

Казахский национальный университет имени аль-Фараби

УДК 581.19

На правах рукописи

**Қуанбай Әйгерім Құрманбекқызы**

**Изучение роли Поли (АДФ-рибоза) полимераз *Arabidopsis thaliana* в ковалентной модификации концов разрывов в цепи ДНК *in vitro* и *in vivo***

6D060700 - Биология

Диссертация на соискание ученой степени  
доктора философии (PhD), доктора по профилю

Научный консультант:  
Бисенбаев А.К., д.б.н.,  
академик НАН РК;

Зарубежный научный  
консультант:  
Сапарбаев М.К., PhD института  
Густава Русси  
(Вильжюиф, Франция)

Республика Казахстан  
Алматы, 2022

## СОДЕРЖАНИЕ

<b>ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ</b>	5
<b>ВВЕДЕНИЕ</b>	8
<b>1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ</b>	16
1.1 Ответ на повреждение ДНК	16
1.1.1 Повреждения ДНК, вызванные эндогенными и экзогенными факторами	16
1.1.2 Окислительное повреждение ДНК	17
1.1.2.1 Источники окислительного повреждения ДНК	17
1.1.2.2 Различные формы окислительного повреждения ДНК и их генотоксические эффекты	18
1.2 Пути репарации ДНК	21
1.2.1 Репарация повреждений оснований ДНК	21
1.2.1.1 Эксцизионная репарация основания (BER)	21
1.2.2 Репарация множественных и объемных повреждений оснований	22
1.2.2.1 Нуклеотидная эксцизионная репарация (NER)	22
1.2.2.2 Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR)	23
1.2.3 Репарация разрывов ДНК	24
1.2.3.1 Репарация одноцепочечных разрывов (SSBR)	24
1.1.3.2 Репарация двухцепочечных разрывов (DSBR)	24
1.3 НАД <sup>+</sup> и АДФ-рибозилирование	26
1.4 Семейство поли (АДФ-рибоза) полимеразы (PARP) млекопитающих	28
1.5 Ферменты деПАРилирования млекопитающих	31
1.5.1 Поли (АДФ-рибоза) гликогидролаза (PARG)	32
1.5.2 АДФ-рибозил-гидролазы (ARHs)	35
1.5.3 Макродоменные стиратели АДФ-рибозы	37
1.5.4 Фосфодиэфирные АДФ-рибозил-гидролазы	38
1.6 Модули чтения ПАР	39
1.6.1 Мотив PBM	40
1.6.2 Мотив PBZ	40
1.6.3 Макродомены	40
1.6.4 Мотив WWE	41
1.6.5 Домены распознавания фосфорилирования (BRCT/FHA)	41
1.6.6 Области взаимодействия с ДНК или РНК	42
1.7 Поли(АДФ-рибозил)ирование в растениях	43
1.7.1 Три канонических белка PARP у <i>Arabidopsis thaliana</i>	43
1.8 Растительные поли(АДФ-рибозы) гликогидролазы (PARG)	45
1.9 Роль растительных PARP в реакциях на повреждение ДНК и целостности генома	46
1.9.1 Участие PARP1 и PARP2 в различных путях реакции на повреждение ДНК у растений	47
1.9.2 PARP3 — ключевой компонент целостности генома семян	49

1.9.3	Связь растительных белков PARP с реакцией на повреждение ДНК	50
1.9.4	Растительные PARP модифицируют хромосомы	50
1.10	Роль растительных PARP в гибели, развитии и метаболизме клеток	51
1.11	Поли(АДФ-рибозил)ирование и реакция растений на абиотический стресс	52
1.12	Поли(АДФ-рибозил)ирование и реакция растений на биотический стресс	55
1.13	Неканонические белки домена PARP в ответ на стресс у растений	57
<b>2</b>	<b>МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	<b>61</b>
2.1	Бактериальные штаммы, плазмиды и реактивы	61
2.2	Олигонуклеотиды	62
2.3	Радиоактивное мечение олигонуклеотидов	65
2.4	Растительный материал	65
2.5	Бесклеточные экстракты <i>A. thaliana</i>	65
2.6	Экстракция геномной ДНК <i>A. thaliana</i>	65
2.7	Выделение тотальной РНК	66
2.8	Реакция обратной транскрипции (ОТ)	66
2.9	Полимеразная цепная реакция (ПЦР)	67
2.10	Сайт направленный мутагенез	68
2.11	Создание рекомбинантной плазмидной конструкции	68
2.12	Приготовление компетентных клеток <i>Escherichia coli</i>	69
2.13	Трансформация клеток <i>Escherichia coli</i>	70
2.14	Выделение плазмид методом щелочного гидролиза	70
2.15	SDS-ПААГ электрофорез	71
2.16	Экспрессия и очистка белков	71
2.17	Приготовление антител против AtPARP1/AtPARP2	71
2.18	Вестерн-блоттинг	72
2.19	Анализ активности поли(АДФ-рибоза)полимеразы	73
2.20	Гидролиз аддуктов АДФ-рибозилированной ДНК	73
2.21	Анализ структуры и состава PAR-ДНК аддуктов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии	73
2.22	Ауто- и ДНК АДФ-рибозилирование	74
2.23	Дотблот	74
<b>3</b>	<b>РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ</b>	<b>75</b>
3.1	Выделение и функциональная экспрессия His-меченных кДНК генов <i>AtPARP1</i> и <i>AtPARP2</i> в <i>E. coli</i>	75
3.2	Характеристика субстратной специфичности AtPARP1, AtPARP2 и AtPARP3 <i>A.thaliana</i> к олигонуклеотидным субстратам с разными конфигурациями и структурой 5' и 3'-концов	80

3.3	Конструирование каталитически инактивных AtPARP1 <sup>E960K, E960Q</sup> и AtPARP2 <sup>E614K</sup> форм белков и определение их ДНК ПАРилирующей активности	96
3.4	Изучение ауто (АДФ)-рибозилирующей активности AtPARP2	100
3.5	Анализ структуры и состава ПАР–ДНК аддуктов обработкой разными ферментами и идентификация их природы с помощью MALDI-TOF MS	102
3.6	Аддукты ПАР-ДНК в геномной ДНК растений после генотоксической обработки	111
	<b>ВЫВОДЫ</b>	114
	<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ</b>	116

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

- $O_2^-$  – Супероксидные радикалы  
ОН – Гидроксильный радикал  
 $ONO_2^-$  – Пероксинитрит  
AGT/MGMT – (O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase) O<sup>6</sup>-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза  
АДФ – Аденозиндифосфат  
АДФр – АДФ-рибоза  
АМФ – Аденозинмонофосфат  
АТР – Аденозинтрифосфат  
AIF – (Apoptosis-inducing factor) Фактор, индуцирующий апоптоз  
AP – (Apuric or apyrimidic) Апуриновая или апиримидиновая  
APE1 – (Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1) AP эндонуклеаза 1  
APLF – (Aprataxin and PNK-like factor) Апратаксин и PNK-подобный фактор  
APTX – (Aprataxin) Апратаксин  
ARN – (ADP-ribosylhydrolase) АДФ-рибозилгидролаза  
ART – (ADP-ribosyltransferase) АДФ-рибозилтрансфераза  
ARTD – (ADP-ribosyltransferase diphtheria toxin like) Дифтерийный токсиноподобный АДФ-рибозилтрансферазы  
АФК – Активные формы кислорода  
AtPARP1 – (*Arabidopsis thaliana* Poly (ADP-Ribose) Polymerase 1) *Arabidopsis thaliana* Поли (АДФ-рибоза) полимеразы 1  
AtPARP2 – (*Arabidopsis thaliana* Poly (ADP-Ribose) Polymerase 2) *Arabidopsis thaliana* Поли (АДФ-рибоза) полимеразы 2  
AtPARP3 – (*Arabidopsis thaliana* Poly (ADP-Ribose) Polymerase 3) *Arabidopsis thaliana* Поли (АДФ-рибоза) полимеразы 3  
BER – (Base excision repair) Эксцизионная репарация оснований  
BSA – (Bovine serum albumin) Альбумин бычьей сыворотки  
BRCA1/2 – (BREast CAncer 1/2) Ген рака молочной железы 1/2  
С – (Carbon) Углерод  
CIP – (Calf-intestinal alkaline phosphatase) Щелочная фосфатаза кишечника телят  
Cys – (Cysteine) Цистеин  
Da – (Dalton) Далтон  
DarG – (DNA ADP-ribose glycohydrolase) ДНК АДФ-рибозилгликогидролаза  
DarT – (DNA ADP-ribosyltransferase) ДНК АДФ-рибозилтрансфераза  
DBB – (DNA damage-binding protein) Белок, связывающий повреждение ДНК  
DDR – (DNA damage response) Ответ на повреждение ДНК  
ДНК – Дезоксирибонуклеиновая кислота  
DNA-PKcs – (DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit) ДНК-зависимая протеинкиназа, каталитическая субъединица  
POL β – (DNA polymerase β) ДНК полимеразы β  
dRP – (Deoxyribose phosphate) Дезоксирибозофосфат  
DSB – (Double stranded break) Двойной разрыв цепи  
дцДНК – Двухцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота

DTT – (Dithiothreitol) Дитиотреитол  
FEN-1 – (Flap endonuclease 1) Флэп эндонуклеаза 1  
Glu – (Glutamic acid) Глютаминовая кислота  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Пероксид водорода  
His – (Histidine) Гистидин  
HR – (Homologous Recombination) Гомологическая рекомбинация  
HMW – (High molecular weight) высоко молекулярная масса  
ICL – (Interstrand crosslinks) межцепочечные поперечные связи  
IPTG – (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) Изопропил D-галактопиранозид  
Ku70 – Кросс-комплементирующий белок для репарации X-ray 6  
Ku80 – Кросс-комплементирующий белок для репарации X-ray 5  
LIG1 – (DNA Ligase 1) ДНК-лигаза 1  
LMW – (Low molecular weight) Низко молекулярная масса  
Lys – (Lysine) Лизин  
MacroD1/2 – (MACRO Domain-Containing Protein 1/2) Белки, содержащие макродомены 1 и 2  
MALDI-TOF – (Matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight) Матричная лазерная десорбция/ионизация  
MAP – Моно (АДФ-рибоза)  
MDC1 – (Mediator of DNA damage checkpoint 1) Медиатор контрольной точки 1 повреждения ДНК  
MMR – (Mismatch repair) Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов  
Mut – Белок репарации ошибочно спаренных нуклеотидов  
MS среда – Murashige and Skoog среда  
НАД – Никотинамидадениндинуклеотид  
NER – (Nucleotide excision repair) Эксцизионная репарация нуклеотидов  
NHEJ – (Non-homologous DNA end joining) Негомологичное соединение концов  
НМН – Никотинамидмононуклеотид  
Нд – Нуклеотид  
NUDX – (Nucleoside diphosphates linked to x) Нуклеозиддифосфаты, связанные с фрагментом-Х  
оцДНК – Одноцепочечная дезоксирибонуклеиновая кислота  
P – (Phosphate) Фосфат  
ПААГ – Электрофорез в полиакриламидном геле  
ПАР – Поли (АДФ-рибоза)  
PARG – (Poly (ADP-ribose) glycohydrolase) Поли (АДФ-рибоза)гликогидролаза  
PARGi – Ингибитор PARG  
PARP – (Poly (ADP-ribose) polymerase) Поли (АДФ-рибоза) полимераза  
PBS – (Phosphate buffered saline) Фосфатно-солевой буфер  
PBZ – (PAR-binding zinc finger) ПАР-связывающий цинковый палец  
PEG – (Polyethylene glycol) Полиэтиленгликоль  
PK – (Proteinase K) Протеиназа К  
PNKP – (Polynucleotide kinase-phosphatase) Полинуклеотидкиназа фосфат  
П.о. – Пара оснований  
РОТ – Реакция обратной транскрипции

RAD51 – (DNA repair protein RAD51 homolog 1) Гомолог 1 белка репарации ДНК  
RAD51  
Rib – (Ribose) Рибоза  
РНК – Рибонуклеиновая кислота  
SAM – (Sterile alpha motif) Стерильный альфа-мотив  
SAP – (Putative DNA-binding motif) Предполагаемый ДНК-связывающий домен  
SDS – (Sodium dodecyl sulfate) Додецилсульфат натрия  
SOC – (Super Optimal broth with Catabolite repression) Супероптимальный бульон с катаболитной репрессией  
SSB – (Single stranded break) Одноцепочечный разрыв  
SROs – (Similar to RCD-one) Группа LIKE RCD-ONE растений  
SVPDE 1 – (Snake venom phosphodiesterases) Фосфодиэстераза змеиного яда 1  
TARG1 – (Terminal ADP-ribose glycohydrolase 1) Терминальная АДФр-протеингликогидролаза 1  
TBS – (Tris buffered saline) Трис-буферный раствор  
TDG – (Thymine-DNA glycosylase) Тимин ДНК-гликозилаза  
Tdp-1 – (Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1) Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза  
Tdt – (Terminal deoxynucleotidyl transferase) Терминальная дезоксирибонуклеотидилтрансфераза  
tRNA – (Transfer RNA) Транспортная РНК  
Trp – (Tryptophan) Триптофан  
UV – Ультрафиолетовый  
WB – (Western blot) Вестерн блот  
WT – (Wild type) Дикий тип  
WWE – Trp-Trp-Glu  
HEG – (Hexaethylene glycol) Гексаэтиленгликоль

## ВВЕДЕНИЕ

**Общая характеристика работы.** Диссертационная работа посвящена исследованиям PARP зависимого ковалентного поли (АДФ-рибозил)ирования ДНК субстратов в условиях *in vitro* и *in vivo*.

**Актуальность исследования.** Растения не могут изменять своё положение в грунте, и поэтому постоянно подвергаются воздействию экологических и генотоксических агентов, в том числе ультрафиолетовому и ионизирующему излучению. Кроме этого, растения непрерывно генерирует радикалы кислорода (АФК) в качестве побочных продуктов метаболических реакций, которые в относительно большом количестве синтезируются в митохондриях, хлоропластах, пероксисомах и на плазматических мембранах. Всё это, в первую очередь, действует на клеточную ДНК, вызывая её повреждения на уровне изменения азотистых оснований, сахаро-фосфатного остова и разрывов ДНК [1]. Если клетки неспособны обнаруживать и восстанавливать разрывы нитей ДНК, то это может привести к пагубным последствиям, таким как хромосомные aberrации, геномная нестабильность и гибель клеток. Сохранение целостности генома посредством восстановления повреждения ДНК имеет важное значение как в зародышевой, так и в соматических клетках [2–5].

Поли (АДФ-рибоза) полимераза (PARP) катализирует синтез полимеров АДФ-рибозы ковалентно-прикрепленные к акцепторным белкам. При этом донором остатков АДФ-рибозы выступает НАД<sup>+</sup> [6]. Использование биоинформационного подхода, позволило выявить ряд белков человека, имеющих очень высокую степень гомологии с каталитическим доменом PARP1. Все эти белки были объединены в семейство PARP, которое сейчас у млекопитающих насчитывается 17 представителей [7]. PARP белки могут оказывать значительное влияние на различные клеточные процессы, такие как транскрипция, деление клеток, репарация ДНК и целостность теломеров [5]. Однако, показано, что только PARP1 и PARP2 активируются в ответ на повреждения ДНК [8].

Геном *Arabidopsis thaliana*, широко используемого модельного растительного организма, кодирует по меньшей мере три предполагаемых PARP фермента: AtPARP1 (At4g02390), AtPARP2 (At2g31320) и AtPARP3 (At5g22470) [9]. Показано, что PARP растений являются структурно гомологичными к PARP белкам млекопитающих [9,10]. Высокая степень консервативности на уровне аминокислотной последовательности между ферментами арабидопсиса и млекопитающих позволяет предположить, что в растениях PARP выполняет аналогичные функции как в животных системах. Помимо структурных сходств, PARP растений также обладают ферментативной активностью функционально гомологичными PARP ферментам млекопитающих [9,10]. Как AtPARP1, так и AtPARP2 локализован в ядре и в присутствии ДНК с разрывами, прикрепляет остатки АДФ-рибоз от НАД<sup>+</sup> к себе (автомодификация) и к акцепторным белкам в условиях *in vitro* и *in vivo* [9]. Подобно животным PARP ферментам, активность PARP растений ингибируется ингибиторами PARP фермента, такими как 3-аминобензамид (ЗАВ) и 3-метоксибензамид (ЗМВ), которые использовались во



многих исследованиях [9]. Интересно что, в противоположность к животным, в арабидопсис *AtPARP2* обладает более высокой ферментативной активностью, чем *AtPARP1* [9]. Нокаутные по генам *parp* мутанты арабидопсиса жизнеспособны и имеют нормальный рост без каких-либо отклонений или аномальных побочных эффектов, которые затрудняли бы их использование для анализа физиологической роли поли(АДФ-рибозил)ирование (*ПАРилирование*) в растениях. Это, в дополнение к химическим ингибиторам PARP, предоставляет возможность для понимания механизмов ПАРилирования белков и их роли в различных биологических процессах на уровне всего организма.

В отличие от млекопитающих, значительно мало известно о ПАРилировании в растениях. Практически не известно об акцепторных белках поли(АДФ-рибозы) и белках, взаимодействующих с АДФ-рибозой. В растениях не обнаружены ПАРилированные белки, кроме гистонов и PARP. Идентификация новых акцепторных белков поможет понять регуляторную функцию ПАРилирования в развитии растений в стрессовых реакциях.

Известно, что PARP-катализируемое ПАРилирование ядерных белков требуется для регуляции репарации ДНК и транскрипции в контексте хроматина в ядрах эукариотических клеток [5,11,12]. У млекопитающих на долю PARP1 приходится 80-90% синтеза поли(АДФ-рибозы) в клетке после повреждения ДНК [13]. В частности, PARP1 катализируемое ауто-поли(АДФ-рибозил)ирование и модификация ядерных белков значительно усиливаются под действием ДНК повреждающих агентов [13]. Ковалентно прикрепленный полимер АДФ-рибозы со сложной разветвленной структурой дает отрицательный заряд PARP ферменту и гистонам, что приводит к ослаблению связи с ДНК и электростатическому отталкиванию этих белков от ДНК [14], [15]. Было высказано предположение, что при более низких уровнях повреждения клеточной ДНК, PARP регулируют репарацию ДНК путем рекрутирования белков в разрывы нитей и при более сильном повреждении ДНК, способствуют гибели клеток через процессы некроза, апоптоза [5,16].

Одной из наиболее известных ролей PARP является их функция в качестве сенсора повреждения ДНК. PARP1, в частности, связывается в ПАРилированной форме с одноцепочечными разрывами (SSB) и двуцепочечными разрывами ДНК (DSB), и привлекает белковую машину репарации ДНК в места повреждения ДНК [16,17]. PARP катализируемое ковалентное присоединение поли(АДФ-рибозы) (ПАР) к белкам является обратимым процессом, поскольку расщепление ПАР до мономеров АДФ-рибозы осуществляется ферментами поли(АДФ-рибоза)-гликогидролазами (PARG) [18], АДФ-рибозиларгинингидролазой 3 (ARH3) [19] и терминальной АДФ-гликогидролазами (TARG1) [20]. PARG является основной гликогидролазой ПАР в клетках млекопитающих, которая удаляет большую часть полимера ПАР, но оставляет единственную АДФ-рибозу, прикрепленную к белку. Этот остаток затем удаляется TARG1. Нокаутные по гену *PARG* мыши погибали [21], а дефицитные по гену *PARG* клетки проявляют повышенную гибель клеток и значительное нарушение процессов репарации повреждения ДНК и разрывов цепей [22], что указывает на

то, что генерация ПАРилированных макромолекул является высокотоксичным для клетки.

PARP растений играют аналогичную роль в реакциях клеток на генотоксический стресс. *AtPARP1* и *AtPARP2* мРНК мгновенно накапливаются в ответ воздействию гамма-излучения и активных форм кислорода (АФК). Белки локализуются в ядре, а экспрессия *AtPARP1* индуцируется в семязачатках *dna-lig1* мутантов, с нарушенным механизмом репарации ДНК [23]. Показано, что сверхэкспрессия *AtPARP2* приводила к снижению разрывов цепей ДНК в присутствии радикалов кислорода, тогда как подавление экспрессии *AtPARP1* увеличивало количество разрывов цепей ДНК [24]. После воздействия ионизирующего излучения наблюдалась активная экспрессия гена *AtPARP1* во всех органах растений. Однако количество белка увеличивалась только в активно пролиферирующих тканях [9]. Такая тканеспецифическая генерация *AtPARP1* белка в ответ на повреждение ДНК указывает на важную роль этого фермента в поддержании целостности ДНК во время репликации. Показано, что мутантные растения по генам *parp1* и *parp2*, по отдельности, были слегка чувствительны к повреждению ДНК, тогда как у мутантов по обоим генам значительно усиливалась чувствительность к ДНК повреждающим агентам [9].

Окислительное повреждение оснований ДНК, разрывы цепи ДНК с нелигируемыми концами и апуриновые/апиримидиновые (AP) сайты являются субстратом для двух пересекающихся путей репарации ДНК: эксцизионной репарации оснований (BER) и инцизионной репарации нуклеотидов (NIR) [20]. В классическом BER механизме репарации ДНК, ДНК-гликозилаза расщепляет N-гликозидную связь между поврежденным основанием и сахарофосфатным остовом, в результате образуются AP-сайты и/или однонуклеотидные разрывы в ДНК с 3'-блокирующими группами и 5'-фосфатной группой [21,22]. В NIR механизме репарации ДНК, AP-эндонуклеазы расщепляют сахарофосфатный остов ДНК с 5'-стороны от AP-сайта в одной цепи с образованием одноцепочечного разрыва с 3'-ОН группой и 5'-модифицированным концом [23]. Таким образом, разрывы цепей в ДНК могут быть генерированы под прямым действием АФК или как промежуточный продукт эксцизионной репарации оснований ДНК [25]. Отделение каталитического домена от ДНК связывающего домена PARP1 привело к ингибированию репарации одноцепочечных разрывов ДНК и увеличению чувствительности клеток к ДНК-повреждающим агентам. Эти наблюдения свидетельствуют о важной роли PARP в репарации как прямых разрывов нитей, так и разрывов нитей ДНК, образуемых в качестве промежуточных продуктов эксцизионной и инцизионной репарации ДНК в условиях *in vivo*.

Экзогенные и эндогенные оксидативные факторы в растениях (за счет фотосинтеза и аэробного дыхания) непрерывно вызывают повреждения в клеточной ДНК, следовательно, системы репарации ДНК должны быть в состоянии устранять повреждение клеточной ДНК в безошибочной манере и с большой эффективностью поддерживать стабильность генома. Оксидативный стресс в растениях помимо простых повреждений таких как окисленные основания ДНК, генерирует комплексные повреждения ДНК, которые включают

аддукты ДНК (циклопурины, экзоциклические ДНК аддукты), кластерные повреждения ДНК и разрывы ДНК с нелигируемыми концами [26], [27]. Показано наличие AP эндонуклеазной активности, которая способна расщеплять олигонуклеотидные дуплексы, содержащие альфа-аномерный 2'-дезоксиаденозин ( $\alpha$ dA) остаток в клетках алейрона пшеницы [28]. В нашей лабораторий впервые выделена и охарактеризована предполагаемая AP-эндонуклеаза *T. aestivum*, обозначенная как TaApe1L, которая является гомологом AP-эндонуклеазы человека (APE1) и AtApe1L *A. thaliana* [29]. Кроме этого, также впервые установлена участие AP-эндонуклеазы *A. thaliana* (ARP) в механизме инцизионной репарации нуклеотидов [30]. Эти AP-эндонуклеазы в ходе репарации ДНК генерируют разрывы ДНК с 3'-ОН группой и 5'-модифицированным концом. Кроме этого, растительный геном подвергается значительному изменению в характере метилирования цитозина во время развития и в ответ на факторы окружающей среды [5,8]. У *A. thaliana* ферменты семейства 5mC-ДНК гликозилаз, ROS1, DME, DML2, DML3 участвуют в регуляции импринтинга и сайленсинга генов [9]. Эти ферменты являются бифункциональными ДНК гликозилазами, поэтому помимо ДНК-гликозилазной активности, они обладают AP-лиазной активностью. Эти ферменты за счет ДНК гликозилазной активности вырезают метилированный цитозин (5mC), затем образованный в результате AP-сайт расщепляют с помощью реакции элиминации межнуклеозидных фосфатов при реакциях  $\beta$ -элиминации и/или  $\beta/\delta$ -элиминации. Конечным продуктом действия 5mC-ДНК гликозилаз являются разрывы ДНК с 5'-концевым фосфатом и 3'-концевым фосфо- $\alpha,\beta$ -ненасыщенным альдегидом (3'-РА), или образуется однонуклеотидный разрыв ДНК с 5'-концевым фосфатом и 3'-концевым фосфатом (3'-Р). Таким образом, активное деметилирование генома инициированное 5mC-ДНК гликозилазами в растениях приводит к образованию высоко генотоксичных разрывов цепей ДНК, содержащие нелигируемые 3'-блокирующие группы.

Эти данные указывают на то, что в геноме растений разрывы ДНК постоянно генерируются не только под прямым действием АФК, но и как промежуточный продукт репарации ДНК, а также во время регуляции развития растений и экспрессии генов.

Недавно, Talhaoui и коллеги обнаружили ранее неизвестное явление пост-репликативной модификации ДНК с помощью ПАРилирования концов разрывов ДНК. Эта реакция катализируется PARP1 и PARP2 ферментами млекопитающих в условиях *in vitro*. Было обнаружено, что PARP ферменты млекопитающих могут непосредственно АДФ-рибозилировать 5'- и 3'-концы ДНК-олигонуклеотидов. PARP1 предпочтительно катализирует ковалентное присоединяет остатки АДФ-рибозы к концам ДНК-дуплексов с одноцепочечным выступом, содержащих 3'-кордицепин, 5'- и 3'-фосфат, а также к 5'-фосфату одноцепочечного олигонуклеотида [31]. PARP2 предпочтительно АДФ-рибозилирует ДНК дуплексы с разрывом и/или брешью, содержащие 5'-фосфат на двуцепочечных концах. ПАР-гликогидролаза (PARG) восстанавливает структуру нативной ДНК путем гидролиза ПАРилированных ДНК-аддуктов. Биохимические и масс-спектрометрические анализы ДНК-аддуктов показало,

что PARP ферменты могут использовать 5'- и 3'-концы ДНК в качестве альтернативы к 2'-гидроксильной группе АДФ-рибозы и аминокислотным остаткам акцепторных белков для инициации ПАРилирования ДНК либо через 2',1"-О-гликозидную связь или через образование фосфодиэфирной связи между С1' атомом АДФ-рибозы и фосфором на конце ДНК-дуплекса.

В настоящее время нет прямых доказательств наличия ПАРилированных ДНК-аддуктов в условиях *in vivo*. Тем не менее, эффективная ПАРилирование разрывов ДНК в условиях *in vitro* очищенными рекомбинантными белками PARP указывает на то, что этот тип пост-репликативной модификации ДНК может также происходить в живых клетках. Авторы полагают, что в условиях *in vivo* PARP-катализируемая модификация ДНК может оказывать значительное влияние на различные клеточные процессы, такие как транскрипция, деление клеток, репарацию ДНК и т. д. [32]. Однако для уточнения этих предположений требуется дальнейшее исследование.

Учитывая высокую степень гомологии между PARP *A. thaliana* и млекопитающих, можно предположить, что PARP растений, так же как животные гомологи проявляют каталитическую активность по отношению к ДНК субстратам. Кроме этого, доступность генетических мутантов арабидопсиса дефицитных по генам *PARP1* и *PARP2* предоставляет возможность исследовать PARP1 и PARP2 зависимое ПАРилирование геномной ДНК в условиях *in vivo*.

В представленной диссертационной работе впервые исследованы PARP1 и PARP2 зависимое ковалентное Поли(АДФ-рибози)лирование ДНК субстратов в условиях *in vitro* и *in vivo* у *Arabidopsis thaliana*.

**Цель исследования.** Выделение и характеристика кДНК генов поли(АДФ-рибоза) полимераз *Arabidopsis thaliana* и детальное изучение субстратной специфичности рекомбинантных ферментов, а также изучение роли поли(АДФ-рибоза) полимераз *A. thaliana* в ковалентной модификации разрывов цепей ДНК в условиях *in vitro* и *in vivo*.

**Задачи исследования:**

1. Выделение и функциональная экспрессия кДНК генов, кодирующих AtPARP1, AtPARP2 и AtPARP3 *Arabidopsis thaliana* в *E. coli*.
2. Характеристика субстратной специфичности AtPARP1, AtPARP2 и AtPARP3 *A. thaliana* к олигонуклеотидным субстратам с разными конфигурациями и структурой 5' и 3'-концов. Изучение НАД<sup>+</sup> зависимости и чувствительности высокомолекулярных ПАР–ДНК аддуктов к обработке протеазе и ДНКазе.
3. Исследование роли консервативной триады «гистидин-тирозин-глутаминовая кислота (H-Y-E)» в каталитическом домене AtPARP в АДФ-рибозилирующей активности фермента.
4. Изучение ауто (АДФ)-рибозилирующей активности AtPARP2.
5. Анализ структуры и состава ПАР–ДНК аддуктов обработкой разными ферментами и идентификация их природы с помощью MALDI-TOF MS
6. Исследование Поли-(АДФ-рибозил)ирования геномной ДНК растений под действием генотоксического агента – блеомицина.

**Объект исследования.** AtPARP, *Arabidopsis thaliana*.

**Предмет исследования.** Изучение ковалентного поли (АДФ-рибозил)ирования концов разрывов ДНК катализируемое PARP белками *Arabidopsis thaliana* в условиях *in vitro* и *in vivo*.

**Методы исследования.** Выделение тотальных нуклеиновых кислот из арабидопсиса; Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле; Выделение мРНК; Обогащение мРНК на олиго-dT целлюлозе; Получения кДНК гена с помощью реакции обратной транскрипции (РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР); Амплификация кДНК генов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с применением сайт специфических паймеров; Элюирование ДНК из агарозного геля; Рестрикция наработанной ДНК и вектора; Лигирование вставляемого фрагмента ДНК и вектора; Приготовление компетентных дрожжевых клеток; Трансформация клеток бактерий; Скрининг трансформантов; Электрофорез белков в денатурирующих условиях в присутствии натрий додецилсульфата; Получение поликлональных антител; Иммуноблотинг с поликлональными антителами; Аффинная хроматография; Обработка растений генотоксичными агентами.

#### **Научная новизна исследования**

Выделена и дана характеристика кДНК генам *AtPARP1*, *AtPARP2* и *AtPARP3*. Проведена функциональная экспрессия *AtPARP1*, *AtPARP2* и *AtPARP3* с гистидиновым концом в *E. coli* и очистка рекомбинантного белка. Впервые показано, что очищенные рекомбинантные *AtPARP1* и *AtPARP2* *A. thaliana* превращают дуплексы олигонуклеотидов ДНК в высокомолекулярные продукты в присутствии НАД<sup>+</sup> за счет АДФ-рибозил трансферазной активности. Показано, что *AtPARP2* обладает высокой активностью АДФ-рибозилирования ДНК по сравнению с *AtPARP1*, но образует более короткие цепи, содержащие до 20 единиц АДФ-рибозы. Впервые показано, что *AtPARP3* не проявляет типичный для PARP ферментов АДФ-рибозилирующую активность, несмотря на его структурное сходство с *PARP3* и *PARP1* млекопитающих. Впервые показано, что *AtPARP1* предпочтительно модифицирует дуплексы с выступающей цепью, в меньшей степени, ДНК дуплексы с разрывом и брешью, тогда как *AtPARP2* предпочитает дуплексы с разрывом и брешью по сравнению с ДНК субстратом с выступающей цепью. Установлено, что высококонсервативный остаток глутаминовой кислоты в каталитической триаде *AtPARP1* и *AtPARP2* необходим для проявления поли (АДФ-рибозил)ирующей ДНК активности. Биохимический анализ структуры и состава аддуктов ПАР-ДНК, генерируемых *AtPARP1* и *AtPARP2*, показал, что, как и их аналоги у млекопитающих, *AtPARP* ферменты используют 5'-концевые фосфаты ДНК в качестве акцепторного остатка для ковалентного присоединения звена АДФ-рибозы для синтеза поли(АДФ-рибозы). Выявлен молекулярный механизм *AtPARP* катализируемого АДФ-рибозилирования ДНК, путем идентификации продуктов деградации ПАР-ДНК с помощью Nudix, NUDT16 гидролазы человека. Показано, что *AtPARP* ферменты переносят звено АДФ-рибозы к концевому фосфатному остатку ДНК на концах разрыва цепи для образования фосфодиэфирной связи между 5'Р ДНК и С1' АДФ-рибозы. Предполагаемая молекулярная структура аддукта АДФ-

рибоза-р-ДНК была дополнительно подтверждена с помощью MALDI-TOF MS-анализа АДФ-рибозилированных фрагментов ДНК.

### **Теоретическое и практическое значение работы**

Выделение и характеристика кДНК генов поли (АДФ-рибоза) полимераз растения *Arabidopsis thaliana* и изучение роли поли (АДФ-рибоза) полимераз *A. thaliana* в ковалентной модификации разрывов цепей ДНК *in vitro* и *in vivo* имеет огромное теоретическое значение для понимания механизмов репарации и пострепликативной модификации геномной ДНК растений. Идентификация ранее неизвестного явления пост-репликативной модификации ДНК с помощью ПАРилирования концов разрыва нитей ДНК в растениях обеспечит лучшее понимание механизмов иммунитета растений и стрессовых реакций, а также процессов развития растительного организма.

### **Основные положения, выносимые на защиту:**

- Поли (АДФ-рибоза) полимеразы AtPARP1 и AtPARP2 *Arabidopsis thaliana* осуществляют АДФ-рибозилирование концевых фосфатных остатков разрывов цепи ДНК.

- Поли (АДФ-рибоза) полимеразы 1 предпочтительно ПАРилирует углубленный дуплекс ДНК с предпочтением дуплексов Rec> Nick> Gap, в то время как Поли (АДФ-рибоза) полимеразы 2 эффективнее ПАРилирует дуплексы с разрывом и брешью с предпочтением дуплексов Nick> Gap> Rec.

- Ферменты AtPARP1 и AtPARP2 используют 5'-концевые фосфаты ДНК в качестве акцепторного остатка для ковалентного присоединения звена АДФ-рибозы для синтеза полимера ПАР с образованием фосфодиэфирной связи между 5'Р ДНК и С1' АДФ-рибозы.

- Белки AtPARP имеют структурное сходство с другими членами семейства PARP и содержит высококонсервативную каталитическую триаду «Н-У-Е» в своих доменах ART, в которой остаток глутаминовой кислоты необходим для ПАРилирования ДНК.

- AtPARP3 не проявляет АДФ-рибозилирующую активность.

**Связь с планом основных научных работ.** Диссертационная работа выполнена в рамках научных проекта AP05131478 «Изучение роли поли (АДФ-рибоза) полимераз *Arabidopsis thaliana* в ковалентной модификации концов разрывов в цепи ДНК *in vitro* и *in vivo*» Министерства образования и науки Республики Казахстан.

**Апробация работы.** Материалы диссертационной работы доложены:

- на международных научных конференциях студентов и молодых учёных «Фараби элемеі», КазНУ им. аль-Фараби, Алматы, 2018-2020 гг.;

- на международной конференции «European Biotechnology Congress» (2018 г., Афины, Греция);

- на международной виртуальной конференции «THE PARP FAMILY & ADP-RIBOSYLATION (Cold Spring Harbor Laboratory)» (2020 г. Нью Йорк, США).

**Публикации.** Основное содержание диссертации отражено в 10 печатных работах, в том числе 1 статья и 2 тезиса в журналах с ненулевым импакт-фактором входящим в базу данных Web of Science или Scopus, 4 статей в

республиканских научных изданиях, рекомендуемых ККСОН МОН РК, и 3 тезисов в материалах международных конференций.

**Структура диссертации.** Диссертация изложена на 141 страницах и состоит из обозначений и сокращений, введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, списка использованных источников литературы из 464 наименований из них 464 на английском языке; содержит 5 таблиц, 37 рисунков.

## 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Ответ на повреждения ДНК

Клеточная ДНК живых организмов подвержена к различного рода повреждениям, которые могут возникать эндогенно или индуцироваться различными внешними генотоксичными агентами, включая ультрафиолетовый свет, ионизирующее излучение и химические мутагены. Наиболее часто встречающиеся повреждения ДНК, часто вызванные неизбежными ошибками внутреннего метаболизма, — это модификации нуклеотидов, внутри- или межцепочечные поперечные связи и разрывы фосфодиэфирных связей. Если поврежденная ДНК не восстанавливается, у нее могут возникнуть трудности с правильной организацией, репликацией или транскрипцией. Нарушение таких важных молекулярных процессов влияет на функциональность клеток и может нарушать нормальное развитие всего организма [33,34]. Живые организмы развили сложную сеть механизмов обнаружения и восстановления повреждений ДНК, предназначенных для обеспечения их геномной стабильности за счет удаления повреждений ДНК и восстановления исходной генетической информации [35,36].

Принято считать, что выбор пути репарации и его действие в первую очередь зависят от типа клетки, статуса ее пролиферации, стадии клеточного цикла, а также от типа повреждения и его геномного контекста [37]. Действительно, было показано, что общие внешние факторы, такие как световой режим, температура или доступность воды, определяют специфическую активацию и эффективность определенных путей репарации ДНК [38–40].

#### 1.1.1 Повреждения ДНК, вызванные эндогенными и экзогенными факторами

С момента своего происхождения геномы всех организмов подвергаются вредному воздействию нескольких факторов окружающей среды и метаболизма. Повреждения ДНК можно разделить на два типа в зависимости от их происхождения: эндогенные и экзогенные. Эндогенные повреждения ДНК в основном происходят из-за ошибок, возникающих во время репликации ДНК, из-за ошибок в распределении хромосом в мейозе или митозе или из-за старения ДНК, вызванного алкилированием или активными формами кислорода, полученными в результате клеточного метаболизма [41]. С другой стороны, экзогенное повреждение ДНК возникает, когда экологические, физические и химические агенты, такие как ультрафиолетовое и ионизирующее излучения, алкилирующие агенты и сшивающие агенты, повреждают молекулы ДНК [42].

В зависимости от факторов воздействующих на организм, повреждения ДНК делятся на две основные категории: одноцепочечные и двухцепочечные. Первая категория состоит из повреждений, нарушающих только одну цепь ДНК, таких как окисление или алкилирование оснований, потеря оснований, аддукты ДНК, внутрицепочечные поперечные связи, фотопродукты ДНК и одноцепочечные разрывы ДНК (SSB). Вторая категория включает повреждения, поражающие обе нити ДНК, такие как межцепочечные поперечные связи и



двухцепочечные разрывы ДНК (DSB), причем последние являются наиболее тяжелым типом повреждения ДНК в эукариотическом геноме (рисунок 1).

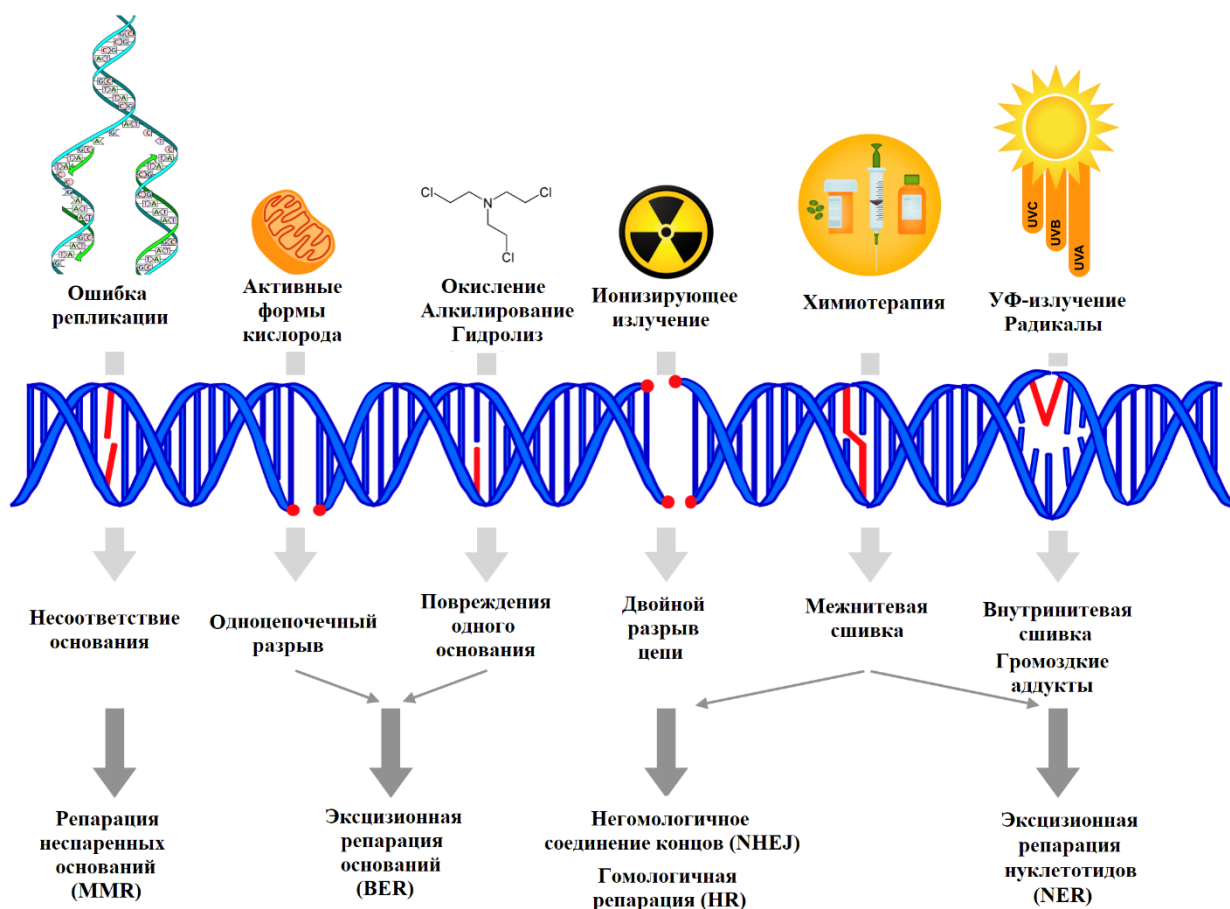


Рисунок 1 – Схематическое изображение основных повреждений ДНК, вызванных различными внешними и эндогенными факторами, и типов механизмов репарации ДНК, используемых для их удаления из эукариотического генома.

## 1.1.2 Окислительное повреждение ДНК

### 1.1.2.1 Источники окислительного повреждения ДНК

Повреждение ДНК, вызванное воздействием активных форм кислорода, является одной из основных причин распада ДНК у большинства организмов. В результате метаболических процессов, происходящих в хлоропластах, митохондриях и пероксисомах, растения постоянно продуцируют АФК [1]. Синглетный кислород ( $^1\text{O}_2$ ) и радикал супероксида ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) являются двумя побочными продуктами АФК, продуцируемыми хлоропластами во время фотосинтеза, тогда как перекись водорода ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) и  $\text{O}_2^{\cdot-}$  являются основными видами, продуцируемыми пероксисомами [43,44]. Большая часть синтеза АФК происходит в темное время суток в митохондриях, которые в основном продуцируют  $\text{O}_2^{\cdot-}$  за счет чрезмерного восстановления электрон-транспортной цепи [45]. Один из первичных механизмов образования АФК, НАДФН-оксидазная система в плазматической мембране, генерирует  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , который

участвует в ряде физиологических событий, включая «окислительный взрыв», происходящий во время воздействий патогенов на организм [46]. В дополнение к эндогенным механизмам воздействие внешних загрязнителей, включая озон [47], ультрафиолетовый свет [48] и небольшое количество ионизирующего излучения [49], может вызывать образование АФК.

Способность различных АФК вызывать клеточное повреждение в значительной степени зависит от их периода полувыведения, реактивности и диффузионной способности. Остальные АФК имеют невероятно короткие периоды полураспада, в отличие от  $\text{H}_2\text{O}_2$ , концентрация которого в растительных клетках может достигать микромолярной концентрации [50]. Супероксиддисмутазы могут катализировать превращение  $\text{O}_2^{\cdot-}$  в  $\text{H}_2\text{O}_2$ , и вполне вероятно, что  $\text{H}_2\text{O}_2$  действует как инертная диффундирующая молекула, которая может производить реакционноспособный  $\cdot\text{OH}$  посредством катализа свободных ионов переходных металлов [51]. Наиболее реакционноспособная первичная АФК, гидроксильный радикал, окисляет все известные биомолекулы со скоростью, ограниченной диффузией. Было подсчитано, что среднее расстояние диффузии до того, как  $\cdot\text{OH}$  воздействует с клеточным компонентом, составляет всего 3 нм [52]. В результате чтобы окислить ДНК,  $\cdot\text{OH}$  должен находиться в непосредственной близости от нее.

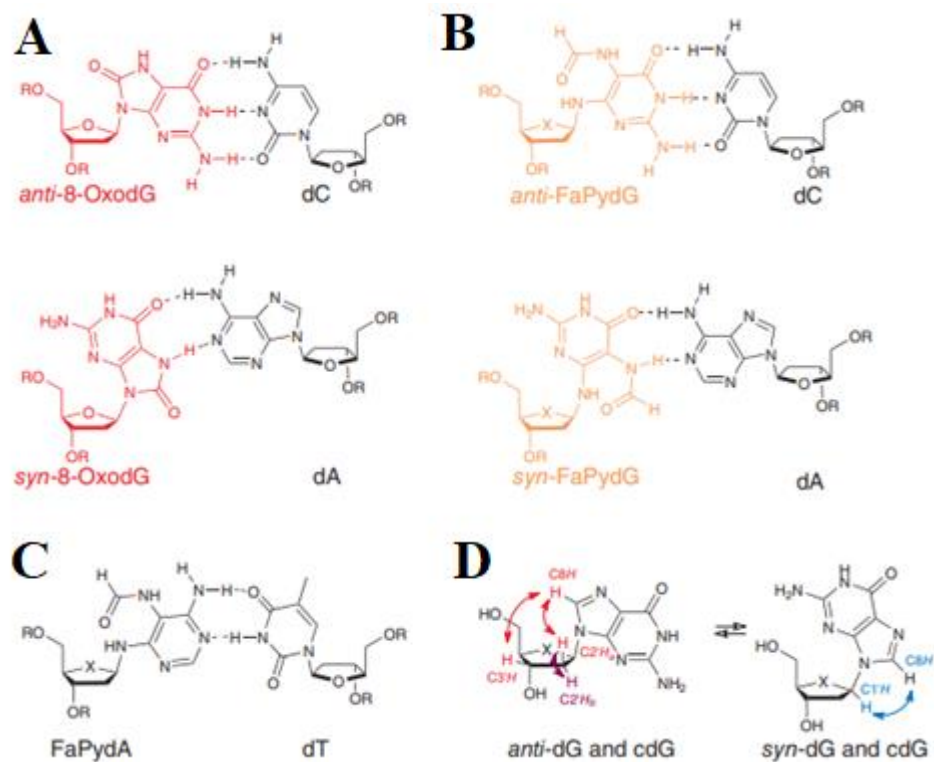
В конце концов, баланс между продукцией АФК в клетке и процессами детоксикации определяет величину цитотоксического повреждения, вызванного АФК. L-аскорбиновая кислота (витамин С), глутатион,  $\alpha$ -токоферол (витамин Е) и каротиноиды — это лишь некоторые из многочисленных низкомолекулярных антиоксидантов, которые растения производят в изобилии в дополнение к ферментативной защите от АФК [53]. Для сбалансированного ответа на образование АФК эти крошечные антиоксиданты могут иметь решающее значение. В результате мутанты арабидопсис с дефицитом аскорбиновой кислоты имели гиперчувствительность к озону, диоксиду серы и УФ-В излучению [54].

#### 1.1.2.2 Различные формы окислительного повреждения ДНК и их генотоксические эффекты

Окислительное повреждение ДНК приводит к измененным основаниям и разрушенным остаткам сахара, которые фрагментируются и вызывают разрывы цепей. В то время как повреждение сахара в основном возникает в результате отщепления водорода от дезоксирибозы, окислительная атака на основания ДНК часто включает добавление  $\text{OH}$  к двойным связям.

Двойная связь C5-C6 атакуется гидроксильным радикалом со скоростью, контролируемой диффузией, с образованием 5-гидрокси-6-ильного и 6-гидрокси-5-ильного радикалов, которые затем реагируют, образуя различные стойкие повреждения ДНК. Производные с насыщенным кольцом, такие как тимингликоль, 5,6-дигидротимин и цитозингликоль, являются одними из основных продуктов окисления пиримидинов [55–57]. Продукты цитозина могут превращаться в производные урацила; например, цитозингликоль можно дезаминировать для получения урацилгликоля, а также дезаминировать и

дегидратировать для получения 5-гидроксиурацила [57,58]. Пиримидиновое кольцо может быть фрагментировано в дополнение к насыщению или окислению с образованием метилтартронилмочевины, 5-гидроксигидантоина, N-формамидо-мочевины или мочевины [57,59]. Пуриновые нуклеозиды dG и dA особенно уязвимы к окислительной деградации из-за их сравнительно низкого окислительного потенциала [59–61].



(A) Для 8-oxodG показаны кристаллографически наблюдаемые пары оснований 8-oxodG·dC и 8-oxodG·dA. (B, C) Кроме того, изображены предполагаемые пары оснований, образованные FaPydG и FaPydA. В природных повреждениях FaPy X = O, тогда как в стабилизированных карбоциклических аналогах FaPydG (B) и FaPydA (C) X = CH<sub>2</sub>. (D) Изображение взаимодействий в пространстве между C8H и протонами сахара в антиконформере (красный) и син-конформере (синий).

Рисунок 2 – Представление двух основных продуктов окисления 2'-дезоксигуанозин (8-oxodG, FaPydG) и FaPydA.

Примечание – Составлено автором на основе источника [62].

Формируются два основных типа поражений (рисунок 2). Два повреждения 8-оксотипа, 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксиаденозин (8-oxodA) и 8-оксо-7,8-дигидро-2'-дезоксигуанозин (8-oxodG), характеризуются окисленным атомом C8. Кроме того, атом N7 несет атом водорода, который меняет свое положение с акцептора водородной связи на донора водородной связи. Второй класс окислительных повреждений представляет собой 4,6-диамино-5-

формами допиримидиновые повреждения с открытым кольцом FaPydA и FaPydG, которые имеют формамидную группу, которая может образовывать множество различных водородных связей (рисунок 2).

В дополнение к прямому окислению основаниям ДНК также может быть причинен косвенный вред из-за взаимодействия с реактивными побочными продуктами АФК на другие макромолекулы. Перекисное окисление липидов, которое происходит, когда кислородные радикалы атакуют остатки полиненасыщенных жирных кислот мембранных фосфолипидов, является одной из основных причин такого непрямого окислительного повреждения [63]. Малоновый диальдегид, акролеин и кротоновый альдегид являются тремя наиболее распространенными реакционноспособными продуктами перекисного окисления липидов. Аддукт пиримидопуринона, известный как M1G, создается, когда малоновый диальдегид взаимодействует с остатками G в ДНК [64]. Этноизменения оснований ДНК, такие как этено-А и этено-С, производятся акролеином и кротоновым альдегидом [65].

Воздействие АФК на ДНК, приводящая к одноцепочечным разрывам происходит путем удаления атома водорода из положения С4' дезоксирибозы, что приводит к образованию радикала дезоксирибозы, который затем вступает в реакцию, вызывая разрывы одной цепи ДНК [66]. Однако двухцепочечные разрывы (DSB) также могут быть результатом окислительного повреждения ДНК, вызванного ионизирующим излучением, из-за образования кластеров радикалов, которые повреждают соседние участки на обеих цепях [49].

В зависимости от степени структурных изменений, которым подверглась исходная основа, окислительные повреждения имеют различные генотоксические эффекты. В то время как окисленные пиримидины, которые сохраняют интактное кольцо, такие как дигидротимин, как правило, не препятствуют синтезу ДНК и легко обходят ДНК-полимеразы [67], крайние формы окисления пиримидинов, такие как мочевины, служат серьезными барьерами для репликации ДНК [68]. А также разрывы цепей, возникающие в результате окислительной атаки на дезоксирибозу, всегда являются блокирующим препятствием для вилки репликации и механизма транскрипции [69].

В ходе эволюции у организмов развились сложные сигнальные пути, опосредующие повреждение ДНК, распознающие и активирующие механизмы репарации, а также различные пути репарации ДНК [70]. За некоторыми исключениями [70,71], растения имеют общие механизмы репарации ДНК, которые ранее были описаны в других эукариотических системах, таких как дрожжи и млекопитающие [72]. Подобно животным, некоторые из механизмов репарации сильно сфокусированы на специфическом повреждении (фотореактивация), в то время как другие пути репарации, такие как эксцизионная или рекомбинация, отвечают за коррекцию различных повреждений [73].

## 1.2 Пути репарации ДНК

Сенсорные белки инициируют локализацию факторов ответа на повреждение ДНК (DDR) в местах повреждения ДНК, напрямую распознавая специфические повреждения ДНК и активируя DDR [74]. Даже в отсутствие повреждений ДНК сенсорные белки, принудительно прикрепленные к хроматину, вызывали каскад DDR в клетках дрожжей и млекопитающих [75,76]. Следующим уровнем репарации ДНК является регулируемое DDR рекрутирование факторов в места повреждения ДНК. Сборка каскада DDR зависит от широкого спектра посттрансляционных модификаций, индуцированных активацией ответа на повреждение ДНК, – фосфорилирование, убиквитинирование, сумоилирование, поли(АДФ-рибозилирование), ацетилирование, метилирование [77]. Большое разнообразие белковых доменов специфически распознает эти посттрансляционные модификации, многие из которых также опосредуют рекрутирование в места повреждения ДНК.

Тип повреждения, нанесенного структуре ДНК, определяет различные стратегии репарации для восстановления потерянной информации. Там, где это возможно, клетки будут использовать немодифицированную комплементарную цепь ДНК или сестринскую хроматиду в качестве матрицы для восстановления исходной ДНК и так далее. В зависимости от этого существуют разные пути репарации ДНК: (1) путь репарации ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR), (2) путь эксцизионной репарации нуклеотидов (NER), (3) путь эксцизионной репарации оснований (BER), (4) путь гомологичной рекомбинации (HR); и (5) путь негомологичного соединения концов (NHEJ).

### 1.2.1 Репарация повреждений оснований ДНК

#### 1.2.1.1 Эксцизионная репарация основания (BER)

BER исправляет такие формы повреждения ДНК, как окислительное, дезаминирование, алкилирование и одноосновное повреждение абазического сайта, которые существенно не искажают спираль ДНК. BER в основном активен в фазе G1 клеточного цикла [78]. Запуск процесса BER сопровождается распознаванием повреждений ДНК-гликозилазой [79]. Поврежденные основания недеформированных спиралей и вывернутые из большой бороздки могут быть распознаны и вырезаны по крайней мере 11 различными ДНК-гликозилазами [80,81]. ДНК-гликозилазы обладают либо гликозилазной активностью, такой как урацилгликозилаза, N-метилпурин-ДНК-гликозилаза (MPG) и MutY Homolog (MUTYH), либо гликозилазной и дополнительной β-лиазной активностью, такой как Nth-подобная ДНК-гликозилаза 1 (NTHL1), Nei-подобная ДНК-гликозилаза 1 (NEIL1) и Nei-подобная ДНК-гликозилаза 2 (NEIL2) [82]. Некоторые гликозилазы, такие как 8-оксогуанин ДНК-гликозилаза (OGG1) и NEIL3, функционируют как моно- и бифункциональные гликозилазы [83]. Абазический сайт, созданный монофункциональными гликозилазами, восстанавливается короткими участками, в то время как двойные гликозилазы инициируют длинный путь восстановления BER [78].

Короткий участок (short patch) осуществляется ферментом AP-эндонуклеазой (APE1 в клетках человека), субстратом которого является

абазический участок. Этот фермент расщепляет 5'-фосфодиэфирную связь с абазическим участком и, таким образом, образует гидроксильный остаток на 3'-конце, оставляя фосфат дезоксирибозы dRP на 5'-конце. Образующийся гэп адаптируется за счет 5'-dRP-лиазной активности POL  $\beta$  с последующим заполнением однонуклеотидного гэпа POL  $\beta$  лигированием LIG1 (ДНК-лигаза 1) или комплексом LIG3 (ДНК-лигаза 3) и XRCC1 (кросс-комплементирующий белок 1 для восстановления с помощью рентгеновских лучей) [84]. Во время репарации длинных участков остающийся после бифункциональной гликозилазной брешы настраивается за счет 3'-фосфодиэстеразной активности APE1. Этот разрыв затем синтезируется с помощью POL  $\beta$  (в непролиферирующих клетках) или POL  $\delta/\epsilon$  (в пролиферирующих клетках) методом смещения цепи с последующим удалением флэп-эндонуклеазы и лигированием, опосредованным LIG1 [83,84].

Было показано, что PARP1 (поли (АДФ-рибоза) полимеразы 1) необходим для восстановления одноцепочечных разрывов и поврежденных пуриновых оснований в субпути BER [81,85]. Наконец, также известно, что митохондрии выполняют как короткие, так и длинные участки BER, где этап синтеза выполняется с помощью POL  $\gamma$  [86,87].

## 1.2.2 Репарация множественных и объемных повреждений основания

### 1.2.2.1 Нуклеотидная эксцизионная репарация (NER)

Эксцизионная репарация нуклеотидов – наиболее универсальная система репарации ДНК [88]. В отличие от BER, субстратом NER являются массивные повреждения ДНК, приводящие к искажению спирали ДНК, такие как циклобутан-пиримидиновые димеры (CPD) или пиримидин-(6-4)-пиримидиновые фотопродукты (6-4PP), а также полициклические ароматические углеводы, содержащиеся в табачном дыме и сшивающих агентах [89–91].

Нарушения функции NER приводят к ряду различных синдромов у человека: пигментная ксеродермия (XP); синдром Коккейна (CK); синдром чувствительности к ультрафиолету (УВСС); и церебро-окуло-фацио-скелетный синдром (COFS) [69,92]. Чтобы инициировать NER, ремоделирование хроматина, опосредованное как компонентами хроматина, так и NER, уступает место механизму NER при определенных повреждениях ДНК [93]. Существует два основных типа NER: глобальная геномная NER (GG-NER) и NER связанная с транскрипцией (TC-NER).

Белок XPC (Xeroderma Pigmentosum, группа комплементации C) в комплексе с белками RAD23B (белок УФ-эксцизионной репарации, чувствительный к излучению 23B) и белками CETN2 (Centrin 2) является сенсором повреждения ДНК в GG-NER. После этого комплекс сканирует поврежденную одноцепочечную ДНК (оцДНК) с нарушенным спариванием оснований из-за повреждения [94,95]. Для репарации УФ-индуцированного CPD белковый комплекс UV-DDB, состоящий из DDB1 (ХРЕ-связывающий фактор) и GG-NER-специфического белка DDB2, связывается с поврежденной ДНК, и только после этого присоединяется к XPC [96,97]. Фактор инициации

транскрипции П Н (TFIIH) и репарационные комплексы затем связываются с ХРС, который может переключать функции как при инициации транскрипции, так и при NER [98–100]. Последний этап двойного удаления и заполнения пробелов координируется для предотвращения образования пробелов в одноцепочечной ДНК [101–103].

На этапе разреза GG-NER специфичные эндонуклеазы XPF-ERCC1 и XPG (также известные как ERCC5) разрезают поврежденную цепь с 5'- и 3'-конца поражения соответственно [104]. Заполняющий пробел синтез и лигирование осуществляются репликационными белками PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток), RFC (фактор репликации C), POL  $\delta$ , POL  $\epsilon$  или POL  $\kappa$  и LIG1 или XRCC1–LIG3. Пролиферативный статус клеток определяет, какая полимеразы будет использоваться. Например, POL  $\epsilon$ -зависимая репарация является основной в нереплицирующихся клетках, тогда как POL  $\delta$  и POL  $\kappa$  преобладают в реплицирующихся клетках. Лигирование с помощью LIG1 происходит в реплицирующихся клетках. Однако в непроделирующихся клетках из-за низкой экспрессии dNTP и LIG1 лигирование происходит с помощью комплекса XRCC1-LIG3 [105].

Путь TC-NER инициируется РНК-полимеразой II, которая запускает рекрутирование TC-NER-специфических комплексных белков CSA (синдром Коккейна, повторяющийся белок А) и CSB (белок В синдрома Коккейна). Они отвечают за сборку других компонентов, таких как основные факторы NER (за исключением GG-NER-специфических комплексов UV-DDB и ХРС) и TC-NER-специфических белков, таких как UVSSA (стимулируемый УФ-излучением каркасный белок А), USP7 (убиквитин-специфическая процессинговая протеаза 7), XAB2 (ХРА-связывающий белок 2) и HMG1 (высокоподвижный групповой нуклеосомосвязывающий домен, содержащий белок 1) [106]. После локализации комплекса CSA-CSB в местах повреждения, РНК-полимераза II отступает, а на ее место рекрутируется TFIIH. Последующие цепочки событий такие же, как и в GG-NER, поскольку повреждение удаляется из транскрибируемой цепи [107].

#### 1.2.2.2 Репарация ошибочно спаренных нуклеотидов (MMR)

MMR – это высококонсервативный путь пострепликативной репарации, обеспечивающий как минимум 100-кратную точность репликации [108,109]. Репликативные несовпадения оснований и петли делеции – вставки (IDL) в повторяющихся последовательностях ДНК являются субстратами пути MMR [69,110]. MMR также участвует в таких процессах, как мейотическая и митотическая рекомбинация, передача сигналов о повреждении ДНК, апоптоз и т.д. [110–112]. Мутации в генах MMR приводят к синдрому Линча, также известному как наследственный неполипозный колоректальный рак или HNPCC [113]. Было показано, что при модификации хроматина белки MMR получают доступ к повреждениям ДНК и инициируют репарацию [114,115].

У человека есть гетеродимер MutS $\alpha$  (MSH2/MSH6) для распознавания несовпадений оснований и IDL, состоящих из одного-двух нуклеотидов, и гетеродимер MutS $\beta$  (MSH2/MSH3) для распознавания больших IDL [116,117]. Было показано, что при несоответствии оснований MutL может захватывать

MutS до того, как он образует скользящий зажим [118], после чего комплексы MutL рекрутируются в ДНК [119]. MutL $\alpha$  обладает эндонуклеазной активностью и через EXO1 (экзонуклеаза 1) в зависимости от PCNA/RFC играет роль в 3'-разрыв-направленном расщеплении [120,121]. EXO1 дополнительно выполняет 5'-направленное удаление несоответствующих оснований, создавая брешь [120,122], который синтезируется и лигируется POL  $\delta$ , RFC, HMGB1 (белок группы 1 с высокой подвижностью) и LIG1 [122–124]. Также PCNA играет важную роль как на этапе инициации MMR, так и в последующем синтезе ДНК путем взаимодействия и локализации комплексов MutS $\alpha/\beta$  и MutL $\alpha$  в пораженном месте [110,125].

