







MPНТИ 34.15.00; 31. 27.00; 34.15.27

<https://doi.org/10.26577/eb.2020.v84.i3.08>

С.М. Тайпакова* , А.К. Куанбай , Д. Манапкызы ,
И.Т. Сmekенов , С.Д. Алыбаев , А.К. Бисенбаев 

Научно-исследовательский институт проблем биологии и биотехнологии,
Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Казахстан, г. Алматы,
*e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

КЛОНИРОВАНИЕ КДНК ГЕНА ПОЛИ(АДФ-РИБОЗА) ПОЛИМЕРАЗЫ 2 *ARABIDOPSIS THALIANA* В *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Поли(АДФ-рибоза) полимеразы (PARP) катализируют синтез полимеров АДФ-рибозы ковалентно прикрепленные к акцепторным белкам. При этом донором остатков АДФ-рибозы выступает НАД⁺. Одной из наиболее известных ролей PARP является их функция в качестве сенсора повреждения ДНК. PARP1, в частности, связывается в поли(АДФ-рибозил)ированной форме с разрывами ДНК и привлекает белковую машину репарации ДНК в места повреждения ДНК. Недавно, впервые показано, что PARP поли-АДФ-рибозилирует не только белки, но и концы разрывов ДНК. Однако, в настоящее время нет прямых доказательств наличия поли-АДФ-рибозилированных ДНК-аддуктов в условиях *in vivo* как в животных, так и в растениях.

В клетках *Saccharomyces cerevisiae* отсутствует PARP активность, несмотря на то, что он обнаружен в организмах от архебактерий до млекопитающих. Из-за простоты манипулирования и генетической трактуемости дрожжи *S. cerevisiae* были использованы для анализа функции многих белков из клеток животных и растений. В связи с этим целью нашей работы является клонирование и гетерологичная экспрессия гена AtPARP2 из модельного растения *Arabidopsis thaliana* в дрожжах.

С применением генно-инженерных методов нами сконструирована рекомбинантная плазида с кДНК геном AtPARP2 под контролем индуцибельного промотора GAL10 эписомального вектора pESC-LEU2. Методом генетической трансформации получен рекомбинантный штам *S. cerevisiae*, способный экспрессировать кДНК ген AtPARP2. Методом Вестерн-блоттинга с применением полученных нами поликлональных анти-AtPARP2 антител выявлено, что продуктом экспрессии гена в дрожжах является глобулярный белок массой 72 кДа, состоящий из 637 аминокислот (рI 5,92). Показано незначительное ингибирование роста в дрожжевых клетках FF 18733, экспрессирующих AtPARP2. Индукция экспрессии AtPARP2 в дрожжевых клетках, выявило PARилирующую активность белка *in vivo*. Показано авто-поли(АДФ-рибозил)ирующая активность AtPARP2 в дрожжах в ответ на двухцепочечные разрывы ДНК, индуцированные обработкой клеток блеомицином. Ингибитор PARP фермента 3-AB значительно ингибировал количество поли АДФ-рибозилированных белковых продуктов.

Ключевые слова: Поли(АДФ-рибоза) полимеразы, AtPARP2, поли-АДФ-рибозилирование, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*.

S.M. Taipakova*, A.K. Kuanbay, D. Manatkyzy,
I.T. Smekenov, S.D. Alybayev, A.K. Bissenbaev

Scientific Research Institute of Biology and Biotechnology Problems,
Al-Farabi Kazakh National University, Kazakhstan, Almaty,
*e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

Cloning of the *Arabidopsis thaliana* Poly(Adp-ribose) polymerase 2 cDNA gene in *Saccharomyces cerevisiae*

Poly(ADP-ribose)polymerase (PARP) catalyzes the synthesis of covalently attached ADP-ribose polymers to acceptor proteins. The donor of the residues of ADP-ribose is NAD⁺. The prominent roles of PARP is a DNA damage sensor. PARP1, in poly(ADP-ribosyl)ated form binds to DNA breaks and engages proteins of DNA repair to this sites. Recently, it has been shown that PARP poly(ADP-ribosyl) ates both proteins and DNA breaks. However, there is no direct evidence of poly(ADP-ribosyl)ated DNA adducts *in vivo* in animals and plants.

PARP activity is absent in *Saccharomyces cerevisiae* cells, despite the fact that it has been identified in organisms ranging from archaeobacteria to mammals. Due to the simplicity of manipulation and genetic interpretation *S. cerevisiae* yeasts have been used to analyze the functions of proteins from animal and plant cells. Therein, the goal of our work is the cloning and heterologous expression of the AtPARP2 gene from the *Arabidopsis thaliana* in yeasts.

By using genetic engineering methods, we have constructed a recombinant plasmid with cDNA of the AtPARP2 gene under the control of the inducible promoter GAL10 from episomal vector pESC-LEU2. A recombinant *S.cerevisiae* strain capable for expressing the cDNA of the AtPARP2 gene was obtained by genetic transformation method. By using Western blotting with the applying of polyclonal anti-AtPARP2 antibodies, it was revealed that the product of gene expression in yeast is a globular protein weighing 72kDa, consisting 637 amino acids (pI 5.92). A slight inhibition of growth was shown in FF 18733 yeast cells which express AtPARP2. Induction of AtPARP2 expression in yeast revealed PARylating activity of protein in vivo. Auto-poly(ADP-ribosylation) activity of AtPARP2 was shown in yeasts in response to double-stranded DNA breaks induced by bleomycin treatment of cells. 3-AB, inhibitor of PARP suppressed the amount of poly(ADP-ribosylated) protein products.

Key words: Poly(ADP-ribose)polymerase, AtPARP2, poly(ADP-ribosylation), *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*.

С.М. Тайпакова*, А.К. Қуанбай, Д. Манапқызы,
И.Т. Смекенов, С.Д. Алыбаев, А.Қ. Бисенбаев

Биология және биотехнология мәселелері Ғылыми-зерттеу институты молекулалық генетика
лабораториясы, әл-Фараби атындағы Қазақ ұлттық университеті, Қазақстан, Алматы қ.,
*e-mail: sabira.taipakova@gmail.com

***Arabidopsis thaliana* Поли(АДФ-рибоза) полимераза 2 қДНК генін *Saccharomyces cerevisiae* жүйесінде клондау**

Поли(АДФ-рибоза) полимераза (PARP) акцепторлы ақуызға ковалентті-бекітілген АДФ-рибоза полимерлерінің синтезін катализдейді. Бұл ретте, АДФ-рибоза қалдығының доноры НАД⁺ болып табылады. PARP белгілі қызметтерінің ішінде айрықша көзге түсетіні – оның ДНҚ зақымдануының сенсоры ретінде әрекет етуі. Атап айтқанда, PARP1 поли(АДФ-рибозил)денген күйде ДНҚ үзілістерімен байланысып, ДНҚ зақымданған аймаққа ДНҚ репарациясының ақуыздық жүйесін шақырады. Жақында, алғаш рет, PARP тек ақуыздарды ғана емес, сонымен қатар ДНҚ үзілістерінің соңдарын да поли(АДФ-рибозил)дейтіні көрсетілді. Алайда, қазіргі таңда жануарлар мен өсімдіктерде *in vivo* жағдайда поли(АДФ-рибозил)денген ДНҚ аддуктары болуының нақты дәлелі жоқ.

