 616 |
| 10 | 3 | 2588 | 804 | 3632 | 1518 |

Коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r_s), рассчитанный для пар переменных: 1) число NCP — средняя площадь проекции (S); 2) число NCP — средний объём (V); 3) средняя площадь проекции (S) — средний объём (V). Во всех случаях r_s составил 1,0. Это свидетельствует о наличии сильной положительной статистической связи: увеличение числа NCP сопровождается возрастанием как средней площади проекции, так и среднего объёма, а рост средней площади проекции ассоциирован с увеличением среднего объёма CLP. Следует отметить, что корреляционный анализ не позволяет установить причинно-следственные связи между переменными.

Для оценки статистической значимости различий в распределении площади проекции (S) между группами с разным числом NCP был применён непараметрический критерий Краскела-Уоллиса. Результаты теста показали статистически значимую гетерогенность распределений (p-value < 0,05), что позволяет отвергнуть нулевую гипотезу об отсутствии различий между группами (**Рис. П1**).

Однако критерий Краскела-Уоллиса не идентифицирует, между какими именно парами групп существуют значимые различия. Для определения пар групп с различающимися распределениями был проведён пост-хок анализ. В частности, выполнено попарное сравнение всех групп с использованием теста Манна-Уитни с поправкой Бонферрони для множественных сравнений. Уровень значимости с учётом поправки Бонферрони был установлен на уровне $p_{Bonf} = 0,003$. Результаты пост-хок анализа выявили статистически значимые различия (p-value < p_{Bonf}) только между группой с NCP = 6 и группой с NCP = 9. Для всех остальных пар

групп различия оказались статистически незначимыми. Полные результаты попарных сравнений представлены в **Таблице П2**.

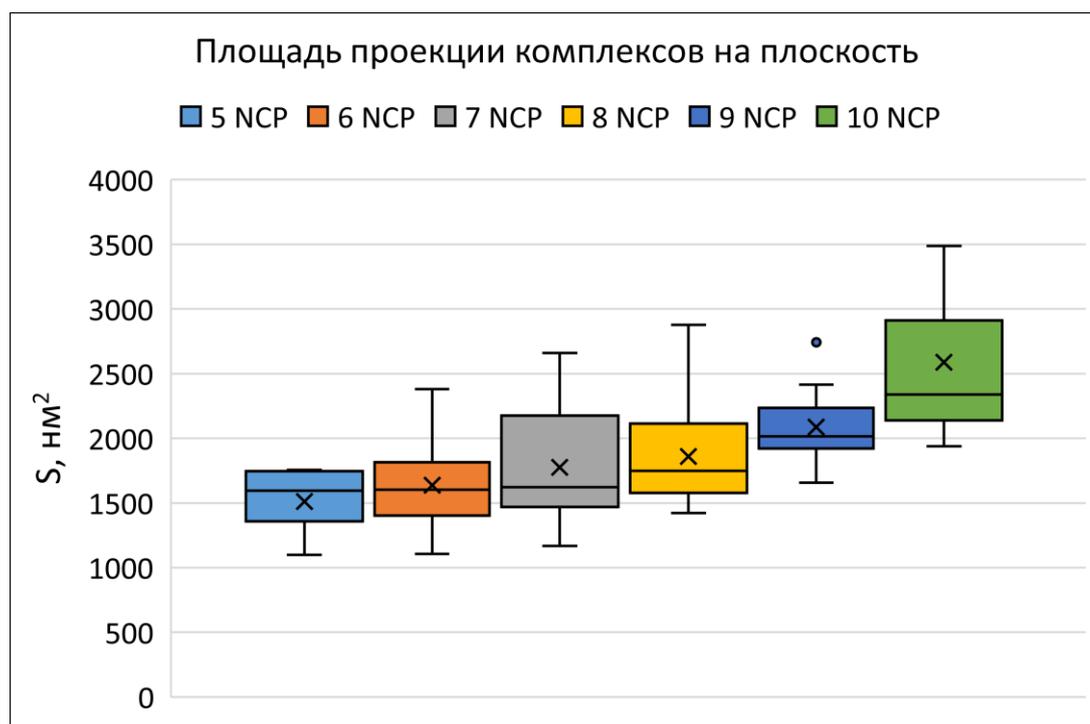


Рис. П1. Блочная диаграмма с ограничителями выбросов площади проекции частиц CLP601-8. Объем выборки (N) для каждой группы соответствует числу обработанных частиц (**Таблица П1**, столбик 2). Крестик — среднее арифметическое по выборке; линия выше или ниже крестика — медиана; нижняя и верхняя грань бара — первый и третий квартиль значений; расстояние между границами — межквартильный размах; верхняя и нижняя граница «усов» — максимальное и минимальное значение в выборке; точки — выбросы. Графики построены в Microsoft Excel.

Таблица П2. Сводная таблица результатов попарного сравнения значений площади проекции между группами молекул CLP тестом Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Красный шрифт со звездочкой в столбце «Поправка Бонферрони» указывает на статистически значимые различия между группами в паре.

| Пары | p-value | Поправка Бонферрони 0,003 |
|------------------|--------------|------------------------------|
| NCP5–NCP6 | 0,600 | |
| NCP5–NCP7 | 0,300 | |
| NCP5–NCP8 | 0,090 | |
| NCP5–NCP9 | 0,006 | |
| NCP5–NCP10 | 0,030 | |
| NCP6–NCP7 | 0,400 | |
| NCP6–NCP8 | 0,030 | |
| NCP6–NCP9 | 0,002 | * |
| NCP6–NCP10 | 0,020 | |
| NCP7–NCP8 | 0,200 | |
| NCP7–NCP9 | 0,040 | |
| NCP7–NCP10 | 0,060 | |
| NCP8–NCP9 | 0,040 | |
| NCP8–NCP10 | 0,060 | |
| NCP9–NCP10 | 0,200 | |

В отличие от результатов анализа площади проекции (S), применение критерия Краскела-Уоллиса к данным по объёму (V) частиц CLP не выявило статистически значимых различий в распределениях между группами с различным числом NCP ($p\text{-value} > 0,05$). Это свидетельствует об отсутствии достаточных оснований для отвержения нулевой гипотезы об однородности распределения объёма по группам NCP (**Рис. П2**). На рисунке ниже представлена соответствующая диаграмма «ящик с усами», иллюстрирующая распределение объёма (V) для препарата CLP. Цветовая кодировка соответствует числу NCP в молекуле CLP, как указано в легенде графика. Согласно общепринятой статистической практике, проведение пост-хок попарных сравнений (например, тестом Манна-Уитни с поправкой Бонферрони) не требуется в случае, если первоначальный критерий Краскела-Уоллиса не выявил статистически значимых различий между группами ($p > 0,05$). Это связано с тем, что отсутствие значимого общего эффекта исключает необходимость поиска различий в отдельных парах групп.

