

На правах рукописи

АЛЕМАСОВА Елизавета Эдуардовна

**МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ Y-БОКС-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК 1:  
ИССЛЕДОВАНИЕ ЕГО РОЛИ В РЕПАРАЦИИ ДНК**

03.01.04 – биохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Новосибирск – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН)

Научные руководители: **Лаврик Ольга Ивановна**, д.х.н., чл.-корр. РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

**Пестряков Павел Ефимович**, к.х.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Официальные оппоненты: **Кантидзе Омар Леванович**, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена РАН

**Гуляева Людмила Фёдоровна**, д.б.н., профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики»

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики РАН

Защита состоится \_\_\_\_\_ 2018 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 003.045.01 при ФБГУН Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу 630090, г. Новосибирск, пр. акад. Лаврентьева, 8.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте [www.niboch.nsc.ru](http://www.niboch.nsc.ru)

Автореферат разослан \_\_\_\_\_ 2018 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 003.045.01,  
к.х.н., доцент



Коваль В. В.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Эксцизионная репарация оснований ДНК (base excision repair, BER) является одной из ключевых систем исправления повреждений, возникающих в ДНК. Основная схема BER включает этапы распознавания и удаления поврежденного основания, расщепление образующегося апуринового/апиримидинового сайта (AP-сайта), заполнение брешы и лигирование разрыва ДНК. Молекулярные механизмы, обеспечивающие эффективность и точность процесса BER, на настоящий момент изучены недостаточно. Изучение механизмов регуляции репарации ДНК, в том числе, системы BER, необходимо для разработки эффективных стратегий терапии онкологических заболеваний, особенно в тех случаях, когда лечение затруднено химиорезистентностью клеток опухоли.

Ключевым механизмом регуляции системы BER и мишенью противоопухолевой терапии является процесс поли(АДФ-рибозил)ирования, катализируемый поли(АДФ-рибоза)-полимеразой 1 (PARP1). Считается, что синтез РНК-подобного полимера поли(АДФ-рибозы) (PAR), индуцируемый повреждением ДНК, необходим для регуляции BER на различных этапах репарации повреждения. Кроме того, в настоящее время рассматриваются другие возможные механизмы регуляции, и предполагается участие в этом процессе неканонических белков. Один из таких белков – мультифункциональный Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1). К началу выполнения данной работы знания о роли YB-1 в регуляции BER были достаточно ограниченными. Так, было показано, что имеющий в норме цитоплазматическую локализацию YB-1 способен переходить в ядро при генотоксическом воздействии на клетки (Lasham A., et al., 2003). В некоторых случаях индуцированная генотоксическим стрессом транслокация YB-1 была связана с посттрансляционными модификациями этого белка – фосфорилированием по Ser102 (Gunasekaran V. P., et al., 2017) или частичным протеолизом 20S протеасомой с образованием специфичной ядерной формы YB-1 – YB-1(1-219) (Sorokin A. V., et al., 2005). При этом роль YB-1 и его ядерной локализации в ответе клетки на повреждение ДНК оставалась неясной. Считалось, что основные функции YB-1 в ядре сопряжены с его участием в регуляции транскрипции. В пользу возможной роли YB-1 в регуляции репарации ДНК свидетельствовали повышенное сродство этого белка к поврежденной ДНК по сравнению с неповрежденной, а также его способность физически взаимодействовать с рядом белков репарации, модулируя их активность (Елисеева И. А. с соавт., 2011). Практически отсутствовала информация о возможном участии YB-1 в процессе поли(АДФ-рибозил)ирования. Единственным фактом, указывающим на функциональную взаимосвязь YB-1 и PARP1, была идентификация YB-1

среди белков, взаимодействующих с PAR (Gagné J. P., et al., 2008).

В настоящей работе нами была исследована роль белка YB-1 в регуляции активности ряда ферментов BER (APE1, NEIL1 и pol  $\beta$ ), а также участие YB-1 в реакции синтеза PAR, катализируемой PARP1. Было установлено, что YB-1 способен не только формировать белок-белковые взаимодействия с ферментами системы BER, но и оказывать непосредственное влияние на активность этих белков. Была открыта новая посттрансляционная модификация YB-1, которая может происходить в условиях ДНК-повреждающего воздействия. Получены данные об участии YB-1 в регуляции активности PARP1 на различных этапах процесса поли(АДФ-рибозил)ирования. На основании полученных результатов предложены возможные молекулярные механизмы, лежащие в основе химиорезистентности клеток, сверхэкспрессирующих YB-1.

**Целью работы** являлось исследование роли мультифункционального белка YB-1 в механизмах эксцизионной репарации оснований ДНК (BER). В ходе работы планировалось решить следующие **задачи**:

- 1) определить роль YB-1 в непосредственной регуляции активностей ферментов BER;
- 2) исследовать функции YB-1 в ключевой регуляторной системе BER – процессе поли(АДФ-рибозил)ирования, катализируемом ферментами PARP1 и PARP2.

**Научная новизна полученных результатов.** В рамках работы зарегистрированы и количественно охарактеризованы физические взаимодействия многофункционального белка YB-1 с рядом ферментов системы BER. Показана способность белка YB-1 напрямую регулировать процесс репарации AP-сайтов в ДНК: YB-1 стимулирует расщепление AP-сайтов, расположенных в ДНК-дуплексах, и ингибирует расщепление AP-сайтов, локализованных в однонитевых фрагментах ДНК. Также в работе впервые показано взаимодействие белка YB-1 с ключевым регуляторным белком системы BER – ферментом PARP1. Открыта новая посттрансляционная модификация YB-1 – поли(АДФ-рибозил)ирование, катализируемое PARP1 в присутствии поврежденной ДНК. Впервые показано, что YB-1 способен формировать гетеромерные комплексы с PARP1 и ДНК, регулируя активность этого фермента на начальных этапах реакции поли(АДФ-рибозил)ирования. В том числе, показано, что белок YB-1 выраженно стимулирует синтез PAR и может влиять на эффективность действия ингибиторов PARP1. Кроме того, на основании полученных результатов предложен возможный механизм влияния YB-1 на активность PARP1. В частности, установлено, что синтез PAR индуцирует диссоциацию

комплексов YB-1-ДНК и нековалентное связывание YB-1 с полимерами PAR, которое способствует увеличению времени жизни каталитически компетентного комплекса PARP1 с повреждённой ДНК и защищает полимер PAR от деградации поли(АДФ-рибоза)-гликогидролазой (PARG). Наконец, в работе впервые показана возможность регуляции реакции поли(АДФ-рибозил)ирования продуктом реакции (PAR) в присутствии YB-1.

**Практическая значимость работы.** Два десятилетия назад была обнаружена зависимость повышенного уровня YB-1, его ядерной локализации и развития опухолевого фенотипа клеток (Bargou R. C., et al., 1997). Эти изменения достигают максимума в агрессивных опухолях, устойчивых к химиопрепаратам, и на последних стадиях заболевания; при этом они настолько ярко выражены, что YB-1 предложен в качестве молекулярного маркера диагностики определённых типов рака (в частности, рака молочной железы) (Dolfini D., Mantovani R., 2013). Согласно многочисленным данным, белок YB-1 снижает чувствительность клеток опухоли к химиопрепаратам различных классов, значительно уменьшая вероятность излечения без рецидивов (То К., et al., 2010).

