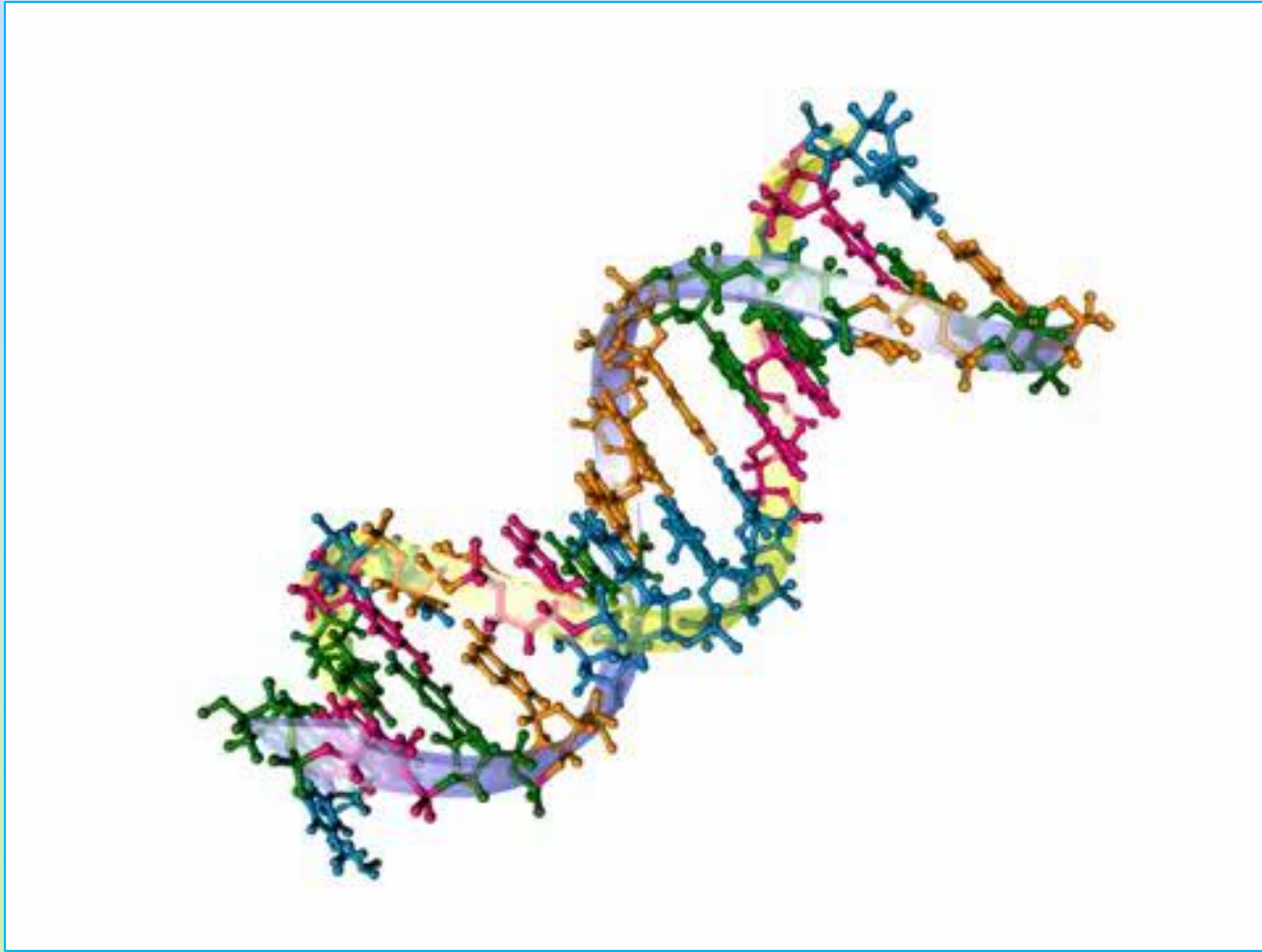
A detailed diagram of a cell nucleus showing the process of DNA repair. The nucleus is depicted as a large, textured sphere with a blue outer membrane and a darker blue inner membrane. Inside, several DNA double helices are shown in various stages of repair. The process is numbered 1 through 7. 1. DNA damage: A DNA double helix is shown with a break. 2. PARP: A protein (PARP) binds to the DNA damage. 3. NAD+: Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD+) is used as a substrate. 4. ADP-ribose: ADP-ribose units are transferred from NAD+ to the PARP, forming a chain. 5. Poly ADP-ribose chain: A long, branched chain of ADP-ribose units (PAR) is formed. 6. DNA repair enzymes: The PAR chain recruits DNA repair enzymes. 7. DNA repaired: The DNA double helix is restored. Labels include 'Mitochondrion' (top left), 'Nucleus' (left), 'Nicotinamide' (top center), 'ADP-ribose' (top center), 'Poly ADP-ribose chain' (right), 'NAD+' (center), 'PARP' (center), 'DNA damage' (bottom center), 'DNA repair enzymes' (right), and 'DNA repaired' (right).

# Репарация ДНК на страже стабильности генома и здоровья человека

**Ольга Ивановна Лаврик**

**Институт химической биологии и  
фундаментальной медицины СО РАН**

# ***ДНК – хранилище генетической информации***



# Число повреждений ДНК составляет до 1 млн на клетку в сутки

Оксидативный стресс

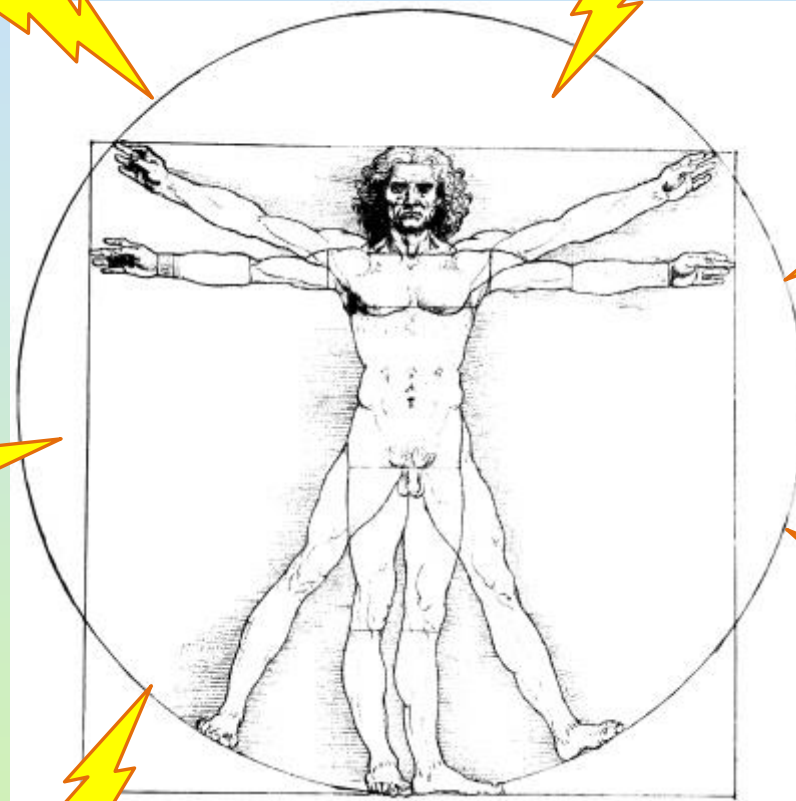
Естественные и искусственные химические препараты

Озон и другие реакционноспособные газы

УФ-излучение

Инфекции, являющиеся причиной оксидативного стресса

Космическое излучение



# Повреждения ДНК и пути их репарации

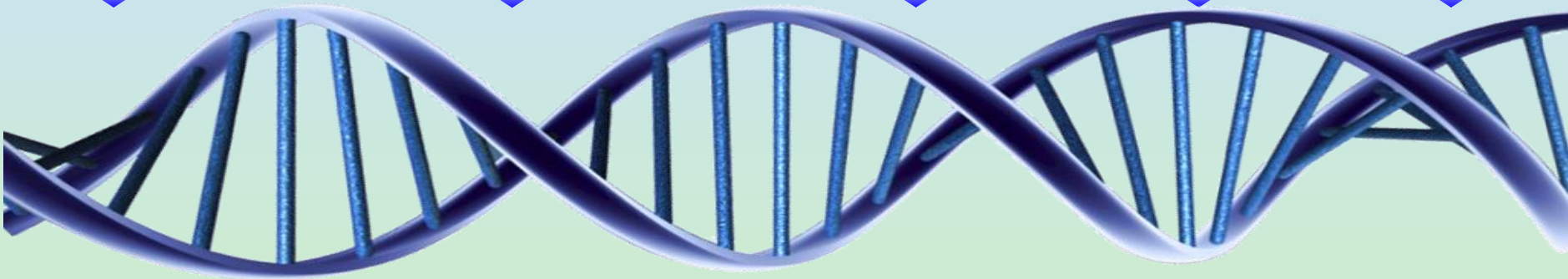
Алкилирующие  
агенты

Эндогенные окислители  
Активные формы кислорода

УФ-излучение  
Мутагены  
окружающей среды

Рентгеновское  
излучение

Ошибки  
репликации



Об-meG

Модифицированные основания  
Однонитевые разрывы

Пиримидиновые  
димеры  
Объемные аддукты

Двухнитевые  
разрывы

Неправильно  
спаренные  
основания  
Вставки, делеции



Прямая  
репарация

Репарация  
оснований

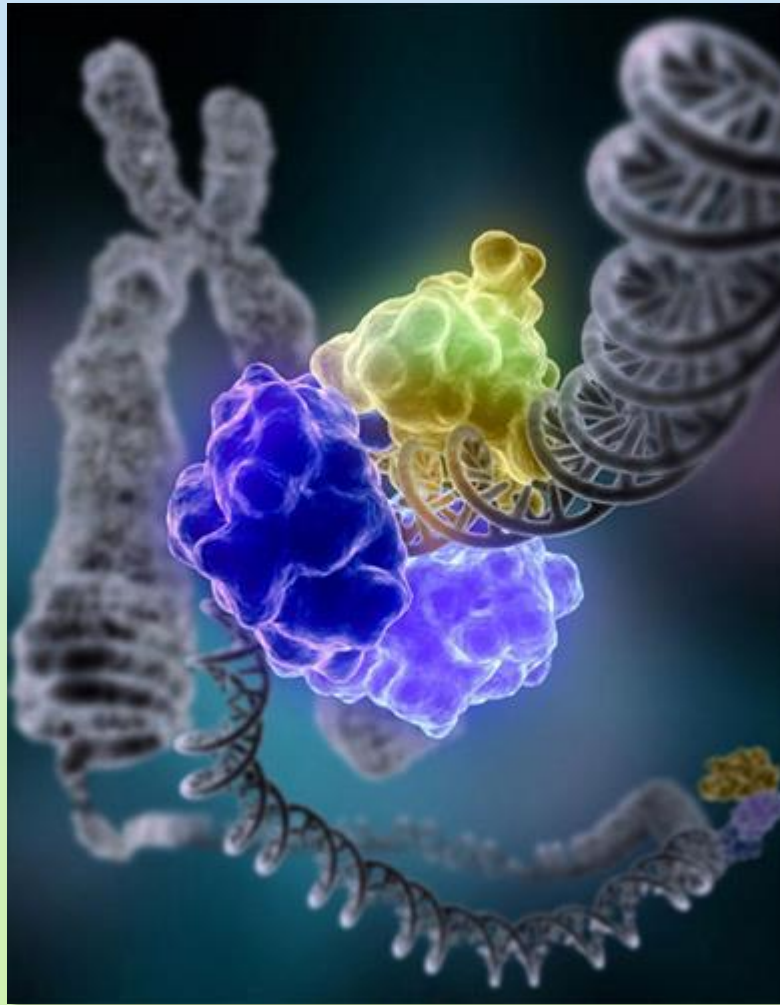
Репарация  
нуклеотидов

Репарация двойных  
разрывов

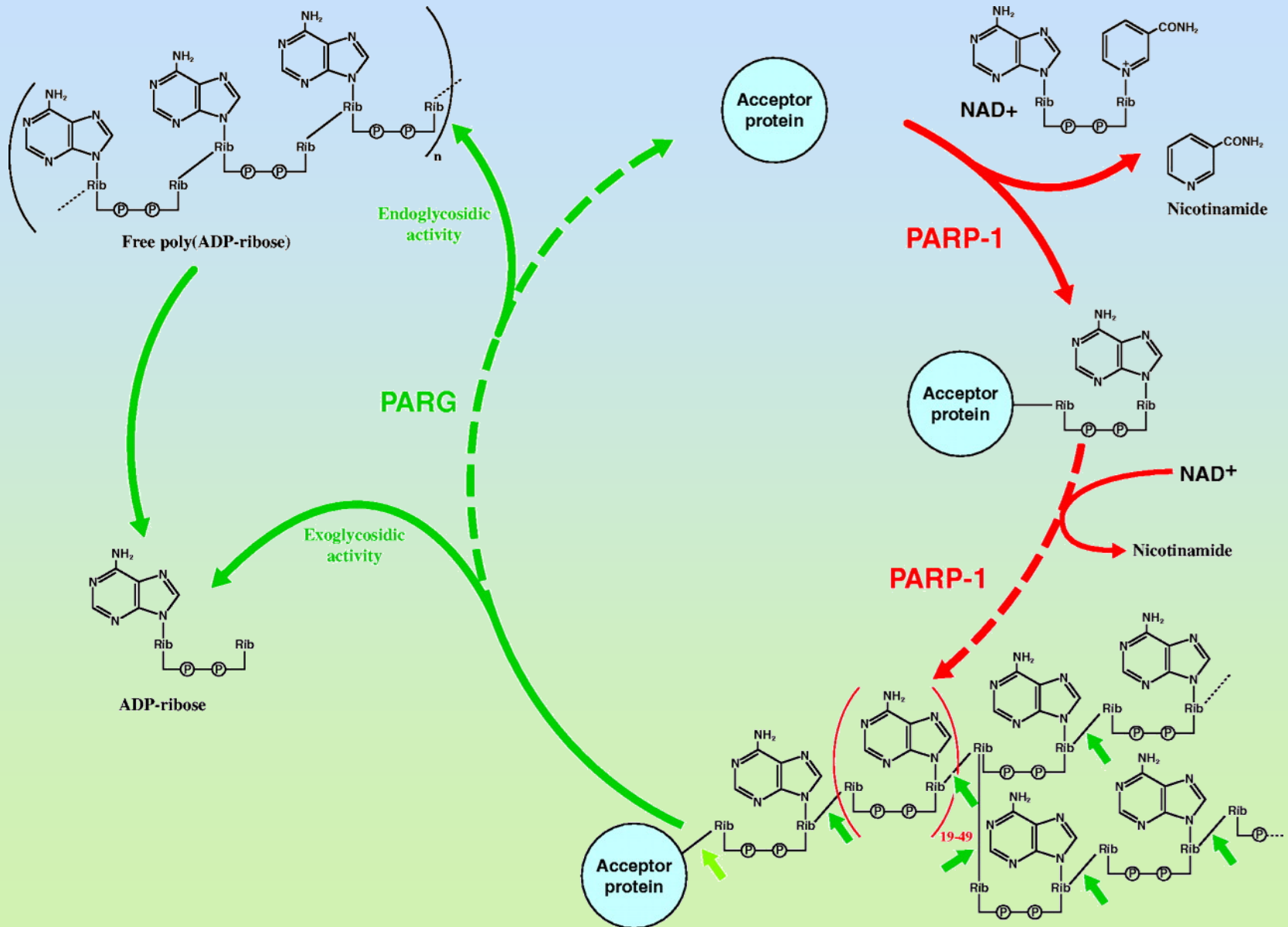
Репарация  
неправильно  
спаренных  
оснований