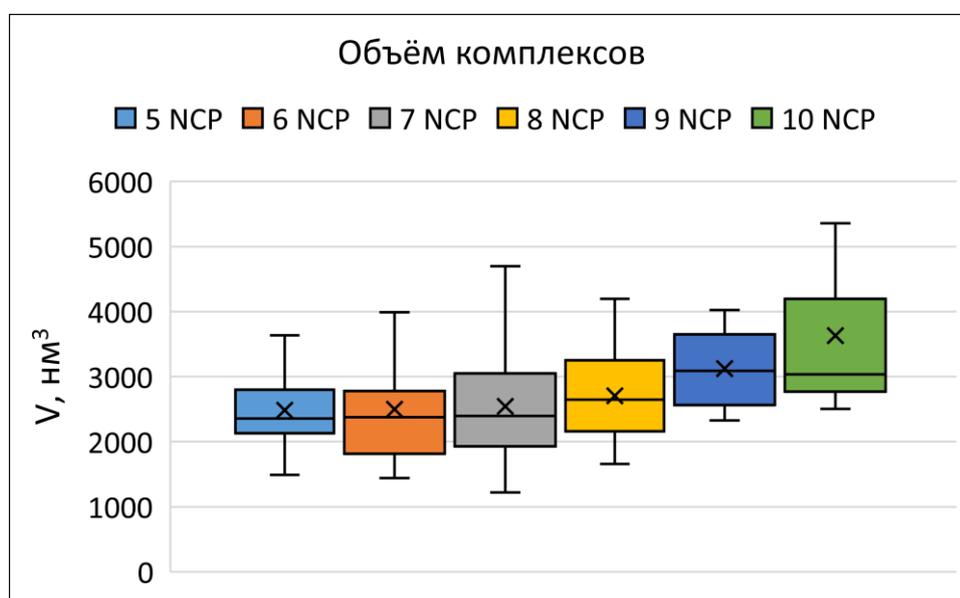


Рис. П2. Блочная диаграмма с ограничителями выбросов объёма частиц CLP601-8. Объём выборки (N) для каждой группы соответствует числу обработанных частиц (**Таблица П1**, столбик 2). Крестик — среднее арифметическое по выборке; линия выше или ниже крестика — медиана; нижняя и верхняя грань бара — первый и третий квартиль значений; расстояние между границами — межквартильный размах; верхняя и нижняя граница «усов» — максимальное и минимальное значение в выборке; точки — выбросы. Графики построены в Microsoft Excel.

Таким образом, результаты анализа как площади проекции (S) (где значимые различия были обнаружены только между NCP=6 и NCP=9), так и объёма (V) (где значимые различия отсутствовали), в целом свидетельствуют об отсутствии устойчивых и выраженных различий в геометрических характеристиках CLP в зависимости от числа NCP в исследованных группах. Наблюдаемое отсутствие чётких структурных закономерностей, по-видимому, обусловлено совокупностью факторов: 1) ограниченным размером выборки для некоторых групп NCP; 2)

существенной неоднородностью (гетерогенностью) геометрии молекул CLP даже при одинаковом числе NCP; 3) неравномерным распределением данных.

Для валидации структурной модели CLP601-8 был применён дополнительный подход. Мы рассчитали удельные геометрические характеристики на одну NCP: площадь проекции на частицу (S/n) и объём на частицу (V/n), где S и V — площадь проекции и объём молекулы CLP, а n — число NCP в конкретной молекуле. Гипотеза состояла в том, что если модель CLP601-8 адекватно описывает геометрию частиц, то значения S/n и V/n не должны статистически значимо различаться между группами с разным числом NCP (n), так как отражают усреднённую геометрию одной частицы в составе молекулы.

В **Таблице ПЗ** представлены средние значения S/n и V/n для всех исследованных CLP, сгруппированные по общему числу NCP (n). Дополнительно приведены значения стандартного отклонения (SD). Для проверки гипотезы об отсутствии различий в распределениях S/n и V/n между группами n был последовательно применён: 1) метод Краскела-Уоллиса для оценки наличия общего значимого различия между всеми группами; 2) в случае обнаружения значимых различий по Краскелу-Уоллису (p -value < 0.05), для идентификации различающихся пар групп был выполнен пост-хок анализ с использованием попарных сравнений тестом Манна-Уитни с поправкой Бонферрони.

Таблица ПЗ. Сводная таблица средних значений площади (S/n) и объёма (V/n) для препаратов CLP с разным числом NCP в составе, рассчитанных на одну нуклеосому.

| NCP (n) | N, штук молекул в выборке | S/n , нм ² | SD (S), нм ² | V/n , нм ³ | SD (V), нм ³ |
|-------------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| 5 | 5 | 302 | 56 | 496 | 160 |
| 6 | 19 | 273 | 57 | 416 | 129 |
| 7 | 26 | 254 | 63 | 363 | 119 |
| 8 | 34 | 232 | 47 | 338 | 81 |
| 9 | 10 | 232 | 36 | 347 | 68 |
| 10 | 3 | 259 | 80 | 363 | 152 |

Результаты методом Краскела-Уоллиса с постобработкой тестом Манна-Уитни с поправкой Бонферрони показали отсутствие статистически значимых различий в значениях S/n (**Рис. ПЗ; Таблица П4**) и V/n (**Рис. П4; Таблица П5**) между группами с различным числом NCP (n), что согласуется с выдвинутой гипотезой. Этот результат свидетельствует о корректности модели CLP601-8 в части описания характеристик молекул CLP.

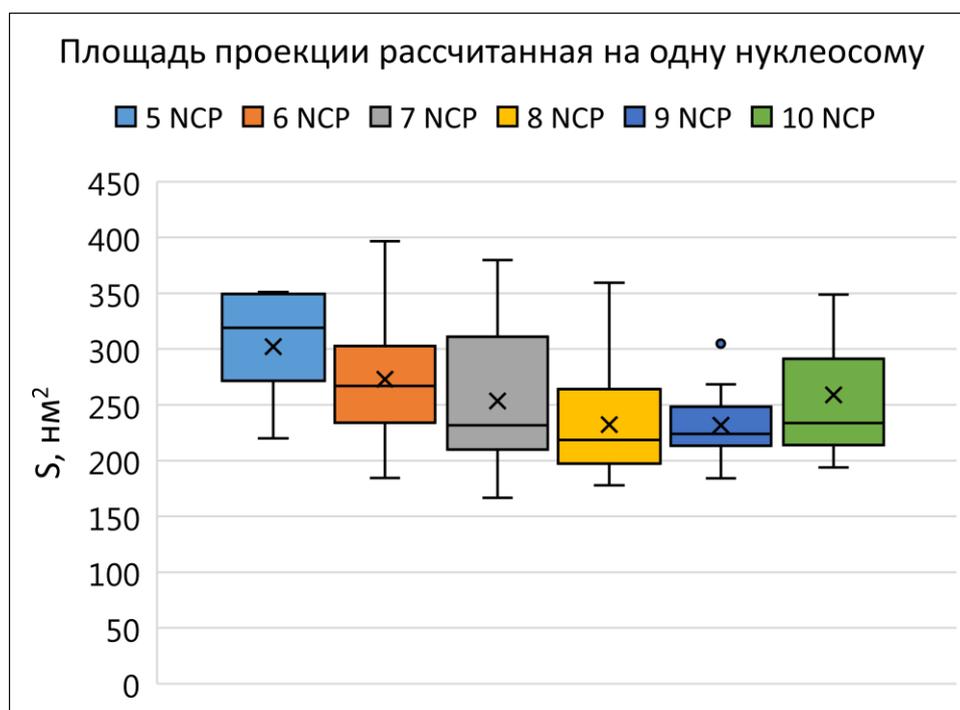


Рис. ПЗ. Блочная диаграмма с ограничителями выбросов средней площади проекции ядра нуклеосомы, вычисленной из средней площади проекции частиц CLP601-8, делённой на число NCP в группе. Объём выборки (N) для каждой группы соответствует числу обработанных частиц (Таблица П1, столбик 2). Крестик — среднее арифметическое по выборке; линия выше или ниже крестика — медиана; нижняя и верхняя грань бара — первый и третий квартиль значений; расстояние между границами — межквартильный размах; верхняя и нижняя граница «усов» — максимальное и минимальное значение в выборке; точки — выбросы. Тест Краскела-Уоллиса с пост-тестом Манна Уитни (поправка Бонферрони) показал отсутствие статистически значимых различий между группами ($p\text{-value} > 0,003$). Графики построены в Microsoft Excel.