Архебактериядан сүтқоректілерге дейінгі ағзалардың барлығында табылғандығына қарамастан, *Saccharomyces cerevisiae* клеткаларында PARP белсенділігі анықталмаған. Манипуляция жүргізу және генетикалық тұрғыдан түсіндіру жеңілдігіне байланысты *S. cerevisiae* ашытқылары өсімдік және жануар клеткаларының көптеген белоктарының функцияларын талдау мақсатында қолданылған. Осыған байланысты, біздің жұмысымыздың мақсаты *Arabidopsis thaliana* модельді өсімдігінің AtPARP2 генін ашытқыларда клондау және гетерологиялық экспрессиялау болып табылады.

Гендік инженерия әдістерінің көмегімен pESC-LEU2 эписомальды векторының GAL10 индуцельді промоторының бақылауындағы AtPARP2 генінің қДНК-сы бар рекомбинатты плазмида құрастырылды. Генетикалық трансформация әдісі арқылы AtPARP2 генінің қДНК-н экспрессиялауға қабілетті *S. cerevisiae* рекомбинатты штаммы алынды. Анти-AtPARP2 поликлональды антиденелерін қолдану арқылы жүргізілген Вестерн-блоттинг әдісінің нәтижесінде ашытқылардағы ген экспрессиясының өнімі массасы 72 кДа, 637 аминқышқылынан (pI 5.92) тұратын глобулярлы ақуыз екендігі анықталды. AtPARP2 экспрессиялайтын FF 18733 ашытқы клеткаларында өсудің шамалы тежелетіні көрсетілген. Ашытқы клеткаларындағы AtPARP2 экспрессиясының индукциясы ақуыздың PARилдеуші белсендігін *in vivo* айқындады. Клеткалардың блеомицинмен өңделуі нәтижесінде индуцирленген қостізбекті ДНҚ үзілістеріне жауап ретінде ашытқыларда AtPARP2-н авто-поли(АДФ-рибозил)деуші белсенділігі көрсетілген. PARP ферментінің ингибиторы, 3-AB поли(АДФ-рибозил)денген ақуыздық өнімдердің мөлшерін айтарлықтай тежеді.

Түйін сөздер: поли(АДФ-рибоза) полимераза, AtPARP2, поли(АДФ-рибозил)дену, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*.

Введение

Поли(АДФ-рибоза) полимеразы (PARP) катализируют синтез полимеров АДФ-рибозы ковалентно-прикрепленные к акцепторным белкам. При этом донором остатков АДФ-рибозы выступает НАД⁺ (Kim M.Y., 2005: 1951-1967). Использование биоинформационного подхода, позволило выявить ряд белков человека, имеющих очень высокую степень гомологии с каталитическим доменом PARP-1. Все эти белки были объединены в семейство PARP, которое сейчас у млекопитающих насчитывается 18 представителей (Ame J.C., 2004: 882-893). PARP белки могут оказывать значительное влияние на различные клеточные процессы, такие как транскрипция, деление клеток, репарация ДНК и целостность теломеров (Schreiber V., 2006: 517-528). И только двое из них PARP1 и PARP2 активируются в ответ на повреждения ДНК (Woodhouse B.C., 2008: 1077-1086).

Геном *Arabidopsis thaliana*, широко используемого модельного растительного организма, кодирует по меньшей мере три предполагаемых PARP фермента: AtPARP1 (At4g02390), AtPARP2 (At2g31320) и AtPARP3 (At5g22470) (Briggs A.G., 2011: 372-80). Показано, что PARP растений являются структурно гомологичными к PARP белкам млекопитающих (Briggs A.G., 2011: 372-80, Lamb R.S., 2012: 175-89). 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 (Briggs A.G., 2011: 372-80, Lamb R.S., 2012: 175-89). Как AtPARP1, так и AtPARP2 локализован в ядре и в присутствии ДНК с разрывами, прикрепляет остатки ADP-рибоз от НАД⁺ к себе (автомодификация) и к акцепторным белкам в условиях *in vitro* и *in vivo* (Briggs A.G., 2011: 360-1385). Подобно животным PARP ферментам, активность PARP растений ингибируется ингибиторами PARP фермента, такими как 3-аминобензамид (3АВ) и 3-метоксибензамид (3МВ), которые использовались во многих исследованиях (Briggs A.G., 2011: 360-1385). Интересно что, в противоположность к животным, в арабидопсисе AtPARP2 обладает более высокой ферментативной активностью, чем AtPARP1 (Briggs A.G., 2011: 360-1385).

Нокаутные по генам *parp* мутанты *Arabidopsis* 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 (PARилирование) в растениях. Это, в дополнение к химическим ингибиторам PARP, предоставляет возможность для понимания механизмов PARилирования белков и их роли в различных биологических процессах на уровне всего организма.

В отличие от млекопитающих, значительно мало известно о PARилировании в растениях. Практически не известно о акцепторных белках поли-ADP-рибозы и белках, взаимодействующих с ADP-рибозой. В растениях не обнаружены PARилированные белки, кроме гистонов и PARP. Идентификация новых акцепторных белков поможет понять регуляторную функцию PARилирования в развитии растений и стрессовых реакциях.

Одной из наиболее известных ролей PARP является их функция в качестве сенсора повреждения ДНК. PARP1, в частности, связывается в PARилированной форме с SSB и DSB, и привлекает белковую машину репарации ДНК в места повреждения ДНК (Hinz J.M., 2010: 4646-4651, Odell I.D., 2011: 4623-4632). PARP-катализируемое ковалентное присоединение поли-АДФ-рибозы (PAR) к белкам является обратимым процессом, поскольку расщепление PAR до мономеров АДФ-рибозы осуществляется ферментами поли(АДФ-рибоза)-гликогидролазами (PARG) (Bonicalzi M.E., 2005: 739-750), АДФ-рибозиларгинин-гидролазой 3 (ARH3) (Ono T., 2006: 16687-16691) и терминальной АДФ-гликогидролазами (TARG1) (Sharifi R., 2013: 1225-1237). PARG является основной гликогидролазой PAR в клетках млекопитающих, которая удаляет большую часть полимера PAR, но оставляет единственную ADP-рибозу, прикрепленную к белку. Этот остаток затем удаляется TARG1. Нокаутные по гену PARG мыши погибали (Koh D.W., 2004: 17699-17704), а дефицитные по гену PARG клетки проявляют повышенную гибель клеток и значительное нарушение процессов репарации повреждения ДНК и разрывов цепей (Ame J.C., 2009: 1990-2002), что указывает на то, что генерация PARилированных макромолекул является высокотоксичным для клетки.

Из-за простоты манипулирования и генетической трактуемости дрожжи *S. cerevisiae* были использованы для анализа функции многих белков из клеток животных и растений. Дрожжи

являются ценным предиктором функций генов человека, так как 31% белков, кодируемых генами дрожжей, имеют человеческие гомологи и, почти 50% генов человека, связанных с наследственными заболеваниями, имеют дрожжевые гомологи (Suter B., 2006: 625–644, Hartwell L.H., 2004: 523–544). В геноме арабидопсис, содержатся множество генов с высокой гомологией к соответствующим генам из дрожжей (Rissel D., 2017: 20-23). Эти данные свидетельствуют о сильной консервативности функции генов между дрожжами, человеком и растениями.

Целью представленной работы является клонирование и гетерологичная экспрессия гена *AtPARP2* из модельного растения *Arabidopsis thaliana* в дрожжах и оптимизация экспрессии *AtPARP2* в дрожжевой системе.

Материалы и методы

Материалы исследования

Объектом исследования явились нуклеиновые кислоты выделенные из *A. thaliana* линии Col0 (растения дикого типа), относящейся к коллекции инсерционных мутантов SALK, полученные из Биологического ресурсного центра (*Arabidopsis Biological Resource Center*, <http://www.arabidopsis.org>).

