

УДК 577.24

НЕКАТАЛИТИЧЕСКИЕ ДОМЕНЫ ДНК-ПОЛИМЕРАЗЫ λ : ВЛИЯНИЕ НА АКТИВНОСТЬ ФЕРМЕНТА И ЕЕ РЕГУЛЯЦИЮ

© 2023 г. Е. А. Мальцева¹, Н. И. Речкунова¹, академик РАН О. И. Лаврик^{1,*}

Поступило 25.04.2023 г.
После доработки 10.05.2023 г.
Принято к публикации 11.05.2023 г.

ДНК-полимераза λ (Pol λ) относится к тому же структурному X-семейству, что и ДНК-полимераза β — основная полимеразы процесса эксцизионной репарации оснований. Роль Pol λ в этом процессе так и остается не до конца выясненной. Существенное отличие двух ДНК-полимераз заключается в наличии в структуре Pol λ протяженного некаталитического N-концевого участка. Впервые детально исследовано влияние этого участка на взаимодействие Pol λ с ДНК и многофункциональными белками — поли(ADP-рибоза)полимеразой 1 (PARP1) и репликативным белком A (RPA). Полученные данные позволяют предположить, что некаталитические домены Pol λ играют супрессорную роль как по отношению к полимеразной активности фермента, так и во взаимодействии с ДНК и PARP1.

Ключевые слова: эксцизионная репарация оснований, ДНК-полимеразы, PARP1, регуляция активности

DOI: 10.31857/S2686738923600358, **EDN:** OZLFUZ

ДНК-полимераза λ (Pol λ) относится к структурному X-семейству, как и ДНК-полимераза β (Pol β) — основная полимеразы в системе эксцизионной репарации оснований (BER). Оба фермента обладают активностями, необходимыми для репаративного синтеза: катализируют синтез ДНК в бреши, в том числе на поврежденных матрицах, обладают 5'-dRP-лиазной активностью, а также способны вести синтез с вытеснением цепи [1, 2]. Pol β признана центральной в процессе заполнения однонуклеотидной бреши, возникающей в процессе BER, тогда как роль Pol λ в этом процессе остается не до конца выясненной.

Исправление повреждений ДНК в процессе BER происходит в несколько стадий, на каждой из которых под действием определенных ферментов формируются специфические ДНК-интермедиаты. Важную роль в процессе играет координация действия ферментов на каждой стадии за счет взаимодействий с белками-партнерами, регулируемыми их активностью [3]. Один из ключевых белков-регуляторов репарации ДНК — поли(ADP-рибоза)полимераза 1 (PARP1) — при взаимодействии с поврежденной ДНК катализирует

синтез полимера ADP-рибозы, используя в качестве субстрата NAD⁺. Ранее мы показали, что PARP1 модулирует активность Pol β на ДНК-интермедиатах коротко- и длиннозаплаточного путей BER [4]. С другой стороны, в присутствии ДНК-структур, содержащих однонуклеотидную брешь или ник, моделирующих интермедиаты BER на стадии ресинтеза ДНК, наблюдается стимуляция активности PARP1 репликативным белком A (RPA) [5]. Показано также, что RPA стимулирует активность Pol λ , в том числе в процессе синтеза на поврежденной матрице [6]. Оба белка, PARP1 и RPA, присутствуют в клетке в значительных количествах и участвуют во многих процессах, поэтому мы исследовали их влияние на активность Pol β и Pol λ , чтобы определить, может ли обнаруженный эффект стимуляции активности PARP1 в присутствии RPA проявляться в процессе репарационного синтеза.

Мы провели сравнительный анализ влияния PARP1 и реакции поли(ADP-рибозил)ирования на активность Pol β и Pol λ в коротко- и длиннозаплаточных путях BER. Радиоактивно меченный ДНК-дуплекс, содержащий однонуклеотидную брешь с 5'-фосфатом (gap1-p-ДНК) инкубировали с ДНК-полимеразой и dNTP в различных концентрациях, при которых происходило встраивание одного нуклеотида либо наблюдался синтез ДНК с вытеснением цепи (рис. 1). Аналогичным образом проводили реакции в присутствии PARP1

