

УДК 577.32

РОЛЬ WGR-ДОМЕНА В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ БЕЛКОВ PARP1 И PARP2

© 2023 г. Н. В. Малюченко^{a, *, **}, А. Н. Коровина^a, А. А. Саулина^a,
В. М. Студитский^{a, b}, А. В. Феофанов^{a, c}

^aБиологический факультет, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
Москва, 119234 Россия

^bFox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA 19111-2497 USA

^cИнститут биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук,
Москва, 117997 Россия

*e-mail: mal_nat@mail.ru

**e-mail: malyuchenkonv@my.msu.ru

Поступила в редакцию 21.03.2023 г.

После доработки 02.05.2023 г.

Принята к публикации 02.05.2023 г.

Белки PARP1 и PARP2 входят в семейство поли(ADP-рибоза)полимераз, вовлеченных в регуляцию репарации и репликации ДНК, процессинг РНК, биогенеза рибосом, транскрипции, а также в процессы деления и гибели клеток. PARP1 и PARP2 считаются перспективными мишенями для разработки противоопухолевых препаратов и могут найти применение для лечения сердечно-сосудистых, нейродегенеративных и онкологических заболеваний. Ранее показано, что домен WGR играет центральную роль в функционировании белков PARP1 и PARP2. В обзоре рассмотрены механизмы участия домена WGR в функционировании белков PARP1 и PARP2, которые имеют ряд как схожих, так и специализированных свойств. Понимание этих процессов представляет большой интерес для фундаментальной науки, а также будет способствовать разработке более эффективных и селективных ингибиторов PARP1 и PARP2.

Ключевые слова: PARP1, PARP2, WGR, ингибиторы PARP1, ингибиторы PARP2

DOI: 10.31857/S0026898423050129, **EDN:** EJBLXO

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ PARP1 И PARP2

Семейство ядерных белков, поли(ADP-рибоза)полимераз (PARP) человека, включает в себя 17 представителей, объединенных по наличию консервативной аминокислотной последовательности каталитического центра (CAT). Характерная особенность CAT всех белков PARP (PARP-signature) – наличие ADP-рибозилтрансферазного домена (ART) [1, 2]. Ключевые представители семейства: PARP1 и PARP2 (PARP1/2) – вовлечены в регуляцию важнейших процессов в клетке, таких как репарация и репликация ДНК, процессинг РНК, биогенез рибосом, транскрипция, деление и гибель клеток [3–6]. Особую роль эти

белки играют в поддержании стабильной работы генома, поскольку выступают в роли сенсоров повреждений и запускают репарацию ДНК, а также реакции, способствующие адаптации клетки к стрессу [7–9].

PARP1 и PARP2 (PARP1/2) обладают как общими, так и самостоятельными функциями в клетке. Нокаут PARP1 в клетках и эмбрионах не приводит к гибели организма, так как белок PARP2 способен компенсировать его функции [10–12], но двойной нокаут, PARP1/2, летален для эмбрионов [12, 13]. Благодаря отличному от PARP1 репертуару узнаваемых ДНК-субстратов, которые формируются при повреждении, PARP2 обладает специфическими функциями в репара-

Сокращения: ART (ADP-ribosyltransferase) – ADP-рибозилтрансферазный домен; BRCT (BRCA1 C-terminus) – домен PARP1, содержащий C-концевой мотив BRCA1 (breast cancer 1); CAT (catalytic domain) – каталитический центр; CTR (C-terminal region) – C-концевая область; FRAP (fluorescence recovery after photobleaching) – метод восстановления флуоресценции после обесцвечивания; HD (helical domain) – спиральный домен; HPF1 (histone PARylation factor 1) – фактор-1 PARилирования гистонов; NTR (N-terminal region) – N-концевая область; PAR (poly(ADP-ribose)) – поли(ADP-рибоза); PARP1 (poly(ADP-ribose) polymerase 1) – поли(ADP-рибоза)полимераза-1; PARP2 (poly(ADP-ribose) polymerase 2) – поли(ADP-рибоза)полимераза-2; SSBs и DSBs (single strand breaks, double strand breaks) – одноцепочечные и двухцепочечные разрывы; WGR (tryptophan-glycine-arginine-rich domain) – домен, названный по ключевым аминокислотным остаткам: Трп (W), Гли (G) и Арг (R); XRCC1 (X-ray repair cross complementing 1) – белок-1 из группы комплементации, фактор репарации; Zn1, Zn2 и Zn3 (zinc fingers 1, 2, 3) – домены цинковых пальцев 1, 2, 3.

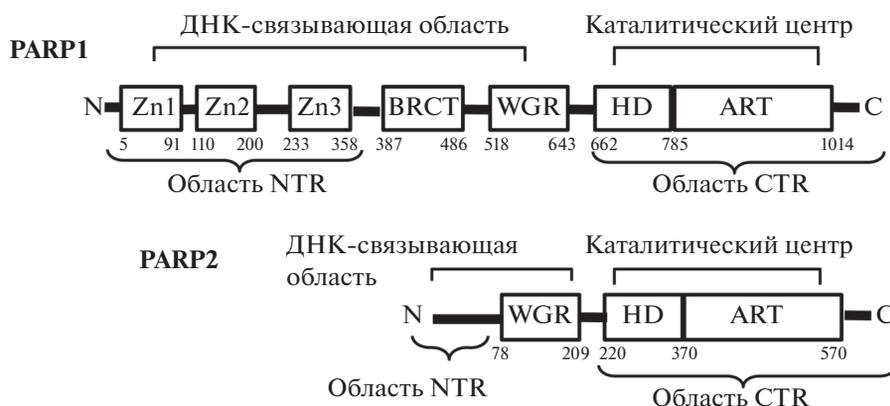


Рис. 1. Доменная структура PARP1 и PARP2. Zn1, Zn2, Zn3 – домены цинковых пальцев; BRCT – домен, родственник С-концевому домену белка репарации BRCA1; WGR – домен, названный по ключевым аминокислотным остаткам: Trp (W), Gly (G) и Arg (R); HD – спиральный домен, регулирующий каталитическую активность; ART – ADP-рибозилтрансферазный каталитический домен; NTR – N-концевая область; CTR – C-концевой участок. Рисунок представляет модифицированную версию из работы [26] (Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CCBY-NC-ND)).

ции, а не полностью дублирует функции PARP1. Кроме того, PARP2 регулирует избыточную ферментативную активность PARP1, которая может приводить к гибели клетки [14]. Об этом косвенно свидетельствует снижение эффективности поли(ADP)рибозилирования (PARилирования) в присутствии обоих ферментов в сравнении с уровнем PARилирования, катализируемым только белком PARP1 [15].