Результаты, полученные автором, имеют высокий потенциал для понимания механизмов химиорезистентности клеток опухолей при лечении онкологических заболеваний. Установлено непосредственное участие онкобелка YB-1 и его специфичной ядерной формы YB-1(1-219) в регуляции активностей ферментов BER, что может играть важную роль в выживаемости раковых клеток в условиях химио- и радиотерапии. В настоящей работе показано, что YB-1 является эффектором PARP1, способным интерферировать с действием ингибитора PARP1 олапариба, используемого в клинике.

**Методы исследования.** Исследования выполнены с использованием рекомбинантных аналогов белков человека и модельных ДНК-структур, имитирующих повреждённую ДНК. В работе применены такие методы, как выделение и очистка рекомбинантных белков, электрофоретическое разделение белков и олигонуклеотидов, метод задержки в геле, флуоресцентное титрование, иммунодетекция и метод флуоресцентной спектроскопии.

#### **Основные положения, выносимые на защиту.**

1. YB-1 взаимодействует с ферментами APE1, NEIL1, pol  $\beta$ , PARP1 и PARP2. Величины констант, характеризующие прочность белок-белковых комплексов, указывают на формирование им слабых взаимодействий, свойственных регуляторным белкам.

2. YB-1 стимулирует активность APE1 и NEIL1 по отношению к AP-сайтам в ДНК-дуплексах и ингибирует расщепление этими ферментами AP-сайтов, локализованных в одностранных фрагментах ДНК. YB-1 также взаимодействует с pol  $\beta$ , ингибируя dRP-лиазную активность фермента.
3. YB-1 формирует гетеромерный комплекс с PARP1 и поврежденной ДНК, выступая в качестве преимущественной мишени для ковалентной модификации молекулой поли(АДФ-рибозы) и регулируя активность PARP1. Взаимодействия YB-1 и PARP1 внутри комплекса на начальных этапах реакции регулируются стехиометрией YB-1:ДНК, а также структурой ДНК.
4. YB-1 стимулирует синтез поли(АДФ-рибозы) и снижает эффективность действия ингибиторов PARP1 различной природы. YB-1 способен стимулировать активность PARP1 в отсутствие ионов  $Mg^{2+}$ , для чего необходим его С-концевой домен.
5. YB-1 обладает высоким сродством к полимеру PAR. Синтез поли(АДФ-рибозы) индуцирует диссоциацию комплексов YB-1-ДНК и локализацию YB-1 на молекулах PAR. Нековалентное связывание PAR белком YB-1 способствует увеличению времени пребывания PARP1 в каталитически активном комплексе с ДНК и защищает PAR от деградации ферментом PARG.
6. Продукт реакции, поли(АДФ-рибоза), в присутствии YB-1 может выступать в качестве регулятора процесса поли(АДФ-рибозил)ирования.

**Личный вклад диссертанта.** Представленные в диссертационной работе экспериментальные данные получены лично автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов.

**Публикации и апробация работы.** По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ в рецензируемых журналах. Результаты работы были представлены на следующих международных и российских конференциях: 14th FEBS Congress Young Scientists Forum (Париж, 2014), VII International Meeting From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies (Рига, 2014), The Fourth Meeting of the CNRS Laboratoire International Associé NUCPROT (Новосибирск, 2015), VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» (Новосибирск, 2015), 10th Quinquennial Conference on Responses to DNA damage: from molecule to disease (Эгмонд-ан-Зее, 2016), Международной конференции «Химическая биология-2016», посвященной 90-летию юбилею академика Д. Г. Кнорре (Новосибирск, 2016), The Tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology (Новосибирск, 2016), 25th Wilhelm Bernard

Workshop on the cell nucleus (Нижний Новгород, 2017) и 42nd FEBS Congress (Иерусалим, 2017).

**Структура и объём работы.** Диссертация изложена на 158 страницах машинописного текста, состоит из введения, трёх глав, заключения, выводов, списка литературы и содержит 4 таблицы и 43 рисунка.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### 1. Исследование участия белка YB-1 в непосредственной регуляции системы BER

#### 1.1. Физические взаимодействия YB-1 с белками BER

Для исследования взаимодействий белка YB-1 с ферментами BER использовали метод флуоресцентного титрования. Мечение белков по N-концевой аминокислоте проводили по ранее разработанной методике (Moog N. A., et al., 2015). По изменению интенсивности флуоресценции белка, несущего FAM-группу (FAM-белка), в присутствии белка-партнера в реакционной смеси, судили о наличии белок-белковых взаимодействий, изменяющих локальное окружение флуорофора. Полученные кривые титрования аппроксимировали четырехпараметрическим уравнением:  $F = F_0 + (F_\infty - F_0) / [1 + (EC_{50}/C)^n]$ , где  $F$  – интенсивность флуоресценции раствора FAM-белка при конкретной концентрации ( $C$ ) белка-партнера;  $F_0$  – интенсивность флуоресценции при  $C = 0$ ;  $F_\infty$  – интенсивность флуоресценции раствора FAM-белка при насыщении белком-партнером;  $EC_{50}$  – концентрация белка-партнера, при которой  $F - F_0 = (F_\infty - F_0)/2$ ;  $n$  – коэффициент Хилла. Для картирования белковых доменов, отвечающих за взаимодействие, ряд экспериментов был выполнен с использованием мутантных форм белков: NΔ35APE1, лишенной 35 а.о. с N-конца, YB-1(1-219) – укороченной с C-конца (ядерной) формы YB-1, и p24 – ДНК-связывающего домена PARP1. Для исследования влияния ДНК на физические взаимодействия белков часть измерений была проведена в присутствии активированной ДНК. Основные результаты исследования приведены в таблице 1.

**Таблица 1.** Количественные характеристики взаимодействия YB-1 и Δ105YB-1 с белками BER, измеренные методом флуоресцентного титрования.  $EC_{50}$  – концентрация белка-партнера, при которой  $F - F_0 = (F_\infty - F_0)/2$ .

FAM-белок	Белок-партнёр	EC <sub>50</sub> , нМ	
		- ДНК	+ ДНК
FAM-APE1	YB-1	54 ± 5	-

FAM- $\Delta$ 35APE1	YB-1	110 $\pm$ 12	-
FAM-YB-1	NEIL1	810 $\pm$ 70	-
FAM-YB-1(1-219)	NEIL1	нет	-
FAM-YB-1	pol $\beta$	670 $\pm$ 60	660 $\pm$ 80
FAM-YB-1(1-219)	pol $\beta$	650 $\pm$ 90	630 $\pm$ 90
FAM-YB-1	PARP1	460 $\pm$ 65	470 $\pm$ 89
FAM-YB-1(1-219)	PARP1	510 $\pm$ 65	310 $\pm$ 28
FAM-YB-1	p24	840 $\pm$ 80	480 $\pm$ 62
FAM-YB-1(1-219)	p24	980 $\pm$ 100	330 $\pm$ 45
FAM-YB-1	PARP2	340 $\pm$ 42	340 $\pm$ 35
FAM-YB-1(1-219)	PARP2	420 $\pm$ 48	320 $\pm$ 32
FAM-YB-1	YB-1	нет	360 $\pm$ 42
FAM-YB-1(1-219)	YB-1(1-219)	нет	310 $\pm$ 37