Таблица П4. Сводная таблица результатов попарного сравнения значений площади проекции на одну NCP между группами молекул CLP тестом Манна Уитни с поправкой Бонферрони. Красный шрифт со звёздочкой в столбце «Поправка Бонферрони» указывает на статистически значимые различия между группами в паре.

| Пары | p-value | Поправка Бонферрони 0,003 |
|------------|---------|------------------------------|
| NCP5–NCP6 | 0,300 | |
| NCP5–NCP7 | 0,090 | |
| NCP5–NCP8 | 0,010 | |
| NCP5–NCP9 | 0,020 | |
| NCP5–NCP10 | 0,400 | |
| NCP6–NCP7 | 0,200 | |
| NCP6–NCP8 | 0,008 | |
| NCP6–NCP9 | 0,040 | |
| NCP6–NCP10 | 0,500 | |
| NCP7–NCP8 | 0,200 | |
| NCP7–NCP9 | 0,500 | |
| NCP7–NCP10 | 0,900 | |
| NCP8–NCP9 | 0,700 | |
| NCP8–NCP10 | 0,600 | |
| NCP9–NCP10 | 0,700 | |

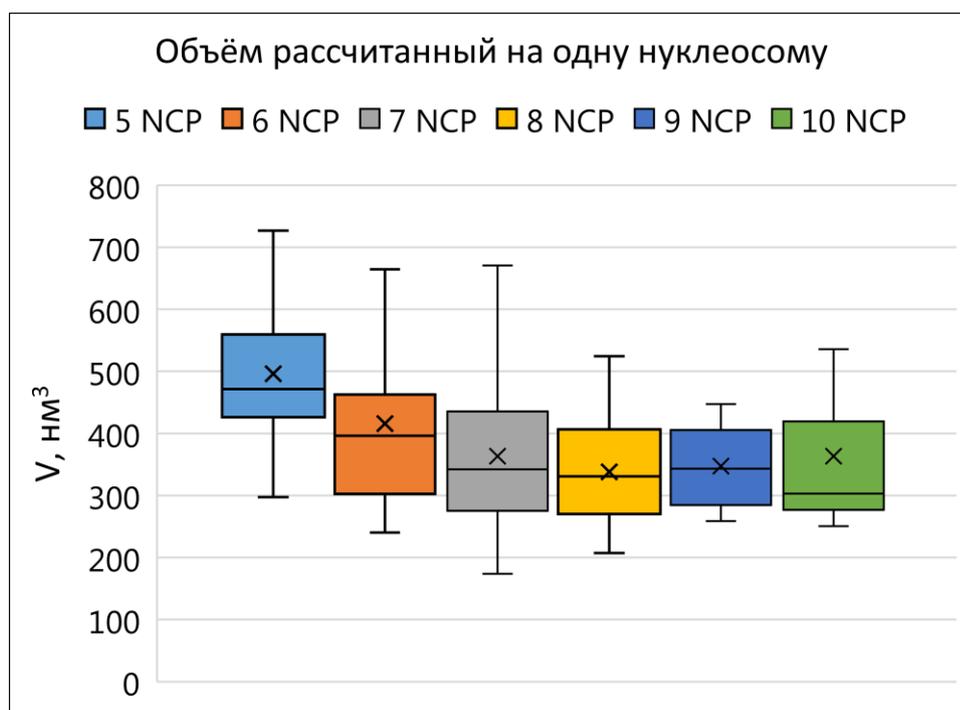


Рис. П4. Блочная диаграмма с ограничителями выбросов средних значений объёма по Лапласу ядра нуклеосомы, вычисленных из среднего объёма по Лапласу частиц CLP601-8, делённого на число NCP в группе. Объём выборки (N) для каждой группы соответствует числу обработанных частиц (**Таблица П1**, столбик 2). Крестик — среднее арифметическое по выборке; линия выше или ниже крестика — медиана; нижняя и верхняя грань бара — первый и третий квартиль значений; расстояние между границами — межквартильный размах; верхняя и нижняя граница «усов» — максимальное и минимальное значение в выборке; точки — выбросы. Тест Краскела-Уоллиса с пост-тестом Манна Уитни (поправка Бонферрони) показал отсутствие статистически значимых различий между группами ($p\text{-value} > 0,003$). Графики построены в Microsoft Excel.

Таблица П5. Сводная таблица результатов попарного сравнения значений площади проекции на одну NCP между группами молекул CLP тестом Манна Уитни с поправкой Бонферрони. Красный шрифт со звёздочкой в столбце «Поправка Бонферрони» указывает на статистически значимые различия между группами в паре.

| Пары | p-value | Поправка Бонферрони 0,003 |
|------------|---------|------------------------------|
| NCP5–NCP6 | 0,200 | |
| NCP5–NCP7 | 0,050 | |
| NCP5–NCP8 | 0,020 | |
| NCP5–NCP9 | 0,040 | |
| NCP5–NCP10 | 0,300 | |
| NCP6–NCP7 | 0,200 | |
| NCP6–NCP8 | 0,030 | |
| NCP6–NCP9 | 0,200 | |
| NCP6–NCP10 | 0,500 | |
| NCP7–NCP8 | 0,500 | |
| NCP7–NCP9 | 0,900 | |
| NCP7–NCP10 | 0,900 | |
| NCP8–NCP9 | 0,700 | |
| NCP8–NCP10 | 1,000 | |
| NCP9–NCP10 | 0,900 | |

Для сравнительного анализа структурных характеристик в различных условиях были исследованы четыре группы препаратов CLP: 1) контрольный препарат (без добавок) (**Рис. П5; Рис. П9**); 2) препарат, инкубированный с PARP1 (+P1) (**Рис. П6; Рис. П10**); 3) препарат, инкубированный с PARP2 (+P2) (**Рис. П7; Рис. П11**); 4) препарат, инкубированный с PARP3 (+P3) (**Рис. П8; Рис. П12**). Для каждой из этих четырёх экспериментальных групп были построены гистограммы распределения комплексов CLP по значениям площади проекции (S) и объёма (V). Эти гистограммы визуализируют частоту встречаемости комплексов CLP в определённых интервалах значений S и V в каждом препарате.



Рис. П5. Распределение частиц CLP601-8 по площади проекции (S).