PARP2 обладает также уникальными тканеспецифичными функциями в организме. Например, он играет ключевую роль в сперматогенезе [16]. PARP2 обеспечивает рецептивность эндометрия и имплантацию эмбрионов у мышей, подавляя экспрессию N-кадгерина и способствуя фосфорилированию E-кадгерина в клетках эндометрия [17, 18]. PARP2 регулирует экспрессию SIRT1 (NAD⁺-зависимой деацетилазы), предотвращая таким образом аутофагию [19]. В работе [20] показано, что PARP2 проявляет высокую активность в присутствии рННК *in vitro*, а также при генотоксическом стрессе участвует в синтезе цепей поли(ADP-рибозы) (PAR) в ядрышке – то есть в каскаде сохранения РНК во время клеточного ответа на повреждение ДНК [21, 22].

Белки PARP1 и PARP2 обладают значительной гомологией САТ-участков: они состоят из домена ART и регуляторного спирального домена (HD) (рис. 1). PARP2, как и PARP1, использует NAD⁺ в качестве донора ADP-рибозы для синтеза цепочек PAR, ковалентно присоединяя их к белкам-мишеням (реакция PARилирования) и прежде всего модифицируя себя (авто-PARилирование) [5]. PARP1/2 модифицируют белки преимущественно по остаткам аспартата и глутамата, но под действием фактора HPF1 происходит изменение специфичности PARилирования и более

предпочтительными субстратами становятся остатки серина [23]. Кроме того, PARP2 способен PARилировать ДНК по 5'-концевым фосфатам и тем самым модифицировать геномную ДНК [24]. В результате сравнительного анализа кристаллических структур каталитических доменов показано [25], что акцепторная петля в ART-доме PARP2 несет 6 уникальных остатков, отсутствующих в петле PARP1. Это приводит к увеличению размера петли и повышенной способности PARP2 генерировать разветвленные цепи PAR [5].

Несмотря на то, что функции N-концевых участков (N-terminal regions, NTR) PARP1 и PARP2 заключаются в связывании ДНК, структурное сходство между ними отсутствует. У белка PARP1 N-концевой участок хорошо структурирован и представлен тремя доменами цинковых пальцев (рис. 1). “Цинковые пальцы” обеспечивают связывание PARP1 с одноцепочечными и двухцепочечными разрывами ДНК (SSBs и DSBs соответственно), а также рядом неканонических структур ДНК: квадруплексами, крестообразными формами, шпильками [27–33]. Известно, что удаление N-конца PARP1 снижает эффективность связывания фермента с ДНК более чем в 1000 раз, при этом удаление N-конца PARP2 приводит к падению эффективности связывания с ДНК всего в 4 раза [2]. NTR PARP2 не обладает упорядоченной структурой и его роль в связывании с ДНК остается предметом для обсуждения. N-конец PARP2 несет сигналы ядерной и ядрышковой локализации и определяет транспорт PARP2 в ядро клетки, но не влияет на связывание с повреждениями ДНК [11]. Таким образом, связывание PARP2 с ДНК регулируется его NTR лишь частично.

Репертуар повреждений, которые узнает PARP2, отличается от такового для PARP1. М. Кутузов

Таблица 1. Ключевые аминокислотные остатки WGR-домена PARP1

Аминокислотный остаток PARP1	Функция	Источник
N567	ДНК-зависимая активация катализа	[32]
R589	Связывание ДНК за счет стекинга с рибозой 5'-концевого нуклеотида	[32]
R591	ДНК-зависимая активация катализа за счет формирования контактов с доменами Zn1 и HD	[38]
K633	ДНК-зависимая активация катализа	[32]

(М. Kutuzov) и соавт. [15] изучили спектр субстратов PARP2, среди которых были ДНК, содержащие SSBs, DSBs, а также одноцепочечные участки, выступающие как по концам фрагментов ДНК, так и внутри дуплекса (flaps and overhangs), бреши различной длины (gaps), липкие концы, ДНК разного размера, а также разветвленные ДНК с сочленениями 4 или 3 цепей и ДНК со шпильками. Показано, что PARP2 наиболее эффективно ($K_d < 30$ нМ) связывается с субстратами, содержащими свисающие одноцепочечные фрагменты и разветвленную ДНК. Константа диссоциации взаимодействия PARP2 с SSBs или бреши варьировала от 60 до 110 нМ, а связывание с DSBs было низкоаффинным ($K_d \sim 200$ нМ). Таким образом, PARP2 может связываться с широким спектром ДНК-структур, имитирующих интермедиаты различных стадий репарации ДНК. Кроме того, для PARP2 выявлено взаимодействие с цепями PAR, что можно объяснить схожестью их третичной структуры с одноцепочечными нуклеиновыми кислотами. Так, цепи PAR эффективно индуцировали каталитическую активность PARP2, но не PARP1; причем действие PAR было более интенсивным, чем одноцепочечных ДНК или РНК [34]. Установлено, что делеция домена WGR предотвращает связывание PARP2 с ДНК, из чего следует, что этот домен играет ключевую роль в этом процессе [2].

РОЛЬ ДОМЕНА WGR В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ PARP1

Особый интерес представляет изучение функций WGR-домена PARP1. С применением биофизических и биохимических подходов определена центральная роль домена WGR в аллостерической регуляции PARP1. Она заключается в том, что распознавание повреждений ДНК “цинковыми пальцами” запускает сеть последовательных конформационных преобразований в молекуле PARP1, приводящих к активации CAT [35, 36]. Установлено, что домен WGR взаимодействует с Zn1, Zn3, CAT и ДНК и образует сеть междоменных контактов, которая связывает интерфейс повреждения ДНК с доменом CAT [32] (рис. 2). С помощью масс-спектрометрии в сочетании с

водородно-дейтериевым обменом показано, что остаток R591 домена WGR образует ключевые контакты с Zn1 и HD – доменом, регулирующим активность CAT [37, 38] (табл. 1). Таким образом, остаток R591 PARP1 играет решающую роль в ДНК-зависимой активации, формируя мостик между ДНК-связывающим интерфейсом и CAT.

