



**Кургина Татьяна Андреевна**

**Влияние фактора модификации гистонов HPP1 на  
активность поли(ADP-рибоза)полимераз 1 и 2 при взаимодействии  
с нуклеосомами**

1.5.3 – молекулярная биология

Автореферат  
диссертации на соискание ученой  
степени кандидата биологических наук

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

**Научный руководитель:**

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

**Официальные оппоненты:**

**Жарков Дмитрий Олегович**, д.б.н., профессор, член-корр. РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, зав. лабораторией геномной и белковой инженерии.

**Колесникова Татьяна Дмитриевна**, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, г. Новосибирск, в.н.с. лаборатории молекулярной цитогенетики.

**Баттулин Нариман Рашитович**, к.б.н., Федеральное государственное бюджетное научное учреждение Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, г. Новосибирск, зав. лабораторией генетики развития.

Защита состоится «24» ноября 2023 г. в 10:00

На заседании диссертационного совета ИХБФМ.03.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, проспект академика Лаврентьева, 8, Новосибирск

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан « » октября 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета  
к.х.н., Пестряков П.Е.



## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность**                      **темы**                      **исследования.**                      Ферменты поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARP) катализируют посттрансляционную модификацию белков, называемую поли(ADP-рибозил)ированием или PAR-илированием [Kraus W.L., et al., 2015]. Эта модификация регулирует различные клеточные процессы, включая репарацию ДНК [Cohen M.S., et al., 2018]. PARP1 и PARP2 — основные ферменты, ответственные за PAR-илирование белков-мишеней в ядре и синтез полимера PAR [Kraus W.L., et al., 2020]. Оба фермента участвуют в эксцизионной репарации оснований (Base excision repair, BER) [Lavrik O.I., et al., 2020], и взаимодействуют с ДНК полимеразой  $\beta$  (Pol $\beta$ ), XRCC1 и ДНК лигазой III $\alpha$  [Vasil'eva I.A., et al., 2019]. Влияние PARP1 и PARP2 на процесс BER показано с использованием синтетических ДНК дуплексов и нуклеосом [Kutuzov M.M., et al., 2021].

PARP1 и PARP2 считаются перспективными мишенями для поиска новых противоопухолевых препаратов [Flippot R., et al., 2022]. В настоящее время многие ингибиторы PARP (PARPi) находятся на различных стадиях клинических и доклинических испытаний, а олапариб, рупапариб, нирапариб и талазопариб уже используются в клиниках для лечения рака [Sim H.W., et al., 2022]. Ингибиторы PARP наиболее интенсивно используются в качестве химиотерапевтических средств при лечении рака яичников и молочной железы, прежде всего при мутациях гена *BRCA1/2*. Многие ингибиторы PARP в настоящее время рассматриваются в качестве препаратов для лечения нейродегенеративных и вирусных заболеваний, а также в качестве противовоспалительной терапии [Curtin N.J., et al., 2020].

Несмотря на то, что изучение синтеза PAR и ферментов PARP началось еще в 60-е годы XX века, только недавно был обнаружен новый белок-партнер PARP1 и PARP2 — фактор PAR-илирования гистонов 1 (HPF1) [Gibbs-Seymour I., et al., 2016], который регулирует активность и специфичность PARP1 и PARP2 и образует с ними временный совместный активный центр [Suskiewicz M.J., et al., 2020]. HPF1 переключает специфичность PAR-илирования с остатков аспартата, глутамата и других аминокислот на остатки серина [Bonfiglio J.J., et al., 2017] и играет важную роль в катализируемом PARP1 и PARP2 PAR-илировании гистонов [Sun F.H., et al., 2021]. В ранних работах, посвященных HPF1, было показано ингибирование PAR-илирования PARP1 и PARP2 и стимуляция их NAD<sup>+</sup>-гидролазной активности в присутствии высоких концентраций HPF1, которые были использованы в связи с его низким сродством к PARP1 *in vitro* [Rudolph J., et al., 2021]. В то же время концентрация PARP1 в клетках в 20-50 раз выше, чем концентрация HPF1 [Gibbs-Seymour I., et al., 2016]. В данный момент механизм взаимодействия PARP1/PARP2 с HPF1 и его функции в контексте хроматина только начинают изучать. Это направление исследований ферментов PARP вызывает большой интерес, особенно учитывая, что HPF1 является первым и пока-что единственным известным фактором, меняющим аминокислотную специфичность PAR-илирования.

**Цель и задачи исследования.** Цель данной работы — исследование механизма действия фактора PAR-илирования гистонов HPF1 в регуляции каталитической активности PARP1 и PARP2 в контексте нуклеосом. В ходе работы были поставлены следующие задачи:

1. Оптимизировать методику исследования активности PARP1 и PARP2 *in vitro* в реальном времени в присутствии различных ДНК-активаторов, в том числе нуклеосом, основанную на флуоресцентной спектроскопии.

2. Оценить сродство PARP1 и PARP2 к различным сайтам в структуре свободной ДНК и ДНК в составе нуклеосом, содержащих однонуклеотидную брешь — интермедиат эксцизионной репарации оснований.

3. Исследовать влияние HPF1 на реакции авто- и гетеро-PAR-илирования, катализируемые PARP1 и PARP2, и на кинетику синтеза поли(ADP-рибозы), для выяснения механизма HPF1-зависимой модуляции реакции PAR-илирования.

4. Установить влияние повреждения ДНК — интермедиата BER на уровни PAR-илирования и кинетику синтеза поли(ADP-рибозы), а также на эффективность инициации PAR-илирования в присутствии HPF1.

**Научная новизна полученных результатов.** Данная работа представляет собой первое детальное исследование механизма влияния фактора PAR-илирования гистонов HPF1 на активность ферментов PARP1 и PARP2. Показано, что HPF1 способен стимулировать начальные стадии реакции PAR-илирования. При этом обнаруживается более значительное влияние на активность PARP2. Присутствие гистонов (акцепторов PAR), HPF1, стимулирующего инициацию PAR-илирования, и повреждения-интермедиата BER приводило к многократному увеличению эффективности PARP2 в синтезе PAR и ускорению его диссоциации с повреждения ДНК. Сопоставление полученных в работе результатов с имеющимися литературными данными позволяет предположить специфическую регуляторную роль тандема PARP2-HPF1 в регуляции BER.

**Практическая значимость работы.** На сегодняшний день ферменты PARP1 и PARP2 являются перспективными терапевтическими мишенями при лечении BRCA ассоциированных злокачественных опухолей. Было показано непосредственное участие HPF1 в переключении аминокислотной специфичности PARP1 и PARP2 и вовлечение данного фактора в клеточный ответ на применение ингибиторов PAR. Результаты, полученные в данной работе, могут иметь важное практическое значение для понимания развития клеточного ответа на повреждение ДНК, а также для поиска новых специфических ингибиторов PARP1 и PARP2 — мишеней противораковой терапии.

**Вклад автора.** Представленные экспериментальные данные получены самим автором. Автор принимал активное участие в анализе полученных результатов и написании статей. Анализ полученных результатов проводился

при участии Моор Н.А. и Шрама С.И. Использование измерения анизотропии флуоресценции в качестве тест-системы предложено Анарбаевым Р. О.

### **Положения, выносимые на защиту.**

1. PARP1 взаимодействует с наиболее высоким сродством с тупыми концами ДНК, в том числе в составе нуклеосом, но также связывается и с однонуклеотидной брешью, и с неповреждённой ДНК. PARP2 имеет низкое сродство к тупым концам и к неповреждённой ДНК, но эффективно взаимодействует с ДНК, содержащей брешь.

2. HPF1 стимулирует инициацию PAR-илирования, катализируемого PARP1 и PARP2, но подавляет элонгацию синтеза PAR. Это влияет на общее количество PAR, длину синтезируемого полимера и уровень гидролиза  $\text{NAD}^+$ .

3. Предпочтительной мишенью PAR-илирования PARP1 является он сам, в том числе в присутствии HPF1. PARP2 преимущественно катализирует модификацию гистонов, которая многократно усиливается при наличии бреши в ДНК. Это свидетельствует о специфической роли PARP2 в ответе на повреждение ДНК в контексте хроматина.

4. Положение повреждения ДНК (интермедиата BER) относительно гистонового кора нуклеосомы влияет на паттерн PAR-илирования гистонов ферментом PARP2.

