








DOI 10.18699/vjgb-24-77

Сравнительный анализ первичной структуры и получение рекомбинантной поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 долгоживущего *Heterocephalus glaber*

К.Н. Науменко ¹, А.Р. Нурисламов ², К.Д. Назаров¹, В.С. Фишман ², А.А. Попов ¹, И.О. Петрусева ¹,
А.Н. Евдокимов¹, О.И. Лаврик ^{1,3} 

¹ Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

² Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

³ Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 lavrik@niboch.nsc.ru








Аннотация. Репарация ДНК – важнейший клеточный процесс, который способствует поддержанию целостности генома. В настоящее время эффективная работа систем репарации ДНК рассматривается исследователями как один из ключевых факторов, определяющих максимальную продолжительность жизни. Центральным регулятором процесса репарации ДНК является фермент поли(ADP-рибоза)полимераза 1 (PARP1), способный синтезировать полимер поли(ADP-рибозы) (PAR) в ответ на повреждение ДНК и присоединять его к белкам-мишеням, в число которых входит и сам PARP1, осуществляя тем самым посттрансляционную модификацию этих белков и регулируя их сродство к ДНК. PARP1 принимает участие и во многих других процессах, ассоциированных с клеточным старением, таких как поддержание целостности теломер и развитие воспалительной реакции. Свойства PARP1 как изолированного белка практически не исследовались у млекопитающих, которые демонстрируют высокую максимальную продолжительность жизни, за исключением человека. Одним из перспективных объектов таких исследований считается голый землекоп (*Heterocephalus glaber*), имеющий экстремально высокую максимальную продолжительность жизни, а также более эффективно функционирующие системы репарации ДНК, которые обеспечивают высокую устойчивость его клеток к воздействию ряда генотоксических агентов, по сравнению с другими мелкими грызунами, например, близкой по размеру и массе тела мышью (*Mus musculus*). В настоящей работе проведено сравнение аминокислотной последовательности PARP1 голого землекопа с аминокислотными последовательностями белков-ортологов других млекопитающих. В отличие от PARP1 человека, в аминокислотной последовательности PARP1 голого землекопа выявлено 13 эволюционно консервативных аминокислотных замен в различных функциональных доменах белка. С использованием поиска в базах данных последовательности кДНК гена *Parp1* голого землекопа и последующего анализа путем выравнивания транскриптомных данных выбрана соответствующая экспрессируемому варианту *Parp1* последовательность кДНК, которая была клонирована с помощью экспрессионного вектора на основе плазмиды pLate31. В результате экспрессии в штамме *Escherichia coli* BL21(DE3)GeneX и очистки, проведенной с использованием трех хроматографических стадий, впервые был получен и охарактеризован функционально активный фермент PARP1 голого землекопа.

Ключевые слова: поли(ADP-рибоза)полимераза 1; репарация ДНК; *Heterocephalus glaber*.

Для цитирования: Науменко К.Н., Нурисламов А.Р., Назаров К.Д., Фишман В.С., Попов А.А., Петрусева И.О., Евдокимов А.Н., Лаврик О.И. Сравнительный анализ первичной структуры и получение рекомбинантной поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 долгоживущего *Heterocephalus glaber*. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2024;28(7):688-695. DOI 10.18699/vjgb-24-77

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-74-10056П).

Comparative analysis of the primary structure and production of recombinant poly(ADP-ribose)polymerase 1 of long-lived *Heterocephalus glaber*

K.N. Naumenko ¹, A.R. Nurislamov ², K.D. Nazarov¹, V.S. Fishman ², A.A. Popov ¹, I.O. Petrusева ¹,
A.N. Evdokimov¹, O.I. Lavrik ^{1,3} 

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

² Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

³ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 lavrik@niboch.nsc.ru

Abstract. DNA repair is a most important cellular process that helps maintain the integrity of the genome and is currently considered by researchers as one of the factors determining the maximum lifespan. The central regulator of the DNA repair process is the enzyme poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP1). PARP1 catalyzes the synthesis of poly(ADP-ribose) polymer (PAR) upon DNA damage using nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) as a substrate. This polymer covalently attaches to PARP1, which leads to its dissociation from the complex with damaged DNA and stimulation of the repair process. Despite intensive research on PARP1, its properties as an isolated protein have not been practically studied in mammals that demonstrate a long maximum lifespan, such as, for example, the naked mole rat (*Heterocephalus glaber*). High activity of DNA repair systems is observed in the cells of the naked mole rat, which ensures their high resistance to oxidative stress, as well as to genotoxic effects. The revealed features may be due to the high activity of PARP1 in the cells of the naked mole rat; however, this issue remains poorly understood and, thus, requires more detailed research, including one with the use of isolated protein PARP1 of the naked mole rat, the isolation and characterization of which have not been carried out before. In the present work, the amino acid sequence of PARP1 of the naked mole rat is compared with the amino acid sequences of orthologous proteins of other mammals. In contrast to human PARP1, 13 evolutionarily conservative amino acid substitutions in various functional domains of the protein have been identified in the amino acid sequence of naked mole rat PARP1. Using the cDNA of the naked mole rat's *Parp1* gene, a vector was created for the expression of the target protein in *Escherichia coli* cell culture. For the first time, a detailed description of the procedure for the expression and purification of the recombinant protein PARP1 of the long-lived naked mole rat is presented. In addition, poly(ADP-ribose)polymerase activity of the obtained protein was evaluated. The results presented in this paper are the basis for further detailed characterization of the properties of purified recombinant naked mole rat PARP1.

Key words: poly(ADP-ribose)polymerase 1; DNA repair; *Heterocephalus glaber*.

