



УДК 615.277.3

Гель-электрофорез как метод классификации ингибиторов поли(АДФ-рибоза)-полимераз 1 и 2

А.А. Лобанова^{1, *}, А.Н. Коровина¹, Д.О. Кошкина¹, П.А. Черникова¹, А.В. Феофанов¹ ,
В.М. Студитский^{1, 2} , Д.К. Нилов³ , Н.В. Малюченко¹ 

¹Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

²Центр исследований рака Фокс Чейз, США, штат Филадельфия, 19111-2497, г. Филадельфия, Коттман Авеню, д. 333;

³Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119992, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40
*e-mail: angelina.lobanova@student.msu.ru

Поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 и 2 (PARP1 и PARP2) играют важную роль в репарации повреждений ДНК в клетке, а их ингибирование применяется для лечения некоторых онкологических заболеваний. Ведутся активные разработки новых ингибиторов PARP и изучение механизмов их действия. В настоящей работе на примере ингибиторов талазопариба, олапариба и велипариба показано, что электрофорез в полиакриламидном геле комплексов ДНК с PARP1 и PARP2 в присутствии ингибиторов позволяет выявить их влияние на сродство ферментов к ДНК, а после добавления субстрата НАД⁺ — оценить эффективность ингибирования каталитической активности ферментов. Учет данных механизмов действия важен для поиска новых ингибиторов PARP1 и PARP2.

Ключевые слова: PARP, ингибиторы, электрофорез, талазопариб, олапариб, велипариб

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-79-4-10

Введение

Ядерные белки поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 и 2 (poly(ADP-ribose) polymerases 1 and 2, PARP1 и PARP2) являются важными компонентами систем репарации ДНК [1–4]. Эти ферменты, связываясь с разрывами ДНК, активируются и начинают синтезировать полимеры АДФ-рибозы (poly(ADP-ribose), PAR) путем модификации собственной молекулы и/или соседних белков, используя в качестве донора АДФ-рибозильных групп НАД⁺ [1, 5]. За счет большого отрицательного заряда PAR деконденсируют хроматин в местах повреждений и привлекают факторы репарации ДНК, создавая условия для устранения повреждений ДНК [6–8]. Геном опухолевых клеток нестабилен, он нуждается в активной системе репарации для поддержания целостности ДНК [9]. При развитии онкологических заболеваний высокая активность белков PARP дает опухолевым клеткам преимущество в выживании и повышает устойчивость к проводимой терапии [10]. Несколько синтетических ингибиторов PARP были одобрены для лечения онкологических заболеваний [11]. Они представляют собой низкомолекулярные соединения,

ингибирующие каталитическую активность PARP1 и/или PARP2 за счет конкуренции с субстратом НАД⁺ за связывание в активном центре [12–16]. Известно, что применяемые в клинике ингибиторы способны влиять как на каталитическую активность PARP1 и PARP2, так и на их способность связываться с ДНК [17]. На связывание PARP с ДНК ингибиторы действуют по-разному в зависимости от их структуры и характера связывания в каталитическом домене белка. Соответственно, ингибиторы подразделяются на три типа: усиливающие сродство PARP к ДНК (I тип), не оказывающие влияния на ДНК-связывающую активность белка (II тип) и уменьшающие сродство PARP к ДНК (III тип) [13]. Например, установлено, что применяемые в клинике талазопариб и олапариб в отношении PARP1 являются ингибиторами II типа, а в отношении PARP2 — I типа, в то время как велипариб действует на оба фермента как ингибитор III типа [14].

Ингибиторы, которые действуют по I или II типу (такие, как олапариб), способны избирательно и эффективно блокировать PARP [18], но их применение часто осложняется повышенной ток-

сичностью и развитием резистентности [19–21]. Ингибиторы III типа характеризуются более щадящим воздействием на организм. С учетом данных о том, что ингибирование PARP2 является гематотоксичным [22], ведется поиск селективных ингибиторов PARP1.

Таким образом, при разработке новых ингибиторов, направленных на PARP1, требуется классификация тестируемых соединений по механизмам действия, которую в настоящее время проводят главным образом с применением методов поляризации флуоресценции и поверхностного плазмонного резонанса [13, 14]. Ранее при изучении взаимодействий нуклеосом с PARP1 и его ингибиторами нами было показано, что дополнительными перспективными методами определения типа ингибиторов этого фермента являются микроскопия одиночных частиц на основе Ферстеровского резонансного переноса энергии и электрофорез в полиакриламидном геле в нативных условиях [23].

В настоящей работе мы сообщаем, что для классификации ингибиторов белков PARP может быть использован простой и надежный метод гель-электрофореза [23–26] с использованием ДНК с тупыми концами в качестве активатора фермента, причем метод применим также для классификации ингибиторов PARP2.

Материалы и методы

ДНК. Двухцепочечную ДНК длиной 187 п.н. получали методом полимеразной цепной реакции с использованием плазмиды pTZ57R и олигонуклеотидов (с включенной в состав обратного праймера флуоресцентной меткой Cy5):

Прямой праймер: 5'-AAGCGACACCGGCAC TGGGCCCGGTTCTCGCGCTCCCGCCT TCCGTGTGTTGTCTCTCGGGCGT-3';

Обратный праймер: 5'-AACCATGATGGGCA CTGGGTACCCAGGGACTTGAAG TAATAAG GACGGAGGGCCTCTTTCAACATCGATGCACG G[Cy5-dT]GGTTAG-3' (Lumiprobe, Россия).