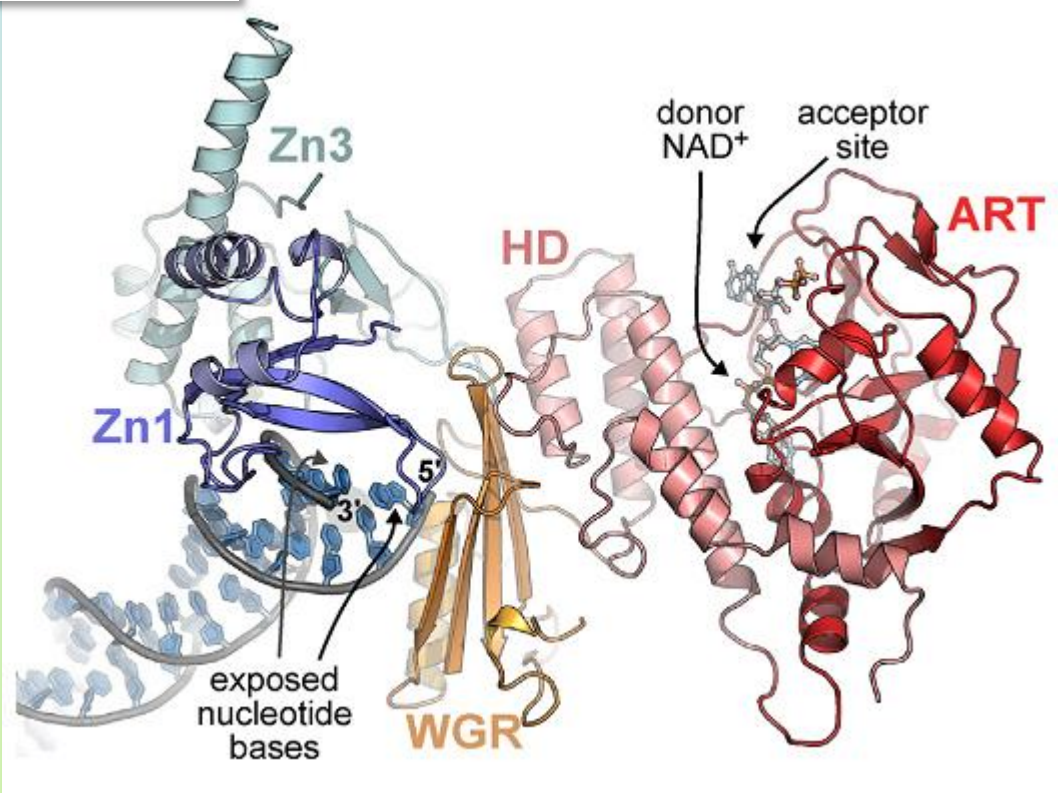
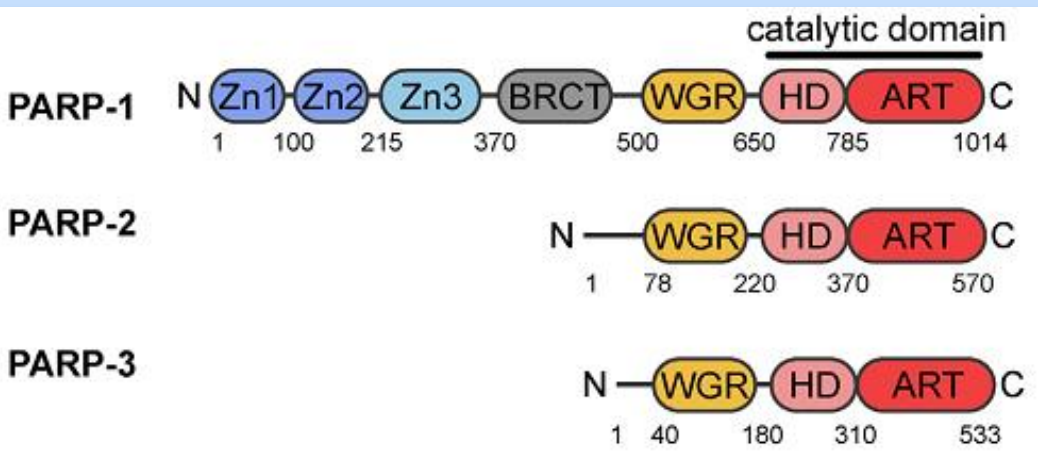
# **Репарация ДНК осуществляется ансамблями белков**



# Поли(ADP-рибозил)ирование катализируется PARP1 при повреждении ДНК

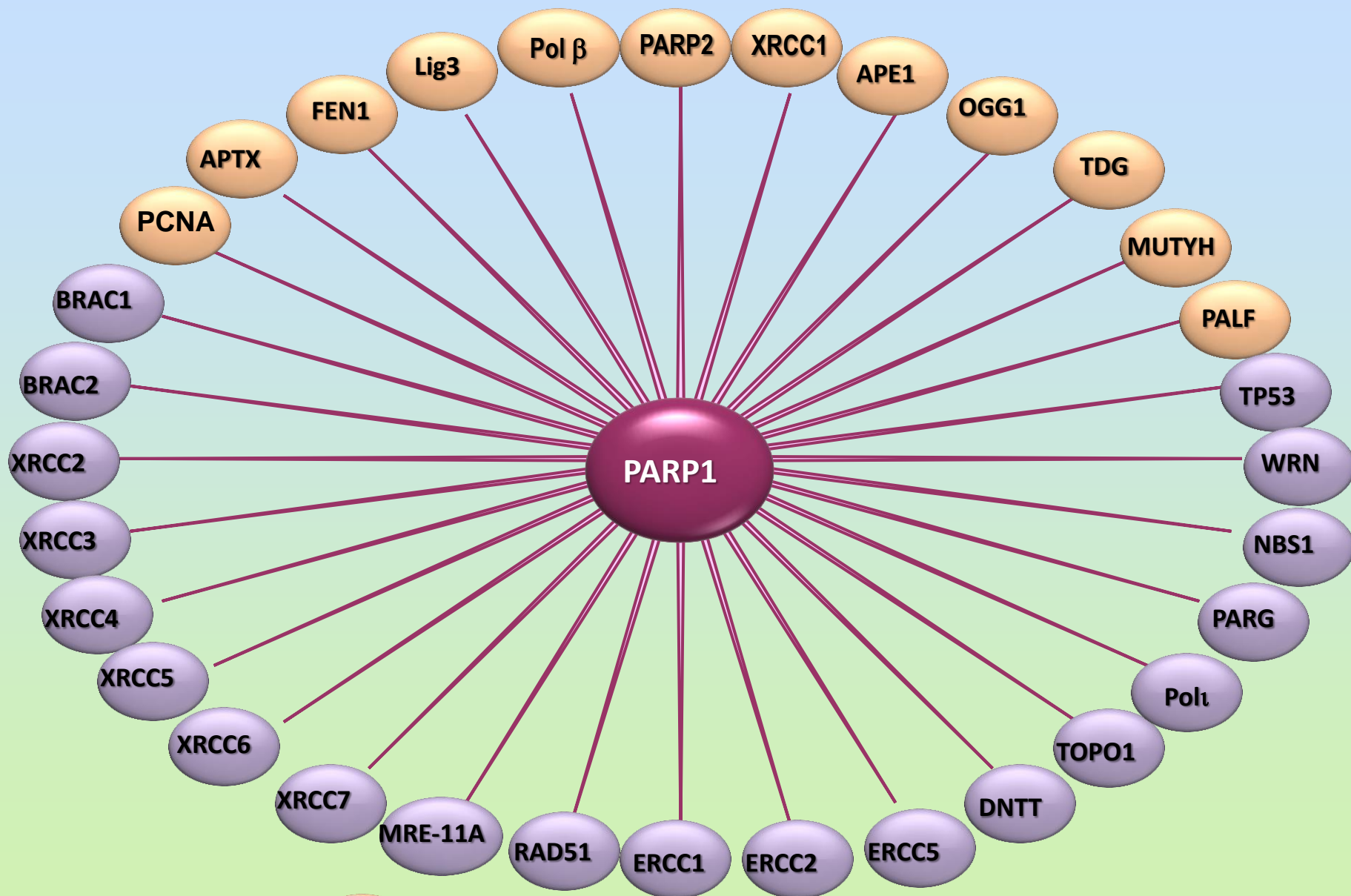



# Поли(ADP-рибоза) полимеразы, участвующие в ответе на повреждение ДНК



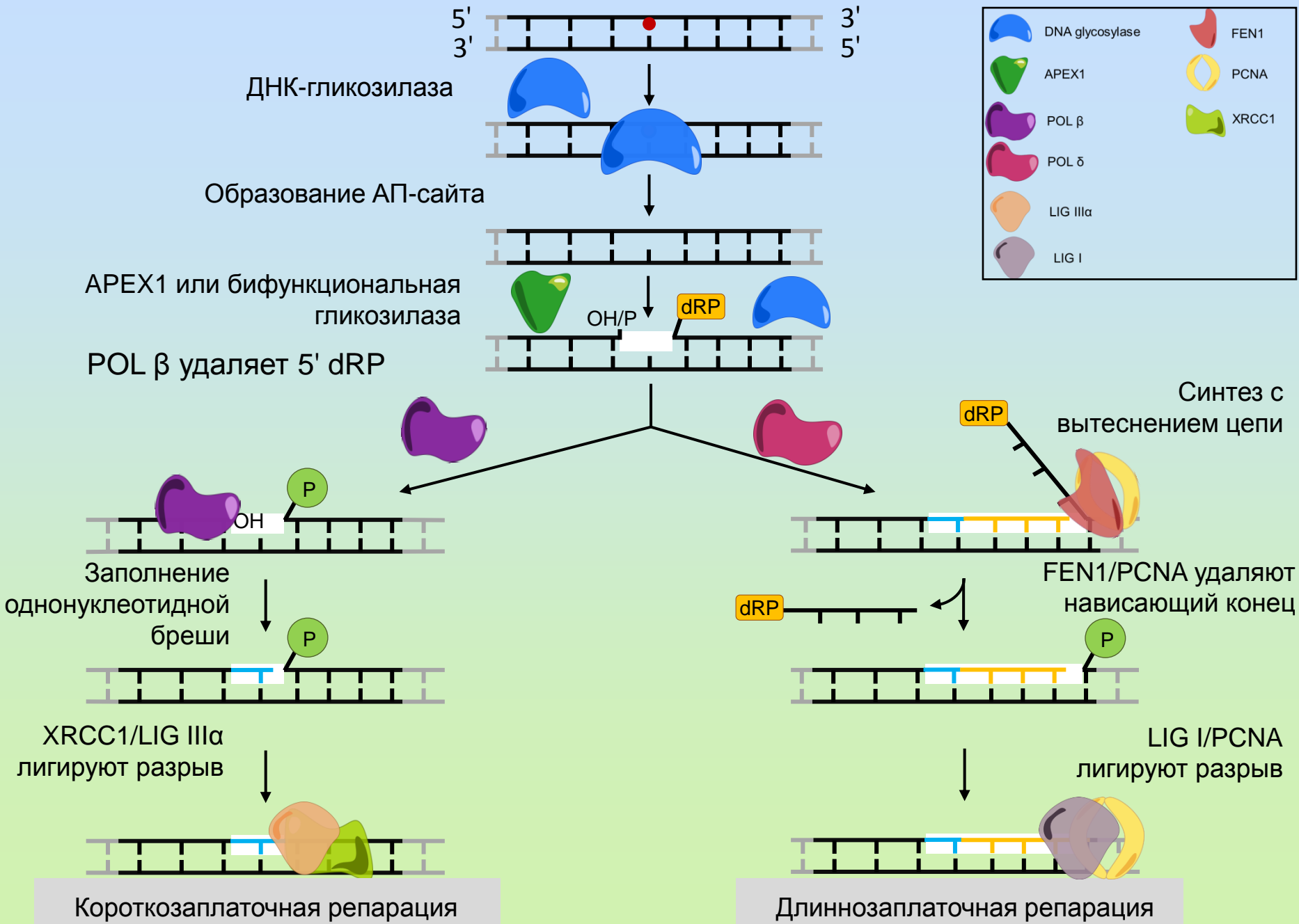


# *PARP1 взаимодействует с белками репарации ДНК*

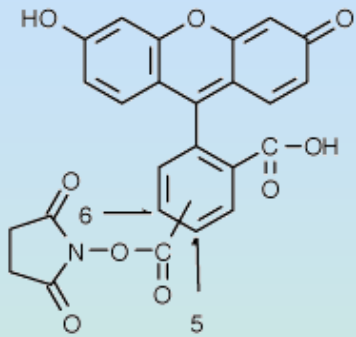


 = белки, участвующие в репарации оснований

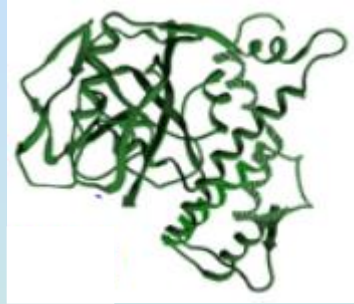
# Эксцизионная репарация оснований



# Белок-белковые взаимодействия были оценены количественно методами флуоресцентного титрования



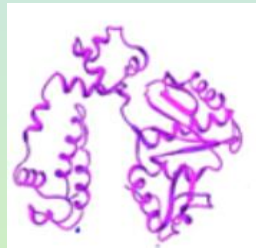
**FAM SE**  
5(6)-Carboxyfluorescein N-hydroxysuccinimide ester



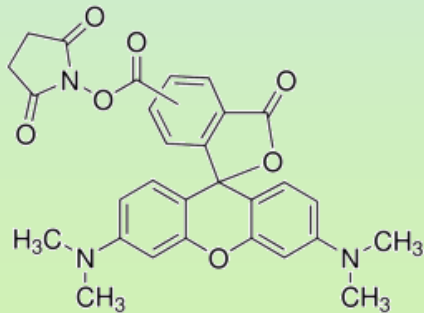
**PARP1**



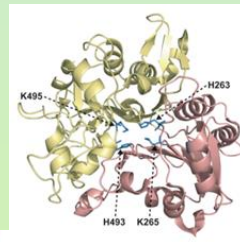
**APE1**



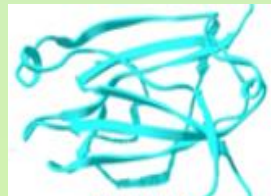
**Polβ**



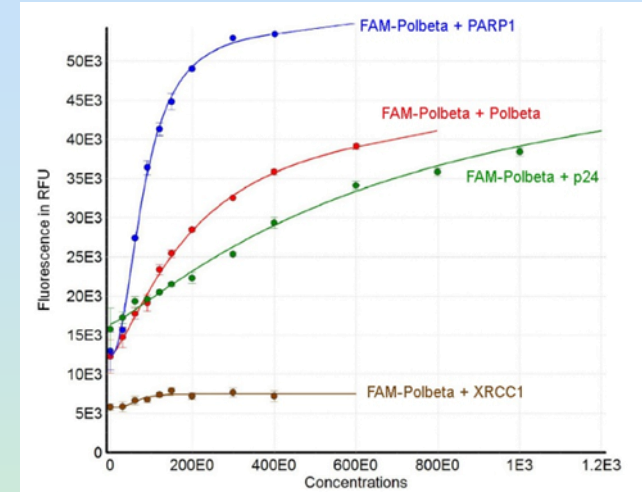
**TMR (TAMRA) SE**  
5-Carboxy-tetramethyl rhodamine N-hydroxysuccinimide ester