### 1.2.3 Репарация разрывов ДНК

#### 1.2.3.1 Репарация одноцепочечных разрывов (SSBR)

Одноцепочечные разрывы (SSB) часто образуются из-за последующих повреждений, таких как окислительное повреждение ДНК, абазические сайты или из-за ошибочной активности фермента ДНК-топоизомеразы 1 (TOP1) [126,127]. Нерепарированные SSB приводят к нарушению репликации ДНК, остановке текущей транскрипции и активации PARP1, который высвобождает НАД<sup>+</sup>, АТФ и фактор, индуцирующий апоптоз (AIF) в клетках [128]. Было предложено что в зависимости от источника SSB SSBR будет происходить тремя различными способами.

Путь длинного участка SSBR опосредован PARP1, который временно обнаруживает SSB и подвергается быстрому циклу поли(АДФ-рибозил)ирования и деполи(АДФ)рибозилирования для обнаружения следующего SSB [129]. После этого апурин-апиримидин эндонуклеаза 1 APE1, RNKP (полинуклеотидкиназа 3'-фосфат) и апратаксин (APTX) подвергаются процессингу [12]. Затем 5'-концы повреждения, вызванные PARP1 и PCNA, удаляются с помощью FEN1, что создает разрыв в одноцепочечной ДНК. После этого полученная брешь заполняется POL  $\beta$  в сочетании с POL  $\delta/\epsilon$ . На последнем этапе последовательность лигируют с LIG1 в присутствии PCNA и XRCC1 [12,130]. Путь коротких участков SSBR протекает так же, как и восстановление длинных участков путем распознавания SSB, генерируемых во время BER, с помощью APE1, за которым следует аналогичный путь процессинга концов, за исключением этапа заполнения пробелов, выполняемого ферментом POL  $\beta$ , за которым следует лигирование LIG3 [12]. Наконец, в пути TOP1-SSB, который является вариантом PARP1-зависимой репарации больших длин, процессинг концов осуществляется ферментом TDP1 (тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1), который удаляет TOP1 с 3'-конца [131].

#### 1.2.3.2 Репарация двухцепочечных разрывов (DSBR)

Двухцепочечные разрывы ДНК (DSB) являются одними из многих типов повреждений ДНК, вызванных ионизирующим излучением, радиомиметическими химическими веществами или активными формами кислорода, а также во время репликации ДНК, когда полимеразы сталкиваются с одноцепочечным повреждением в репликационной вилке [132]. Существует два



основных пути разрешения DSB – гомологичная рекомбинация (HR) и негомологичное соединение концов (NHEJ). В присутствии DSB происходит модификация хроматина и запускается каскад событий, включая целенаправленное фосфорилирование H2AX путем активации ATM, ПАрирование хроматина, рекрутирование MDC1, 53BP1 и BRCA1 [133–137].

53BP1 играет важную регуляторную роль в пути NHEJ DSB, привлекая компоненты NHEJ к месту разрыва, активируя передачу сигналов контрольной точки, облегчая связывание двух концов [138]. DSB сначала распознаются и в течение нескольких секунд связываются с гетеродимером Ku (Ku70 и Ku80), чтобы предотвратить делецию концов и имеют тенденцию рекрутировать другие компоненты NHEJ в качестве каркаса [139–141]. Также рекрутируются другие компоненты, такие как DNA-PKcs, XRCC4, LIG4 и XLF (XRCC4-подобный фактор), APLF (апратаксин-и-PNK-подобный фактор) [142–144]. Было показано, что эти компоненты могут рекрутироваться в определенном порядке в зависимости от сложности повреждения ДНК; например, рекрутирование DNA-PKcs зависит от характера разрыва [139,145]. Однако, как только DNA-PKcs рекрутируется, он внедряет Ku в ДНК, а затем фосфорилирует другие близлежащие компоненты, включая само аутофосфорилирование [143]. В то же время считается, что XRCC4 стабилизирует комплекс NHEJ, связывая концы и привлекая другие компоненты наряду с Ku [146–148]. Процессинг концов ДНК инициируется Artemis, PNKP, APLF, WRN, Aprataxin и Ku после соединения и стабилизации концов [149–153]. Синтез бреши, оставшихся после удаления концов, осуществляется полимеразми семейства X матрично-зависимым (POL  $\mu$ ) или матрикс-независимым (POL  $\lambda$ ) образом [154,155]. Процесс NHEJ завершается соединением концов с помощью LIG4 [156].

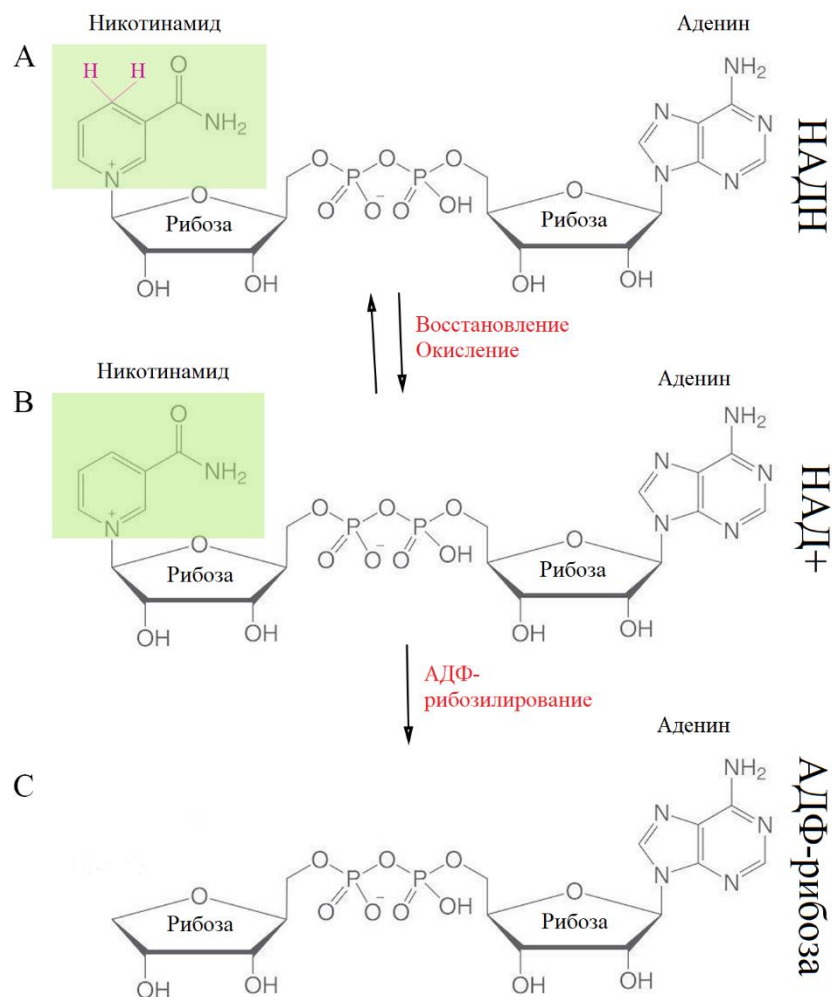
DSB распознаются и связываются комплексом MRN (MRE11-RAD50-NBS1), чтобы инициировать путь HR, который затем рекрутирует ATM и TIP60 в ДНК [154,155]. Активированный ATM (из TIP60) фосфорилирует H2AX и MDC1 [157]. Затем фосфорилированный MDC1 рекрутирует убиквитин E3 лигазы RNF8 и RNF168 [158]. Затем H2AX убиквитинируется этими лигазами E3, способствуя стыковке 53BP1 и BRCA1. В фазе S/G2, где преобладает HR, BRCA1 (рекрутируемый убиквитинированным хроматином) противодействует 53BP1 и инициирует убиквитинирование CtIP [159,160].

Для создания 3'-выступов первоначальная резекция происходит за счет эндонуклеазной активности MRN с CtIP, после чего следует резекция на большом расстоянии с помощью EXO1 или BLM вместе с DNA2 [161,162]. Затем RPA и RAD51 генерируют нуклеопротеиновую цепь в 3'-выступающем сайте. BRCA2 и PALB2 образуют нуклеопротеиновую цепь, которая проникает в близлежащий дуплекс ДНК, образуя D-петлю [163,164]. Удаление RAD51 с помощью RAD54 и RAD54B позволяет полимеразам  $\delta$ ,  $\kappa$  и  $\nu$  начать синтез с использованием 3'-ОН группы [165,166]. Если синтез новой ДНК прекращается через определенное расстояние, то D-петля растворяется ферментом RTEL1 [167]. Если же этого не происходит, то соединение Холлидея обрабатывается сборкой комплекса BLM-ТОРОIII-RMI1-RMI2, эндонуклеазы GEN1, комплекса MUS81-EME1 и комплекса SLX1-SLX4 [168–172].

ДНК постоянно подвергается воздействию эндогенных и экзогенных агентов, которые ее повреждают, в таком случае нерепарированные повреждения ДНК могут привести к заболеваниям и раку. Однако надежные пути репарации ДНК и толерантности к повреждениям помогают удалить или перенести повреждение, чтобы обеспечить выживание. Понимание этих путей помогает оценить возможные токсические эффекты и разработать стратегии контроля вредного воздействия на организм [173].

### 1.3 НАД<sup>+</sup> и АДФ-рибозилирование

Никотинамидадениндинуклеотид – важная органическая молекула, обнаруженная во всех живых организмах. Он состоит из двух моонуклеотидов, аденозин-5'-монофосфата (АМР) и никотинамидмоонуклеотида (NMN), соединенных фосфодиэфирной связью. Установлено, что НАД<sup>+</sup> служит коферментом клеточных окислительно-восстановительных реакций, катализируемых оксидоредуктазами, переносит электроны на пиридиновое кольцо никотинамидного основания [32]. Таким образом, в клетках НАД<sup>+</sup> существует в двух состояниях: в окисленной форме НАД<sup>+</sup> действует как окислитель и отбирает электроны у другой молекулы, а восстанавливаясь в НАДН – служит восстановителем и отдает электроны (рисунок 3). Основное поле действия НАД<sup>+</sup> – реакции, связанные с переносом электронов, однако НАД<sup>+</sup> выполняет в клетке и другие функции, в частности, служит субстратом для ферментов, удаляющих или присоединяющих химические группы к белкам в ходе посттрансляционных модификаций. В связи с важностью функций НАД<sup>+</sup> ферменты, участвующие в его метаболизме, являются мишенями для поиска новых лекарственных средств. Одними из таких ферментов, использующих НАД<sup>+</sup> в качестве вспомогательного субстрата, являются трансферазы. Эти реакции переноса включают аденилирование и АДФ-рибозилирование, при которых фосфодиэфирная связь и N-гликозидная связь расщепляются в присутствии никотинамида соответственно. НАД<sup>+</sup>-зависимые ДНК-лигазы многих видов бактерий катализируют НАД<sup>+</sup>-зависимые реакции аденилирования. Эти ферменты используют НАД<sup>+</sup> для образования промежуточного соединения аденилатлигазы, которое затем переносит фрагмент АМР на 5'-фосфатные концы ДНК с разрывом. Аденилирование 5'-конца ДНК облегчает последующее лигирование ДНК, что приводит к высвобождению свободного АМФ [174,175]. Большинство ферментов, потребляющих НАД<sup>+</sup>, катализируют реакцию переноса АДФ-рибозилтрансферазы или реакцию АДФ-рибозилирования (рисунок 3) [174].



А), В) окислительно-восстановительная (восстановительно-окислительная) реакция; С) Реакция АДФ-рибозилирования.

Рисунок 3 – НАД<sup>+</sup>-зависимые реакции.

Поли (АДФ-рибозил)ирование (ПАРилирование) является ключевой посттрансляционной модификацией белка (ПТМ), которая быстро появляется в местах повреждения ДНК. У человека поли(АДФ-рибоза) полимеразы (PARP) состоят из 17 членов, которые катализируют АДФ-рибозилирование [176–178]. Первая АДФ-рибоза (АДФр) ковалентно присоединяется к карбоксильной группе аминокислотных остатков, как остатки глутамата или аспартата белков-мишеней, с помощью PARP [179,180]. Остатки цистеина (Cys) и лизина (Lys) также могут действовать как акцепторы [181,182]. Однако большинство членов семейства PARP способны переносить только одну группу моно (АДФ-рибозы) (МАР) на свои белки-мишени. Было обнаружено, что PARP1, 2 и 3 катализируют ПАРилирование во время ответа на повреждение ДНК (DDR) [183]. Кроме того, было продемонстрировано, что танкиразы, включая танкиразу-1 (PARP5a) и танкиразу-2 (PARP5b), участвуют в стабильности генома [184]. Среди семейства PARP, PARP1 синтезируют большинство цепей ПАР, а также хорошо известно,

что PARP1 активируется одноцепочечными и двухцепочечными разрывами ДНК (SSB и DSB) [185]. PARP катализируют перенос фрагментов АДФр, используя НАД<sup>+</sup> в качестве донора АДФр, через уникальную 2',1"-О-гликозидную рибозо-рибозную связь к белкам-мишеням, образуя цепь ПАР [183]. Было продемонстрировано, что цепи ПАР могут содержать до 200 единиц АДФр в длину [179,183,185]. Кроме того, разветвление цепей ПАР с помощью PARP1 может происходить через 2",1"-гликозидную связь [186,187].

Все члены семейства PARP имеют высококонсервативное каталитическое ядро PARP1, домен (АДФ-рибозил)трансферазы (ART) [174]. Домен ART содержит НАД<sup>+</sup>-связывающий сайт, который позиционирует «донорскую» АДФ-рибозу для трансферазной реакции, и акцепторный сайт, который связывает либо мишень ПАРилирования во время инициации, либо дистальную АДФ-рибозу цепи разветвления/элонгации ПАР [188]. Донорский сайт состоит из никотинамидсвязывающего кармана, фосфатсвязывающего сайта и сайта связывания аденин-рибозы [189]. Существует консервативная триада His-Tyr-Glu (H-Y-E) («сигнатура ART») в никотинамид-связывающем кармане, которая является общей для PARP 1-6, но изменена в других (АДФ-рибозил) трансферазах. Аминокислотные остатки триады His862 и Tyr896 необходимы для связывания НАД<sup>+</sup>, тогда как Glu988 необходим для позиционирования субстрата и катализа. His862 связывается с 2'-ОН НАД<sup>+</sup> аденинрибозы, и его замены были обнаружены в каталитически неактивных PARP9 и PARP13, предотвращая связывание НАД<sup>+</sup> [188,190]. Tyr896 связывается с никотинамидным кольцом [189]. Glu988 образует водородную связь с 2'-ОН никотинамидрибозой [191]. В PARP 6-8, 10-12 и 14-16 остаток Glu заменен на Leu, Ile, Tyr, Val или Thr, что делает эти члены семейства PARP моно (АДФ-рибозо) трансферазами *in vitro* [188].

#### **1.4 Семейство поли (АДФ-рибоза) полимеразы (PARP) млекопитающих**

Семейство PARP включает 17 членов с различными структурными доменами, активностью, субклеточной локализацией и функциями (рисунок 4) [183,192]. Различные PARP по их структурным доменам и функциям можно разделить на ДНК-зависимые PARP-PARP 1, PARP 2 и PARP 3, танкиразы – PARP 5a, PARP 5b, Cys-Cys-Cys-His-содержащие цинковые пальцы (CCCH) и PARP, содержащие домен WWE - PARP 7, PARP 12, PARP 13.1 и PARP 13.2, и ПАР-связывающие макродомены, содержащие "макро" PARP - PARP 9, PARP 14 и PARP 15 [193]. Также, в зависимости от их каталитической активности, члены семейства PARP делятся на: «моно», «поли» или неактивные. Моно (АДФ-рибозил)трансферазы (MART), такие как PARP 3, PARP 4, PARP 6, PARP 10, PARP 14, PARP 15 и PARP 16, катализируют добавление одной единицы АДФ-рибозы к белкам-мишеням путем МАРилирования [182]. Тогда как такие полимеразы, как PARP-1, PARP-2, PARP-5a и PARP-5b, катализируют присоединение звеньев АДФ-рибозы в линейные или разветвленные цепи через  $\alpha(1 \rightarrow 2)$  О-гликозидные связи [183]. Для PARP-9 и PARP-13 ферментативная активность не описана [182].

Фермент PARP1 является одним из наиболее распространенных и хорошо изученных представителей семейства PARP. Этот белок расположен в ядре и состоит из шести доменов, которые необходимы для связывания ДНК, самомодификации, белок-белковых взаимодействий и ПАРилирующей каталитической активности. PARP1 отвечает за большую часть ПАРилирующей активности в клетке, около 80-90% [194]. Первоначально PARP1 характеризовался важным игроком в ответ на повреждение ДНК и процесса репарации. Из-за отрицательного заряда ПАРилированного белка и стерических затруднений ПАРилирование может привести к ускоренной диссоциации модифицированных белков от ДНК. Примером такой диссоциации является ПАРилирование гистона H1 с помощью PARP1 и ПАРилирование гистона H2B с помощью PARP2. Эти модификации белка ДНК приводят к релаксации хроматина, что необходимо для репликации, транскрипции и репарации ДНК [195–197]. Впоследствии список известных биологических функций PARP1 был дополнен такими функциями, как регуляция структуры хроматина, транскрипция, стрессовые реакции, участие в различных физиологических процессах [198]. Более того, дополнительно подтверждена роль PARP1 в таких нормальных физиологических условиях, как регуляция экспрессии генов, РНК и процессов в цитоплазме. Недавно было установлено, что PARP1 действует как сенсор для нелигированных фрагментов Окадзаки во время репликации ДНК в нормальных клетках S-фазы, что способствует их созреванию [199]. В клетках с дефицитом PARP1 (эмбриональные фибробласты, полученные от мышей с нокаутом PARP1) оставшаяся АДФ-рибозилирующая активность осуществляется другими активными членами PARP, которые имеют высококонсервативный каталитически активный (CD) домен (характеристика PARP), но которые могут или не могут иметь структурного сходства или локализации с PARP1. Этот каталитический домен состоит из спирального регуляторного (HD) и домена АДФ-рибозилтрансферазы (ART), ответственного за каталитическую активность, который также присутствует в PARP2 и PARP3.

На PARP2 приходится ~ 10 % активности ПАРилирования в клетке. PARP2 распознает и связывает DSB или SSB. Двойной нокаут *Parp1<sup>-/-</sup>Parp2<sup>-/-</sup>* у мышей приводит к ранней эмбриональной гибели, что указывает на перекрытие функций PARP2 с PARP1, необходимых для нормального эмбриогенеза [200]. PARP2 имеет функцию, которая ограничивает накопление резекционного барьерного фактора 53BP1 в местах повреждения ДНК и направляет DSB на пути репарации, зависимые от резекции [201]. PARP 2 участвует в процессах репарации ДНК, регуляции клеточного цикла, воспалении, регуляции метаболизма и регуляции экспрессии транскрипции [202–205].

PARP3 похож по организации домена на PARP2, но вместо ПАРилирования PARP3 катализирует МАРилирование [193]. PARP3 играет важную роль в регуляции клеточного цикла и репарации ДНК [183]. Взаимодействуя с PARP1, ДНК-лигазой III, Ku70/80 и другими белками NHEJ, PARP 3 способствует процессингу DSB в каноническом пути NHEJ [206]. PARP3 также связывается с белками группы Polysomb, участвующими в сайленсинге транскрипции и ремоделировании хроматина [207].

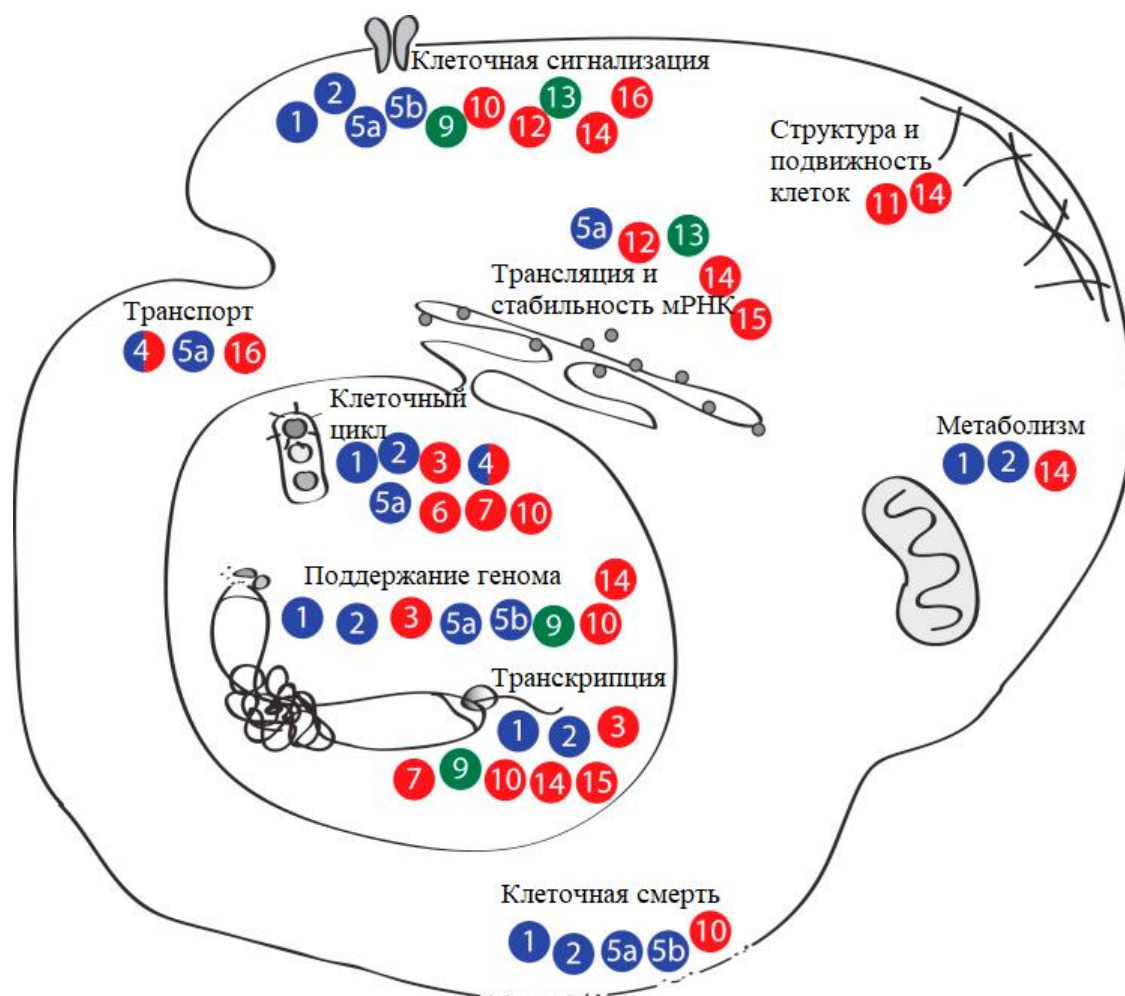


Рисунок 4 – Совпадение идентификаторов белков (например, 1=PARP-1) указывает на участие белка в регуляции клеточного процесса. Ферментативная активность обозначена цветными кружками: синий=поли(АДФ-рибозил)трансфераза, красный=моно(АДФ-рибозил)трансфераза, зеленый=трансферазная активность отсутствует.

Примечание – Составлено автором на основе источника [208].

Другие члены семейства PARP играют важную роль в поддержании стабильности генома, регуляции транскрипции, функции центромер, формировании митотического веретена, функции центросомы, динамике теломер, транспорте эндосомальных везикул, воспалении, апоптозе и некрозе [209].

PARP 4 (также называемый VPARP или ARTD4) представляет собой комплекс цитозольного рибонуклеопротеинового свода (vault) [209]. Он присутствует в цитоплазматических скоплениях (палочки VPARP) и в ядерном матриксе [177]. В PARP 4 отсутствует полимеразная активность, где консервативный остаток глутамата PARP 1 заменен изолейцином, лейцином или тирозином [210]. Было высказано предположение, что PARP 4 может участвовать в противовирусном ответе [211].

PARP 6 участвует в развитии нейронов гиппокампа [209], а также в прогрессировании клеточного цикла, что связано с прогрессированием колоректального рака [211]. Биологическая активность PARP 6 зависит от его N-концевого домена, богатого цистеином [210].

Несколько PARP (PARP 7, PARP 10, PARP 12 и PARP 13) участвуют в посттранскрипционной регуляции мРНК [209]. PARP 7 участвует в противовирусных эффектах, процессинге цитозольной РНК и транскрипции [54]. PARP 10 напрямую АДФ-рибозилирует NEMO, что приводит к ингибированию ядерной локализации субъединицы p65 NF-κB и последующему ослаблению экспрессии NF-κB-зависимого гена [210]. PARP 12 представляет собой каталитически активный монофермент, присутствующий в цитозоле [212]. Он регулирует сборку стрессовых гранул, активность микроРНК и противовирусный ответ [211]. PARP 12 участвует в клеточном иммунном ответе, повышая экспрессию PARP 12 при стимуляции интерферонами типа II, что приводит к усилению передачи сигналов NF-κB [210]. PARP 13, также называемый ZAP (противовирусный белок цинкового пальца), считается каталитически неактивным АРТ, который играет роль в сборке стрессовых гранул и регуляции микроРНК для врожденной противовирусной защиты [211,212]. Считается, что PARP 9 и PARP 14 действуют на транскрипцию, особенно на транскрипцию генов, необходимых для активации макрофагов [209]. PARP 14 выполняет множество функций, таких как выживание В-клеток, миграция клеток, сборка стрессовых гранул, транскрипция при воспалительных процессах, ответ на повреждение ДНК и противовирусный ответ [211]. PARP 11 локализует ядерные поры и модифицирует мишени, участвующие в координации ядерной оболочки и организации ядерных пор [211]. Как центросомный PARP, PARP 15 участвует в формировании стрессовых гранул, противовирусном ответе, процессинге цитозольной РНК и образовании опухоли [210,211]. PARP 16 находится в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) и регулирует реакцию развернутых белков [211]. Локализация других PARP (PARP 8 и PARP 17) в клетке и их участие в биологических процессах остаются неизвестными.

### **1.5 Ферменты деПАРилирования млекопитающих**

Недавние открытия предполагают, что баланс между белками, которые катализируют добавление (называемые писателями) и удаление (стиратели) АДФ-рибозы, имеет решающее значение для координации множественных путей клеточного ответа [213]. Чем больше увеличивается количество белков, участвующих в процессах записи, чтения и стирания модификации АДФ-рибозилирования, тем больше доказательств этой точки зрения. АДФ-рибозилирование – обратимый процесс, в котором разные специализированные «ластики» могут занимать разные каталитические ниши. Основной фермент деПАРилирования, PARG, не способен удалять продукты МАРилирования [214,215], что позволяет другим ластикам принимать участие в удалении АДФ-рибозы (таблица 1).

Таблица 1 – Стиратели АДФ-рибозы человека

Стира-тели	Классифика-ция	Субстрат	Связь которую действуют на	Обратимость АДФрибозили-рования	Белковые аддукты	Селектив-ность аминокислот
PARG	Макродомен	ПАР	О-гликозидное	Частичное	АДФ-рибоза	Независим-ость от связи
MacroD 1	Макродомен	МАР	Карбоксильный эфир	Полное	Ничто	D/E
MacroD 2	Макродомен	МАР	Карбоксильный эфир	Полное	Ничто	D/E
TARG1	Макродомен	МАР/ПАР	Карбоксильный эфир	Полное	Ничто	D/E
ARN1	ARN fold	МАР	N-гликозидное	Полное	Ничто	R
ARN3	ARN fold	МАР/ПАР	О-гликозидное	Полное	Ничто	S
NUDT9	NUDIX	ПАР	Фосфоди-эфирное	Частичное	Фосфо-рибоза	Независи-мость от связи
NUDT1 6	NUDIX	МАР/ПАР	Фосфоди-эфирное	Частичное	Фосфо-рибоза	Независи-мость от связи
ENPP1	ENPP (PDNP)	МАР/ПАР	Фосфоди-эфирное	Частичное	Фосфо-рибоза	Независи-мость от связи

В клетках человека деМАРилирование осуществляется аминокислотоспецифическими АДФ-рибозо-акцепторными гидролазами, такими как белки, содержащие макродомены MacroD1 и MacroD2, терминальная АДФ-рибозопротеингликогидролаза 1 (TARG1) и члены семейства АДФ-рибозогидролаз (ARN). Кроме того, было показано, что некоторые фосфодиэстеразы обладают активностью процессинга АДФ-рибозы.

#### 1.5.1 Поли (АДФ-рибоза) гликогидролаза (PARG)

При обширном повреждении ДНК значительное снижение внутриклеточных концентраций НАД происходит в сочетании только с ПАРилированием, хотя роль МАРилирования в ответ на генотоксический стресс в последнее время стала более достоверной [216]. Большая часть активности АДФ-рибозилтрансфераз связана с процессами ПАРилирования. Соответственно, преобладающей стирающей активностью является деПАРилирование.



PARG, являясь основным ферментом деПАРилирования, катализирует гидролиз гликозидных связей между звеньями АДФ-рибозы полимеров ПАР с образованием свободных мономеров АДФ-рибозы. Гомологи PARG обнаружены у широкого круга эукариот, за исключением почкующихся дрожжей, а у млекопитающих идентифицирован только один ген PARG, последовательность которого высококонсервативна [217]. В результате альтернативного сплайсинга уникальной мРНК ген PARG человека кодирует несколько вариантов [218,219]. PARG представляет собой модульный белок с четырьмя доменами [217] (Рисунок 5). Домен А (экзоны 1-3) образует предсказанный N-концевой внутренне неупорядоченный регуляторный домен [220]. Домен В (экзоны 4-8) соединяет N-концевую область с каталитическим доменом через петлю [218] и содержит регуляторный сегмент [221]. Экзоны с 9 по 14 представляют собой домен С (экзоны с 9 по 14), который содержит каталитически активный сайт и фирменный (signature) мотив PARG [222]. Маркодобен PARG образован доменом С и С-концевым доменом D (экзоны 15-18) [214,223].

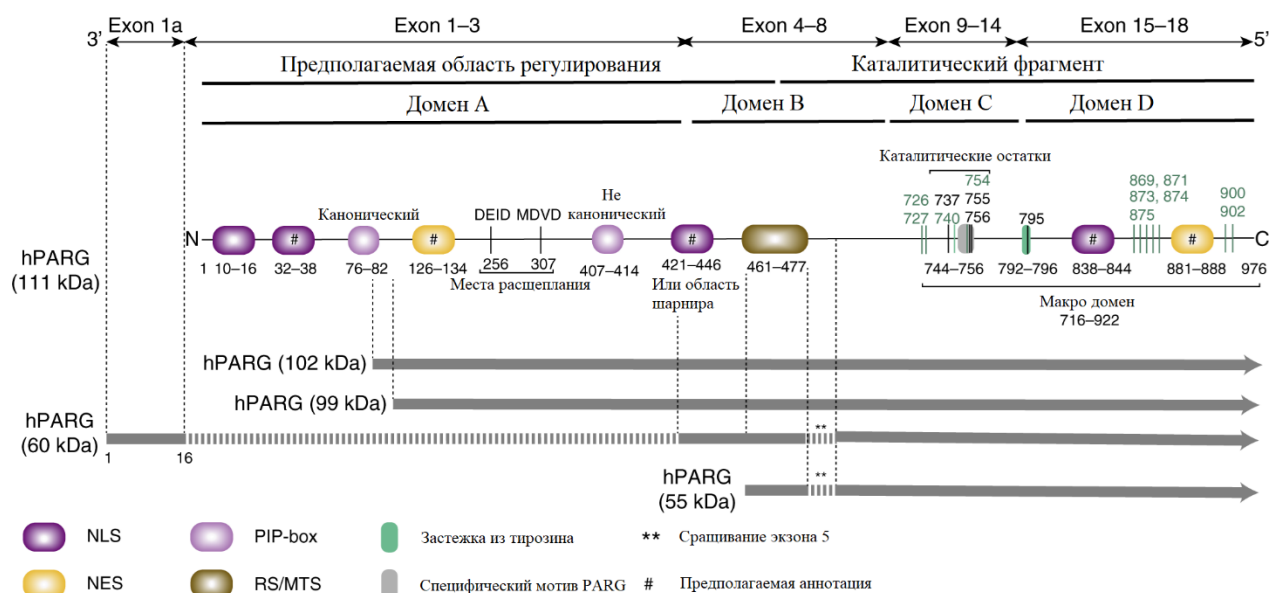


Рисунок 5 – Схематическое изображение PARG человека и его изоформ

Примечание – Составлено автором на основе источника [224].

Распределение ряда сигналов ядерного экспорта (NES) и сигналов ядерной локализации (NLS) происходит по всей последовательности PARG.

Экспрессия различных вариантов сплайсинга PARG в разных местах обеспечивает функциональную специализацию [218,225]. В клетках человека основные изоформы состоят из полноразмерного фермента PARG 111 кДа, а его варианты сплайсинга генерируют белки 102 и 99 кДа (рисунок 5). В то время как полноразмерный PARG в основном является ядерным и отвечает за незначительную часть общей клеточной активности, более мелкие изоформы преимущественно цитоплазматические с перинуклеарным распределением и, по-

видимому, ответственны за большую часть активности процессинга ПАР [226]. Следовательно ядерная и цитоплазматическая компартиментализация и транслокация изоформ PARC между ядром и цитоплазмой были предложены в качестве механизма регуляции клеточных уровней ПАР [225]. мРНК PARC также подвергается дополнительному альтернативному сплайсингу, в результате чего образуются малые изоформы 55 и 60 кДа. Из-за отсутствия 5 аминокислот, кодируемых экзоном, изоформы hPARC55 и hPARC60 оказались каталитически неактивными (Рисунок 5) [227]. По этой причине эти небольшие изоформы PARC человека не участвуют в общем клеточном обороте ПАР.

PARC человека представляет собой конститутивно активный фермент, который функционирует как экзогликозидазы и эндогликозидазы. PARC обладает в основном экзогликозидазной активностью, последовательно отщепляя гликозидные связи от белкового дистального конца полимера, подобно углеводным гликозилгидролазам [228]. Эта процессивность улучшает каталитическую активность PARC, но сильно зависит от длины цепи [229]. С другой стороны, было подсчитано, что около 20 % деполимеризационной активности PARC можно объяснить расщеплением внутрицепочечных эндогликозидов [230].

У мышей PARC<sup>-/-</sup> эмбрионы были летальными [21], а истощенные по PARC клетки были гиперчувствительны к генотоксичному повреждению [231][232], что указывает на важность каталитической активности PARC в клетках. Это связано с накоплением ПАР и ранним апоптозом и позволяет предположить, что для восстановления повреждений ДНК необходим эффективный PARC-опосредованный оборот ПАР. Также было показано, что PARC необходим для предотвращения массового производства ПАР во время длительного репликативного стресса [233]. Schreiber и его коллеги продемонстрировали, что дефицит PARC задерживает восстановление клеток после постоянного стресса репликации, вызванного длительным лечением гидроксимочевинной [233]. Эти заблокированные клетки демонстрируют высокий уровень ПАР, что негативно влияет на формирование очагов RPA и его ассоциацию с одноцепочечной ДНК (оцДНК). Предотвращение загрузки RPA в конечном итоге приводит к увеличению площади непокрытой одноцепочечной ДНК, которая затем трансформируется в двухцепочечные разрывы ДНК (DSB), что приводит к увеличению ПАР. В конечном счете, эта петля амплификации способствует апоптозу и/или некротической гибели клеток в пролиферирующих популяциях клеток. Эти наблюдения согласуются с выводом о том, что PARC локализуется в очагах репликации на протяжении всей S-фазы и взаимодействует с репликационным белком PCNA [234,235]. Кроме того, они дополняют более раннее сообщение о том, что клетки с дефицитом PARC, обработанные агентами, алкилирующими ДНК, имеют повышенную остановку S-фазы наряду с высокими уровнями маркера DSB  $\gamma$ H2AX31. Соответственно, группа Лопеса показала, что инактивация PARC влияет на развитие всех вилок репликации и изменяет молекулярную архитектуру значительной части промежуточных продуктов репликации [236]. Эти результаты обеспечили механистическое

понимание важной роли PARG в росте и развитии клеток, что согласуется с наблюдаемой эмбриональной летальностью PARG<sup>-/-</sup> мышей [237].

Другая важная роль PARG во время реакции на повреждение ДНК заключается в поддержании стабильных уровней ПАР и рециркуляции сильно аутомодифицированного PARP 1. Стабилизация уровней ПАР имеет решающее значение для защиты клетки от партанатоза, независимого от каспазы типа ПАР-опосредованной гибели клеток [238]. Запуск партанатоза обусловлен высвобождением фактора, индуцирующего апоптоз (AIF), из митохондрий в ядро [239,240, р. 200]. AIF после попадания в среду хроматина приводит к крупномасштабной фрагментации ДНК и конденсации хроматина с последующей гибелью клеток [241]. Было проиллюстрировано, что истощение PARG защищает от партанатоза, вызванного окислительным стрессом, путем предотвращения высвобождения AIF из митохондрий [242].

Наконец, PARG также участвует в поддержании теломер. PARG способен негативно регулировать доступ к теломерной ДНК, обращая АДФ-рибозилирование специфичного для теломер белка TRF1, способствуя регуляции репарации и репликации теломер [243,244]. В целом, эти примеры показывают, что динамическое равновесие, установленное между активностью PARP 1 и PARG, и, следовательно, уровнями ПАР, является ключом к контролю клеточных судеб, предполагая, что стиратели ПАР столь же важны, как и писатели ПАР для клеточного гомеостаза.

### 1.5.2 АДФ-рибозил-гидролазы (ARHs)

Первыми были описаны бактериальные АДФ-рибозилирующие экзотоксины, катализирующие конъюгацию АДФ-рибозы в виде ПТМ (bAREs) [245]. Бактериальные MAP-трансферазы (MART) имеют родственные гены у людей, внеклеточная экспрессия которых делает их неактуальными или неактивными в отношении внутриклеточных путей, опосредованных АДФ-рибозой [246].

В клетках человека MAPилирование внутриклеточного белка осуществляется представителями белков, сходных с АДФ-рибозилтрансферазами дифтерийного токсина (ARTD). Ранее классифицированные как PARP [193], 17 членов семейства ARTD человека были переименованы в соответствии с систематической номенклатурой, которая лучше отражает их структурные особенности и каталитические свойства [174]. В настоящее время существует 11 членов семейства ARTD человека, описываемых как MART, обычно переименовываемых в честь типа молекулы АДФ-рибозы (т. е. MAP), которую они несут на себе или на целевых субстратах [247].

Семейство АДФ-рибозогидролаз (ARH) включает три родственных белка [248]. ARH1 является высокоактивной АДФ-рибозил-аргинингидролазой [249], ARH3 – АДФ-рибозил-серингидролазой [250], а субстраты ARH2 еще неизвестны (таблица 1 и рисунок б).

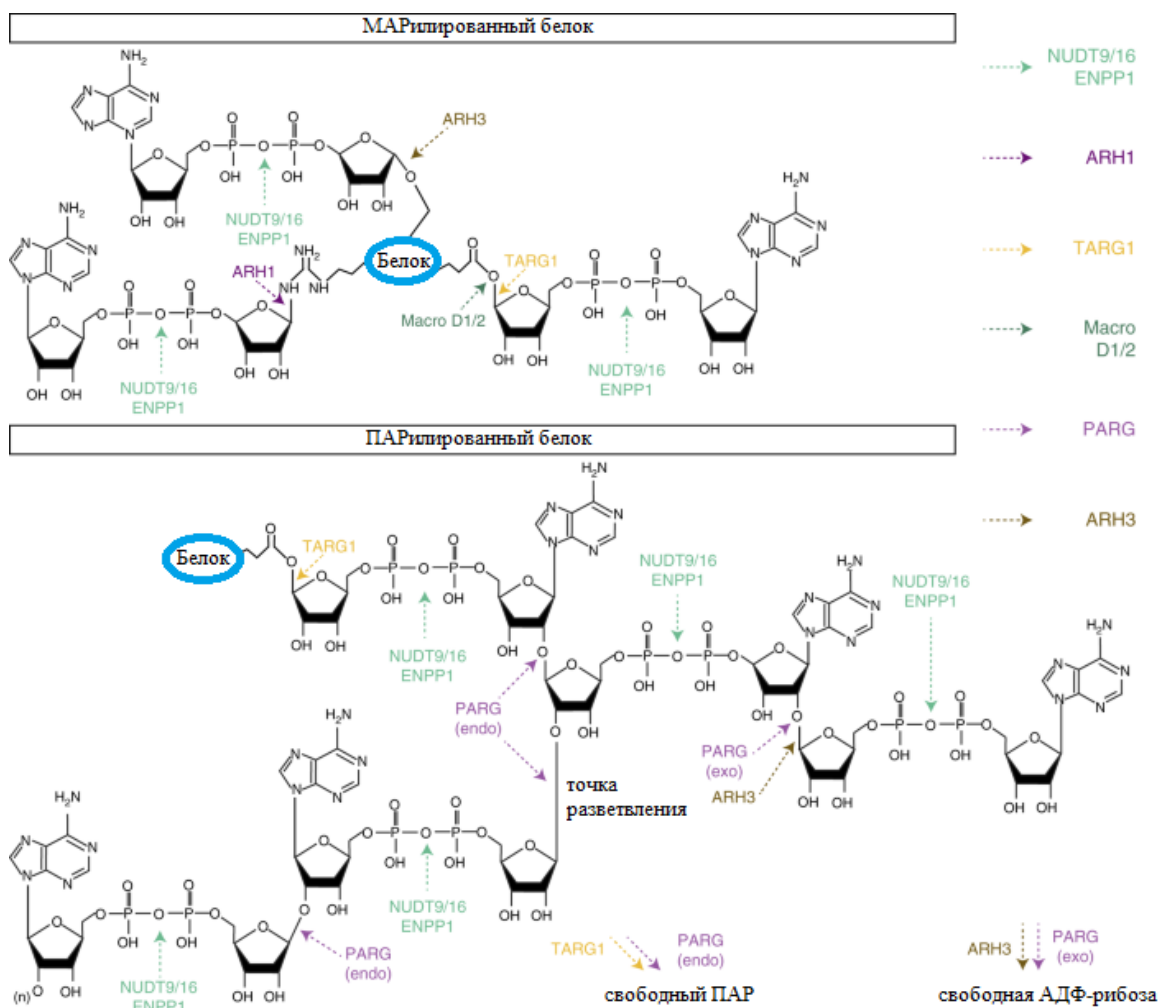


Рисунок 6 – деАДФ-рибозилирование белка с помощью стирателей МАР и ПАР. На диаграммах показаны МАРилированные (верхняя панель) и ПАРилированные белки (нижняя панель) со специфическими для связи сайтами химического расщепления для каждого стирателя

Примечание – Составлено автором на основе источника [224].

Мыши, у которых отсутствует ARH1, более чувствительны к холерному токсину [251] и склонны к опухолям, а также имеют повышенную заболеваемость аденокарциномой, лимфомой и метастазами [252]. Эмбриональные фибробласты мышей с дефицитом ARH3 демонстрируют повышенную стабильную степень серин-АДФ-рибозилирования *in vivo* [253], а индуцированное повреждением ДНК серин-АДФ-рибозилирование эффективно устраняется с помощью ARH3 [250].

В отличие от ARH1, ARH3 также обладает активностью против О-гликозидной связи ПАР, сходной с экзогликозидной активностью PARG [246]. Однако ARH3 не спасает дрозофилу или мышей с генетическим нокаутом PARG от гибели клеток или накопления ПАР [254], что позволяет предположить, что он не может компенсировать потерю PARG. Из-за своего обилия в цитоплазме ARH3 участвует во второй стадии гидролиза ПАР после высвобождения

свободных ответвлений полимера ПАР другими стирателями. Это может помочь снизить уровень цитоплазматического ПАР, в конечном итоге предотвращая митохондриально-зависимые пути апоптоза, такие как партанатос [255].

В то время как ARH стирают только МАРилирование аргинина и серина, а ферменты, содержащие макродомены, специально нацелены на МАРилирование аспартата и глутамата, было показано, что ARTD опосредуют АДФ-рибозилирование широкого спектра аминокислотных остатков [256].

### 1.5.3 Макродоменные стиратели АДФ-рибозы

Складка макродомена представляет собой эволюционно законсервированную компактную глобулярную структуру с массой ~25 кДа, присутствующую во всех биологических царствах [257]. Его можно найти в виде отдельного модуля или интегрировать в мультидоменные белки. Макродомен был первым охарактеризованным модулем, связывающим АДФ-рибозу. Он может связывать терминальные структуры АДФ-рибозы с наномолярным сродством [258].

Существует функциональное разнообразие, связанное со структурными вариациями в семействе макродоменных белков. Подгруппа макродоменов неспособна связывать АДФ-рибозу, тогда как другие приобрели гликозидную активность, участвующую в реверсии АДФ-рибозилирования [259]. Существует десять генов, кодирующих макродомены человека: варианты гистона H2A Macro H2A.1 и Macro H2A.2; МакроD1, D2 и D3; TARG1; хромодомен-хеликаза-ДНК-связывающий 1-подобный белок (CHD1L) и макродомен-содержащие ARTD 7-8-9 (ранее называвшиеся PARP 15-14-9). Среди них MacroD1, MacroD2 и TARG1 были классифицированы как стиратели АДФ-рибозы из-за их АДФ-рибозогидролазной активности. MacroD1 и MacroD2 разрушают химическую связь между МАР и белком-акцептором, в то время как TARG1 обладает уникальной способностью разрушать как МАРилированные, так и ПАРилированные боковые цепи остатков аспартата и глутамата [20] (Рисунок 6).

Роль TARG1 в циркуляции ПАР остается неясной, но существует ПАРилирование-зависимое перемещение TARG1 в нуклеоплазму [260] в дополнение к его участию в повреждении ДНК ПАР-зависимым образом [20]. Каталитический домен TARG1 отличается от PARP, но напоминает ДНК-гликозилазу OGG1 [20] и непосредственно нацеливается на связи карбоксиэфира АДФ-рибозы для удаления модификации из его субстрата. Способность TARG1 удалять целые цепи ПАР из самой проксимальной точки прикрепления субстрата уникальна среди известных стирателей, добавляя еще один предполагаемый регуляторный слой к клеточным функциям ПАР. Уже много лет известно, что только PARP образует безбелковые полимеры АДФ-рибозы благодаря своей эндогликозидной активности [229] (Рисунок 6), которая становится основным механизмом действия, когда устойчивая активация PARP (т.е. тяжелое генотоксическое повреждение) приводит к синтезу больших и разветвленных ПАР [190]. Несмотря на то, что эта идея не была полностью оценена, TARG1-опосредованные продукты ПАР, не содержащие белков, могут быть вовлечены в партанатоз [20].

Подобно TARG 1, моно-АДФ-рибозогидролазная активность MacroD1 и MacroD2 также избирательно направлена на сложноэфирные связи, образованные АДФ-рибозилированными остатками аспартата и глутамата, хотя и с использованием различных каталитических методов [188]. Современные экспериментальные данные свидетельствуют о том, что АДФ-рибоза сложноэфирного типа в белковых субстратах является специфической мишенью для стирателей макромолекул. Эта активность может играть регулируемую роль *in vivo*, поскольку MacroD2 участвует, например, в процессинге аутомодифицированного PARP 1 [261]. Удаление аутоингибиторных частей PAR из PARP 1 с использованием MacroD2 было предложено для объяснения накопления PARилированного PARP 1 в контексте делеции гена MacroD2 в клетках колоректального рака человека [262]. Лежащая в основе MacroD2-зависимая модель рециркуляции PARP 1, предложенная Sakthianandeswaren и др., включает двухфазное стирание аутомодификации PARP 1, что указывает на то, что PARG является основным ферментом, усекающим PAR, ответственным за создание аддуктов PAR, которые впоследствии могут стать мишенью для MacroD2 [262].

Как упоминалось выше, PARG является членом семейства стирателей макромолекул, хотя между аминокислотной последовательностью PARG и другими белками, содержащими макромолекулы, нет сходства. Однако существует тесная структурная и эволюционная связь между макромолекулами и PARG, а ее каталитическим центром является макромолекулярная складка [214][223].

#### 1.5.4 Фосфодиэфирные АДФ-рибозил-гидролазы

Гомополимеры PAR состоят из последовательных фрагментов АДФ-рибозы, связанных вместе чередующимися фосфодиэфирными и O-гликозидными связями (рисунок 6). Фосфодиэфирная связь также является центральной для самого мономера АДФ-рибозы, поскольку она связывает структуру аденозина с рибозой. Активность фосфодиэстераз змеиного яда сыграла важную роль в выяснении структуры PAR в ранних исследованиях PARилирования, поскольку она использовалась для определения длины цепи и частоты ветвления PAR [263].

Совсем недавно в обращении АДФ-рибозилирования после открытия группы фосфодиэстераз была предложена роль фосфодиэстераз, обрабатывающих АДФ-рибозу, которая включает членов надсемейства NUDIX (нуклеозиддифосфаты, связанные с фрагментом-X) NUDT9 и NUDT16, а также эктонуклеотидная пирофосфатаза/фосфодиэстераза 1 (ENPP1) [264,264,265]. Мишенью для этих стирателей является фосфодиэфир, связанный с фрагментами АДФ рибозы, поэтому их активность не зависит от типа АДФ-рибозы, установленной с белком-субстратом. Однако эти ферменты следует классифицировать как частичные стиратели, поскольку они оставляют остаток фосфорибозы, присоединенный к белку-мишени (рисунок 6 и таблица 1). До сих пор неясно, коррелируют ли эти остатки фосфорибозы с конкретными биологическими результатами. Однако описано патологическое накопление фосфорибозы на остатках глутамата [266].

Более того, катализируемое фосфодиэстеразой удаление дистального аденина в полимерах ПАР путем расщепления терминального АМФ, вероятно, предотвращает расщепление PARG, как это наблюдалось с этено-ПАР, дериватизированным ПАР с модифицированными адениновыми фрагментами [267].

*In vivo* гидролазы NUDIX, по-видимому, действуют как ферменты «домашнего хозяйства», помогая детоксицировать потенциально вредные эндогенные метаболиты [268]. Кроме того, предполагается, что они участвуют в восполнении клеточного пула АМФ за счет мономерных продуктов АДФ-рибозы, опосредованной PARG/ARN3-опосредованной деполимеризации ПАР. Этот метаболический ответ согласуется с АМФ-зависимым дефицитом митохондриальной энергии, наблюдаемым после повреждения ДНК и активации PARP 1 [269]. Накопление АМФ, происходящего из ПАР, также участвует в модуляции передачи сигналов mTOR посредством активации AMPK [270]. Указанные примеры показывают, что реакции стирания АДФ-рибозы могут оказывать различное влияние на метаболизм за счет образования свободных мономеров АДФ-рибозы и родственных молекул, таких как АМФ.

Интересно, что третий NUDIX, NUDT5, отличается по гидролазной активности от других гидролаз NUDIX, которые процессируют АДФ-рибозу, поскольку он не может гидролизовать АДФ-рибозу, конъюгированную с белком. Однако NUDT5 генерирует АТФ из свободной АДФ-рибозы и пирофосфата в процессе оборота для быстрого пополнения ядерных уровней АТФ [271]. Хотя NUDT5 сам по себе не может быть классифицирован как стиратель АДФ-рибозы из-за его неспособности удалять АДФ-рибозилирование белка, он, безусловно, заслуживает внимания, поскольку может влиять на уровни энергетического субстрата после катаболизма ПАР.

Внеклеточную фосфодиэстеразу ENPP1, в которой отсутствует NUDIX и макродомен, еще предстоит охарактеризовать в отношении ее участия в процессинге АДФ-рибозы. ENPP1 проявляет значительную активность фосфодиэстеразы *in vitro* в отношении MAP и ПАР, превышающую активность, наблюдаемую NUDT16-ом в бесклеточной системе [272]. Высокая скорость превращения модификаций рибозилирования АДФ в аддукты фосфорибозы с помощью ENPP1 была предложена в качестве ключевой особенности для создания сигнатур фосфорибозы для анализа с помощью жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (LC-MS) [272].

## 1.6 Модули чтения поли(АДФ-рибозы)

В ответ на активацию белка PARP индуцированные посттрансляционные модификации позволяют локально рекрутировать многочисленные белки с помощью модулей распознавания ПАР или MAP. Этот ответ обеспечивает локальное и быстрое накопление большого количества белков и способствует последующим белок-белковым взаимодействиям (рисунок 7). Некоторые из них хорошо структурированы и характеризуются белковыми доменами, в то время как другие определены недостаточно четко.

### 1.6.1 Мотив RBM

Первым белком, идентифицированным как имеющий мотив RBM (для ПАР-связывающего мотива) нековалентного взаимодействия с ПАР, является супрессор опухоли p53 [273]. Мотив RBM (рисунок 7) был охарактеризован в 2000-х годах и состоит из двух консервативных участков. Первая область содержит основные аминокислоты, а вторая содержит гидрофобные аминокислоты, но с вкраплениями основных остатков [274]. Консенсусная последовательность RBM ([HKR]-X-X-[AIQVY]-[KR]-[KR]-[AILV]-[FILPV]), состоит из 20 остатков. Положительно заряженные аминокислоты, содержащиеся в RBM, обеспечивают электростатическое взаимодействие с сильно отрицательно заряженными полимерами ПАР. Согласно анализу биоинформатики, этот мотив можно найти более чем в 800 белках. Белки, содержащие этот мотив, включают XRCC1, ДНК-лигазу III, ATM, Ku70, MSH6 или p53 [275]. RBM часто обнаруживаются во многих белках, отвечающих за повреждение ДНК, и других белках, включенных в базу данных ADPrigoDB по АДФ-рибозилированным белкам [276], что позволяет предположить, что связывание ПАР способствует ПАРилированию.

### 1.6.2 Мотив PBZ

Мотив PBZ (для ПАР-связывающего цинкового пальца) (рисунок 7) был идентифицирован в трех белках APLF (апратаксин и PNK-подобный фактор) и CHFR (контрольная точка с доменами FHA и RING) and CTCF [259,276]. Консенсусная последовательность PBZ [K/R]-X-X-C-X-[F/Y]-G-X-X-C-X-[K/R]-[K/R]-X-X-X-X-N-X-X-X-[F/Y]-X-N состоит из примерно 30 аминокислотных остатков. Один из PBZ мотивов APLF распознает две молекулы АДФ-рибозы, связанные между собой гликозидной связью, тогда как считается, что второй домен PBZ связывается с 3-й единицей АДФр, вероятно, на разветвленном полимере ПАР или концевом поли-АДФр [277–279]. Этот мотив имеет сильное сродство к ПАР: субнанолярный порядок белка APLF, содержит два тандемных домена PBZ [280].

### 1.6.3 Макродомены

В отличие от мотивов RBM и PBZ, макродомен (рисунок 7) состоит из структурированного мотива приблизительно из 130-190 аминокислот. Этот домен взаимодействует с концевым АДФ-рибозным ПАР и, следовательно, может взаимодействовать с белком, несущим моно-АДФ-рибозу [281]. Этот домен был идентифицирован в 11 белках, включая три ранее представленных макроPARP (PARP9, PARP14 и PARP15). Этот домен также обнаружен в ремоделере хроматина ALC1 (амплифицированном при раке печени 1), в гистоновом варианте macroH2A или даже в моноАДФ-рибозогидролазах macroD1/2 [281–283].



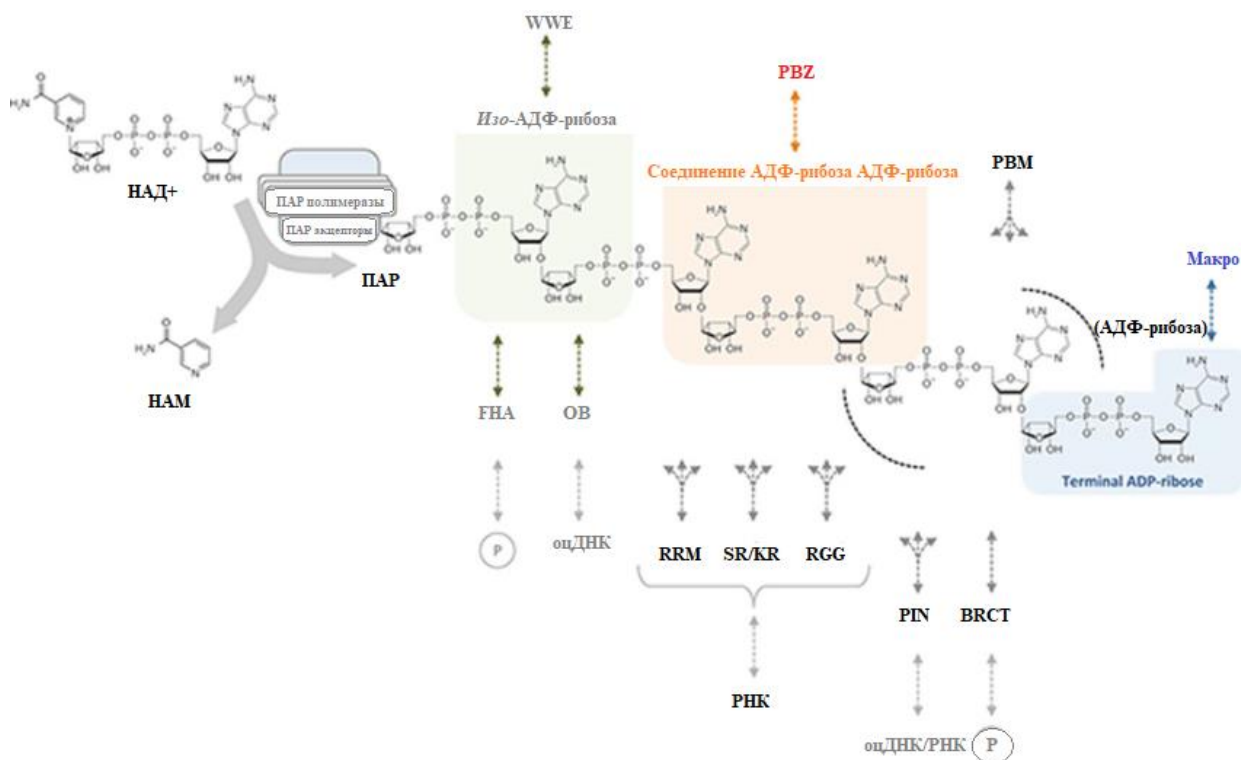


Рисунок 7 – Считыватели поли (АДФ-рибозы). Полимеразы PAR используют НАД<sup>+</sup> для образования сильно анионных линейных и разветвленных (не показаны) цепей PAR различного размера и сложности ветвления. В дополнение к классическим, хорошо охарактеризованным PAR, WWE, PBZ, PBM и макромономерам (вверху), существуют также недавно появившиеся модули чтения PAR, такие как FNA, OB-fold, домен PIN, повторы RRM, SR и KR, повторы RGG и BRCT (внизу) отображаются как считыватели и эффекторы PAR. Разветвленные стрелки указывают на то, что точные сайты связывания не идентифицированы.

Примечание – Составлено автором на основе источника [259].

#### 1.6.4 Мотив WWE

Этот мотив содержит консервативные остатки триптофана (W) и глутамата (E). Мотив WWE (рисунок 7) обнаружен в белках семейства PARP (PARP11 и PARP14) и убиквитинлигаз (DELTEX1, DELTEX2, DELTEX4 и HUWE1). Было показано, что активность некоторых убиквитинлигаз E3 требует связывания с PAR через их WWE мотив [284,285]. Это может свидетельствовать о том, что PARилирование некоторых белков может служить сигналом для их последовательного убиквитинилирования [286]. Было ясно продемонстрировано, что домен WWE специфически распознает рибозо-рибозогликозидные связи в полимере PAR, а не единичное звено АДФр. [286].

#### 1.6.5 Домены распознавания фосфорилирования (BRCT/FNA)

Хорошо известно, что домены BRCT (С-концевой BRCA1) и FNA (связанный вилок) (рисунок 7) обладают сродством к фосфорилированным

белкам [286,287]. Было обнаружено, что эти два домена также могут иметь сродство к ПАР [288]. Таким образом, происходит взаимодействие доменов FHA белков APTX (апратаксин) и PDKP (полинуклеотидкиназа-3-фосфатаза) с изо-АДФ-рибозами. Также вероятно, что домен BRCT1 белка XRCC1 или два домена BRCT белка BARD1 (для связанного с BRCA1 домена RING 1) являются доменами взаимодействия с ПАР, позволяя им рекрутироваться и функционировать в местах повреждения ДНК [288–290]. Однако домен BRCT1 белка XRCC1 также содержит ранее описанный домен PBM для взаимодействия с ПАР [274]. Следовательно, неясно, требуется ли вся структура домена BRCT1 белка XRCC1 для взаимодействия XRCC1 с ПАР. Зная, что эти домены BRCT и FHA позволяют взаимодействовать с ПАР, а также с фосфопротеинами, возможно, что ПАРилированные белки после индукции активности PARP конкурируют с белками, фосфорилированными киназами, модифицируя таким образом белки системы белковых взаимодействий.

#### 1.6.6 Области взаимодействия с ДНК или РНК

Несколько открытий показали, что ДНК- или РНК-связывающие мотивы (рисунок 7) могут связывать ПАР. Это наблюдение еще раз подтверждает идею о том, что ПАР обладают свойствами, сходными со свойствами нуклеиновых кислот. Действительно, как и в случае РНК, ДНК или даже белков, несущих фосфорилирование, ПАР представляют собой преимущественно отрицательно заряженную структуру, для которой даже использовался термин третья нуклеиновая кислота. Таким образом, при сильной стимуляции синтеза ПАР взаимодействие некоторых белков с РНК и ДНК может быть снижено.

- Складчатый домен OB (для связывания олигонуклеотидов / олигосахаридов) представляет собой хорошо сохранившуюся белковую область, которая была идентифицирована в группе бактерий и дрожжей [291]. Этот домен позволяет распознавать одноцепочечную ДНК или РНК и обнаружен в таких белках, как RPA, hSSB1/2, BRCA2 [292]. Недавно этот домен был идентифицирован для распознавания изо-АДФ-рибозы и для рекрутирования многих белков репарации в места повреждения ДНК [293]. В частности, быстрая фаза рекрутирования белка BRCA2 к месту повреждения ДНК зависит от узнавания ПАР через его свернутый OB-домен [294].

