

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.22

## Оценка связывания ингибиторов PARP в режиме реального времени на основе Ni-NTA-агарозных шариков

А.А. Лобанова<sup>1,\*</sup>, А.А. Саулина<sup>1</sup>, О.В. Гераськина<sup>2</sup>, Д.О. Кошкина<sup>1</sup> ,  
Н.В. Малюченко<sup>1</sup> , А.В. Феофанов<sup>1,2</sup> , В.М. Студитский<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>Биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;

<sup>2</sup>Институт биологии гена, Российской академия наук, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 34/5;

<sup>3</sup>Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA

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

В исследовании была создана платформа для флуоресцентной микроскопии, которая позволяет в режиме реального времени визуализировать динамику взаимодействия лиганда с белками, помеченными His-tag, связывающимися с  $\text{Ni}^{2+}$  на NTA-агарозных шариках. Эта методология преодолевает критические ограничения традиционных методов, таких как поверхностный плазмонный резонанс или гель-электрофорез, за счет сохранения кинетики фазы раствора и обеспечения субминутного временного разрешения в физиологических буферах. Мы применили эту платформу для исследования действия ингибиторов в системе нуклеосом, которая является более физиологически подходящей моделью, чем свободная ДНК. Изучая взаимодействия PARP2 с нуклеосомами в присутствии и в отсутствие клинических ингибиторов (талацопариба и велипариба), а также реакцию поли(АДФ-рибозил)ирования в присутствии НАД<sup>+</sup>, мы смогли продемонстрировать прямое пространственное и временное разрешение динамики хроматин-белок. Практически неограниченная совместимость платформы с буферами, возможность мониторинга в режиме реального времени и устранение артефактов ковалентной иммобилизации обеспечивают новое понимание механизмов взаимодействия лекарственных средств и хроматина.

**Ключевые слова:** Ni-NTA-агарозные шарики, PARP2, ингибиторы PARP, нуклеосомы

**DOI:** 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-11

### Введение

Современные методологии анализа биомолекулярных взаимодействий сталкиваются с фундаментальными ограничениями, которые не дают возможности полноценно и функционально исследовать хроматин-ассоциированные мишени [1]. Поверхностный плазмонный резонанс (SPR, Surface Plasmon Resonance) требует ковалентной иммобилизации белка посредством соединения аминов или стрептавидин-биотиновых связей, что приводит к появлению конформационных артефактов, которые изменяют доступность ДНК-связывающего домена и ферментативную функцию [2, 3]. Такой подход по своей сути ограничивает совместимость буфера, исключая физиологически важные компоненты. Поляризация флуоресценции, хотя и совместима с раствором, страдает от усреднения по ансамблю, которое скрывает пространственную неоднородность при

формировании комплекса [4]. Метод микроскопии, отслеживающий резонансный перенос Ферстеровской энергии от единичных молекул (spFRET, single pair Förster Resonance Energy Transfer) является одним из ключевых методов, позволяющих проводить точечные исследования межмолекулярных взаимодействий [5–7]. Однако он не обеспечивает прямую визуализацию исследуемых объектов в режиме реального времени. Электрофоретический анализ сдвига подвижности (EMSA, Electrophoretic Mobility Shift Assay) дают только конечные снимки состояний равновесия, не позволяя выявить переходные промежуточные соединения или катализические процессы (поскольку этот метод включает воздействие электрического поля на образцы, а также механические препятствия и ограничения, нестабильные комплексы становятся невозможно визуализировать с помощью такого метода) [8, 9]. Эти ограни-

чения становятся особенно существенными для изучения белков полигидроксиполимераз (PARPs), где наблюдение за НАД<sup>+</sup>-зависимой диссоциацией в режиме реального времени имеет важное значение для характеристики механизмов ингибирования в биологически значимом контексте. PARPs являются ядерными белками и важными компонентами системы репарации ДНК [10–13]. Эти ферменты одни из первых обнаруживают место повреждения ДНК, активируются и синтезируют из субстрата НАД<sup>+</sup> полигидроксиполимеразу, которая является маркером для факторов репарации ДНК [14].

Важно отметить, что для понимания взаимодействия PARP с хроматином необходимо использовать именно нуклеосомы, а не свободную ДНК [5–7]. Нуклеосомы являются фундаментальными функциональными единицами хроматина, состоящими из ~147 п.н. ДНК, обернутой вокруг октамеров гистонов [15–17]. Чтобы воспроизвести физиологическую компактизацию ДНК, стericеские ограничения и эпигенетические ландшафты, можно использовать мононуклеосомы. Изучая взаимодействия белков с мононуклеосомами, мы можем установить прямые параллели с организацией хроматина более высокого порядка и клеточными процессами, что позволяет экстраполировать механистические выводы из экспериментов *in vitro* на ядерную среду [5]. Традиционные методы (такие как EMSA) дестабилизируют нуклеосомы или игнорируют их структурное воздействие, что ставит под вопрос возможность данными методами исследовать процессы в физиологических условиях [1].