**Tdp1**



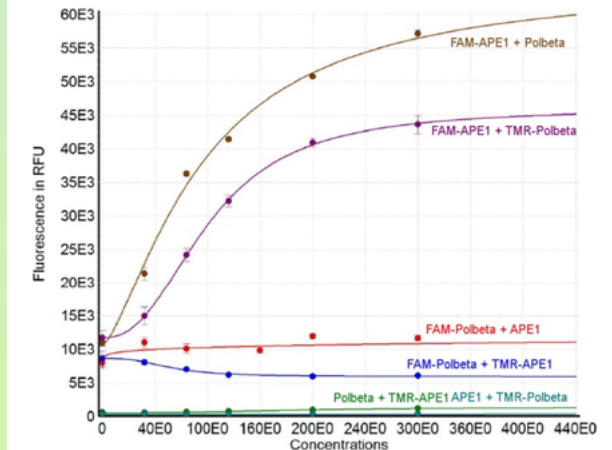
**XRCC1**



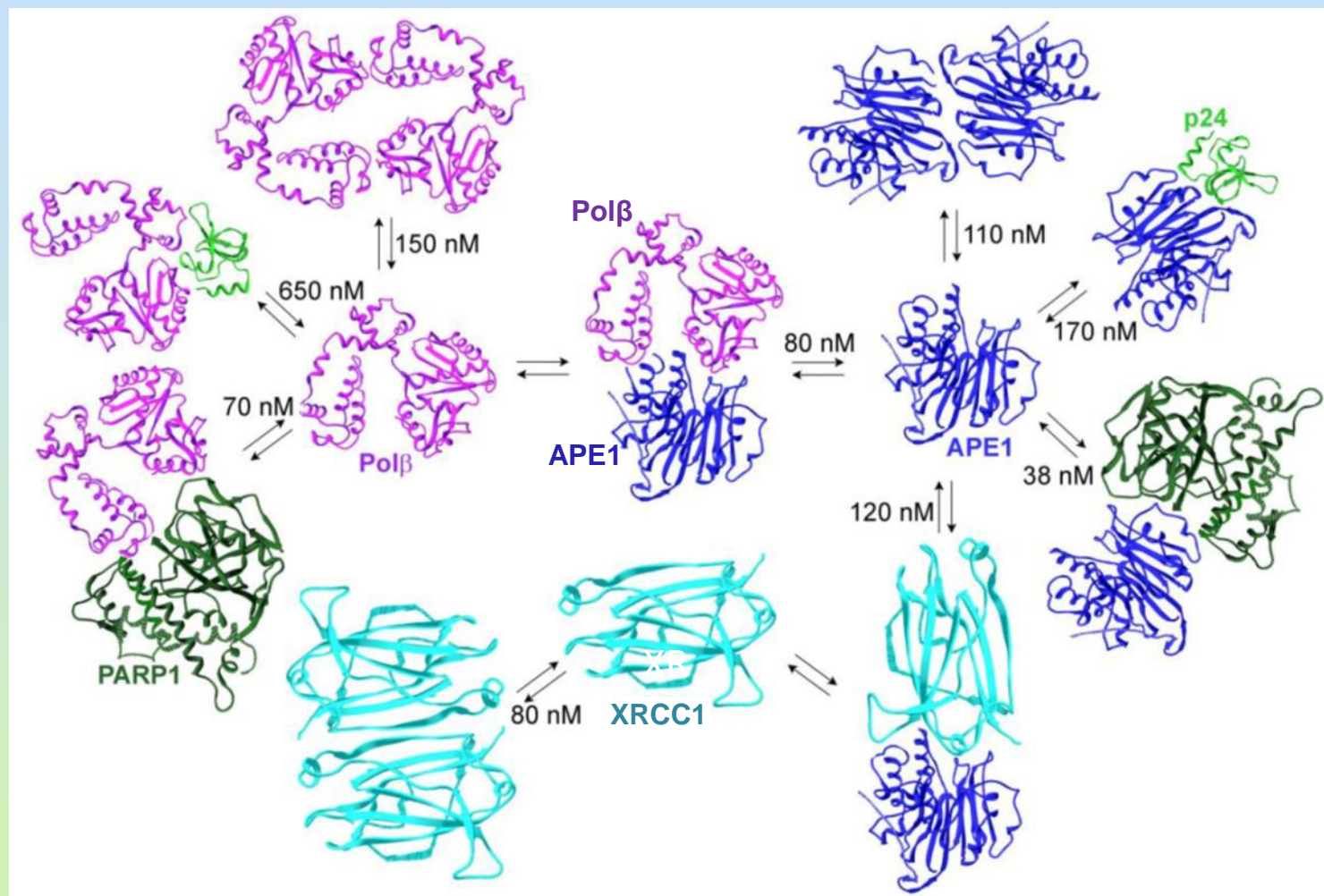
4-Parameter fit

Formula:  $Y = \text{Bottom} + (\text{Top} - \text{Bottom}) / (1 + (\text{EC50}/x)^{\text{Slope}})$

Group: A		Group: B		Group: C		Group: D	
Top	37.775E3	Top	54.923E3	Top	54.556E3	Top	7.483E3
Slope	2.435E0	Slope	2.114E0	Slope	1.194E0	Slope	3.611E0
EC50	155.684E0	EC50	82.328E0	EC50	722.109E0	EC50	65.986E0
log(EC50)	2.192E0	log(EC50)	1.916E0	log(EC50)	2.859E0	log(EC50)	1.819E0
Bottom	11.514E3	Bottom	12.363E3	Bottom	16.378E3	Bottom	5.784E3
r	999.505E-3	r	998.757E-3	r	992.845E-3	r	938.535E-3
r1	999.01E-3	r1	997.515E-3	r1	985.74E-3	r1	880.849E-3
Curve Color:	Red	Curve Color:	Blue	Curve Color:	Green	Curve Color:	Brown

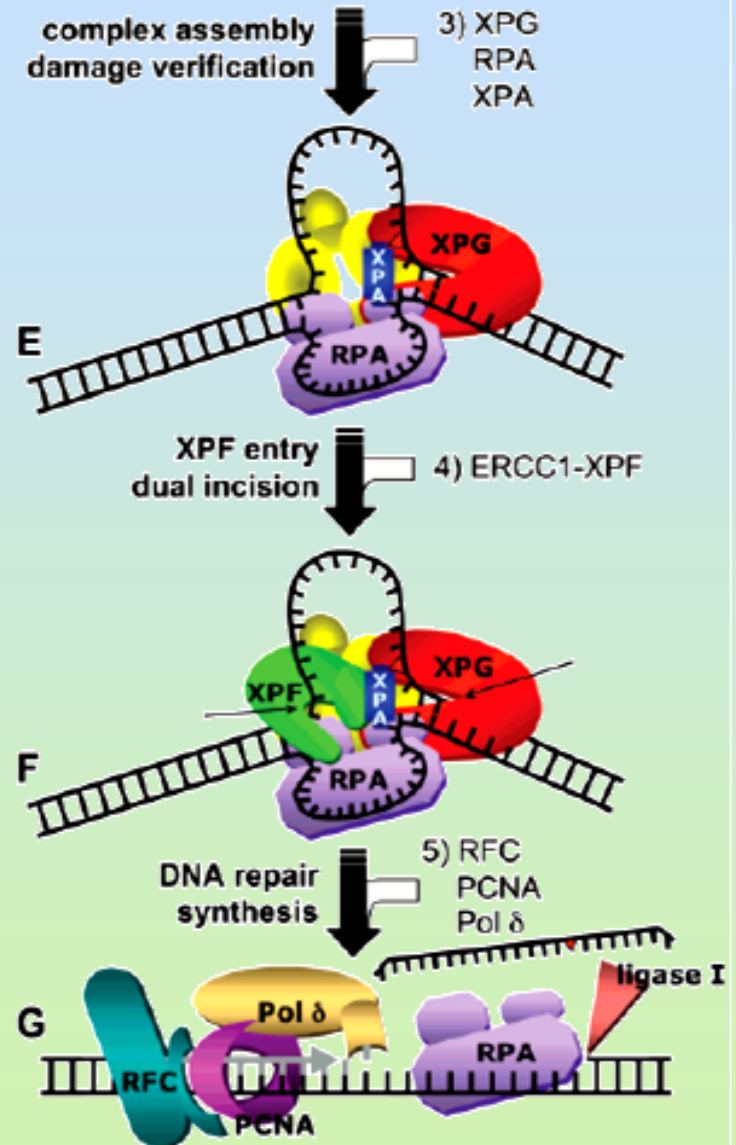
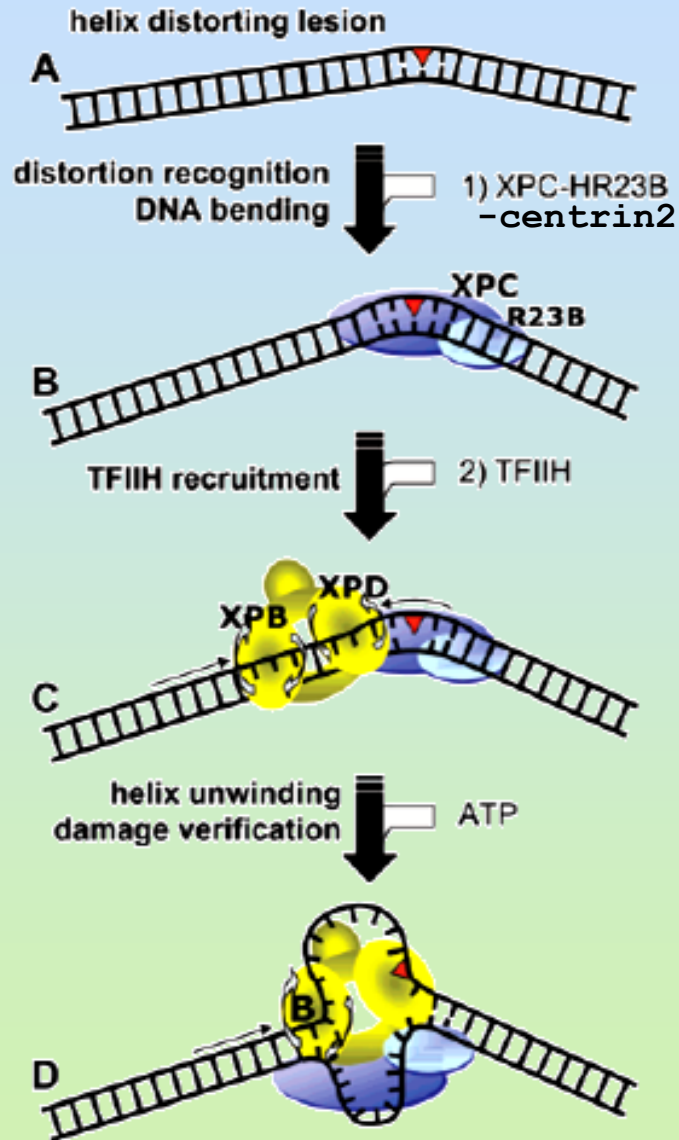


# Белок-белковые взаимодействия в «репарасоме»

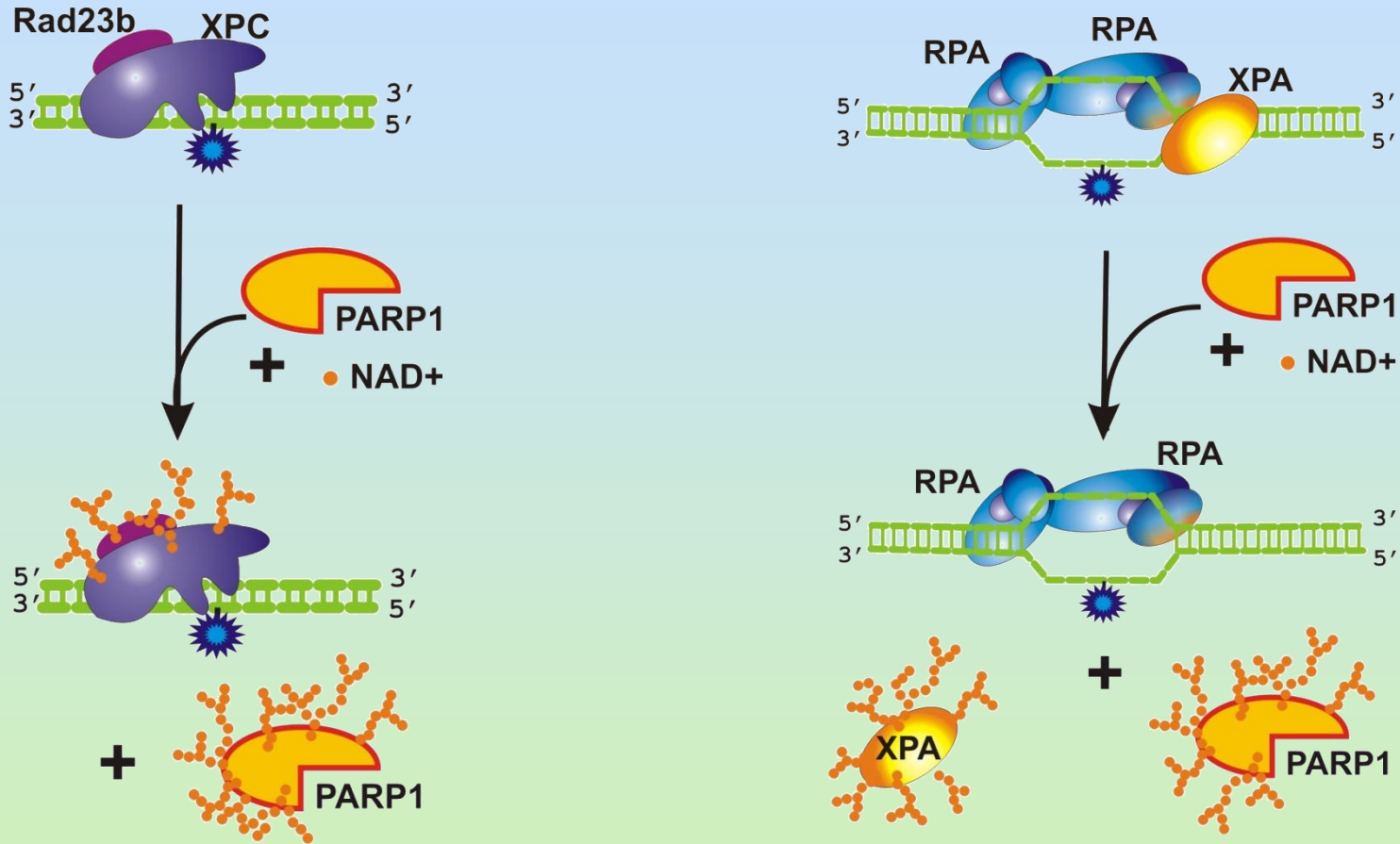


Представлены 3D-структуры белков репарасомы и количественные характеристики их взаимодействий по данным флуоресцентного титрования, резонансного переноса энергии (FRET) и динамического светорассеяния (*Moor N, Vasil'eva I ... Lavrik O, 2015, Nucleic Acids Res; Vasil'eva I, Anarbaev R, Moor N, Lavrik O, 2018, Biochem Biophys Acta*).

# Экцизионная репарация нуклеотидов



# PARP1 регулирует нуклеотидную репарацию



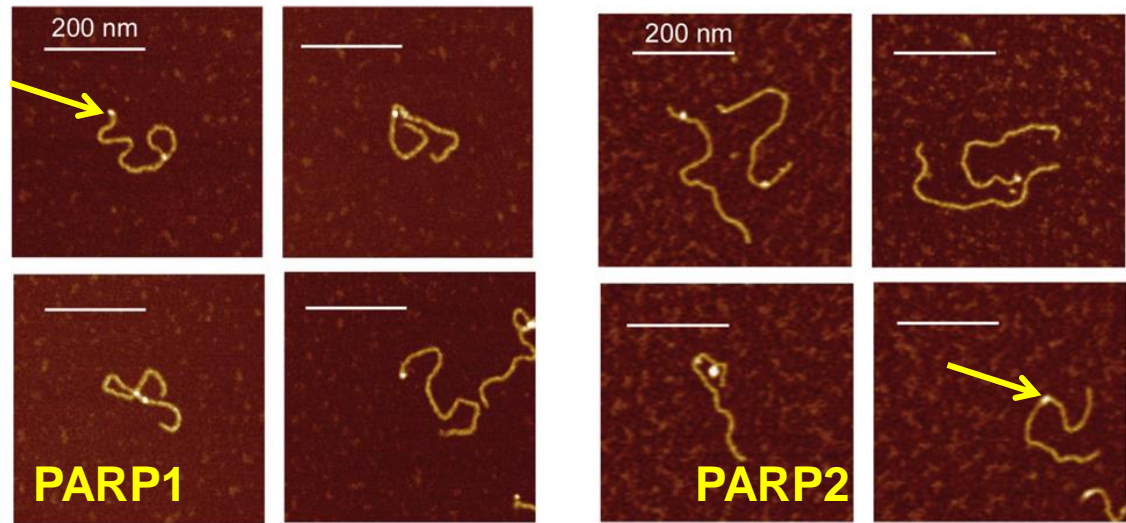
Ключевые белки нуклеотидной репарации связывают поли(ADP-рибозу) и являются мишенями для ее ковалентного присоединения. PARP1 регулирует процесс репарации УФ-индуцированных повреждений в хроматине.