Таким образом, в настоящей работе впервые были показаны прямые взаимодействия YB-1 с белками PARP1, PARP2 и NEIL1. Метод также позволил детектировать и количественно охарактеризовать связывание YB-1 с ферментами APE1 и pol  $\beta$ , ранее установленное в работах (Sengupta S., et al., 2011; Das S., et al., 2007). Константы, характеризующие сродство YB-1 к белкам NEIL1, pol  $\beta$ , PARP1 и PARP2, примерно на порядок превышают параметры связывания, ранее определённые для различных пар основных факторов BER (Moore N. A., et al., 2015). Единственным исключением является низкое значение  $EC_{50}$ , определённое для пары мультифункциональных белков YB-1-APE1 (табл. 1). Увеличение интенсивности флуоресценции при добавлении pol  $\beta$ , PARP1 или PARP2 к предформированному комплексу YB-1-ДНК указывает на формирование тройных комплексов YB-1-(белок-партнёр)-ДНК. Пониженное сродство ДНК-связывающего фрагмента PARP1 (p24) к YB-1 по сравнению с полноразмерным белком свидетельствует об участии других доменов PARP1 во взаимодействии с YB-1. Наконец, из экспериментов с ядерной формой YB-1 – YB-1(1-219) – можно заключить, что: 1) физическое взаимодействие YB-1 и NEIL1 осуществляется, главным образом, посредством С-концевого фрагмента YB-1 (220-324 а.о.), поскольку нам не удалось детектировать связывание YB-1(1-219) и NEIL1; 2) С-концевой фрагмент YB-1 не влияет на связывание с pol  $\beta$ , что согласуется с данными других исследователей (Das S., et al., 2007); 3) взаимодействие YB-1(1-219) с PARP1 (особенно с его ДНК-связывающим доменом) и PARP2 повышается в присутствии повреждённой ДНК.

## 1.2. Функциональные взаимодействия YB-1 и APE1

AP-эндонуклеаза 1 (APE1) является ключевым ферментом BER, осуществляющим превращение до 95% AP-сайтов, возникающих при повреждении клеточной ДНК (Khodyreva S. N., Lavrik O. I., 2011). N-концевая часть APE1 (~1-35 аминокислотные остатки) имеет неупорядоченную структуру и выполняет регуляторную функцию в AP-эндонуклеазной реакции, катализируемой C-концевым каталитическим доменом белка (Fantini D., et al., 2010). Для осуществления AP-эндонуклеазной реакции ферменту необходимо присутствие ионов магния, принимающих участие в стабилизации структуры активного центра APE1 и фермент-субстратного комплекса, а также непосредственно в катализе (Miroshnikova A. D., et al., 2016).

Мы показали, что YB-1 способен стимулировать активность APE1 по расщеплению AP-сайтов, локализованных в двухцепочечных ДНК, и ингибировать активность фермента при расщеплении однонитевых AP-сайт-содержащих ДНК-структур (рис. 1).

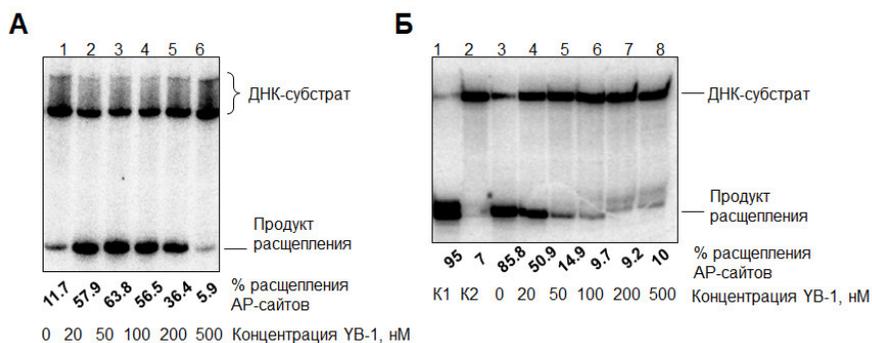


Рис. 1. Влияние YB-1 на активность APE1 при расщеплении AP-сайтов, расположенных в двухцепочечной (А) и одноцепочечной (Б) ДНК. Радиоавтографы ПААГ, содержащих 7 М мочевины, в которых проводили разделение продуктов реакции расщепления ДНК, несущей радиоактивную метку. (А): 50 нМ дцДНК, 0.25 нМ APE1 (10 мин при 37°C); (Б): 50 нМ оцДНК, 500 нМ APE1 (30 мин при 37°C). K1 – контроль выщепления урацила ферментом Ung; K2 – контроль неферментативной деградации AP-сайтов.

В соответствии с нашими результатами, удаление N-концевого фрагмента APE1 (1-35 а.о.) понижает прочность комплекса APE1 и YB-1 (табл. 1). В эксперименте с мутантной формой APE1 мы обнаружили, что нарушение взаимодействия YB-1 с этой регуляторной областью приводит к исчезновению эффекта стимуляции (рис. 2А).

Следует отметить, что влияние YB-1 на активность APE1 было

наиболее выражено при низкой концентрации ионов магния (но в отсутствие ЭДТА). YB-1, лишённый положительно заряженного С-концевого домена (мутантная форма AP-CSD, рис. 2Б), не стимулировал активность APE1. Можно предположить, что YB-1 способен участвовать в стабилизации APE1 и/или фермент-субстратного комплекса, однако не влияет на каталитическую функцию APE1. В пользу этого предположения свидетельствуют значения констант  $K_M$  и  $k_{cat}$ , найденные для AP-эндонуклеазной реакции в отсутствие YB-1 ( $2.7 \pm 0.2$ )·10<sup>-7</sup> М и (2.5 ± 0.2) сек<sup>-1</sup>, соответственно ( $r^2 = 0.98$ ); и в присутствии YB-1 (60 нМ) – (1.4 ± 0.2)·10<sup>-7</sup> М и (2.6 ± 0.3) сек<sup>-1</sup>, соответственно ( $r^2 = 0.98$ ).

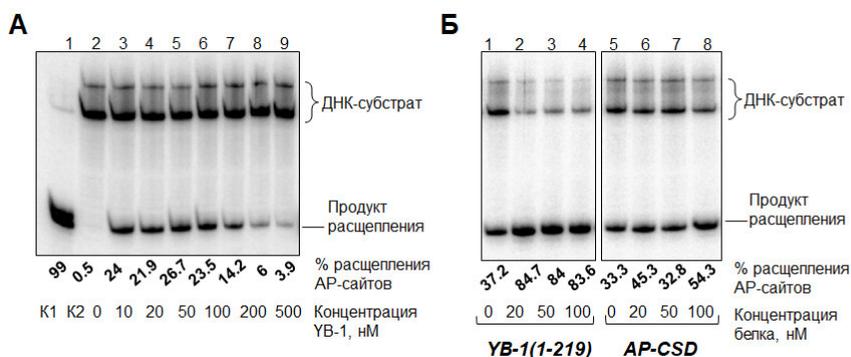


Рис. 2. Для стимуляции активности APE1 белком YB-1 необходим N-концевой фрагмент APE1 (1-35 а.о.) и проксимальная часть С-концевого домена YB-1 (129-219 а.о.). Радиоавтографы ПААГ, содержащих 7 М мочевины, в которых проводили разделение продуктов реакции расщепления ДНК, несущей радиоактивную метку. (А): 50 нМ дцДНК, 0.1 нМ NΔ35-APE1 (5 мин при 37°C); (Б): 50 нМ дцДНК, 0.25 нМ APE1 (10 мин при 37°C). K1 – контроль выщепления урацила ферментом Ung; K2 – контроль неферментативной дегградации AP-сайтов.

