

УДК 577.29

## РОЛЬ ОКИСЛЕНИЯ БЕЛКА XRCC1 В РЕГУЛЯЦИИ ПРОЦЕССА РЕПАРАЦИИ ДНК У МЛЕКОПИТАЮЩИХ

И. А. Васильева, Н. А. Моор, член-корреспондент РАН О. И. Лаврик\*

Поступило 22.07.2019 г.

Впервые изучено влияние окисления белка XRCC1 на модификацию белков, катализируемую поли(АДФ-рибоза) полимеразы (PARP1 и PARP2). XRCC1, PARP1 и PARP2 обеспечивают координацию многоступенчатого процесса репарации самых многочисленных повреждений ДНК в роли организующих платформ. Нами показано, что окисление снижает эффективность АДФ-рибозилирования XRCC1 и сродство белка к поли(АДФ-рибозе). Модификация разных форм XRCC1 АДФ-рибозой усиливается в присутствии ДНК-полимеразы  $\beta$  (Pol $\beta$ ), образующей стабильный комплекс с XRCC1. Окисление подавляет ингибирующую активность XRCC1 и её комплекса с Pol $\beta$  в отношении процесса аутомодификации PARP1 и PARP2, что может усиливать эффективность репарации. Результаты исследования указывают на роль окисления XRCC1 в тонкой регуляции уровней поли(АДФ-рибозил)ирования белков и их координирующих функций в репарации ДНК.

*Ключевые слова:* эксцизионная репарация оснований, координация репарации ДНК, XRCC1, PARP1, PARP2, поли(АДФ-рибозил)ирование белков.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-5652489193-98>

Эксцизионная репарация оснований (BER) обеспечивает коррекцию самых многочисленных повреждений ДНК — модифицированных оснований, апуриновых/апириимидиновых (AP) сайтов и одноцепочечных разрывов [1], возникающих под воздействием различных факторов, включая активные формы кислорода. Активность ферментов, катализирующих отдельные стадии многоступенчатого процесса BER, координируется с участием поли(АДФ-рибоза) полимераз (PARP1 и PARP2) и белка XRCC1 (X-ray repair cross-complementing protein 1), опосредующих сборку мультибелковых ансамблей (репарасом). PARP1 образует прямые контакты с ключевыми ферментами и XRCC1, в которые вовлечены N-концевой ДНК-связывающий, BRCT и C-концевой каталитический домены PARP1 [2]. ДНК-связывающий и BRCT домены отсутствуют в PARP2; их функцию выполняет WGR домен [2]. Несмотря на сходные функции PARP1 и PARP2, роль PARP2 в процессе BER до конца не ясна [1, 2]. Взаимодействуя с ДНК как основной детектор разрывов, PARP1 активируется и катализирует синтез поли(АДФ-рибозы) (PAR) и её присоединение к себе и другим белкам-участникам репарации. Такая модификация (PARилирование) белков регулирует их активности. Аутомодификация

PARP1 усиливает его взаимодействие с другими белками, содержащими PAR-связывающие мотивы. XRCC1, привлекаемый в первую очередь с помощью PARP1 к повреждениям ДНК, является основной мишенью PARилирования и регулирует уровень аутомодификации PARP1. Не имея ферментативной активности, XRCC1 играет роль “платформы” в организации репарасом: его N-концевой домен (NTD) и два домена BRCT (BRCTa и BRCTb), соединённые неупорядоченными фрагментами, формируют сайты связывания для разных белков [2, 3]. Эти взаимодействия регулируются посттрансляционными модификациями XRCC1 [2]. При окислительном стрессе возникает окисленная форма XRCC1 (XRCC1ox), что потенциально может регулировать эффективность процесса репарации. Структурная перестройка в результате образования дисульфидной связи между остатками Cys12 и Cys20 стабилизирует взаимодействие XRCC1ox с ДНК-полимеразой  $\beta$  (Pol $\beta$ ), ответственной за восстановление структуры ДНК [3]. Предполагается, что от формирования такого комплекса зависит эффективность BER in vivo [4, 5]. В данной работе мы исследовали влияние окисления белка XRCC1 на его взаимодействие с PAR и модификацию белков, катализируемую PARP1 и PARP2, в отсутствие и в присутствии Pol $\beta$ , поскольку оба белка известны как мишени PARилирования и образуют прочный комплекс [6–8].