Экспрессия и очистка белков PARP1 и PARP2. Рекombинантный белок PARP1 получали, как описано ранее [27]. Рекombинантный белок PARP2, используя методику [28], экспрессировали в бактериальной системе в клетках *Escherichia coli* штамма Rosetta 2 (DE3) pLysS, используя плазмиду pET-28-PARP2, несущую ген PARP2 человека и гексагистидиновый тэг на N-конце. Клетки растили в среде Лурии-Бертани с 10 мМ бензамида и 50 мкг/мл канамицина 4–6 ч до достижения оптической плотности при 600 нм 0,5–0,8 опт.ед./см, выдерживали на льду 1 ч, индуцировали экспрессию PARP2 добавкой изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (0,2 мМ) и ZnCl₂ (100 мкМ), а затем инкубировали 18 ч при 16°C. Клетки осаждали центрифугированием (3200 g, 30 мин при 4°C), а осадок ресуспендировали при 4°C в буфере, содержащем 25 мМ HEPES (pH 8,0), 500 мМ NaCl, 0,5 мМ трис(2-кар-

боксиил)фосфина (tris(2-carboxyethyl)phosphine, TCEP) и 10 мМ бензамида. Клетки лизировали френч-прессом в присутствии 1 мМ фенилметилсульфонил фторида (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF), 1 мМ бензамидина и смеси ингибиторов протеаз А (0,5 мкг/мл лейпептина, 0,7 мкг/мл пепстатина А, 0,5 мкг/мл антипаина, смесь ингибиторов протеаз P2714; Sigma, США). Лизат центрифугировали 1 ч при 18000 g, а собранный супернатант фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

PARP2 предварительно очищали методом металл-аффинной хроматографии на хроматографе АКТА Purifier (Cytiva, США) с колонкой HiTrap Chelating HP (Cytiva, США), содержащей Ni²⁺-сефарозу (GE Healthcare, США). Образец наносили на колонку (2 мл/мин) и промывали буфером А (25 мМ HEPES (pH 8,0), 0,5 мМ TCEP, 0,1% NP40, 1 мМ бензамидина, 1 мМ PMSF, смесь ингибиторов протеаз А) с 20 мМ имидазола, содержащим 0,5 М, затем 1М и затем 0,5 М NaCl. PARP2 элюировали буфером А с 0,5 М NaCl и 250 мМ имидазола. Элюат разбавляли буфером Б (50 мМ Tris-HCl (pH 7,0), 1 мМ EDTA, 1 мМ PMSF, 1 мМ бензамидин, 0,1 мМ TCEP), понижая концентрацию NaCl до 0,2 М, и подвергали очистке методом аффинной хроматографии на колонке с гепарином HiTrap Heparin HP (GE Healthcare, США). После промывки буфером Б с 0,2 М NaCl PARP2 элюировали с колонки градиентом NaCl (от 0,2 до 1 М в течение 100 мин) в буфере Б. Собранные фракции, содержавшие целевой белок по данным денатурирующего гель-электрофореза, объединяли и концентрировали с помощью концентратора Amicon Ultra (Merck, Германия) с фильтром на 50 кДа, центрифугируя раствор 6500 g, при 4°C. Для удаления твердых частиц раствор центрифугировали при 10000 g.

Окончательно PARP2 очищали методом гель-фильтрации на колонке HiPrep 16/60 Sephacryls-200 HR (Cytiva, США), элюируя его буфером (25 мМ HEPES pH 8,0, 150 мМ NaCl, 1 мМ EDTA, 0,1 мМ TCEP) со скоростью 0,3 мл/мин. Фракции, содержавшие белок по данным денатурирующего гель-электрофореза, объединяли и концентрировали центрифугированием при 13800 g. Белок разбавляли в два раза буфером (40 мМ HEPES (pH 8,0), 300 мМ NaCl, 0,2 мМ TCEP, 80% глицерина, 0,3 мМ ZnCl₂), замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C.

Ингибиторы. Талазопариб, олапариб и велипариб (Selleck, США) растворяли в ДМСО в концентрации 10 мМ и хранили при температуре -20°C.

Подготовка образцов для электрофореза. Все исследования проводили в буфере, содержащем 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 40 мМ NaCl, 0,3 мМ ZnCl₂ и 1 мМ β-меркаптоэтанол (ранее была показана важность использования ионов Zn²⁺ для исследования PARP2 [29]).

ДНК (10 нМ) инкубировали с PARP1 (25 нМ) или PARP2 (50 нМ) в течение 20 мин при 25°C. Для запуска реакции поли(АДФ-рибозил)ирования в пробу добавляли 100 мкМ НАД⁺ (Merck, Германия) и инкубировали смесь в течение 45 мин при 25°C.

В экспериментах с ингибиторами PARP1 или PARP2 образцы преинкубировали с олапарибом (1, 10 или 20 мкМ), велипарибом (1, 5 или 15 мкМ) или талазопарибом (0,5 или 1 мкМ) в течение 15 мин при 25°C и затем инкубировали с ДНК и НАД⁺, как описано выше. Содержание ДМСО в реакционной смеси не превышало 0,2%.

