

HPF1 регулирует поли(ADP-рибозил)ирование РНК-связывающего белка FUS и влияет на образование поли(ADP-рибоза)-содержащих компартментов

Сингатулина А.*, Суханова М., Лаврик О.

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

* nastsing@yandex.ru

Ключевые слова: репарация ДНК; поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 и 2 (PARP1/2); фактор поли(ADP-рибозил)ирования гистонов 1 (HPF1)

Мотивация и цель: В настоящее время многие РНК-связывающие белки рассматриваются как участники поддержания стабильности генома, поскольку способны напрямую участвовать в репарации ДНК и могут локализоваться вблизи сайтов повреждений ДНК за счет их взаимодействия с поли(ADP-рибозой) [1]. Поли(ADP-рибоза) (PAR) – это отрицательно заряженный разветвленный полимер, состоящий из мономеров ADP-рибозы. Синтез PAR из NAD⁺ катализируют ферменты поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARPs), которые активируются при взаимодействии с поврежденной ДНК [2]. Ядерные ферменты PARP1 и PARP2 катализируют автополи(ADP-рибозил)ирование (авто-PAR-илирование), а также PAR-илирование других белков-мишеней. Недавно был открыт фактор PAR-илирования гистонов 1, белок HPF1, который способен образовывать временный совместный активный центр с PARP1(2), изменять специфичность реакции PAR-илирования и регулировать уровень синтеза PAR. В данной работе мы исследовали влияние HPF1 на активность PARP1(2) и формирование компартментов с участием PAR-илированной PARP1(2) и РНК-связывающего белка FUS (FUS/TLS, Fused in Sarcoma). FUS-зависимое образование компартментов представляет большой интерес для исследования, поскольку FUS взаимодействует с PAR, а также способен локализоваться в сайтах повреждения ДНК, и этот процесс зависит от активности PARPs и синтеза PAR [3]. Кроме того, ранее методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) нами было показано, что FUS и PAR-илированный PARP1 образуют сложные надмолекулярные структуры (компартменты), в которых концентрируется поврежденная ДНК [4].

Методы и алгоритмы: АСМ: в образцы добавляли путресцин до конечной концентрации 5 мМ и магний (5 мМ) и наносили на поверхность свежесколотой слюды и инкубировали в течение 1 минуты. Поверхность слюды промывали 0.02 % раствором уранилацетата с последующей промывкой водой и высушивали на воздухе. АСМ-исследования проводили в полуконтактном режиме на микроскопе Nanoscope V Multimode 8 на воздухе с использованием кантиливера Scanasyt-Air. Электрофореграмма PAR-илированных белков по Леммли: анализ PAR-илирования белков проводили методом денатурирующего геле-электрофореза. Гели визуализировали с помощью сканера Typhoon FLA 9500 или окрашиванием коллоидным Гимасси G250.

Результаты: Важную роль в формировании компартментов играет взаимодействие FUS с PAR [4], поэтому структура PAR, ее длина и уровень синтеза могут оказывать существенное влияние на этот процесс. HPF1 регулирует активность PARP1(2), оказывая влияние на уровень автомодификации этих белков и длину синтезируемой PAR. С помощью биохимических методов мы показали, что с увеличением концентрации HPF1 уменьшается размер синтезируемого PAR в реакции автомодификации PARP1(2). Для анализа размера и количества компартментов, образующихся с участием FUS после PAR-илирования PARP1(2) в отсутствие или в присутствии различных концентраций HPF1, мы провели серию экспериментов с использованием ACM. Мы обнаружили, что во время автомодификации PARP1 и PARP2 в присутствии HPF1 размер PAR-илированного белка уменьшается. Кроме того, FUS способен образовывать компартменты с участием PAR-илированного PARP2.). С помощью ACM мы также наблюдали, что увеличение концентрации HPF1 приводило к уменьшению размеров компартментов, образующихся при взаимодействии FUS с PAR-илированным PARP1(2), но при этом количество компартментов оставалось на прежнем уровне (рис. 1).