Рекомбинантные белки XRCC1 и Pol $\beta$  млекопитающих получали, как описано ранее [9, 10]. Реком-

*Институт химической биологии и фундаментальной  
медицины Сибирского отделения Российской Академии наук,  
Новосибирск*

\*E-mail: [lavrik@niboch.nsc.ru](mailto:lavrik@niboch.nsc.ru)

бинантные PARP1 и PARP2 млекопитающих свободно предоставлены М.М. Кутузовым (ИХБФМ СО РАН). Структура ДНК для активации PARP1/PARP2 и синтез [<sup>32</sup>P]NAD<sup>+</sup> описаны ранее [11]. Препарат PAR, содержащий полимеры разной длины, получен по известному методу [12]. Для получения XRCC1ox использован метод мягкого окисления SH-групп в белках [13]. XRCC1 (100 мкМ) инкубировали с окисленным глутатионом GSSG (10 мМ) в 50 мМ Na-фосфатном буфере, pH 7,8, содержащем 100 мМ NaCl, в течение 18 ч в темноте при 4 °С. Белок диализовали в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0, 100 мМ NaCl и 40%-й глицерин, и хранили при -30 °С. Восстановленную форму XRCC1 (XRCC1red) получали обработкой исходного препарата белка 10 мМ ТСЕР в течение 18 ч при 4 °С. Содержание SH-групп в белках анализировали колориметрическим методом с помощью реактива Элмана [14].

Модификацию белков, катализируемую PARP1/PARP2, проводили в реакционной смеси (12 мкл), содержащей 0,8 мкМ [<sup>32</sup>P]NAD<sup>+</sup>, 1 мкМ gar-ДНК, 50 мМ трис-HCl буфер, pH 8,0, 100 мМ NaCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,2–0,6 мкМ PARP1 или 0,6 мкМ PARP2, в отсутствие или в присутствии 0,4–2,4 мкМ XRCC1red или XRCC1ox и/или 0,8–4,0 мкМ Polβ; смеси инкубировали в течение 20 мин при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением буфера для нанесения образцов в SDS-ПААГ; пробы прогревали 2 мин при 90 °С. Продукты реакции разделяли электрофорезом в 10%-м SDS-ПААГ. Гели визуализировали с помощью сканера Typhoon FLA 9500 (“GE Healthcare”) и анализировали с помощью программы Quantity One (Bio-Rad).

Связывание Polβ и разных форм XRCC1 с PAR исследовали методом задержки в геле. Белки в концентрации 0,2–8,0 мкМ инкубировали с [<sup>32</sup>P]PAR (~10 нМ) в смеси (10 мкл), содержащей 50 мМ трис-HCl, pH 8,0, 100 мМ NaCl, при 4 °С в течение 30 мин. Смеси разделяли электрофорезом в 5%-м нативном ПААГ (77:1) в 30 мМ ТБЕ-буфере при 4 °С. Гели визуализировали и анализировали, как описано выше. Кажущиеся равновесные константы диссоциации комплексов определяли, используя уравнение  $\theta = \theta_{\max}/[1 + (EC_{50}/C)^n]$  (где  $\theta$  и  $\theta_{\max}$  — доля лиганда, связанного при данной и насыщающей концентрации C белка; EC<sub>50</sub> — концентрация белка, при которой  $\theta = \theta_{\max}/2$ ; n — коэффициент Хилла).