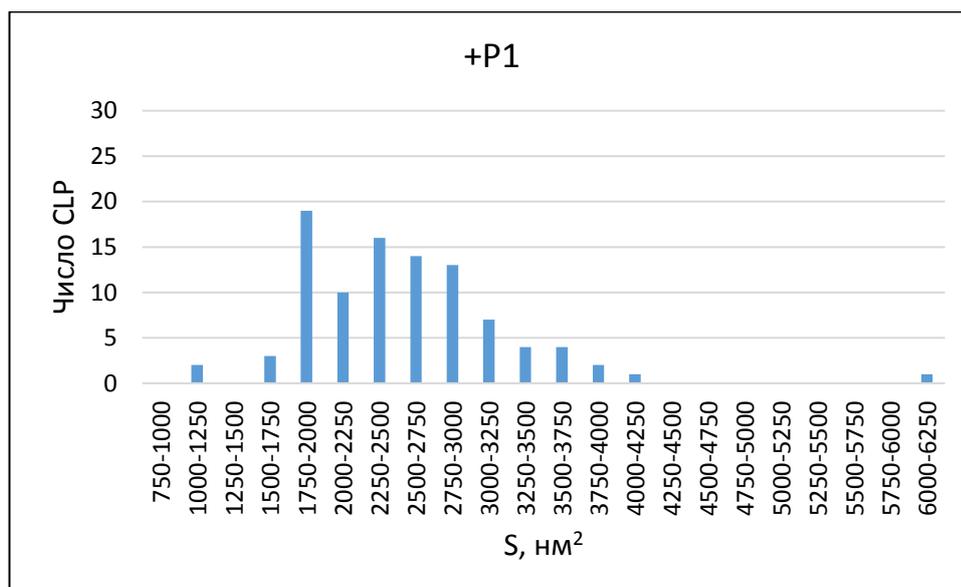


Рис. П6. Распределение комплексов PARP1•CLP601-8 по площади проекции (S).

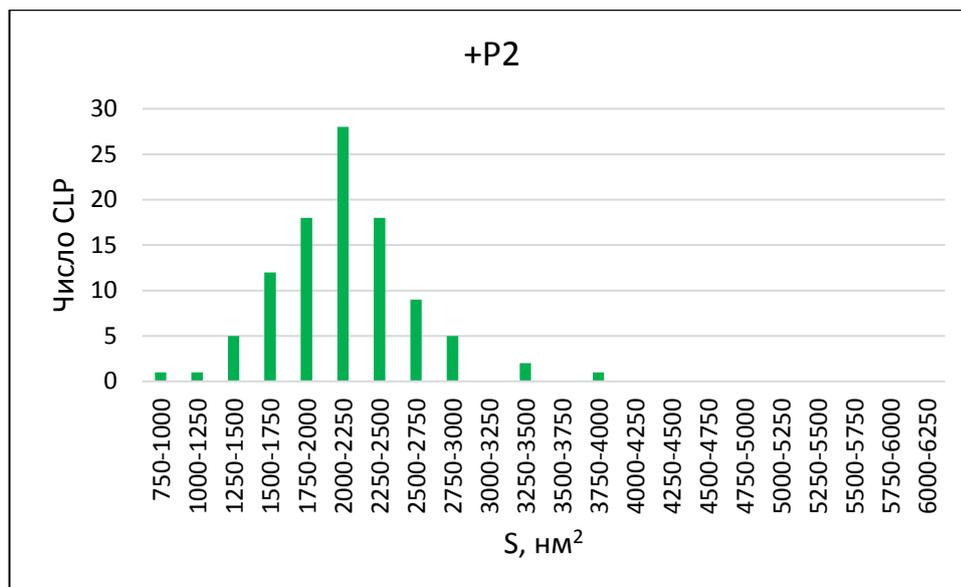


Рис. П7. Распределение комплексов P2•CLP601-8 по площади проекции (S).

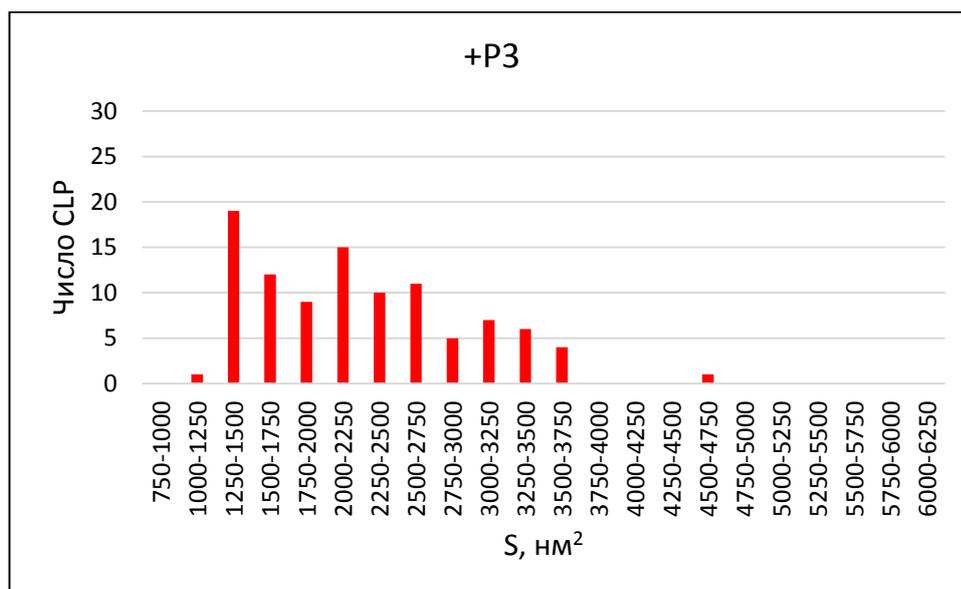


Рис. П8. Распределение комплексов P3•CLP601-8 по площади проекции (S).