- Мотив RRM (для мотива узнавания РНК) является одним из наиболее распространенных РНК-связывающих доменов среди белков, взаимодействующих с РНК [295]. В последние годы стало очевидным, что многие белки, содержащие RRM-мотивы, могут быть вовлечены в сайты синтеза ПАР [296–299]. Таким образом, имея строение, сходное со структурой РНК, ПАР создают реальную конкуренцию за взаимодействие многих белков с РНК.

- Домен PIN (N-конец PilT) является хорошо консервативным доменом в процессе эволюции, что позволяет ему связываться с одноцепочечной ДНК или РНК. Этот домен также несет нуклеазную активность [300]. Например, он несет экзонуклеазную активность белка EXO1 (экзонуклеаза 1) и эндонуклеазную активность белка GEN1 (гомолог 1 эндонуклеазы 1 лоскута GEN). Было обнаружено, что PIN-домен распознает ПАР *in vitro* и *in vivo* с высокой

аффинностью наномолярного порядка. Это взаимодействие позволяет белку EXO1 быстро рекрутироваться в места повреждения ДНК. Домен PIN эндонуклеазы GEN1 также взаимодействует с ПАР [301].

- Домены, богатые серинами и аргининами (домен SR) или глицинами и аргининами (домен GAR), обнаружены во многих РНК-связывающих белках. Эти области находятся в основном в регуляторах сплайсинга РНК и в стрессовых гранулах [302]. Недавно было показано, что многие белки, несущие этот домен, могут взаимодействовать с ПАР [303,304]. Механизм распознавания ПАР не был охарактеризован, но вполне вероятно, что положительные заряды, переносимые этим доменом, обеспечивают электростатические взаимодействия с отрицательными зарядами ПАР. Таким образом, эти взаимодействия могут играть ключевую роль в сплайсинге РНК и сборке стрессовых гранул [305]. Наконец, рекрутирование и агрегация определенных белков, несущих домены GAR, может вызывать сложное и очень интригующее явление фазового разделения. Это физическое явление можно сравнить с тем, что происходит, когда капля масла попадает в воду. Действительно, локальный синтез ПАР будет индуцировать рекрутирование белков, несущих домены GAR, таких как онкогенный белок Fus (белок, связывающий РНК FUS). Этот естественно неупорядоченный белок способен агрегировать по механизму, сходному с прионоподобными белками [306]. Это явление вызовет реорганизацию и компартментализацию среды вокруг места синтеза ПАР. Следствием этого будет стимуляция локальной диффузии белков и стимуляция некоторых белок-белковых взаимодействий, в частности, в местах повреждения ДНК [306,307]. Это же явление может быть причиной многих нейродегенеративных патологий, связанных со старением.

## **1.7 Поли(АДФ-рибозил)ирование в растениях**

### **1.7.1 Три канонических белка PARP у *Arabidopsis thaliana***

В конце 1970-х годов активность поли(АДФ-рибозил)ирования была показана у высших растений путем включения [<sup>3</sup>H]НАД в ядра клеток зародыша лука и пшеницы и меристематические ткани корней лука [308–311]. Было обнаружено, что это включение представляет собой ферментативную реакцию ковалентного связывания молекул поли(АДФ-рибозы) с карбоксильными группами белков-мишеней [312]. Богатые лизином гистоны H1, H2A и H2B, но не аргинином гистоны H3 и H4, были идентифицированы как акцепторные белки для молекул поли(АДФ-рибозы) [310,312]. Кроме того, в ранних исследованиях поли(АДФ-рибозы) в растениях была описана аутомодификация белка молекулярной массой от 114 до 116 кДа [312,313].

Первым геном PARP, идентифицированным у растений, был APP *Arabidopsis thaliana* (At4g02390) [314]. APP это AtPARP2, поскольку он структурно наиболее похож на человеческий PARP2 (рисунок 8). кДНК *AtPARP2* была идентифицирована благодаря ее 62 %-ному сходству с каталитическим доменом PARP1 человека в ходе экспериментов, проведенных для идентификации белков арабидопсиса, позволяющих дрожжевым клеткам расти в условиях стресса. Белок AtPARP2 состоит из 637 аминокислот и имеет размер

72 кДа. Домен PARP сохраняется в AtPARP2. Кроме того, были обнаружены сигнал ядерной локализации и домен аутомодификации. В отличие от человеческого PARP1, который обладает N-концевыми доменами цинковых пальцев, AtPARP2 содержит N-концевой домен SAP (рисунок 8). Домен SAP является предполагаемым ДНК-связывающим доменом, участвующим в метаболизме нуклеиновых кислот, названным в честь трех белков, которые его содержат (SAF-A/B, Acinus и PIAS) [315]. Экспрессия AtPARP2 в дрожжах выявила ядерную локализацию и поли(АДФ-рибозил)ирующую активность. Основной размер полимера составлял от 10 до 15 остатков, но образовывались полимеры до 40 АДФ-рибозильных остатков [316]. Поли(АДФ-рибозил)ирующая активность снижалась ингибиторами PARP, 3-аминобензамидом (3AB) и никотинамидом. Ядерная локализация AtPARP2 в растениях была подтверждена транзитной экспрессией конструкций AtPARP2-GFP у *Nicotiana benthamiana* и *Arabidopsis* [317–319]. Недавно было показано, что импорт AtPARP2 в ядро опосредуется Importin- $\alpha$  [319]. Предполагается, что в дополнение к ядерной локализации AtPARP2 частично локализован в хлоропластах [318]. Слияния промотор-GUS и исследования гибридизации РНК *in situ* показали экспрессию AtPARP2 в набухших семенах, вегетативной меристеме верхушки побега, тычинках открытых цветков и на поздних стадиях развития зародыша [318].

AtPARP1 (At2g31320) был идентифицирован при скрининге генов, индуцированных ионизирующим излучением, у *Arabidopsis thaliana* [320]. AtPARP1 состоит из 983 аминокислот и имеет консервативные структурные мотивы по сравнению с PARP1 человека. Подобно PARP1 человека, AtPARP1 содержит консервативный каталитический домен, мотивы цинковых отпечатков и мотив ядерной локализации (рисунок 8). Центральный домен аутомодификации менее консервативен, но присутствуют остатки глутамата, что делает возможным аутополи(АДФ-рибозил)ирование. Кроме того, домен BRCT, позволяющий белок-белковые взаимодействия, также менее консервативен. Как правило, структурное сходство между AtPARP1 и PARP1 человека вызывает функциональное сходство. Это предположение дополнительно было доказано исследованием экспрессии дрожжей, в которой экспрессия AtPARP1 ингибирует рост дрожжевых клеток, также как и HsPARP1 [321]. Ингибирование роста двумя белками возвращалась назад добавлением ингибиторов PARP 3AB и 6-(5H)-фенантридинона [321].

Как и AtPARP2, было обнаружено, что AtPARP1-GFP локализуется в ядре у *Nicotiana benthamiana* и в культуре суспензии клеток *Arabidopsis* [317,318]. Кроме того, PARP1-GFP был обнаружен в хлоропластах и митохондриях при экспрессии в протопластах *Arabidopsis* [318]. Слияние предполагаемого промотора AtPARP1 с GUS и гибридизационным анализом РНК выявило экспрессию AtPARP1 в корнях, верхушках соцветий, вегетативной меристеме и на поздних стадиях развития зародыша [318].

Пока меньше известно об AtPARP3 (At5g22470), впервые идентифицированном при анализе генома арабидопсиса. В основном он экспрессировался в семенах, а также в проростках и корнях взрослых растений

[318,322–324]. Кроме того, экспрессия AtPARP3 сильно индуцировалась (хотя и на низком абсолютном уровне) в листьях сильным абиотическим стрессом в виде параквата, NaCl, яркого света или высушивания [325]. Слияния PARP3-GFP локализованы в ядре [318,324], а в одном исследовании также в цитозоле [318].

В отличие от экспрессии AtPARP1 в дрожжевых клетках, AtPARP2 только частично ингибировал рост дрожжей, в то время как экспрессия AtPARP3 не влияла на рост [321]. Это может быть связано с различиями или отсутствием ДНК-связывающего домена в AtPARP2 и AtPARP3. ДНК-связывающий домен HsPARP2 также структурно отличается от домена HsPARP1, но экспрессия HsPARP2 вызывает ингибирование роста дрожжей [326]. Дифференциальное ингибирование роста дрожжей указывало на то, что PARP арабидопсиса и человека имеют общие структурные или функциональные особенности, но также указывало на специфические для растений функции AtPARP2 и AtPARP3.

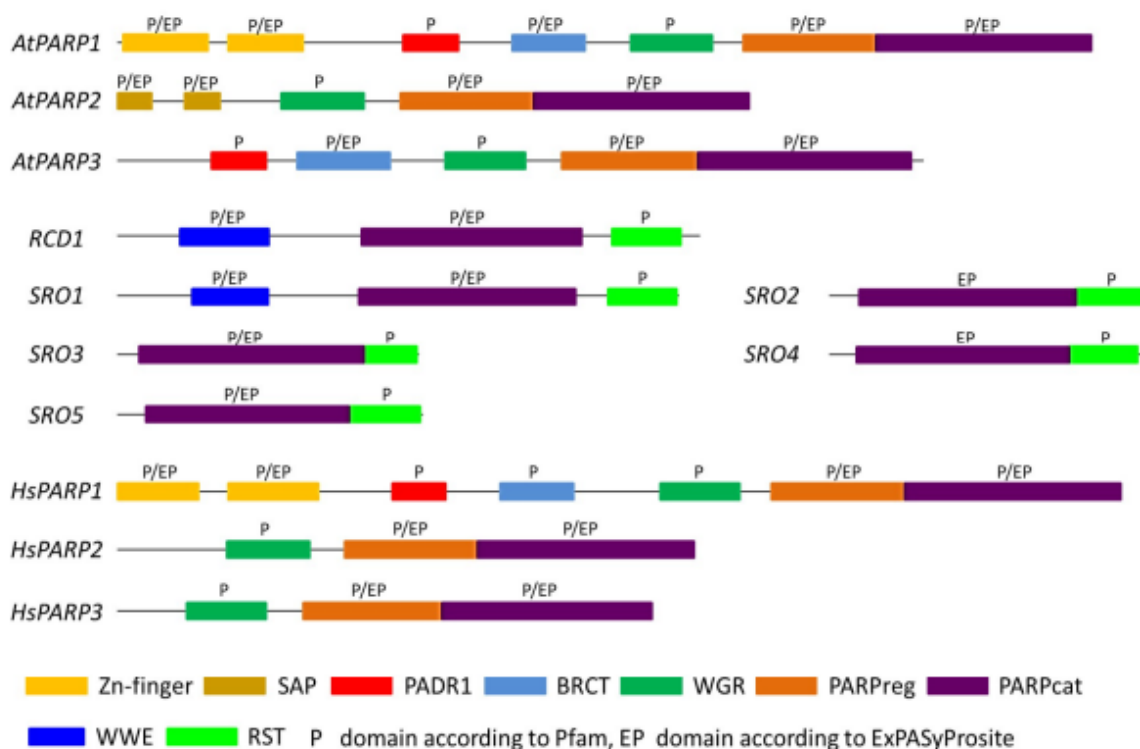


Рисунок 8 – Схематическое изображение доменов в белках PARP человека и *Arabidopsis thaliana*.

Примечание – Составлено автором на основе источника [327].

### 1.8 Растительные поли(АДФ-рибозы) гликогидролазы (PARG)

Всего у *Arabidopsis thaliana* идентифицировано три гена, гомологичных человеческому PARG [323]. Для одного из них до сих пор не были обнаружены экспрессированные метки последовательностей (EST) или кДНК. Поэтому этот ген классифицируется как псевдоген. Два других гена, AtPARG1 (At2g31870) и AtPARG2 (At2g31865), локализованы в тандеме на хромосоме 2.

У арабидопсиса оба белка PARG локализованы в ядре, цитоплазме и плазматической мембране [322,328]. AtPARG1 (также известный как TEJ) был впервые идентифицирован при генетическом скрининге измененной длины циркадного периода у *Arabidopsis* [329]. Мутантные растения, несущие замену G262E в белке AtPARG1, демонстрировали длительный период автономной работы в отношении экспрессии генов, контролируемых циркадными часами, и движениями листьев. Эти мутанты *tej* также зацвели раньше. Эти фенотипы указывают на общий дефект часов, что делает AtPARG1 компонентом функции часов у растений. Уровни полимера поли(АДФ-рибозы) были повышены у мутантов *tej*, указывая на то, что AtPARG1 является настоящим PARG [329]. Поли(АДФ-рибозо)гликогидролазная активность AtPARG1 подтверждена *in vitro* и *in vivo* [322]. Вестерн-блоттинг и авторадиография  $^{32}\text{P}$ -НАД<sup>+</sup> показали, что рекомбинантный AtPARG1 способен удалять поли(АДФ-рибозу) из аутомодифицированного AtPARP2. Сходным образом совместная экспрессия AtPARP2 и AtPARG1 в протопластах *Arabidopsis* приводила к значительному удалению поли(АДФ-рибозы) из аутомодифицированного AtPARP2. В отличие от этого, поли(АДФ-рибозо)гликогидролазная активность в отношении аутомодифицированных AtPARP2 или AtPARP1 не была обнаружена для AtPARG2 *in vitro* и *in vivo*. Это отсутствие активности нельзя объяснить исключительно наличием полиморфизма в консервативном сигнатурном мотиве PARG в PARG2, поскольку рекомбинантный белок PARG2, несущий консервативный мотив PARG, также не проявлял какой-либо обнаруживаемой активности поли(АДФ-рибоза) гликогидролазы. Поэтому считается, что дополнительные отклонения в последовательности белков AtPARG1 и AtPARG2 объясняют различия в активности ферментов [322].

Белки, обладающие способностью гидролизовать сложноэфирную связь между рибозой и акцепторной аминокислотой у арабидопсиса, пока не определены. Однако белки, кодируемые локусами At1g63410, At1g69340 и At2g37710, обнаруживают значительную гомологию с описанными выше белками MacroD1 и MacroD2 человека и, таким образом, являются кандидатами на эту функцию. По-видимому, не существует белков *Arabidopsis*, гомологичных человеческим ARH3 и TARG1.

### **1.9 Роль растительных PARP в реакциях на повреждение ДНК и целостности генома**

В течение примерно 40 лет работы над поли(АДФ-рибози)лированием у растений различные исследования показали, что растительные белки PARP являются компонентами ответов на повреждение ДНК, сходными с их аналогами у млекопитающих. Экспрессия AtPARP1 и AtPARP2, но не AtPARP3, индуцируется обработкой агентами, повреждающими ДНК, такими как ионизирующее излучение, зеоцин (радиомиметрический препарат, индуцирующий DSB) или цисплатин (ингибитор репликации ДНК путем перекрестного связывания соседних гуаниновых оснований) у арабидопсиса [320,330,331]. Экспрессия AtPARP3 индуцировалась только в отсутствие AtPARP1 или AtPARP2 [331]. Напротив, экспрессия HvPARP3 индуцировалась

в корнях ячменя в ответ на блеомицин (гликопептид, который в основном индуцирует DSB) [332]. Подобно экспрессии PARP, активность AtPARP индуцировалась агентами, повреждающими ДНК, такими как зеонин и рентгеновское облучение [333,334]. Рекомбинантные AtPARP1 и AtPARP2 активируются при ДНК с разрывом, как показано аутомодификацией рекомбинантных белков AtPARP [316,320,322,333]. Для AtPARP2 также была показана аутомодификация *in vivo* [322]. Аутомодификация белков *in vitro* и *in vivo* блокировалась добавлением фармакологического ингибитора PARP ЗАВ [316,333].

В соответствии с повышенной экспрессией и активностью генов генетическое ингибирование AtPARP в мутантных растениях *parp1* и *parp2* повышало чувствительность роста растений к метилметансульфонату (MMS, агенту алкилирования ДНК, который вызывает повреждения N-алкила и одноцепочечные разрывы (SSB)) и блеомицину [328,330,335,336]. Точно так же образование настоящих листьев было снижено у проростков *parp2*, выращенных на блеомицине и митомицине С (агент, сшивающий ДНК) [317]. Некоторые авторы сообщают, что мутанты *parp2* более чувствительны к агентам, повреждающим ДНК, чем мутанты *parp1* [317,330]. В соответствии с этим поли(АДФ-рибозил)ирование было сильно снижено у мутантов *parp2*, но не у мутантов *parp1* [317]. Повышенное повреждение растений наблюдалось у двойных мутантов *parp1* и *parp2* по сравнению с соответствующими одиночными мутантами, что указывает на то, что оба гена AtPARP участвуют в реакциях на агенты, повреждающие ДНК [317,328,330,335]. Это представление дополнительно подтверждается усиленной экспрессией AtPARP1 у мутантов *parp2* и наоборот [317,327,330]. Кроме того, было показано, что AtPARP1 и AtPARP2 физически взаимодействуют друг с другом [317,333]. У тройных мутантов *parp1 parp2 parp3* обострения тяжести повреждения растений не наблюдалось, что указывает на то, что AtPARP3 не активен в ответе на повреждение ДНК у проростков [328]. Однако у ячменя мутация HvPARP3 приводила к изменению реакции роста корней на блеомицин [332]. Таким образом, повреждение растений и снижение роста мутантов *parp* в условиях генотоксического стресса можно объяснить усугублением повреждения ДНК.

Помимо агентов, повреждающих ДНК, заражение растений бактерией *Pseudomonas syringae* (*Pst*) вызывает повреждение ДНК [337]. В соответствии с этим повреждение ДНК усиливалось у мутантов *parp2* и *parp1 parp2* в ответ на обработку *Pst* [317].

### 1.9.1 Участие PARP1 и PARP2 в различных путях реакции на повреждение ДНК у растений

Обостренная чувствительность *parp* мутантов *Arabidopsis* к различным агентам, повреждающим ДНК, показала, что PARP растений играют важную роль в реакциях на повреждение ДНК, как и их аналоги у человека. В соответствии с этим было обнаружено, что опосредованная ионизирующим излучением индукция AtPARP2 зависит от присутствия АТМ, так как у мутантных растений *atm* индукция отсутствовала [338]. АТМ является

инициатором различных путей репарации повреждений ДНК [339]. Тем не менее, участие растительных белков PARP в специфических путях репарации ДНК еще предстоит выяснить. Например, ингибитор PARP 3-метоксибензамид (3МВ) увеличивал количество рекомбинационных событий у арабидопсиса и табака [340]. Это указывает на то, что PARP негативно регулируют репарацию ДНК с помощью HR. В соответствии с этим экспрессия компонентов HR *AtRAD51* и *AtXRCC3* усиливалась при обработке 3АВ [341]. Более того, экспрессия *AtPARP2* индуцировалась у мутантных растений *mms21-1*, в то время как случаи гомологичной рекомбинации у этого мутанта были снижены [331]. *AtMMS21* кодирует лигазу SUMO E3, критический компонент комплекса SMC5/6, который играет центральную роль в поддержании стабильности генома [331]. Напротив, было обнаружено, что экспрессия *AtXRCC2*, другого компонента HR, снижается при обработке 3АВ [330,341]. Эти явно противоречащие друг другу выводы еще предстоит выяснить.

Другое исследование показало, что PARP вовлечены в склонный к ошибкам альтернативный путь NHEJ, как и их аналоги у млекопитающих [335]. Тройные мутантные растения, лишенные *AtPARP1*, *AtPARP2* и *AtKu80*, компонента классического NHEJ, были более чувствительны к MMS, чем мутанты *parp1*, *parp2* и *ku80*, что указывает на то, что у мутантов нарушены различные пути ответа на повреждение ДНК [335]. Кроме того, степень повреждения ДНК была выше у мутантных растений *parp1 parp2 ku80*. Бесклеточный анализ соединения концов выявил большее количество крупных делеций (>10 п.н.) на концах разорванных цепей ДНК у *ku80* и *parp1 parp2 ku80*, чем у мутантов *parp1 parp2*. Так, резекция нуклеотидов с концов ДНК происходила в основном у мутантов *ku80* и *parp1 parp2 ku80*. Альтернативным путем NHEJ у мутантов *ku80* является опосредованное микрогомологией соединение концов (MMEJ). Более высокий уровень продуктов MMEJ был обнаружен у *ku*-мутантов по сравнению с мутантами *parp1*, *parp2* или *parp1, parp2 ku80*, что указывает на участие PARP в MMEJ [335]. Напротив, Shen и коллеги предположили, что PARP действуют в альтернативном NHEJ, независимо от микрогомологии [342].

Недавно была дополнительно выяснена одна функция *AtPARP1* в реакциях на повреждение ДНК. Двойной мутант *parp1 rad5a* был более чувствителен к ДНК-алкилирующему агенту MMS, чем соответствующие одиночные мутантные растения [336]. Напротив, *parp1 rad5a* не проявлял повышенной чувствительности к сшивающим агентам цисплатину и митомицину С по сравнению с мутантными растениями *rad5a*. У мутанта *parp1* не наблюдалось повышенной чувствительности к любому агенту по сравнению с растениями дикого типа. Эти находки позволяют предположить, что *AtPARP1* участвует в репарации алкилированных оснований по пути, параллельному пути с участием RAD5a, который, возможно, соответствует эксцизионной репарации оснований (BER) и независимой от HR репарации одноцепочечных разрывов [336]. В соответствии с этим 3АВ подавлял индуцированную паракватом экспрессию XRCC1 [341]. XRCC1 является компонентом стадии заполнения пробела и запечатывания разрыва в BER [343]. Экспрессия *AtPARP2* индуцируется в



отсутствие LIG1, другого компонента BER, что указывает на то, что AtPARP2 также взаимодействует с путем BER [316].

### 1.9.2 PARP3 — ключевой компонент целостности генома семян

Предполагается, что у взрослых растений арабидопсиса AtPARP3 либо неактивен, либо не участвует в реакциях на повреждение ДНК [328]. Напротив, сильная экспрессия была обнаружена в семенах [322,323]. Скрининг общедоступных наборов данных микрочипов и гистохимический анализ GUS подтвердили накопление транскриптов AtPARP3 именно в зародыше и эндосперме сухих семян, во время набухания и во время прорастания семян [342]. Аналогичный паттерн экспрессии был также обнаружен для ортолога PARP3 в рисе [344]. Кроме того, уровни поли(АДФ-рибозы) коррелировали не с глубиной покоя семян у разных экотипов арабидопсиса, а с их чувствительностью к MMS [345,346]. Следовательно, предполагалось, что AtPARP3 участвует в защите зародыша растения от повреждения ДНК в семени. Это мнение подтверждается данными о том, что активность промотора AtPARP3 совпадает с накоплением активных форм кислорода (АФК) в эмбрионе и что семена мутантов *parp3* теряют жизнеспособность при длительном хранении или искусственном старении, что указывает на роль AtPARP3 в индуцированном АФК ответе на повреждении ДНК во время хранения семян и прорастания [324,347]. Поиски в базе данных показывают наличие последовательностей, гомологичных AtPARP3, у других видов растений, таких как *Populus trichocarpa*, *Physcomitrella patens*, *Oryza sativa*, *Brachypodium distachyon*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays* и *Hordeum vulgare* [324,332,344]. Это приводит к выводу, что защитная роль PARP3 может сохраняться во всем царстве растений.

Активность PARP приводит к образованию ингибитора обратной связи никотинамида в качестве побочного продукта [348]. Никотинамидазы превращают никотинамид в никотинат, который далее метаболизируется обратно в НАД<sup>+</sup> в спасательном пути [348]. У арабидопсиса шаблон экспрессии AtPARP3 коррелирует с шаблоном никотинамидазы 2 (NIC2) [345]. Прорастание мутантных семян *nic2* было гиперчувствительным к MMS, возможно, из-за сниженных уровней поли(АДФ-рибозил)ирования, что, в свою очередь, вероятно, связано с уменьшением деградации никотинамида [345,346]. С другой стороны, избыточное накопление никотината в результате разложения никотинамида является токсичным. Следовательно, было показано, что детоксикация никотината путем О-гликозилирования, опосредованная никотинатгликозилтрансферазой UGT74F2-1, необходима для прорастания семян в условиях стресса [349]. Это еще одно свидетельство индукции активности PARP3 в семенах в неблагоприятных условиях.

Поскольку AtPARP3 проявляет структурную гомологию с AtPARP1 и PARP3 человека (рисунок 8), можно предположить сходные функции. PARP3 человека участвует в репарации повреждений ДНК с помощью негомологичного соединения концов (NHEJ), что указывает на роль растительного PARP3 в репарации DSB посредством NHEJ. Интересно, что у *Hordeum vulgare* экспрессия HvPARP3 в корнях молодых проростков усиливалась под действием

агента, индуцирующего DSB ДНК, блеомицина [332], поддерживая такую функцию. Тем не менее, точная роль растительного PARP3 в репарации DSB ДНК должна быть выяснена. Помимо прорастания мутантных семян арабидопсиса *parp3* в присутствии агентов, индуцирующих DSB ДНК, скрещивание мутантов *parp3* с мутантами *ku70* и *ku80* может предоставить доказательства того, действует ли AtPARP3 в NHEJ, как его аналог у млекопитающих. Поскольку прямые доказательства активности поли(АДФ-рибозил)ирования AtPARP3 до сих пор отсутствуют, необходимо определить активность PARP в мутантных семенах *parp3*. Аберрантные уровни поли(АДФ-рибозы) будут указывать, способен ли AtPARP3 к поли(АДФ-рибозил)ированию. Однако также возможна активность моно(АДФ-рибозил)ирования этим ферментом, сходная с его человеческим аналогом.

### 1.9.3 Связь растительных белков PARG с реакцией на повреждение ДНК

Подобно мутантным растениям *parp*, *parg1* мутанты *Arabidopsis* проявляли повышенную чувствительность к митомицину С и блеомицину [350]. Мутантные растения, лишённые AtPARG2, не обнаруживали или лишь немного повышали чувствительность к агентам, повреждающим ДНК, что указывает на то, что AtPARG1 более важен в ответ на повреждение ДНК, вызванное агентами, повреждающими ДНК [328,350]. Примечательно, что мутации *parg1* вызывали более серьёзные повреждения растений, чем отсутствие AtPARP [328]. Это было связано с тем, что свободная поли(АДФ-рибоза) считается токсичной для растительных клеток, как это было описано для клеток млекопитающих [328].

Механистическую роль PARG в реакциях растений на повреждение ДНК ещё предстоит выяснить. У мутантов *parg1* была обнаружена повышенная экспрессия компонентов HR (т.е. SMC6A, SMC6B, RAD17, RAD51, RAD54, REV7) и компонентов NHEJ (т.е. LIG4, Ku70, Ku80) [328]. Напротив, у мутантов *parg1* была нарушена экспрессия RAD51 и SWI, индуцированная бактериальным элиситором flg22 [351]. Кроме того, индукция экспрессии AtPARG1 была ослаблена у мутантных растений *atm* и *atr* и наоборот [328]. Подобно ATM, ATR является инициатором различных путей репарации повреждений ДНК [339]. Следовательно, PARG, как и PARP, по-видимому, действуют как переключатель между различными путями репарации ДНК в растениях. Тем не менее, их точная функция все ещё неоднозначна.

### 1.9.4 Растительные PARP модифицируют хромосомы

В соответствии с ролью в реакции растений на повреждение ДНК, PARP обладают поли(АДФ-рибозил)ирующей активностью в отношении хромосомных белков. AtPARP1 и AtPARP2 связываются с хромосомами в делящихся клетках через свои N-концевые домены [352]. Таким образом, оба белка совместно локализуются и, вероятно, конкурируют за предполагаемые сайты ассоциации с гетерохроматином. Гистоны H1, H2A и H2B в пшенице и табаке, а также гистоны H1.1 и H1.3 в арабидопсисе были нацелены на поли(АДФ-рибозил)ирование, предположительно создавая структуру хроматина, более доступную для РНК-полимеразы II, как это было обнаружено

для PARP1 человека [310,312,322]. На возможную регуляцию транскрипции белками PARP указывает взаимодействие AtPARP1 с DIP1 и DIP2, двумя белками, гомологичными транскрипционному коактиватору ALY, через его ДНК-связывающий домен *in vitro* и в дрожжах [353].

Экспрессия AtPARP1 и AtPARP2, но не AtPARP3, увеличивается в ответ на дисфункцию теломеразы [330,354]. Однако, в отличие от своих аналогов у человека, AtPARP1 и AtPARP2 не стимулируют активность теломеразы. Кроме того, ни PARP арабидопсиса не участвует в защите концов теломер и защите длины теломер у проростков и цветков [330]. Напротив, предполагалось, что HvPARP3 участвует в поддержании длины теломер у проростков ячменя [332]. Это явное несоответствие требует систематического изучения роли PARP, связанных с теломерами, у большего разнообразия видов растений.

### **1.10 Роль растительных PARP в гибели, развитии и метаболизме клеток**

Белки PARP млекопитающих являются регуляторами различных аспектов клеточной гибели. Сопоставимые функции были обнаружены и у растительных PARP [355,356]. Таким образом, обработка ингибиторами PARP, ЗАВ и никотинамидом, блокировала РСД, вызванную тепловым шоком и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, в культивируемых клетках табака и сои, при этом опосредованная ингибитором PARP защита от H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцированной РСД была наиболее эффективной в начальной фазе обработки H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [355,356]. В этот момент резкое падение уровня НАД<sup>+</sup> в клетках сои указывало на начало активности PARP. Интересно, что сверхэкспрессия AtPARP2 в культуре клеток сои приводила к снижению гибели клеток при низких концентрациях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (легкий окислительный стресс), но к резкому увеличению гибели клеток при высоких концентрациях H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (тяжелый окислительный стресс). Кроме того, экспрессия AtPARP2 снижала количество ДНК с разрывами как при легком, так и при тяжелом окислительном стрессе [355]. Кроме того, расщепление белков AtPARP каспазой-3, центральным компонентом запрограммированной гибели клеток, было продемонстрировано в клетках табака непосредственно после воздействия теплового шока, вызывающего РСД [356]. Эти данные свидетельствуют о том, что PARP растений выполняют те же функции, что и их аналоги у млекопитающих: они действуют как переключатель между репарацией повреждений ДНК в условиях умеренного стресса и РСД в условиях сильного стресса.

Предполагается, что помимо повреждения ДНК и РСД важную роль в развитии растений играют белки PARP и поли(АДФ-рибозил)ирование [357]. Например, образование трахейных элементов в культурах клеток артишока, клубнях артишока и эксплантатах корней гороха ингибировалось добавлением ингибитора PARP, ЗАВ [358]. В дополнение к этому экспрессия AtPARP1 и AtPARP2 и их активность увеличивались в культурах клеток арабидопсиса в фазе экспоненциального роста [359]. Это увеличение экспрессии и активности было временно связано с увеличением экспрессии маркерного гена для фазового перехода от S к G2 в клеточном цикле. Одновременно была обнаружена корреляция между повышением активности PARP и увеличением пула глутатиона при экспоненциальном росте клеточной культуры [359].

Следовательно, активность PARP связана с ходом клеточного цикла и регуляцией окислительно-восстановительного потенциала, что указывает на регулируемую функцию AtPARP в развитии растений. В соответствии с этим всхожесть семян была изменена у мутантных растений *parp1*, *parp2* и *parp3*. В нестрессовых условиях растения *parp3* прорастали быстрее, чем растения дикого типа, в то время как растения *parp1* и *parp2* демонстрировали более медленную и частично сниженную скорость прорастания [9].

Помимо прорастания, регуляция роста растений, по-видимому, включает поли(АДФ-рибозил)ирование, поскольку было показано, что ингибитор PARP ЗМВ улучшает рост арабидопсиса в нестрессовых условиях [360,361]. Усиленный рост на ЗМВ был связан с более высоким числом клеток листа из-за укороченного цикла клеточного деления, что привело к увеличению общего размера листа [361]. Более того, обработка ЗМВ изменяла экспрессию генов у растений арабидопсиса в условиях отсутствия стресса, влияя на компоненты реакции растений на внешние и внутренние раздражители и реакцию на абиотический стресс, циркадный ритм, рост растений, энергетический обмен и фотосинтез, а также первичный и вторичный метаболизм [351,360,361]. Для ингибитора PARP ЗАВ сообщалось о противоположных эффектах в зависимости от используемой концентрации ЗАВ. Биомасса растений арабидопсиса снижалась при обработке 2,5 или 5 мМ ЗАВ [330,351,362], тогда как 1 мМ ЗАВ способствовал развитию биомассы растений и корневой системы, что приводило к большему количеству боковых корней, образованию боковых корней второго порядка, увеличению длины боковых корней и увеличению длины первичного корня по сравнению с контрольными растениями [333]. Подобные, хотя и более слабые эффекты наблюдались для другого ингибитора PARP, 6(5Н)-фенантридинона. Подобно фармакологическому ингибированию PARP, отсутствие AtPARP1 и AtPARP2 у двойных мутантов *parp1 parp2* приводило к формированию более крупной корневой системы по сравнению с диким типом [333], но этот фенотип был слабее, чем вызываемый ингибиторами. Напротив, нокаутные мутантные линии всех генов PARP арабидопсиса, включая все комбинации двойных мутантов и тройной мутант *parp1, parp2, parp3*, не демонстрировали очевидных изменений развития в нестрессовых условиях роста [327]. Это согласуется с выводами, полученными другими авторами [317,328,333]. Следовательно, PARP, по-видимому, влияют на развитие растений только в определенных условиях, природу которых еще предстоит определить. Кроме того, более сильные и более устойчивые эффекты ингибиторов PARP по сравнению с генетическим нокаутом указывают на нецелевые эффекты этих веществ. Необходима дальнейшая работа для выяснения конкретной роли PARP в развитии растений.

### **1.11 Поли(АДФ-рибозил)ирование и реакция растений на абиотический стресс**

Белки PARP растений были связаны с реакцией на абиотический стресс. В некоторых исследованиях экспрессия генов AtPARP и AtPARG была изменена в ответ на абиотические стрессы [320,325], хотя во многих других исследованиях

не удалось обнаружить транскрипционные ответы на засуху, осмотический или солевой стресс [327,363–369]. Нокдаун P ARP1 или P ARP2 у масличного рапса и арабидопсиса с помощью конструкций шпилек P ARP повышает толерантность к высыханию, кратковременной обработке паракватом и яркому свету, что связано со снижением активности P ARP в условиях стресса [24]. Соответственно, высокое потребление энергии, которое является ответом на активацию P ARP после сильного стресса в клетках млекопитающих, было предотвращено в линиях нокдауна. Энергетический гомеостаз и нормальный уровень митохондриального дыхания сохранялись, а продукция АФК поддерживалась на низком уровне [24]. Следовательно, сохранение энергии при стрессе было предложено как причина повышенной устойчивости к абиотическому стрессу линий нокдауна P ARP. Дополнительные объяснения были получены при транскриптомном исследовании растений со сниженной экспрессией AtP ARP1 [370]. При «высоком световом» стрессе ( $250\text{--}300\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{sec}^{-1}$ ) нокдаун AtP ARP1 приводил к ослаблению экспрессии генов, чувствительных к температуре и зависимых от окислительного стресса. Кроме того, гены, участвующие в клеточном транспорте и энергетическом обмене, были репрессированы, что еще раз подтверждает гипотезу о том, что снижение активности P ARP повышает устойчивость к стрессу за счет снижения окислительного стресса и сохранения энергетического гомеостаза. Напротив, гены, реагирующие на абсцизовую кислоту (АБК), дегидратацию и холод, гипериндуцировались нокдауном AtP ARP1 при сильном световом стрессе [370]. В то же время уровни АБК были выше у растений со сниженной экспрессией AtP ARP1. Эти данные указывают на роль AtP ARP1 как негативного регулятора транскрипции стрессовых реакций растений АБК-зависимым образом. Это вызвало дополнительную гипотезу, объясняющую повышенную толерантность к абиотическому стрессу снижением активности P ARP, связывающую повышенный уровень НАД<sup>+</sup> с повышенным уровнем АБК и повышенной экспрессией АБК-чувствительных генов через циклическую АДФ-рибозу (цАДФР) [370]. Эта молекула синтезируется неизвестной АДФ-рибозоциклазой с использованием НАД<sup>+</sup> в качестве субстрата и участвует в АБК-зависимой передаче сигналов стресса, а также в регуляции циркадных часов [32,323,371,372]. цАДФР запускает высвобождение Ca<sup>2+</sup> из внутренних хранилищ, что индуцирует выработку АБК и, следовательно, экспрессию гена, чувствительного к АБК. Было высказано предположение, что сохранение пула НАД<sup>+</sup> за счет снижения экспрессии AtP ARP1 способствует синтезу цАДФР, тем самым обеспечивая повышенную стрессоустойчивость. Хотя синтез цАДФР, его активность в качестве вторичного мессенджера, высвобождающего Ca<sup>2+</sup>, и его участие в передаче сигналов АБК и оксида азота были индивидуально продемонстрированы у растений [372–376], лежащие в их основе молекулярные механизмы остаются в значительной степени неясными, поскольку в высших растениях отсутствуют присущие животным АДФ-рибозоциклазы и активируемые цАДФР, Ca<sup>2+</sup>-каналы (например, рианодиновые рецепторы) [377]. Поэтому проверка этой гипотезы представляет собой сложную задачу.

Представление о PARP растений как важных негативных факторах устойчивости к абиотическому стрессу было оспорено недавно опубликованным исследованием, в котором рост мутантов *Arabidopsis* с одинарным, двойным и тройным нокаутом по всем трем генам AtPARP не изменился по сравнению с диким типом при воздействии высыхания, солевого, осмотического или окислительного стресса [327]. Эти противоположные результаты приводят к выводу, что фенотип повышенной стрессоустойчивости является условным. Условные фенотипы часто встречаются у мутантов с потерей функции, поскольку растения развили много адаптивных черт, которые позволяют им справляться с изменениями в окружающей среде [378]. Факторами, определяющими условные фенотипы, могут быть свет, температура и состояние питания, и между ними возможны взаимодействия [378]. Соответственно, у мутантов с потерей функции было описано большое количество условных фенотипов, которые влияют на все аспекты развития растений [379]. Например, мутант *quill* с условным расширением корней демонстрирует аналогичный рост корней, как у дикого типа, на 0,5% сахарозе, но резко сниженный рост корней на 4,5% сахарозной среде. В этих условиях рост корней растений дикого типа даже выражен [380]. Аналогично, мутант *petit1* демонстрирует пониженное удлинение гипокотыля на среде, содержащей сахарозу, но не на среде, не содержащей сахарозу [381]. Нечувствительный к фотопериоду раннецветущий 3-мутант *elf3* демонстрирует ритмичное движение листьев в темноте и при нескольких режимах свет/темнота, но не при постоянном освещении [382]. Не только световой режим, но и интенсивность освещения могут влиять на фенотипы растений. Следовательно, мутанты *vad1* демонстрируют повреждения, вызванные гиперчувствительным ответом, при высокой, но не при низкой интенсивности света [383]. Напротив, растения, лишённые белков, содержащих домен миелобластоза (MYB) MYB33 и MYB65, демонстрируют мужскую стерильность, особенно в условиях низкой освещённости [384]. Эти примеры иллюстрируют широкий спектр условных фенотипов, выявленных до сих пор в исследованиях растений с использованием мутантных линий с потерей функции.

По сравнению с генетическим ингибированием PARP, фармакологическое ингибирование PARP широко используется в качестве инструмента для выяснения роли белков PARP в устойчивости растений к стрессу [24,341,360,361,385]. Энергетический гомеостаз в растениях улучшался за счёт ингибирования PARP, опосредованного ЗМВ. В то время как экспрессия генов, связанных с фотосинтезом, эффективным квантовым выходом фотосинтеза и скоростью транспорта электронов, индуцировалась, маркерные гены низкого энергетического статуса не изменялись у растений арабидопсиса, выращенных в нестрессовых условиях [361], а содержание НАД<sup>+</sup> увеличивалось как при состоянии без стресса и окислительного стресса [360]. Примечательно, что обработка ЗМВ дерегулировало экспрессию генов компонентов фенилпропаноидного пути в условиях отсутствия стресса и окислительного стресса [360,361]. Количество метаболитов, полученных из фенилпропаноидного пути, таких как флавонолы и лигнины, уменьшалось при обработке ЗМВ [361]. Эти результаты могут объяснить снижение пигментации

листьев, снижение накопления антоцианов и усиление роста растений, наблюдаемые при обработке ЗМВ в условиях окислительного стресса, вызванного паракватом [360]. Снижение накопления антоцианов не было специфичным для ЗМВ, так как ингибиторы PARP 3-метилбензамид и 3-аминофталгидразид действовали аналогично. Кроме того, ингибиторы снижали концентрацию других связанных со стрессом метаболитов, таких как галактинол или мио-инозитол. Помимо вмешательства в реакцию на окислительный стресс, ЗМВ усиливал рост растений в ответ на солевой, тепловой и световой стресс [106]. Кроме того, ЗМВ и никотинамид повышали толерантность эксплантатов гипокотыля *Brassica napus* к окислительному стрессу, вызванному ацетилсалициловой кислотой [24]. В другом исследовании 4-амино-1,8-нафталамид, ингибитор PARP, увеличивал скорость роста *Lemna minor*, сталкивающейся с осмотическим стрессом, при обработке полиэтиленгликолем (-0,3 МПа) и повышал толерантность культуры клеток *Arabidopsis* к H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [385]. В отличие от данных о том, что фармакологическое ингибирование PARP снижает чувствительность растений к обработке паракватом [24], другие авторы обнаружили, что обработка проростков арабидопсиса ЗАВ повышала чувствительность к длительной обработке паракватом [341]. Это несоответствие можно объяснить разным уровнем стресса и, как следствие, степенью активации PARP.

### 1.12 Поли(АДФ-рибозил)ирование и реакция растений на биотический стресс

Патоген-ассоциированные молекулярные паттерны (РАМР) представляют собой структурные или функциональные единицы микроба, которые распознаются иммунной системой растений и вызывают защитные реакции. Такими РАМР являются N-концевые 22 аминокислоты флагеллина (flg22) из бактерий *Pseudomonas* и N-концевые 18 аминокислот EF-Tu (elf18) из *Escherichia coli* [386]. Они вызывают иммунные реакции, такие как окислительный взрыв, повышение уровня свободного Ca<sup>2+</sup> в цитозоле, усиление клеточной стенки каллозой и лигнином и индукцию транскрипции защитных генов [387,388]. Ингибиторы PARP ЗАВ и 6-(5Н)-фенантридинон блокируют индуцированное flg22 и elf18 отложение каллозы в проростках арабидопсиса [327,350,362,389], хотя индукция транскрипта и белка гена каллозосинтазы не затрагивается [389]. Этот эффект можно обойти салициловой кислотой [350]. Никаких изменений при обработке ингибитором PARP не было обнаружено в ранних ответах РАМР, таких как всплеск АФК, и в индуцированном ранами отложении каллозы [350,389]. В отличие от ЗАВ и 6(5Н)-фенантридинона, мощные ингибиторы PARP PJ-34, INH2BP и 4ANI не блокировали РАМР-индуцированное отложение каллозы [327,389], что можно объяснить нецелевыми эффектами препаратов.

В ряде других фармакологических исследований PARP отводится роль регуляторов ответа патогенов. Например, было показано, что ингибитор PARP ЗМВ, который структурно очень похож на ЗАВ, отрицательно влияет на фенилпропаноидный путь [360,361]. Подобные наблюдения были также сделаны для ЗАВ, который ингибирует фенилаланин-аммоний-лиазу, компонент

фенилпропаноидного пути [390]. Аналогичным образом индуцированное elf18 накопление гваяцил-лигнина блокировалось при обработке ЗАВ [350]. Транскриптомный анализ также показал, что фармакологическое ингибирование PARP с помощью ЗАВ дерегулирует PAMP-индуцированные транскрипционные ответы у арабидопсиса [351].

Вопреки фармакологическому ингибированию PARP ЗАВ и 6-(5H)-фенантридином, генетическая отмена *AtPARP1* или *AtPARP2* в линиях с одиночным нокаутом Т-ДНК не изменяла индуцированное flg22 отложение каллозы, тогда как в двух исследованиях линии двойных мутантов *parp1* и *parp2* демонстрировали усиленные или снижение отложения каллозы в зависимости от возраста растения и/или применяемой концентрации flg22 [317,391]: перенос пятидневных проростков в жидкую среду, содержащую 1 мкМ flg22, усиливал отложение каллозы (но не всплеск АФК) [317], в то время как инфильтрация листьев четырехнедельных растений 0,5 мкМ flg22 снижала этот ответ [391]. Тем не менее, мутантные растения *parp2* и двойные мутантные растения *parp1 parp2* проявляли повышенную чувствительность к штамму *Pst* DC3000 [317,322]. Этот штамм также индуцировал активацию PARP в растениях арабидопсиса, о чем свидетельствует снижение уровня НАД<sup>+</sup> в клетках и увеличение содержания поли(АДФ-рибозы) в листьях [350]. В совокупности эти данные указывают на роль белков PARP, особенно PARP2, в качестве регуляторных компонентов базального иммунного ответа. Однако в двух независимых недавних исследованиях индуцированное flg22 отложение каллозы не было изменено в проростках с тройным нокаутом *parp1*, *parp2*, *parp3* [327,389]. В двух исследованиях растения различались по стадии развития и условиям роста во время применения flg22. Следовательно, эти противоречивые данные дополнительно подтверждают выдвинутые выше представления об обусловленности фенотипов мутаций *parp* и нецелевых эффектов ингибиторов PARP, которые еще предстоит проверить экспериментально.

Недавно был идентифицирован новый участник PARP-опосредованного иммунитета растений. Мутантные растения, лишённые *AtPARP2*-поли(АДФ-рибозил)ированного белка DWADLE (DDL), проявляли повышенную чувствительность к *Pst* DC3000, *P. syringae* pv. *maculicola*, непатогенный *Pst* DC3000 hrcC (секреционный мутант *Pst* DC3000 типа III) и неадаптивный патоген *P. syringae* pv. *phaseolicola* [391]. Сходным образом мутанты *ddl* показали пониженное отложение каллозы в ответ на flg22 и *Pst* DC3000 hrcC. В отличие от фармакологического ингибирования PARP, ранняя PAMP-индуцированная экспрессия генов была снижена у мутантов *parp1* и *parp2*, но не у *ddl* [322,391]; поздние транскрипционные ответы на обработку PAMP были снижены как у *parp1*, *parp2*, так и у *ddl* [391]. Эти частично перекрывающиеся фенотипы *parp1*, *parp2* и *ddl* дополнительно указывают на взаимодействие этих белков в ответ на PAMP. Фактически, взаимодействие *AtPARP2* и DDL было подтверждено анализами иммунопреципитации и биомолекулярной флуоресценции, и было обнаружено, что оно усиливается с помощью flg22. Прямое взаимодействие обоих белков было заметно сильнее при поли(АДФ-рибозил)ировании. В дополнение к *AtPARP2* было показано, что *AtPARP1* также



поли(АДФ-рибозил)ируют DDL, но в меньшей степени, чем AtPARP2. Белок DDL, в котором отсутствуют сайты поли(АДФ-рибозил)ирования, не может компенсировать чувствительность к обработке PAMP, что указывает на то, что поли(АДФ-рибозил)ирование DDL необходимо для правильного иммунного ответа растений. Поскольку DDL усиливает экспрессию генов, индуцированную поздним PAMP, и поскольку предполагалось, что он взаимодействует с ацетилтрансферазами гистонов у арабидопсиса, Feng и его коллеги пришли к выводу, что DDL участвует в ремоделировании хроматина, опосредованном поли(АДФ-рибозил)ированием, чтобы обеспечить доступ к промоторам генов-мишеней при иммунитете растений [391].

Поскольку PARG противодействуют действию PARP, мутанты *parg* также должны демонстрировать измененные ответы на биотический стресс. Соответственно, мутанты *parg1*, но не *parg2*, демонстрировали более сильное ингибирование роста при обработке *elf18*, что сопровождалось повышенным накоплением пигмента [350]. Зрелые растения *parg1* также демонстрировали усиленное отложение каллозы, индуцированное *flg22*, и повышенную экспрессию генов, регулируемых *flg22* [322]. Подобно мутантным растениям *parp* и фармакологическому ингибированию PARP, ранняя PAMP-индуцированная продукция ROS не изменялась у мутантных растений *parg1*. Тем не менее, этот мутант демонстрировал транскрипционные изменения в экспрессии защитных генов [351]. Эти изменения не могут быть отнесены к конкретным сигнальным путям, индуцированным патогеном, что позволяет сделать вывод, что AtPARG1 действует как регуляторный элемент в узлах путей ответа [351]. Кроме того, появление симптомов инфекции *B. cinerea* ускорялось как у мутантных растений *parg1*, так и у *parg2* [350]. Следовательно, в частности, AtPARG1 может быть описан как положительный регулятор ответов на биотический стресс. На этом фоне удивительно, что экспрессия *AtPARG2* повышалась в ответ на инфекцию *Pst* и *Botrytis cinerea* и обработку *flg22*, в то время как *AtPARG1* лишь временно индуцировалась обработкой *flg22* и *elf18* [317,350,362]. Это несоответствие необходимо разъяснить.

### 1.13 Неканонические белки домена PARP в ответ на стресс у растений

В дополнение к каноническим белкам PARP члены семейства SRO (Similar to RCD One) обладают каталитическим доменом PARP, хотя и с необычным каталитическим мотивом триады [392,393]. Таким образом, SRO-белки можно рассматривать как часть растительного семейства PARP *sensu lato*. Гены SRO присутствуют во всех секвенированных геномах наземных растений со значительными различиями в составе между секвенированными видами растений [393,394]. У арабидопсиса это семейство включает белки Radical-Induced Cell Death1 (RCD1) и его гомологи от SRO1 до SRO5 [393,395]. В отличие от канонических белков PARP, близкие гомологи RCD1 и SRO1 содержат центральный каталитический домен PARP, который окружен N-концевым доменом WWE и C-концевым доменом RST, в то время как от SRO2 до SRO5 домен WWE отсутствует (рисунок 8) [392,396]. В исследованиях *in vitro* RCD1 не проявляет ферментативной активности [393], тогда как активность

PARP была продемонстрирована *in vitro* и *in vivo* для гомологичного белка пшеницы [397].

RCD1 является первым признанным членом этого семейства белков. Первоначально он был идентифицирован во время скрининга чувствительности к озону у арабидопсиса и регуляторов окислительного стресса у дрожжей [395,398]. Соответственно, *rcd1* мутантные растения *Arabidopsis* были гиперчувствительны к обработке озоном и, как следствие, апопластически продуцируемым АФК [392,398]. Напротив, растения *rcd1* устойчивы к АФК, образующимся в хлоропластах при обработке паракватом [392,399]. RCD1 экспрессируется повсеместно и конститутивно в растениях арабидопсиса [396,400]. Он локализуется в ядре [401,402], но при солевом и окислительном стрессе RCD1 также локализуется в цитоплазме [402]. Было показано, что RCD1 участвует в реакциях на солевой стресс, в защите от патогенов, в регуляции устьичной проводимости, в реакциях на УФ-В, в температурных реакциях, в РСД, в регуляции окислительно-восстановительного потенциала, а также в передаче сигналов АФК и растительных гормонов [392,399,402–411]. Интересно, что RCD1 является мишенью эффекторного белка оомицета-патогена *Hyaloperonospora arabidopsis*, и связывание этого эффектора подавляет активацию генов защиты, индуцированных салициловой кислотой, и изменяет реакцию на свет [184]. RCD1 фосфорилируется, вероятно, путем взаимодействия с Mut9-подобными протеинкиназами, которые также фосфорилируют фоторецепторы. Это может представлять собой связь фотоответа и передачи сигналов салициловой кислоты [405]. Мутантные растения *Rcd1* демонстрируют серьезные дефекты развития, такие как задержка роста, измененная морфология розетки и листьев, раннее время цветения и большое количество дифференциально регулируемых генов [392,396,400]. Белок RCD1 физически взаимодействует с Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-антипортером SOS1 и, в частности, с факторами транскрипции из различных семейств, таких как AP2/ERF, NAC (NAM, ATAF1 и -2 и CUC2), MYB и основная спираль-петля-спираль [395,396,402,412]. Наиболее заметным фактором транскрипции, с которым взаимодействует RCD1, является белок DREB2A семейства AP2/ERF [395,396,413], который является регулятором транскрипции генов, участвующих в реакциях на различные стрессы, такие как засуха, засоление и жара, а также старение растений [413,414]. Это взаимодействие опосредовано спирально структурированным С-концевым доменом RST длиной около 70 аминокислот [395,411,415,416, р. 1]. Термин «RST» назван в честь трех белков, несущих этот домен: RCD1, SRO1 и TAF4 [415]. В DREB2A связывание с RCD1 обеспечивается RCD1-interacting motif (RIM), хотя последовательности RIM недостаточно для этого взаимодействия [413]. В других транскрипционных факторах, взаимодействующих с RCD1, этот мотив отсутствует, и не было идентифицировано общей последовательности мотива, обеспечивающей взаимодействие [413,417, р. 1]. Вместо этого взаимодействие между RCD1 и его партнерами по факторам транскрипции опосредуется внутренне неупорядоченными областями [418]. Соответственно, было обнаружено, что короткие линейные мотивы неупорядоченных областей фактора транскрипции достаточны для взаимодействия RCD1 [417]. Таким

образом, белок домена PARP RCD1, по-видимому, является центральным узлом в реакциях растений на стресс и патогены, гомеостазе АФК, передаче сигналов растительных гормонов и PCD.

Белок SRO1 с доменом PARP имеет 76% сходства с RCD1. Оба белка были идентифицированы как паралоги, вероятно, возникающие в результате дубликации генов [400]. Оба они локализуются в ядре и экспрессируются повсеместно в растении [396,400,419], при этом уровни экспрессии SRO1 обычно ниже, чем у RCD1 [400]. В отличие от мутантных растений *rcd1*, растения *sro1* не проявляли чувствительности к озону и солевому стрессу и нормально росли в нестрессовых условиях [396,400]. Подобно RCD1, SRO1 взаимодействует с транскрипционными факторами, но только с теми, которые взаимодействуют с RCD1 [396]. Двойные мутанты, лишённые как RCD1, так и SRO1, обнаруживают вредные дефекты развития [396,400,419]. В совокупности RCD1 и SRO1, по-видимому, являются неравно перекрывающимися белками [396].

Еще одним членом семейства SRO является SRO5. В отличие от RCD1 и SRO1, экспрессия которых практически не изменяется при стрессе, уровни транскриптов SRO5 изменялись при воздействии солености, озона, света, ранения, аноксии и бактериальных элиситоров [393,420]. Кроме того, было показано, что SRO5 очень своеобразно участвует в ответе на солевой и окислительный стресс [200]: при солевом стрессе транскрипты SRO5 образуют siРНК с перекрывающимся в антисмысловой ориентации геном P5CDH (1-пирролин-5-карбоксилат дегидрогеназы), тем самым регулируя ее на посттранскрипционном уровне. Удивительно, но экспрессия гена P5CDH не была усилена в мутантных растениях *sro5* [393,420]. Кроме того, SRO5 и P5CDH не перекрываются у *Arabidopsis lyrata*, виноградной лозы и тополя [393]. Поэтому было высказано предположение, что регуляция P5CDH не является основной функцией гена SRO5 [393,420]. Сам SRO5, по-видимому, участвует в регуляции АФК [200]. Подобно RCD1 и SRO1, SRO5 локализуется в ядре и взаимодействует с факторами транскрипции, включая DREB2A [393], обеспечивая альтернативное объяснение действия SRO5 в растениях. Подобно SRO5, SRO2 и SRO3 показали изменения уровней их транскриптов в ответ на свет, соль и озон [393].

Центральное положение семейства SRO в передаче сигналов и реакциях на стресс также верно для однодольных. Модуляция гомеостаза АФК и положительная роль в устойчивости к абиотическим стрессам были продемонстрированы для гомолога пшеницы RCD1/SRO1, Ta-SRO1 [397]. Белок SRO в рисе, OsSRO1c, который является мишенью фактора транскрипции NAC, также участвует в устойчивости к окислительному стрессу, регуляции устьиц и устойчивости к засухе и холоду [394,421]. Подобно RCD1 и SRO1 *Arabidopsis*, этот белок риса взаимодействует с транскрипционными факторами DREB и NAC [421]. Взаимодействие с фактором транскрипции NAC также было показано для гомолога ячменя HvRCD1 [412]. Другой член семейства OsSRO, OsSRO1a, взаимодействует с белком РНК-связывающего домена, OsRBD1 [422]. Совместная экспрессия обоих белков в дрожжах приводила к улучшению роста в условиях абиотического стресса, но к снижению устойчивости к

окислительному стрессу [422]. Недавно в кукурузе было идентифицировано шесть белков SRO. Промоторные области генов, кодирующих эти белки, содержат элементы, связанные со стрессом и гормональной сигнализацией. Соответственно, стресс и гормональная терапия по-разному влияли на экспрессию генов ZmSRO [423,424].

Несмотря на то, что исследования белков SRO в основном были сосредоточены на арабидопсисе и однодольных культурах, члены семейства недавно были описаны у других двудольных видов. Белок томата Sl-SRO11, наиболее похожий на AtSRO5, улучшал солеустойчивость при экспрессии в арабидопсисе [420], а белок RCD1 лилии взаимодействовал с DREB2 транскрипционным фактором L1DREB2B, подобно его ортологу у арабидопсиса [425].

## 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Бактериальные штаммы, плазмиды и реактивы

В ходе работы мы использовали бактериальные штаммы NovaXG (Zappers) для наработки плазмидной ДНК и Rosetta 2(DE3) (Novagen-EMD4 Biosciences) для экспрессии белков. Соответствующие генотипы всех штаммов бактерий, использованные в этой работе, приведены в таблице 2.

Клетки *E. coli* культивировали в полноценной среде LB (Invitrogen) (5 г/л дрожжевого экстракта, 10 г/л триптона, 10 г/л NaCl) при 37 °С на шейкере с 250 об/мин, добавляли канамицин (50 мкг/мл).

Таблица 2 – Источники и генотипы и изоляции бактериальных штаммов использованных в ходе работы

Штамм	Генотип/Источник изоляции	Источник
NovaXG	F- mcrA Δ(mcrC-mrr) endA1 recA1 φ80dlacZΔM15 ΔlacX74 araD139 Δ(ara- leu)7697 galU galK rpsL nupG λ- tonA	Zappers
Rosetta 2(DE3)	F- ompT hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> - m <sub>B</sub> -) gal dcm (DE3) pRARE2 (Cam <sup>R</sup> )	Novagen

*Плазмиды и вектора.* В данной работе были использованы вектора и плазмиды представленные в таблице 3.

Таблица 3 – Плазмиды и вектора использованные в данной работе

Плазмиды	Особенности	Источник
pET28c	Индукцибельный <i>lac</i> -промотор бактериофага T7, 6xHis-tag на С- конце	Clontech
pET28c/ <i>AtPARP1</i>	Индукцибельный <i>lac</i> -промотор бактериофага T7; 6xHis-tag на С- конце, ген <i>AtPARP1</i>	В настоящей работе
pET28c/ <i>AtPARP2</i>	Индукцибельный <i>lac</i> -промотор бактериофага T7; 6xHis-tag на С- конце, ген <i>AtPARP2</i>	В настоящей работе

*Ферменты и реактивы.* Рестриционные ферменты, T4 ДНК лигаза, RPROTKSOL-RO: рекомбинантная, ПЦР Grade Протеиназа К была от Roche (Базель, Швейцария) и Дезоксирибонуклеаза I из поджелудочной железы быка (DNase I) была от ThermoFisher Scientific (Литва), щелочная фосфатаза кишечника теленка (CIP) была от New England Biolabs France (Эври, Франция). Фосфодиэстераза 1 из змеиного яда из *Crotalus adamanteus* (SVPDE1) была от Worthington (Biochemical Corporation). Очищенный человеческий Nudix белок

(нуклеозид дифосфат-связанная частица X)-тип мотива 16 (NUDT16) был приготовлен, как описано [264]. Бычий PARC был из Trevigen (Гейтерсбург, США). Блеомицин был из Sanofi-Aventis (Франция).

## 2.2 Олигонуклеотиды

Последовательности олигонуклеотидов и их дуплексов, используемых в настоящей работе, представлены в таблице 4. Все олигонуклеотиды были приобретены у Eurogentec (Серен, Бельгия), включая модифицированные олигонуклеотиды. Перед ферментативными анализами олигонуклеотиды метили либо на 5'-конце, используя полинуклеотидкиназу T4 (New England Biolabs, OZYME France) в присутствии [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ] АТФ ( $3000 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$ ) [426] (PerkinElmer), либо на 3'-конец с помощью терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы (New England Biolabs) в присутствии [ $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ ] -3'-dATP (кордицепин 5'-трифосфат,  $5000 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$ ; PerkinElmer) [427] в соответствии с протоколом производителя. Холодный АТФ в концентрации 1 мМ добавляли для фосфорилирования оставшихся немеченых олигонуклеотидов. После реакций радиоактивно меченные олигонуклеотиды обессоливали на колонке Sephadex G-25, уравновешенной водой, а затем отжигали с соответствующей дополнительной цепью в течение 3 минут при  $65^\circ\text{C}$  в буфере, содержащем 20 мМ HEPES-KOH (pH 7,6) и 50 мМ KCl. Кроме того, радиоактивное мечение ДНК и белков выполняли с использованием [аденилат- $^{32}\text{P}$ ] НАД $^+$  ( $800 \text{ Ci}\cdot\text{mmol}^{-1}$ ) (PerkinElmer) в присутствии AtPARP, олигонуклеотидов и 1 мМ холодного НАД $^+$ . Для приготовления 5'- [ $^{32}\text{P}$ ] -меченного линейаризованного субстрата плазмидной ДНК, 50 мкМ плазмиды pML2 (такой же, как pBluescript, но содержит вставку уникального сайта PmlI) линейаризовали 30 U *PmlI* в течение 1 ч при  $37^\circ\text{C}$  в  $1 \times$  CutSmart (New England Biolabs, Франция), затем добавляли 15 U *Nb.BsmI* и инкубировали в течение 1 ч при  $65^\circ\text{C}$ . Метка  $^{32}\text{P}$  была введена путем повторного отжига линейаризованного pML2 с 5'- [ $^{32}\text{P}$ ] -меченным олигонуклеотидом EhoA d(GTGGTTGTA AAAACCTCAGCCAG), соответствующим 22-нуклеотидному фрагменту, охватывающему область между 5'-концом DSB и индуцированным *Nb.BsmI* с разрывом. ДНК-дуплексы с разрывом, пробелом или углублениями EhoA•RexT<sup>nick/gap/rec</sup>, состоящие из RexT d(GGAATTC CCGCGCCAAATTTCTCTAAGTCTCCGCGCCAC), EhoA d(GTGGCGCGGAGACTTAGGAAAATTTGT), 5P-Eho19 d(pATTTGGCGCGGGGAATTCC), или 5P-Eho18, d(pTTTGGCGCGGGGAATTCC), где 5P представляет собой 5'-концевой фосфат (таблица 4), которые в основном использовались для количественного определения ПАРилирования концов ДНК с помощью AtPARP [31].



