

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ:
ОТ РЕПАРАЦИИ ДНК ДО МЕТАБОЛОМИКИ

УДК 577.29

ВЛИЯНИЕ УРОВНЯ ПОЛИ(ADP-РИБОЗА)ПОЛИМЕРАЗЫ 1 НА СТАТУС
СИСТЕМЫ ЭКСЦИЗИОННОЙ РЕПАРАЦИИ ОСНОВАНИЙ
В КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. Е. С. Ильина^{a, b, 1}, А. С. Кочеткова^{a, b, 1}, Е. А. Белоусова^{a, b}, М. М. Кутузов^{a, b},
О. И. Лаврик^{a, b}, С. Н. Ходырева^{a, *}

^aИнститут химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук,
Новосибирск, 630090 Россия

^bНовосибирский национальный исследовательский государственный университет,
Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: svetakh@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 02.08.2022 г.

После доработки 22.08.2022 г.

Принята к публикации 22.08.2022 г.

Система эксцизионной репарации оснований (BER) направлена на исправление самой многочисленной группы повреждений ДНК, а именно поврежденных оснований. Основные этапы BER включают распознавание и удаление аберрантного основания, разрезание сахарофосфатного остова ДНК, процессинг бреши (включая встраивание dNMP) и лигирование ДНК. Точное функционирование BER зависит от регуляции каждой стадии процесса регуляторными/вспомогательными белками, наиболее значимый из которых — поли(ADP-рибоза)полимераза 1 (PARP1). PARP1 играет важную роль в репарации ДНК, сохранении целостности генома, а также в регуляции стабильности и распада мРНК, поэтому PARP1 может влиять на BER как на уровне белков, участвующих в процессе, так и на уровне экспрессии кодирующих их мРНК. Систематические данные о влиянии количества PARP1 на активность ключевых белков BER и уровни кодирующих их мРНК в клетках человека пока отсутствуют. В нашей работе с использованием цельноклеточных экстрактов и препаратов РНК, полученных из родительской клеточной линии HEK293T и происходящей из нее линии HEK293T/P1-KD со сниженной экспрессией PARP1 (shPARP1-экспрессирующие клетки, нокдаун PARP1), оценены уровни мРНК, кодирующих белки BER: PARP1, PARP2, урацил-ДНК-гликозилазу (UNG2), AP-эндонуклеазу 1 (APE1), ДНК-полимеразу β (POL β), ДНК-лигазу III (LIG3) и XRCC1. Параллельно оценена каталитическая активность этих ферментов. Не обнаружено значимого влияния количества PARP1 на уровни мРНК UNG2, APE1, POL β , LIG3 и XRCC1. В то же время, показано снижение количества мРНК PARP2 в клетках HEK293T/P1-KD в 2 раза. Активности указанных ферментов в цельноклеточных экстрактах клеток HEK293T и HEK293T/P1-KD также не отличались статистически значимо. В условиях синтеза поли(ADP-рибозы) эффективность протекания реакций, катализируемых UNG2, APE1, POL β и LIG3, также не изменялась статистически значимо. Кроме того, сниженное количество PARP1 в экстракте клеток HEK293T/P1-KD не приводило к принципиальным изменениям в характере PARилирования ДНК по сравнению с экстрактом клеток родительской линии HEK293T.

Ключевые слова: ферменты эксцизионной репарации оснований, поли(ADP-рибоза)полимераза 1, мРНК, синтез поли(ADP-рибозы), поли(ADP-рибозил)ирование ДНК

DOI: 10.31857/S0026898423020106, **EDN:** EFCKOU

ВВЕДЕНИЕ

Система эксцизионной репарации оснований (BER) направлена на исправление самой многочисленной группы повреждений ДНК — повре-

жденных азотистых оснований, но по этому пути могут репарироваться и одноцепочечные разрывы или спонтанно возникшие апуриновые/апиримициновые (AP) сайты [1–5]. BER проходит следующие основные этапы: распознавание и

¹ Эти авторы внесли равный вклад в выполнение работы.

Сокращения: AP-сайты — апуриновые/апиримициновые сайты, APE1 — апуриновая/апиримициновая эндонуклеаза 1, BER — эксцизионная репарация оснований, dRP — дезоксирибозофосфатный остаток, LIG3 — ДНК-лигаза III, PARP1, PARP2, PARP3 — поли(ADP-рибоза)полимеразы 1, 2 или 3, PAR — поли(ADP-рибоза), PARилирование — поли(ADP-рибозил)ирование, POL β — ДНК-полимераза β , UNG — урацил-ДНК-гликозилаза, UDG — урацил-ДНК-гликозилаза *E. coli*, XRCC1 — белок, входящий в группу комплементации 1, обуславливающую чувствительность клеток к рентгеновскому излучению.

удаление аберрантного основания, разрезание сахарофосфатного остова, процессинг бреши (включая встраивание dNMP) и лигирование ДНК. BER может протекать по одному из двух путей: “короткозаплаточному” (SP-BER), при котором заменяется только 1 нуклеотид, или “длиннозаплаточному” (LP-BER), отвечающему за замену 2–13 нуклеотидов [4, 5].

Короткозаплаточный (как и длиннозаплаточный) путь начинается с распознавания поврежденного азотистого основания подходящей ДНК-гликозилазой. Эти ферменты гидролизуют N-гликозидную связь между дезоксирибозой и неправильным основанием. ДНК-гликозилазы, распознающие урацил и алкилированные основания, являются монофункциональными ферментами, т.е. они ограничиваются удалением основания, не затрагивая сахарофосфатный остов. Затем апуриновая/апириமிдиновая эндонуклеаза 1 (APE1) расщепляет сахарофосфатный остов с 5'-стороны от AP-сайта с образованием 3'-ОН и 5'-dRP. Окисленные основания удаляются преимущественно бифункциональными ДНК-гликозилазами, которые обладают дополнительной лиазной активностью. Они могут не только выщеплять основания, но также расщеплять сахарофосфатный остов по механизму β - или β,δ -элиминирования. В первом случае получается разрыв, фланкированный 5'-фосфатом и 3'-ненасыщенным альдегидом, во втором – однонуклеотидная брешь с 5'-фосфатом и 3'-фосфатом. Эти заблокированные 3'-концы нуждаются в процессинге до синтеза ДНК. В случае β -элиминирования роль APE1 сводится к удалению 3'-ненасыщенного альдегида, а 3'-фосфат, образующийся в результате β,δ -элиминирования, преимущественно удаляется полинуклеотидкиназой. В случае SP-BER ДНК-полимераза β (POL β) встраивает один dNMP и удаляет 5'-dRP-остаток. Затем разрыв лигируется ДНК-лигазой III (LIG3) в комплексе со своим кофакторным белком XRCC1 (белок, входящий в группу комплементации 1, обуславливающую чувствительность клеток к рентгеновскому излучению) [1–3]. LP-BER включается, когда POL β не может удалить 5'-dRP-группу. POL β встраивает первый нуклеотид, затем диссоциирует с ДНК, далее POL δ или POL ϵ осуществляют синтез с вытеснением участка цепи с получением структуры типа “flap” (ДНК-дуплекс, в котором одна из цепей имеет свисающий одноцепочечный участок). Затем флэп-эндонуклеаза 1 (FEN1) удаляет этот одноцепочечный участок и ДНК-лигаза I (LIG1) лигирует разрыв [1–5].

Точное функционирование BER зависит от регуляции каждой стадии процесса регуляторными/вспомогательными белками, наиболее важным из которых является поли(ADP-рибоза)полимераза 1 (PARP1) [6–8]. PARP1 принадлежит к

семейству белков, три члена которого, PARP1, PARP2 и PARP3, связываясь с повреждением ДНК катализируют реакцию ADP-рибозилирования, используя NAD⁺ в качестве субстрата [6–10]. PARP способны добавлять одиночные остатки ADP-рибозы к мишеням или синтезировать на них полимер ADP-рибозы. PARP используют в качестве мишеней сами себя (автоPARилирование) или ряд белков или ДНК (PARилирование) [6–10]. Показано, что PARP1 и PARP2 играют важную роль в процессах репарации ДНК и сохранении целостности генома [6–10].

Взаимодействие PARP1 с ключевыми белками и промежуточными продуктами ДНК на разных стадиях BER интенсивно анализировали, используя различные методы [9–13]. В частности, выявлено специфическое взаимодействие PARP1 и PARP2 с ранним интермедиатом BER до образования разрыва, т.е. с AP-сайтом [13, 14]. Изучено влияние PARилирования на активность POL β и других ферментов BER в SP- и LP-путях [12, 15, 16].

В последние годы обнаружено, что PARP1 является фактором регуляции стабильности и распада мРНК [17], поэтому PARP1 может влиять на BER как на уровне белков, участвующих в процессе, так и на уровне экспрессии кодирующих их мРНК.

Следует отметить, что способность PARP1 функционировать одновременно и как каталитический, и как акцепторный белок, привела к накоплению противоречивых данных о его функциях. Роль PARP1 в регуляции BER изучали на различных экспериментальных моделях, включая очищенные белки, клеточные экстракты, клетки и организмы. Однако систематические исследования влияния различных количеств PARP1 на активность ключевых белков BER и уровни кодирующих их мРНК в клетках человека пока не проведены.