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

*e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru

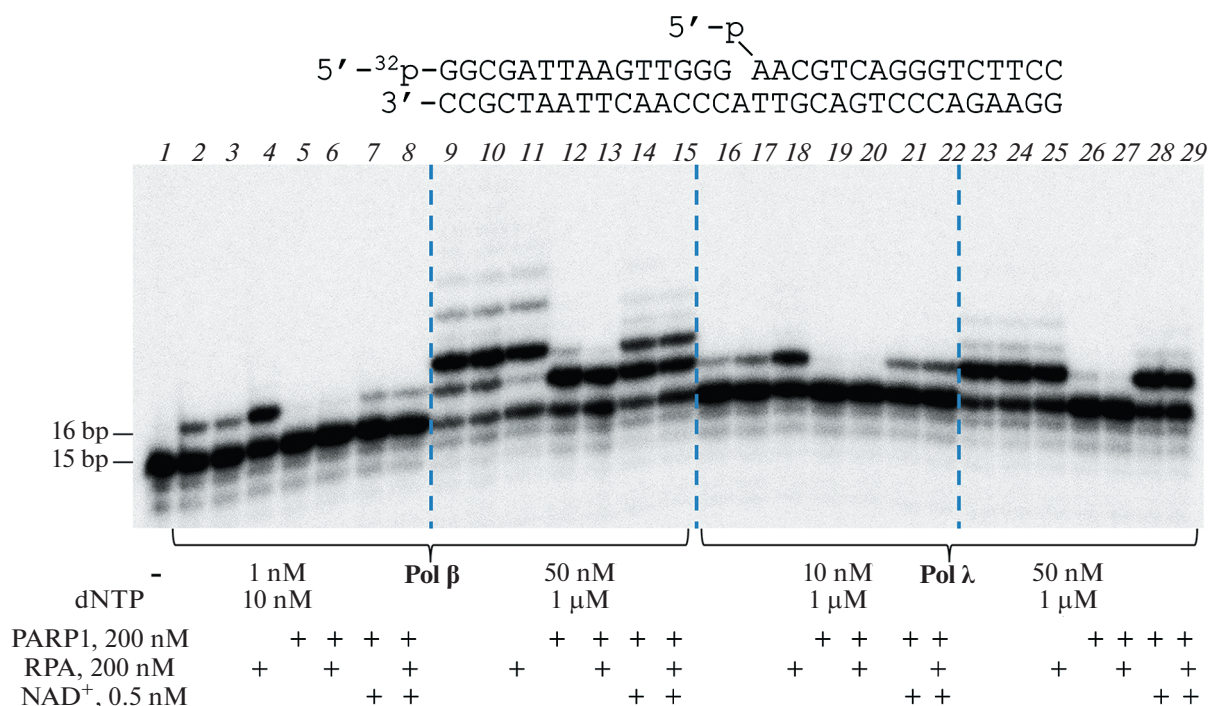


Рис. 1. Влияние PARP1, синтеза поли(ADP-рибозы), RPA и совместного присутствия PARP1 и RPA на активность ДНК-полимераз β и λ в реакции застраивания однонуклеотидной бреши и синтеза с вытеснением цепи. Анализ продуктов реакции в денатурирующем 10%-м ПААГ. Радиоактивно меченный (по 5'-концу праймера) ДНК-дуплекс (20 нМ), содержащий однонуклеотидную брешь с 5'-фосфатом (gap1-р-ДНК), инкубировали с ДНК-полимеразой и dNTP в указанных концентрациях при 25°C в течение 30 мин в присутствии PARP1 и/или RPA, в отсутствие или в присутствии NAD⁺ (как обозначено на рисунке). Все реакционные смеси содержали 50 мМ Трис-HCl, pH 7.5 (25°C), 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂ и 50 мкг/мл БСА.

и/или RPA, в отсутствие или в присутствии NAD⁺. Проведенный анализ показал, что PARP1 ингибирует активность обеих ДНК-полимераз, однако ингибирующий эффект зависит как от ДНК-полимеразы, так и от ее концентрации.