Продолжение таблицы 4

S11	<sup>32</sup> P 5' GTGGCGCGGAGACTTAGAGAA ATTTGGCGCGGGGAATTCC CACCGCGCCTCT GAATCTC TT TAAACCGCGCCCCTTAAGG 5' RexT
S12	<sup>32</sup> P 5' GTGGCGCGGAGACTTAGAGAA ATTTGGCGCGGGGAATTCC CACCGCGCCTCT GAATCTC TT TAAACCGCGCCCCTTAAGG 5' RexT
S13	<sup>32</sup> P 5' GTGGCGCGGAGACTTAGAGAA ATTTGGCGCGGGGAATTCC CACCGCGCCTCT GAATCTC TT TAAACCGCGCCCCTTAAGG 5' RexT
S14	<sup>32</sup> P 5' GTGGCGCGGAGACTTAGAGAAATTTGGCACGGGGAATT CC CACCGCGCC TCTGAA TCTC TTTAAACCGTGCCCC TTAAGG 5' Rex12T
S15	<sup>32</sup> P 5' GTGGCGCGGAGACTT ATTTGGCGCGGGGAATTCC CGCCTCTGAATCTCTTTAAACCGCGCCCCTTAAGG 5' Rex-T-35
S16	P 5' GTGGCGCGGAGACTTAGAGAAATTTGGCGCGGGGAATTCC CACCGCGCCTCTGAATCT CTTTAAACCGTGCCCC TT AAGG 5' P Rex12T <sup>32</sup> P
S17	P 5' GTGGCGCGGAGACTTAGAGAAATTTGGCACGGGGAATT CC CACCGCGCC TCTGAA TCTC TTTAAACCGTGCCCC TTAAGG 5' Rex12T <sup>32</sup> P
S18	<sup>32</sup> P 5' TGA CTGCATA GCATGTAGACGATGTGCAT ACTGACGTATACGTACATCTGCTACACGTA 5' RT-A
S19	<sup>32</sup> P 5' <b>GTCATTC</b> GCTGTGCCCTCAA CGAATCACAGCCTAGA ) HEG 3' CGACACGGGAGTTGGCTTAA GTGTTCCGATCT ) Linker t t t 32
S20	<sup>32</sup> Pt 5' GCTGTGCCCT CAACCGAATTCA CAAGCCTAGA ) HEG 3' CGACACGGGA-GTTGGCTTAA GTGTTCCGATCT ) Linker t t t 32



### 2.3 Радиоактивное мечение олигонуклеотидов

Для мечения 5'-конца олигонуклеотида с радиоактивной меткой провели киназную реакцию в микроцентрифужной пробирке с содержанием 20 pmol олигонуклеотидов 5'-концом, 1 x T4 киназного буфера (Tris-HCl (pH 7.5), MgCl<sub>2</sub>, дитиотреитол (ДТТ)), [ $\gamma$ <sup>32</sup>P] АТФ (3000 Ci.mmol<sup>-1</sup>) (PerkinElmer), 100 pmol полинуклеотидкиназы T4 (New England Biolabs, OZYME France) инкубируя 1 час при 37 °С. Останавливали реакцию, добавляя 50 mM ЭДТА (pH 8,0). Не включённую радиоактивность удаляли с помощью центрифуги на колонке Sephadex G-25, уравновешенной водой [426].

Для радиоактивного мечения 3'-конца олигонуклеотида провели реакцию в присутствии [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] -3'-dATP (кордицепин 5'-трифосфат, 5000 Ci.mmol<sup>-1</sup>; PerkinElmer), 100 pmol терминальной дезоксинуклеотидилтрансферазы (New England Biolabs), 2,5mM CoCl<sub>2</sub>, 1 x TdT буфера и инкубировали 40 минут при 37 °С. Не включённую радиоактивность удаляли с помощью центрифуги на колонке Sephadex G-25, уравновешенной водой [427].

### 2.4 Растительный материал

Штамм Col-0 дикого типа (WT) *A. thaliana* и мутантные линии, несущие вставки Т-ДНК в генах *AtPARP*, получены из Центра Биологических Ресурсов арабидопсиса (<http://www.arabidopsis.org>). Для всех растений семена высевали на чашки с агаром 1/2 Murashige-Skoog (MS) [428], содержащим 1 % сахарозы и 1 % агара, стратифицировали в течение 48 часов при 4 °С и выращивали в условиях длинного дня при 22 °С и циклов из 16 часов света / 8 часов темноты. Растения собирали через 18 дней и пересаживали в почву из смеси земли, перлита и вермикулита в соотношении 4:2:3, и выращивали в условиях длинного дня при 22 °С (16-часовой световой день/8 ч темноты).

Для изучения действия генотоксических агентов, *A. thaliana* дикого типа Col-0 и семена мутантных линий стратифицировали и затем выращивали в течение 14 дней на чашке с агаром MS. Затем, двухнедельные проростки арабидопсиса обрабатывали блеомицином в концентрации 50 мкг•мл<sup>-1</sup> (чашки MS с растениями покрывали 5 мл PBS, содержащий блеомицин), и проростки собирали через 24 часа.

### 2.5 Бесклеточные экстракты *A. thaliana*

Экстракты готовили из 100 мг свежих необработанных или обработанных блеомицином 14-дневных проростков. Гомогенизировали в заранее охлажденной фарфоровой ступке с помощью буфера для экстракции (20 mM HEPES-KOH, pH 7,6, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 10 % глицерин, 0,1 % NP-40 и смесь ингибиторов протеаз в соотношении 1: 100). Гомогенат перенесли в пробирку и инкубировали в течение 1 часа при температуре 4 °С. Затем, центрифугировали при 13000 x g в течение 30 минут при температуре 4 °С. [30].

### 2.6 Экстракция геномной ДНК *A. thaliana*

Геномную ДНК растений экстрагировали из 100 мг свежих необработанных или обработанных блеомицином 14-дневных проростков в жидком азоте с

использованием метода СТАВ. На каждые 100 мг гомогенизированной ткани использовали 500 мкл СТАВ экстракционного буфера. После тщательного перемешивания гомогенат перенесли в баню с температурой 60 °С на 30 минут. По окончании инкубационного периода гомогенат центрифугировали в течение 5 минут при 14000 x g. Добавляли 10 U РНКазы А в перенесенный в новую пробирку супернатант и инкубировали при 37 °С в течение 20 минут. Для удаления белков и липидов добавляли равный объем хлороформа/изоамилового спирта (24: 1), перемешивали на вортексе в течение 5 секунд, затем образец центрифугировали в течение 1 минуты при 14000 x g, чтобы разделить фазы. Повторяли экстракцию, пока верхняя фаза не станет прозрачной. Для осаждения ДНК добавляли 0,7 объема холодного изопропанола в перенесенную в новую пробирку верхнюю водную фазу и инкубировали при -20 °С в течение 15 минут. Образец центрифугировали при 14000 x g в течение 10 минут. Оставшийся осадок промывали 500 мкл ледяного 70 % этанола. Высушенный осадок растворили в 20 мкл буфере ТЕ (10 mM Трис, рН 8, 1 mM ЭДТА) [429].

## 2.7 Выделение тотальной РНК

Тотальную РНК экстрагировали из 100 мг свежих тканей листьев *A. thaliana* в жидком азоте с использованием реагента Trizol™ (Invitrogen). Для лизирования клеток на измельчённую в жидком азоте 100 мг свежих тканей листьев *A. thaliana* добавляли 0,3-0,4 мл реагента TRIzol™ [430]. Для обеспечения полной диссоциации комплекса нуклеопротеинов, лизат инкубировали в течение 5 минут. Добавляли 0,2 мл хлороформа на 1 мл реагента TRIzol™, используемого для лизиса и инкубировали 2–3 минуты. После образец центрифугировали в течение 15 минут при 12000 x g при 4 °С. Переносили бесцветную верхнюю водную фазу содержащую РНК в новую пробирку. Осаждали РНК из водной фазы путем смешивания с изопропиловым спиртом. Использовали 0,5 мл изопропилового спирта на 1 мл реагента TRIzol™, используемого для начальной гомогенизации. Инкубировали образцы при температуре от 15 до 30 °С в течение 10 минут и центрифугировали при не более 12 000 x g в течение 10 минут при температуре от 2 до 4 °С. Осадок РНК, часто невидимый перед центрифугированием, образует гелеобразный осадок на стенках и дне пробирки. После полного удаления супернатанта, осадок РНК промывали один раз 75 % этанолом, добавив 1 мл 75 % этанола на 1 мл реагента TRIzol™, использованного для начальной гомогенизации. Перемешали образцы встряхиванием и центрифугированием при 7500 x g в течение 5 минут при температуре от 2 до 8 °С. После повторной промывки удалили оставшийся этанол. Растворили РНК в ультрачистой воде, обработанной DEPC.

## 2.8 Реакция обратной транскрипции (ОТ)

Пять мкг свободной от ДНК тотальной РНК превращали в одноцепочечную ДНК с использованием смеси праймеров олиго-dT<sub>20</sub>. Для синтеза кДНК в стерильную пробирку добавляли (в указанной последовательности): РНК (0,5 мкг тотальной РНК или 500 нг поли-А РНК), праймер (15-20 пмоль ген-специфичного праймера), стерильной dH<sub>2</sub>O до 12,5 мкл. Реакционную смесь

прогревали при 70 °С в течение 5 минут, затем охлаждали на льду. Далее, к смеси добавляли (в указанной последовательности): при 25 °С 1 х реакционный буфер (250 мМ Tris-HCl pH 8.3, 20 мМ MgCl<sub>2</sub>, 250 мМ KCl, 50 мМ DTT), 20 ед. RiboLock™ RNase Inhibitor, 1 мМ смеси dNTP, 200 ед. RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase. Затем осторожно перемешивали и инкубировали смесь при 37 °С в течение 5 мин. Реакцию проводили в водяной бане при 42°С в течение 1,5 часов. Реакцию останавливали прогреванием при 70 °С в течение 10 мин. Полученный продукт хранили при -20 °С [431].

## 2.9 Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР проводили с использованием 2 мкл 20-кратного разведения кДНК, 15 пмоль каждого праймера и 1 единицы полимеразы Taq в реакционном объеме 25 мкл. Чтобы сгенерировать кДНК для полноразмерных *AtPARP1* (соответствует гену At2g31320) и *AtPARP2* (соответствует гену At4g02390), кодирующие последовательности были амплифицированы с помощью ПЦР с использованием праймеров *AtPARP1NdeI\_F/AtPARP1BamHI\_R* для *AtPARP1*, *AtPARP2NdeI\_F/AtPARP2BamHI\_R* для *AtPARP2* (Таблица 5).

ПЦР-амплификацию проводили в следующих температурных режимах: денатурация при 94 °С – 5 мин, 30 циклов амплификации при 94 °С – 30 сек, 45-65 °С (в зависимости от используемых праймеров) – 30 сек, 72 °С – 30-150 сек (в зависимости от длины генов) и заключительная элонгация при 72 °С – 5 мин, после чего была пауза при 4 °С [432]. Праймеры, приведенные в таблице 5, были разработаны с использованием бесплатного программного обеспечения Primer 3 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

Таблица 5 – Список праймеров ПЦР, используемых для клонирования и сайт-направленного мутагенеза.

<i>AtPARP1NdeI_F</i>	CAGCCATATGGCAAGCCCTCATAAGC
<i>AtPARP1BamHI_R</i>	AGGCGGATCCTTAGCGTTTGTGTTTAAAGC
<i>AtPARP2NdeI_F</i>	CAGCCATATGGCAAACAAGCTGAAGG
<i>AtPARP2BamHI_R</i>	AGGCGGATCCTTAATGTTTGTAGTTG
<i>AtPARP1_E960K_F</i>	CGAACTGATGTATAACAATATATTGTATATGAT
<i>AtPARP1_E960K_R</i>	GTATCATATACAATATATTTGTTATACATCAGTT
<i>AtPARP1_E960Q_F</i>	CGAACTGATGTATAACCAATATATTGTATATGAT
<i>AtPARP1_E960Q_R</i>	GTATCATATACAATATATTTGGTTATACATCAGTT
<i>AtPARP2_E614K_F</i>	GCATGCTGCTGTATAACAATATATTGTTTATAA
<i>AtPARP2_E614K_R</i>	GTTATAACAATATATTTGTTATACAGCAGCATG
$\Delta$ N273 <i>AtPARP3NdeI_</i>	AATGCTCATATGGATGTAGTTAGCGAC
$\Delta$ N273 <i>AtPARP3BamHI</i>	AGCTGGATCCTTAGTATGCTTCTAACGGCTG
$\Delta$ HDA <i>AtPARP3_F</i>	GGTGATATGCGTGGTGATACC
$\Delta$ HDA <i>AtPARP3_R</i>	ATAATTATAAATTTCTGACCACAC

## 2.10 Сайт направленный мутагенез

Следующие мутанты AtPARP1<sup>E960K</sup>, AtPARP1<sup>E960Q</sup>, AtPARP2<sup>E614K</sup> и  $\Delta$ HD AtPARP3 были сконструированы с использованием набора для сайт-направленного мутагенеза QuikChange (Stratagene) и олигонуклеотидных праймеров, показанных в таблице 5. Первый этап сайт направленного мутагенеза – это проведение ПЦР в присутствии следующих реагентов: 1 x Q5 Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, 0.5 мкМ праймеры, 1-25 нг матричная ДНК, вода свободная от нуклеаз. Полностью перемешанные реагенты перенесли в термоциклер. Условия термоциклирования для проведения ПЦР: денатурация при 98 °С - 5 мин, 25 циклов амплификации при 98 °С – 10 сек, 50-72 °С (в зависимости от используемых праймеров) – 10-30 сек, 72 °С – 30-150 сек (в зависимости от длины генов) и заключительная элонгация при 72 °С – 5 мин, после была пауза при 4 °С.

На втором этапе происходит обработка киназой, лигазой и DpnI (KLD). 1 мкл ПЦР продукта инкубируется в пробирке содержащий 1 x KLD реакционный буфер, 1 x ферментативной смеси из киназы, лигазы и *DpnI*. Расщепление ПЦР продукта *DpnI* является важной частью работы. *DpnI* разрезает только по метилированным сайтам, расщепляя матричную плазмиду, но не продукт ПЦР, что позволяет отбирать трансформированные клетки с плазмидой с сайт направленным мутагенезом [433].

## 2.11 Создание рекомбинантной плазмидной конструкции

Вектор pET28с (Novagen, Германия) был выбран для функциональной экспрессии кДНК *AtPARP* в прокариотической системе, который обладает необходимыми для экспрессии генов качествами: сильным, *lac* индуцибельным промотором бактериофага T7, подходящей для вставки емкостью, и простотой селекции, с 6xHis tag последовательностью на С – конце, что позволяет аффинной очистке белкового продукта на основе Ni<sup>2+</sup>-основанной хроматографии. Для создание рекомбинантной плазмидной конструкции продукт ОТ – ПЦР кДНК *AtPARP* клонировали в плазмиду pET28с по сайтам рестрикции *NdeI* и *BamHI*.

Реакционная смесь для рестрикции содержала: 1X реакционный буфер, 0,5 мкг ДНК, 1 ед. каждой из эндонуклеаз и dH<sub>2</sub>O до конечного объема. Далее рестрикцию проводили инкубированием при 37 °С в течение 20-60 минут. Продукты рестрикции анализировали методом электрофореза в 0,8-1 % агарозном геле [434]. После нуклеиновые кислоты разделялись в агарозном геле, а соответствующие фрагменты ДНК вырезали из агарозного геля и элюировали с помощью набора «GeneJET Gel Extraction Kit» (#K0692, Thermo Scientific™) согласно рекомендациям производителя.

Аmplифицированную ДНК и векторы после реакции рестрикции лигировали с использованием ДНК-лигазы бактериофага T4 производства фирмы Thermo Scientific™ (#EL0014). Молярное соотношение для лигирования вектора и вставки составляет 1:3. Для лигирования смешивали 1X лигазный буфер, векторную ДНК, вставку и объем доводили добавлением dH<sub>2</sub>O. В последнюю очередь добавляли 0,2 мкл T4-лигазы. Реакционную смесь

осторожно смешивали и инкубировали при 16 °С 60 минут и на всю ночь при 4 °С. По истечении срока инкубации лигазную смесь использовали для трансформирования компетентных бактериальных клеток.

При выбранном молярном соотношении для вычисления количества вектора и вставки использовали онлайн калькулятор «Ligation calculator» по ссылке [http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig\\_Input.html](http://www.insilico.uni-duesseldorf.de/Lig_Input.html).

Полученные конструкции pET28c/*AtPARP1*, pET28c/*AtPARP2* и pET28c/*AtPARP3* трансформировали в *E.coli* штамма NovaXG Zappers для наработки рекомбинантной плазмиды. Селекцию клонов проводили на агаризованной среде LB с канамицином (50 мкг/мл). Далее с протоколом набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific #K0503) были выделены плазмиды ДНК, которые использовались для тестирования клонов на наличие рекомбинантных плазмид с помощью рестрикционного и ПЦР анализа, содержащих в своем составе гены *AtPARP1/AtPARP2/AtPARP3*.

## 2.12 Приготовление компетентных клеток *Escherichia coli*

Для получения компетентных клеток на агаризованную LB среду методом штриха наносили суспензию бактериальных клеток. Далее, выросшую в течение ночи одну бактериальную колонию, ресуспендировали в LB-среде (10 г бакто-триптона, 10 г NaCl, 5 г дрожжевого экстракта) и инкубировали на круговом шейкере при 200 об/мин для сильной аэрации (200 об/мин на круговом шейкере) при 37 °С в течение ночи. После ночную культуру ресуспендировали в большом объеме среды LB и выращивали при 37 °С с сильной аэрацией в течение нескольких часов до достижения плотности OD<sub>600</sub> равной 0,3-0,4 (~10<sup>8</sup> клеток/мл). Бактериальные клетки собирали в стерильные и охлажденные пробирки методом центрифугирования при 5000 об/мин в течение 5 мин при 4 °С.

Хемокомпетентные клетки готовились в буфере ТВ (10 mM Pipes-NaOH (pH 6.7), 15 mM CaCl<sub>2</sub>, 55 mM MnCl<sub>2</sub>, 25 mM KCl), для этого клетки ресуспендировались в холодном буфере ТВ и инкубировались 10 мин на льду. Суспензию из клеток собирали центрифугированием при 5000 об/мин в течение 10 мин при 4 °С. После 2 этапов промывки клеточный осадок ресуспендировали в 20 мл холодного ТВ буфера, добавляли 1,5 мл DMSO и инкубировали 10 мин на льду. Суспензию разливали на аликвоты и хранили при -80 °С [435].

Электрокомпетентные клетки *Escherichia coli*, готовились в 10 % растворе глицерина. Но прежде собранные клетки трижды отмывали в автоклавированной и предварительно охлажденной dH<sub>2</sub>O, а так же трижды охлажденным стерильным 10 % раствором глицерина. В конце центрифугированные клетки ресуспендировали в 3 мл 10 % раствора глицерина. Суспензию разливали по 200 мкл на аликвоты в охлажденные пробирки и замораживали в жидком азоте. Компетентные клетки хранили при -80 °С [435].

### 2.13 Трансформация клеток *Escherichia coli*

Лигазную смесь ДНК (не более 50 нг или в объеме не более 10 мкл) добавляли в суспензию компетентных и осторожно перемешали и инкубировали на льду в течение 30 мин. После клетки подвергали тепловому шоку на водяной бане при 42 °С в течение 90 сек и инкубировали 5 мин на льду. Сверху добавляли 800 мкл среды SOC (20 г бакто-триптона, 0,5 г NaCl, 5 г дрожжевого экстракта, 20 mM глюкозы) и инкубировали при 100 об/мин для умеренной аэрации в при 37 °С течение 45 мин. Далее трансформированные компетентные клетки наносили на твердую агаризованную среду LB с антибиотиками – 50 мкг/мл канамицин. Клетки равномерно распределяли по поверхности агаризованной среды стерильным шпателем. Чашки инкубировали при 37 °С в течение ночи.

Для трансформации лигазной смеси в электрокомпетентные клетки использовался метод электропорации с использованием электропоратора «Bio-Rad GenePulse™». В заранее охлажденные специальные кюветы переносили 50 мкл электрокомпетентных клеток. Далее 1 мкл лигазной смеси добавляли в кювету с клетками перемешивали. Электропорирование проводили при силе тока - 2,5 kV, ёмкостном сопротивлении – 25 µF, электрическом сопротивлении – 200 Ом. После электропорирования к клеткам добавляли 1 мл питательный среды SOC и инкубировали при 100 об/мин для умеренной аэрации при 37 °С в течение 45 мин. Трансформированные клетки с использованием шпателя равномерно распределяли на поверхности LB агара, содержащий соответствующий антибиотик – 50 мкг/мл канамицин. Чашки переворачивали и инкубировали при 37 °С в течение ночи [435].

### 2.14 Выделение плазмид методом щелочного гидролиза

Клетки, выращенные после трансформации, растили в 8 мл жидкой ЛБ среде с соответствующим антибиотиком при 37 °С в течение 11-12 ч. Ночные культуры центрифугировали при 13000 об/мин в течение 2 мин. Клеточный осадок ресуспендировали в 100 мкл раствора №1 (состав: 50 mM глюкоза, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8.0) и инкубировали в течение 5 мин при 22 °С. Затем к смеси добавляли 200 мкл раствора №2 (состав: 0,2N NaOH, 1 % SDS), перемешивали по несколько раз, осторожно инвертируя пробирку, и инкубировали на льду в течение 10 мин. После инкубации сверху добавляли заранее охлажденного до -20 °С 150 мкл раствора №3 (на 100 мл раствора: 60 мл 5 M ацетата калия, 11,5 мл ЛУК, 28,5 мл dH<sub>2</sub>O). Перемешивали и инкубировали на льду в течение 10 мин. Для очищения нуклеиновых кислот от примесей из белков и липидов к смеси добавляли равный объем хлороформа. Полученную смесь после тщательного перемешивания инкубировали в течение 10 мин и центрифугировали со скоростью 13000 об/мин при 4 °С в течение 5 мин. В новую микропробирку переносили верхнюю водную фазу и экстрагировали с 6/10 объемом охлажденного (-20 °С) изопропанола, после перемешивали и инкубировали при 22 °С в течение 15 мин. Центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант сливали и осадок промывали 70 % спиртом. Осадок содержащий плазмидную ДНК высушивали на воздухе и ресуспендировали в TE (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA) [436].

### 2.15 SDS-ПААГ электрофорез

Для электрофоретического анализа использовались растворимые белки в супернатанте. Концентрацию белка в супернатанте в каждом образце определяли методом Брэдфорда [437] перед нанесением на гель. Электрофорез белков в денатурирующих условиях, приготовленных кипячением образцов в 2х образцовом буфере (2X:125мМ Tris-HCl pH 6.8, 10 %  $\beta$ -меркаптоэтанола, 4 % SDS, 0.02 % бромфенолового синего, 20 % глицерина), проводили в полиакриламидном геле по методу Лэммли [438].

### 2.16 Экспрессия и очистка белков

Плазмиды дикого типа pET28c/*AtPARP1*, pET28c/*AtPARP2* pET28c/*AtPARP3* и мутантные *AtPARP1*<sup>E960K</sup>, *AtPARP1*<sup>E960Q</sup>, *AtPARP2*<sup>E614K</sup>,  $\Delta$ N273*AtPARP3* и  $\Delta$ HD*AtPARP3* экспрессировали рекомбинантные белки, содержащие C-концевую His-метку в штамме *E. coli* Rosetta 2 (DE3) (Merck). Трансформированные клетки выращивали до плотности клеток OD<sub>600</sub> ~ 0,6 при 37 °C в среде LB, а затем индуцировали с добавлением 50 мкМ изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозидом в течение ночи при 30 °C. Используя только две хроматографические стадии стало возможным очистить белки *AtPARP* почти до гомогенности благодаря сильной экспрессии в штамме Rosetta. Все этапы очистки проводились при 4 °C. Бактериальные клетки собирали центрифугированием, а осадки клеток лизировали в буфере, содержащем 50 мМ трис-HCl pH 8,0, 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 5 % глицерин, 1 мМ DTT и 0,5 % NP-40, 1х коктейль ингибиторов протеаз (Roche Diagnostics, Швейцария) с использованием французского пресса при 18000 psi (фунт на квадратный дюйм). На грамм клеток следует использовать приблизительно 3 мл загрузочного буфера. Во избежание возможного протеолиза лизат нужно держать как можно более холодным.

Лизаты от клеточного мусора очищали методом центрифугирования при 40000  $\times$  g при 4 °C в течение 60 мин, полученный супернатант доводили до 500 мМ NaCl и 20 мМ имидазола и загружали в колонку заполненную Ni<sup>2+</sup> NiTrap Chelating HP (GE Healthcare). Фракции элюировали и объединяли содержащие рекомбинантные белки и загружали в колонку NiTrap-Neparin объемом 1 мл (GE Healthcare). Далее градиентом 50-1500 мМ NaCl элюировали связанные белки. С помощью метода SDS-PAGE оценивали гомогенность очищенных белков. Очищенные образцы белка развели в 100 % глицерине до 50 % и хранили при -20 °C [439].

### 2.17 Приготовление антител против *AtPARP1* и *AtPARP2*

Рекомбинантные His-меченные белки *AtPARP1* и *AtPARP2* *A.thaliana* полного размера были очищены для получения поликлональных антител против *AtPARP1/AtPARP2*. Для получения антител против *AtPARP1* и *AtPARP2*, мы выбрали 4 белых самок кролика в возрасте 1-2 месяцев. Для иммунизации кролика, полный адъювант Фрейнда смешивают с 1 мг очищенного рекомбинантного белка *AtPARP1/AtPARP2*, полученную 200 мкл

антигенадъювантную смесь ввели в каждый из 8-10 подкожных участков на спине кролика. 2-недельным интервалом делали еще три дополнительных инъекции. На 21 день брали пробу крови у кроликов через ушную вену без использования анестетика и анализировали ответ антител с помощью ELISA. Для измерения антител собирали от 5 до 10 мл крови. До получения удовлетворительного ответа продолжали иммунизацию [440]. Кровь собирали и иммунную сыворотку очищали аффинно с использованием смолы Fast Flow на агарозе с белком А (Sigma) через одну неделю после последней инъекции.

Процедура очистки антител. Добавление 5 мл связывающего буфера перед очисткой антител уравнивают колонку на агарозе с белком А. Для оптимального связывания перед нанесением на колонку с белком А образец разбавили как минимум 1: 1 буфером для связывания для поддержания надлежащей ионной силы и рН. После центрифугирования при  $10000 \times g$  в течение 20 минут отобранный супернатант нанесли на уравновешенную агарозу с белком А. 15 мл связывающего буфера промывали агарозную колонку с белком А. Последние фракции имели такую же абсорбционную способность, аналогичную связывающему буферу. 5 мл буфера для элюции антитела элюировали и собирали по 0,5 мл фракции. Для доведения элюированных фракции до физиологического рН, в 1 мл элюата добавляли 100 мкл нейтрализующего буфера и объединяли элюированные фракции IgG. В качестве первичных антител используются очищенные кроличьи поликлональные антитела против AtPARP1/AtPARP2, а в качестве вторичных антител – конъюгированные с пероксидазой хрена козы антикроличьи IgG.

### 2.18 Вестерн-блоттинг

Без клеточные растворимые белки разделяли в 10 % SDS-полиакриламидном геле и затем переносили электроблоттингом на поливинилдифторидную мембрану (Pierce) с использованием Bio-Rad Minitransblot Cell в соответствии с инструкциями производителя. Мембрану после переноса белков осторожно перемишавая инкубировали в блокирующем растворе, содержащем 5 % молока и 0,1 % Tween -20 в  $1 \times$  TBS (Трис-буферный солевой раствор: 50 мМ Трис-НСl (рН 7,5), 20 мМ NaCl) при 22 °С в течение 1 часа. Мембрану после отмывки блокирующего раствора инкубировали в 10 мл аффинно очищенных антител против AtPARP1/AtPARP2 и коммерческих анти-ПАР (разведение 1: 10000 в блокирующем растворе с 0,1 % Tween-20) при 4 °С в течение ночи. Мембрану промывали 3 раза в 10 мл промывочного буфера ( $1 \times$  TBS с добавлением 0,1 % твина-20) по 10 мин каждый раз. После промывки мембрану инкубировали с вторичным антителом (разведение 1: 30000 в блокирующем растворе с 0,1 % Tween-20) в 10 мл при 22 °С в течение 1 часа. Затем мембрану промывали 3 раза по 10 мл промывочного буфера по 10 мин каждый раз. Путем смешивания равного объема пероксида и люминола готовили раствор рабочего субстрата из расчета  $0,1 \text{ мл} \cdot \text{см}^{-2}$  на площадь блоттинга. Мембрану в течение 2 мин инкубировали в рабочем растворе в темноте и экспонировали на пленке Kodak X-Omat [441].



## 2.19 Анализ активности поли(АДФ-рибоза) полимеразы

Стандартный анализ ПАРилирования ДНК (10 мкл), выполняемый путем инкубации 20 нМ [<sup>32</sup>P]-меченного олигонуклеотида, 250 нМ AtPARP1/AtPARP2/AtPARP3 и 1 мМ НАД<sup>+</sup> в буфере ADPR (20 мМ HEPES-KOH pH 7,6, 50 мМ KCl, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT и мкг•мл<sup>-1</sup> бычьего сывороточного альбумина (BSA)) в течение 30 мин при 37 °С, если не указано иное. После реакции образцы инкубировали в присутствии 50 мкг•мл<sup>-1</sup> протеиназы К и 0,15 % SDS в течение 30 минут при 50 °С с последующей инкубацией в течение 3 минут при 95 °С. Образцы обессоливали на колонке Sephadex G-25 (Amersham Biosciences), уравновешенной 7,5 М мочевиной, а затем продукты анализировали электрофорезом в денатурирующем 20 % (мас./об.) полиакриламидном геле (PAGE, 7 М мочевины, 0,5×TBE, 42 °С). Влажный гель завернули в пластиковую пленку, затем подвергли воздействию Storage Fuji FLA-3000 Phosphor Screen, который затем сканировали с использованием Typhoon FLA 9500, и цифровые изображения получали и количественно оценивали с использованием программного обеспечения FUJI Image Gauge V3.12 [31; 393; 394].

## 2.20 Гидролиз аддуктов АДФ-рибозилированной ДНК

Гидролиз аддуктов ПАР-ДНК и МАР-ДНК с помощью PARG проводили после денатурации белков AtPARP путем нагревания образца в течение 20 мин при 80 °С; затем к реакционным смесям добавляли 50 пг•мкл<sup>-1</sup> PARG и образцы инкубировали в течение 30 мин при 37 °С. Анализ дефосфорилирования с CIP проводили с использованием 10 ед. фермента в буфере CIP (New England Biolabs) в течение 1 часа при 37 °С. Гидролиз полимеров ПАР-ДНК с помощью SVPDE1 проводили в два этапа: сначала инкубировали 20 нМ ДНК-субстрата с 250 нМ AtPARP2, 1 мМ НАД<sup>+</sup> в буфере PARG в течение 30 минут при 37 °С, а затем проводили ступенчатую инкубацию со 100 мU SVPDE1 в реакционной смеси с добавлением 10 мМ MgCl<sub>2</sub> и 75 мМ Tris-HCl pH 8,9 в течение 1 часа при 37 °С. Кроме того, продукты реакции SVPDE1 обрабатывали 10 ед. CIP в буфере CIP в течение 40 мин при 37 °С. Гидролиз полимера ПАР-ДНК с помощью гидролазы NUDIX, выполняли с использованием 2-20 мкМ NUDT16 в буфере для анализа ПАРилирования ДНК с добавлением 10 мМ MgCl<sub>2</sub> в течение 18 часов при 30 °С [443].

## 2.21 Анализ структуры и состава ПАР-ДНК аддуктов с помощью MALDI-TOF масс-спектрометрии

Для проведения масс-спектрометрических измерений 5 мкМ холодного нерадиоактивного 5'-фосфорилированного 30-мерного дуплексного олигонуклеотида (обозначаемого здесь как p10•RT-A<sup>nick</sup> и состоящего из 30-мерной (RT-A) цепочки-матрицы и двух 5'-фосфорилированных комплементарных цепей: 10 мер (p10) и 19 мер (p19) (таблица 5) инкубировали с 2,5 мкМ AtPARP2 в присутствии 1 мМ НАД<sup>+</sup> при 37 °С в течение 1 часа. После инкубации реакцию останавливали нагреванием образцов в течение 20 мин при 80 °С. Затем продукты реакции осаждали 2 % перхлоратом лития в ацетоне, обессоливали и использовали для измерений MALDI-TOF MS. Масс-спектры

MALDI-TOF были получены в отрицательном режиме на масс-спектрометре Microflex (Bruker, Висамбурд, Франция), оборудованном азотным лазером с длиной волны 337 нм и извлечением из источника с импульсной задержкой. Матрицу получали растворением 3-гидроксипиколиновой кислоты в 10 мМ цитратном буфере аммония и небольшом количестве катионообменной смолы Dowex-50W 50 × 8-200 (Sigma). Матрицу (1 мкл) добавляли к образцу (1 мкл) на планшете-мишени и давали ему высохнуть. Для калибровки спектров использовали упомянутые олигонуклеотиды известных масс [444].

### 2.22 Ауто- и ДНК АДФ-рибозилирование

Эффективность катализируемого AtPARP2 ауто- и ДНК АДФ-рибозилирования измеряли с использованием холодного дуплекса EhoA•RexT<sup>nick</sup>, фосфорилированного на 5' конце ника, и с фосфатом на 5' DSB (double stranded break) конце или без него. Анализ проводили в буфере ADPR без BSA. Один мкМ AtPARP2 инкубировали в присутствии 10 мкМ олигонуклеотидного дуплекса и 1 мкМ [аденилат-<sup>32</sup>P] НАД<sup>+</sup> в течение 30 мин при 37 °С. Реакции останавливали добавлением стоп-раствора (7,5 М мочевины, 0,33 % SDS, 10 мМ EDTA и 0,25 % бромфенолового синего) в соотношении 1: 1 (об./об.) и нагреванием при 95 °С в течение 10 мин после получения продуктов реакций анализировали на денатурирующем ПААГ [31,442,443].

### 2.23 Дот блот

Для определения связывания между фрагментами ПАР и ДНК использовали дот блот. Для этого была подготовлена нитроцеллюлозная мембрана, карандашом нарисована сетка, чтобы обозначить область, которую собирались прокапать. Были нанесены 50 нг образца на нитроцеллюлозную мембрану в центре сетки, далее высушили мембрану в печи при 80 °С в течение 2 часов. Неспецифические участки высушенной мембраны были заблокированы, пропитав 5 % молока в TBS-T (0,5–1 час, RT). После блокировки мембрану инкубировали с первичным антителом (0,1-10 мкг/мл для очищенного антитела, разведение от 1: 1000 до 1: 100000 для антисыворотки) растворяли в 1 х TBS-T в течение ON при 4 °С, затем трижды промывали TBS-T (3 х 5 мин) и инкубировали со вторичным антителом, конъюгированным с HRP в течение 1 часа при 22 °С. Промывание производили трижды TBS-T (15 мин х 1, 5 мин х 2), затем один раз TBS (5 мин). Инкубировали с реактивом ECL в течение 1 мин и экспонировали [445].

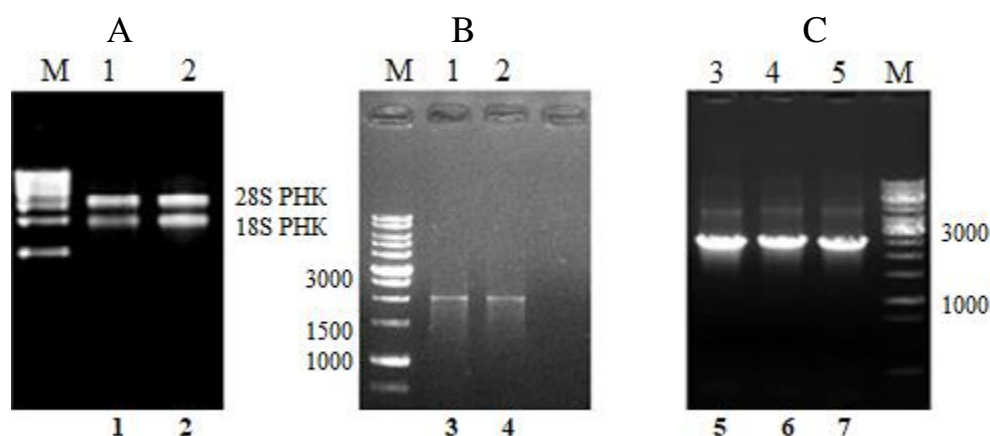
### 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1 Выделение и функциональная экспрессия His-меченных кДНК генов *AtPARP1* и *AtPARP2* в *E. coli*

В процессе исследования был проведен компьютерный анализ нуклеотидной последовательности кДНК гена *AtPARP1* длиной 2953 пар нуклеотидов (регистрационный номер AY150460.1 в GenBank), кодирующего поли (АДФ-рибоза) полимеразу 1 *A. thaliana* – белок длиной 983 аминокислот с расчетной молекулярной массой 111,2 кДа и изоэлектрической точкой (ИЭТ) около 8,8. Анализ нуклеотидной последовательности кДНК гена *AtPARP2* (1914 пар нуклеотидов, регистрационный номер NM\_116472.4 в GenBank) показало, что поли (АДФ-рибоза) полимеразы 2 *A. thaliana* состоит из 637 аминокислот, расчетная молекулярная масса 72,2 кДа и изоэлектрическая точка (ИЭТ) около 5,92.

На основании анализа нуклеотидной последовательности кДНК генов *AtPARP1* и *AtPARP2* проведен расчет и осуществлен синтез олигонуклеотидных праймеров (таблица 5) для амплификации вышеуказанных генов *A. thaliana*. Тотальный препарат РНК выделяли из 14-дневных проростков растений тризол методом, как описано в разделе методы исследования. Электрофоретический анализ РНК на 0,8 % агарозном геле показал наличие 28S рРНК и 18S рРНК (рисунок 9А). Отношения A260/A280 и A260/A230 были 1,9 и 2,0, соответственно. Это свидетельствует о высоком качестве препарата и низкой загрязненности изолированных образцов белковыми компонентами и вторичными метаболитами. Далее препарат РНК использовали для амплификации кДНК *AtPARP2* и *AtPARP1* с применением сайт специфических праймеров с помощью реакции обратной транскрипции (РОТ) и полимеразной цепной реакции (ПЦР). Условия проведения этих реакций указаны в разделе «Материалы и методы», а результаты приведены на рисунке 9. Из приведенной электрофореграммы видно, что главным продуктом амплификации является кДНК с ожидаемым размером около 1900 и 2900 пар нуклеотидов, что соответствует длине кДНК генов *AtPARP2* и *AtPARP1*, соответственно.

В следующих экспериментах, для функциональной экспрессии кДНК *AtPARP1* и *AtPARP2* в прокариотической системе нами был выбран вектор рЕТ28с (Novagen, Германия), который обладает необходимыми для экспрессии генов качествами: сильным, *lac* индуцибельным промотором бактериофага Т7, с 6хHis•tag последовательностью на С – конце, что позволяет аффинной очистке белкового продукта на основе никель-основанной хроматографии и подходящей для вставки емкостью, и простотой селекции. Для создания рекомбинантной ДНК-конструкции продукт ОТ – ПЦР *AtPARP1* и *AtPARP2* кДНК клонировали в плазмиду рЕТ28с по сайтам рестрикции *NdeI* и *BamHI*. Полученные конструкции рЕТ28с/*AtPARP1* и рЕТ28с/*AtPARP2* (рисунок 10) трансформировали в *E. coli* штамм NovaXG Zappers для наработки рекомбинантной плазмиды.

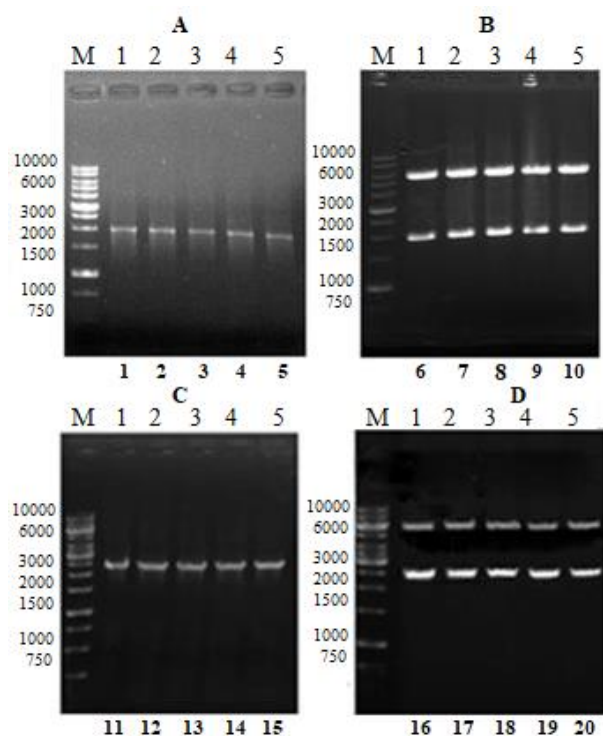


А) Препараты тотальной РНК: М - GeneRuler™ RNA Ladder. 1-2- суммарный препарат рибонуклеиновых кислот. Справа указано положение 28S рРНК, 18S рРНК. В) РТ-ПЦР продукты *AtPARP2*. С) РТ-ПЦР продукты *AtPARP1*: М – маркерные ДНК, размеры которых указаны в нуклеотидах слева. 1 - 5 – продукты последовательных реакций РОТ и ПЦР.

Рисунок 9 – Препараты нуклеиновых кислот, выделенных из проростков *A. thaliana* и РОТ-ПЦР продукты

Далее плазмидные ДНК, выделенные в соответствии с протоколом набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific #K0503), были использованы для тестирования клонов на наличие рекомбинантных плазмид, содержащих в своем составе ген *AtPARP1* и *AtPARP2* с помощью рестрикционного и ПЦР анализа.

При проведении ПЦР анализа с использованием ген-специфических праймеров и плазмидной ДНК, выделенных из трансформантов, фрагменты, обнаруженные в результате агарозного гель-электрофореза полностью соответствовали длине клонированного гена *AtPARP1* (рисунок 10С) и *AtPARP2* (рисунок 10А). Результаты рестрикционного анализа плазмиды представлены на рисунке 10В и D. Как видно из рисунка 10В клоны, содержащие плазмиды рЕТ28с/*AtPARP2* при обработке эндонуклеазами рестрикции *NdeI* и *BamHI* на 1 % агарозном геле, дают четко выраженные две полосы с длиной около 5,4 т.п.н. и 1,9 т.п.н. тогда как клоны, содержащие плазмиды рЕТ28с/*AtPARP1* при обработке эндонуклеазами рестрикции *NdeI* и *BamHI* на 1 % агарозном геле, дают четко выраженные две полосы с длиной около 5,4 т.п.н. и 2,9 т.п.н. По размеру первая полоса соответствовала длине плазмиды рЕТ28с без вставки, а вторая длине гена. В результате скрининга удалось идентифицировать 5 колоний, содержащих рекомбинантные плазмиды. Клоны были секвенированы в обоих направлениях. Определение нуклеотидной последовательности показало полное соответствие первичной структуры гена ранее опубликованной нуклеотидной последовательности генов *AtPARP1* и *AtPARP2* (AY150460.1 и NM\_116472.4 в GenBank).



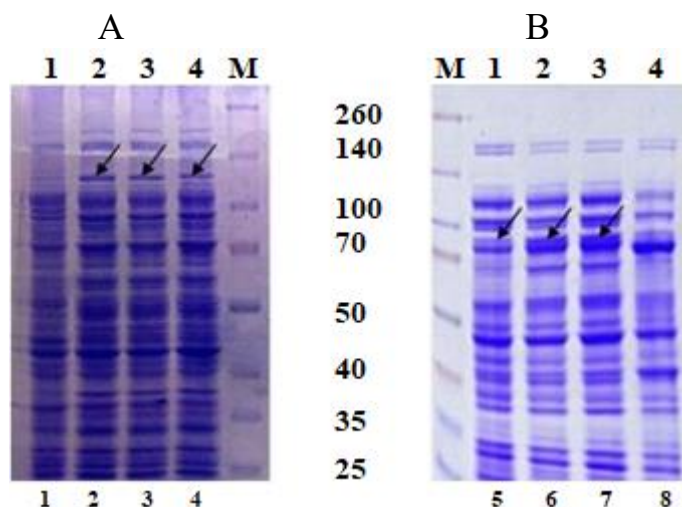
А) ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды pET28c/AtPARP2; В) Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды pET28c/AtPARP2; С) ПЦР анализ рекомбинантной плазмиды pET28c/AtPARP1; D) Рестрикционный анализ рекомбинантной плазмиды pET28c/AtPARP1. М: ДНК маркер; 1-5 – клоны.

Рисунок 10 – Анализ клонов, трансформированных pET28c/AtPARP1 и pET28c/AtPARP2 штаммов *E. coli* на наличие рекомбинантной плазмиды

Для идентификации продукта генов *AtPARP1* и *AtPARP2* в клетках *E. coli* использовали систему экспрессии на основе РНК-полимеразы фага Т7. Для синтеза поли (АДФ-рибоза) полимераз *A. thaliana* в бактериальных клетках нами был выбран экспрессионный штамм *E. coli* Rosetta2 (DE3) pLysS, разновидность штамма К-12. Этот штамм содержал в хромосоме копию гена, кодирующий Т7 РНК полимеразу под контролем lacUV5-промотора. Rosetta2(DE3)pLysS создан на основе штамма BL21 lacZY для увеличения экспрессии эукариотических белков, содержащих редко используемые в *E. coli* кодоны. Этот штамм содержит гены тРНК к следующим кодонам: AUA, AGG, AGA, CUA, CCC, GGA в, устойчивой к хлорамфениколу, плазмиде.

Экспрессию генов *AtPARP1* и *AtPARP2*, в трансформированных клетках *E. coli* штамма Rosetta2(DE3) pLysS, выявляли с помощью SDS-ПААГ электрофореза и определения ферментативной активности. По результатам SDS-ПААГ электрофореза удалось установить, что рекомбинантный штамм Rosetta2(DE3)pLysSpET28c/AtPARP1 продуцирует белок с молекулярной массой 111,2 кДа, тогда как Rosetta2(DE3)pLysSpET28c/AtPARP2 продуцирует белок с молекулярной массой 72 кДа, что соответствует молекулярной массе, предсказанной для AtPARP2. В отсутствии индуктора накопление белка с

соответствующей молекулярной массой не происходило (рисунок 11), что свидетельствует об эффективной экспрессии данных генов.

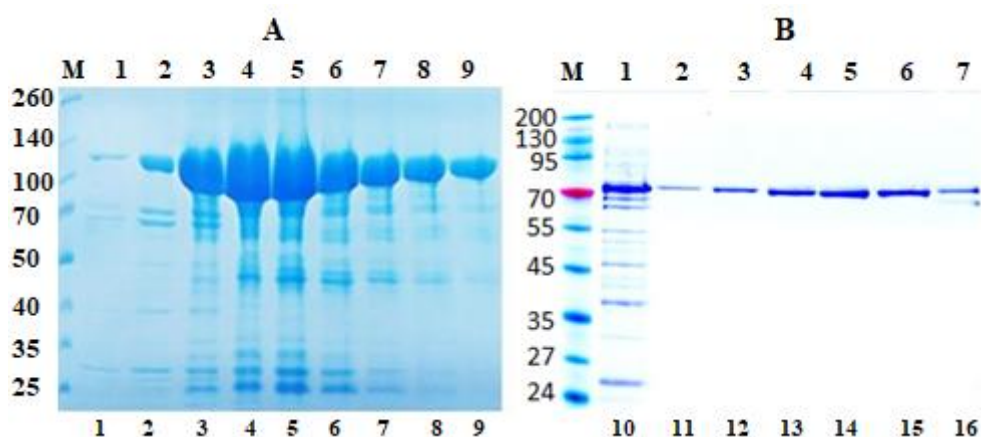


М – Маркер; 1 – клеточный экстракт *E. coli*, несущий пустой вектор рЕТ28с; 2-4- клеточный экстракт *E. coli* несущий рЕТ28с/*AtPARP1* (А) и рЕТ28с/*AtPARP2* (Б) после 12 часов индукции с ИПТГ, 1-3- клеточный экстракт *E. coli* несущий рЕТ28с/*AtPARP2*, 4 - клеточный экстракт *E. coli*, несущий пустой вектор рЕТ28с.

Рисунок 11 – Экспрессия кДНК гена *AtPARP2* и *AtPARP1* в *E. coli*

Так как для экспрессии кДНК поли (АДФ-рибоза) полимераз *A. thaliana* в *E. coli* был выбран вектор рЕТ28с с 6хHis•tag последовательностью на С-конце, экспрессированный рекомбинантный белок содержал шесть идентичных гистидиновых остатков на С-конце, которые действовали как сайт связывания металлов для очистки экспрессированных белков. В связи с этим, рекомбинантные белки с His-концом были очищены металлоаффинной хроматографией. Степень очистки полученных белков определяли с помощью SDS-ПААГЭ (Рисунок 12). Как видно из представленных данных (рисунок 12А, В) рекомбинантные белки *AtPARP1* и *AtPARP2* были очищены до гомогенного состояния и не содержали примесей других белков.

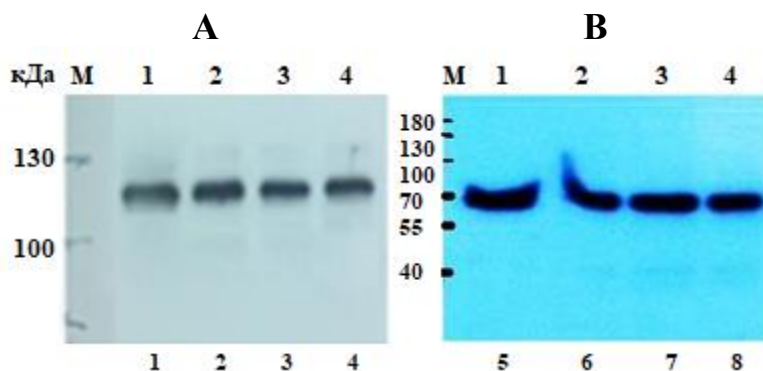
Для обнаружения белков *AtPARP1* и *AtPARP2* в растениях требуется получение специфических антител к данным ферментам. Для этого очищенные рекомбинантные белки *AtPARP1* и *AtPARP2* совместно с адьювантом Фрейнда ввели в кровотоки кролика. После серии иммунизации было отобрано необходимое количество крови, из которой выделена сыворотка, содержащая антитела к *AtPARP1* и *AtPARP2*.



А) Очистка на Ni-NTA матрице рекомбинантного AtPARP1, содержащего гистидиновую метку. В) Очистка на Ni-NTA матрице рекомбинантного AtPARP2. М - белковый маркер, размеры которых указаны в кДа слева. 1-9 - Очищенные фракции белка.

Рисунок 12 – Аффинная хроматография клеточного экстракта клеток *E.coli*, экспрессирующих рекомбинантные AtPARP1-6xHis и AtPARP2-6xHis белки.

В последующих экспериментах для выявления AtPARP1 и AtPARP2 в корнях и листьях проростка арабидопсиса, семена выращивали 14 дней после стратификации и отделяли корни и листья. Затем экстрагировали белок и белки фракционировали с помощью SDS-ПААГЭ.



А) Вестерн блоттинг клеточных экстрактов *A. thaliana* с поликлональными антителами к AtPARP1; В) Вестерн блоттинг клеточных экстрактов *A. thaliana* с поликлональными антителами к AtPARP2. М - белковый маркер, размеры которых указаны в кДа слева. 1- Рекомбинантный белок AtPARP2 или AtPARP1. 2- Корень. 3- Листья. 4- 14 дневное растение 5- Рекомбинантный белок AtPARP1.

Рисунок 13 – Анализ специфичности анти-AtPARP1 и анти-AtPARP2 поликлональных антител

Далее переносили белки из полиакриламидного геля на PVDF мембрану и инкубировали ее с поликлональными антителами к AtPARP1 и AtPARP2. При этом хроматографически очищенные рекомбинантные AtPARP1 и AtPARP2 использовали в качестве контроля (рисунок 13, дорожка 1).

Анти-AtPARP1 антитела специфически распознают AtPARP1, на это указывает белковая полоса с молекулярной массой приблизительно 110 кДа (рисунок 13А). Тогда как, анти-AtPARP2 антитела выявили белок с молекулярной массой 70 кДа (рисунок 13В), что соответствует молекулярной массе AtPARP2. Эти данные свидетельствуют о том, что AtPARP1 и AtPARP2 присутствуют в тканях растений арабидопсис.

### **3.2 Характеристика субстратной специфичности AtPARP1, AtPARP2 и AtPARP3 *A.thaliana* к олигонуклеотидным субстратам с разными конфигурациями и структурой 5' и 3'-концов**

В предыдущих работах было продемонстрировано, что *in vitro* белки PARP1 и PARP2 млекопитающих могут поли(АДФ-рибозил)ировать (ПАРилирование) олигонуклеотидные дуплексы, содержащие множественные близко расположенные разрывы и фосфорилированные концы цепи ДНК [31]. Белки AtPARP1 и AtPARP2 *A. thaliana* обладают гомологией с белками PARP1 и PARP2 млекопитающих, соответственно, что позволяет предположить, что белки растений также могут проявлять активность по модификации ДНК.

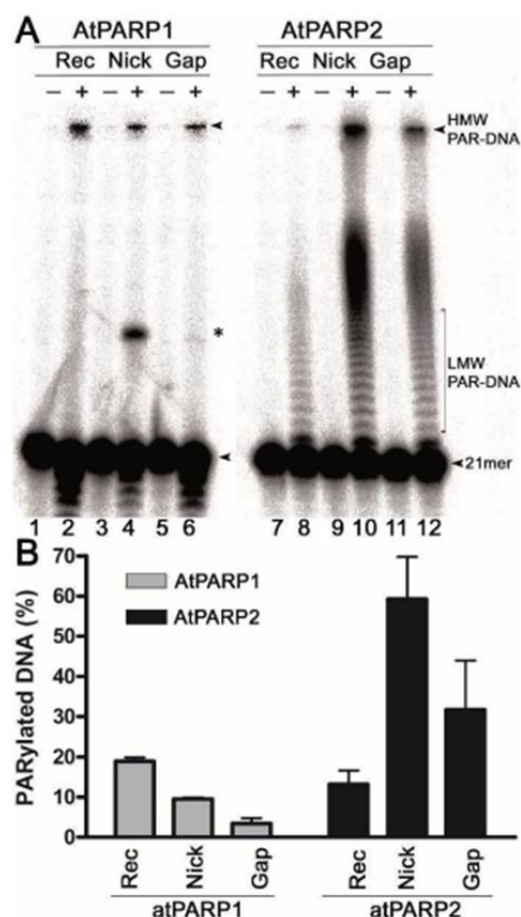
Для того чтобы проверить это, мы исследовали ферментативную активность очищенных белков AtPARP1 и AtPARP2 с использованием ДНК-субстратов, содержащих более двух разрывов цепи, для имитации кластерных повреждений ДНК и промежуточных продуктов репарации: EhoA•RexT<sup>nick</sup> и EhoA•RexT<sup>gap</sup>, которые представляют собой 40-мерные олигонуклеотидные дуплексы, содержащие разрыв и брешь длиной в один нуклеотид, соответственно. Эти ДНК субстраты состоят из 40-мерной (RexT) матричной цепи и двух комплементарных цепей: 21-мерная (EhoA) и фосфорилированные 18-мерная (5'pEho18) или 19-мерная (5'pEho19) цепи (таблица 4). Кроме того, мы подготовили Eho21•RexT<sup>rec</sup>, который представляет собой дуплекс с 5'-однонитевой выступающей матричной цепью, состоящий из RexT и EhoA. В каждом дуплексе EhoA или RexT были помечены [<sup>32</sup>P] радиоактивным фосфором либо 5', либо 3' концы. Меченные 5'-[<sup>32</sup>P] -олигонуклеотидные дуплексы инкубировали с белками AtPARP в присутствии 1 мМ НАД<sup>+</sup>, затем реакцию останавливали добавлением 0,15 % SDS и 50 мкг·мл<sup>-1</sup> протеиназы К и инкубацией в течение 30 мин при 55 °С. После этого образцы обессоливали, а затем подвергали термообработке (5 мин при 95 °С) в буфере для загрузки геля, и продукты разделяли электрофорезом на денатурирующем полиакриламидном геле.

Как показано, обработка протеиназой К и последующая термическая обработка не разрушили продукты ПАР-ДНК, что свидетельствует о том, что NMW ДНК-продукты являются ковалентно присоединенными к ДНК полимерами АДФ-рибозы.



Анализ продуктов реакции показал, что от трех до шестидесяти процентов меченных [<sup>32</sup>P] олигонуклеотидов превращаются в медленно мигрирующие продукты ДНК, которые локализованы на геле над немодифицированным 21-мерным фрагментом (рисунок 14А, дорожки 2, 4, 6, 8, 10 и 12), предполагая, что полимер ПАР, синтезируемый AtPARP, генерирует комплекс с ДНК. Важно отметить, что эти медленно мигрирующие продукты ПАР-ДНК были устойчивы к протеиназе К, SDS и термообработке, что указывает на возможную ковалентную природу модификаций ДНК, индуцированных AtPARP ферментами. Примечательно, что AtPARP2 более эффективно модифицирует ДНК по сравнению с AtPARP1 (рисунок 14А, В). В частности, AtPARP1 генерировал в основном продукты ПАР-ДНК с высокой молекулярной массой (НМВ-ДНК), которые не могли проникать в гель (рисунок 14А, дорожки 2, 4 и 6), тогда как AtPARP2 производил, в дополнение к НМВ, низкомолекулярные (ЛМВ-ДНК) продукты ПАР-ДНК, которые могли проникать в гель и мигрировать в виде лестницы отдельных фрагментов ДНК разного размера над свободным 21-мерным фрагментом (дорожки 8, 10 и 12). Как показано на рисунке 14В, эффективность катализируемого AtPARP1 и AtPARP2 образования продуктов ПАР-ДНК сильно зависят от структур ДНК дуплекса. AtPARP1 предпочитительно модифицирует дуплексы с выступающей цепью EcoA•RexT<sup>rec</sup> (20 % продуктов НМВ ПАР-ДНК) и, в меньшей степени, ДНК дуплексы с разрывом и брешью (3 и 10 % продуктов НМВ ПАР-ДНК, соответственно), тогда как AtPARP2 предпочитает дуплексы с разрывом и брешью (30 % продуктов ЛМВ и 60 % НМВ ПАР-ДНК) по сравнению с ДНК субстратом с выступающей цепью (14 % продуктов ПАР-ДНК). Следует отметить, что AtPARP1, но не AtPARP2, индуцирует неспецифическое расщепление 21-мерного фрагмента 3'→5' экзонуклеазой (рисунок 14А, дорожки 2, 4 и 6). Кроме того, инкубация AtPARP1 с EcoA•RexT<sup>nick</sup> и, в гораздо меньшей степени с EcoA•RexT<sup>gap</sup> приводит к формированию дискретной полосы, мигрирующую в положении 40-мерного фрагмента (дорожки 4 и 6), что свидетельствует о наличии активности ДНК-лигазы в очищенном растительном белке. Эти наблюдения предполагают, что рекомбинантный белок AtPARP1, несмотря на обширную очистку, загрязнен НАД<sup>+</sup>-зависимой ДНК-лигазой *E. coli* хозяина и неспецифическими экзонуклеазами ДНК.

Таким образом, результаты нами проведенных *in vitro* экспериментов показало, что поли (АДФ-рибоза)полимеразы растений *Arabidopsis thaliana* AtPARP1 и AtPARP2, как и их аналоги у млекопитающих, АДФ рибозилируют концевые фосфатные остатки разрывов цепи ДНК. В частности, AtPARP1, подобно человеческому PARP1, предпочитательно ПАРилируют ДНК дуплексы с выступающей цепью и проявляет следующий порядок предпочтения по отношению к ДНК субстратам: Rec > Nick > Gap. Тогда как AtPARP2, подобно PARP2 млекопитающих, ПАРилируют дуплексы с разрывом и брешью более эффективно, чем ДНК дуплексы с выступающей цепью, и отображает следующий порядок предпочтения дуплексов: Nick > Gap > Rec.



А) Анализ НМВ продуктов, генерированных AtPARP1 и AtPARP2, после инкубации с мечеными 5' - [<sup>32</sup>P] 40-мерными ДНК дуплексами с разрывами, брешью и выступами с помощью ПААГ в денатурирующих условиях. Стрелки указывают на свободный 21-мерный олигонуклеотид, НМВ и LMW продукты. Звездочкой обозначен продукт неспецифического лигирования, генерируемый НАД<sup>+</sup>-зависимой ДНК-лигазой *E. coli*.

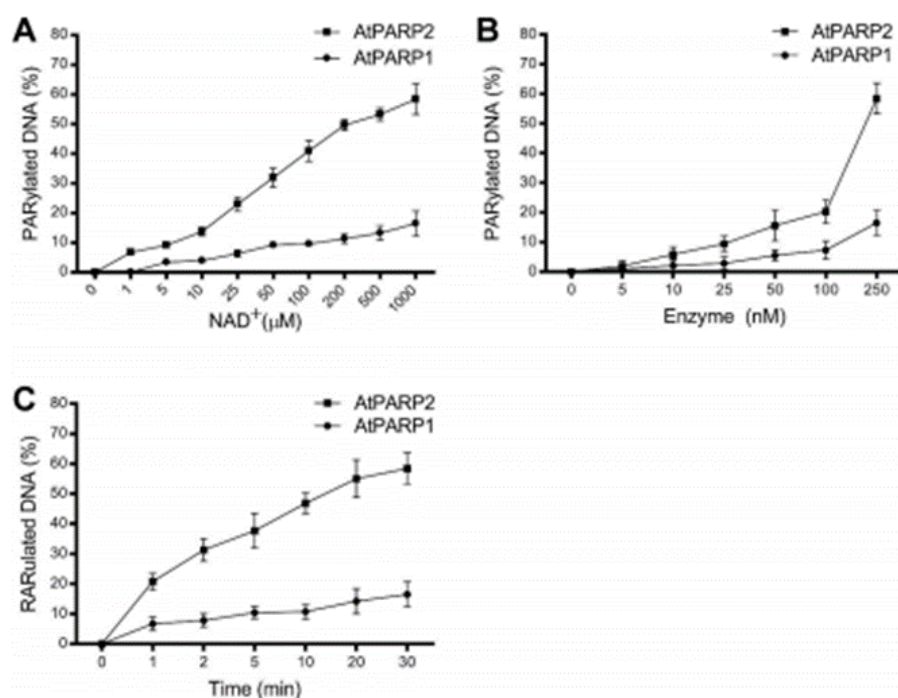
В) Графическое представление образования НМВ и LMW продуктов с помощью AtPARP1 и 2 при воздействии на дуплексы ДНК с разрывом, брешью и выступом. Каждая полоса представляет активность AtPARP как среднее значение ± стандартное отклонение от трех независимых экспериментов.