Для преодоления некоторых технологических трудностей мы разработали платформу для флуоресцентной микроскопии, использующую иммобилизацию гексагистидиновой метки (His<sub>6</sub>-tag) на агарозных гранулах из никельнитрилтриуксусной кислоты (Ni-NTA, Ni-Nitrilotriacetic Acid). Эта методология сохраняет фазовую динамику раствора за счет привязки к определенной ориентации с помощью координационной химии между ионами His<sub>6</sub>-tag и Ni<sup>2+</sup>, поддерживая гидратацию нативного белка и свободу вращения [18, 19]. Трехмерная гранулярная матрица (диаметр 45–165 мкм) обеспечивает оптимальное соотношение поверхности к объему для обеспечения доступности лиганда и в то же время поддерживает различные физиологические буферы, включая системы стабилизации нуклеосом на основе Tris, физиологический раствор с фосфатным буфером и 10-миллиметровым дитиотреитолом (DTT, dithiothreitol), а также условия с высоким содержанием соли, имитирующие ядерную среду. Важно отметить, что система достигает субсекундного временного разрешения за счет конфокального детектирования, что позволяет напрямую визуализировать кинетику связывания и каталитические переходы, недоступные для многих других методов [20].

Методология возникла в результате попыток охарактеризовать домен PARP2 WGR, нуклеосомные комплексы которого не обнаруживаются EMSA из-за быстрой диссоциации при электрофоретическом разделении [6]. Более того, мы стремились преодолеть ограничения spFRET-микроскопии, которая обычно используется для изучения PARP-нуклеосомных взаимодействий [7], разработав методологию, позволяющую отслеживать динамические биомолекулярные процессы в режиме реального времени. Устранив артефакты миграции супрамолекулярных комплексов в геле, наша платформа выявляет взаимодействия, которые не могут быть зафиксированы некоторыми другими подходами. Этот метод позволяет исследовать механизмы, лежащие в основе функционирования ингибиторов; в данной работе исследовалось влияние на ДНК-связывающую и катализическую активность PARP2 ингибитора типа I (таларапарив), который стабилизирует комплексы PARP-ДНК за счет повышения сродства к ДНК, и ингибитора типа III (велирапарив), который ослабляет связывание с ДНК [21]. Возможность визуализировать эти различные эффекты в режиме реального времени поможет устранить сохраняющиеся пробелы в характеристике терапевтического воздействия на пути репарации ДНК, связанные с активностью белков PARP.

## Материалы и методы

**Экспрессия и очистка белка.** Рекомбинантный PARP2 человека экспрессировали с His<sub>6</sub>-tag в составе, в *E. coli* в соответствии с описанным ранее протоколом [22, 23].

**Сборка нуклеосом.** Меченнную Су5 ДНК длиной 187 п.о., содержащую последовательность позиционирования 603, амплифицировали с использованием праймеров:

Forward: 5'-AAGCGACACCGGCACTGGGCC  
CGGTTCGCGCTCCCGCCTCCGTGTGTTGTC  
GTCTCTCGGGCGT-3'

Reverse: 5'-AACCATGATGGGCACTGGGTA  
CCCCAGGGACTTGAAGTAATAAGGACGGAG  
GGCCTCTTCAACATCGATGCACGG[Cy5-dT]  
GGTTAG-3' (Lumiprobe, Россия)

Октаамеры гистонов были выделены из эритроцитов цыплят в соответствии с описанным ранее протоколом [7]. Мононуклеосомы были собраны с помощью солевого диализа и их качество было проверено с помощью нативного гель-электрофореза в соответствии с описанным ранее протоколом [7, 24].

**Подготовка шариков и флуоресцентная микроскопия.** Для изучения связывания белков с нуклеосомами, мечеными Су5, использовали суспензию агарозных шариков диаметром от 45 до 165 мкм, поверхность которых была модифицирована Ni<sup>2+</sup>-NTA (Qiagen, Германия). В среднем бусины имеют примерно одинаковую форму

и размер, а расхождения составляют небольшой процент от общего количества бусин.