**Апробация и публикации результатов.** По результатам исследования опубликовано 6 статей в рецензируемых журналах, индексируемых в базах Web of Science и Scopus: Результаты работы были представлены на конференциях: V международной конференции Postgenom (Казань, 2018), конференции «Systems Biology and Bioinformatics» (Новосибирск, 2019), IX Российском симпозиуме «Белки и пептиды» (Дагомыс, 2019), 45-ом конгрессе FEBS (онлайн конференция, 2021), VII молодёжной школе-конференции по молекулярной и клеточной биологии Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, 2021), конференции BGRS-SB (Новосибирск, 2022), III объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, 2023).

**Структура и объём диссертации.** Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 125 страницах, содержит 33 рисунка и 9 таблиц. Библиография включает 325 литературных источников.

## **СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **1. Анализ активности PARP1 и PARP2 в реальном времени с помощью измерения анизотропии флуоресценции**

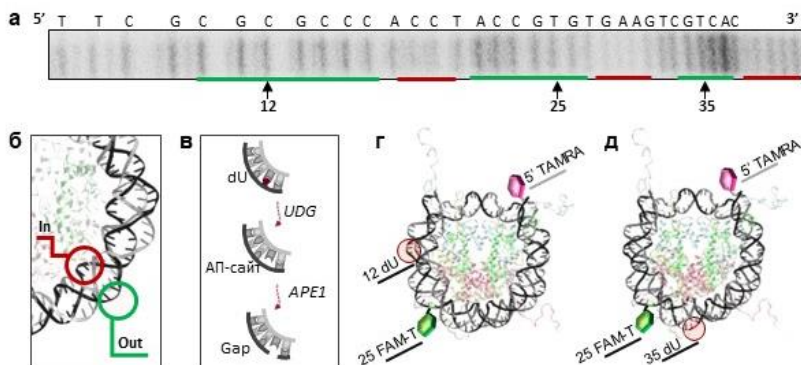
*1.1. Оптимизация методики для изучения активности PARP1/2 в присутствии нуклеосом*

К моменту начала данной работы не существовало метода, позволяющего изучать активность PARP1 *in vitro* в реальном времени. Для

определения основных кинетических параметров реакций, катализируемых этим ферментом, была разработана и опубликована методика, основанная на измерении анизотропии флуоресценции [Kurgina T.A., et al., 2018].

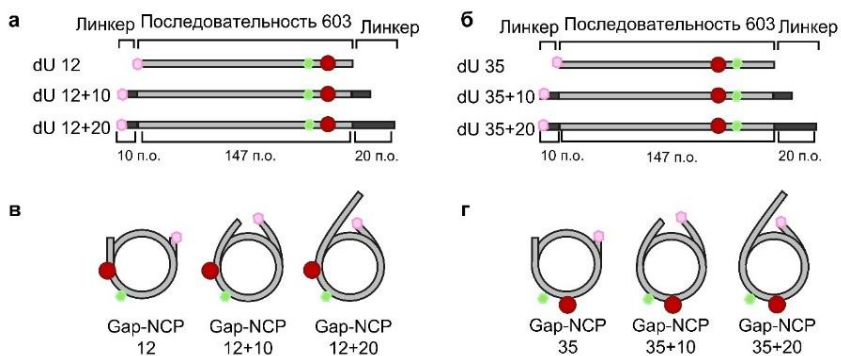
Ранее данная методика была опробована для определения величин  $EC_{50}$  для ферментов PARP1/2 и коротких модельных ДНК дуплексов (30 п.о.) [Kurgina T.A., et al., 2018]. Затем протокол был оптимизирован для ДНК длиной 147–177 п.о. и NCP (Nucleosome core particle, нуклеосомная коровая частица) (Рис.1). В данной работе все структуры содержали урацил (dU), необходимый для последующего ферментативного получения вариантов ДНК, содержащих брешь (Gap, интермедиат BER) (Рис.1в). В структуры ДНК были введены две избирательно регистрируемые флуоресцентные метки.: флуоресцеин (FAM, максимумы поглощения/испускания 495/520 нм соответственно) и TAMRA (максимумы поглощения/испускания 541/560 нм соответственно) (Рис.1г,д). TAMRA расположена на 5'-конце ДНК и отражает связывание ферментов с тупыми концами ДНК. Флуоресцеин связан с основанием ДНК [dT-FAM] на расстоянии 10–15 п.о. от dU. Расположенный таким образом FAM будет отражать неспецифическое связывание PARP1/PARP2 с неповреждённой ДНК или связывание с брешью при её наличии. Иными словами, две флуоресцентных метки будут независимо отражать связывание ферментов в непосредственной близости от них.

Масштабирование описанного выше подхода для работы с NCP накладывает существенные ограничения на положение dU (и, в последствии, повреждения) и [dT-FAM], в связи с экранированием некоторых оснований ДНК гистоновым ядром NCP (Рис.1б). Оценка ориентации каждого основания проводилась методом футпринтинга (Рис.1а). Нами были выбраны следующие положения относительно 5'-конца последовательности 603: 12 и 35 для размещения dU, и 25 для [dT-FAM]. При таком расположении в NCP повреждения будут находиться в разном гистоновом контексте, в то время как FAM в обеих структурах будет расположен в одинаковом окружении.



**Рис.1.** Выбор положений dU и FAM: а – определение ориентации оснований ДНК клона 603 в NCP методом футпринтинга; б – различия в ориентации «In» и «Out»; в – схема получения брешы, путём ферментативного удаления dU ферментами UNG и APE1 с образованием вначале AP-сайта, затем брешы; г, д – структуры NCP с отмеченными положениями dU, FAM и TAMRA (PDB: 1KX5).

Было сконструировано две группы ДНК-активаторов: свободная ДНК 147–177 п.о. (клон ДНК-603 с линкерами и без) и нуклеосомные коровые частицы (NCP), реконструированные с использованием всех вариантов ДНК (**Рис.2**).



**Рис.2.** Дизайн используемых ДНК-активаторов: а, б – схематичное изображения ДНК, содержащих dU (обозначен красным) в положении 12 и 35 соответственно (относительно конца последовательности 603, выделена серым); в, г – популяции NCP, содержащие брешь в положениях 12 и 35, а также линкеры разной длины.

Все ДНК-активаторы содержали либо тупые концы без 5'-концевого фосфата (имитирующие двухцепочечный разрыв ДНК), либо тупые концы в комбинации с однонуклеотидной брешью. Активаторы с соответствующими повреждениями далее обозначены как ДНК, Gap ДНК, NCP и Gap NCP. ДНК-активаторы содержали dU либо в положении 12 (**Рис.2а,в**), либо в положении 35 (**Рис.2б,г**) относительно 5'-конца последовательности клона 603 (147 п.о.). Последовательность клона 603 длиной 147 п.о. обеспечивает однозначное позиционирование ДНК в нуклеосоме, что позволяет использовать её как в исходном варианте (ДНК 147 п.о.), так и в вариантах с дополнительными линкерами с обоих концов ДНК-дуплекса, выступающими за пределы реконструированных NCP. В данной работе ДНК была представлена либо исходной ДНК-603 (147 п.о.), либо ДНК с линкерами по 10 п.о. с каждого конца или с линкерами 10 п.о. с одного конца и 20 п.о. с другого. При этом положение dU менялось с 12 на 22 и 32, и с 35 на 45 и 55 относительно 5'-конца ДНК. Таким образом, положение повреждения внутри каждой популяции NCP оставалось постоянным относительно гистоновому октамеру, но удалялось от 5'-конца ДНК на 10 и 20 п.о. (**Рис.2 в,г**).

### 1.2. Определение величин $EC_{50}$ для ферментов PARP1/2 и ДНК (NCP) с повреждением

В данной работе для определения величин  $EC_{50}$ , отражающих сродство PARP1 и PARP2 к различным ДНК активаторам использовали измерение анизотропии флуоресценции. Величины  $EC_{50}$ , определённые в канале TAMRA

для PARP1 и всех вариантов ДНК статистически не отличались и составили  $2 \pm 1$  нМ для ДНК и  $3 \pm 1$  нМ для Gap ДНК, независимо от положения этого повреждения. В случае NCP, мы детектировали увеличение значений  $EC_{50}$  для обеих структур без линкеров (до  $7 \pm 2$  нМ). Это хорошо согласуется с данными Кларк с соавторами, показавшими существенные затруднения в связывании PARP1 с тупыми концами в составе NCP без линкеров [Clark N.J., et al., 2012]. Мы не детектировали связывание PARP2 в канале TAMRA. Это наблюдение согласуется с литературными данными, описывающими критическую роль фосфата в распознавании повреждения ферментом PARP2 [Sukhanova M. V., et al., 2019].