*Maltseva E, Rechkunova N, Sukhanova M, Lavrik O, 2015, J Biol Chem.*

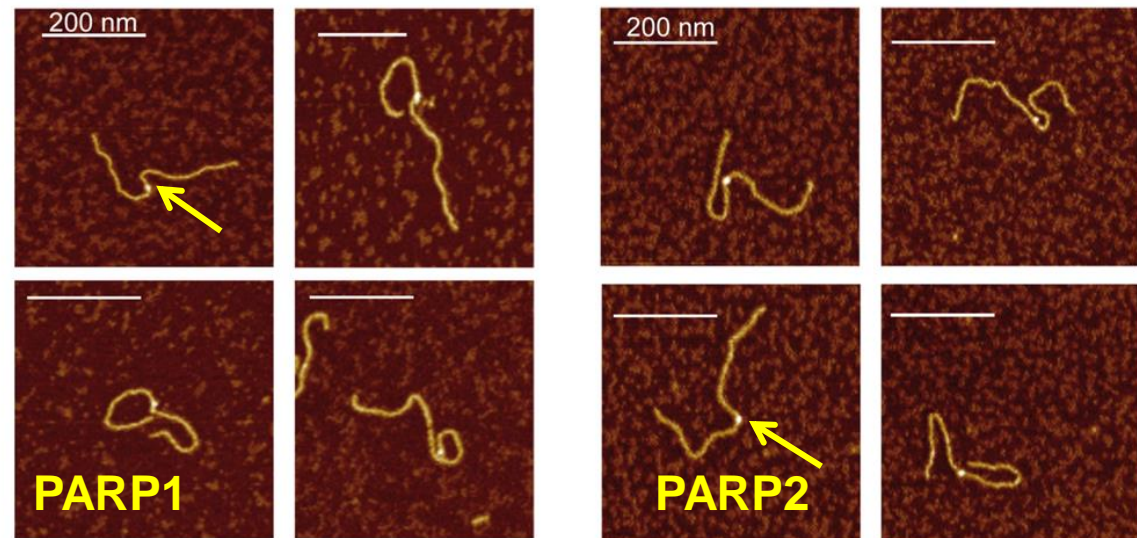
*Maltseva E, Krasikova Y, Sukhanova M, Rechkunova N, Lavrik O, 2018, DNA Repair.*

# Единичные молекулы PARP1 и PARP2, взаимодействующие с повреждением ДНК

ДНК-дуплекс  
1200 пар  
оснований



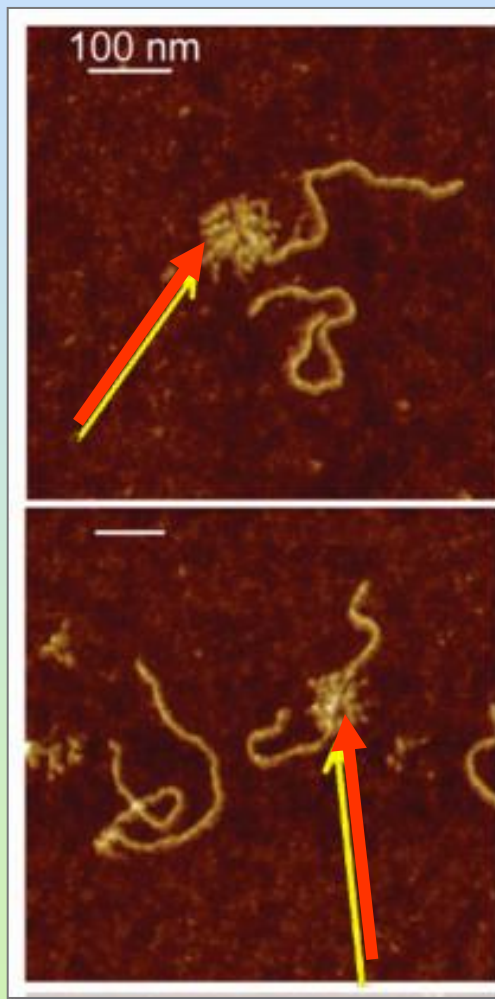
ДНК-дуплекс с  
однонитевым  
разрывом



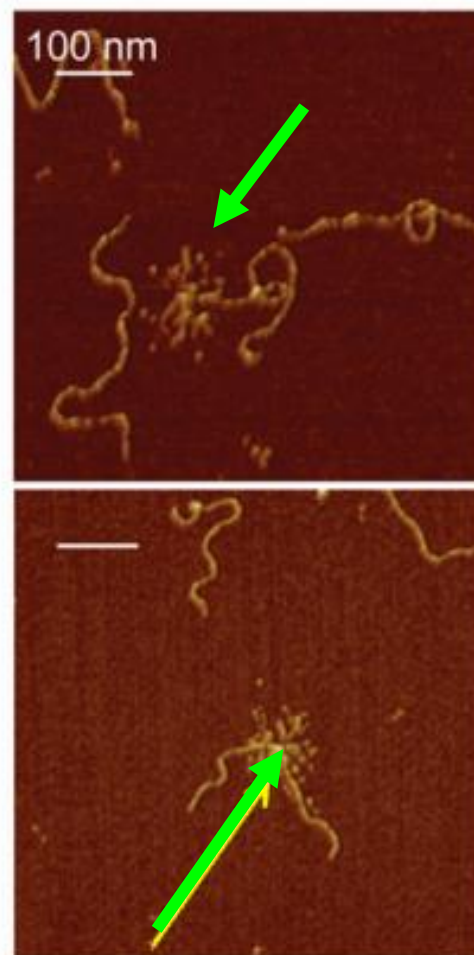
Визуализация с помощью атомно-силовой микроскопии  
*Sukhanova M ...Lavrik O, 2016, Nucleic Acids Res*

# Детекция синтеза поли(ADP-рибозы) методом атомно-силовой микроскопии

**PARP1**



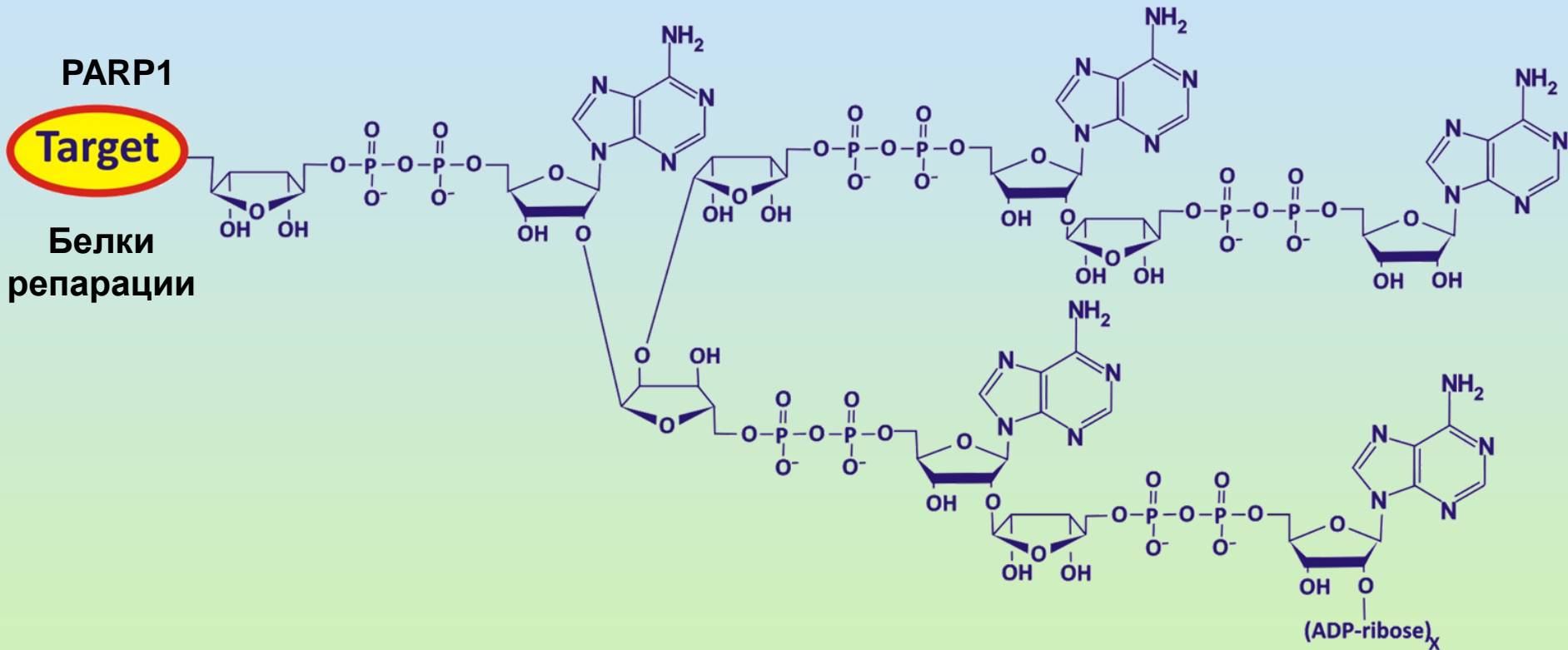
**PARP2**



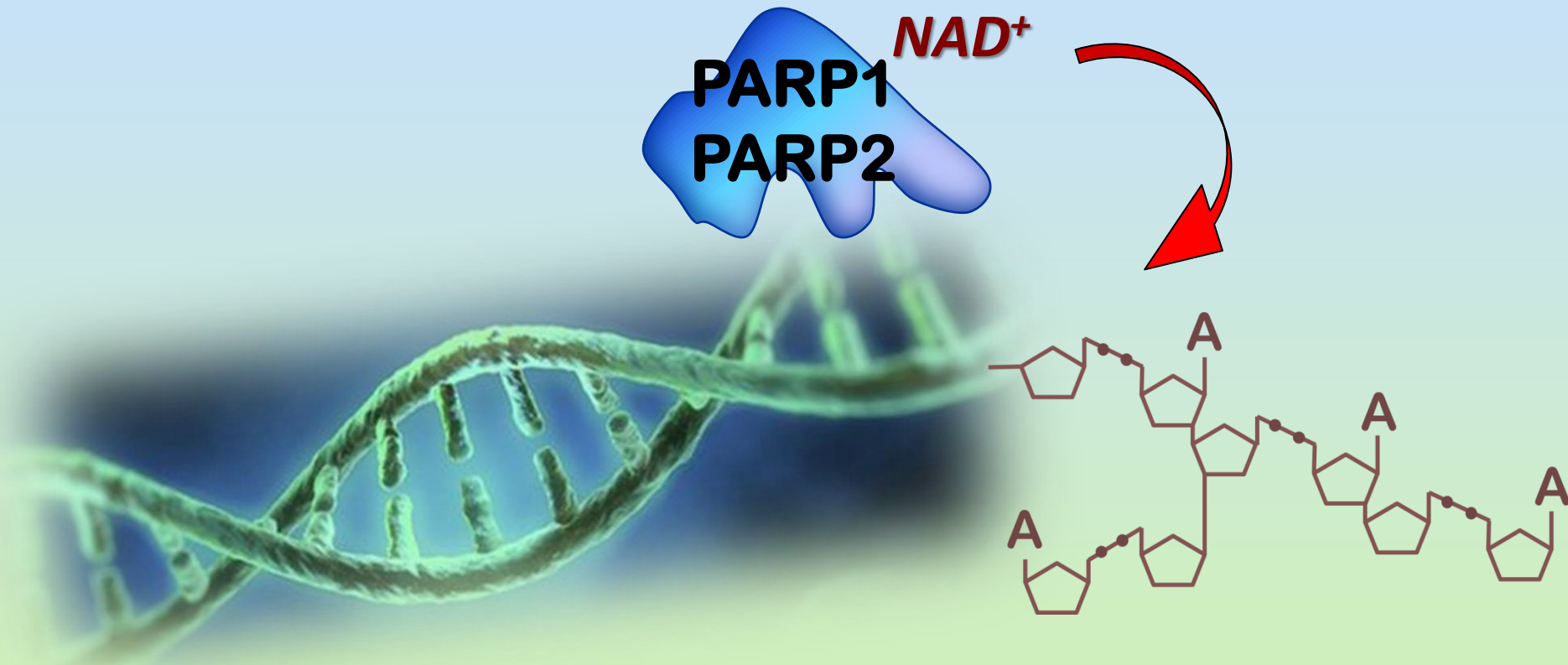
*Sukhanova M ...Lavrik O, 2016, Nucleic Acids Res*



**Поли(ADP-рибоза) – разветвленный полимер,  
синтезируемый из  $NAD^+$  ферментами семейства PARP  
модифицирует белки**



# Мишенью поли(АДФ-рибозил)ирования являются не только белки, но и ДНК!

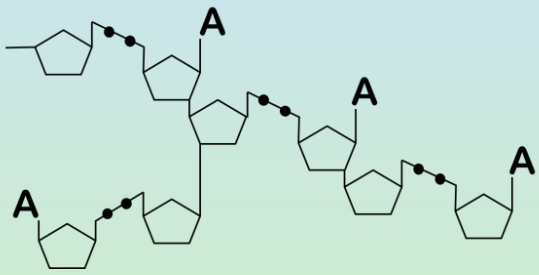


1. Talhaoui I, Lebedeva NA, Zarkovic G, Saint-Pierre C, Kutuzov MM, Sukhanova MV, Matkarimov BT, Gasparutto D, Saparbaev MK, **Lavrik OI**. Poly(ADP-ribose) polymerases covalently modify strand break termini in DNA fragments in vitro. *Nucleic Acids Res.* **2016**.
2. Zarkovic G, Belousova EA, Talhaoui 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**.