**Процедура.** К пяти объемам буферного раствора, в котором должна была протекать реакция, добавили небольшой объем (приблизительно 50 мкл) агарозных шариков и тщательно перемешали смесь. Затем гранулы осаждали центрифугированием при 100 об./мин в течение 1 мин. Надосадочную жидкость удалили и к гранулам добавили два объема свежего буфера, которые тщательно перемешали, чтобы предотвратить их высыхание. Поскольку гранулы хранились в 20%-ном этаноле, этот этап помог снизить концентрацию этанола перед добавлением белка. Важно, чтобы используемый буфер не препятствовал взаимодействию His-tag с Ni-NTA.

Добавили PARP2 к гранулам, тщательно перемешали и выдержали на льду в течение 5–10 мин. Мы использовали наномолярные и микромолярные концентрации белка. Связывающая способность гранул составляет до 50 мкг белка на 1 мг гранул. Представляющий интерес белок должен содержать аффинную метку с шестью или более остатками гистидина, чтобы избирательно связываться со смолой Ni-NTA.

После инкубации гранулы центрифугировали в течение 1 мин при 1 об./мин. Удалили надосадочную жидкость, содержащую несвязанный белковый буфер. Сразу же добавили в гранулы в 1,5 раза больше буфера и тщательно перемешали.

Для изучения взаимодействия между белком и нуклеосомами добавляли 10–100 нМ флуоресцентно меченых нуклеосом к суспензии шариков, содержащих белок. Затем смесь тщательно перемешали и выдержали на льду в течение 5–10 мин.

Изображения были получены с помощью конфокального микроскопа LSM710 (Zeiss, Германия), оснащенного объективом C-Apochromat 40×/1,2 Вт M27 (Zeiss, Германия), как в конфокальном, так и в проходящем свете. Для возбуждения флуоресценции использовался гелий-неоновый лазер (Не-Не) длиной волны 633 нм, а флуоресценция Су5 регистрировалась в диапазоне от 655 до 750 нм с помощью лавинного фотодиода (APD, Avalanche Photodiode). Размер конфокальной апертуры соответствовал одному воздушному диску.

Реагенты, совместимые с Ni-NTA, включают различные денатурирующие вещества (Gu HCl – 6 М, мочевина – 8 М), детергенты (Triton X-100 – 2%, Tween 20 – 2%, CHAPS – 1%), восстановители ( $\beta$ -меркаптоэтанол – 20 мМ, дитиотреитол (DTT, dithiothreitol) – 10 мМ, три(2-карбоксиэтил)fosфин гидрохлорид (TCEP, tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride) – 20 мМ), глицерин – 50%, этанол – 20%, имидазол – 20 мМ, а также соли ( $MgCl_2$  – 4 мМ,  $CaCl_2$  – 5 мМ,  $NaCl$  – 2 М).

Для экспериментов с ингибиторами PARP2 (концентрация белка – 100 мкМ) образцы (объемом 10 мкл) предварительно инкубировали с тала-

зопарибом (100 нМ) или велипарибом (100 нМ) (Selleck, США) в течение 20 мин. Для инициирования реакции поли(АДФ-рибозилирования) к образцу добавляли 100 мкМ НАД<sup>+</sup> (Merck, Германия).

## Результаты и обсуждение

**Ni-NTA-агарозные шарик.** Платформа из агарозных шариков Ni-NTA (рис. 1А) обеспечивала трехмерное связывание белка при сохранении нативной конформационной динамики. His<sub>6</sub>-tag-опосредованное ориентационно-специфическое связывание практически не влияет на активные участки белка (как ДНК-связывающий, так и катализический домены), что подтверждается сохранением ферментативной активности. Контрольные эксперименты показали минимальное неспецифическое связывание Су5-нуклеосом с шариками без белка, в то время как анализы на фотообесцвечивание подтвердили стабильность Су5 в условиях визуализации (рис. S1А).