Значения  $EC_{50}$ , определённые в канале FAM для комплексов PARP1 с ДНК и Gap ДНК, практически одинаковы (Таблица 1). В наших экспериментах нижний предел  $EC_{50}$  определяется концентрацией ДНК (3 нМ). Вероятнее всего, определённые нами величины превышают реальные значения констант диссоциации ( $K_D$ ) для комплексов PARP1. В случае NCP, мы наблюдаем увеличение значений  $EC_{50}$  для PARP1 при приближении бреши к 5' концу ДНК. Такое уменьшение сродства может быть связано с конкуренцией молекул PARP1 за связывание с двумя близкорасположенными повреждениями: тупым концом и брешью. Исходя из величин  $EC_{50}$  для NCP и ДНК без бреши, мы можем заключить, что PARP2 имеет низкое сродство к неповреждённой ДНК (Таблица 1). При этом PARP2 специфически взаимодействует с брешью с высоким сродством. В случае PARP2 не наблюдается зависимости сродства к бреши от удалённости этого повреждения от тупого конца.

Таблица 1. Кажущиеся равновесные константы диссоциации комплексов PARP1 и PARP2 с ДНК и NCP, детектированные в канале FAM ( $EC_{50}$ , нМ).								
Фермент	ДНК-активатор	Без бреши	Положение бреши относительно 5'-конца ДНК					
			12	12+10	12+20	35	35+10	35+20
PARP1	ДНК/gap-ДНК	$4 \pm 1$	$2 \pm 0,5$	$2 \pm 0,5$	$2 \pm 0,5$	$2 \pm 0,5$	$2 \pm 0,5$	$2 \pm 0,5$
	NCP/gap-NCP	$4 \pm 1$	$20 \pm 5$	$14 \pm 2$	$9 \pm 2$	$8 \pm 2$	$5 \pm 1$	$4 \pm 1$
PARP2	ДНК/gap-ДНК	$700 \pm 100$	$2 \pm 1$	$3 \pm 1$	$4 \pm 2$	$3 \pm 1$	$3 \pm 1$	$2 \pm 1$
	NCP/gap-NCP	$600 \pm 100$	$3 \pm 1$	$4 \pm 1$	$3 \pm 2$	$5 \pm 2$	$6 \pm 2$	$7 \pm 3$

Представлены значения  $EC_{50}$ , измеренные регистрацией анизотропии флуоресценции FAM (средние значения трёх независимых экспериментов и их стандартные отклонения).

### 1.3. Определение величин $IC_{50}$ в анализе конкурентного связывания ферментов PARP1/2 и ДНК

Ввиду невозможности достоверного определения величин  $EC_{50}$  для PARP1 и использованных в работе структур ДНК, мы провели эксперименты по конкурентному связыванию. В качестве ДНК-конкурентов была применена плазмидная ДНК (суперскрученная pBR322) и ДНК-603 длиной 147 п.о. (без флуоресцентных меток). К предформированному комплексу PARP1/2-ДНК



(при соотношении 0,5:1, в соответствии с полученными величинами  $EC_{50}$ ) добавляли возрастающие концентрации конкурентной ДНК.

Для PARP1, мы наблюдали уменьшение значений  $IC_{50}$  при приближении бреши к 5' концу ДНК (Таблица 2). Это, вероятно, отражает уменьшение сродства PARP1 к повреждению, находящемуся в непосредственной близости от тупого конца ДНК, либо иную архитектуру комплекса PARP1 с кластерным повреждением.

Величины  $IC_{50}$ , полученные для PARP1 и плазмидной ДНК в канале TAMRA, статистически не различались независимо от присутствия бреши и её удалённости от тупых концов. Величина  $IC_{50}$ , отражающая ингибирование связывания PARP1 с тупыми концами, составляет  $5 \pm 1$  нМ, что в 10 раз выше соответствующей величины для бреши в положениях 45–55 и в 70 раз выше  $IC_{50}$  для неповреждённой ДНК. Это даёт нам основание предположить, что сродство PARP1 к тупым концам ДНК многократно выше сродства к бреши и неповреждённой ДНК, и именно связывание с концами определяет взаимодействие PARP1 с используемыми ДНК-активаторами в целом.

Величины  $IC_{50}$  для PARP2 статистически не различаются (Таблица 2). Мы не наблюдаем какой-либо выраженной динамики изменения величин  $IC_{50}$ , что согласуется с отсутствием таковой для значений  $EC_{50}$ . При этом значения  $IC_{50}$  для PARP2 выше (до 5 раз), чем для PARP1 для обоих ДНК-конкурентов. Это вероятнее всего отражает более низкое сродство PARP2 к неповреждённой ДНК и тупым концам ДНК, лишенным фосфатов. Величины  $IC_{50}$  для комплексов PARP2 с неповреждённой ДНК не определяли ввиду изначально низкого сродства фермента к данной структуре.

Таблица 2. Кажущиеся равновесные константы ингибирования связывания PARP1 и PARP2 с ДНК, детектированные в канале FAM и TAMRA ( $IC_{50}$ , нМ).									
Фермент	ДНК-конкурент	TAMRA	FAM						
			Без бреши	Положение бреши относительно 5'-конца ДНК					
				12	12+10	12+20	35	35+10	35+20
PARP1	pBR322	$5 \pm 1$	0,07 $\pm 0,01$	0,12 $\pm 0,02$	0,16 $\pm 0,02$	0,21 $\pm 0,02$	0,24 $\pm 0,02$	0,43 $\pm 0,05$	0,43 $\pm 0,07$
	147 п.о. ДНК	-	$4 \pm 2$	$5 \pm 2$	$12 \pm 1$	$16 \pm 3$	$18 \pm 1$	$20 \pm 2$	$19 \pm 1$
PARP2	pBR322	-	-	0,6 $\pm 0,2$	0,6 $\pm 0,1$	0,5 $\pm 0,1$	0,8 $\pm 0,1$	0,9 $\pm 0,2$	0,9 $\pm 0,2$
	147 п.о. ДНК	-	-	$28 \pm 7$	$31 \pm 8$	$43 \pm 5$	$42 \pm 7$	$23 \pm 8$	$27 \pm 7$
Представлены значения $IC_{50}$ , измеренные регистрацией анизотропии флуоресценции FAM (средние значения трёх независимых экспериментов и их стандартные отклонения).									

Таким образом мы оптимизировали представленную методику изучения активности PARP1/2 *in vitro* в реальном времени для использования НСР и ДНК длиной 147–177 п.о. в качестве активаторов ферментов. Мы можем