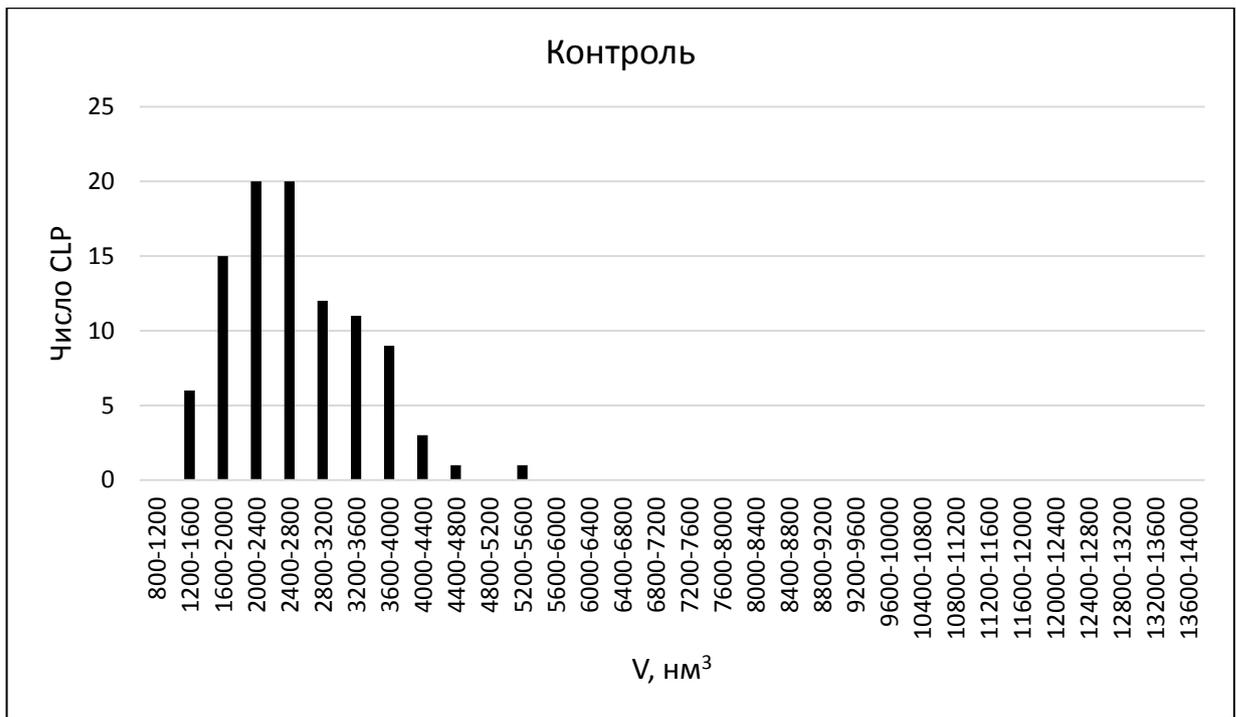


Рис. П9. Распределение частиц CLP601-8 по объёму (V).

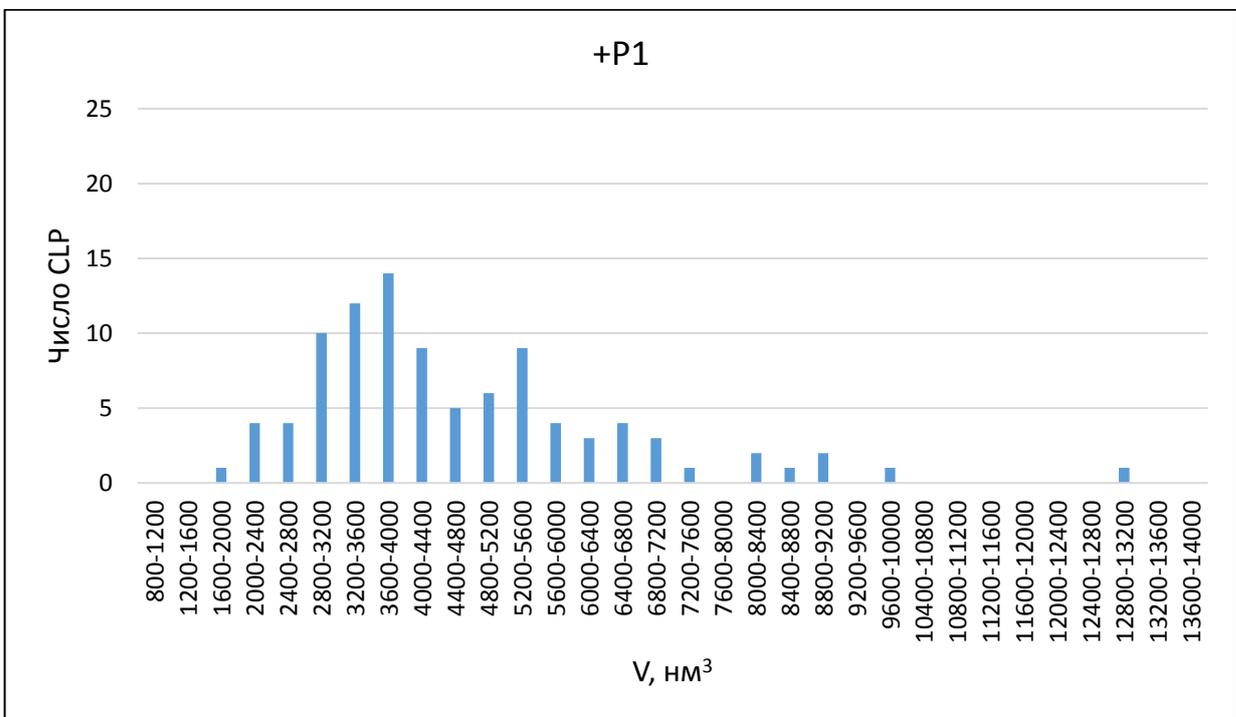


Рис. П10. Распределение комплексов PARP1•CLP601-8 по объёму (V).

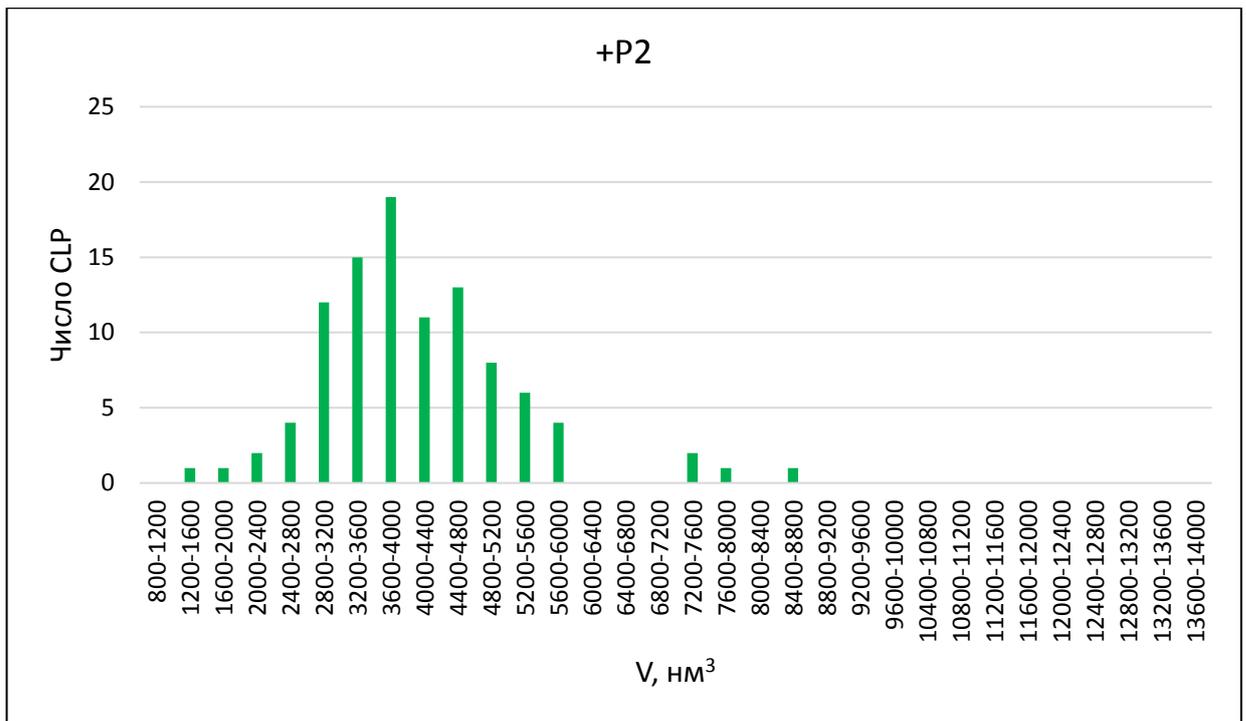


Рис. П11. Распределение комплексов PARP2•CLP601-8 по объёму (V).