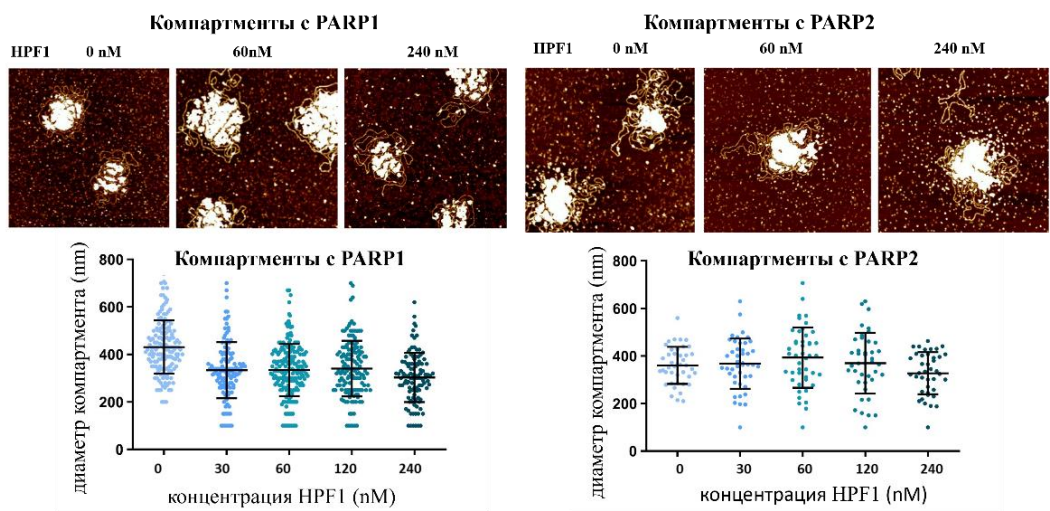


Рис. 1. Визуализация компартментов, сформированных с участием FUS после авто-PAR-илирования PARP1(2) в присутствии различной концентрации HPF1 (верхние панели: ACM-изображения компартментов). Анализ размеров компартментов методом ACM (нижние графики)

Ранее было показано, что FUS не только способен взаимодействовать с PAR, но и является мишенью в реакции PAR-илирования, катализируемой PARP1. Согласно литературным данным, в присутствии HPF1 специфичность действия PARP1(2) изменяется, и вместо аминокислотных остатков аспартата и глутамата, как это происходит в отсутствие HPF1, основными сайтами модификации становятся остатки серина. Поэтому возможно, что присутствие HPF1 может оказывать влияние на PAR-илирование FUS за счет активности PARP1(2).

Далее была проведена серия экспериментов по изучению влияния HPF1 на PAR-илирование FUS (WT) и его фосфомиметика (FUS 12E), содержащего замены остатков серина/треонина на глутамин, или мутантных форм, содержащих делецию N-концевого (FUS ΔLCD) или двух С-концевых (FUS ΔRGG1-2) доменов (рис. 2). Было показано, что в присутствии HPF1 происходит значительная стимуляция PAR-илирования FUS и его мутантов за счет активности PARP1 и PARP2. Важно отметить, что HPF1 оказывал более сильный стимулирующий эффект на уровень PAR-илирования FUS белком PARP2. Изучение PAR-илирования FUS в присутствии HPF1 важно, поскольку FUS является неотъемлемым компонентом PAR-содержащих компартментов и принимает непосредственное участие в их формировании.