В нашем исследовании с использованием цельноклеточных экстрактов и препаратов РНК, полученных из родительской клеточной линии HEK293T и происходящей из нее линии HEK293T/P1-KD со сниженной экспрессией PARP1 (shPARP1-экспрессирующие клетки, нокдаун PARP1), оценены уровни мРНК, кодирующих белки BER: PARP1, PARP2, урацил-ДНК-гликозилазу (UNG2), AP-эндонуклеазу 1 (APE1), ДНК-полимеразу β (POL β), ДНК-лигазу III (LIG3) и XRCC1. В этих экспериментах параллельно определяли каталитическую активность этих ферментов. Не обнаружено значимого влияния количества PARP1 на уровни мРНК урацил-ДНК-гликозилазы, AP-эндонуклеазы 1, ДНК-полимеразы β , ДНК-лигазы III и XRCC1. В то же время оказалось, что количество мРНК PARP2 в клетках HEK293T/P1-KD снижено в 2 раза. Активности указанных ферментов в цельноклеточных экстрактах клеток HEK293T и HEK293T/P1-KD не

Таблица 1. Последовательности использованных ДНК

ДНК	Нуклеотидная последовательность	Схематическое изображение
ДНК-1	5'-pGGGAGGCCCTGGCGTTUCCCGGCTTAGTCGCC-3'	$^{32}\text{P} \text{---} \text{U} \text{---} 3'$
ДНК-2	5'-pGGCGACTAAGCCGGG-3'	$^{32}\text{P} \text{---} \text{OH}$
ДНК-3	5'-pCGGTATCCAGGTCTG-3'	$^{32}\text{P} \text{---}$
ДНК-4	5'-pGGGAGGCCCTGGCGTTUCCCGGCTTAGTCGCC-3' 3'-CCCTCCGGGACCGCAAGGGGCCGAATCAGCGG-5'	$^{32}\text{P} \text{---} \text{U} \text{---} 3'$ $5'$
ДНК-5	5'-pGGCGACTAAGCCGGG pUCCCGGCTTAGTCGCC-3' 3'-CCGCTGATTCGGCCCCGTTGCGGTCCCGGGCGG-5'	$^{32}\text{P} \text{---} \text{OH}$ $\text{---} \text{pU} \text{---} 3'$ $5'$
ДНК-6	5'-pGGCGACTAAGCCGGG pCAACGCCAGGGCCTCCC-3' 3'-CCGCTGATTCGGCCCCGTTGCGGTCCCGGAGGG-5'	$^{32}\text{P} \text{---} \text{OH}$ $\text{---} \text{pC} \text{---} 3'$ $5'$
ДНК-7	5'-pCGGTATCCAGGTCTG pGACAACGATGAAGCC-3' 3'-GCCATAGGTCCAGACTCTGTTGCTACTTCCGG-5'	$^{32}\text{P} \text{---} \text{p} \text{---} 3'$ $5'$

различались статистически значимо. Не выявлено значимых изменений в эффективности протекания реакций, катализируемых UNG2, AP-эндонуклеазой 1, POL β и LIG3 в условиях синтеза поли(ADP-рибозы), а также принципиальных отличий в протекании недавно обнаруженного процесса поли(ADP-рибозил)ирования ДНК [18–23] в экстракте клеток НЕК293Т/P1-KD со сниженным количеством PARP1 и в экстракте клеток родительской линии НЕК293Т.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалы. Олигонуклеотиды, в том числе ПЦР-праймеры, синтезированы в Лаборатории биомедицинской химии ИХБФМ СО РАН. [γ - ^{32}P]АТР и [α - ^{32}P]dАТР (>3000 Ки/ммоль) (Лаборатория биотехнологии, ИХБФМ СО РАН); урацил-ДНК-гликозилаза *E. coli* (UDG), Т4-полинуклеотидкиназа (“Биосан”, Россия), вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Лаборатория биотехнологии, ИХБФМ СО РАН). БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue ($\times 2$) (“Биолаб-микс”, Россия).

Плазмиды, несущие кДНК AP-эндонуклеазы 1 человека и ДНК-полимеразы β мыши, любезно предоставлены S.H. Wilson (NIHNS, NIH, США). Рекомбинантные белки POL β и APE1 очищены согласно [24, 25]. Векторы, кодирующие PARP1 и PARP2, любезно предоставлены V. Schreiber (ESBS, Pkirch, Франция). Препараты PARP1 и PARP2 выделены как описано в [26]. Плазмида, несущая кДНК PARP3, любезно предоставлена G. Zarkovich (Gustave Roussy, Université Paris-Saclay, Франция). PARP3 очищен согласно [21].

Клеточные линии НЕК293Т и НЕК293Т/P1-KD (со сниженным содержанием PARP1) любезно

предоставлены коллегами из лаборатории нуклеопротеинов, руководимой О.А. Донцовой (МГУ, Москва). Цельноклеточные экстракты из этих клеток получены согласно [27]. РНК выделяли набором Invitrogen (“Thermo Fisher Scientific”, США) в соответствии с протоколом производителя [28]. Чистоту препарата проверяли по соотношению значений поглощения на длинах волн 260 и 230 нм ($A_{260/230}$) (в чистом препарате соотношение варьирует в диапазоне 1.8–2.2). Перед использованием в реакции обратной транскрипции с последующей количественной ПЦР (ОТ-кПЦР) препарат РНК обрабатывали ДНКазой. Концентрацию белков определяли по методу Брэдфорда [29] с использованием бычьего сывороточного альбумина (BSA) в качестве стандарта.

Введение [^{32}P] на 5'-конец олигонуклеотида и получение ДНК-субстратов. ДНК-1, ДНК-2 или ДНК-3 метили [^{32}P] по 5'-концу (табл. 1) с использованием Т4-полинуклеотидкиназы и [γ - ^{32}P]АТР, затем меченые олигонуклеотиды выделяли согласно [30].

С полученными ^{32}P -мечеными олигонуклеотидами создавали ДНК-дуплексы, структура и обозначение которых приведены в табл. 1. Олигонуклеотиды смешивали в эквимольном соотношении и проводили гибридизацию, нагревая в течение 5 мин при 95°C с последующим медленным охлаждением до комнатной температуры.

Количественная обработка результатов радиоавтографии. Для визуализации радиоактивных продуктов гель экспонировали с радиочувствительным экраном. Радиоактивные продукты в геле визуализировали с помощью прибора The Typhoon FLA 9000 Scanner (“GE Healthcare”, США). Интенсивность пятен оценивали с использова-

Таблица 2. Прямые (F) и обратные (R) праймеры

Ген	Нуклеотидная последовательность
<i>GAPDH</i>	F: 5'-AGATCATCAGCAATGCCTCCT-3' R: 5'-TGGTCATGAGTCCTTCCACG-3'
<i>B2M</i>	F: 5'-CGCTCCGTGGCCTTAGCTGT-3' R: 5'-AAAGACAAGTCTGAATGCTC-3'
<i>TUBβ</i>	F: 5'- TGGTGGATCTAGAACCTGGGA-3' R: 5'- CTGCCCCAGACTGACCAAAT-3'
<i>PARP1</i>	F: 5'-TGCCTATTACTGCACTGGGG-3' R: 5'-TCTCGGAATTCCTTTGGGGTT-3'
<i>PARP2</i>	F: 5'-TCCTAAGGCCGAAGGATTGC-3' R: 5'-CCCATTCCAGGGTGACGAAGT-3'
<i>UNG2</i>	F: 5'-AAGCAAGGTGTTCTCCTTCTCA-3' R: 5'-GCCAGGACACAACCTGCATC-3'
<i>APE1</i>	F: 5'- GATCTCGCGAGTAGGGCAAC-3' R: 5'- TTCGGCATTCCCCTTACGAA-3'
<i>POLβ</i>	F: 5'-GAACACTCTGGGGTTCTCGG-3' R: 5'-TGCGAGTTCTGTGAGCATGT-3'
<i>LIG3</i>	F: 5'-GAACACTCTGGGGTTCTCGG-3' R: 5'-TGCGAGTTCTGTGAGCATGT-3'
<i>XRCC1</i>	F: 5'-TACAGCAAGGACTCCCCCTT-3' R: 5'-CACTGTCACCTTCTGGGACG-3'

нием программного обеспечения Quantity One (“Bio-Rad”, США).

Количественная полимеразная цепная реакция в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-кПЦР). Относительный уровень экспрессии генов в клетках НЕК293Т и НЕК293Т/P1-KD определяли с помощью ОТ-кПЦР с использованием БиоМастер ОТ-ПЦР SYBR Blue (×2). Реакционная смесь объемом 20 мкл содержала 10 нг суммарной РНК, 0.5 мкМ праймеры, смесь обратной транскриптазы (75 ед. акт./мкл) и ДНК-полимеразы (4 ед. акт./мкл) в буфере для ОТ-кПЦР (из расчета 2 мкл смеси ферментов на 25 мкл ОТ-ПЦР SYBR Blue (×2)). Реакцию проводили в амплификаторе LigthCycler96 (“Roche”, Швейцария) по заданной программе: обратная транскрипция при 45°C в течение 1800 с, прединкубация при 95°C – 300 с, 40 циклов: денатурация при 95°C – 10 с, гибридизация праймеров при 60°C – 10 с и элонгация при 72°C – 10 с. Сигнал детектировали при 84°C в течение 5 с. В эксперименте проводили по 3 повтора для каждой точки, в качестве калибраторов использовали гены домашнего хозяйства *GAPDH*, *B2M*, *TUBβ*. Последовательности использованных праймеров представлены в табл. 2. Все праймеры подобраны с использованием программы Primer-BLAST (NCBI, США),

для каждой пары определена эффективность амплификации.