Для Pol β в условиях встраивания одного нуклеотида наблюдалось практически полное ингибирование реакции (рис. 1, дор. 5), тогда как при более высокой концентрации ДНК-полимеразы белок PARP1 подавлял только синтез с вытеснением цепи и практически не влиял на встраивание первого нуклеотида (рис. 1, дор. 12). В случае Pol λ наблюдалось практически полное ингибирование не только синтеза с вытеснением цепи, но и включения нуклеотида в брешь (рис. 1, дор. 19 и 26). Следует отметить, что Pol λ существенно менее эффективна в реакции синтеза с вытеснением цепи, чем Pol β (рис. 1, сравнить дор. 9, 10 и 23, 24), как было показано ранее [7, 8]. В присутствии NAD⁺ ингибирующий эффект PARP1 значительно снижался, особенно в случае реакции заполнения бреши, катализируемой Pol λ (дор. 21). Добавление в реакционные смеси RPA также приводило к разным эффектам — при низкой концентрации ДНК-полимераз RPA стимулировал их активность (рис. 1, дор. 4 и 18), а при высокой — ингибиро-

вал, в большей степени через влияние на встраивание первого нуклеотида, чем на синтез с вытеснением цепи (рис. 1, дор. 11 и 25). При совместном добавлении PARP1 и RPA, даже в условиях встраивания одного нуклеотида RPA не только не снимал ингибирующий эффект PARP1, но даже умеренно его усиливал, как в отсутствие (рис. 1, дор. 6, 13, 20, 27), так и в присутствии NAD⁺ (рис. 1, дор. 8, 15, 22, 29). Таким образом, активность Pol β и Pol λ может модулироваться белками PARP1 и RPA в зависимости от соотношения концентраций этих белков. Однако влияние стимуляции PARP1 в присутствии RPA на активность ДНК-полимераз в явном виде в наших экспериментах не проявилось.

Основное отличие исследуемых ДНК-полимераз заключается в наличии в структуре Pol λ протяженного некаталитического N-концевого участка, включающего BRCT-домен и серин/пролин-богатую область (рис. 2а). С одной стороны, эти домены влияют на каталитическую активность фермента, а с другой — могут участвовать в белок-белковых взаимодействиях с другими факторами репарации и подвергаться посттрансляционным модификациям [9–11]. Возможно, разница во влиянии PARP1 на активности Pol β и Pol λ