For citation: Naumenko K.N., Nurislamov A.R., Nazarov K.D., Fishman V.S., Popov A.A., Petrusева I.O., Evdokimov A.N., Lavrik O.I. Comparative analysis of the primary structure and production of recombinant poly(ADP-ribose)polymerase 1 of long-lived *Heterocephalus glaber*. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Selekcii* = *Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2024;28(7):688-695. DOI 10.18699/vjgb-24-77

Введение

Одной из главных причин старения является нестабильность генома, которая может развиваться в результате накопления повреждений геномной ДНК, образующихся при неблагоприятном воздействии экзогенных и эндогенных факторов (López-Otín et al., 2023). В устранении последствий этих неблагоприятных воздействий и поддержании целостности генома важную роль играет репарация ДНК. Эффективная работа систем репарации ДНК рассматривается как один из факторов, способствующих долголетию (Schumacher et al., 2021). В связи с этим актуальным направлением исследований стало изучение механизмов и особенностей функционирования систем репарации ДНК в клетках млекопитающих, которые демонстрируют высокую продолжительность жизни.

К перспективным объектам таких исследований может быть отнесен голый землекоп (*Heterocephalus glaber*), имеющий более высокую максимальную продолжительность жизни по сравнению с близкой по размеру и массе тела мышью (*Mus musculus*) (Buffenstein, 2005; Gorbunova et al., 2014). Согласно результатам проведенных к настоящему времени сравнительных исследований, в клетках голого землекопа наблюдается более высокая активность систем репарации ДНК и устойчивость к воздействию некоторых генотоксических агентов (метанметилсульфонат, паракват, эпопозид и т. д.), чем в клетках мыши (Salmon et al., 2008; MacRae et al., 2015; Evdokimov et al., 2018, 2021). Для того чтобы выяснить возможные причины этих особенностей, необходимо проведение исследований на изолированных белках землекопа, участвующих в репарации ДНК.

Центральным регулятором репарации ДНК в клетках млекопитающих является фермент поли(ADP-рибоза)полимераза 1 (PARP1), который, используя NAD⁺ в качестве

субстрата, катализирует синтез поли(ADP-рибозы) (PAR), а кроме того способен использовать PAR для проведения ковалентной модификации белков – как самого PARP1 – авто-поли(ADP-рибозил)ирование, так и молекул других белков-акцепторов – транс-поли(ADP-рибозил)ирование. Показано, что PARP1 модулирует активность ферментов репарации, их взаимодействие с поврежденной ДНК и привлечение к местам повреждения ДНК (Sinha et al., 2021; Bilkis et al., 2023; Rouleau-Turcotte, Pascal, 2023). Кроме того, PARP1 участвует в образовании «немембранных компартментов», которые формируются с участием полимера PAR, ковалентно присоединенного к PARP1. В таких компартментах концентрируются поврежденная ДНК и белки репарации, что способствует повышению эффективности процесса репарации ДНК (Singatulina et al., 2019; Leung, 2020; Alesmasova, Lavrik, 2022). Все это определяет PARP1 как ключевой фактор в регуляции эффективности репарации ДНК и обеспечении стабильности генома.

В одном из первых исследований, направленных на поиск этой взаимосвязи, сравнительная оценка поли(ADP-рибоза)полимеразной активности в клетках тринадцати видов млекопитающих, из которых человек обладал самой высокой максимальной продолжительностью жизни, выявила наличие положительной корреляции между активностью PARP и продолжительностью жизни (Grube, Bürkle, 1992). Позже при исследовании кинетики реакции PARилирования, катализируемой рекомбинантными PARP1 человека (*Homo sapiens*) и короткоживущей серой крысы (*Rattus norvegicus*), были найдены различия, которые говорят о более эффективной работе фермента человека (Beneke et al., 2000, 2010).

Помимо того, при исследовании эффективности систем репарации в клетках голого землекопа и мыши нами были

показаны более высокая активность синтеза PAR в клетках голого землекопа по сравнению с клетками мыши, так же как и более высокое содержание белка PARP1, детектированное с помощью его ковалентных пришивок к ДНК (Evdokimov et al., 2018). Представлялось интересным изучение свойств PARP1 голого землекопа и сравнение свойств этих белков из разных организмов. Свойства PARP1 голого землекопа как изолированного белка прежде не изучались, поскольку препарат индивидуального белка был недоступен.

Целью данной работы было получение рекомбинантной PARP1 голого землекопа, для того чтобы в дальнейшем исследовать свойства этого белка и провести их сравнение со свойствами PARP1 других млекопитающих. Для достижения поставленной цели нами впервые проведен сравнительный анализ аминокислотной последовательности PARP1 голого землекопа с белками-ортологами других млекопитающих. По результатам биоинформатического анализа баз данных была выбрана последовательность кДНК, соответствующая экспрессируемому варианту гена *Parp1* голого землекопа. Выбранная последовательность была использована для клонирования в плазмидный вектор pLate31, что позволило впервые провести экспрессию в клетках *E. coli*, очистку и характеристику рекомбинантного PARP1 этого долгоживущего грызуна.

Материалы и методы

Олигодезоксинуклеотиды. В работе использованы олигодезоксинуклеотиды, последовательность которых представлена в таблице. Олигодезоксинуклеотиды 1–3 были синтезированы в лаборатории синтетической биологии ИХБФМ СО РАН (Новосибирск, Россия). Праймеры pLate31-PARP1-For и pLate31-PARP1-Rev были производства ООО «ДНК-Синтез» (Москва, Россия).