**ДНК**



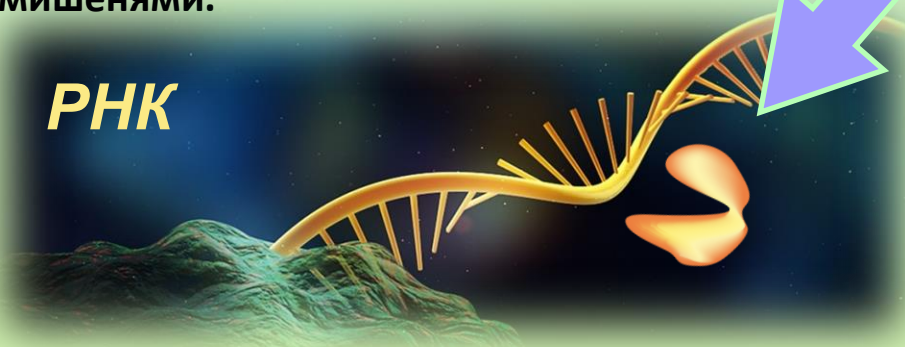
**PAR – третья нуклеиновая кислота**



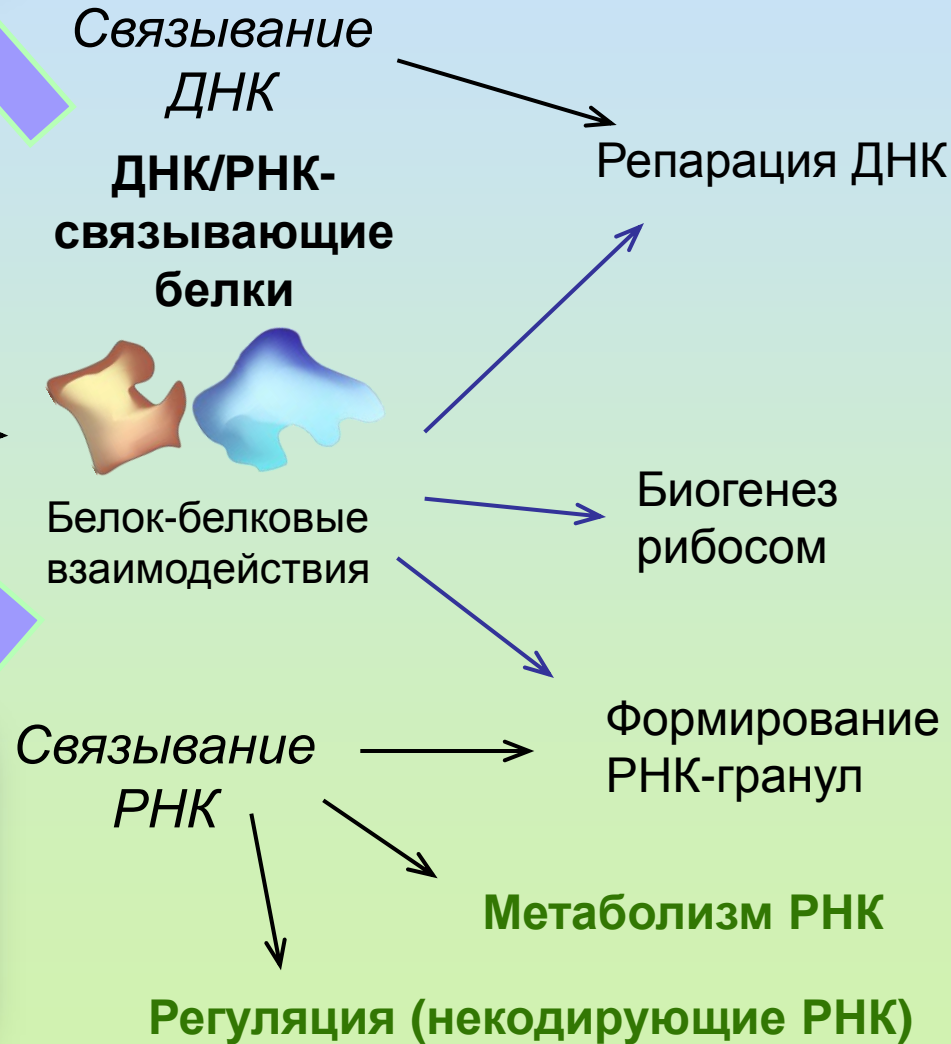
**PAR**

PAR модулирует взаимодействие ДНК/РНК-связывающих белков с белками-партнерами и ДНК/РНК-мишенями.

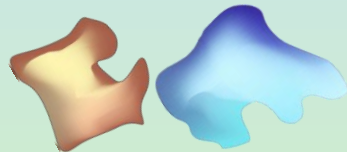
**РНК**



**Деконденсация хроматина**



**Связывание ДНК/РНК-связывающие белки**



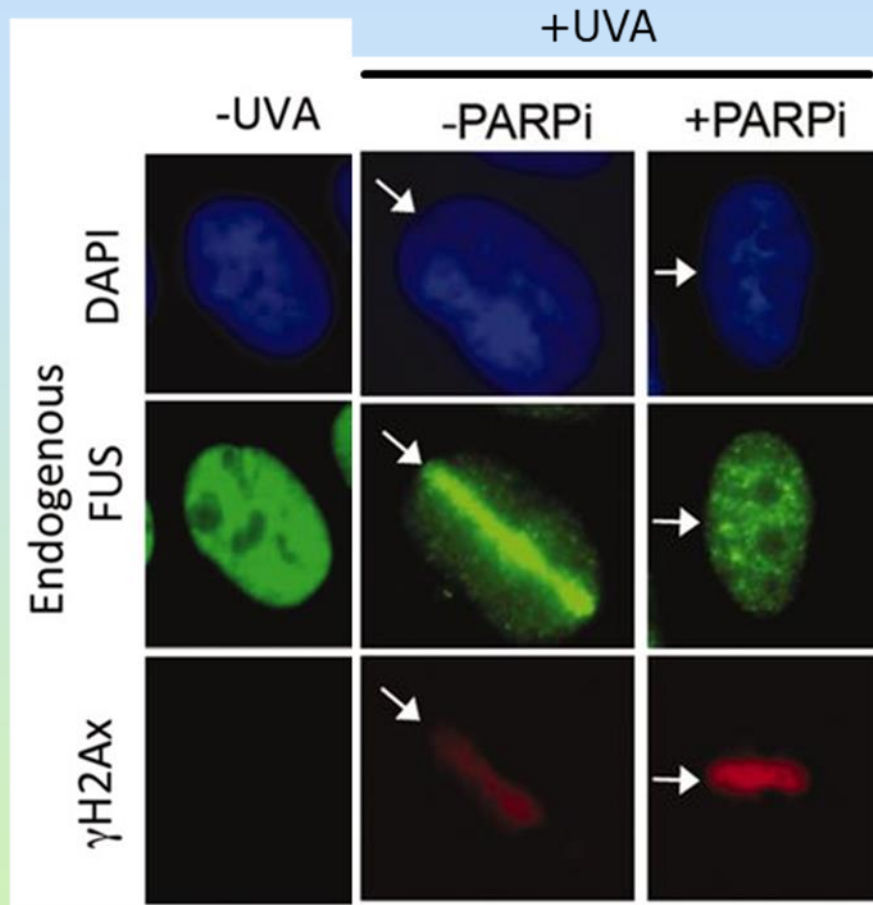
**Белок-белковые взаимодействия**

**Связывание РНК**

**Метаболизм РНК**

**Регуляция (некодирующие РНК)**

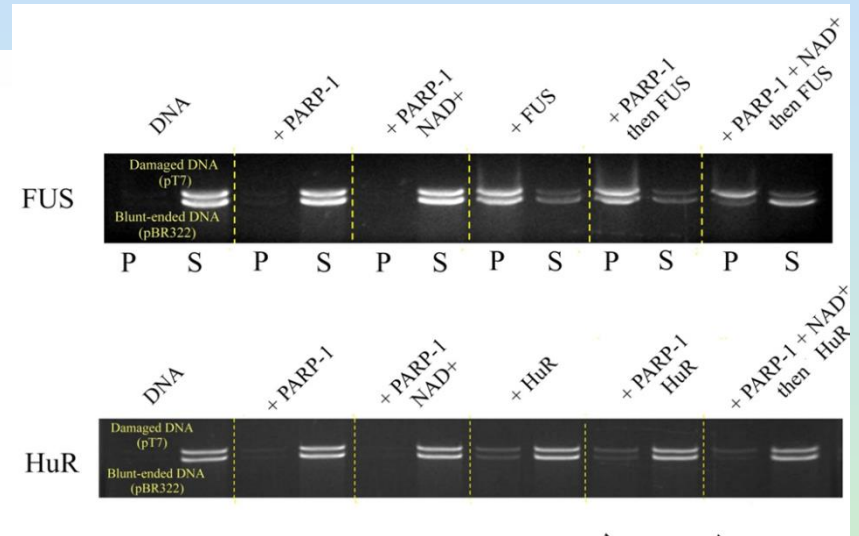
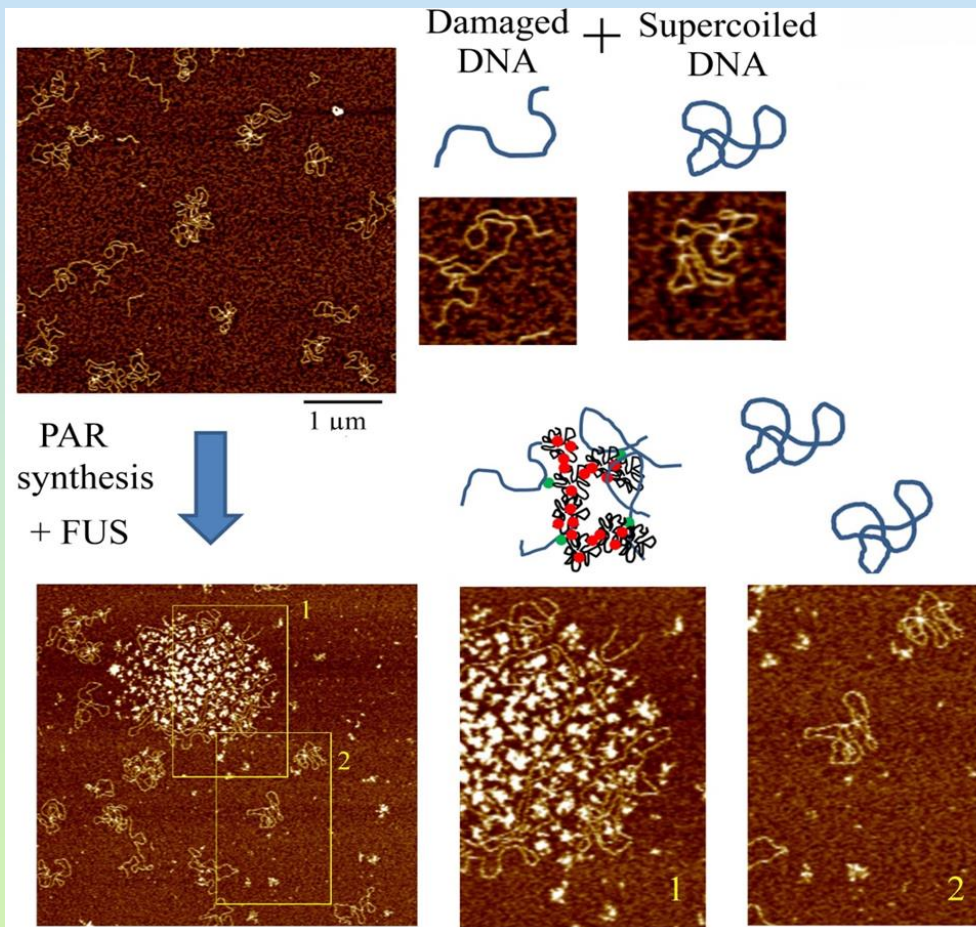
# Взаимодействие РНК-связывающего белка FUS к месту повреждения ДНК зависит от PARP1



- FUS (FUUsed in Sarcoma) – ядерный РНК-связывающий белок, вовлеченный в транскрипцию, сплайсинг и транспорт мРНК.
- Связывает ДНК, РНК и поли(ADP-рибозу).
- Содержит неупорядоченные домены, склонные к агрегации, что может быть причиной развития возрастных заболеваний.
- Мутации в гене FUS связывают с возникновением бокового амиотрофического склероза.

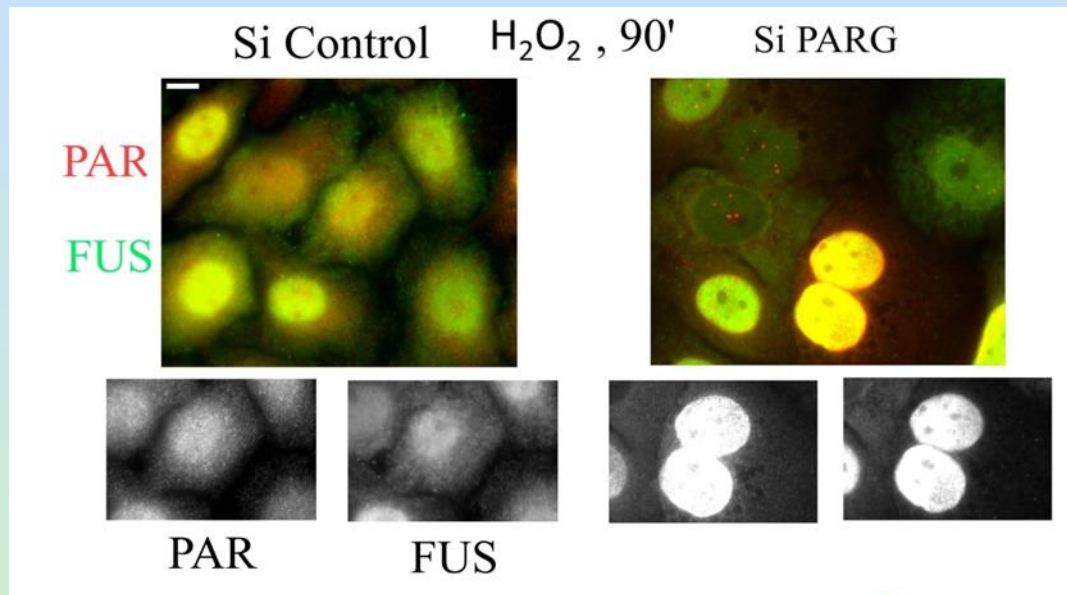
Клетки, обработанные ингибитором PARP, облучали и окрашивали флуоресцентными антителами против FUS и гистона  $\gamma$ H2Ax (индикатор двухцепочечных разрывов в ДНК).

# *FUS* связывает поли(ADP-рибозу) в местах повреждений ДНК и образует компартменты, в которых идет эффективная репарация



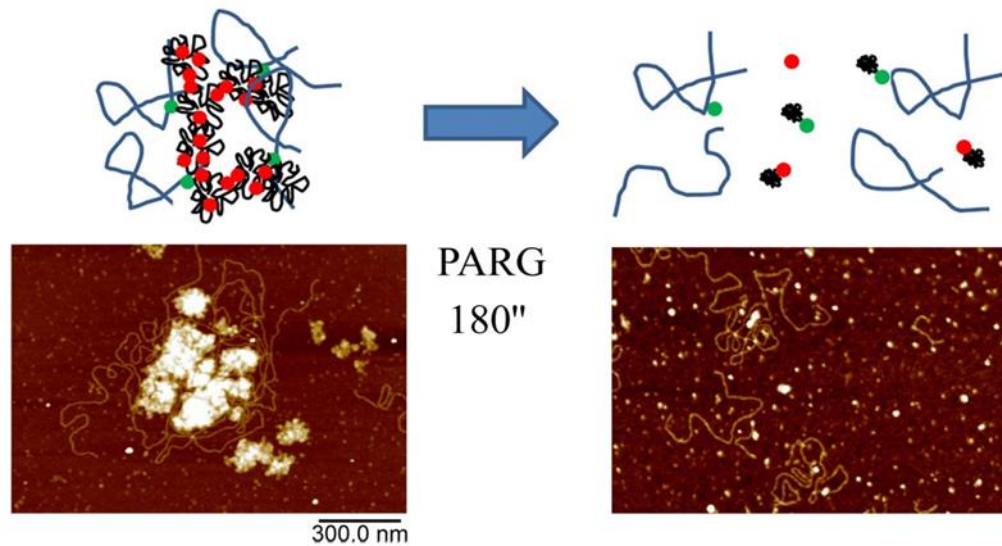
Локализация *FUS* в местах повреждения ДНК при активации PARP1 может создавать условия для привлечения и концентрирования факторов репарации ДНК в нужном месте в нужное время.  
**РНК-связывающие белки организуют «компартменты репарации» на повреждениях ДНК!**

# Гидролиз поли(ADP-рибозы) приводит к диссоциации FUS от поврежденной ДНК и его транслокации в цитоплазму



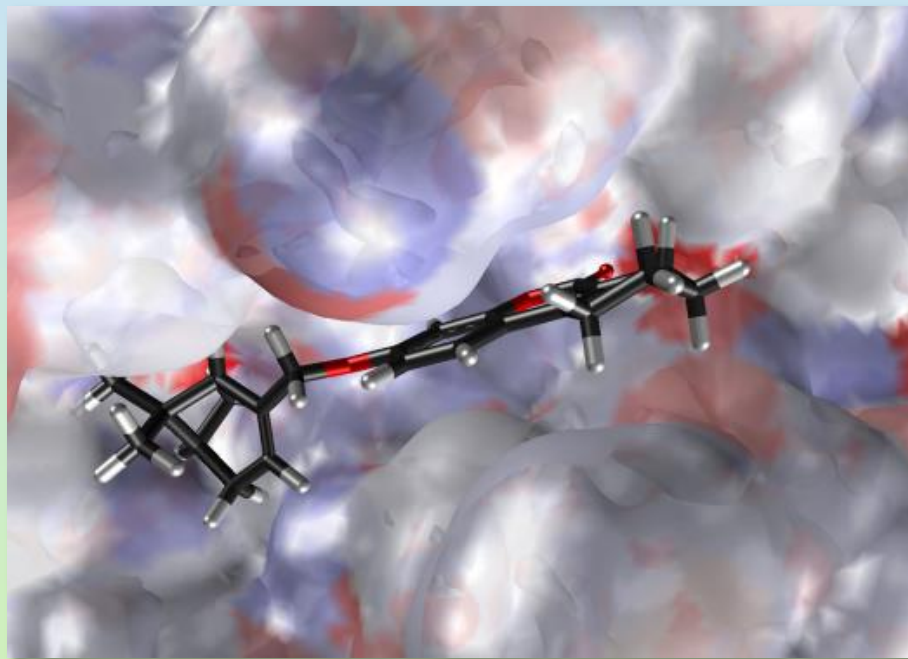
РНК-связывающие белки организуют компартменты репарации на повреждениях ДНК!

