



ВОСЬМИДЕСЯТОЕ БАХОВСКОЕ ЧТЕНИЕ

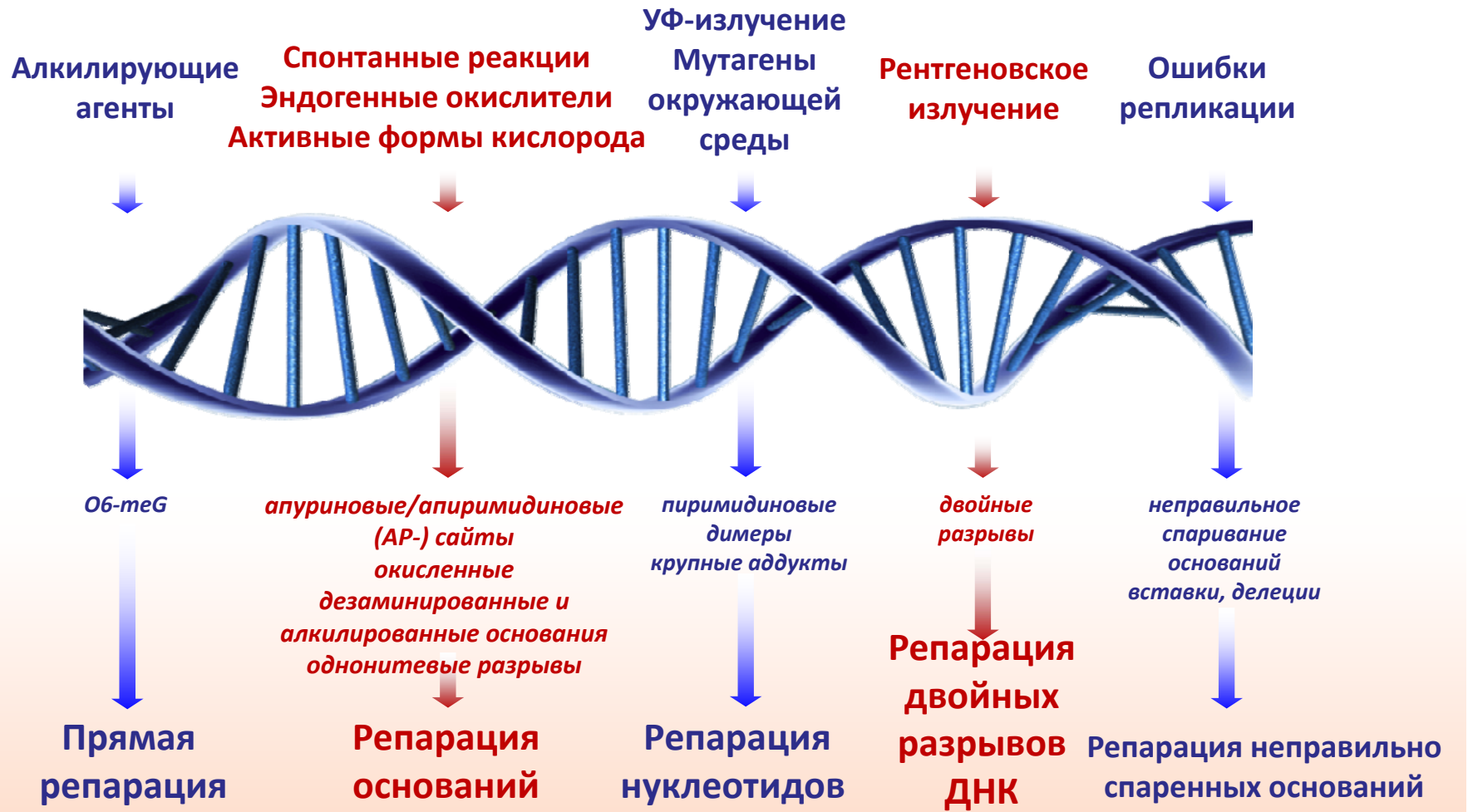
Поли(ADP-рибоза) полимеразы на страже стабильности генома

Лаврик Ольга Ивановна

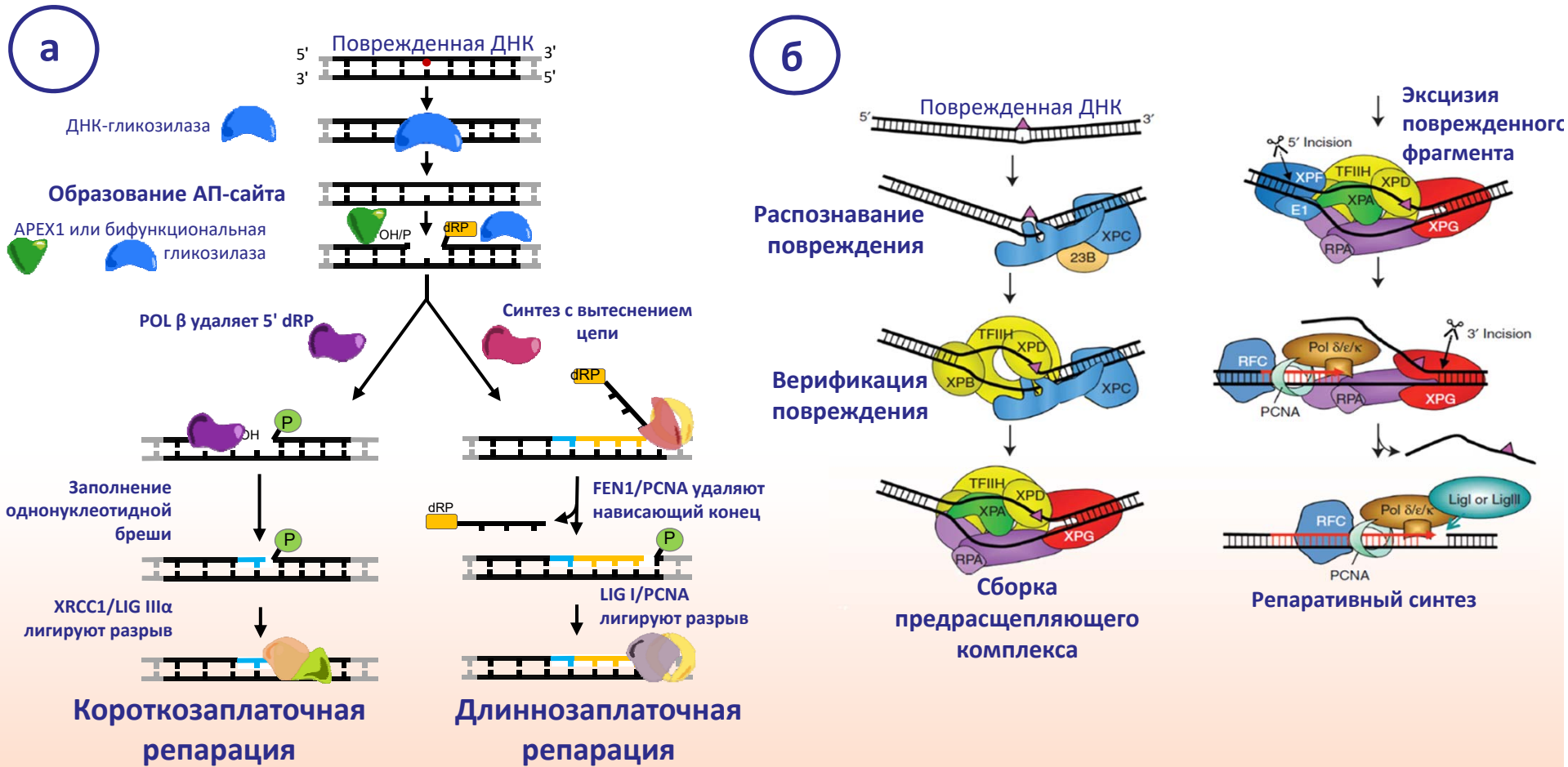
Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН,
Новосибирск

**ФИЦ Биотехнологии РАН
17 марта 2025**

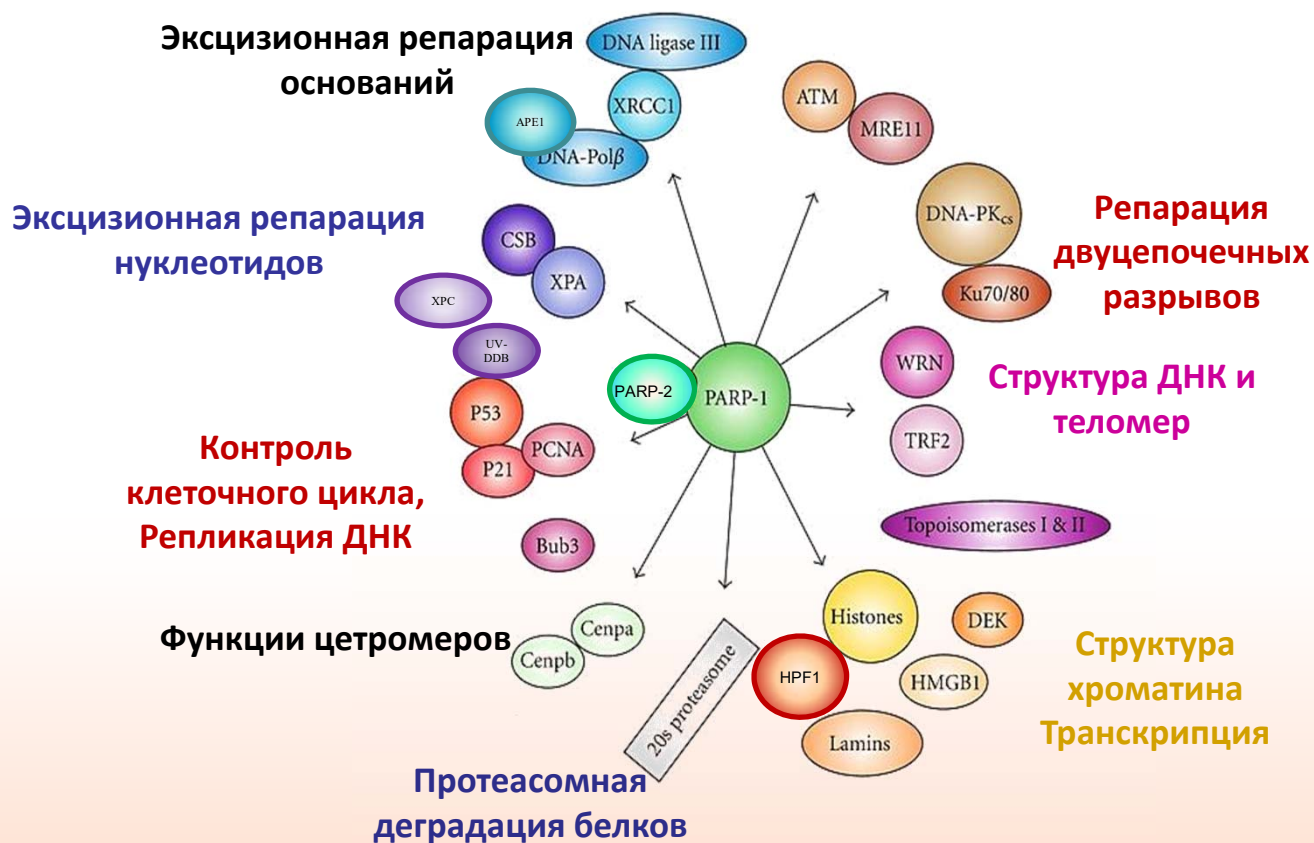
Повреждения и механизмы репарации ДНК



Системы репарации оснований (а) и объемных повреждений (б), ответственные за противостояние оксидативному стрессу и мутагенам окружающей среды



Поли(ADP-рибоза) полимеразы 1 и 2 (PARP1 и PARP2) – ядерные ферменты, обеспечивающие регуляцию ключевых клеточных процессов и стабильность генома человека





Pierre Chambon



Biochemical and Biophysical Research
Communications

Volume 11, Issue 1, 2 April 1963, Pages 39-43



Nicotinamide mononucleotide activation
of a new DNA-dependent polyadenylic
acid synthesizing nuclear enzyme ☆

P. Chambon, J.D. Weill, P. Mandel



Paul Mandel

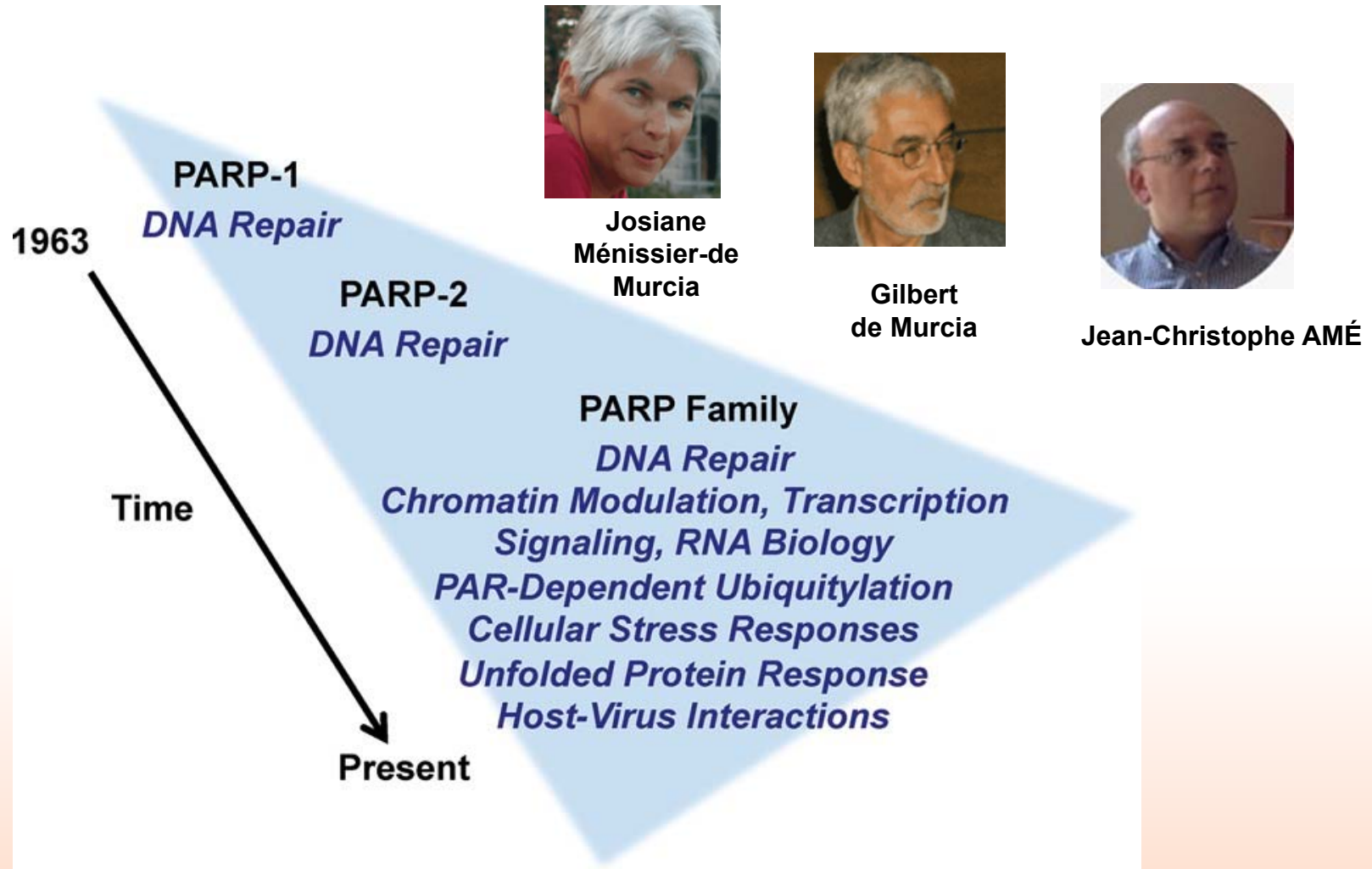
Chambon P, Weill JD, Doly J, Strosser MT,
Mandel P. On the formation of a novel
adenylic compound by enzymatic extracts of
liver nuclei. Biochem Biophys Res Commun.
1966