### 1.3. Функциональные взаимодействия YB-1 и NEIL1

Репарация AP-сайтов в клетке преимущественно осуществляется по «каноническому» пути BER с участием APE1. Однако в некоторых случаях может реализоваться «дополнительный» путь, инициируемый расщеплением повреждённой цепи ДНК AP-лиазной активностью бифункциональных ДНК-гликозилаз, например, NEIL1.

Мы установили, что YB-1 стимулирует AP-лиазную активность NEIL1 в отношении AP-сайтов, расположенных в ДНК-дуплексах, и ингибирует активность фермента при расщеплении AP-сайтов в одноцепочечных фрагментах ДНК (рис. 3).

В отличие от влияния YB-1 на активность APE1 по отношению к AP-сайтам в ДНК-дуплексах (рис. 1A), стимуляция белком YB-1 AP-лиазной активности фермента NEIL1 носит линейный, а не колоколообразный характер (рис. 3A). Это может быть обусловлено тем, что для ферментов APE1 и NEIL1 наиболее предпочтительными являются ДНК-субстраты с отличающейся локальной вторичной структурой. Исходя из данных, свидетельствующих о предпочтительном связывании белком YB-1 одноцепочечных ДНК-субстратов по сравнению с двуцепочечными, а также способности этого белка понижать температуру плавления двойных спиралей (Zasedateleva O. A., et al., 2002), можно предположить, что взаимодействуя с

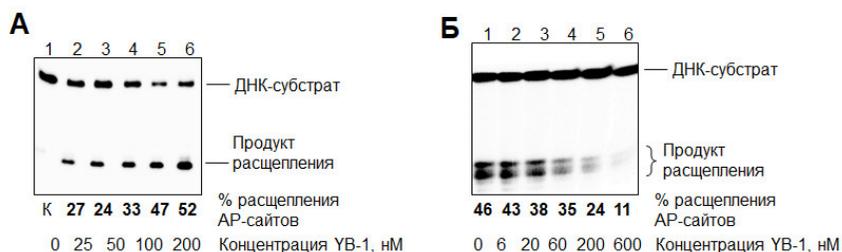


Рис. 3. Влияние YB-1 на активность NEIL1 при расщеплении AP-сайтов в двухцепочечной (A) и одноцепочечной (Б) ДНК. Радиоавтографы ПААГ, содержащих 7 М мочевины, в которых проводили разделение продуктов реакции расщепления ДНК, несущей радиоактивную метку. (A): 40 нМ дцДНК, 25 нМ NEIL1 (5 мин при 37°C); (Б): 40 нМ оцДНК, 25 нМ NEIL1 (10 мин при 37°C). К – контроль неферментативной деградации AP-сайтов.

AP-ДНК, YB-1 способствует локальному плавлению дуплекса. В отличие от APE1, активность которой по отношению к AP-сайтам в ДНК-дуплексах значительно выше, чем к AP-сайтам, расположенным в одонитевых ДНК-структурах (Marenstein D. R., et al., 2004), NEIL1 более эффективно расщепляет AP-сайты в одноцепочечных и частично некомплементарных фрагментах ДНК (Dou H., et al., 2003).

## 2. Исследование участия YB-1 в ключевой регуляторной системе BER – процессе поли(АДФ-рибозил)ирования

### 2.1. YB-1 формирует гетеромерный комплекс с PARP1 и ДНК

Одним из свидетельств в пользу формирования тройного комплекса YB-1-PARP1-ДНК являются данные, полученные методом флуоресцентного титрования (раздел 1.1). Образование гетеромерного комплекса YB-1 с PARP1 и ДНК также можно детектировать с использованием ДНК, несущей

радиоактивную метку (методом задержки в геле, рис. 4А) либо флуоресцентную метку (по изменению анизотропии флуоресценции FAM-ДНК при связывании с ней белков, методом флуоресцентной спектроскопии, рис. 4Б).

Согласно литературным данным, аутомодификация PARP1 может происходить как межмолекулярная модификация внутри гомодимера PARP1 (Steffen J. D., et al., 2016). Можно предположить, что замещение одной из молекул димера белком YB-1 с формированием гипотетического гетеродимера YB-1-PARP1 на ДНК может служить для регуляции активности PARP1 на ранних этапах синтеза поли(АДФ-рибозы).

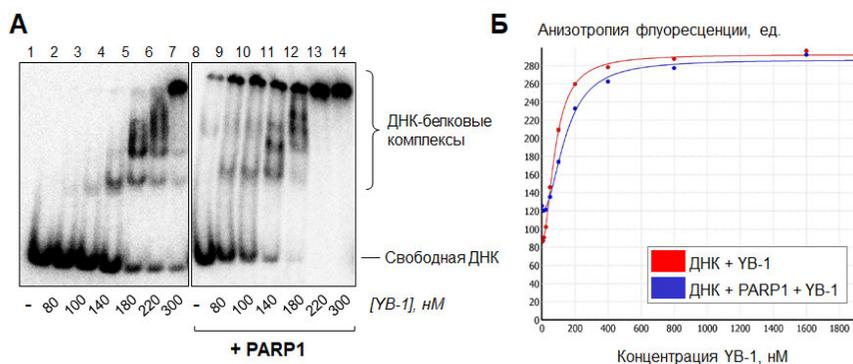


Рис. 4. А. Радиоавтограф нативного ПААГ, в котором проводили разделение образцов, содержащих 0 либо 200 нМ PARP1, 100 нМ несущую радиоактивную метку дцДНК и 0-300 нМ YB-1. Б. Исследование формирования комплексов YB-1-PARP1-ДНК методом флуоресцентной спектроскопии. Реакционные смеси содержали 200 нМ PARP1, 100 нМ FAM-дцДНК и 0-1000 нМ YB-1.

## 2.2. Новая посттрансляционная модификация YB-1

С использованием метода флуоресцентной спектроскопии также можно исследовать взаимодействие YB-1 и PARP1 в режиме реального времени. Детекция процесса поли(АДФ-рибозил)ирования в этом случае осуществляется непрямым образом по уменьшению анизотропии FAM-ДНК, вызванному диссоциацией модифицированных белков из комплекса с ДНК после добавления НАД<sup>+</sup> в реакционную смесь (Kurgina T. A., et al., 2018). Мы обнаружили, что добавление НАД<sup>+</sup> приводит к диссоциации комплексов YB-1-PARP1-ДНК, причём освобождение ДНК от белков замедлено в присутствии высоких концентраций YB-1 (рис. 5А). С использованием НАД<sup>+</sup>, несущего радиоактивную метку, было установлено, что YB-1 поли(АДФ-рибозил)ируется, а при избытке YB-1 этот белок является

преимущественной мишенью для модификации (рис. 5В). При этом уровень автополи(АДФ-рибозил)ирования PARP1 понижается, что может быть обусловлено конкуренцией YB-1 и PARP1 за поли(АДФ-рибозу) (рис. 5В, сравнить дор. 1-4 и 9-12 для PARP1\*).

