

## ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ



УДК 577.112.083

## Оптимизация получения рекомбинантной поли(АДФ-рибозы 3 человека)

Е.А. Волкова<sup>1,\*</sup>, А.Н. Коровина<sup>1,\*\*</sup> , Н.В. Малюченко<sup>1</sup> , В.М. Студитский<sup>1, 2</sup>

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

<sup>2</sup> Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA

\*e-mail: katerinavlkv@yandex.ru

\*\*e-mail: anna.korovina@gmail.com

PARP3 (Poly(ADP-ribose) polymerase 3), наряду с другими членами семейства PARP – PARP1 и PARP2, является важным фактором репарации ДНК. Специфические функции и молекулярные механизмы действия этого белка изучены недостаточно. Разработка надежного протокола получения PARP3 с высокой чистотой и выходом представляет собой необходимое условие для всестороннего анализа белка, в том числе изучения его связывания с ДНК, ферментативной активности, взаимодействий с другими белковыми факторами, а также структурных исследований. В данной работе представлен модифицированный протокол экспрессии белка PARP3 человека в клетках *Escherichia coli* и его последующей очистки, позволяющий существенно увеличить выход белка по сравнению с ранее опубликованными методиками.

**Ключевые слова:** PARP3, рекомбинантный белок, очистка белка,  $Ni^{2+}$ -сепароза, гепарин-сепароза, хроматография, *E. coli*

**DOI:** 10.55959/MSU0137-0952-16-80-3S-12

На сегодняшний день известно 17 представителей семейства поли(АДФ-рибозы) полимераз (PARP) человека [1, 2], наиболее изученной из них является PARP1. Она имеет наибольшую молекулярную массу среди белков семейства (113 кДа) и отличается наличием трех доменов цинковых пальцев, связывающих ДНК [3]. PARP1 локализуется в ядре и характеризуется высоким уровнем экспрессии – до миллиона копий на клетку. Она участвует в широком спектре клеточных процессов: от базовой эксцизионной репарации оснований до регуляции апоптоза и устойчивости к генотоксическому стрессу [3–5]. Молекулярная масса PARP2 составляет 65 кДа, она не содержит цинковых пальцев и домена BRCT. Ее функции схожи с функциями PARP1, и долгое время она рассматривалась как его функциональный дублер [3]. Оба этих фермента осуществляют модификацию, известную как поли-АДФ-рибозилирование – присоединение длинных цепей АДФ-рибозы к ДНК- или белковым мишениям, включая аминокислотные остатки собственной полипептидной цепи [6].

Структура PARP3 близка к структуре белка PARP2. Она включает короткий N-концевой неструктурированный домен, домен WGR (Trp-Gly-

Arg) и C-концевой каталитический домен (CAT), который подразделяется на спиральный домен (HD) и складку АДФ-рибозилтрансферазы (ART) [7]. До недавнего времени PARP3 относили к группе вспомогательных ферментов, дублирующих функции PARP1 и PARP2, но было показано, что она обладает особыми свойствами – осуществляет исключительноmono-АДФ-рибозилирование (МАРилирование) и проявляет высокую специфичность по отношению к определенным структурам ДНК [4].

Все больше данных свидетельствует о том, что PARP3 является необходимым регулятором в ряде клеточных процессов. Недавно было установлено, что PARP3 участвует в регуляции выбора пути репарации двухцепочечных разрывов ДНК, а именно способствует подавлению гомологичной рекомбинации и направляет клетку по пути классического негомологичного соединения концов (classical non-homologous end joining, c-NHEJ) [8, 9]. Таким образом, PARP3 представляет собой не просто «молекулярный дублер» других белков семейства, а самостоятельный, критически важный регуляторный элемент ответа на повреждение ДНК.

Для формирования более глубокого понимания механизмов действия PARP3, включая его взаимодействие с ДНК и хроматином, необходим высокочистый, стабильный белковый препарат, пригодный для биохимических и структурных исследований. В литературе описаны различные протоколы получения PARP3 человека с выходом не более 2 мг с 1 л клеточной культуры [10, 11]. Настоящая работа посвящена оптимизации протокола экспрессии и очистки рекомбинантного PARP3 человека с целью получения белка с высоким выходом и с сохранением активностей.