Кроме ключевой роли WGR домена в активации PARP1 было показано, что он играет важную роль в способности PARP1 перемещаться по ДНК. В экспериментах по лазерному микроблучению живых клеток показано, что PARP1 может перемещаться по хроматину, сканируя повреждения ДНК [39], и очень быстро (менее чем за 10 с) в больших количествах накапливаться в местах повреждения ДНК [40]. PARP1 хорошо связывает DSBs, но при этом обладает существенным сродством к неповрежденной ДНК – миллиардам пар оснований, которые присутствуют в ядре в концентрациях ~ 100 мг/мл [41]. Парадоксальным образом высокая скорость накопления PARP1 в местах повреждений не соответствует скорости повторяющихся циклов случайной ассоциации–диссоциации при перемещении PARP1 за счет диффузии. Это наблюдение дает основание полагать, что PARP1, как и другие ДНК-связывающие белки (например, факторы транскрипции [42]), перемещается по геному, задействуя механизм, который не опирается на нерегулируемую диссоциацию–реассоциацию. В 2018 году группой Каролин Люгер (К. Luger) [41] для перемещения PARP1 по ДНК предложен механизм внутрицепочечного переноса (intrastrand transfer). В соответствии с этой моделью, PARP1 перемещается от одного сайта ДНК к другому, подобно тому, как обезьяны “кочуют” с ветки на ветку за счет переноса центра тяжести с одной конечности на другую, – поэтому этот механизм также называют “Monkey bar”.

Для проверки гипотезы “Monkey bar” использовали олигомеры с DSBs на концах, имитирующие поврежденную ДНК, а также кольцевую плазмидную ДНК, не имеющую повреждений и разрывов. Перемещение PARP1 происходило и на поврежденной, и на интактной ДНК [41]. Таким образом, этот механизм может быть реализо-

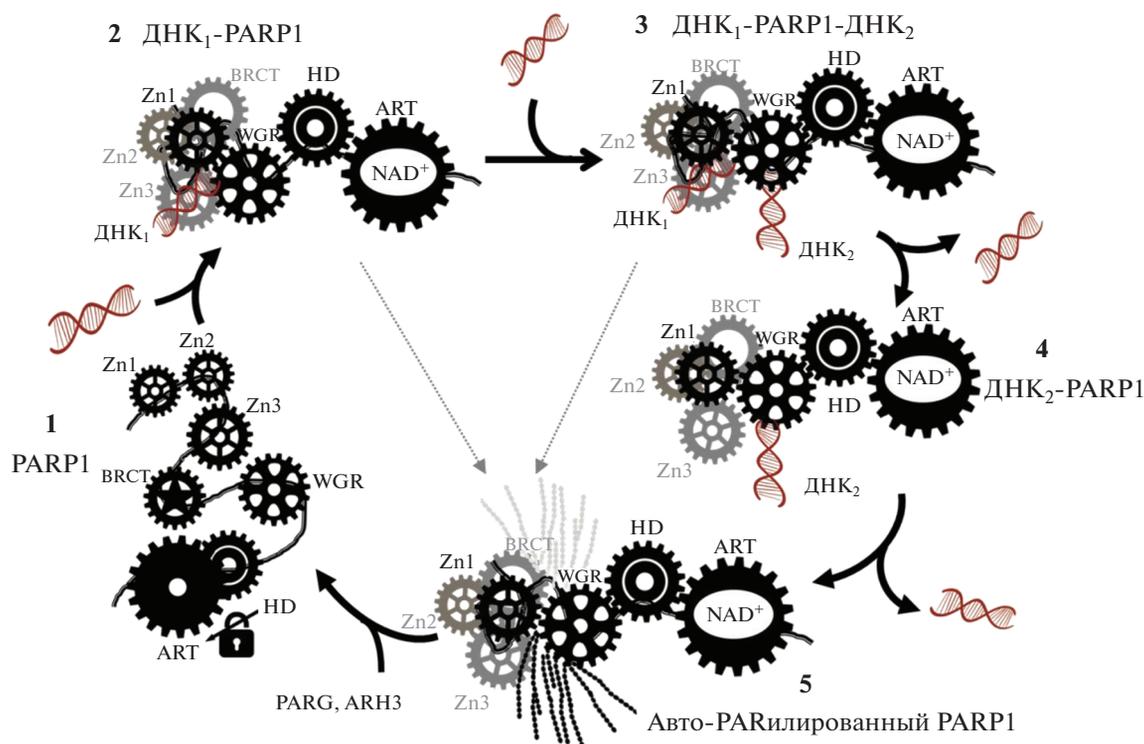


Рис. 2. Функционирование PARP1. 1 – Домены белка PARP1, не связанного с ДНК, разделены линкерными областями и располагаются подобно бусинам на нитке. HD стабилизирует каталитический домен ART в неактивном состоянии. 2 – При обнаружении повреждения ДНК домены Zn1, Zn2 и Zn3 группируются вокруг разрыва ДНК и преимущественно за счет Zn1 образуют междоменные контакты с WGR. WGR в свою очередь взаимодействует с HD, что приводит к дестабилизации конформации последнего и формированию более гибкой и динамичной конформации ART, обеспечивая тем самым доступ NAD^+ к активному центру. Так, домены PARP1, перемещаясь подобно элементам зубчатого механизма, последовательно индуцируют его каталитическую активность. 3 – При появлении конкурентной ДНК домены PARP1 могут диссоциировать от исходного сайта и взаимодействовать с новым (подробнее в тексте). Происходит формирование тройного комплекса PARP1 с двумя сайтами ДНК. 4 – В результате конформационных перестроек может происходить диссоциация PARP1 от исходного сайта и связывание с новым. Так реализуется механизм перемещения PARP1 по ДНК по механизму “Monkey bar”. 5 – В результате поступления NAD^+ в активный центр происходит PARилирование целевых белков и, прежде всего, авто-PARилирование. При авто-PARилировании происходит высвобождение PARP1 от ДНК (за счет электростатического отталкивания отрицательно заряженных полимеров PAR и ДНК) и возвращение к исходной, более релаксированной, структуре.

ван и при перемещении PARP1 по хроматину в поисках дефектов ДНК.

Такой способ перемещения позволяет PARP1 эффективно сканировать геном и быстро связываться с новыми участками ДНК. При обнаружении повреждения сродство PARP1 к ДНК резко увеличивается, фермент останавливается на дефектном участке и запускает процесс репарации. С помощью флуоресцентной анизотропии показано, что в растворе, в котором присутствовали флуоресцентно меченные олигомеры ДНК (ДНК_ф), PARP1 и конкурентная ДНК (ДНК_к), происходит формирование тройного комплекса ДНК_ф-PARP1-ДНК_к и конформационная перестройка PARP1 [43]. Для образования тройного комплекса с одновременно связанными двумя разными молекулами ДНК требуется два отдельных сайта связывания ДНК. В молекуле PARP1 присутствует три домена цинковых пальцев (Zn1,

Zn2, Zn3) и WGR, которые могут вносить вклад в подобное связывание ДНК (рис. 1). С целью определить, участвует ли один или несколько из этих доменов в образовании тройного комплекса, необходимого для эффективного высвобождения ДНК, M. Langelier и др. [32] сконструировали делеционные мутанты PARP1, в которых отсутствовал один из этих доменов. Для всех мутантов измерили скорость ассоциации и диссоциации. Показано, что мутанты с делецией цинковых пальцев ($\Delta Zn1$, $\Delta Zn2$ и $\Delta Zn3$) работали так же, как PARP1 дикого типа, в то время как мутант ΔWGR , терял способность формировать тройной комплекс. Аналогично вел себя мутант PARP1 с точечной мутацией аминокислотного остатка W589 в WGR-домене [32], для которого ранее было показано, что он необходим для связывания с ДНК.