В ходе работы использовали клеточные линии: NovaXG Zappers (*F-mcrA Δ(mcrC-mrr) endA1 recA1 φ80dlacZAM15 ΔlacX74 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL nupG λ-tonA*) фирмы «Novagen» для наработки плазмидной ДНК и экспрессионный штамм FF 18733 *S. cerevisiae* (MATa, leu2-3-112, trp1-289, his7-2, ura3-52, lys1-1, CAN1), а так же эписомальный вектор pESC-LEU2. Культивирование клеток *S. cerevisiae* проводили при 30°C в богатой среде YPAD, скрининг трансформантов проводили на синтетической минимальной селективной среде, включающей глюкозу и смеси аминокислот (среда SD DO – LEU). Для приготовления буферных растворов использовали реактивы марок х.ч., ч.д.а., и о.с.ч., производимых фирмами «Sigma» (США), «Amresco» (Германия), «Serva» (Германия) и «Реахим» (Россия). В ходе работы использовали ферменты модификации ДНК и белков производства фирм «Sigma-Aldrich» (США), «New England Biolabs» (Англия), «Thermo Fisher Scientific» (США), «Promega» (США), «Roche» (США).

Конструкция рекомбинантной плазмиды pESC-LEU/AtPARP2

кДНК ген *AtPARP2 A. thaliana* амплифицировали методом ПЦР на матрице, получен-

ной нами рекомбинантной плазмиды pET28c/*AtPARP2* (Куанбай А.К., 2018: 99-111) с использованием две пары праймеров: смысловой праймер *AtPARP2 Dir* 5'- ATTAGGATCCT-TATGGGCAGCAGCCATC-3', содержащий сайт узнавания рестриктазой *Bam*HI и антисмысловый праймер *AtPARP2 Pr*5'- AGGCGTCGACT-TAATGTTTGTAGTTG-3', содержащие сайт *Sall* (подчеркнут).

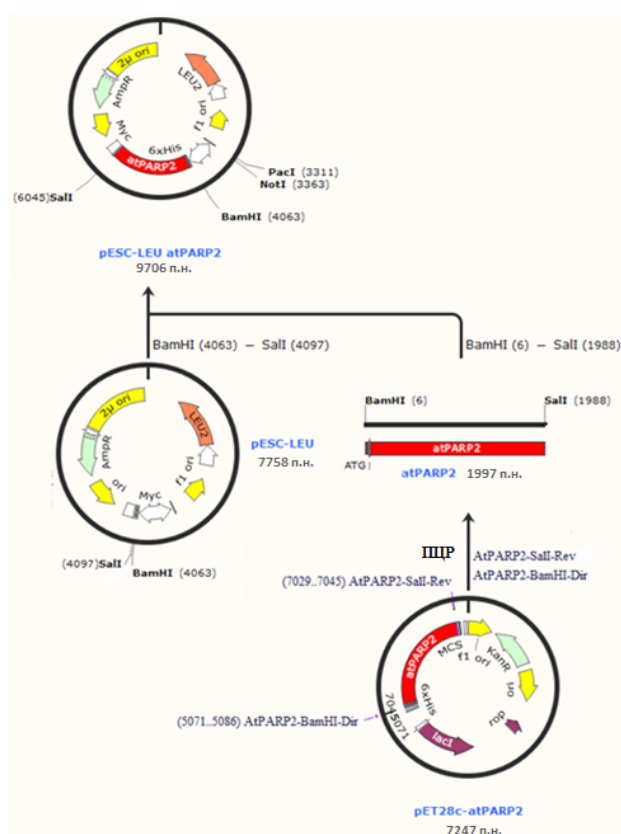


Рисунок 1 – Схема конструкции рекомбинантной плазмиды pESC-LEU/AtPARP2

Продукт ПЦР обработали рестриктазами *Bam*HI и *Sall*. Затем с помощью ДНК-лигазы фага T4 фрагмент встраивали в вектор pESC-LEU, предварительно обработанный рестриктазами *Bam*HI и *Sall* и щелочной фосфотазой FastAP для удаления 5'-концевых фосфатов с целью воспрепятствовать восстановлению вектора при последующем лигировании. Полученным в результате лигирования продуктом трансформировали штамм *E. coli* NovaXG Zappers. Отбор несущих плазмиду клеток осуществляли путем посева продуктов, полученных в результате трансформации, на LB-агар, дополненный 50 мг/л ампи-

циллина. Плазмидную ДНК выделяли из одного трансформанта, проверяли на наличие вставки методом ПЦР и рестрикционного анализа. Клоны секвенировали в обоих направлениях на отсутствие мутаций.

Трансформация дрожжевых клеток

С помощью охлажденного стерильного наконечника 50 мкл компетентных клеток дрожжей перенесли в охлажденную микропробирку и смешали с плазмидной ДНК и одноцепочечной ДНК бычьего тимуса (10 мг/мл ДНК бычьего тимуса кипятили 5 мин при 100 °С и быстро охладили на льду). Добавили 300 мкл свежеприготовленной стерильной трансформационной смеси (40% PEG 4000, 1X TE, 1X LiOAc) и тщательно перемешали встряхиванием на вихре. Смесь инкубировали при 30 °С в течение 30 мин при перемешивании со скоростью 200 об/мин на круговом шейкере. По истечению времени инкубации добавили 40 мкл DMSO и тщательно перемешали вихреванием. Далее клетки подвергали тепловому шоку на водяной бане при 42 °С в течение 15 мин, после чего инкубировали 3 мин во льду. Трансформированные клетки равномерно распределяли на поверхности селективной агаризованной среды и инкубировали при 30 °С в течение 2-3 суток.

Индукция экспрессии AtPARP2 гена под контролем GAL10 промотора в S. cerevisiae

Для индукции экспрессии рекомбинантного белка под контролем T *GAL10* промотора в клетках *S. cerevisiae* несколько колоний трансформированных клеток выросших на чашках Петри с селективной средой инокулировали в 20 мл синтетической минимальной SD DO – LEU среды и культивировали при 30 °С и интенсивной аэрации (150 об/мин на качалке) в течение ночи. Затем ночную культуру ресуспензировали в 1 л жидкой SD DO – LEU и растили до достижения оптической плотности $OD_{600} \sim 1.0$. При достижении необходимой плотности клетки осаждали центрифугированием при скорости 3000 об/мин 5 мин при 4 °С, культуральную жидкость удалили. Осадок в виде клеток ресуспензировали в 1 л жидкой SG DO – LEU (0,7% дрожжевая азотистая основа без аминокислот 2% галактоза). Индукцию экспрессии проводили инкубированием в присутствии галактозы в течение 16 ч при 30 °С и интенсивном перемешивании на качалке. Клетки собираемые центрифугированием при скорости 3000 об/мин 5 мин при 4 °С ресуспензировали в буфере для хранения (20 мМ HEPES-KOH pH 7,6; 40 мМ NaCl) и хранили при -20 °С до последующего использования.

ДСН-ПААГ электрофорез

Приблизительно 100 мг дрожжевых клеток собирали и замораживали при 80 °С. 500 мл буфера для экстракции белка [25 мМ Трис-HCl (pH 7,4), 10 мМ MgCl₂, 10 мМ β-меркаптоэтанол, 1% коктейль ингибитора протеазы (Sigma-Aldrich)] и 600 мл стеклянных шариков, промытых кислотой (425-600 мм, Sigma-Aldrich) добавляли к замороженным дрожжевым клеткам и клетки лизировали вихреванием в течение 3 минут. Полученный лизат центрифугировали при 14000 g в течение 40 мин при 4 °С для осаждения клеточных остатков. Супернатант переносили в новую пробирку и концентрацию белка в каждом образце определяли методом Брэдфорда (Bradford M., 1976:248-254) перед нанесением на гель. Для электрофоретического анализа использовали растворимые белки (супернатант). Электрофорез белков, приготовленных кипячением образцов в 2х образцовом буфере (2X: 125 мМ Tris-HCl pH 6,8, 10% β-меркаптоэтанол, 4% SDS, 0,02% бромфенолового синего, 20% глицерина), проводили в полиакриламидном геле по методу Лэммли (Laemmli U.K., 1970:680-5) в денатурирующих условиях.

