

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины
Сибирского отделения РАН

На правах рукописи

Алемасова Елизавета Эдуардовна

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

03.01.04 – биохимия

Диссертация на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

д.х.н., чл.-корр. РАН **Лаврик Ольга Ивановна**

к.х.н. **Пестряков Павел Ефимович**

Новосибирск – 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
Актуальность темы исследования.	7
Цель и задачи исследования.....	8
Научная новизна полученных результатов.	8
Практическая значимость.	9
Основные положения, выносимые на защиту.	9
Апробация работы и публикации.....	10
Личный вклад автора.	12
Глава 1. ЭКСЦИЗИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ ОСНОВАНИЙ ДНК ЭУКАРИОТ И ЕЁ РЕГУЛЯЦИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	13
1.1. Основная схема процесса эксцизионной репарации оснований ДНК (BER)	14
<i>1.1.1. Природа повреждения → выбор ДНК-гликозилазы</i>	14
<i>1.1.2. ДНК-гликозилаза → выбор пути расщепления цепи ДНК и процессинга концов разрыва</i>	15
<i>1.1.3. Фланкирующие группы → выбор ДНК-полимеразы и лигазы</i>	16
1.2. Регуляция процесса BER	17
<i>1.2.1. Пространственная регуляция BER</i>	17
<i>1.2.2. Функциональная регуляция BER</i>	19
<i>1.2.3. Количественная регуляция BER</i>	20
<i>1.2.4. Универсальная регуляторная молекула. Регуляция внутри системы</i>	21
1.3. BER в регуляции РНК	23
<i>1.3.1. Ферменты BER в метаболизме РНК</i>	23
<i>1.3.2. Повреждение РНК – спонтанное и...целенаправленное</i>	25
<i>1.3.3. Репарация РНК и BER</i>	26
1.4. На стыке трёх нуклеиновых кислот: роль РНК-связывающих белков и поли(АДФ-рибозы) в репарации ДНК	28
<i>1.4.1. Интерференция транскрипции и репарации ДНК</i>	28
<i>1.4.2. «РНК-опероны» эукариот</i>	30

1.4.3. Новые функции РНК-связывающих белков в ответе клетки на повреждение ДНК.....	32
1.4.4. РНК-связывающие белки: модульное строение.....	33
1.4.5. «Танцующие» белки, хамелеоны, 4D и «белковые облака».....	34
1.4.6. Фазовые переходы биомолекул.....	36
1.4.7. Поли(АДФ-рибоза) и поли(АДФ-рибозил)ирование.....	38
1.5. Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1).....	41
1.5.1. Структурно-функциональная организация YB-1.....	41
1.5.2. Внутридоменные взаимодействия, олигомеризация и взаимодействия с другими белками.....	43
1.5.3. Взаимодействие с нуклеиновыми кислотами.....	44
1.5.4. YB-1 как молекулярный маркер и мишень противоопухолевой терапии.....	47
Заключение.....	48
Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	50
2.1. Материалы.....	50
Состав основных буферных растворов, использованных в работе.....	52
2.2. Методики экспериментов.....	53
2.2.1. Электрофоретическое разделение белков.....	53
2.2.2. Электрофоретическое разделение олигонуклеотидов.....	53
2.2.3. Анализ белок-нуклеиновых комплексов методом задержки в геле.....	54
2.2.4. Очистка олигонуклеотидов гель-электрофорезом.....	54
2.2.5. Получение олигонуклеотида, содержащего остаток 5-формилурацила, из предшественника.....	54
2.2.6. Получение олигонуклеотидов, содержащих [γ - ^{32}P]-метку на 5'-конце.....	54
2.2.7. Получение двухцепочечных ДНК-структур.....	55
2.2.8. Введение флуоресцентной метки на 3'-конец U ₁₇	56
2.2.9. Получение апуриновых/апиримидиновых сайтов <i>in situ</i>	56
2.2.10. Щелочной гидролиз AP-сайтов.....	56
2.2.11. Получение рекомбинантных аналогов полноразмерной и ядерной форм белка YB-1.....	57
2.2.11.1. Выделение и очистка рекомбинантного белка his-tagYB-1.....	57
2.2.11.2. Выделение и очистка рекомбинантного белка his-tagYB-1(1-219).....	58

