

УДК 577.29

## ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ДНК-ЗАВИСИМЫХ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА PARP С НУКЛЕОСОМНЫМИ ЧАСТИЦАМИ, СОДЕРЖАЩИМИ ИНТЕРМЕДИАТЫ НАЧАЛЬНЫХ СТАДИЙ ПРОЦЕССА BER

© 2022 А.А. Украинцев<sup>1#</sup>, Е.А. Белоусова<sup>1#</sup>, М.М. Кутузов<sup>1</sup>, О.И. Лаврик<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090 Новосибирск, Россия; электронная почта: lavrik@niboch.nsc.ru

<sup>2</sup> Новосибирский государственный университет, 630090 Новосибирск, Россия

Поступила в редакцию 05.10.2021

После доработки 20.01.2022

Принята к публикации 22.02.2022

Клеточным сигналом в ответ на повреждение ДНК является реакция (ADP-рибозил)ирования, катализируемая ДНК-зависимыми белками семейства поли(ADP-рибозо)полимераз (PARP) – PARP1, PARP2 и PARP3. Эти белки являются участниками процесса эксцизионной репарации оснований (BER). Несмотря на обширные исследования, остаётся неизвестным, каким образом PARP участвуют в регуляции процесса BER и как распределяются роли между ДНК-зависимыми членами семейства. В настоящей работе мы исследовали взаимодействие ДНК-зависимых белков семейства PARP с нуклеосомными частицами, содержащими в своем составе ДНК-интермедиаты начальных стадий процесса BER. Для этого были реконструированы нуклеосомы на основе последовательности ДНК Widom «Clone 603», содержащие повреждение вблизи одного из тупых концов ДНК-дуплекса. Были определены константы диссоциации комплексов PARP с нуклеосомами, ДНК которых содержали урацил (Native), апуриновый/апиримидиновый сайт (AP-сайт) или однонуклеотидную брешь с 5'-dRp-фрагментом (Gap). Показано, что сродство белков к нуклеосоме увеличивается в ряду PARP3 << PARP2 < PARP1, а сродство каждого белка к определённому типу повреждений увеличивается в ряду Native = AP-сайт < Gap для PARP1 и PARP2 и Gap <<< Native = AP-сайт – для PARP3. Также были определены области взаимодействия белков PARP с нуклеосомой методами боргидридной сшивки и футпринтинга. На основании полученных и литературных данных обсуждены закономерности вовлечения PARP1, PARP2 и PARP3 во взаимодействие с нуклеосомными частицами, содержащими ДНК-интермедиаты процесса BER.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** нуклеосома, PARP1, PARP2, PARP3, BER.

**DOI:** 10.31857/S0320972522030022

### ВВЕДЕНИЕ

BER (base excision repair) – система эксцизионной репарации оснований ДНК, действие которой направлено на удаление небольших повреждений, возникающих в процессе нормальной жизнедеятельности клетки и не вызывающих значительных искажений структуры двойной спирали ДНК. К таким повреждениям относятся апуриновые/апиримидиновые сай-

ты (AP-сайты), алкилированные или окисленные азотистые основания [1–3]. Процесс BER проходит в несколько этапов и требует активности целого ряда ферментов и белковых факторов. На первом этапе происходит распознавание повреждённого азотистого основания с последующим его удалением; на втором этапе происходит гидролиз сахарно-фосфатного остова по остатку AP-сайта; на третьем – реализуется процессинг разрыва, включающий коррекцию концов разрыва и включение комплементарного dNMP; на последнем этапе происходит лигирование цепи ДНК [4].

Несмотря на то что сам процесс BER известен достаточно давно, механизмы его регуляции являются основным предметом исследований многих лабораторий. В ответ на повреждение молекулы ДНК регуляция процессов репарации осуществляется в том числе с помощью клеточного сигнала поли(ADP-рибозил)ирования (PARирирования), катализируемого белка-

Принятые сокращения: пнт – пара нуклеотидов; AP-сайт – апуриновый/апиримидиновый сайт; AP-кластер – кластер AP-сайтов; APE1 – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза I; BER – эксцизионная репарация оснований; DNase I – дезоксирибонуклеаза I; 5'-dRP – 5'-дезоксирибозофосфат; Gap – 5'-dRp-фрагмент; NCP – нуклеосома, нуклеосомная частица; PARирирование – поли(ADP-рибозил)ирование; PARP – поли(ADP-рибозо)полимераза; UDG – урацил-ДНК-гликозилаза.

\* Адресат для корреспонденции.

# Авторы внесли равный вклад в работу.

ми семейства поли(ADP-рибозо)полимераз (PARP) [5]. Из 17 представителей семейства PARP три белка (PARP1, PARP2 и PARP3) являются ДНК-зависимыми, активируются и участвуют в формировании клеточного ответа на повреждение ДНК [6–8]. Белки PARP1 и PARP2 катализируют присоединение полимера ADP-рибозы, а PARP3 – перенос одного остатка ADP-рибозы на белок-акцептор [7–9]. Их мишенями преимущественно являются белки, обеспечивающие динамику процесса укладки хроматина и метаболизм ДНК, включая гистоны, транскрипционные факторы, белки репарации ДНК, а также сами PARP1, PARP2 и PARP3 [8, 10–14].

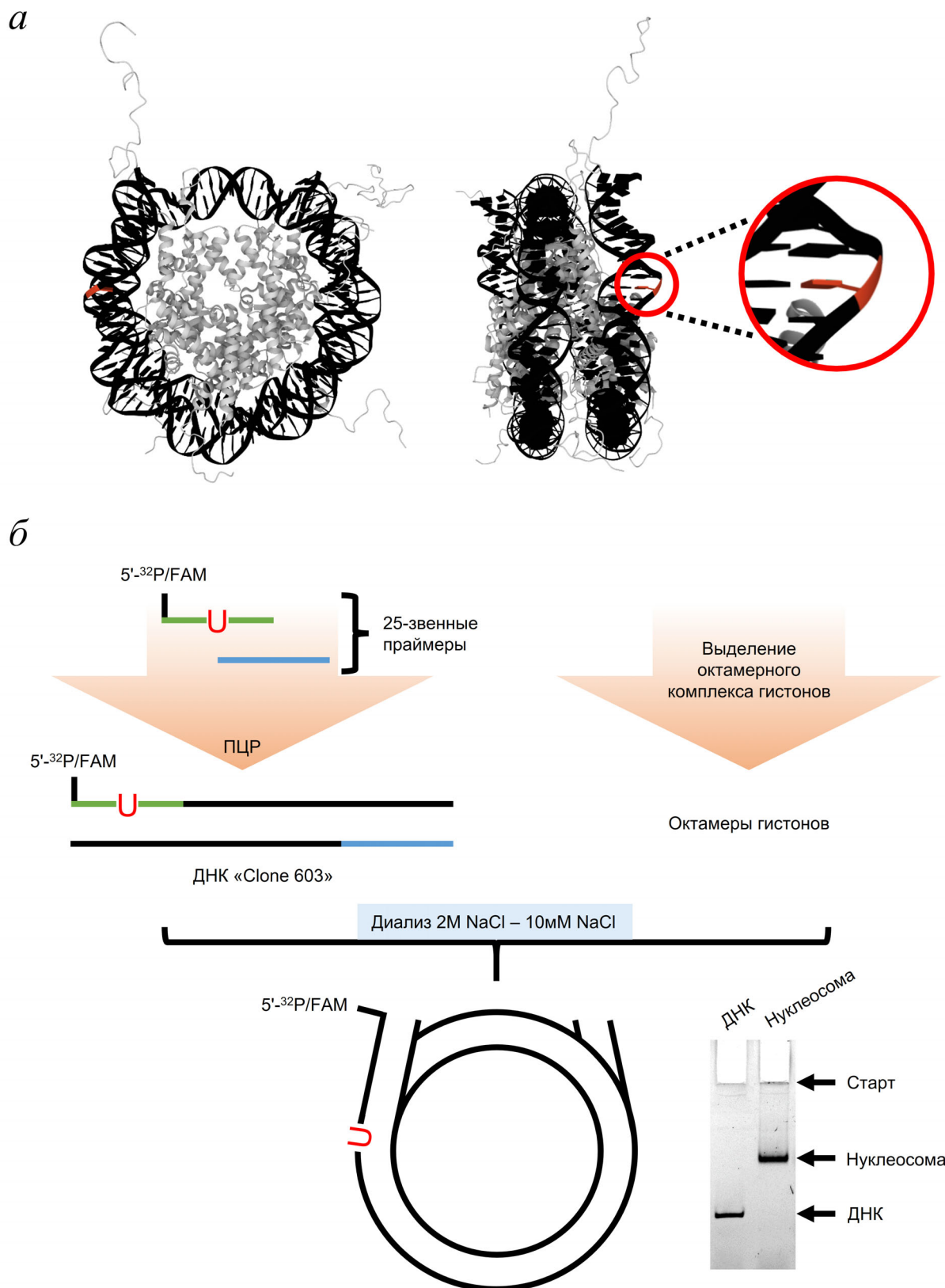
Белок PARP1 способен распознавать различные повреждения ДНК, в том числе интермедиаты процесса BER, активируется при взаимодействии с ними и катализирует реакцию PARилирования в ответ на их появление [9, 15–22]. PARP2 активируется при взаимодействии с одноцепочечными разрывами, частичными ДНК-дуплексами с одно- и динуклеотидными брешами и флэп-структурами [9, 21–26]. Было показано, что PARP3 также 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 [24, 11]. Кроме того, было показано, что PARP1, PARP2 и PARP3 катализируют ADP-рибозилирование ДНК, и реакция идёт наиболее эффективно при взаимодействии с ДНК-дуплексами, содержащими однуклеотидную брешь с каноническими 5'-P- и 3'-ОН-группами [27–29].