Эффективность амплификации каждой пары праймеров, нормированное значение уровня экспрессии относительно калибратора ($\Delta\Delta Ct$) и стандартную ошибку рассчитывали с использованием программного обеспечения LigthCycler96 (“Roche”). Данные представлены в виде средних значений, для каждого рассчитано стандартное отклонение. Относительный уровень экспрессии генов в двух клеточных линиях НЕК293Т и НЕК-293Т/P1-KD сравнивали, рассчитывая *p*-значение и используя критерий Манна–Уитни, статистически значимым считали $p \leq 0.05$ (* $p \leq 0.05$). Расчеты производили с использованием программы PRISM (GraphPad Software, США).

Сравнение количества PARP1 в клеточных экстрактах с помощью вестерн-блот-анализа. Вестерн-блот-анализ проводили согласно методике, описанной в [31]. Кратко, 2.5 мкг суммарного белка клеточного экстракта или 0.05 мкг индивидуального белка PARP1 разделяли с помощью электрофореза по методу Лэммли [32]. Перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану проводили с использованием набора Trans-Blot Turbo в условиях, указанных производителем. Нитроцеллюлозную мембрану инкубировали в растворе первич-

ных антител (антитела кролика к PARP1 в разведении 1: 1000), в растворе конъюгата пероксидазы хрена с вторичными антителами к антителам кролика, затем с коммерческим субстратом для проявления вестерн-блота Super Signal West Pico PLUS ("Thermo Scientific"). Хемилюминесценцию регистрировали на приборе Amersham Imager 600 ("GE Healthcare", США).

Получение ДНК-структур, содержащих AP-сайт или расщепленный AP-сайт с остатком 5'-dRP. Указанные ДНК получали из урацил-содержащих ДНК под действием фермента UDG непосредственно перед проведением эксперимента, инкубируя ДНК в течение 30 мин при 37°C в соотношении 1 мкМ U-ДНК: 0.1 ед. акт./мкл UDG. Реакцию проводили в TE-буфере (10 мМ Трис-НСl, рН 7.8, 1 мМ EDTA).

Определение уровня поли(ADP-рибозил)ирования в клеточных экстрактах. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 0.6 A₂₆₀/мл активированной ДНК, 20 мкМ радиоактивно меченный [³²P]NAD⁺ ([³²P]NAD⁺ : NAD⁺ = 1 : 9), 0.5 мг/мл экстракта или 30 нМ PARP1, 5 мМ MgCl₂ и буферные компоненты (50 мМ Трис-НСl рН 8.0, 40 мМ NaCl, 0.1 мг/мл BSA, 1 мМ DTT). Смесь инкубировали при 37°C в течение 1 мин. Отбирали 4 мкл пробы и наносили на бумажные мишени, пропитанные трихлоруксусной кислотой (ТХУ), останавливая реакцию. Мишени промывали 3 раза 5%-ным раствором ТХУ и 2 раза этиловым спиртом, затем высушивали и проводили радиоавтографический анализ.

Определение урацил-ДНК-гликозилазной активности в клеточных экстрактах. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 0.1 мкМ меченую ³²P U-ДНК (ДНК-1 или ДНК-4, табл. 1), 0.05 мг/мл экстракта или 0.1 ед. акт./мкл UDG, 10 мМ EDTA, 400 мкМ NAD⁺ (где указано), буферные компоненты (50 мМ Трис-НСl рН 8.0, 40 мМ NaCl, 5% глицерин, 0.1% Nonidet P-40, 1 мМ DTT). Реакцию проводили при температуре 37°C. Аликвоты объемом 2 мкл отбирали через 2, 5, 10 мин в равный объем 100 мМ NaOH и инкубировали в течение 10 мин при 60°C. Продукты реакции анализировали с помощью гель-электрофореза в 20% полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии 7 М мочевины и 10% формамида [33].

Анализ процессинга AP-сайтов белками клеточных экстрактов. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 0.1 мкМ ³²P-меченый AP-ДНК-дуплекс (ДНК-4, предварительно обработанная UDG, табл. 1), 0.01 мг/мл экстракта или 1 нМ APE1, 5 мМ MgCl₂, 400 мкМ NAD⁺ (где указано) и буферные компоненты: 50 мМ Трис-НСl рН 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 5% глицерин, 0.1% Nonidet P-40, 0.1 мг/мл BSA. Реакцию проводили при температуре 37°C. Аликвоты объемом 2 мкл отбирали через 2, 4, 8 мин в равный объем смеси метоксиами-

на (100 мМ) и EDTA (50 мМ) и инкубировали в течение 30 мин при 0°C. Продукты реакции анализировали с помощью электрофореза в 20%-ном ПААГ в присутствии 7 М мочевины и 10% формамида с последующей радиоавтографией [33]. Определение эффективности расщепления AP-сайтов по лиазному механизму проводили аналогичным образом, за исключением того, что в реакционные смеси вместо ионов магния добавляли 20 мМ EDTA, а времена инкубации составляли 10, 15 и 30 мин.

Определение ДНК-полимеразной активности в клеточных экстрактах. Реакционные смеси содержали 0.1 мкМ ³²P-меченый ДНК-дуплекс (ДНК-5, предварительно обработанная UDG, табл. 1), 0.05 мг/мл экстракта или 50 нМ POLβ, 5 мМ MgCl₂, смесь dATP, dCTP, dGTP и dTTP по 0.1 мкМ каждого, 400 мкМ NAD⁺ (где указано) и буферные компоненты: 50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 5% глицерин, 0.1% Nonidet P-40, 0.1 мг/мл BSA. Пробы инкубировали при 37°C и через 5, 10 и 15 мин отбирали аликвоты по 2 мкл в 1 мкл 25 мМ EDTA для остановки реакции. Анализ продуктов реакции проводили с помощью электрофореза в 20%-ном ПААГ в присутствии 7 М мочевины и 10% формамида с последующей радиоавтографией [33].

Определение ДНК-лигазной активности в клеточных экстрактах. Реакционные смеси содержали 0.1 мкМ ³²P-меченый ДНК-дуплекс (ДНК-6, табл. 1), 0.05 мг/мл экстракта или 0.1 ед. акт./мкл ДНК-лигазы T4, 5 мМ MgCl₂, 1 мМ АТР, 400 мкМ NAD⁺ (где указано) и буферные компоненты (50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 50 мМ NaCl), 1 мМ DTT, 5% глицерин, 0.1% Nonidet P-40, 0.1 мг/мл BSA. Пробы инкубировали при 37°C и через 5, 15, 30 мин отбирали аликвоты по 2 мкл в 1 мкл 25 мМ EDTA для остановки реакции. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 20%-ном ПААГ в присутствии 7 М мочевины и 10% формамида с последующей радиоавтографией [33].

РАРилирование ДНК. Стандартные реакционные смеси (10 мкл) содержали 50 мМ Трис-НСl (рН 8.0), 50 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 0.1 мг/мл BSA, 2 мМ спермин, 0.15 мМ NAD⁺, 10 мМ EDTA, 20 нМ [5'-³²P]-меченый ДНК-субстрат (ДНК-7, табл. 1) и 200 нМ PARP3; реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 15 мин. Затем добавляли белки клеточного экстракта (до 1.25 мг/мл) и/или PARP1 (200 нМ), PARP2 (200 нМ) и дополнительно инкубировали при 37°C в течение 15 мин. Реакцию останавливали, добавляя равный объем формамида. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 20% ПААГ в присутствии 7 М мочевины и 10% формамида с последующей радиоавтографией [33].

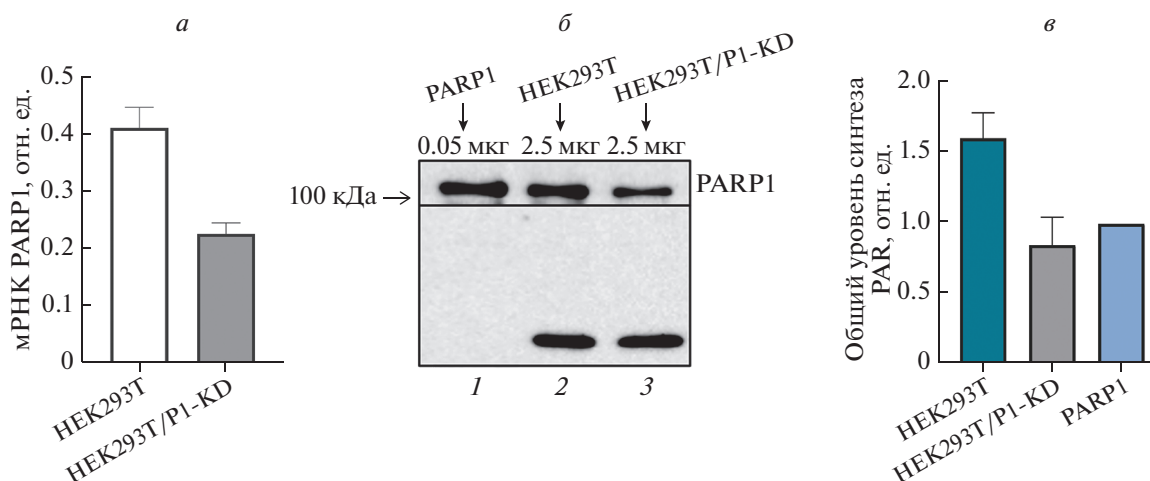


Рис. 1. Результаты ОТ-кПЦР (а), вестерн-блот-анализа уровня PARP1 в клеточных линиях HEK293T и HEK293T/P1-KD (б) и синтеза поли(ADP-рибозы) в цельноклеточных экстрактах (в). Относительные уровни мРНК определены в трех независимых экспериментах и представлены в виде средних значений со стандартным отклонением. Количество поли(ADP-рибозы), синтезированной за 1 мин при 37°C, представлено в виде гистограммы. В каждом эксперименте количество PAR, синтезируемой эндогенными PARP экстрактов, нормировали на количество полимера, синтезированное с помощью 30 нМ рекомбинантного PARP1. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение, вычисленные из трех независимых экспериментов.