Иммуноблоттинг

Экстракты рекомбинантных дрожжей (12 мкг белка) фракционировали в 10%-ном ДСН-полиакриламидном геле и затем белки переносились из полиакриламидного геля на PVDF мембрану (Pierce, США) с использованием Bio-Rad Mini-transblot Cell (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкциями производителя. После переноса белка, мембрану осторожно встряхивали в блокирующем растворе, содержащем 5% молока и 0,1% Tween-20 в 1x TBS (трис-буферный солевой раствор: 50 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 20 мМ NaCl) в течение 1 часа при комнатной температуре. После удаления блокирующего раствора мембрану инкубировали в 10 мл аффинно-очищенном анти-AtPARP поликлональном антителе (разведение 1: 10000 в блокирующем растворе 0,1% Твин-20) в течение ночи при 4 °С. Мембрану промывали пять раз в 10 мл буфера для промывки (1x TBS, 0,1% Tween-20) в течение 5 мин, каждый раз. После промывки, мембрану инкубировали в 10 мл растворе вторичных антител (разведение 1:20000 в блокирующем растворе с 0,1% Твин-20) в течение 1 часа при комнатной температуре. Затем мембрану промывали пять раз в 10 мл растворе для промывки в течение 5 мин каждый раз. Иммунодетекцию проводили люминолом, с помощью анализатора Image Quant Las 4000 (Amersham Biosciences, СК).

Результаты и его обсуждения

Клонирование и экспрессия кДНК гена AtPARP2 A. thaliana в pESC-LEU2 векторе дрожжей под контролем индуцибельного промотора GAL10

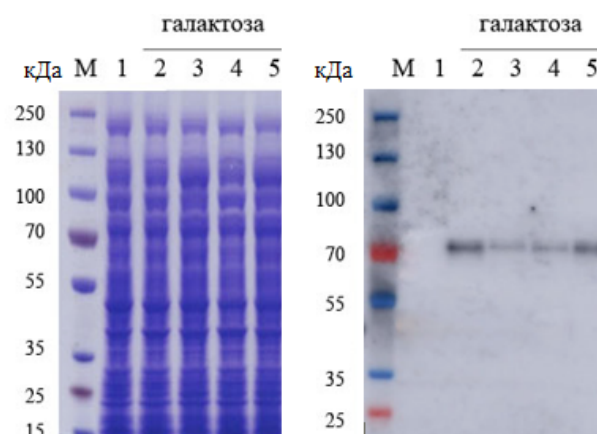
Известно, что дрожжи *S. cerevisiae* не способны продуцировать поли(АДФ-рибоза)-полимеразы, способные синтезировать цепочки полимера АДФ-рибозы используя НАД⁺ в качестве субстрата и присоединять их к гистонам, белкам репарации ДНК, транскрипционным факторам и т.д. Такая особенность дрожжевой системы намного облегчает регистрацию рекомбинантной AtPARP2 в трансформированных клетках. Кроме этого, отсутствие в *S. cerevisiae* антагониста PARP белков поли(АДФ-рибоза)-гликогидролаз делает возможным изучение функциональной активности гетерологичного белка в условиях *in vivo*.

С этой целью кДНК AtPARP2 (*At4g02390*) амплифицировали с помощью ПЦР из рекомбинантной плазмиды pET28c/*AtPARP2*. Праймеры, использованные для амплификации последовательностей кДНК, перечислены в материалах и методах. Полученные кДНК были клонированы в дрожжевой экспрессионный вектор pESC-LEU, сконструированный для экспрессии эукариотических генов в дрожжах *S. cerevisiae*. Вектор экспрессии pESC содержит индуцируемый галактозой (*GAL1* и *GAL10*) промоторы, обеспечивающие контролируемую экспрессию, поскольку предполагается, что экспрессия PARP ингибирует рост дрожжевых клеток. Кроме этого вектор pESC содержит дрожжевые *HIS3*, *TRP1*, *LEU2* и *URA3* гены для селекции трансформированных клеток, а также множественные сайты рестрикции. В результате проведенных работ нами была сконструирована рекомбинантная плаزمиды pESC-LEU/*AtPARP2*.

Несмотря на то, что последовательности аминокислот, установленные на основе нуклеотидной последовательности гена, полностью соответствовали клонированному нами *AtPARP2* было необходимо продемонстрировать, кодирует ли на самом деле этот ген *AtPARP2 A. thaliana*. Для анализа экспрессии поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 2 *A. thaliana* в дрожжевой системе под контролем индуцибельного *GAL10* промотора, рекомбинантную плазмиду pESC-LEU/*AtPARP2* трансформировали в *S. cerevisiae* штамм FF 18733. Скрининг трансформантов проводили на агаризованной синтетической минимальной среде (SD DO-LEU supplement) без

лейцина (LEU), содержащую 2% глюкозы (Glu) в качестве источника углерода. В результате селекции было получено более двадцати колоний, из которых было отобрано три индивидуальных клонов. Трансформированные клетки переносили в жидкую синтетическую минимальную среду SD DO-LEU supplement и инкубировали при 30 °С в течение ночи. 150 мкл жидкой дрожжевой культуры смешивали с 850 мкл стерильного глицерина, аликвотировали и замораживали при 80 °С для получения криостартерных аликвот. Эти заквасочные культуры обеспечивали одинаковые исходные условия во всех экспериментах.

Остальную ночную культуру переносили в большой объем минимальной среды и растили при +30 °С до достижения плотности OD – 1,0. При достижении OD до 1,0 клетки собрали центрифугированием и ресуспендировали в питательной среде SG DO-LEU с 2% галактозой для индукции экспрессии клонированных генов. Синтез рекомбинантных белков тестировали методом электрофореза в присутствии ДСН (рисунок 2).



А- ДСН-ПААГЭ белков *S. cerevisiae*, трансформированных pESC-LEU/*AtPARP2*. Б – Вестерн блоттинг. М – Маркер; 1- клеточный экстракт *S. cerevisiae*, трансформированный pESC-LEU/*AtPARP2* без индукции галактозой; 2-5- клеточный экстракт *S. cerevisiae*, трансформированный pESC-LEU/*AtPARP2* после 24 ч индукции с галактозой.

