

Abstract

Maintaining genome stability is crucial for all living organisms, and an efficient repair machinery has evolved to address numerous DNA lesions encountered daily during evolution. Post-translational modifications, particularly adenosine diphosphate-ribosylation (ADPr), play a pivotal role in signal transduction and repair coordination. ADPr involves the covalent attachment of either a single (mono-ADPr) or a chain (poly-ADPr) of ADP-ribose units on various amino acid side chains. While most PARP family members are known as mono-ADP-ribosylating, PARP1 and PARP2, the main players in DNA damage repair, are studied as poly-ADPr polymerases. Despite the clinical development of PARP inhibitors, the chemical nature of ADPr has posed challenges for in-depth study.

Here, we introduce novel tools to explore this elusive PTM. By exploiting the biological interplay of PARP1 and its cofactor HPF1, we generated a phosphor-guided strategy to precisely obtain ADP-ribosylated peptides, forming the basis for the first site-specific antibodies for studying ADPr. Through the generation of these antibodies, combined with mono- and pan-ADPr antibodies, we discovered that PARP1 and Histone 3 are primarily mono-ADP-ribosylated upon DNA damage. We further elucidated the enzymatic regulation of mono-ADPr, highlighting the significance of PARG and ARH3 in its occurrence and persistence.

Next, we matured our antibodies and combined them with the SpyTag technology to introduce our new high affinity mono-ADPr antibodies. This format enabled optimized approaches, including sensitive immunoblotting and immunofluorescence imaging, as well as high affinity immunoprecipitation. Furthermore, we used this new format to follow ADPr signalling in live cell imaging by introducing our antibody via bead loading to living cells. Utilizing these tools, we confirmed and enhanced our previous findings, revealing a temporal regulation of mono- and poly-ADPr, resulting in distinct signaling waves upon DNA damage. Underscored by multilevel chromatin proteomics, identifying RNF114 as a specific mono-ADPr reader, active in telomere maintenance and DNA repair signaling.

Last, we studied the dynamics of mono-ADPr under various genotoxic stresses and revealed a specific mono-ADPr signature depending on the type of stress and resulting repair responses. Additionally, we investigated the impact of ADPr readers on the PTM itself, discovering that XRCC1, a central hub of single-strand-break repair, modulates the ADPr response. The absence of XRCC1 led to a significant increase in serine-mono-ADPr. Further study identified the linker histone H1 as the primary PARG-independent serine mono-ADPr target.

In conclusion, our findings challenge previous assumptions about ADPr signalling, suggesting a more specialized and complex role in coordinating DNA damage responses.

Zusammenfassung

Die Aufrechterhaltung der Genomstabilität ist für alle lebenden Organismen von entscheidender Bedeutung, und im Laufe der Evolution hat sich ein effizienter Reparaturmechanismus entwickelt, um die zahlreichen DNA-Schäden zu beheben, denen sie täglich ausgesetzt sind. Posttranslationale Modifikationen, insbesondere die Adenosindiphosphat-Ribosylierung (ADPr), spielen eine zentrale Rolle bei der Signalübertragung und der Koordination von Reparaturprozessen. ADPr beinhaltet die kovalente Anlagerung entweder einer einzelnen (Mono-ADPr) oder einer Kette (Poly-ADPr) von ADP-Ribose-Einheiten an verschiedene Aminosäureseitenketten. Während die meisten Mitglieder der PARP-Familie als Mono-ADP-Ribosylase bekannt sind, werden PARP1 und PARP2, die Hauptakteure bei der Reparatur von DNA-Schäden, als Poly-ADPr-Polymerasen untersucht. Trotz der klinischen Entwicklung von PARP-Inhibitoren stellt die chemische Beschaffenheit von ADPr eine Herausforderung für eingehende Untersuchungen dar.

Hier stellen wir neue Werkzeuge zur Erforschung dieser schwer fassbaren PTM vor. Durch die Nutzung der biologischen Wechselwirkung zwischen PARP1 und seinem Cofaktor HPF1 haben wir eine phosphorgeführte Strategie entwickelt, um ADP-ribosylierte Peptide präzise zu gewinnen, was die Grundlage für die ersten aminosäurespezifischen Antikörper zur Untersuchung von ADPr bildet. Durch die Erzeugung dieser Antikörper in Kombination mit Mono- und Pan-ADPr-Antikörpern haben wir entdeckt, dass PARP1 und Histon 3 bei DNA-Schäden in erster Linie mono-ADP-ribosyliert werden. Wir haben die enzymatische Regulation von Mono-ADPr weiter aufgeklärt und dabei die Bedeutung von PARG und ARH3 für dessen Entstehung und Persistenz hervorgehoben.

Anschließend haben wir unsere Antikörper weiterentwickelt und sie mit der SpyTag-Technologie kombiniert, um unsere neuen hochaffinen Mono-ADPr-Antikörper einzuführen. Dieses Format ermöglichte optimierte Verfahren, darunter empfindliche Immunoblotting- und Immunfluoreszenz-Bildgebung sowie hochaffine Immunpräzipitation. Darüber hinaus nutzten wir dieses neue Format, um die ADPr-Signalübertragung im Rahmen der Live-Cell-Bildgebung zu verfolgen, indem wir unseren Antikörper mittels Bead-Loading in lebende Zellen einbrachten. Mithilfe dieser Werkzeuge konnten wir unsere früheren Erkenntnisse bestätigen und vertiefen

und eine zeitliche Regulation von Mono- und Poly-ADPr aufdecken, die bei DNA-Schäden zu unterschiedlichen Signalwellen führt. Untermuert durch mehrstufige Chromatin-Proteomik wurde RNF114 als spezifischer Mono-ADPr-Leser identifiziert, der bei der Telomererhaltung und der DNA-Reparatur-Signalübertragung aktiv ist.

Zuletzt untersuchten wir die Dynamik von Mono-ADPr unter verschiedenen genotoxischen Belastungen und konnten eine spezifische Mono-ADPr-Signatur nachweisen, die von der Art der Belastung und den daraus resultierenden Reparaturreaktionen abhängt. Darüber hinaus untersuchten wir den Einfluss von ADPr-Lesern auf die PTM selbst und stellten fest, dass XRCC1, ein zentraler Knotenpunkt der Reparatur von Einzelstrangbrüchen, die ADPr-Reaktion moduliert. Das Fehlen von XRCC1 führte zu einem signifikanten Anstieg von Serin-mono-ADPr. Weitere Untersuchungen identifizierten das Linker-Histon H1 als primäres PARG-unabhängiges Serin-mono-ADPr-Ziel.

Zusammenfassend stellen unsere Ergebnisse bisherige Annahmen zur ADPr-Signalübertragung in Frage und deuten auf eine spezialisiertere und komplexere Rolle bei der Koordination von DNA-Schadensreaktionen hin.