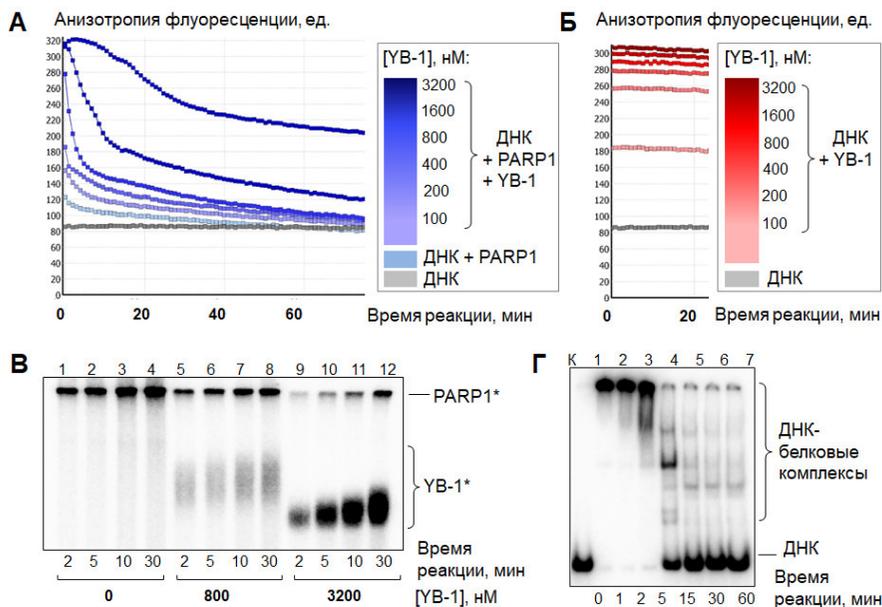


Рис. 5. А. Реакционные смеси содержали 200 нМ PARP1, 100 нМ FAM-дцДНК, 0-3200 нМ YB-1 и 500  $\mu$ М НАД<sup>+</sup>. Б. Контроль. (То же, без PARP1). Образцы исследовали методом флуоресцентной спектроскопии в режиме реального времени (А, Б) либо с использованием НАД<sup>+</sup>, несущего радиоактивную метку (В, представлен радиоавтограф SDS-ПААГ). PARилированные YB-1 и PARP1 обозначены (\*). Г. Контроль. Исследование диссоциации комплекса YB-1-PARP1-ДНК в ходе поли(АДФ-рибозил)ирования методом задержки в геле. Реакционные смеси содержали 40 нМ дцДНК, несущую радиоактивную метку, 100 нМ PARP1, 400 нМ YB-1 и 500  $\mu$ М немеченый НАД<sup>+</sup>. К – контроль ДНК.

Новая посттрансляционная модификация YB-1 была подтверждена также по изменению подвижности белка в SDS-ПААГ (рис. 6А), методом иммунодетекции с использованием антител специфичных к YB-1 и PAR (рис. 6Б) и обработки продуктов реакции поли(АДФ-рибозил)ирования, несущих радиоактивную метку, ферментом поли(АДФ-рибоза)-гликогидролазой (PARG) (рис. 6В).

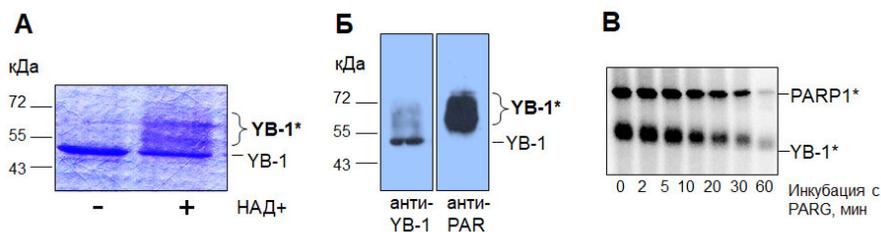


Рис. 6. Доказательства поли(АДФ-рибозил)ирования YB-1. А. SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(АДФ-рибозил)ирования YB-1 и PARP1 (окраска Кумасси). Б. Иммунодетекция поли(АДФ-рибозил)ированного YB-1 с использованием антител, специфичных к YB-1 (первая мембрана) и поли(АДФ-рибозе) (вторая мембрана). В. Радиоавтограф SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции деградации поли(АДФ-рибозы), присоединённой к белкам PARP1 и YB-1, ферментом PARG.

### 2.3. Влияние YB-1 на активность PARP1

Выступая в качестве эффективного акцептора PAR, YB-1 существенно повышает суммарный выход реакции поли(АДФ-рибозил)ирования (рис. 5Б, рис. 7А (сравнить дор. 3 и 4), 7Б). Напротив, низкий уровень модификации

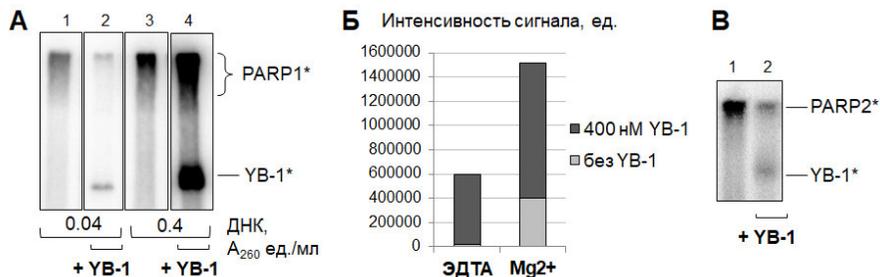


Рис. 7. Влияние YB-1 на активность PARP1 и PARP2. А. Радиоавтограф SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(АДФ-рибозил)ирования PARP1, выполненной в отсутствие или в присутствии 400 нМ YB-1, с использованием НАД+, несущего радиоактивную метку, и различных концентраций ДНКакт. Б. Влияние ЭДТА (10 мМ), ионов магния (5 мМ) и белка YB-1 (400 нМ) на суммарную активность PARP1 в присутствии 100 нМ дцДНК. В. Модификация YB-1 ферментом PARP2. Для активации PARP2 использовали ДНКакт.

YB-1 всегда коррелирует с ингибированием активности поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (рис. 7А (дор. 1 и 2), 7В). Следует отметить, что низкая каталитическая активность PARP (1 или 2) и неэффективная модификация

YB-1 связаны *не только прямой, но и обратной зависимостью*, поскольку поли(АДФ-рибозил)ирование YB-1, если оно имеет место, приводит к диссоциации этого белка из комплекса с ДНК (рис. 5А, 5Г). Напротив, немодифицированный YB-1 обладает достаточно высоким сродством к ДНК (Kretov D. A., et al., 2015) и может ингибировать активность PARP1 из-за конкуренции с ферментом за связывание с ДНК, необходимое для формирования каталитически активной конформации PARP1 (или каталитически активного гомодимера PARP1).