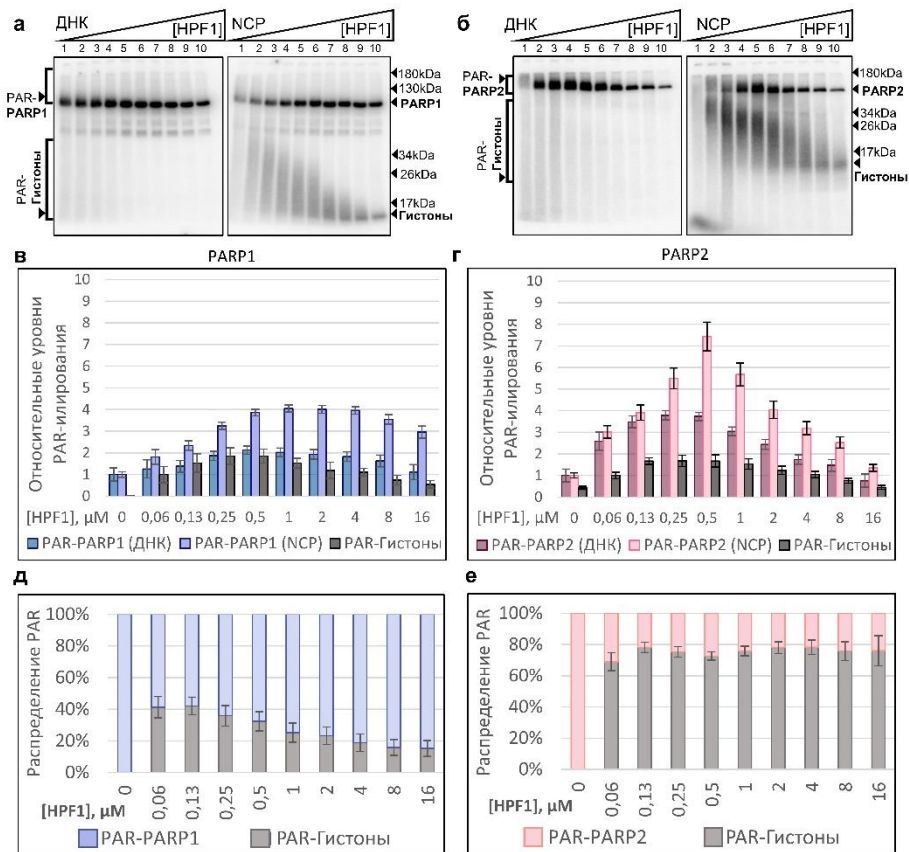
предположить, что в используемых ДНК-активаторах действительно присутствуют несколько сайтов взаимодействия, а именно тупые концы ДНК, неповреждённая ДНК и брешь (при наличии). Присутствие двух конкурирующих сайтов связывания (тупых концов и бреши) на расстоянии до 30 п.о. влияет на связывание PARP1 с брешью. PARP1 преимущественно связывается с тупыми концами ДНК, в т.ч. и в составе NCP. PARP1 образует комплексы и с брешью, и с неповреждённой ДНК, но их доля существенно ниже доли комплексов с тупыми концами. В отличие от PARP1, PARP2 эффективно связывается только с брешью, но не с тупым концом ДНК. При этом сродство PARP2 к бреши не зависит от ее удалённости от тупых концов.

## **2. HPF1 стимулирует инициацию PAR-илирования PARP1 и PARP2 одновременно с подавлением элонгации PAR-илирования**

### **2.1. HPF1 стимулирует авто-PAR-илирование PARP1 и PARP2 одновременно с переключением PAR-илирования на гистоны**

Было изучено влияние различных концентраций HPF1 на активность PARP1 и PARP2. Для активации PARP1 и PARP2 использовали ДНК-603 (147 п.о.) и NCP без линкеров и без бреши. Продукты реакции PAR-илирования анализировали с помощью разделения в SDS-ПААГ и количественного определения количества поли (ADP-рибозы) с использованием [<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> (Рис.3). Было обнаружено, что даже низкие концентрации HPF1 (60 нМ по сравнению с 500 нМ PARP1/2, образец 2) стимулируют PAR-илирование гистонов. Максимальная стимуляция HPF1 катализируемой PARP1 и PARP2 аутомодификации наблюдались при концентрации HPF1 1 и 0,5 мкМ для PARP1 и PARP2 (Рис.3в,г). При дальнейшем увеличении концентрации HPF1 его стимулирующий эффект на аутомодификацию как PARP1, так и PARP2 снижался. Гетерогенные смеси модифицированных белков с совершенно разной электрофоретической подвижностью (визуализируемой как размытие полосы) становились более однородными в присутствии высоких концентраций HPF1 (Рис.3а,б). Таким образом, повышение концентрации HPF1 влияло на общий уровень ADP-рибозилирования PARP и гистонов, а также приводило к укорочению полимера ADP-рибозы, присоединенного к белкам. При этом наличие модифицированных гистонов с разной электрофоретической подвижностью свидетельствует о гетерогенности длины синтезированного PAR. Невозможность элонгации в совместном активном центре и модификация гистонов (строго HPF1-зависимая *in vitro*) полимерами разной длины дают нам основание предположить, что после опосредованной HPF1 инициации PAR-илирования остатков серина дальнейший синтез протяжённого PAR осуществляется свободным PARP.

Между PARP1 и PARP2 наблюдалась достоверная разница в относительных уровнях авто- и гетеро-PAR-илирования, определяемых как процент от общего количества ADP-рибозы, ковалентно связанной с PARP и гистонами (Рис.3д,е). В то время как предпочтительной мишенью для PARP1 при различных концентрациях HPF1 был сам PARP1, большая часть PAR, синтезируемого PARP2, была связана с гистонами.



**Рис.3.** HPF1 стимулирует авто-PAR-илирование PARP1 и PARP2 и гетеро-PAR-илирование гистонов: а, б – автордиограммы показывают ковалентное связывание [<sup>32</sup>P]-меченой ADP-рибозы с белками после инкубации 500 нМ PARP1 (PARP2) с 1 мкМ [<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> в присутствии 250 нМ ДНК/НСП и HPF1 возрастающей концентрации (60 нМ–16 мкМ), продукты разделяли в SDS-ПААГ; в, г – на графиках представлены относительные уровни меченя (среднее значение ± стандартное отклонение трех независимых измерений) PARP1, PARP2 и гистонов, определенные путем нормализации количеств ADP-рибозы, ковалентно связанных с данным белком в присутствии HPF1 (образцы 2–10 для PARP1/PARP2 и образцы 3–10 для гистонов) до соответствующего количества в отсутствие HPF1 или его минимальной концентрации (образец 1 для PARP1/PARP2 и образец 2 для гистонов); д, е – графики показывают распределение (%) общего количества ковалентно связанной [<sup>32</sup>P]ADP-рибозы в каждом образце между модифицированным PARP1 (PARP2) и гистонами.

## 2.2. HPF1 модулирует активность PARP1 и PARP2 на начальной стадии реакций

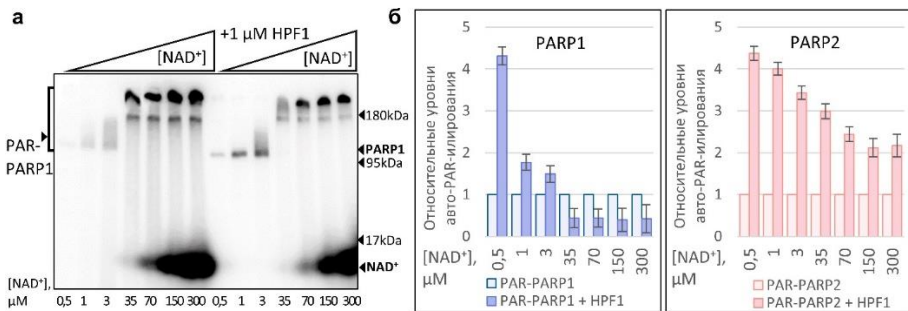
Стимуляция активности PARP1 и PARP2 в присутствии HPF1, вместе с подавлением элонгации PAR-илирования, оставляют открытым вопрос о механизме наблюдаемой стимуляции. Мы исследовали кинетику реакций авто- и гетеромодификации, катализируемых PARP1/2. Кинетические измерения в отсутствие или в присутствии HPF1 (в оптимальной концентрации) проводили при концентрациях NAD<sup>+</sup> 1 мкМ и 10 мкМ (Таблица 3).

Таблица 3. Начальные скорости катализируемой PARP1 (PARP2) авто- и гетеромодификации (фмоль/с).						
PARP	ДНК-зависимая реакция					
	Автомодификация				Модификация гистонов	
	Без HPF1		+ HPF1			
	1 $\mu$ M NAD <sup>+</sup>	10 $\mu$ M NAD <sup>+</sup>	1 $\mu$ M NAD <sup>+</sup>	10 $\mu$ M NAD <sup>+</sup>	1 $\mu$ M NAD <sup>+</sup>	10 $\mu$ M NAD <sup>+</sup>
PARP1	13 $\pm$ 5	350 $\pm$ 20	120 $\pm$ 15	760 $\pm$ 30	70 $\pm$ 20	400 $\pm$ 50
PARP2	1 $\pm$ 0.2	5 $\pm$ 1	11 $\pm$ 2	90 $\pm$ 10	18 $\pm$ 4	100 $\pm$ 20
Начальные скорости (фмоль/с), определенные по линейному участку кинетических кривых, представляют собой среднее $\pm$ стандартное отклонение трех независимых измерений.						

