

УДК 57.088.1

## КОНЦЕВЫЕ УЧАСТКИ ГИСТОНОВ СПОСОБСТВУЮТ PARP1-ЗАВИСИМЫМ СТРУКТУРНЫМ ПЕРЕСТРОЙКАМ В НУКЛЕОСОМАХ

Н. В. Малюченко<sup>1,\*</sup>, Д. С. Султанов<sup>2</sup>, Е. Ю. Котова<sup>2</sup>,  
академик РАН М. П. Кирпичников<sup>1,3</sup>, В. М. Студитский<sup>1,2</sup>, А. В. Феофанов<sup>1,3</sup>

Поступило 02.08.2019 г.

PARP1 изменяет укладку нуклеосомной ДНК на октамере гистонов, модулируя доступность различных участков генома для ядерных белковых факторов. Мы показали, что неструктурированные концевые участки гистонов участвуют в PARP1-индуцированных структурных перестройках нуклеосом, облегчают и стабилизируют их, но не влияют на ферментативную активность PARP1.

*Ключевые слова:* N-концы гистонов, PARP1, нуклеосома, spFRET.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524893318-320>

Поли(АДФ-рибоза)полимераза 1 (PARP1) — ключевой белок системы репарации ДНК, выполняющий функцию узнавания разрывов [1], который вовлечён также в процессы репликации, транскрипции, регуляции клеточного цикла, апоптоза, воспаления и старения [2, 3]. Установлено, что помимо разрывов ДНК, PARP1 может связываться вблизи диадой оси нуклеосом в линкерной области [4, 5]. Взаимодействуя с нуклеосомами, PARP1 облегчает доступ пионерных транскрипционных факторов к участкам нуклеосомной ДНК, которые в отсутствие PARP1 экранированы октамером гистонов [5, 14]. Обнаружено, что при связывании с нуклеосомной ДНК PARP1 вызывает АТФ- и НАД<sup>+</sup>-независимые обратимые структурные перестройки нуклеосом [6]. Эти структурные изменения затрагивают области входа и выхода ДНК из нуклеосомы, происходят с участием не менее 50 п.н. и требуют детального изучения.

Известно, что протяжённые неструктурированные концевые участки гистонов, формирующих коровую область нуклеосомы, выходят за границу этой области, подвергаются ковалентным модификациям и выполняют разнообразные регуляторные и архитектурные функции в хроматине [7]. Мы предположили, что концевые участки гистонов могут быть вовлечены также в PARP1-опосредованное ремоделирование нуклеосом.

Для проверки этой гипотезы были получены мононуклеосомы, реконструированные по методике [8] с использованием ДНК-матрицы, имеющей нуклеосом-позиционирующую последовательность s603 (147 п.н.), и рекомбинантных гистонов из *Xenopus laevis*: полноразмерные (нуклеосомы N) и с удалёнными (как описано в [9]) концевыми доменами (нуклеосомы N<sub>m</sub>). Исследование взаимодействий N- и N<sub>m</sub>-нуклеосом с рекомбинантным PARP1 (получен по методике [10] и любезно предоставлен проф. Паскалем) выполняли с применением методов электрофореза в полиакриламидном геле EMSA (electrophoretic mobility shift assay; методика в [11]), Вестерн-блота и флуоресцентной микроскопии одиночных частиц на основе фёрстеровского резонансного переноса энергии (spFRET-микроскопии; методика в [12]).

Формирование нуклеосом N и N<sub>m</sub>, а также их комплексов с PARP1 (20 нМ) было подтверждено данными электрофореза (рис. 1). Удаление концов гистонов не препятствовало сборке нуклеосом и образованию комплексов с PARP1. Комплексообразование активировало PARP1 и приводило к его авто-поли-АДФ-рибозилированию в присутствии НАД<sup>+</sup>, что подтверждено методом Вестерн-блота с применением моноклональных антител против поли-АДФ-рибозы (рис. 2). Как и ожидалось, удаление концов гистонов не повлияло на ферментативную активность PARP1 в комплексе с нуклеосомами.

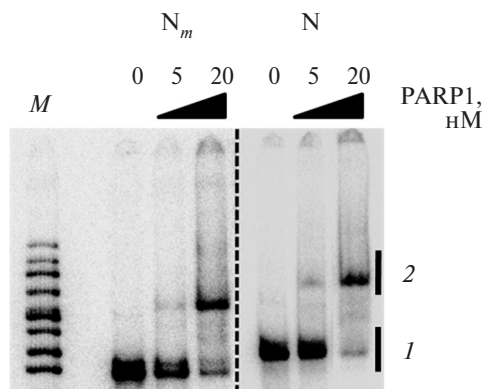
Анализ распределений нуклеосом по эффективности FRET (*E*), измеренных методом spFRET-микроскопии, показал, что как N-, так и N<sub>m</sub>-нуклеосомы присутствовали в растворе в виде двух субпопуляций (рис. 3):

<sup>1</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова

<sup>2</sup> Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA

<sup>3</sup> Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской Академии наук, Москва