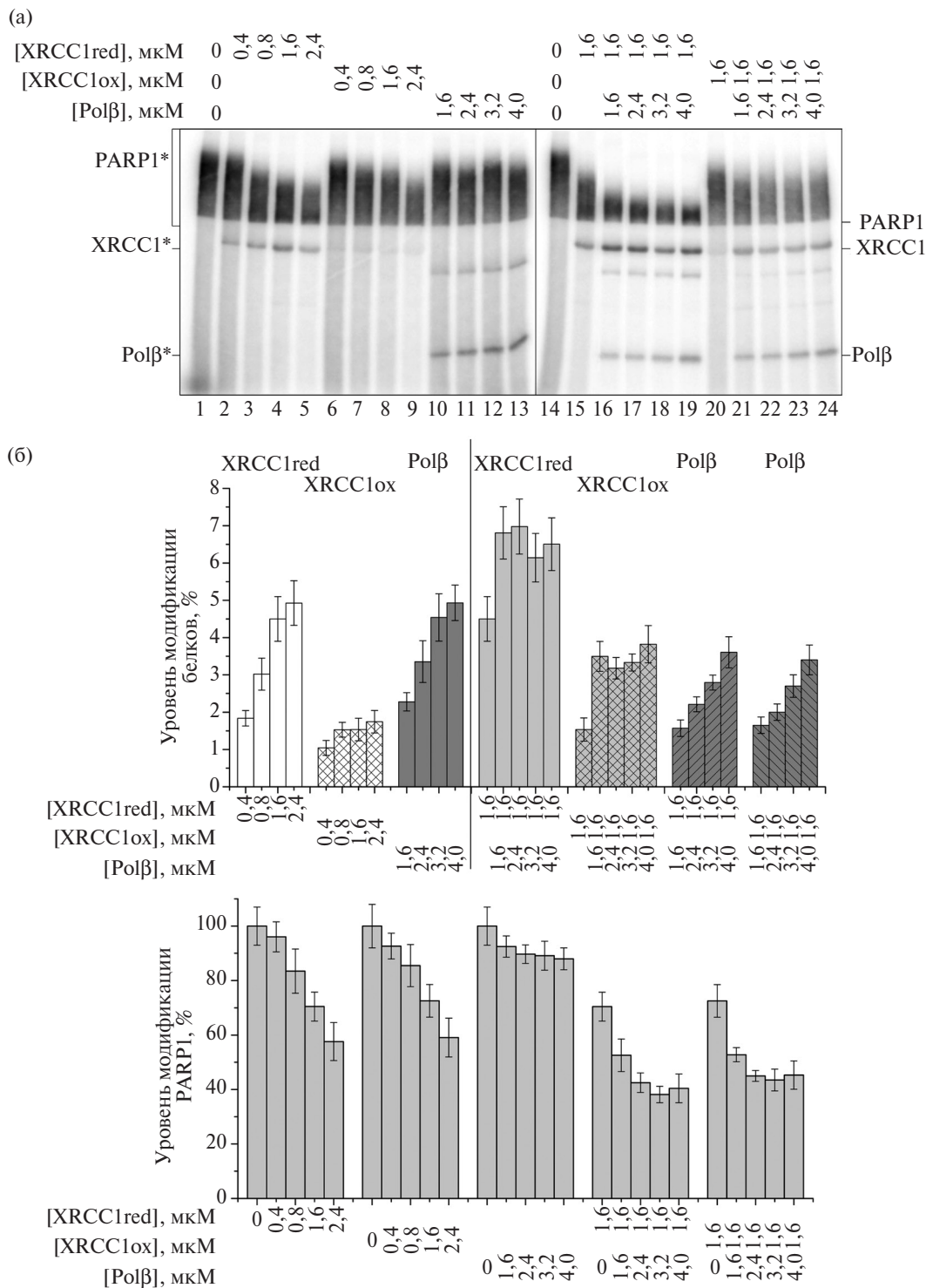
Результаты исследования модификации белков, катализируемой PARP1, представлены на рис. 1. XRCC1red модифицируется более эффективно, чем XRCC1ox: их уровни модификации различаются