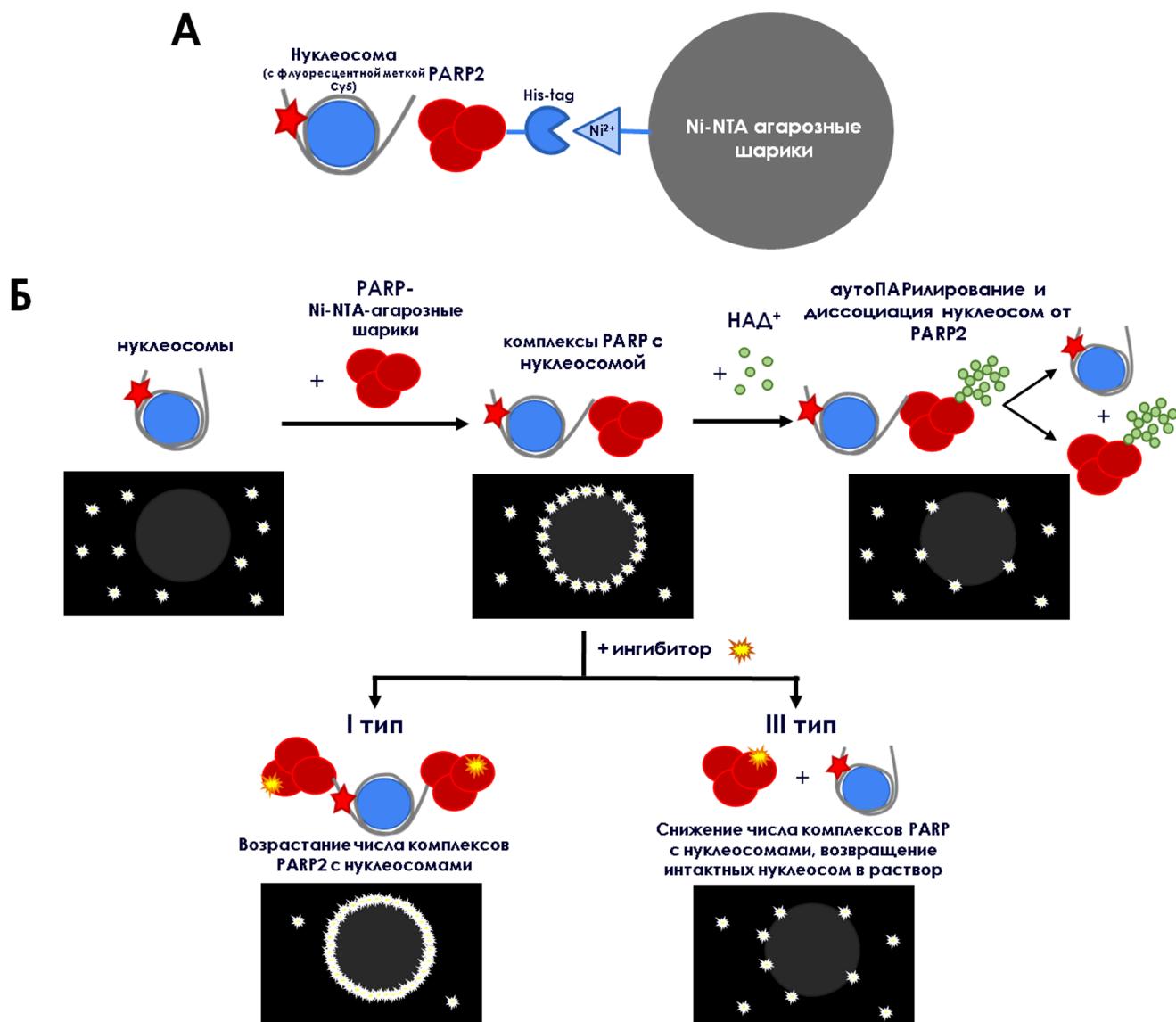
**Визуализация взаимодействия PARP2 с нуклеосомами в режиме реального времени.** Метод флуоресцентной микроскопии позволил получить прямое пространственное отображение молекулярных взаимодействий с помощью визуализации распределения и интенсивности флуоресценции (рис. 1Б; рис. 2). Контрольные образцы, содержащие только белок (PARP2, связанный с гранулами), не демонстрировали заметной флуоресценции вокруг гранул (рис. 2А), что подтверждает отсутствие автофлуоресценции или неспецифического накопления флуорофора. Полная темнота (отсутствие флуоресцентного сигнала) вокруг шариков служила основой для определения специфического связывания. Контрольные образцы, содержащие только нуклеосомы, показали, что флуоресцентный сигнал равномерно распределен по всему полю с заметными темными пустотами, соответствующими расположению шариков (рис. 2Б). Этот паттерн продемонстрировал две важные особенности: свободные Су5-нуклеосомы в растворе генерировали диффузные сигналы флуоресценции; отсутствие ореолов флуоресценции вокруг гранул подтверждало незначительную неспецифическую адгезию к поверхности Ni-NTA. Специфические белково-нуклеосомные комплексы образовывали характерные ореолы флуоресценции вокруг гранул. Взаимодействие PARP2 с нуклеосомами приводило к интенсивной равномерной флуоресценции, охватывающей гранулы, в течение 2 мин после добавления нуклеосом (рис. 2В), что также отображает изменение накопления сигнала флуоресценции во времени (рис. S1Б). Этот непрерывный ореол указывал на гомогенное присоединение нуклеосом к ДНК-связывающим доменам PARP2, что согласуется с высокоаффинным взаимодействием фермента с хроматином.

