

На правах рукописи

Украинцев Александр Андреевич

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

1.4.9 – биоорганическая химия

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Новосибирск 2025

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

Научные руководители:

Лаврик Ольга Ивановна, д.х.н., академик РАН, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

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

Официальные оппоненты:

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

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

Шайтан Алексей Константинович, д.ф.-м.н., чл.-корр. РАН, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», г. Москва, профессор.

Защита состоится «03» октября 2025 г. в 12:00
на заседании диссертационного совета ИХБФМ.02.01 при Институте
химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу:
630090, проспект академика Лаврентьева, 8, Новосибирск

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

Автореферат разослан «01» сентября 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н., Пестряков П.Е.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Положения, выносимые на защиту.

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

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

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

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

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

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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

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

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

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

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

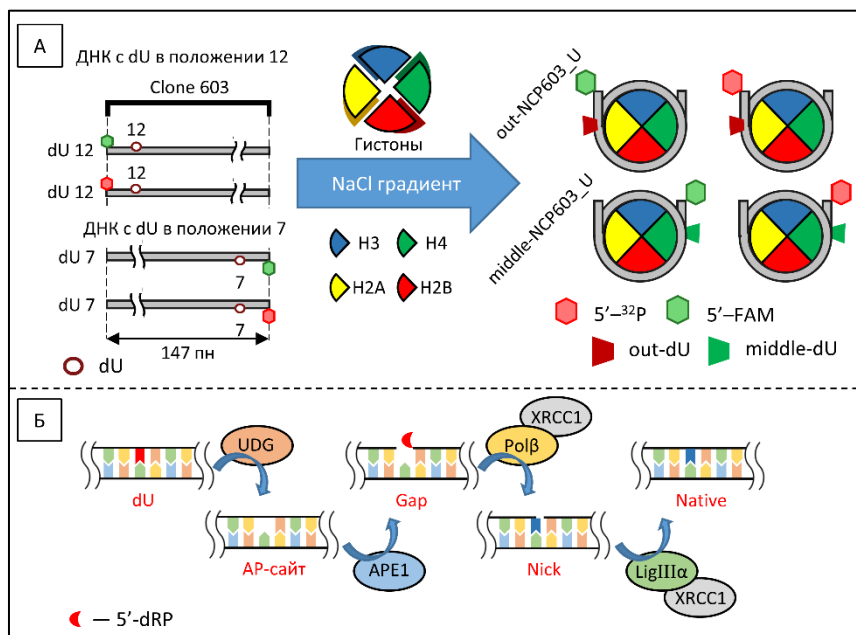


Рис. 1. **А** — Схематичное изображение процесса реконструирования нуклеосом NCP603_U. Изображены используемые в работе ДНК на основе нуклеосом-позиционирующей последовательности (NPS) «Clone 603» и нуклеосомы «NCP603_U», содержащие dU в положении 12 и 7. Положение 12 в нуклеосоме соответствует «out»-ориентированному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

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

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

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

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

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

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

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

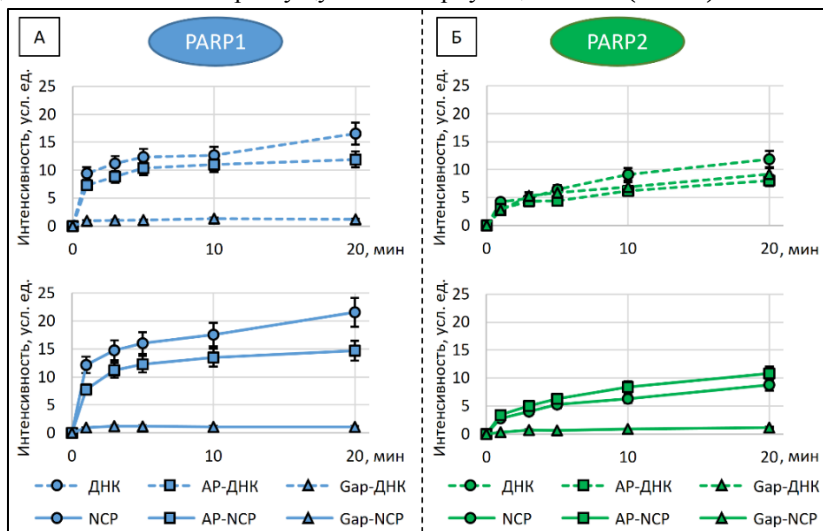


Рис. 2. Активация PARP1 и PARP2 на ДНК и NCP, включая интермедиаты BER в положении «out» (**Рис. 1**). **А** — Кинетические кривые синтеза поли(ADP-рибозы) ферментом PARP1. **Б** — Кинетические кривые синтеза поли(ADP-рибозы) ферментом PARP2. Каждая точка на графиках отражает среднее значение синтезированного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