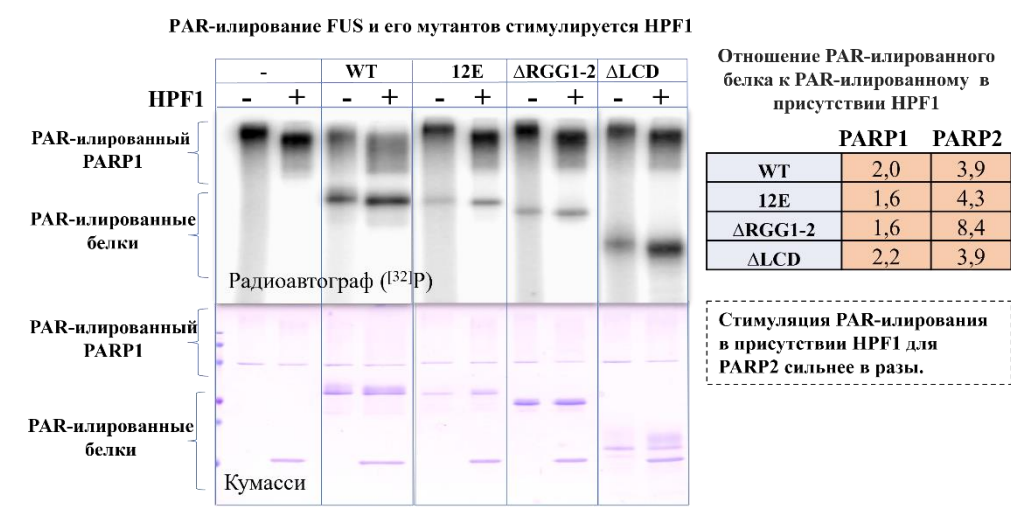


Рис. 2. HPF1 значительно увеличивает уровень PAR-илирования белка FUS (WT) и его мутантов. PAR-илирование белка FUS и его мутантов (12E, ΔLCD ΔRGG1-2) ферментами PARP1 и PARP2 в присутствии HPF1 анализировали с использованием радиоактивно меченного NAD⁺ по уровню включения [³²P]-меченной ADP

Выводы: Таким образом, HPF1 оказывает ингибирующее действие на уровень авто-PAR-илирования PARP1 и PARP2, тем самым оказывая влияние на размер компартментов, содержащих FUS, PAR-илированный белок и поврежденную ДНК. Однако в присутствии HPF1 происходит значительная стимуляция PAR-илирования самого белка FUS и его мутантов. Полученные результаты указывают на возможную роль HPF1 в регуляции формирования FUS-PAR-зависимых компартментов в процессе репарации ДНК. Это может иметь важное значение для разработки и использования ингибиторов PARP1(2) в противоопухолевой терапии.

Финансирование: Исследование поддержано грантом РНФ (№ 20-14-00086).

HPF1 regulates poly(ADP-ribosyl)ation of the RNA-binding protein FUS and influences the formation of poly(ADP-ribose)-containing compartments

Singatulina A.*, Sukhanova M., Lavrik O.

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

* nastsing@yandex.ru

Key words: DNA repair; poly(ADP-ribose) polymerases 1 and 2 (PARP1/2); histone poly(ADP-ribosyl)ation factor 1 (HPF1)

Motivation and Aim: Currently, many RNA-binding proteins are considered to be involved in maintaining genome stability, since they are able to directly participate in DNA repair and can be localized at the sites of DNA damage due to their ability to interact with poly(ADP-ribose) [1]. Poly(ADP-ribose) (PAR) is a negatively charged branched polymer consisting of ADP-ribose monomers. The synthesis of PAR from NAD⁺ is catalyzed by the enzymes poly(ADP-ribose) polymerases (PARPs), which are activated upon interaction with damaged DNA [2]. The nuclear enzymes PARP1 and PARP2 can catalyze autopoly(ADP-ribosyl)ation (auto-PARylation), as well as PARylation of other target proteins. Recently, the histone PARylation factor 1 (HPF1) was discovered, it is capable to form a temporary joint active site with PARP1(2), changing the specificity of the PARylation reaction and regulating the level of PAR synthesis. In this work, we investigated the effect of HPF1 on the activity of PARP1(2) and the formation of compartments involving PARylated PARP1(2) and the RNA-binding protein FUS (FUS/TLS, Fused in Sarcoma). FUS-dependent formation of compartments is of great interest for research, since FUS interacts with PAR and is also able to localize at the sites of DNA damage, and this process depends on the activity of PAR synthesis [3]. In addition, we previously showed using atomic force microscopy (AFM) that FUS and PARylated PARP1 form complex supramolecular structures (compartments) in which damaged DNA is concentrated [4].