2.2.12. Мечение белков YB-1, YB-1(1-219), APE1 и N135APE1 флуоресцентной меткой	58
2.2.13. Исследование белок-белковых взаимодействий методом флуоресцентного титрования.....	59
2.2.14. Влияние YB-1 на расщепление AP-сайтов ферментами APE1 и NEIL1	60
2.2.15. Изучение влияния YB-1 на dRP-лиазную активность $\rho\lambda\beta$	60
2.2.16. Получение НАД ⁺ , содержащего [α - ³² P]-метку	60
2.2.17. Поли(АДФ-рибозил)ирование ферментами PARP1 и PARP2	61
2.2.18. Подтверждение модификации YB-1 методом иммунодетекции.....	61
2.2.19. Получение поли(АДФ-рибозы).....	62
2.2.20. Исследование функциональных взаимодействий YB-1 и PARP1 методом флуоресцентной спектроскопии	63
2.2.21. Исследование активности PARP1 с использованием ТХУ-фильтров.....	64
2.2.22. Ковалентная модификация ДНК ферментом PARP3	64
2.2.23. Определение K_M и k_{cat} AP-эндонуклеазной реакции	64
Глава 3. РОЛЬ МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНОГО БЕЛКА YB-1 В РЕГУЛЯЦИИ РЕПАРАЦИИ ДНК (РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ)...	66
3.1. Исследование участия YB-1 в непосредственной регуляции системы BER	66
3.1.1. Физические взаимодействия YB-1 с белками BER.....	66
3.1.2. Функциональные взаимодействия YB-1 с белками BER	72
3.1.2.1. Влияние YB-1 на активность фермента APE1	72
3.1.2.1.1. Сравнение активности APE1 на различных ДНК-структурах	73
3.1.2.1.2. YB-1 стимулирует активность APE1 по расщеплению AP-сайтов в двухцепочечной ДНК при недостатке ионов магния.....	74
3.1.2.1.3. Для стимуляции активности APE1 белком YB-1 необходимы N-концевая регуляторная область APE1 и C-концевой домен YB-1	77
3.1.2.1.4. YB-1 ингибирует активность APE1 по расщеплению AP-сайтов, локализованных в некомплементарных участках ДНК.....	80
3.1.2.2. Влияние YB-1 на активность фермента NEIL1	82
3.1.2.2.1. Сравнение активности NEIL1 на различных ДНК-структурах.....	82
3.1.2.2.2. Влияние YB-1 на расщепление AP-сайтов в ДНК ферментом NEIL1	83
3.1.2.3. Влияние YB-1 на dRP-лиазную активность $\rho\lambda\beta$	85