в 1,8–2,9 раза при одинаковых концентрациях белков в возрастающем порядке (образцы 2–9 и соответствующие столбцы на верхней гистограмме). В присутствии Polβ модификация XRCC1red и XRCC1ox усиливается в ~1,5 и ~2 раза соответственно, и этот эффект достигается уже при эквивалентном соотношении Polβ и XRCC1 (образцы 15–19 и 20–24). При этом уровни модификации Polβ снижаются в одинаковой степени в присутствии разных форм XRCC1. Таким образом, взаимное влияние XRCC1 и Polβ на их модификацию мало зависит от SS/SH-статуса XRCC1.

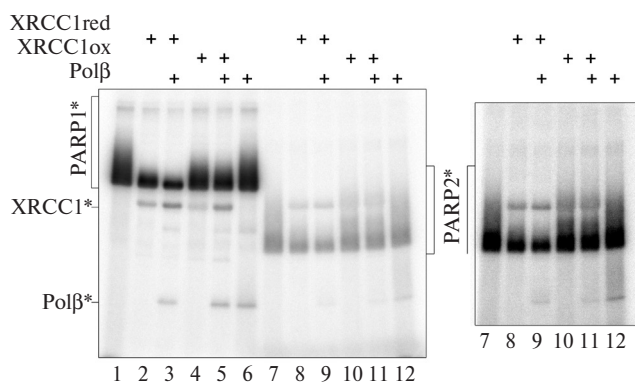
Общий уровень аутомодификации PARP1 снижается в присутствии разных белков-мишеней, при этом профили концентрационной зависимости очень похожи для разных форм XRCC1 (образцы 1–9 и соответствующие столбцы на нижней гистограмме). Ингибирующее влияние Polβ существенно ниже даже при более высокой концентрации (12% при 4 мкМ по сравнению с 41–42% при 2,4 мкМ XRCC1red/XRCC1ox). В отличие от Polβ обе формы XRCC1 подавляют удлинение полимера АДФ-рибозы в продуктах модификации PARP1, о чём свидетельствует увеличение их электрофоретической подвижности. Ингибирование удлинения белком XRCC1red существенно усиливается в присутствии Polβ, чего не наблюдается в случае XRCC1ox (образцы 15–19 по сравнению с образцами 21–24). Более эффективное действие XRCC1red на аутомодификацию PARP1 даже в отсутствие Polβ наблюдалось при исследовании процесса при высоких концентрациях PARP1 (рис. 2; образцы 2 и 3 в сравнении с образцами 4 и 5). Таким образом, окисление XRCC1 оказывает существенное влияние на его функцию в регуляции уровня аутомодификации PARP1.

Мы сравнили модификацию белков в реакциях, катализируемых PARP1 и PARP2, в одинаковых условиях. Эксперименты выполнены при высоких концентрациях ферментов из-за низкой активности PARP2: общий уровень модификации PARP2 в 6 раз ниже по сравнению с PARP1 (рис. 2, образцы 1 и 7). XRCC1red ингибирует аутомодификацию PARP2, его влияние на длину полимера несколько усиливается в присутствии Polβ. В то же время ингибирующее действие XRCC1ox неочевидно из-за плохого разрешения продуктов модификации белков при электрофорезе. Эффекты, оказываемые XRCC1red на аутомодификацию PARP1 и PARP2, сравнимы.

Далее мы исследовали влияние окисления XRCC1 на его взаимодействие с PAR. Представленные в табл. 1 характеристики показывают более прочное



