

Апуриновая/апириимидиновая эндонуклеаза 1 и тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1 препятствуют накоплению необратимых ДНК-белковых комплексов

Речкунова Н.*, Лебедева Н., Ендуткин А., Дырхеева Н., Лаврик О.

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

* nadyarec@niboch.nsc.ru

Ключевые слова: ДНК-белковые сшивки; апуриновые/апириимидиновые сайты; апуриновая/апириимидиновая эндонуклеаза 1; тирозил-ДНК-фосфодиэстераза 1; репарация ДНК

Мотивация и цель: ДНК-белковые сшивки (DPC) – распространенные повреждения ДНК, вызываемые различными внутриклеточными и внешними факторами. Такие повреждения очень токсичны, поскольку из-за большого размера блокируют процессы, протекающие в хроматине, и не способны удаляться каноническими системами репарации ДНК [1]. Один из главных источников таких повреждений – апуриновые/апириимидиновые (AP) сайты, образующие сшивки с белками. Целью работы было исследование роли ферментов, осуществляющих процессинг AP-сайтов – апуриновой/апириимидиновой эндонуклеазы 1 (APE1) и тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы 1 (TDP1) – в предотвращение или удаление ДНК-белковых аддуктов, формируемых в отсутствие восстанавливающих агентов. Такие аддукты считаются суицидальными, поскольку могут образовываться в клетке и стабильны без дополнительной обработки.

Методы и алгоритмы: В работе использовали очищенные рекомбинантные белки, а также экстракты клеток, полученных из линий НЕК293FT дикого типа и нокаутных по генам (APE1^{-/-}) или TDP1 (TDP1^{-/-}). AP-сайт в составе ДНК генерировали путем обработки ДНК-дуплекса, содержащего урацил или 8-охогуанин, соответствующей ДНК-гликозилазой (UDG или OGG1). Формирование сшивок белков с радиоактивно меченными AP-сайт-содержащими ДНК-дуплексами анализировали электрофорезом в ПАА геле без предварительной обработки проб NaBH₄ с последующей радиоавтографией.

Результаты: Ранее было показано, что белки-участники процесса эксцизионной репарации оснований (BER) – ДНК-гликозилаза OGG1, поли(ADP-рибоза) полимеразы 1 (PARP1) и 2 (PARP2), а также белок-платформа XRCC1 – взаимодействуют с AP-сайтом с образованием основания Шиффа, после восстановления которого с помощью NaBH₄ формируются стабильные ковалентные аддукты [2]. Кроме того, было показано, что PARP1 образует стабильный ковалентный комплекс с ДНК, содержащей AP-сайт (AP-ДНК), без восстановления NaBH₄ [3]. Мы исследовали, является ли образование стабильной ДНК-белковой сшивки (DPC) в отсутствие NaBH₄ уникальной особенностью PARP1, или другие белки, взаимодействующие с AP-сайтом, также способны образовывать такие аддукты [4]. Проведенный анализ показал, что не только PARP1, но и OGG1, PARP2 и XRCC1 образуют стабильные сшивки с AP-ДНК без восстановления NaBH₄.

Ключевой фермент BER, расщепляющий AP-сайты, – APE1. Расщепление AP-сайта также может катализировать TDP1, хотя и с меньшей эффективностью, чем APE1 [5]. Мы показали, что гидролиз AP-сайта с помощью APE1 предотвращает

образование DPC, тогда как TDP1 способен расщеплять DPC, удаляя из ковалентного комплекса с ДНК некоторые белки, в частности OGG1 и PARP2. В то же время TDP1 не способен расщеплять DPC, образованные высокомолекулярными белками, в том числе PARP1, а также XRCC1, который незначительно превышает по молекулярной массе TDP1, но имеет неглобулярную структуру. Мы предполагаем, что TDP1 удаляет белки, присоединенные к ДНК путем ковалентной сшивки с 3'-фосфо- α,β -ненасыщенным альдегидом, образующимся в результате расщепления AP-сайта под действием AP-лиазной активности OGG1 или других белков, по тому же механизму, что и другие аддукты с 3'-фосфатной группы ДНК [5].

Мы также исследовали влияние APE1 и TDP1 на эффективность образования DPC в экстрактах клеток APE1^{-/-} или TDP1^{-/-}. Наши данные показывают, что нокаут гена, кодирующего APE1, приводит к повышению уровня сшивок PARP1-ДНК в клеточном экстракте, тогда как дефицит TDP1 мало влияет на образование DPC.

Выводы: Таким образом, мы продемонстрировали, что APE1 играет решающую роль в предотвращении образования DPC в клеточных экстрактах. Напротив, TDP1 удаляет некоторые белковые аддукты с ДНК, используя тот же механизм, что и для удаления других групп, связанных с 3'-фосфатом ДНК, но не способен предотвращать их образование из-за низкой эффективности расщепления AP-сайта по сравнению с APE1. Поскольку активность APE1 остается высокой в клетках TDP1^{-/-}, уровни DPC в экстрактах из мутантных клеток и клеток дикого типа были очень похожи и ниже, чем в экстракте клеток APE1^{-/-}.