Эволюционный анализ первичной структуры PARP1 голого землекопа. Для выявления аминокислотных замен, уникальных для PARP1 голого землекопа, было проведено множественное выравнивание аминокислотных последовательностей PARP1 данного вида и других млекопитающих. В анализ включили ортологи PARP1 десяти видов животных, включая трех грызунов (*Fukomys damarensis*, *M. musculus*, *R. norvegicus*) и широкую филогенетическую группу из шести видов млекопитающих (*H. sapiens*, *Equus caballus*, *Dasyurus novemcinctus*, *Loxodonta africana*, *Monodelphis domestica*, *Ornithorhynchus anatinus*). Аминокислотные последовательности PARP1 выбранных видов загружали из публичных баз данных

NCBI и Ensembl. Множественное выравнивание выполняли в web-версии Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>).

Культивирование клеток. Фибробласты кожи голого землекопа (линия NSF8) культивировали в α MEM-среде, содержащей 15 % FBS, 10 % AmnioMAX, 0.005 мкг/мл bFGF, смесь антибиотик/антимикотик (Gibco, США) при температуре 32 °C и 5 % CO₂.

Выделение суммарной РНК из фибробластов голого землекопа и получение кДНК. Полученную культуру клеток промывали 5 мл PBS от остатков среды и добавляли 1 мл раствора TRIzol (Thermo Fisher Scientific, США). Клетки ресуспендировали до гомогенной суспензии и переносили в чистую пробирку. Добавляли 200 мкл хлороформа, инкубировали 5 мин при комнатной температуре и центрифугировали 15 мин при 16000 g при 4 °C. После центрифугирования отбирали верхнюю водную фазу в чистую пробирку. Полученный образец переосаждали изопропиловым спиртом. Осажденную РНК растворяли в 200 мкл воды и добавляли равный объем смеси фенол: хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1). После центрифугирования отбирали водную фазу и переосаждали РНК этанолом.

Для наработки кДНК *Parp1* реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 4 мкг суммарной РНК и 100 нмоль oligo dT, инкубировали 2 мин при 70 °C, после чего добавляли буфер для обратной транскрипции и 1 мкл обратной транскриптазы ОТ-MMLV (100 ед. активности/мкл; «Биолабмикс», Россия). Реакцию проводили в течение часа при 42 °C.

Создание вектора для экспрессии PARP1. ПЦР продукт, содержащий кодирующую транскрибируемую часть кДНК PARP1 голого землекопа, которая была фланкирована специфичными нуклеотидными последовательностями, получали с использованием пары праймеров pLate31-PARP1-For/pLate31-PARP1-Rev (см. таблицу). Полученный продукт переосаждали в 96 % этаноле. Очищенный ПЦР продукт растворяли в 10 мкл LIC-буфера, после чего к реакционной смеси добавляли 1 мкл ДНК-полимеразы фага T4 (1 ед. активности/мкл; Thermo Fisher Scientific, США). Смесь тщательно перемешивали и инкубировали 5 мин при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 50 мМ. Далее к реакционной смеси добавляли 20 фмоль линейаризованной формы вектора pLate31 (Thermo Scientific, США), содержащей комплементарные «липкие» концы, перемешивали и инкубировали 5 мин при комнат-

Последовательности олигодезоксинуклеотидов и праймеров, использованных в работе

Наименование	Последовательность (5'-3')
Олигодезоксинуклеотид 1	ggcgataaagttggg
Олигодезоксинуклеотид 2	aacgtcaggtctcc
Олигодезоксинуклеотид 3	ggaagaccctgacgttccaactttatcgcc
pLate31-PARP1-For	agaaggagatataactatgatggccgaggcagcggac
pLate31-PARP1-Rev	gtgggtgatgggtgatggcccccacagggaggacttaaattgaac

ной температуре. Полученным препаратом плазмидной ДНК проводили трансформацию клеток *E. coli* штамма XLBlue.

Определение суммарного уровня поли(ADP-рибозы), синтезируемой в реакции автоPARилирования. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 100, 200, 400 нМ рекомбинантного белка PARP1, 100 нМ ДНК-дуплекс размером 32 п. н. с одноцепочечным разрывом (получен путем гибридизации олигодезоксинуклеотидов 1–3, см. таблицу), 400 мкМ NAD^+ и $[^{32}\text{P}]$ -меченный NAD^+ (0.4 мкКи). Реакцию запускали добавлением NAD^+ с последующей инкубацией реакционных смесей в течение 10 мин при 37 °С. Останавливали реакцию путем нанесения реакционной смеси на мишени из хроматографической бумаги (GE Healthcare, США), предварительно инкубированной в 10 % ТХУ. Избыток меченного $[^{32}\text{P}]$ - NAD^+ , не включившегося в PAR, удаляли последовательной отмывкой мишеней в 5 % ТХУ и этаноле. Бумагу подсушивали, уровень синтеза PAR оценивали по суммарной радиоактивности продуктов реакции путем радиоавтографии с использованием прибора Turphoon FLA 7000 (GE Healthcare, США).

Выделение и очистка рекомбинантного белка PARP1. Клетки *E. coli* BL21(DE3)GeneX, трансформированные плазмидой pLate31-PARP1, инкубировали в системе автоиндукции по методу Штудера в среде LB, содержащей 50 мМ Na_2HPO_4 , 50 мМ KH_2PO_4 , 25 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 мМ MgSO_4 , 0.5 % глицерин, 0.05 % глюкозу, 0.2 % лактозу и ампициллин (100 мкг/мл) в течение 18 ч при 37 °С. После инкубации клетки осаждали центрифугированием при 3000 g, супернатант отбирали и осажденные клетки хранили при –70 °С.