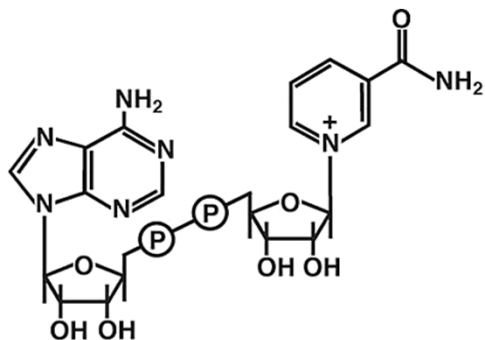
Masanao Miwa

Miwa M, Sugimura T. Splitting of the ribose-ribose
linkage of poly(adenosine diphosphate-ribose) by a calf
thymus extract. J Biol Chem. **1971**

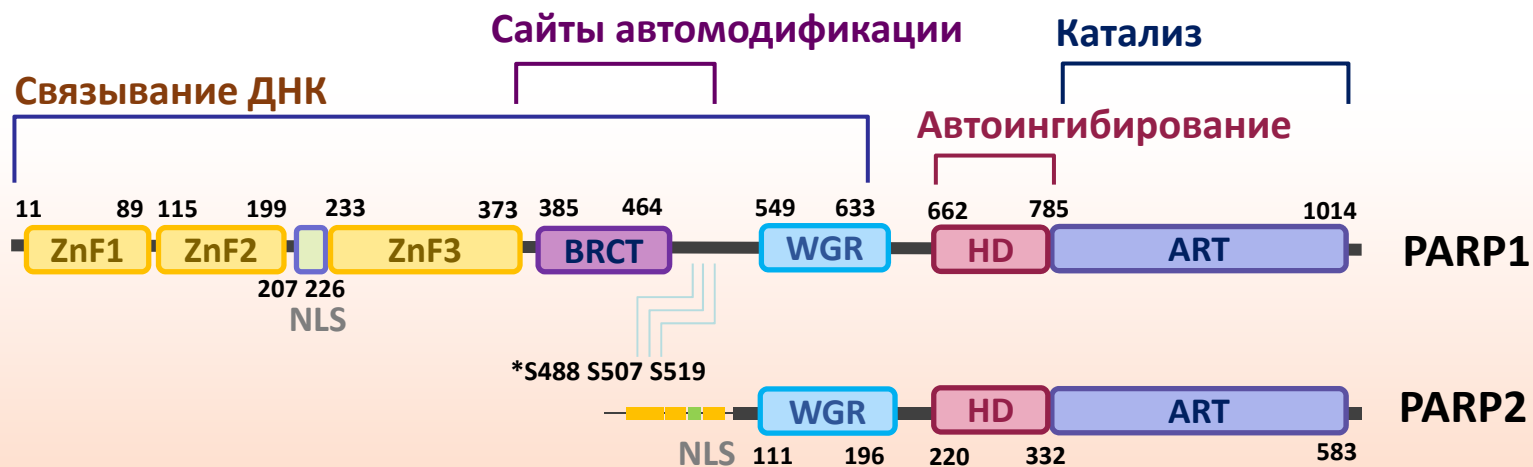
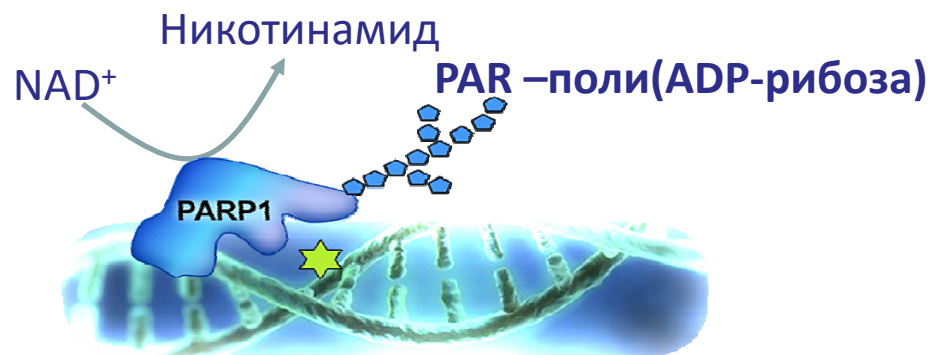
Miwa M, Tanaka M, Matsushima T, Sugimura T.
Purification and properties of glycohydrolase from calf
thymus splitting ribose-ribose linkages of
poly(adenosine diphosphate ribose). J Biol Chem. **1974**



PARP1 и PARP2 взаимодействуют с разрывами ДНК и катализируют синтез поли(ADP-рибозы)



Никотинамидадениндинуклеотид (NAD⁺)



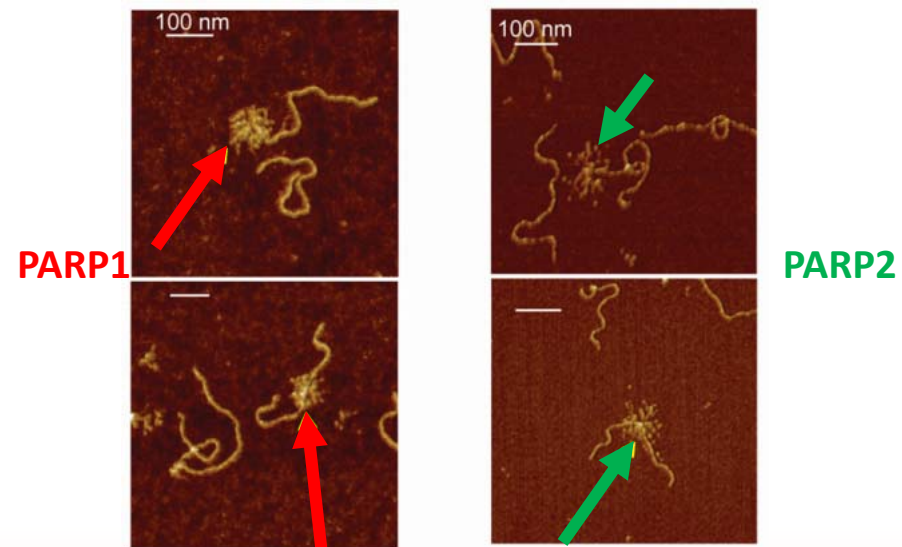
PAR-илирование PARP1 и PARP2 на поврежденной ДНК детектировано с помощью атомно-силовой микроскопии



Суханова М.В.



Loic Hamon



David Pastre

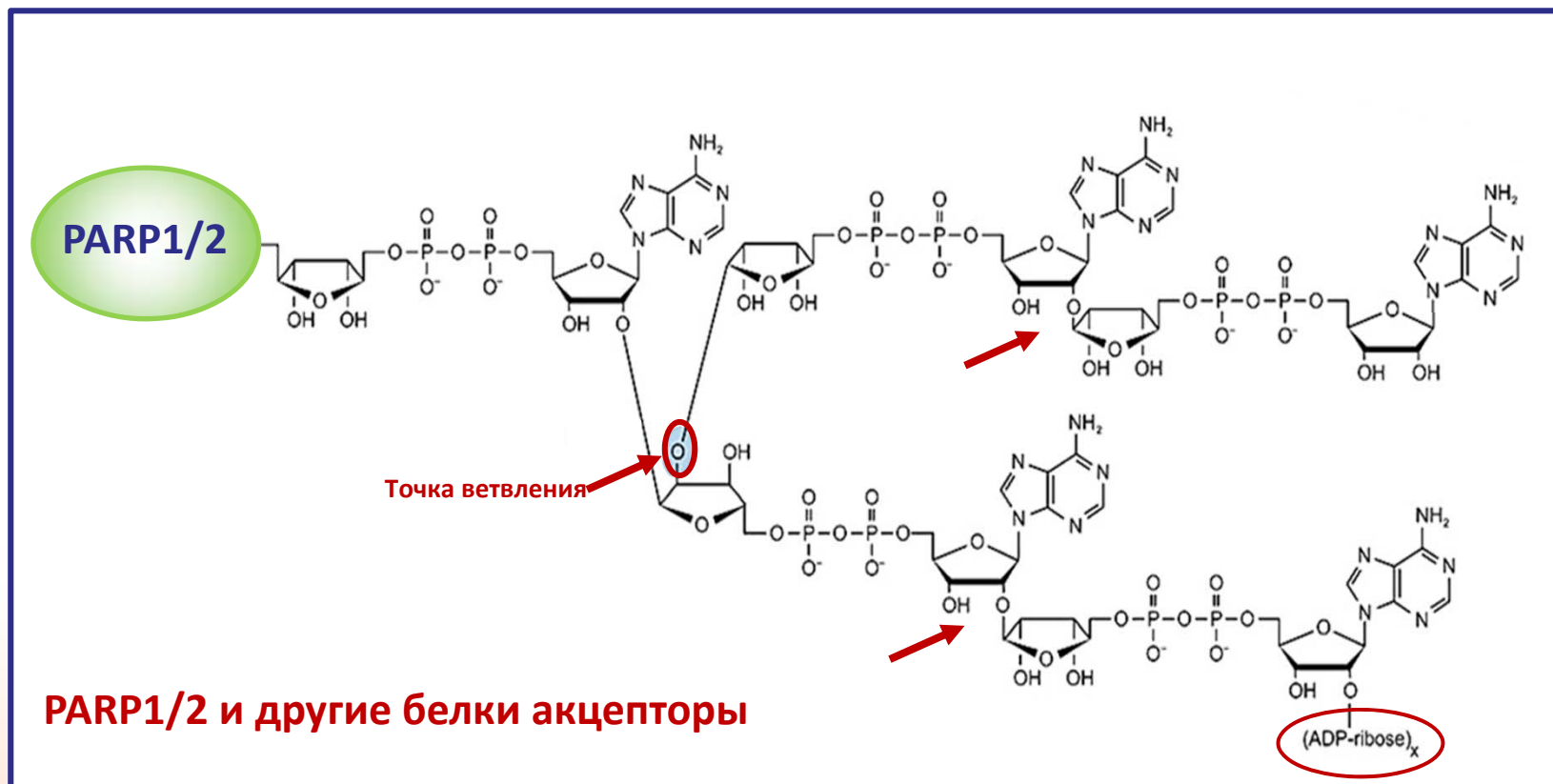


Patrick Curmi

Atomic force microscopy imaging of PARylated PARP2 or PARP1 in the presence of nicked 1200-bp DNA. Arrows indicate that PARylated PARP1 and PARP2 interacting with DNA

Sukhanova et al, Nucleic Acids Res, 2016

Поли(ADP-рибозил)ирование белков-мишеней

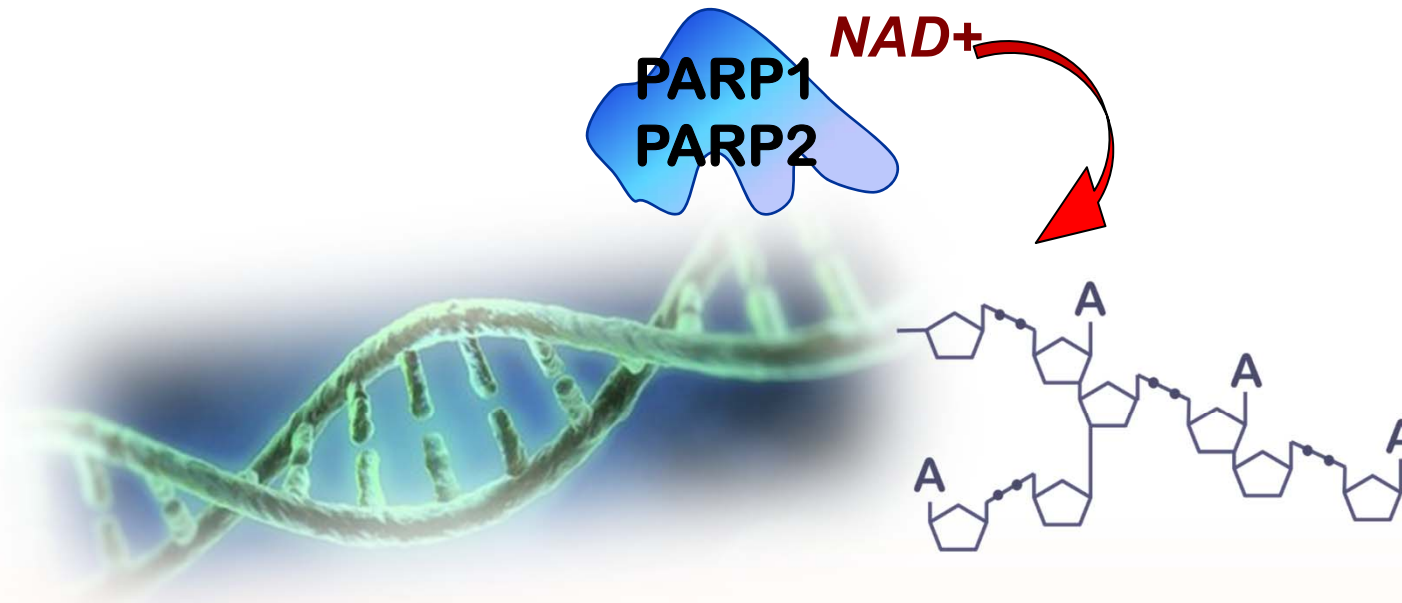


PARP1/2 катализируют синтез PAR и его присоединение к белкам по остаткам Asp/Glu и некоторым другим. PARP1 - наиболее эффективный катализатор поли(ADP-рибозил)ирования и акцептор PAR.

Функциональная роль ADP-рибозилирования

- Поли(ADP-рибозил)ирование белков приводит к диссоциации их комплексов с нуклеиновыми кислотами, то есть регулирует белок-нуклеиновые взаимодействия в различных системах клетки.
- В то же время белки взаимодействуют с поли(ADP-рибозой) и этот процесс важен для привлечения белков репарации на повреждения ДНК для восстановления структуры ДНК. Репарация ДНК и другие процессы происходят в биоконденсатах, формируемых поли(ADP-рибозой), ионами, полиаминами и/или PAR-связывающими белками.