Особый интерес представляет тот факт, что YB-1 способен не только повышать общий уровень PAR, синтезируемой в реакции, но и стимулировать аутомодификацию PARP1 (рис. 7А, дор. 3 и 4). Возможный механизм YB-1-опосредованной стимуляции автоPARилирования PARP1 рассматривается далее (раздел 2.4).

#### *2.4. Нековалентное связывание YB-1 с поли(АДФ-рибозой) и его роль на поздних этапах реакции поли(АДФ-рибозил)ирования*

Ранее было установлено, что повреждённая ДНК сама по себе не является эффективным кофактором PARP1, и для активации фермента требуются дополнительные эффекторы (Kun E., et al., 2004). К настоящему моменту показано, что активность PARP1 в присутствии ДНК стимулируют катионы, полиамины и ряд основных белков (гистон H1 (Kun E., et al., 2004) (pI = 10.84), HMGN1 (Masaoka A., et al., 2012) (pI = 9.6), HMG2L1 (Kalisch T., 2013 (Thesis)) (pI = 9.35) и DDB2 (Robu M., et al., 2013) (pI = 9.56)). Все эти белки идентифицированы как мишени PARилирования, а для некоторых из них установлена способность нековалентно связывать поли(АДФ-рибозу) или физически взаимодействовать с PARP1. Кроме того, общей чертой всех вышеупомянутых эффекторов PARP1 является положительный заряд. Можно предположить, что действие этих агентов направлено на стабилизацию PARP1 в «каталитически компетентном» комплексе с ДНК посредством их связывания с растущим полимером PAR и экранирования отрицательного заряда этой молекулы.

Для YB-1 также характерна необычно высокая изоэлектрическая точка (pI(YB-1) = 9.87). Как можно судить из значений pI укороченных форм YB-1, рассчитанных с использованием программы ExPASy ProtParam tool – pI = 9.84 для ядерной формы YB-1(1-219) и pI = 6.58 для мутанта, лишённого С-концевого домена (AP-CSD) – положительный заряд YB-1 локализован в С-концевом домене белка (CTD). Мы показали, что AP-CSD действительно не способен стимулировать активность PARP1 (рис. 8А). Кроме того, YB-1 способен нековалентно связывать поли(АДФ-рибозу), которая образуется в ходе реакции (рис. 8Б).

Следует отметить, что комплексы YB-1 с PAR, несущей

радиоактивную метку (YB-1-PAR\*, рис. 8Б), детектировали несмотря на присутствие в реакционной смеси избытка ДНК, используемой для активации PARP1. Дополнительным подтверждением данного феномена является тот факт, что YB-1 ингибирует активность PARG (рис. 8В).

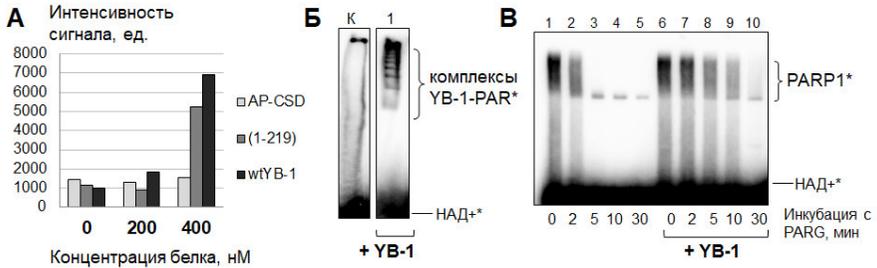


Рис. 8. А. Влияние мутантных форм YB-1 на активность PARP1. Б. Исследование комплексов YB-1 и PAR\* методом задержки в геле, К – суммарный препарат PAR\* 1 – PAR\* после 5 мин инкубации с 400 нМ YB-1. В. Дegrаdация PAR, присоединенных к PARP1, ферментом PARG. (1-5) – без YB-1; (6-10) – в присутствии 400 нМ YB-1.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что синтез поли(АДФ-рибозы) в ходе реакции может индуцировать диссоциацию комплексов YB-1-ДНК и связывание YB-1 с молекулами PAR. Можно предположить, что в результате такого взаимодействия YB-1 способен увеличивать время жизни каталитически активного комплекса PARP1-ДНК, дестабилизированного на поздних этапах реакции из-за аутомодификации PARP1. Для проверки этой гипотезы, нами был выполнен следующий эксперимент (рис. 9). Реакцию аутомодификации PARP1 проводили в условиях отсутствия катионов магния (10 мМ ЭДТА) и белков-эффекторов

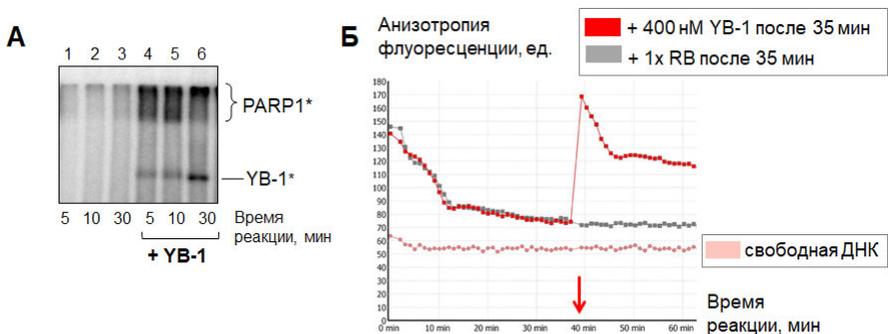


Рис. 9. А. Реакцию автополи(АДФ-рибозил)ирования PARP1 проводили с

использованием НАД<sup>+</sup>, несущего радиоактивную метку, в присутствии 10 мМ ЭДТА до выхода на плато. Затем в образцы добавляли либо 1х реакционный буфер (RB) в качестве контроля (дор. 1-3) либо YB-1 до конечной концентрации 400 нМ (дор. 4-6) и дополнительно инкубировали 5-30 мин при 37°C. Б. «Реактивация» PARP1 белком YB-1, исследованная в режиме реального времени (методом флуоресцентной спектроскопии). После 35 мин реакции в идентичные образцы добавляли либо 1х RB в качестве контроля, либо YB-1 до конечной концентрации 400 нМ. Момент добавления RB / YB-1 показан стрелкой. Нижняя линия показывает уровень анизотропии флуоресценции свободной ДНК.

до тех пор, пока накопление продуктов реакции не прекратилось в результате диссоциации поли(АДФ-рибозил)ированных молекул PARP1 из каталитически активных комплексов с ДНК. Затем в реакционные смеси добавляли либо 1х реакционный буфер, либо YB-1 до конечной концентрации 400 нМ и дополнительно выдерживали образцы в течение 30 мин при температуре 37°C. Действительно, в присутствии YB-1 можно было наблюдать «реактивацию» PARP1, отсутствующую в контроле (рис. 9А). Связывание YB-1 с PARP1\* и ДНК с последующей «реактивацией» процесса поли(АДФ-рибозил)ирования также детектировали в режиме реального времени с использованием метода флуоресцентной спектроскопии (рис. 9Б).