Рисунок 2 – Экспрессия кДНК гена *AtPARP2 A. thaliana* в *S. Cerevisiae*

Данные ДСН-ПААГ электрофореза показали белковые полосы с молекулярной массой приблизительно 75 кДа в растворимой фракции. Однако с такой же молекулярной массой белковая полоса обнаруживалась в нетрансформированных клетках *S. cerevisiae*. Это указывает на то,

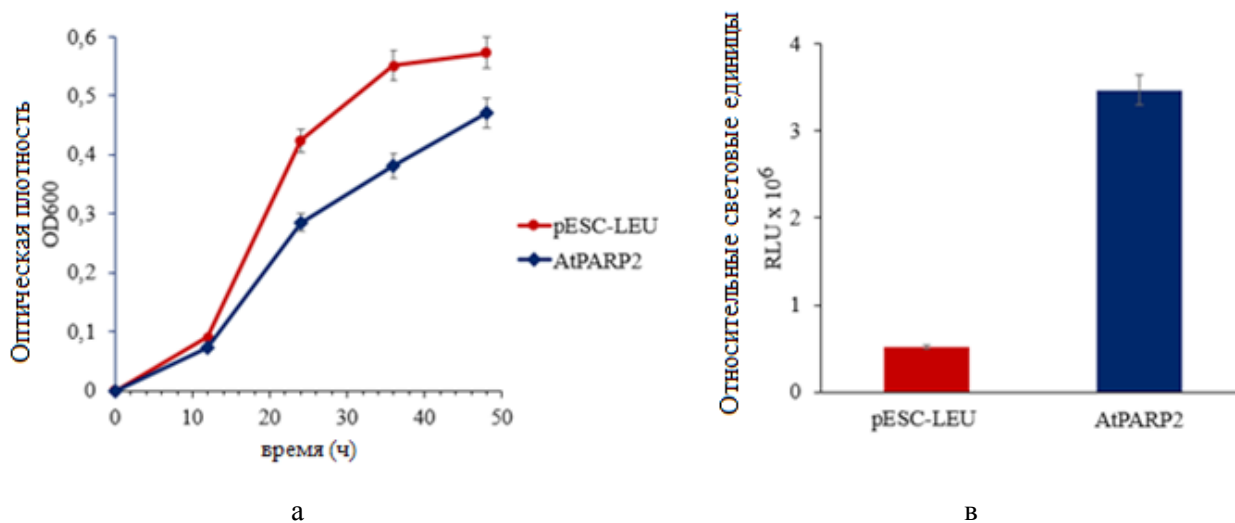
что дрожжевые клетки содержат конститутивные белки с молекулярной массой аналогичной AtPARP2 *A. thaliana*.

В последующих экспериментах для доказательства экспрессии рекомбинантного AtPARP2 *A. thaliana* использовали метод иммуноблоттинга с полученными нами кроличьими поликлональными анти-AtPARP2 антителами (Куанбай А.К., 2018: 99-111). Для этого белки из ДСН-ПААГ перенесли на PVDF мембрану и инкубировали с анти-AtPARP2 антителами. Иммуноблоттинг выявил мажорную белковую полосу с молекулярной массой около 75 kDa, следовательно, эти данные указывают на эффективную экспрессию рекомбинантного AtPARP2 *A. thaliana* в *S. cerevisiae*.

Для анализа роста дрожжей 50 мкл из аликвоты криостартера культивировали в течение ночи в 10 мл жидкой SD DO-LEU supplement. Через 24 ч роста культуру разбавляли свежей SD DO-LEU supplement и растили до достижения 1×10^6 клеток/мл. Суспензию клеток

промывали дистиллированной водой, разбавляли до 1×10^6 клеток/мл в среде SG DO-LEU, содержащей 2% галактозы, для индукции экспрессии гена AtPARP2 при 30°C, и 2 мл суспензии клеток переносили в кюветы. Оптическую плотность клеток при OD600 измеряли в указанные интервалы времени с использованием спектрофотометра PD-303UV (ApeI, Япония).

Как и ожидалось, индукция экспрессии AtPARP2 в дрожжевых клетках FF 18733 привело к незначительному ингибированию роста по сравнению с контрольными клетками, несущими пустой вектор pESC-LEU (рисунок 3А) в течение 48-часового периода роста. Индукция экспрессии полноразмерного PARP1 человека в клетках *S. cerevisiae* приводила к накоплению PAR-модифицированных белков, что, в свою очередь, вызывало подавление репликации и транскрипции ДНК и, впоследствии к ингибированию клеточного деления (Kaiser P., 1992: 231e239).



А) Рост штамма FF 18733, трансформированного пустым вектором pESC-LEU (кружки) или вектором pESC-LEU/AtPARP2 (ромбы). Экспрессия AtPARP2 была вызвана добавлением галактозы в среду. Рост был оценен определением оптической плотности клеток при OD600 в указанные интервалы времени. В) PARилирование белка в дрожжевых клетках FF 18733 определено иммуноблоттингом моноклональными анти-PAR антителами после 16 ч экспрессии гена AtPARP2. Столбики ошибок представляют SE из трех повторностей.

Рисунок 3 – Эффект экспрессии гена AtPARP2 на клеточную пролиферацию дрожжей

Ранние исследования показали, что экспрессия HsPARP1 и HsPARP2 человека в дрожжах приводила к значительному ингибированию клеточного деления (Kaiser P., 1992: 231e239, Perrin D., 2000: 461e469, Perkins E., 2001: 4175e4183,

Tao Z., 2009: 11745e11754, La Ferla M., 2015: 14e24). Авторами высказано предположение, что наличие ДНК-связывающего домена в составе HsPARP1 является причиной ингибирования роста дрожжей (Kaiser P., 1992: 231e239).

При этом, показано, что коэкспрессия антагониста HsPARP поли-(ADP-рибозы) гликогидролазы (PARG), который удаляет фрагменты АДФ-рибозы из целевых белков, а также применение ингибиторов активности PARP может тормозит вызванное HsPARP1 ингибирование роста клеток (Kaiser P., 1992: 231e239, Perkins E., 2001: 4175e4183, Tao Z., 2009: 11745e11754).

Необходимо отметить, что AtPARP2 в отличие от HsPARP1 не содержит домен типа “цинковый палец”, часто встречающиеся у белков, взаимодействующих с ДНК. Показано, что AtPARP2 содержит на N-конце предполагаемый ДНК-связывающий домен SAP (SAF-A / B, Acinus и PIAS) (Rissel D., 2007: 59.25).

Можно предположить, что различия в структуре N-концевой области AtPARP2, вероятно, являются причиной отсутствия полного подавления роста дрожжей. Кроме этого, известно, что ингибиторы PARP представляют собой новый класс противораковой терапии (Gottipati P., 2010: 5389–5398., Weil M.K., 2011: 7–50., De Vos M., 2012: 137–146). В связи с этим, из-за наблюдаемого нами фенотипа, дрожжевая система представляет собой полезную модель для характеристики новых ингибиторов PARP и выявления потенциальных мишеней поли (АДФ-рибозил)илирования (Perkins E., 2001: 4175e4183, Tao G.H., 2009: 2413–2422).

В последующих экспериментах, мы анализировали РАРилирующую активность AtPARP2 в дрожжевой системе. Для этого экспрессию AtPARP2 индуцировали в среде SG DO-LEU, содержащей 2% галактозу, в течение 8 часов. Затем, 8 мкг белкового лизата смешивали с равным объемом 40% метанола и наносили на нитроцеллюлозную мембрану. Для предотвращения неспецифической сорбции мембрану обрабатывали 5% раствором обезжиренного молока. Остатки поли-АДФ-рибозы (PAR) определяли с использованием моноклональных антител специфичного к PAR (10H) (Enzo Life Sciences, Farmingdale, США). Обнаружение остатков PAR на нитроцеллюлозной мембране проводили путем регистрации люминесценции при обработке мембраны хемилюминесцентным реагентом, с помощью анализатора Image Quant Las 4000.