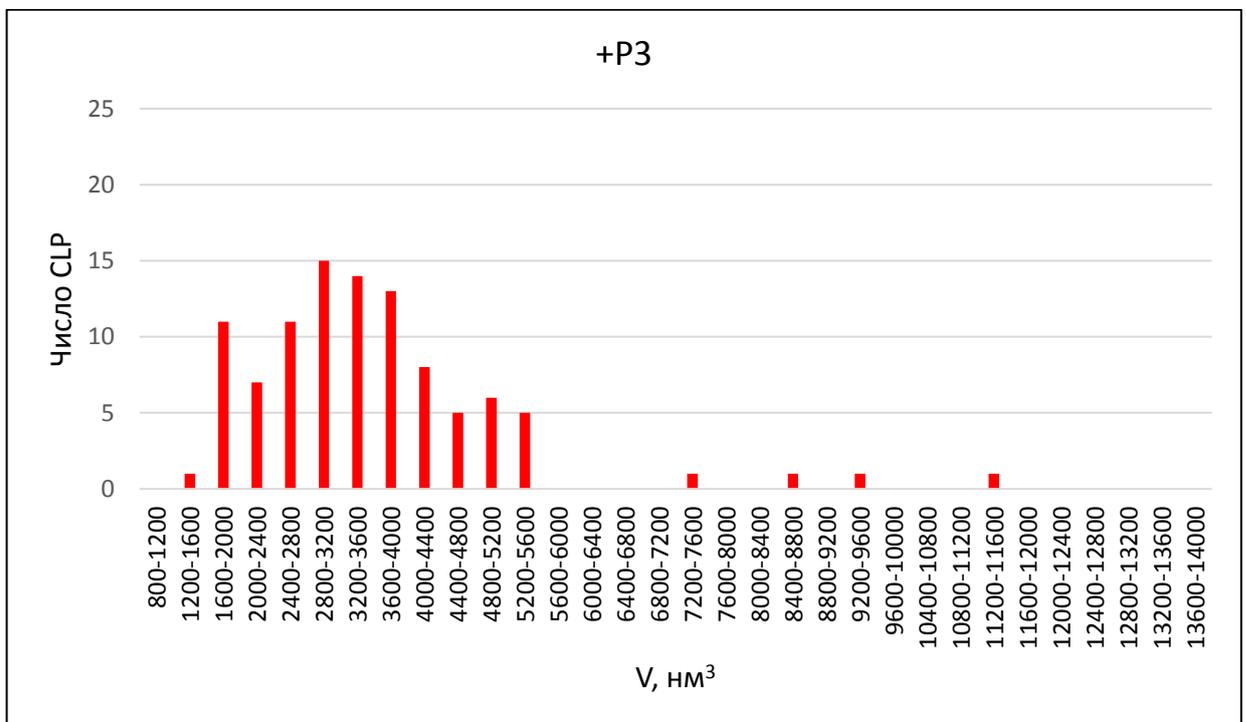


Рис. П12. Распределение комплексов PARP3•CLP601-8 по объёму (V).

Визуальный анализ гистограмм распределения комплексов CLP по площади проекции (S) и объёму (V) для всех четырёх препаратов (контроль, +P1, +P2, +P3), а также формальная проверка на нормальность с использованием критерия Шапиро-Уилка, выявили значимое отклонение от нормального распределения ($p\text{-value} < 0,05$ для каждого препарата). Это отклонение от параметрических предположений обосновывает применение непараметрических статистических методов для последующего сравнения групп.

Для оценки различий в распределении площади проекции (S) между четырьмя группами препаратов (контроль, +P1, +P2, +P3) был применён непараметрический критерий Краскела-Уоллиса. Результаты теста показали наличие статистически значимых различий между распределениями S в исследуемых группах ($p < 0,05$). Для выявления конкретных пар групп, ответственных за эти различия, был проведён пост-хок анализ с использованием попарных сравнений тестом Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Уровень значимости с учётом поправки был установлен на значении $p_{\text{Bonf}} = 0,0083 (0,05 / 6)$.

Результаты пост-хок анализа для S приведены на **Рис. П13, Таблица П6**. Статистически значимые различия ($p\text{-value} < p_{\text{Bonf}}$) были выявлены при сравнении следующих пар групп: 1) Контроль vs. +P1; 2) Контроль vs. +P2; 3) Контроль vs. +P3; 4) +P1 vs +P2; 5) +P1 vs. +P3. Статистически значимых различий не обнаружено между группой +P2 vs +P3 ($p\text{-value} = 0,7$). Это свидетельствует о схожести распределений площади проекции комплексов CLP в препаратах, инкубированных с PARP2 и PARP3.

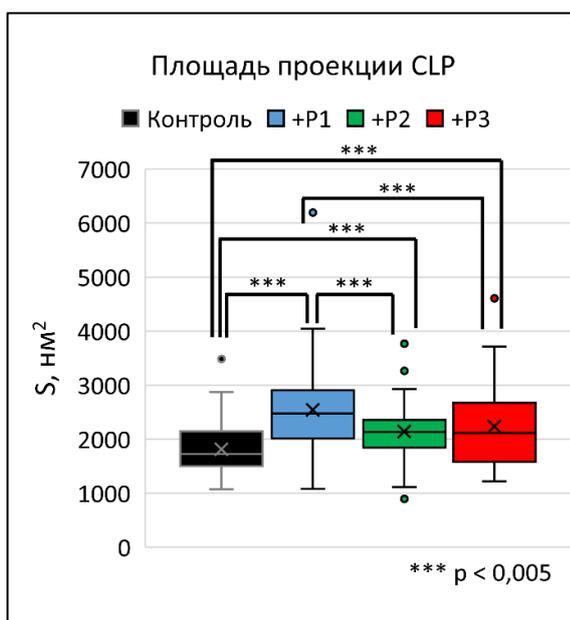


Рис. П13. Блочная диаграмма с ограничителями выбросов площади проекции CLP и их комплексов с белками PARP1, PARP2 и PARP3. Объём каждой выборки, $N = 100$. Крестик — среднее арифметическое по выборке; линия выше или ниже крестика — медиана; нижняя и верхняя грань бара — первый и третий квартиль значений; расстояние между границами — межквартильный размах; верхняя и нижняя граница «усов» — 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 ***). Графики построены в Microsoft Excel.

Таблица П6. Сводная таблица результатов попарного сравнения значений площади проекции CLP и их комплексов с PARP тестом Манна Уитни с поправкой Бонферрони. Красный шрифт со звёздочкой в столбце «Поправка Бонферрони» указывает на статистически значимые различия между группами в паре.

| Пары | p-value | Поправка Бонферрони 0,0083 |
|---------------|--------------------|-------------------------------|
| Контр–CLP+P1 | 0,0000000000000002 | * |
| Контр–CLP+P2 | 0,00000009 | * |
| Контр–CLP+P3 | 0,00005 | * |
| CLP+P1–CLP+P2 | 0,000001 | * |
| CLP+P1–CLP+P3 | 0,002 | * |
| CLP+P2–CLP+P3 | 0,7 | |

Метод Краскела-Уоллиса выявил статистически значимые различия в распределениях по объёму (V) комплексов CLP между исследуемыми группами препаратов ($p < 0,05$). Для выявления конкретных пар групп, ответственных за эти различия, был проведён пост-хок анализ с использованием попарных сравнений тестом Манна-Уитни с поправкой Бонферрони. Уровень значимости с учётом поправки был установлен на значении $p_{Bonf} = 0,0083$ ($0,05 / 6$).