**Влияние агентов на взаимодействие PARP2 с нуклеосомами.** Мониторинг в режиме реального времени фиксировал динамические реакции на НАД<sup>+</sup> и ингибиторы (рис. 1Б; рис. 2В–Е).

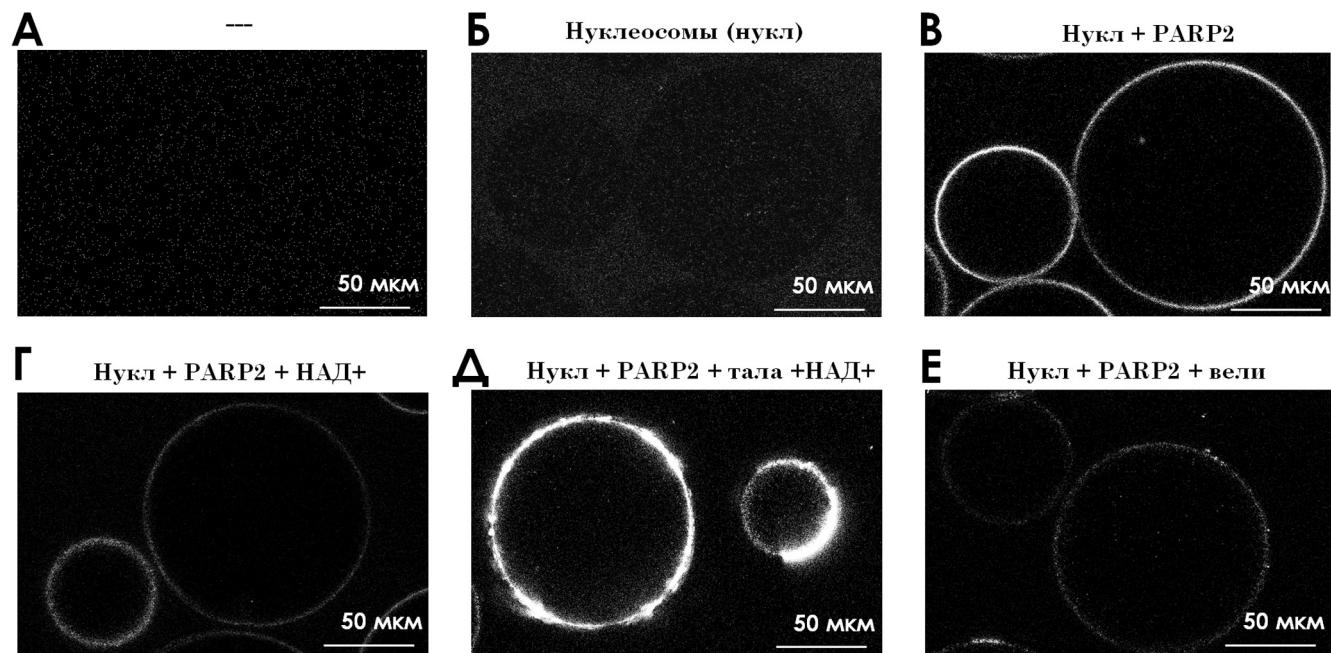
ПАРилирование и диссоциация комплексов, вызванные добавлением НАД<sup>+</sup>. Добавление 100 мкм НАД<sup>+</sup> к предварительно сформированным комплексам PARP2-нуклеосома вызывало постепенное затухание флуоресценции в течение 40 мин (рис. 2Г). Это соответствует автопарилированию PARP2, при котором накапливающиеся отрицательно заряженные цепи PAR создают электростатическое отталкивание, что приводит к диссоциации нуклеосом обратно в раствор. Это спровоцированное постепенное затухание флуоресценции в течение 40 мин было визуализировано с помощью покадрового анализа в реальном времени, который зафиксировал полную траекторию диссоциации (рис. S1Б, S1Д). Важно отметить, что наблюдаемый профиль затухания отличался от незначительных артефактов фотообесцвечивания при идентичных условиях получе-

ния изображения (рис. S1А, S1Г). После добавления НАД<sup>+</sup> определенная область образца сканируется с регулярными интервалами (каждую минуту (рис. S1Д); на рис. S1Б показаны результаты измерения через каждую пятую минуту). Поскольку гранулы тяжелые, они могут постепенно перемещаться в объеме раствора, но достаточно медленно, чтобы можно было отслеживать одну частицу в течение длительного времени (не менее 1 ч).