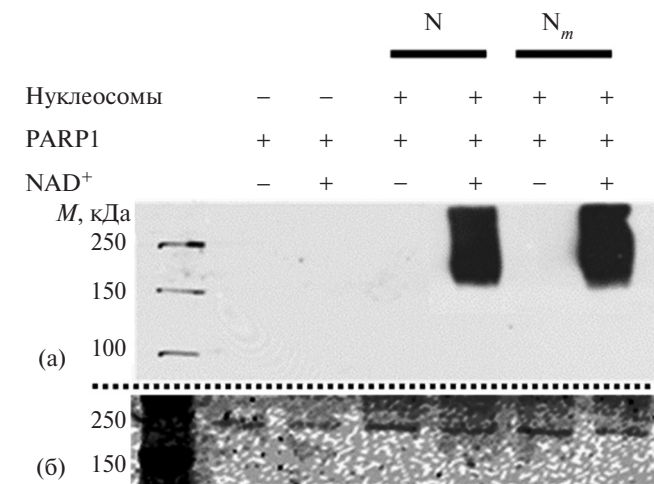
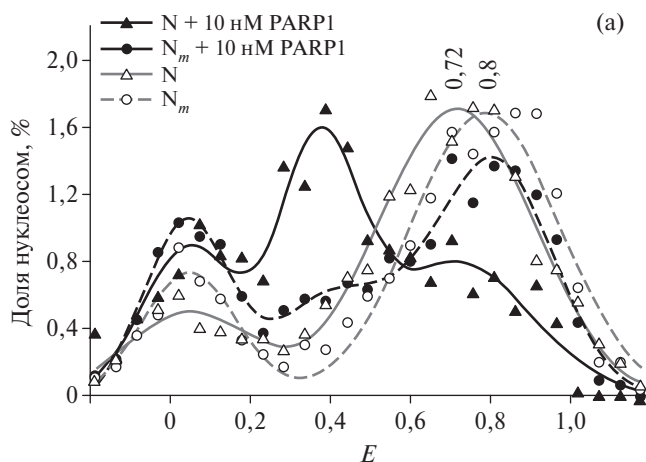
\*E-mail: mal\_nat@mail.ru



**Рис. 1.** Анализ образования комплексов PARP1 с N- и  $N_m$ -нуклеосомами при различных концентрациях фермента методом электрофореза в 4,5%-м полиакриламидном геле. Нуклеосомы собраны на радиоактивно меченой ДНК (147 п.н.). Изображения получены на PhosphoImager Turrhoon. *M* — набор ДНК-маркёров, отличающихся на 100 п.н. *1* — нуклеосомы, *2* — комплексы нуклеосомы с PARP1.

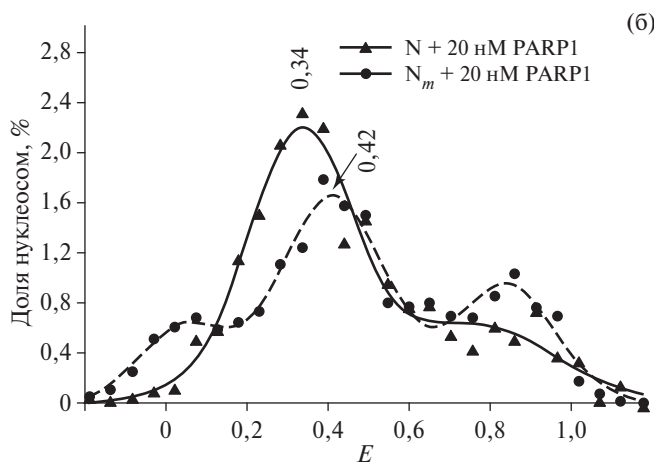
1) с компактной укладкой ДНК на гистоновом коре (максимум нормального распределения при  $E = 0,72 \pm 0,03$  и  $0,8 \pm 0,02$  соответственно у N и  $N_m$ );

2) с ДНК, открученной от гистонового кора в области расположения меток (максимум распределения при  $E \sim 0,06$ ). Откручивание ДНК могло возникнуть в результате так называемого дыхания нуклеосом, а также из-за потери одного или нескольких гистонов в разбавленных растворах (концентрация нуклеосом при измерениях  $< 1$  нМ). Смещение максимума распределения в области высоких значений  $E$  указывает на то, что удаление концов гистонов меняет укладку ДНК на октамере гистонов, сближая витки ДНК в области расположения меток.



**Рис. 2.** Анализ активации PARP1 нуклеосомами N и  $N_m$  и его авто-поли-АДФ-рибозилирования в присутствии НАД<sup>+</sup>. Градиентный (4–12% Bis-Tris гель) электрофорез выполняли в денатурирующих условиях. а — Вестерн-блот с антителами против поли-АДФ-рибозы (PAR), б — окраска Кумасси, визуализирующая наличие белка PARP1 в реакции. *M* — белковый маркёр.