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

1.3. Влияние PARP1 и PARP2 на активность фермента APE1

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

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

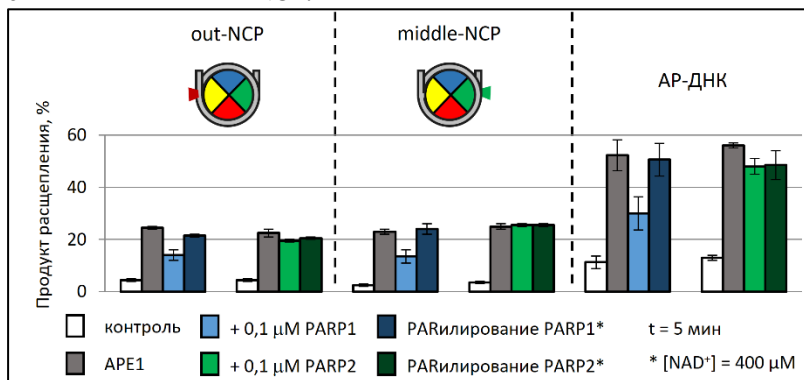


Рис. 3. Влияние PARP1 и PARP2 на активность APE1 в присутствии различных ДНК-структур. На рисунке приведены средние значения уровня расщепления AP-сайта ($\pm$ SD) для трех независимых экспериментов. Реакционные смеси во всех случаях содержали буфер состава: 10 mM Tris-HCl, pH = 7,5; 0,1 % NP-40; 0,2 mM EDTA; 5 mM β -ME; 10 mM NaCl; 5 mM $MgCl_2$. Дополнительно реакционные смеси содержали: белый бар — 100 nM AP-сайт содержащий субстрат; серый бар — 100 nM AP-сайт содержащий субстрат и 0,03 мкМ APE1 для out-NCP / 1 мкМ APE1 для middle-NCP / 0,001 мкМ APE1 для ДНК; синий и зеленый бары содержали компоненты серого бара и дополнительно 100 nM PARP1 или PARP2; темные синий и зеленый бары содержали компоненты из синего и зеленого соответственно, а также 400 мкМ NAD^+ . Реакционные смеси инкубировали в течение 5 мин при 37 °C.

1.4. Влияние PARP1 и PARP2 на активность фермента Pol β

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

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

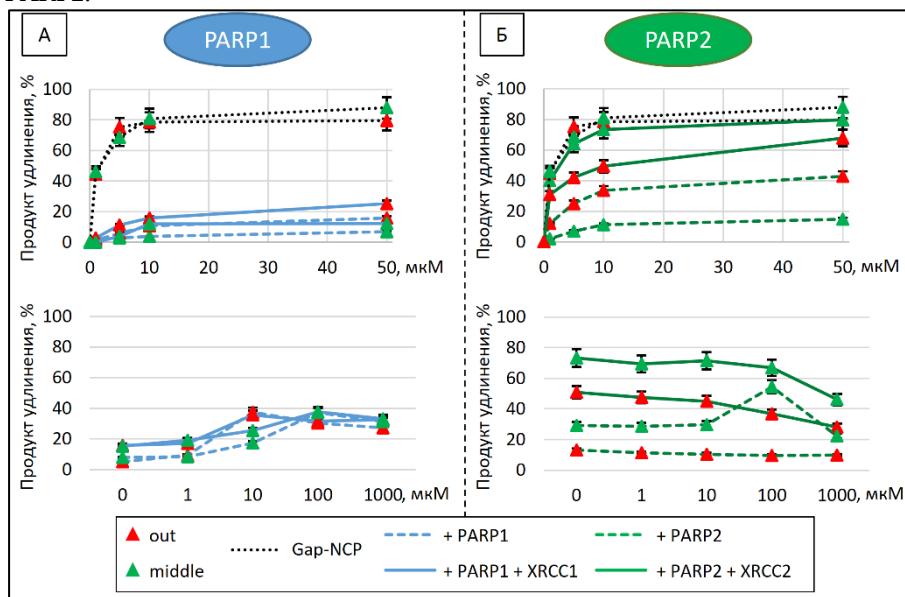


Рис. 4. Влияние PARP1 (А) и PARP2 (Б) на активность Pol β в Gap-NCP: верхний график — в отсутствие NAD⁺; нижний график — в присутствии NAD⁺. На рисунке приведены средние значения уровня удлинения ($\pm$ SD) для трех независимых экспериментов. Реакционные смеси во всех случаях содержали: 100 нМ Gap-NCP;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