Таким образом, эта платформа может определять временную кинетику активации PARP в различных биохимических условиях (рН, температура, ионная сила). Чтобы подтвердить его полезность для определения профиля ингибиторов, мы выбрали два клинически протестированных ингибитора с различными механизмами влияния на PARP2 – талазопарив и велипарив.



**Рис. 1.** Схема визуализации результатов флуоресцентной микроскопии в реальном времени. (А) Поверхность агарозного шарика модифицирована Ni<sup>2+</sup>-NTA, который избирательно связывается с белками, несущими His-tag. Если интересующий белок способен связываться с нуклеосомой, поверхность гранул будет флуоресцировать из-за флуоресцентных меток на нуклеосомах. (Б) Экспериментальная схема показывает взаимодействие между нуклеосомами и PARP2, связанным с гранулами, в отсутствие или в присутствии НАД<sup>+</sup> и ингибиторов.



**Рис. 2.** Визуализация динамики взаимодействия PARP2 с нуклеосомами в режиме реального времени. (А) Немеченный PARP2 с His-tag сам по себе связывается с гранулами, но это связывание не приводит к флуоресценции гранул в отсутствие флуоресцентно меченых нуклеосом. (Б) Сами по себе флуоресцентно меченые нуклеосомы специфически не связываются с гранулами в отсутствие His-меченоого PARP2. (В) Исходное связывание нуклеосом с PARP2, ассоциированного с гранулами. (Г) Диссоциация комплексов PARP2-нуклеосома при добавлении НАД<sup>+</sup> и автопарилировании PARP приводит к уменьшению интенсивности флуоресценции. (Д) Ингибирирование I типа: усиление флуоресценции, вызванное талазопаривом, и гетерогенное перераспределение гало. (Е) Ингибирирование III типа: ослабление сигнала флуоресценции, вызванное велипаривом, из-за снижения эффективности связывания PARP2 с нуклеосомами.

**Талазопарив (ингибитор I типа для PARP2).** Добавление талазопарива (100 нМ) к нуклеосомам и PARP2 усиливало первоначальное связывание с нуклеосомами по сравнению с контролем без ингибиторов (рис. 2Д). Важно отметить, что распределение флуоресценции стало заметно более неоднородным, с участками интенсивной флуоресценции, чередующимися с областями более низкой интенсивности, что является морфологическим свидетельством «захваченных» комплексов PARP с нуклеосомами. Добавление НАД<sup>+</sup> не вызывало диссоциации, что подтверждает полное подавление катализитического высвобождения талазопарива. Эти результаты подтверждают, что талазопарив является эффективным ингибитором I типа (для PARP2): усиленное связывание демонстрирует повышенное сродство к ДНК, в то время как полное подавление диссоциации, вызванной НАД<sup>+</sup>, подтверждает ингибирирование катализитической активности, что согласуется с установленным механизмом захвата [21].

**Велипарив (ингибитора III типа).** Добавление 100 нМ велипарива снижало первоначальное связывание нуклеосом с PARP2 (в отсутствие НАД<sup>+</sup>) (рис. 2Е) и приводило к появлению характерных фрагментированных паттернов флуоресценции с неравномерным распределением сигнала. Несмотря на гетерогенность, подобно комплексам, обработанным талазопаривом (рис. 2Д), интен-

сивность сигнала была существенно снижена по сравнению с пробами, не содержащими ингибиторов (рис. 2В) и состояния, связанные с талазопаривом (рис. 2Д). Эти визуальные паттерны непосредственно демонстрируют, что велипарив относится к ингибиторам III типа: ослабленное связывание отражает нарушение функции ДНК-связывающего домена [21]. Чтобы точно определить влияние велипарива на эффективность связывания PARP2 с нуклеосомами, в этот образец не добавляли НАД<sup>+</sup>. В таком случае можно отделить действие ингибитора от эффекта, вызванного полигАДФ-рибозильным соединением.

Таким образом, была продемонстрирована возможность достижения качественного результата, но возможен и количественный анализ. Поскольку сигнал накапливается в течение заданного времени, путем многократного сканирования определенной области образца можно отследить изменения во времени. Кроме того, сравнивая накопленные сигналы от разных образцов, можно оценить действие реагентов. Эффективность ассоциации нуклеосом с белком может быть определена путем измерения изменения накопленного сигнала от частиц с течением времени. Влияние ингибиторов на связывание нуклеосом с белками можно оценить косвенно, измерив изменение эффективности связывания в присутствии ингибитора.