### Материалы и методы

Данная методика основана на опубликованном ранее методе экспрессии и очистки белка PARP3 с модификациями [10].

**Получение экспрессионной плазиды.** Ген PARP3 человека амплифицировали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием праймеров, содержащих сайты рестрикций *NdeI* и *XhoI*:

hPARP3 forward *NdeI*: gattaCATATGGCTCCA AAGCCGAAGCCCTGG,

hPARP3 reverse *XhoI*: gccaatCTCGAGTCAGA GGTGGACCTCCAGCAGGTAGCCGAG.

Матрицей служила кДНК, полученная из РНК макрофагов крови человека.

Амплификацию проводили с помощью полимеразы Q5 в следующем режиме ПЦР: 30 с предварительной денатурации при 98°C, 34 цикла: денатурация в течение 10 с при 98°C, отжиг праймеров в течение 10 с при 72°C, элонгация в течение 50 с при 72°C. Дополнительная элонгация длилась 2 мин при 72°C. Продукт реакции был очищен с помощью стандартного коммерческого набора. Концентрация полученного фрагмента ДНК, кодирующего белок PARP3, составляла > 400 нг/мкл.

Вставку и вектор *pET-15b*, кодирующий гексагистидиновый фрагмент на 5'-конце вставки, обрабатывали рестриктазами *NdeI* и *XhoI*, очищали с помощью коммерческого набора, затем обрабатывали Т4-лигазой в течение ночи при 4°C. Продукт реакции трансформировали в компетентные клетки *E. coli* XL10 Gold.

Селекцию клонов проводили с помощью ПЦР-скрининга с праймерами к плазмиде (T7lac) и целевому гену (hPARP3 reverse *XhoI*). Из клонов, содержащих вставку, выделяли плазиды с помощью коммерческого набора и секвенировали их по Сэнгеру (центр коллективного пользования «Геном», Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН).

Плазиду, кодирующую ген PARP3 без изменений относительно описанной в литературе последовательности, использовали для экспрессии белка.

**Экспрессия белка PARP3.** Для получения белка PARP3 использовали штамм *E. coli* Rosetta 2 (DE3)

pLysS. Бактерии трансформировали плазмидой pET-15b-PARP3 методом электропорации. Колонии выращивали в течение ночи на чашке с LB-агаром в присутствии 150 мкг/мл ампциллина и 35 мкг/мл хлорамфеникола, далее переносили в жидкую среду LB с теми же антибиотиками и 1% глюкозы и выращивали при 37°C в течение ночи. Полученную культуру переносили в соотношении 1:100 по объему в свежую среду LB с 150 мкг/мл ампциллина и инкубировали до оптической плотности OD<sub>600</sub> ~ 0,8–0,9. Для подавления аутоМАРИрования PARP3 в питательную среду добавляли ингибитор бензамида. Экспрессию белка индуцировали 0,5 или 1 мМ изопропил-бета-галактопиранозида при температурах 16°C, 18°C или 30°C в течение 5 или 18 ч. Далее клеточную культуру осаждали центрифугированием при 3400 g в течение 30 мин, промывали фосфатно-солевым буфером и хранили при –80°C.

Для оценки содержания целевого белка в растворимой фракции после экспрессии в разных условиях измеряли оптическую плотность клеточной культуры до и после индукции. Аликвоты клеточной культуры объемом 1 мл осаждали, лизировали в мягких условиях в объеме буфера пропорциональном оптической плотности данного образца, центрифугировали 10 мин при 10000 g и наносили на 10%-ный полиакриламидный гель (ПААГ) супернатант для определения эффективности выхода белка в раствор.

**Выделение и очистка PARP3.** Все стадии выделения и очистки проводили при 4°C.

Клеточную культуру размораживали и ресусцинировали в буфере для лизиса (25 мМ HEPES pH 8,0; 0,5 M NaCl; 0,5 мМ трихлорэтилфосфат (TCEP); 1 мМ фенилметансульфонилфторид; 10 мМ бензамид; 0,7 мкг/мл пепстатин A; смесь ингибиторов протеаз). Клетки разрушали ультразвуком (импульс:пауза – 1:1,5, 1–20 мин) и гомогенизировали при высоком давлении с помощью френч-пресса. Лизат центрифугировали (18000 g, 1 ч, 4 °C), полученный осветленный лизат пропускали через фильтр с диаметром пор равным 0,22 мкм.