1.5. Влияние PARP1 и PARP2 на активность фермента LigIII α

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

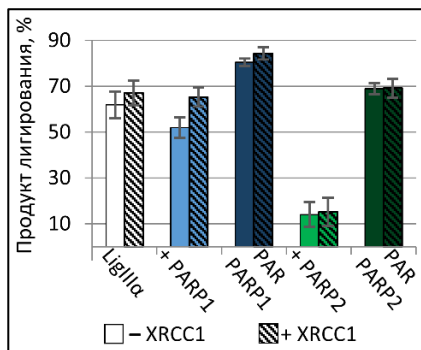


Рис. 5. Влияние PARP1 и PARP2 на активность LigIIIa в присутствии NCP с Nick-повреждением. На рисунке приведены средние значения уровня лигирования ($\pm$ SD) для трех независимых экспериментов. Реакционные смеси содержали 20 нМ 5'-[32 P]-меченый субстрата NCP603_U и 1 мМ АТФ в буфере 100 мМ NaCl; 50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

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

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

2.1. Определение величин K_D комплекса PARP3•NCP

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

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

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

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

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

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

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

2.2.1. Метод боргидридной сшивки и ферментативного футпринтинга

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

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

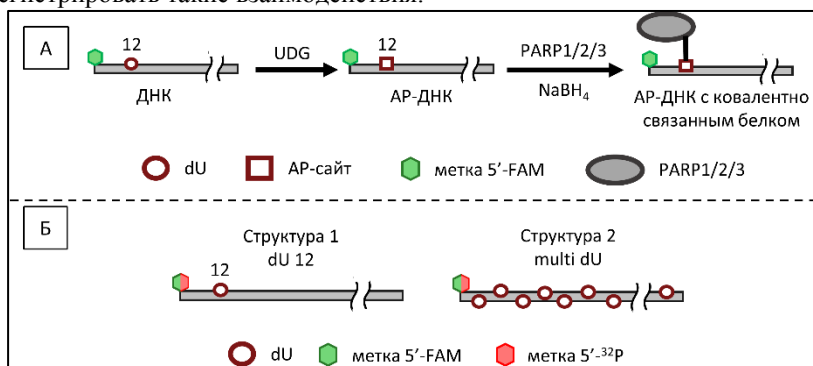


Рис. 6. А — Схематическое изображение метода боргидридной сшивки, использованного в работе. Б — Схематическое изображение структур ДНК, использованных в методах боргидридной сшивки и ферментативного футпринтинга.