Singatulina A, Sukhanova M ...  
Lavrik O, Cell Reports, in press



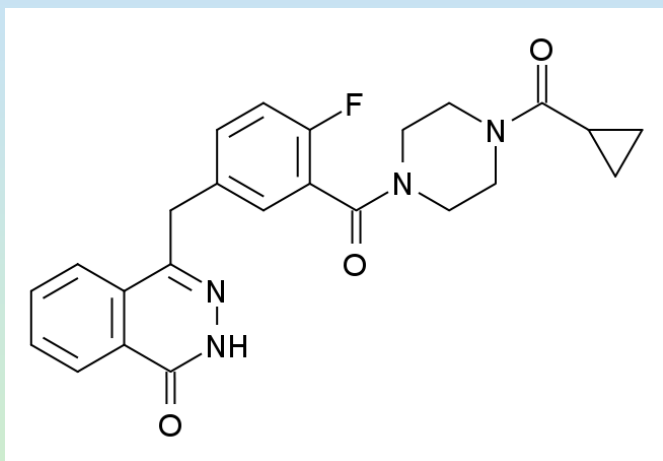
# ***Системы репарации ДНК являются мишенями для создания новых лекарств***

Действие используемых в клинике антираковых препаратов и экзогенных факторов (ионизирующая радиация, цисплатина, алкилирующие агенты) основано на повреждении ДНК и модулируется системами репарации.



Избирательное ингибирование репарации улучшает терапевтические эффекты химио- и радиотерапии при лечении рака.

# Олапариб (Lynparza, KU-0059436, AZD2281) – первый ингибитор PARP1, одобренный для клинического применения



Агентство FDA (U.S. Food and Drug Administration) одобрило применение этого препарата для лечения рака яичников и молочной железы у женщин с мутацией в генах BRCA1 и BRCA 2.

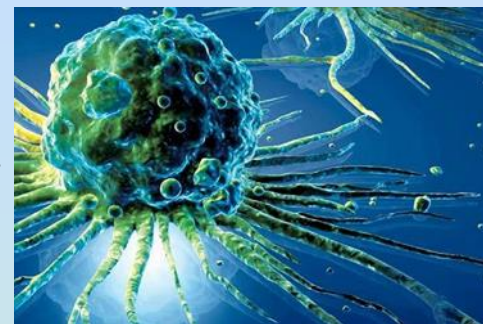
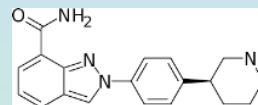
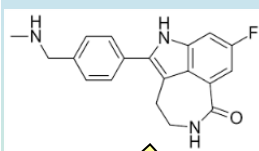
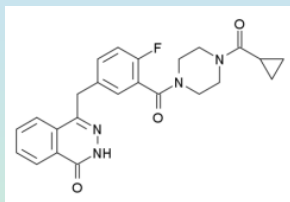
Препарат находится на третьей стадии клинических испытаний для лечения рака желудка, поджелудочной железы и простаты.



# Проводятся доклинические испытания антираковых препаратов, ингибирующих другие ключевые ферменты репарации ДНК

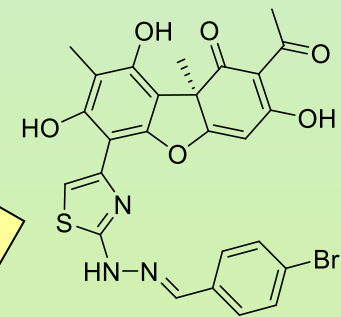
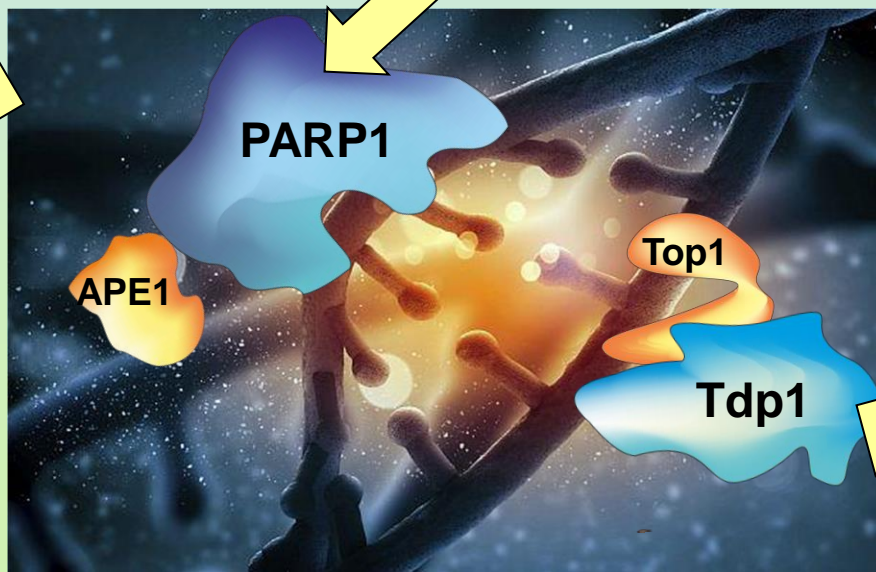


В клинике используются ингибиторы PARP1 олапариб, рукапариб, нирапариб



Нами разработаны препараты для воздействуют на другие мишени. Испытания показали уменьшение на 50% первичной опухоли и на 90% уменьшение метастазов

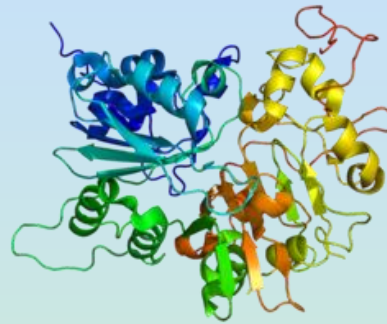
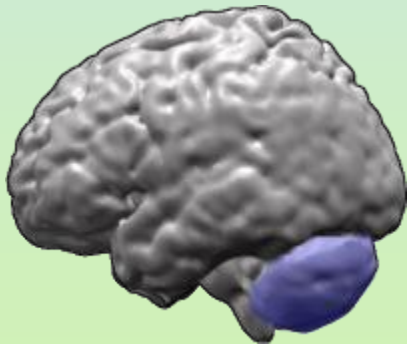
Повышение чувствительности опухолей к терапии, снижение числа и тяжести побочных эффектов



# Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1) в патологии человека

Мутация SCAN1

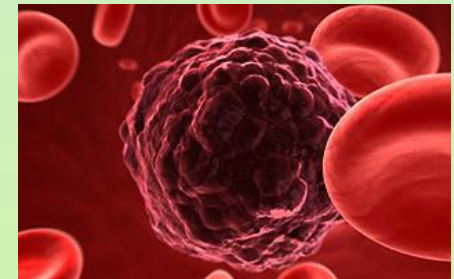
Спиноцеребеллярная атаксия-нейропатия



Тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 (TDP1)

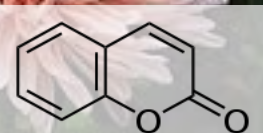
Удаление аддуктов Top1/ДНК

Ослабление действия клинических антираковых препаратов на основе камптотецина



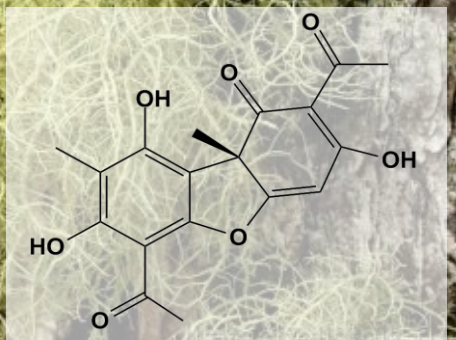
# Ингибиторы ферментов репарации на основе природных соединений ( комплексное исследование ИХБФМ, НИОХ и ИЦИГ СО РАН)

Кумарины



Отдел медицинской химии НИОХ (д.х.н, проф. Салахутдинов Н.Ф.) и Лаборатория регуляции экспрессии генов ИЦИГ (д.б.н. Попова Н.А.)

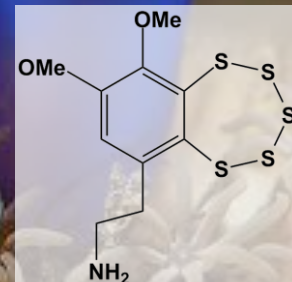
Производные урсниновой кислоты



Производные адамантана



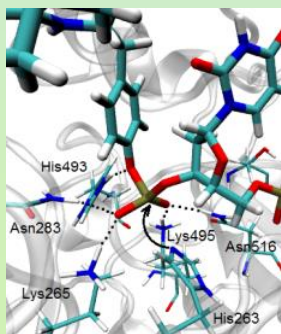
Производные варацина



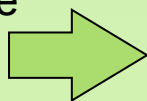
# Стратегия поиска ингибиторов репарации



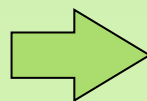
Природные соединения с противоопухолевыми свойствами



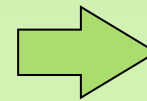
1. Компьютерное моделирование



2. Синтез

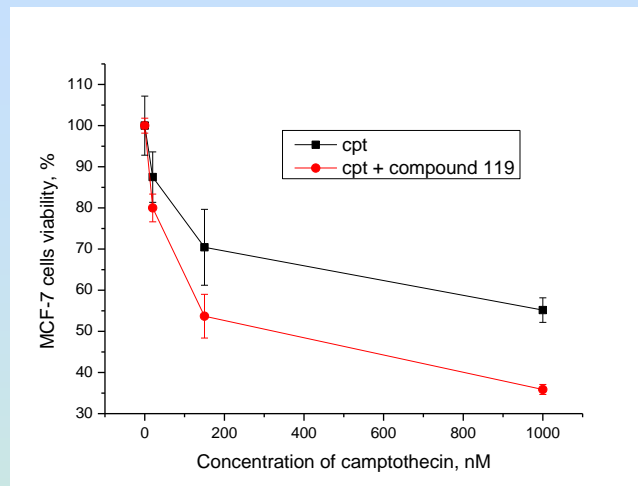


3. Скрининг *in vitro*



4. Анализ цитотоксичности

5. Влияние на цитотоксичность клинических препаратов (производное камптотецина топотекан, применяемый для лечения рака легких и прямой кишки)





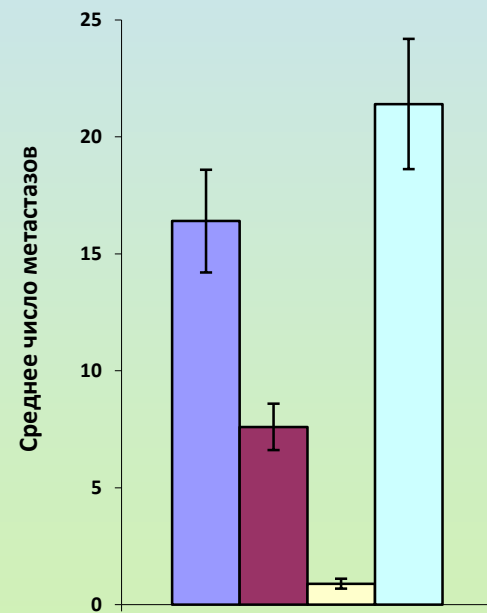
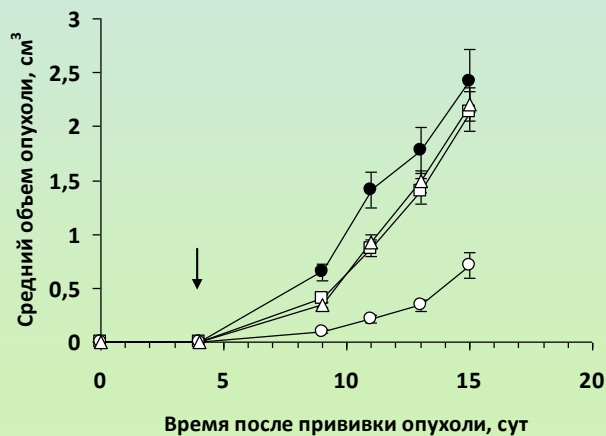
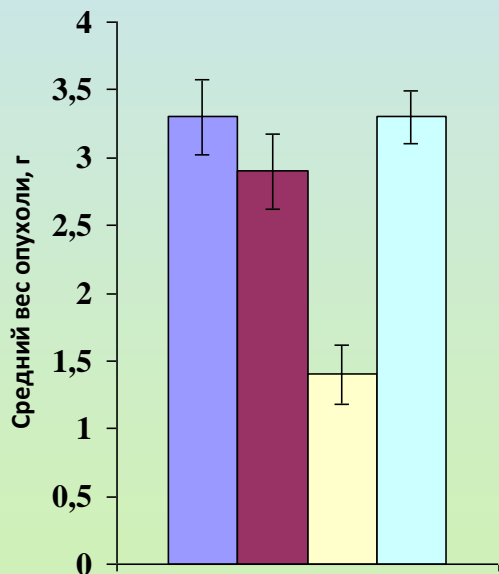
# Соединения - лидеры усиливают противоопухолевый и антиметастатический эффект топотекана в отношении карциномы Льюис мышей

**C57 black 6**

Применение ингибитора Tdp1 (№ 119) уменьшает вес опухоли на 30-50%

Эффект от ингибитора заметен уже на 2-3 сутки после начала лечения и нарастает в дальнейшем

Число метастазов в легких уменьшается в 5 раз при совместной использовании топотекана и ингибитора



■ ДМСО ■ ТПК □ ТПК+119 □ И119

● К □ ТПК ○ ТПК+119 △ И119

■ К ■ ТПК □ ТПК+119 □ И119

Zakharenko A, Luzina O ... Popova N, Salakhutdinov N, Lavrik O, 2018, Eur J Med Chem

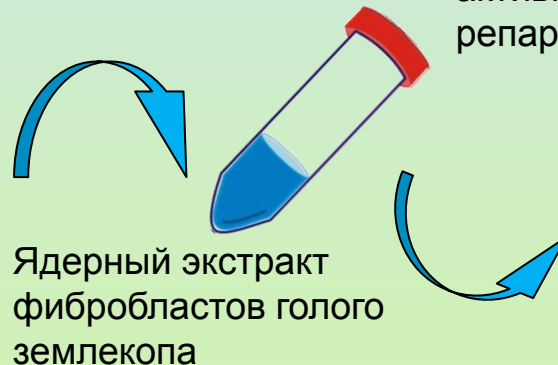
# Загадка “голового землекопа” (*Heterocephalus glaber*)

С возрастом не выявляется изменений, присущих старению, не меняются внешний вид и репродуктивная функция, а также уровень экспрессии различных генов. Нечувствителен к химическому или радиологическому воздействию, не подвержен образованию раковых опухолей. В пересчете на вес человека - живет 600 лет!