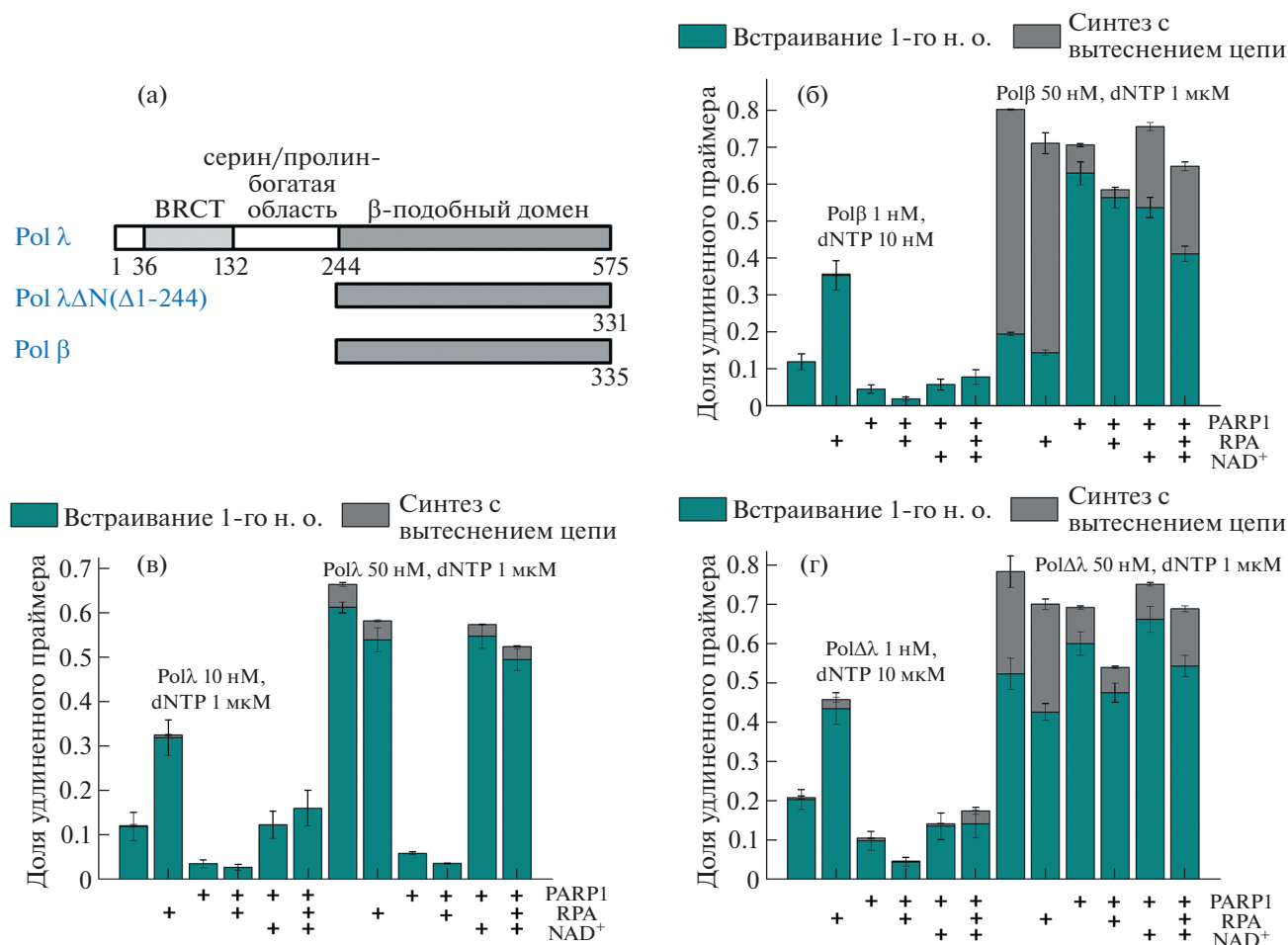


Рис. 2. Влияние PARP1, синтеза поли(ADP-рибозы), RPA и совместного присутствия PARP1 и RPA на активность ДНК-полимераз β, λ и λΔN в реакции застраивания однонуклеотидной брешы и синтеза с вытеснением цепи. (а) Схематическое изображение доменной структуры Polβ, Polλ и PolλΔN. BRCT-домен — С-концевой домен BRCA1. (б, в и г) Доля удлиненного праймера, определенная как отношение интенсивности продуктов реакции к интенсивности исходного праймера, для реакции, катализируемой Polβ, Polλ и PolλΔN соответственно. Радиоактивно меченный (по 5'-концу праймера) ДНК-дуплекс (20 нМ), содержащий однонуклеотидную брешу с 5'-фосфатом (gar1-р-ДНК), инкубировали с ДНК-полимеразой и dNTP в указанных концентрациях при 25°C в течение 30 мин в присутствии 200 нМ PARP1 и/или 200 нМ RPA, в отсутствие или в присутствии 0.5 мМ NAD⁺ (как обозначено на рисунке). Все реакционные смеси содержали 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5 (25°C), 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂ и 50 мкг/мл БСА.

вызвана в том числе взаимодействием этого белка с некаталитическим участком Polλ. В связи с этим была получена мутантная форма PolλΔN, содержащая только каталитический β-подобный домен (удалены 244 аминокислоты с N-конца) [12, 13]. Следует отметить, что удаление некаталитического участка привело к увеличению активности фермента в реакции заполнения брешы в gar1-р-ДНК практически до уровня Polβ (рис. 2, сравнить панели б и г). Эффективность синтеза с вытеснением цепи, катализируемого PolλΔN, также значительно увеличилась по сравнению с полно-размерной Polλ. Как видно из диаграмм, представленных на рис. 2, влияние PARP1 и RPA на активность PolλΔN в большей степени совпадает с характером влияния этих белков на Polβ, чем на

Polλ. Таким образом, некаталитические домены Polλ влияют не только на активность фермента, но и на регуляцию этой активности.