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

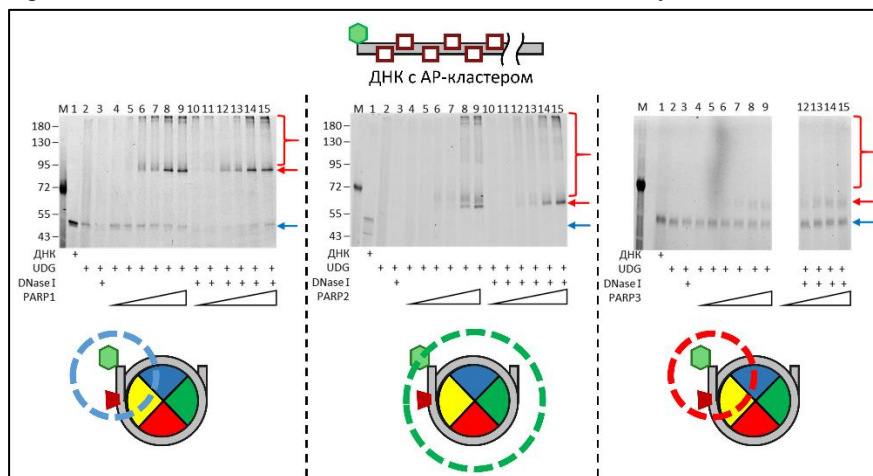


Рис. 7. Взаимодействие белков PARP1, PARP2 и PARP3 с AP-кластером в составе NCP. Автографы гелей после разделения продуктов реакции в 10 % ПААГ по Лэммли. Реакционные смеси содержали 0,2 мкМ NCP и 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1 мкМ PARP1, PARP2 или PARP3 в буфере состава: 10 мМ Tris-HCl, pH = 7,5; 0,1 % NP-40; 0,2 мМ EDTA; 5 мМ β-ME4 10 мМ NaCl. Пробы инкубировали при 37 °C в течение 20 мин. Далее к смеси добавляли NaBH₄ до конечной концентрации 20 мМ и инкубировали во льду в течение 30 мин. После чего к смеси добавляли 1 е.а. DNase I и инкубировали при 37 °C в течение 15 мин. Синей стрелкой обозначена электрофоретическая подвижность нерасщепленной цепи ДНК с AP-кластером, красной стрелкой и фигурной скобкой — белок-нуклеиновые аддукты. Под автографами гелей схематично приведены структуры нуклеосом с обозначением локализации соответствующих PARP пунктирной линией: PARP1 — синяя; PARP2 — зеленая; PARP3 — красная.

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

2.2.2. Метод атомно-силовой микроскопии

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

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

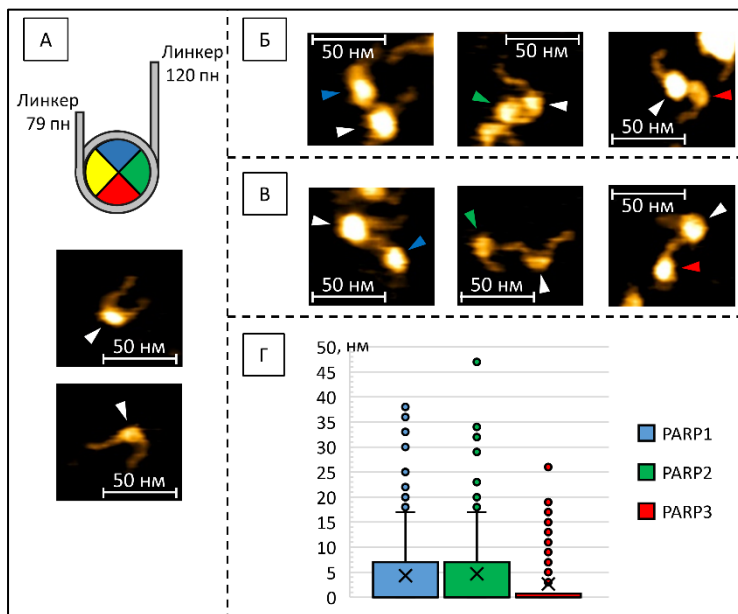


Рис. 8. Изучение локализации белков PARP1, PARP2 и PARP3 на нуклеосоме. **А** — Схематичное изображение структуры нуклеосомы L-NCP603, содержащей в составе NCP «Clone603» с ДНК-линкерами длиной 79 и 120 пн. Приведены снимки ACM исследуемых молекул. Белой стрелкой указано ядро L-NCP603 ($Z = 4$ нм). **Б**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

