

Сравнение кинетических параметров рекомбинантных PARP1 человека и голого землекопа

Назаров К.Д.^{1, 2*}, Петрусева И.О.², Лаврик О.И.²

¹ Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

* k.nazarov1@g.nsu.ru

Ключевые слова: репарация; старение; голый землекоп; PARP1

Мотивация и цель: Голый землекоп (*Heterocephalus glaber*) представляет собой перспективную модель для изучения функционирования систем поддержания стабильности генома. Этот небольшой грызун демонстрирует экстремально высокую продолжительность жизни (~32 года) по сравнению с близкой по размеру и массе тела мышью (*Mus musculus*) (~4 года). Клетки голого землекопа обладают рядом особенностей функционирования генома, транскриптома и протеома, которые обуславливают устойчивость его клеток к старению, раковым заболеваниям, а также окислительному стрессу. Кроме того, клетки голого землекопа имеют более эффективные системы репарации ДНК по сравнению с клетками близкой по размеру тела мыши [1]. Несмотря на это, особенности функционирования белков репарации, обеспечивающие повышенную эффективность репарации ДНК в клетках голого землекопа, требуют более углубленного исследования. Ключевым регулятором многих клеточных процессов, в том числе репарации ДНК, является фермент PARP1. Регуляция работы многих клеточных белков-мишеней, включая собственную активность PARP1, обеспечивается благодаря катализируемой данным ферментом реакции поли(АДФ-рибозил)ирования.

Ранее нами было проведено изучение уровня синтеза поли(АДФ-рибозы) на белковых экстрактах клеток человека (НЕК 293Т) и голого землекопа (NSF8) [2]. Было показано, что в экстракте клеток НЕК 293Т уровень аутомодификации PARP1 был в 10 раз выше по сравнению с наблюдаемым в экстракте клеток NSF8. Наблюдаемые различия могут быть обусловлены как неопределенной концентрацией PARP1 в экстрактах, так и присутствием в них белковых факторов, стимулирующих аутомодификацию PARP1. В связи с этим целью нашей работы было получение рекомбинантных PARP1 человека и голого землекопа и проведение сравнительной оценки их кинетических параметров.

Данная работа посвящена сравнительному изучению характеристик взаимодействия рекомбинантного PARP1 голого землекопа и человека с ДНК, а также его термостабильности и устойчивости к денатурирующим воздействиям другой природы. Цель работы – получение рекомбинантного PARP1 голого землекопа и сравнение ключевых характеристик (кинетические параметры реакции парилирования, сродство к ДНК, термостабильность и устойчивость к денатурирующим воздействиям), с соответствующими характеристиками PARP1 человека.

Методы и алгоритмы: Нарботка PARP1 проведена в клетках *E. coli* BL21 Gen-X методом аутоиндукции при 37 °С в течение 18 часов с использованием плазмиды pLate31_{Hgl}PARP1; целевой белок был очищен хроматографически. Кинетические

параметры полученных рекомбинантных PARP1 определяли методом флуоресцентного титрования с измерением анизотропии флуоресценции.

Результаты: В результате данной работы была выбрана методика очистки рекомбинантного белка PARP1 голого землекопа. Было показано, что значения K_M и V_{max} рекомбинантных PARP1 человека и голого землекопа близки, что говорит о схожести кинетических свойств двух белков. Сравнительный биоинформатический анализ аминокислотной последовательности обнаружил 13 уникальных аминокислотных замен в структуре PARP1 голого землекопа по сравнению с PARP1 человека и мыши. Однако ни одна из замен не затрагивает каталитическую триаду His862, Tyr896 и Glu988.

Выводы: Результаты биоинформатического анализа соответствуют полученным экспериментальным путем значениям кинетических параметров для очищенных рекомбинантных PARP1 человека и голого землекопа, экспрессированных в *E. coli*.

Финансирование: Работа выполнена в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300041-4.