Далее было проведено сравнение эффективности поли(ADP-рибозил)ирования исследуемых ДНК-полимераз в присутствии gar1-р-ДНК. Выявлено, что Polλ в сравнении с Polβ является менее эффективной мишенью для модификации (следали за уменьшением количества немодифицированной ДНК-полимеразы при увеличении концентрации NAD⁺). Удаление некаталитического участка приводит к увеличению эффективности модификации — уровень модификации PolλΔN практически не отличается от уровня модификации Polβ (рис. 3). Присоединение отрицательно заряженной поли(ADP-рибозы) значи-

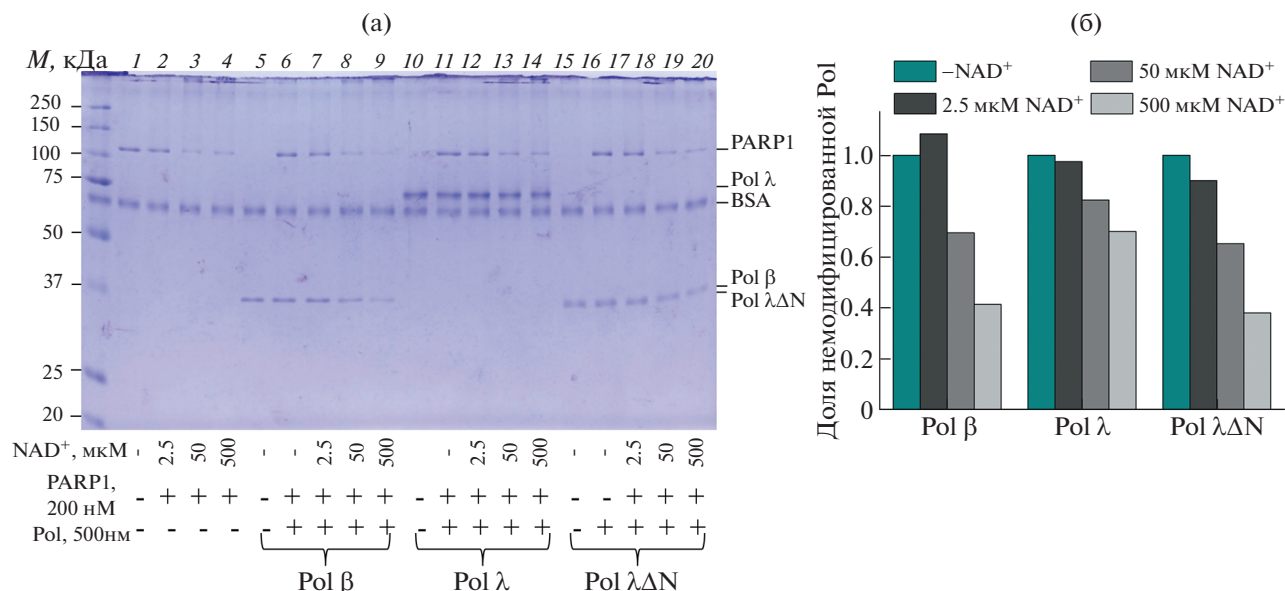


Рис. 3. Сравнение эффективности поли(ADP-рибозил)ирования ДНК-полимераз β , λ и $\lambda\Delta N$. Анализ продуктов поли(ADP-рибозил)ирования Pol β , Pol λ и Pol $\lambda\Delta N$ в денатурирующем 12.5%-м SDS-ПААГ после окрашивания Кумасси R250 (а) и зависимость доли немодифицированных ДНК-полимераз (отношение интенсивности полос в геле (а), соответствующих немодифицированной ДНК-полимеразе в присутствии и в отсутствие NAD⁺) от концентрации NAD⁺ (б). 200 нМ PARP1 инкубировали с 500 нМ ДНК-полимеразой в присутствии 20 нМ ДНК-дуплекса, содержащего однонуклеотидную брешь с 5'-фосфатом (gap1-p-ДНК), и 1 мкМ dNTP при 25°C в течение 30 мин в отсутствие или в присутствии NAD⁺ в указанных концентрациях (как обозначено на рисунке). Все реакционные смеси содержали 50 мМ Трис-НСl, pH 7.5 (25°C), 50 мМ NaCl, 50 мкг/мл БСА и 5 мМ MgCl₂.