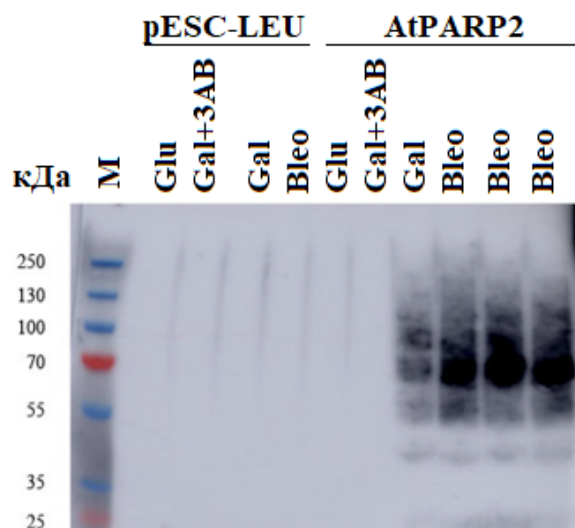
Как видно из рисунка 3В клетки дрожжей, экспрессирующие AtPARP2, проявляли РАРилирующую активность после индукции галактозой, тогда как в экстракте клеток, трансформированных пустым вектором, инкубированных галактозой не обнаружили сигнал РАРилирования.

Одной из наиболее известных ролей PARP является их функция в качестве сенсора повреждения ДНК. PARP1, в частности, связывается в РАРилированной форме с одно- (SSB) и двухцепочечным разрывом ДНК (DSB), и привлекает белковую машину репарации ДНК в места повреждения ДНК (Hinz J.M., 2010: 4646-4651, Odell I.D., 2011: 4623-4632). Предполагается, что PARP растений играют аналогичную роль в реакциях клеток на генотоксический стресс. Показано, что сверхэкспрессия AtPARP2 приводит к снижению разрывов цепей ДНК в присутствии радикалов кислорода, тогда как подавление экспрессии AtPARP1 увеличивало количество разрывов цепей ДНК (De Block M., 2005: 95–106). После воздействия ионизирующего излучения наблюдалась активная экспрессия гена AtPARP1 во всех органах растений. Однако количество белка увеличивалась только в активно пролиферирующих тканях (Amy G., 2011: 360-1385). Такая тканеспецифическая генерация AtPARP1 белка в ответ на повреждение ДНК указывает на важную роль этого фермента в поддержании целостности ДНК во время репликации.

В связи с вышеизложенными, мы решили изучить активность AtPARP2 в дрожжевой системе в присутствии агентов, вызывающих двухцепочечные разрывы в геномной ДНК. В качестве агента мы использовали блеомицин (Bleo), гликопептидный антибиотик, синтезируемый бактериями *Streptomyces verticillus* (Abraham A.T., 2003: 45–52). Необходимо отметить, что блеомицин в отличие от радиомиметических, вызывают накопление двухцепочечные разрывы с 5'-фосфатными и 3'-фосфогликолятными концами либо с тупыми концами ДНК, либо с концами ДНК, смещенными на один из 5'-выступов основания (Povirk L.F., 1989: 5808-14).

Для этого культуру рекомбинантных дрожжей, экспрессирующих AtPARP2 по истечении времени индукции галактозой (см. раздел «Материалы и методы») собрали центрифугированием и ресуспендировали в 5 мл питательной среды SG DO-LEU и инкубировали в присутствии блеомицина в концентрации 50 мкг/мл в течение 30 мин. Клетки собирали центрифугированием, отмывали автоклавирующей охлажденной dH₂O. Клеточный лизат приготовленный лизированием дрожжевой массы вотрексированием в гомогенизационном буфере центрифугировали при 14000 об/мин в течении 40 мин, при температуре +4 °C. В качестве негативного контроля использовали клеточный экстракт клеток дрожжей, трансформированные пустым вектором

pESC-LEU. Белковый экстракт фракционировали с помощью ДСН-ПААГ электрофореза. Далее белки из полиакриламидного геля перенесли на PVDF мембрану и инкубировали ее с моноклональными анти-PAR антителами.



М- Маркеры молекулярной массы белков PageRuler Plus, окрашенные, 10-250 кДа; Glu – 2% глюкозы; Gal – 2% галактозы; Bleo – блеомицин 50 мкг/мл; 3AB – 5 мкМ 3-Аминобензамида.

Рисунок 4 – Анализ авто-поли(АДФ-рибозил)ирующей активности AtPARP2

Как видно из рисунка 4, анти-PAR антитела выявили белковые полосы с молекулярной массой приблизительно в пределах 40-130 кДа в присутствии блеомицина. Можно предположить, что в дрожжей системе присутствие блеомицина вызывает накопление двухцепочечных разрывов в ДНК и активацию AtPARP2. При этом, AtPARP2 активно поли-АДФ-рибозилирует дрожжевые акцепторные белки путем многократного переноса АДФ-рибозных групп из НАД⁺. В присутствии ингибитора PARP фермента – 5 мкМ

3-Аминобензамида АДФ-рибозилирование белков полностью блокируется, что подтверждает, что наблюдаемые АДФ-рибозилирование белков является следствием активации AtPARP2.

Заключение

В результате проведенных работ нами был амплифицирован AtPARP2 кДНК ген методом ПЦР на матрице созданной нами ранее рекомбинантной плазмиды pET28c/AtPARP2 и успешно экспрессирован в *S. cerevisiae* под контролем GAL10 промотора. Анализ экспрессии методом вестерн блоттинга с полученными нами поликлональными антителами к AtPARP2 показал, что AtPARP2 представляет собой основной белок, продуцируемый в *S. cerevisiae* с молекулярной массой 72,2 кДа, что соответствует массе белка предсказанной на основе аминокислотной последовательности. Анализ роста рекомбинантных дрожжей показал, что экспрессия AtPARP2 в дрожжевых клетках FF 18733 не приводит к значительному ингибированию роста по сравнению с контрольными клетками. Вероятно, различия в структуре N-концевой области AtPARP2 с ДНК связывающим доменом PARP1, являются причиной отсутствия полного подавления роста дрожжей. Определение PAR-илированных белков рекомбинантных дрожжевых клеток и автомодифицирующей активности рекомбинантного AtPARP2 с применением коммерчески доступных моноклональных анти-PAR антител показало что AtPARP2 проявляет PARилирующую активность после индукции галактозой. А также в ответ на двухцепочечные разрывы ДНК, индуцированные блеомицином может катализировать реакцию поли-АДФ-рибозилирования акцепторных белков дрожжей. Ингибитор PARP фермента 3-AB значительно ингибировал количество поли АДФ-рибозилированных белковых продуктов.

Литература

- 1 Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L. Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal // *Genes Dev.* – 2005. – Vol. 19. – P. 1951-1967.
- 2 Ame J-C., Spelnhauer C., de Murcia G. The PARP superfamily // *BioEssays.* – 2004. – Vol. 26. – P. 882-893.
- 3 Schreiber V., Dantzer F., Ame J-C., de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* – 2006. – Vol. 7. – P. 517-528.
- 4 Woodhouse B.C., Dianov G.L. Poly ADP-ribose polymerase-1: an international molecule of mystery // *DNA Repair.* – 2008. – Vol. 7. – P. 1077-1086.
- 5 Briggs A.G., Bent A.F. Poly(ADP-ribose)ylation in plants // *Trends Plant Sci.* – 2011. – Vol. 16, № 7. – P. 372-80.