Очистку PARP3 проводили в три этапа с использованием хроматографической системы AKTA Purifier (GE, США) методами металл-аффинной хроматографии, хроматографии на гепариновом носителе и гель-фильтрации.

Перед очисткой белка колонку с Ni<sup>2+</sup>-сефарозой для металл-аффинной хроматографии NiTrap Chelating HP (GE Healthcare, США) заполняли буфером для лизиса без бензамида и ингибиторов протеаз (25 мМ HEPES pH 8,0; 0,5 M NaCl; 0,5 мМ TCEP). Осветленный лизат пропускали через колонку со скоростью 2,5 мл/мин и далее последовательно промывали ее буфером №1 (25 мМ HEPES pH 8,0; 500 мМ NaCl; 0,5 мМ TCEP; 20 мМ имидазол; 0,7 мкг/мл пепстатин A; смесь

ингибиторов протеаз), буфером №2 (25 мМ HEPES pH 8,0; 1 М NaCl; 0,5 мМ TCEP; 20 мМ имидазол; 0,7 мкг/мл пепстатин A; смесь ингибиторов протеаз) и повторно буфером №1. PARP3 элюировали буфером, содержащим 250 мМ имидазола (25 мМ HEPES pH 8,0; 0,5 М NaCl; 0,5 мМ TCEP; 250 мМ имидазол; 0,7 мкг/мл пепстатин A; смесь ингибиторов протеаз). Элюат анализировали в 10%-ном ПААГ, целевые фракции объединяли и разбавляли в 10 раз буфером без соли (50 мМ Tris-HCl, pH 7,0; 0,1 мМ TCEP; 1 мМ ЭДТА).

Колонку с гепарин-сепарозой HiTrap Heparin HP (GE Healthcare, США) уравновешивали буфером А (50 мМ Tris-HCl pH 7,0; 0,1 мМ TCEP; 1 мМ ЭДТА; 50 мМ NaCl). Для связывания PARP3 с колонкой использовали циклическое нанесение в течение 14 ч со скоростью 1 мл/мин. Промывку и элюцию белка проводили в градиенте концентрации соли от 50 мМ до 1 М NaCl (буфер А и буфер Б – 50 мМ Tris-HCl pH 7,0; 0,1 мМ TCEP; 1 мМ ЭДТА; 1 М NaCl) в течение 60 мин со скоростью 2 мл/мин. Содержание целевого белка во фракциях контролировали по поглощению при 280 нм и анализировали с помощью электрофореза в 10%-ном ПААГ. Фракции с белком объединяли и концентрировали до 0,6 мл.

Финальный этап очистки выполнялся с помощью колонки для гель-фильтрации HiPrep Sephadryl S300 HR (Cytiva, США), уравновешенной буфером S (25 мМ HEPES pH 8,0; 150 мМ NaCl; 1 мМ ЭДТА; 0,1 мМ TCEP). Промывку проводили на скорости 0,5 мл/мин, и собирали фракции объемом 4 мл. Чистоту и гомогенность белка PARP3 анализировали с помощью электрофореза в 10%-ном ПААГ. Целевые фракции объединяли и концентрировали. Полученный образец хранили в 40%-ном глицерине при -80°C.

#### **ДНК- и нуклеосом-связывающая активность.**

Для испытаний ДНК-связывающей активности белка использовали фрагмент ДНК длиной 187 п.н., флуоресцентно-меченный Cy3, представляющий собой позиционирующую нуклеосому последовательность 603 (147 п.н.) [12] с удаленными аденоzinами до положения 42 до входа в нуклеосому (42A) и двумя линкерами длиной 20 п.н. в начале и конце последовательности.

#### Последовательность s603 42A:

5'-CCCGGTTCGCGCTCCGCCTCCGTG  
TGGTGTGTCGCTCTCGAGCGTCTAAGT ACGCT  
TAGCGCACGGTAGAGCGCAATCCAAGGCTAA  
CCACCGTGATCGATGTTGAAAGAGGCCCTC  
CGTCCTTATTACTCAAGTCCCTGGGGT-3'.