### *2.5. Поли(АДФ-рибоза) как регулятор реакции поли(АДФ-рибозил)ирования*

Для исследования влияния свободной поли(АДФ-рибозы) на активность PARP1, был получен препарат PAR, очищенный от примеси ДНК. Мы показали, что добавление различных концентраций PAR в реакционную смесь не влияет на активность PARP1, проявляемую ферментом в присутствии поврежденной ДНК (рис. 10А, дор. 1-5). Однако если в образце присутствовал также YB-1, интенсивность синтеза PAR в реакции и уровни модификации обоих белков существенно различались в зависимости от концентрации экзогенной поли(АДФ-рибозы) (рис. 10А, дор. 6-10).

Можно предположить, что наблюдаемый феномен усиления функциональных взаимодействий белков YB-1 и PARP1 в присутствии экзогенной поли(АДФ-рибозы) (рис. 10А, дор. 7 и 8) обусловлен связыванием с PAR и удалением из реакции избыточных молекул YB-1, ингибирующих активность PARP1 (см. раздел 2.3). Однако это не совсем так, поскольку при понижении концентрации YB-1 в реакционной смеси не наблюдается сходного эффекта (рис. 10Б). С другой стороны, присутствие PAR в высокой концентрации действительно нарушает взаимодействие YB-1 и PARP1, при этом на радиоавтографе исчезает полоса, соответствующая поли(АДФ-рибозил)ированному YB-1 (рис. 10А, дор. 10). Одним из возможных объяснений усиления взаимодействий YB-1 и PARP1 в присутствии небольших концентраций экзогенной поли(АДФ-рибозы) (рис.

10А, дор. 7 и 8), может быть способность PAR действовать как «молекулярный клей», увеличивающий время пребывания белков и интенсивность взаимодействий в динамических комплексах (Teloni F., Altmeyer M., 2016).

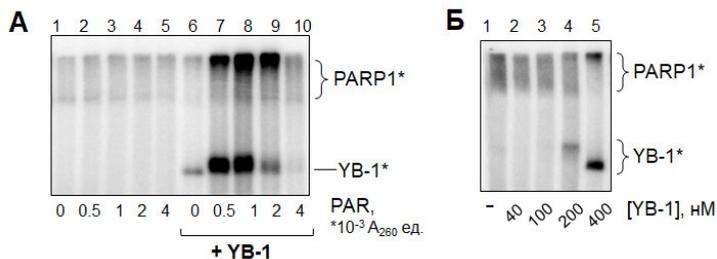


Рис. 10. Радиоавтографы SDS-ПААГ, в которых проводили разделение продуктов реакции поли(АДФ-рибозил)ирования. А. Реакционные смеси содержали 10 нМ дцДНК, 200 нМ PARP1, 0 или 400 нМ YB-1, 10 мМ ЭДТА, 4  $\mu$ М несущий радиоактивную метку НАД<sup>+</sup> и 0-0.004  $A_{260}$  ед./мл PAR (без радиоактивной метки). Реакции проводили в течение 10 мин при 37°C. Б. Реакционные смеси содержали 10 нМ дцДНК, 200 нМ PARP1, 0-400 нМ YB-1, 10 мМ ЭДТА и 4  $\mu$ М несущий радиоактивную метку НАД<sup>+</sup>. Реакции проводили в течение 10 мин при 37°C.

Таким образом, поли(АДФ-рибоза) может выступать в качестве посредника взаимодействий фермента PARP1 и белка YB-1, регулирующего его активность. Данный результат очень интересен, поскольку показывает возможность регуляции реакции поли(АДФ-рибозил)ирования ее продуктом. При этом в присутствии белка-эффектора YB-1, синтез PAR на начальных этапах реакции поли(АДФ-рибозил)ирования может рассматриваться как автокаталитический процесс, а на поздних этапах реакции – подвергаться ингибированию по механизму обратной связи.

## 2.6. YB-1 и ингибиторы PARP1

Олапариб и его аналоги как ингибиторы PARP1 используются для повышения эффективности ДНК-повреждающей терапии при лечении онкологических заболеваний (Davar D., et al., 2012).

Мы показали, что YB-1 способен поддерживать относительно высокие уровни поли(АДФ-рибозил)ирования в реакционных смесях, содержащих низкие концентрации олапариба (0-100 нМ, рис.11А). Вероятно, данный эффект можно объяснить способностью YB-1 стимулировать активность тех молекул PARP1, которые не были инактивированы. Действительно, YB-1 не

влияет на синтез PAR в присутствии высоких концентраций ингибатора ( $\geq 200$  нМ олапариба, рис. 11А).

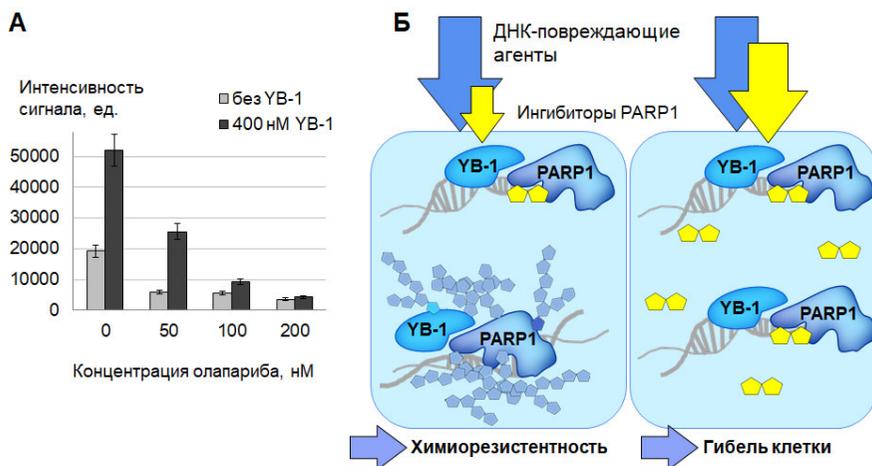


Рис. 11. А. Реакционные смеси содержали 100 нМ дцДНК, 100 нМ PARP1, 0 или 400 нМ YB-1, 5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 2  $\mu$ М несущий радиоактивную метку НАД<sup>+</sup> и олапариб в варьирующей концентрации. Б. Применение ингибиторов PARP1 в терапии опухолей, сверхэкспрессирующих YB-1 (схема).

На основании полученных результатов можно предположить, что применение ингибиторов PARP1 совместно с ДНК-повреждающими агентами при терапии онкологических заболеваний может быть особенно выгодной стратегией в отношении опухолей, сверхэкспрессирующих YB-1. Однако, учитывая стимулирующий эффект YB-1 на активность PARP1, следует иметь в виду, что в этом случае для эффективной терапии могут потребоваться повышенные дозы ингибиторов PARP1 (рис. 11Б).

## Заключение

Результаты, полученные в настоящей работе, позволили идентифицировать Y-бокс-связывающий белок 1 в качестве мультифункционального регуляторного фактора эксцизионной репарации оснований ДНК у эукариот. Являясь классическим РНК-связывающим белком / транскрипционным фактором, YB-1 представляет пример участия этих классов белков в обеспечении дополнительного стресс-индуцируемого уровня защиты целостности генома.