На сегодняшний день множество работ по исследованию регуляции процесса BER с помощью ДНК-зависимых белков PARP были проведены в контексте свободных ДНК-субстратов, тогда как в клетке ДНК компактизована в хроматин. Базовой структурной единицей хроматина является нуклеосома (NCP). Нуклеосома представляет собой белок-нуклеиновый комплекс, в котором вокруг белкового ядра намотана ДНК длиной 147 пнт [30, 31] (рис. 1, а). Ядро нуклеосомы состоит из четырёх гетеродимеров гистонов: двух H3–H4 и двух H2A–H2B. Гистоны являются высококонсервативными белками среди эукариот и имеют молекулярную массу ~11–15 кДа. Гистоновый октамер связывается с ДНК длиной ~121 пнт, ещё по 13 пнт с концов ДНК поддерживается за счёт взаимодействий с N-концевыми  $\alpha$ -спиралями гистонов H3. Кроме того, 8 оставшихся N- и C-«хвостов» гистонов, имеющих большую подвижность, выступают за пределы нуклеосомного ядра. Потенциально эти участки могут влиять на белок-нуклеиновые взаимодействия других,

например репарационных ДНК-связывающих белков. Нуклеотиды в составе ДНК-дуплекса располагаются несимметрично относительно гистонового октамера и могут быть обращены внутрь, наружу или занимать промежуточное положение относительно октамера гистонов [32]. Различная ориентация нуклеотидов накладывает отпечаток на функциональную активность ферментов при их взаимодействии с нуклеосомой [33, 34]. Наиболее доступными для ферментов являются ориентированные наружу нуклеотиды, наименее – ориентированные внутрь.

На сегодняшний день известно, что при взаимодействии с нуклеосомной частицей PARP1 связывается как с нуклеосомной ДНК [35], так и с октамером гистонов [36, 37]. PARP2 тоже способен эффективно взаимодействовать с ДНК в составе нуклеосомы [38]. Группа Caldecott [11] показала, что в нуклеосомном контексте PARP3 может являться сенсором одноцепочечных разрывов с 5'-P- и 3'-ОН-группами, но количественные характеристики такого взаимодействия определены не были. Кроме того, PARP3 способен моно(АДФ-рибозил)ировать гистон H2B по аминокислотному остатку Glu2 *in vitro*. Таким образом, совокупность полученных данных говорит о способности ДНК-зависимых белков семейства PARP взаимодействовать с разными компонентами NCP. Однако характер взаимодействий PARP1, PARP2 и PARP3 с нуклеосомной частицей, содержащей в своём составе интермедиаты начальных стадий процесса BER, остаётся неизвестным.

Настоящая работа посвящена исследованию взаимодействия ДНК-зависимых белков семейства PARP, а именно: PARP1, PARP2 и PARP3, с нуклеосомными частицами, имитирующими интермедиаты начальных стадий процесса эксцизионной репарации оснований. В качестве субстрата были использованы NCP, реконструированные в присутствии октамера гистонов домашних кур *Gallus gallus* и 147 пнт ДНК-последовательности Widom «Clone 603», содержащей изотоп  $^{32}\text{P}$  или остаток FAM на одном из 5'-концов ДНК-дуплекса и имеющей в своём составе урацил в положении 12 от 5'-меченого конца (рис. 1, б). Интермедиаты начальных стадий процесса BER, т.е. NCP, содержащие в своём составе ДНК с AP-сайтом или одноцепочечным разрывом с 5'-дезоксирибозофосфатом (5'-dRp) и 3'-P группами, получали при обработке реконструированных частиц урацил-ДНК-гликозилазой (UDG) и/или апуриновой/апириимидиновой эндонуклеазой 1 (APE1). С помощью методов EMSA, боргидридной сшивки и ферментативного футпринтинга с использованием дезокси-



**Рис. 1.** Структура нуклеосомы (PDB: ID 1KX5); красным выделен нуклеотид в позиции 12 ДНК-дуплекса, гетероциклическое основание которого обращено наружу относительно октамера гистонов (*a*). *б* – Схема реконструирования нуклеосомы (согласно [31]) и автограф 4%-ного нативного ПААГ после разделения продуктов реакции реконструирования нуклеосом

рибонуклеазы I (DNase I) были охарактеризованы взаимодействия белков PARP1, PARP2 и PARP3 с NCP. На основании полученных результатов было выдвинуто предположение о разном характере взаимодействия ДНК-зависимых белков семейства PARP с повреждениями ДНК, имитирующими интермедиаты начальных этапов процесса BER в нуклеосомном контексте.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для наработки целевой ДНК была использована плазида pGEM-3z/603 («AddGene», США), содержащая последовательность ДНК Widom «Clone 603»: 5'-ACCCAGGGACTTG-AAGTAATAAGGACGGAGGGCCTCTTTCAA-CATCGATGCACGGTGGTTAGCCTTGGATTGCGCTCTACCGTGCCTAAGCGTACTTAGAAGCCCGAGTGACGACTTCACACGGTAGGTGGGCGCGCGAAGTGGG-3', 147 нт.

Синтетические олигодезоксирибонуклеотиды, использованные в качестве праймеров при амплификации ДНК «Clone 603», в том числе олигодезоксирибонуклеотиды, меченные флуоресцеином по 5'-концу (5'-FAM), были синтезированы в Лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН (Россия): 5'-ACCCAGGGACCTGAAGTAATAAGG-3'; 5'-FAM-ACCCAGGGGACCTGAAGTAATAAGG-3'; 5'-CCCAGTTCGCGCGCGCCACC-3'.

В работе использовали следующие реактивы: диализные мембраны 3,5 кДа («Spectrum Laboratories Inc.», США); бромфеноловый синий и ксиленцианол («Fluka», Швейцария); [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-АТФ с удельной активностью 185 ТБк/ммоль и [ $\alpha$ - $^{32}$ P]-АТФ с удельной активностью 111 ТБк/ммоль (Лаборатория биотехнологии ИХБФМ СО РАН); Taq-полимераза («БИОСАН», Россия); DNase I («New England Biolabs», США). Основные реактивы, использованные в работе, были производства «Sigma» (США).

Рекомбинантные белки PARP1 человека, PARP2 *Mus musculus*, PARP3 человека, гистоновые октамеры H2A, H2B, H3 и H4 *G. gallus* были выделены согласно опубликованным ранее методикам [28, 31, 39] соответственно. Рекомбинантная APE1 человека и урацил-ДНК-гликозилаза *E. coli* были любезно предоставлены Ходыревой С.Н. (ИХБФМ СО РАН), полинуклеотидкиназа фага T4 – Петрусевой И.О. (ИХБФМ СО РАН).

**Получение субстратов ДНК и NCP.** В работе использовали олигодезоксирибонуклеотидный праймер, содержащий в положении 12 остаток dUMP и меченный по 5'-концу с помощью

[ $\gamma$ - $^{32}$ P]-АТФ полинуклеотидкиназы T4, как описано в работе Belousova et al. [28], либо меченный флуоресцеином при химическом синтезе. Амплификацию ДНК с использованием 5'-[ $^{32}$ P]- или 5'-FAM-олигодезоксирибонуклеотидных праймеров для последующего реконструирования NCP проводили в соответствии с протоколом, описанным ранее [31]. При наработке ДНК-субстрата, содержащего статистически распределённый dUMP для получения кластера AP-сайтов (AP-кластера), реакционная смесь для амплификации содержала смесь dNTP в соотношении dATP/dGTP/dCTP/dUTP/dTTP = 1/1/1/0,9/0,1. Чистоту препарата реконструированных NCP оценивали по электрофоретической подвижности в 4%-ном ПААГ в неденатурирующих условиях. При использовании флуоресцентных компонентов в смеси после разделения продуктов реакции в геле детекцию проводили с помощью системы «Typhoon FLA 9500» («GE Healthcare Life Science», США) с использованием лазера с длиной волны возбуждения 473 нм. При использовании радиоактивных компонентов детекцию проводили с помощью радиолуминесцентного сканирования экрана Image Screen K («Kodak», США) с помощью системы «Typhoon FLA 9500» с использованием лазера с длиной волны возбуждения 635 нм. Полученные электрофореграммы анализировали с использованием программы «Quantity One» («Bio-Rad», США). Во всех случаях AP-сайт получали *in situ* с помощью активности UDG. Для этого реакционную смесь, содержащую 0,1 мкМ ДНК или NCP с одиночным или статистически распределённым по ДНК остатком урацила и 4 мкМ UDG в буфере следующего состава: 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 0,1% NP-40, 0,2 мМ EDTA, 5 мМ  $\beta$ -МЕ, 10 мМ NaCl; инкубировали при 37 °С в течение 30 мин, после чего использовали для дальнейших превращений. Получение субстратов, содержащих брешь, осуществляли ферментативным гидролизом AP-сайта с помощью APE1. Реакционная смесь содержала 0,1 мкМ ДНК или NCP с одиночным остатком урацила, 4 мкМ UDG и 10 нМ APE1 в буфере следующего состава: 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 0,1% NP-40, 0,2 мМ EDTA, 5 мМ  $\beta$ -МЕ, 10 мМ NaCl и 5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 30 мин, после чего использовали для дальнейших превращений.

**Определение значений  $K_d$ .** Значения констант диссоциации определяли методом EMSA, согласно материалам работы Kutuzov et al. [38]. Реакционная смесь объёмом 10 мкл содержала 0,1 мкМ 5'-[ $^{32}$ P]-меченой ДНК или NCP и 0,001,

0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 мкМ PARP1, PARP2 или PARP3 или 0,05, 0,1, 0,3, 0,5, 0,7, 0,85, 1, 1,5 мкМ PARP3 для структуры с 5'-dRp-фрагментом (Gap) Gap-ДНК и 0,2, 0,5, 1, 1,5, 3, 5, 7,5, 10 мкМ PARP3 – для структуры Gap-NCP в буфере следующего состава: 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 0,1% NP-40, 0,2 мМ EDTA, 5 мМ  $\beta$ -МЕ, 10 мМ NaCl и 5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Реакционную смесь инкубировали при 37 °С в течение 20 мин. Компоненты реакционной смеси разделяли в 4%-ном ПААГ в неденатурирующих условиях. Детекцию продуктов электрофоретического разделения в геле проводили, как описано выше. Расчёт значений констант диссоциации проводили с использованием программного обеспечения OriginPro 7.5 («OriginLab Corporation», США).