Результаты пост-хок анализа для V приведены на **Рис. П14, Таблица П7**. Значимые различия ($p\text{-value} < p_{Bonf}$) обнаружены между парами: 1) Контроль vs. +P1; 2) Контроль vs. +P2; 3) Контроль vs. +P3; 4) +P1 vs. +P3; 5) +P2 vs. +P3. Статистически значимых различий не выявлено ($p\text{-value} > p_{Bonf}$) между группами +P1 vs +P2 ($p\text{-value} = 0,09$). Это указывает на схожесть распределений объёма комплексов CLP в препаратах, инкубированных с PARP1 и PARP2.

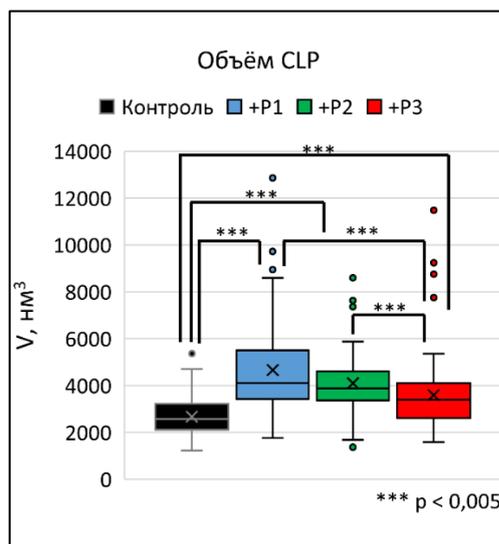


Рис. П14. Блочная диаграмма с ограничителями выбросов площади проекции CLP и их комплексов с белками PARP1, PARP2 и PARP3. Объём каждой выборки, $N = 100$. Крестик — среднее арифметическое по выборке; линия выше или ниже крестика — медиана; нижняя и верхняя грань бара — первый и третий квартиль значений; расстояние между границами — межквартильный размах; верхняя и нижняя граница «усов» — 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 ***). Графики построены в Microsoft Excel.

Таблица П7. Сводная таблица результатов попарного сравнения значений площади проекции CLP и их комплексов с PARP тестом Манна Уитни с поправкой Бонферрони. Красный шрифт со звёздочкой в столбце «Поправка Бонферрони» указывает на статистически значимые различия между группами в паре.

| Пары | p-value | Поправка Бонферрони 0,008 |
|---------------|-----------|------------------------------|
| Контр–CLP+P1 | 0 | * |
| Контр–CLP+P2 | 0 | * |
| Контр–CLP+P3 | 0,0000003 | * |
| CLP+P1–CLP+P2 | 0,09 | |
| CLP+P1–CLP+P3 | 0,000002 | * |
| CLP+P2–CLP+P3 | 0,0002 | * |

Интересно отметить, что в то время как распределения по площади проекции (S) не различались между группами «+P2» и «+P3», распределения по объёму (V) показали схожесть между группами «+P1» и «+P2». Это может свидетельствовать о различном влиянии белков PARP на пространственную организацию комплексов CLP.

Гистограммы распределения комплексов CLP по площади проекции (S) и объёму (V) в контрольном препарате (**Рис. П5, Рис. П9**) демонстрируют особенности, свидетельствующие о структурной неоднородности комплексов *in vitro*. Наблюдается правосторонняя асимметрия распределения по площади проекции (S) (**Рис. П5**). Эта особенность может указывать на присутствие в популяции подгруппы комплексов с увеличенной площадью проекции, что можно интерпретировать как структуры с пониженной плотностью упаковки («рыхлые» структуры). Распределение по объёму (V) характеризуется наличием двух основных пиков (**Рис. П9**): 1) первый пик с максимумом в диапазоне 2000–2800 (нм³) соответствует основной популяции комплексов; 2) второй, более широкий, пик с максимумом в диапазоне 2800–3600 (нм³) может отражать подгруппу более стабильных комплексов. Однако значительная ширина этого пика указывает на существенную вариабельность объёма внутри данной подгруппы. Это свидетельствует о выраженной структурной гетерогенности (разнообразии геометрии) даже среди относительно стабильных комплексов и ограниченной стабильности CLP в условиях *in vitro*.

Для P1 наблюдается более широкое распределение частиц по площади (**Рис. П6**), по сравнению с контролем (**Рис. П5**). Этот эффект может быть объяснен взаимодействием PARP1 с линкерными участками ДНК, приводящим к увеличению площади проекции комплексов. Присутствие пика в диапазоне 1750–2000 нм² может отражать формирование субпопуляции компактных структур, вероятно, вследствие образования белковых мостиков между нуклеосомами (NCP) через домены PARP1. Распределение по объёму (**Рис. П10**) носит многомодовый характер, что свидетельствует о формировании гетерогенной популяции

комплексов. Широкое распределение по площади частиц коррелирует с возросшим объёмом, что указывает на взаимодействие PARP1 с линкерной ДНК. Это может способствовать дестабилизации хроматиновой структуры за счёт стерического отталкивания соседних NCP из-за размеров PARP1. Наличие дискретных пиков (**Рис. П10**, например, в области 5200–5600 нм³ и 6400–6800 нм³) может указывать на стабилизацию комплексов с определённым числом NCP, хотя низкая интенсивность пика в области 6400–6800 нм³ позволяет предположить либо низкую стабильность этих крупных комплексов, либо их малое исходное количество. Совокупный анализ распределений по S и V согласуется с моделью, предполагающей взаимодействие PARP1 как с ДНК, так и с гистоновыми компонентами.

В отличие от «+P1», гистограмма распределения по площади проекции (S) для препарата «+P2» (**Рис. П7**) не демонстрирует существенных изменений по сравнению с контрольным препаратом. При этом наблюдается смещение основного пика: от диапазона 1500–1750 нм² в контроле (**Рис. П5**) к диапазону 2000–2250 нм² в «+P2» (**Рис. П7**). Важно отметить, что это смещение может быть связано, по крайней мере частично, с увеличенной высотой NCP из-за взаимодействия PARP2 с ядром нуклеосомы. Этот факт приводит к увеличению площади проекции высоких структур при сканировании АСМ. Качественный анализ изображений подтверждает данные гистограмм: ручной анализ АСМ-изображений не выявил заметных отличий во внешнем виде и расположении комплексов «CLP+P2» по сравнению с контрольным препаратом. Распределение по объёму (V) демонстрирует профиль, качественно схожий с контрольным препаратом, включая наличие двух пиков (**Рис. П11**). Ключевое отличие в препарате «+P2» — более симметричная форма основного пика, что может указывать на равномерное распределение PARP2 на NCP в препарате CLP.