Установлено, что начальная скорость автомодификации значительно выше для PARP1, чем для PARP2. Разница между PARP1 и PARP2 в начальных скоростях автомодификации в присутствии HPF1 составляла один порядок. Примечательно, что начальная скорость автомодификации в отсутствие HPF1 сильнее зависит от концентрации NAD<sup>+</sup> для реакции, катализируемой PARP1, чем PARP2. Это различие, которое можно объяснить более высокой активностью PARP1 на этапе элонгации исчезало в присутствии HPF1. Мы предполагаем, что HPF1 стимулирует начальные стадии реакций авто- и гетеро PAR-илирования, катализируемые PARP1 и PARP2. При этом мы наблюдаем более значительную модуляцию активности PARP2, индуцированную HPF1, по сравнению с PARP1.

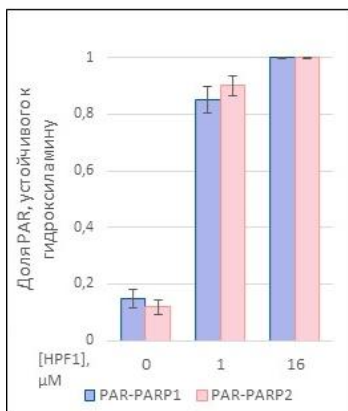
### 2.3. Стимулирующее действие HPF1 на PARP1 и PARP2 зависит от концентрации NAD<sup>+</sup>

Для обоих ферментов наблюдается уменьшение стимулирующего эффекта HPF1 при повышении концентрации NAD<sup>+</sup> (Рис.4). В случае PARP1 уровень автомодификации повышался при низких (0,5–3 мкМ) и подавлялся при высоких (35–300 мкМ) концентрациях NAD<sup>+</sup>. В то же время, автомодификация PARP2 во всех случаях была выше в присутствии HPF1, нежели в его отсутствие, хотя также снижалась при повышении концентрации NAD<sup>+</sup>. Мы предполагаем, что такое «обращение» эффектов, наблюдаемых в присутствии эквимоллярных (по отношению к PARP1/2) концентраций HPF1 связано с противоположным действием, оказываемым HPF1 на стадию инициации и элонгации. Вместе с данными, показывающими увеличение начальных скоростей PAR-илирования в присутствии HPF1, эти результаты дают нам основание предположить, что данный фактор стимулирует стадию инициации PAR-илирования, но подавляет элонгацию. Это приводит к уменьшению количества PAR, синтезируемого при высоких концентрациях NAD<sup>+</sup>, когда большая часть синтезированных продуктов представлено результатом элонгации.



**Рис. 4.** Зависимость стимулирующего действия HPF1 на PARP1 и PARP2 от концентрации NAD<sup>+</sup>: а – ковалентное связывание ADP-рибозы с белками осуществляли путем инкубации PARP1 (500 нМ) с [<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> (0,5–300 мкМ), в присутствии ДНК (250 нМ) и HPF1 (500 нМ); продукты разделяли в 10 % SDS-ПААГ; б – на графиках представлены относительные уровни метки (среднее ± стандартное отклонение трех независимых измерений) PARP1 и PARP2 при различных концентрациях NAD<sup>+</sup>, определенные путем нормализации количеств ADP-рибозы, ковалентно связанных с PARP1/PARP2 в присутствии HPF1, до соответствующего количества в отсутствие HPF1.

#### 2.4. Степень вызванного HPF1 переключения субстратной специфичности зависит от относительных концентраций PARP и HPF1

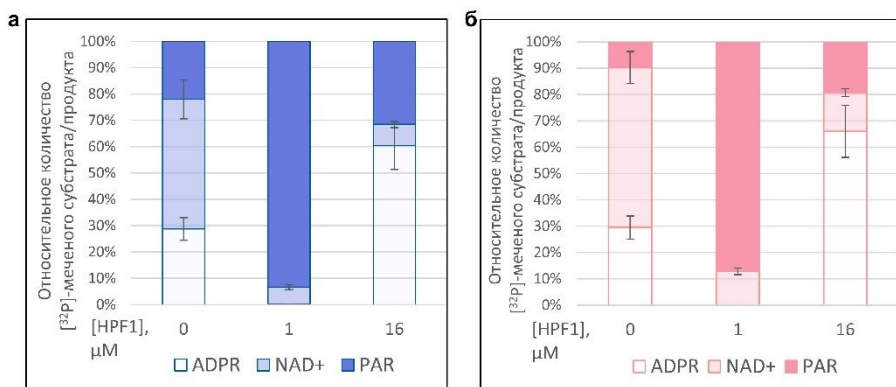


**Рис.5.** Индуцированное HPF1 переключение аминокислотной специфичности ADP-рибозилирования зависит от концентрации HPF1: на графиках представлена часть модификации, устойчивой к гидроксиламину (среднее значение ± стандартное отклонение трех независимых измерений и отдельных точек данных), определяемая путем нормализации количества ADP-рибозы, включенной в белок, в образце, обработанном гидроксиламином, по отношению к соответствующему необработанному образцу.

Для того, чтобы изучить, как HPF1-индуцированная стимуляция активности PARP связана с переключением аминокислотной специфичности ADP-рибозилирования, мы исследовали устойчивость модификации к гидроксиламину, который специфически удаляет ADP-рибозу, связанную с остатками Asp/Glu. При этом PAR, связанный с серинами, не удаляется. Большая часть ADP-рибозы, включенной в PARP1/PARP2 в отсутствие HPF1, удалялась гидроксиламином, а потеря модификации в присутствии оптимальной концентрации HPF1 не превышала 12–20% (**Рис.5**). Полная устойчивость к гидроксиламину была обнаружена для модификации в присутствии большого избытка HPF1 по отношению к PARP1/2. Мы предполагаем, что наличие свободных от HPF1 молекул PARP1/PARP2 необходимо для эффективной элонгации. Наличие свободных молекул PARP1/PARP2 обеспечивает временный характер взаимодействия HPF1 с ферментами и более эффективную элонгацию.

## 2.5. NAD<sup>+</sup>-гидролазная активность PARP1 и PARP2 усиливается большим избытком HPF1

Было показано, что активность NAD<sup>+</sup>-гидролазы, обнаруженная для PARP1 в раннем исследовании [Desmarais Y., et al., 1991], значительно стимулируется в присутствии больших избытков HPF1 [Rudolph J., et al., 2021]. Здесь мы показали, что в присутствии концентрации HPF1, оптимальной для стимуляции, относительное количество свободной ADP-рибозы было ниже, чем в его отсутствие или при большом избытке (Рис.6). Таким образом, NAD<sup>+</sup>-гидролазная активность как PARP1, так и PARP2 усиливается при значительном избытке HPF1 по отношению к концентрации этих ферментов, но уменьшается при эквимоллярной концентрации. Так как стадия инициации PAR-илирования является лимитирующей, и, по всей видимости, сопряжена с высоким уровнем гидролиза NAD<sup>+</sup>, полученные данные свидетельствуют в пользу нашей гипотезы о стимуляции инициации в совместном активном центра PARP1/2:HPF1.



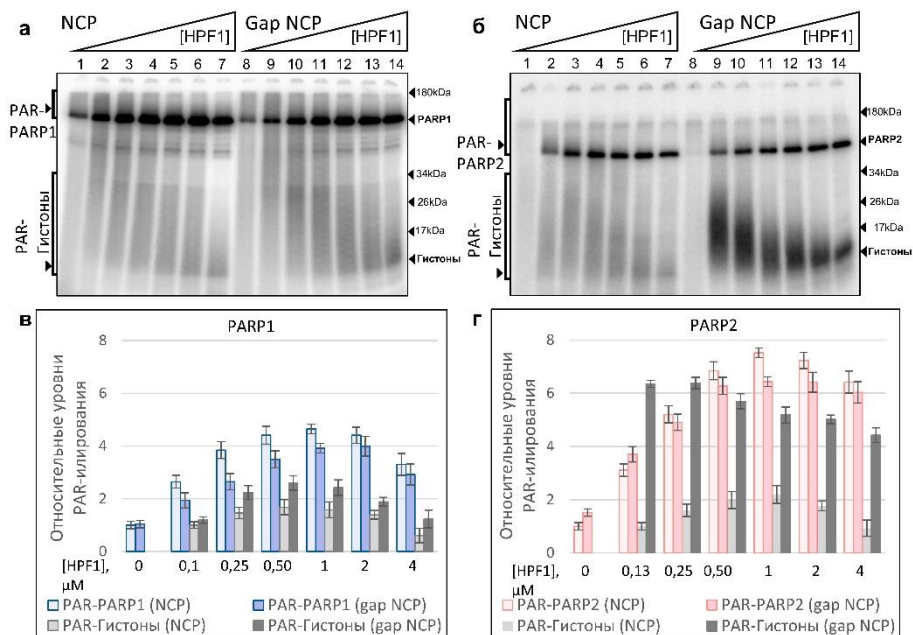
**Рис.6.** NAD<sup>+</sup>-гидролазная активность PARP стимулируется большим избытком HPF1: а, б на графиках представлены относительные количества (%) [32P]-NAD<sup>+</sup> и [32P]-меченой ADP-рибозы, ковалентно связанных с PARP и гистонами и высвобождаемых в свободной форме (ADPR) в результате гидролиза NAD<sup>+</sup>.