**Изучение белок-нуклеиновых взаимодействий методом боргидридной сшивки.** Реакционную смесь объёмом 10 мкл, содержащую 0,2 мкМ 5'-[FAM]-меченую AP-ДНК или AP-NCP и 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 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  $\beta$ -МЕ, 10 мМ NaCl; инкубировали при 37 °С в течение 20 мин. Далее к смеси добавляли NaBH<sub>4</sub> до конечной концентрации 20 мМ и инкубировали во льду в течение 30 мин, после чего реакционную смесь прогревали при 65 °С в течение 5 мин для удаления остатков непрореагировавшего NaBH<sub>4</sub>. Для деградации несвязанной белками ДНК в реакционную смесь добавляли 1 Ед DNase I и инкубировали при 37 °С в течение 15 мин. Реакцию останавливали добавлением 1/5 объёма раствора буфера Лэммли. Анализ компонентов реакционной смеси проводили с помощью гель-электрофореза в 10%-ном ПААГ по Лэммли [40]. Детекцию продуктов реакции проводили, как описано выше.

**Изучение белок-нуклеиновых взаимодействий методом ферментативного футпринтинга.** Реакционная смесь объёмом 10 мкл содержала 0,2 мкМ 5'-[<sup>32</sup>P]-меченой ДНК или NCP 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  $\beta$ -МЕ, 10 мМ NaCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>. Реакционную смесь инкубировали при 37 °С в течение 15 мин. Для реакции PARирования реакционную смесь дополняли 400 мкМ NAD<sup>+</sup>. Далее пробы с ДНК обрабатывали 0,002 Ед DNase I, пробы с NCP – 0,007 Ед 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

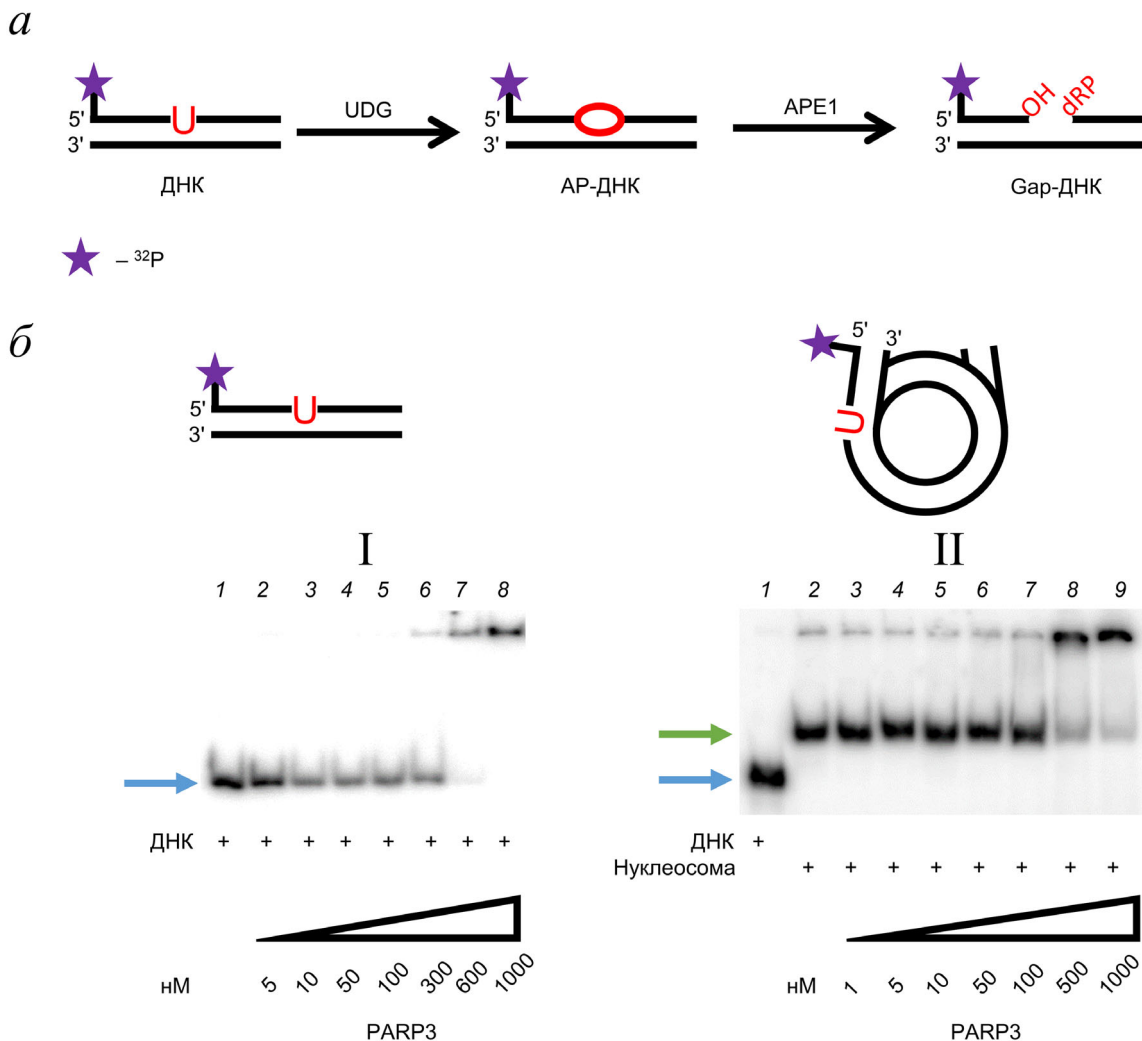
смесь обрабатывали метоксиамином в конечной концентрации 30 мМ во льду в течение 30 мин. Реакцию останавливали добавлением 1/5 объёма раствора, содержащего 90% формамида, 50 мМ EDTA, 0,025% бромфенолового синего и 0,025% ксиленцианола. Пробы разделяли в 20%-ном ПААГ в денатурирующих условиях. Детекцию и обработку результатов проводили, как описано выше.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Определение значений  $K_d$  комплексов ДНК/NCP–PARP1/PARP2/PARP3 методом задержки в геле.** Для оценки вклада взаимодействий ДНК-зависимых белков семейства PARP с повреждением в составе ДНК-дуплекса или гистоновыми компонентами NCP был использован метод EMSA [41]. В работе были использованы ДНК-субстраты, свободный ДНК-дуплекс и намотанный на октамер гистонов, имитирующие интермедиаты начальных стадий процесса BER – 147 пнт ДНК с AP-сайтом и 147 пнт ДНК, содержащая однонуклеотидную брешь с 5'-dRp-фрагментом – Gap (рис. 2, а). Для контрольных экспериментов была использована нативная форма 147 пнт ДНК. Наличие на радиоавтографе полос, обладающих меньшей электрофоретической подвижностью по сравнению с контрольным препаратом, говорит об образовании продуктов комплексообразования белков PARP со свободной ДНК и ДНК/гистонами в составе NCP (рис. 2, б). По результатам EMSA были рассчитаны значения констант диссоциации для всех исследованных типов комплексов (таблица).

Оказалось, что сродство ДНК-связывающих белков PARP к использованным субстратам изменяется в ряду PARP3 << PARP2 < PARP1. При появлении повреждения в составе ДНК-дуплекса белки PARP1 и PARP2 проявляют следующую закономерность как при взаимодействии с ДНК в свободной форме, так и при комплексообразовании с NCP: Native = AP < Gap. Повышенное сродство PARP1 к Gap-субстратам проявляется как при использовании свободной ДНК, так и при использовании нуклеосомы. При формировании комплексов PARP2 с NCP этот эффект становится особенно выраженным. Следует отметить, что количественные данные, полученные методом измерения анизотропии флуоресценции для комплексов PARP1 и PARP2 с различными типами NCP, в общем случае коррелируют с данными метода EMSA [38].

Для PARP3 в целом наблюдается более низкое сродство к использованным субстратам по



**Рис. 2.** Схема получения субстратов начальных стадий процесса BER (*a*). *б* – Радиоавтограф 4%-ного ПААГ после разделения продуктов реакции комплексообразования PARP3 с нативной ДНК в свободном (I) и нуклеосомном (II) состояниях в нативных условиях. I: дорожка 1 – свободная нативная ДНК, дорожки 2–8 – ДНК с PARP3; II: дорожка 1 – свободная нативная ДНК, дорожка 2 – NCP, дорожки 3–9 – NCP с PARP3. Стрелками обозначена подвижность: синей – свободной ДНК, зеленой – NCP. Концентрация ДНК/NCP составляла 100 нМ; концентрация PARP3 – 1–1000 нМ

сравнению с PARP1 и PARP2, а закономерность в изменении прочности комплекса трансформируется к  $\text{Gap} \lll \text{Native} = \text{AP}$  независимо от формы ДНК.

**Изучение взаимодействия ДНК-зависимых белков семейства PARP с нуклеосомами методом боргидридной сшивки.** В работах Zhou et al. [42], Sczeranski et al. [43] и Yang et al. [44] показано, что в составе нуклеосомной частицы октамеры гистонов способны образовывать основания Шиффа с AP-сайтами ДНК. С одной стороны, в зависимости от расположения AP-сайта взаимодействие гистонов с таким типом повреждения может влиять и на взаимодействие ДНК-связывающих белков, например PARP1, PARP2 и PARP3 с повреждённой нуклеосомной ДНК.

С другой стороны, следствием формирования основания Шиффа между белком и цепью ДНК может быть расщепление последней по AP-сайту с образованием одноцепочечного разрыва [43]. Соответственно, если AP-сайты образуются одновременно в двух цепях ДНК-дуплекса, то возможно появление двуцепочечного разрыва наиболее токсичной формы поврежденных [44]. Изучение взаимодействия гистонов и белков семейства PARP с ДНК, содержащей AP-сайты в составе нуклеосомы, может помочь в понимании механизма репарации множественных повреждений в контексте хроматина, особенно учитывая тот факт, что PARP1 и PARP2 обладают AP-лиазной активностью [16, 45].