Рисунок 14 – AtPARP зависимое образование радиоактивно меченных высокомолекулярных (НМВ) продуктов ДНК

Следует подчеркнуть, что в качестве субстратов для катализируемого PARP ПАРилирования были использованы дуплексные ДНК олигонуклеотиды с одноцепочечным разрывом, с брешью и дуплексы с выступающей цепью, а также олигонуклеотиды в одноцепочечной форме. Эти дуплексы ДНК в условиях *in vivo* могут образовываться либо в результате прямого действия активных форм кислорода [397-399], либо во время репликации ДНК [45; 106; 400] либо в результате различных путей эксцизионной репарации ДНК, когда они воздействуют на повреждение ДНК [360; 401]. Например, дуплексы ДНК с

одноцепочечными разрывами имитируют промежуточный продукт BER, NER и других путей эксцизионной репарации ДНК [360; 401]. Концы разрыва цепи ДНК, содержащие 3'-фосфатные и 3'-блокирующие группы, могут представлять собой продукты действия бифункциональных ДНК-гликозилаз и Tdp1-подобных ферментов [453]. ДНК-дуплексы с выступающей цепью могут образовываться в результате коллапса репликационной вилки и/или резекции 3'→5' разрывов цепей ДНК [169; 403; 404]. Все дуплексные ДНК, которые использовались в качестве субстратов в этой работе, содержали по крайней мере один конец с двуцепочечным разрывом, указывая на то, что PARP-катализируемое ПАРилирование может специфически происходить на сайтах хромосом с двуцепочечным разрывом.

Как правило, источником остатков АДФ-рибозы служит НАД<sup>+</sup>. В этой реакции переноса N-гликозидная связь в НАД<sup>+</sup>, которая связывает АДФ-рибозу с никотинамидной группой, разрывается, после чего боковая группа модифицируемой аминокислоты осуществляет нуклеофильную атаку [456]. При этом, для модификации одного акцептора требуется несколько молекул НАД<sup>+</sup>. В связи с этим, мы в последующих экспериментах изучали зависимость ферментативной активности AtPARP1 и 2 от концентрации НАД<sup>+</sup> и фермента.



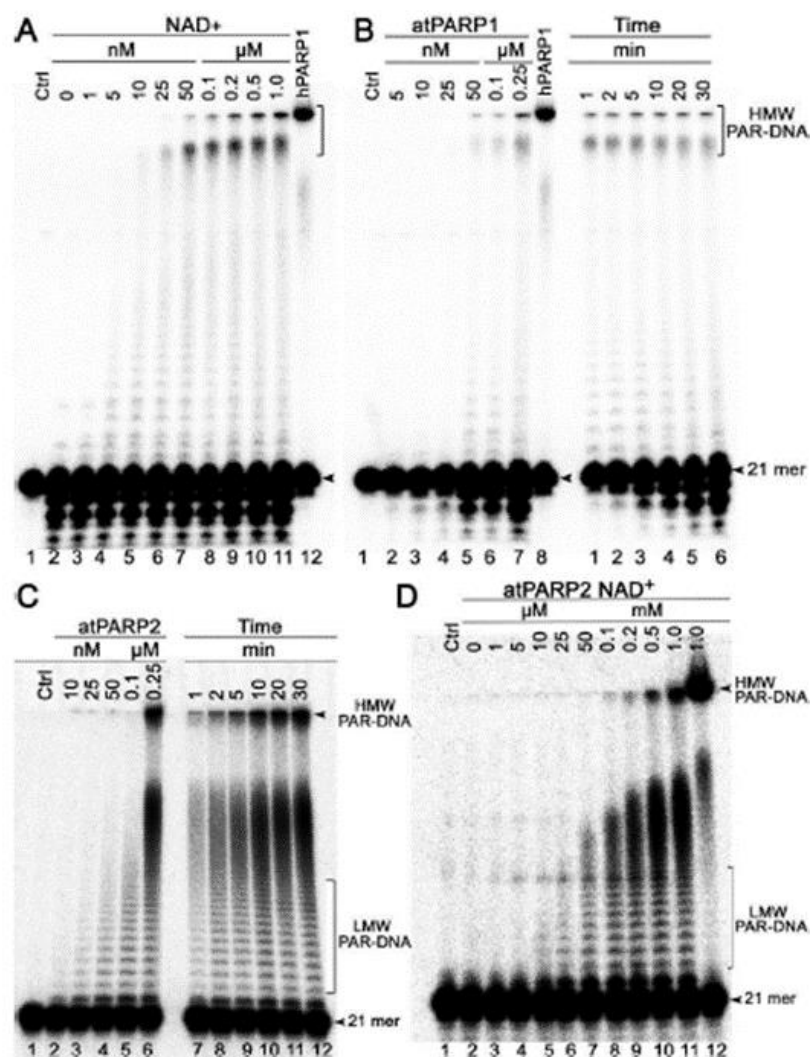
А) Катализируемое AtPARP1 и AtPARP2 ПАРилирование ДНК в присутствии различных концентраций НАД<sup>+</sup> (от 1 мкМ до 1000 мкМ). В) Зависимость ПАРилирования ДНК от концентрации белков AtPARP (0–250 нМ). С) Зависимость от времени ПАРилирования ДНК с помощью AtPARP (0-30 мин).

Рисунок 15 – Зависимость от условий реакции образования ПАР-ДНК, катализируемого AtPARP1 и AtPARP2

Для этого мы инкубировали AtPARP1 и AtPARP2 с их предпочтительными субстратами меченными 5'-[<sup>32</sup>P] EhoA•RexT<sup>rec</sup> и EhoA•RexT<sup>nick</sup>, соответственно, в присутствии разных концентрации НАД<sup>+</sup> и фермента. Для atPARP1 ПАР-ДНК продукты не образовывались в отсутствие или при очень низких концентрациях НАД<sup>+</sup> (0-10 мкМ) и белка (5-50 нМ) (рисунок 15А, В), но уровень модификации ДНК увеличивается при более высоких концентрациях НАД<sup>+</sup> (от 25 мкМ до 1 мМ) и белка (100–250 нМ) (рисунок 15А, В). Примечательно, что активность ПАРилирования ДНК под действием AtPARP1 быстро достигла уровня плато уже через 1 мин инкубации (рисунок 15С). Аналогично для AtPARP2, ПАРилирование ДНК было очень низким или отсутствовало при низких концентрациях НАД<sup>+</sup> (0-25 мкМ) (рисунок 15А) и белка (5-10 нМ) (рисунок 15В), но активность возрастала при более высоких концентрациях НАД<sup>+</sup> (от 0,1 до 1 мМ) и белка (25-250 нМ) (рисунок 15 и рисунок 16). Интересно отметить, что при концентрации белка ниже 250 нМ, atPARP2 не мог генерировать продукты НМВ ПАР-ДНК, при этом наблюдалась на электрофореграмме только LMW продукты (рисунок 16). Следует отметить, что AtPARP2, но не AtPARP1, генерировал продукты LMW ПАР-ДНК, которые мигрируют в виде лестницы отдельных фрагментов ДНК разного размера над свободным 21-мерным олигонуклеотидом, который становится слитым на расстоянии 1/3 от начала геля (рисунок 16).

Появление лестницы ДНК подразумевает дистрибутивный синтез полимера ПАР катализируемое AtPARP2, тогда как образование НМВ-фрагментов ПАР-ДНК обоими ферментами AtPARP указывает на высокую процессивность синтеза ПАР полимера ферментами PARP растений (Рисунок 16). Эти данные, позволяют предположить, что PARP растений, подобно своим аналогам у млекопитающих, могут синтезировать длинные полимеры ПАР, ковалентно связанные с ДНК.

Таким образом, на основании проведенных экспериментов были выявлены оптимальные стандартные условия ферментативной реакции для atPARP1 и AtPARP2. Кроме этого выявлено, что AtPARP2 обладает высокой активностью АДФ-рибозилирования ДНК по сравнению с AtPARP1, но образующие более короткие цепи и содержащие до 20 единиц АДФ-рибозы. Показано, что продукты АДФ-рибозилирования ДНК не образуются в отсутствие или при очень низких концентрациях НАД<sup>+</sup> (0–10 нМ), но их образование увеличивается при более высоких концентрациях НАД<sup>+</sup> (от 25 нМ до 1 мМ).



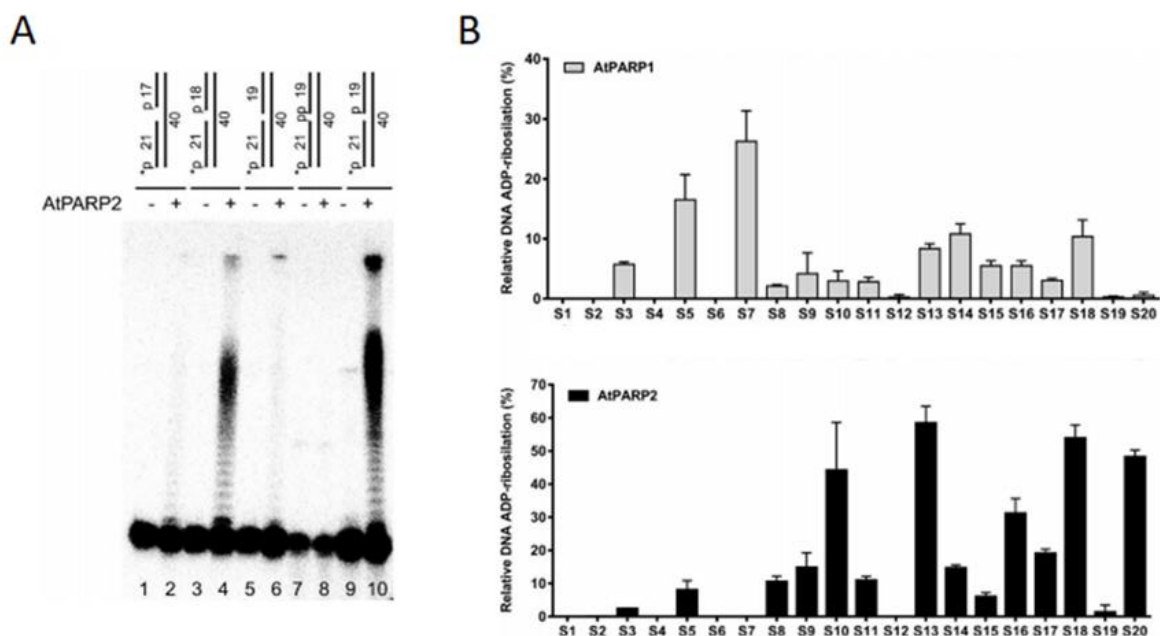
А) AtPARP1 зависимое ПАРилирования ДНК в присутствии разных концентрации НАД<sup>+</sup>; В) ПАРилирования ДНК в зависимости от концентрации AtPARP1 и времени инкубации; С) ПАРилирования ДНК в зависимости от концентрации AtPARP2 и времени инкубации; D) AtPARP2 зависимое ПАРилирования ДНК в присутствии разных концентрации НАД<sup>+</sup>.

Рисунок 16 – Катализируемое AtPARP1 и AtPARP2 ПАРилирование ДНК в зависимости от концентраций НАД<sup>+</sup>, белка и времени инкубации

В следующих экспериментах мы более подробно оценили влияние различных структур ДНК (разрыв, брешь, дуплексы с выступами и одноцепочечная (оцДНК) и природы концов ДНК на катализируемое AtPARP образование ПАР-ДНК аддуктов. Для этого мы инкубировали [<sup>32</sup>P]-меченные олигонуклеотиды различной конфигурации и концевых структур в присутствии AtPARP и НАД<sup>+</sup>. После инкубации продукты реакции анализировали с помощью ПААГ в денатурирующих условиях и количественно выражали образованные ПАР-ДНК аддукты (рисунок 17А). Количественная оценка результатов,

представленные на рисунке 17В, показала, что: (i) в целом AtPARP2 более активен по сравнению с AtPARP1 на большинстве тестируемых субстратов ДНК; (ii) тем не менее, AtPARP1 был более активен в отношении меченной 3'-кордицепином [<sup>32</sup>P] дуплексной ДНК с выступающей цепью (3'dAM<sup>32</sup>P-ExoA•RexT<sup>rec</sup>) по сравнению с AtPARP2; (iii) AtPARP1 более активен на ДНК дуплексе с выступами (<sup>32</sup>pExo15•RexT-12<sup>rec</sup>), который содержит 15-мерный фрагмент, по сравнению с дуплексом <sup>32</sup>pExoA•RexT<sup>rec</sup> с более длинной 21-мерной цепью; (iv) субстратное предпочтение AtPARP2 было противоположным таковому у AtPARP1, поскольку AtPARP2 был активен на втором субстрате ДНК (<sup>32</sup>pExoA•RexT<sup>rec</sup>), но терял свою активность на первом (<sup>32</sup>pExo15•Rex12T<sup>rec</sup>); (v) AtPARP1 был активен на одноцепочечном 40-мерном олигонуклеотиде RexT-12, содержащем как 3'-P, так и 5'-[<sup>32</sup>P] концевые остатки, но не на фрагменте ДНК, содержащем только один 5'-[<sup>32</sup>P] концевой остаток. Тогда как AtPARP2 проявлял очень низкую активность или не проявлял активности на одноцепочечном ДНК субстратах. Интересно, что присутствие двух 5'-концевых фосфатов в дуплексах ExoA•RexT<sup>nick/gap</sup> было необходимо для эффективного ПАРилирования ДНК, тогда как присутствие 3'-концевого фосфата сильно ингибировало модификацию ДНК (рисунок 17).

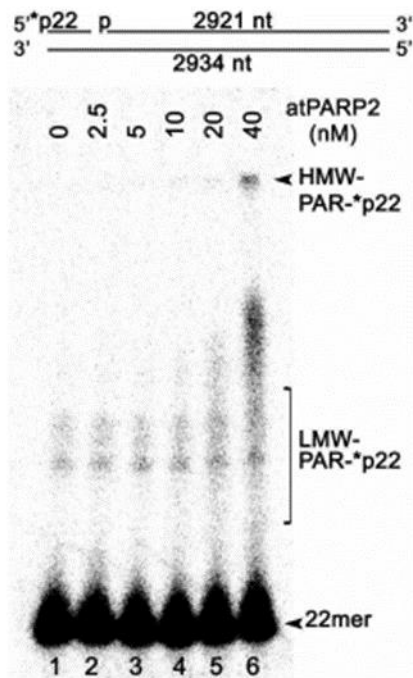
Ранее было показано, что PARP млекопитающих могут АДФ-рибозилировать длинные фрагменты плазмидной ДНК, содержащих одноцепочечные разрывы (SSB), в непосредственной близости к концам двуцепочечных разрывов (DSB) [442]. Чтобы проверить, может ли AtPARP2 АДФ-рибозилировать высокомолекулярные фрагменты ДНК, мы сконструировали линейный фрагмент ДНК на основе плазмиды размером 2934 п.н., содержащий одноцепочечный разрыв на расстоянии 22 нуклеотидов от 5'-[<sup>32</sup>P]-меченного DSB с тупым концом (рисунок 18). 40 нМ AtPARP2 продемонстрировал устойчивое АДФ-рибозилирование 5'-фосфорилированного 22-мерного фрагмента, который расположен между разрывом и концом DSB (дорожка б), что позволяет предположить, что активность АДФ-рибозилирования ДНК под действием PARP ферментов арабидопсиса не ограничивается короткими олигонуклеотидными дуплексами, но распространяется и на высокомолекулярные структуры ДНК. Следовательно, эти данные указывают на то, что PARP растений обладают широкой специфичностью к ДНК субстрату, подобно таковой у аналогов млекопитающих, хотя AtPARP2 обладает более эффективной активностью АДФ-рибозилирования ДНК по сравнению с AtPARP1.



А) Денатурирующий гель, демонстрирующий влияние концевых фосфатных остатков ДНК на катализируемое AtPARP2 ПАРилирование ДНК. В) Графическое представление эффектов различных структур ДНК на ПАРилирование ДНК, катализируемое AtPARP1 и AtPARP2. Данные по катализируемому PARP образованию продуктов PAR-ДНК представлены в виде среднего значения  $\pm$  стандартное отклонение из трех независимых экспериментов.

Рисунок 17 – Влияние структуры ДНК и природы концов на катализируемое AtPARP1 и AtPARP2 образование аддуктов PAR-ДНК

Необходимо отметить, что, в отличие от ферментов млекопитающих, AtPARP2 проявлял более высокую активность ПАРилирования ДНК, чем AtPARP1, на большинстве протестированных субстратах ДНК. Тем не менее, AtPARP1, но не AtPARP2, был способен ПАРилировать ДНК дуплексы с одноцепочечными выступающими концами, содержащий короткий 15-мерный олигонуклеотид, с 5'-концевым фосфатом, что позволяет предположить, что эти растительные ферменты обладают неперекрывающейся специфичностью по отношению к ДНК-субстратам. Следует подчеркнуть, что PARP растений были особенно чувствительны к расстоянию, которое разделяет DSB и SSB (представленное в виде разрыва, пробела или выступающим оцДНК) в дуплексе ДНК. Например, AtPARP1 проявляет предпочтение к ДНК-субстратам, содержащим два разрыва цепи, разделенных 1,5 витками спирали, тогда как AtPARP2 предпочитает расстояние в 1 или 2 витка спирали.



Стрелки указывают HMW и LMW продукты ПАР-ДНК и свободные олигонуклеотиды.

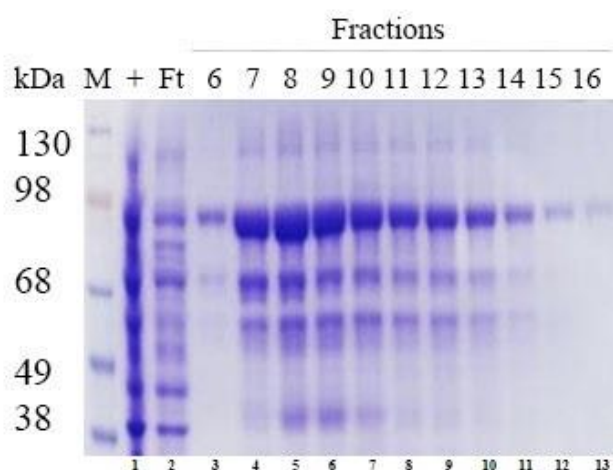
Рисунок 18 – Поли-АДФ-рибозилирование фрагмента ДНК линейной плазмиды размером 2,3 т.п.н под действием AtPARP2

Таким образом, наличие множественных близко расположенных разрывов цепей ДНК, их сравнительное расположение и природа 5' и 3' концов в ДНК-субстрате важны для катализируемого AtPARP ДНК АДФ-рибозилирования. В целом, за исключением более высокой активности AtPARP2, субстратная специфичность растительных белков AtPARP1 и atPARP2 [443] была очень похожа на таковую у их аналогов PARP1 и PARP2 у млекопитающих, соответственно [31].

Как отмечалось выше, на сегодняшний день в геноме *A. thaliana* обнаружено три типа PARP с различной молекулярной массой и структурной архитектурой: AtPARP1, AtPARP2 и AtPARP3 [9,10]. Нами показано, что AtPARP1 и AtPARP2 АДФ-рибозилируют 5'-концевые фосфатные остатки в дуплексных олигонуклеотидах ДНК и плазмиде, содержащей по крайней мере два близко расположенных разрыва цепи ДНК. Однако, остается неясным, обладает ли AtPARP3 АДФ-рибозилирующей активностью по отношению ДНК. До недавнего времени предполагалось, что PARP3 млекопитающих участвует в основном в белок-белковых взаимодействиях, а также моно-АДФ-рибозилирует ДНК (МАР-ДНК) на концевых фосфатных остатках на концах DSB и SSB коротких и длинных молекул ДНК [442]. Необходимо отметить, что на филогенетическом дереве растительный PARP3 группируется близко к человеческому PARP1, а не к человеческому PARP3, что позволяет предполагать, что для PARP3 характерно АДФ-рибозилирующая активность 5'-



концевых фосфатных остатков в дуплексных олигонуклеотидах ДНК. Для выяснения данного вопроса кДНК ген *AtPARP3* клонировали в вектор pET28с с 6хHis•tag последовательностью на С–конце. В результате нами получены рекомбинантные плазмиды pET28с/*AtPARP3*. Затем, рекомбинантный белок был очищен с помощью металлоаффинной хроматографии и после элюирования степень очистки полученных белков определяли с помощью гель-электрофореза в 10 % SDS-ПААГ (Рисунок 19). В результате проведенных работ удалось установить, что рекомбинантный штамм продуцирует белок с молекулярной массой приблизительно **91 кДа**, что соответствует расчетной молекулярной массе предсказанной для *AtPARP3*.



Очистка на Ni-NTA матрице рекомбинантного *AtPARP3*, содержащего гистидиновую метку. М - белковый маркер, размеры которых указаны в кДа слева. 1-9 - Очищенные фракции белка.

Рисунок 19 – Аффинная хроматография клеточного экстракта клеток *E.coli*, экспрессирующих рекомбинантные *AtPARP3*-6хHis белка

Как отмечалось выше наиболее предпочтительным субстратом для *AtPARP1* является ДНК-дуплекс с одноцепочечными выступающими концами, содержащие короткий 15-мерный олигонуклеотид, с 5'-концевым фосфатом. В связи с этим было решено проверить АДФ-рибозилирующую активность фермента с использованием *Eco15•Rex12-T* ДНК субстрата, который представляет собой дуплекс с 5'-однонитевой выступающей матричной цепью, состоящий из *RexT* и *EcoA*. В ДНК дуплексе 5'-конец *EcoA* были помечены [<sup>32</sup>P]-радиоактивным фосфором. Как видно из представленных на рисунке 20 данных, как *AtPARP3*, так и *PARP3* человека не проявлял каких-либо обнаруживаемых активностей поли-АДФ рибозилирования ДНК, даже если они присутствовали в избыточных количествах.

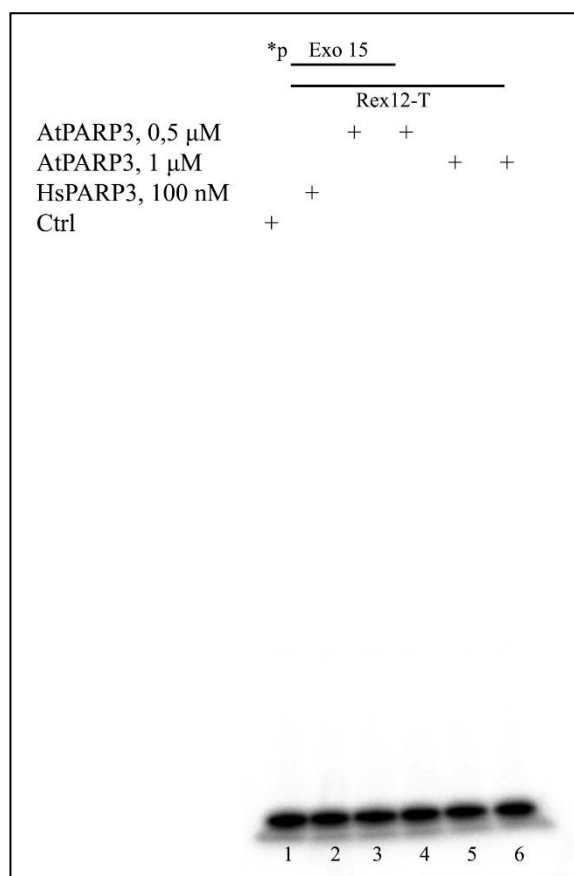


Рисунок 20 – Денатурирующий ПААГ анализ активности AtPARP3

Ранее было показано, что PARP3 человека эффективно продуцирует аддукты MAP-ДНК на концевых фосфатных остатках на концах DSB и SSB коротких и длинных молекул ДНК, проявляя субстратную специфичность близкую к PARP2 человека [31]. При этом PARP3 человека не был способен ПАРилировать ДНК дуплексы с одноцепочечными выступающими концами. Можно предположить, что AtPARP3, подобно таковой у аналогов млекопитающих, проявляет субстратную специфичность к ДНК дуплексам с разрывом и брешью. Далее, для того чтобы проверить АДФ-рибозилирующую активность фермента были использованы ДНК-субстраты, содержащие разрыв и брешь длиной в один и два нуклеотида. В качестве положительного контроля использовали PARP3 человека.

Как видно из рисунка 21, несмотря на предположение что AtPARP3 будет показывать возможную моно(АДФ-рибозил)ирующую активность, мы не наблюдали активности этого фермента. При этом, человеческий PARP3 продуцировал MAP-ДНК на всех исследованных ДНК субстратах.

Таким образом, AtPARP3 не проявляет (АДФ-рибозил)ирующую активность как по отношению к дуплексам с 5'-однонитевой выступающей матричной цепью, так и ДНК дуплексам с разрывом и брешью.

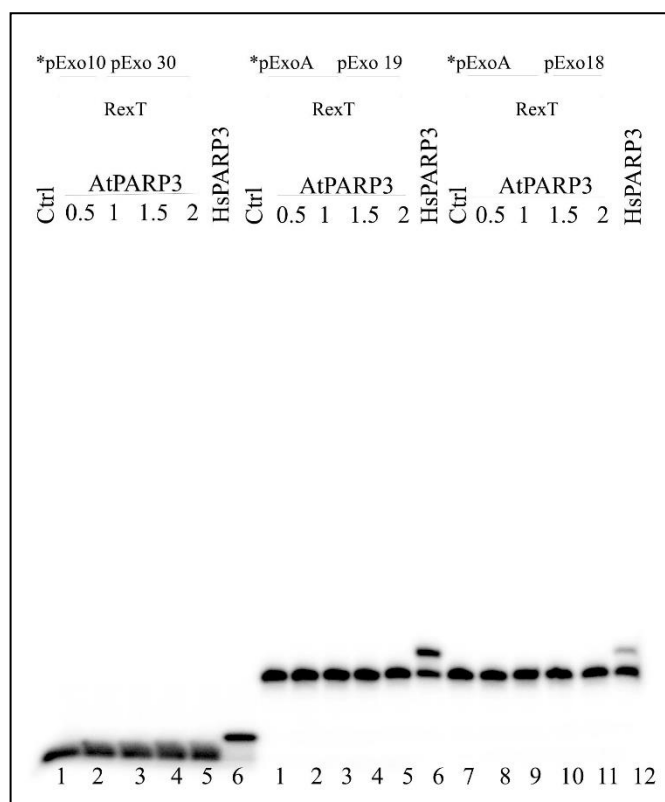
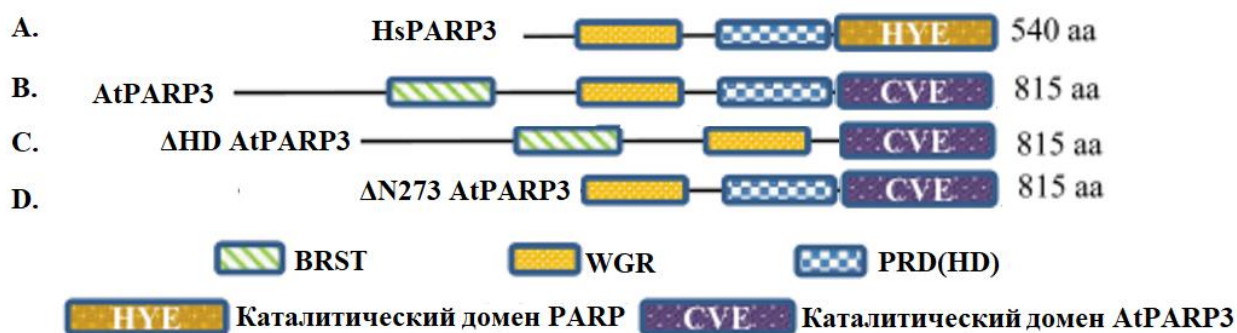


Рисунок 21 – Денатурирующий ПААГ анализ ПАРилирования ДНК субстрата в зависимости от концентрации AtPARP3

Как отмечалось выше, HsPARP3 человека состоит из нескольких доменов, включая WGR, PRD(HD) и каталитического доменов (Рисунок 22). AtPARP3 значительно длиннее HsPARP3, дополнительно к вышеуказанным доменам содержит BRCT-домен (от breast cancer type 1), который требуется для взаимодействия PARP фермента с различными белками-партнерами.

PARP ферменты катализируют синтез полимеров АДФ-рибозы, ковалентно связанных с акцепторными белками, используя в качестве субстрата НАД<sup>+</sup>. Показано, HD домен ингибирует каталитическую активность PARP ферментов, при этом делеция HD приводит к конститутивной гиперактивации PARP [457]. Кроме того, аутоингибирующая роль HD сохраняется в PARP2 и PARP3 млекопитающих, активность которых зависит от повреждения ДНК [204].

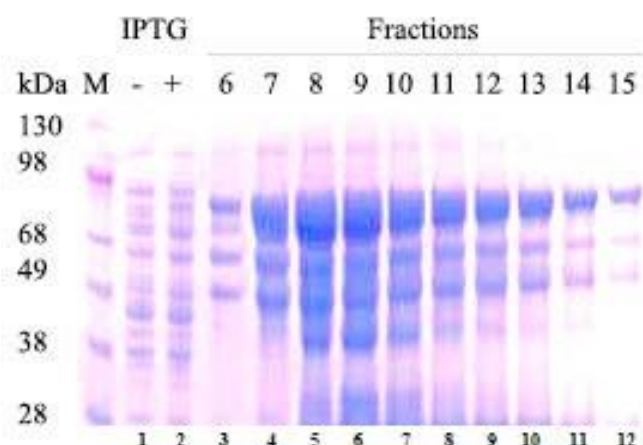
Можно предположить, что делеция HD домена, как и в случае с PARP-3 млекопитающих, может приводить к гиперактивации АДФ-рибозил трансферазной активности AtPARP3. Для выяснения этого вопроса нами были сконструирован ген AtPARP3 без HD домена ( $\Delta$ HD AtPARP3) на основе исходной плазмиды pET28c/AtPARP3 с помощью сайт направленного мутагенеза с помощью специфических праймеров (таблица 5).



А) Доменная структура PARP3 человека. В) Полноразмерный белок AtPARP3. С) Делетированная форма с делецией HD субдомена. D) Укороченная форма включающая в себя ДНК-связывающий WGR домен и каталитический CAT-домен.

Рисунок 22 – Конструированные варианты AtPARP3

Примечание – Составлено автором на основе источника [458].



Очистка на Ni-NTA матрице ΔHD AtPARP3, M - белковый маркер, размеры которых указаны в кДа слева. «-» Неиндуцированный клеточный лизат. «+» - Индуцированный клеточный лизат. Ft - Проскок через колонку NiTrap; F6- F15 - Очищенные фракции белков.

Рисунок 23 – Аффинная хроматография экстрактов клеток *E.coli*, экспрессирующей ΔHD AtPARP3 белок

Для экспрессии гена мутантной ΔHD AtPARP3 в *E.coli* был выбран вектор pET28с с 6xHis•tag последовательностью на С– конце. Рекомбинантный белок с His-концом был очищен металлоаффинной хроматографией на ионах никеля ( $\text{Ni}^{2+}$ ) с использованием NiTrap Chelating колонки и после элюирования степень очистки полученных мутантных белков определяли с помощью гель-электрофореза в 10 % SDS-ПААГ (Рисунок 23). В результате установили, что рекомбинантный штамм продуцирует белок с молекулярной массой

приблизительно 76 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе предсказанной  $\Delta$ HD AtPARP3.

Для выявления АДФ-рибозил трансферазной активности  $\Delta$ HD AtPARP3 мы определяли ферментативную активность очищенного мутантного белка с использованием 5'- [ $^{32}$ P]-Exo15•Rex12T<sup>rec</sup>, 5'- [ $^{32}$ P]-ExoA/pExo19•RexT<sup>nick</sup> и 5'- [ $^{32}$ P]-ExoA/pExo18•RexT<sup>gap</sup> дуплексных ДНК. Как видно из представленных данных на рисунке,  $\Delta$ HD AtPARP3 не проявил (рисунок 24) каких-либо обнаруживаемых активностей поли-АДФ рибозилирования ДНК как и исходный интактный AtPARP3 дикого типа (рисунок 20 и рисунок 21).

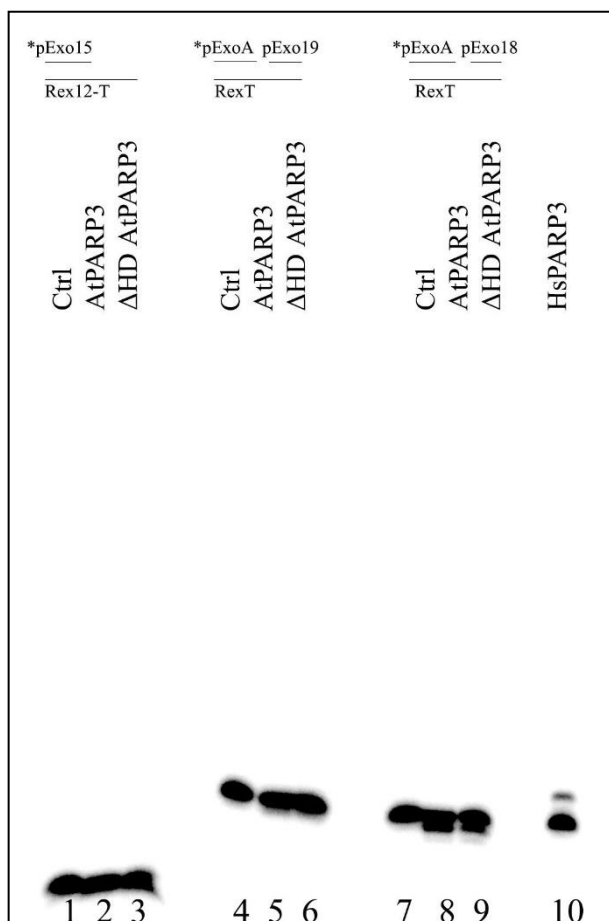
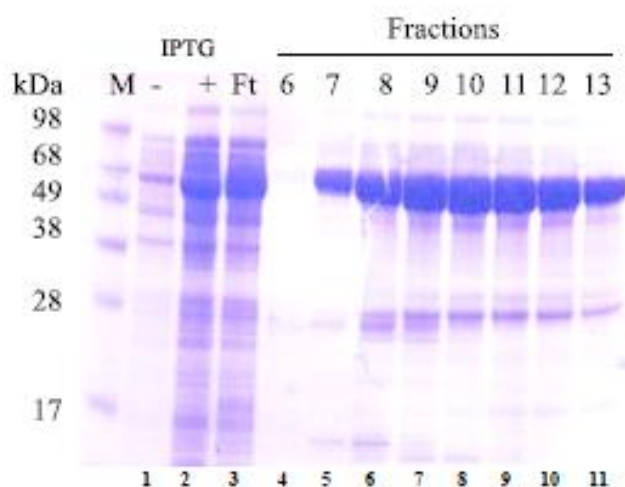


Рисунок 24 – Денатурирующий ПААГ анализ активности  $\Delta$ HD AtPARP3

Как отмечалось выше, N-концевая область AtPARP3 на 220 аминокислот длиннее по сравнению с HsPARP3. Кроме этого, AtPARP3 на N-конце содержит BRCT-домен, который требуется для взаимодействия PARP фермента с различными белками-партнерами [458]. Можно предположить, что AtPARP3 может взаимодействовать с другим гипотетическим белком через свой домен BRCT, необходимый для активации фермента. В связи с этим, в последующих экспериментах мы решили удалить N-концевую область AtPARP3, т.е. конструировать ген кодирующий укороченный вариант AtPARP3 белка.

Для этого на основе исходной плазмиды pET28c/AtPARP3 с помощью специфических праймеров (таблица 5) мы амплифицировали участок

гена *AtPARP3*, который короче на 273 аминокислотных остатков ( $\Delta N273$  AtPARP3) чем интактный AtPARP3. Затем  $\Delta N273$  AtPARP3 клонировали в экспрессионный вектор pET28c с 6xHis•tag последовательностью на С– конце. Полученный вектор pET28c- $\Delta N273$  AtPARP3•6xhis•tag трансформировали в компетентные клетки *E.coli* Rosetta (DE3). Очистку белка  $\Delta N273$  AtPARP3 проводили металлоаффинной хроматографией на ионах никеля ( $Ni^{2+}$ ) с использованием колонки HiTrap Chelating объемом 1 мл. Элюаты анализировали электрофорезом в присутствии SDS (Рисунок 25). В результате проведенных работ установили, что рекомбинантный штамм продуцирует белок с молекулярной массой приблизительно 62 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе предсказанной  $\Delta N273$  AtPARP3.



Очистка на Ni-NTA матрице  $\Delta N273$  AtPARP3, M - белковый маркер, размеры которых указаны в кДа слева. «-» Неиндуцированный клеточный лизат. «+» - Индуцированный клеточный лизат. Ft - Проскок через колонку HiTrap; F6-F13 - Очищенные фракции белков.

Рисунок 25 – Аффинная хроматография экстрактов клеток *E.coli*, экспрессирующий  $\Delta N273$  AtPARP3 белок

Для определения ферментативной активности очищенного мутантного белка  $\Delta N273$  AtPARP3 мы использовали 5'- [ $^{32}P$ ]-Eco15•Rex12T<sup>rec</sup>, 5'- [ $^{32}P$ ] – EcoA/pEco19•RexT<sup>nick</sup> и 5'- [ $^{32}P$ ] -EcoA/pEco18•RexT<sup>gap</sup> дуплексные ДНК. Как и полноразмерный AtPARP3 дикого типа, мутантная укороченная форма  $\Delta N273$  AtPARP3 не проявил каких-либо обнаруживаемых активностей АДФ рибозилирования ДНК (рисунок 26).

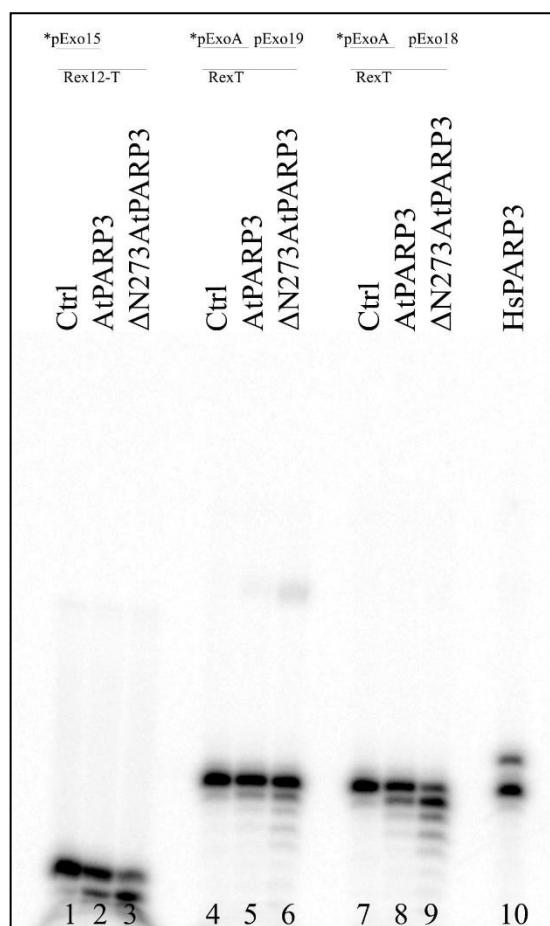


Рисунок 26 – Денатурирующий ПААГ анализ активности  $\Delta N273$  AtPARP3

Ранее было показано, что AtPARP3 высоко экспрессируется в семенах, тогда как AtPARP1 и AtPARP2 почти не обнаруживаются в семенах [341; 407]. Предполагается, что AtPARP3 участвует в поддержании жизнеспособности семян при их хранении [324], поэтому было высказано предположение, что AtPARP3 вместо AtPARP1 и AtPARP2 является основным ферментом, катализирующим ПАРилирование и ответственным за репарацию ДНК во время прорастания семян [341; 407]. Хотя как филогенетическим отношениями, так и структурное сходство указывают на то, что AtPARP3 соответствуют PARP3 животных, наши исследования показали, что AtPARP3 не проявляет типичной для PARP ферментов АДФ-рибозилирующей активности. Анализ фермента с делециями аутоингибиторного и N-концевого BRCT-доменов дополнительно показали, что AtPARP3 утратил АДФ-рибозилирующую активность. Как отмечалось выше, на филогенетическом дереве AtPARP3 группируется близко к HsPARP1, а не к HsPARP3, а также отсутствует АДФ-рибозилирующая активность, что предполагает, что AtPARP3 мог эволюционировать для выполнения других функций у растений, что требует проведение дальнейших исследований.

### 3.3 Конструирование каталитически инактивных AtPARP1<sup>E960K</sup>, E960Q и AtPARP2<sup>E614K</sup> форм белков и определение их ДНК ПАРилирующей активности

Первичная структура PARP1 млекопитающих состоит из 1014 остатков, организованные в 3 функциональных домена: ДНК-связывающий N-концевой домен, ii) домен автомодификации для АДФ-рибозилирования и iii) каталитический домен на С-конце. Каталитический домен PARP1, также называемый доменом АДФ-рибозил-трансферазы (ART), является высококонсервативным у всех членов семейства PARP и имеет структурное сходство с ферментами АДФ-рибозилирования растений. Активные PARP млекопитающих разделяют консервативную триаду гистидин-тирозин-глутаминовая кислота (H-Y-E) (сигнатура PARP) в своих каталитических доменах [459]. Эта эволюционно консервативная триада «H-Y-E» важна для позиционирования НАД<sup>+</sup> во время АДФ-рибозилирования: в PARP1 H862 и Y896 участвуют в связывании НАД<sup>+</sup>, в то время как E988 имеет решающее значение для катализа и позиционирования субстрата. Y896 связывается с никотинамидным кольцом [189], а H862 с 2'-ОН НАД<sup>+</sup> аденин-рибозы, в то время как E988 образует водородную связь с 2'-ОН никотинамид-рибозы и поляризует молекулу НАД<sup>+</sup> для нуклеофильной атаки [191]. Выравнивание аминокислотных последовательностей ART-доменов PARP выявило значительную гомологию между человеческими и растительными ферментами: PARP1 имел 49,6 % и 45,6 % гомологии с AtPARP1 и AtPARP2, соответственно. Примечательно, что PARP человека и растения имеют общую консервативную каталитическую триаду H-Y-E: каталитическая триада PARP1 человека H862-Y896-E988 соответствует таковой для AtPARP1, состоящего из H833-Y867-E960 и AtPARP2, состоящего из остатков H486-Y520-E614 (рисунок 27).

Для исследования роли предполагаемого сайта связывания НАД<sup>+</sup>, высококонсервативного каталитического E960 в AtPARP1 и E614 в AtPARP2, мы получили сайт-направленные мутантные гены, в которых высококонсервативный остаток глутаминовой кислоты в каталитической триаде был заменен на лизин или глутамин (AtPARP1<sup>E960K</sup>, AtPARP1<sup>E960Q</sup> и AtPARP2<sup>E614K</sup>). Мутантные варианты ферментов получили с помощью QuikChange ПЦР. Продукты QuikChange ПЦР после обработки ферментом рестрикции *DpnI* трансформировали в штамм *E.coli* NovaXG Zappers для наработки рекомбинантной плазмиды. Далее плазмидная ДНК, выделенная в соответствии с протоколом набора GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Scientific #K0503) была использована для анализа конструкции на наличие мутаций. Наличие вводимой мутации и отсутствие возможных ошибок на протяжении всего гена проверяли с помощью секвенирования. При проведении полного секвенирования с трех плазмид выбранных случайным образом, полученных по методике QuikChange, в двух плаزمидях для каждого гена нами были обнаружены необходимые замены Glu->Lys и отсутствие возможных ошибок. В результате проведенных нами работ были получены рекомбинантные плазмиды pET28c/AtPARP1<sup>E960K</sup> и pET28c/AtPARP2<sup>E614K</sup>.



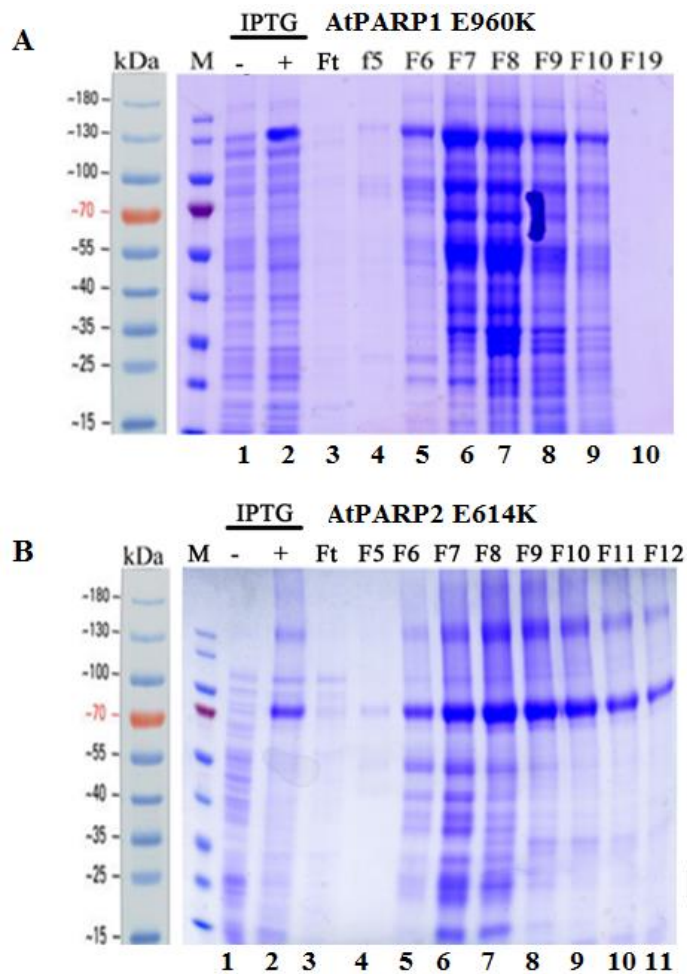
AtPARP2	EVKPEQSKLDTRVAKFISLICNVSMMAQHMEIGYNANKLPLGKISKSTISKGYEVLKRI	60
AtPARP1	-----SNLAPSLIELMKMLFDVETYSAMMEFEINMSEMP LGKLSKHNIQKGFALTEI	54
hPARP1	-----KSKLPKPVQDLIKMIFDVESMKKAMVEYEIDLQKMP LGKLSKRQIQAAYSILSEV	55
	*:* : . : : : : : * . . *:* : . : : * : * * . . . * . . :	
AtPARP2	SEVIDRYD-----RTRLEELSGEFYTVIPHDFGFKMSQFVIDTPQKCLKQKIEMVEALG	114
AtPARP1	QRLLTESDPQPTMKESLLVDASNRFFTMIPF----IHPH--IIRDEDDFKSKVKMLEALQ	108
hPARP1	QQAVSQGS-----SDSQILDLSNRFYTLIPHDFGMKKPP--LLNNADSVQAKVEMLDNLL	108
	.. : . . : : : * . * : * * . : : : : : * : * : * : *	
AtPARP2	EIELATKLLSVDPG-LQDDPLYHYHQQLNCGLTPVGNDSSEFSMVANYMENTHAKTHSGY	173
AtPARP1	DIEIASRIV--GFDVDSTESLDDKYKKLHCDISPLPHDSEYRLIEKYLNTTHAPHTHEW	166
hPARP1	DIEVAYSLLRGGSDSSKDPIDVNYEKLKTDIKVVDRDSEAEIIRKYVKNTHATTHNAY	168
	: * : * : : . . . : : : * : * : : . . : . * * : : : * : * : * * . . :	
AtPARP2	TVEIAQLFRASRAVEADRFQQFSS-SKNRMLLWHGSRLTNWAGILSQGLRIAPPEAPVTG	232
AtPARP1	SLELEEVFALEREGEFDKYAPHREKLGKMLLWHGSRLTNFVGIILNQLRIAPPEAPATG	226
hPARP1	DLEVIDIFKIEREGECQRYKPFKQ-LHNRLLWHGSRTTNFAGILSQGLRIAPPEAPVTG	227
	: * : : * . * * : : : . . * : * * * * * * * : * * * * * * * * * * * * *	
AtPARP2	YMFSGKGVYFADMFSKSANYCYANTGANDGVLLLCEVALGDMNELLYSDYNADNLPPGKLS	292
AtPARP1	YMFSGKIYFADLVSKSAQYCYTCKKNPVGLMLLSEVALGEIHELTKAKY-MDKPPRGKHS	285
hPARP1	YMFSGKIYFADMVSKSANYCHTSQGDPIGLILLGEVALGNMYELKHASH-ISKLPKGGKHS	286
	* * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * : * * * * :	
AtPARP2	TKGVGKTAPNPSEAQTLEDGVVPLGKPFVERSCSKGMLLYNEYIVYNVEQIKMRYVIQVK	352
AtPARP1	TKGLGKKVPQDSEFAKWRGDVTVPCGKPVSSKVKASELMYNEYIVYDIAQVQLQFLKVR	345
hPARP1	VKGLGKTTDPDSANISL-DGVDVPLGTGISSGVNDTSLLYNEYIVYDIAQVNLKYLKLR	345
	. * * : * * . * . . * * * . . . * : * * * * * : * : : : : : :	

Рисунок 27 – Сравнительное выравнивание аминокислотной последовательности каталитического домена PARP1 человека и AtPARP1, AtPARP2 *A.thaliana*.

Примечание – Использовали компьютерную программу Clustal Omega [460]

Для экспрессии генов мутантных *AtPARP1*<sup>E960K</sup> и *AtPARP2*<sup>E614K</sup> в *E.coli* был выбран вектор pET28c с 6xHis•tag последовательностью на С– конце. В связи с этим рекомбинантный белок с His-концом был очищен металлоаффинной хроматографией на ионах никеля (Ni<sup>2+</sup>) с использованием NiTrap Chelating колонки и после элюирования степень очистки полученных мутантов определяли с помощью гель-электрофореза в 10 % SDS-ПААГ (Рисунок 28). В результате проведенных работ удалось установить, что рекомбинантный штамм продуцирует белок с молекулярной массой приблизительно 111 кДа и 72 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе предсказанной для AtPARP1 и AtPARP2, соответственно.

Для выявления роли консервативного каталитического глутамата в поли-АДФ-рибозилировании ДНК мы определяли ферментативную активность очищенных мутантных белков AtPARP1<sup>E960K</sup> и AtPARP2<sup>E614K</sup> с использованием 5'- [<sup>32</sup>P]-pEho15•Rex12T<sup>rec</sup> и 5'- [<sup>32</sup>P] -p-10-RT•RT-A<sup>nick</sup> дуплексной ДНК. Как и ожидалось, обе мутантные AtPARP, даже если они присутствовали в избыточных количествах, не проявляли каких-либо обнаруживаемых активностей поли-АДФ-рибозилирования ДНК по сравнению с AtPARP дикого типа.

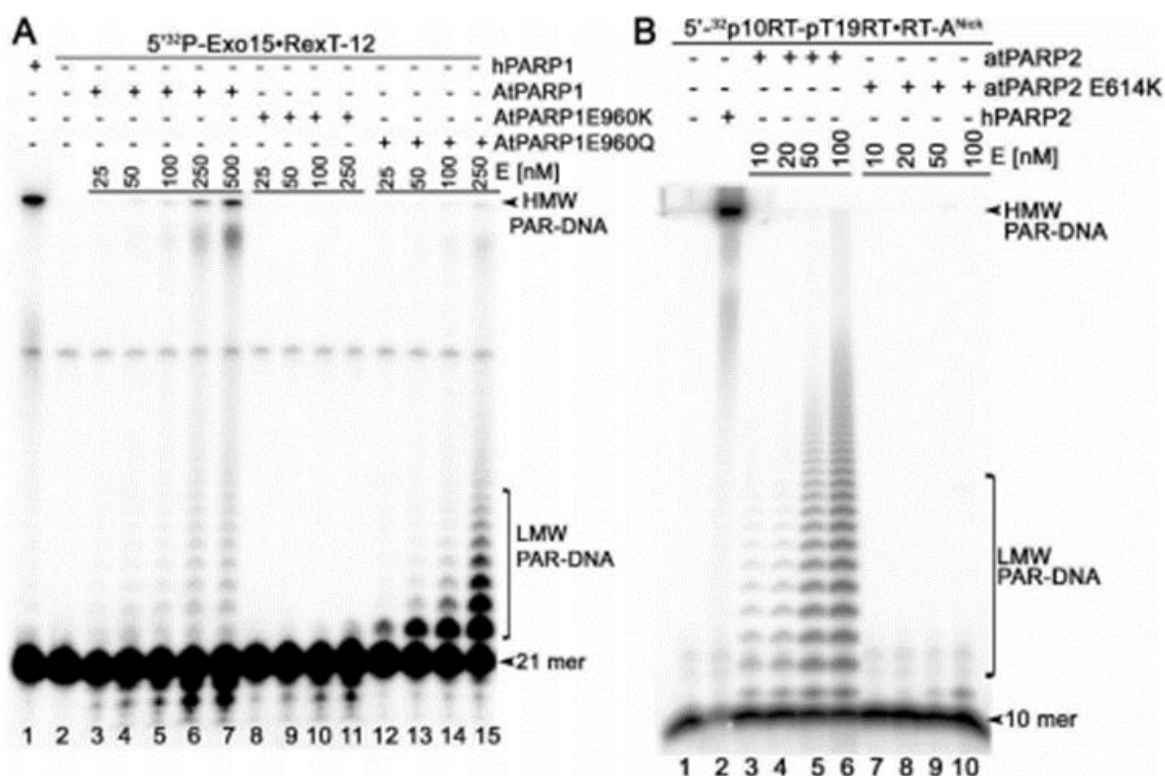


А) Очистка на Ni-NTA матрице AtPARP1<sup>E960K</sup>, В) Очистка на Ni-NTA матрице AtPARP2<sup>E614K</sup>. М - белковый маркер, размеры которых указаны в кДа слева. «-» Неиндуцированный клеточный лизат. «+» - Индуцированный клеточный лизат. Ft - Проскок через колонку NiTrap; F5- F19 - Очищенные фракции белков.

Рисунок 28 – Аффинная хроматография экстрактов клеток *E. coli*, экспрессирующих AtPARP1<sup>E960K</sup> и AtPARP2<sup>E614K</sup> белки

Соответствующие мутации E988Q и E988K в белке PARP1 человека сильно снижают активность фермента (> 40-кратно) и превращают PARP1 в моно-АДФ-рибозил-трансферазу [461,462]. Очищенные мутантные белки atPARP1<sup>E960K</sup>, atPARP1<sup>E960Q</sup> и atPARP2<sup>E614K</sup> инкубировали с 5'-32P мечеными дуплексами Exo15•RexT-12<sup>rec</sup> и p10•RT-A<sup>nick</sup>, соответственно, для измерения активности АДФ-рибозилирования ДНК. Результаты показали, что мутантный белок atPARP1<sup>E960K</sup> полностью утратил активность ДНК-АДФ-рибозилирования (рисунок 28А, дорожки 8-11), тогда, как и ожидалось, мутант AtPARP1<sup>E960Q</sup> проявлял сильную активность в отношении МАРилирования ДНК (дорожки 12-14). Примечательно, что при более высокой концентрации мутантный AtPARP1<sup>E960Q</sup> был способен синтезировать короткие олигомеры АДФ-рибозы, но

скорее распределенным образом (дорожка 15). В контрольных реакциях PARP1 человека и AtPARP1 дикого типа синтезировали в основном HMW продукты ПАР-ДНК (рисунок 29А, дорожки 1 и 6-7, соответственно). Мутант AtPARP2<sup>E614K</sup> при низкой концентрации белка не проявлял детектируемой активности ПАРИлирования ДНК (рисунок 29В, дорожки 7-8), но проявлял очень слабую активность моно-АДФ-рибозилирования (МАРИлирование) ДНК при более высокой концентрации белка (дорожки 9-10). В контрольных реакциях PARP2 человека и AtPARP2 дикого типа показали эффективную активность в отношении ПАРИлирования ДНК (рисунок 29В, дорожка 2 и дорожки 3-6, соответственно). В целом, эти результаты указывают на то, что высококонсервативные E960 AtPARP1 и E614 AtPARP2 важны для активности ДНК-ПАРИлирования растительных ферментов и что препараты растительных белков, используемые в этом исследовании, не загрязнены некоторыми неизвестными бактериальными трансферазами АДФ-рибозы.



А) Анализ HMW продуктов, генерируемых мутантами AtPARP1-WT, AtPARP1-E960K и AtPARP1-E960Q. В) Анализ HMW продуктов, генерируемых мутантами AtPARP2-WT и AtPARP2-E614K. Стрелки указывают HMW и LMW продукты ПАР-ДНК и свободные олигонуклеотиды.

Рисунок 29 – Денатурирующий ПААГ анализ аддуктов ПАР-ДНК, генерируемых мутантными AtPARP ферментами

Таким образом, все мутантные AtPARP ферменты растений, сходные с соответствующими мутантами млекопитающих, обладают сильно сниженной активностью ПАРилирования ДНК. Тем не менее, мутанты AtPARP1<sup>E960Q</sup> и AtPARP2<sup>E614K</sup> проявляли активность МАРилирования ДНК. Следовательно, эти результаты демонстрируют, что высококонсервативный остаток глутаминовой кислоты в каталитической триаде растительных AtPARP необходим для активностей ПАРилирования ДНК и что препараты рекомбинантных белков PARP не загрязнены некоторыми нехарактеризованными бактериальными трансферазами АДФ-рибозы.

### 3.4 Изучение ауто (АДФ)-рибозилирующей активности AtPARP2

В зависимости от конкретных конфигураций множественных близко расположенных разрывов цепей ДНК PARP1-3 млекопитающих может переключать свою субстратную специфичность с белка на ДНК АДФ-рибозилирование [393; 411]. Чтобы оценить относительную эффективность аутопарилирования (белка), катализируемого AtPARP2, по сравнению с ДНК АДФ-рибозилирования активностями, мы использовали нерадиоактивный (холодный), нефосфорилированный, имеющий разрыв 40-мерный дуплекс  $\text{ExoA} \cdot \text{RexT}^{\text{nick}}$  в качестве кофактора и холодный фосфорилированный  $\text{pExoA} \cdot \text{RexT}^{\text{nick}}$  дуплекс как субстрат ДНК. Следует отметить, что дуплекс  $\text{pExoA} \cdot \text{RexT}^{\text{nick}}$ , содержащий 5'-фосфорилированный 21-мерный фрагмент, склонен к ковалентному АДФ-рибозилированию человеческими и растительными PARP по 5'-концевому фосфатному остатку, тогда как дуплекс  $\text{ExoA} \cdot \text{RexT}^{\text{nick}}$ , содержащий нефосфорилированный 21-мерный фрагмент не является субстратом для АДФ-рибозилирования с помощью PARP. Важно отметить, что оба ДНК-дуплекса могут активировать ауто-АДФ-рибозилирование PARP млекопитающих и растений. Чтобы избежать образования длинных полимеров ПАР, мы инкубировали 10-кратно молярный избыток дуплексов ДНК (10 мкМ) с AtPARP2 (1 мкМ) в присутствии ограниченного количества радиоактивно меченного [аденилат-<sup>32</sup>P] НАД<sup>+</sup> (1 мкМ). Мы ожидали, что в этих конкретных условиях реакции AtPARP2 и другие PARP будут способствовать МАРилированию, а не ПАРилированию белков и ДНК. PARP3 человека использовался в качестве контроля, поскольку при воздействии на дуплекс  $\text{pExoA} \cdot \text{RexT}^{\text{nick}}$  этот фермент переключает свою субстратную специфичность с ауто- на ДНК-МАРилирование [442]. Однако, если PARP3 действует на нефосфорилированный дуплекс  $\text{ExoA} \cdot \text{RexT}^{\text{nick}}$  в качестве кофактора ДНК, он переключается на ауто-МАРилирование.

Как показано на рисунке 30, человеческий PARP3, инкубированный с дуплексом  $\text{pExoA} \cdot \text{RexT}^{\text{nick}}$  и [аденилат-<sup>32</sup>P] НАД<sup>+</sup>, генерировал МАРилированный 21-мерный фрагмент  $\text{pExoA}$  (дорожка 7), который мигрировал медленнее, чем маркер размера 21-мер (дорожка 13), тогда как ДНК МАРилирование не происходило, когда PARP3 инкубировали с нефосфорилированным 40-звенным дуплексом с разрывом (дорожка 12). В то время как инкубация AtPARP2 с холодным фосфорилированным  $\text{pExoA} \cdot \text{RexT}^{\text{nick}}$  и радиоактивным НАД<sup>+</sup> приводила к образованию основной полосы в верхней

части геля, мазков и минорные полосы, мигрирующей подобно ПАРилированному 21-мерному фрагменту рЕхоА (дорожка 3). Образование основной полосы наверху геля указывает на ауто-АДФ-рибозилирование AtPARP2, тогда как появление размытого и модифицированного 21-мерного фрагмента рЕхоА указывает на ПАРилирование и МАРилирование ДНК, соответственно. В соответствии с этим обработка продуктов реакции AtPARP2 протеиназой К приводила к исчезновению основной полосы и резкому уменьшению размытости, но не к минорной полосе (дорожка 4). Как и ожидалось, обработка ДНКазой I и PARG приводила к полному исчезновению минорного МАРилированного 21-мерного фрагмента рЕхоА, но не основной полосы (дорожки 5 и 6).