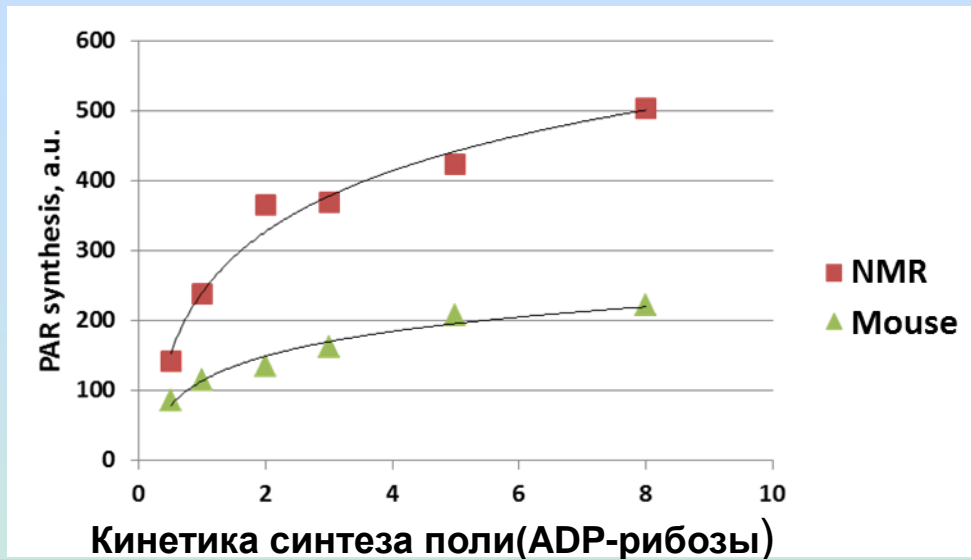


Средняя продолжительность жизни ~ 30 лет

**Изучение репарации ДНК у голого землекопа (совместно с ИМКБ СО РАН, Графодатский А.С., Трифионов В.А.)**



Исследование репарации ДНК у землекопов позволит найти новые пути избавления от рака, заболеваний, связанных со старением организма, и увеличить продолжительность и качество жизни человека.



**Нами впервые установлено, что активность репарации оснований и нуклеотидов, а также активность PARP1 в клетках голого землекопа выше, чем в клетках мыши.**

*Evdokimov A, Kutuzov M, Petruseva I ... Graphodatsky A, Trifonov V, Khodyreva S, Lavrik O, 2018, Aging*

# **Мониторинг активности систем репарации необходим для космических полетов**

За время полёта до Марса космонавты поглотят потенциально смертельную дозу космической радиации (свыше 1 зиверта). На поверхности планеты радиационный фон также высокий из-за разреженной атмосферы и слабого магнитного поля Марса (примерно в 800 раз слабее земного).



Для полётов в космическом пространстве необходимо тестировать активность систем репарации ДНК космонавтов. Необходим мониторинг людей, работающих с излучением по профпригодности с помощью тест-систем, разработанных на основе фундаментальных исследований.



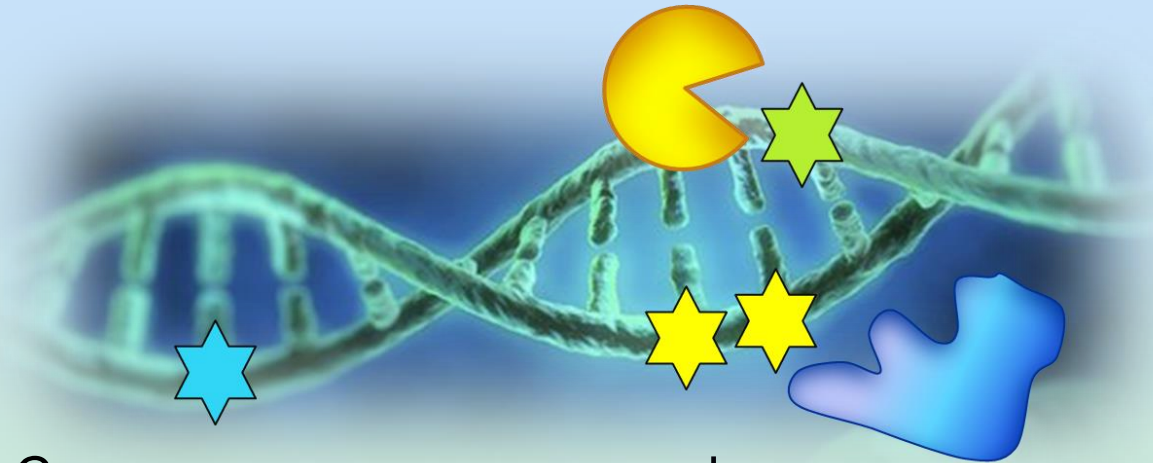
### **Фундаментальные достижения:**

- Установлены механизмы организации и функционирования комплексов белков, осуществляющих репарацию поврежденных оснований и нуклеотидов у человека, а также механизмы их регуляции с участием PARP1.
- Установлено, что не только белки, но и поврежденная ДНК может подвергаться ковалентной модификации, катализируемой PARP.
- Выявлена роль РНК-связывающих белков в репарации ДНК в качестве «затравок» образования клеточных «компартов репарации».

### **Инновационные практические достижения:**

- Найдены эффективные белковые мишени для разработки антираковых препаратов. Препараты находятся в доклинических испытаниях в качестве потенциальных лекарств рака прямой кишки, легких и желудка.
- Исследована роль систем репарации в процессах старения. Разработаны системы мониторинга активности процессов репарации ДНК. Установлено, что репарация идет более эффективно в клетках долгоживущих организмов, что определяет ключевую роль этого процесса в долголетию.

# Системы репарации ДНК – основа жизни и будущее современной медицины



Системы репарации – платформа для создания лекарственных препаратов:

- Предотвращение раковых и нейродегенеративных заболеваний

- Долголетие и решение проблемы старения

*Время жизни (в пересчёте на килограмм организма)*

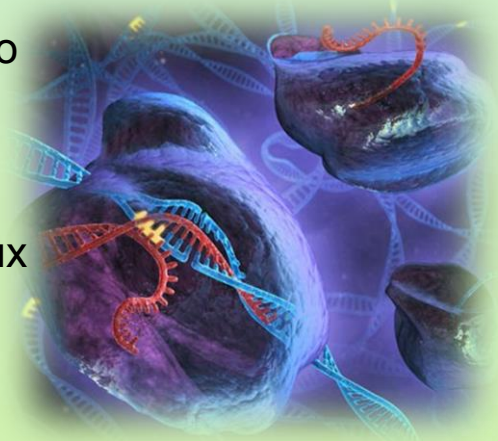


**1** год



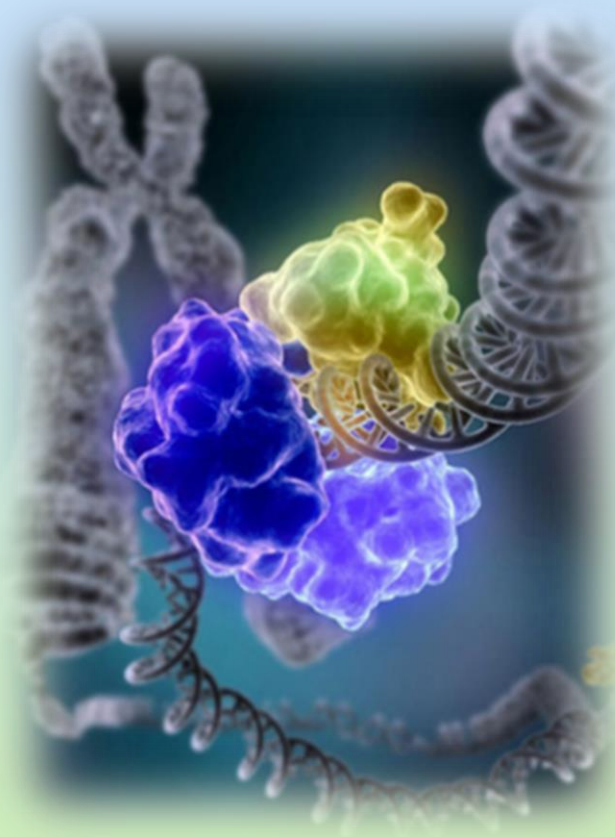
**670** лет

- Исследование репарации важно для технологий целевого редактирования генома, подобных **CRISPR/Cas9** – будущего медицины



# ***Исследование систем репарации необходимо:***

- Чтобы победить онко – и нейродегенеративные заболевания;
- Чтобы научиться жить несколько сотен лет, не старея;
- Чтобы осваивать космос
- В мире в этой области работают сотни лабораторий. Наша лаборатория является лидером в этой области исследований в России !



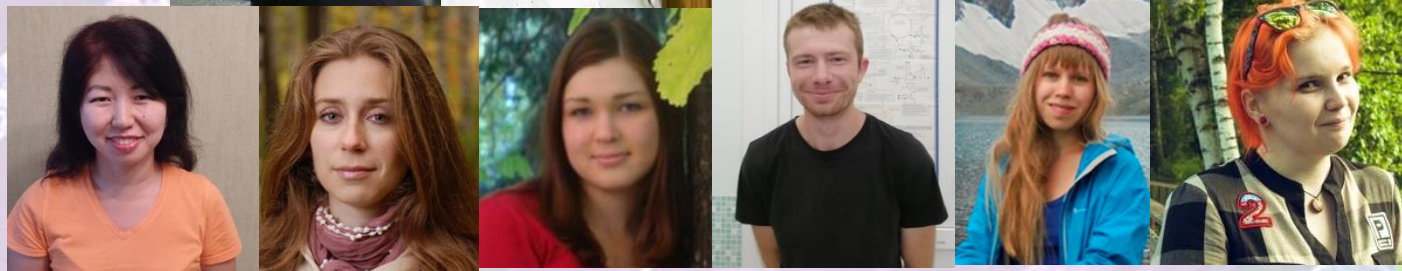
# Лаборатория биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН

д.х.н. Моор Н.А.  
д.б.н. Ходырева С.Н.  
к.б.н. Алемасова Е.Э.  
к.х.н. Анарбаев Р.О.  
к.х.н. Белоусова Е.А.  
к.х.н. Васильева И.А.  
к.х.н. Дырхеева Н.С.  
к.б.н. Евдокимов А.Н.  
к.х.н. Захаренко А.Л.  
к.х.н. Ильина Е.С.  
к.х.н. Красикова Ю.С.  
к.х.н. Кутузов М.М.  
к.х.н. Лебедева Н.А.  
к.х.н. Мальцева Е.А.  
к.х.н. Петрусева И.О.  
к.х.н. Речкунова Н.И.  
к.х.н. Суханова М.В.



## Аспиранты

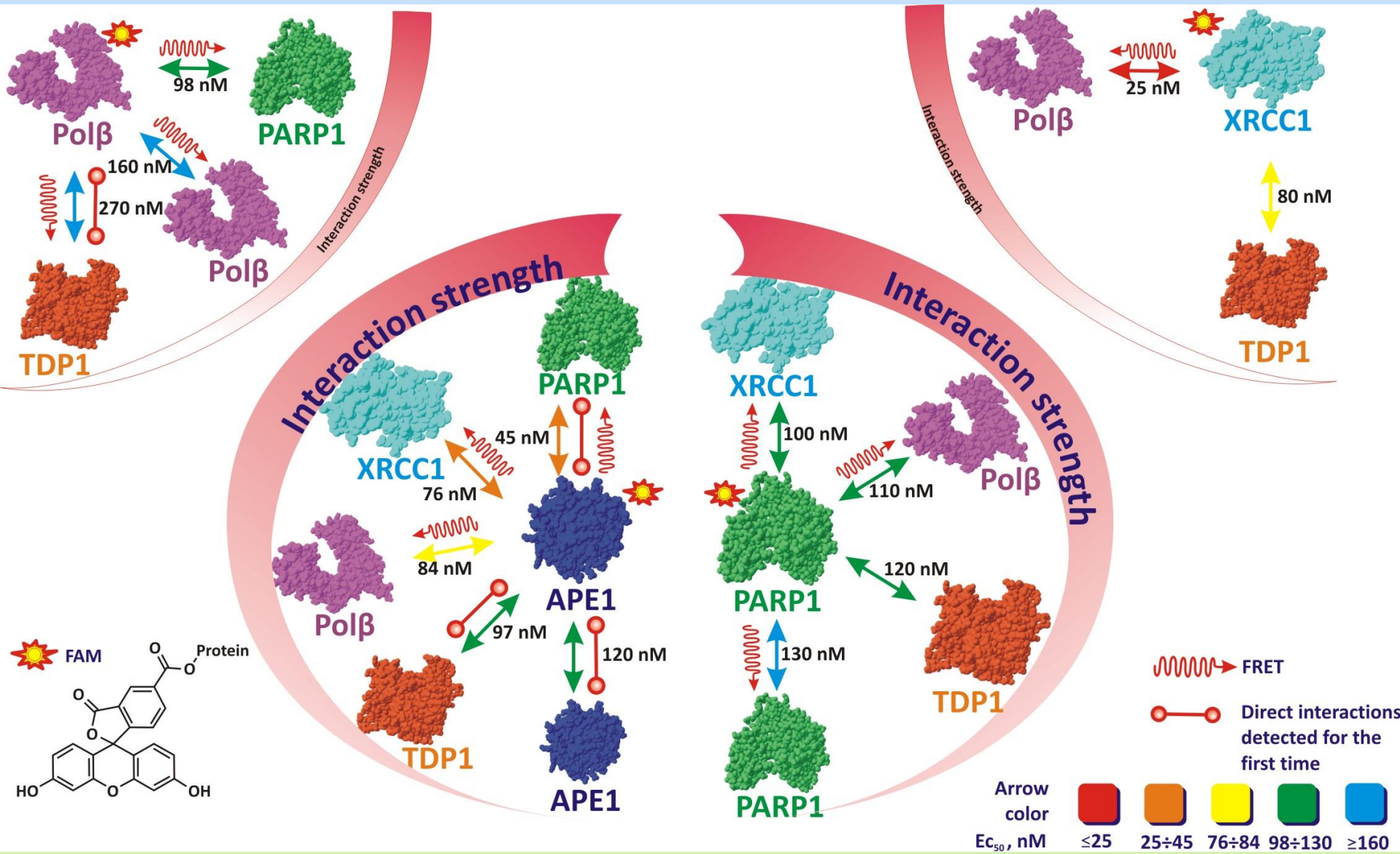
Кургина Т.А.  
Науменко К.Н.  
Лукьянчикова Н.В.  
Сингатулина А.Ш.  
Чепанова А.А.  
Попов А.А.