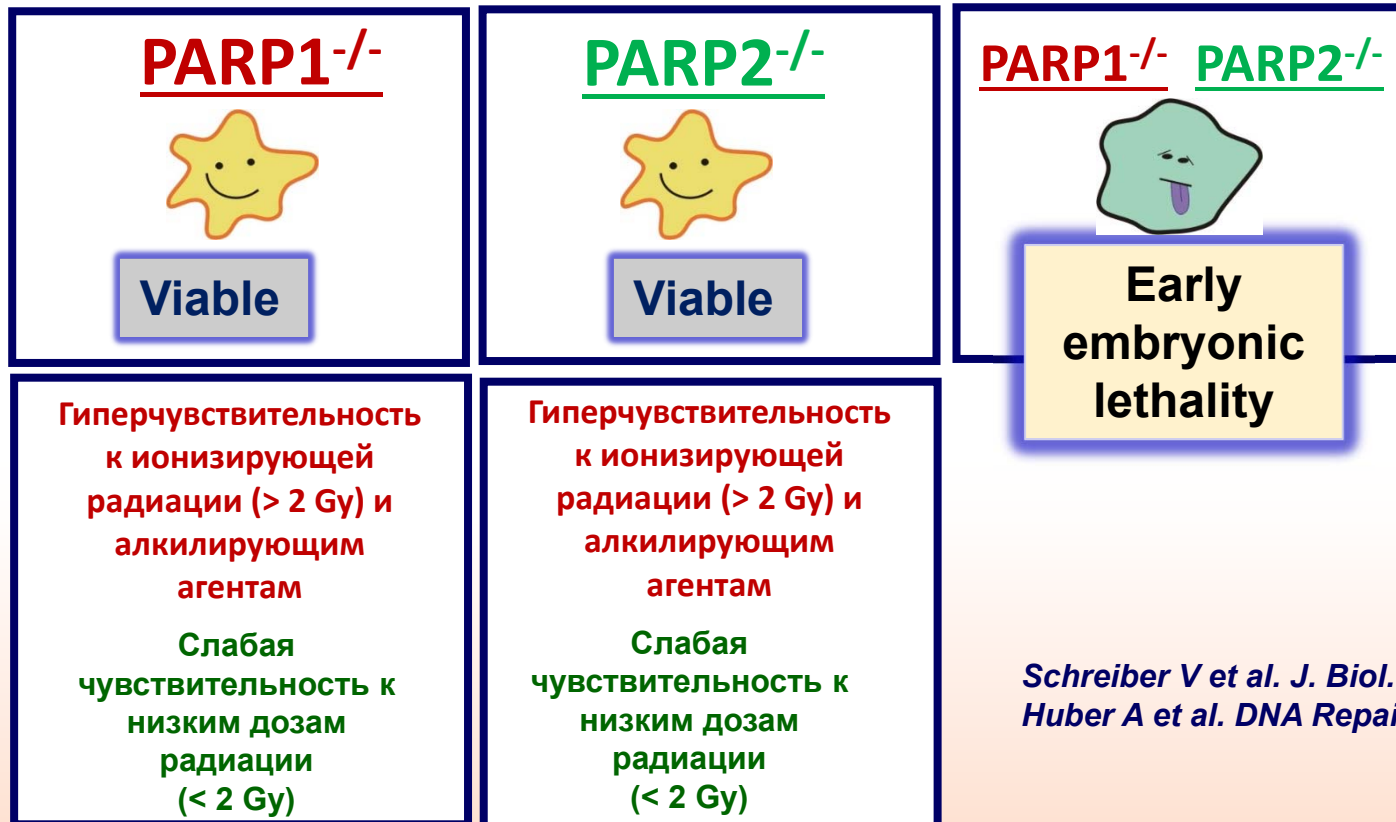
Не только белки, но и ДНК может быть мишенью поли(ADP-рибозил)ирования



PAR-илирование происходит вблизи разрыва цепи ДНК по конечным фосфатам

1. Talhaoui I, Lebedeva NA, Zarkovic G, Saint-Pierre C, Kutuzov MM, Sukhanova MV, Matkarimov BT, Gasparutto D, Saparbaev MK, Lavrik OI, Ishchenko AA. Poly(ADP-ribose) polymerases covalently modify strand break termini in DNA fragments in vitro. *Nucleic Acids Res.* 2016.
2. Zarkovic G, Belousova EA, Talhaoui I, Saint-Pierre C, Kutuzov MM, Matkarimov BT, Biard D, Gasparutto D, Lavrik OI, Ishchenko AA. Characterization of DNA ADP-ribosyltransferase activities of PARP2 and PARP3: new insights into DNA ADP-ribosylation. *Nucleic Acids Res.* 2018.
3. Belousova EA, Ishchenko AA, Lavrik OI. Dna is a New Target of Parp3. *Sci Rep.* 2018.

Нокаут генов PARP1 либо PARP2 повышает чувствительность к генотоксическому стрессу



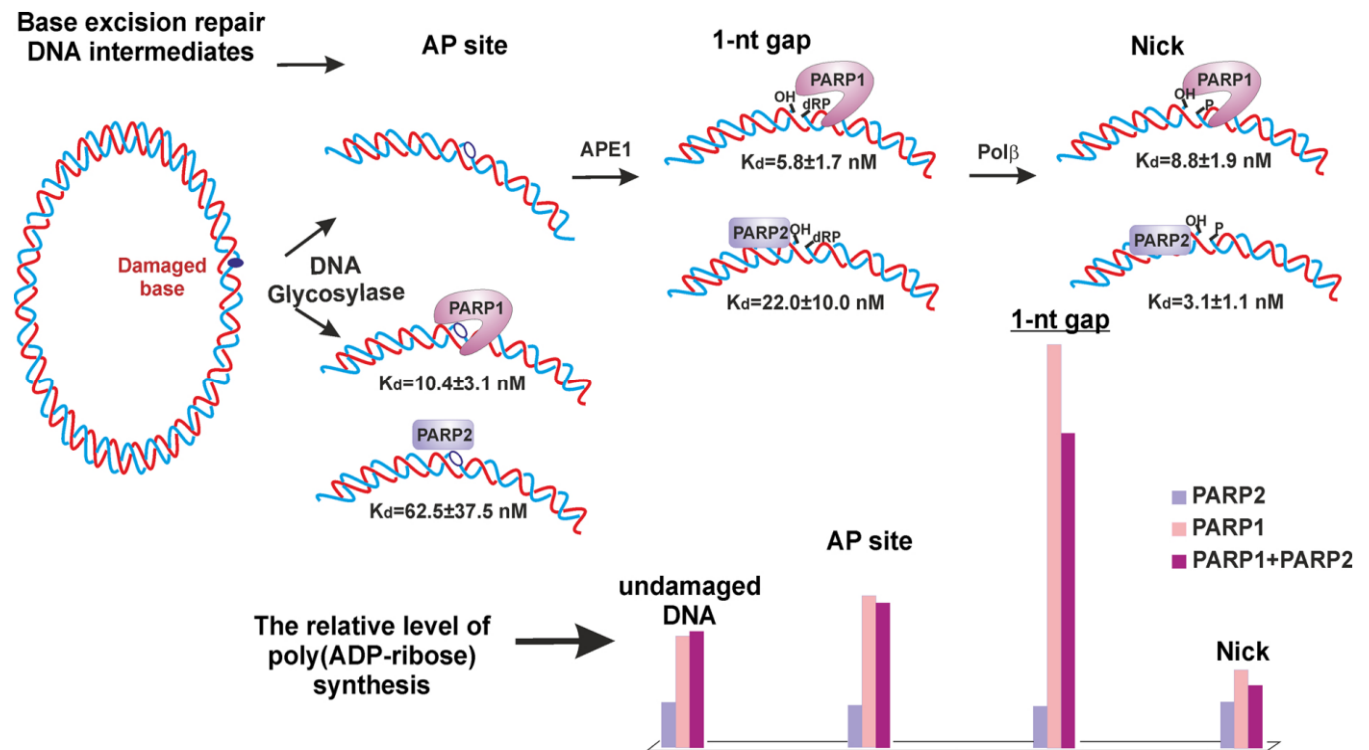
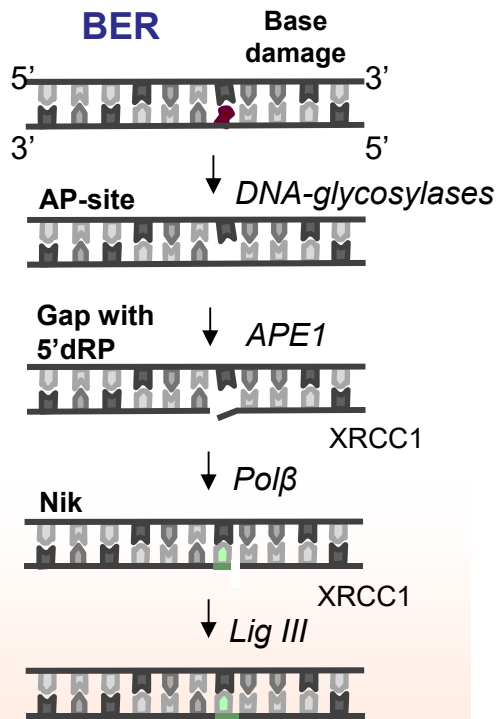
*Schreiber V et al. J. Biol. Chem. 2002;
Huber A et al. DNA Repair. 2004*

PARP1 и PARP2: зачем клетке два подобных фермента?

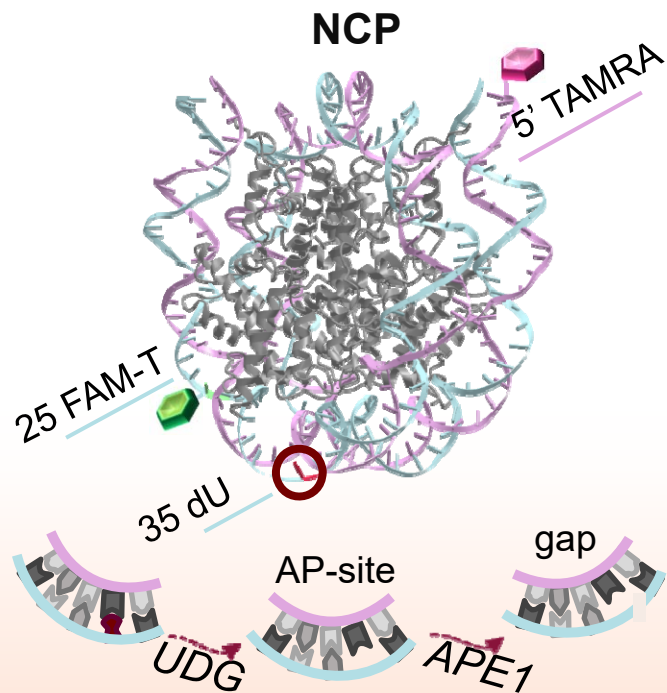
- Все ли функции PARP1 и PARP2 перекрываются или у них совершенно специфические задачи в клетке?
- Обладают ли эти ферменты специфичностью во взаимодействии с различными повреждениями ДНК?
- Существует ли селективность PAR-илирования гистонов и как это влияет на релаксацию хроматина?
- Существует ли специфичность в регуляции различных клеточных процессов, в частности процессов репарации ДНК?





Сродство PARP1 and PARP2 (K_D) к ДНК-интермедиатам эксцизионной репарации оснований (BER), как и к другим повреждениям ДНК, отличается

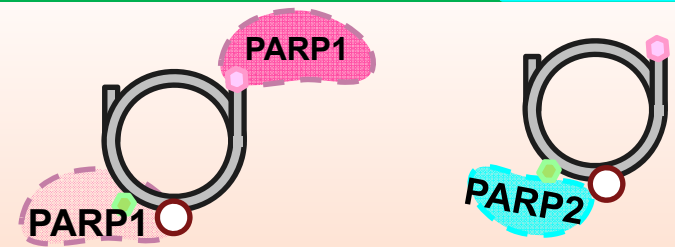
Short patch BER



PARP1 проявляет высокое сродство к двойным разрывам в случае свободной ДНК и ДНК в составе нуклеосомы, PARP2 имеет высокое сродство к ДНК, содержащей GAP



Protein	DNA/ NCP	TAMRA signal 		FAM signal 	
		DNA	Gap-DNA	DNA	Gap-DNA
	DNA	<1.5	<1.5	4±1	<1.5
	NCP	<1.5	<1.5	4±2	<1.5
	DNA	n.a.	n.a.	400±50	<1.5
	NCP	n.a.	n.a.	300±50	<1.5



HPF1 – фактор PAR-илирования гистонов, новый партнер PARP1/2



Ivan Ahel

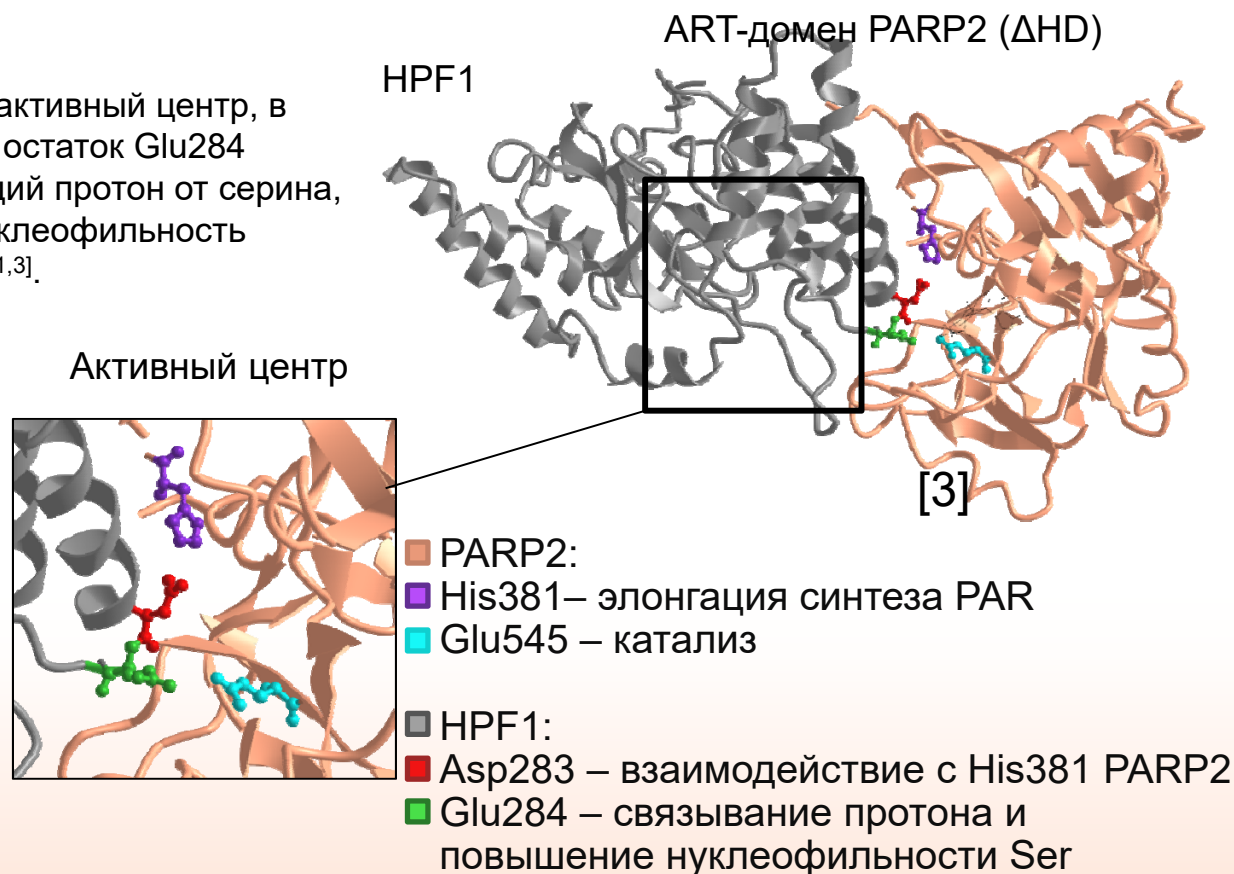
-Образует общий активный центр, в который вводится остаток Glu284 HPF1, оттягивающий протон от серина, что повышает нуклеофильность остатков серина [1,3].