Для приготовления клеточного лизата полученную биомассу ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 10 % глицерин, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 10 мМ имидазол, 0.5 мМ PMSF и смесь ингибиторов протеаз из расчета 5 мл буфера на 1 г биомассы клеток. После инкубации на льду в течение 20 мин к смеси добавляли равный объем буферного раствора, содержащего 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 2 М NaCl, 2 % NP-40, 10 % глицерин, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 0.5 мМ PMSF, смесь ингибиторов протеаз. Суспензию обрабатывали в ультразвуковом дезинтеграторе при 40 кГц в течение 20 мин с охлаждением до 4 °С. Полученный лизат центрифугировали при 30000 g 30 мин в роторе Beckman JA 25.50.

Осветленный лизат пропускали через колонку, содержащую в качестве сорбента Ni-NTA-агарозу (GE Healthcare, США), уравновешенную буфером 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 1 М NaCl, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 10 % глицерин, 5 мМ имидазол. Затем носитель последовательно промывали буфером уравновешивания до стабилизации базовой линии и буфером 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 0.1 М NaCl, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 10 % глицерин, 5 мМ имидазол до стабилизации базовой линии. Хроматографическое разделение на Ni-NTA проводили элюцией буферным раствором, содержащим 250 мМ имидазол. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и наносили на колонку, содержащую в качестве сорбента 5 мл гепарин-сефарозы (GE Healthcare, США). Хроматографическое разделение

на гепарин-сефарозе проводили в режиме изократической промывки буфером, содержащим 0.3 М NaCl для промывки от слабосвязанного нецелевого белка, и буфером, содержащим 1 М NaCl для элюции целевого белка. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и разбавляли в 10 раз буфером, содержащим 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 7 мМ 2-меркаптоэтанол, 10 % глицерин, и наносили на колонку, содержащую в качестве сорбента 5 мл оцДНК-целлюлозы (Sigma, США). Хроматографическое разделение на оцДНК-целлюлозе проводили в условиях, аналогичных разделению белков на гепарин-сефарозе.

Результаты и обсуждение

Для того чтобы определить, имеются ли в структуре PARP1 голого землекопа характерные эволюционно консервативные аминокислотные замены, которые потенциально могут повлиять на функциональные свойства этого фермента, мы провели сравнение аминокислотной последовательности PARP1 голого землекопа с аминокислотными последовательностями белков-ортологов других млекопитающих. Аминокислотная последовательность PARP1 высококонсервативна у млекопитающих, на что указывает высокий уровень гомологии среди ортологов белка (более 90 %), несмотря на дивергенцию, произошедшую свыше 150 млн лет назад (рис. 1, а). PARP1 голого землекопа также сохраняет все функциональные домены, присутствующие в PARP1 других млекопитающих. Значительная часть последовательности белка консервативна, однако в PARP1 голого землекопа мы идентифицировали несколько замен в высококонсервативных сайтах функциональных доменов (см. рис. 1, б); часть этих замен присутствует также у дамасского пескороя (*F. damarensis*) – родственного вида из семейства землекоповых (Bathyergidae). Выявленные замены могут повлиять на узнавание PARP1 поврежденной ДНК и на каталитические функции этого фермента.

В результате поиска последовательности кДНК гена *Parp1* голого землекопа в базах данных и последующего анализа с помощью выравнивания транскриптомных данных для различных органов голого землекопа (мозг – SRS899007; тестикулы – SRR1959204; печень – ERS1090459) на три альтернативные матрицы *Parp1* была выбрана последовательность кДНК (NCBI NM_001310226.1 (Bens et al., 2016)), соответствующая экспрессируемому варианту *Parp1*. Эта кДНК была взята нами для амплификации и последующего клонирования.

Для получения рекомбинантной PARP1 голого землекопа в клетках *E. coli* был использован экспрессионный вектор на основе плазмиды pLate31 (Thermo Scientific, США). С помощью специфических праймеров и суммарной кДНК фибробластов голого землекопа методом ПЦР была амплифицирована кодирующая последовательность PARP1. Полученный ПЦР-продукт отжигали с линейризованным вектором pLate31 и проводили трансформацию клеток *E. coli* XLBlue для амплификации плазмидной ДНК. Отсутствие ошибок в амплифицированной последовательности подтвердили методом секвенирования по Сэнгеру.

При поиске оптимальных условий экспрессия PARP1 проводилась в штаммах *E. coli* (BL21(DE3), BL21(DE3)