Исследования поддержаны грантами РФФИ и РНФ







# ДНК – хранилище генетической информации







Моор Нина Александровна

**Заведующая ЛБХФ**  
**Чл.-корр. РАН, профессор**  
**Лаврик Ольга Ивановна**



Речкунова  
Надежда  
Ивановна



Петрусева Ирина Олеговна

Ходырева  
Светлана  
Николаевна



Суханова  
Мария  
Владиславовна



Лебедева  
Наталья  
Александровна



Захаренко  
Александра  
Леонидовна



Мальцева Екатерина  
Анатольевна



Красикова Юлия  
Сергеевна



Васильева Инна  
Анатольевна



Дырхеева  
Надежда  
Сергеевна



Белуосова Екатерина  
Анатольевна

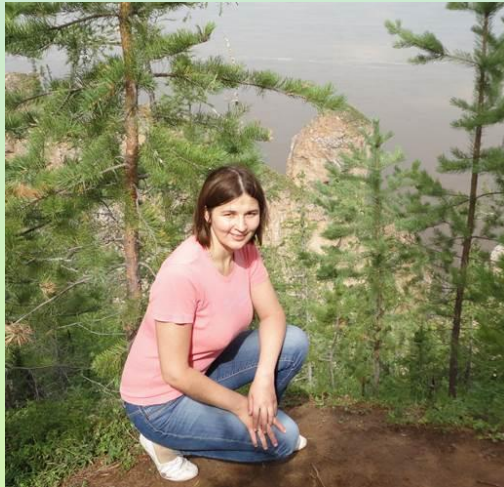


Медведева  
Лидия  
Ильинична

Старостенко Лидия  
Васильевна



Косова Анастасия  
Андреевна



Ильина Екатерина  
Сергеевна

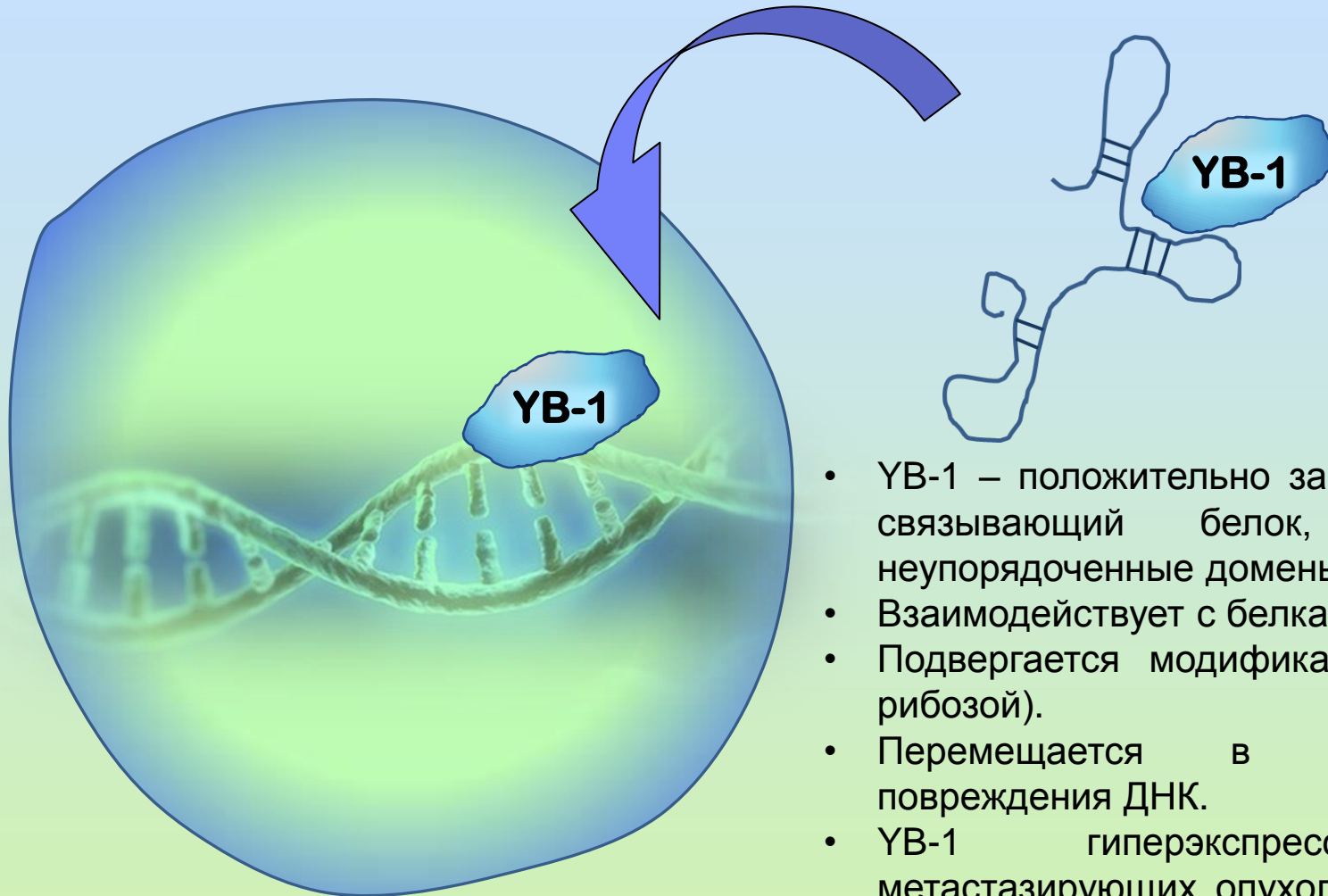


Алемасова Елизавета  
Эдуардовна



Лукьянчикова Наталья  
Вильевна

# РНК-связывающий белок YB-1 стимулирует активность PARP1



- YB-1 – положительно заряженный РНК-связывающий белок, содержащий неупорядоченные домены.
- Взаимодействует с белками репарации
- Подвергается модификации поли(ADP-рибозой).
- Перемещается в ядро после повреждения ДНК.
- YB-1 гиперэкспрессирован в метастазирующих опухолях, устойчивых к химиотерапии.

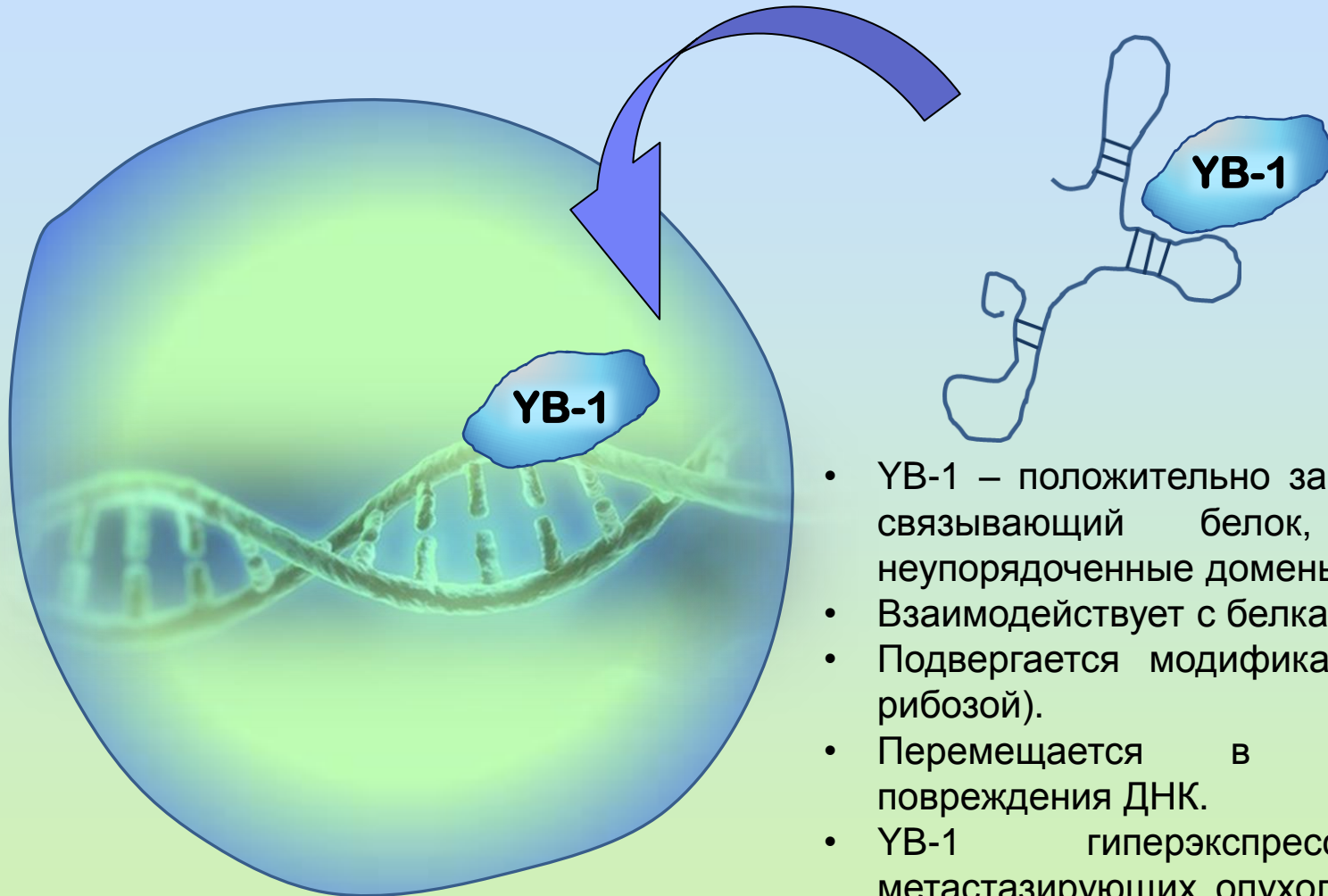


# **Системы репарации являются мишенями для создания новых лекарств**

*Действие используемых в клинике химиотерапевтических препаратов и экзогенных факторов (ионизирующая радиация) основано на повреждении ДНК и **модулируется** системами репарации.*

*Поэтому избирательное **ингибирование** репарации улучшает терапевтические эффекты.*

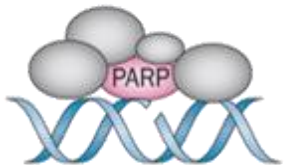
# РНК-связывающий белок YB-1 стимулирует активность PARP1



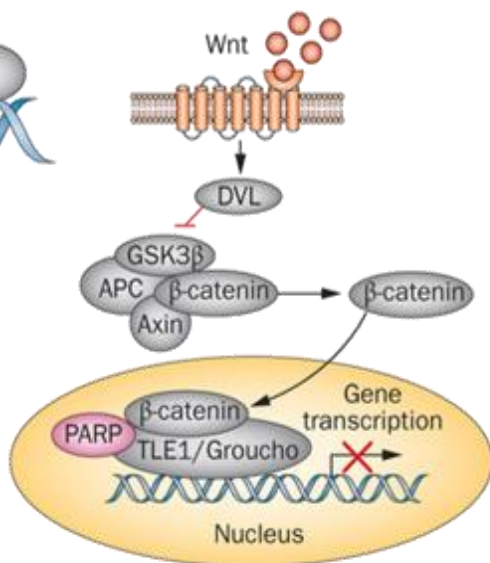
- YB-1 – положительно заряженный РНК-связывающий белок, содержащий неупорядоченные домены.
- Взаимодействует с белками репарации
- Подвергается модификации поли(ADP-рибозой).
- Перемещается в ядро после повреждения ДНК.
- YB-1 гиперэкспрессирован в метастазирующих опухолях, устойчивых к химиотерапии.

# Функции PARP1 в клетке

## Репарация ДНК



## Регуляция транскрипции

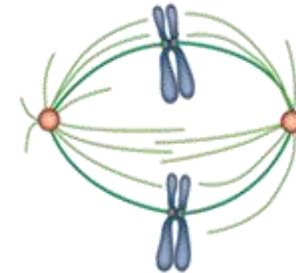


## Модификация хроматина

Регуляция длины теломер и стабильности хромосом

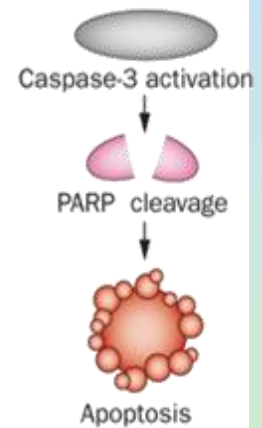


## Митоз



## Клеточная смерть

Апоптоз  
Некроз



**PARP1 участвует в поддержании длины теломер и стабильности хромосом, а также регулирует практически все пути репарации ДНК.**

conference**series**.com

CERTIFICATE OF RECOGNITION



*Olga I. Lavrik*

in recognition of outstanding services rendered in organizing

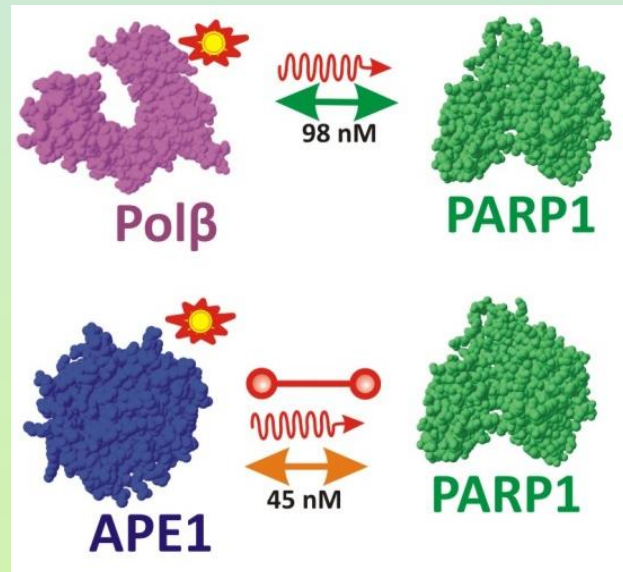
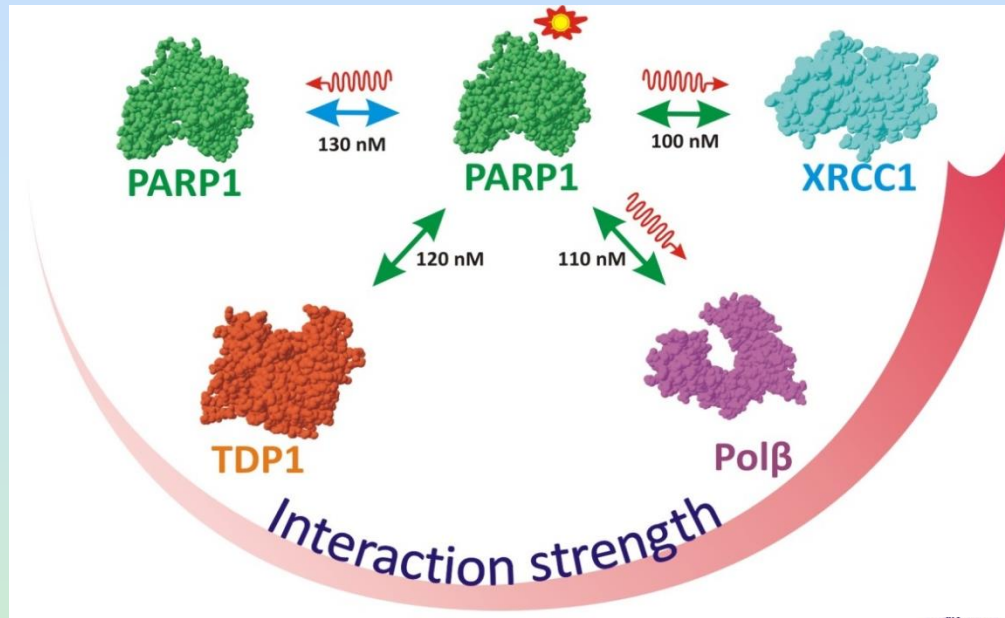
**6<sup>th</sup> World Congress on Medicinal Chemistry and Drug Design**

held during during June 07-08, 2017 in Milan, Italy

Medicinal Chemistry 2017



# PARP1 эффективно взаимодействует с ключевыми белками репарации



# «Транссибирская» ДНК

Число повреждений ДНК, ежедневно возникающих в каждой клетке человека, можно соотнести с возникновением аварий на Транссибирской магистрали через каждые 100 метров пути.