-Эта перестройка активного центра изменяет специфичность PAR-илирования, переключая реакцию от Asp/Glu на остатки серина [1,3].

-HPF1 участвует в модификации коровых гистонов (преимущественно H2B и H3) [2].

-Взаимодействует только с каталитически-активированным PARP1/2 [1].

-Блокирует аминокислотные остатки, участвующие в элонгации синтеза PAR, в активном центре PARP [3].



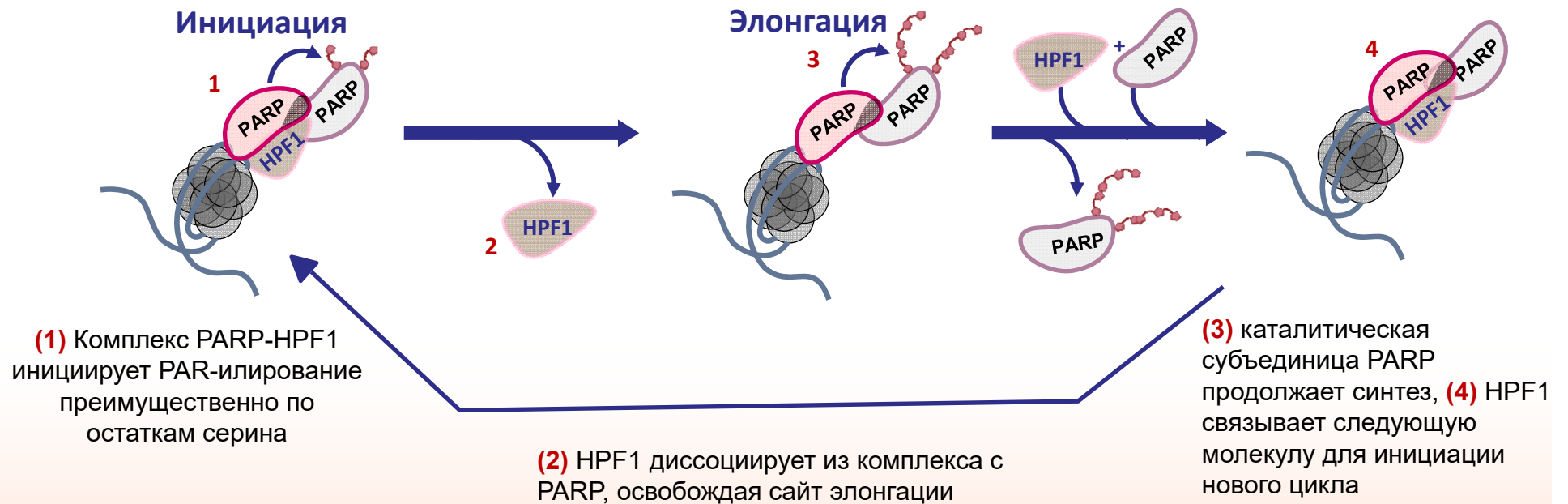
1. Gibbs-Seymour I. et al. Molecular Cell, 2016.

2. Bonfiglio J.J. et al. Molecular Cell. 2017.

3. Suskiewicz M.J. et al. Nature, 2020.

4. Rudolph J., et al. Elife. 2021.

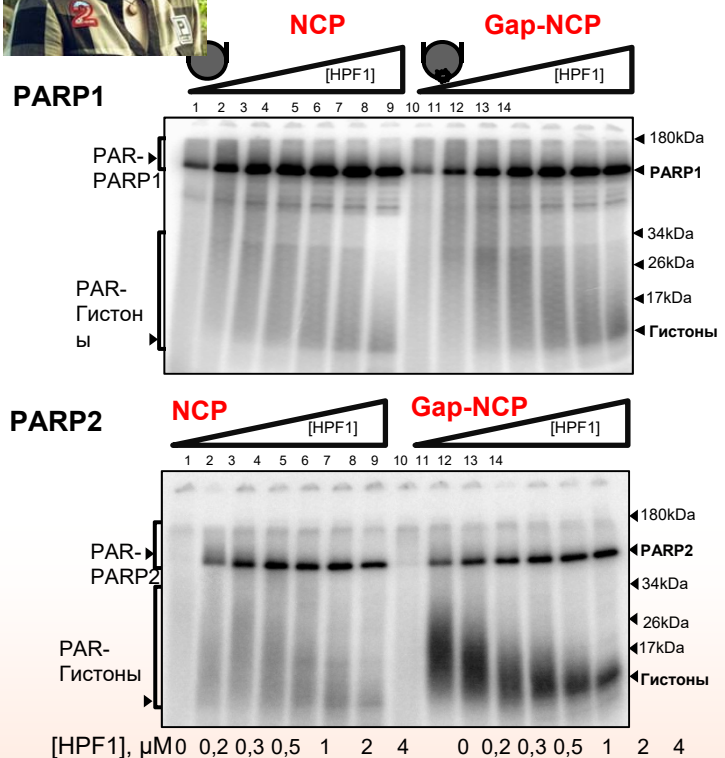
Комплексы PARP1 и PARP2 с HPF1 иницируют PAR-илирование по серинам, а элонгация поли(ADP-рибозы) происходит без участия HPF1



*Kurgina T, et al, Communication Biology, 2021
Kurgina T et al, DNA Repair, 2022*

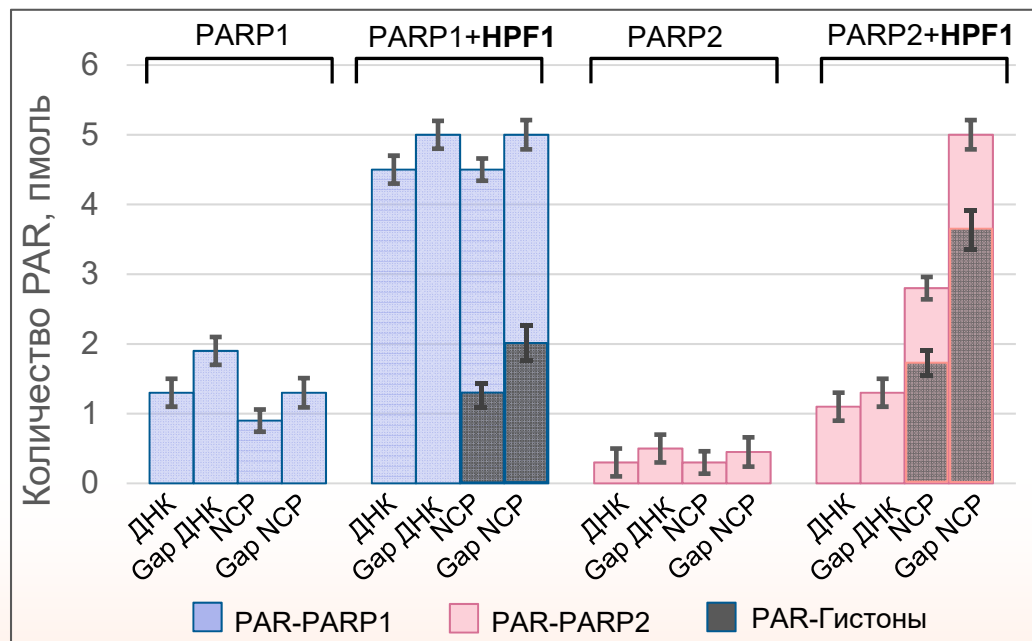


HPF1 стимулирует PAR-илирование гистонов по серинам, более эффективно в случае PARP2



Модификация белков [³²P]-меченой ADP-рибозой в присутствии возрастающей концентрации HPF1

Kurgina T.A. et al, DNA Repair, 2022



Общее количество PAR (звеньев ADP-рибозы), синтезированной PARP1/2 в присутствии ДНК/Gap-ДНК или NCP/Gap-NCP и 1 μM HPF1.

Gap в структуре ДНК в NCP приводит к увеличению HPF1-зависимого PAR-илирования гистонов, катализируемого PARP1 и в особенности PARP2.

- PARP1 и PARP2 имеют различную специфичность во взаимодействии с повреждениями ДНК как в свободной ДНК, так и в нуклеосоме
- PARP1 PAR-илирует в нуклеосоме все гистоны независимо от положения разрыва в структуре нуклеосомной ДНК
- PARP2 модифицирует гистоны H2B и H2A в зависимости от положения в нуклеосоме специфического повреждения ДНК
- HPF1 стимулирует модификацию гистонов более интенсивно в случае PARP2 в присутствии ДНК, содержащей разрыв .



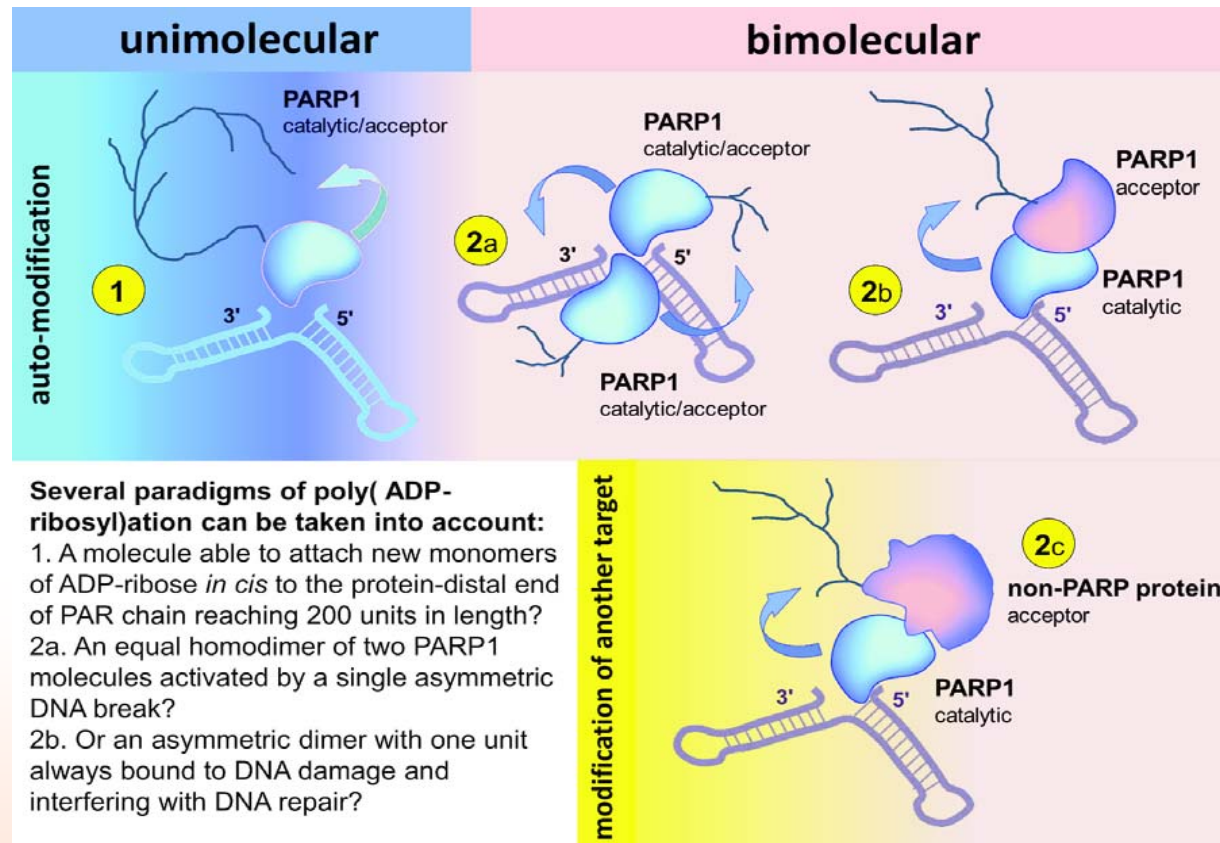
Volume 95, November 2020

**Cathrine Broberg Vågb
Geir Slupphaug**

**RNA and RNA binding proteins in
DNA repair**

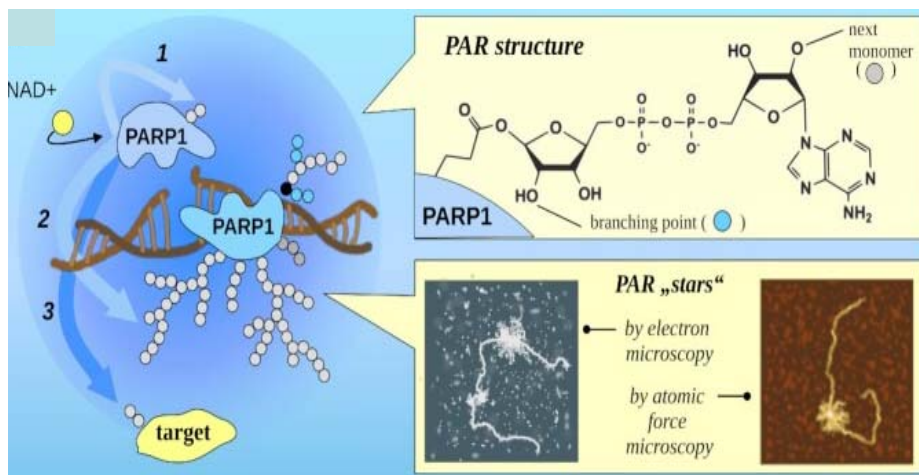
***Бурно растущее число доказательств
заставляет предполагать, что РНК-
связывающие белки участвуют в репарации
ДНК, являются партнерами PARP1,
подвергаются поли(ADP-рибозил)ированию
и взаимодействуют с поли(ADP-рибозой)***

PARP1 - мономер, димер, гетеродимер ?



Several paradigms of poly(ADP-ribosylation) can be taken into account:

1. A molecule able to attach new monomers of ADP-ribose *in cis* to the protein-distal end of PAR chain reaching 200 units in length?
- 2a. An equal homodimer of two PARP1 molecules activated by a single asymmetric DNA break?
- 2b. Or an asymmetric dimer with one unit always bound to DNA damage and interfering with DNA repair?