Methods and Algorithms: AFM: putrescine was added to the samples to a final concentration of 5 mM and magnesium (5 mM) and applied to the surface of freshly cleaved mica and incubated for 1 minute. The mica surface was washed with a 0.02 % solution of uranyl acetate, followed by washing with water and dried in air. AFM studies were carried out in semi-contact mode on a Nanoscope V Multimode 8 microscope in air using a Scanasyt-Air cantilever. Electropherogram of PARylated proteins according to Laemmli: analysis of PARylated proteins was carried out by denaturing gel electrophoresis. Gels were visualized using a Typhoon FLA 9500 scanner or colloidal Coomassie G250 staining.

Results: The interaction of FUS with PAR plays an important role in the formation of compartments [4], therefore the structure of PAR, its length and level of synthesis can have a significant impact on this process. HPF1 regulates the activity of PARP1(2), influencing the level of auto-modification of these proteins and the length of synthesized PAR. Using biochemical methods, we showed that the size of PAR synthesized in the PARP1(2) automodification reaction was decreased with increasing of HPF1 concentration. To analyze the size and number of compartments formed by FUS after PARylation of PARP1(2) in the presence of various concentrations of HPF1, we

performed a series of experiments using AFM. We found that the size of the PARylated protein was decreased during automodification of PARP1 and PARP2 in the presence of HPF1. In addition, FUS is able to form compartments involving PARylated PARP2. Using AFM, we also observed that an increase in the concentration of HPF1 led to a decrease in the size of compartments formed during the interaction of FUS with PARylated PARP1(2), but the number of compartments remained at the same level (Fig. 1).

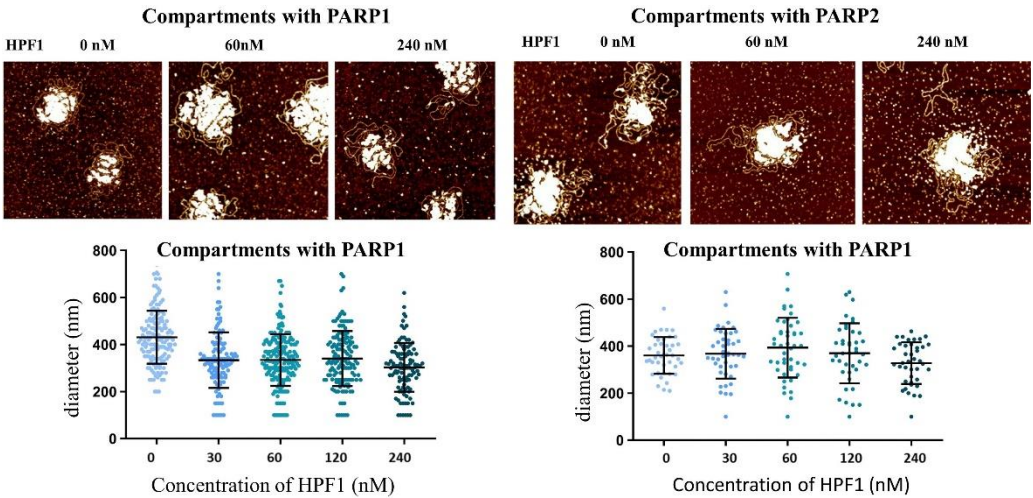


Fig. 1. Visualization of compartments formed with the participation of FUS after auto-PARylation of PARP1(2) in the presence of different concentrations of HPF1 (top panels: AFM images of compartments). Analysis of compartment sizes by AFM (lower graphs)

It was previously shown that FUS is not only able to interact with PAR, but it is also a target in the PARylation reaction catalyzed by PARP1. According to the literature, in the presence of HPF1, the specificity of PARP1(2) action changes, and instead of the amino acid residues of aspartate and glutamate, as happens in the absence of HPF1, serine residues become the main modification sites. It is therefore possible that the presence of HPF1 may influence FUS PARylation through PARP1(2) activity.