## Заключение

В этом исследовании была создана платформа для флуоресцентной микроскопии, которая позволяет непосредственно визуализировать влияние различных агентов на взаимодействие белок-лиганд в режиме реального времени с помощью His-tag-опосредованного связывания белков с гранулами Ni-NTA. Основное достижение методики заключается в ее способности фиксировать пространственную и временную динамику биомолекулярного связывания без артефактов ковалентной фиксации. Наши визуальные наблюдения дают однозначные доказательства: специфический набор нуклеосом проявляется в виде флуоресцентных ореолов вокруг гранул (рис. 2В), в то время как контрольные эксперименты подтверждают отсутствие неспецифического связывания (рис. 2А, Б). Важно отметить, что ингибиторы PARP I типа усиливают и гетерогенно перераспределяют сигналы флуоресценции (рис. 2Д), в то время как ингибиторы III типа и каталитический субстрат НАД<sup>+</sup> ослабляют их (рис. 2Г, Е). В будущих исследованиях также возможно аналогичным образом изучить влияние различных типов ингибиторов на ДНК-связывающую и каталитическую активность PARP1 и других белков семейства PARP.

Значимость платформы заключается не только в конкретных результатах, но и в широких методологических преимуществах. Сохраняя фазовую динамику раствора и обеспечивая временное разрешение с точностью до минуты, она преодолевает фундаментальные ограничения других методов, используемых для определения типа ингибитора, а также для других аналогичных целей. Практически неограниченная совместимость с бу-

фером обеспечивает физиологически значимые условия, ранее недоступные для традиционных подходов. Возможности отслеживания в реальном времени позволяют фиксировать промежуточные переходные процессы и динамические переходы, которые не поддаются анализу в конечной точке.

Эти достижения открывают несколько новых областей применения: классификация механизмов ингибирования; скрининг терапевтических средств, нацеленных на хроматин; анализ комплексов репарации ДНК в режиме реального времени; и, в целом, исследования ремоделирования хроматина. Адаптивность платформы к различным флуоресцентным и экспериментальным условиям предполагает ее непосредственную пригодность для изучения рецепторов, связанных с G-белком, взаимодействий киназа-субстрат и механизмов проникновения вирусов. Будущее внедрение высокопроизводительных систем визуализации может ускорить разработку лекарств, в то время как адаптация отдельных молекул может выявить гетерогенные свойства связывания, скрытые при комплексных измерениях. Таким образом, эта методология устанавливает важную связь между структурной биохимией и клеточной физиологией, предоставляя универсальный визуальный инструментарий для динамического анализа молекулярных взаимодействий.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, проект № 21-64-00001-п. Исследование проведено без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Luger K., Hansen J.C. Nucleosome and chromatin fiber dynamics. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2005;15(2):188–196.
2. Luger K., Dechassa M.L., Tremethick D.J. New insights into nucleosome and chromatin structure. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2012;13(7):436–447.
3. Langelier M.F., Planck J.L., Roy S., Pascal J.M. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1. *Science*. 2012;336(6082):728–732.
4. Lakowicz J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3<sup>rd</sup> ed. N.Y.: Springer; 2006. 954 pp.
5. 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.
6. Maluchenko N., Saulina A., Geraskina O., Kotova E., Korovina A., Armeev G., Kirpichnikov M., Feofanov A., Studitsky V. Poly(ADP-ribose)polymerase 2 is zinc-dependent enzyme and nucleosome reorganizer. *Cell. Mol. Life Sci.* 2025;82(1):267.
7. Maluchenko N., Koshkina D., Korovina A., Studitsky V., Feofanov A. Interactions of PARP1 inhibitors with PARP1-nucleosome complexes. *Cells*. 2022;11(21):3343.
8. Hellman L.M., Fried M.G. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions. *Nat. Protoc.* 2007;2(8):1849–1861.
9. Pascal J.M. The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage. *DNA Repair (Amst)*. 2018;71:177–182.
10. Riccio AA, Cingolani G, Pascal JM. PARP-2 domain requirements for DNA damage-dependent activation and localization to sites of DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(4):1691–1702.
11. 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.
12. Krüger A., Bürkle A., Hauser K., Mangerich A. Real-time monitoring of PARP1-dependent PARylation by ATR-FTIR spectroscopy. *Nat. Commun.* 2020;11(1):2174.