3.2. Исследование участия YB-1 в ключевой регуляторной системе BER – процессе поли(АДФ-рибозил)ирования	87
<i>3.2.1. «Инициация»: взаимодействие YB-1 и PARP1, опосредованное ДНК</i>	87
3.2.1.1. Белки YB-1 и PARP1 формируют гетеромерный комплекс с повреждённой ДНК	87
3.2.1.2. Поли(АДФ-рибозил)ирование – новая посттрансляционная модификация YB-1	88
<i>3.2.1.2.1. Поли(АДФ-рибозил)ирование YB-1 и его доказательства</i>	88
<i>3.2.1.2.2. Модификация YB-1 ферментом PARP2</i>	92
<i>3.2.1.2.3. Модификация YB-1 ферментами PARP1 и PARP2 в присутствии РНК</i>	93
<i>3.2.1.2.4. Влияние поли(АДФ-рибозил)ирования на свойства YB-1</i>	94
3.2.1.3. ДНК как регулятор функциональных взаимодействий YB-1 и поли(АДФ-рибоза)-полимераз	95
<i>3.2.1.3.1. Влияние концентрации ДНК на взаимодействие YB-1 и PARP1</i>	95
<i>3.2.1.3.2. Влияние структуры ДНК на взаимодействие YB-1 и PARP1</i>	97
<i>3.2.1.3.3. Влияние YB-1 на ковалентную модификацию ДНК ферментом PARP3</i>	99
3.2.1.4. Исследование взаимодействий белков YB-1 и PARP1 в режиме реального времени	101
<i>3.2.2. «Элонгация» (ранние этапы): взаимодействие YB-1 и PARP1 посредством полимера PAR, ковалентно присоединённого к PARP1</i>	103
3.2.2.1. Связывание YB-1 с поли(АДФ-рибозой)	103
3.2.2.2. Влияние YB-1 на активность PARG	104
3.2.2.3. Стимуляция активности PARP1 белком YB-1 и её предполагаемый механизм	105
<i>3.2.2.3.1. YB-1 стимулирует активность PARP1 в отсутствие Mg²⁺-ионов</i>	106
<i>3.2.2.3.2. YB-1 стимулирует активность PARP1 в присутствии ингибиторов PARP1</i>	108
<i>3.2.2.3.3. Роль связывания YB-1 с поли(АДФ-рибозой) в стимуляции PARP1</i>	112
<i>3.2.3. «Элонгация» (поздние этапы) и «терминация»: взаимодействие YB-1 и PARP1 посредством свободного полимера АДФ-рибозы</i>	114
3.2.3.1. Поли(АДФ-рибоза) как регулятор функциональных взаимодействий YB-1 и PARP1	114
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	118
ВЫВОДЫ	119
ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ	120

БЛАГОДАРНОСТИ	123
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	124

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Под действием экзо- и эндогенных факторов в ДНК каждой живой клетки ежедневно образуются десятки тысяч повреждений. В отличие от других биомолекул (РНК, белков, липидов и т.д.), повреждённая ДНК не подлежит замене, и по этой причине сохранность её структуры полностью зависит от процесса репарации (исправления повреждений). Кумулятивный эффект повреждений, которые не могут восстановить системы репарации ДНК, является одним из основных факторов старения и онкотрансформации клеток [1]. В клетках млекопитающих функционирует несколько систем репарации ДНК, специализированных для исправления повреждений ДНК различной природы. Одним из важнейших путей репарации ДНК является эксцизионная репарация оснований (*base excision repair*, BER). С помощью этого механизма исправляется основной массив повреждений, возникающих вследствие оксидативного стресса, – модификации азотистых оснований, апуриновые/апиримидиновые (AP-) сайты и однонитевые разрывы молекулы ДНК.

Изучение фундаментальных принципов репарации ДНК и её регуляции на протяжении многих лет привлекает внимание исследователей как основа для разработки новых подходов к лечению онкологических заболеваний [2,3]. Большинство стратегий противоопухолевой терапии нацелено на повреждение ДНК раковых клеток, поэтому значительное повышение эффективности лечения достигается за счёт комбинации генотоксических агентов с ингибиторами ключевых ферментов репарации [4]. Основной проблемой при терапии рака является развитие химиорезистентности клеток опухоли. Одной из её причин может быть активация регуляторных систем репарации ДНК, которые во многом не изучены. Понимание молекулярных механизмов этих процессов и их роли в развитии химиорезистентности представляет необходимую фундаментальную базу для разработки новых эффективных стратегий терапии онкологических заболеваний.

Ключевым механизмом регуляции системы BER и мишенью противоопухолевой терапии является процесс поли(АДФ-рибозил)ирования, катализируемый ферментом 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 [5]. В некоторых случаях индуцированная генотоксическим стрессом транслокация YB-1 была связана с посттрансляционными модификациями этого белка – фосфорилированием по Ser102 [6] или частичным протеолизом 20S протеасомой с образованием специфичной ядерной формы YB-1 – YB-1(1-219) [7-9]. 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 [10,11]. В пользу возможной роли YB-1 в регуляции репарации ДНК свидетельствовало то, что этот белок обладает повышенным сродством к повреждённой ДНК по сравнению с неповреждённой [12], а также способен физически взаимодействовать с рядом белков репарации, модулируя их активность [12-17]. 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 поли(АДФ-рибозой) [18].