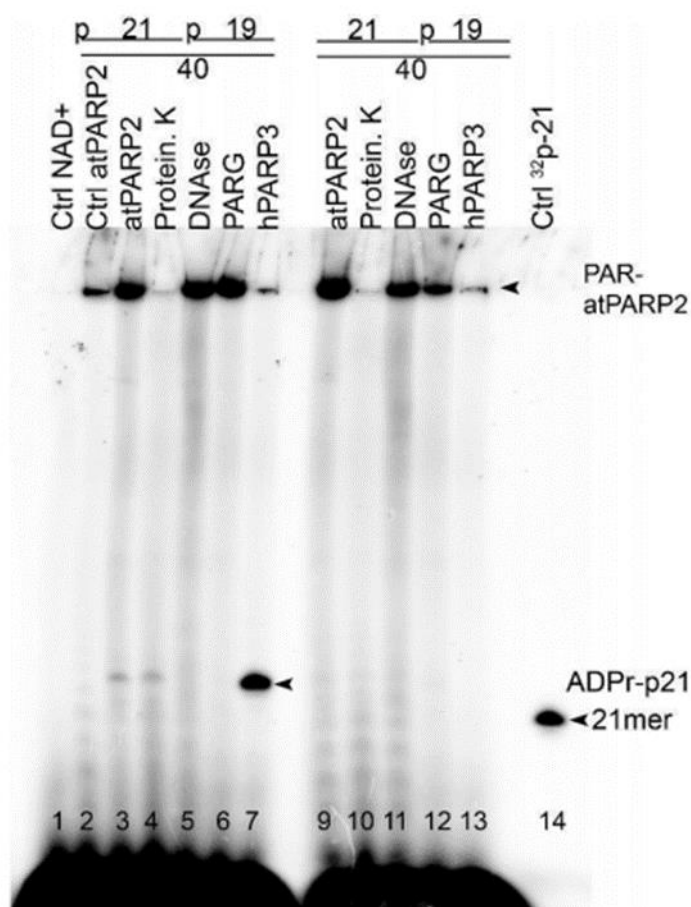


Рисунок 30 – Сравнение относительной эффективности катализируемого AtPARP2 ауто- и ДНК АДФ-рибозилирования

Эти результаты позволяют заключить, что AtPARP2 при действии на фосфорилированный разорванный дуплекс может частично переключать свою субстратную специфичность с белка на ДНК, но сохраняет свое предпочтение ауто-АДФ-рибозилированию.

Инкубация AtPARP2 с холодным нефосфорилированным дуплексом ЕхоА•RexT<sup>nick</sup> и радиоактивным НАД<sup>+</sup> привела к образованию основной полосы в верхней части геля и некоторому размазыванию, никаких дискретных полос,

мигрирующих между 21-мерным фрагментом рЕхoA и верхней частью геля, не наблюдалось (рисунок 30, дорожка 8). Обработка протеиназой K, но не обработкой ДНКазой I и PARG, приводила к полной потере основной полосы, что свидетельствует об ауто-АДФ-рибозилировании AtPARP2 (дорожки 9 против 10-11). Примечательно, что обработка PARG привела к значительному уменьшению верхней полосы и размытости, что свидетельствует о присутствии ПАРилированного белка AtPARP2 и свободного полимера ПАР (дорожка 11). Взятые вместе, эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что фрагменты ДНК, содержащие несколько близко расположенных концов фосфорилированных разрывов цепи, склонны к ковалентным модификациям с помощью белков PARP растений.

Таким образом, нами показано, что AtPARP2 растений может приобретать дополнительную субстратную специфичность при воздействии на 5'-фосфорилированный дуплекс ДНК с разрывом. В отличие от человеческого PARP3, AtPARP2 не полностью переключался с ауто- на ДНК-АДФ-рибозилирование при воздействии на свой предпочтительный ДНК-субстрат, но продолжал действовать на оба субстрата: белок и ДНК, с предпочтением первому. В используемых экспериментальных условиях нефосфорилированный дуплекс ДНК с разрывами активирует ауто-АДФ-рибозилирование, катализируемое AtPARP2, в той же степени, что и фосфорилированное. Возможно, что определенная конфигурация концов фосфорилированных разрывов цепи в ДНК-субстрате, не исследованная в этой работе, дала бы возможность более выраженного переключения с ауто- на ДНК АДФ-рибозилирования растительной AtPARP2. Важно отметить, что, подобно PARP млекопитающих, активность АДФ-рибозилирования ДНК растения AtPARP2 не ограничивается короткими дуплексными олигонуклеотидами, но также эффективна в отношении разрывов цепей в пределах высокомолекулярной линейной плазмидной ДНК, что свидетельствует о хромосомном контексте ковалентной модификации ДНК растений.

### **3.5 Анализ структуры и состава ПАР–ДНК аддуктов обработкой разными ферментами и идентификация их природы с помощью MALDI-TOF MS**

Поли (АДФ)рибозилирование, ковалентное присоединение полимера АДФ-рибозы к белкам, катализируемое PARP ферментами в ответ на повреждение ДНК, – одна из ключевых посттрансляционных модификаций белков, вовлеченная, в том числе, в регуляцию процессов репарации ДНК. Первая АДФ-рибоза связывается с аминокислотой акцепторного белка за счет 2',1''-О-гликозидные связи. В последующем каждая 2'-гидроксильная группа молекулы АДФ-рибозы служит акцептором для присоединения следующей АДФ-рибозы (рисунок 31А). Нами показано, что наиболее предпочтительным субстратом для AtPARP2 и AtPARP1 в реакции АДФ-рибозилирования ДНК является ДНК-дуплекс, содержащий фосфатную группу на 5'-конце. Соответственно, мы предположили, что концевые фосфатные остатки, могут служить в качестве

акцептора для инициации AtPARP2-зависимого удлинения АДФ-рибозной цепочки.

Чтобы проверить эту гипотезу, мы по отдельности инкубировали AtPARP1 и AtPARP2 в присутствии 5'-[<sup>32</sup>P] меченых ДНК дуплексов и НАД<sup>+</sup>, а затем обрабатывали продукты реакции различными ферментами, включая:

(i) ПАР гликогидролаза (PARG), которая гидролизует O-гликозидные (1''→2') связи рибоза-рибоза в полимерах ПАР с образованием мономерной АДФ-рибозы (рисунок 31А);

(ii) щелочная фосфатаза из кишечника телят (CIP), которая удаляет фосфатные группы с 5' и 3' концов разрывов цепи ДНК;

(iii) фосфодиэстераза 1 змеиного яда (SVPDE1), которая расщепляет ДНК в направлении 3'→5' с образованием dNMP и расщепляет пиррофосфатные связи в полимере ПАР с образованием 2'-(5'-фосфорибозил)-5'-аденозин монофосфатное (pRib-AMP) соединение в качестве конечного продукта (рисунок 31А);

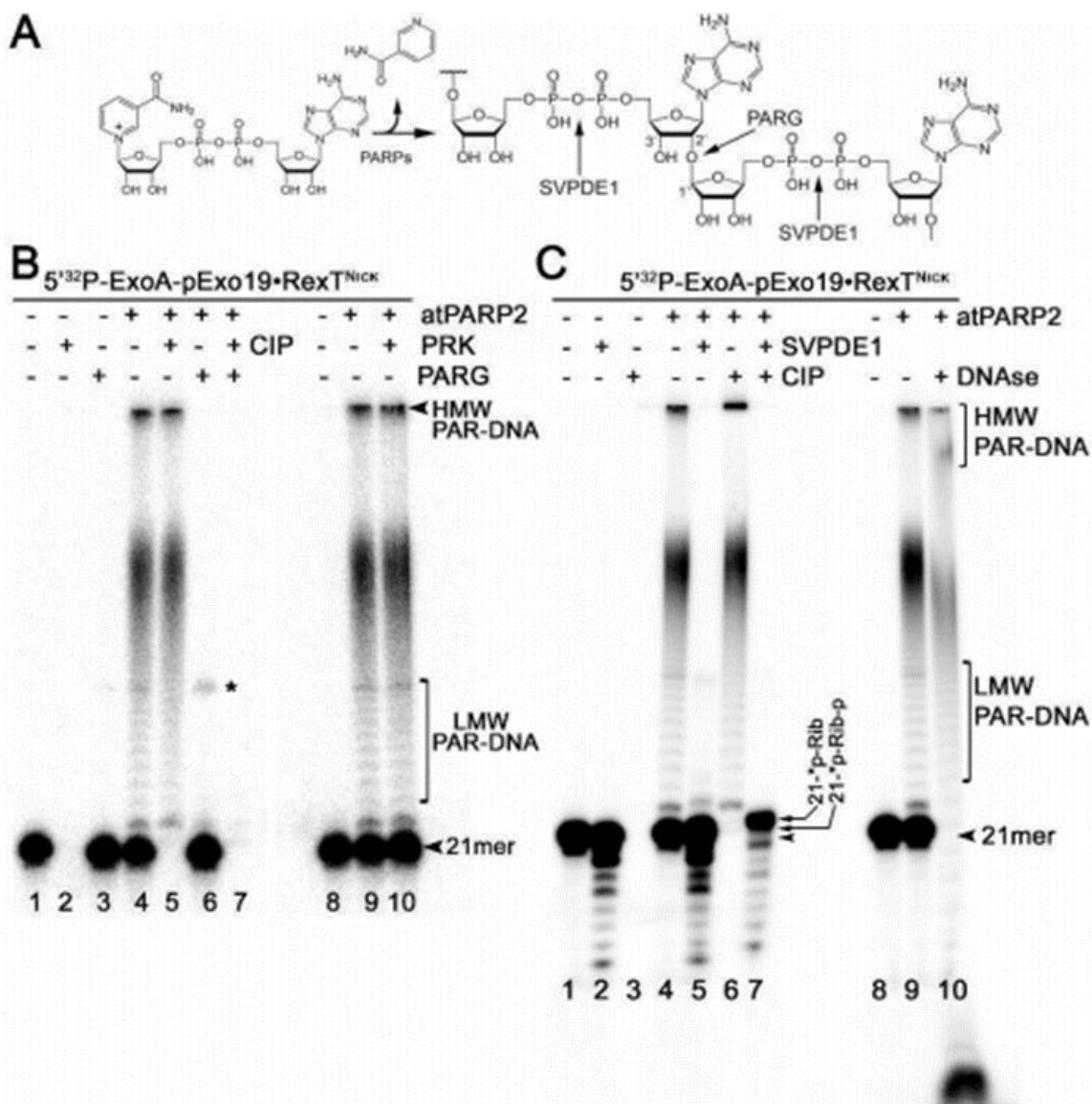
(iv) дезоксирибонуклеаза I из поджелудочной железы крупного рогатого скота (ДНКазы I), которая неспецифически расщепляет оцДНК и дцДНК с образованием ди-, три- и олигомерных фрагментов ДНК; и

(v) протеиназа К - высокоэффективная неспецифическая сериновая протеаза, которая может эффективно переваривать большинство белков.

Инкубация 5' [<sup>32</sup>P]-меченного дуплекса EhoA•RexT<sup>nick</sup> с AtPARP2 приводила к образованию LMW и HMW-комплексов ПАР-ДНК (рисунок 31В, дорожки 4 и 9). Как и ожидалось, обработка комплексов ПАР-ДНК с помощью PARG привела к полному исчезновению АДФ-рибозилированной ДНК и восстановлению исходного 21-мерного фрагмента (дорожка 6), что указывает на то, что PARG может полностью удалить фрагменты АДФ-рибозы, прикрепленные к ДНК. Однако эти комплексы ПАР-ДНК были устойчивы к протеиназе К, SDS и термообработке (дорожка 10), что позволяет предположить, что полимер ПАР не присоединен к белку AtPARP2. Действительно, обработка комплексов ПАР-ДНК ДНКазой I привела к более быстрой подвижности LMW и HMW продуктов (рисунок 31С, дорожка 10), что указывает на то, что полимеры ПАР связаны с меченым 21-мерным фрагментом. Примечательно, что CIP дефосфорилирует свободный 5' [<sup>32</sup>P]-меченный дуплекс EhoA•RexT<sup>nick</sup> (рисунок 30В, дорожка 2 и рисунок 31С, дорожка 3), но не меченные [<sup>32</sup>P] LMW и HMW аддукты ПАР-ДНК, генерируемые AtPARP2 (рисунок 31В, дорожка 5 и рисунок 30С, дорожка 6), что указывает на то, что 5'-концевой Р ПАРилированных олигонуклеотидов недоступен для фосфатазы. Более того, эффективная защита 5' [<sup>32</sup>P] групп от CIP короткими олигомерами АДФ-рибозы, присоединенными к олигонуклеотиду EhoA в LMW продуктах ПАР-ДНК (рисунок 31В, дорожка 5 и рисунок 31С, дорожка 6), предполагает, что эти 5'-фосфаты ДНК защищены ковалентной фосфодиэфирной связью между 5'Р и С1' АДФ-рибозы.

Далее для исследования выяснения присутствия пиррофосфатной связи между АДФ-рибозами, прикрепленных к ДНК, мы инкубировали AtPARP2 в присутствии 5' [<sup>32</sup>P]-меченный дуплекс EhoAρEho19•RexT<sup>nick</sup> дуплекса и НАД<sup>+</sup>,

затем 5'-[<sup>32</sup>P] меченные поли-АДФ-рибозилированные ДНК-дуплексы обработали SVPDE1 ферментом (рисунок 31С, дорожка 2). Инкубация ПАРилированного ExoA-pExo19•RexT<sup>Nick</sup> дуплекса с SVPDE1 привела к исчезновению LMW и HMW комплексов ПАР-ДНК (дорожка 5), что указывает на то, что фермент разрушает ПАР, расщепляя пирофосфатные связи в полимерной цепи.



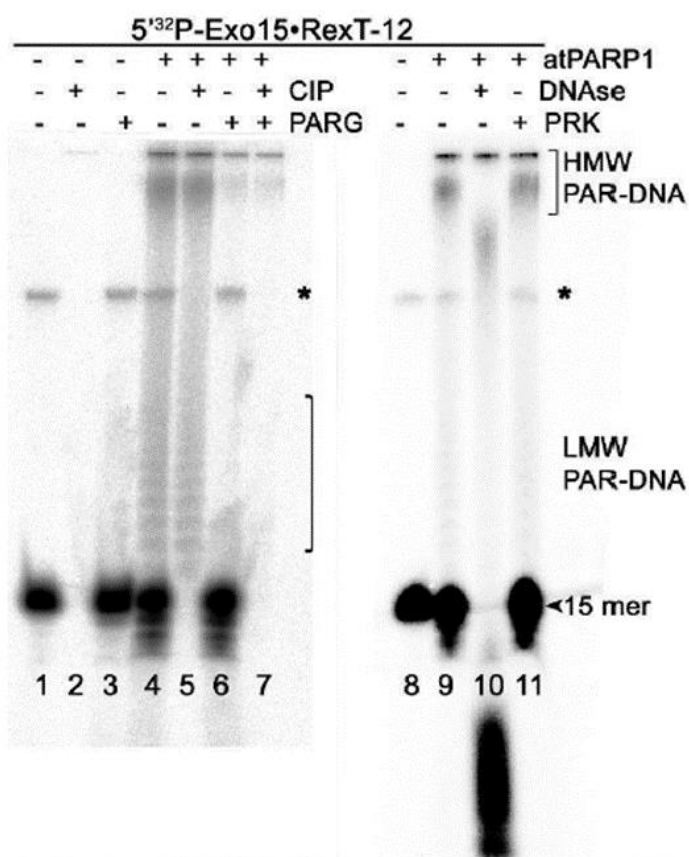
А) Графическое изображение образования полимера поли (АДФ-рибозы) и сайтов расщепления ферментами. В) Денатурирующий анализ в ПААГ продуктов расщепления, катализируемого PARG и протеиназой, 5'-[<sup>32</sup>P] меченных продуктов ПАР-ДНК. С) Денатурирующий анализ в ПААГ продуктов расщепления, катализируемого SVPDE1, CIP и ДНКазой, 5'-[<sup>32</sup>P] меченных продуктов ПАР-ДНК. Стрелки указывают LMW и HMW продукты ПАР-ДНК и 21-мерный свободный олигонуклеотид.

Рисунок 31 – Анализ продуктов ферментативного расщепления аддуктов ПАР-ДНК



Катализируемый SVPDE1 гидролиз продуктов ПАР-ДНК, меченных [<sup>32</sup>P], превращает LMW и HMW-комплексы обратно в свободный фрагмент ДНК, который мигрирует подобно свободному 21-меру (дорожка 5).

Мы предполагаем, что этот 21-мерный фрагмент, образованный SVPDE1, все еще содержит фосфорильный фрагмент, оставшийся после гидролиза последнего мономера АДФ-рибозы, связанного с концевым фосфатным остатком ДНК на 5'-конце EhoA. В соответствии с этим комбинированная обработка продуктов ПАР-ДНК, меченных 5'-[<sup>32</sup>P], SVPDE1 и CIP привела к появлению полосы (дорожка 7), которая мигрировала медленнее, чем свободный 21 мер 5'-[<sup>32</sup>P]- меченный EhoA (дорожка 1). Этот результат убедительно свидетельствует о наличии защитного фрагмента рибозы на 5' конце АДФ-рибозилированного EhoA, который остается после удаления ПАР и фосфатного остатка SVPDE1 и CIP, соответственно.



Стрелки указывают продукты LMW и HMW ПАР-ДНК и свободный 15-мерный олигонуклеотид. Звездочкой обозначен продукт неспецифического лигирования, продуцируемый НАД<sup>+</sup>-зависимой ДНК-лигазой А *E. coli*.

Рисунок 32 – Денатурирующий ПААГ анализ продуктов расщепления аддуктов ПАР-ДНК различными ферментами

Затем были исследованы структура и состав аддуктов ПАР-ДНК, генерируемых AtPARP1. Для этого меченые 5'-[<sup>32</sup>P] ПАРилированные



В результате проведения исследования было показано, что 5'-дезоксирибозофосфатные остатки в различных позициях ДНК способны образовывать основания Шиффа 5'-dRP группами, расположенными не только в разрывах цепи, но в других типах повреждений, в частности, на концах двухцепочечных разрывов с несколькими белками репарации (PARP1, PARP2, ДНК-полимераза  $\beta$ , Ku-антиген и APE1). Специфичность взаимодействия белков с этими ДНК определяется расположением 5'-dRP остатка в структуре ДНК. Предполагается возможную роль этих белков в удалении 5'-dRP групп, которые блокируют последующие стадии различных путей репарации ДНК.

Ранее было продемонстрировано, что гидролазы нуклеозид дифосфат-связанного фрагмента X (Nudix) могут действовать на свободный остаток АДФ-рибозы (и на полимер ПАР, присоединенный к белку) путем гидролиза пиррофосфатных связей [463]. Кроме того, гидролазы nudix могут расщеплять длинный полимер ПАР, прикрепленный к ДНК [264,464], здесь это свойство было использовано для дальнейшей характеристики ДНК, катализируемой АДФ-рибозилированием PARP растений. Для этого дуплексы EhoA•RexT<sup>nick</sup> и Eho15•RexT-12<sup>rec</sup>, меченные 5'-[<sup>32</sup>P], подвергали АДФ-рибозилированию с помощью AtPARP1 и AtPARP2, соответственно, и полученные комплексы ПАР-ДНК инкубировали с избыточным количеством гидролазы человеческого Nudix, NUDT16 и продукты реакции анализировали денатурирующим ПААГ.

Инкубация 5'-[<sup>32</sup>P]-меченых свободных олигонуклеотидных дуплексов с избыточным количеством NUDT16 приводила только к незначительной деградации 21-мерного олигонуклеотида, тогда как более короткий 15-мерный олигонуклеотид разлагался сильнее (рисунок 33, дорожки 2 и 9, соответственно), что позволяет предположить, что гидролаза Nudix человека обладает слабой неспецифической активностью нуклеолитического расщепления. NUDT16 полностью разрушал аддукты ПАР-ДНК и генерировал отдельные фрагменты ДНК, которые мигрировали подобно свободным 21-мерным и 15-мерным олигонуклеотидам (дорожки 5 и 12). Механизм действия NUDT16 на ПАР предполагает, что фрагмент фосфорибозила (pRib) присоединен к 5'-концевому [<sup>32</sup>P] остатку на концах ДНК (21-\*p-Rib-p и 15-\*p-Rib-p, где звездочка обозначает радиоактивный остаток <sup>32</sup>P) должен оставаться после катализируемого NUDT16 гидролиза пиррофосфатных связей АДФ-рибозной единицы, ковалентно связанной с ДНК. Как и ожидалось, обработка ДНК-олигонуклеотидов, полученных после обработки с NUDT16, с помощью СІР приводила к появлению отдельных 5'-монорибозилированных 21 и 15-мерных фрагментов ДНК (дорожки 7 и 14 соответственно), которые мигрировали медленнее, чем свободные 21 и 15-мерные олигонуклеотиды ДНК (дорожки 1 и 8 соответственно) и 5'-монофосфорибозилированные 21 и 15-мерные продукты NUDT16 (дорожки 5 и 12 соответственно). Эти результаты предполагают, что NUDT16 генерировал фрагменты 21-\*p-Rib-p и 15-\*p-Rib-p путем гидролиза ПАРилированных 21 и 15-мерных олигонуклеотидов, соответственно. После этого СІР дефосфорилировал продукты NUDT16 с образованием монорибозилированных фрагментов 21-\*p-Rib и 15-\*p-Rib, которые все еще содержат остаток <sup>32</sup>P. Примечательно, что СІР не удаляет остаток 5'-[<sup>32</sup>P] в

ПАРилированных фрагментах ДНК даже после гидролиза полимера ПАР с помощью NUDT16 (дорожки 5-12), что указывает на то, что оставшаяся часть сахара рибозы защищает 5'Р в 5'-[<sup>32</sup>P]-ЕхоА(Ехо15)-р\*-Rib олигонуклеотиде. Эти результаты дополнительно подтверждают, что PARP растений катализируют ковалентное присоединение звена АДФ-рибозы к ДНК через фосфодиэфирную связь между ДНК 5'Р и С1' АДФ-рибозы.

В приведенных выше данных предполагаемый молекулярный механизм ПАРилирования ДНК, катализируемого AtPARP арабидопсиса, выявляется из рисунков миграции фрагментов ДНК с мечеными концами в денатурирующем ПААГ. Чтобы дополнительно обосновать механизм действия ферментов AtPARP на дуплексные олигонуклеотиды, мы охарактеризовали природу аддуктов ПАР-ДНК с помощью MALDI-TOF MS-анализа продуктов ПАРилированных ДНК.

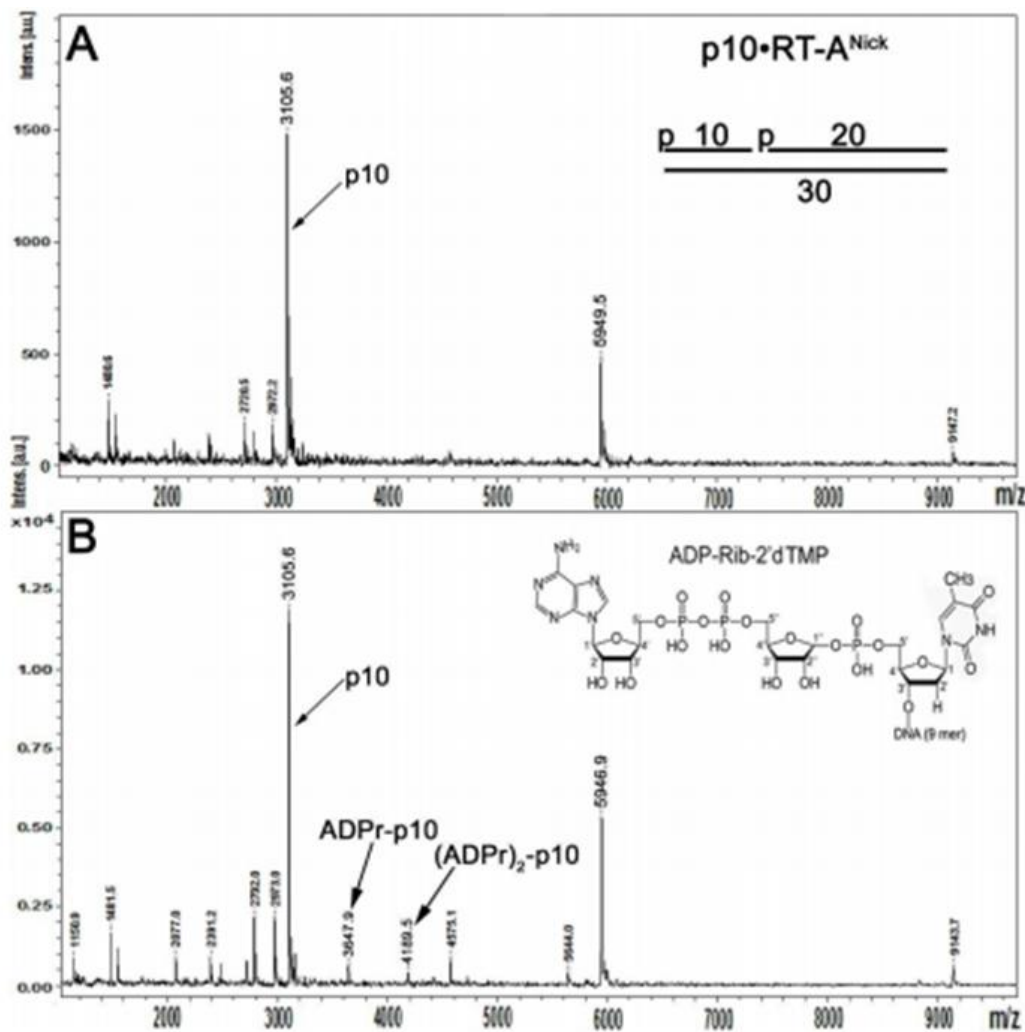


Стрелка указывает свободный 10-мерный олигонуклеотид.

Рисунок 34 – Подготовка продуктов ПАР-ДНК катализируемого AtPARP2 для анализа MALDI-TOF MS

Для этой цели как наиболее эффективный фермент был выбран AtPARP2 и сконструирован холодный нерадиоактивный 30-мерный дуплексный олигонуклеотид (называемый здесь р10•RT-A<sup>nick</sup> или S18), состоящий из 30-

мерной (RT-A) матричной цепи и двух 5'-фосфорилированных комплементарных цепей: 10-мер (p10) и 19-мер (p19) в качестве ДНК-субстрата (таблица 4). Следует отметить, что при воздействии на  $p10 \cdot RT-A^{nick}$  AtPARP2 генерирует в основном LMW продукты ПАР-ДНК, которые мигрируют как лестницы ДНК в денатурирующем геле, что указывает на присутствие коротких олигомеров АДФ-рибозы (1–20 единиц), связанных с 10-мерным фрагментом (рисунок 34).



(A) MALDI-TOF спектр контрольного ложно обработанного холодного 5'-фосфорилированного дуплекса  $RT^{nick}$ ; (B) MALDI-TOF спектр неочищенных продуктов реакции AtPARP2, дополненных очищенным 10-мерным фрагментом p-10-RT-поли-АДФ-рибозы в качестве маркера размера.

Рисунок 35 – MALDI-TOF MS-анализ моно- и поли-АДФ-рибозилированных олигонуклеотидов, генерируемых AtPARP2.

Кроме того, короткие низкомолекулярные олигонуклеотиды (такие как 10 мер в  $p10 \cdot RT-A^{nick}$ ) в целом имеют более высокую вероятность обнаружения с помощью MALDI-TOF MS по сравнению с их длинными аналогами

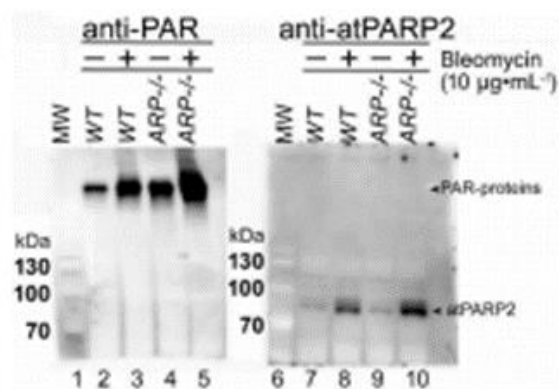
олигонуклеотидов с высокой молекулярной массой (такими как 21 мер в  $\text{ExoA} \cdot \text{RexT}^{\text{nick}}$ ) [444] таким образом, использование  $\text{p10} \cdot \text{RT-A}^{\text{nick}}$  позволило нам значительно повысить чувствительность масс-спектрометрии.

MALDI TOF-анализ ложно обработанного дуплекса  $\text{p10} \cdot \text{RT-A}^{\text{nick}}$  показал наличие двух основных пиков при  $[\text{M-H}]^- = 3105,6$  Да и  $[\text{M-H}]^- = 5949,5$  Да, соответствующих фосфорилированным 10-мерным и 20-мерным олигонуклеотидам, а также как минорный пик, соответствующий 30-мерному олигонуклеотиду RT-A (рисунок 35А). Анализ масс-спектров AtPARP2 АДФ-рибозилированного дуплексного олигонуклеотида  $\text{p10} \cdot \text{RT-A}^{\text{nick}}$  показал два монозарядных пика при  $[\text{M-H}]^- = 3647,9$  Да и 4189,5 Да, соответствующих 5'-фосфорилированным 10-мерам, содержащим один и два остатка АДФ-рибозы, соответственно (расчетная масса, 3647 и 4187 Да) (рисунок 35В). Эти результаты показывают, что AtPARP2 катализирует ковалентное присоединение остатков АДФ-рибозы к 5'-фосфорилированному 10-мерному ( $\text{p10}$ ) олигонуклеотиду. В заключение эти данные хорошо согласуются с данными, полученными при анализе продуктов ПАР-ДНК на денатурирующем ПААГ (рисунки 31-33), и однозначно подтверждают образование ковалентных аддуктов ПАР-ДНК растительными PARP.

Таким образом, биохимический анализ структуры и состава аддуктов ПАР-ДНК, генерируемых PARP растений, показал, что, как и их аналоги у млекопитающих, AtPARP используют 5'-концевые фосфаты ДНК в качестве акцепторного остатка для ковалентного присоединения звена АДФ-рибозы для синтеза поли-АДФ-рибозы. Мы также подтвердили молекулярный механизм растительного AtPARP, катализирующего АДФ-рибозилирование ДНК, путем идентификации продуктов деградации ПАР-ДНК с помощью Nudix, NUDT16 гидролазы человека. NUDT16 расщепляет полимер ПАР, присоединенный к меченному  $[\text{}^{32}\text{P}]$  олигонуклеотидному дуплексу, и генерирует рибозилированный фрагмент ДНК, в котором концевой фосфатный остаток защищен от дефосфорилирования посредством CIP. Эти результаты показывают, что AtPARP переносят звено АДФ-рибозы к концевому фосфатному остатку ДНК на концах разрыва цепи для образования фосфодиэфирной связи между 5'P и C1' ДНК АДФ-рибозы. Предполагаемая молекулярная структура аддукта АДФ-рибоза-р-ДНК была дополнительно подтверждена с помощью MALDI-TOF MS-анализа АДФ-рибозилированных фрагментов ДНК. Масс-спектры AtPARP2 зависимого АДФ-рибозилированного дуплексного олигонуклеотида  $\text{p10} \cdot \text{RT-A}^{\text{nick}}$  показали присутствие двух новых пиков, соответствующих 5'-фосфорилированным 10-мерам, содержащим один и два остатка АДФ-рибозы. Следовательно, данные масс-спектрометрии и биохимический анализ демонстрируют, что структура ковалентных аддуктов ПАР-ДНК, генерируемых растительными AtPARP, такая же, как и структура, синтезируемая ферментами PARP млекопитающих.

### 3.6 Аддукты ПАР-ДНК в геномной ДНК растений после генотоксической обработки

Для измерения АДФ-рибозилирования *in vivo* внеклеточные экстракты и клеточная ДНК из *Arabidopsis* были проанализированы иммуноблоттингом с использованием поликлональных кроличьих антител против AtPARP2 и коммерческих моноклональных антител против поли-АДФ-рибозы. PARP арабидопсиса активировали воздействием на растения блеомицина (10 мкг/мл<sup>-1</sup>). Для измерения АДФ-рибозилирования белка растворимые бесклеточные экстракты из *A. thaliana* дикого типа (WT) и мутанта *agr*<sup>-/-</sup> (АР-эндонуклеаза-дефицитный) разделяли на геле SDS ПААГ, а затем проводили вестерн-блоттинг с использованием антител против поли-АДФ-рибозы и AtPARP2 (рисунок 36). Антитело против поли-АДФ-рибозы обнаружило слабую активность ПАРилирования у необработанных растений дикого типа, которая сильно увеличивалась после воздействия на растения блеомицина (дорожки 1 и 2, соответственно), что позволяет предположить, что разрывы цепи ДНК, индуцированные блеомицином, активируют PARP катализированное АДФ-рибозилирование. Интересно, что уровень ПАРилирования в необработанных мутантных растениях *agr*<sup>-/-</sup> (дорожка 3) был значительно выше по сравнению с диким типом (дорожка 1), что указывает на накопление нерепарированных разрывов цепей ДНК в отсутствие основной АР-эндонуклеазы растения и активации сигнального пути повреждения ДНК. Как и ожидалось, воздействие блеомицина на мутантные растения *agr*<sup>-/-</sup> привело к значительно более высокому уровню ПАРилирования (дорожка 4) по сравнению с контрольными необработанными *agr*<sup>-/-</sup> растениями (дорожка 3) и даже обработанными растениями дикого типа (дорожка 2) предполагая, что АР участвует в репарации разрывов цепи ДНК, вызванных блеомицином.



Стрелки указывают на ПАРилированные белки и на белок AtPARP2.

Рисунок 36 – Вестерн-блот-анализ АДФ-рибозилирования белка в экстрактах растений дикого типа и мутантных растений

Вестерн-блоттинг с использованием антител против AtPARP2 показал индуцированную блеомицином сверхэкспрессию белка AtPARP2 в WT и мутантных растениях *agr<sup>-/-</sup>* (дорожки 8 и 10) по сравнению с необработанными контролями (дорожки 7 и 9). Опять же, сверхэкспрессия AtPARP2 в ответ на повреждение ДНК была значительно выше у мутантных *agr<sup>-/-</sup>* растений по сравнению с дикими растениями (дорожка 10 против 8). В целом эти результаты предполагают, что в ответ на повреждение ДНК растения активируют АДФ-рибозилирование белка и сверхэкспрессируют белок AtPARP2.

В последующих экспериментах для изучения АДФ-рибозилирования геномной ДНК в живых клетках, из растений дикого типа были выделены геномная ДНК (гДНК) и AtPARP-дефицитных растений, обработанные или не обработанные блеомицином, и исследованы на наличие поли(АДФ-рибозы). Геномную ДНК повторно очищали, включая обширную обработку РНКазой А и протеиназой К с последующей экстракцией фенолом/хлороформом, а затем анализировали методом дот-блоттинга с использованием моноклонального антитела против ПАР. Иммуно дот-блоттинг 0,9 и 0,6 мкг гДНК, выделенной из контрольных необработанных WT, *atPARP1<sup>-/-</sup>*, *atPARP2<sup>-/-</sup>* и двойного мутанта *atPARP1<sup>-/-</sup> atPARP2<sup>-/-</sup>* выявил присутствие ПАР во всех образцах (рисунок 37). Очищенная гДНК из растений, обработанных блеомицином, показала повышенное присутствие ПАР по сравнению с необработанными контролями. Тем не менее, присутствие гДНК-ассоциированного ПАР в контрольном необработанном WT и мутантном *atPARP<sup>-/-</sup>* растении предполагает две возможности: (i) загрязнение очищенной гДНК ПАРилированными пептидами, которые прочно связаны или перекрестно связаны с ДНК и обладают высокой устойчивостью к обработке протеиназой К или свободными олигомерами АДФ-рибозы, которые могут существовать в нековалентных переплетенных комплексах с гДНК; и (ii) перекрестная реактивность или неспецифическое распознавание некоторых структур ДНК, присутствующих в растительной гДНК, моноклональными антителами против поли (АДФ-рибозы). Взятые вместе, эти результаты демонстрируют, что поли (АДФ-рибозы)-специфические антитела, хотя и хороши для обнаружения ПАРилированных белков, имеют очень ограниченное применение для обнаружения ковалентных аддуктов ПАР-ДНК, поскольку они не способны специфически распознавать нуклеотид ДНК, связанный с АДФ-рибозой.

Таким образом, для обнаружения АДФ-рибозилированной ДНК в живых клетках необходимы новые типы антител с высокой специфичностью, которые могут распознавать как АДФ-рибозу, так и нуклеотид.



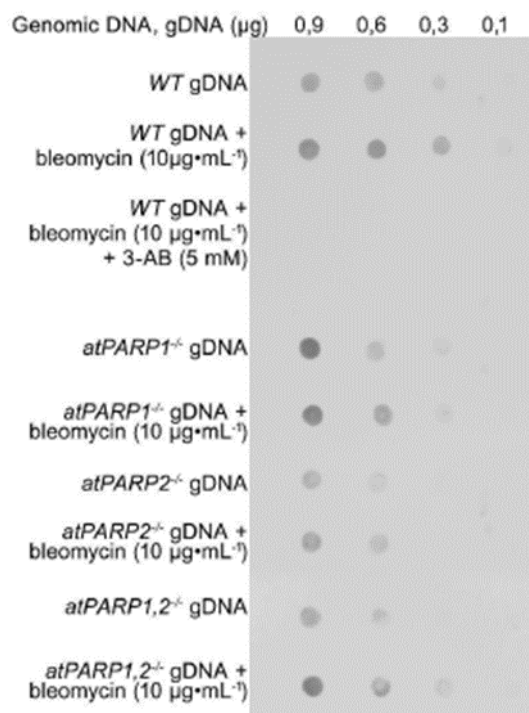


Рисунок 37 – Обнаружение аддуктов ПАР-ДНК в геномной ДНК, экстрагированной из 14-дневных проростков, в присутствии и в отсутствие генотоксического агента

Результаты наших исследований показали, что коммерческие моноклональные антитела против ПАР распознают гДНК, выделенную как из контрольных необработанных, так и из обработанных блеомицином растений, а также растений дикого типа и растений мутантными по генам PАРР (рисунок 37), что позволяет предположить, что подход, использованный в настоящем исследовании отсутствует достаточная специфичность для обнаружения аддуктов ПАР-ДНК в гДНК. Требуется новые более совершенные инструменты, чтобы надежно отличить АДФ-рибозилированные продукты ДНК от АДФ-рибозилированных белков и свободных полимеров поли-АДФ-рибозы в живых клетках.

## ВЫВОДЫ

1. Установлено, что продуктом экспрессии генов AtPARP1, AtPARP2 и AtPARP3 являются глобулярные белки с молекулярной массой 111,2 кДа, 70,2 кДа, и 91,5 кДа соответственно.

2. Впервые показано, что очищенные рекомбинантные AtPARP1 и AtPARP2 *A. thaliana* превращают дуплексы олигонуклеотидов ДНК в высокомолекулярные продукты в присутствии НАД<sup>+</sup> за счет АДФ-рибозил трансферазной активности; AtPARP2 обладает более высокой активностью АДФ-рибозилирования по сравнению с AtPARP1; установлена зависимость продуктов АДФ-рибозилирования ДНК от наличия и концентрации НАД<sup>+</sup>. Впервые продемонстрировано, что эффективность катализируемого AtPARP1 и AtPARP2 образования продуктов ПАР-ДНК сильно зависят от структуры ДНК дуплекса. AtPARP1 предпочитительно модифицирует дуплексы с выступающей цепью, в меньшей степени, ДНК дуплексы с разрывом и брешью, тогда как AtPARP2 предпочитает дуплексы с разрывом и брешью по сравнению с ДНК субстратом с выступающей цепью. Впервые проиллюстрировано, что AtPARP3 не проявляет типичный для PARP ферментов АДФ-рибозилирующую активность, несмотря на его структурное сходство с PARP3 и PARP1 млекопитающих. Удаление аутоингибиторного и N-концевого BRCT-доменов для конститутивной гиперактивации AtPARP3 не приводило к восстановлению АДФ-рибозил трансферазной активности, что предполагает, что AtPARP3 у растений мог эволюционировать для выполнения другой функций.

3. Установлено, что PARP человека и растений имеют общую консервативную каталитическую триаду Н-У-Е: каталитическая триада PARP1 человека (H862-Y896-E988) соответствует таковой для AtPARP1 (H833-Y867-E960) и AtPARP2 (H486-Y520-E614) *Arabidopsis thaliana*. Полученные с помощью сайт-направленного мутагенеза мутантные формы ферментов AtPARP1<sup>E960K, E960Q</sup> и AtPARP2<sup>E614K</sup> проявили сильно сниженную поли (АДФ)-рибозилирующую ДНК активность, как и соответствующие мутантные варианты фермента млекопитающих. Полученные неактивные формы ферментов растений проявили активность МАРилирования ДНК, что указывает на необходимость высококонсервативного остатка глутаминовой кислоты в каталитической триаде AtPARP1 и AtPARP2 для проявления поли (АДФ)-рибозилирующей ДНК активности.

4. Биохимический анализ структуры и состава аддуктов ПАР-ДНК, генерируемых AtPARP1 и AtPARP2, показал, что, как и их аналоги у млекопитающих, AtPARP ферменты используют 5'-концевые фосфаты ДНК в качестве акцепторного остатка для ковалентного присоединения звена АДФ-рибозы для синтеза поли(АДФ-рибозы).

5. Выявлен молекулярный механизм AtPARP катализируемого АДФ-рибозилирования ДНК, путем идентификации продуктов деградации ПАР-ДНК с помощью Nudix, NUDT16 гидролазы человека. Показано, что AtPARP ферменты переносят звено АДФ-рибозы к концевому фосфатному остатку ДНК на концах разрыва цепи для образования фосфодиэфирной связи между 5'Р ДНК

и C1' АДФ-рибозы. Предполагаемая молекулярная структура аддукта АДФ-рибоза-р-ДНК была дополнительно подтверждена с помощью MALDI-TOF MS-анализа АДФ-рибозилированных фрагментов ДНК.

6. Коммерческие моноклональные антитела против ПАР распознают гДНК, выделенную как из контрольных необработанных, так и из обработанных блеомицином растений, а также растений дикого типа и растений мутантными по генам PARP.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Foyer, C. H. Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria / C. H. Foyer, G. Noctor // *Physiologia Plantarum*. – 2003. – Vol. 119, N 3. – P. 355–364. – DOI: 10.1034/j.1399-3054.2003.00223.x
2. Weitzman, M. D. What's the damage? The impact of pathogens on pathways that maintain host genome integrity / M. D. Weitzman, J. B. Weitzman // *Cell Host & Microbe*. – 2014. – Vol. 15, N 3. – P. 283–294. – DOI: 10.1016/j.chom.2014.02.010
3. Papamichos-Chronakis, M. Chromatin and the genome integrity network / M. Papamichos-Chronakis, C. L. Peterson // *Nature Reviews. Genetics*. – 2013. – Vol. 14, N 1. – P. 62–75. – DOI: 10.1038/nrg3345
4. Ermolaeva, M. A. Systemic DNA damage responses: organismal adaptations to genome instability / M. A. Ermolaeva, B. Schumacher // *Trends in genetics: TIG*. – 2014. – Vol. 30, N 3. – P. 95–102. – DOI: 10.1016/j.tig.2013.12.001
5. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule / V. Schreiber, F. Dantzer, J. Ame, G. Murcia // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. – 2006. – Vol. 7, N 7. – P. 517–528. – DOI: 10.1038/nrm1963
6. Kim, M. Y. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP-1: 'PAR-laying' NAD<sup>+</sup> into a nuclear signal / M. Y. Kim, T. Zhang, W. L. Kraus // *Genes & Development*. – 2005. – Vol. 19, N 17. – P. 1951–1967. – DOI: 10.1101/gad.1331805
7. Luo, X. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1 / X. Luo, W. L. Kraus // *Genes & Development*. – 2012. – Vol. 26, N 5. – P. 417–432. – DOI: 10.1101/gad.183509.111
8. Woodhouse, B. C. Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery / B. C. Woodhouse, G. L. Dianov // *DNA repair*. – 2008. – Vol. 7, N 7. – P. 1077–1086. – DOI: 10.1016/j.dnarep.2008.03.009
9. Briggs, A. G. Poly(ADP-ribosyl)ation in plants / A. G. Briggs, A. F. Bent // *Trends in Plant Science*. – 2011. – Vol. 16, N 7. – P. 372–380. – DOI: 10.1016/j.tplants.2011.03.008
10. Lamb, R. S. Functions of the poly(ADP-ribose) polymerase superfamily in plants / R. S. Lamb, M. Citarelli, S. Teotia // *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. – 2012. – Vol. 69, N 2. – P. 175–189. – DOI: 10.1007/s00018-011-0793-4
11. Kraus, W. L. PARP-1 and gene regulation: progress and puzzles / W. L. Kraus, M. O. Hottiger // *Molecular Aspects of Medicine*. – 2013. – Vol. 34, N 6. – P. 1109–1123. – DOI: 10.1016/j.mam.2013.01.005
12. McKinnon, P. J. DNA strand break repair and human genetic disease / P. J. McKinnon, K. W. Caldecott // *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. – 2007. – Vol. 8. – P. 37–55. – DOI: 10.1146/annurev.genom.7.080505.115648
13. Murcia, G. Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor / G. Murcia, J. Ménissier de Murcia // *Trends in Biochemical Sciences*. – 1994. – Vol. 19, N 4. – P. 172–176. – DOI: 10.1016/0968-0004(94)90280-1
14. Mechanism of the inhibition of Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation / Y. Tanaka, K. Yoshihara, A. Itaya, T. Kamiya, S. S. Koide // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1984. – Vol. 259, N 10. – P. 6579–6585
15. Satoh, M. S. Dual function for poly(ADP-ribose) synthesis in response to DNA strand breakage / M. S. Satoh, G. G. Poirier, T. Lindahl // *Biochemistry*. – 1994. – Vol. 33, N 23. – P. 7099–7106. – DOI: 10.1021/bi00189a012
16. Hinz, J. M. Rotational dynamics of DNA on the nucleosome surface markedly impact accessibility to a DNA repair enzyme / J. M. Hinz, Y. Rodriguez, M. J. Smerdon // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Vol. 107, N 10. – P. 4646–4651. – DOI: 10.1073/pnas.0914443107
17. Nucleosome disruption by DNA ligase III-XRCC1 promotes efficient base excision repair / I. D. Odell, J. Barbour, D. L. Murphy, J. A. Della-Maria, J. B. Sweasy, A. E. Tomkinson, S. S. Wallace, D. S. Pederson // *Molecular and Cellular Biology*. – 2011. – Vol. 31, N 22. – P. 4623–4632. – DOI: 10.1128/MCB.05715-11
18. Regulation of poly(ADP-ribose) metabolism by poly(ADP-ribose) glycohydrolase: where and when? / M. -. Bonicalzi, J. -. Haince, A. Droit, G. G. Poirier // *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. – 2005. – Vol. 62, N 7-8. – P. 739–750. – DOI: 10.1007/s00018-004-4505-1
19. The 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase ARH3 hydrolyzes O-acetyl-ADP-ribose, a product of the Sir2 family of acetyl-histone deacetylases / T. Ono, A. Kasamatsu, S. Oka, J. Moss // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103, N 45. – P. 16687–16691. – DOI: 10.1073/pnas.0607911103

20. Deficiency of terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease / R. Sharifi, R. Morra, C. D. Appel, M. Tallis, B. Chioza, G. Jankevicius, M. A. Simpson, I. Matic, E. Ozkan, B. Golia, M. J. Schellenberg, R. Weston, J. G. Williams, M. N. Rossi, H. Galehdari, J. Krahn, A. Wan, R. C. Trembath, A. H. Crosby, D. Ahel, R. Hay, A. G. Ladurner, G. Timinszky, R. S. Williams, I. Ahel // *The EMBO journal*. – 2013. – Vol. 32, N 9. – P. 1225–1237. – DOI: 10.1038/emboj.2013.51
21. Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality / D. W. Koh, A. M. Lawler, M. F. Poitras, M. Sasaki, S. Wattler, M. C. Nehls, T. Stöger, G. G. Poirier, V. L. Dawson, T. M. Dawson // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101, N 51. – P. 17699–17704. – DOI: 10.1073/pnas.0406182101
22. Radiation-induced mitotic catastrophe in PARG-deficient cells / J. Amé, E. Fouquerel, L. R. Gauthier, D. Biard, F. D. Boussin, F. Dantzer, G. Murcia, V. Schreiber // *Journal of Cell Science*. – 2009. – Vol. 122, N Pt 12. – P. 1990–2002. – DOI: 10.1242/jcs.039115
23. Plant PARPs, PARGs and PARP-like Proteins / J. P. Vainonen, A. Shapiguzov, A. Vaattovaara, J. Kangasjarvi // *Current Protein and Peptide Science*. – 2016. – Vol. 17, N 7. – P. 713–723. – DOI: 10.2174/1389203717666160419144721
24. Poly(ADP-ribose) polymerase in plants affects energy homeostasis, cell death and stress tolerance / M. De Block, C. Verduyn, D. De Brouwer, M. Cornelissen // *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. – 2005. – Vol. 41, N 1. – P. 95–106. – DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.02277.x
25. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs / Y. Pommier, E. Leo, H. Zhang, C. Marchand // *Chemistry & Biology*. – 2010. – Vol. 17, N 5. – P. 421–433. – DOI: 10.1016/j.chembiol.2010.04.012
26. Bjelland, S. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation / S. Bjelland, E. Seeberg // *Mutation Research*. – 2003. – Vol. 531, N 1-2. – P. 37–80. – DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2003.07.002
27. Oxidative damage to DNA: formation, measurement and biochemical features / J. Cadet, T. Douki, D. Gasparutto, J. Ravanat // *Mutation Research*. – 2003. – Vol. 531, N 1-2. – P. 5–23. – DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2003.09.001
28. Presence of base excision repair enzymes in the wheat aleurone and their activation in cells undergoing programmed cell death / A. K. Bissenbaev, A. A. Ishchenko, S. M. Taipakova, M. K. Saparbaev // *Plant physiology and biochemistry: PPB*. – 2011. – Vol. 49, N 10. – P. 1155–1164. – DOI: 10.1016/j.plaphy.2011.07.017
29. Cloning and characterization of a wheat homologue of apurinic/aprimidinic endonuclease Ape1L / B. Joldybayeva, P. Prorok, I. R. Grin, D. O. Zharkov, A. A. Ishenko, B. Tudek, A. K. Bissenbaev, M. Saparbaev // *PloS One*. – 2014. – Vol. 9, N 3. – P. e92963. – DOI: 10.1371/journal.pone.0092963
30. The major Arabidopsis thaliana apurinic/aprimidinic endonuclease, ARP is involved in the plant nucleotide incision repair pathway / Z. Akishev, S. Taipakova, B. Joldybayeva, C. Zutterling, I. Smekenov, A. A. Ishchenko, D. O. Zharkov, A. K. Bissenbaev, M. Saparbaev // *DNA Repair*. – 2016. – Vol. 48. – P. 30–42. – DOI: 10.1016/j.dnarep.2016.10.009
31. Poly(ADP-ribose) polymerases covalently modify strand break termini in DNA fragments in vitro / I. Talhaoui, N. A. Lebedeva, G. Zarkovic, C. Saint-Pierre, M. M. Kutuzov, M. V. Sukhanova, B. T. Matkarimov, D. Gasparutto, M. K. Saparbaev, O. I. Lavrik, A. A. Ishchenko // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44, N 19. – P. 9279–9295. – DOI: 10.1093/nar/gkw675
32. Berger, F. The new life of a centenarian: signalling functions of NAD(P) / F. Berger, M. H. Ramírez-Hernández, M. Ziegler // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2004. – Vol. 29, N 3. – P. 111–118. – DOI: 10.1016/j.tibs.2004.01.007
33. Britt, A. B. Repair of DNA damage induced by ultraviolet radiation / A. B. Britt // *Plant Physiology*. – 1995. – Vol. 108, N 3. – P. 891–896. – DOI: 10.1104/pp.108.3.891
34. Polyn, S. Cell cycle entry, maintenance, and exit during plant development / S. Polyn, A. Willems, L. De Veylder // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2015. – Vol. 23. – P. 1–7. – DOI: 10.1016/j.pbi.2014.09.012
35. Bray, C. M. DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity / C. M. Bray, C. E. West // *The New Phytologist*. – 2005. – Vol. 168, N 3. – P. 511–528. – DOI: 10.1111/j.1469-8137.2005.01548.x
36. Yoshiyama, K. O. DNA damage response in plants: conserved and variable response compared to animals / K. O. Yoshiyama, K. Sakaguchi, S. Kimura // *Biology*. – 2013. – Vol. 2, N 4. – P. 1338–1356. – DOI: 10.3390/biology2041338
37. Britt, A. B. Molecular genetics of DNA repair in higher plants / A. B. Britt // *Trends in Plant Science*. – 1999. – Vol. 4, N 1. – P. 20–25. – DOI: 10.1016/S1360-1385(98)01355-7

38. Li, S. Temperature-dependent formation and photorepair of DNA damage induced by UV-B radiation in suspension-cultured tobacco cells / S. Li, M. Paulsson, L. O. Björn // *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology.* – 2002. – Vol. 66, N 1. – P. 67–72. – DOI: 10.1016/s1011-1344(01)00277-9
39. Boyko, A. Homologous recombination in plants is temperature and day-length dependent / A. Boyko, J. Filkowski, I. Kovalchuk // *Mutation Research.* – 2005. – Vol. 572, N 1-2. – P. 73–83. – DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2004.12.011
40. Regulation of Ku gene promoters in Arabidopsis by hormones and stress / W. Chang, Y. Wang, P. Liu, Y. Tsai, L. Kong, C. Lin, C. Yang, R. Pan // *Functional plant biology: FPB.* – 2008. – Vol. 35, N 4. – P. 265–280. – DOI: 10.1071/FP07249
41. Lindahl, T. Repair of endogenous DNA damage / T. Lindahl, D. E. Barnes // *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology.* – 2000. – Vol. 65. – P. 127–133. – DOI: 10.1101/sqb.2000.65.127
42. Hoeijmakers, J. H. J. DNA damage, aging, and cancer / J. H. J. Hoeijmakers // *The New England Journal of Medicine.* – 2009. – Vol. 361, N 15. – P. 1475–1485. – DOI: 10.1056/NEJMra0804615
43. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species in peroxisomes. Production, scavenging, and role in cell signaling / L. A. Río, L. M. Sandalio, F. J. Corpas, J. M. Palma, J. B. Barroso // *Plant Physiology.* – 2006. – Vol. 141, N 2. – P. 330–335. – DOI: 10.1104/pp.106.078204
44. Asada, K. Production and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts and their functions / K. Asada // *Plant Physiology.* – 2006. – Vol. 141, N 2. – P. 391–396. – DOI: 10.1104/pp.106.082040
45. Maxwell, D. P. The alternative oxidase lowers mitochondrial reactive oxygen production in plant cells / D. P. Maxwell, Y. Wang, L. McIntosh // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 1999. – Vol. 96, N 14. – P. 8271–8276. – DOI: 10.1073/pnas.96.14.8271
46. Apel, K. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction / K. Apel, H. Hirt // *Annual Review of Plant Biology.* – 2004. – Vol. 55. – P. 373–399. – DOI: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701
47. Mehlhorn, H. Electron spin resonance evidence for the formation of free radicals in plants exposed to ozone / H. Mehlhorn, B. J. Tabner, A. R. Wellburn // *Physiologia Plantarum.* – 1990. – Vol. 79, N 2. – P. 377–383. – DOI: 10.1111/j.1399-3054.1990.tb06756.x
48. Landry, L. G. Arabidopsis mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage / L. G. Landry, C. C. Chapple, R. L. Last // *Plant Physiology.* – 1995. – Vol. 109, N 4. – P. 1159–1166. – DOI: 10.1104/pp.109.4.1159
49. Ward, J. F. DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability / J. F. Ward // *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* – 1988. – Vol. 35. – P. 95–125. – DOI: 10.1016/s0079-6603(08)60611-x
50. Cheeseman, J. M. Hydrogen peroxide concentrations in leaves under natural conditions / J. M. Cheeseman // *Journal of Experimental Botany.* – 2006. – Vol. 57, N 10. – P. 2435–2444. – DOI: 10.1093/jxb/erl004
51. Bohnson Van L. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts / Van L. Bohnson A. C. Robertson // *Proceedings of the Royal Society of London. Series A - Mathematical and Physical Sciences.* – 1934. – Vol. 147, N 861. – P. 332–351. – DOI: 10.1098/rspa.1934.0221.
52. Hutchinson, F. The distance that a radical formed by ionizing radiation can diffuse in a yeast cell / F. Hutchinson // *Radiation Research.* – 1957. – Vol. 7, N 5. – P. 473–483.
53. Antioxidants in Higher Plants / R. G. Alscher, C. H. Foyer, J. L. Hess, N. G. Lewis, K. E. Pallett, A. J. Young, W. W. Adams, III, B. Demmig-Adams. – Boca Raton : CRC Press, 2017. – 192 p.
54. Conklin, P. L. Environmental stress sensitivity of an ascorbic acid-deficient Arabidopsis mutant / P. L. Conklin, E. H. Williams, R. L. Last // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* – 1996. – Vol. 93, N 18. – P. 9970–9974. – DOI: 10.1073/pnas.93.18.9970
55. Furlong, E. A. Production of dihydrothymidine stereoisomers in DNA by gamma-irradiation / E. A. Furlong, T. J. Jorgensen, W. D. Henner // *Biochemistry.* – 1986. – Vol. 25, N 15. – P. 4344–4349. – DOI: 10.1021/bi00363a025
56. Radiation-induced hydroxylation of thymine promoted by electron-affinic compounds / S. Nishimoto, H. Ide, T. Wada, T. Kagiya // *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine.* – 1983. – Vol. 44, N 6. – P. 585–600. – DOI: 10.1080/09553008314551651
57. Téoule, R. Radiation-induced DNA damage and its repair / R. Téoule // *International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry, and Medicine.* – 1987. – Vol. 51, N 4. – P. 573–589. – DOI: 10.1080/09553008414552111

58. Dizdaroglu, M. Substrate specificity of the Escherichia coli endonuclease III: excision of thymine- and cytosine-derived lesions in DNA produced by radiation-generated free radicals / M. Dizdaroglu, J. Laval, S. Boiteux // *Biochemistry*. – 1993. – Vol. 32, N 45. – P. 12105–12111. – DOI: 10.1021/bi00096a022
59. Steenken, S. How Easily Oxidizable Is DNA? One-Electron Reduction Potentials of Adenosine and Guanosine Radicals in Aqueous Solution / S. Steenken, S. V. Jovanovic // *Journal of the American Chemical Society*. – 1997. – Vol. 119, N 3. – P. 617–618. – DOI: 10.1021/ja962255b
60. Cadet, J. Oxidatively generated damage to the guanine moiety of DNA: mechanistic aspects and formation in cells / J. Cadet, T. Douki, J. Ravanat // *Accounts of Chemical Research*. – 2008. – Vol. 41, N 8. – P. 1075–1083. – DOI: 10.1021/ar700245e
61. Jena, N. R. Formation of ring-opened and rearranged products of guanine: mechanisms and biological significance / N. R. Jena, P. C. Mishra // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2012. – Vol. 53, N 1. – P. 81–94. – DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2012.04.008
62. Unexpected non-Hoogsteen-based mutagenicity mechanism of FaPy-DNA lesions / T. H. Gehrke, U. Lischke, K. L. Gasteiger, S. Schneider, S. Arnold, H. C. Müller, D. S. Stephenson, H. Zipse, T. Carell // *Nature Chemical Biology*. – 2013. – Vol. 9, N 7. – P. 455–461. – DOI: 10.1038/nchembio.1254
63. Marnett, L. J. Oxyradicals and DNA damage / L. J. Marnett // *Carcinogenesis*. – 2000. – Vol. 21, N 3. – P. 361–370. – DOI: 10.1093/carcin/21.3.361
64. Fink, S. P. Mutagenicity in Escherichia coli of the major DNA adduct derived from the endogenous mutagen malondialdehyde / S. P. Fink, G. R. Reddy, L. J. Marnett // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1997. – Vol. 94, N 16. – P. 8652–8657. – DOI: 10.1073/pnas.94.16.8652
65. Sapparbaev, M. 3,N4-ethenocytosine, a highly mutagenic adduct, is a primary substrate for Escherichia coli double-stranded uracil-DNA glycosylase and human mismatch-specific thymine-DNA glycosylase / M. Sapparbaev, J. Laval // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1998. – Vol. 95, N 15. – P. 8508–8513. – DOI: 10.1073/pnas.95.15.8508
66. Evans, M. D. Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance / M. D. Evans, M. Dizdaroglu, M. S. Cooke // *Mutation Research*. – 2004. – Vol. 567, N 1. – P. 1–61. – DOI: 10.1016/j.mrrev.2003.11.001
67. Thymine ring saturation and fragmentation products: lesion bypass, misinsertion and implications for mutagenesis / J. Evans, M. Maccabee, Z. Hatahet, J. Courcelle, R. Bockrath, H. Ide, S. Wallace // *Mutation Research*. – 1993. – Vol. 299, N 3-4. – P. 147–156. – DOI: 10.1016/0165-1218(93)90092-r
68. Ide, H. Thymine glycols and urea residues in M13 DNA constitute replicative blocks in vitro / H. Ide, Y. W. Kow, S. S. Wallace // *Nucleic Acids Research*. – 1985. – Vol. 13, N 22. – P. 8035–8052. – DOI: 10.1093/nar/13.22.8035
69. DNA Repair and Mutagenesis / E. C. Friedberg, G. C. Walker, W. Siede, R. D. Wood. – Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 2005. – 2845 p.
70. Donà, M. DNA Damage Repair in the Context of Plant Chromatin1 / M. Donà, O. Mittelsten Scheid // *Plant Physiology*. – 2015. – Vol. 168, N 4. – P. 1206–1218. – DOI: 10.1104/pp.15.00538
71. Trapp, O. Homologs of Breast Cancer Genes in Plants / O. Trapp, K. Seeliger, H. Puchta // *Frontiers in plant science*. – 2011. – Vol. 2. – P. 19. – DOI: 10.3389/fpls.2011.00019
72. Britt, A. Repair of Damaged Bases / A. Britt // *The Arabidopsis Book*. – 2002. – Vol. 2002, N 1. – P. 1: e0005. – DOI: 10.1199/tab.0005
73. UV-damage-mediated induction of homologous recombination in Arabidopsis is dependent on photosynthetically active radiation / G. Ries, G. Buchholz, H. Frohnmeyer, B. Hohn // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2000. – Vol. 97, N 24. – P. 13425–13429. – DOI: 10.1073/pnas.230251897
74. Zhou, B. B. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective / B. B. Zhou, S. J. Elledge // *Nature*. – 2000. – Vol. 408, N 6811. – P. 433–439. – DOI: 10.1038/35044005
75. Bonilla, C. Y. Colocalization of sensors is sufficient to activate the DNA damage checkpoint in the absence of damage / C. Y. Bonilla, J. A. Melo, D. P. Toczyski // *Molecular Cell*. – 2008. – Vol. 30, N 3. – P. 267–276. – DOI: 10.1016/j.molcel.2008.03.023
76. Soutoglou, E. Activation of the Cellular DNA Damage Response in the Absence of DNA Lesions / E. Soutoglou, T. Misteli // *Science (New York, N.Y.)*. – 2008. – Vol. 320, N 5882. – P. 1507–1510. – DOI: 10.1126/science.1159051
77. Bergink, S. Principles of ubiquitin and SUMO modifications in DNA repair / S. Bergink, S. Jentsch // *Nature*. – 2009. – Vol. 458, N 7237. – P. 461–467. – DOI: 10.1038/nature07963