**Поли(ADP-рибоза)(PAR)–
третья нуклеиновая
кислота клетки**

- **PAR имеет высокий отрицательный заряд и эффективно конкурирует с РНК за ее связывание с РНК-связывающими белками, имеющими неупорядоченные домены**
- **С помощью протеомных подходов и использованием PAR как инструмента было идентифицировано много РНК-связывающих белков, взаимодействующих с PAR**
- **РНК-связывающие белки, содержащие неупорядоченные домены, являются эффективными мишенями поли(ADP-рибозил)ирования при генотоксическом стрессе**

Какова роль РНК-связывающих белков в репарации ДНК и поли(ADP-рибозил)ировании?

Gagne JP, et al., *Nucleic Acids Research*, 2012

Jungmichel S, et al., *Molecular Cell*, 2013

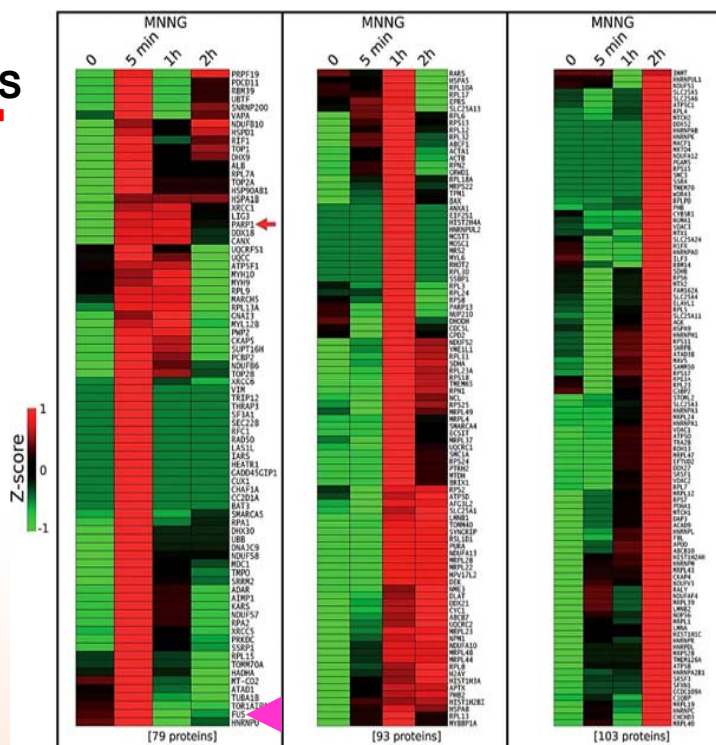
Протеомный анализ мишеней поли(ADP-рибозил)ирования в ответ на генотоксический стресс: РНК-связывающие белки как мишени

PARP1 →

Gene name	Ratio H/L H ₂ O ₂
MPG	13,78
PARP1	12,57
FUS	12,06
RBMX	10,46
DTX2	7,72
TAF15	6,87
CHD1L	6,63
RPA1	6,44
ZNF384	3,85
RUNX1	3,41
EWSR1	15,09
TEAD3	12,78
FBL	12,50
ERH	11,78
KHDRBS1	9,46
HNRNPA0	9,40
FIP1L1	8,40
CHTOP	7,93
YY1	7,68
HNRNPA2B1	7,61
MECP2	7,60
ALYREF	6,94
WDR33	6,64
HIST1H2BK;HIST2H2BF;HIST1H2BD;HIST1H2BC;HIST1H2BH;HIST1H2BN;HIST1H2BM;H2BFS;HIST1H2BL	6,60
TOP2A	6,39

← FUS

Анализ индуцируемого повреждением ДНК PAR-илирования белков

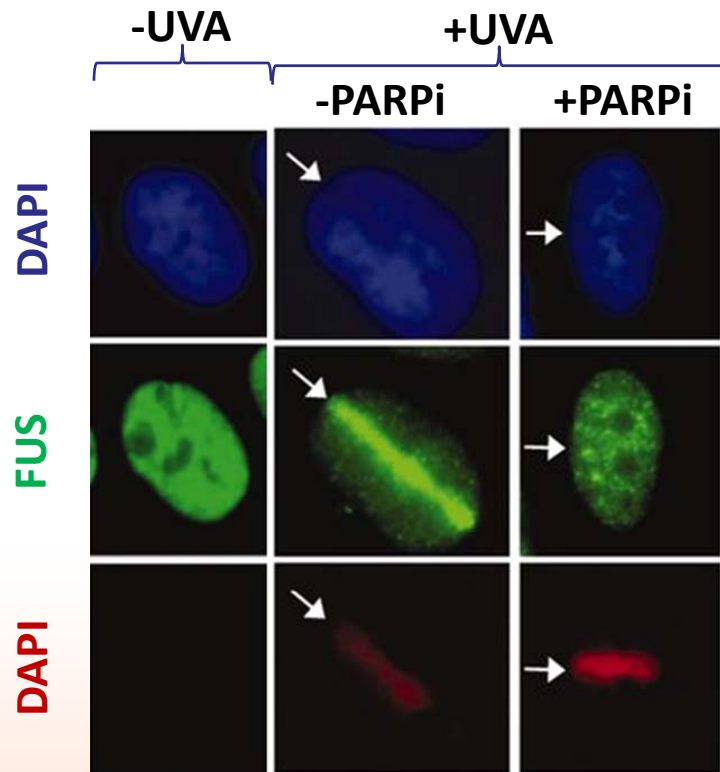


Протеомный анализ белков, взаимодействующих с поли(ADP-рибозой) в клетках после воздействия повреждающих агентов

(Jungmichel S, et al., Molecular cell. 2013)

(Gagne JP, et al., Nucleic acids research, 2012)

Привлечение РНК-связывающего белка FUS к месту повреждения ДНК в клетках зависит от синтеза PAR



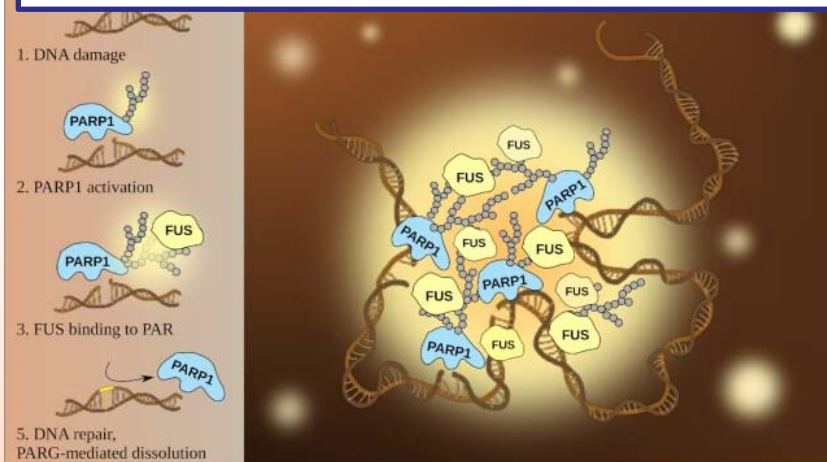
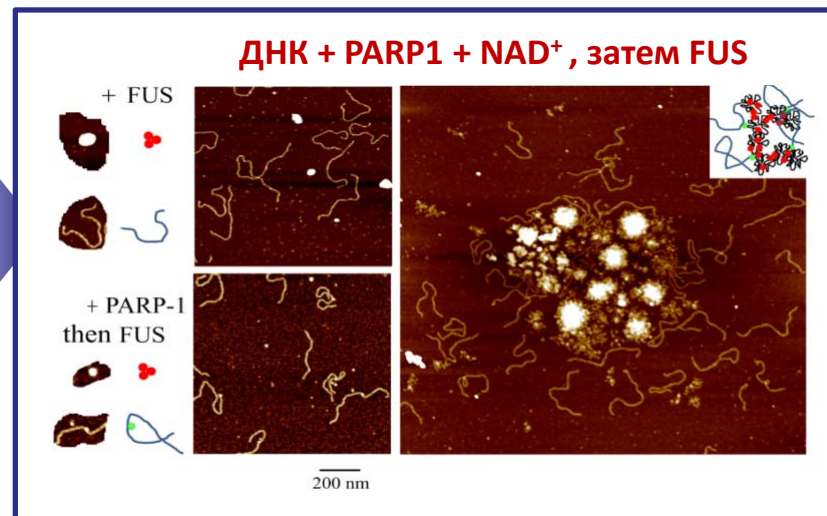
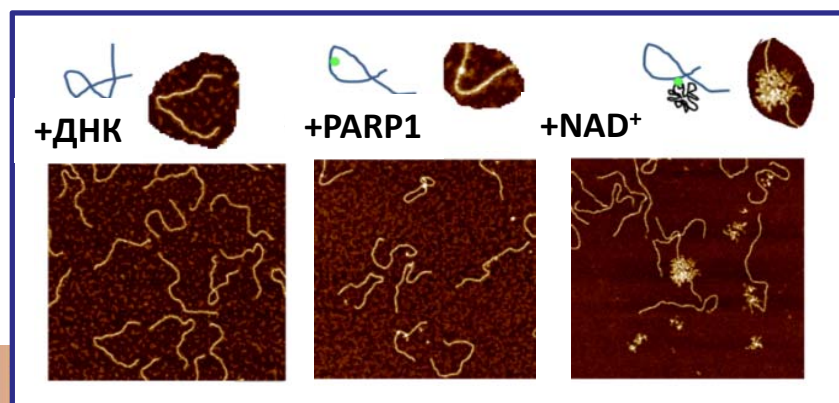
FUS (FUsed in Sarcoma) –

ядерный РНК-связывающий белок, вовлеченный в транскрипцию, сплайсинг и транспорт мРНК.

- Взаимодействует с одноцепочечной ДНК, РНК и поли(ADP-рибозой).
- Содержит неупорядоченные домены.
- Мутации в гене FUS связаны с возникновением бокового амиотрофического склероза и других нейродегенеративных заболеваний.

Клетки, обработанные ингибитором PARP, облучали и окрашивали флуоресцентными антителами против FUS и гистона γ H2Ax (индикатор двухцепочечных разрывов в ДНК).

Связывание FUS с поли(ADP-рибозой), синтезируемой PARP1 на повреждениях ДНК, приводит к формированию «компарментов» вблизи этих повреждений с помощью процесса разделения фаз



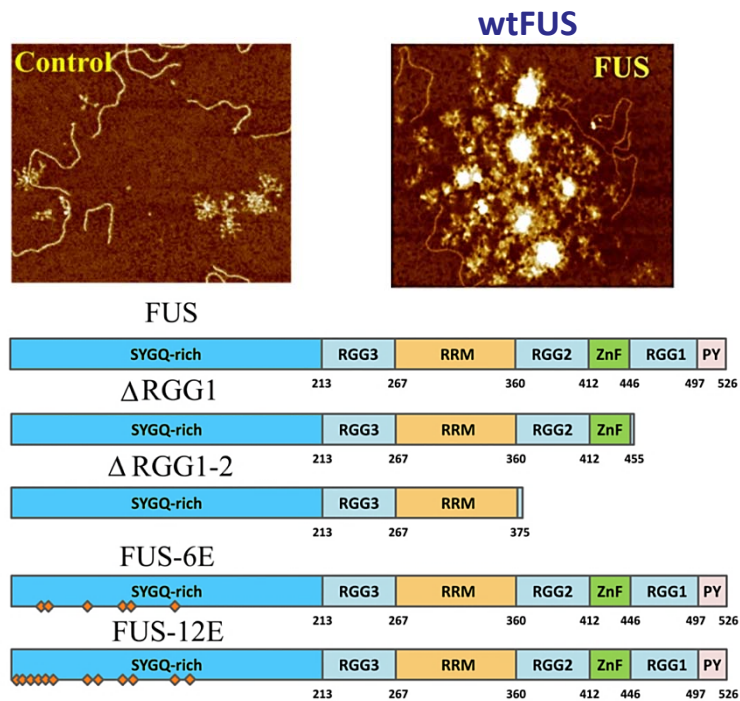
В обнаруженных «компартаментах» концентрируется преимущественно поврежденная ДНК

*Singatulina et al, Cell Rep, 2019;
Alemasova&Lavrik, Nucleic Acids Res, 2022*

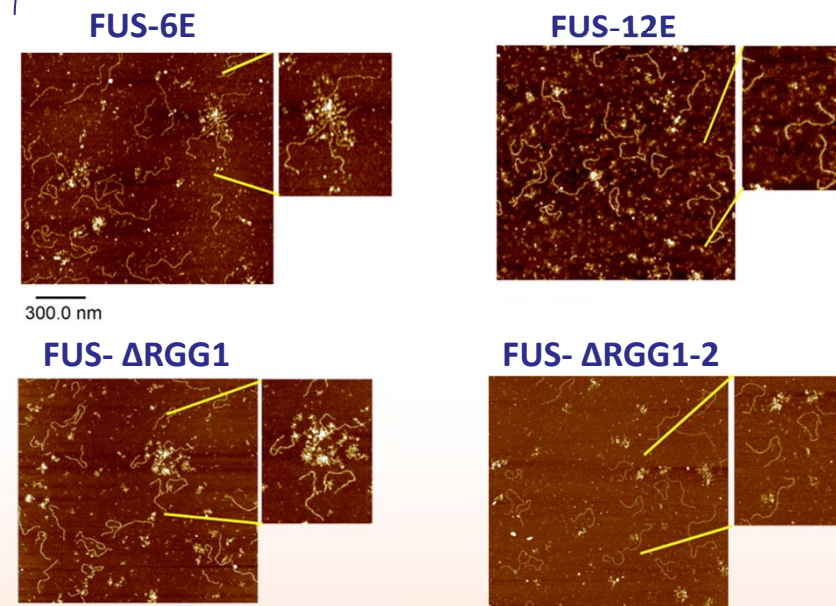
В формировании компартментов на поврежденной ДНК участвуют N-концевой неупорядоченный домен и C-концевой RGG-домены FUS, то есть PAR взаимодействует с неупорядоченными доменами



Сингатулина А.Ш.