Синтез $[^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$. Синтез радиоактивного NAD^+ осуществляли из $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, как описано в [19]. Реакционные смеси, содержащие 1 мМ АТФ, 10 МБк $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$, 20 мМ MgCl_2 , 2 мМ β -никотинамидмононуклеотид и 5 мг/мл никотинамиднуклеотидаденилилтрансферазы в 25 мМ Трис- HCl (pH 7.5), инкубировали при 37°C в течение 60 мин и останавливали нагреванием до 90°C в течение 3 мин. После удаления денатурированного белка центрифугированием раствор использовали в качестве источника NAD^+ без очистки.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

PARP1 – высококопийный белок, выполняющий плейотропные функции в клетках. Роль PARP1 в различных способах репарации ДНК ранее изучали на различных экспериментальных моделях, которые имеют свои преимущества и недостатки. Одним из удобных и продуктивных способов анализа активности ферментов репарации ДНК (в том числе и системы BER) на определенном этапе является реконструкция этой системы *in vitro* с использованием цельноклеточных экстрактов и интермедиатов ДНК с характерными для данной стадии репарации повреждениями ДНК. Использование клеток с уменьшенным количеством PARP1 открывает новые возможности для изучения влияния этого белка на эффективность системы BER как на уровне самих белков и/или их активности, так и на уровне кодирующих их мРНК. В нашей работе использована клеточная линия HEK293T/P1-KD, в которой уро-

вень PARP1 снижен введением в клетки конструкции (лентивирусный вектор LeGO Cer), подавляющей экспрессию по механизму РНК-интерференции.

Сначала были охарактеризованы уровни PARP1 в клетках HEK293T и HEK293T/P1-KD. С помощью ОТ-кПЦР показано, что в клеточной линии HEK293T/P1-KD уровень мРНК PARP1 практически в 2 раза ниже, чем в родительской линии HEK293T (рис. 1а).

Данные вестерн-блот-анализа (рис. 1б) согласуются с результатами ОТ-кПЦР и свидетельствуют о значительном, но неполном снижении количества PARP1. Следует отметить, что умеренное снижение количества PARP1 в клетках HEK293T/P1-KD отмечено исследователями, предоставившими нам клеточную линию [34].

С целью дальнейшей характеристики клеточных линий оценили эффективность синтеза поли(ADP-рибозы) (PAR), катализируемого эндогенными PARP цельноклеточных экстрактов. Для этого использовали меченный $[^{32}\text{P}]\text{NAD}^+$ и активированную ДНК в качестве кофактора (рис. 1в). Исходя из кинетики синтеза PAR эндогенными PARP экстрактов, в качестве интервала времени на линейной части кинетической кривой была выбрана 1 мин. Количество PAR, синтезированное в экстрактах, для адекватного сравнения нормировали на количество полимера, синтезированного с помощью 30 нМ рекомбинантного PARP1. Уровни синтеза PAR хорошо коррелируют с уровнями мРНК, кодирующей PARP1, и количеством PARP1, оцененным с помощью ве-

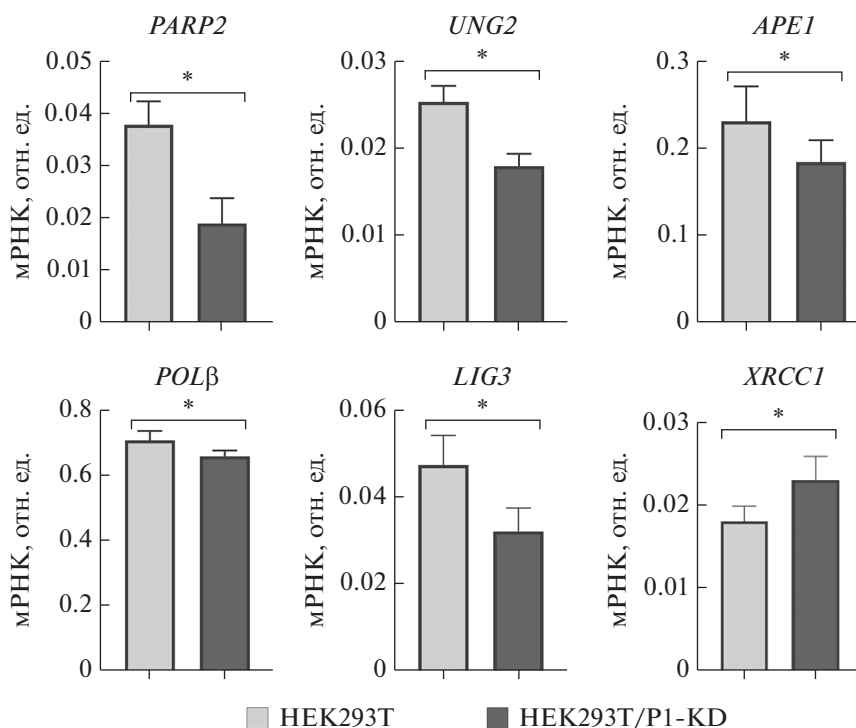


Рис. 2. Сравнение уровней мРНК, кодирующих PARP2, UNG2, APE1, POLβ, LIG3 и XRCC1 в клетках HEK293T и HEK293T/P1-KD. Уровни мРНК получены из трех независимых экспериментов. Величину P рассчитывали с использованием критерия Манна–Уитни, статистически значимым считали $p \leq 0.05$; * $p \leq 0.05$).

стерн-блотинга. Сравнение уровней PAR, синтезированной в экстрактах за счет активности именно PARP1, правомерно, поскольку, согласно опубликованным данным, этот фермент обеспечивает синтез более 90% поли(ADP-рибозы) в клетке [6–10]. Таким образом, снижение уровней PAR в исследуемых клеточных экстрактах соответствует степени подавления экспрессии PARP1.

Сравнение относительного уровня мРНК PARP2, UNG, APE1, POLβ, LIG3 и XRCC1 в клетках HEK293T и HEK293T/P1-KD

С использованием суммарной РНК, полученной из клеток HEK293T и HEK293T/P1-KD, оценено влияние изменения количества PARP1 в клетках на уровни мРНК, кодирующих белки SP-BER. На рис. 2 представлены данные ОТ-кПЦР с относительными уровнями мРНК генов, кодирующих некоторые ключевые белки, участвующие в SP-BER: PARP2, UNG, APE1, POLβ, LIG3 и XRCC1. В клетках с нокаутом PARP1 уровень мРНК PARP2 снижен приблизительно в 2 раза в сравнении с клетками родительской линии. Кроме того, снижение экспрессии генов UNG2, APE1, POLβ и LIG3 в этих клетках менее выражено, а в случае XRCC1 регистрируется умеренное повышение.

Оценка эффективности стадий BER в экстрактах из клеток HEK293T и HEK293T/P1-KD

Влияние PARP1 на активность белков SP-BER на всех этапах процесса: удаление урацила из цепи, процессинг AP-сайта, синтез ДНК и лигирование разрыва, оценили с помощью функциональных тестов с использованием ^{32}P -меченых ДНК-структур, моделирующих интермедиаты соответствующих стадий BER, и цельноклеточных экстрактов. Кроме того, чтобы оценить возможное влияние синтеза PAR на этапы процесса BER, тесты выполняли в присутствии NAD^+ .

Удаление урацила из ДНК. В общем случае BER начинается с удаления поврежденного азотистого основания ДНК-гликозилазами. Таким поврежденным азотистым основанием, репарируемым системой BER, может быть урацил. Урацил иногда включается вместо тимина во время синтеза ДНК или может получаться путем спонтанного и ферментативного дезаминирования цитозина. Считается, что в одной клетке спонтанное дезаминирование цитозинон происходит 70–200 раз в день [35].