Данные гистограмм распределения по площади проекции (**Рис. П8**) и объёму (**Рис. П12**) указывают на стабилизирующее влияние PARP3 на комплексы CLP, проявляющееся в повышенной структурной упорядоченности по сравнению с контрольным препаратом (**Рис. П5, Рис. П9**). Анализ распределения комплексов CLP по количеству NCP в препарате «+P3» выявил крайне низкую представленность комплексов с 4 и 5 NCP (**Таблица П1**). Это наблюдение согласуется с гипотезой, что такие мелкие комплексы могут возникать преимущественно вследствие дестабилизации более крупных структур (например, 6 NCP или 7 NCP). Для контрольного препарата низкий уровень CLP содержащих 9 и 10 NCP (**Таблица П1**) может быть связан с пониженной стабильностью таких комплексов, из-за формирования NCP на участках ДНК не содержащих NPS «601», что делает их более подверженными декомпактизации. Гистограмма распределения частиц по площади проекции препарата «+P3» (**Рис. П8**) демонстрирует пять выраженных дискретных пиков, соответствующих следующим диапазонам

значений площади: 1250–1500 нм² (предположительно, NCP6); 1500–1750 нм² (предположительно, NCP7); 2000–2250 нм² (предположительно, NCP8); 2500–2750 нм² (предположительно, NCP9); 3000–3250 нм² (предположительно, NCP10). Особенно высокая интенсивность пика в диапазоне 1250–1500 нм² может свидетельствовать о дополнительной стабилизации структур, соответствующих NCP6, возможно, за счёт организации в более упорядоченное хроматиновое волокно. Однако такой вывод требует дополнительных исследований.

При изучении гистограммы распределения CLP по объёму (**Рис. П12**), наблюдается аналогичная многомодовое распределение с пятью основными пиками, что подтверждает формирование дискретных популяций комплексов с различными геометрическими параметрами. Узкая ширина пиков на двух гистограммах (**Рис. П8, Рис. П12**) характерна для стабильных структур с ограниченными конформационными флуктуациями, поддерживающих определённую геометрию.

Линейная регрессия, построенная для точечной диаграммы зависимости объёма (V) от площади проекции (S) в препарате «+P3» ($y = 1,7129x - 239,3$; где y — V, x — S), демонстрирует качественное сходство наклона с аналогичной зависимостью для контрольного препарата ($y = 1,5544x - 148,36$) (**Рис. П15**). Совпадение наклонов (коэффициент $\sim 1,55$ и $1,71$) при разных значениях смещения позволяет предположить, что добавление PARP3 не приводит к кардинальному изменению пропорций комплексов (соотношения V/S), характерных для нуклеосомной организации в контрольных условиях. Это указывает на сохранение нуклеосомной организации CLP *in vitro*.

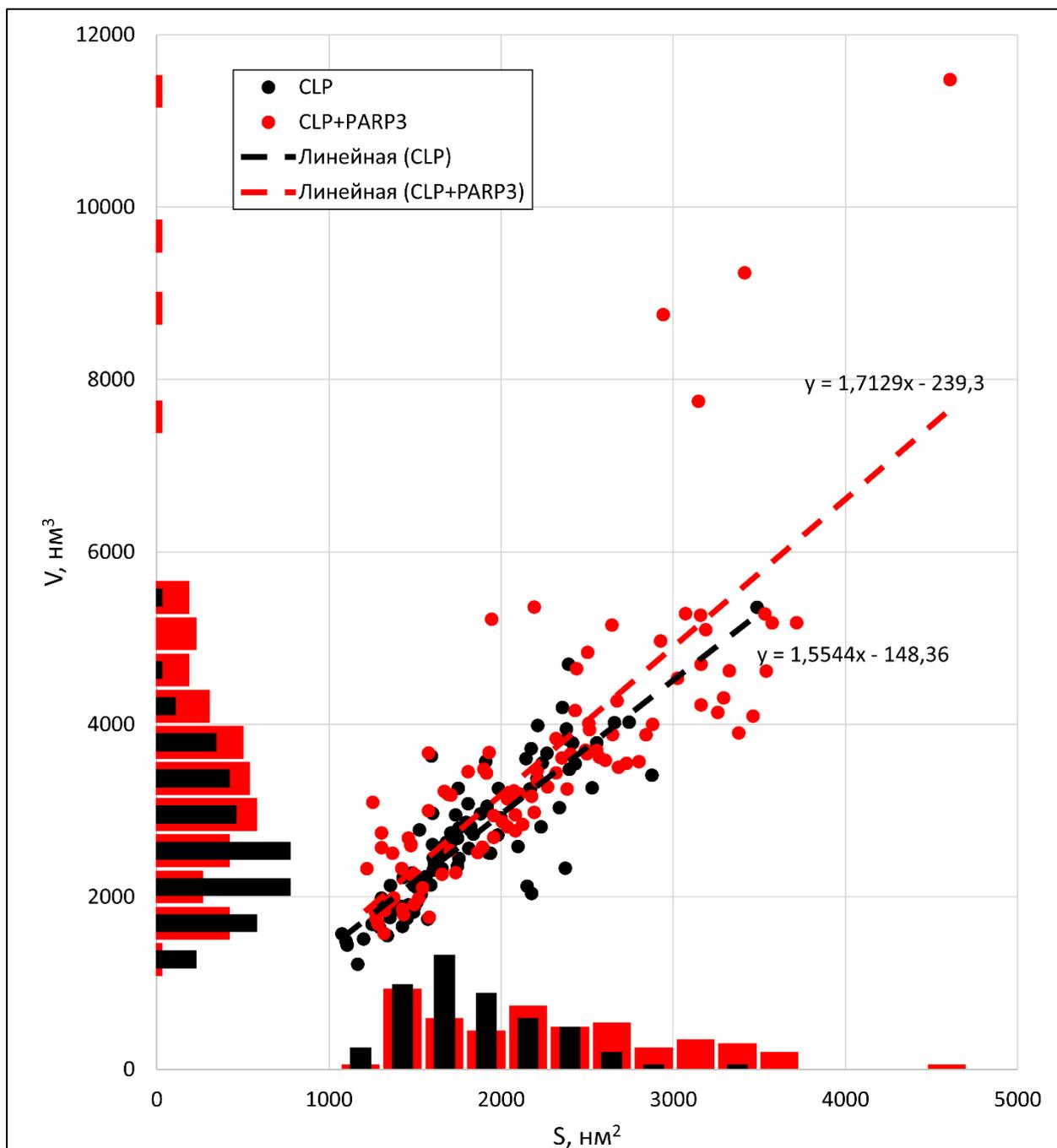


Рис. П15. Диаграмма распределения хроматиноподобных частиц (CLP, чёрные точки) и их комплексов с белком PARP3 (CLP + PARP3, красные точки). По оси Y — объём частиц (nm^3); по оси X — площадь проекции частиц (nm^2). Каждая точка соответствует отдельной частице CLP или комплексу CLP + PARP3. Пунктирная чёрная линия — аппроксимации данных контрольного препарата CLP. Красная пунктирная линия — аппроксимации данных препарата CLP в комплексе с PARP3. Гистограммы, расположенные на осях графика, отражают плотность точек в данной области диаграммы распределения частиц. Цвета баров соответствуют цветам точек.