Мутантные формы FUS

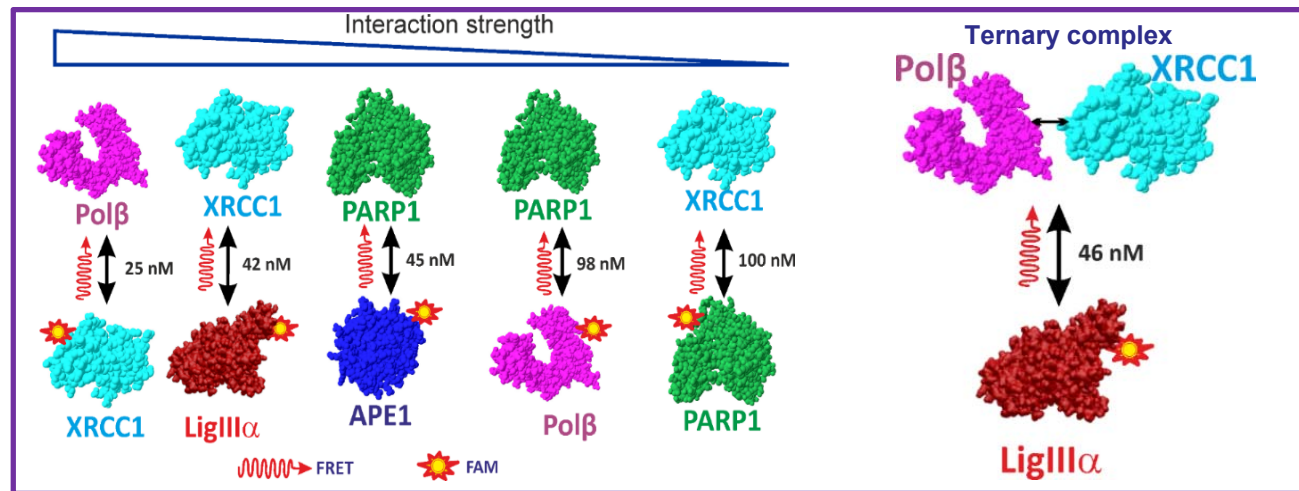


Сборка компартментов при взаимодействии FUS с PAR зависит от неупорядоченных доменов

Singatulina et al, Cell Rep, 2019; Mamontova et al, Cell Rep, 2023

Protein-protein interaction and interaction of proteins with poly(ADP-ribose) are important for assembly of DNA repair compartments

BER proteins demonstrate efficient protein-protein interactions. These interactions might be important for assembly of BER complex in the liquid compartment for the following processing of DNA repair. (Moor et al, Nucleic Acids Res. 2015)



(Vasil'eva, Moor, Lavrik, 2020)

Another driving force of BER protein concentration in membraneless liquid compartments is the protein interaction with PAR. We showed that XRCC1, Pol β, APE1, and DNA ligase IIIα efficiently interact with Poly(ADP-ribose). (Moor et al, Biochimie, 2020)

Белки репарации оснований собираются в ансамбли, взаимодействуя с поли(ADP-рибозой), ковалентно присоединенной к PARP1 /2 , т. е. авто-PAR-илирование PARP важно для инициации образования конденсатов

Using BER proteins labeled with different fluorophores

FAM-XRCC1,

Cy3-PARP1,

Cy5-Polβ

and fluorescent imaging system we have observed their co-localization under PARP1 activation on the damaged DNA.

FAM – 5,6-carboxyfluorescein

Cy3 – sulfo-Cyanin 3

Cy5 – sulfo-Cyanin 5

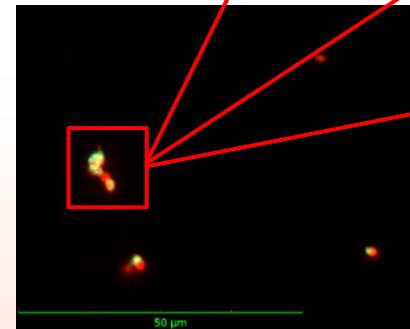
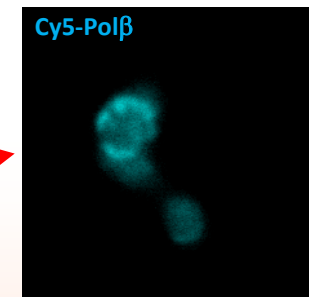
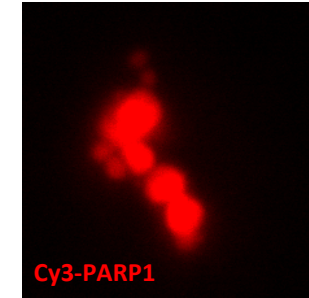
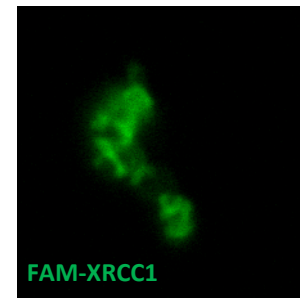


Моор Н.А.



Васильева И.А.

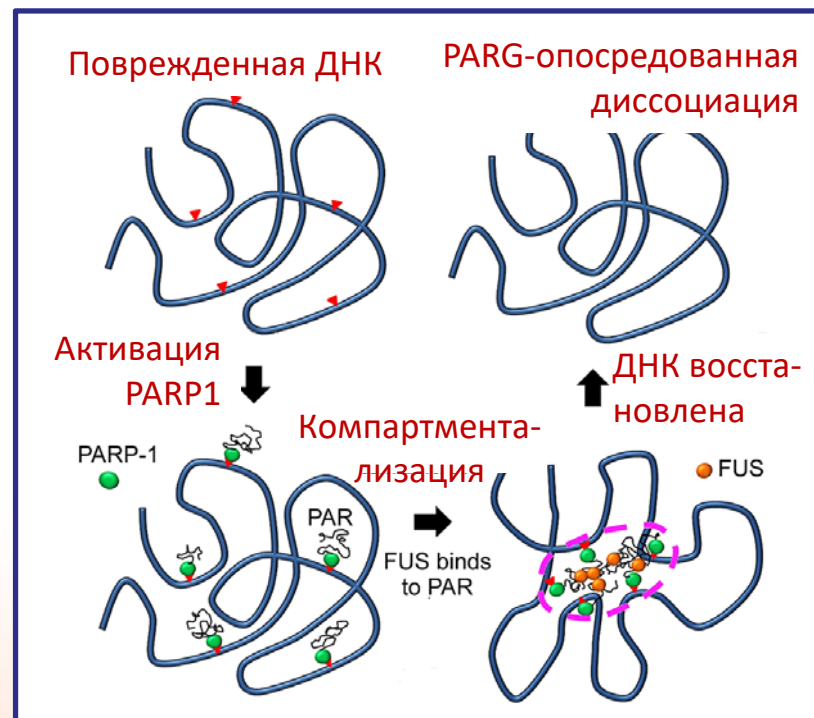
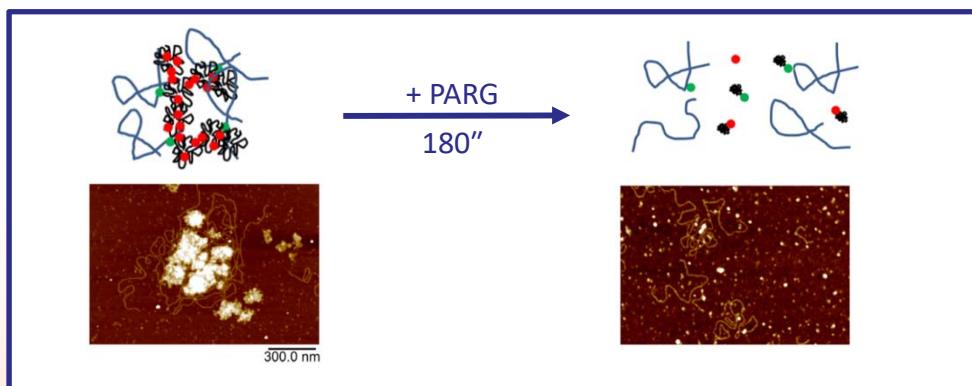
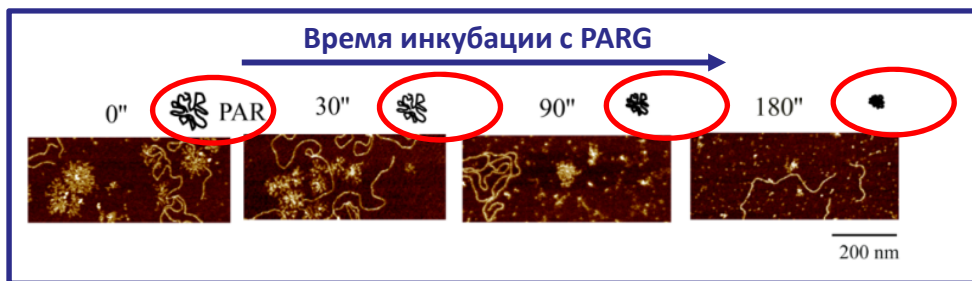
BER protein-PAR associate



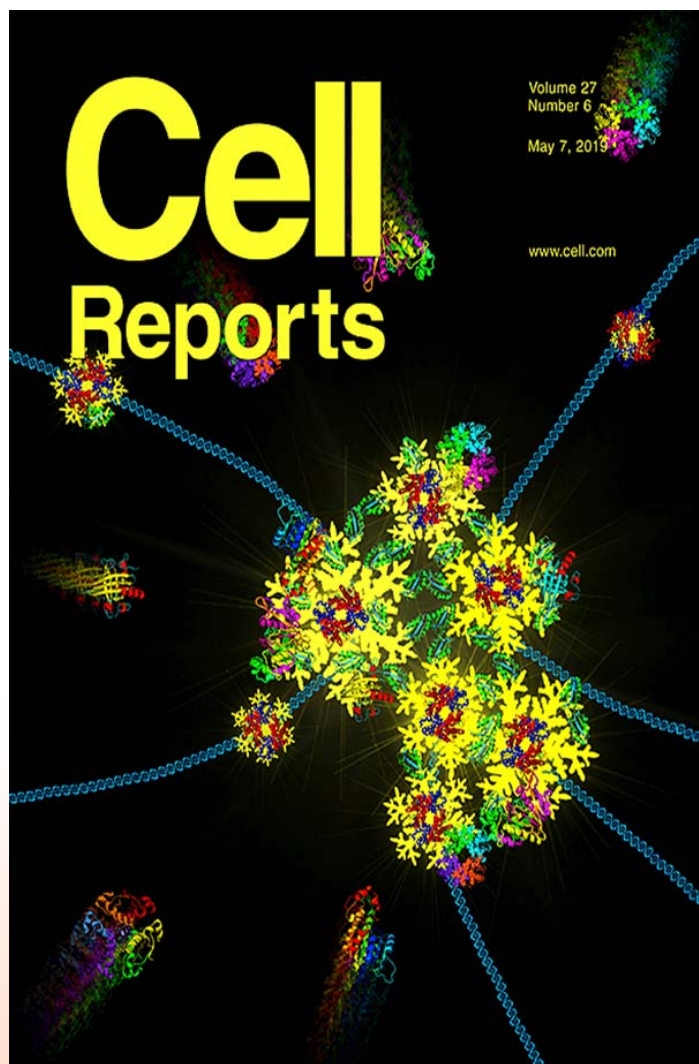
merge

Vasil'eva et al, IJMS, 2021
Sukhanova et al, Commun Biol, 2024

Гидролиз PAR с помощью PARG приводит к диссоциации компартментов, что может увеличивать число оборотов в процессах репарации



*Singatulina et al, Cell Rep, 2019,
Sukhanova et al, IJMS, 2021*

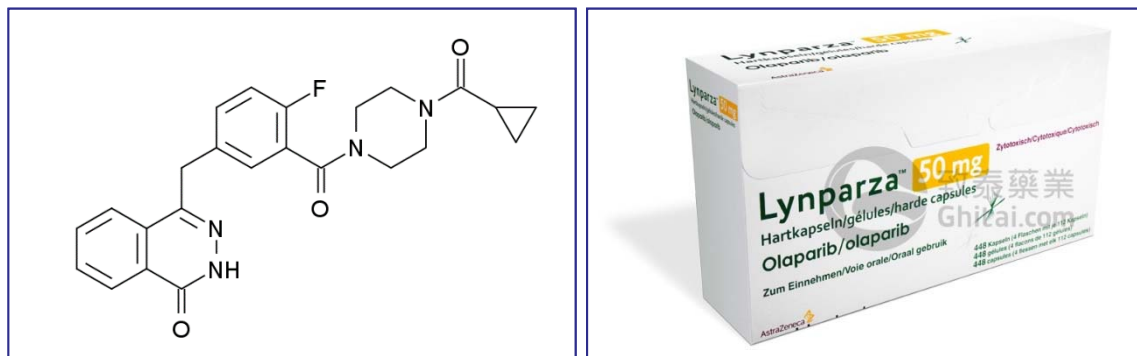


- ➔ РНК-связывающий белок FUS привлекается в сайты повреждений ДНК за счет взаимодействия с PAR, что инициирует процесс “liquid demixing” и приводит к образованию немембранных компартментов (биоконденсатов), обогащенных поврежденной ДНК.
- ➔ Взаимодействие с PAR и белок-белковые взаимодействия вовлечены в формирование ансамблей белков репарации ДНК в биоконденсатах.
- ➔ Гидролиз PAR с помощью PARG ведет к разрушению структур и стимулирует эффективные обороты процесса репарации ДНК.

Поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 и 2 являются важнейшими мишенями для создания онкопрепаратов и лечения нейродегенеративных заболеваний, поскольку ингибиторы этих ферментов могут влиять одновременно на репарацию, репликацию и другие процессы.

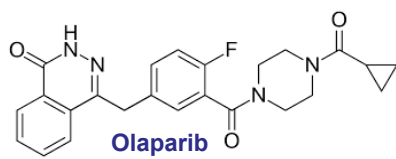
Ежегодно публикуются более 300 обзоров, касающихся разработки ингибиторов PARP (PARPi) как потенциальных лекарств, а число статей по этой теме - более 1000 в год.

**Olaparib (Lynparza, KU-0059436, AZD2281) –
первый ингибитор PARP, одобренный для клинического применения**

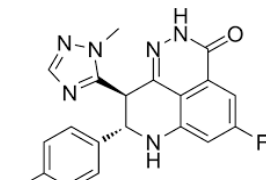


FDA (FDA, Управление по надзору за качеством медикаментов США) одобрило лечение препаратом Lynparza женщин **раком яичников**, ассоциированным с дефектом по генам BRCA ½.
Lynparza проходит клинические испытания в лечении **рака груди, желудка и поджелудочной железы**.