ДНК получали с помощью ПЦР с плазмидой, кодирующей нуклеосомную матрицу, с праймерами:

F\_Pr20Cy3\_42: 5'-CAAGCGACACCGGCCT  
GGGCCGGTTCGCGC[Cy3-dT]CCC GCCTTC  
CGTGTGTTGTCGTCTCGGGCGT-3';

R\_Pr20Cy5\_425'-GAACCATGATGGGCCT  
G G G T A C C C C A G G G A C T T G A A G T A A

TAAGGAC GGAGGGCCTTTCAACATCGATG  
CACGGTGGTTAG-3'.

Очистку полученного ПЦР-продукта проводили в 1,5%-ном агарозном геле с помощью коммерческого набора.

Мононуклеосомы получали ступенчатым дилизом нуклеосомной матрицы в присутствии октамера рекомбинантных гистонов человека, как описано ранее [13].

К суспензии Ni-NTA-агарозы добавляли 800 нМ PARP3 и инкубировали 10 мин. Затем к смеси добавляли 50 нМ ДНК-матрицы или нуклеосом (концентрация рассчитана по ДНК) инкубировали 10 мин, промывали и детектировали флуоресценцию с помощью конфокального микроскопа LSM710 (Zeiss, Германия) при возбуждении длиной волны 514 нм.

#### **Результаты и обсуждение**

**Получение белка PARP3.** В литературе описано два основных подхода к получению белков PARP, в том числе PARP3. Оверэкспрессию этих белков проводят либо в бактериальной системе в клетках *Sf9* [14], что позволяет получать белок с посттрансляционными модификациями близкими к характерным для человека, либо в прокариотической системе экспрессии в клетках *E. coli*, что упрощает получение белка и снижает его стоимость [10, 11]. В данной работе за основу был взят протокол экспрессии в *E. coli*.

Ген, кодирующий PARP3, содержит кодоны, редкие для *E. coli* (таблица), что может препятствовать эффективному биосинтезу белка, поэтому экспрессию проводили в штамме *E. coli* Rosetta 2 (DE3) pLysS.

Для выбора оптимальных условий экспрессии PARP3 проводили в трех температурных режимах: при 16°C в течение 18 ч, как описано ранее [10], при 30°C в течение 5 ч и при 18°C в течение 18 ч. Было показано, что температура мало влияет на общий уровень экспрессии белка, хотя при 18°C он несколько выше, чем при 16°C.

Таблица  
Содержание кодонов, редких для *E. coli*, в гене PARP3 человека

Аминокислота	Кодон	Число в гене	Доля кодона для данной аминокислоты
Arg	AGA	3	0,12
Arg	AGG	4	0,16
Arg	CGG	6	0,24
Ile	ATA	3	0,13
Leu	CTA	2	0,04
Gly	GGA	5	0,15
Pro	CCC	13	0,37

Информация получена на сайте [https://www.bioinformatics.org/sms2/codon\\_usage.html](https://www.bioinformatics.org/sms2/codon_usage.html)

При этом при изменении температуры индукции наблюдалось изменение количества белка в растворимой фракции. По данным денситометрии в результате экспрессии при 30°C в лизате содержалось около 50% целевого белка (рис. 1A). При экспрессии при 18°C содержание PARP3 составляет около 70% (рис. 1Б) что, вероятно, обусловлено более низкой скоростью биосинтеза при этой температуре, что приводит к более корректному фолдингу и более высокому содержанию белка в растворе. Повышение концентрации индуктора изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозида (ИПТГ) в клеточной культуре с 0,5 мМ до 1 мМ не оказывало влияния на уровень экспрессии и растворимость PARP3. Таким образом, оптимальным условием для препаративной экспрессии PARP3 является инкубация клеточной культуры при 18°C в течение 18 ч в присутствии 0,5 мМ ИПТГ.

Основной метод очистки белков PARP – аффинная хроматография. Часто используют металло-аффинную хроматографию белков слияния PARP с гексагистидиновым фрагментом на носителях с иммобилизованным  $\text{Ni}^{2+}$ . Также используют способность белков PARP связывать никотинамидную группу, которая входит в состав ингибиторов PARP, представляющих собой производные субстрата НАД $^+$ . Так, 4B-сефароза ковалентно-связанная через длинный линкер 3-аминобензамидом является высокоспецифичным носителем для аффинной хроматографии PARP1-3 [11]. Однако такой метод требует специальной подготовки носителя. В данной работе использовалась более распространенная металло-аффинная хроматография.