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

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

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

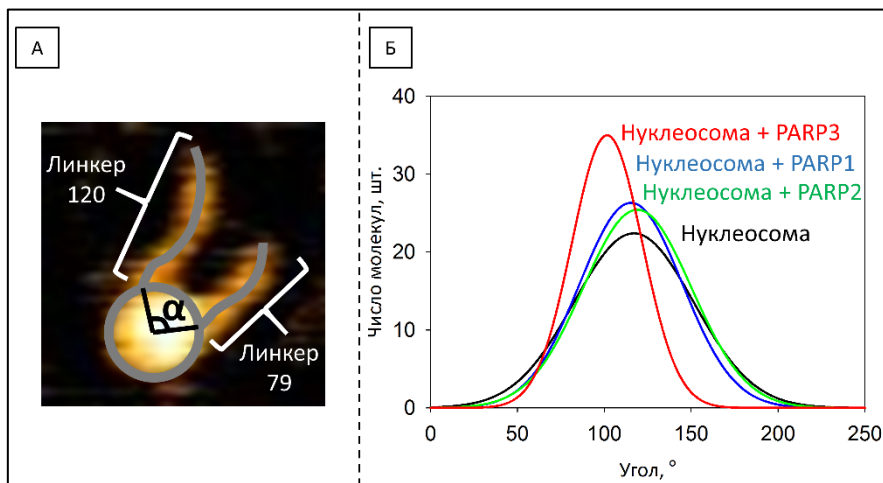


Рис. 9. А — обозначение угла α (черным) между точками входа-выхода в исследуемой молекуле L-NCP603. Серым кругом обозначены границы ядра NCP. Серыми линиями обозначены контуры линкерных ДНК. Б — Гауссова интерполяция распределения значений угла α . Число проанализированных молекул в выборке для каждой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

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

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

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

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

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

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

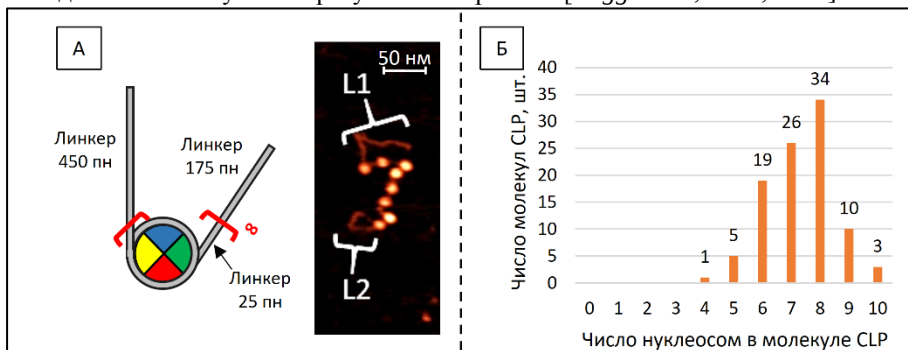


Рис. 10. Реконструированный препарат хроматиноподобных частиц — CLP601-8. **А** — Схематичное изображение структуры CLP601-8. Структура состоит из 8 NCP «Clone 601», соединенных между собой ДНК-линкерами длиной 25 пн (красные скобки; цифра означает число повторений). По краям полинуклеосомной структуры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

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

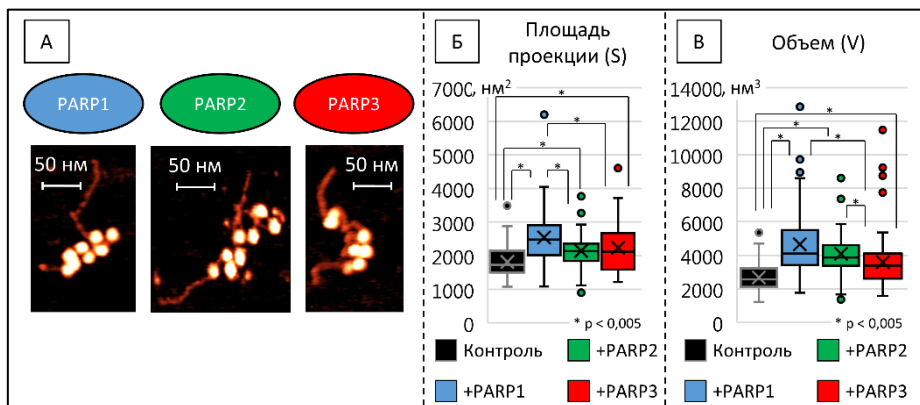


Рис. 11. А — типичные АСМ-изображения комплексов CLP с ДНК-зависимыми белками PARP ($Z = 4$ нм). Б — Блочная диаграмма с ограничителями выбросов площади проекции CLP и их комплексов с белками PARP1, PARP2 и PARP3. В — Блочная диаграмма с ограничителями выбросов объема по Лапласу CLP и их комплексов с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