Электрофорез в нативных условиях. Для электрофореза в нативных условиях готовили 4%-ный полиакриламидный гель в 0,2×буфере TBE (3,6 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 3,6 мМ H₃BO₃, 0,08 мМ ЭДТА). Предварительный электрофорез (без проб) проводили при напряжении 140 В и температуре 4°C, пока сила тока не снижалась до 5–8 мА. Затем в лунки вносили пробы с предварительно добавленной сахарозой (5% конечная концентрация) и проводили электрофорез при 120 В (4°C) в течение 60 мин. Гели сканировали лазерным флуоресцентным сканером Amersham Typhoon RGB (GE Healthcare, США), возбуждая и регистрируя флуоресценцию красителя Су5 в составе ДНК.

Результаты и обсуждение

Анализ взаимодействий PARP1 и PARP2 с ДНК методом гель-электрофореза. Образование комплексов ДНК с PARP1 и PARP2 оценивали по изменению электрофоретической подвижности ДНК в полиакриламидном геле в нативных условиях, детектируя флуоресценцию Су5-меченной ДНК (свободной и в комплексе с белком).

Измерение электрофоретической подвижности ДНК в присутствии белков PARP показало, что PARP1 и PARP2 концентрационно-зависимым образом взаимодействуют с ДНК. При концентрации PARP1 25 нМ (рис. 1А, дорожка 2) в геле наблюдается появление трех полос, соответствующих

связующих комплексам ДНК–PARP1. Как было показано ранее [30], данные полосы соответствуют комплексам с различным числом молекул PARP1, в которых на молекулу ДНК приходится от одной до трех молекул PARP1. При концентрации PARP1 40 нМ разделение смеси на комплексы с фиксированной стехиометрией ухудшается, по-видимому, из-за связывания дополнительных молекул PARP1 и взаимодействия комплексов между собой (рис. 1А, дорожка 3). При концентрации ≥60 нМ большая часть комплексов переходит в самоассоциаты с низкой подвижностью в геле (рис. 1А, дорожка 4). Образование самоассоциатов может быть связано с установленной способностью комплексов PARP1 с ДНК формировать конденсаты за счет взаимодействия молекул PARP1, связавшихся на концах разных молекул ДНК [31]. Концентрационно-зависимое образование комплексов естественно сопровождается уменьшением интенсивности полосы свободной ДНК в геле. Для дальнейших экспериментов с ингибиторами была выбрана концентрация PARP1 25 нМ, при которой на электрофореграмме видны узкие четко изолированные полосы комплексов.

Аналогично был проведен подбор условий комплексообразования для белка PARP2. При концентрации PARP2 25–40 нМ происходит формирование одного-двух типов комплексов с ДНК, отличающихся по подвижности в геле (рис. 1Б, дорожки 2, 3). При концентрации PARP2 50 нМ образуется три типа комплекса (рис. 1Б, дорожка 4), а при 75 нМ наблюдается образование 5–6 типов комплексов, детектируемых как набор дискретных полос в геле (рис. 1Б, дорожка 5). Похожие результаты были получены ранее [24]. Размер PARP2 существенно меньше, чем PARP1, что позволяет большему количеству молекул белка связаться с одной молекулой ДНК. Кроме того, известно, что PARP2 при концентрациях около 100 нМ в присутствии ДНК способен образовывать гомодимеры [32]. Для дальнейших экспериментов был выбран диапазон концентрации PARP2 25–50 нМ.

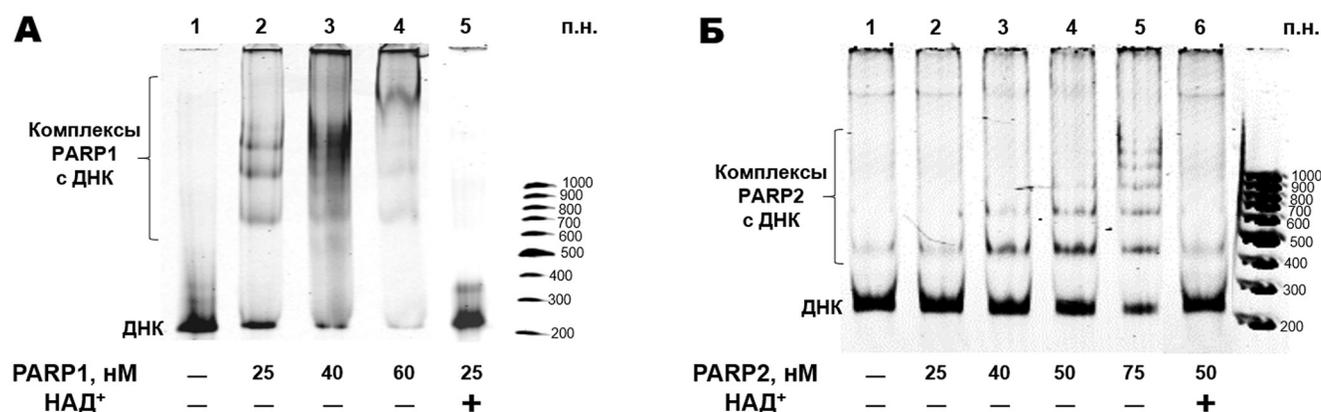


Рис. 1. Исследование взаимодействия белков PARP1 и PARP2 с ДНК длиной 187 п.н. методом гель-электрофореза. А – электрофорез в полиакриламидном геле ДНК (20 нМ), проинкубированной с PARP1 (25, 40 или 60 нМ) и НАД⁺ (100 мкМ), Б – электрофорез в полиакриламидном геле ДНК (20 нМ), проинкубированной с PARP2 (25, 40, 50 или 75 нМ) и НАД⁺ (100 мкМ).