Клетки высших эукариот содержат три типа урацил-ДНК-гликозилаз [36] – SMUG (одноцепочечная селективная урацил-ДНК-гликозилаза), UNG1 (митохондриальная UNG) и UNG2 (ядерная UNG). Урацил-N-гликозилазы UNG2 и

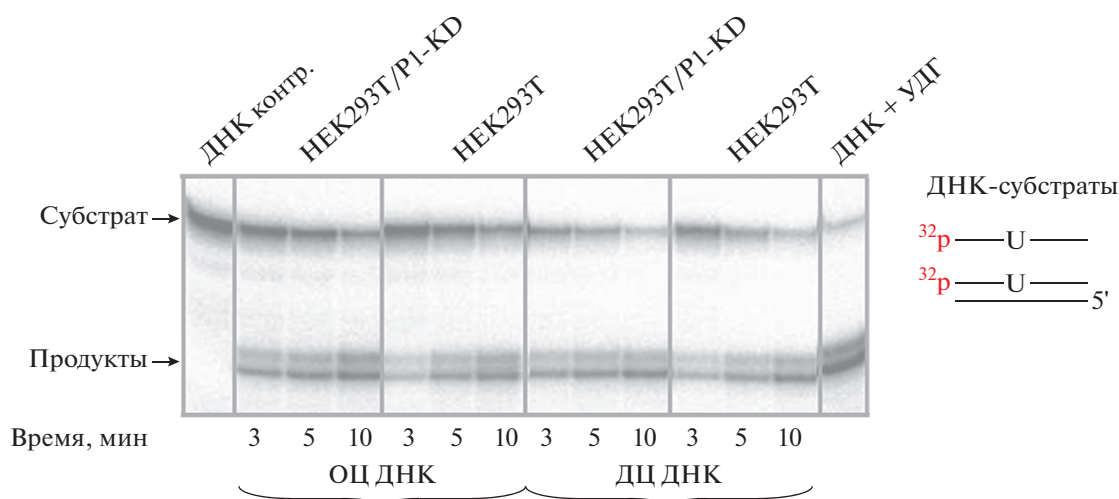


Рис. 3. Эффективность удаления урацила из ДНК. Реакционные смеси (10 мкл) содержали 0.1 мкМ ^{32}P -меченую урацилсодержащую ДНК, цельноклеточный экстракт в конечной концентрации 0.05 мг/мл или UDG и буферные компоненты.

SMUG1 инициируют BER в большинстве контекстов ДНК [36].

Удаление урацила отслеживали, применяя обработку ДНК щелочью, которая расщепляет сахарофосфатный остов в месте AP-сайта, образовавшегося в результате удаления урацила. Сравнили эффективность удаления урацила как из двухцепочечной, так и из одноцепочечной ДНК (ДНК-1 и ДНК-4, табл. 1).

Не обнаружено значимых отличий в эффективности выщепления урацила из одноцепочечных и двухцепочечных субстратов в экстрактах обоих типов (рис. 3). Присутствие NAD^+ также не оказывало значимого влияния на удаление урацила.

Следует отметить, что при определении влияния синтеза PAR на активность эндогенных ферментов исследуемых экстрактов в качестве кофактора PARP1, необходимого для активации этого фермента, выступал ДНК-субстрат, имитирующий интермедиат определенной стадии BER. Предварительно с использованием рекомбинантной PARP1 сравнили кофакторные характеристики активированной ДНК, традиционно используемой в тестах определения активности PARP1, и ДНК-субстратов BER в концентрации 0.1 мкМ. Такая концентрация ДНК-субстратов BER использована нами для определения в экстрактах активности ферментов этого пути репарации. Скорость синтеза PAR в присутствии ДНК-субстратов BER приблизительно в 2 раза ниже, чем в стандартной смеси с активированной ДНК (0.6 A_{260} /мл). В результате выщепления урацила из цепи образуется AP-сайт, который далее подвергается процессингу.

Процессинг AP-сайтов. Разрезание сахарофосфатного остова по положению AP-сайта может

происходить за счет гидролиза либо расщепления по механизму β - или β,δ -элиминирования. Основной вклад в процессинг AP-сайтов в клетках млекопитающих вносит именно гидролиз, приводящий к формированию разрыва с 3'-гидроксильной и 5'-дезоксирибозофосфатной группами [37]. APE1 ответственна за гидролиз 95% AP-сайтов в клетках млекопитающих [38].

Данные о взаимном влиянии PARP1 и APE1 в процессе BER противоречивы. Следует отметить, что наблюдали как стимулирующие, так и ингибирующие эффекты при кооперации этих ферментов [12, 13, 39–41]. На рис. 4 представлены данные по эффективности расщепления AP-сайтов. Степень гидролиза AP-сайтов в экстракте клеток HEK293T/P1-KD несколько ниже, чем в экстракте клеток родительской линии. Таким образом, в использованных условиях PARP1 оказывает слабое стимулирующее влияние. Присутствие NAD^+ как субстрата PARилирования практически не влияет на процесс.

Для оценки вклада независимого от Mg^{2+} расщепления AP-сайтов реакцию проводили в присутствии EDTA, чтобы подавить связывание ионов металла с APE1. Такое расщепление AP-сайта может происходить по лиазному механизму за счет действия бифункциональных ДНК-гликозилаз и других ферментов, обладающих AP-лиазной активностью [1, 2, 6, 13, 14]. В частности, такую активность, согласно полученным нами данным, проявляют PARP1 и PARP2 [6, 13, 14]. Также возможно ферментативное расщепление AP-сайтов по гидролитическому механизму, не требующему ионов магния для катализа. К числу таких ферментов относится тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 [42]. В целом, вклад магний-не-

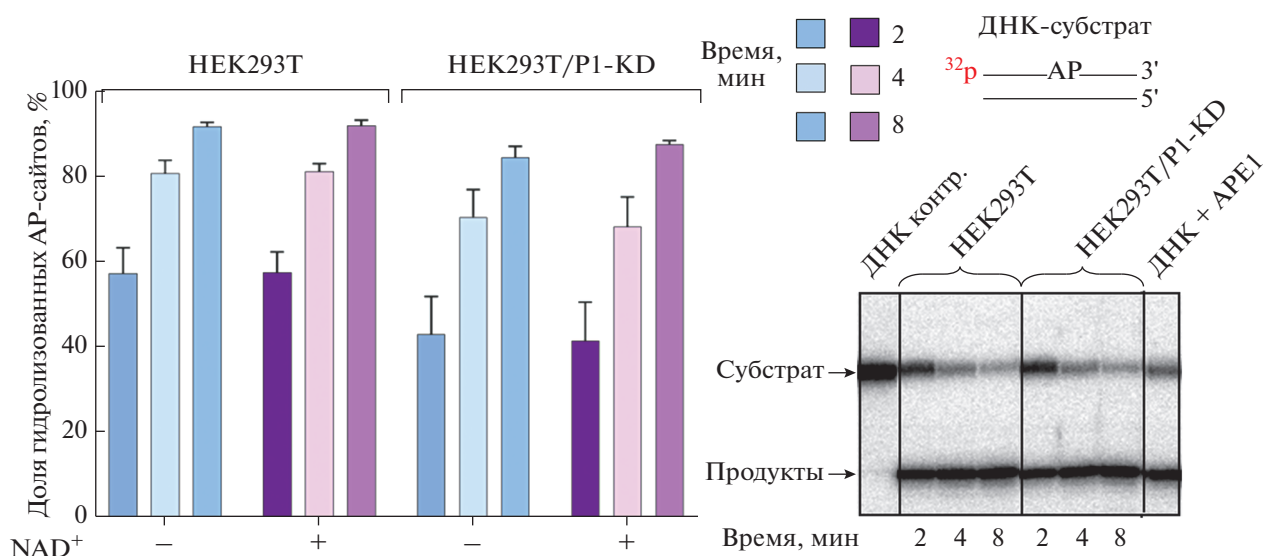


Рис. 4. Эффективность гидролиза AP-сайтов. Реакционные смеси (10 мкл) содержали 0.1 мкМ ³²P-меченую AP-ДНК, цельноклеточный экстракт в конечной концентрации 0.01 мг/мл или 1 нМ APE1, 5 мМ MgCl₂, 400 мкМ NAD⁺ (если указано) и буферные компоненты. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

зависимого процессинга AP-сайтов невелик и в использованных условиях составляет 4–6%. Эти варианты расщепления AP-сайтов могут обеспечивать независимые от APE1 пути процессинга AP-сайтов, однако они значительно менее эффективны и, по-видимому, могут иметь значение для обеспечения выживания клеток при утрате APE1.

Синтез ДНК. Следующий шаг BER — синтез цепи ДНК в месте разрыва, образовавшегося после процессинга AP-сайта. Основной вклад в застраивание бреши в субстрате SP-BER вносит ДНК-полимераза β [43].

В работах нашей лаборатории с использованием рекомбинантных белков и некоторых клеточных экстрактов было показано, что PARP1 может снижать ДНК-полимеразную активность POL β , особенно в синтезе ДНК с вытеснением цепи [40, 41, 44]. Автомоификация же PARP1 снижает ингибирующее действие этого белка. Данные по синтезу ДНК представлены на рис. 5. В экстракте клеток HEK293T/P1-KD со сниженным содержанием PARP1 эффективность удлинения праймеров несколько выше, чем в экстракте исходной клеточной линии. Это относится как к встраиванию одного нуклеотида, в случае SP-BER, так и к включению в праймеры нескольких нуклеотидных звеньев, что происходит в LP-BER. Удлинение праймеров на большее количество нуклеотидных звеньев не учитывается в использованной здесь количественной оценке. В условиях синтеза PAR (присутствие NAD⁺) эффективность синтеза ДНК несколько выше для обоих экстрактов. Полученные результаты полностью объясняются

конкуренцией за связывание с субстратом между POL β и PARP1, а, возможно, и PARP2. PARP1 и PARP2 обладают высоким сродством к ДНК, содержащим брешь [44–46]. Автомоифицированная форма PARP1 проявляет более низкое сродство к ДНК по сравнению с исходной формой из-за электростатического отталкивания ДНК и PAR, что выражается в уменьшении комплексообразования фермента с ДНК и приводит к менее эффективному удлинению праймера.