78. Dianov, G. L. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel / G. L. Dianov, U. Hübscher // *Nucleic Acids Research*. – 2013. – Vol. 41, N 6. – P. 3483–3490. – DOI: 10.1093/nar/gkt076
79. Odell, I. D. Rules of engagement for base excision repair in chromatin / I. D. Odell, S. S. Wallace, D. S. Pederson // *Journal of Cellular Physiology*. – 2013. – Vol. 228, N 2. – P. 258–266. – DOI: 10.1002/jcp.24134
80. Huffman, J. L. DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves / J. L. Huffman, O. Sundheim, J. A. Tainer // *Mutation Research*. – 2005. – Vol. 577, N 1-2. – P. 55–76. – DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2005.03.012
81. Krokan, H. E. Base excision repair / H. E. Krokan, M. Bjørås // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2013. – Vol. 5, N 4. – P. a012583. – DOI: 10.1101/cshperspect.a012583
82. Jacobs, A. L. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond / A. L. Jacobs, P. Schär // *Chromosoma*. – 2012. – Vol. 121, N 1. – P. 1–20. – DOI: 10.1007/s00412-011-0347-4
83. Base excision repair and lesion-dependent subpathways for repair of oxidative DNA damage / D. Svilar, E. M. Goellner, K. H. Almeida, R. W. Sobol // *Antioxidants & Redox Signaling*. – 2011. – Vol. 14, N 12. – P. 2491–2507. – DOI: 10.1089/ars.2010.3466
84. Almeida, K. H. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification / K. H. Almeida, R. W. Sobol // *DNA repair*. – 2007. – Vol. 6, N 6. – P. 695–711. – DOI: 10.1016/j.dnarep.2007.01.009
85. Disruption of PARP1 function inhibits base excision repair of a sub-set of DNA lesions / P. Reynolds, S. Cooper, M. Lomax, P. O'Neill // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – Vol. 43, N 8. – P. 4028–4038. – DOI: 10.1093/nar/gkv250
86. Mitochondrial base excision repair of uracil and AP sites takes place by single-nucleotide insertion and long-patch DNA synthesis / M. Akbari, T. Visnes, H. E. Krokan, M. Otterlei // *DNA repair*. – 2008. – Vol. 7, N 4. – P. 605–616. – DOI: 10.1016/j.dnarep.2008.01.002
87. Prakash, A. Base Excision Repair in the Mitochondria / A. Prakash, S. Doublié // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2015. – Vol. 116, N 8. – P. 1490–1499. – DOI: 10.1002/jcb.25103
88. Laat, W. L. Molecular mechanism of nucleotide excision repair / W. L. Laat, N. G. Jaspers, J. H. Hoeijmakers // *Genes & Development*. – 1999. – Vol. 13, N 7. – P. 768–785. – DOI: 10.1101/gad.13.7.768
89. Recognition of nonhybridizing base pairs during nucleotide excision repair of DNA / N. Buschta-Hedayat, T. Buterin, M. T. Hess, M. Missura, H. Naegeli // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1999. – Vol. 96, N 11. – P. 6090–6095. – DOI: 10.1073/pnas.96.11.6090
90. Wood, R. D. DNA damage recognition during nucleotide excision repair in mammalian cells / R. D. Wood // *Biochimie*. – 1999. – Vol. 81, N 1-2. – P. 39–44. – DOI: 10.1016/s0300-9084(99)80036-4
91. Mitchell, D. L. The biology of the (6-4) photoproduct / D. L. Mitchell, R. S. Nairn // *Photochemistry and Photobiology*. – 1989. – Vol. 49, N 6. – P. 805–819. – DOI: 10.1111/j.1751-1097.1989.tb05578.x
92. Vermeulen, W. Mammalian Transcription-Coupled Excision Repair / W. Vermeulen, M. Foustieri // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2013. – Vol. 5, N 8. – P. a012625. – DOI: 10.1101/cshperspect.a012625
93. Schärer, O. D. Nucleotide Excision Repair in Eukaryotes / O. D. Schärer // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2013. – Vol. 5, N 10. – P. a012609. – DOI: 10.1101/cshperspect.a012609
94. Purification and cloning of a nucleotide excision repair complex involving the xeroderma pigmentosum group C protein and a human homologue of yeast RAD23 / C. Masutani, K. Sugawara, J. Yanagisawa, T. Sonoyama, M. Ui, T. Enomoto, K. Takio, K. Tanaka, P. J. Speck, D. Bootsma // *The EMBO journal*. – 1994. – Vol. 13, N 8. – P. 1831–1843.
95. Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein / R. Nishi, Y. Okuda, E. Watanabe, T. Mori, S. Iwai, C. Masutani, K. Sugawara, F. Hanaoka // *Molecular and Cellular Biology*. – 2005. – Vol. 25, N 13. – P. 5664–5674. – DOI: 10.1128/MCB.25.13.5664-5674.2005
96. DDB accumulates at DNA damage sites immediately after UV irradiation and directly stimulates nucleotide excision repair / M. Wakasugi, A. Kawashima, H. Morioka, S. Linn, A. Sancar, T. Mori, O. Nikaido, T. Matsunaga // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2002. – Vol. 277, N 3. – P. 1637–1640. – DOI: 10.1074/jbc.C100610200
97. Structural basis of UV DNA-damage recognition by the DDB1-DDB2 complex / A. Scrima, R. Konícková, B. K. Czyzewski, Y. Kawasaki, P. D. Jeffrey, R. Groisman, Y. Nakatani, S. Iwai, N. P. Pavletich, N. H. Thomä // *Cell*. – 2008. – Vol. 135, N 7. – P. 1213–1223. – DOI: 10.1016/j.cell.2008.10.045
98. The xeroderma pigmentosum group C protein complex XPC-HR23B plays an important role in the recruitment of transcription factor IIH to damaged DNA / M. Yokoi, C. Masutani, T. Maekawa, K. Sugawara,



- Y. Ohkuma, F. Hanaoka // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275, N 13. – P. 9870–9875. – DOI: 10.1074/jbc.275.13.9870
99. Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors in vivo / M. Volker, M. J. Moné, P. Karmakar, A. Hoffen, W. Schul, W. Vermeulen, J. H. Hoeijmakers, R. Driel, A. A. Zeeland, L. H. Mullenders // *Molecular Cell*. – 2001. – Vol. 8, N 1. – P. 213–224. – DOI: 10.1016/s1097-2765(01)00281-7
100. Compe, E. TFIIH: when transcription met DNA repair / E. Compe, J. Egly // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. – 2012. – Vol. 13, N 6. – P. 343–354. – DOI: 10.1038/nrm3350
101. DNA nucleotide excision repair-dependent signaling to checkpoint activation / F. Marini, T. Nardo, M. Giannattasio, M. Minuzzo, M. Stefanini, P. Plevani, M. Muzi Falconi // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103, N 46. – P. 17325–17330. – DOI: 10.1073/pnas.0605446103
102. H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks / T. M. Marti, E. Hefner, L. Feeney, V. Natale, J. E. Cleaver // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103, N 26. – P. 9891–9896. – DOI: 10.1073/pnas.0603779103
103. Sequential recruitment of the repair factors during NER: the role of XPG in initiating the resynthesis step / V. Mocquet, J. P. Lainé, T. Riedl, Z. Yajin, M. Y. Lee, J. M. Egly // *The EMBO journal*. – 2008. – Vol. 27, N 1. – P. 155–167. – DOI: 10.1038/sj.emboj.7601948
104. Fagbemi, A. F. Regulation of endonuclease activity in human nucleotide excision repair / A. F. Fagbemi, B. Orelli, O. D. Schärer // *DNA repair*. – 2011. – Vol. 10, N 7. – P. 722–729. – DOI: 10.1016/j.dnarep.2011.04.022
105. Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells / T. Ogi, S. Limsirichaikul, R. M. Overmeer, M. Volker, K. Takenaka, R. Cloney, Y. Nakazawa, A. Niimi, Y. Miki, N. G. Jaspers, L. H. F. Mullenders, S. Yamashita, M. I. Fousteri, A. R. Lehmann // *Molecular Cell*. – 2010. – Vol. 37, N 5. – P. 714–727. – DOI: 10.1016/j.molcel.2010.02.009
106. UV-sensitive syndrome protein UVSSA recruits USP7 to regulate transcription-coupled repair / P. Schwertman, A. Lagarou, D. H. W. Dekkers, A. Raams, A. C. Hoek, C. Laffeber, J. H. J. Hoeijmakers, J. A. A. Demmers, M. Fousteri, W. Vermeulen, J. A. Marteijn // *Nature Genetics*. – 2012. – Vol. 44, N 5. – P. 598–602. – DOI: 10.1038/ng.2230
107. Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing / J. A. Marteijn, H. Lans, W. Vermeulen, J. H. J. Hoeijmakers // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. – 2014. – Vol. 15, N 7. – P. 465–481. – DOI: 10.1038/nrm3822
108. Arana, M. E. Mutator phenotypes due to DNA replication infidelity / M. E. Arana, T. A. Kunkel // *Seminars in Cancer Biology*. – 2010. – Vol. 20, N 5. – P. 304–311. – DOI: 10.1016/j.semcancer.2010.10.003
109. Jiricny, J. The multifaceted mismatch-repair system / J. Jiricny // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. – 2006. – Vol. 7, N 5. – P. 335–346. – DOI: 10.1038/nrm1907
110. Jiricny, J. Postreplicative mismatch repair / J. Jiricny // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2013. – Vol. 5, N 4. – P. a012633. – DOI: 10.1101/cshperspect.a012633
111. Chatterjee, N. Mismatch repair enhances convergent transcription-induced cell death at trinucleotide repeats by activating ATR / N. Chatterjee, Y. Lin, J. H. Wilson // *DNA repair*. – 2016. – Vol. 42. – P. 26–32. – DOI: 10.1016/j.dnarep.2016.03.016
112. Peltomäki, P. DNA mismatch repair and cancer / P. Peltomäki // *Mutation Research*. – 2001. – Vol. 488, N 1. – P. 77–85. – DOI: 10.1016/s1383-5742(00)00058-2
113. The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS $\alpha$  / F. Li, G. Mao, D. Tong, J. Huang, L. Gu, W. Yang, G. Li // *Cell*. – 2013. – T. 153, № 3. – C. 590–600. – DOI: 10.1016/j.cell.2013.03.025
114. Li, G. New insights and challenges in mismatch repair: getting over the chromatin hurdle / G. Li // *DNA repair*. – 2014. – Vol. 19. – P. 48–54. – DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.03.027
115. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability / S. M. Lipkin, V. Wang, R. Jacoby, S. Banerjee-Basu, A. D. Baxevanis, H. T. Lynch, R. M. Elliott, F. S. Collins // *Nature Genetics*. – 2000. – Vol. 24, N 1. – P. 27–35. – DOI: 10.1038/71643
116. Sachadyn, P. Conservation and diversity of MutS proteins / P. Sachadyn // *Mutation Research*. – 2010. – Vol. 694, N 1-2. – P. 20–30. – DOI: 10.1016/j.mrfmmm.2010.08.009
117. MutL traps MutS at a DNA mismatch / R. Qiu, M. Sakato, E. J. Sacho, H. Wilkins, X. Zhang, P. Modrich, M. M. Hingorani, D. A. Erie, K. R. Wenginger // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2015. – Vol. 112, N 35. – P. 10914–10919. – DOI: 10.1073/pnas.1505655112

118. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability / S. M. Lipkin, V. Wang, R. Jacoby, S. Banerjee-Basu, A. D. Baxevanis, H. T. Lynch, R. M. Elliott, F. S. Collins // *Nature Genetics*. – 2000. – Vol. 24, N 1. – P. 27–35. – DOI: 10.1038/71643
119. Reconstitution of 5'-directed human mismatch repair in a purified system / Y. Zhang, F. Yuan, S. R. Presnell, K. Tian, Y. Gao, A. E. Tomkinson, L. Gu, G. Li // *Cell*. – 2005. – Vol. 122, N 5. – P. 693–705. – DOI: 10.1016/j.cell.2005.06.027
120. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair / F. A. Kadyrov, L. Dzantiev, N. Constantin, P. Modrich // *Cell*. – 2006. – Vol. 126, N 2. – P. 297–308. – DOI: 10.1016/j.cell.2006.05.039
121. Endonucleolytic function of MutLalpha in human mismatch repair / F. A. Kadyrov, L. Dzantiev, N. Constantin, P. Modrich // *Cell*. – 2006. – Vol. 126, N 2. – P. 297–308. – DOI: 10.1016/j.cell.2006.05.039
122. Genschel, J. Mechanism of 5'-directed excision in human mismatch repair / J. Genschel, P. Modrich // *Molecular Cell*. – 2003. – Vol. 12, N 5. – P. 1077–1086. – DOI: 10.1016/s1097-2765(03)00428-3
123. Evidence for involvement of HMGB1 protein in human DNA mismatch repair / F. Yuan, L. Gu, S. Guo, C. Wang, G. Li // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2004. – Vol. 279, N 20. – P. 20935–20940. – DOI: 10.1074/jbc.M401931200
124. Regulation of replication protein A functions in DNA mismatch repair by phosphorylation / S. Guo, Y. Zhang, F. Yuan, Y. Gao, L. Gu, I. Wong, G. Li // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – Vol. 281, N 31. – P. 21607–21616. – DOI: 10.1074/jbc.M603504200
125. Lau, P. J. Transfer of the MSH2.MSH6 complex from proliferating cell nuclear antigen to mispaired bases in DNA / P. J. Lau, R. D. Kolodner // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2003. – Vol. 278, N 1. – P. 14–17. – DOI: 10.1074/jbc.C200627200
126. Wang, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective / J. C. Wang // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. – 2002. – Vol. 3, N 6. – P. 430–440. – DOI: 10.1038/nrm831
127. Hegde, M. L. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells / M. L. Hegde, T. K. Hazra, S. Mitra // *Cell Research*. – 2008. – Vol. 18, N 1. – P. 27–47. – DOI: 10.1038/cr.2008.8
128. Heeres, J. T. Poly(ADP-ribose) makes a date with death / J. T. Heeres, P. J. Hergenrother // *Current Opinion in Chemical Biology*. – 2007. – Vol. 11, N 6. – P. 644–653. – DOI: 10.1016/j.cbpa.2007.08.038
129. Importance of poly(ADP-ribose) glycohydrolase in the control of poly(ADP-ribose) metabolism / L. Davidovic, M. Vodenicharov, E. B. Affar, G. G. Poirier // *Experimental Cell Research*. – 2001. – Vol. 268, N 1. – P. 7–13. – DOI: 10.1006/excr.2001.5263
130. Differential recruitment of DNA Ligase I and III to DNA repair sites / O. Mortusewicz, U. Rothbauer, M. C. Cardoso, H. Leonhardt // *Nucleic Acids Research*. – 2006. – Vol. 34, N 12. – P. 3523–3532. – DOI: 10.1093/nar/gkl492
131. Caldecott, K. W. Single-strand break repair and genetic disease / K. W. Caldecott // *Nature Reviews. Genetics*. – 2008. – Vol. 9, N 8. – P. 619–631. – DOI: 10.1038/nrg2380
132. Jackson, S. P. Sensing and repairing DNA double-strand breaks / S. P. Jackson // *Carcinogenesis*. – 2002. – Vol. 23, N 5. – P. 687–696. – DOI: 10.1093/carcin/23.5.687
133. Poly(ADP-ribosyl)ation directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler / A. J. Gottschalk, G. Timinszky, S. E. Kong, J. Jin, Y. Cai, S. K. Swanson, M. P. Washburn, L. Florens, A. G. Ladurner, J. W. Conaway, R. C. Conaway // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Vol. 106, N 33. – P. 13770–13774. – DOI: 10.1073/pnas.0906920106
134. A chromatin localization screen reveals poly (ADP ribose)-regulated recruitment of the repressive polycomb and NuRD complexes to sites of DNA damage / D. M. Chou, B. Adamson, N. E. Dephore, X. Tan, A. C. Nottke, K. E. Hurov, S. P. Gygi, M. P. Colaiácovo, S. J. Elledge // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Vol. 107, N 43. – P. 18475–18480. – DOI: 10.1073/pnas.1012946107
135. Lukas, J. More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance / J. Lukas, C. Lukas, J. Bartek // *Nature Cell Biology*. – 2011. – Vol. 13, N 10. – P. 1161–1169. – DOI: 10.1038/ncb2344
136. Price, B. D. Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks / B. D. Price, A. D. D'Andrea // *Cell*. – 2013. – Vol. 152, N 6. – P. 1344–1354. – DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.011
137. A fine-scale dissection of the DNA double-strand break repair machinery and its implications for breast cancer therapy / C. Liu, S. Srihari, K. L. Cao, G. Chenevix-Trench, P. T. Simpson, M. A. Ragan, K. K. Khanna // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42, N 10. – P. 6106–6127. – DOI: 10.1093/nar/gku284
138. Panier, S. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus / S. Panier, S. J. Boulton // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. – 2014. – Vol. 15, N 1. – P. 7–18. – DOI: 10.1038/nrm3719

139. Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4 / P. Mari, B. I. Florea, S. P. Persengiev, N. S. Verkaik, H. T. Brüggewirth, M. Modesti, G. Giglia-Mari, K. Bezstarosti, J. A. A. Demmers, T. M. Luidier, A. B. Houtsmuller, D. C. Gent // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103, N 49. – P. 18597–18602. – DOI: 10.1073/pnas.0609061103
140. Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells / E. Soutoglou, J. F. Dorn, K. Sengupta, M. Jasin, A. Nussenzweig, T. Ried, G. Danuser, T. Misteli // *Nature Cell Biology*. – 2007. – Vol. 9, N 6. – P. 675–682. – DOI: 10.1038/ncb1591
141. Mimitou, E. P. Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2 / E. P. Mimitou, L. S. Symington // *The EMBO journal*. – 2010. – Vol. 29, N 19. – P. 3358–3369. – DOI: 10.1038/emboj.2010.193
142. Interaction of the Ku heterodimer with the DNA ligase IV/Xrcc4 complex and its regulation by DNA-PK / S. Costantini, L. Woodbine, L. Andreoli, P. A. Jeggo, A. Vindigni // *DNA repair*. – 2007. – Vol. 6, N 6. – P. 712–722. – DOI: 10.1016/j.dnarep.2006.12.007
143. Weterings, E. The endless tale of non-homologous end-joining / E. Weterings, D. J. Chen // *Cell Research*. – 2008. – Vol. 18, N 1. – P. 114–124. – DOI: 10.1038/cr.2008.3
144. Yano, K. Live cell imaging of XLF and XRCC4 reveals a novel view of protein assembly in the non-homologous end-joining pathway / K. Yano, D. J. Chen // *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*. – 2008. – Vol. 7, N 10. – P. 1321–1325. – DOI: 10.4161/cc.7.10.5898
145. APLF promotes the assembly and activity of non-homologous end joining protein complexes / G. J. Grundy, S. L. Rulten, Z. Zeng, R. Arribas-Bosacoma, N. Iles, K. Manley, A. Oliver, K. W. Caldecott // *The EMBO journal*. – 2013. – Vol. 32, N 1. – P. 112–125. – DOI: 10.1038/emboj.2012.304
146. Delineation of the Xrcc4-interacting region in the globular head domain of cernunnos/XLF / L. Malivert, V. Ropars, M. Nunez, P. Drevet, S. Miron, G. Faure, R. Guerois, J. Mornon, P. Revy, J. Charbonnier, I. Callebaut, J. Villartay // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – Vol. 285, N 34. – P. 26475–26483. – DOI: 10.1074/jbc.M110.138156
147. XRCC4 protein interactions with XRCC4-like factor (XLF) create an extended grooved scaffold for DNA ligation and double strand break repair / M. Hammel, M. Rey, Y. Yu, R. S. Mani, S. Classen, M. Liu, M. E. Pique, S. Fang, B. L. Mahaney, M. Weinfeld, D. C. Schriemer, S. P. Lees-Miller, J. A. Tainer // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286, N 37. – P. 32638–32650. – DOI: 10.1074/jbc.M111.272641
148. A human XRCC4-XLF complex bridges DNA / S. N. Andres, A. Vergnes, D. Ristic, C. Wyman, M. Modesti, M. Junop // *Nucleic Acids Research*. – 2012. – Vol. 40, N 4. – P. 1868–1878. – DOI: 10.1093/nar/gks022
149. The molecular architecture of the mammalian DNA repair enzyme, polynucleotide kinase / N. K. Bernstein, R. S. Williams, M. L. Rakovszky, D. Cui, R. Green, F. Karimi-Busheri, R. S. Mani, S. Galicia, C. A. Koch, C. E. Cass, D. Durocher, M. Weinfeld, J. N. M. Glover // *Molecular Cell*. – 2005. – Vol. 17, N 5. – P. 657–670. – DOI: 10.1016/j.molcel.2005.02.012
150. The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates / I. Ahel, U. Rass, S. F. El-Khamisy, S. Katyal, P. M. Clements, P. J. McKinnon, K. W. Caldecott, S. C. West // *Nature*. – 2006. – Vol. 443, N 7112. – P. 713–716. – DOI: 10.1038/nature05164
151. WRN exonuclease structure and molecular mechanism imply an editing role in DNA end processing / J. J. P. Perry, S. M. Yannone, L. G. Holden, C. Hitomi, A. Asaithamby, S. Han, P. K. Cooper, D. J. Chen, J. A. Tainer // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2006. – Vol. 13, N 5. – P. 414–422. – DOI: 10.1038/nsmb1088
152. Ku is a 5'-dRP/AP lyase that excises nucleotide damage near broken ends / S. A. Roberts, N. Strande, M. D. Burkhalter, C. Strom, J. M. Havener, P. Hasty, D. A. Ramsden // *Nature*. – 2010. – Vol. 464, N 7292. – P. 1214–1217. – DOI: 10.1038/nature08926
153. Polynucleotide kinase and aprataxin-like forkhead-associated protein (PALF) acts as both a single-stranded DNA endonuclease and a single-stranded DNA 3' exonuclease and can participate in DNA end joining in a biochemical system / S. Li, S. Kanno, R. Watanabe, H. Ogiwara, T. Kohno, G. Watanabe, A. Yasui, M. R. Lieber // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286, N 42. – P. 36368–36377. – DOI: 10.1074/jbc.M111.287797
154. A role for the Tip60 histone acetyltransferase in the acetylation and activation of ATM / Y. Sun, X. Jiang, S. Chen, N. Fernandes, B. D. Price // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2005. – Vol. 102, N 37. – P. 13182–13187. – DOI: 10.1073/pnas.0504211102

155. Stracker, T. H. The MRE11 complex: starting from the ends / T. H. Stracker, J. H. J. Petrini // *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. – 2011. – Vol. 12, N 2. – P. 90–103. – DOI: 10.1038/nrm3047
156. Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells / U. Grawunder, M. Wilm, X. Wu, P. Kulesza, T. E. Wilson, M. Mann, M. R. Lieber // *Nature*. – 1997. – Vol. 388, N 6641. – P. 492–495. – DOI: 10.1038/41358
157. ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress / S. Bhatti, S. Kozlov, A. A. Farooqi, A. Naqi, M. Lavin, K. K. Khanna // *Cellular and molecular life sciences: CMLS*. – 2011. – Vol. 68, N 18. – P. 2977–3006. – DOI: 10.1007/s00018-011-0683-9
158. Altmeyer, M. To spread or not to spread--chromatin modifications in response to DNA damage / M. Altmeyer, J. Lukas // *Current Opinion in Genetics & Development*. – 2013. – Vol. 23, N 2. – P. 156–165. – DOI: 10.1016/j.gde.2012.11.001
159. BRCA1 ubiquitinates its phosphorylation-dependent binding partner CtIP / X. Yu, S. Fu, M. Lai, R. Baer, J. Chen // *Genes & Development*. – 2006. – Vol. 20, N 13. – P. 1721–1726. – DOI: 10.1101/gad.1431006
160. Chapman, J. R. Playing the end game: DNA double-strand break repair pathway choice / J. R. Chapman, M. R. G. Taylor, S. J. Boulton // *Molecular Cell*. – 2012. – Vol. 47, N 4. – P. 497–510. – DOI: 10.1016/j.molcel.2012.07.029
161. Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair / L. Chen, C. J. Nievera, A. Y. Lee, X. Wu // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283, N 12. – P. 7713–7720. – DOI: 10.1074/jbc.M710245200
162. BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair / A. V. Nimonkar, J. Genschel, E. Kinoshita, P. Polaczek, J. L. Campbell, C. Wyman, P. Modrich, S. C. Kowalczykowski // *Genes & Development*. – 2011. – Vol. 25, N 4. – P. 350–362. – DOI: 10.1101/gad.2003811
163. PALB2 functionally connects the breast cancer susceptibility proteins BRCA1 and BRCA2 / F. Zhang, Q. Fan, K. Ren, P. R. Andreassen // *Molecular cancer research: MCR*. – 2009. – Vol. 7, N 7. – P. 1110–1118. – DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0123
164. Holloman, W. K. Unraveling the mechanism of BRCA2 in homologous recombination / W. K. Holloman // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2011. – Vol. 18, N 7. – P. 748–754. – DOI: 10.1038/nsmb.2096
165. Rad54, the motor of homologous recombination / A. V. Mazin, O. M. Mazina, D. V. Bugreev, M. J. Rossi // *DNA repair*. – 2010. – Vol. 9, N 3. – P. 286–302. – DOI: 10.1016/j.dnarep.2009.12.006
166. Role of PCNA and TLS polymerases in D-loop extension during homologous recombination in humans / M. Sebesta, P. Burkovics, S. Juhasz, S. Zhang, J. E. Szabo, M. Y. W. T. Lee, L. Haracska, L. Krejci // *DNA repair*. – 2013. – Vol. 12, N 9. – P. 691–698. – DOI: 10.1016/j.dnarep.2013.05.001
167. RTEL1 maintains genomic stability by suppressing homologous recombination / L. J. Barber, J. L. Youds, J. D. Ward, M. J. McIlwraith, N. J. O'Neil, M. I. R. Petalcorin, J. S. Martin, S. J. Collis, S. B. Cantor, M. Auclair, H. Tissenbaum, S. C. West, A. M. Rose, S. J. Boulton // *Cell*. – 2008. – Vol. 135, N 2. – P. 261–271. – DOI: 10.1016/j.cell.2008.08.016
168. Crystal structure of the Mus81-Eme1 complex / J. H. Chang, J. J. Kim, J. M. Choi, J. H. Lee, Y. Cho // *Genes & Development*. – 2008. – Vol. 22, N 8. – P. 1093–1106. – DOI: 10.1101/gad.1618708
169. Ciccica, A. Structural and functional relationships of the XPF/MUS81 family of proteins / A. Ciccica, N. McDonald, S. C. West // *Annual Review of Biochemistry*. – 2008. – Vol. 77. – P. 259–287. – DOI: 10.1146/annurev.biochem.77.070306.102408
170. RMI, a new OB-fold complex essential for Bloom syndrome protein to maintain genome stability / D. Xu, R. Guo, A. Sobeck, C. Z. Bachrati, J. Yang, T. Enomoto, G. W. Brown, M. E. Hoatlin, I. D. Hickson, W. Wang // *Genes & Development*. – 2008. – Vol. 22, N 20. – P. 2843–2855. – DOI: 10.1101/gad.1708608
171. Human SLX4 is a Holliday junction resolvase subunit that binds multiple DNA repair/recombination endonucleases / S. Fekairi, S. Scaglione, C. Chahwan, E. R. Taylor, A. Tissier, S. Coulon, M. Dong, C. Ruse, J. R. Yates, P. Russell, R. P. Fuchs, C. H. McGowan, P. L. Gaillard // *Cell*. – 2009. – Vol. 138, N 1. – P. 78–89. – DOI: 10.1016/j.cell.2009.06.029
172. Mechanism of Holliday junction resolution by the human GEN1 protein / U. Rass, S. A. Compton, J. Matos, M. R. Singleton, S. C. Y. Ip, M. G. Blanco, J. D. Griffith, S. C. West // *Genes & Development*. – 2010. – Vol. 24, N 14. – P. 1559–1569. – DOI: 10.1101/gad.585310
173. Chatterjee, N. Mechanisms of DNA damage, repair and mutagenesis / N. Chatterjee, G. C. Walker // *Environmental and molecular mutagenesis*. – 2017. – Vol. 58, N 5. – P. 235–263. – DOI: 10.1002/em.22087

174. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases / M. O. Hottiger, P. O. Hassa, B. Lüscher, H. Schüler, F. Koch-Nolte // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2010. – Vol. 35, N 4. – P. 208–219. – DOI: 10.1016/j.tibs.2009.12.003
175. Doherty, A. J. Structural and mechanistic conservation in DNA ligases / A. J. Doherty, S. W. Suh // *Nucleic Acids Research*. – 2000. – Vol. 28, N 21. – P. 4051–4058.
176. Hakmé A. The expanding field of poly(ADP-ribosylation) reactions / A. Hakmé, H.K. Wong, F. Dantzer, V. Schreiber // *EMBO reports*. – 2008. – Vol. 9, N 11. – P. 1094–1100. – DOI: 10.1038/embor.2008.191
177. Hottiger, M. O. Nuclear ADP-Ribosylation and Its Role in Chromatin Plasticity, Cell Differentiation, and Epigenetics / M. O. Hottiger // *Annual Review of Biochemistry*. – 2015. – Vol. 84. – P. 227–263. – DOI: 10.1146/annurev-biochem-060614-034506
178. PARP inhibition: PARP1 and beyond / M. Rouleau, A. Patel, M. J. Hendzel, S. H. Kaufmann, G. G. Poirier // *Nature Reviews Cancer*. – 2010. – Vol. 10, N 4. – P. 293–301. – DOI: 10.1038/nrc2812
179. Poly(ADP-ribosylation) reactions in the regulation of nuclear functions / D. AMOURS, S. DESNOYERS, I. SILVA, G. G. POIRIER // *Biochemical Journal*. – 1999. – Vol. 342, N 2. – P. 249–268. – DOI: 10.1042/bj3420249
180. Poly(ADP-ribosylation) in regulation of chromatin structure and the DNA damage response / M. Tallis, R. Morra, E. Barkauskaite, I. Ahel // *Chromosoma*. – 2014. – Vol. 123, N 1. – P. 79–90. – DOI: 10.1007/s00412-013-0442-9
181. Altmeyer, M. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 at the crossroad of metabolic stress and inflammation in aging / M. Altmeyer, M. O. Hottiger // *Aging*. – 2009. – Vol. 1, N 5. – P. 458–469. – DOI: 10.18632/aging.100052
182. Family-wide analysis of poly(ADP-ribose) polymerase activity / S. Vyas, I. Matic, L. Uchima, J. Rood, R. Zaja, R. T. Hay, I. Ahel, P. Chang // *Nature communications*. – 2014. – Vol. 5. – P. 4426. – DOI: 10.1038/ncomms5426
183. Gibson, B. A. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs / B. A. Gibson, W. L. Kraus // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. – 2012. – Vol. 13, N 7. – P. 411–424. – DOI: 10.1038/nrm3376
184. Regulatory roles of tankyrase 1 at telomeres and in DNA repair: suppression of T-SCE and stabilization of DNA-PKcs / R. C. Dregalla, J. Zhou, R. R. Idate, C. L. R. Battaglia, H. L. Liber, S. M. Bailey // *Aging*. – 2022. – Vol. 2, N 10. – P. 691–708. – DOI: 10.18632/aging.100210
185. Poly(ADP-ribose) has a branched structure in vivo / H. Juarez-Salinas, V. Levi, E. L. Jacobson, M. K. Jacobson // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1982. – Vol. 257, N 2. – P. 607–609.
186. Structure of poly(adenosine diphosphate ribose): identification of 2'-[1''-ribosyl-2''-(or 3''-)(1'''-ribosyl)]adenosine-5',5'',5'''-tris(phosphate) as a branch linkage. / M. Miwa, N. Saikawa, Z. Yamaizumi, S. Nishimura, T. Sugimura // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1979. – Vol. 76, N 2. – P. 595–599. – DOI: 10.1073/pnas.76.2.595
187. Tanuma, S. Poly(ADP-ribosylation) of chromosomal proteins in the HeLa S3 cell cycle. / S. Tanuma, Y. Kanai // *Journal of Biological Chemistry*. – 1982. – Vol. 257, N 11. – P. 6565–6570. – DOI: 10.1016/S0021-9258(20)65179-1
188. Barkauskaite, E. Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation / E. Barkauskaite, G. Jankevicius, I. Ahel // *Molecular Cell*. – 2015. – Vol. 58, N 6. – P. 935–946. – DOI: 10.1016/j.molcel.2015.05.007
189. Structural Implications for Selective Targeting of PARPs / J. D. Steffen, J. R. Brody, R. S. Armen, J. M. Pascal // *Frontiers in Oncology*. – 2013. – Vol. 3. – P. 301. – DOI: 10.3389/fonc.2013.00301
190. Visualization of poly(ADP-ribose) bound to PARG reveals inherent balance between exo- and endoglycohydrolase activities / E. Barkauskaite, A. Brassington, E. S. Tan, J. Warwicker, M. S. Dunstan, B. Banos, P. Lafite, M. Ahel, T. J. Mitchison, I. Ahel, D. Leys // *Nature Communications*. – 2013. – Vol. 4. – P. 2164. – DOI: 10.1038/ncomms3164
191. The mechanism of the elongation and branching reaction of poly(ADP-ribose) polymerase as derived from crystal structures and mutagenesis / A. Ruf, V. Rolli, G. Murcia, G. E. Schulz // *Journal of Molecular Biology*. – 1998. – Vol. 278, N 1. – P. 57–65. – DOI: 10.1006/jmbi.1998.1673
192. A systematic analysis of the PARP protein family identifies new functions critical for cell physiology / S. Vyas, M. Chesarone-Cataldo, T. Todorova, Y. Huang, P. Chang // *Nature Communications*. – 2013. – Vol. 4, N 1. – P. 2240. – DOI: 10.1038/ncomms3240
193. Amé, J. The PARP superfamily / J. Amé, C. Spenlehauer, G. Murcia // *BioEssays*. – 2004. – Vol. 26, N 8. – P. 882–893. – DOI: 10.1002/bies.20085

194. Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers / W. M. Shieh, J. C. Amé, M. V. Wilson, Z. Q. Wang, D. W. Koh, M. K. Jacobson, E. L. Jacobson // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273, N 46. – P. 30069–30072. – DOI: 10.1074/jbc.273.46.30069
195. Poly(ADP-ribosylation) of polynucleosomes causes relaxation of chromatin structure / G. G. Poirier, G. Murcia, J. Jongstra-Bilen, C. Niedergang, P. Mandel // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1982. – Vol. 79, N 11. – P. 3423–3427. – DOI: 10.1073/pnas.79.11.3423
196. Krishnakumar, R. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets / R. Krishnakumar, W. L. Kraus // *Molecular Cell*. – 2010. – Vol. 39, N 1. – P. 8–24. – DOI: 10.1016/j.molcel.2010.06.017
197. Krishnakumar, R. PARP-1 regulates chromatin structure and transcription through a KDM5B-dependent pathway / R. Krishnakumar, W. L. Kraus // *Molecular Cell*. – 2010. – Vol. 39, N 5. – P. 736–749. – DOI: 10.1016/j.molcel.2010.08.014
198. Kraus, W. L. PARPs and ADP-Ribosylation: 50 Years ... and Counting / W. L. Kraus // *Molecular Cell*. – 2015. – T. 58, № 6. – C. 902–910. – DOI: 10.1016/j.molcel.2015.06.006
199. The Importance of Poly(ADP-Ribose) Polymerase as a Sensor of Unligated Okazaki Fragments during DNA Replication / H. Hanzlikova, I. Kalasova, A. A. Demin, L. E. Pennicott, Z. Cihlarova, K. W. Caldecott // *Molecular Cell*. – 2018. – Vol. 71, N 2. – P. 319–331.e3. – DOI: 10.1016/j.molcel.2018.06.004
200. Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse / J. Ménessier de Murcia, M. Ricoul, L. Tartier, C. Niedergang, A. Huber, F. Dantzer, V. Schreiber, J. Amé, A. Dierich, M. LeMeur, L. Sabatier, P. Chambon, G. Murcia // *The EMBO journal*. – 2003. – Vol. 22, N 9. – P. 2255–2263. – DOI: 10.1093/emboj/cdg206
201. PARP2 controls double-strand break repair pathway choice by limiting 53BP1 accumulation at DNA damage sites and promoting end-resection / A. Fouquin, J. Guirouilh-Barbat, B. Lopez, J. Hall, M. Amor-Guéret, V. Pennaneach // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – Vol. 45, N 21. – P. 12325–12339. – DOI: 10.1093/nar/gkx881
202. Bai, P. Biology of Poly(ADP-Ribose) Polymerases: The Factotums of Cell Maintenance / P. Bai // *Molecular Cell*. – 2015. – Vol. 58, N 6. – P. 947–958. – DOI: 10.1016/j.molcel.2015.01.034
203. Obaji, E. Characterization of the DNA dependent activation of human ARTD2/PARP2 / E. Obaji, T. Haikarainen, L. Lehtiö // *Scientific Reports*. – 2016. – Vol. 6, N 1. – P. 34487. – DOI: 10.1038/srep34487
204. Langelier, M. PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1 / M. Langelier, A. A. Riccio, J. M. Pascal // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42, N 12. – P. 7762–7775. – DOI: 10.1093/nar/gku474
205. Riccio, A. A. PARP-2 domain requirements for DNA damage-dependent activation and localization to sites of DNA damage / A. A. Riccio, G. Cingolani, J. M. Pascal // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44, N 4. – P. 1691–1702. – DOI: 10.1093/nar/gkv1376
206. Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3 / C. Beck, I. Robert, B. Reina-San-Martin, V. Schreiber, F. Dantzer // *Experimental Cell Research*. – 2014. – Vol. 329, N 1. – P. 18–25. – DOI: 10.1016/j.yexcr.2014.07.003
207. PARP-3 associates with polycomb group bodies and with components of the DNA damage repair machinery / M. Rouleau, D. McDonald, P. Gagné, M. -. Ouellet, A. Droit, J. M. Hunter, S. Dutertre, C. Prigent, M. J. Hendzel, G. G. Poirier // *Journal of Cellular Biochemistry*. – 2007. – Vol. 100, N 2. – P. 385–401. – DOI: 10.1002/jcb.21051
208. Daniels, C. M. The Promise of Proteomics for the Study of ADP-Ribosylation / C. M. Daniels, S. Ong, A. K. L. Leung // *Molecular Cell*. – 2015. – Vol. 58, N 6. – P. 911–924. – DOI: 10.1016/j.molcel.2015.06.012
209. Palazzo, L. ADP-ribosylation: new facets of an ancient modification / L. Palazzo, A. Mikoč, I. Ahel // *The FEBS journal*. – 2017. – Vol. 284, N 18. – P. 2932–2946. – DOI: 10.1111/febs.14078
210. Gupte, R. PARPs and ADP-ribosylation: recent advances linking molecular functions to biological outcomes / R. Gupte, Z. Liu, W. L. Kraus // *Genes & Development*. – 2017. – Vol. 31, N 2. – P. 101–126. – DOI: 10.1101/gad.291518.116
211. Palazzo, L. PARPs in genome stability and signal transduction: implications for cancer therapy / L. Palazzo, I. Ahel // *Biochemical Society Transactions*. – 2018. – Vol. 46, N 6. – P. 1681–1695. – DOI: 10.1042/BST20180418. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6299239/>
212. Expanding functions of ADP-ribosylation in the maintenance of genome integrity / K. Martin-Hernandez, J. -. Rodriguez-Vargas, V. Schreiber, F. Dantzer // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. – 2017. – Vol. 63. – P. 92–101. – DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.09.009
213. Cohen, M. S. Insights into the biogenesis, function, and regulation of ADP-ribosylation / M. S. Cohen, P. Chang // *Nature Chemical Biology*. – 2018. – Vol. 14, N 3. – P. 236–243. – DOI: 10.1038/nchembio.2568

214. The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase / D. Slade, M. S. Dunstan, E. Barkauskaite, R. Weston, P. Lafite, N. Dixon, M. Ahel, D. Leys, I. Ahel // *Nature*. – 2011. – Vol. 477, N 7366. – P. 616–620. – DOI: 10.1038/nature10404
215. Purification and characterization of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. Different modes of action on large and small poly(ADP-ribose) / K. Hatakeyama, Y. Nemoto, K. Ueda, O. Hayaishi // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1986. – Vol. 261, N 32. – P. 14902–14911.
216. Intracellular Mono-ADP-Ribosylation in Signaling and Disease / M. Bütepage, L. Ecker, P. Verheugd, B. Lüscher // *Cells*. – 2015. – Vol. 4, N 4. – P. 569–595. – DOI: 10.3390/cells4040569
217. Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) gene and the common promoter sequence it shares with inner mitochondrial membrane translocase 23 (TIM23) / R. G. Meyer, M. L. Meyer-Ficca, E. L. Jacobson, M. K. Jacobson // *Gene*. – 2003. – Vol. 314. – P. 181–190. – DOI: 10.1016/S0378-1119(03)00738-8. – URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111903007388>
218. Human poly(ADP-ribose) glycohydrolase is expressed in alternative splice variants yielding isoforms that localize to different cell compartments / M. L. Meyer-Ficca, R. G. Meyer, D. L. Coyle, E. L. Jacobson, M. K. Jacobson // *Experimental Cell Research*. – 2004. – Vol. 297, N 2. – P. 521–532. – DOI: 10.1016/j.yexcr.2004.03.050
219. Overexpression of poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) isoforms / M. L. Meyer-Ficca, R. G. Meyer, E. L. Jacobson, M. K. Jacobson // *Cancer Research*. – 2005. – Vol. 65, N 9\_Supplement. – P. 420.
220. Proteomic investigation of phosphorylation sites in poly(ADP-ribose) polymerase-1 and poly(ADP-ribose) glycohydrolase / J. Gagné, X. Moreel, P. Gagné, Y. Labelle, A. Droit, M. Chevalier-Paré, S. Bourassa, D. McDonald, M. J. Hendzel, C. Prigent, G. G. Poirier // *Journal of Proteome Research*. – 2009. – Vol. 8, N 2. – P. 1014–1029. – DOI: 10.1021/pr800810n
221. Botta, D. Identification of a regulatory segment of poly(ADP-ribose) glycohydrolase / D. Botta, M. K. Jacobson // *Biochemistry*. – 2010. – Vol. 49, N 35. – P. 7674–7682. – DOI: 10.1021/bi100973m
222. Identification of three critical acidic residues of poly(ADP-ribose) glycohydrolase involved in catalysis: determining the PARG catalytic domain / C. N. Patel, D. W. Koh, M. K. Jacobson, M. A. Oliveira // *The Biochemical Journal*. – 2005. – Vol. 388, N Pt 2. – P. 493–500. – DOI: 10.1042/BJ20040942
223. Hassler, M. PARG: a macrodomain in disguise / M. Hassler, G. Jankevicius, A. G. Ladurner // *Structure (London, England: 1993)*. – 2011. – Vol. 19, N 10. – P. 1351–1353. – DOI: 10.1016/j.str.2011.09.007
224. Emerging roles of eraser enzymes in the dynamic control of protein ADP-ribosylation / J. O’Sullivan, M. Tedim Ferreira, J. Gagné, A. K. Sharma, M. J. Hendzel, J. Masson, G. G. Poirier // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 10, N 1. – P. 1182. – DOI: 10.1038/s41467-019-08859-x. – URL: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-08859-x>
225. Alteration of poly(ADP-ribose) glycohydrolase nucleocytoplasmic shuttling characteristics upon cleavage by apoptotic proteases / M. Bonicalzi, M. Vodenicharov, M. Coulombe, J. Gagné, G. G. Poirier // *Biology of the Cell*. – 2003. – Vol. 95, N 9. – P. 635–644. – DOI: 10.1016/j.biolcel.2003.10.003
226. Preferential perinuclear localization of poly(ADP-ribose) glycohydrolase / E. Winstall, E. B. Affar, R. Shah, S. Bourassa, I. A. Scovassi, G. G. Poirier // *Experimental Cell Research*. – 1999. – Vol. 251, N 2. – P. 372–378. – DOI: 10.1006/excr.1999.4594
227. ADP-ribosylhydrolase 3 (ARH3), not poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) isoforms, is responsible for degradation of mitochondrial matrix-associated poly(ADP-ribose) / M. Niere, M. Mashimo, L. Agledal, C. Dölle, A. Kasamatsu, J. Kato, J. Moss, M. Ziegler // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2012. – Vol. 287, N 20. – P. 16088–16102. – DOI: 10.1074/jbc.M112.349183
228. Davies, G. Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases / G. Davies, B. Henrissat // *Structure (London, England: 1993)*. – 1995. – Vol. 3, N 9. – P. 853–859. – DOI: 10.1016/S0969-2126(01)00220-9
229. Mode of action of poly(ADP-ribose) glycohydrolase / G. Brochu, C. Duchaine, L. Thibeault, J. Lagueux, G. M. Shah, G. G. Poirier // *Biochimica Et Biophysica Acta*. – 1994. – Vol. 1219, N 2. – P. 342–350. – DOI: 10.1016/0167-4781(94)90058-2
230. Endoglycosidic cleavage of branched polymers by poly(ADP-ribose) glycohydrolase / S. A. Braun, P. L. Panzeter, M. A. Collinge, F. R. Althaus // *European Journal of Biochemistry*. – 1994. – Vol. 220, N 2. – P. 369–375. – DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb18633.x
231. Depletion of the 110-kilodalton isoform of poly(ADP-ribose) glycohydrolase increases sensitivity to genotoxic and endotoxic stress in mice / U. Cortes, W. Tong, D. L. Coyle, M. L. Meyer-Ficca, R. G. Meyer, V. Petrilli, Z. Herceg, E. L. Jacobson, M. K. Jacobson, Z. Wang // *Molecular and Cellular Biology*. – 2004. – Vol. 24, N 16. – P. 7163–7178. – DOI: 10.1128/MCB.24.16.7163-7178.2004

232. Deletion of the nuclear isoform of poly(ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) reveals its function in DNA repair, genomic stability and tumorigenesis / W. Min, U. Cortes, Z. Herceg, W. Tong, Z. Wang // *Carcinogenesis*. – 2010. – Vol. 31, N 12. – P. 2058–2065. – DOI: 10.1093/carcin/bgq205
233. PARG is dispensable for recovery from transient replicative stress but required to prevent detrimental accumulation of poly(ADP-ribose) upon prolonged replicative stress / G. Illuzzi, E. Fouquerel, J. Amé, A. Noll, K. Rehmert, H. Nasheuer, F. Dantzer, V. Schreiber // *Nucleic Acids Research*. – 2014. – Vol. 42, N 12. – P. 7776–7792. – DOI: 10.1093/nar/gku505
234. PARG is recruited to DNA damage sites through poly(ADP-ribose)- and PCNA-dependent mechanisms / O. Mortusewicz, E. Fouquerel, J. Amé, H. Leonhardt, V. Schreiber // *Nucleic Acids Research*. – 2011. – Vol. 39, N 12. – P. 5045–5056. – DOI: 10.1093/nar/gkr099
235. A novel non-canonical PIP-box mediates PARG interaction with PCNA / T. Kaufmann, I. Grishkovskaya, A. A. Polyansky, S. Kostrhon, E. Kukolj, K. M. Olek, S. Herbert, E. Beltzung, K. Mechtler, T. Peterbauer, J. Gotzmann, L. Zhang, M. Hartl, B. Zagrovic, K. Elsayad, K. Djinovic-Carugo, D. Slade // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – Vol. 45, N 16. – P. 9741–9759. – DOI: 10.1093/nar/gkx604
236. Poly(ADP-ribosyl) glycohydrolase prevents the accumulation of unusual replication structures during unperturbed S phase / A. Ray Chaudhuri, A. K. Ahuja, R. Herrador, M. Lopes // *Molecular and Cellular Biology*. – 2015. – Vol. 35, N 5. – P. 856–865. – DOI: 10.1128/MCB.01077-14
237. Koh, D. W. The road to survival goes through PARG / D. W. Koh, V. L. Dawson, T. M. Dawson // *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*. – 2005. – Vol. 4, N 3. – P. 397–399. – DOI: 10.4161/cc.4.3.1559
238. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018 / L. Galluzzi, I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E. S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio, D. W. Andrews, M. Annicchiarico-Petruzzelli, G. Kroemer // *Cell Death and Differentiation*. – 2018. – Vol. 25, N 3. – P. 486–541. – DOI: 10.1038/s41418-017-0012-4
239. Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos) / Y. Wang, N. S. Kim, J. Haince, H. C. Kang, K. K. David, S. A. Andrabi, G. G. Poirier, V. L. Dawson, T. M. Dawson // *Science Signaling*. – 2011. – Vol. 4, N 167. – P. ra20. – DOI: 10.1126/scisignal.2000902
240. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor / S. Yu, H. Wang, M. F. Poitras, C. Coombs, W. J. Bowers, H. J. Federoff, G. G. Poirier, T. M. Dawson, V. L. Dawson // *Science (New York, N.Y.)*. – 2002. – Vol. 297, N 5579. – P. 259–263. – DOI: 10.1126/science.1072221
241. Fatokun, A. A. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities / A. A. Fatokun, V. L. Dawson, T. M. Dawson // *British Journal of Pharmacology*. – 2014. – Vol. 171, N 8. – P. 2000–2016. – DOI: 10.1111/bph.12416
242. Blenn, C. Poly(ADP-ribose) glycohydrolase silencing protects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death / C. Blenn, F. R. Althaus, M. Malanga // *The Biochemical Journal*. – 2006. – Vol. 396, N 3. – P. 419–429. – DOI: 10.1042/BJ20051696
243. Tankyrase1-mediated poly(ADP-ribosylation) of TRF1 maintains cell survival after telomeric DNA damage / L. Yang, L. Sun, Y. Teng, H. Chen, Y. Gao, A. S. Levine, S. Nakajima, L. Lan // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – Vol. 45, N 7. – P. 3906–3921. – DOI: 10.1093/nar/gkx083
244. WRN is recruited to damaged telomeres via its RQC domain and tankyrase1-mediated poly-ADP-ribosylation of TRF1 / L. Sun, S. Nakajima, Y. Teng, H. Chen, L. Yang, X. Chen, B. Gao, A. S. Levine, L. Lan // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – Vol. 45, N 7. – P. 3844–3859. – DOI: 10.1093/nar/gkx065
245. Krueger, K. M. The family of bacterial ADP-ribosylating exotoxins / K. M. Krueger, J. T. Barbieri // *Clinical Microbiology Reviews*. – 1995. – Vol. 8, N 1. – P. 34–47. – DOI: 10.1128/CMR.8.1.34
246. Mashimo, M. Structure and function of the ARH family of ADP-ribosyl-acceptor hydrolases / M. Mashimo, J. Kato, J. Moss // *DNA Repair*. – 2014. – Vol. 23. – P. 88–94. – DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.03.005
247. Leung, A. K. L. PARPs / A. K. L. Leung // *Current biology: CB*. – 2017. – Vol. 27, N 23. – P. R1256–R1258. – DOI: 10.1016/j.cub.2017.09.054
248. Oka, S. Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADP-ribose) glycohydrolase / S. Oka, J. Kato, J. Moss // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2006. – Vol. 281, N 2. – P. 705–713. – DOI: 10.1074/jbc.M510290200
249. ADP-ribosylation of arginine / S. Laing, M. Unger, F. Koch-Nolte, F. Haag // *Amino Acids*. – 2011. – Vol. 41, N 2. – P. 257–269. – DOI: 10.1007/s00726-010-0676-2
250. Serine ADP-ribosylation reversal by the hydrolase ARH3 / P. Fontana, J. J. Bonfiglio, L. Palazzo, E. Bartlett, I. Matic, I. Ahel // *eLife*. – 2017. – Vol. 6. – P. e28533. – DOI: 10.7554/eLife.28533



251. Enhanced sensitivity to cholera toxin in ADP-ribosylarginine hydrolase-deficient mice / J. Kato, J. Zhu, C. Liu, J. Moss // *Molecular and Cellular Biology*. – 2007. – Vol. 27, N 15. – P. 5534–5543. – DOI: 10.1128/MCB.00302-07
252. ADP-ribosylarginine hydrolase regulates cell proliferation and tumorigenesis / J. Kato, J. Zhu, C. Liu, M. Stylianou, V. Hoffmann, M. J. Lizak, C. G. Glasgow, J. Moss // *Cancer Research*. – 2011. – Vol. 71, N 15. – P. 5327–5335. – DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-0733
253. Proteomic analyses identify ARH3 as a serine mono-ADP-ribosylhydrolase / J. Abplanalp, M. Leutert, E. Frugier, K. Nowak, R. Feurer, J. Kato, H. V. A. Kistemaker, D. V. Filippov, J. Moss, A. Caflisch, M. O. Hottiger // *Nature Communications*. – 2017. – Vol. 8, N 1. – P. 2055. – DOI: 10.1038/s41467-017-02253-1
254. Loss of poly(ADP-ribose) glycohydrolase causes progressive neurodegeneration in *Drosophila melanogaster* / S. Hanai, M. Kanai, S. Ohashi, K. Okamoto, M. Yamada, H. Takahashi, M. Miwa // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2004. – Vol. 101, N 1. – P. 82–86. – DOI: 10.1073/pnas.2237114100
255. Mashimo, M. ADP-ribosyl-acceptor hydrolase 3 regulates poly (ADP-ribose) degradation and cell death during oxidative stress / M. Mashimo, J. Kato, J. Moss // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2013. – Vol. 110, N 47. – P. 18964–18969. – DOI: 10.1073/pnas.1312783110
256. Kaufmann, M. Function and Regulation of the Mono-ADP-Ribosyltransferase ARTD10 / M. Kaufmann, K. L. H. Feijs, B. Lüscher // *Endogenous ADP-Ribosylation* / ed. F. Koch-Nolte. – Cham : Springer International Publishing, 2015. – P. 167–188.
257. Han, W. The macro domain protein family: structure, functions, and their potential therapeutic implications / W. Han, X. Li, X. Fu // *Mutation Research*. – 2011. – Vol. 727, N 3. – P. 86–103. – DOI: 10.1016/j.mrrev.2011.03.001
258. The macro domain is an ADP-ribose binding module / G. I. Karras, G. Kustatscher, H. R. Buhecha, M. D. Allen, C. Pugieux, F. Sait, M. Bycroft, A. G. Ladurner // *The EMBO journal*. – 2005. – Vol. 24, N 11. – P. 1911–1920. – DOI: 10.1038/sj.emboj.7600664
259. Teloni, F. Readers of poly(ADP-ribose): designed to be fit for purpose / F. Teloni, M. Altmeyer // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44, N 3. – P. 993–1006. – DOI: 10.1093/nar/gkv1383
260. Nucleolar-nucleoplasmic shuttling of TARG1 and its control by DNA damage-induced poly-ADP-ribosylation and by nucleolar transcription / M. Bütepage, C. Preisinger, A. Kriegsheim, A. Scheufen, E. Lausberg, J. Li, F. Kappes, R. Feederle, S. Ernst, L. Ecker, S. Krieg, G. Müller-Newen, G. Rossetti, K. L. H. Feijs, P. Verheugd, B. Lüscher // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8, N 1. – P. 6748. – DOI: 10.1038/s41598-018-25137-w
261. MACROD2 Haploinsufficiency Impairs Catalytic Activity of PARP1 and Promotes Chromosome Instability and Growth of Intestinal Tumors / A. Sakthianandeswaren, M. J. Parsons, D. Mouradov, R. N. MacKinnon, B. Catimel, S. Liu, M. Palmieri, C. Love, R. N. Jorissen, S. Li, L. Whitehead, T. L. Putoczki, A. Preaudet, C. Tsui, C. J. Nowell, R. L. Ward, N. J. Hawkins, J. Desai, P. Gibbs, M. Ernst, I. Street, M. Buchert, O. M. Sieber // *Cancer Discovery*. – 2018. – Vol. 8, N 8. – P. 988–1005. – DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0909
262. MACROD2 deletions cause impaired PARP1 activity and chromosome instability in colorectal cancer / A. Sakthianandeswaren, M. J. Parsons, D. Mouradov, O. M. Sieber // *Oncotarget*. – 2018. – Vol. 9, N 69. – P. 33056–33058. – DOI: 10.18632/oncotarget.25887
263. Studies on the Polymer of Adenosine Diphosphate Ribose: II. CHARACTERIZATION OF THE POLYMER / R. H. Reeder, K. Ueda, T. Honjo, Y. Nishizuka, O. Hayaishi // *Journal of Biological Chemistry*. – 1967. – Vol. 242, N 13. – P. 3172–3179. – DOI: 10.1016/S0021-9258(18)95948-X. – URL: [https://www.jbc.org/article/S0021-9258\(18\)95948-X/abstract](https://www.jbc.org/article/S0021-9258(18)95948-X/abstract)
264. Processing of protein ADP-ribosylation by Nudix hydrolases / L. Palazzo, B. Thomas, A. Jemth, T. Colby, O. Leidecker, K. L. H. Feijs, R. Zaja, O. Loseva, J. C. Puigvert, I. Matic, T. Helleday, I. Ahel // *The Biochemical Journal*. – 2015. – Vol. 468, N 2. – P. 293–301. – DOI: 10.1042/BJ20141554
265. Nudix hydrolases degrade protein-conjugated ADP-ribose / C. M. Daniels, P. Thirawatananond, S. Ong, S. B. Gabelli, A. K. L. Leung // *Scientific Reports*. – 2015. – Vol. 5. – P. 18271. – DOI: 10.1038/srep18271
266. Williams, J. C. Glutamyl ribose 5-phosphate storage disease. A hereditary defect in the degradation of poly(ADP-ribosylated) proteins / J. C. Williams, J. P. Chambers, J. G. Liehr // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1984. – Vol. 259, N 2. – P. 1037–1042.