тельно ослабляет связывание белков с ДНК, уменьшая эффективную концентрацию ДНК-полимераз. Можно предположить, что именно этот эффект приводит к существенному ослаблению эффективности синтеза с вытеснением цепи для всех ДНК-полимераз в условиях синтеза поли(ADP-рибозы).

Отличия во влиянии PARP1 на ДНК-полимеразы могут быть также обусловлены белок-белковыми взаимодействиями. Взаимодействие Pol β и PARP1 показано ранее [4, 14, 15], тогда как для Pol λ такие исследования не проводились. Предполагалось, что наличие BRCT-доменов в структурах Pol λ и PARP1 может внести значительный вклад во взаимодействие между этими белками. Был получен препарат флуоресцентно меченной по N-концевой аминокислоте PARP1 (Cy3-PARP1) и оценено взаимодействие этого белка с ДНК-полимеразами методом флуоресцентного титрования. Результаты измерений показали, что эффективность взаимодействия Pol β и Pol $\lambda\Delta N$ с PARP1 сопоставимы и практически в два раза выше по сравнению с полноразмерной Pol λ (рис. 4), что, с одной стороны, согласуется с эффективностью поли(ADP-рибозил)ирования ДНК-полимераз, а с другой — указывает на возможные взаимодействия PARP1 и ДНК-полимераз на ДНК. Однако обнаруженная разница все же недостаточна, чтобы однозначно сделать вывод о том,

участвует ли некаталитический участок Pol λ в связывании с PARP1, или связывание осуществляется преимущественно за счет β -подобного домена. Кроме того, следует иметь в виду, что Pol β и Pol $\lambda\Delta N$ не являются полностью идентичными, и их каталитические домены могут по-разному взаимодействовать с PARP1 и другими факторами репарации.

Суммируя полученные данные, мы предполагаем, что в отсутствие NAD⁺ ингибирующий эффект PARP1 на активность Pol β и Pol λ вызван преимущественно конкуренцией за ДНК, но при этом за счет белок-белковых взаимодействий с PARP1 ДНК-полимеразы могут удерживаться на ДНК-субстрате, что снижает эффективность ингибирования. При добавлении NAD⁺ PARP1 автополи(ADP-рибозил)ируется и высвобождает ДНК, что приводит к практически полному восстановлению активности ДНК-полимераз, а остаточный ингибирующий эффект объясняется поли(ADP-рибозил)ированием ДНК-полимераз, ослабляющим связывание ДНК-полимераз с ДНК. Влияние PARP1 на активность Pol β и Pol λ принципиально схоже, но отличается по силе воздействия. Эта разница обусловлена, по-видимому, наличием в структуре Pol λ протяженного некаталитического N-концевого участка. Согласно литературным данным, этот участок не участвует в связывании ДНК напрямую [12], но при