Остатки дезоксирибозы AP-сайтов в молекуле ДНК представлены в нескольких равновесных формах [46]. Одной из них является ациклическая альдегидная форма AP-сайта, которая может образовывать основания Шиффа с аминоклассами ДНК-связывающих белков [47], в частности с различными участками BER [2, 16, 45, 48, 49]. Основание Шиффа формируется как интермедиат многих ферментативных реакций, и его распад по механизму  $\beta$ -элиминирования приводит к разрыву сахарофосфатного остова ДНК [42]. Тем не менее *in vitro* этот интермедиат можно стабилизировать восстановлением боргидридом натрия [50] (рис. 3, а). Таким образом, при дальнейшем анализе продуктов реакции с помощью гель-электрофореза по Лэммли появление белок-нуклеиновых аддуктов будет свидетельствовать о формировании комплекса между исследуемым белком и локализованным AP-сайтом ДНК. Следует отметить, что при анализе продуктов реакции могут наблюдаться аддукты, соответствующие пришивке белка к целой цепи ДНК, а также к участку цепи ДНК, расщепленному по положению AP-сайта. Кроме того, использование денатурирующих условий при проведении эксперимента не всегда гарантирует полную денатурацию двух цепей ДНК-дуплекса, особенно в составе белок-нуклеинового аддукта (рис. 3, б). Все эти факты будут влиять на электрофоретическую подвижность аддуктов. Метод боргидридной сшивки можно применять как универсальный подход при исследовании белок-нуклеиновых взаимодействий с использованием AP-сайт-содержащих ДНК различной структуры [51].

Для установления характера взаимодействий белков PARP1, PARP2 и PARP3 с AP-содержащими нуклеосомными частицами методом боргидридной сшивки были использованы 5'-FAM-меченые ДНК-структуры, содержащие как одиночный AP-сайт, так и кластер AP-сайтов, в котором повреждения были распределены статистически по всей длине дуплекса. Статистическое распределение AP-сайтов по ДНК-субстрату позволит выявить потенциальные участки взаимодействия белков семейства PARP по всей поверхности нуклеосомной частицы независимо от положения AP-сайта, как одиночного повреждения. Для контрольных экспериментов были использованы свободные AP-ДНК аналогичной структуры.

На рис. 4 и 5 представлены автографы гелей после разделения продуктов реакции боргидридной сшивки с помощью гель-электрофореза по Лэммли. Оказалось, что все три белка семейства PARP способны взаимодействовать как с

Константы диссоциации комплексов белков PARP1, PARP2 и PARP3 со свободной ДНК и нуклеосомой\*

ДНК			
Структура	$K_d$ , нМ (PARP1)	$K_d$ , нМ (PARP2)	$K_d$ , нМ (PARP3)
Native	113 ± 5	300 ± 100	461 ± 9
AP	92 ± 3	330 ± 80	426 ± 8
Gap	48 ± 3	240 ± 80	750 ± 20
Нуклеосома			
Native	65 ± 3**	192 ± 10**	287 ± 5
AP	61 ± 5**	130 ± 4**	250 ± 30
Gap	38 ± 4**	57 ± 8**	4400 ± 300

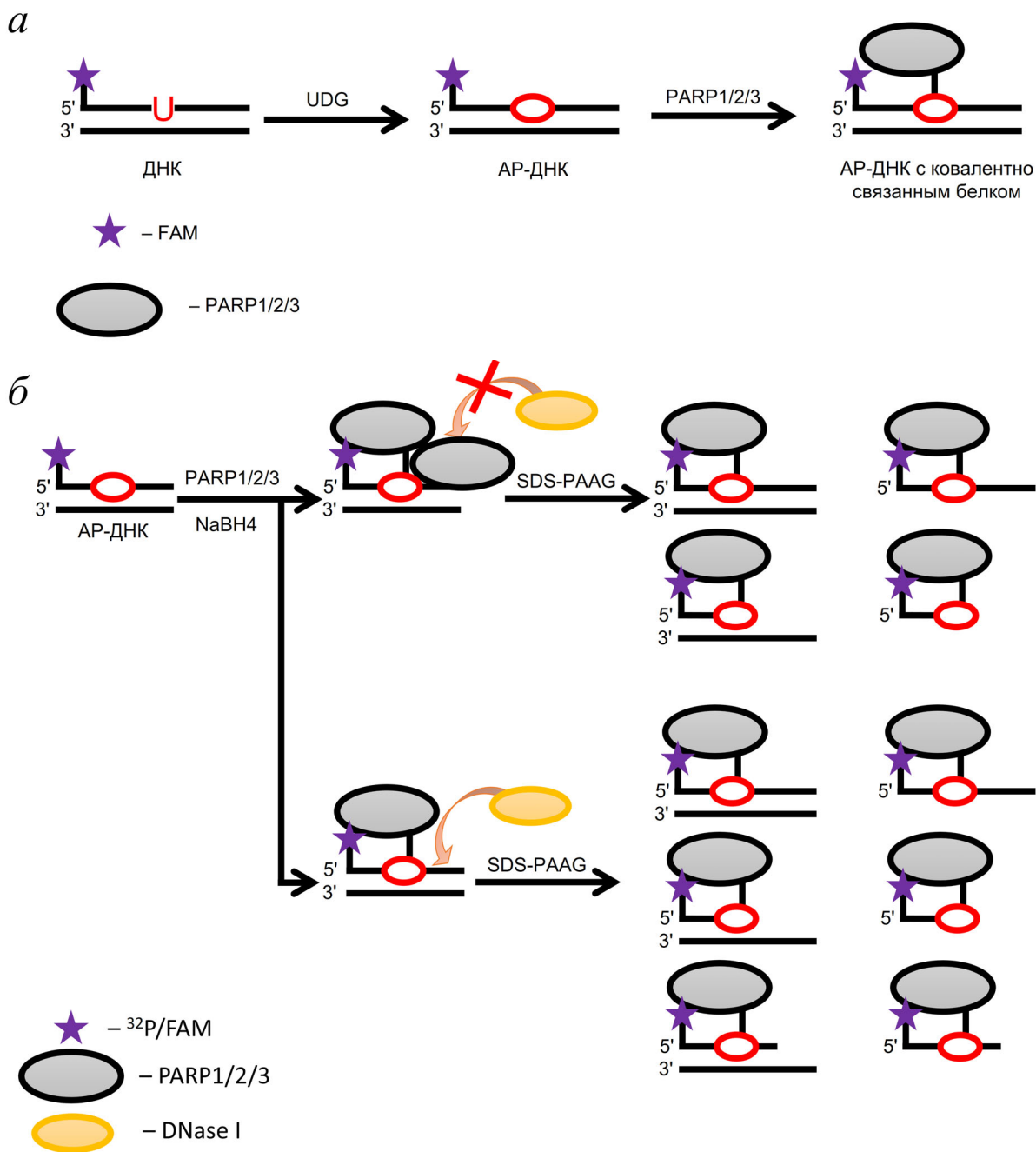
\* Данные представлены как среднее минимум из трёх независимых экспериментов.

\*\* Данные опубликованы в работе Kutuzov et al. [38].

одиночным AP-сайтом, так и с AP-кластером свободной или нуклеосомной ДНК. Формирование оснований Шиффа между PARP1, PARP2 и AP-сайтом в составе свободной ДНК было показано ранее [15, 16, 45]. Формирование оснований Шиффа между PARP3 и AP-сайтом в составе свободной ДНК, а также PARP1, PARP2, PARP3 и AP-сайтом в составе нуклеосомы показано впервые.

При добавлении PARP1 в реакционную смесь наблюдается образование ковалентных аддуктов с AP-сайтом, расположенным вблизи тупого конца свободной или нуклеосомной ДНК, с молекулярной массой выше 95 кДа (рис. 4, а и 5, 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. Однако при взаимодействии PARP1 с AP-кластером как в составе свободной ДНК, так и в нуклеосомном контексте также 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 перера-



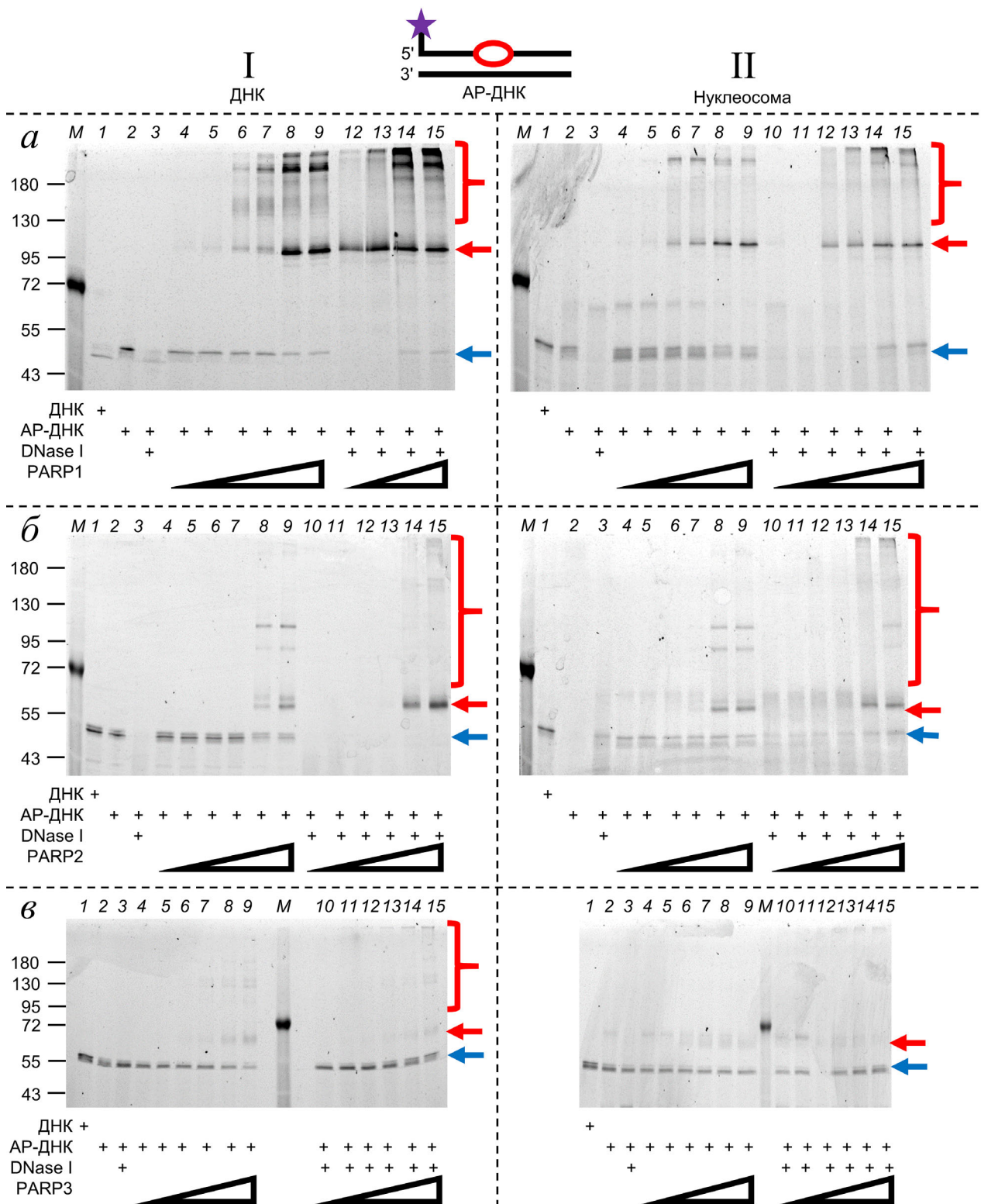
**Рис. 3.** Получение белок-нуклеиновых аддуктов методом боргидридной сшивки. *a* – Схема получения ковалентного аддукта ДНК–белок; *б* – типы возможных белок-нуклеиновых аддуктов при разделении продуктов реакции гель-электрофорезом по Лэммли