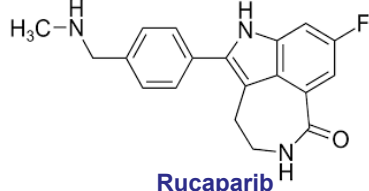
Ингибиторы PARP1 и PARP2 (PARPi), одобренные FDA для противораковой терапии, прогнозируются для других болезней



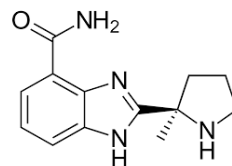
Рецидивирующие
гинекологические
раковые заболевания



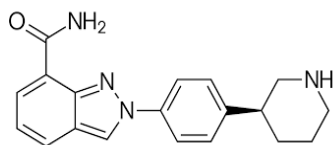
Рак груди



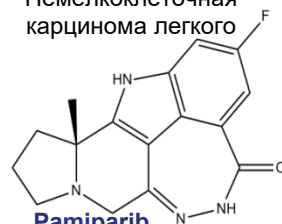
Рак яичников с мутациями
в генах BRCA



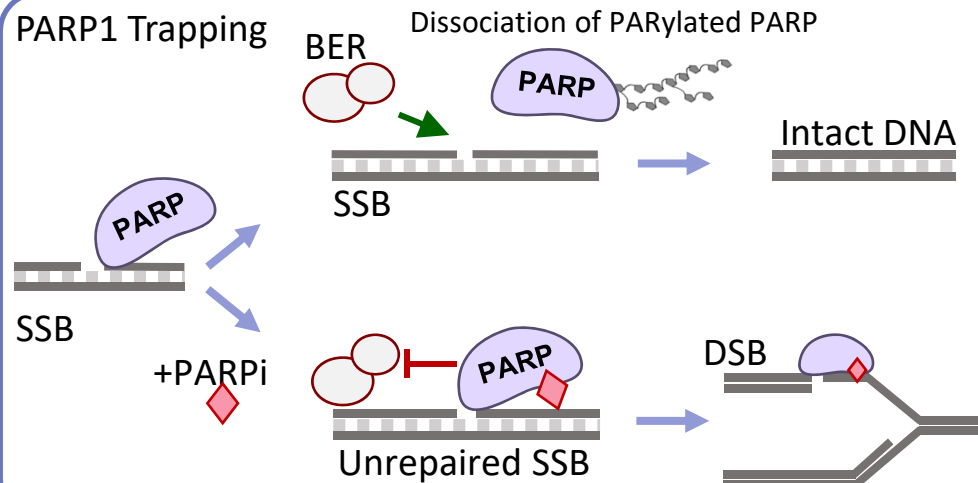
Немелкоклеточная
карцинома легкого



Рецидивирующие гинекологические
раковые заболевания, независимо
от BRCA мутаций и/или HRD
статуса



Рецидивирующие
гинекологические
раковые заболевания с
мутациями в генах
BRCA

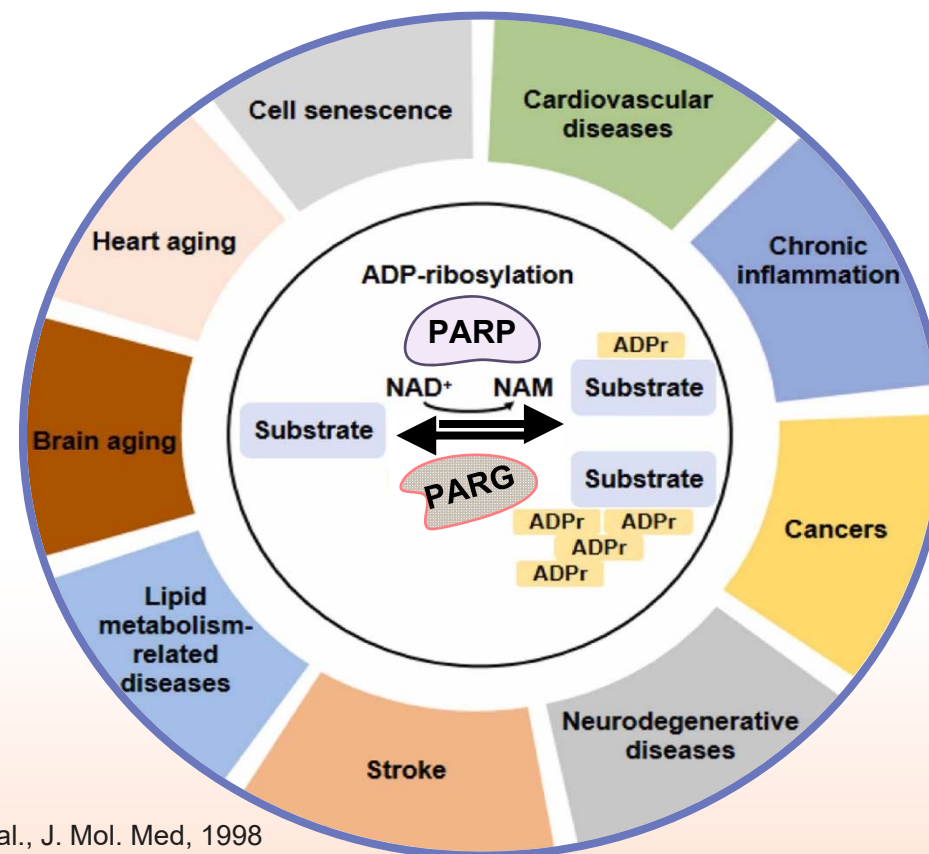


Approved by FDA:

- **Rucaparib** (Pfizer/Clovis),
- **Olaparib** (KuDOS/AstraZeneca),
- **Talazoparib**
(Lead/Biomarin/Medivation/Pfizer)
- **Pamiparib** (BeiGene/MerckSerono)

ADP-рибозилирование, катализируемое PARP, играет ключевую роль в связанных со старением заболеваниях

- **Активность PARP коррелирует с продолжительностью жизни.**
- Среднее повышение активности PARP1 улучшает репарацию ДНК и, соответственно, предотвращает накопление повреждений ДНК.
- В противоположность мышам с нокаутом гена PARP1, мыши с повышенной экспрессией гена PARP1 имеют избыточный вес и непереносимость глюкозы, что позволяет предположить, что дополнительная активность PARP1 делает мышей более восприимчивыми к метаболическим нарушениям, связанным со старением.



Muiras et al., J. Mol. Med, 1998
Mangerich, A. et al, Mech. Ageing Dev, 2010
Hao W, et al, Ageing Res Rev, 2024

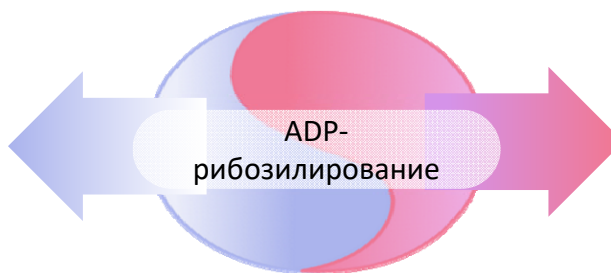
PARP1/2 и поли(ADP-рибозилирование) играют важную роль в процессах нейродегенерации

- a) Поли(ADP-рибоза)(PAR) взаимодействует с ключевыми белками, ответственными за процессы нейродегенерации, такими как синуклеин, агрегация которого определяет симптомы болезни Паркинсона, а также FUS, агрегация которого наблюдается при амиотропном латеральном склерозе и других заболеваниях (Rhine K et al.Chem. Rev, 2023).
- b) Агрегация белков-маркеров нейродегенеративных заболеваний регулируется PAR - продуктом реакции, катализируемой PARP1 и PARP2, поэтому важен не только синтез PAR,но и его гидролиз для регуляции уровня PAR в клетке.
- c) Предложено использовать ингибиторы PARP1/2 для лечения нейродегенеративных заболеваний, то есть через подавление синтеза PAR.

ADP-рибозилирование – «двуликий Янус»

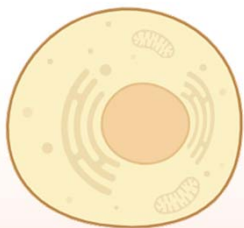
Предотвращает старение:

- Регуляция клеточного цикла
- Поддержание длины теломер
- Сохранение целостности генома

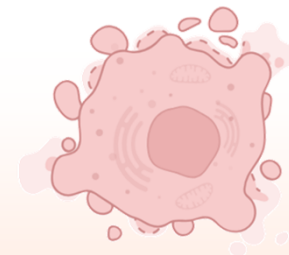


Вызывает старение:

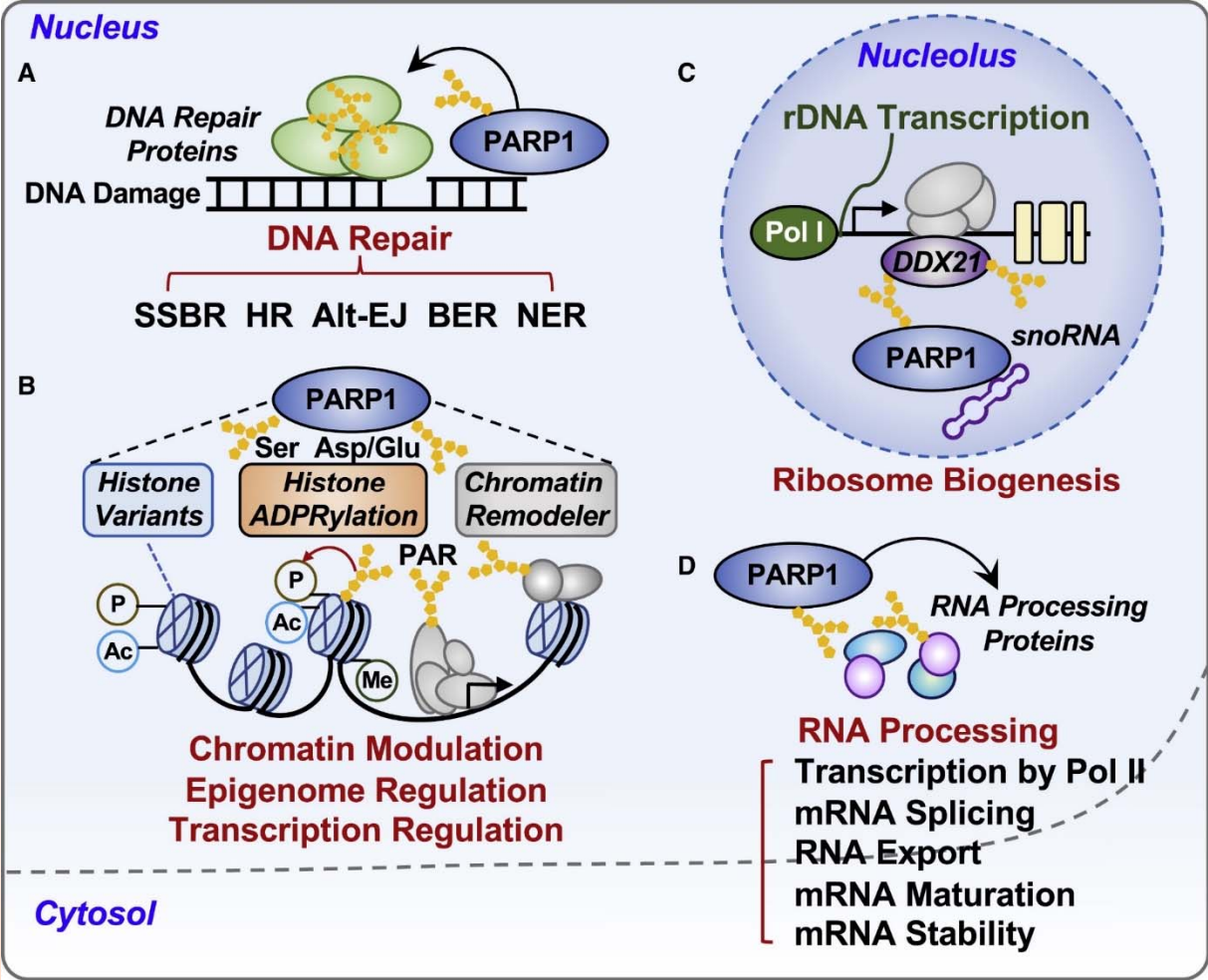
- Истощение NAD^+
- Дисфункция митохондрий
- Эпигенетические изменения
- Образование агрегатов



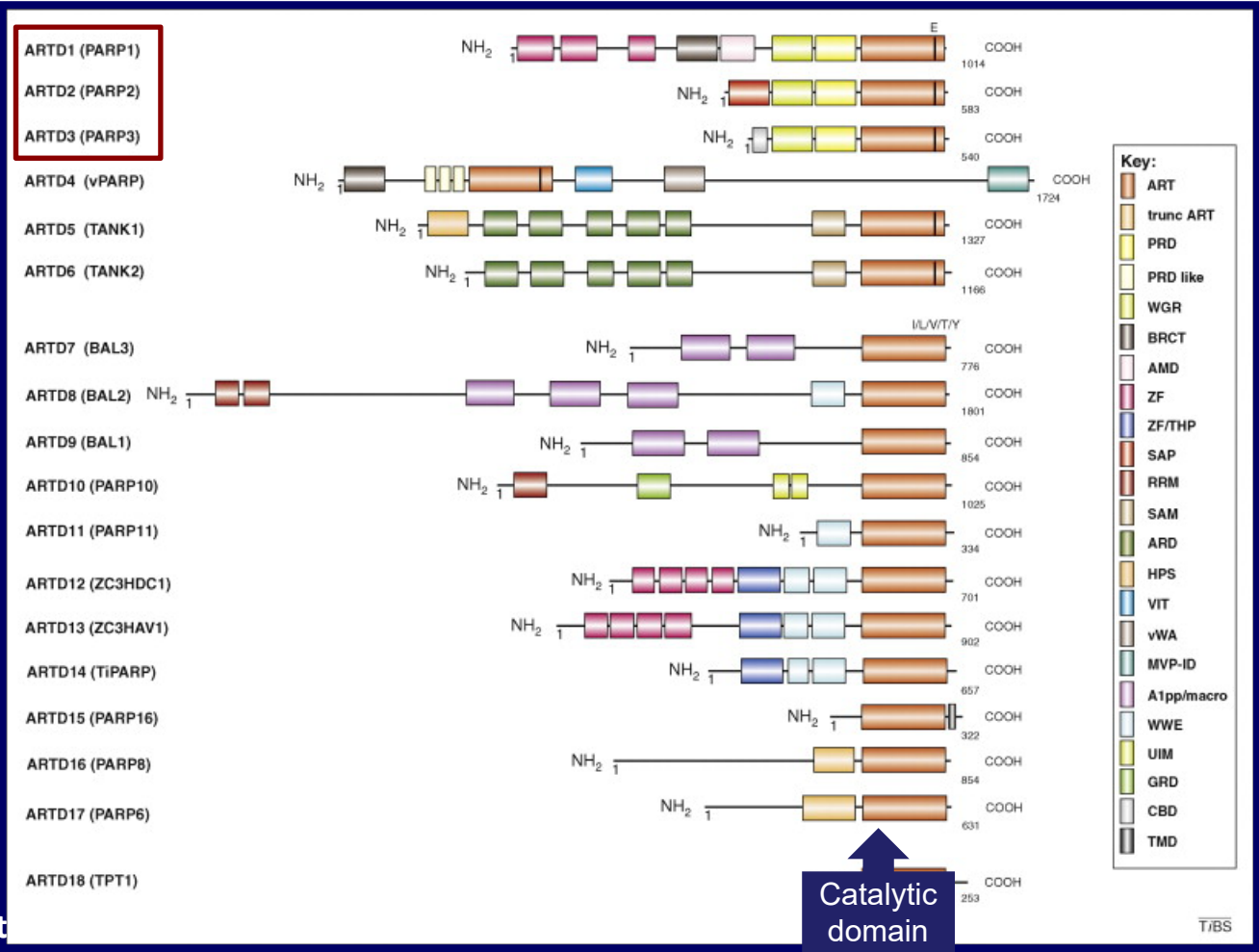
- ✓ С одной стороны, ADP-рибозилирование предотвращает клеточное старение: препятствует замедлению клеточного цикла, поддерживает длину теломер и сохраняет целостность генома.
- ✓ С другой стороны - ускоряет старение: истощает NAD^+ , вызывает дисфункцию митохондрий и изменение эпигенетики.