**Рис. 1.** Поли(АДФ-рибозил)ирование PARP1 в отсутствие и в присутствии разных форм XRCC1 и Polβ. а — ковалентное присоединение <sup>32</sup>P-меченой ADP-рибозы к белкам проводили инкубацией PARP1 (0,2 мкМ) с [<sup>32</sup>P]NAD<sup>+</sup> (0,8 мкМ) и gar-ДНК (1 мкМ) в присутствии XRCC1 и Polβ в указанных концентрациях. Положения белков и их продуктов (отмеченных звездочкой) в геле указаны справа и слева от радиоавтографа соответственно. Препарат Polβ содержит устойчивый димер, который также модифицируется. б — гистограммы отображают относительные уровни модификации XRCC1red, XRCC1ox и Polβ (верхняя панель) и аутомодификации PARP1 (нижняя панель) в разных экспериментальных условиях. Количество АДФ-рибозы в основных продуктах модификации белков-мишеней и PARP1 в их присутствии нормировано на её количество, присоединённое к PARP1 в отсутствие других белков (принятое за 100%). Модифицированный белок в каждой серии столбцов верхней гистограммы обозначен сверху. Представлены данные трёх независимых экспериментов.



**Рис. 2.** Сравнение поли(АДФ-рибозил)ирования PARP1 и PARP2 в отсутствие и в присутствии разных форм XRCC1 и Polβ. Концентрации белков: 0,6 мкМ PARP1/PARP2, 1,2 мкМ XRCC1 и Polβ; концентрации остальных компонентов, как в подписи к рис. 1. Справа представлен радиоавтограф части геля (дорожки 7–12), полученный после более длительной экспозиции.

**Таблица 1.** Характеристики связывания Polβ и разных форм XRCC1 с поли(АДФ-рибозой)

Белок	EC <sub>50</sub> <sup>*</sup> , мкМ
Polβ	3,9±0,5
XRCC1red	0,63±0,08
XRCC1ox	1,0±0,1

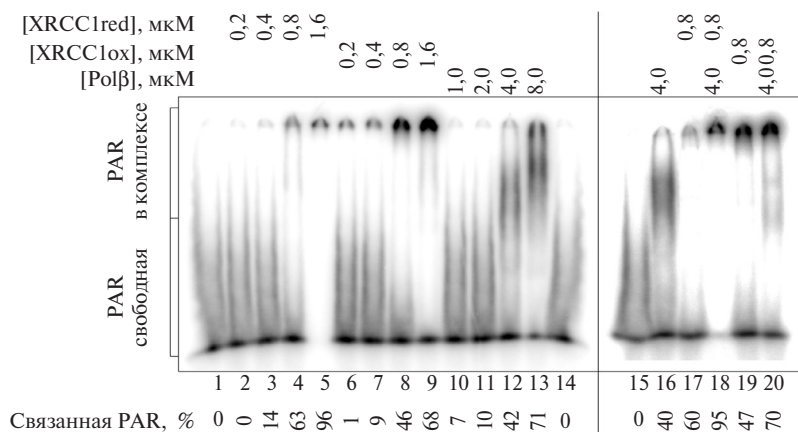
Примечание. Величина EC<sub>50</sub> в уравнении для расчёта соответствует кажущейся константе диссоциации комплекса. Приведены средние значения и их средние отклонения в трёх независимых экспериментах.

связывание полимера белком XRCC1red. Добавление Polβ к XRCC1red приводит к полному связыванию PAR при ненасыщающих концентрациях белков (рис. 3, дорожка 18 в сравнении с дорожками 16 и 17), тогда как при совместном присутствии Polβ

и XRCC1ox сохраняется значительная доля свободной PAR и её комплекса с Polβ (дорожка 20 в сравнении с дорожками 16 и 19). Эти данные свидетельствуют о формировании более стабильного тройного комплекса Polβ-XRCC1-PAR в случае XRCC1red.