Добавление НАД⁺ к комплексам ДНК–PARP запускает реакцию, сопровождающуюся автополи(АДФ-рибозил)ированием самих ферментов. Образование отрицательно заряженных цепей PAR на поверхности PARP1 и PARP2 приводит к уменьшению сродства белков к ДНК и их диссоциации, что регистрируется в геле как исчезновение полос комплексов и восстановление полосы свободной ДНК – рис. 1А (дорожка 5), рис. 1Б (дорожка 6).

Очевидно, что влияние ингибиторов на сродство PARP1 и PARP2 к ДНК должно приводить к изменению интенсивностей полос свободной ДНК и комплексов ДНК с ферментами в геле в отсутствие НАД⁺, а подавление реакции поли(АДФ-рибозил)ирования ингибиторами должно влиять на степень высвобождения свободной ДНК из комплексов в присутствии НАД⁺.

Классификация ингибиторов PARP методом гель-электрофореза. Исследованы три ингибитора PARP: олапариб, талазопариб и велипариб, которые отличаются по влиянию на сродство PARP1 с хроматином в клетке [1, 13, 33]. Диапазон концентраций ингибиторов выбирали, исходя из ранее полученных нами данных [23].

Анализ данных гель-электрофореза показывает, что талазопариб в концентрации 0,5 и 1 мкМ не влияет на связывание PARP1 с ДНК (рис. 2Г, дорожки 3, 4), но блокирует НАД⁺-опосредованную диссоциацию комплексов ДНК–PARP1 (рис. 2Г, дорожки 6, 7), что указывает на эффективное подавление каталитической активности фермента талазопарибом в этих концентрациях. Согласно этим данным, талазопариб является ингибитором PARP1 II типа.