спределение 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. 4, бI и 5, бI) при использовании свободной ДНК и с 53 до 64% (дорожка 15 на рис. 4, бII и 5, бII) при использовании ДНК в составе NCP (рис. 4, б и 5, б, дорожки 4–15). Подобные изменения могут быть следствием взаи-

модействия молекулы PARP2 с разными участками NCP.

Сродство PARP3 к AP-содержащим субстратам существенно ниже, чем PARP1 и PARP2, что выражается в том числе в количестве непрореагировавшей с PARP3 AP-содержащей ДНК (отмечено синей стрелкой на рис. 4, в, ср. дорожки 1 и 10–15 в обеих частях). Интересно, что интенсивность сшивки между PARP3 и NCP-





**Рис. 4.** Взаимодействие белков PARP1 (а), PARP2 (б) и PARP3 (в) с AP-сайтом в составе свободной (I) и нуклеосомной (II) ДНК (см. «Материалы и методы»). Автографы гелей после разделения продуктов реакции в 10%-ном ПААГ по Лэммли. Слева указаны положения маркёров молекулярных масс (кДа). М – маркёры молекулярных масс; дорожка 1 – нативная ДНК/НСП; дорожка 2 – ДНК/НСП, обработанная UDG; дорожка 3 – ДНК/НСП, обработанная UDG и DNase I. Концентрация PARP в дорожках 4–9 и 10–15 составляла 5, 10, 50, 100, 500, 1000 нМ соответственно. Синими стрелками обозначена электрофоретическая подвижность нерасщеплённой цепи AP-ДНК, красными стрелками и скобками – белок-нуклеиновые аддукты

субстратом возрастает при переходе от одиночного к кластерному AP-сайту — доля комплекса с молекулярной массой выше 55 кДа по отношению к непрореагировавшей ДНК увеличивается с 22% до 38% (ср. дорожки 15 на рис. 4, вII и 5, вII). Однако образования аддуктов, соответствующих одновременному взаимодействию нескольких молекул PARP3 с несколькими AP-сайтами в составе NCP, не наблюдается (рис. 5, вII), что может быть обусловлено взаимодействием PARP3 с AP-сайтом, расположенным вблизи тупого конца ДНК-дуплекса или наличием структурных изменений AP-NCP в присутствии большого количества AP-сайтов.

Следует отметить, что сшивок, соответствующих белок-нуклеиновым аддуктам октамера гистонов при использовании описанных AP-содержащих субстратов, не наблюдалось. Этот факт позволяет исключить вклад конкретного типа повреждения в формирование одноцепочечных разрывов в нуклеосомной ДНК за счёт октамера гистонов.

**Изучение локализации PARP1, PARP2 и PARP3 на нуклеосоме методом ферментативного футпринтинга.** Выявить белок-белковые контакты членов семейства PARP, а также их специфических взаимодействий с повреждением ДНК в составе NCP позволяет метод футпринтинга с использованием фермента DNase I [52]. В представленной работе для изучения локализации PARP1, PARP2 и PARP3 на свободной ДНК и нуклеосоме использовали ДНК-субстраты как в нативной форме, так и с одиночным AP-сайтом.

Как видно из представленных данных, присутствие PARP1 практически полностью подавляет реакцию ферментативного расщепления нативной формы свободной ДНК (рис. 6, дорожка 3). Такая ситуация возможна только в том случае, когда молекулы белка в составе комплекса равномерно распределены по всей длине ДНК-субстрата, включая 5'-концевой участок дуплекса. Добавление  $NAD^+$  в реакционную смесь запускает реакцию PARилирования (рис. 6, дорожка 4). 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 поли(ADP-рибозы) способствует диссоциации комплекса поли(ADP-рибозил)ированный PARP–ДНК.

Из представленных данных видно, что доступ к ДНК в составе нуклеосомы ограничен по сравнению со свободной ДНК (рис. 6, ср. дорожки 2 и 9, 5 и 12). Сохранение сигнала полно-

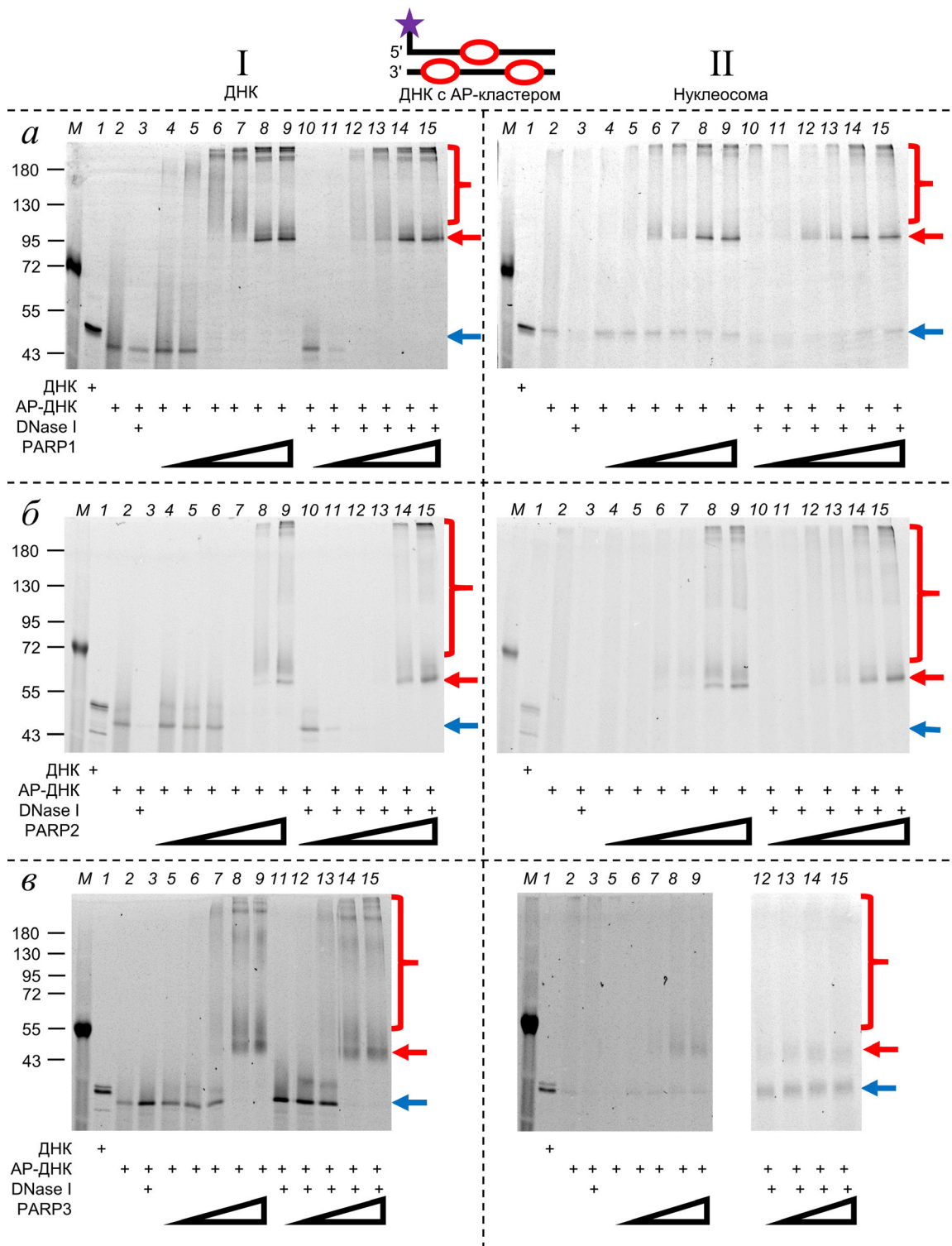
размерной ДНК в присутствии PARP1 свидетельствует о преимущественной локализации белка вблизи 5'-концевого участка дуплекса ДНК в составе NCP (дорожки 10, 11).

Формирование комплекса между PARP1 и AP-содержащей свободной ДНК практически полностью подавляет реакцию ферментативного расщепления (рис. 6, ср. дорожку 5 с 6 и 7), что говорит о равномерном распределении молекул белка по всей длине ДНК-субстрата. Однако появление продуктов  $\beta$ -элиминирования говорит о специфическом взаимодействии PARP1 с AP-сайтом (рис. 6, ср. дорожку 5 с 6 и 7; продукт  $\beta$ -элиминирования отмечен синей звёздочкой) [16].