Comparison of kinetic parameters of recombinant PARP1 man and naked mole rat

Nazarov K.D.^{1, 2*}, Petrusheva I.O.², Lavrik O.I.²

¹ Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

² Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, SB RAS, Novosibirsk, Russia

* k.nazarov1@g.nsu.ru

Key words: reparation; aging; naked mole rat; PARP1

Motivation and Aim: The naked mole rat (*Heterocephalus glaber*) represents a promising model for studying the functioning of genome stability maintenance systems. This small rodent demonstrates an extremely high life lifespan (~32 years) compared to a mouse (*Mus musculus*) of similar size and body weight (~4 years). Naked mole rat cells have a number of features of the functioning of the genome, transcriptome and proteome, which determine the resistance of its cells to aging, cancer, and oxidative stress. In addition, naked mole rat cells have more efficient DNA repair systems than cells of a similar body size in a mouse [1]. Despite this, the peculiarities of the functioning of repair proteins, which ensure increased efficiency of DNA repair in naked mole rat cells, require more in-depth study. A key regulator of many cellular processes, including DNA repair, is the enzyme PARP1. Regulation of the work of many cellular target proteins, including the intrinsic activity of PARP1, is ensured by the poly(ADP-ribosyl)ation reaction catalyzed by this enzyme.

Previously, we studied the level of poly(ADP-ribose) synthesis on protein extracts of human cells (HEK 293T) and naked mole rat (NSF8) [2]. It was shown that in the HEK 293T cell extract the level of PARP1 automodification was 10 times higher compared to that observed in the NSF8 cell extract. The observed differences may be due to both an uncertain concentration of PARP1 in the extracts and the presence of protein factors in them that stimulate PARP1 automodification. In this regard, the goal of this work was to obtain recombinant human and naked mole rat PARP1, and to conduct a comparative assessment of their kinetic parameters.

This work is devoted to a comparative study of the characteristics of the interaction of recombinant naked mole rat and human PARP1 with DNA, as well as its thermal stability and resistance to denaturing influences of other nature. Purpose of the work: to obtain recombinant naked mole rat PARP1 and compare key characteristics (kinetic parameters of the parylation reaction, affinity for DNA, thermal stability and resistance to denaturing influences) with the corresponding characteristics of human PARP1.

Methods and Algorithms: PARP1 production was carried out in *E. coli* BL21 Gen-X cells by autoinduction at 37 °C for 18 hours using the pLate31_{-Hgl}PARP1 plasmid; the target protein was purified by chromatography. The kinetic parameters of the obtained recombinant PARP1 were determined by fluorescence titration with fluorescence anisotropy measurements.

Results: As a result of this work, a method for purifying the recombinant naked mole rat PARP1 protein was selected. It was shown that the K_M and V_{max} values of recombinant human and naked mole rat PARP1 are close, which indicates the similarity of the kinetic properties of the two proteins. Comparative bioinformatics analysis of the amino acid sequence revealed 13 unique amino acid substitutions in the structure of naked mole rat PARP1 compared to human and mouse PARP1. However, none of the substitutions affected the catalytic triad His862, Tyr896 and Glu988.

Conclusion: The results of bioinformatics analysis are consistent with experimentally obtained kinetic parameter values for purified recombinant human and naked mole rat PARP1 expressed in *E. coli*.

Funding: The work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of Russian Federation (project number 121031300041-4).

Список литературы/References

1. Evdokimov A., Kutuzov M., Petruseva I., Lukjanchikova N. et al. Naked mole rat cells display more efficient excision repair than mouse cells. *Aging (Albany NY)*. 2018;10:1454-1473
2. Kosova A., Kutuzov M., Evdokimov A., Ilina E., Belousova E., Romanenko S., Trifonov V., Khodyreva S., Lavrik O. Poly(ADP-ribosyl)ation and DNA repair synthesis in the extracts of naked mole rat, mouse, and human cells. *Aging (Albany NY)*. 2019;11:2852-2873