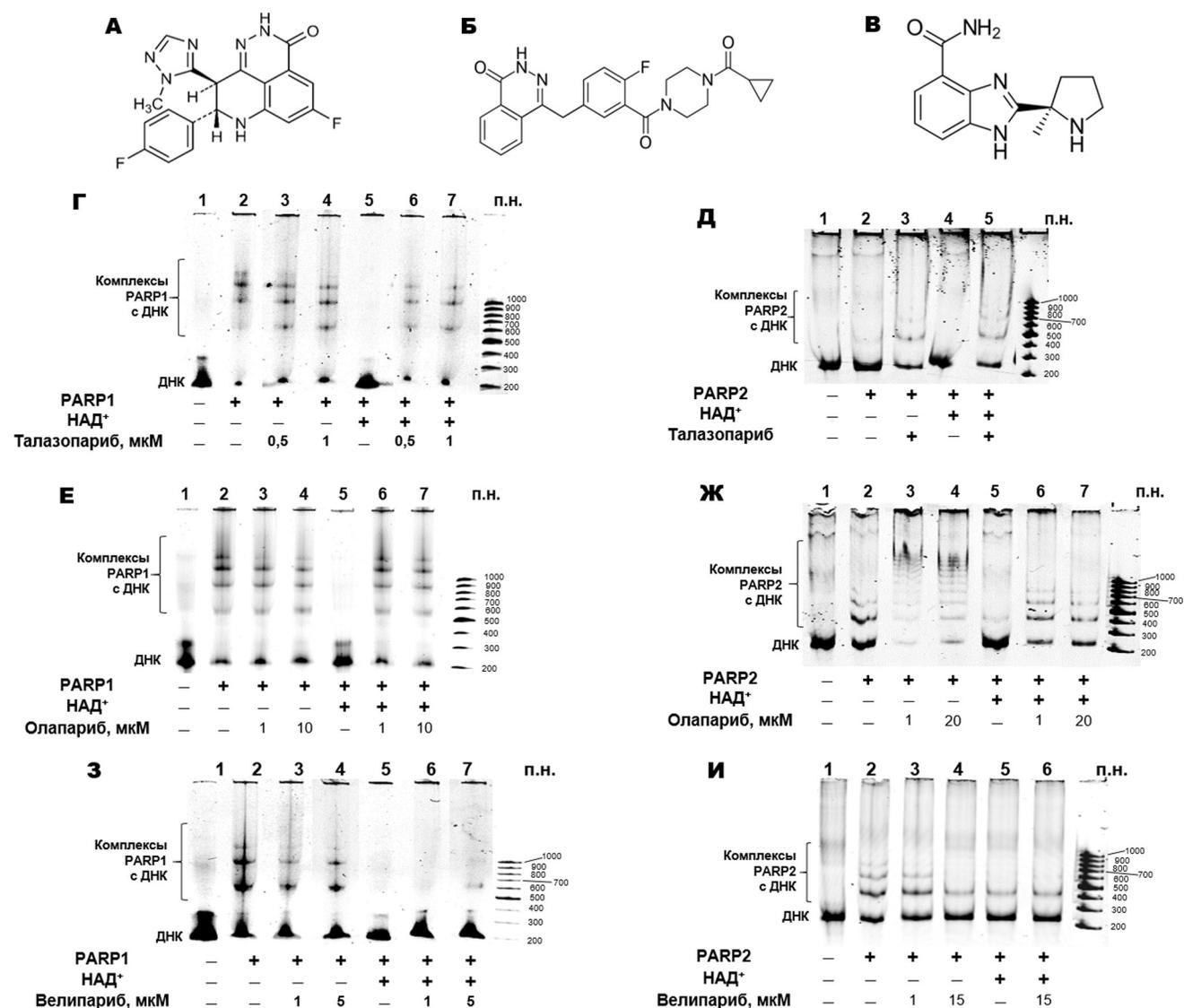


Рис. 2. Влияние ингибиторов на связывание PARP1 и PARP2 с ДНК до и после инкубации с НАД⁺. А, Б, В – Структурные формулы талазопариба, олапариба и велипариба. Г, Е, 3 – Анализ электрофоретической подвижности ДНК (20 нМ) и ее комплексов с PARP1 (25 нМ) в присутствии НАД⁺ (100 мкМ) и ингибиторов: талазопариба (0,5 и 1 мкМ); олапариба (1 и 10 мкМ) и велипариба (1 и 5 мкМ). Д, Ж, И – Анализ электрофоретической подвижности ДНК (20 нМ) и ее комплексов с PARP2 (25 нМ, 50 нМ и 50 нМ; Д, Ж и И) в присутствии НАД⁺ (100 мкМ) и ингибиторов: талазопариба (1 мкМ); олапариба (1 и 20 мкМ) и велипариба (1 и 15 мкМ).

Талазопариб в концентрации 1 мкМ заметно усиливает образование комплексов PARP2 с ДНК (рис. 2Д, дорожка 3). При добавлении НАД^+ в присутствии талазопариба комплексы PARP2 с ДНК сохраняются, что свидетельствует о подавлении каталитической активности фермента и позволяет классифицировать талазопариб как ингибитор PARP2 I типа.

По данным гель-электрофореза олапариб в концентрации 1 и 10 мкМ ингибирует каталитическую активность PARP1 (рис. 2Е, дорожки 6, 7), не влияя на образование комплексов ДНК с PARP1 (рис. 2Е, дорожки 3, 4). Это указывает на то, что олапариб является ингибитором PARP1 II типа.

В случае PARP2 олапариб при концентрации 1 и 20 мкМ усиливает образование комплексов фермента с ДНК, на что указывает уменьшение интенсивности полосы свободной ДНК и появление дополнительной полосы комплексов с низкой подвижностью в геле (рис. 2Ж, дорожки 3, 4). После добавления НАД^+ к комплексам ДНК–PARP2 в присутствии олапариба полоса комплексов с низкой подвижностью в геле исчезает, а интенсивность полосы свободной ДНК усиливается, свидетельствуя о диссоциации части комплексов вследствие авто-поли(АДФ-рибозил)ирования PARP2. Это согласуется с данными о том, что олапариб является более слабым ингибитором

PARP2, чем талазопариб [15, 20, 21, 34]. Таким образом, по данным гель-электрофореза олапариб относится к ингибиторам PARP2 I типа.

Велипариб при концентрациях 1 и 5 мкМ не оказывает заметного влияния на ДНК-связывающую активность PARP1 (рис. 23, дорожки 3 и 4). В концентрации 1 мкМ велипариб не препятствует высвобождению ДНК из комплексов с ферментом в результате НАД^+ -зависимой реакции автополи(АДФ-рибозил)ирования PARP1 (рис. 23, дорожка 6), но в концентрации 5 мкМ он немного затрудняет этот процесс (рис. 23, дорожка 7), что согласуется с ранее полученными данными о том, что велипариб является более слабым ингибитором PARP1, чем талазопариб [33, 35]. Таким образом, велипариб может быть отнесен к ингибиторам PARP1 II типа.

Велипариб в концентрации 1 мкМ не оказывает значительного влияния на связывание PARP2 с ДНК, однако в концентрации 15 мкМ он заметно снижает образование комплексов ДНК–PARP2 (рис. 2И, дорожки 3, 4). Добавление НАД^+ к комплексам ДНК–PARP2 в присутствии 15 мкМ велипариба не приводит к полному высвобождению ДНК из комплексов с ферментом (рис. 2И, дорожка 6). С учетом данных гель-электрофореза велипариб следует классифицировать как ингибитор PARP2 III типа.