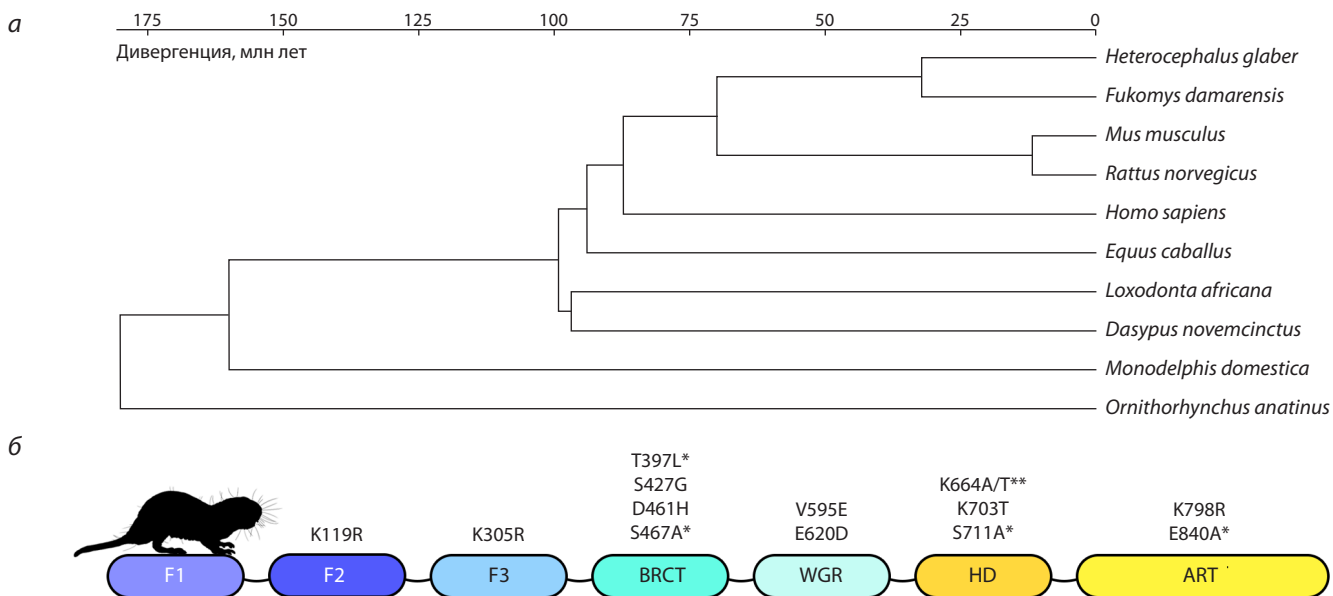


Рис. 1. Эволюционный анализ первичной структуры белка PARP1.

а – список видов млекопитающих, включенных в анализ, и их дивергенция; б – уникальные для голого землекопа замены аминокислот в PARP1. * Замены, присутствующие также у дамарского пескороя; ** варианты замен из баз данных NCBI и Ensembl.

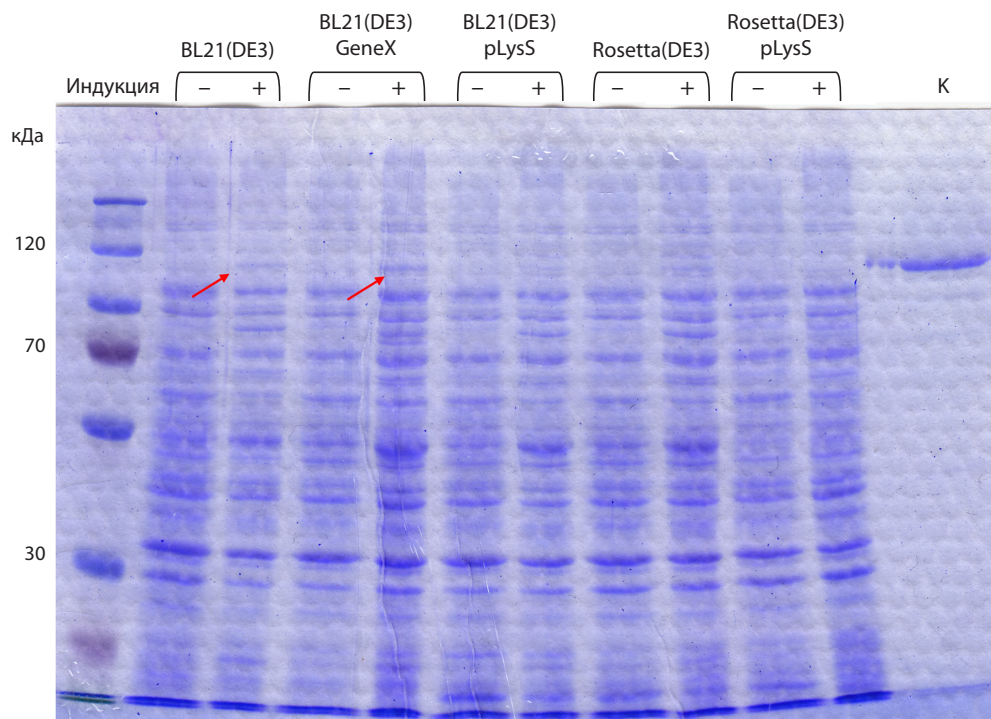


Рис. 2. Анализ содержания PARP1 в лизатах трансформированных клеток *E. coli*.

Клетки культивировали в системе автоиндукции при 37 °С в отсутствие (индукция «-») и в присутствии (индукция «+») лактозы. Положение белка PARP1 показано красными стрелками. К – рекомбинантный белок PARP1 человека.

pLysS, BL21(DE3)GeneX, Rosetta(DE3) и Rosetta(DE3) pLysS). Появление целевого белка в клетках *E. coli* после индукции по сравнению с неиндуцированными клетками было визуально обнаружено только при электрофоретическом анализе белков, экспрессированных в штаммах клеток BL21(DE3) и BL21(DE3)GeneX (рис. 2).

Выбранные условия культивирования использовали для наработки препаративного количества биомассы клеток BL21(DE3)GeneX, трансформированных вектором pLate31-PARP1. Полученную биомассу лизировали с последующей обработкой в ультразвуковом дезинтеграторе и центрифугировали для осаждения дебриса. Далее

последовательно проводили три хроматографические стадии очистки на колонках, содержащих в качестве сорбента Ni-NTA (рис. 3, а), гепарин-сефарозу (б), оцДНК-целлюлозу (в) (Sukhanova et al., 2004).

За наличием целевого белка следили путем электрофоретического анализа с окрашиванием по Лэмбли (рис. 4). Фракции, содержащие очищенный препарат белка, концентрировали с помощью центрифужных фильтров. Степень очистки препарата проверяли электрофорезом с последующим окрашиванием Coomassie R250.

Концентрация белка в конечном препарате, определенная по методу Брэдфорда, составила 0.5 мг/мл. Суммарный выход – 0.3 мг белка на 10 г биомассы клеток *E. coli*.