В экспериментах, проведенных J. Rudolph и др. [41] на эмбриональных фибробластах мыши,

сравнивали скорость и эффективность накопления PARP1 дикого типа и мутанта W589A в местах повреждения ДНК. В результате выявлено, что накопление мутанта W589A в местах повреждения ДНК в клетках снижено. В связи с тем, что аффинность связывания домена WGR с ДНК ниже, чем у “цинковых пальцев”, WGR легче диссоциирует от исходного сайта в комплексе с ДНК и присоединяется к другому сайту по механизму “Monkey bar”. Затем происходит перемещение остальной части PARP1 на новый сайт ДНК.

Может ли подобный механизм работать в хроматине, где геномная ДНК имеет плотную нуклеосомную упаковку? В этом отношении особого внимания заслуживают работы, в которых на мутантных формах PARP1, лишенных “цинковых пальцев”, показано, что PARP1 обладает способностью взаимодействовать с хроматином *in vivo* не только за счет взаимодействия с ДНК, а также за счет распознавания конца гистона H4 доменами WGR и CAT [39] и активирования гистоном H2A [44]. Этот фрагмент PARP1 при взаимодействии с H4 проявлял способность к эффективно связыванию и последующему стабильному PARилированию. Эти и другие данные по исследованию распределения мутантов PARP1 с помощью флуоресцентной визуализации на хромосомах позволили авторам предположить, что PARP1 как бы “прогуливается” по геномной неповрежденной ДНК через слабые низкоаффинные взаимодействия, сканируя ее [39].

Недавно J. Rudolph и др. [45], используя криоэлектронную микроскопию, показали, что домен PARP1, содержащий С-концевой мотив белка BRCA1 (BRCT), способен связываться с нуклеосомным кором. Скорость высвобождения флуоресцентно меченного дуплекса из комплекса с мутантной формой PARP1, лишённого домена BRCT (Δ BRCT), значительно меньше зависит от концентрации интактной ДНК, чем в случае PARP1 дикого типа. Кроме того, в клеточной линии, экспрессирующей только мутантный Δ BRCT PARP1, наблюдалась его пониженная подвижность в сайтах повреждений ДНК, индуцированных лазерным излучением. Однако такой эффект не наблюдали (в отличие от W589A PARP1) для клеточной линии, несущей и Δ BRCT PARP1, и PARP1 дикого типа. На основании этих результатов можно сделать вывод о вкладе BRCT-домена, наряду с WGR, в перемещение PARP1 по механизму “Monkey bar” [45].

Механизм, в котором ключевую роль играют домены WGR и CAT, реализуется за счет связывания с концом гистона H4, который экспонирован в особых нуклеосомах, располагающихся в промоторных областях генов [39]. Этот механизм связан с участием PARP1 в транскрипции и не зависит от присутствия цинковых пальцев и связывания с ДНК. Показано, что роль PARP1 в ядер-

ных процессах может быть опосредована способностью PARP1 реорганизовать плотную упаковку нуклеосом и тем самым способствовать функционированию больших белковых комплексов (транскрипционной и репарационной машин в хроматине) [46, 47].

В исследовании, проведенном X. Li и др. [48], показано, что, влияя непосредственно на WGR, можно активировать каталитическую активность PARP1. Так, обнаружено, что антиоксидантное действие салидрозиды (растительного гликозида, используемого в фармакологии и косметологии) *in vitro* и *in vivo* обусловлено связыванием с WGR-доменом PARP1, что приводит к активации CAT.

Таким образом, домен WGR PARP1 играет ключевую роль в активации его ферментативной активности за счет формирования интерфейса с CAT в ходе последовательных конформационных перестроек в PARP1, происходящих при взаимодействии белка с поврежденной ДНК. Кроме того, WGR PARP1 совместно с доменом BRCT участвует в обеспечении перемещения PARP1 по хроматину посредством механизма “Monkey bar”.

РОЛЬ ДОМЕНА WGR В ФУНКЦИОНИРОВАНИИ PARP2

WGR PARP2 играет ключевую роль в связывании белка с ДНК и последующей ДНК-зависимой активации каталитической активности PARP2 [5, 49]. Реализуется сценарий активации PARP2, сходный с аллостерическим механизмом, описанным выше для PARP1 (рис. 3). A. Riccio и др. [50] установили, что, связываясь с ДНК, WGR-домен запускает механизм передачи сигнала домену CAT следующим образом: связывание WGR с ДНК дестабилизирует регуляторный домен HD, тем самым высвобождая домен ART для связывания с NAD^+ и, как следствие, PARилирования белков-мишеней. M. Langelier и др. [2] показали, что в случае мутантов PARP2 по остатку R140 (аналог R591 PARP1 – ключевой аминокислоты в WGR-домене, обеспечивающей интерфейс Zn1 и CAT) исчезала ДНК-зависимая каталитическая активность. Интересно, что подобный аллостерический механизм есть у еще одного представителя этого семейства – PARP3, в молекуле которого ключевую роль играет остаток R103 WGR-домена [2]. В клетке присутствуют две изоформы PARP2. Изоформа-2 отличается отсутствием 13 аминокислотных остатков, начиная с G68. В связи с тем, что разные исследователи работают с различными изоформами PARP2, нумерация ключевых аминокислотных остатков в них может отличаться. Так, R591 PARP1 соответствует R153 изоформы-1 и R140 изоформы-2 PARP2.