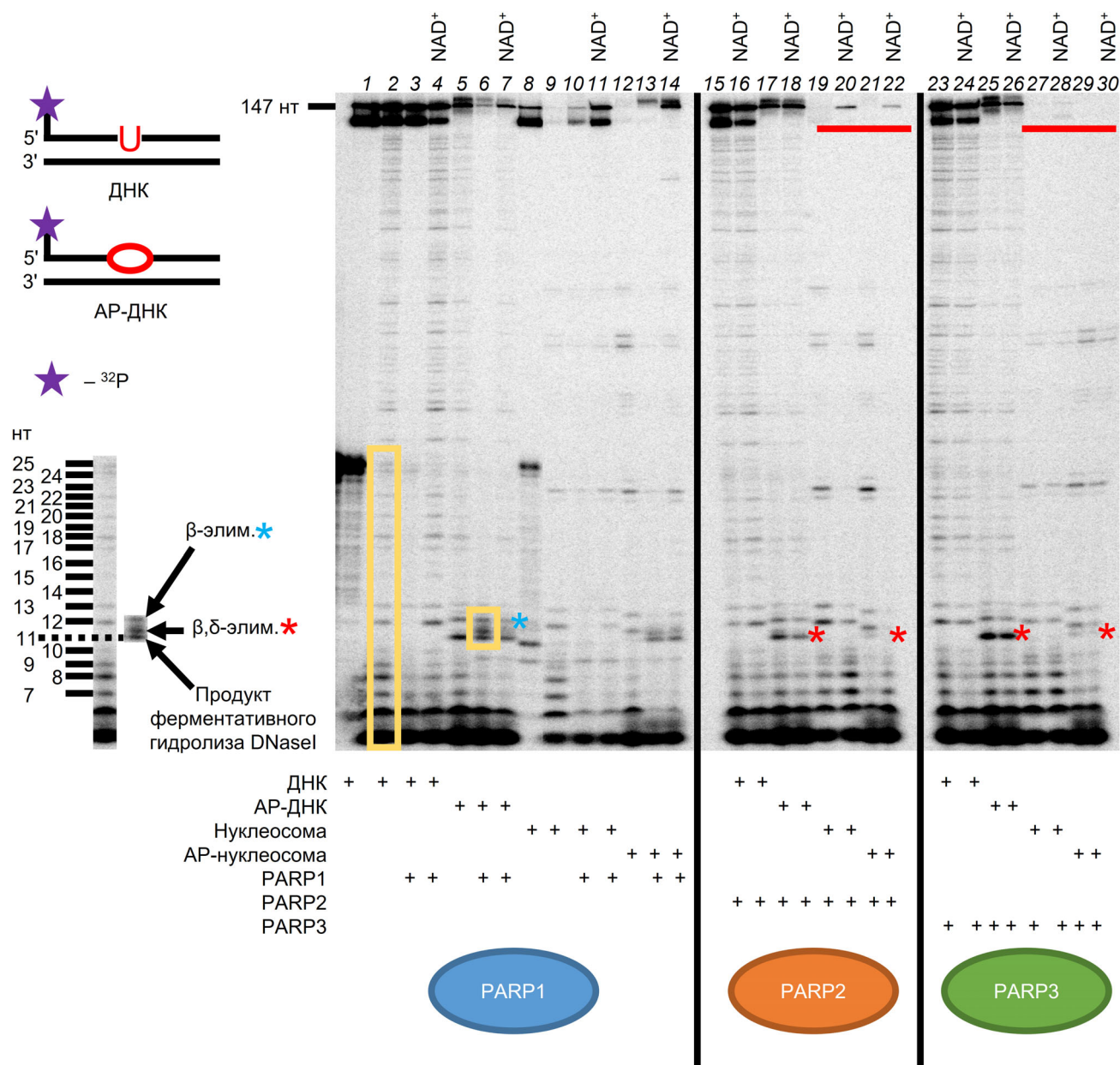
При взаимодействии PARP1 и AP-содержащей NCP на электрофореграмме пропадает один из сигналов, соответствующий полноразмерной 5'-[ $^{32}P$ ]-ДНК в составе нативной NCP (рис. 6, ср. дорожки 10, 11 с 13, 14). Этот факт говорит о формировании разного типа комплексов PARP1–NCP с 5'-концевым участком ДНК-дуплекса при появлении AP-сайта. Кроме того, появляется продукт реакции  $\beta$ -элиминирования, т.е. специфического взаимодействия PARP1 с AP-сайтом в составе нуклеосомной ДНК.

Равномерный характер распределения полос, а также 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. 6, дорожка 15 — для PARP2, дорожка 23 — для PARP3). Присутствие  $NAD^+$  в реакционной смеси существенно не влияет на изменение распределения полос после реакции расщепления (рис. 6, ср. дорожки 15 и 16 — для PARP2, дорожки 25 и 26 — для PARP3). В случае PARP2 этот факт можно объяснить пониженным сродством фермента и его более низкой каталитической активностью по сравнению с PARP1, что может выражаться в отсутствии драматических изменений в концентрациях белок-нуклеинового комплекса в условиях проведения эксперимента. PARP3 имеет ещё более низкое сродство к ДНК и катализирует перенос лишь одного остатка ADP-рибозы, что может не приводить к существенному изменению концентрации белок-нуклеинового комплекса за счёт электростатического отталкивания компонентов при PARилировании.

Наличие AP-сайта в составе свободной ДНК приводит к изменению типа взаимодействия белков PARP2 и PARP3 с 5'-концевой частью ДНК-субстрата (рис. 6, ср. дорожки 15 с 17 — для PARP2, дорожки 23 с 25 — для PARP3). Наличие продуктов  $\beta, \delta$ -элиминирования говорит о спон-



**Рис. 5.** Взаимодействие белков PARP1 (а), PARP2 (б) и PARP3 (в) с AP-кластером в составе свободной (I) и нуклеосомной (II) ДНК (см. «Материалы и методы»). Автографы гелей после разделения продуктов реакции в 10%-ном ПААГ по Лэмбли. Слева указаны положения маркёров молекулярных масс (кДа). М – маркёры молекулярных масс; дорожка 1 – нативная ДНК/НСП; дорожка 2 – ДНК/НСП, обработанная UDG; дорожка 3 – ДНК/НСП, 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 в I и 11–15 в I составляла 10, 50, 100, 500, 1000 нМ соответственно; концентрация PARP3 в дорожках 5–9 в II и 12–15 в II составляла 10, 50, 100, 500, 1000 нМ и 50, 100, 500, 1000 нМ соответственно. Синими стрелками обозначена электрофоретическая подвижность нерасщеплённой цепи AP-ДНК, красными стрелками и скобками – белок-нуклеиновые аддукты



**Рис. 6.** Исследование структуры белок-нуклеиновых комплексов PARP1, PARP2 и PARP3 со свободной ДНК и с нуклеосомой. Дорожка 1 – смесь 5'-[<sup>32</sup>P]-меченых компонентов системы – 147 пнт ампликон и 25 нт праймер; дорожка 2 – смесь 5'-[<sup>32</sup>P]-меченых компонентов системы – NCP и 25 нт праймер с урацилом в положении 12; дорожки 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 14 – продукты расщепления комплексов PARP1 с ДНК, АР-ДНК, NCP и АР-NCP соответственно; дорожки 15–22 – продукты расщепления комплексов PARP2 с ДНК, АР-ДНК, NCP и АР-NCP; дорожки 23–30 – продукты расщепления комплексов PARP3 с ДНК, АР-ДНК, NCP и АР-NCP. Синей звездочкой отмечены продукты β-элиминирования, красной звездочкой – продукты β,δ-элиминирования, красной линией отмечено положение полноразмерной 5'-[<sup>32</sup>P]-ДНК. Зоны в жёлтой рамке вынесены за пределы электрофореграммы

танном разрушении АР-сайта в процессе гелелектрофореза, т.е. об отсутствии АР-лиазной активности PARP3 (рис. 6, ср. дорожки 5 с 25, 26; продукт β,δ-элиминирования отмечен красной звездочкой). PARP2 способен проявлять АР-лиазную активность в отношении АР-сайта, хотя и в существенно меньшей степени,

чем PARP1, что выражается в появлении продукта реакции β-элиминирования (рис. 6, ср. дорожки 5 с 17, 18; продукт β,δ-элиминирования отмечен красной звездочкой) [45].

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. 6, ср. дорожки 9, 12 с 19–22 (для PARP2) и с 27–30 (для PARP3); отмечено красной линией). Тем не менее продукт спонтанного распада AP-сайта также отсутствует, но наблюдается продукт  $\beta$ -элиминирования, что говорит о специфическом взаимодействии PARP2 и PARP3 с AP-сайтом и/или гистонами вблизи повреждения ДНК в составе NCP (рис. 6, ср. дорожки 19 с 23 – для PARP2 и 27 с 31 – для PARP3).

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В представленной работе был изучен характер взаимодействия белков PARP1, PARP2 и PARP3 с нуклеосомными частицами, содержащими в своём составе ДНК-интермедиаты начальных стадий процесса BER. Используемый ДНК-субстрат содержал повреждение на расстоянии чуть более одного витка спирали от одного из тупых концов ДНК-дуплекса. Опираясь на полученные результаты, можно сделать ряд последовательных выводов, которые важны для понимания механизма действия ДНК-зависимых белков семейства PARP и регуляции начальных стадий процесса BER.

Известно, что PARP1 с высокой эффективностью связывается с тупыми концами модельных ДНК-дуплексов, проявляет AP-лиазную активность при взаимодействии с AP-сайтами, а также эффективно взаимодействует с разрывом ДНК после действия APE1 [6, 21, 22]. Отсутствие существенных различий в значениях констант диссоциации PARP1 с использованными в представленной работе структурами ДНК и NCP может быть связано с предпочтительным взаимодействием PARP1 с тупыми концами ДНК-дуплекса, являющимися аналогом двуцепочечного разрыва [35, 53]. Стоит обратить внимание, что сродство PARP1 к свободной ДНК оказалось несколько ниже, чем к нуклеосоме. Это может свидетельствовать о влиянии дополнительных белок-белковых взаимодействий PARP1 с гистонами при формировании комплекса PARP1–NCP. Тем не менее, по данным метода боргидридной сшивки, характер взаимодействия PARP1 с ДНК и ДНК в составе NCP существенно не изменяется (см. рис. 3, а и 4, а) либо эти изменения не выявляются с помощью использованного подхода. Можно предположить, что в контексте таких структур близкое расположение тупого конца дуплекса ДНК будет маскировать взаимодействие PARP1 с AP-сайтом или одноцепочечным разрывом и, как

следствие, влиять на белок-белковые взаимодействия в процессе репарации.

