

Положение повреждения ДНК в составе нуклеосом влияет на HPF1-зависимую модификацию гистонов ферментами PARP1 и PARP2

Кургина Т.*, Моор Н., Кутузов М., Лаврик О.

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

* t.a.kurgina@gmail.com

Ключевые слова: репарация ДНК; PAR-илирование; PARP1; PARP2; HPF1; гистоны

Мотивация и цель: Поли(ADP-рибозил)ирование (PAR-илирование) представляет собой посттрансляционную модификацию белков, которую осуществляют ферменты, известные как поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARP). PAR-илирование играет ключевую роль в регуляции различных клеточных процессов, включая репарацию ДНК, организацию структуры хроматина, экспрессию генов, репликацию ДНК, процессинг РНК и биогенез рибосом [1]. Основные ферменты, катализирующие PAR-илирование в ядре и синтез протяженного полимера поли(ADP-рибозы) (PAR), – два ДНК-зависимых фермента семейства PARP: PARP1 и PARP2 [2]. Функции этих ферментов в регуляции репарации ДНК существенно пересекаются, оба они участвуют в эксцизионной репарации оснований (BER) и взаимодействуют с ключевыми компонентами этого процесса, такими как ДНК-полимераза- β , XRCC1 и APE1 [3]. Ферменты PARP1 и PARP2 взаимодействуют с молекулами ДНК, имитирующими интермедиаты коротко- и длиннозаплаточного путей BER, что было показано с использованием синтетических ДНК-дуплексов, содержащих повреждения, и нуклеосом [4]. Здесь мы показали различия во взаимодействии ферментов PARP1 и PARP2 с повреждениями ДНК – интермедиатами BER на модельных нуклеосомах, а также влияния положения повреждения на модификацию гистонов данными ферментами.

Методы и алгоритмы: Электрофорез в ПААГ по методу Леммли, флуоресцентная спектрофотометрия.

Результаты: Несмотря на обширные исследования аффинности PARP1 и PARP2 к различным формам ДНК повреждений, включая однонуклеотидные бреши в контексте нуклеосомных коровых частиц (nucleosome core particle, NCP), детального рассмотрения взаимодействия этих ферментов с порождениями ДНК, в зависимости от их удаленности от 5'-конца ДНК, не проводилось. В данном исследовании для оценки величин EC_{50} , отражающих аффинность PARP1 и PARP2 к различным активаторам ДНК, было использовано измерение анизотропии флуоресценции. Мы показали, что приближение бреши к 5'-концу ДНК приводило к увеличению значений EC_{50} для PARP1, но не для PARP2. Снижение аффинности может быть связано с конкуренцией молекул PARP1 за связывание с двумя близкорасположенными повреждениями: тупым концом ДНК и однонуклеотидной брешью. В то же время PARP2 специфически взаимодействует с брешью с высокой аффинностью, и данное повреждение является единственным сайтом специфического взаимодействия PARP2 с NCP.

Дополнительно было проанализировано количество и распределение PAR, синтезированного PARP1 и PARP2 в присутствии фактора PAR-илирования гистонов HPF1. Мы показали, что модификация гистонов зависит скорее от положения бреши относительно гистонового ядра, нежели от удаленности бреши от 5'-конца ДНК.

Выводы: Присутствие бреши в структуре ДНК в нуклеосоме влияет на HPF1-зависимое PAR-илирование гистонов. Сродство PARP1 к однонуклеотидной бреши в ДНК зависит от удаленности бреши от 5'-конца ДНК.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РФФ № 22-74-10059.

DNA damage position in the nucleosomes affects the HPF1-dependent modification of histones by PARP1 and PARP2

Kurgina T.*, Moor N., Kutuzov M., Lavrik O.

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

* *t.a.kurgina@gmail.com*

Key words: DNA repair; PARylation; PARP 1; PARP2; HPF1; histones

Motivation and Aim: Poly(ADP-ribosyl)ation (PARylation) is a post-translational protein modification catalyzed by enzymes known as poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs). PARylation plays a pivotal role in regulating various cellular processes, including DNA repair, chromatin structure organization, gene expression, DNA replication, RNA processing, and ribosome biogenesis [1]. The primary enzymes catalyzing PARylation in the nucleus and synthesis of the elongated poly(ADP-ribose) polymer (PAR) are two DNA-dependent enzymes of the PARP family: PARP1 and PARP2 [2]. The functions of these enzymes in DNA repair regulation significantly overlap, as both participate in base excision repair (BER) and interact with key components of this process, such as DNA polymerase β , XRCC1, and APE1 [3]. PARP1 and PARP2 interact with DNA molecules mimicking intermediates of short- and long-patch BER pathways, as demonstrated using synthetic DNA duplexes containing lesions and nucleosomes [4]. Here, we elucidated differences in the interaction of PARP1 and PARP2 enzymes with DNA lesions – BER intermediates on model nucleosomes, as well as the influence of lesion position on histone modification by these enzymes.

Methods and Algorithms: Polyacrylamide gel electrophoresis, fluorescence spectrophotometry.

Results: Despite extensive studies on the affinity of PARP1 and PARP2 for various forms of DNA damage, including single-nucleotide gaps in the context of nucleosome core particles (NCPs), a detailed examination of the interaction of these enzymes with DNA lesions, depending on their distance from the 5'-end of DNA, has not been conducted. In this study, anisotropy fluorescence measurements were used to evaluate EC50 values reflecting the affinity of PARP1 and PARP2 for various DNA activators. We demonstrated that approaching the gap to the 5'-end of DNA led to increased EC50 values for PARP1, but not for PARP2. The decrease in affinity may be associated with the competition of PARP1 molecules for binding to two closely spaced lesions: the blunt end of DNA and a single-nucleotide gap. Meanwhile, PARP2 specifically interacts with

the gap with high affinity, and this damage is the sole site of specific interaction of PARP2 with NCP. Additionally, the amount and distribution of PAR synthesized by PARP1 and PARP2 in the presence of the histone PARylation factor HPF1 were analyzed. We showed that histone modification likely depends more on the position of the gap relative to the histone core than on the distance of the gap from the 5'-end of DNA.

Conclusion: The presence of a gap in the DNA structure within the nucleosome affects HPF1-dependent PARylation of histones. The affinity of PARP1 for a single-nucleotide gap in DNA depends on the distance of the gap from the 5'-end of DNA.

Funding: The study is supported by the grant from RFFS No. 22-74-10059.

Список литературы/References

1. Kraus W.L. PARPs and ADP-ribosylation: 60 years on. *Genes Dev.* 2020;34:251-253
2. Wei H., Yu X. Functions of PARylation in DNA damage repair pathways. *Genomics Proteomics Bioinf.* 2016;14:131-139
3. Vasil'eva I.A. et al. Dynamic light scattering study of base excision DNA repair proteins and their complexes. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom.* 2019;1867(3):297-305
4. Kutuzov M.M. et al. The contribution of PARP1, PARP2 and poly(ADP-ribosyl)ation to base excision repair in the nucleosomal context. *Sci Rep.* 2021;11:4849