Разрешенные рентгеноструктурным анализом структуры комплексов WGR-домена PARP2 с

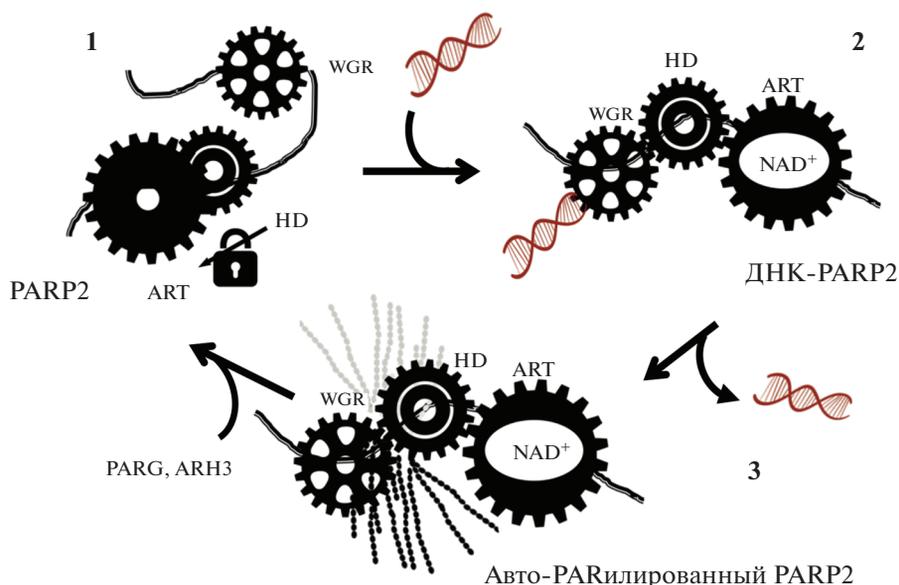


Рис. 3. Функционирование PARP2. 1 – Домены белка PARP2, не связанного с ДНК, разделены линкерными областями и располагаются подобно бусинам на нитке. HD стабилизирует каталитический домен ART в неактивной состоянии. 2 – Связываясь с ДНК, WGR-домен запускает аллостерический механизм передачи активирующего сигнала, аналогичный PARP1. В то же время в отсутствие “цинковых пальцев” перемещение PARP2 по ДНК по механизму “Monkey bar” невозможно. Такое отличие определяет различия в удержании (траппинга) белков PARP1 и PARP2 на хроматине под действием ингибиторов. 3 – При авто-ПАРилировании PARP2, как и в случае PARP1, происходит электростатическое отталкивание отрицательно заряженных полимеров PAR и ДНК, в результате чего происходит высвобождение PARP2 от ДНК и формирование исходной, более релаксированной, структуры PARP2.

различными олигомерами: с ДНК длиной 10 п.н. с тупыми концами, фосфолированными по 5'-концу (2.8 Å); с ДНК длиной 20 п.н. с тупыми концами, фосфолированными по 5'-концу (2.2 Å); с ДНК длиной 10 п.н. с выступающим одноцепочечным концом длиной 5 нуклеотидов – позволили авторам, E. Obaji и др. [51], идентифицировать конкретные аминокислотные остатки WGR-домена, участвующие во взаимодействиях PARP2 с ДНК (2.98 Å) (табл. 2). Так, WGR PARP2 связывается по обеим сторонам от повреждения ДНК: K179, Y132 и K183 контактируют с сахарофосфатным остовом ДНК; W151, благодаря гидрофобному кольцу, вступает в стекинг-взаимодействия с рибозой на 5'-конце ДНК; R153 образует водородные связи с 3'-фосфатной группой $n - 1$ нуклеотида; Q159 образует водородную связь с рибозой $n - 1$ нуклеотида комплементарной цепи. Y201 напрямую взаимодействует с 5'-фосфатом, а замена тирозина на фенилаланин приводила к формированию неактивного PARP2, не обладающего способностью специфически связываться с 5'-фосфолированной ДНК. Таким образом, аминокислотные остатки в домене WGR PARP2 играют ключевую роль во взаимодействии полноразмерного PARP2 с ДНК, а остаток N129 является ключевым элементом в передаче сигнала активации с WGR на CAT; при этом две молекулы PARP2 образуют мостик между двумя олигомерами ДНК [51].

Недавно опубликованы две работы по исследованию структуры комплекса PARP2 с нуклеосомами [52, 53], в формировании которого ключевая роль принадлежит домену WGR. S. Bilokapic и соавт. [53] в закристаллизованном комплексе HPF1–PARP2–нуклеосомы обнаружили, что между двумя нуклеосомами есть мостик, соединяющий свободные концы нуклеосомной ДНК. Этот мостик образован двумя комплексами PARP2–HPF1; причем домены WGR PARP2 связывают разрыв ДНК и тем самым удерживают вместе две нуклеосомы. Описаны ключевые остатки WGR PARP2, среди которых важен остаток R140, располагающийся в сигнальной петле WGR. Мутация этого остатка предотвращала связывание нуклеосом и образование мостиков, что объясняет наблюдаемую *in vivo* быструю диссоциацию мутантного по R140 PARP2 от хроматина [53].

С помощью количественной визуализации живых клеток, подвергнутых микрооблучению, обнаружено, что привлечение и необратимое связывание (траппинг) PARP2 с поврежденной ДНК может происходить двумя способами: PARP1-зависимым (преимущественно) и PARP1-независимым [54]. Первый механизм реализуется посредством распознавания повреждений белком PARP1, его активацией, в результате чего в месте дефекта ДНК происходит активный синтез PAR, который привлекает PARP2. Это было продемон-

Таблица 2. Ключевые аминокислотные остатки WGR-домена PARP2

Аминокислотный остаток PARP2 ^a	Функция	Источник
N127	Образование стабильного комплекса с ДНК; активация катализа при связывании SSBs и DSBs	[51]
N129	ДНК-зависимая активация катализа	[51]
Y132	Взаимодействие с сахарофосфатным остовом ДНК со стороны 5'-конца; влияние на активность в случае DSB	[51]
W151	Стекинг с рибозой на 5'-конце ДНК; образование стабильного комплекса с ДНК	[51]
R153 (R140 в изоформе-2)	Водородные связи с 3'-фосфатной группой нуклеотида $n - 1$; образование стабильного комплекса с ДНК; ДНК-зависимая активация катализа в случае SSB и DSB	[2, 51]
Q159	Водородные связи с нуклеотидом $n - 1$ комплементарной цепи; необходим для активации PARP2 под действием ДНК с тупыми концами	[51]
K179	Взаимодействие с сахарофосфатным остовом ДНК; влияние на активность в случае DSB с или без выступающего конца ДНК	[51]
K183	Взаимодействие с сахарофосфатным остовом ДНК; образование стабильного комплекса с ДНК; влияние на активность в случае DSB с или без выступающего конца ДНК	[51]
Y201	Взаимодействие с концевым 5'-фосфатом или с фосфатом второго нуклеотида с 5'-конца в случае выступающих концов; образование стабильного комплекса с ДНК и активация ДНК-зависимого катализа	[51]

^aНумерация аминокислотных остатков соответствует изоформе-1 PARP2.