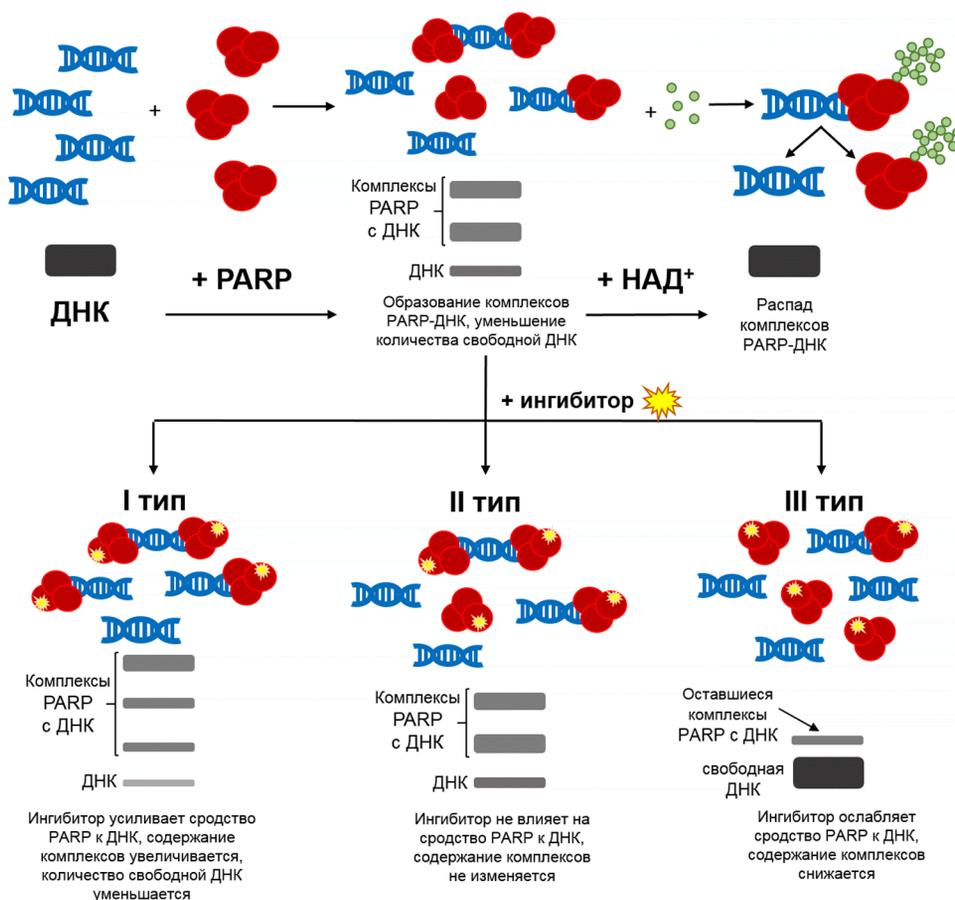


Рис. 3. Классификация ингибиторов PARP1/2 с использованием метода гель-электрофоретического анализа комплексов белок–ДНК.

Результаты исследований с применением метода гель-электрофореза талазопариба и олапариба согласуются с результатами, полученными методами поляризации флуоресценции и поверхностного плазмонного резонанса [13, 14]: для PARP1 данные соединения являются ингибиторами II типа, а для PARP2 – ингибиторами I типа.

Полученные нами данные методом гель-электрофореза подтверждают выводы другого исследования, в котором велипариб был отнесен к ингибиторам PARP2 III типа [14]. В тоже время исследования методом гель-электрофореза не позволяют отнести велипариб к ингибиторам PARP1 III типа, т.к. влияния велипариба на ДНК-связывающую активность PARP1 не было обнаружено. Таким образом, в настоящей работе было продемонстрировано, что для классификации ингибиторов PARP1 и PARP2 может быть использован метод гель-электрофореза, в котором в качестве субстрата и активатора фермента выступает двухцепочечный олигонуклеотид (рис. 3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Langelier M.F., Eisemann T., Riccio A.A., Pascal J.M. PARP family enzymes: regulation and catalysis of the poly(ADP-ribose) posttranslational modification. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2018;53:187–198.
- Szanto M., Yelamos J., Bai P. Specific and shared biological functions of PARP2 – is PARP2 really a lil' brother of PARP1? *Expert. Rev. Mol. Med.* 2024;3(26)e13.
- Kutuzov M.M., Belousova E.A., Ilina E.S., Lavrik O.I. Impact of PARP1, PARP2 & PARP3 on the base excision repair of nucleosomal DNA. *Mechanisms of genome protection and repair. Advances in experimental medicine and biology, vol 1241.* Ed. D. Zharkov. Cham Springer, 2020:47–57.
- Alemasova E.E., Lavrik O.I. Poly(ADP-ribose)ylation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins. *Nucleic Acids Res.* 2019;47(8):3811–3827.
- Cohen M.S., Chang P. Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation. *Nat. Chem. Biol.* 2018;14(3):236–243.
- Maluchenko N.V., Koshkina D.O., Feofanov A.V., Studitsky V.M., Kirpichnikov M.P. Poly(ADP-ribose) code functions. *Acta Naturae.* 2021;13(2):58–69.
- Pan L., Penney J., Tsai L.H. Chromatin regulation of DNA damage repair and genome integrity in the central nervous system. *J. Mol. Biol.* 2014;426(20):3376–3388.
- Ko H.L., Ren E.C. Functional aspects of PARP1 in DNA repair and transcription. *Biomolecules.* 2012;2(4):524–548.
- Das B., Choudhury B., Kumar A., Jyoti Baruah V. Genomic instability and DNA repair in cancer. *DNA: Damages and repair mechanisms.* Ed. P. Behzadi. IntechOpen; 2021:189–202.
- Pazzaglia S., Pioli C. Multifaceted role of PARP-1 in DNA repair and inflammation: Pathological and therapeutic implications in cancer and non-cancer diseases. *Cells.* 2019;9(1):41.
- Frederick M.I., Abdesselam D., Clouvel A., Croteau L., Hassan S. Leveraging PARP-1/2 to target distant metastasis. *Int. J. Mol. Sci.* 2024;25(16):9032.