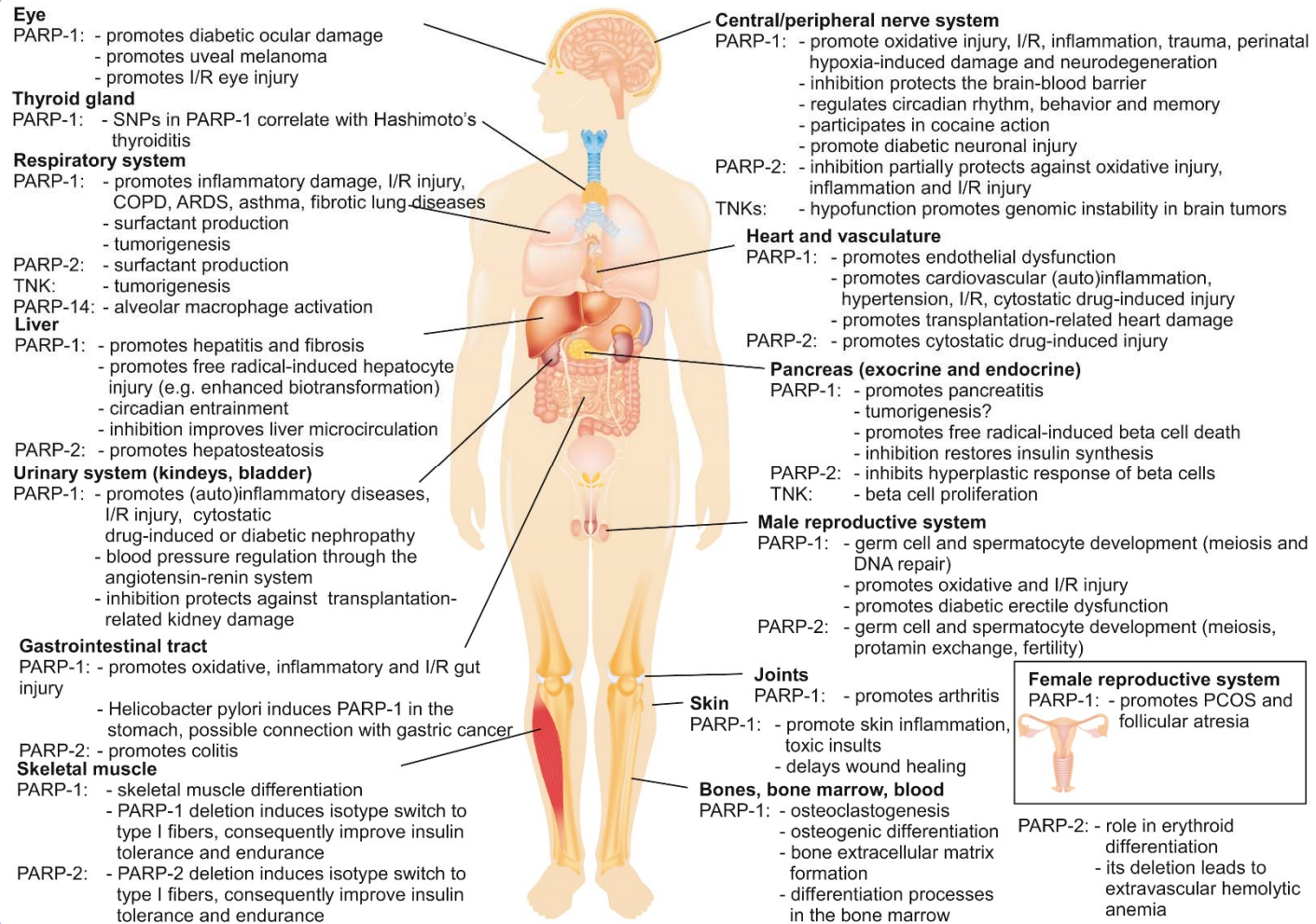
Функции PARP1



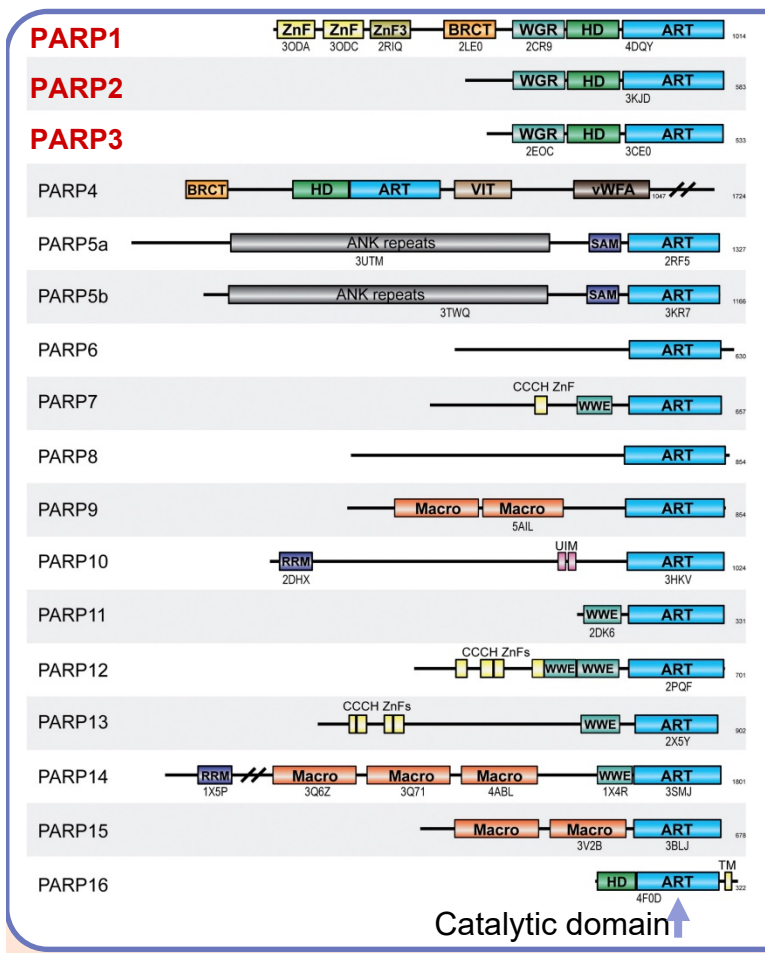
Семейство белков PARP



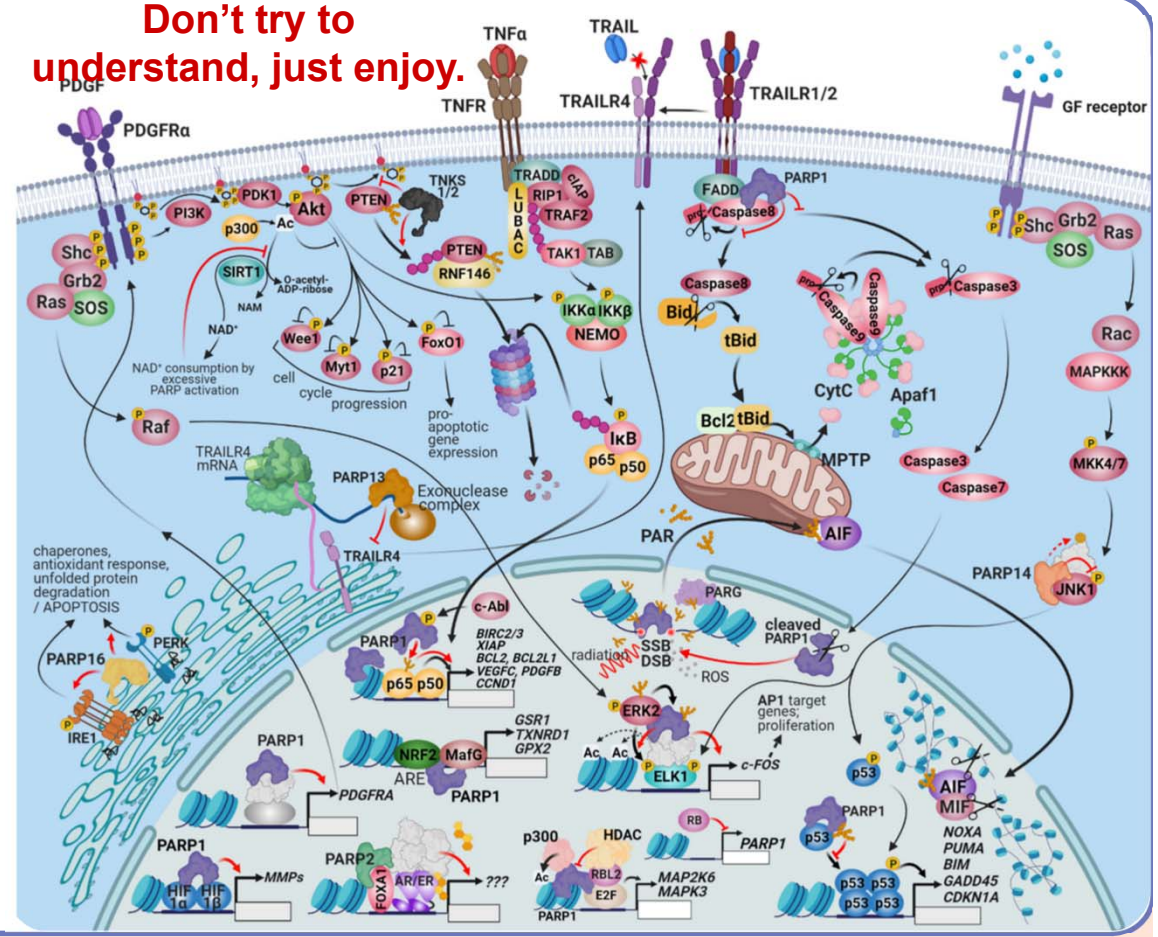
Роль PARP в заболеваниях человека



Функции белков семейства PARP и ADP-рибозилирования активно исследуются!



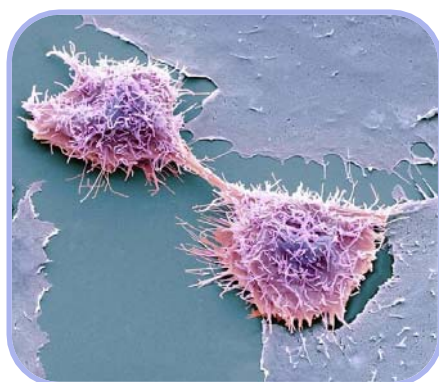
Don't try to understand, just enjoy.



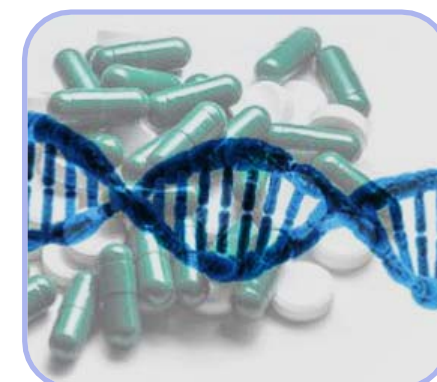
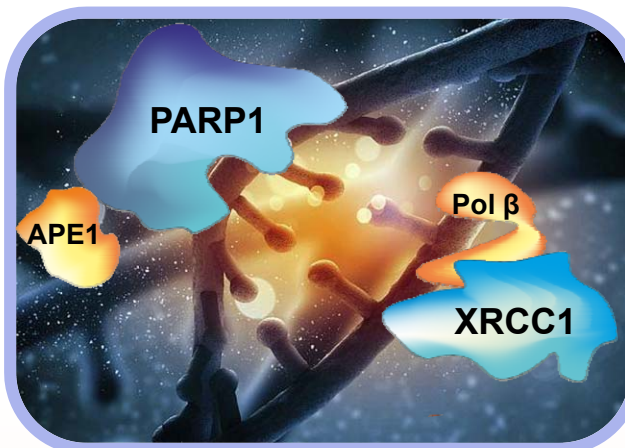
Barkauskaite E et al, Mol Cell, 2015; Demény MA et al, Cancers, 2021

Системы репарации ДНК противостоят развитию заболеваний и процессу старения

Репарация ДНК – основа жизни и долголетия



Предотвращение рака



Ферменты репарации являются мишенями для создания лекарственных препаратов

Проблема старения



Heterocephalus glaber

Системы репарации более эффективны у долгоживущих видов

Знание механизмов репарации ДНК необходимо для совершенствования генетических технологий



**Лаборатория
биоорганической химии
ферментов ИХБФМ СО РАН**

д.х.н. Моор Н.А.
 д.б.н. Ходырева С.Н.
 д.х.н. Речкунова Н.И.
 к.б.н. Суханова М.В.
 к.х.н. Петрусева И.О.
 к.х.н. Захаренко А.Л.
 к.х.н. Лебедева Н.А.
 к.х.н. Дырхеева Н.С.
 к.х.н. Белоусова Е.А.
 к.х.н. Кутузов М.М.
 к.б.н. Алемасова Е.Э.
 к.х.н. Анарбаев Р.О.
 к.х.н. Васильева И.А.
 к.х.н. Ильина Е.С.
 к.х.н. Красикова Ю.С.
 к.х.н. Мальцева Е.А.
 к.б.н. Кургина Т.А.
 к.б.н. Науменко К.Н.
 к.б.н. Сингатулина А.Ш.
 к.б.н. Чепанова А.А.
 Украинцев А.А.
 Чернышова И.А.
 Корниенко Т.Е.
 Попов А.А.
 Назаров К.Д.

**Institut Gustave-Roussy,
Villejuif, France**
 Alexander Ischenko,
Murat Saparbaev

**Université d'Évry-Val-
d'Essonne, Evry, France**
 Loic Hamon
David Pastré

НИОХ СО РАН
 Член-корр. РАН
 Салахутдинов Н.Ф.
 Д.х.н. Волчо К.П.

ИЦиГ СО РАН
 Попова Н.А.
 Каледин В.И.



Исследования поддержаны грантами РФФ и РФФИ

МГУ им. М.В.Ломоносова



Донцова О.А.
Рубцова М.П.
Зверева М.Э.
Швядас В.К.
Нилов Д.К.

ИМБ им. В.А. Энгельгардта РАН



Киселев Л.Л.
Фаворова О.О
Михайлов С.Н.
Дреничев М.С.
Хомутов А.Р.

ФИЦ Биотехнологии РАН



Равин Н.В.

НИОХ им. Н.Н. Ворожцова СО РАН



Багрянская Е.Г.
Салахутдинов Н.Ф.
Волчо К.П.
Лузина О.А.

Институт белка РАН



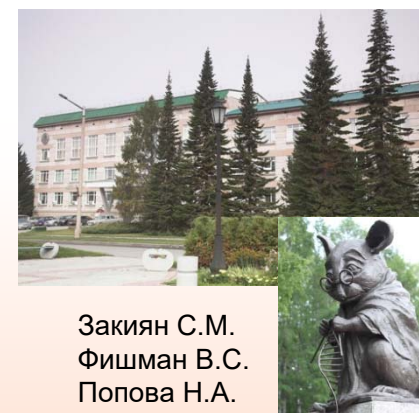
Овчинников Л.П.
Лябин Д.Н.

ИМГ РАН



Шрам С.И.

ИЦИГ СО РАН



Закиян С.М.
Фишман В.С.
Попова Н.А.