стрировано с использованием мутантов PARP2 по R140 в WGR-домене. Несмотря на то, что этот мутант PARP2 терял способность связывать ДНК, он накапливался в местах повреждения ДНК при микрооблучении клеток с активным PARP1. Интересно, что нирапариб почти полностью отменял привлечение мутантного белка PARP2-R140A в PARP1-продуцирующих клетках. Из этого следует, что PAR, синтезированный PARP1, а не сам белок PARP1, привлекает PARP2 к местам повреждения ДНК [54]. Хотя NTR-домен PARP2 может связывать PAR *in vitro* [34], мутанты, лишённые NTR ($\Delta 1-70$ и $\Delta 1-87$), формировали устойчивые кластеры, содержащие множество молекул PARP2 в области повреждения ДНК в клетках, содержащих PARP1. Это предполагает наличие другого механизма, опосредующего PAR-зависимое привлечение PARP2.

PARP2 может также привлекаться к местам повреждений ДНК независимо от каталитической активности PARP1 – за счет прямого ДНК-зависимого связывания. Такой способ продемонстрирован на клетках с дефицитом PARP1 и с применением ингибиторов PARP1/2. В этом случае ингибиторы переклочали связывание PARP2 с хроматином с первого механизма (описанного выше) на второй. При PAR-независимом способе именно WGR-домен PARP2 играет ключевую роль в привлечении PARP2 к местам поврежде-

ния в хроматине [54]. Авторы предполагают, что противоопухолевые препараты нирапариб и талазопариб стерически запирают PARP2 в месте повреждения ДНК через домен WGR за счет механизма, который в значительной степени независим от авто-PARилирования.

При визуализации поведения живых клеток при микрооблучении и FRAP (метод восстановления флуоресценции после обесцвечивания) выявили, что механизм, лежащий в основе захвата PARP2, отличается от PARP1-зависимого. В случае PARP1 ингибиторы формируют стойкие очаги накопления PARP1 и обеспечивают его необратимое связывание в месте повреждения не за счет фиксации PARP1 в сайте связывания, а за счет постоянного обмена молекул PARP1 – из-за ослабленного привлечения комплекса XRCC1-LIG3 (основных ферментов репарации, привлекаемых PAR-зависимым способом к месту действия) [55]. Необратимое связывание PARP1 ведет к отсроченной репарации дефекта ДНК. Ключевым остатком, регулирующим обмен PARP1 в месте повреждений, служит H862 [55], мутации которого приводят к физическому блокированию молекул PARP1 на ДНК. В случае PARP2 ингибиторы меняют способ формирования его кластеров, индуцированных повреждением ДНК, из преимущественно PAR-зависимого к стабильному взаимодействию PARP2 с ДНК через домен WGR.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, WGR-домены белков PARP1 и PARP2 выполняют как схожие функции, так и различные. В частности, их сближает то, что этот домен играет ключевую роль в активации каталитической функции белков, поскольку именно WGR дестабилизирует регуляторный домен HD, что необходимо для проникновения молекулы NAD⁺ в активный центр. Различие в механизмах действия заключается в том, что в случае PARP2 WGR-домен напрямую взаимодействует с ДНК и передает сигнал к активации фермента, а в случае PARP1 WGR-домен играет роль посредника между ДНК-связывающим цинковым пальцем Zn1 и CAT. Кроме того, для PARP1, обладающего высокоаффинными ДНК-связывающими структурами – цинковыми пальцами, – WGR-домен совместно с доменом BRCT служит дополнительной “слабой рукой”, необходимой для перемещения по ДНК с помощью механизма внутрищепочного переноса (“Monkey bar”). Для продвижения таким способом необходимо иметь менее аффинную ДНК-связывающую структуру, которая позволяет свободно ассоциировать–реассоциировать с ДНК и таким образом “нащупывать” новое, отличное от исходного, место ДНК, а затем переносить оставшуюся часть молекулы PARP1 – подобно тому, как обезьяны “кочуют” с ветки на ветку. Видимо, такая специализация WGR-доменов PARP1 и PARP2 влияет на особенности необратимого связывания этих белков под действием ингибиторов и формирования стабильных очагов скопления молекул PARP1 и PARP2 в месте повреждения ДНК.

Понимание молекулярных механизмов действия PARP1 или PARP2 позволит ускорить разработку их селективных ингибиторов, которые получат применение в будущем [56] в лечении онкологических и ряда метаболических заболеваний.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации в рамках Соглашения № 075-15-2021-1354 от 07.10.2021 г.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Amé J.C., Spenlehauer C., de Murcia G. (2004) The PARP superfamily. *BioEssays*. **26**, 882–893.
- Langelier M.F., Riccio A.A., Pascal J.M. (2014) PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1. *Nucleic Acids Res.* **42**, 7762–7775.
- Žaja R., Mikoč A., Barkauskaite E., Ahel I. (2013) Molecular insights into poly(ADP-ribose) recognition and processing. *Biomolecules*. **3**(1), 1–17.
- Kraus W.L. (2020) PARPs and ADP-ribosylation: 60 years on. *Genes Dev.* **34**, 51–53.
- Ali S.O., Khan F.A., Galindo-Campos M.A., Yelamos J. (2016) Understanding specific functions of PARP-2: new lessons for cancer therapy. *Am. J. Cancer Res.* **6**, 1842–1863.
- Dantzer F., Santoro R. (2013) The expanding role of PARPs in the establishment and maintenance of heterochromatin. *FEBS J.* **280**, 3508–3518.
- Sutcu H.H., Matta E., Ishchenko A.A. (2019) Role of PARP-catalyzed ADP-ribosylation in the crosstalk between DNA strand breaks and epigenetic regulation. *J. Mol. Biol.* **432**, 1769–1771.
- Azarm K., Smith S. (2020) Nuclear PARPs and genome integrity. *Genes Dev.* **34**, 285–301.
- Eisemann T., Pascal J.M. (2020) Poly(ADP-ribose) polymerase enzymes and the maintenance of genome integrity. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 19–33.
- Shieh W.M., Ame J.C., Wilson M.V., Wang Z.Q., Koh D.W., Jacobson M.K., Jacobson E.L. (1998) Poly(ADP-ribose) polymerase null mouse cells synthesize ADP-ribose polymers. *J. Biol. Chem.* **273**, 30069–30072.
- Ame J.C., Rolli V., Schreiber V., Niedergang C., Apiou F., Decker P., Muller S., Hoger T., Menissier-de Murcia J., de Murcia G. (1999) PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase. *J. Biol. Chem.* **274**, 17860–17868.
- Navarro J., Gozalbo-Lopez B., Mendez A.C., Dantzer F., Schreiber V., Martinez C., Arana D.M., Farres J., Revilla-Nuin B., Bueno M.F., Ampurdanes C., Galindo-Campos M.A., Knobel P.A., Segura-Bayona S., Martin-Caballero J., Stracker T.H., Aparicio P., Del Val M., Yelamos J. (2017) PARP-1/PARP-2 double deficiency in mouse T cells results in faulty immune responses and T lymphomas. *Sci. Rep.* **7**, 41962.
- Menissier de Murcia J., Ricoul M., Tartier L., Niedergang C., Huber A., Dantzer F., Schreiber V., Ame J.C., Dierich A., LeMeur M., Sabatier L., Chambon P., de Murcia G. (2003) Functional interaction between PARP-1 and PARP-2 in chromosome stability and embryonic development in mouse. *EMBO J.* **22**, 2255–2263.
- Кутузов М.М., Ходырева С.Н., Schreiber V., Лаврик О.И. (2014) Роль PARP2 в репарации ДНК. *Молекуляр. биология*. **48**, 561–572.
- Kutuzov M.M., Khodyreva S.N., Ame J.C., Ilina E.S., Sukhanova M.V., Schreiber V., Lavrik O.I. (2013) Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins. *Biochimie*. **95**, 1208–1215.
- Dantzer F., Mark M., Quenet D., Scherthan H., Huber A., Liebe B., Monaco L., Chicheportiche A., Sassone-Corsi P., de Murcia G., Menissier-de Murcia J. (2006) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 contributes to the fidelity of male meiosis I and spermiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 14854–14859.

