

Роль WGR-домена в цинк-зависимых эффектах поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 2 на структуру нуклеосом

Научный руководитель – Феофанов Алексей Валерьевич

Саулина Александра Александровна

Аспирант

Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра биоинженерии, Москва, Россия

E-mail: lys-alex-bio-msu@yandex.ru

Поли(АДФ-рибоза)-полимераза 2 (PARP2) – ядерный фермент, являющийся сенсором одноцепочечных разрывов ДНК. Связываясь с повреждением, PARP2 осуществляет поли(АДФ-рибозилирование): синтезирует полимерные цепи из АДФ-рибозы, которые привлекают белки-факторы репарации к месту повреждения ДНК. В настоящее время функции PARP2 активно изучаются, а ингибиторы PARP2 даже используются в таргетной терапии онкологических заболеваний. В PARP2 за связывание с ДНК ответственен домен WGR. WGR-домен также является главным звеном при запуске поли(АДФ)рибозилирования. Также WGR-домен PARP2 содержит сайты для автополи(АДФ-рибозилирования).

Ранее было показано, что PARP2 приобретает способность менять структуру нуклеосом в присутствии ионов Zn^{2+} , делая менее плотной посадку нуклеосомной ДНК на октамере гистонов [1]. Для этого PARP2 исследовали методом spFRET-микроскопии с использованием флуоресцентно меченых нуклеосом. Учитывая, что WGR является важным доменом для ДНК-связывающей и ферментативной активности PARP2, было выдвинуто предположение, что WGR-домен также может отвечать в PARP2 за изменение структуры нуклеосом. Для исследования роли WGR-домена в ремоделирующей хроматин активности PARP2 был получен рекомбинантный WGR-домен человеческого PARP2 (hPARP2). Метод получения WGR-домена PARP2 был основан на протоколе получения полноразмерного PARP2 [2]. Ген WGR hPARP2 получили методом ПЦР с использованием гена hPARP2. Ген WGR hPARP2 заклонировали в плазмиду *E. coli* pET-15b-TEV с использованием эндонуклеаз рестрикции BamHI и NdeI. Плазмиды *E. coli* pET-15b-TEV-WGR трансформировали в электрокомпетентные клетки *E. coli* Rosetta 2(DE3)pLysS. Белок индуцировали добавлением ИПТГ, после чего очищали в несколько стадий: 1) металл-аффинная хроматография с использованием колонки Ni^{2+} -сефароза; 2) отрезание гексистидинового тега с WGR PARP2 с использованием TEV-протеазы; 3) аффинная хроматография с использованием гепариновой колонки; 4) финальная очистка WGR PARP2 методом гель-фильтрации с использованием колонки с сефакрилом. Эффекты полученного рекомбинантного WGR-домена PARP2 на структуру нуклеосом были также исследованы методом spFRET-микроскопии с использованием флуоресцентно меченых нуклеосом. Результаты показали, что WGR-домен PARP2 обладает аналогичным эффектом на структуру нуклеосом, как у полноразмерного PARP2. Также было показано, что эффект WGR PARP2 на структуру нуклеосом также является Zn^{2+} -зависимым. Таким образом, WGR-домен PARP2 является ключевым доменом PARP2, отвечающим за Zn^{2+} -зависимое изменение структуры нуклеосом.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РНФ (проект № 19-74-30003).

Источники и литература

- 1) Langelier M.-F., Steffen J. D., Riccio A. A., McCauley M., Pascal J. M. Purification of DNA Damage-Dependent PARPs from E.coli for Structural and Biochemical Analysis // Methods in Molecular Biology. 2017; 1608, p. 431-444.
- 2) Maluchenko N., Saulina A., Geraskina O., Kotova E., Korovina A., Feofanov A., Studitsky V. Zinc-dependent Nucleosome Reorganization by PARP2 [Preprint]