Ранее с использованием модельных ДНК было установлено, что сродство PARP2 к тупым концам ДНК-дуплекса ниже, чем к одноцепочечному разрыву [21]. В работе Gaullier et al. [54] с использованием криоэлектронной микроскопии было показано, что PARP2 взаимодействует с NCP через связывание с тупыми концами ДНК-дуплекса. Стоит отметить, что такое взаимодействие было продемонстрировано с использованием реконструированной NCP с двумя линкерными участками длиной 9 пнт. На основе значений  $K_d$ , полученных в настоящей работе, можно предположить, что наличие одноцепочечного разрыва ДНК обеспечивает эффективность взаимодействия PARP2 с нуклеосомой. Методом футпринтинга было показано, что PARP2 не взаимодействует с тупыми концами нуклеосомной ДНК, но способен взаимодействовать с AP-сайтом вблизи тупого конца. Таким образом, на основании полученных нами данных, а также литературных данных с использованием свободной ДНК и ДНК в составе NCP [21, 22, 38] можно говорить об эффективном взаимодействии PARP2 как с AP-сайтом, так и с разрывом в ДНК в контексте нуклеосомы, содержащей повреждение вблизи конца ДНК-дуплекса.

С использованием модельных структур ДНК и NCP было установлено, что PARP3 взаимодействует и активируется ДНК с одноцепочечным разрывом, содержащим 5'-концевую фосфатную группу, – классическим интермедиатом поздних этапов BER [11, 24]. Тем не менее оказалось, что PARP3 взаимодействует с использованными в работе Gap-структурами менее эффективно, чем с нативной и AP-содержащей ДНК. Вероятно, такое различие в данных можно объяснить тем, что используемый в представленной работе классический интермедиат более ранних стадий BER – ДНК-дуплекс с одноцепочечной брешью с 5'-dRP-фрагментом – не является каноническим субстратом для PARP3. Кроме того, наличие одноцепочечного разрыва может приводить к структурным изменениям NCP, что, вероятно, является критическим фактором при взаимодействии PARP3 с нуклеосомой. Следовательно, аномально высокое значение константы диссоциации комплекса PARP3–Gap–NCP, вероятно, можно объяснить существованием пространственной структуры нуклеосомной частицы, не позволяющей PARP3 эффективно взаимодействовать с повреждением в цепи ДНК. Таким образом, аффинность PARP3 к ДНК с разрывом в составе NCP может определяться как размером брешки, так и модификацией 5'-концевого фрагмента.

Методом футпринтинга было показано, что PARP3 взаимодействует с AP-сайтом в составе NCP. Тем не менее при использовании NCP с AP-кластером не было зафиксировано высокомолекулярных белок-нуклеиновых аддуктов, которые обнаруживались при взаимодействии PARP3 со свободной ДНК аналогичной структуры. Возможно, PARP3 предпочтительно взаимодействует только с AP-сайтом вблизи тупых концов ДНК-дуплекса. Альтернативно такой результат может быть связан с наличием структурных изменений в NCP, содержащей ДНК с кластером AP-сайтов. Таким образом, совокупность полученных данных позволяет предположить, что PARP3 может взаимодействовать с AP-сайтами и/или октамером гистонов NCP, но вряд ли способен направленно конкурировать с белками PARP1 и PARP2 за взаимодействие с интермедиатами начальных стадий BER после действия APE1.

Таким образом, совокупность всех результатов, представленных в работе, говорит о разном