17. Soni U.K., Chadchan S.B., Joshi A., Kumar V., Maurya V.K., Verma R.K., Jha R.K. (2020) Poly(ADP-ribose) polymerase-2 is essential for endometrial receptivity and blastocyst implantation, and regulated by caspase-8. *Mol. Cell Endocrinol.* **518**, 110946–11061.
18. Verma R.K., Soni U.K., Chadchan S.B., Maurya V.K., Soni M., Sarkar S., Pratap J.V., Jha R.K. (2022) miR-149-PARP-2 signaling regulates E-cadherin and N-cadherin expression in the murine model of endometrium receptivity. *Reprod. Sci.* **29**, 975–992.
19. Janko L., Sari Z., Kovacs T., Kis G., Szanto M., Antal M., Juhasz G., Bai P. (2020) Silencing of PARP2 blocks autophagic degradation. *Cells.* **9**, 380–401.
20. Leger K., Bar D., Savic N., Santoro R., Hottiger M.O. (2014) ARTD2 activity is stimulated by RNA. *Nucleic Acids Res.* **42**, 5072–5082.
21. Wurtmann E.J., Wolin S.L. (2009) RNA under attack: cellular handling of RNA damage. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **44**, 34–49.
22. Li Z., Wu J., Deleo C.J. (2006) RNA damage and surveillance under oxidative stress. *IUBMB Life.* **58**, 581–588.
23. Bonfiglio J.J., Fontana P., Zhang Q., Colby T., Gibbs-Seymour I., Atanassov I., Bartlett E., Zaja R., Ahel I., Matic I. (2017) Serine ADP-ribosylation depends on HPF1. *Mol. Cell.* **65**, 932–940.e6.
24. Matkarimov B.T., Zharkov D.O., Saparbaev M.K. (2020) Mechanistic insight into the role of poly(ADP-ribose) in DNA topology modulation and response to DNA damage. *Mutagenesis.* **35**, 107–118.
25. van Beek L., McClay E., Patel S., Schimpl M., Spagnolo L., Maia de Oliveira T. (2021) PARP power: a structural perspective on PARP1, PARP2, and PARP3 in DNA damage repair and nucleosome remodelling. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 5112–5135.
26. Rudolph J., Jung K., Luger K. (2022) Inhibitors of PARP: number crunching and structure gazing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **119**, e2121979119.
27. D'Silva I., Pelletier J.D., Lagueux J., D'Amours D., Chaudhry M.A., Weinfeld M., Lees-Miller S.P., Poirier G.G. (1999) Relative affinities of poly(ADP-ribose) polymerase and DNA-dependent protein kinase for DNA strand interruptions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1430**, 119–126.
28. Pion E., Bombarda E., Stiegler P., Ullmann G.M., Mély Y., de Murcia G., Gérard D. (2003) Poly(ADP-ribose) polymerase-1 dimerizes at a 5' recessed DNA end *in vitro*: a fluorescence study. *Biochemistry.* **42**, 12409–12417.
29. Lonskaya I., Potaman V.N., Shlyakhtenko L.S., Ousatcheva E.A., Lyubchenko Y.L., Soldatenkov V.A. (2005) Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding. *J. Biol. Chem.* **280**, 17076–17083.
30. Eustermann S., Videler H., Yang J.C., Cole P.T., Gruszka D., Veprintsev D., Neuhaus D. (2011) The DNA-binding domain of human PARP-1 interacts with DNA single-strand breaks as a monomer through its second zinc finger. *J. Mol. Biol.* **407**, 149–170.
31. Langelier M.F., Planck J.L., Roy S., Pascal J.M. (2011) Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity. *J. Biol. Chem.* **286**, 10690–10701.
32. Langelier M.F., Planck J.L., Roy S., Pascal J.M. (2012) Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribose)ylation by human PARP-1. *Science.* **336**, 728–732.
33. Singatulina A.S., Hamon L., Sukhanova M.V., Desforges B., Joshi V., Bouhss A., Lavrik O.I., Pastre D. (2019) PARP-1 activation directs FUS to DNA damage sites to form PARP-reversible compartments enriched in damaged DNA. *Cell Rep.* **27**, 1809–1821.e5.
34. Chen Q., Kassab M.A., Dantzer F., Yu X. (2018) PARP2 mediates branched poly ADP-ribosylation in response to DNA damage. *Nat. Commun.* **9**, 3233–3246.
35. Steffen J.D., McCauley M.M., Pascal J.M. (2016) Fluorescent sensors of PARP-1 structural dynamics and allosteric regulation in response to DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **44**, 9771–9783.
36. Langelier M.F., Pascal J.M. (2013) PARP-1 mechanism for coupling DNA damage detection to poly(ADP-ribose) synthesis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **23**, 134–143.
37. Steffen J.D., Tholey R.M., Langelier M.F., Planck J.L., Schiewer M.J., Lal S., Bildzukewicz N.A., Yeo C.J., Knudsen K.E., Brody J.R., Pascal J.M. (2014) Targeting PARP-1 allosteric regulation offers therapeutic potential against cancer. *Cancer Res.* **74**, 31–37.
38. Dawicki-McKenna J.M., Langelier M.F., DeNizio J.E., Riccio A.A., Cao C.D., Karch K.R., McCauley M., Steffen J.D., Black B.E., Pascal J.M. (2015) PARP-1 activation requires local unfolding of an autoinhibitory domain. *Mol. Cell.* **60**, 755–768.
39. Thomas C., Ji Y., Wu C., Datz H., Boyle C., MacLeod B., Patel S., Ampofo M., Currie M., Harbin J., Pechenkina K., Lodhi N., Johnson S.J., Tulin A.V. (2019) Hit and run versus long-term activation of PARP-1 by its different domains fine-tunes nuclear processes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **116**, 9941–9946.
40. Mortusewicz O., Ame J.C., Schreiber V., Leonhardt H. (2007) Feedback-regulated poly(ADP-ribose)ylation by PARP-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells. *Nucleic Acids Res.* **35**, 7665–7675.
41. Rudolph J., Mahadevan J., Dyer P., Luger K. (2018) Poly(ADP-ribose) polymerase 1 searches DNA via a 'monkey bar' mechanism. *Elife.* **7**, e37818–e37841.
42. Mirny L., Slutsky M., Wunderlich Z., Tafvizi A., Leith J., Kosmrlj A. (2009) How a protein searches for its site on DNA: the mechanism of facilitated diffusion. *J. Phys. A: Math. Theor.* **42**, 434013–434023.
43. Rudolph J., Mahadevan J., Luger K. (2020) Probing the conformational changes associated with DNA binding to PARP1. *Biochemistry.* **59**, 2003–2011.
44. Kotova E., Lodhi N., Jarnik M., Pinnola A.D., Ji Y., Tulin A.V. (2011) *Drosophila* histone H2A variant (H2Av) controls poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) activation in chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **108**, 6205–6210.
45. Rudolph J., Muthurajan U.M., Palacio M., Mahadevan J., Roberts G., Erbse A.H., Dyer P.N., Luger K. (2021) The BRCT domain of PARP1 binds intact DNA and mediates intrastrand transfer. *Mol. Cell.* **81**, 4994–5006 e5.