Финансирование: Исследование поддержано Российским научным фондом (№ 21-64-00017).

Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 prevent suicidal covalent DNA-protein crosslinks

Rechkunova N.*, Lebedeva N., Endutkin A., Dyrkheeva N., Lavrik O.

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

* nadyarec@niboch.nsc.ru

Key words: DNA-protein crosslinks; apurinic/apyrimidinic site; apurinic/apyrimidinic endonuclease 1; tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1; DNA repair

Motivation and Aim: DNA-protein crosslinks (DPC) are common DNA lesions induced by various external and endogenous agents. Such lesions are highly toxic due to the bulk, resulting in virtual blocking of chromatin-based processes and their inability to be repaired by canonical repair pathways [1]. Apurinic/apyrimidinic sites (AP sites) and proteins interacting with them are one of the main sources of DPC. The aim of the work was to investigate the role of AP site processing enzymes, apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) and tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1), in preventing or removing DNA-protein adducts formed in the absence of reducing agents. Such DNA-protein crosslinks can arise in cells where there are no additional reducing agents.

Methods and Algorithms: Purified recombinant proteins, as well as extracts of cells obtained from wild-type HEK293FT and APE1 or TDP1 knockout lines (APE1^{-/-} or TDP1^{-/-}) were used. The AP site in DNA was generated by treating a DNA duplex containing uracil or 8-oxoguanine with the appropriate DNA glycosylase (UDG or

OGG1). The formation of protein crosslinks with radioactively labeled AP site-containing DNA duplexes was analyzed by electrophoresis in a PAA gel without treatment of the samples with NaBH₄, followed by autoradiography.

Results: It was previously shown that proteins involved in the base excision repair (BER) process – DNA glycosylase OGG1, poly(ADP-ribose) polymerases 1 (PARP1) and 2 (PARP2), as well as the scaffold protein XRCC1 – interact with the AP site with the formation of a Schiff base, after reduction of which with NaBH₄ stable covalent adducts are formed [2]. In addition, PARP1 has been shown to form a stable covalent complex with DNA containing an AP site (AP-DNA) without NaBH₄ reduction [3]. We investigated whether the formation of a stable DNA-protein crosslinks (DPC) in the absence of NaBH₄ is a unique feature of PARP1 or whether other AP site-interacting proteins are also capable to form such adducts [4]. The analysis showed that not only PARP1, but also OGG1, PARP2 and XRCC1 form stable crosslinks with AP-DNA without NaBH₄ reduction.

The key BER enzyme that cleaves AP sites is APE1. AP site cleavage can also be catalyzed by TDP1, although with less efficiency than APE1 [5]. We have shown that hydrolysis of the AP site by APE1 prevents the formation of DPC, while TDP1 is able to resolve DPC, removing some proteins, in particular OGG1 and PARP2, from the covalent complex with DNA. At the same time, TDP1 is not able to cleave DPCs formed by high molecular weight proteins, including PARP1, as well as XRCC1, which slightly exceeds the molecular weight of TDP1, but has a non-globular structure. We propose that TDP1 removes proteins attached to DNA by covalent crosslinking with a 3'-phospho- α,β -unsaturated aldehyde resulting from AP site cleavage by the AP lyase activity of OGG1 or other proteins by the same mechanism as other adducts with the 3'-phosphate group of DNA [5].

We also examined the effect of APE1 and TDP1 on the efficiency of DPC formation in extracts of APE1^{-/-} or TDP1^{-/-} cells. Our data show that knockout of the gene encoding APE1 leads to increased level of PARP1-DNA crosslinks in the cell extract, whereas TDP1 deficiency has little effect on DPC formation.

Conclusion: In summary, we demonstrated that APE1 plays a critical role in preventing DPC formation in cell extracts. In contrast, TDP1 resolves some protein adducts with DNA using the same mechanism as for the removal of other groups bound to the DNA 3'-phosphate, but is unable to prevent their formation due to low AP site cleavage efficiency compared to APE1. Because APE1 activity remains high in TDP1^{-/-} cells, DPC levels in extracts from mutant and wild-type cells were very similar and lower than in extract from APE1^{-/-} cells.

Funding: The study is supported by the Russian Science Foundation (No. 21-64-00017).

Список литературы/References

1. Weickert P., Stingle J. DNA-Protein Crosslinks and Their Resolution. *Annu Rev Biochem.* 2022;91:157-181
2. Khodyreva S., Lavrik O. Non-canonical interaction of DNA repair proteins with intact and cleaved AP sites. *DNA Repair.* 2020;90:102847
3. Prasad R. et al. Suicidal cross-linking of PARP-1 to AP site intermediates in cells undergoing base excision repair. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:6337-6351
4. Lebedeva N.A. et al. Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease 1 and Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 Prevent Suicidal Covalent DNA-Protein Crosslink at Apurinic/Apyrimidinic Site. *Front Cell Dev Biol.* 2021;8:617301
5. Interthal H. et al. Human TDP1 cleaves a broad spectrum of substrates, including phosphoamide linkages. *J Biol Chem.* 2005;280:36518-36528