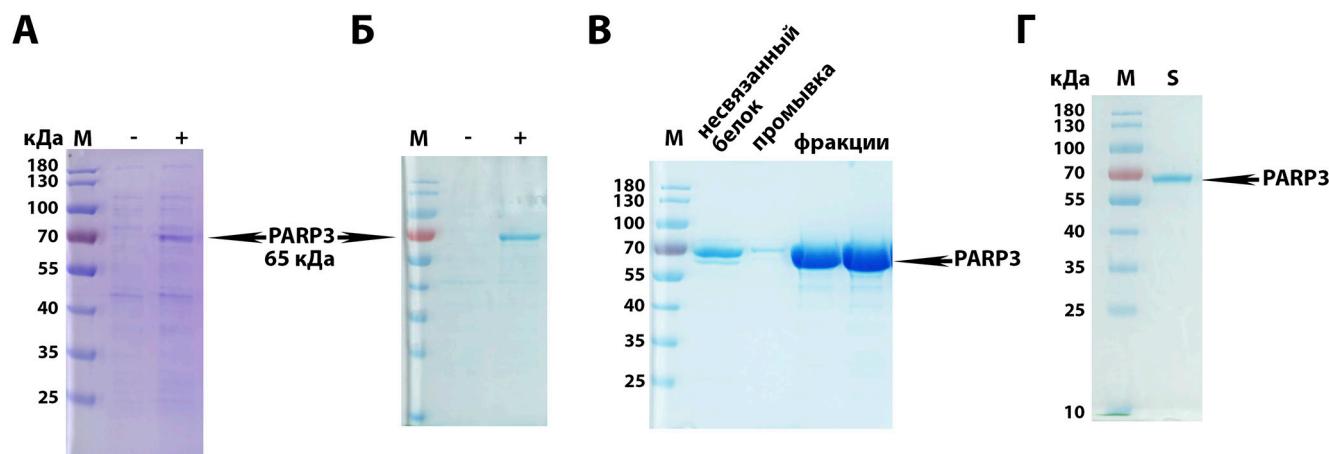
Поскольку очистка белков PARP на  $\text{Ni}^{2+}$ -сефарозе не позволяет получить препарат с достаточной чистотой, используют дополнительный этап доочистки методом гель-фильтрации.

Белки PARP являются ДНК-связывающими, и для получения подходящего для экспериментов

с ДНК препарата необходима очистка от неспецифически связанных ДНК-субстрата. Способность этих белков связывать ДНК позволяет также очищать их от нее с помощью гепарин-сефарозы, сочетающей свойства аффинного и катионобменного сорбента. Гепарин – высокосульфатированный гликозаминогликан, полианионная структура которого имитирует нуклеиновые кислоты. При этом замечено, что аффинность гепарина к белкам PARP не очень высока, и на этой стадии очистки происходят довольно большие потери. В данной работе для улучшения связывания PARP3 с гепарин-сефарозой использовали циклическое нанесение на носитель в течение 14 ч при низкой скорости (рис. 1В), что привело к существенному повышению общего выхода белка. Чистота полученного препарата была достаточно высока, однако для получения белка, подходящего для исследования высокочувствительными методами, стадия доочистки с помощью гель-фильтрации в данном протоколе была сохранена (рис. 1Г).

Использование схемы очистки, состоящей из последовательных стадий металло-аффинной хроматографии, хроматографии на гепарин-сефарозе и гель-фильтрации, на основе протокола [10] с увеличением времени нанесения на гепариновую колонку (рис. 2), позволило повысить выход PARP3 на порядок по сравнению с описанным в литературе – с 2 до 23 мг с литра клеточной культуры – и обеспечить высокую чистоту белка (около 99%).

Таким образом, повышение концентрации ИПТГ с 0,5 до 1 мМ не дало видимого эффекта на уровень экспрессии белка, индукция при 18°C приводила к высокому выходу растворимого белка PARP3, а длительное циклическое нанесение на колонку с гепариновым носителем позволило существенно повысить эффективность связывания PARP3, несмотря на его низкую аффинность к гепарину.