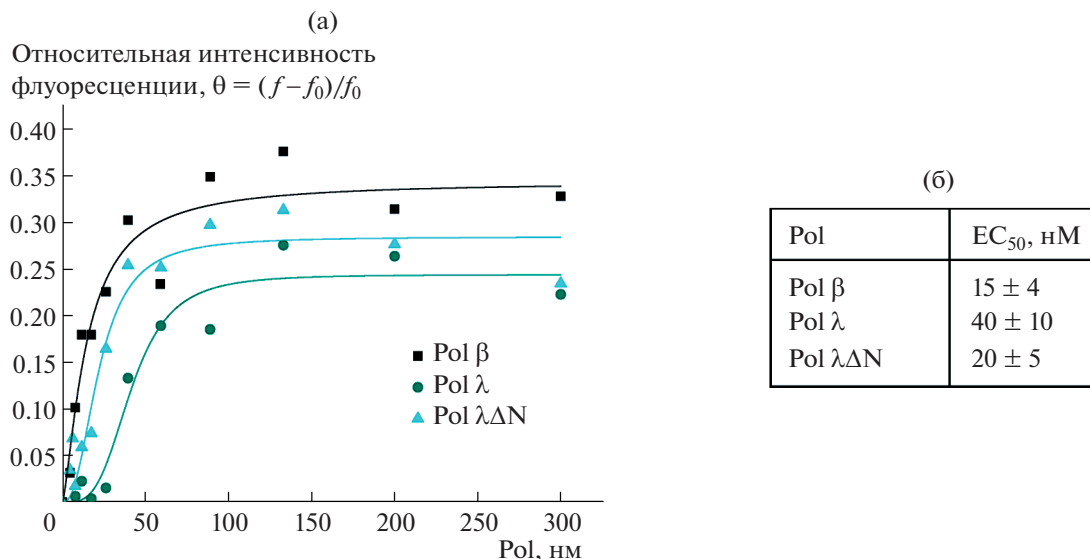


Рис. 4. Сравнение эффективности связывания PARP1 с ДНК-полимеразами β, λ и λΔN. Кривые титрования флуоресцентно меченной Cy3-PARP1 (10 нМ) Polβ, Polλ и PolλΔN в возрастающих концентрациях (а) и значения EC₅₀ для комплексов PARP1 с ДНК-полимеразами, рассчитанные с помощью уравнения Хилла (б). Уравнение Хилла: $\theta = \theta_{\infty} \left[1 + (EC_{50}/C)^n \right]^{-1}$, где θ – относительная интенсивность флуоресценции PARP1 в комплексе с ДНК-полимеразой в концентрации C; θ_{∞} – максимальное значение относительной интенсивности флуоресценции PARP1 в комплексе с ДНК-полимеразой (в насыщающих концентрациях), EC₅₀ – концентрация ДНК-полимеразы, при которой $\theta = \theta_{\infty}/2$; n – коэффициент Хилла (угол наклона кривой). Относительная интенсивность флуоресценции $\theta = (f - f_0)/f_0$, f и f₀ – интенсивности флуоресценции PARP1 в присутствии и в отсутствие ДНК-полимеразы соответственно. Все реакционные смеси содержали 25 мМ Трис-НCl, pH = 7.5 (25°C), 50 мМ NaCl, 0.5 мМ DTT.

этом влияет на сродство полноразмерной ДНК-полимеразы к ДНК. Так, ранее было показано, что сродство Polλ к однонуклеотидной бреши в 3 раза ниже, чем Polβ, 90 нМ и 30 нМ соответственно [16]. Кроме того, наличие этого участка ингибирует белок-белковые взаимодействия между Polλ и PARP1. Как результат, Polλ более “чувствительна” к влиянию PARP1, чем Polβ, поскольку менее эффективно конкурирует с PARP1 за ДНК-субстрат и менее эффективно удерживается на ДНК за счет взаимодействия с PARP1.

Таким образом, некаталитические домены Polλ играют супрессорную роль как по отношению к полимеразной активности фермента, так и во взаимодействии с ДНК и PARP1. Это может быть одной из причин ключевой роли Polβ в BER в сравнении с Polλ [17].

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при финансовой поддержке РНФ (проект № 21-64-00017) и в рамках государственного задания ИХБФМ СО РАН № 121031300041-4 (получение ДНК-субстратов и выделение рекомбинантного белка RPA).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы декларируют отсутствие конфликта интересов.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность М.М. Кутузову, Н.С. Дырхеевой и Р.О. Анарбаеву (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) за предоставление PARP1, ДНК-полимеразы λ и получение Cy3-PARP1 соответственно.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Belousova E.A., Lavrik O.I. DNA polymerases β and λ and their roles in cell. // DNA Repair (Amst). 2015. V. 29. P. 112–126.
2. Beard W.A., Wilson S.H. DNA polymerase beta and other gap-filling enzymes in mammalian base excision repair. // Enzymes. 2019. V. 45. P. 1–26.
3. Carter R.J., Parsons J.L. Base Excision Repair, a Pathway Regulated by Posttranslational Modifications. // Mol Cell Biol. 2016. V. 36. № 10. P. 1426–37.
4. Sukhanova M., Khodyreva S., Lavrik O. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates activity of DNA polymerase beta in long patch base excision repair. // Mutat Res. 2010. V. 685. № 1–2. P. 80–9.