Заключение

Метод гель-электрофореза в нативных условиях расширяет ограниченный набор методов, которые применимы для исследования механизмов действия ингибиторов ферментов PARP1 и PARP2, позволяя определить влияние ингибиторов на сродство ферментов с ДНК и на их каталитическую активность.

Работа поддержана в рамках Междисциплинарных научно-образовательных школ Московского государственного университета (проект № 23-Ш04-57; исследование ингибиторов методом гель-электрофореза), а также Российским научным фондом (проект № 19-74-30003; экспрессия и очистка белков PARP1 и PARP2).

Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

- Spiegel J.O., Van Houten B., Durrant J.D. PARP1: structural insights and pharmacological targets for inhibition. *DNA Repair (Amst.)*. 2021;103:103125.
- Zandarashvili L., Langelier M.F., Velagapudi U.K., Hancock M.A., Steffen J.D., Billur R., Hannan Z.M., Wicks A.J., Krastev D.B., Pettitt S.J., Lord C.J., Talele T.T., Pascal J.M., Black B.E. Structural basis for allosteric PARP-1 retention on DNA breaks. *Science.* 2020;368(6486):eaax6367.
- Langelier M.F., Lin X., Zha S., Pascal J.M.. Clinical PARP inhibitors allosterically induce PARP2 retention on DNA. *Sci. Adv.* 2023;9(12):eadf7175.8.
- Rudolph J., Jung K., Luger K. Inhibitors of PARP: number crunching and structure gazing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2022;119(11):e2121979119.
- Malyuchenko N.V., Kotova E.Y., Kulaeva O.I., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M. PARP1 Inhibitors: antitumor drug design. *Acta Naturae.* 2015;7(3):27–37.
- Velagapudi U.K., Langelier M.F., Delgado-Martin C., Diolaiti M.E., Bakker S., Ashworth A., Patel B.A., Shao X., Pascal J.M., Talele T.T. Design and synthesis of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors: impact of adenosine pocket-binding motif appendage to the 3-oxo-2,3-dihydrobenzofuran-7-carboxamide on potency and selectivity. *J. Med. Chem.* 2019;62(11):5330–5357.
- Kaufman B., Shapira-Frommer R., Schmutzler R.K., Audeh M.W., Friedlander M., Balmaña J., Mitchell G., Fried G., Stemmer S.M., Hubert A., Rosengarten O., Steiner M., Loman N., Bowen K., Fielding A., Domchek S.M. Olaparib monotherapy in patients with advanced cancer and a germline BRCA1/2 mutation. *J. Clin. Oncol.* 2015;33(3):244–250.
- Harvey-Jones E., Raghunandan M., Robbez-Masson L., et al. Longitudinal profiling identifies co-occurring BRCA1/2 reversions, TP53BP1, RIF1 and PAXIP1 mutations in PARP inhibitor-resistant advanced breast cancer. *Ann. Oncol.* 2024;35(4):364–380.