Наиболее вероятный продукт окисления XRCC1 — образование дисульфидной C12–C20-связи, которое индуцирует перестройку NTD и его комплекса с каталитическим доменом Polβ с увеличением межмолекулярных контактов, как показано с помощью рентгеноструктурного анализа [3]. Наше исследование показывает влияние окисления на взаимодействие XRCC1 с PAR, сайт связывания которого локализован на BRCTa-домене [15]. Скорее всего, образование C12–C20-связи индуцирует перестройку не только NTD, но и его внутримолекулярных контактов с BRCTa-доменом. XRCC1red сильнее ингибирует стадию элонгации в процессе аутомодификации PARP1/PARP2, чем XRCC1ox, так как обладает более высоким сродством к PAR и лучше модифицируется как мишень. Различие между разными формами XRCC1 в их ингибирующем действии усиливается в присутствии Polβ. Более эффективную репарацию *in vivo* при наличии XRCC1ox в клетке авторы объясняли стабилизацией комплекса этого белка с Polβ [4, 5]. Мы не обнаружили существенных различий между разными формами XRCC1 во взаимном влиянии XRCC1 и Polβ на их модификацию АДФ-рибозой. Эти данные свидетельствуют о том, что контактов XRCC1red с Polβ достаточно для их взаимодействия в тройном комплексе с PAR-PARP1.

Как показано нами ранее, из основных участников BER Polβ образует самый прочный комплекс



**Рис. 3.** Связывание поли(АДФ-рибозы) разными формами XRCC1 и Polβ. <sup>32</sup>P-меченую PAR инкубировали в отсутствие и в присутствии белков (взятых в отдельности или вместе) в указанных концентрациях; комплексы белок–PAR отделяли от свободной PAR с помощью электрофореза в нативном 5%-м ПААГ. Комплексы PAR с XRCC1 вымываются в процессе электрофореза из-за плохого вхождения в гель; доля связанного полимера оценивалась по убыли свободной PAR по сравнению с контролем (в отсутствие белков).

с XRCC1 даже в отсутствие его окисления [8]. Главные эффекты окисления XRCC1, показанные в данной работе, — подавление способности белка акцептировать АДФ-рибозу и ингибировать процесс удлинения цепи PAR в PAR-PARP1/2. Негативное влияние окисления на PARилирование XRCC1, необходимое для усиления его взаимодействия с другими белками — участниками BER, может компенсироваться образованием комплекса с Pol $\beta$  как постоянным партнёром. Чрезмерное подавление белком XRCC1 ред стадии элонгации в процессе аутомодификации PARP1/PARP2 может снижать эффективность репарации из-за продления времени жизни PAR-PARP1/2 в комплексе с повреждённой ДНК. Таким образом, наиболее вероятная роль окисления XRCC1 — тонкая регуляция уровней PARилирования белков и их координирующих функций при формировании репарасом.

Первый и второй авторы внесли равный вклад в публикацию.