Таким образом, полученные нами данные позволяют предположить, что образование гибридного активного центра PARP:HPF1 способствует ускорению стадии инициации PAR-илирования, а также переключению PAR-илирования на гистоны (в присутствии NCP) При этом подавляется стадия элонгации синтеза PAR. Баланс между стимуляцией инициации и подавлением элонгации, как и между уровнями гидролиза NAD<sup>+</sup>, определяется равновесием в системе PARP + HPF1 ↔ PARP:HPF1. Смещение равновесия в сторону образования гибридного активного центра приводит к подавлению элонгации, увеличению уровня гидролиза NAD<sup>+</sup> и снижению уровня PAR-илирования. Наличие же свободных молекул PARP обеспечивает высвобождение HPF1 из совместного активного центра после эффективной инициации и позволяет ферментам катализировать удлинение цепей PAR.

### 3. Гетеро PAR-илирование гистонов модулируется интермедиатом эксцизионной репарации оснований ДНК

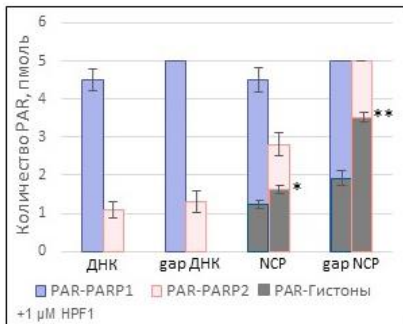
#### 3.1. Влияние интермедиата эксцизионной репарации оснований ДНК на HFP1-зависимое PAR-илирование гистонов обнаруживается в широком диапазоне концентраций фактора HFP1

Мы оценили влияние различных концентраций HPF1 на активность PARP1 и PARP2 в присутствии NCP и Gap NCP (Рис.7). Присутствие бреши мало влияло на активность PARP1, что согласуется с полученными величинами  $EC_{50}$ , отражающими преимущественное связывание фермента с тупыми концами ДНК. Уровень модификации гистонов несколько увеличивался. Обращает на себя внимание существенное усиление модификации гистонов ферментом PARP2 при наличии бреши в структуре ДНК (Рис.7б,г).



**Рис.7.** Зависимость уровней авто- и гетеро-PAR-илирования, катализируемого PARP1 и PARP2, от присутствия бреши в ДНК: а, б – автордиограммы показывают ковалентное связывание [ $^{32}$ P]-меченой ADP-рибозы с PARP1 и PARP2 после инкубации PARP (500 нМ) с [ $^{32}$ P]-NAD $^{+}$  (1 мкМ) и NCP или Gap NCP (250 нМ) в отсутствие (образцы 1 и 8) и в присутствии возрастающих концентраций HPF1 (от 125 нМ до 4 мкМ, образцы 2–7 и 9–14) (разделение продуктов в 20% SDS-ПААГ); в, г – графики представляют относительные уровни модификации (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение трех независимых измерений) PARP1, PARP2 и гистонов, определенные путем нормализации количества ADP-рибозы, ковалентно связанной с данными белками (за единицу принято количество ADP-рибозы, синтезированной в отсутствие HPF1 или при его минимальной концентрации в присутствии NCP без бреши (образец 1 для PARP1/PARP2 и образец 2 для гистонов)).

Для лучшего понимания влияния бреши в ДНК на модуляцию фактором HPF1 авто- и гетеромодификации PARP1/2 и гистонов, мы провели сравнение количества ADP-рибозы, ковалентно связанной с данными белками при активации на разных структурах в присутствии 1 мкМ HPF1 (Рис.8).



**Рис.8.** Зависимость эффектов HPF1 на активность PARP1/2 от структуры ДНК-активатора: графики показывают общее количество PAR, синтезированного PARP1/PARP2 в присутствии ДНК/Gap ДНК или NCP/ Gap NCP в присутствии 1 мкМ HPF1. Показано общее количество PAR и его распределение между PARP1/PARP2 и гистонами. Для уровней PAR-илирования гистонов отмечены статистически значимые различия:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*).

Уровни автомодификации PARP1 в присутствии как NCP, так и Gap NCP превышают уровни гетеро-PAR-илирования. PARP2, в свою очередь, преимущественно катализирует PAR-илирование гистонов.

Примечательно, что в отсутствие гистонов не наблюдалось значительного увеличения синтеза PAR, катализируемого PARP2, в присутствии Gap ДНК. Так, выход PAR, синтезируемого PARP2, в присутствии Gap NCP был в 4 раза выше, чем в присутствии Gap ДНК. Скорее всего, для эффективного синтеза PAR этим ферментом необходимо наличие акцепторных белков (в данном случае гистонов), а также наличие в качестве активатора Gap NCP, к которой PARP2 проявляет высокое сродство.

### 3.2. Интермедиат эксцизионной репарации оснований ДНК влияет на скорость синтеза PAR в присутствии HPF1

Измерение начальных скоростей реакций авто- и гетеро-модификации проводили в присутствии NCP или Gap NCP и 1 мкМ HPF1 при концентрации  $\text{NAD}^+$  1 мкМ (Таблица 4). Обнаружено, что наличие бреши в ДНК не влияет на начальную скорость автомодификации обоих ферментов. Наличие бреши в ДНК приводит к увеличению начальной скорости HPF1-зависимой модификации гистонов ферментом PARP1 в 1,6 раза, что в очередной раз подтверждает наличие небольшого числа комплексов PARP1 с брешью.

Начальная скорость катализируемой PARP2 модификации гистонов превышает скорость автомодификации. Наличие бреши в ДНК способствовало увеличению начальной скорости модификации гистонов ферментом PARP2 в 2,3 раза.

Фермент	Автомодификация		Гетеромодификация гистонов	
	NCP	Gap NCP	NCP	Gap NCP
PARP1	53±3	49±4	21±2	35±3
PARP2	5±0,4	5±0,7	8±0,6	18±1,2

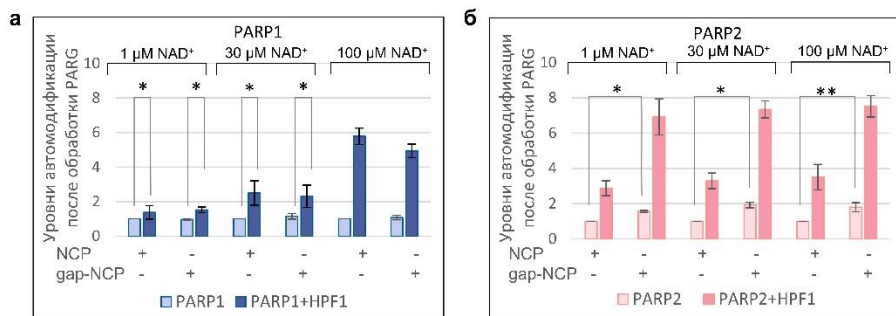
Начальную скорость (фмоль/с) определяли как скорость присоединения ADP-рибозы к белкам на линейном участке кинетической кривой реакции; представлены средние значения трех независимых измерений (±SD).



### 3.3. Присутствие бреши в структуре ДНК и HPF1 влияют на баланс событий инициации и элонгации PAR-илирования

Для сравнения количества событий инициации определяли относительный уровень автомодификации PARP после катализируемого PARC гидролиза цепи PAR (Рис.9). Уровни модификации гистонов не определяли количественно из-за невозможности обнаружить их в условиях реакции.

В случае PARP1, количество событий инициации увеличивалось в присутствии HPF1 в разной степени в зависимости от концентрации  $NAD^+$ , при этом эффекты были похожими для реакций в присутствии NCP и Gap NCP. В то же время и HPF1, и присутствие бреши в NCP способствовали реакции инициации, катализируемой PARP2, при этом наблюдаемые эффекты практически не зависели от концентрации  $NAD^+$ .