20. Murthy P., Muggia F. PARP inhibitors: clinical development, emerging differences, and the current therapeutic issues. *Cancer Drug Resist.* 2019;2(3):665–679.
21. Bruin M.A.C., Sonke G.S., Beijnen J.H., Huite-ma A.D.R. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of PARP inhibitors in oncology. *Clin. Pharmacokinet.* 2022;61(12):1649–1675.
22. Loehr A., Hussain A., Patnaik A., Bryce A.H., et al. Emergence of BRCA reversion mutations in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer after treatment with rucaparib. *Eur. Urol.* 2023;83(3):200–209.
23. Maluchenko N., Koshkina D., Korovina A., Studitsky V., Feofanov A. Interactions of PARP1 inhibitors with PARP1-nucleosome complexes. *Cells.* 2022;11(21):3343.
24. Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Ame J.C., Iina E.S., Sukhanova M.V., Schreiber V., Lavrik O.I. Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins. *Biochimie.* 2013;95(6):1208–1215.
25. Deeksha W., Abhishek S., Giri J., Rajakumara E. Regulation of PARP1 and its apoptotic variant activity by single-stranded DNA. *FEBS J.* 2023; 290(18):4533–4542.
26. Laspata N., Kaur P., Mersaoui S.Y., Muoio D., Liu Z.S., Bannister M.H., Nguyen H.D., Curry C., Pascal J.M., Poirier G.G., Wang H., Masson J.Y., Fouquel E. PARP1 associates with R-loops to promote their resolution and genome stability. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(5):2215–2237.
27. Andreeva T.V., Maluchenko N.V., Efremenko A.V., Lyubitelev A.V., Korovina A.N., Afonin D.A., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. Epigallocatechin gallate affects the structure of chromatosomes, nucleosomes and their complexes with PARP1. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(18):14187.
28. 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. *Poly(ADP-Ribose) Polymerase. Methods in Molecular Biology, vol 1608.* Ed. A. Tulin. N.Y.: Humana Press, 2017: 431–444.
29. Maluchenko N., Saulina A., Geraskina O., Kotova E., Korovina A., Feofanov A., Studitsky V. Zinc-dependent nucleosome reorganization by PARP2. *bioRxiv.* 2023.
30. Maluchenko N.V., Nilov D.K., Pushkarev S.V., Kotova E.Y., Gerasimova N.S., Kirpichnikov M.P., Langelier M.F., Pascal J.M., Akhtar M.S., Feofanov A.V., Studitsky V.M. Mechanisms of nucleosome reorganization by PARP1. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(22):12127.
31. Chappidi N., Quail T., Doll S., Vogel L.T., Aleksandrov R., Felekyan S., Kuhnemuth R., Stoynov S., Seidel C.A.M., Bruges J., Jahnel M., Franzmann T.M., Alberti S. PARP1-DNA co-condensation drives DNA repair site assembly to prevent disjunction of broken DNA ends. *Cell.* 2024;187(4):945-961.e18.
32. Vasil'eva I., Moor N., Anarbaev R., Kutuzov M., Lavrik O. Functional roles of PARP2 in assembling protein-protein complexes involved in base excision DNA repair. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(9):4679.
33. Murai J., Huang S.Y., Das B.B., Renaud A., Zhang Y., Doroshow J.H., Ji J., Takeda S., Pommier Y. Trapping of PARP1 and PARP2 by clinical PARP inhibitors. *Cancer Res.* 2012;72(21):5588–5599.
34. Murai J. Targeting DNA repair and replication stress in the treatment of ovarian cancer. *Int. J. Clin. Oncol.* 2017;22:619–628.
35. Murai J., Huang S.Y., Renaud A., Zhang Y., Ji J., Takeda S., Morris J., Teicher B., Doroshow J.H., Pommier Y. Stereospecific PARP trapping by BMN 673 and comparison with olaparib and rucaparib. *Mol. Cancer Ther.* 2014;13(2):433–443.

Поступила в редакцию 31.08.2024

После доработки 28.10.2024

Принята в печать 29.10.2024

RESEARCH ARTICLE

Gel electrophoretic analysis of protein-DNA complexes to classify inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerases 1 and 2

A.A. Lobanova^{1,*}, A.N. Korovina¹, D.O. Koshkina¹, P.A. Chernikova¹, A.V. Feofanov¹ , V.M. Studitsky^{1,2} , D.K. Nilov³ , N.V. Maluchenko¹ 

¹Department of Bioengineering, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Lenin Hills 1, bldg. 12, Moscow, 119234, Russia;

²Fox Chase Cancer Research Center, Cottman Avenue 333, Philadelphia, Philadelphia 19111-2497, USA;

³Belozersky Institute of Physicochemical Biology, Lomonosov Moscow State University, Lenin Hills 1, bldg. 40, 119992, Moscow, Russia.

*e-mail: angelina.lobanova@student.msu.ru

Poly(ADP-ribose) polymerases 1 and 2 (PARP1 and PARP2) play an important role in repairing DNA, and their inhibition is being used to treat certain oncological diseases. New inhibitors of PARP are being actively developed and the mechanisms of their action are being studied. In the present work, using the inhibitors talazoparib, olaparib and veliparib, as example, it is shown that electrophoresis of DNA complexes with PARP1 and PARP2 in polyacrylamide gel in the presence of inhibitors makes it possible to identify the effect of inhibitors on the affinity of

enzymes to DNA, and after adding the NAD⁺ substrate, to evaluate the inhibition of the catalytic activity of enzymes. When selecting new inhibitors for biomedical research, it is important to consider these mechanisms of action against PARP1 and PARP2.

Keywords: *PARP, inhibitors, electrophoresis, talazoparib, olaparib, veliparib*

Funding: The study was supported by the scientific project of Lomonosov Moscow State University research and education schools (project No. 23-Sh04-57; study of inhibitors by gel electrophoresis) and by the Russian Science Foundation (project No. 19-74-30003; expression and purification of PARP1 and PARP2 proteins).

Сведения об авторах

Лобанова Ангелина Андреевна – инженер кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ, магистр 1 года кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: angelina.lobanova@student.msu.ru

Коровина Анна Николаевна – науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: anna.korovina@gmail.com

Кошкина Дарья Олеговна – мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495 939-57-38; e-mail: koshkina.daria.2015@post.bio.msu.ru

Черникова Полина Андреевна – мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495 939-57-38; e-mail: xirom210197@gmail.com

Феофанов Алексей Валерьевич – докт. биол. наук, руководитель лаборатории оптической микроскопии и спектроскопии биомолекул ИБХ РАН, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: avfeofanov@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1596-9506>

Студитский Василий Михайлович – докт. биол. наук, гл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ и отдела эпигенетики рака ракового центра Фокс Чейз, Филадельфия, США. Тел.: 8-495-938-22-91; e-mail: vasily.studitsky@fcc.edu; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7389-7993>

Нилов Дмитрий Константинович – вед. науч. сотр. отдела биокинетики Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-53-59; e-mail: nilovdm@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5067-7939>

Малюченко Наталия Валериевна – канд. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-938-57-38, e-mail: mal_nat@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4129-4984>