Для проверки активности полученного рекомбинантного белка использовали систему *in vitro*, содержащую радиоактивно меченный NAD⁺ и модельную поврежденную ДНК, содержащую разрыв и свободные тупые концы в качестве кофактора для активации реакции синтеза PAR, катализируемой PARP1 (рис. 5). Как видно из представленных данных, выделенный белок обладает ферментативной активностью в реакции автоPARилирования и пригоден для дальнейшего исследования его свойств.

В сравнительных исследованиях активности систем репарации ДНК в клетках голого землекопа и мыши (*M. musculus*) было показано, что системы эксцизионной репарации оснований (BER) и нуклеотидов (NER) клеток голого землекопа обеспечивают более эффективное удаление объемных повреждений, а также поврежденных оснований, чем аналогичные системы клеток мыши (Evdokimov et al., 2018). Активность PARP1 была также заметно выше в клетках долгоживущего голого землекопа, чем в клетках короткоживущей мыши (Evdokimov et al., 2018). Дальнейшее развитие работы предполагает определение характера взаимодействия выделенного белка PARP1 голого землекопа с белками-партнерами в процессе репарации ДНК, влияния этих белков на активность PARP1, а также определение сродства PARP1 к поврежденной ДНК.

Получение рекомбинантных белков, таких сложных по структуре и функциям, как PARP1, не является рутинной задачей и требует подбора оптимальных условий наработки, выделения и очистки, которые могут значительно отличаться от стандартно применяемых. Использование сочетания описанных выше методов позволило нам успешно провести клонирование, наработку в системе экспрессии *E. coli* и хроматографическую очистку белка PARP1 голого землекопа. Предложенная процедура очистки белка, включающая, помимо хроматографии на Ni-NTA, две «псевдоаффинные» колонки в отработанных нами буферных и солевых условиях, может быть использована для эффективной очистки рекомбинантного PARP1 голого землекопа.

Данные, полученные в результате впервые проведенного нами сравнительного анализа аминокислотной последовательности PARP1 голого землекопа и человеческого белка-ортолога, говорят о том, что две замены, обнаруженные в ответственной за синтез PAR ART-домене, не затронули каталитическую триаду и кинетические параметры при синтезе PAR ферментами этих двух долгожителей, вероятно, не будут значительно различаться. Тем не менее

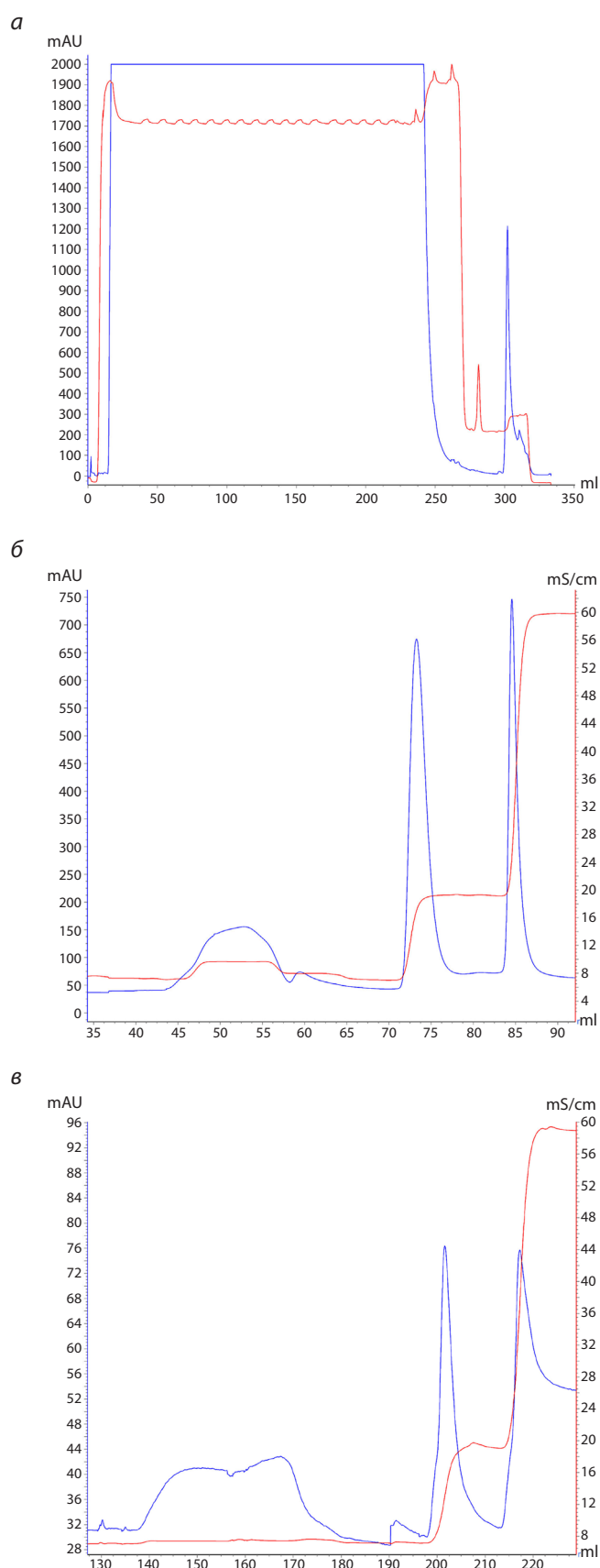


Рис. 3. Профили элюции белка PARP1 (*H. glaber*) с Ni-NTA-агарозы (а), гепарин-сефарозы (б), оцДНК-целлюлозы (в).

Синяя линия – оптическая плотность раствора при длине волны 280 нм (10⁻³ о. е.); красная линия – проводимость раствора (мСм/см).