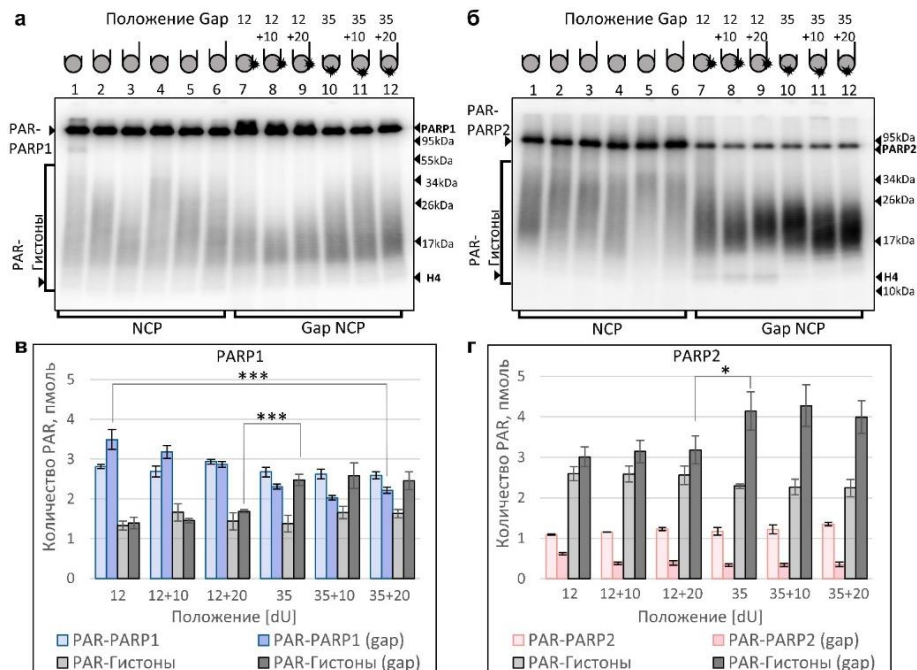
**Рис. 9.** Влияние HPF1, Gap NCP и концентрации  $NAD^+$  на эффективность инициации PAR-илирования: а, б – графики показывают относительные уровни автомодификации (среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение трех независимых измерений) PARP1/PARP2 после гидролиза, катализируемого PARC, определённые путем нормализации количества ADP-рибозы, ковалентно связанной с белками до соответствующего количества, полученного в отсутствие HPF1 и в присутствии NCP (без Gap) при каждой концентрации  $NAD^+$  (образцы 1, 5, 9). Отмечены статистически значимые различия между сравниваемыми величинами:  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*).

### 3.4. Положение повреждения в составе NCP влияет на HPF1-зависимую модификацию гистонов

Мы проанализировали влияние положения повреждения (как относительно турых концов, так и относительно гистонового ядра NCP) на активность PARP1 и PARP2. Было проанализировано количество и распределение PAR, синтезированного данными ферментами в присутствии HPF1 на всех вариантах NCP (Рис.10). Все NCP использовали как в вариантах без Gap, так и с повреждением. В присутствии Gap NCP, уровень автомодификации PARP1 незначительно снижался при удалении повреждения от 5'-конца ДНК(Рис.10в). PAR-илирование гистонов, по всей видимости, зависит скорее от положения повреждения относительно гистоновой коры: уровень модификации гистонов в структурах, содержащих брешь в положении 12, был достоверно ниже, чем в структурах с брешью в положении 35, и практически не отличался от уровня модификации для NCP без бреши.

В случае PARP2 мы также наблюдали увеличение количества ADP-рибозы, связанной с гистонами, в присутствии бреши в 35-м положении

(Рис.10г). Однако, мы не наблюдали какого-либо влияния положения повреждения и наличия линкеров на аутомодификацию PARP2.

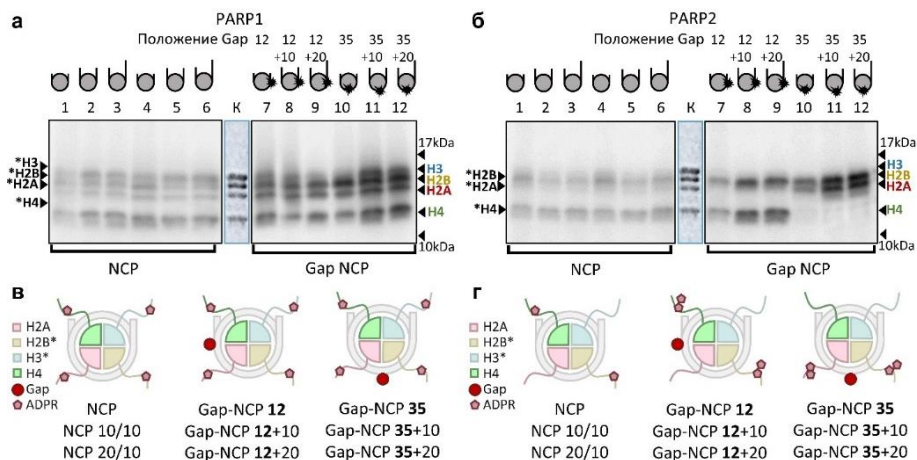


**Рис.10.** Влияние структуры NCP на HPF1-зависимое PAR-илирование: а, б – авторадииограммы показывают ковалентное связывание [<sup>32</sup>P]-меченой ADP-рибозы с PARP1 и PARP2 после инкубации PARP (500 нМ) с [<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> (1 мкМ) и 250 нМ NCP (дорожки 1-6) или Gap NCP (дорожки 7-12) в присутствии 1 мкМ HPF1 (разделение продуктов в 20% SDS-ПААГ). Сверху обозначено положение повреждения относительно 5'-конца ДНК и схематично изображены структуры NCP; в, г – графики отражают количество PAR, связанного с PARP1, PARP2 и гистонами. Отмечены статистически значимые различия между сравниваемыми величинами: p < 0,05 (\*), p < 0,001 (\*\*\*).

Для подтверждения предположения о ключевой роли влияния расположения повреждения относительно гистонов на их модификацию, было проанализировано распределение PAR между гистонами. Для этого реакционные смеси дополнительно были обработаны PARG (Рис.11). В случае PARP1, PAR оказался связанным со всеми четырьмя коровыми гистонами (Рис.11а).

В наших экспериментах PARP2 модифицировал гистоны H2B, H2A и H4, но модификация H3 не была детектирована (Рис.11б). Присутствие бреши приводило к увеличению числа актов инициации PAR-илирования гистонов. При этом, в отличие от PARP1, мы наблюдали различия в распределении PAR между гистонами в зависимости от расположения бреши относительно гистонов. В структуре Gap NCP с повреждением в положении 12 были модифицированы преимущественно гистоны H2B и H4. Основными мишенями модификации в структуре Gap NCP с повреждением в положении 35 были

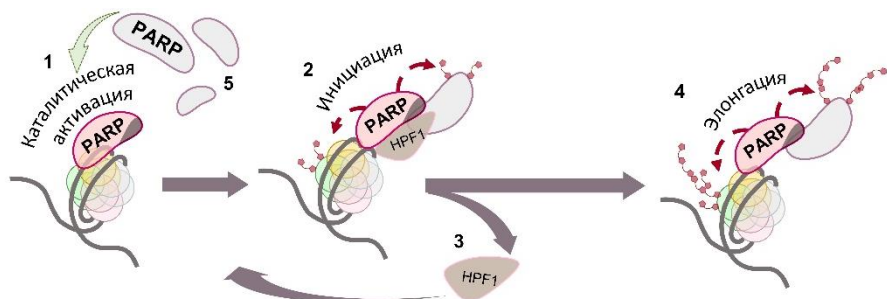
гистоны H2B и H2A. Таким образом, катализируемая PARP2 модификация гистонов зависит от гистонического окружения повреждения в большей степени, нежели катализируемая PARP1, что может указывать на специфические особенности PARP2 в реакции PAR-илирования гистонов.