Лигирование ДНК. Последний этап SP-BER — восстановление целостности сахарофосфатного остова — осуществляется ATP-зависимой ДНК-лигазой III альфа (LIG3). LIG3 образует стабильный комплекс с архитектурным белком XRCC1 и этот комплекс участвует в BER [46]. XRCC1 не обладает каталитической активностью, но формируя двойные и тройные комплексы с несколькими ферментами (белками) BER, обеспечивает их согласованное взаимодействие, которое в значительной степени обусловлено способностью XRCC1 связываться с самими белками BER, а также PARилироваться и связываться с PAR [46, 47].

ДНК-лигазную активность в экстрактах исследуемых клеточных линий оценивали с использованием ДНК-субстрата с разрывом в одной из цепей (ДНК-6, табл. 1). На рис. 6 представлены данные эффективности лигирования разрыва в экстрактах за 5, 15, 30 мин. Из-за низкой эффективности этого процесса времена инкубации были увеличены по сравнению с другими реакциями BER, что приводит к появлению в образцах частично гидролизованного олигонуклеотидов. Не

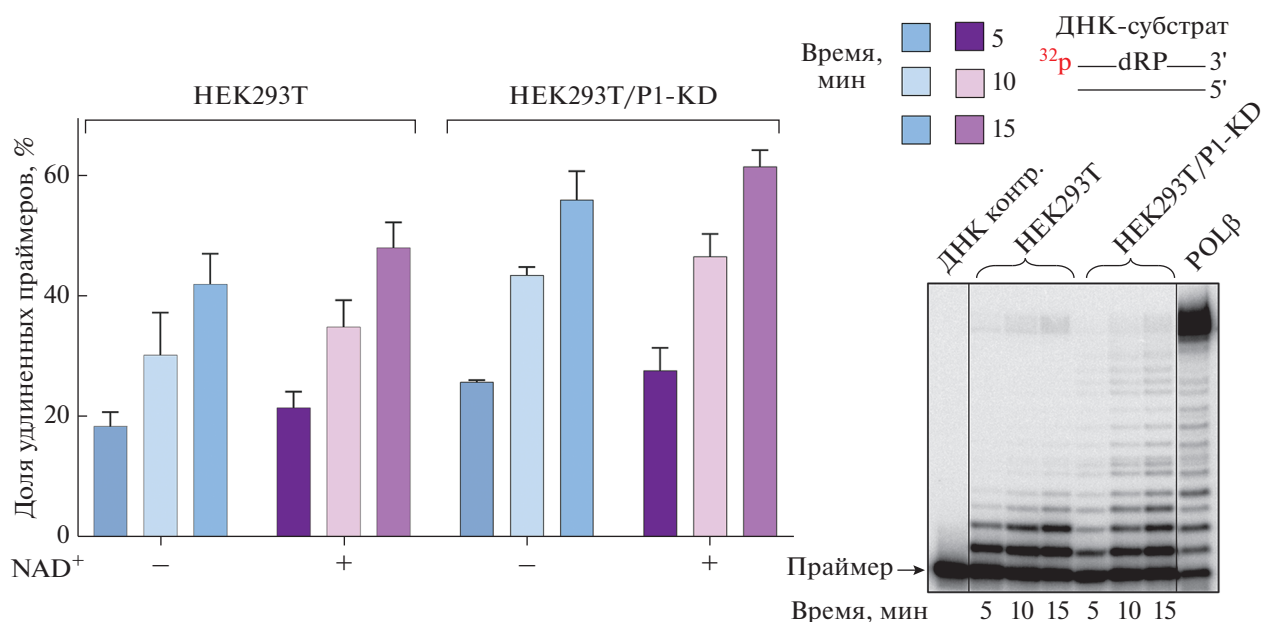


Рис. 5. Эффективность синтеза ДНК. Реакционные смеси (10 мкл) содержали 0.05 мг/мл белков экстракта или 50 нМ POL β , 5 мМ MgCl $_2$, смесь dATP, dCTP, dGTP и dTTP по 0.1 мМ каждого, 0.1 мкМ 32 P-меченую ДНК, 400 мкМ NAD $^+$ (где указано) и буферные компоненты. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение, вычисленные в трех независимых экспериментах.

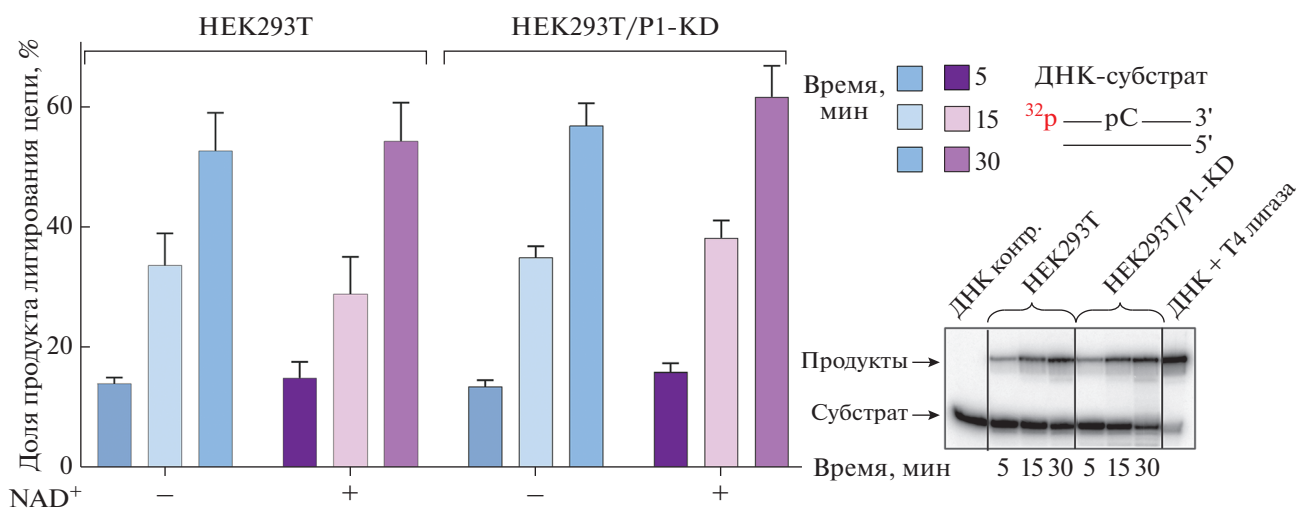


Рис. 6. Эффективность лигирования ДНК. Реакционные смеси (10 мкл) содержали 0.1 мкМ 32 P-меченый ДНК-дуплекс, 0.05 мг/мл белков экстракта или 0.1 ед. акт./мкл ДНК-лигазы T4, 5 мМ MgCl $_2$, 1 мМ ATP, 400 мкМ NAD $^+$ (где указано) и буферные компоненты. Данные представлены как среднее значение \pm стандартное отклонение, вычисленные из трех независимых экспериментов.

удалось обнаружить ни достоверной разницы в эффективности лигирования между исходным и модифицированным по содержанию белка PARP1 экстрактами, ни влияния синтеза PAR на этот процесс.

Поли(ADP-рибозил)ирование ДНК. Еще один недавно обнаруженный процесс, в котором участвуют PARP, — поли(ADP-рибозил)ирование

ДНК [18–23]. Нами и другими исследователями продемонстрировано поли(ADP-рибозил)ирование концов ДНК за счет активности PARP1 и PARP2 и моно(ADP-рибозил)ирование — PARP3 [18–23]. Более того, 5'-концевые моно(ADP-рибозил)ированные ДНК являются значительно более эффективными субстратами для удлинения цепи PAR с помощью PARP1 и PARP2 по сравне-

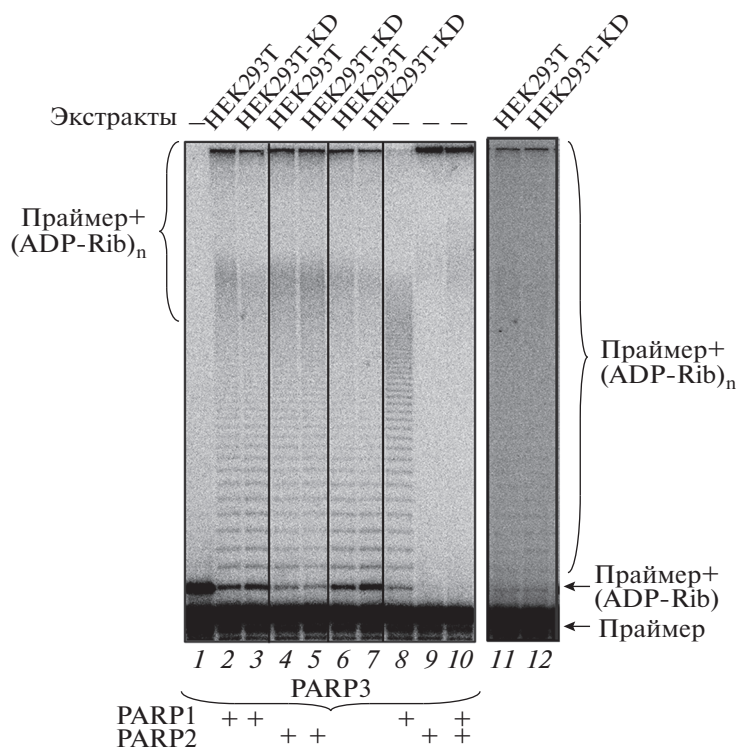


Рис. 7. Поли(ADP-рибозил)ирование ДНК. Стандартные реакционные смеси (10 мкл) содержали 50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ DTT, 0.1 мг/мл BSA, 2 мМ спермин, 0.15 мМ NAD⁺, 10 мМ EDTA, 20 нМ [5'-³²P]-меченый ДНК-субстрат (ДНК-7, табл. 1) и белки клеточного экстракта (1.25 мг/мл); реакционные смеси инкубировали при 37°C в течение 15 мин (11 и 12). В ряде случаев в реакционные смеси добавляли 200 нМ PARP3 и инкубировали при 37°C в течение 15 мин, затем добавляли белки клеточного экстракта (до 1.25 мг/мл) и/или PARP1 (200 нМ), PARP2 (200 нМ) и дополнительно инкубировали при 37°C в течение 15 мин.