267. Poly(etheno ADP-ribose) blocks poly(ADP-ribose) glycohydrolase activity / M. Shirato, S. Tozawa, D. Maeda, M. Watanabe, H. Nakagama, M. Masutani // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2007. – Vol. 355, N 2. – P. 451–456. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.01.171
268. Bessman, M. J. The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes / M. J. Bessman, D. N. Frick, S. F. O'Handley // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol. 271, N 41. – P. 25059–25062. – DOI: 10.1074/jbc.271.41.25059
269. Poly(ADP-ribose) catabolism triggers AMP-dependent mitochondrial energy failure / L. Formentini, A. Macchiarulo, G. Cipriani, E. Camaioni, E. Rapizzi, R. Pellicciari, F. Moroni, A. Chiarugi // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2009. – Vol. 284, N 26. – P. 17668–17676. – DOI: 10.1074/jbc.M109.002931
270. PARP-1 modulation of mTOR signaling in response to a DNA alkylating agent / C. Ethier, M. Tardif, L. Arul, G. G. Poirier // *PloS One*. – 2012. – Vol. 7, N 10. – P. e47978. – DOI: 10.1371/journal.pone.0047978
271. ADP-ribose-derived nuclear ATP synthesis by NUDIX5 is required for chromatin remodeling / R. H. G. Wright, A. Lioutas, F. Le Dily, D. Soronellas, A. Pohl, J. Bonet, A. S. Nacht, S. Samino, J. Font-Mateu, G. P. Vicent, M. Wierer, M. A. Trabado, C. Schelhorn, C. Carolis, M. J. Macias, O. Yanes, B. Oliva, M. Beato // *Science (New York, N.Y.)*. – 2016. – Vol. 352, N 6290. – P. 1221–1225. – DOI: 10.1126/science.aad9335
272. ENPP1 processes protein ADP-ribosylation in vitro / L. Palazzo, C. M. Daniels, J. E. Nettleship, N. Rahman, R. L. McPherson, S. Ong, K. Kato, O. Nureki, A. K. L. Leung, I. Ahel // *The FEBS journal*. – 2016. – Vol. 283, N 18. – P. 3371–3388. – DOI: 10.1111/febs.13811
273. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains of p53 and alters its DNA binding functions / M. Malanga, J. M. Pleschke, H. E. Kleczkowska, F. R. Althaus // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1998. – Vol. 273, N 19. – P. 11839–11843. – DOI: 10.1074/jbc.273.19.11839
274. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins / J. M. Pleschke, H. E. Kleczkowska, M. Strohm, F. R. Althaus // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2000. – Vol. 275, N 52. – P. 40974–40980. – DOI: 10.1074/jbc.M006520200
275. Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes / J. Gagné, M. Isabelle, K. S. Lo, S. Bourassa, M. J. Hendzel, V. L. Dawson, T. M. Dawson, G. G. Poirier // *Nucleic Acids Research*. – 2008. – Vol. 36, N 22. – P. 6959–6976. – DOI: 10.1093/nar/gkn771
276. ADPriboDB: The database of ADP-ribosylated proteins / C. A. Vivello, R. Wat, C. Agrawal, H. Y. Tee, A. K. L. Leung // *Nucleic Acids Research*. – 2017. – Vol. 45, N D1. – P. D204–D209. – DOI: 10.1093/nar/gkw706
277. Solution structures of the two PBZ domains from human APLF and their interaction with poly(ADP-ribose) / S. Eustermann, C. Brockmann, P. V. Mehrotra, J. Yang, D. Loakes, S. C. West, I. Ahel, D. Neuhaus // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 17, N 2. – P. 241–243. – DOI: 10.1038/nsmb.1747
278. Poly(ADP-ribose)-binding zinc finger motifs in DNA repair/checkpoint proteins / I. Ahel, D. Ahel, T. Matsusaka, A. J. Clark, J. Pines, S. J. Boulton, S. C. West // *Nature*. – 2008. – Vol. 451, N 7174. – P. 81–85. – DOI: 10.1038/nature06420
279. The second zinc-finger domain of poly(ADP-ribose) polymerase determines specificity for single-stranded breaks in DNA / G. Gradwohl, J. M. Ménissier de Murcia, M. Molinete, F. Simonin, M. Koken, J. H. Hoeijmakers, G. Murcia // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1990. – Vol. 87, N 8. – P. 2990–2994. – DOI: 10.1073/pnas.87.8.2990
280. Structure and identification of ADP-ribose recognition motifs of APLF and role in the DNA damage response / G. Li, R. D. McCulloch, A. L. Fenton, M. Cheung, L. Meng, M. Ikura, C. A. Koch // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2010. – Vol. 107, N 20. – P. 9129–9134. – DOI: 10.1073/pnas.1000556107
281. Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1 / D. Ahel, Z. Horejsí, N. Wiechens, S. E. Polo, E. Garcia-Wilson, I. Ahel, H. Flynn, M. Skehel, S. C. West, S. P. Jackson, T. Owen-Hughes, S. J. Boulton // *Science (New York, N.Y.)*. – 2009. – Vol. 325, N 5945. – P. 1240–1243. – DOI: 10.1126/science.1177321
282. A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-ribosylation / G. Jankevicius, M. Hassler, B. Golia, V. Rybin, M. Zacharias, G. Timinszky, A. G. Ladurner // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2013. – Vol. 20, N 4. – P. 508–514. – DOI: 10.1038/nsmb.2523
283. A macrodomain-containing histone rearranges chromatin upon sensing PARP1 activation / G. Timinszky, S. Till, P. O. Hassa, M. Hothorn, G. Kustatscher, B. Nijmeijer, J. Colombelli, M. Altmeyer, E. H. K. Stelzer, K. Scheffzek, M. O. Hottiger, A. G. Ladurner // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2009. – Vol. 16, N 9. – P. 923–929. – DOI: 10.1038/nsmb.1664

284. Allosteric activation of the RNF146 ubiquitin ligase by a poly(ADP-ribosylation) signal / P. A. DaRosa, Z. Wang, X. Jiang, J. N. Pruneda, F. Cong, R. E. Klevit, W. Xu // *Nature*. – 2015. – Vol. 517, N 7533. – P. 223–226. – DOI: 10.1038/nature13826
285. Iduna is a poly(ADP-ribose) (PAR)-dependent E3 ubiquitin ligase that regulates DNA damage / H. C. Kang, Y. I. Lee, J. H. Shin, S. A. Andrabi, Z. Chi, J. P. Gagné, Y. Lee, H. S. Ko, B. D. Lee, G. G. Poirier, V. L. Dawson, T. M. Dawson // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2011. – Vol. 108, N 34. – P. 14103–14108. – DOI: 10.1073/pnas.1108799108
286. Recognition of the iso-ADP-ribose moiety in poly(ADP-ribose) by WWE domains suggests a general mechanism for poly(ADP-ribosylation)-dependent ubiquitination / Z. Wang, G. A. Michaud, Z. Cheng, Y. Zhang, T. R. Hinds, E. Fan, F. Cong, W. Xu // *Genes & Development*. – 2012. – Vol. 26, N 3. – P. 235–240. – DOI: 10.1101/gad.182618.111
287. The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms / D. Durocher, I. A. Taylor, D. Sarbassova, L. F. Haire, S. L. Westcott, S. P. Jackson, S. J. Smerdon, M. B. Yaffe // *Molecular Cell*. – 2000. – Vol. 6, N 5. – P. 1169–1182. – DOI: 10.1016/s1097-2765(00)00114-3
288. The FHA and BRCT domains recognize ADP-ribosylation during DNA damage response / M. Li, L. Lu, C. Yang, S. Wang, X. Yu // *Genes & Development*. – 2013. – Vol. 27, N 16. – P. 1752–1768. – DOI: 10.1101/gad.226357.113
289. The XRCC1 phosphate-binding pocket binds poly (ADP-ribose) and is required for XRCC1 function / C. Breslin, P. Hornyak, A. Ridley, S. L. Rulten, H. Hanzlikova, A. W. Oliver, K. W. Caldecott // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – Vol. 43, N 14. – P. 6934–6944. – DOI: 10.1093/nar/gkv623
290. Li, M. Function of BRCA1 in the DNA damage response is mediated by ADP-ribosylation / M. Li, X. Yu // *Cancer Cell*. – 2013. – Vol. 23, N 5. – P. 693–704. – DOI: 10.1016/j.ccr.2013.03.025
291. Murzin, A. G. OB(oligonucleotide/oligosaccharide binding)-fold: common structural and functional solution for non-homologous sequences / A. G. Murzin // *The EMBO journal*. – 1993. – Vol. 12, N 3. – P. 861–867.
292. Flynn, R. L. Oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold proteins: a growing family of genome guardians / R. L. Flynn, L. Zou // *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. – 2010. – Vol. 45, N 4. – P. 266–275. – DOI: 10.3109/10409238.2010.488216
293. The oligonucleotide/oligosaccharide-binding fold motif is a poly(ADP-ribose)-binding domain that mediates DNA damage response / F. Zhang, Y. Chen, M. Li, X. Yu // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2014. – Vol. 111, N 20. – P. 7278–7283. – DOI: 10.1073/pnas.1318367111
294. Poly(ADP-Ribose) Mediates the BRCA2-Dependent Early DNA Damage Response / F. Zhang, J. Shi, C. Bian, X. Yu // *Cell Reports*. – 2015. – Vol. 13, N 4. – P. 678–689. – DOI: 10.1016/j.celrep.2015.09.040
295. Maris, C. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression / C. Maris, C. Dominguez, F. H. Allain // *The FEBS journal*. – 2005. – Vol. 272, N 9. – P. 2118–2131. – DOI: 10.1111/j.1742-4658.2005.04653.x
296. A genome-wide homologous recombination screen identifies the RNA-binding protein RBMX as a component of the DNA-damage response / B. Adamson, A. Smogorzewska, F. D. Sigoillot, R. W. King, S. J. Elledge // *Nature Cell Biology*. – 2012. – Vol. 14, N 3. – P. 318–328. – DOI: 10.1038/ncb2426
297. A proteomic approach to the identification of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins as a new family of poly(ADP-ribose)-binding proteins / J. Gagné, J. M. Hunter, B. Labrecque, B. Chabot, G. G. Poirier // *The Biochemical Journal*. – 2003. – Vol. 371, N Pt 2. – P. 331–340. – DOI: 10.1042/BJ20021675
298. A Systematic Analysis of Factors Localized to Damaged Chromatin Reveals PARP-Dependent Recruitment of Transcription Factors / L. Izhar, B. Adamson, A. Ciccia, J. Lewis, L. Pontano-Vaites, Y. Leng, A. C. Liang, T. F. Westbrook, J. W. Harper, S. J. Elledge // *Cell Reports*. – 2015. – Vol. 11, N 9. – P. 1486–1500. – DOI: 10.1016/j.celrep.2015.04.053
299. PARP activation regulates the RNA-binding protein NONO in the DNA damage response to DNA double-strand breaks / J. Krietsch, M. Caron, J. Gagné, C. Ethier, J. Vignard, M. Vincent, M. Rouleau, M. J. Hendzel, G. G. Poirier, J. Masson // *Nucleic Acids Research*. – 2012. – Vol. 40, N 20. – P. 10287–10301. – DOI: 10.1093/nar/gks798
300. The PIN-domain ribonucleases and the prokaryotic VapBC toxin-antitoxin array / V. L. Arcus, J. L. McKenzie, J. Robson, G. M. Cook // *Protein engineering, design & selection: PEDS*. – 2011. – Vol. 24, N 1-2. – P. 33–40. – DOI: 10.1093/protein/gzq081

301. The PIN domain of EXO1 recognizes poly(ADP-ribose) in DNA damage response / F. Zhang, J. Shi, S. Chen, C. Bian, X. Yu // *Nucleic Acids Research*. – 2015. – Vol. 43, N 22. – P. 10782–10794. – DOI: 10.1093/nar/gkv939. – URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4678857/>
302. Shepard, P. J. The SR protein family / P. J. Shepard, K. J. Hertel // *Genome Biology*. – 2009. – Vol. 10, N 10. – P. 242. – DOI: 10.1186/gb-2009-10-10-242. – URL: <https://doi.org/10.1186/gb-2009-10-10-242>
303. Quantitative proteomics and dynamic imaging reveal that G3BP-mediated stress granule assembly is poly(ADP-ribose)-dependent following exposure to MNNG-induced DNA alkylation / M. Isabelle, J. Gagné, I. Gallouzi, G. G. Poirier // *Journal of Cell Science*. – 2012. – Vol. 125, N Pt 19. – P. 4555–4566. – DOI: 10.1242/jcs.106963
304. Poly(ADP-ribose) binds to the splicing factor ASF/SF2 and regulates its phosphorylation by DNA topoisomerase I / M. Malanga, A. Czubyaty, A. Girstun, K. Staron, F. R. Althaus // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283, N 29. – P. 19991–19998. – DOI: 10.1074/jbc.M709495200
305. Poly(ADP-ribose) regulates stress responses and microRNA activity in the cytoplasm / A. K. L. Leung, S. Vyas, J. E. Rood, A. Bhutkar, P. A. Sharp, P. Chang // *Molecular Cell*. – 2011. – Vol. 42, N 4. – P. 489–499. – DOI: 10.1016/j.molcel.2011.04.015
306. A Liquid to Solid Phase Transition Underlying Pathological Huntingtin Exon1 Aggregation / T. R. Peskett, F. Rau, J. O'Driscoll, R. Patani, A. R. Lowe, H. R. Saibil // *Molecular Cell*. – 2018. – Vol. 70, N 4. – P. 588–601.e6. – DOI: 10.1016/j.molcel.2018.04.007
307. Liquid demixing of intrinsically disordered proteins is seeded by poly(ADP-ribose) / M. Altmeyer, K. J. Neelsen, F. Teloni, I. Pozdnyakova, S. Pellegrino, M. Grøfte, M. D. Rask, W. Streicher, S. Jungmichel, M. L. Nielsen, J. Lukas // *Nature Communications*. – 2015. – Vol. 6. – P. 8088. – DOI: 10.1038/ncomms9088
308. WHITBY, A. J. Poly(Adenosine Diphosphate Ribose) in Wheat / A. J. WHITBY, W. J. D. WHISH // *Biochemical Society Transactions*. – 1977. – Vol. 5, N 4. – P. 948–949. – DOI: 10.1042/bst0050948
309. WHITBY, A. J. Poly(Adenosine Diphosphate Ribose) Glycohydrolase in Germinating Wheat Embryos / A. J. WHITBY, W. J. D. WHISH // *Biochemical Society Transactions*. – 1978. – Vol. 6, N 3. – P. 619–620. – DOI: 10.1042/bst0060619
310. Whitby, A. J. Effect of polyamines and Mg<sup>++</sup> on poly(ADP-ribose) synthesis and ADP-ribosylation of histones in wheat / A. J. Whitby, P. R. Stone, W. J. D. Whish // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1979. – Vol. 90, N 4. – P. 1295–1304. – DOI: 10.1016/0006-291X(79)91177-X
311. Payne, J. F. Cytological detection of poly (ADP-ribose) polymerase / J. F. Payne, A. K. Bal // *Experimental Cell Research*. – 1976. – Vol. 99, N 2. – P. 428–432. – DOI: 10.1016/0014-4827(76)90601-7
312. Willmitzer, L. Demonstration of in vitro covalent modification of chromosomal proteins by poly(ADP) ribosylation in plant nuclei / L. Willmitzer // *FEBS letters*. – 1979. – Vol. 108, N 1. – P. 13–16. – DOI: 10.1016/0014-5793(79)81167-9
313. Chen, Y. Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Plant Nuclei / Y. Chen, S. Shall, M. O'farrell // *European Journal of Biochemistry*. – 1994. – Vol. 224, N 1. – P. 135–142. – DOI: 10.1111/j.1432-1033.1994.tb20004.x
314. Characterization of an Arabidopsis thaliana cDNA homologue to animal poly(ADP-ribose) polymerase / L. Lepiniec, E. Babiychuk, S. Kushnir, M. Van Montagu, D. Inzé // *FEBS letters*. – 1995. – Vol. 364, N 2. – P. 103–108. – DOI: 10.1016/0014-5793(95)00335-7
315. Aravind, L. SAP – a putative DNA-binding motif involved in chromosomal organization / L. Aravind, E. V. Koonin // *Trends in Biochemical Sciences*. – 2000. – Vol. 25, № 3. – P. 112–114. – DOI: 10.1016/S0968-0004(99)01537-6
316. Higher plants possess two structurally different poly(ADP-ribose) polymerases / E. Babiychuk, P. B. Cottrill, S. Storozhenko, M. Fuangthong, Y. Chen, M. K. O'Farrell, M. Van Montagu, D. Inzé, S. Kushnir // *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. – 1998. – Vol. 15, N 5. – P. 635–645. – DOI: 10.1046/j.1365-313x.1998.00240.x
317. PARP2 Is the Predominant Poly(ADP-Ribose) Polymerase in Arabidopsis DNA Damage and Immune Responses / J. Song, B. D. Keppler, R. R. Wise, A. F. Bent // *PLOS Genetics*. – 2015. – Vol. 11, N 5. – P. e1005200. – DOI: 10.1371/journal.pgen.1005200
318. Analysis of knockout mutants reveals non-redundant functions of poly(ADP-ribose)polymerase isoforms in Arabidopsis / P. A. Pham, V. Wahl, T. Tohge, L. R. Souza, Y. Zhang, P. T. Do, J. J. Olas, M. Stitt, W. L. Araújo, A. R. Fernie // *Plant Molecular Biology*. – 2015. – Vol. 89, N 4-5. – P. 319–338. – DOI: 10.1007/s11103-015-0363-5
319. Nuclear Import of Arabidopsis Poly(ADP-Ribose) Polymerase 2 Is Mediated by Importin- $\alpha$  and a Nuclear Localization Sequence Located Between the Predicted SAP Domains / C. Chen, R. D. Masi, R. Lintermann, L. Wirthmueller // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1581.

320. Ionising radiation induces the expression of PARP-1 and PARP-2 genes in Arabidopsis / G. Doucet-Chabeaud, C. Godon, C. Brutesco, G. Murcia, M. Kazmaier // *Molecular genetics and genomics: MGG.* – 2001. – Vol. 265, N 6. – P. 954–963. – DOI: 10.1007/s004380100506
321. Rissel, D. A yeast growth assay to characterize plant poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) proteins and inhibitors / D. Rissel, P. P. Heym, E. Peiter // *Analytical Biochemistry.* – 2017. – Vol. 527. – P. 20–23. – DOI: 10.1016/j.ab.2017.04.002
322. Protein poly(ADP-ribosyl)ation regulates arabidopsis immune gene expression and defense responses / B. Feng, C. Liu, M. V. V. Oliveira, A. C. Intorne, B. Li, K. Babilonia, G. A. Souza Filho, L. Shan, P. He // *PLoS genetics.* – 2015. – Vol. 11, N 1. – P. e1004936. – DOI: 10.1371/journal.pgen.1004936
323. Hunt, L. NAD – new roles in signalling and gene regulation in plants / L. Hunt, F. Lerner, M. Ziegler // *New Phytologist.* – 2004. – T. 163, № 1. – C. 31–44. – DOI: 10.1111/j.1469-8137.2004.01087.x
324. Rissel, D. The nuclear protein Poly(ADP-ribose) polymerase 3 (AtPARP3) is required for seed storability in Arabidopsis thaliana / D. Rissel, J. Losch, E. Peiter // *Plant Biology.* – 2014. – Vol. 16, N 6. – P. 1058–1064. – DOI: 10.1111/plb.12167
325. Overexpression of an ADP-ribose pyrophosphatase, *AtNUDX2*, confers enhanced tolerance to oxidative stress in Arabidopsis plants / T. Ogawa, K. Ishikawa, K. Harada, E. Fukusaki, K. Yoshimura, S. Shigeoka // *The Plant Journal.* – 2009. – Vol. 57, N 2. – P. 289–301. – DOI: 10.1111/j.1365-313X.2008.03686.x
326. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase/PARP1 and PARP2 identified using a cell-based screen in yeast / E. Perkins, D. Sun, A. Nguyen, S. Tulac, M. Francesco, H. Tavana, H. Nguyen, S. Tugendreich, P. Barthmaier, J. Couto, E. Yeh, S. Thode, K. Jarnagin, A. Jain, D. Morgans, T. Melese // *Cancer Research.* – 2001. – Vol. 61, N 10. – P. 4175–4183.
327. No Silver Bullet - Canonical Poly(ADP-Ribose) Polymerases (PARPs) Are No Universal Factors of Abiotic and Biotic Stress Resistance of Arabidopsis thaliana / D. Rissel, P. P. Heym, K. Thor, W. Brandt, L. A. Wessjohann, E. Peiter // *Frontiers in Plant Science.* – 2017. – Vol. 8. – P. 59. – DOI: 10.3389/fpls.2017.00059
328. Arabidopsis PARG1 is the key factor promoting cell survival among the enzymes regulating post-translational poly(ADP-ribosyl)ation / H. Zhang, Z. Gu, Q. Wu, L. Yang, C. Liu, H. Ma, Y. Xia, X. Ge // *Scientific Reports.* – 2015. – Vol. 5. – P. 15892. – DOI: 10.1038/srep15892
329. Panda, S. Defines a Role for Poly(ADP-Ribosyl)ation in Establishing Period Length of the Arabidopsis Circadian Oscillator / S. Panda, G. G. Poirier, S. A. Kay // *Developmental Cell.* – 2002. – Vol. 3, N 1. – P. 51–61. – DOI: 10.1016/S1534-5807(02)00200-9
330. Analysis of Poly(ADP-Ribose) Polymerases in Arabidopsis Telomere Biology / K. A. Boltz, M. Jasti, J. M. Townley, D. E. Shippen // *PLOS ONE.* – 2014. – Vol. 9, N 2. – P. e88872. – DOI: 10.1371/journal.pone.0088872
331. AtMMS21 regulates DNA damage response and homologous recombination repair in Arabidopsis / D. Yuan, J. Lai, P. Xu, S. Zhang, J. Zhang, C. Li, Y. Wang, J. Du, Y. Liu, C. Yang // *DNA repair.* – 2014. – Vol. 21. – P. 140–147. – DOI: 10.1016/j.dnarep.2014.04.006
332. Alleles of newly identified barley gene HvPARP3 exhibit changes in efficiency of DNA repair / M. Stolarek, D. Gruszka, A. Braszewska-Zalewska, M. Maluszynski // *DNA repair.* – 2015. – Vol. 28. – P. 116–130. – DOI: 10.1016/j.dnarep.2015.02.018
333. Poly(ADP-ribose) polymerases regulate cell division and development in Arabidopsis roots / C. Liu, Q. Wu, W. Liu, Z. Gu, W. Wang, P. Xu, H. Ma, X. Ge // *Journal of Integrative Plant Biology.* – 2017. – Vol. 59, N 7. – P. 459–474. – DOI: 10.1111/jipb.12530
334. Arena, C. Growth alteration and leaf biochemical responses in Phaseolus vulgaris exposed to different doses of ionising radiation / C. Arena, V. De Micco, A. De Maio // *Plant Biology (Stuttgart, Germany).* – 2014. – Vol. 16 Suppl 1. – P. 194–202. – DOI: 10.1111/plb.12076
335. Poly(ADP-ribose) polymerases are involved in microhomology mediated back-up non-homologous end joining in Arabidopsis thaliana / Q. Jia, A. Dulk-Ras, H. Shen, P. J. J. Hooykaas, S. Pater // *Plant Molecular Biology.* – 2013. – Vol. 82, N 4-5. – P. 339–351. – DOI: 10.1007/s11103-013-0065-9
336. The DNA translocase RAD5A acts independently of the other main DNA repair pathways, and requires both its ATPase and RING domain for activity in Arabidopsis thaliana / T. Klemm, A. Mannuß, D. Kobbe, A. Knoll, O. Trapp, A. Dorn, H. Puchta // *The Plant Journal.* – 2017. – Vol. 91, N 4. – P. 725–740. – DOI: 10.1111/tbj.13602
337. Song, J. Microbial Pathogens Trigger Host DNA Double-Strand Breaks Whose Abundance Is Reduced by Plant Defense Responses / J. Song, A. F. Bent // *PLOS Pathogens.* – 2014. – Vol. 10, N 4. – P. e1004030. – DOI: 10.1371/journal.ppat.1004030

338. Arabidopsis WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint / K. De Schutter, J. Joubès, T. Cools, A. Verkest, F. Corellou, E. Babiychuk, E. Van Der Schueren, T. Beeckman, S. Kushnir, D. Inzé, L. De Veylder // *The Plant Cell*. – 2007. – Vol. 19, N 1. – P. 211–225. – DOI: 10.1105/tpc.106.045047
339. Genotoxic stress in plants: shedding light on DNA damage, repair and DNA repair helicases / N. Tuteja, P. Ahmad, B. B. Panda, R. Tuteja // *Mutation Research*. – 2009. – Vol. 681, N 2-3. – P. 134–149. – DOI: 10.1016/j.mrrev.2008.06.004
340. Intrachromosomal homologous recombination in whole plants / P. Swoboda, S. Gal, B. Hohn, H. Puchta // *The EMBO journal*. – 1994. – Vol. 13, N 2. – P. 484–489. – DOI: 10.1002/j.1460-2075.1994.tb06283.x
341. Modulation of the poly(ADP-ribosyl)ation reaction via the Arabidopsis ADP-ribose/NADH pyrophosphohydrolase, AtNUDX7, is involved in the response to oxidative stress / K. Ishikawa, T. Ogawa, E. Hirose, Y. Nakayama, K. Harada, E. Fukusaki, K. Yoshimura, S. Shigeoka // *Plant Physiology*. – 2009. – Vol. 151, N 2. – P. 741–754. – DOI: 10.1104/pp.109.140442
342. CRISPR/Cas9-Induced Double-Strand Break Repair in Arabidopsis Nonhomologous End-Joining Mutants / H. Shen, G. D. Strunks, B. J. P. M. Klemann, P. J. J. Hooykaas, S. Pater // *G3 Genes|Genomes|Genetics*. – 2017. – Vol. 7, N 1. – P. 193–202. – DOI: 10.1534/g3.116.035204
343. Spampinato, C. P. Protecting DNA from errors and damage: an overview of DNA repair mechanisms in plants compared to mammals / C. P. Spampinato // *Cellular and Molecular Life Sciences*. – 2017. – Vol. 74, N 9. – P. 1693–1709. – DOI: 10.1007/s00018-016-2436-2
344. Mapping Metabolic and Transcript Temporal Switches during Germination in Rice Highlights Specific Transcription Factors and the Role of RNA Instability in the Germination Process / K. A. Howell, R. Narsai, A. Carroll, A. Ivanova, M. Lohse, B. Usadel, A. H. Millar, J. Whelan // *Plant Physiology*. – 2009. – Vol. 149, N 2. – P. 961–980. – DOI: 10.1104/pp.108.129874
345. Hunt, L. Nicotinamidase activity is important for germination / L. Hunt, M. J. Holdsworth, J. E. Gray // *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. – 2007. – Vol. 51, N 3. – P. 341–351. – DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03151.x
346. Hunt, L. The relationship between pyridine nucleotides and seed dormancy / L. Hunt, J. E. Gray // *The New Phytologist*. – 2009. – Vol. 181, N 1. – P. 62–70. – DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02641.x
347. Staying Alive: Molecular Aspects of Seed Longevity / N. Sano, L. Rajjou, H. M. North, I. Debeaujon, A. Marion-Poll, M. Seo // *Plant & Cell Physiology*. – 2016. – Vol. 57, N 4. – P. 660–674. – DOI: 10.1093/pcp/pcv186
348. NAD<sup>+</sup> Biosynthesis and Signaling in Plants / B. Gakière, J. Hao, L. Bont, P. Pétriacq, A. Nunes-Nesi, A. R. Fernie // *Critical Reviews in Plant Sciences*. – 2018. – Vol. 37, N 4. – P. 259–307. – DOI: 10.1080/07352689.2018.1505591
349. Nicotinate O-Glucosylation Is an Evolutionarily Metabolic Trait Important for Seed Germination under Stress Conditions in Arabidopsis thaliana / W. Li, F. Zhang, Y. Chang, T. Zhao, M. E. Schranz, G. Wang // *The Plant Cell*. – 2015. – Vol. 27, N 7. – P. 1907–1924. – DOI: 10.1105/tpc.15.00223
350. Adams-Phillips, L. Disruption of poly(ADP-ribosyl)ation mechanisms alters responses of Arabidopsis to biotic stress / L. Adams-Phillips, A. G. Briggs, A. F. Bent // *Plant Physiology*. – 2010. – Vol. 152, N 1. – P. 267–280. – DOI: 10.1104/pp.109.148049
351. A transcriptomics approach uncovers novel roles for poly(ADP-ribosyl)ation in the basal defense response in Arabidopsis thaliana / A. G. Briggs, L. C. Adams-Phillips, B. D. Keppler, S. G. Zebell, K. C. Arend, A. A. Apfelbaum, J. A. Smith, A. F. Bent // *PloS One*. – 2017. – Vol. 12, N 12. – P. e0190268. – DOI: 10.1371/journal.pone.0190268
352. Babiychuk, E. N-terminal domains of plant poly(ADP-ribose) polymerases define their association with mitotic chromosomes / E. Babiychuk, M. Van Montagu, S. Kushnir // *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. – 2001. – Vol. 28, N 3. – P. 245–255. – DOI: 10.1046/j.1365-313x.2001.01143.x
353. Arabidopsis coactivator ALY-like proteins, DIP1 and DIP2, interact physically with the DNA-binding domain of the Zn-finger poly(ADP-ribose) polymerase / S. S. I. D. V. M. M. K. S // *Journal of experimental botany*. – 2001. – Vol. 52, N 359. – P. 1375–80.
354. An alternative telomerase RNA in Arabidopsis modulates enzyme activity in response to DNA damage / C. Cifuentes-Rojas, A. D. L. Nelson, K. A. Boltz, K. Kannan, X. She, D. E. Shippen // *Genes & Development*. – 2012. – Vol. 26, N 22. – P. 2512–2523. – DOI: 10.1101/gad.202960.112
355. The involvement of poly(ADP-ribose) polymerase in the oxidative stress responses in plants / Y. Amor, E. Babiychuk, D. Inzé, A. Levine // *FEBS letters*. – 1998. – Vol. 440, N 1-2. – P. 1–7. – DOI: 10.1016/s0014-5793(98)01408-2

356. Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase and activation of caspase-3-like protease in heat shock-induced apoptosis in tobacco suspension cells / R. Tian, G. Y. Zhang, C. H. Yan, Y. R. Dai // *FEBS letters*. – 2000. – Vol. 474, N 1. – P. 11–15. – DOI: 10.1016/S0014-5793(00)01561-1
357. Plant PARPs, PARGs and PARP-like Proteins / J. P. Vainonen, A. Shapiguzov, A. Vaattovaara, J. Kangasjarvi // *Current Protein and Peptide Science*. – 2016. – Vol. 17, N 7. – P. 713–723. – DOI: 10.2174/1389203717666160419144721
358. PHILLIPS, R. Characteristics of the Inhibition of Induced Tracheary Element Differentiation by 3-Aminobenzamide and Related Compounds / R. PHILLIPS, S. W. HAWKINS // *Journal of Experimental Botany*. – 1985. – Vol. 36, N 1. – P. 119–128. – DOI: 10.1093/jxb/36.1.119
359. Pyridine Nucleotide Cycling and Control of Intracellular Redox State in Relation to Poly (ADP-Ribose) Polymerase Activity and Nuclear Localization of Glutathione during Exponential Growth of Arabidopsis Cells in Culture / T. K. Pellny, V. Locato, P. D. Vivancos, J. Markovic, L. De Gara, F. V. Pallardó, C. H. Foyer // *Molecular Plant*. – 2009. – Vol. 2, N 3. – P. 442–456. – DOI: 10.1093/mp/ssp008
360. Chemical PARP Inhibition Enhances Growth of Arabidopsis and Reduces Anthocyanin Accumulation and the Activation of Stress Protective Mechanisms / P. Schulz, J. Neukermans, K. V. D. Kelen, P. Mühlenbock, F. V. Breusegem, G. Noctor, M. Teige, M. Metzlauff, M. A. Hannah // *PLOS ONE*. – 2012. – Vol. 7, N 5. – P. e37287. – DOI: 10.1371/journal.pone.0037287
361. Poly(ADP-Ribose) Polymerase Activity Controls Plant Growth by Promoting Leaf Cell Number / P. Schulz, K. Jansseune, T. Degenkolbe, M. Méret, H. Claeys, A. Skirycz, M. Teige, L. Willmitzer, M. A. Hannah // *PLOS ONE*. – 2014. – Vol. 9, N 2. – P. e90322. – DOI: 10.1371/journal.pone.0090322
362. Discovery of ADP-ribosylation and other plant defense pathway elements through expression profiling of four different Arabidopsis-Pseudomonas R-avr interactions / L. Adams-Phillips, J. Wan, X. Tan, F. M. Dunning, B. C. Meyers, R. W. Michelmore, A. F. Bent // *Molecular plant-microbe interactions: MPMI*. – 2008. – Vol. 21, N 5. – P. 646–657. – DOI: 10.1094/MPMI-21-5-0646
363. The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses / J. Kilian, D. Whitehead, J. Horak, D. Wanke, S. Weinl, O. Batistic, C. D'Angelo, E. Bornberg-Bauer, J. Kudla, K. Harter // *The Plant Journal*. – 2007. – Vol. 50, N 2. – P. 347–363. – DOI: 10.1111/j.1365-313X.2007.03052.x
364. Transgenic Arabidopsis plants expressing the type 1 inositol 5-phosphatase exhibit increased drought tolerance and altered abscisic acid signaling / I. Y. Perera, C. Hung, C. D. Moore, J. Stevenson-Paulik, W. F. Boss // *The Plant Cell*. – 2008. – Vol. 20, N 10. – P. 2876–2893. – DOI: 10.1105/tpc.108.061374
365. F-Box Protein DOR Functions As a Novel Inhibitory Factor for Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure under Drought Stress in Arabidopsis / Y. Zhang, W. Xu, Z. Li, X. W. Deng, W. Wu, Y. Xue // *Plant Physiology*. – 2008. – Vol. 148, N 4. – P. 2121–2133. – DOI: 10.1104/pp.108.126912
366. Chan, Z. Global gene expression analysis of transgenic, mannitol-producing, and salt-tolerant Arabidopsis thaliana indicates widespread changes in abiotic and biotic stress-related genes / Z. Chan, R. Grumet, W. Loeschner // *Journal of Experimental Botany*. – 2011. – Vol. 62, N 14. – P. 4787–4803. – DOI: 10.1093/jxb/err130
367. Bhaskara, G. B. Unique Drought Resistance Functions of the Highly ABA-Induced Clade A Protein Phosphatase 2Cs / G. B. Bhaskara, T. T. Nguyen, P. E. Verslues // *Plant Physiology*. – 2012. – Vol. 160, N 1. – P. 379–395. – DOI: 10.1104/pp.112.202408
368. IAA-Ala Resistant3, an Evolutionarily Conserved Target of miR167, Mediates Arabidopsis Root Architecture Changes during High Osmotic Stress / N. Kinoshita, H. Wang, H. Kasahara, J. Liu, C. MacPherson, Y. Machida, Y. Kamiya, M. A. Hannah, N. Chua // *The Plant Cell*. – 2012. – Vol. 24, N 9. – P. 3590–3602. – DOI: 10.1105/tpc.112.097006
369. Two closely related subclass II SnRK2 protein kinases cooperatively regulate drought-inducible gene expression / M. Mizoguchi, T. Umezawa, K. Nakashima, S. Kidokoro, H. Takasaki, Y. Fujita, K. Yamaguchi-Shinozaki, K. Shinozaki // *Plant & Cell Physiology*. – 2010. – Vol. 51, N 5. – P. 842–847. – DOI: 10.1093/pcp/pcq041
370. Silencing of poly(ADP-ribose) polymerase in plants alters abiotic stress signal transduction / S. Vanderauwera, M. De Block, N. Van de Steene, B. Cotte, M. Metzlauff, F. Van Breusegem // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – Vol. 104, N 38. – P. 15150–15155. – DOI: 10.1073/pnas.0706668104
371. Sánchez, J. ABA activates ADPR cyclase and cADPR induces a subset of ABA-responsive genes in Arabidopsis / J. Sánchez, P. Duque, N. Chua // *The Plant Journal*. – 2004. – Vol. 38, N 3. – P. 381–395. – DOI: 10.1111/j.1365-313X.2004.02055.x

372. The Arabidopsis circadian clock incorporates a cADPR-based feedback loop / D. An, G. Mj, H. Ct, H. Ke, D. N, L. J, A. Jm, R. Fc, J. Mk, G. J, S. D, W. Aa // *Science (New York, N.Y.)*. – 2007. – Vol. 318, N 5857. – P. 1789–92. – DOI: 10.1126/science.1146757
373. NO-Mediated [Ca<sup>2+</sup>]<sub>cyt</sub> Increases Depend on ADP-Ribosyl Cyclase Activity in Arabidopsis / S. M. Abdul-Awal, C. T. Hotta, M. P. Davey, A. N. Dodd, A. G. Smith, A. A. R. Webb // *Plant Physiology*. – 2016. – Vol. 171, N 1. – P. 623–631. – DOI: 10.1104/pp.15.01965
374. Abscisic acid-induced stomatal closure mediated by cyclic ADP-ribose / C. P. Leckie, M. R. McAinsh, G. J. Allen, D. Sanders, A. M. Hetherington // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1998. – Vol. 95, N 26. – P. 15837–15842. – DOI: 10.1073/pnas.95.26.15837
375. Abscisic acid signaling through cyclic ADP-ribose in plants / Y. Wu, J. Kuzma, E. Maréchal, R. Graeff, H. C. Lee, R. Foster, N. H. Chua // *Science (New York, N.Y.)*. – 1997. – Vol. 278, N 5346. – P. 2126–2130. – DOI: 10.1126/science.278.5346.2126
376. Allen, G. J. Release of Ca<sup>2+</sup> from individual plant vacuoles by both InsP<sub>3</sub> and cyclic ADP-ribose / G. J. Allen, S. R. Muir, D. Sanders // *Science (New York, N.Y.)*. – 1995. – Vol. 268, N 5211. – P. 735–737. – DOI: 10.1126/science.7732384
377. Peiter, E. The plant vacuole: emitter and receiver of calcium signals / E. Peiter // *Cell Calcium*. – 2011. – Vol. 50, N 2. – P. 120–128. – DOI: 10.1016/j.ceca.2011.02.002
378. Bouché, N. Arabidopsis gene knockout: phenotypes wanted / N. Bouché, D. Bouchez // *Current Opinion in Plant Biology*. – 2001. – Vol. 4, N 2. – P. 111–117. – DOI: 10.1016/S1369-5266(00)00145-X
379. Lloyd, J. A comprehensive dataset of genes with a loss-of-function mutant phenotype in Arabidopsis / J. Lloyd, D. Meinke // *Plant Physiology*. – 2012. – Vol. 158, N 3. – P. 1115–1129. – DOI: 10.1104/pp.111.192393
380. Mt, H. Conditional root expansion mutants of Arabidopsis / H. Mt, M. A, B. Pn // *Development (Cambridge, England)*. – 1995. – Vol. 121, N 4. – P. 1237–52. – DOI: 10.1242/dev.121.4.1237
381. Kurata, T. *petit1*, a conditional growth mutant of Arabidopsis defective in sucrose-dependent elongation growth / T. Kurata, K. T. Yamamoto // *Plant Physiology*. – 1998. – Vol. 118, N 3. – P. 793–801. – DOI: 10.1104/pp.118.3.793
382. Conditional circadian dysfunction of the Arabidopsis early-flowering 3 mutant / K. A. Hicks, A. J. Millar, I. A. Carré, D. E. Somers, M. Straume, D. R. Meeks-Wagner, S. A. Kay // *Science (New York, N.Y.)*. – 1996. – Vol. 274, N 5288. – P. 790–792. – DOI: 10.1126/science.274.5288.790
383. VASCULAR ASSOCIATED DEATH1, a Novel GRAM Domain-Containing Protein, Is a Regulator of Cell Death and Defense Responses in Vascular Tissues / S. Lorrain, B. Lin, M. C. Auriac, T. Kroj, P. Saindrenan, M. Nicole, C. Balagueé, D. Roby // *The Plant Cell*. – 2004. – Vol. 16, N 8. – P. 2217–2232. – DOI: 10.1105/tpc.104.022038
384. Millar, A. A. The Arabidopsis GAMBYB-like genes, MYB33 and MYB65, are microRNA-regulated genes that redundantly facilitate anther development / A. A. Millar, F. Gubler // *The Plant Cell*. – 2005. – Vol. 17, N 3. – P. 705–721. – DOI: 10.1105/tpc.104.027920
385. Geissler, T. A Whole-Plant Microtiter Plate Assay for Drought Stress Tolerance-Inducing Effects / T. Geissler, L. A. Wessjohann // *Journal of Plant Growth Regulation*. – 2011. – Vol. 30, N 4. – P. 504–511. – DOI: 10.1007/s00344-011-9212-1
386. The N terminus of bacterial elongation factor Tu elicits innate immunity in Arabidopsis plants / G. Kunze, C. Zipfel, S. Robatzek, K. Niehaus, T. Boller, G. Felix // *The Plant Cell*. – 2004. – Vol. 16, N 12. – P. 3496–3507. – DOI: 10.1105/tpc.104.026765
387. Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin / G. Felix, J. D. Duran, S. Volko, T. Boller // *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*. – 1999. – Vol. 18, N 3. – P. 265–276. – DOI: 10.1046/j.1365-313x.1999.00265.x
388. Thor, K. Cytosolic calcium signals elicited by the pathogen-associated molecular pattern flg<sub>22</sub> in stomatal guard cells are of an oscillatory nature / K. Thor, E. Peiter // *The New Phytologist*. – 2014. – Vol. 204, N 4. – P. 873–881. – DOI: 10.1111/nph.13064
389. 3-Aminobenzamide Blocks MAMP-Induced Callose Deposition Independently of Its Poly(ADP-ribose) Polymerase Inhibiting Activity / B. D. Keppler, J. Song, J. Nyman, C. A. Voigt, A. F. Bent // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – Vol. 9. – P. 1907.
390. UV-B- and oxidative stress-induced increase in nicotinamide and trigonelline and inhibition of defensive metabolism induction by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor in plant tissue / T. Berglund, G. Kalbin, Å. Strid, J. Rydström, A. B. Ohlsson // *FEBS Letters*. – 1996. – Vol. 380, N 1-2. – P. 188–193. – DOI: 10.1016/0014-5793(96)00027-0



391. PARylation of the forkhead-associated domain protein DAWDLE regulates plant immunity / B. Feng, S. Ma, S. Chen, N. Zhu, S. Zhang, B. Yu, Y. Yu, B. Le, X. Chen, S. P. Dinesh-Kumar, L. Shan, P. He // *EMBO reports*. – 2016. – Vol. 17, N 12. – P. 1799–1813. – DOI: 10.15252/embr.201642486
392. Arabidopsis RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 belongs to the WWE protein-protein interaction domain protein family and modulates abscisic acid, ethylene, and methyl jasmonate responses / R. Ahlfors, S. Lång, K. Overmyer, P. Jaspers, M. Brosché, A. Tauriainen, H. Kollist, H. Tuominen, E. Belles-Boix, M. Piippo, D. Inzé, E. T. Palva, J. Kangasjärvi // *The Plant Cell*. – 2004. – Vol. 16, N 7. – P. 1925–1937. – DOI: 10.1105/tpc.021832
393. The RST and PARP-like domain containing SRO protein family: analysis of protein structure, function and conservation in land plants / P. Jaspers, K. Overmyer, M. Wrzaczek, J. P. Vainonen, T. Blomster, J. Salojärvi, R. A. Reddy, J. Kangasjärvi // *BMC Genomics*. – 2010. – Vol. 11. – P. 170. – DOI: 10.1186/1471-2164-11-170
394. Special member of the rice SRO family, OsSRO1c, mediates responses to multiple abiotic stresses through interaction with various transcription factors / J. You, W. Zong, H. Du, H. Hu, L. Xiong // *Plant molecular biology*. – 2014. – Vol. 84, N 6 – P. 693-705.
395. CEO1, a new protein from Arabidopsis thaliana, protects yeast against oxidative damage 1 / E. Belles-Boix, E. Babiychuk, M. Van Montagu, D. Inzé, S. Kushnir // *FEBS Letters*. – 2000. – Vol. 482, N 1-2. – P. 19–24. – DOI: 10.1016/S0014-5793(00)02016-0
396. Unequally redundant RCD1 and SRO1 mediate stress and developmental responses and interact with transcription factors / P. Jaspers, T. Blomster, M. Brosche, J. Salojarvi, R. Ahlfors, J. P. Vainonen, R. A. Reddy, R. Immink, G. Angenent, F. Turck, K. Overmyer, J. Kangasjarvi // *Plant Journal*. – 2009. – Vol. 60, N 2. – P. 268–279. – DOI: 10.1111/j.1365-313X.2009.03951.x
397. A Wheat SIMILAR TO RCD-ONE Gene Enhances Seedling Growth and Abiotic Stress Resistance by Modulating Redox Homeostasis and Maintaining Genomic Integrity[C][W] / S. Liu, S. Liu, M. Wang, T. Wei, C. Meng, M. Wang, G. Xia // *The Plant Cell*. – 2014. – Vol. 26, N 1. – P. 164–180. – DOI: 10.1105/tpc.113.118687
398. Ozone-sensitive arabidopsis rcd1 mutant reveals opposite roles for ethylene and jasmonate signaling pathways in regulating superoxide-dependent cell death / K. Overmyer, H. Tuominen, R. Kettunen, C. Betz, C. Langebartels, H. Sandermann, J. Kangasjärvi // *The Plant Cell*. – 2000. – Vol. 12, N 10. – P. 1849–1862. – DOI: 10.1105/tpc.12.10.1849
399. A Methyl Viologen-Resistant Mutant of Arabidopsis, Which Is Allelic to Ozone-Sensitive rcd1, Is Tolerant to Supplemental Ultraviolet-B Irradiation / T. Fujibe, H. Saji, K. Arakawa, N. Yabe, Y. Takeuchi, K. T. Yamamoto // *Plant Physiology*. – 2004. – Vol. 134, N 1. – P. 275–285. – DOI: 10.1104/pp.103.033480
400. Teotia, S. The paralogous genes RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 and SIMILAR TO RCD ONE1 have partially redundant functions during Arabidopsis development / S. Teotia, R. S. Lamb // *Plant Physiology*. – 2009. – Vol. 151, N 1. – P. 180–198. – DOI: 10.1104/pp.109.142786
401. Overexpression of the RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 (RCD1) gene of Arabidopsis causes weak rcd1 phenotype with compromised oxidative-stress responses / T. Fujibe, H. Saji, M. K. Watahiki, K. T. Yamamoto // *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. – 2006. – Vol. 70, N 8. – P. 1827–1831. – DOI: 10.1271/bbb.50673
402. The plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter SOS1 interacts with RCD1 and functions in oxidative stress tolerance in Arabidopsis / S. Katiyar-Agarwal, J. Zhu, K. Kim, M. Agarwal, X. Fu, A. Huang, J. Zhu // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103, N 49. – P. 18816–18821. – DOI: 10.1073/pnas.0604711103
403. Ozone-induced programmed cell death in the Arabidopsis radical-induced cell death1 mutant / K. Overmyer, M. Brosché, R. Pellinen, T. Kuittinen, H. Tuominen, R. Ahlfors, M. Keinänen, M. Saarma, D. Scheel, J. Kangasjärvi // *Plant Physiology*. – 2005. – Vol. 137, N 3. – P. 1092–1104. – DOI: 10.1104/pp.104.055681
404. Arabidopsis radical-induced cell death1 is involved in UV-B signaling / L. Jiang, Y. Wang, L. O. Björn, S. Li // *Photochemical & Photobiological Sciences: Official Journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*. – 2009. – Vol. 8, N 6. – P. 838–846. – DOI: 10.1039/b901187k
405. Arabidopsis downy mildew effector HaRxL106 suppresses plant immunity by binding to RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 / L. Wirthmueller, S. Asai, G. Rallapalli, J. Sklenar, G. Fabro, D. S. Kim, R. Lintermann, P. Jaspers, M. Wrzaczek, J. Kangasjärvi, D. MacLean, F. L. H. Menke, M. J. Banfield, J. D. G. Jones // *New Phytologist*. – 2018. – Vol. 220, N 1. – P. 232–248. – DOI: 10.1111/nph.15277

406. Metacaspase-8 Modulates Programmed Cell Death Induced by Ultraviolet Light and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Arabidopsis\* / R. He, G. E. Drury, V. I. Rotari, A. Gordon, M. Willer, T. Farzaneh, E. J. Woltering, P. Gallois // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283, N 2. – P. 774–783. – DOI: 10.1074/jbc.M704185200
407. Transcriptomics and Functional Genomics of ROS-Induced Cell Death Regulation by RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 / M. Brosché, T. Blomster, J. Salojärvi, F. Cui, N. Sipari, J. Leppälä, A. Lamminmäki, G. Tomai, S. Narayanasamy, R. A. Reddy, M. Keinänen, K. Overmyer, J. Kangasjärvi // *PLOS Genetics*. – 2014. – Vol. 10, N 2. – P. e1004112. – DOI: 10.1371/journal.pgen.1004112
408. Disease Resistance Gene-Induced Growth Inhibition Is Enhanced by rcd1 Independent of Defense Activation in Arabidopsis / Y. Zhu, B. Du, J. Qian, B. Zou, J. Hua // *Plant Physiology*. – 2013. – Vol. 161, N 4. – P. 2005–2013. – DOI: 10.1104/pp.112.213363
409. Pelagio-Flores, R. Serotonin modulates Arabidopsis root growth via changes in reactive oxygen species and jasmonic acid–ethylene signaling / R. Pelagio-Flores, L. F. Ruiz-Herrera, J. López-Bucio // *Physiologia Plantarum*. – 2016. – Vol. 158, N 1. – P. 92–105. – DOI: 10.1111/ppl.12429
410. Irani, S. Exogenous allantoin increases Arabidopsis seedlings tolerance to NaCl stress and regulates expression of oxidative stress response genes / S. Irani, C. D. Todd // *Journal of Plant Physiology*. – 2018. – Vol. 221. – P. 43–50. – DOI: 10.1016/j.jplph.2017.11.011
411. The radical induced cell death protein 1 (RCD1) supports transcriptional activation of genes for chloroplast antioxidant enzymes / H. Hiltcher, R. Rudnik, J. Shaikhali, I. Heiber, M. Mellenthin, I. Meirelles Duarte, G. Schuster, U. Kahmann, M. Baier // *Frontiers in Plant Science*. – 2014. – Vol. 5. – P. 475. – DOI: 10.3389/fpls.2014.00475
412. Senescence-associated barley NAC (NAM, ATAF1,2, CUC) transcription factor interacts with radical-induced cell death 1 through a disordered regulatory domain / T. Kjaersgaard, M. K. Jensen, M. W. Christiansen, P. Gregersen, B. B. Kragelund, K. Skriver // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2011. – Vol. 286, N 41. – P. 35418–35429. – DOI: 10.1074/jbc.M111.247221
413. RCD1-DREB2A interaction in leaf senescence and stress responses in Arabidopsis thaliana / J. P. Vainonen, P. Jaspers, M. Wrzaczek, A. Lamminmäki, R. A. Reddy, L. Vaahtera, M. Brosché, J. Kangasjärvi // *The Biochemical Journal*. – 2012. – Vol. 442, N 3. – P. 573–581. – DOI: 10.1042/BJ20111739
414. Dual function of an Arabidopsis transcription factor DREB2A in water-stress-responsive and heat-stress-responsive gene expression / Y. Sakuma, K. Maruyama, F. Qin, Y. Osakabe, K. Shinozaki, K. Yamaguchi-Shinozaki // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2006. – Vol. 103, N 49. – P. 18822–18827. – DOI: 10.1073/pnas.0605639103
415. The transcription factor interacting protein RCD1 contains a novel conserved domain / P. Jaspers, M. Brosché, K. Overmyer, J. Kangasjärvi // *Plant Signaling & Behavior*. – 2010. – Vol. 5, N 1. – P. 78–80. – DOI: 10.4161/psb.5.1.10293
416. <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR chemical shift assignments of A. thaliana RCD1 RST / H. Tossavainen, M. Hellman, J. P. Vainonen, J. Kangasjärvi, P. Permi // *Biomolecular NMR Assignments*. – 2017. – Vol. 11, N 2. – P. 207–210. – DOI: 10.1007/s12104-017-9749-4
417. Structures and Short Linear Motif of Disordered Transcription Factor Regions Provide Clues to the Interactome of the Cellular Hub Protein Radical-induced Cell Death1 / C. O'Shea, L. Staby, S. K. Bendtsen, F. G. Tidemand, A. Redsted, M. Willemoës, B. B. Kragelund, K. Skriver // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2017. – Vol. 292, N 2. – P. 512–527. – DOI: 10.1074/jbc.M116.753426
418. Kragelund, B. B. Order by disorder in plant signaling / B. B. Kragelund, M. K. Jensen, K. Skriver // *Trends in Plant Science*. – 2012. – Vol. 17, N 11. – P. 625–632. – DOI: 10.1016/j.tplants.2012.06.010
419. Teotia, S. RCD1 and SRO1 are necessary to maintain meristematic fate in Arabidopsis thaliana / S. Teotia, R. S. Lamb // *Journal of Experimental Botany*. – 2011. – Vol. 62, N 3. – P. 1271–1284. – DOI: 10.1093/jxb/erq363
420. Babajani, G. Sl-SRO11 increases salt tolerance and is a member of the radical-induced cell death 1—similar to RCD1 gene family of tomato / G. Babajani, J. Effendy, A. L. Plant // *Plant Science*. – 2009. – Vol. 176, N 2. – P. 214–222. – DOI: 10.1016/j.plantsci.2008.10.012
421. The SNAC1-targeted gene OsSRO1c modulates stomatal closure and oxidative stress tolerance by regulating hydrogen peroxide in rice / J. You, W. Zong, X. Li, J. Ning, H. Hu, X. Li, J. Xiao, L. Xiong // *Journal of Experimental Botany*. – 2013. – Vol. 64, N 2. – P. 569–583. – DOI: 10.1093/jxb/ers349
422. OsSRO1a Interacts with RNA Binding Domain-Containing Protein (OsRBD1) and Functions in Abiotic Stress Tolerance in Yeast / S. Sharma, C. Kaur, S. L. Singla-Pareek, S. K. Sopory // *Frontiers in Plant Science*. – 2016. – Vol. 7. – P. 62. – DOI: 10.3389/fpls.2016.00062

423. Maize similar to RCD1 gene induced by salt enhances *Arabidopsis thaliana* abiotic stress resistance / X. Li, Y. Xu, F. Liu, M. Zhao, Y. Sun, Q. Ma // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2018. – Vol. 503, N 4. – P. 2625–2632. – DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.08.014
424. Jiang, H. Genome-wide identification, systematic analysis and characterization of SRO family genes in maize (*Zea mays* L.) / H. Jiang, Y. Xiao, S. Zhu // *Acta Physiologiae Plantarum*. – 2018. – Vol. 40, N 10. – P. 176. – DOI: 10.1007/s11738-018-2738-0
425. A Canonical DREB2-Type Transcription Factor in Lily Is Post-translationally Regulated and Mediates Heat Stress Response / Z. Wu, J. Liang, S. Zhang, B. Zhang, Q. Zhao, G. Li, X. Yang, C. Wang, J. He, M. Yi // *Frontiers in Plant Science*. – 2018. – Vol. 9. – P. 243. – DOI: 10.3389/fpls.2018.00243
426. Labeling efficiency of oligonucleotides by T4 polynucleotide kinase depends on 5'-nucleotide / V. Houten, F. Denkers, M. Dijk, M. Brekel, R. Brakenhoff // *Analytical Biochemistry*. – 1998. – Vol. 265, N 2. – P. 386–389. – DOI: 10.1006/abio.1998.2900
427. Green, M. R. Labeling the 3' Termini of Oligonucleotides Using Terminal Deoxynucleotidyl Transferase / M. R. Green, J. Sambrook // *Cold Spring Harbor Protocols*. – 2021. – Vol. 2021, N 8. – DOI: 10.1101/pdb.prot100685
428. Murashige, T. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures / T. Murashige, F. Skoog // *Physiologia Plantarum*. – 1962. – Vol. 15, N 3. – P. 473–497. – DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
429. Isolation of High-Quality DNA from a Desert Plant *Reaumuria soongorica* / X. Wang, H. Xiao, X. Zhao, C. Li, J. Ren, F. Wang, L. Pang. – London : IntechOpen, 2012. – 10.5772/38367 p.
430. Chomczynski, P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Analytical Biochemistry*. – 1987. – Vol. 162, N 1. – P. 156–159. – DOI: 10.1006/abio.1987.9999
431. Zhang, J. Differential priming of RNA templates during cDNA synthesis markedly affects both accuracy and reproducibility of quantitative competitive reverse-transcriptase PCR / J. Zhang, C. D. Byrne // *The Biochemical Journal*. – 1999. – Vol. 337 ( Pt 2). – P. 231–241.
432. Green, M. R. The Basic Polymerase Chain Reaction (PCR) / M. R. Green, J. Sambrook // *Cold Spring Harbor Protocols*. – 2018. – Vol. 2018, N 5. – DOI: 10.1101/pdb.prot095117
433. Kunkel, T. A. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection / T. A. Kunkel // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 1985. – Vol. 82, N 2. – P. 488–492. – DOI: 10.1073/pnas.82.2.488
434. Chapter 14 - Techniques for Nucleic Acid Engineering: The Foundation of Gene Manipulation / Ş. Tüzmen, Y. Baskın, A. Feyda Nursal, S. Eraslan, Y. Esemem, G. Çalıbaşı, A. Banu Demir, D. Abbasoğlu, C. Hizel // *Omics Technologies and Bio-Engineering* / ed. D. Barh, V. Azevedo. – Cambridge, Massachusetts : Academic Press, 2018. – P. 247–315.
435. Inoue, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids / H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama // *Gene*. – 1990. – Vol. 96, N 1. – P. 23–28. – DOI: 10.1016/0378-1119(90)90336-p
436. Sasagawa, N. Plasmid Purification / ed. I. M. Gull. – *Plasmid*. – London: IntechOpen, 2018. – 10.5772/intechopen.76226
437. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / M. M. Bradford // *Analytical Biochemistry*. – 1976. – Vol. 72. – P. 248–254. – DOI: 10.1006/abio.1976.9999
438. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol. 227, N 5259. – P. 680–685. – DOI: 10.1038/227680a0
439. Li, Y. Viral removal by column chromatography in downstream processing of monoclonal antibodies / Y. Li // *Protein Expression and Purification*. – 2022. – Vol. 198. – P. 106131. – DOI: 10.1016/j.pep.2022.106131
440. Smith, H. The production of specific rabbit antibodies by injecting individual antigen—antibody complexes separated from mixed antigens / H. Smith, R. C. Gallop, B. T. Tozer // *Immunology*. – 1964. – Vol. 7, N 2. – P. 111–117
441. Mahmood, T. Western Blot: Technique, Theory, and Trouble Shooting - PMC [Online] / T. Mahmood, P.-C. Yang // *N Am J Med Sci*. – 2012. – Vol. 4, N 9. – P. 429-434
442. Characterization of DNA ADP-ribosyltransferase activities of PARP2 and PARP3: new insights into DNA ADP-ribosylation / G. Zarkovic, E. A. Belousova, I. Talhaoui, C. Saint-Pierre, M. M. Kutuzov, B. T. Matkarimov, D. Biard, D. Gasparutto, O. I. Lavrik, A. A. Ishchenko // *Nucleic Acids Research*. – 2018. – Vol. 46, N 5. – P. 2417–2431. – DOI: 10.1093/nar/gkx1318

443. The Arabidopsis thaliana Poly(ADP-Ribose) Polymerases 1 and 2 Modify DNA by ADP-Ribosylating Terminal Phosphate Residues / S. Taipakova, A. Kuanbay, C. Saint-Pierre, D. Gasparutto, Y. Baiken, R. Groisman, A. A. Ishchenko, M. Saparbaev, A. K. Bissenbaev // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. – 2020. – Vol. 8. – P. 1-21
444. Nordhoff, E. Mass spectrometry of nucleic acids / E. Nordhoff, F. Kirpekar, P. Roepstorff // *Mass Spectrometry Reviews*. – 1996. – Vol. 15, N 2. – P. 67–138. – DOI: 10.1002/(SICI)1098-2787(1996)15:2<67::AID-MAS1>3.0.CO;2-8
445. Rey, M. -. Detection of alien genetic introgressions in bread wheat using dot-blot genomic hybridisation / M. -. Rey, P. Prieto // *Molecular Breeding*. – 2017. – Vol. 37, N 3. – P. 32. – DOI: 10.1007/s11032-017-0629-5
446. Visconti, R. New insights on oxidative stress in cancer / R. Visconti, D. Grieco // *Current Opinion in Drug Discovery & Development*. – 2009. – Vol. 12, N 2. – P. 240–245.
447. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? / S. Reuter, S. C. Gupta, M. M. Chaturvedi, B. B. Aggarwal // *Free Radical Biology & Medicine*. – 2010. – Vol. 49, N 11. – P. 1603–1616. – DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2010.09.006
448. Oxidative Stress in Cancer-Prone Genetic Diseases in Pediatric Age: The Role of Mitochondrial Dysfunction / S. Perrone, F. Lotti, U. Geronzi, E. Guidoni, M. Longini, G. Buonocore // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2016. – Vol. 2016. – P. 4782426. – DOI: 10.1155/2016/4782426
449. Jackson, A. L. The contribution of endogenous sources of DNA damage to the multiple mutations in cancer / A. L. Jackson, L. A. Loeb // *Mutation Research*. – 2001. – Vol. 477, N 1-2. – P. 7–21. – DOI: 10.1016/s0027-5107(01)00091-4
450. Loeb, L. A. DNA polymerases and human disease / L. A. Loeb, R. J. Monnat // *Nature Reviews. Genetics*. – 2008. – Vol. 9, N 8. – P. 594–604. – DOI: 10.1038/nrg2345
451. Structure of mammalian poly(ADP-ribose) glycohydrolase reveals a flexible tyrosine clasp as a substrate-binding element / I. Kim, J. R. Kiefer, C. M. W. Ho, R. A. Stegeman, S. Classen, J. A. Tainer, T. Ellenberger // *Nature Structural & Molecular Biology*. – 2012. – Vol. 19, N 6. – P. 653–656. – DOI: 10.1038/nsmb.2305
452. Lindahl, T. DNA glycosylases, endonucleases for apurinic/aprimidinic sites, and base excision-repair / T. Lindahl // *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. – 1979. – Vol. 22. – P. 135–192. – DOI: 10.1016/s0079-6603(08)60800-4
453. Moor, N. Coordination of DNA Base Excision Repair by Protein-Protein Interactions / N. Moor, O. Lavrik // *Biochemistry (Mosc)*. – 2018. – Vol. 83, N 4. – P. 411-422.
454. ATR-dependent pathways control hEXO1 stability in response to stalled forks / M. El-Shemerly, D. Hess, A. K. Pyakurel, S. Moselhy, S. Ferrari // *Nucleic Acids Research*. – 2008. – Vol. 36, N 2. – P. 511–519. – DOI: 10.1093/nar/gkm1052
455. Mimitou, E. P. Sae2, Exo1 and Sgs1 collaborate in DNA double-strand break processing / E. P. Mimitou, L. S. Symington // *Nature*. – 2008. – Vol. 455, N 7214. – P. 10.1038/nature07312. – DOI: 10.1038/nature07312
456. Alesmasova, E. E. Poly(ADP-ribosylation) by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins / E. E. Alesmasova, O. I. Lavrik // *Nucleic Acids Research*. – 2019. – Vol. 47, N 8. – P. 3811–3827. – DOI: 10.1093/nar/gkz120
457. PARP-1 Activation Requires Local Unfolding of an Autoinhibitory Domain / J. M. Dawicki-McKenna, M. Langelier, J. E. DeNizio, A. A. Riccio, C. D. Cao, K. R. Karch, M. McCauley, J. D. Steffen, B. E. Black, J. M. Pascal // *Molecular Cell*. – 2015. – Vol. 60, N 5. – P. 755–768. – DOI: 10.1016/j.molcel.2015.10.013
458. New perspectives on the plant PARP family: Arabidopsis PARP3 is inactive, and PARP1 exhibits predominant poly (ADP-ribose) polymerase activity in response to DNA damage / Z. Gu, W. Pan, W. Chen, Q. Lian, Q. Wu, Z. Lv, X. Cheng, X. Ge // *BMC Plant Biology*. – 2019. – Vol. 19. – P. 364. – DOI: 10.1186/s12870-019-1958-9
459. Hassa, P. O. The diverse biological roles of mammalian PARPS, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases / P. O. Hassa, M. O. Hottiger // *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. – 2008. – Vol. 13. – P. 3046–3082. – DOI: 10.2741/2909
460. Sievers, F. Clustal Omega / F. Sievers, D. G. Higgins // *Current Protocols in Bioinformatics*. – 2014. – Vol. 48, N 1. – P. 3.13.1–3.13.16. – DOI: 10.1002/0471250953.bi0313s48
461. Marsischky, G. T. Role of glutamic acid 988 of human poly-ADP-ribose polymerase in polymer formation. Evidence for active site similarities to the ADP-ribosylating toxins / G. T. Marsischky, B. A.

- Wilson, R. J. Collier // *The Journal of Biological Chemistry*. – 1995. – Vol. 270, N 7. – P. 3247–3254. – DOI: 10.1074/jbc.270.7.3247
462. Random mutagenesis of the poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain reveals amino acids involved in polymer branching / V. Rolli, M. O'Farrell, J. Ménessier-de Murcia, G. Murcia // *Biochemistry*. – 1997. – Vol. 36, N 40. – P. 12147–12154. – DOI: 10.1021/bi971055p
463. Structures and mechanisms of Nudix hydrolases / A. S. Mildvan, Z. Xia, H. F. Azurmendi, V. Saraswat, P. M. Legler, M. A. Massiah, S. B. Gabelli, M. A. Bianchet, L. -. Kang, L. M. Amzel // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 2005. – Vol. 433, N 1. – P. 129–143. – DOI: 10.1016/j.abb.2004.08.017
464. Insight into DNA substrate specificity of PARP1-catalysed DNA poly(ADP-ribosylation) / E. Matta, A. Kiribayeva, B. Khassenov, B. T. Matkarimov, A. A. Ishchenko // *Scientific Reports*. – 2020. – Vol. 10, N 1. – P. 3699. – DOI: 10.1038/s41598-020-60631-0