- 6 Lamb R.S., Citarelli M., Teotia S. Functions of the poly(ADP-ribose) polymerase superfamily in plants // *Cell Mol. Life Sci.* – 2012. – Vol. 69, № 2. – P.175-89.
- 7 Briggs A.G., Bent A.F. Poly(ADP-ribosylation) in plants // *Trends in Plant Science.* – 2011. – Vol. 16, № 7. – P. 360-1385.
- 8 Hinz J.M., Rodriguez Y., Smerdon M.J. Rotational dynamics of DNA on the nucleosome surface markedly impact accessibility to a DNA repair enzyme // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2010. – Vol. 107. – P. 4646-4651.
- 9 Odell I.D., Barbour J.E., Murphy D.L., Della-Maria J.A., Sweasy J.B., Tomkinson A.E., Wallace, S.S., Pederson, D.S. Nucleosome disruption by DNA ligase III-XRCC1 promotes efficient base excision repair // *Mol. Cell. Biol.* – 2011. – Vol. 31. – P. 4623-4632.
- 10 Bonicalzi M.E., Haince J.F., Droit A., Poirier G.G. Regulation of poly(ADP-ribose) metabolism by poly(endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation-ribose) glycohydrolase: where and when? // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2005. – Vol. 62. – P. 739-750.
- 11 Ono T., Kasamatsu A., Oka S., Moss J. The 39-kDa poly-(ADP-ribose) glycohydrolase ARH3 hydrolyzes O-acetyl-ADP-ribose, a product of the Sir2 family of acetyl-histone deacetylases // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2006. – Vol. 103. – P. 16687-16691.
- 12 Sharifi R., Morra R., Appel C.D., Tallis M. et al. Deficiency of terminal endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease // *EMBO J.* – 2013. – Vol. 32. – P.1225-1237.
- 13 Koh D.W., Lawler A.M., Poitras M.F., Sasaki M., Wattler S., Nehls M.C., Stoger T., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.M. Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2004. – Vol. 101. – P. 17699-17704.
- 14 Ame J.C., Fouquerel E., Gauthier L.R., Biard, D., Boussin F.D., Dantzer F., de Murcia G., Schreiber V. Radiation-induced mitotic catastrophe in PARG-deficient cells // *J. Cell Sci.* 2009. – Vol. 122. – P. 1990-2002.
- 15 Suter B., Auerbach D., Stagljar I. Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond // *Biotechniques.* – 2006. – Vol. 40. – P. 625–644.
- 16 Hartwell L.H. Yeast and cancer // *Biosci. Rep.* – 2004. – Vol. 24. – P. 523–544.
- 17 Rissel D., Heym P.P., Peiter E.A. yeast growth assay to characterize plant poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) proteins and inhibitors // *Anal. Biochem.* – 2017. – Vol. 15, №527. – P. 20-23.
- 18 Куанбай А.К., Сметенов И.Т., Сапарбаев М.К., Ищенко А.А., Тайпакова С.М., Бисенбаев А.К. Выделение и характеристика кДНК гена поли(АДФ-рибоза) полимеразы 2 *Arabidopsis thaliana* // *Вестник КазНУ. Серия биологическая.* – 2018. – Том 74. – № 1. – С. 99-111.
- 19 Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – № 5259. – P. 680-685.
- 20 Kaiser P., Auer B., Schweiger M. Inhibition of cell proliferation in *Saccharomyces cerevisiae* by expression of human NAD⁺ ADP-ribosyltransferase requires the DNA-binding domain (“zinc fingers”) // *Mol. Gen. Genet.* – 1992. – Vol. 232. – P. 231e239.
- 21 Perrin D., Gras S., van Hille B., Hill B.T. Expression in yeast and purification of functional recombinant human poly(ADP-ribose)polymerase (PARP). Comparative pharmacological profile with that of the rat enzyme // *J. Enzyme Inhib.* – 2000. – Vol. 15. – P. 461e469.
- 22 Perkins E., Sun D., Nguyen A., Tulac S., Francesco M., Tavana H., Nguyen H., Tugendreich S., Barthmaier P., Couto J., Yeh E., Thode S., Jarnagin K., Jain A., Morgans D., Melese T. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase PARP1 and PARP2 identified using a cell-based screen in yeast // *Cancer Res.* – 2001. – Vol. 61. – P. 4175e4183.
- 23 Tao Z., Gao P., Liu H.W. Studies of the expression of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of PARP-1 substrates by yeast proteome microarray screening // *Biochemistry.* – 2009. – Vol. 48. – P. 11745e11754.
- 24 La Ferla M., Mercatanti A., Rocchi G., Lodovichi S., Cervelli T., Pignata L., Caligo M.A., Galli A. Expression of human poly(ADP-ribose) polymerase 1 in *Saccharomyces cerevisiae*: effect on survival, homologous recombination and identification of genes involved in intracellular localization // *Mut. Res. – Fundam. Mol. Mechan. Mutagen.* – 2015. – Vol. 774. – P. 14e24.
- 25 Rissel D., Heym P.P., Thor K., Brandt W., Wessjohann L.A., Peiter E. No silver bullet – canonical poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs) are no universal factors of abiotic and biotic stress resistance of *Arabidopsis thaliana* // *Front. Plant Sci.* 2007. – Vol. 8. – P. 59.
- 26 Gottipati P., Vischioni B., Schultz N., Solomons J., Bryant H.E., Djureinovic T., Issaeva N., Sleeth K., Sharma R.A., Helleday T. Poly(ADP-ribose) polymerase is hyperactivated in homologous recombination-defective cells // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70. – P. 5389–5398.
- 27 Weil M.K., Chen A.P. PARP inhibitor treatment in ovarian and breast cancer // *Curr. Probl. Cancer.* – 2011. – Vol. 35. – P. 7–50.
- 28 De Vos M., Schreiber V., Dantzer F. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art // *Biochem. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 84. – P. 137–146.
- 29 Tao G.H., Yang L.Q., Gong C.M., Huang H.Y., Liu J.D., Liu J.J., Yuan J.H., Chen W., Zhuang Z.X. Effect of PARP-1 deficiency on DNA damage and repair in human bronchial epithelial cells exposed to benzo(a)pyrene // *Mol. Biol. Rep.* – 2009. – Vol. 36. – P. 2413–2422.
- 30 De Block M., Verduyn C., De Brouwer D., Cornelissen M. Poly(ADP-ribose) polymerase in plants affects energy homeostasis, cell death and stress tolerance // *Plant J.* – 2005. – Vol. 41. – P. 95–106.

- 31 Amy G. Briggs and Andrew F. Bent. Poly(ADP-ribosylation) in plants // Trends in Plant Science. – 2011. – Vol. 16, № 7. – P. 360-1385.
- 32 Abraham A.T., Lin J., Newton D.L., Rybak S., Hecht S. RNA cleavage and inhibition of protein synthesis by bleomycin // Chem. Biol. – 2003. – Vol. 10. – P. 45–52.
- 33 Povirk L.F., Han Y.H., Steighner R.J. Structure of bleomycin-induced DNA double-strand breaks: predominance of blunt ends and single-base 5' extensions // Biochemistry. – 1989. – Vol. 28, № 14. – P. 5808-14.