нию с немодифицированными ДНК. Кроме того, обнаружено поли(ADP-рибозил)ирование ДНК эндогенными PARP нескольких экстрактов клеток млекопитающих, которые отличаются количеством PARP-рибозилирования ДНК от количества этого белка [18, 19, 21–23]. Такая модификация ДНК может рассматриваться как механизм защиты двухцепочечных концов от “подрезания” клеточными нуклеазами. С учетом специфических требований PARP к структуре ДНК в реакции ее (ADP-рибозил)ирования защитный эффект может реализовываться, когда двухцепочечные концы и разрывы/бреши расположены в пределах 1–2 витков спирали ДНК, чтобы обеспечить временной промежутки, необходимый для репарации одноцепочечного разрыва [20, 21, 23]. Учитывая различия в содержании PARP1 и, вероятно, PARP2 в исследуемых экстрактах, можно ожидать и существование различий в паттернах модификации ДНК. Данные поли(ADP-рибозил)ирования ДНК в экстрактах с использованием ДНК-7, которая содержит однонуклеотидную брешь, приведены на рис. 7. Эта ДНК представляет собой модельный субстрат BER, мы использовали ее и ранее [21, 23]. Поли(ADP-рибозил)ирование ДНК эндогенными

PARP происходит в обоих экстрактах (рис. 7, 11 и 12), однако с низким выходом, что затрудняет проведение анализа. Ранее такую же картину регистрировали для схожих по структуре ДНК-дуплетов и экстрактов клеток млекопитающих и показали, что выход продуктов поли(ADP-рибозил)ирования ДНК значительно увеличивается в случае ДНК, предварительно модифицированных одним остатком ADP-рибозы [19]. Такую модификацию удобнее всего вводить с использованием PARP3 (рис. 7, 1) [18]. Последующая инкубация с белками экстрактов, а также белками экстрактов, дополненными рекомбинантным PARP3 и/или рекомбинантными PARP1 и PARP2 (рис. 7, 4–8) приводит к формированию поли(ADP-рибозил)ированной ДНК, которая содержит продукты пошагового удлинения праймера остатками ADP-рибозы и высокомолекулярные продукты, не решающиеся в процессе электрофореза (обозначены скобками слева).

Экстракт HEK293T/P1-KD характеризуется менее эффективным PARP-рибозилированием праймера — выход продуктов 71 против 84% в экстракте HEK293T (рис. 7, 6 и 7). Каждая из рекомбинантных PARP1 и PARP2 имеет свой паттерн PARP-рибозилирования олигонуклеотида; продукты пошагового

удлинения праймера остатками ADP-рибозы при незначительном количестве высокомолекулярных продуктов характерны для PARP1, в то время как PARP2 образует высокомолекулярные продукты, не разрешающиеся в процессе электрофореза, при практически полном отсутствии праймера с относительно небольшим количеством присоединенных остатков ADP-рибозы (рис. 7, 8 и 9). При совместном присутствии PARP1 и PARP2 наблюдается распределение продуктов PARилирования праймера, характерное для PARP2, что свидетельствует об эффективном функционировании PARP2 в этом процессе. Если же добавлять PARP1 и PARP2 в экстракты, то распределение указанных продуктов изменяется незначительно по сравнению с исходными экстрактами (рис. 7, сравнить 2+3 и 4+5 с 6+7). Однако следует отметить уменьшение количества неизрасходованного моно(ADP-рибозил)ированного праймера при добавлении PARP2 в экстракты (с 16 до 5% и с 29 до 6% для HEK293T и HEK293T/P1-KD соответственно). Добавление дополнительных количеств PARP1 и PARP2 в экстракты приводит к сдвигу паттерна формируемых продуктов к виду, характерному для каждой из PARP. Этот эффект более ярко проявляется в случае PARP2. Однако нужно отметить, что влияние добавленного PARP2 в экстрактах несоизмеримо ниже, чем в системе, реконструированной из очищенных белков, где паттерн продуктов при совместном присутствии эквимоллярных количеств PARP1 и PARP2 практически не отличается от паттерна PARP2. Это, по-видимому, обусловлено конкуренцией других ДНК-связывающих белков клетки. В целом, снижение количества PARP1 в экстрактах не внесло принципиальных изменений в характер PARилирования ДНК. Полученные результаты однозначно выявляют кооперацию трех PARP, активирующихся при взаимодействии с ДНК, в PARилирование этой мишени.

Таким образом, не выявлено значимого влияния количества PARP1 в экстрактах на активность основных ферментов SP-BER и PARилирование ДНК. Не обнаружено также существенного влияния PARP1 на уровни мРНК ферментов BER. По-видимому, в отсутствие сильного стрессового воздействия на клетки PARP1 может участвовать в точной подстройке активностей ферментов BER за счет относительно небольших эффектов. Полученные данные о слабом влиянии PARP1 на активность системы BER согласуются с текущими представлениями об избыточной “пропускной способности” системы BER и о том, что лишние количества невостребованных белков подвергаются процессингу, например, за счет убиквитинзависимой системы протеолиза [48–50].

Основная часть работы выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 19-