**Рис. 1.** Получение и очистка белка PARP3: А – экспрессия в клетках *E. coli* штамм Rosetta 2 (DE3) pLysS при 30°C, «-» – до добавления ИПТГ, «+» – через 5 ч после добавления ИПТГ, Б – экспрессия при 18°C, «-» – до добавления ИПТГ, «+» – через 18 ч после добавления ИПТГ. В – хроматография на гепариновом носителе. Количество несвязавшегося с колонкой белка и белка, элюированного при промывке, незначительно. Г – финальный препарат PARP3 после гель-фильтрации (S). М – маркер молекулярных весов PageRuler Prestained Protein Ladder.



**Рис. 2.** Схематическое изображение этапов получения и очистки PARP3 человека.

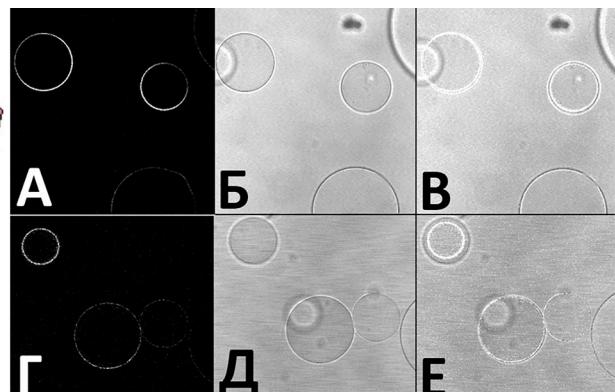
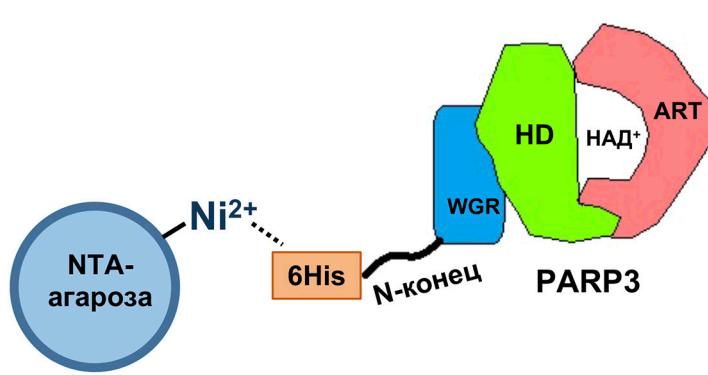
**Связывание PARP3 с ДНК и нуклеосомой.** Функциональная активность полученного препарата была протестирована в экспериментах по связыванию флуоресцентно-меченых Су3 ДНК и нуклеосом с PARP3, иммобилизованных на по-

верхности Ni-NTA-агарозных микросфер (рис. 3 слева) с помощью флуоресцентной микроскопии. Связывание ДНК (рис. 3 справа вверху) или нуклеосом (рис. 3 справа внизу) с немеченным PARP3 приводит к появлению флуоресцентного сигнала на поверхности частиц носителя.

### Заключение

Представлен подробный оптимизированный протокол экспрессии и выделения рекомбинантного PARP3 человека с помощью *E. coli* с использованием металла-аффинной и гепариновой хроматографий, а также гель-фильтрации. Методика обеспечивает высокий выход и качество белка, пригодного для кристаллизации и для структурных исследований методами рентгеноструктурного анализа и криоЭМ. Полученная PARP3 связывается с ДНК и нуклеосомой, что позволяет использовать ее для детализированных биохимических исследований ее свойств, как элемента хроматина.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-30003). Данная работа не содержала экспериментов с участием людей или животных. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.