13. 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;545:91–97.
14. Langelier M.F., Riccio A.A., Pascal J.M. PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1. *Nucleic Acids Res.* 2014;42(12):7762–7775.
15. Luger K., Mäder A.W., Richmond R.K., Sargent D.F., Richmond T.J. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*. 1997;389(6648):251–260.
16. Richmond T.J., Davey C.A. The structure of DNA in the nucleosome core. *Nature*. 2003;423(6936):145–150.
17. Luger K., Rechsteiner T.J., Richmond T.J. Preparation of nucleosome core particle from recombinant histones. *Chromatin. Methods in Enzymology*, vol. 304. Eds. P.M. Wasserman and A.P. Wolffe. Academic Press; 1999:3–19.
18. Wasserberg D., Cabanas-Danés J., Prangsma J., O'Mahony S., Cazade P.A., Tromp E., Blum C., Thompson D., Huskens J., Subramaniam V., Jonkheijm P. Controlling protein surface orientation by strategic placement of His-tags. *ACS Nano*. 2017;11(9):9350–9361.
19. Wu C.C., Reinhoudt D.N., Otto C., Velders A.H., Subramaniam V. Protein immobilization on Ni(II) ion patterns prepared by microcontact printing and dip-pen nanolithography. *ACS Nano*. 2010;4(2):1083–1091.
20. Castro-Hinojosa C., Del Sol-Fernández S., Moreno-Antolín E., Martín-Gracia B., Ovejero J.G., de la Fuente J.M., Grazú V., Fratila R.M., Moros M. A simple and versatile strategy for oriented immobilization of His-tagged proteins on magnetic nanoparticles. *Bioconjug. Chem.* 2023;34(12):2275–2292.
21. 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.
22. Lobanova A.A., Korovina A.N., Koshkina D.O., Chernikova P.A., Feofanov A.V., Studitsky V.M., Nilov D.K., Maluchenko N.V. Gel electrophoresis as a method for classifying inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerases 1 and 2. *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* 2024;79(4):239–245.
23. 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. N.Y.: Humana Press; 2017:431–444.
24. Koshkina D., Maluchenko N., Nilov D., Lyubitshev A., Korovina A., Pushkarev S., Armeev G., Kirpichnikov M., Studitsky V., Feofanov A. Non-classical H1-like PARP1 binding to chromatosome. *Cells*. 2025;14(17):1309.

Поступила в редакцию 01.07.2025

После доработки 07.10.2025

Принята в печать 07.10.2025

## RESEARCH ARTICLE

## Ni-NTA bead-based real-time monitoring of PARPs inhibitor binding

A.A. Lobanova<sup>1,\*</sup>, A.A. Saulina<sup>1</sup>, O.V. Geraskina<sup>2</sup>, D.O. Koshkina<sup>1</sup> ,  
N.V. Maluchenko<sup>1</sup> , A.V. Feofanov<sup>1,2</sup> , V.M. Studitsky<sup>3</sup> 

<sup>1</sup>*School of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–12 Leninskie gory, Moscow, 119234, Russia;*

<sup>2</sup>*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 34/5 Vavilov Str., Moscow, 119334, Russia;*

<sup>3</sup>*Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA*

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

This study establishes a real-time fluorescence microscopy platform for visualizing ligand binding dynamics to His-tagged proteins bound to Ni-NTA agarose beads. By preserving solution-phase kinetics while enabling sub-minute temporal resolution in physiological buffers, the methodology overcomes critical limitations of surface-based techniques and gel electrophoretic methods. We applied this platform to investigate inhibitor action within a nucleosomal system, a more physiologically relevant context than free DNA. Through studies of PARP2-nucleosome interactions modulated by clinical inhibitors (talazoparib, veliparib) and by reaction of poly(ADP-ribosylation) in the presence of NAD<sup>+</sup>, we demonstrate direct spatial and temporal resolution of chromatin-protein dynamics. The platform's virtually unlimited buffer compatibility, real-time monitoring capabilities, and elimination of covalent immobilization artifacts provide transformative insights into drug mechanisms and chromatin engagement processes.

**Keywords:** *Ni-NTA-agarose beads, PARP2, PARP inhibitors, nucleosomes*

**Funding:** This work was supported by the Russian Science Foundation, project no. 21-64-00001-p.

### Информация об авторах

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

*Саулина Александра Александровна* – мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: lys-alex-bio-msu@yandex.ru

*Гераськина Ольга Вячеславовна* – науч. сотр. Института биологии гена РАН. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: olgasamsonova@yandex.ru

*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; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8137-4685>

*Малюченко Наталья Валерьевна* – канд. биол. наук, доц. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: mal\_nat@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4129-4984>

*Феофанов Алексей Валерьевич* – докт. биол. наук, 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, вед. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: vasily.studitsky@fccc.edu; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7389-7993>