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

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

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

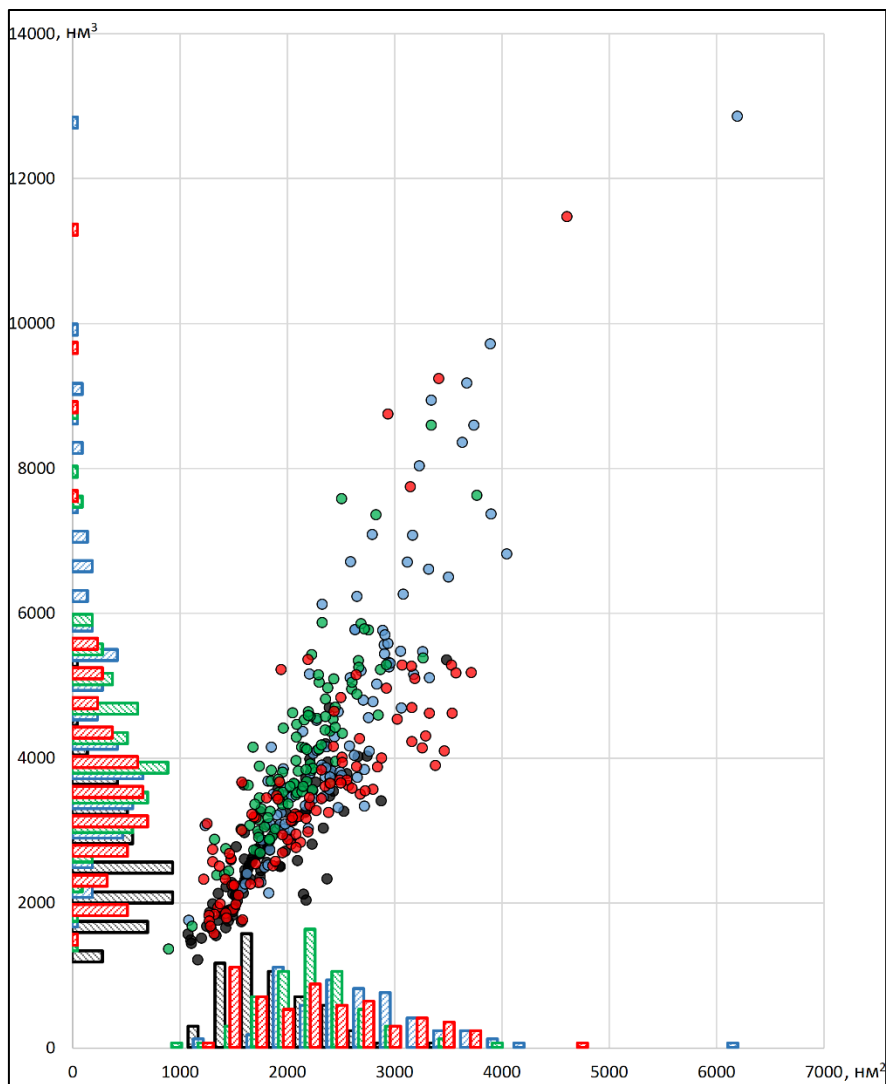


Рис. 12. Диаграмма распределения хроматиноподобных частиц (CLP, черные точки) и их комплексов с белками PARP1 (синие точки); PARP2 (зеленые точки); PARP3 (красные точки). По оси Y — объем частиц (nm^3); по оси X — площадь проекции частиц (nm^2). Каждая точка соответствует отдельной частице CLP или комплексу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

Заключение

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

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

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

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

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

Выводы

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

Список публикаций по теме диссертации

1. Kutuzov M.M., Belousova E.A., Kurgina T.A., **Ukrainitsev A.A.**, Vasil'eva I.A., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. The contribution of PARP1, PARP2 and poly(ADP-ribosylation) to base excision repair in the nucleosomal context // Sci. Rep. — 2021. — V. 11. — P. 4849, DOI: 10.1038/s41598-021-84351-1
2. **Украинцев А.А.**, Белоусова Е.А., Кутузов М.М., Лаврик О.И. Изучение взаимодействия ДНК-зависимых белков семейства PARP с нуклеосомными частицами, содержащими интермедиаты начальных стадий процесса BER // Биохимия. — 2022. — Т. 87(3). — С. 321–336, DOI: 10.1134/S0006297922040034
3. **Ukrainitsev A.**, Kutuzov M., Belousova E., Joyeau M., Golyshev V., Lomzov A., Lavrik O. PARP3 Affects Nucleosome Compaction Regulation // Int. J. Mol. Sci. — 2023. — V. 24. — P. 9042, DOI: 10.3390/ijms24109042
4. **Украинцев А.А.**, Кутузов М.М., Лаврик О.И. Изучение структуры и функций нуклеосом методом атомно-силовой микроскопии // Биохимия. — 2024. — Т. 89(4). — С. 635–650, DOI: 10.31857/S0320972524040078