**Рис. 3.** Связывание PARP3 с ДНК и нуклеосомой. Слева – схема иммобилизации PARP3 на микросферах Ni-NTA-агарозы. Справа – конфокальная микроскопия микросфер с иммобилизованным PARP3: А, Б, В – с ДНК длиной 187 пн (вверху) и Г, Д, Е – с нуклеосомами (внизу). Слева – флуоресценция, в центре – проходящий свет, справа – совмещение двух изображений.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Augustin A., Spenlehauer C., Dumond H., Ménissier-de Murcia J., Piel M., Schmit A.C., Apiou F., Vonesch J.L., Kock M., Bornens M., De Murcia G. PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression. *J. Cell Sci.* 2003;116(8):1551–1562.
- Vyas S., Chesarone-Cataldo M., Todorova T., Huang Y.H., Chang P. A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology. *Nat. Commun.* 2013;4(1):2240.
- Luo X., Kraus W.L. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev.* 2012;26(5):417–432.
- 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.
- Los M., Mozoluk M., Ferrari D., Stepczynska A., Stroh C., Renz A., Herceg Z., Wang Z.Q., Schulze-Osthoff K. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: A molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. *Mol. Biol. Cell.* 2002;13(3):978–988.
- Gupte R., Liu Z., Kraus W.L. PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes. *Genes Dev.* 2017;31(2):101–126.
- Van Beek L., McClay É., Patel S., Schimpl M., Spagnolo L., Maia De Oliveira T. PARP Power: A structural perspective on PARP1, PARP2, and PARP3 in DNA damage repair and nucleosome remodelling. *Int. J. Mol. Sci.* 2021;22(10):5112.

8. Morales J., Li L., Fattah F.J., Dong Y., Bey E.A., Patel M., Gao J., Boothman D.A. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2014;24(1):15–28.
9. Rulten S.L., Fisher A.E.O., Robert I., Zuma M.C., Rouleau M., Ju L., Poirier G., Reina-San-Martin B., Caldecott K.W. PARP-3 and APLF function together to accelerate nonhomologous end-joining. *Mol. Cell.* 2011;41(1):33–45.
10. 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.V. Tulin. N.Y.: Springer New York; 2017:431–444.
11. Amé J.C., Camuzeaux B., Dantzer F., Schreiber V. Purification of recombinant human PARP-3. *Poly(ADP-Ribose) Polymerase. Methods in Molecular Biology*, vol. 1608. Ed. A.V. Tulin. N.Y.: Springer New York; 2017:373–394.
12. Lowary P.T., Widom J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning. *J. Mol. Biol.* 1998;276(1):19–42.
13. 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. Wasarman and A.P. Wolffe. Academic Press; 1999:3–19.
14. Grundy G.J., Polo L.M., Zeng Z., Rulten S.L., Hoch N.C., Paomephan P., Xu Y., Sweet S.M., Thorne A.W., Oliver A.W., Matthews S.J., Pearl L.H., Caldecott K.W. PARP3 is a sensor of nicked nucleosomes and monoribosylates histone H2BGlu2. *Nat. Commun.* 2016;7(1):12404.

Поступила в редакцию 30.06.2025

После доработки 26.09.2025

Принята в печать 30.09.2025

## ORIGINAL RESEARCH

# Optimization of recombinant human poly(ADP-ribose) polymerase 3 production

**Е.А. Volkova<sup>1,\*</sup>, А.Н. Korovina<sup>1, \*\*</sup>, N.V. Maluchenko<sup>1</sup>, V.M. Studitsky<sup>1, 2</sup>**

<sup>1</sup>*Department of Bioengineering, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,  
1–12 Leninskie Gory, Moscow, 119234, Russia;*

<sup>2</sup>*Fox Chase Cancer Center, 333 Cottman Ave., Philadelphia, 19111, Pennsylvania, USA*

\*e-mail: katerinavlkv@yandex.ru

\*\*e-mail: anna.korovina@gmail.com

PARP3 (Poly(ADP-ribose) polymerase 3), like other PARP family members (PARP1 and PARP2), is an important factor in DNA repair. The specific functions and molecular mechanisms of action of this protein remain insufficiently studied. The development of a reliable protocol for obtaining high-purity and yield PARP3 is essential for comprehensive protein analysis, enzymatic activity, including studies of its binding to DNA, interactions with other protein factors, and structural investigations. In this study, we present a modified protocol for the expression of human PARP3 from *Escherichia coli* cells and its subsequent purification, which significantly increases protein yield compared to previously published methods.

**Keywords:** PARP3, recombinant protein, protein purification, Ni<sup>2+</sup>-sepharose, heparin-sepharose, chromatography, *E. coli*

## Сведения об авторах

**Волкова Екатерина Александровна** – мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: katerinavlkv@yandex.ru

**Коровина Анна Николаевна** – канд. биол. наук, мл. науч. сотр. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: anna.korovina@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9240-9054>

**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>

**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>