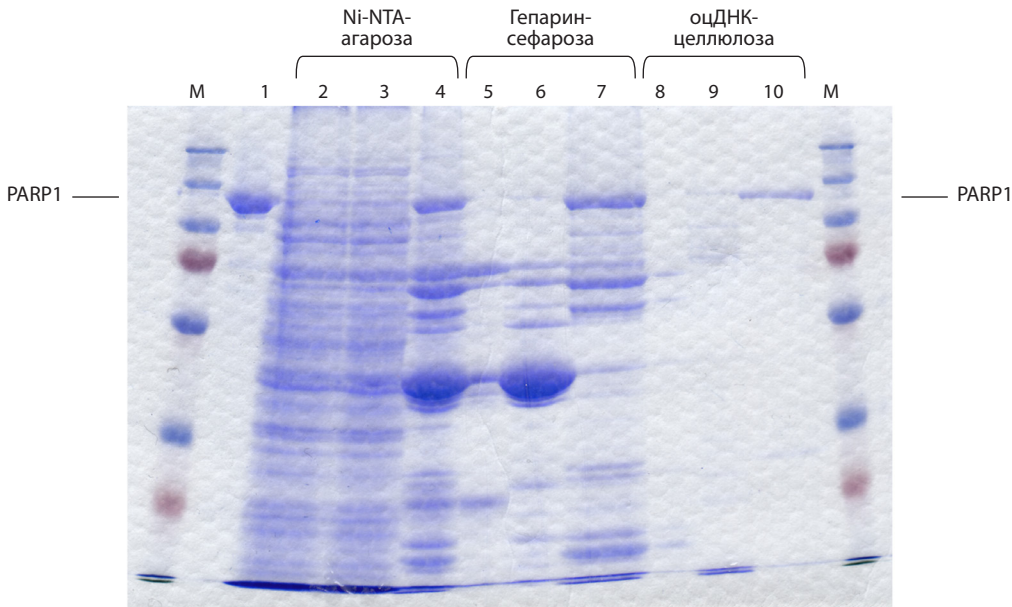


Рис. 4. Электрофореграмма, отражающая стадии очистки рекомбинантного PARP1 голого землекопа.

1 – контрольный образец белка; 2–4 – нанесение, пропуск и элюция с Ni-NTA-агарозы соответственно; 5 – пропуск с гепарин-сефарозы; 6, 7 – элюция с гепарин-сефарозы 0.3 и 1 M NaCl соответственно; 8 – пропуск с оцДНК-целлюлозы; 9, 10 – элюция целевого белка с оцДНК-целлюлозы 0.3 и 1 M NaCl соответственно.

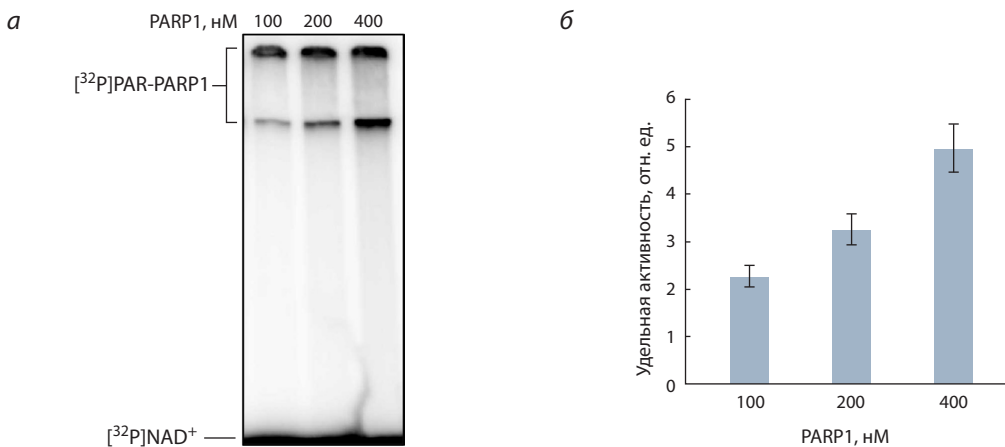


Рис. 5. Анализ активности рекомбинантного PARP1 голого землекопа в реакции автоPARилирования.

а – радиоавтограф 10%-го SDS-ПААГ, в котором проводилось разделение продуктов модификации белков; *б* – диаграмма, суммирующая результаты трех независимых экспериментов, выполненных с использованием метода ТХУ-мишеней (см. Материалы и методы).

замены в других функциональных доменах, происходящие со сменой типа остатка (появление более гидрофобного или смена нейтрального остатка на остаток, несущий заряд, и т. п.), особенно если это происходит в непосредственной близости от мишеней автоPARилирования, Asp и Glu, как, например, замена K305R в домене Zn3, D461H в домене BRCT, а также замены аминокислотных остатков, участвующих в междоменных взаимодействиях, могут влиять на свойства белка. Это возможно исследовать далее с использованием мутантных форм PARP1 голого землекопа, содержащих в своем составе замены вышеперечисленных аминокислотных остатков.

Заключение

Изучение свойств PARP1 различных долгоживущих млекопитающих является перспективным направлением исследований, поскольку может способствовать более глубокому пониманию роли репарации ДНК в старении и того, как организован этот процесс в клетках млекопитающих.

Сравнение аминокислотных последовательностей PARP1 двух млекопитающих с высокой максимальной продолжительностью жизни, голого землекопа и человека, выявило 13 эволюционно консервативных замен в белке голого землекопа. Влияние этих замен на свойства и функции PARP1 предстоит выяснить. Кроме того, были

впервые выполнены клонирование PARP1 голого землекопа, а также наработка в клетках *E. coli* и очистка рекомбинантного белка с использованием достаточно простой процедуры, оценена его способность к проведению реакции автоПАРилирования. В дальнейших работах будет проведено сравнение свойств рекомбинантных PARP1 долгоживущих голого землекопа и человека, которое не выполнялось ранее.