**Источник финансирования.** Работа поддержана грантом РФФ № 19–14–00107.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abbotts R., Wilson 3rd D.M.* Coordination of DNA Single Strand Break Repair // *Free Radic. Biol. Med.* 2017. V. 107. P. 228–244. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.11.039.
2. *Моор Н.А., Лаврик О.И.* Белок-белковые взаимодействия системы эксцизионной репарации оснований ДНК // *Биохимия*. 2018. Т. 83. В. 4. С. 564–576.
3. *London R.E.* The Structural Basis of XRCC1-Mediate DNA Repair // *DNA Repair (Amst)*. 2015. V. 30. P. 90–103. DOI: 10.1016/j.dnarep.2015.02.005.
4. *Horton J.K., Stefanick D.F., Gassman N.R., et al.* Preventing Oxidation of Cellular XRCC1 Affects PARP-Mediated DNA Damage Responses // *DNA Repair (Amst)*. 2013. V. 12. № 9. P. 774–785. DOI: 10.1016/j.dnarep.2013.06.004.
5. *Horton J.K., Seddon H.J., Zhao M.L., et al.* Role of the Oxidized form of XRCC1 in Protection Against Extreme Oxidative Stress // *Free Radic Biol Med.* 2017. V. 107. P. 292–300. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.02.005.
6. *Masson M., Niedergang C., Schreiber V., et al.* XRCC1 is Specifically Associated with Poly(ADP-ribose) Polymerase and Negatively Regulates Its Activity Following DNA Damage // *Mol. Cell Biol.* 1998. V. 18. P. 3563–3571. DOI: 10.1128/mcb.18.6.3563.
7. *Ohashi Y., Itaya A., Tanaka Y., et al.* Poly(ADP-ribosylation) of DNA Polymerase  $\beta$  *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1986. V. 140. № 2. P. 666–673. DOI: 10.1016/0006-291x(86)90783-7.
8. *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. P. 6009–6022. DOI: 10.1093/nar/gkv569.
9. *Belousova E.A., Vasil'eva I.A., Moor N.A., et al.* Clustered DNA Lesions Containing 5-Formyluracil and AP Site: Repair via the BER System // *PLoS One*. 2013. V. 8. P. e68576. DOI: 10.1371/journal.pone.0068576.
10. *Kumar A., Widen S.G., Williams K.R., et al.* Studies of the Domain Structure of Mammalian DNA Polymerase  $\beta$ . Identification of a Discrete Template Binding Domain // *J. Biol. Chem.* 1990. V. 265. № 4. P. 2124–2131.
11. *Vasil'eva I.A., Anarbaev R.O., Moor N.A., et al.* Dynamic Light Scattering Study of Base Excision DNA Repair Poteins and Their Complexes // *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.* 2019. V. 1867. № 3. P. 297–305. DOI: 10.1016/j.bbapap.2018.10.009.
12. *Alvarez-Gonzalez R., Jacobson M.K.* Characterization of Polymers of Adenosine Diphosphate Ribose Generated *in vitro* and *in vivo* // *Biochemistry*. 1987. V. 26. № 11. P. 3218–3224. DOI: 10.1021/bi00385a042.
13. *Chim N., Harmston C.A., Guzman D.J., et al.* Structural and Biochemical Characterization of the Essential DsbA-like Disulfide Bond Forming Protein from *Mycobacterium Tuberculosis* // *BMC Struct. Biol.* 2013. V. 13. P. 23. DOI: 10.1186/1472-6807-13-23.
14. *Wunderlich M., Glockshuber R.* Redox Properties of Protein Disulfide Isomerase (DsbA) from *Escherichia coli* // *Protein Sci.* 1993. V. 2. № 5. P. 717–726. DOI: 10.1002/pro.5560020503.
15. *Polo L.M., Xu Y., Hornyak P., et al.* Efficient Single-Strand Break Repair Requires Binding to Both Poly(ADP-ribose) and DNA by the Central BRCT Domain of XRCC1 // *Cell Rep.* 2019. V. 26. № 3. P. 573–581.e5. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.12.082.

## ROLE OF OXIDATION OF XRCC1 PROTEIN IN REGULATION OF MAMMALIAN DNA REPAIR PROCESS

**I. A. Vasil'eva, N. A. Moor, Corresponding Member of the RAS O. I. Lavrik**

*Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,  
Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

Received July 22, 2019

Influence of XRCC1 protein oxidation on the modification of proteins catalyzed by poly(ADP-ribose)polymerases (PARP1 and PARP2) has been studied for the first time. XRCC1, PARP1 and PARP2 are responsible for coordination of multistep repair of most abundant DNA lesions, functioning as scaffold proteins. We have shown that the XRCC1 oxidation reduces the efficiency of its ADP-ribosylation and the protein affinity for poly(ADP-ribose). The ADP-ribose modification of various XRCC1 forms is enhanced in the presence of DNA polymerase  $\beta$  (Pol $\beta$ ) capable to form a stable complex with XRCC1. The oxidation suppresses the inhibiting activity of XRCC1 and its complex with Pol $\beta$  towards the automodification of PARP1 and PARP2, that may enhance the efficiency of repair. The results of this study indicate that the oxidation of XRCC1 play a role in fine regulation of poly(ADP-ribose)ylation levels of proteins and their coordinating functions in the DNA repair.

*Keywords:* base excision repair, coordination of DNA repair, XRCC1, PARP1, PARP2, poly(ADP-ribose)ylation of proteins.