46. Kotova E.Y., Hsieh F.K., Chang H.W., Maluchenko N.V., Langelier M.F., Pascal J.M., Luse D.S., Feofanov A.V., Studitsky V.M. (2022) Human PARP1 facilitates transcription through a nucleosome and histone displacement by Pol II *in vitro*. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 7107–7122.
47. Maluchenko N.V., Nilov D.K., Pushkarev S.V., Kotova E.Y., Gerasimova N.S., Kirpichnikov M.P., Langelier M.F., Pascal J.M., Akhtar M.S., Feofanov A.V., Studitsky V.M. (2021) Mechanisms of nucleosome reorganization by PARP1. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 12127–12144.
48. Li X., Erden O., Li L., Ye Q., Wilson A., Du W. (2014) Binding to WGR domain by salidroside activates PARP1 and protects hematopoietic stem cells from oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 1853–1865.
49. Obaji E., Haikarainen T., Lehtio L. (2016) Characterization of the DNA dependent activation of human ARTD2/PARP2. *Sci. Rep.* **6**, 34487–34500.
50. Riccio A.A., Cingolani G., Pascal J.M. (2016) PARP-2 domain requirements for DNA damage-dependent activation and localization to sites of DNA damage. *Nucleic Acids Res.* **44**, 1691–1702.
51. Obaji E., Haikarainen T., Lehtio L. (2018) Structural basis for DNA break recognition by ARTD2/PARP2. *Nucleic Acids Res.* **46**, 12154–12165.
52. Gaullier G., Roberts G., Muthurajan U.M., Bowerman S., Rudolph J., Mahadevan J., Jha A., Rae P.S., Luger K. (2020) Bridging of nucleosome-proximal DNA double-strand breaks by PARP2 enhances its interaction with HPF1. *PLoS One.* **15**, e0240932–e0240961.
53. Bilokapic S., Suskiewicz M.J., Ahel I., Halic M. (2020) Bridging of DNA breaks activates PARP2-HPF1 to modify chromatin. *Nature.* **585**, 609–613.
54. Lin X., Jiang W., Rudolph J., Lee B.J., Luger K., Zha S. (2022) PARP inhibitors trap PARP2 and alter the mode of recruitment of PARP2 at DNA damage sites. *Nucleic Acids Res.* **50**, 3958–3973.
55. Shao Z., Lee B.J., Rouleau-Turcotte E., Langelier M.F., Lin X., Estes V.M., Pascal J.M., Zha S. (2020) Clinical PARP inhibitors do not abrogate PARP1 exchange at DNA damage sites *in vivo*. *Nucleic Acids Res.* **48**, 9694–9709.
56. Galindo-Campos M.A., Lutfi N., Bonnin S., Martinez C., Velasco-Hernandez T., Garcia-Hernandez V., Martin-Caballero J., Ampurdanes C., Gimeno R., Colomo L., Roue G., Guilbaud G., Dantzer F., Navarro P., Murga M., Fernandez-Capetillo O., Bigas A., Menendez P., Sale J.E., Yelamos J. (2022) Distinct roles for PARP-1 and PARP-2 in c-Myc-driven B-cell lymphoma in mice. *Blood.* **139**, 228–239.

The Role of the WGR Domain in the Functions of PARP1 and PARP2

N. V. Maluchenko^{1, *, **}, A. N. Korovina¹, A. A. Saulina¹, V. M. Studitsky^{1, 2}, and A. V. Feofanov^{1, 3}

¹*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119234 Russia*

²*Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA 19111-2497 USA*

³*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

**e-mail: mal_nat@mail.ru*

***e-mail: malyuchenkov@my.msu.ru*

PARP1 and PARP2 proteins are members of the poly(ADP-ribose) polymerase family involved in the regulation of DNA repair and replication, RNA processing, ribosome biogenesis, transcription, and cell division and death. PARP1 and PARP2 are promising targets for the development of anticancer and can be used in treatment of cardiovascular and neurodegenerative diseases, as well as other disorders. WGR domain was shown to play a central role in functioning of PARP1 and PARP2 proteins. This review considers the mechanisms of functioning of WGR domains in PARP1 and PARP2 proteins, which have a number of similar and specialized properties. Understanding these processes is of great interest for fundamental science and will contribute to the development of more effective and selective inhibitors of PARP1 and PARP2.

Keywords: PARP1, PARP2, WGR, PARP1 inhibitors, PARP2 inhibitors