14-00204); эксперименты по PARилированию ДНК – Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-00674 А).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hegde M.L., Hazra T.K., Mitra S. (2008) Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res.* **18**, 27–47.
- Almeida K.H., Sobol R.W. (2007) A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification. *DNA Repair.* **6**, 695–711.
- Schärer O.D. (2003) Chemistry and biology of DNA repair. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **42**, 2946–2974.
- Frosina G., Fortini P., Rossi O., Carrozzino F., Raspaglio G., Cox L.S., Lane D.P., Abbondandolo A., Dogliotti E. (1996) Two pathways for base excision repair in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **271**, 9573–9578.
- Klungland A., Lindahl T. (1997) Second pathway for completion of human DNA base excision-repair: reconstitution with purified proteins and requirement for DNase IV (FEN1). *EMBO J.* **16**, 3341–3348.
- Ходырева С.Н., Лаврик О.И. (2016) Поли(ADP-рибоза)полимераза 1 – ключевой регулятор репарации ДНК. *Молекуляр. биология.* **50**, 655–673.
- Langelier M.F., Eisemann T., Riccio A.A., Pascal J.M. (2018) PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly(ADP-ribose) posttranslational modification. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **53**, 187–198.
- Alemasova E.E., Lavrik O.I. (2019) Poly(ADP-ribosylation) by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins. *Nucl. Acids Res.* **47**, 3811–3827.
- Hanzlikova H., Gittens W., Krejciikova K., Zeng Z., Caldecott K.W. (2017) Overlapping roles for PARP1 and PARP2 in the recruitment of endogenous XRCC1 and PNKP into oxidized chromatin. *Nucl. Acids Res.* **45**, 2546–2557.
- De Vos M., Schreiber V., Dantzer F. (2012) The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art. *Biochem. Pharmacol.* **84**, 137–146.
- Mortusewicz O., Amé J.-C., Schreiber V., Leonhardt H. (2007) Feedback-regulated poly(ADP-ribosylation) by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. *Nucl. Acids Res.* **35**, 7665–7675.
- Sukhanova M.V., Khodyreva S.N., Lebedeva N.A., Prasad R., Wilson S.H., Lavrik O.I. (2005) Human base excision repair enzymes apurinic/apyrimidinic endonuclease1 (APE1), DNA polymerase beta and poly(ADP-ribose) polymerase 1: interplay between strand-displacement DNA synthesis and proofreading exonuclease activity. *Nucl. Acids Res.* **33**, 1222–1229.
- Khodyreva S.N., Prasad R., Ilna E.S., Sukhanova M.V., Kutuzov M.M., Liu Y., Hou E.W., Wilson S.H., Lavrik O.I. (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.
14. Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Ilina E.S., Sukhanova M.V., Amé J.C., Lavrik O.I. (2015) Interaction of PARP-2 with AP site containing DNA. *Biochimie*. **112**, 10–19.
 15. Sukhanova M.V., Hamon L., Kutuzov M.M., Joshi V., Abrakhi S., Dobra I., Curmi P.A., Pastre D., Lavrik O.I. (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.
 16. Kurgina T.A., Anarbaev R.O., Sukhanova M.V., Lavrik O.I. (2018). A rapid fluorescent method for the real-time measurement of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity. *Anal. Biochem.* **545**, 91–97.
 17. Matveeva E.A., Mathbout L.F., Fondufe-Mittendorf Y.N. (2019) PARP1 is a versatile factor in the regulation of mRNA stability and decay. *Sci. Repts.* **9**, 1–12.
 18. Belousova E.A., Ishchenko A.A., Lavrik O.I. (2018) DNA is a new target of PARP3. *Sci. Rep.* **8**, 4176.
 19. Kosova A.A., Kutuzov M.M., Evdokimov A.N., Ilina E.S., Belousova E.A., Romanenko S.A., Trifonov V.A., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. (2019) Poly(ADP-ribosylation) and DNA repair synthesis in the extracts of naked mole rat, mouse, and human cells. *Aging (Albany NY)*. **11**, 2852–2873.
 20. Белоусова Е.А., Кутузов М.М., Иванкина П.А., Ищенко А.А., Лаврик О.И. (2018) Новый путь репарации разрывов ДНК с участием PARP3 и белков эксцизионной репарации оснований. *ДАН*. **482**, 96–100.
 21. 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. (2016) Poly(ADP-ribose) polymerases covalently modify strand break termini in DNA fragments *in vitro*. *Nucl. Acids Res.* **44**, 9279–9295.
 22. Munnur D., Ahel I. (2017) Reversible mono-ADP-ribosylation of DNA breaks. *FEBS J.* **284**, 4002–4016.
 23. 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. (2018) Characterization of DNA ADP-ribosyltransferase activities of PARP2 and PARP3: new insights into DNA ADP-ribosylation. *Nucl. Acids Res.* **46**, 2417–2431.
 24. Lebedeva N.A., Khodyreva S.N., Favre A., Lavrik O.I. (2003) AP endonuclease 1 has no biologically significant 3'–5'-exonuclease activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 182–187.
 25. Драчкова И.А., Петрусева И.О., Сафронов И.В., Захаренко А.Л., Шишкин Г.В., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. (2001) Реагенты для модификации белково-нуклеиновых комплексов. II. Сайт-специфическая фотомодификация комплексов ДНК-полимеразы β праймерами, элонгированными экзо-N-замещенными арилизидными производными dСТР. *Биоорганическая химия*. **27**, 197–204.
 26. Amé J.C., Kalisch T., Dantzer F., Schreiber V. (2011) Purification of recombinant poly(ADP-ribose) polymerases. *Meth. Mol. Biol.* **780**, 135–152.
 27. Biade S., Sobol R.W., Wilson S.H., Matsumoto Y. (1998) Impairment of proliferating cell nuclear antigen-dependent apurinic/aprimidinic site repair on linear DNA. *J. Biol. Chem.* **273**, 898–902.
 28. Rio D.C., Ares M. Jr., Hannon G.J., Nilsen T.W. (2010) Purification of RNA using TRIzol (TRI Reagent). *Cold Spring Harb. Protoc.* pdb.prot.5439.
 29. Bradford M.A. (1976) Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
 30. Ilina E.S., Lavrik O.I., Khodyreva S.N. (2008) Ku antigen interacts with abasic sites. *Biochim. Biophys. Acta*. **1784**, 1777–1785.
 31. Ilina E.S., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. (2018) Unusual interaction of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1) with abasic sites via the Schiff-base-dependent mechanism. *Biochimie*. **150**, 88–99.
 32. Laemmli U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–685.
 33. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press., 2nd Ed.
 34. Savelyev N.V., Shepelev N.M., Lavrik O.I., Rubtsova M.P., Dontsova O.A. (2021) PARP1 regulates the biogenesis and activity of telomerase complex through modification of H/ACA-Proteins. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, 621134.
 35. Doseth B., Visnes T., Wallenius A., Ericsson I., Sarno A., Pettersen H.S., Flatberg A., Catterall T., Slupphaug G., Krokan H.E., Kavli B. (2011) Uracil-DNA glycosylase in base excision repair and adaptive immunity: Species differences between man and mouse. *J. Biol. Chem.* **286**, 16669–16680.
 36. Doseth B., Ekre C., Slupphaug G., Krokan H.E., Kavli B. (2012) Strikingly different properties of uracil-DNA glycosylases UNG2 and SMUG1 may explain divergent roles in processing of genomic uracil. *DNA Repair (Amst)*. **11**, 587–593.
 37. Mol C.D., Hosfield D.J., Tainer J.A. (2000) Abasic site recognition by two apurinic/aprimidinic endonuclease families in DNA base excision repair: the 3' ends justify the means. *Mutat. Res.* **460**, 211–229.
 38. Wilson D.M., Barsky D. (2001) The major human abasic endonuclease: formation, consequences and repair of abasic lesions in DNA. *Mutat. Res.* **485**, 283–307.
 39. Prasad R., Dyrkheeva N., Williams J., Wilson S.H. (2015) Mammalian base excision repair: functional partnership between PARP-1 and APE1 in AP-site repair. *PLoS One*. **10**, e0124269.
 40. Суханова М.В., Ходырева С.Н., Лаврик О.И. (2004) Поли(ADP-рибоза)-полимераза-1 ингибирует синтез ДНК с вытеснением цепи, катализируемый ДНК-полимеразой β . *Биохимия*. **69**, 558–568.
 41. Sukhanova M., Khodyreva S., Lavrik O. (2010) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates activity of DNA polymerase beta in long patch base excision repair. *Mutat. Res. — Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **685**(1–2), 80–89.
 42. Lebedeva N.A., Rechkunova N.I., El-Khamisy S.F., Lavrik O.I. (2012) Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1

- initiates repair of apurinic/aprimidinic sites. *Biochimie*. **94**, 1749–1753.
43. Srivastava D.K., Berg B.J., Prasad R., Molina J.T., Beard W.A., Tomkinson A.E., Wilson S.H. (1998) Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps. *J. Biol. Chem.* **273**, 21203–21209.
 44. Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Amé J.C., Ilina E.S., Sukhanova M.V., Schreiber V., Lavrik O.I. (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.
 45. Kutuzov M.M., Belousova E.A., Kurgina T.A., Ukraintsev A.A., Vasil'eva I.A., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. (2021) The contribution of PARP1, PARP2 and poly(ADP-ribose) to base excision repair in the nucleosomal context. *Sci. Rep.* **11**, 4849.
 46. Caldecott K.W. (2019) XRCC1 protein; form and function. *DNA Repair (Amst)*. **81**, 102664.
 47. Моор Н.А., Лаврик О.И. (2018) Белок-белковые взаимодействия системы эксцизионной репарации оснований ДНК. *Биохимия*. **83**, 564–576.
 48. Parsons J.L., Dianov G.L. (2013) Co-ordination of base excision repair and genome stability. *DNA Repair (Amst)*. **12**, 326–333.
 49. Edmonds M.J., Parsons J.L. (2014) Regulation of base excision repair proteins by ubiquitylation. *Exp. Cell. Res.* **329**, 132–138.
 50. Fang Q., Inanc B., Schamus S., Wang X.H., Wei L., Brown A.R., Svilar D., Sugrue K.F., Goellner E.M., Zeng X., Yates N.A., Lan L., Vens C., Sobol R.W. (2014) HSP90 regulates DNA repair via the interaction between XRCC1 and DNA polymerase β . *Nat. Commun.*, **5**, 5513.

Influence of Poly(ADP-ribose)polymerase 1 Level on the Status of Base Excision Repair in Human Cells

E. S. Ilina^{1, 2}, A. S. Kochetkova^{1, 2}, E. A. Belousova^{1, 2}, M. M. Kutuzov^{1, 2},
O. I. Lavrik^{1, 2}, and S. N. Khodyreva^{1, *}

¹*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: svetakh@niboch.nsc.ru

The base excision repair (BER) system is aimed at repair of the largest group of DNA lesions, namely of damaged bases. The main steps in BER are: recognition and removal of the aberrant base, cutting the DNA sugar-phosphate backbone, gap processing (including dNMP insertion), and DNA ligation. The precise functioning of BER depends on the regulation of each step of the process by regulatory/accessory proteins, the most important of which is poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP1). PARP1 plays an important role in various processes of DNA repair, maintenance of genome integrity, and regulation of mRNA stability and decay. In this regard, PARP1 can affect BER both at the level of proteins involved in the process and at the level of expression of the mRNAs encoding them. There are no systematic data on the effect of various amounts of PARP1 on the activity of key BER proteins and the levels of mRNAs encoding them in human cells. In our work, using whole-cell extracts and RNA preparations obtained from the parental HEK293T cell line and its derivative HEK293T/P1-KD cell line with reduced PARP1 expression (shPARP1-expressing cells, PARP1 knockdown), we assessed the levels of mRNA encoding BER proteins: PARP1, PARP2, uracil DNA glycosylase (UNG2), AP endonuclease 1 (APE1), DNA polymerase β (POL β), DNA ligase III (LIG3), and XRCC1. In parallel, the catalytic activity of these enzymes was evaluated. No significant effect of the PARP1 amount of on the mRNA levels of UNG2, APE1, POL β , LIG3, and XRCC1 was found. At the same time, in HEK293T/P1-KD cells, the amount of PARP2 mRNA was reduced by 2 times. The activities of these enzymes in whole-cell extracts of HEK293T and HEK293T/P1-KD cells also did not differ significantly. Under the conditions of poly(ADP-ribose) synthesis, the efficiency of the reactions catalyzed by UNG2, APE1, POL β , and LIG3 also did not change significantly. In addition, it was shown that a reduced amount of PARP1 in the extract of HEK293T/P1-KD cells does not cause fundamental changes in the nature of DNA PARylation compared to the extract of the parental HEK293T cell line.

Keywords: Base excision repair enzymes, poly(ADP-ribose)polymerase 1, mRNA, poly(ADP-ribose) synthesis, DNA poly(ADP-ribose)ylation