Функции YB-1 также иллюстрируют взаимосвязь его неупорядоченной структуры и способности этого белка взаимодействовать с

широким спектром разнородных лигандов, обеспечивая координацию и регуляцию функций узкоспециализированных ферментов, имеющих упорядоченную структуру. Множественные взаимодействия YB-1 с факторами BER, детектированные в настоящей работе, являются характерными для белков с неупорядоченной структурой. В связи с установленной ролью неупорядоченных элементов структуры ферментов репарации ДНК в формировании репарационных ансамблей (Dutta A., et al., 2015), можно предположить, что YB-1 как вспомогательный белок может служить для организации репаросомы. Действительно, данные, полученные для APE1 и PARP1 в настоящей работе, свидетельствуют в пользу способности YB-1 стабилизировать комплексы этих белков с повреждённой ДНК.

Особый интерес представляет идентификация многофункционального белка YB-1 как эффектора PARP1, обладающего высоким регуляторным потенциалом в отношении процесса поли(АДФ-рибозил)ирования практически на всех его этапах – от связывания PARP1 с повреждённой ДНК, инициирующего синтез поли(АДФ-рибозы), до регуляции активности PARP1 посредством PAR как продукта реакции. Более того, открытая нами способность YB-1 выступать в качестве эффективной мишени поли(АДФ-рибозил)ирования и белка, нековалентно связывающего PAR, защищая этот полимер от деградации ферментом поли(АДФ-рибоза)-гликогидролазой, может играть важную роль в распространении «волны» PARилирования как сигнала о повреждении ДНК.

Следует отметить, что помимо регуляции репарации ДНК, поли(АДФ-рибоза) выполняет важнейшие регуляторные функции в ряде других клеточных процессов. По крайней мере для некоторых из них показано участие YB-1. Так, потенциальными «точками соприкосновения» YB-1 и PAR являются стрессовые гранулы (Leung A. K., et al., 2011; Yang W. H., Bloch D. B., 2007), ядрышки (Boamah E. K., et al., 2012; Gonda K., et al., 2006), регуляция топологического статуса ДНК с участием Topo1 (Malanga M., Althaus F. R., 2004; Wu Y., et al., 2014), а также веретено деления (Chang P., et al., 2005; Kawaguchi A., et al., 2015). Таким образом, полученные научные результаты даже выходят за пределы области регуляции репарации ДНК и открывают широкие перспективы для дальнейших исследований.

## ВЫВОДЫ

### **1. Многофункциональный белок YB-1 участвует в регуляции активности ферментов эксцизионной репарации оснований ДНК (BER):**

- Зарегистрированы и количественно охарактеризованы физические взаимодействия белка YB-1 с ключевыми (апуриновая/апиримидиновая (AP-) эндонуклеаза APE1, ДНК-полимераза  $\text{pol } \beta$ ) и непосредственными (ДНК-гликозилаза NEIL1) участниками BER, а также регуляторными белками этой системы (поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 и 2 – PARP1 и PARP2).
- YB-1 регулирует AP-лиазную активность ДНК-гликозилазы NEIL1 на разных ДНК-интермедиатах, ингибируя расщепление AP-сайтов в одонитевых и частично некомплементарных участках ДНК и стимулируя расщепление AP-сайтов в ДНК-дуплексах.
- YB-1 ингибирует AP-эндонуклеазную активность APE1 при гидролизе AP-сайтов в одонитевых и частично некомплементарных участках ДНК и стимулирует активность APE1 при расщеплении AP-сайтов, расположенных в двухцепочечных ДНК-структурах. Для стимуляции активности APE1 в присутствии YB-1 необходим N-концевой регуляторный фрагмент APE1.

### **2. YB-1 подвергается посттрансляционной модификации – поли(АДФ-рибозил)ированию и регулирует процесс синтеза поли(АДФ-рибозы) ферментом PARP1:**

- YB-1 способен формировать гетеромерный комплекс с белком PARP1 и повреждённой ДНК.
- Открыта новая посттрансляционная модификация YB-1 – поли(АДФ-рибозил)ирование *in vitro* ферментами PARP1 и PARP2 в присутствии повреждённой ДНК.
- YB-1 обладает выраженной способностью стимулировать синтез поли(АДФ-рибозы), катализируемый PARP1, тем самым понижая эффективность действия ингибиторов фермента. Активирующая функция YB-1 связана с C-концевым доменом белка и наиболее ярко проявляется в отсутствие ионов  $\text{Mg}^{2+}$ .
- YB-1 ингибирует активность PARP1 в условиях избыточной концентрации YB-1 по отношению к ДНК, а также в тех случаях, когда диссоциация YB-1 из комплекса с PARP1 и ДНК затруднена вследствие низкого уровня поли(АДФ-рибозил)ирования YB-1.
- Синтез поли(АДФ-рибозы) индуцирует диссоциацию комплексов YB-1-

ДНК как в результате ковалентной модификации белка YB-1 полимером PAR, так и вследствие нековалентного связывания YB-1 с поли(АДФ-рибозой). Связывание YB-1 с PAR способствует увеличению времени жизни каталитически активного комплекса PARP1 с поврежденной ДНК и защищает полимер PAR от деградации поли(АДФ-рибоза)-гликогидролазой (PARG).

- Поли(АДФ-рибоза) в присутствии белка YB-1 может выступать в качестве регулятора процесса поли(АДФ-рибозил)ирования.

### СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Pestryakov P.E., Zharkov D. O., Grin I.R., **Fomina E.E.**, Kim E. R., Hamon L., Eliseeva I. A., Petruseva I. O., Curmi P. A., Ovchinnikov L. P., Lavrik O. I. Effect of the multifunctional proteins RPA, YB-1 and XPC repair factor on AP-site cleavage by DNA glycosylase NEIL1 // *J. Mol. Recognit.* –2012. –V. 25 (4). –P. 224–233.
2. **Fomina E. E.**, Pestryakov P. E., Kretov D. A., Zharkov D. O., Ovchinnikov L. P., Curmi P. A., Lavrik O. I. Inhibition of abasic site cleavage in bubble DNA by multifunctional protein YB-1 // *J. Mol. Recognit.* –2015. –V. 28 (2). –P. 117–123.
3. **Alemasova E. E.**, Pestryakov P. E., Sukhanova M. V., Kretov D. A., Moor N. A., Curmi P. A., Ovchinnikov L. P., Lavrik O. I. Poly(ADP-ribosylation) as a new posttranslational modification of YB-1 // *Biochimie.* –2015. –V. 119. –P. 36–44.
4. **Alemasova E. E.**, Moor N. A., Naumenko K. N., Kutuzov M. M., Sukhanova M. V., Pestryakov P. E., Lavrik O. I. Y-box-binding protein 1 as a non-canonical factor of base excision repair // *Biochim. Biophys. Acta.* –2016. –1864 (12). –P. 1631–1640.
5. **Алемасова Е. Э.**, Лаврик О. И. На стыке трёх нуклеиновых кислот: роль РНК-связывающих белков и поли(АДФ-рибозы) в репарации ДНК // *Acta Naturae.* –2017. –Т. 9 (2). –С. 4–16.
6. **Алемасова Е. Э.**, Науменко К. Н., Моор Н. А., Лаврик О. И. Y-бок-связывающий белок 1 как стимулятор расщепления апуриновых/апиримидиновых сайтов в ДНК // *Биохимия.* –2017. –Т. 82 (12). –С. 1898–1906.