Список литературы / References

- Alemasova E.E., Lavrik O.I. Poly(ADP-ribose) in condensates: the partnership of phase separation and site-specific interactions. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(22):14075. DOI 10.3390/ijms232214075
- Beneke S., Alvarez-Gonzalez R., Bürkle A. Comparative characterisation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 from two mammalian species with different life span. *Exp. Gerontol.* 2000;35(8):989-1002. DOI 10.1016/s0531-5565(00)00134-0
- Beneke S., Scherr A.L., Ponath V., Popp O., Bürkle A. Enzyme characteristics of recombinant poly(ADP-ribose) polymerases-1 of rat and human origin mirror the correlation between cellular poly(ADP-ribose)ylation capacity and species-specific life span. *Mech. Ageing Dev.* 2010;131(5):366-369. DOI 10.1016/j.mad.2010.04.003
- Bens M., Sahn A., Groth M., Jahn N., Morhart M., Holtze S., Hildebrandt T.B., Platzer M., Szafranski K. FRAMA: from RNA-seq data to annotated mRNA assemblies. *BMC Genomics.* 2016;17:54. DOI 10.1186/s12864-015-2349-8
- Bilkis R., Lake R.J., Cooper K.L., Tomkinson A., Fan H.Y. The CSB chromatin remodeler regulates PARP1- and PARP2-mediated single-strand break repair at actively transcribed DNA regions. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(14):7342-7356. DOI 10.1093/nar/gkad515
- Buffenstein R. The naked mole-rat: a new long-living model for human aging research. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2005;60(11):1369-1377. DOI 10.1093/gerona/60.11.1369
- Evdokimov A., Kutuzov M., Petruseva I., Lukjanchikova N., Kashina E., Kolova E., Zemerova T., Romanenko S., Perelman P., Prokopov D., Seluanov A., Gorbunova V., Graphodatsky A., Trifonov V., Khodyreva S., Lavrik O. Naked mole rat cells display more efficient excision repair than mouse cells. *Ageing (Albany NY).* 2018;10(6):1454-1473. DOI 10.18632/aging.101482
- Evdokimov A., Popov A., Ryabchikova E., Koval O., Romanenko S., Trifonov V., Petruseva I., Lavrik I., Lavrik O. Uncovering molecular mechanisms of regulated cell death in the naked mole rat. *Ageing (Albany NY).* 2021;13(3):3239-3253. DOI 10.18632/aging.202577
- Gorbunova V., Seluanov A., Zhang Z., Gladyshev V.N., Vijg J. Comparative genetics of longevity and cancer: insights from long-lived rodents. *Nat. Rev. Genet.* 2014;15(8):531-540. DOI 10.1038/nrg3728
- Grube K., Bürkle A. Poly(ADP-ribose) polymerase activity in mononuclear leukocytes of 13 mammalian species correlates with species-specific life span. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992;89(24):11759-11763. DOI 10.1073/pnas.89.24.11759
- Leung A.K.L. Poly(ADP-ribose): a dynamic trigger for biomolecular condensate formation. *Trends Cell Biol.* 2020;30(5):370-383. DOI 10.1016/j.tcb.2020.02.002
- López-Otín C., Pietrocola F., Roiz-Valle D., Galluzzi L., Kroemer G. Meta-hallmarks of aging and cancer. *Cell Metab.* 2023;35(1):12-35. DOI 10.1016/j.cmet.2022.11.001.5
- MacRae S.L., Croken M.M., Calder R.B., Aliper A., Milholland B., White R.R., Zhavoronkov A., Gladyshev V.N., Seluanov A., Gorbunova V., Zhang Z.D., Vijg J. DNA repair in species with extreme lifespan differences. *Ageing (Albany NY).* 2015;7(12):1171-1184. DOI 10.18632/aging.100866
- Rouleau-Turcotte É., Pascal J.M. ADP-ribose contributions to genome stability and PARP enzyme trapping on sites of DNA damage; paradigm shifts for a coming-of-age modification. *Biol. Chem.* 2023;299(12):105397. DOI 10.1016/j.jbc.2023.105397
- Salmon A.B., Sadighi Akha A.A., Buffenstein R., Miller R.A. Fibroblasts from naked mole-rats are resistant to multiple forms of cell injury, but sensitive to peroxide, ultraviolet light, and endoplasmic reticulum stress. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2008;63(3):232-241. DOI 10.1093/gerona/63.3.232
- Schumacher B., Pothof J., Vijg J., Hoeijmakers J.H.J. The central role of DNA damage in the ageing process. *Nature.* 2021;592(7856):695-703. DOI 10.1038/s41586-021-03307-7
- Singatulina A.S., Hamon L., Sukhanova M.V., Desforges B., Joshi V., Bouhss A., Lavrik O.I., Pastré D. PARP-1 activation directs FUS to DNA damage sites to form PARG-reversible compartments enriched in damaged DNA. *Cell Rep.* 2019;27(6):1809-1821.e5. DOI 10.1016/j.celrep.2019.04.031
- Sinha S., Molla S., Kundu C.N. PARP1-modulated chromatin remodeling is a new target for cancer treatment. *Med. Oncol.* 2021;38(10):118. DOI 10.1007/s12032-021-01570-2
- Sukhanova M.V., Khodyreva S.N., Lavrik O.I. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 inhibits strand-displacement synthesis of DNA catalyzed by DNA polymerase beta. *Biochemistry (Moscow).* 2004;69(5):558-568. DOI 10.1023/b:biry.0000029855.68502.fa

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 23.04.2024. После доработки 25.07.2024. Принята к публикации 25.07.2024.