**Рис.11.** Зависимость распределения PAR между гистонами от структуры NCP: а, б – автордиограммы показывают ковалентное связывание [<sup>32</sup>P]-меченой ADP-рибозы с гистонами после инкубации PARP (500 нМ) с [<sup>32</sup>P]-NAD<sup>+</sup> (1 мкМ), HPF1 (1 мкМ) и NCP или Gap NCP (250 нМ) с последующим катализируемым PARG гидролизом PAR и разделением продуктов в 20%-м SDS-ПААГ. Положение гистонов визуализировали окрашиванием кумасси (K); в, г – схематическое отображение паттерна PAR-илирования гистонов, возникающее на NCP без Gap и структурах, содержащих Gap в 12-м и 35-м положениях. Звездочками отмечены гистоны, для которых ранее показано PAR-илирование остатков серина.

Таким образом, можно заключить, что образование гибридного активного центра PARP:HPF1 действительно приводит к подавлению элонгации и укорочению синтезируемого PAR. В то же время, HPF1 стимулирует инициацию PAR-илирования, обеспечивая вклад в увеличение числа оборотов реакции, в пользу чего говорит возрастание начальных скоростей аутомодификации в присутствии HPF1 и стимуляция PAR-илирования при низких концентрациях NAD<sup>+</sup>. На основании полученных нами данных предполагаются следующий механизм PAR-илирования в комплексах HPF1 с PARP1 и PARP2 (**Рис.12**).

Кроме того, мы предполагаем специфическую роль PARP2 в ответе на повреждение ДНК в контексте хроматина. Так, мы показали, что изначально низкая активность PARP2 может быть многократно усилена присутствием HPF1, специфического для BER повреждения ДНК и гистонов — акцепторов PAR. При этом положение повреждения в структуре NCP может оказывать влияние на распределение PAR между гистонами в процессе их PAR-илирования.



**Рис.12.** Предполагаемый механизм PAR-илирования в комплексе PARP:HPF1: молекула PARP связывается с ДНК/НСР (1), комплекс PARP-HPF1 (2) участвует в инициации PAR-илирования. После инициации HPF1 диссоциирует из комплекса с PARP (3). Каталитически активная субъединица PARP продолжает синтез PAR (4), в то время как HPF1 может связаться со следующей молекулой PARP (5) для очередного этапа инициации PAR-илирования.

## Заключение

Недавно обнаруженный фактор PAR-илирования гистонов (HPF1) в настоящее время является объектом интенсивных исследований. Данный белок модулирует активность ферментов PARP1 и PARP2. Было показано, что HPF1 образует совместный активный центр с данными ферментами, тем самым обеспечивая переключение специфичности PAR-илирования с остатков аспартата и глутамата на остатки серина, что, в свою очередь, играет важную роль в катализируемом PARP1 и PARP2 PAR-илировании гистонов. В настоящий момент механизм взаимодействия PARP1/PARP2 с HPF1 активно изучается. Было показано, что HPF1 подавляет элонгацию синтеза PAR, что приводит к синтезу более коротких полимеров и увеличению гидролиза  $NAD^+$ .

В данной работе мы впервые показали стимуляцию PAR-илирования в присутствии HPF1 и предлагаем модель его взаимодействия с PARP1 и PARP2. Показано влияние HPF1 на этапах инициации и элонгации PAR-илирования. С учётом низкого сродства HPF1 к PARP1 и PARP2, а также разницы клеточных концентраций PARP1 и HPF1 ( $\sim 2 \mu M$  (PARP1) относительно  $\sim 0,1 \mu M$  (HPF1)), мы предполагаем, что для успешной стимуляции PAR-илирования необходима диссоциация HPF1 из комплекса с ферментами после акта инициации PAR-илирования для последующей элонгации синтеза PAR свободными молекулами PARP. Примечательно, что новые данные, полученные *in vivo*, подтверждают некоторые из обнаруженных нами эффектов. Было показано, что гиперэкспрессия HPF1 приводит к увеличению количества ADP-рибозы в ядре, но длина полимеров при этом сокращается [Smith R., et al., 2023].

Понимание механизмов регуляции активности ферментов PARP1 и PARP2 имеет важнейшее значение для разработки ингибиторов данных ферментов, являющихся противораковыми и противовоспалительными агентами. Мы полагаем, что предложенный механизм стимуляции PARP1 и PARP2 фактором HPF1 может оказывать влияние на эффективность действия препаратов — ингибиторов PARP1 и PARP2.

Работа поддержана грантом РФФИ № 20-34-90095.

## Выводы

1. Методика определения сродства и активности PARP1 и PARP2 *in vitro* в реальном времени с помощью флуоресцентной спектроскопии, оптимизирована для количественной оценки величин констант диссоциации комплексов PARP1 и PARP2 с ДНК и ДНК в нуклеосомах, а также скорости диссоциации этих комплексов в процессе PAR-илирования PARP1 и PARP2.
2. PARP1 и PARP2 имеют разное сродство и специфичность к повреждениям ДНК и ДНК в нуклеосомах. Наибольшую аффинность PARP1 проявляет к тупым концам ДНК. PARP2 связывается преимущественно с брешью в ДНК — интермедиатом эксцизионной репарации оснований.
3. HPF1 стимулирует инициацию PAR-илирования PARP1 и PARP2, но подавляет стадию элонгации. Увеличение эффективности и скорости инициации приводит к уменьшению уровня гидролиза  $\text{NAD}^+$  в гибридном активном центре PARP1/2:HPF1. Для процессивного синтеза PAR необходима диссоциация HPF1 из его комплекса с PARP1 и PARP2. Соотношение концентраций PARP1/2:HPF1 на сайтах повреждения ДНК может влиять на длину синтезируемого полимера.
4. PARP1 и PARP2 проявляют различную специфичность в отношении мишеней PAR-илирования. В присутствии HPF1 на нуклеосомах, гистоны становятся основной мишенью модификации PARP2. PARP1 преимущественно катализирует аутомодификацию.
5. Присутствие бреши в структуре ДНК в нуклеосоме влияет на HPF1-зависимое гетеро-PAR-илирование гистонов, но не на аутомодификацию PARP1 и PARP2. Присутствие повреждения ДНК — интермедиата BER приводит к увеличению как начальных скоростей PAR-илирования гистонов обоими ферментами, так и общего количества связанного с гистонами полимера. Каталитическая активность PARP2 усиливается в присутствии повреждения ДНК — интермедиата BER и HPF1 в большей степени, нежели активность PARP1. Брешь в ДНК приводит к значительному увеличению количества синтезированного PAR ферментом PARP2, преимущественно за счёт существенной стимуляции PAR-илирования гистонов. Таким образом, изначально низкая активность PARP2 стимулируется присутствием бреши в ДНК, HPF1, повышающего эффективность инициации, а также гистонов, выступающих в роли акцепторов PAR.

## Список публикаций по теме диссертации

1. **Kurgina T.A.**, Anarbaev R.O., Sukhanova M.V., Lavrik O.I. A rapid fluorescent method for the real-time measurement of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity // *Anal. Biochem.* – 2018. – V. 545. – P. 91–97.
2. Kutuzov M.M., **Kurgina T.A.**, Belousova E.A., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Optimization of nucleosome assembling from histones and model DNAs and estimation of the reconstitution efficiency // *Biopolymers and Cell.* – 2019. – V. 35. – No. 2. – P. 91–98.
3. **Kurgina T.A.**, Moor N.A., Kutuzov M.M., Naumenko K.N., Ukraintsev A.A., Lavrik O.I. Dual function of HPF1 in the modulation of PARP1 and PARP2 activities // *Commun. Biol.* – 2021. – V. 4. – No. 1. – Article No. 1259.
4. **Кургина Т. А.**, Шрам С. И., Кутузов М. М., Абрамова Т. В., Щербакова Т. А., Мальцева Е. А. Поройков В. В., Лаврик О. И., Швядас В. К., Нилов Д. К. Ингибиторное действие 7-метилгуанина и его метаболита 8-гидрокси-7-метилгуанина на поли(ADP-рибозо)полимеразу 1 человека // *Биохимия.* – 2022. – Т. 87. – No. 6. – С. 794–803.
5. **Kurgina T.A.**, Moor N.A., Kutuzov M.M., Lavrik O.I. The HPF1-dependent histone PARylation catalyzed by PARP2 is specifically stimulated by an incised AP site-containing BER DNA intermediate // *DNA Repair.* – 2022. – V. 120. – Article No. 103423.
6. **Кургина Т. А.**, Лаврик О. И., Поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 и 2: классические функции и взаимодействие с HPF1 – новым фактором поли(ADP-рибозил)ирования гистонов // *Молекулярная биология.* – Т. 57. – No. 11. – С. 254-268.