характере взаимодействия ДНК-зависимых белков семейства PARP с повреждёнными ДНК в нуклеосомном контексте: PARP1 взаимодействует преимущественно с тупыми концами ДНК-дуплекса; PARP2 взаимодействует с повреждениями в структуре NCP и/или октамерами гистонов; PARP3 способен распознавать AP-сайты ДНК в нуклеосомном контексте и/или октамеры гистонов.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-00674) и Проекта государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300041-4.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lindahl, T. (1993) Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature*, **362**, 709-715, doi: 10.1038/362709a0.
- Wilson, D. M., and Barsky, D. (2001) The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA, *Mutat. Res.*, **485**, 283-307, doi: 10.1016/s0921-8777(01)00063-5.
- Schärer, O. D. (2003) Chemistry and biology of DNA repair, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **42**, 2946-2974, doi: 10.1002/anie.200200523.
- Kim, Y.-J., and Wilson, D. M. (2012) Overview of base excision repair biochemistry, *Curr. Mol. Pharmacol.*, **5**, 3-13, doi: 10.2174/1874467211205010003.
- Shall, S. S., and de Murcia, G. (2000) Poly(ADP-ribose) polymerase-1: what have we learned from the deficient mouse model? *Mutat. Res.*, **460**, 1-15, doi: 10.1016/s0921-8777(00)00016-1.
- Khodyreva, S. N., and Lavrik, O. I. (2016) Poly(ADP-Ribose) polymerase 1 as a key regulator of DNA repair, *Mol. Biol. (Mosk)*, **50**, 580-595, doi: 10.7868/S0026898416040030.
- Amé, J. C., Rolli, V., Schreiber, V., Niedergang, C., Apiou, F., et al. (1999) PARP-2, a novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase, *J. Biol. Chem.*, **274**, 17860-17868, doi: 10.1074/jbc.274.25.17860.
- Rouleau, M., McDonald, D., Gagné, P., Ouellet, M. E., Droit, A., et al. (2007) PARP-3 associates with polycomb group bodies and with components of the DNA damage repair machinery, *J. Cell. Biochem.*, **100**, 385-401, doi: 10.1002/jcb.21051.
- Beck, C., Robert, I., Reina-San-Martin, B., Schreiber, V., and Dantzer, F. (2014) Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3, *Exp. Cell Res.*, **329**, 18-25, doi: 10.1016/j.yexcr.2014.07.003.
- Isabelle, M., Moreel, X., Gagné, J. P., Rouleau, M., Ethier, C., et al. (2010) Investigation of PARP-1, PARP-2, and PARG interactomes by affinity-purification mass spectrometry, *Proteome Sci.*, **8**, 22-32, doi: 10.1186/1477-5956-8-22.
- Grundy, G. J., Polo, L. M., Zeng, Z., Rulten, S. L., Hoch, N. C., et al. (2016) PARP3 is a sensor of nicked nucleosomes and monoribosylates histone H2B(Glu2), *Nat. Commun.*, **7**, 12404-12415, doi: 10.1038/ncomms12404.
- Van Beek, L., McClay, E., Patel, S., Schimpl, M., Spagnolo, L., et al. (2021) A PARP power: Structural perspective on PARP1, PARP2, and PARP3 in DNA damage repair and nucleosome remodelling, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 5112, doi: 10.3390/ijms22105112.
- Huang, X., LeDuc, R. D., Fornelli, L., Schunter, A. J., Bennett, R. L., et al. (2019) Defining the NSD2 interactome: PARP1 PARylation reduces NSD2 histone methyltransferase activity and impedes chromatin binding, *J. Biol. Chem.*, **294**, 12459-12471, doi: 10.1074/jbc.RA118.006159.
- Boehler, C., Gauthier, L. R., Mortusewicz, O., Biard, D. S., Saliou, J.-M., et al. (2011) Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (PARP3), a newcomer in cellular response to DNA damage and mitotic progression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 2783-2788, doi: 10.1073/pnas.1016574108.
- Cistulli, C., Lavrik, O. I., Prasad, R., Hou, E., and Wilson, S. H. (2004) AP endonuclease and poly(ADP-ribose) polymerase-1 interact with the same base excision repair intermediate, *DNA Repair (Amst)*, **3**, 581-591, doi: 10.1016/j.dnarep.2003.09.012.
- Khodyreva, S. N., Prasad, R., Ilina, E. S., Sukhanova, M. V., Kutuzov, M. M., et al. (2010) Apurinic/apyrimidinic (AP) site recognition by the 5'-dRP/AP lyase in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 22090-22095, doi: 10.1073/pnas.1009182107.
- Sukhanova, M., Khodyreva, S., and Lavrik, O. (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates activity of DNA polymerase  $\beta$  in long patch base excision repair, *Mutat. Res.*, **685**, 80-89, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2009.08.009.
- Lavrik, O. I., Prasad, R., Sobol, R. W., Horton, J. K., Ackerman, E. J., et al. (2001) 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.*, **276**, 25541-25548, doi: 10.1074/jbc.M102125200.
19. Hanzlikova, H., Kalasova, I., Demin, A. A., Pennicott, L. E., Cihlarova, Z., et al. (2018) The importance of poly(ADP-ribose) polymerase as a sensor of unligated Okazaki fragments during DNA replication, *Mol. Cell*, **71**, 319-331, doi: 10.1016/j.molcel.2018.06.004.
  20. Hakmé, A., Wong, H. K., Dantzer, F., and Schreiber, V. (2008) The expanding field of poly(ADP-ribose)ation reactions. "Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects" Review Series, *EMBO Rep.*, **9**, 1094-1100, doi: 10.1038/embor.2008.191.
  21. Sukhanova, M. V., Abrakhi, S., Joshi, V., Pastre, D., Kutuzov, M. M., et al. (2016) Single molecule detection of PARP1 and PARP2 interaction with DNA strand breaks and their poly(ADP-ribose)ation using high-resolution AFM imaging, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 1-12, doi: 10.1093/nar/gkv1476.
  22. Sukhanova, M. V., Hamon, L., Kutuzov, M. M., Joshi, V., Dobra, I., et al. (2019) A single-molecule atomic force microscopy study of PARP1 and PARP2 recognition of base excision repair DNA intermediates, *J. Mol. Biol.*, **431**, 2655-2673, doi: 10.1016/j.jmb.2019.05.028.
  23. Kutuzov, M. M., Khodyreva, S. N., Amé, J.-C., Ilina, E. S., Sukhanova, M. V., et al. (2013) Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins, *Biochimie*, **95**, 1208-1215, doi: 10.1016/j.biochi.2013.01.007.
  24. Langelier, M. F., Riccio, A. A., and Pascal, J. M. (2014) 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.*, **42**, 7762-7775, doi: 10.1093/nar/gku474.
  25. Yélamos, J., Schreiber, V., and Dantzer, F. (2008) Toward specific functions of poly(ADP-ribose)polymerase-2, *Trends Mol. Med.*, **14**, 169-178, doi: 10.1016/j.molmed.2008.02.003.
  26. Kutuzov, M. M., Khodyreva, S. N., Schreiber, V., and Lavrik, O. I. (2014) The role of PARP2 in DNA repair, *Mol. Biol. (Mosk)*, **48**, 561-572, doi: 10.1134/S0026893314040062.
  27. Talhaoui, I., Lebedeva, N. A., Zarkovic, G., Saint-Pierre, C., Kutuzov, M. M., et al. (2016) Poly(ADP-ribose) polymerases covalently modify strand break termini in DNA fragments *in vitro*, *Nucleic Acids Res.*, **44**, 9279-9295, doi: 10.1093/nar/gkw67523.
  28. Belousova, E. A., Ishchenko, A. A., and Lavrik, O. I. (2018) DNA is a new target of Parp3, *Sci. Rep.*, **8**, 4176-4187, doi: 10.1038/s41598-018-22673-3.
  29. Zarkovic, G., Belousova, E. A., Talhaoui, I., Saint-Pierre, C., Kutuzov, M. M., et al. (2018) Characterization of DNA ADP-ribosyltransferase activities of PARP2 and PARP3: new insights into DNA ADP-riboseylation, *Nucleic Acids Res.*, **46**, 2417-2431, doi: 10.1093/nar/gkx1318.
  30. McGinty, R. K., and Tan, S. (2015) Nucleosome structure and function, *Chem. Rev.*, **115**, 2255-2273, doi: 10.1021/cr500373h.
  31. Kutuzov, M. M., Kurgina, T. A., Belousova, E. A., Khodyreva, S. N., and Lavrik, O. I. (2019) Optimization of nucleosome assembly from histones and model DNAs and estimation of the reconstitution efficiency, *Biopolym. Cell*, **35**, 91-98, doi: 10.7124/bc.00099A.
  32. Beard, B. C., Wilson, S. H., and Smerdon, M. J. (2003) Suppressed catalytic activity of base excision repair enzymes on rotationally positioned uracil in nucleosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7465-7470, doi: 10.1073/pnas.1330328100.
  33. Cole, H. A., Tabor-Godwin, J. M., and Hayes, J. J. (2010) Uracil DNA glycosylase activity on nucleosomal DNA depends on rotational orientation of targets, *J. Biol. Chem.*, **285**, 2876-2885, doi: 10.1074/jbc.M109.073544.
  34. Hinz, J. M. (2014) Impact of abasic site orientation within nucleosomes on human APE1 endonuclease activity, *Mutat. Res.*, **766**, 19-24, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2014.05.008.
  35. Clark, N. J., Kramer, M., Muthurajan, U. M., and Luger, K. (2012) Alternative modes of binding of poly(ADP-ribose) polymerase 1 to free DNA and nucleosomes, *J. Biol. Chem.*, **287**, 32430-32439, doi: 10.1074/jbc.M112.397067.
  36. D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., and Poirier, G. G. (1999) Poly(ADP-ribose)ation reactions in the regulation of nuclear functions, *Biochem. J.*, **342**, 249-268.
  37. Messner, S., Altmeyer, M., Zhao, H., Pozivil, A., Roschitzki, B., et al. (2010) PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 6350-6362, doi: 10.1093/nar/gkq463.
  38. Kutuzov, M. M., Belousova, E. A., Kurgina, T. A., Ukraintsev, A. A., Vasil'eva, I. A., et al. (2021) The contribution of PARP1, PARP2 and poly(ADP-ribose)ation to base excision repair in the nucleosomal context, *Sci. Rep.*, **11**, 4849-4865, doi: 10.1038/s41598-021-84351-1.
  39. Amé, J.-C., Kalisch, T., Dantzer, F., and Schreiber, V. (2011) Purification of recombinant poly(ADP-ribose) polymerases, *Methods Mol. Biol.*, **780**, 135-152, doi: 10.1007/978-1-61779-270-0\_9.
  40. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
  41. Dey, B., Thukral, S., Krishnan, S., Chakrobarty, M., Gupta, S., et al. (2012) DNA-protein interactions: Methods for detection and analysis, *Mol. Cell. Biochem.*, **365**, 279-299, doi: 10.1007/s11010-012-1269-z.
  42. Zhou, C., Szczepanski, J. T., and Greenberg, M. M. (2012) Mechanistic studies on histone catalyzed cleavage of apyrimidinic/apurinic sites in nucleosome core particles, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 16734-16741, doi: 10.1021/ja306858m.
  43. Szczepanski, J. T., Zhou, C., and Greenberg, M. M. (2013) Nucleosome core particle – catalyzed strand scission at abasic sites, *Biochemistry*, **52**, 2157-2164, doi: 10.1021/bi3010076.
  44. Yang, K., and Greenberg, M. M. (2018) Enhanced cleavage at abasic sites within clustered lesions in nucleosome core particles, *Chembiochem*, **19**, 2061-2065, doi: 10.1002/cbic.201800338.
  45. Kutuzov, M. M., Khodyreva, S. N., Ilina, E. S., Sukhanova, M. V., Amé, J.-C., et al. (2015) Interaction of PARP-2 with AP site containing DNA, *Biochimie*, **112**, 10-19, doi: 10.1016/j.biochi.2015.02.010.
  46. Wiederhold, L., Leppard, J. B., Kedar, P., Karimi-Busheri, F., Rasouli-Nia, A., et al. (2004) AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells, *Mol. Cell*, **15**, 209-220, doi: 10.1016/j.molcel.2004.06.003.
  47. Khodyreva, S. N., and Lavrik, O. I. (2020) Non-canonical interaction of DNA repair proteins with intact and cleaved AP sites, *DNA Repair (Amst)*, **90**, 102847-102861, doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102847.
  48. Fromme, J. C., and Verdine, G. L. (2004) Base excision repair, *Adv. Protein Chem.*, **69**, 1-41, doi: 10.1016/S0065-3233(04)69001-2.
  49. Krokeide, S. Z., Bolstad, N., Laerdahl, J. K., Bjorås, M., and Luna, L. (2009) Expression and purification of NEIL3, a human DNA glycosylase homolog, *Protein Expr. Purif.*, **65**, 160-164, doi: 10.1016/j.pep.2008.11.014.
  50. Piersen, C. E., McCullough, A. K., and Lloyd, R. S. (2000) AP lyases and dRPases: Commonality of mechanism,

- Mutat. Res.*, **459**, 43-53, doi: 10.1016/s0921-8777(99)00054-3.
51. Khodyreva, S. N., and Lavrik, O. I. (2011) Affinity modification in a proteomic study of DNA repair ensembles, *Bioorg. Khim.*, **37**, 91-107, doi: 10.1134/s1068162011010109.
52. Galas, D. J., and Schmitz, A. (1978) DNase footprinting: a simple method for the detection of protein-DNA binding specificity, *Nucleic Acids Res.*, **5**, 3157-3170, doi: 10.1093/nar/5.9.3157.
53. Maluchenko, N. V., Nilov, D. K., Pushkarev, S. V., Kotova, E. Y., Gerasimova, N. S., et al. (2021) Mechanisms of nucleosome reorganization by PARP1, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12127, doi: 10.3390/ijms222212127.
54. Gaullier, G., Roberts, G., Muthurajan, U. M., Bowerman, S., Rudolph, J., et al. (2020) Bridging of nucleosome-proximal DNA double-strand breaks by PARP2 enhances its interaction with HPF1, *PLoS One*, **15**, doi: 10.1371/journal.pone.0240932.

## THE STUDY OF THE INTERACTION PARP FAMILY DNA-DEPENDENT PROTEINS WITH NUCLEOSOMES CONTAINING DNA-INTERMEDIATES OF THE INITIAL STAGES OF THE BER PROCESS

A. A. Ukraintsev<sup>1#</sup>, E. A. Belousova<sup>1#</sup>, M. M. Kutuzov<sup>1</sup>, and O. I. Lavrik<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, 630090 Novosibirsk, Russia; e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru*

<sup>2</sup> *Novosibirsk State University, 630090 Novosibirsk, Russia*

The cellular signal at the DNA damage response is the reaction of (ADP-ribosylation) catalyzed by PARP's family DNA-dependent proteins – PARP1, PARP2, and PARP3. These proteins are involved in the base excision repair process, BER. Despite of the extensive research, it remains unknown how PARPs are involved in BER regulation and how roles are distributed between DNA-dependent family members. Here, we investigated the interaction of PARP's family DNA-dependent proteins with nucleosome core particles containing DNA intermediates of the BER initial stages. To do that, the nucleosomes containing damage in the vicinity of the duplex blunt end were reconstituted based on the Widom "Clone 603" DNA sequence. The dissociation constants of PARP complexes with nucleosomes bearing DNA contained uracil (Native), AP-site, or single nucleotide gap (Gap), were determined. It was shown that the affinity of proteins for the nucleosomes was increased in row PARP3 << PARP2 < PARP1; and the affinity of each protein for the specific damage type was increased in the row Native = AP-site < Gap for PARP1 and PARP2, Gap <<< Native = AP-site for PARP3. The interaction regions of each PARP protein with the nucleosome were also determined by sodium borohydride cross-linking and footprinting assay. Based on the obtained and published data, the involvement pattern of PARP1, PARP2, and PARP3 into the interaction with NCPs containing DNA intermediates of the BER process was discussed.

**Keywords:** nucleosome, PARP1, PARP2, PARP3, BER