Next, a series of experiments was carried out to study the effect of HPF1 on PARylation of FUS (WT) and its phosphomimetic (FUS 12E), containing replacements of serine/threonine residues with glutamine, or mutant forms containing a deletion of the N-terminal (FUS Δ LCD) or two C-terminal (FUS Δ RGG1-2) domains (Fig. 2). It has been shown that in the presence of HPF1 there is a significant stimulation of PARylation of FUS and its mutants due to the activity of PARP1 and PARP2. Importantly, HPF1 had a stronger stimulatory effect on the level of FUS PARylation by PARP2. Studying FUS PARylation in the presence of HPF1 is important because FUS is an integral component of PAR-containing compartments and is directly involved in their formation.

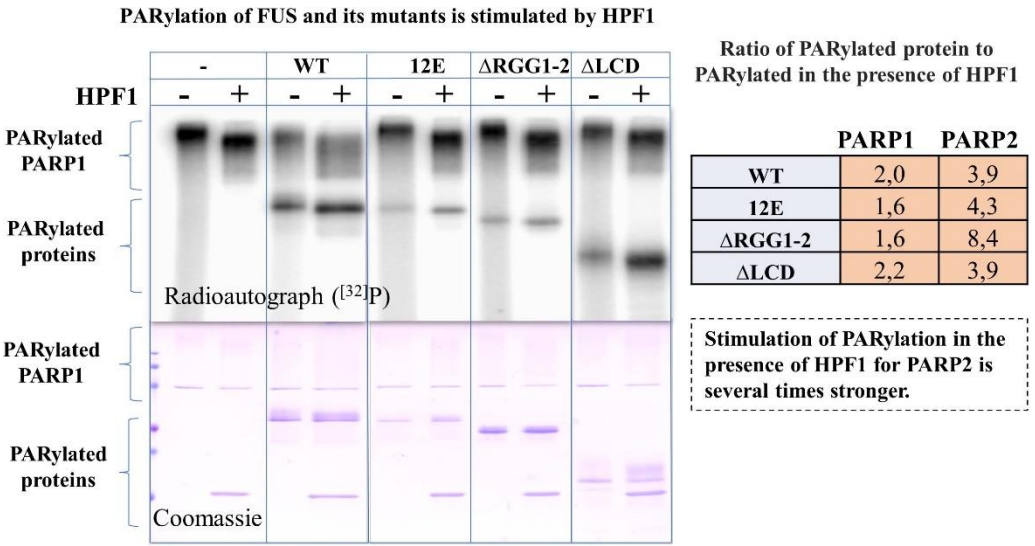


Fig. 2. HPF1 significantly increases the level of PARylation of the FUS protein (WT) and its mutants. PARylation of the FUS protein and its mutants (12E, ΔLCD ΔRGG1-2) by the enzymes PARP1 and PARP2 in the presence of HPF1 was analyzed using [³²P]-labelled NAD⁺ based on the level of incorporation of [³²P]-ADP-ribose

Conclusion: Thus, HPF1 has an inhibitory effect on the level of auto-PARylation of PARP1 and PARP2, thereby influencing the size of compartments containing FUS, PARylated protein and damaged DNA. However, there is a significant stimulation of PARylation of FUS and its mutant forms in the presence of HPF1. The results indicate a possible role of HPF1 in regulating the formation of FUS-PAR-dependent compartments during DNA repair. This may have important implications for the development and using of PARP1(2) inhibitors in anticancer therapy.

Funding: The study is supported by a grant from the Russian Science Foundation (No. 20-14-00086).

Список литературы/References

1. Bock F.J., Todorova T.T., Chang P. RNA regulation by poly (ADP-ribose) polymerases. *Mol Cell.* 2015;58(6):959-969
2. Alemasova E.E., Lavrik O.I. A sePARate phase? Poly (ADP-ribose) versus RNA in the organization of biomolecular condensates. *Nucleic Acids Res.* 2022;50(19):10817-10838
3. Rulten S.L. et al. PARP-1 dependent recruitment of the amyotrophic lateral sclerosis-associated protein FUS/TLS to sites of oxidative DNA damage. *Nucleic Acids Res.* 2014;2(1):307-314
4. Singatulina A.S. et al. PARP-1 activation directs FUS to DNA damage sites to form PARG-reversible compartments enriched in damaged DNA. *Cell Rep.* 2019;27:1809-1821