5. *Maltseva E.A., Krasikova Y.S., Sukhanova M.V., et al.* Replication protein A as a modulator of the poly(ADP-ribose)polymerase 1 activity. // *DNA Repair (Amst)*. 2018. V. 72. P. 28–38.
6. *Maga G., Crespan E., Wimmer U., et al.* Replication protein A and proliferating cell nuclear antigen coordinate DNA polymerase selection in 8-oxo-guanine repair. // *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008. V. 105. № 52. P. 20689–94.
7. *Lebedeva N.A., Rechkunova N.I., Dezhurov S.V., et al.* Comparison of functional properties of mammalian DNA polymerase lambda and DNA polymerase beta in reactions of DNA synthesis related to DNA repair. // *Biochim Biophys Acta*. 2005. V. 1751. № 2. P. 150–8.
8. *Thapar U., Demple B.* Deployment of DNA polymerases beta and lambda in single-nucleotide and multinucleotide pathways of mammalian base excision DNA repair. // *DNA Repair (Amst)*. 2019. V. 76. P. 11–19.
9. *Fiala K.A., Duym W.W., Zhang J., et al.* Up-regulation of the fidelity of human DNA polymerase lambda by its non-enzymatic proline-rich domain. // *J Biol Chem*. 2006. V. 281. № 28. P. 19038–44.
10. *Taggart D.J., Dayeh D.M., Fredrickson S.W., et al.* N-terminal domains of human DNA polymerase lambda promote primer realignment during translesion DNA synthesis. // *DNA Repair (Amst)*. 2014. V. 22. P. 41–52.
11. *Braithwaite E.K., Kedar P.S., Lan L., et al.* DNA polymerase lambda protects mouse fibroblasts against oxidative DNA damage and is recruited to sites of DNA damage/repair. // *J Biol Chem*. 2005. V. 280. № 36. P. 31641–7.
12. *Shimazaki N., Yoshida K., Kobayashi T., et al.* Over-expression of human DNA polymerase lambda in *E. coli* and characterization of the recombinant enzyme. // *Genes Cells*. 2002. V. 7. № 7. P. 639–51.
13. *Blanca G., Shelev I., Ramadan K., et al.* Human DNA polymerase λ diverged in evolution from DNA polymerase β toward specific Mn^{++} dependence: a kinetic and thermodynamic study. // *Biochemistry* 42 (2003) 7467–7476.
14. *Prasad R., Williams J.G., Hou E.W., et al.* Pol β associated complex and base excision repair factors in mouse fibroblasts. // *Nucleic Acids Res*. 2012. V. 40. № 22. P. 11571–82.
15. *Moor N.A., Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O., et al.* Quantitative characterization of protein-protein complexes involved in base excision DNA repair. // *Nucleic Acids Res*. 2015. V. 43. № 12. P. 6009–22.
16. *Howard M.J., Horton J.K., Zhao M.L., et al.* Lysines in the lyase active site of DNA polymerase β destabilize nonspecific DNA binding, facilitating searching and DNA gap recognition. // *J Biol Chem*. 2020. V. 295. № 34. P. 12181–12187.
17. *Jelezcova E., Trivedi R.N., Wang X.H., Tang J.B., et al.* Parp1 activation in mouse embryonic fibroblasts promotes Pol beta-dependent cellular hypersensitivity to alkylation damage. // *Mutat Res*. 2010. V. 686. № 1–2. P. 57–67.

NON-CATALYTIC DOMAINS OF DNA POLYMERASE λ : INFLUENCE ON ENZYME ACTIVITY AND ITS REGULATION

Ekaterina A. Maltseva^a, Nadejda I. Rechkunova^a, and Academician of the RAS Olga. I. Lavrik^{a, #}

^a*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: lavrik@niboch.nsc.ru*

DNA polymerase λ (Pol λ) belongs to the same structural X-family as DNA polymerase β , the main polymerase of base excision repair. The role of Pol λ in this process remains not fully understood. A significant difference between the two DNA polymerases is the presence of an extended non-catalytic N-terminal region in the Pol λ structure. The influence of this region on the interaction of Pol λ with DNA and multifunctional proteins, poly(ADP-ribose)polymerase 1 (PARP1) and replication protein A (RPA), was studied in detail for the first time. The data obtained suggest that non-catalytic Pol λ domains play a suppressor role both in relation to the polymerase activity of the enzyme and in interaction with DNA and PARP1.

Keywords: base excision repair, DNA polymerases, PARP1, activity regulation