References

- 1 Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L. Poly(ADP-ribosylation) by PARP-1: 'PAR-laying' NAD⁺ into a nuclear signal // Genes Dev. – 2005. – Vol. 19. – P. 1951-1967.
- 2 Ame J-C., Spenlehauer C., de Murcia G. The PARP superfamily // BioEssays. – 2004. – Vol. 26. – P. 882-893.
- 3 Schreiber V., Dantzer F., Ame J-C., de Murcia G. Poly(ADP -ribose): novel functions for an old molecule // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. – 2006. – Vol. 7. – P. 517-528.
- 4 Woodhouse B.C., Dianov G.L. Poly ADP -ribose polymerase-1: an international molecule of mystery // DNA Repair. – 2008. – Vol. 7. – P. 1077-1086.
- 5 Briggs A.G, Bent A.F. Poly(ADP -ribose)ylation in plants // Trends Plant Sci. – 2011. – Vol. 16, № 7. – P. 372-80.
- 6 Lamb R.S., Citarelli M., Teotia S. Functions of the poly(ADP -ribose) polymerase superfamily in plants // Cell Mol. Life Sci. – 2012. – Vol. 69, № 2. – P.175-89.
- 7 Briggs A.G., Bent A.F. Poly(ADP -ribose)ylation in plants // Trends in Plant Science. – 2011. – Vol. 16, № 7. – P. 360-1385.
- 8 Hinz J.M., Rodriguez Y., Smerdon M.J. Rotational dynamics of DNA on the nucleosome surface markedly impact accessibility to a DNA repair enzyme // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2010. – Vol. 107. – P. 4646-4651.
- 9 Odell I.D., Barbour J.E., Murphy D.L., Della-Maria J.A., Sweasy J.B., Tomkinson A.E., Wallace, S.S., Pederson, D.S. Nucleosome disruption by DNA ligase III-XRCC1 promotes efficient base excision repair // Mol. Cell. Biol. – 2011. – Vol. 31. – P. 4623-4632.
- 10 Bonicalzi M.E., Haince J.F., Droit A., Poirier G.G. Regulation of poly(ADP-ribose) metabolism by poly(endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation -ribose) glycohydrolase: where and when? // Cell. Mol. Life Sci. – 2005. – Vol. 62. – P. 739-750.
- 11 Ono T., Kasamatsu A., Oka S., Moss J. The 39-kDa poly-(ADP-ribose) glycohydrolase ARH3 hydrolyzes O-acetyl-ADP-ribose, a product of the Sir2 family of acetyl-histone deacetylases // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2006. – Vol. 103. – P. 16687-16691.
- 12 Sharifi R., Morra R., Appel C.D., Tallis M. et al. Deficiency of terminal endonuclease of bull seminal plasma induced by ADP-ribosylation -ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease // EMBO J. – 2013. – Vol. 32. – P.1225-1237.
- 13 Koh D.W., Lawler A.M., Poitras M.F., Sasaki M., Wattler S., Nehls M.C., Stoger T., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.M. Failure to degrade poly(ADP-ribose) causes increased sensitivity to cytotoxicity and early embryonic lethality // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2004. – Vol. 101. – P. 17699-17704.
- 14 Ame J.C., Fouquerel E., Gauthier L.R., Biard,D., Boussin F.D., Dantzer F., de Murcia G., Schreiber V. Radiation-induced mitotic catastrophe in PARG-deficient cells // J. Cell Sci. 2009. – Vol. 122. – P. 1990-2002.
- 15 Suter B., Auerbach D., Stagljar I. Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: the first 15 years and beyond // Biotechniques. – 2006. – Vol. 40. – P. 625–644.
- 16 Hartwell L.H. Yeast and cancer // Biosci. Rep. – 2004. – Vol. 24. – P. 523–544.
- 17 Rissel D., Heym P.P., Peiter E.A. yeast growth assay to characterize plant poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) proteins and inhibitors // Anal. Biochem. – 2017. – Vol. 15, №527. – P. 20-23.
- 18 Kuanbay A.K., Smekenov I.T., Saparbayev M.K., Ishchenko A.A., Taipakova S.M., Bissenbaev A.K. Isolation and characterization of *Arabidopsis thaliana* poly(ADP-ribose) polymerase 2 cDNA// Experimental Biology. -2018. -Vol. 74, №1. – P. 99-111.
- 19 Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // Nature. – 1970. – Vol. 227. – № 5259. – P. 680-685.
- 20 Kaiser P., Auer B., Schweiger M. Inhibition of cell proliferation in *Saccharomyces cerevisiae* by expression of human NAD⁺ ADP-ribosyltransferase requires the DNA-binding domain ("zinc fingers") // Mol. Gen. Genet. – 1992. – Vol. 232. – P. 231e239.
- 21 Perrin D., Gras S., van Hille B., Hill B.T. Expression in yeast and purification of functional recombinant human poly(ADP-ribose)polymerase (PARP). Comparative pharmacological profile with that of the rat enzyme // J. Enzyme Inhib. – 2000. – Vol. 15. – P. 461e469.
- 22 Perkins E., Sun D., Nguyen A., Tulac S., Francesco M., Tavana H., Nguyen H., Tugendreich S., Barthmaier P., Couto J., Yeh E., Thode S., Jarnagin K., Jain A., Morgans D., Melese T. Novel inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase PARP1 and PARP2 identified using a cell-based screen in yeast // Cancer Res. – 2001. – Vol. 61. – P. 4175e4183.
- 23 Tao Z., Gao P., Liu H.W. Studies of the expression of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of PARP-1 substrates by yeast proteome microarray screening // Biochemistry. – 2009. – Vol. 48. – P. 11745e11754.

- 24 La Ferla M., Mercatanti A., Rocchi G., Lodovichi S., Cervelli T., Pignata L., Caligo M.A., Galli A. Expression of human poly (ADP-ribose) polymerase 1 in *Saccharomyces cerevisiae*: effect on survival, homologous recombination and identification of genes involved in intracellular localization // *Mut. Res. – Fundam. Mol. Mechan. Mutagen.* – 2015. – Vol. 774. – P. 14e24.
- 25 Rissel D., Heym P.P., Thor K., Brandt W., Wessjohann L.A., Peiter E. No silver bullet – canonical poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs) are no universal factors of abiotic and biotic stress resistance of *Arabidopsis thaliana* // *Front. Plant Sci.* 2007. – Vol. 8. – P. 59.
- 26 Gottipati P., Vischioni B., Schultz N., Solomons J., Bryant H.E., Djureinovic T., Issaeva N., Sleeth K., Sharma R.A., Helleday T. Poly(ADP-ribose) polymerase is hyperactivated in homologous recombination-defective cells // *Cancer Res.* – 2010. – Vol. 70. – P. 5389–5398.
- 27 Weil M.K., Chen A.P. PARP inhibitor treatment in ovarian and breast cancer // *Curr. Probl. Cancer.* – 2011. – Vol. 35. – P. 7–50.
- 28 De Vos M., Schreiber V., Dantzer F. The diverse roles and clinical relevance of PARPs in DNA damage repair: current state of the art // *Biochem. Pharmacol.* – 2012. – Vol. 84. – P. 137–146.
- 29 Tao G.H., Yang L.Q., Gong C.M., Huang H.Y., Liu J.D., Liu J.J., Yuan J.H., Chen W., Zhuang Z.X. Effect of PARP-1 deficiency on DNA damage and repair in human bronchial epithelial cells exposed to benzo(a)pyrene // *Mol. Biol. Rep.* – 2009. – Vol. 36. – P. 2413–2422.
- 30 De Block M., Verduyn C., De Brouwer D., Cornelissen M. Poly(ADP-ribose) polymerase in plants affects energy homeostasis, cell death and stress tolerance // *Plant J.* – 2005. – Vol. 41. – P. 95–106.
- 31 Amy G. Briggs and Andrew F. Bent. Poly(ADP-ribosylation) in plants // *Trends in Plant Science.* – 2011. – Vol. 16, № 7. – P. 360-1385.
- 32 Abraham A.T., Lin J., Newton D.L., Rybak S., Hecht S. RNA cleavage and inhibition of protein synthesis by bleomycin // *Chem. Biol.* – 2003. – Vol. 10. – P. 45–52.
- 33 Povirk L.F., Han Y.H., Steighner R.J. Structure of bleomycin-induced DNA double-strand breaks: predominance of blunt ends and single-base 5' extensions // *Biochemistry.* – 1989. – Vol. 28, № 14. – P. 5808-14.