Образование комплексов с PARP1 приводило к появлению субпопуляции N-нуклеосом с изменённой структурой, для которой характерно распределение с максимумом при  $E = 0,34 \pm 0,02$  (рис. 3б) так же, как и в случае нуклеосом с природными гистонами, выделенными из эритроцитов цыплят [6]. С учётом того что в рекомбинантных гистонах *X. laevis* в отличие от природных гистонов посттрансляционные модификации отсутствуют, можно заключить, что происхождение гистонов, а также наличие или отсутствие в них модификаций не влияют на PARP1-индуцированные структурные



**Рис. 3.** Влияние концов гистонов на PARP1-зависимые структурные перестройки в нуклеосомах. Нуклеосомы, содержащие флуоресцентные метки в положениях 13 и 91 п.н. от начала последовательности s603 и расположенные на соседних витках сверхспирали ДНК вблизи от её входа в нуклеосому [12], исследовали методом spFRET-микроскопии, как в [6]. Представлены частотные распределения нуклеосом по эффективности FRET ( $E$ ), измеренные для N- и  $N_m$ -нуклеосом при взаимодействии с 10 нМ (а) и 20 нМ (б) PARP1.

изменения в нуклеосомах. Характер этих изменений свидетельствует об увеличении расстояния между соседними витками ДНК [6].

PARP1-опосредованные структурные изменения в  $N_m$  сходны по характеру с N, но приводят к появлению субпопуляции нуклеосом со смещённым максимумом  $E = 0,42 \pm 0,02$  (рис. 3б). При этом при равных концентрациях PARP1 доля комплексов с изменённой структурой нуклеосом в случае  $N_m$  заметно меньше (рис. 3). Согласно расчётам, доли  $N_m$ - и N-нуклеосом с изменённой структурой составляют соответственно  $25 \pm 7$  и  $40 \pm 5\%$  при 10 нМ PARP1;  $44 \pm 5$  и  $64 \pm 4\%$  при 20 нМ PARP1.

Полученные данные подтверждают нашу гипотезу и свидетельствуют о том, что концы гистонов, участвуя в PARP1-индуцированных структурных перестройках нуклеосом, облегчают и стабилизируют их.

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта 17–54–33045 Российского фонда фундаментальных исследований.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang Y., Luo W., Wang Y. // DNA Repair (Amsterdam). 2019. V. 8. P. 102651.
2. Posavec Marjanović M., Crawford K., Ahel I. // Semin. Cell Dev Biol. 2017. V. 63. P. 102–113.
3. Thomas C., Ji Y., Wu C., Datz H., Boyle C., MacLeod B., Patel S., Ampofo M., Currie M., Harbin J., Pechenkina K., Lodhi N., Johnson S.J., Tulin A.V. // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2019. V. 116. P. 9941–9946.
4. Krishnakumar R., Gamble M., Frizzell K.M., Berrocal J.G., Kininis M., Kraus W.L. // Science. 2008. V. 319. P. 819–821.
5. Liu Z., Kraus K. // Mol. Cell. 2017. V. 65. P. 589–603.
6. Sultanov D.C., Gerasimova N.S., Kudryashova K., Maluchenko N.V., Kotova E.Y., Langelier M.F., Pascal J.M., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Studitsky V.M. // AIMS Genet. 2017. V. 4. P. 21–31.
7. Azad G.K., Swagatika K.M., Kumawat R., Tomar R.S. // J. Mol. Biol. 2018. V. 430. P. 3051–3067.
8. Gaykalova D.A., Kulaeva O.I., Bondarenko V.A., Studitsky V.M. // Methods Mol. Biol. 2009. V. 523. P. 109–123.
9. Luger K., Rechsteiner T., Flaus A.J., Wayne M.M., Richmond T.J. // J. Mol. Biol. 1997. V. 27. P. 301–311.
10. Langelier M.F., Planck J.L., Servent K.M., Pascal J.M. // Methods Mol. Biol. 2011. 780. P. 209–226.
11. Clark N.J., Kramer M., Muthurajan U.M., Luger K. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. P. 32430–32439.
12. Kudryashova K.S., Nikitin D.V., Chertkov O.V., Gerasimova N.S., Valeva M.E., Studitsky V.M., Feofanov A.V. // Moscow Univ. Biol. Sciences Bulletin. 2015. V. 70. P. 189–193.

## HISTONE TAILS PROMOTE PARP1-DEPENDENT STRUCTURAL REARRANGEMENTS IN NUCLEOSOMES

N. V. Maluchenko<sup>1</sup>, D. S. Sultanov<sup>2</sup>, E. Yu. Kotova<sup>2</sup>,  
Academician of the RAS M. P. Kirpichnikov<sup>1,3</sup>, V. M. Studitsky<sup>1,2</sup>, A. V. Feofanov<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

<sup>2</sup>Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA

<sup>3</sup>Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Received August 2, 2019

PARP1 alters the wrapping of nucleosomal DNA on the surface of the histone octamer, thereby modulating the accessibility of different genome sites to nuclear protein factors. Here we show that non-structured histone tails participate in the PARP1-induced structural rearrangements in nucleosomes, facilitate and stabilize them, but do not affect the enzymatic activity of PARP1.

**Keywords:** histone tails, PARP1, nucleosome, spFRET.