В настоящей работе нами была исследована роль белка YB-1 в регуляции активности ряда ферментов BER (APE1, NEIL1 и pol β), а также участие YB-1 в реакции синтеза поли(АДФ-рибозы), катализируемой PARP1. Было установлено, что YB-1 способен не только образовывать 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.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы было 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

ΥВ-1 с рядом ферментов системы BER. Показана способность белка ΥВ-1 напрямую регулировать процесс репарации AP-сайтов в ДНК: ΥВ-1 стимулирует расщепление AP-сайтов, расположенных в ДНК-дуплексах, и ингибирует расщепление AP-сайтов, локализованных в одностранных фрагментах ДНК. Также в работе впервые показано взаимодействие белка ΥВ-1 с ключевым регуляторным белком системы BER – ферментом PARP1. Открыта новая посттрансляционная модификация ΥВ-1 – поли(АДФ-рибозил)ирование, катализируемое PARP1 в присутствии поврежденной ДНК. Впервые показано, что ΥВ-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 ΥВ-1 выражено стимулирует синтез PAR и может влиять на эффективность действия ингибиторов PARP1. Кроме того, на основании полученных результатов предложен возможный механизм влияния ΥВ-1 на активность PARP1. В частности, установлено, что синтез PAR индуцирует диссоциацию комплексов ΥВ-1-ДНК и нековалентное связывание ΥВ-1 с полимерами PAR, которое способствует увеличению времени жизни каталитически компетентного комплекса PARP1 с поврежденной 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 ΥВ-1.

Практическая значимость. Два десятилетия назад была обнаружена зависимость повышенного уровня ΥВ-1, его ядерной локализации и развития опухолевого фенотипа клеток [19]. Эти изменения достигают максимума в агрессивных опухолях, устойчивых к химиопрепаратам и на последних стадиях заболевания настолько ярко выражены, что ΥВ-1 предложен в качестве молекулярного маркера диагностики определённых типов рака (в частности, рака молочной железы) [20]. Согласно многочисленным данным, белок ΥВ-1 снижает чувствительность клеток опухоли к химиопрепаратам различных классов, значительно снижая вероятность излечения без рецидивов [21].

Результаты, полученные автором, имеют высокий потенциал для понимания механизмов химиорезистентности клеток опухолей при лечении онкологических заболеваний. Установлено непосредственное участие онкобелка ΥВ-1 и его ядерной формы ΥВ-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 ΥВ-1 является эффектором PARP1, способным интерферировать с действием ингибитора PARP1 олапариба, используемого в клинике.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. YB-1 взаимодействует с ферментами APE1, NEIL1, pol β , 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 однонитевых фрагментах ДНК. YB-1 также взаимодействует с pol β , ингибируя dRP-лиазную активность фермента.
3. YB-1 формирует гетеромерный комплекс с PARP1 и повреждённой 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 понижает 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 поли(АДФ-рибозы) белком YB-1 способствует увеличению времени пребывания PARP1 в каталитически активном комплексе с ДНК и защищает PAR от деградации поли(АДФ-рибоза)-гликогидролазой (PARG).
6. Продукт реакции, поли(АДФ-рибоза), в присутствии YB-1 может выступать в качестве регулятора процесса поли(АДФ-рибозил)ирования.

Апробация работы и публикации. По материалам работы опубликовано 6 статей, результаты работы были представлены на 9 международных и российских конференциях:

- 1) Pestryakov P., Zharkov D. O., Grin I., **Fomina E.**, Kim E. R., Hamon L., Eliseeva I. A., Petrusheva 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/апириимидиновых сайтов в ДНК // *Биохимия.* – 2017. – Т. 82 (12). – С. 1898–1906.
- 7) **Alemasova E. E.**, Pestryakov P. E., Lavrik O. I. Contribution of multifunctional protein YB-1 in the BER pathway during oxidative DNA lesions repair // *FEBS Journal.* – 2014. – V. 281 (Suppl.1). – P. 714 (постерный доклад). Представлен на конференциях 14th YSF 27-30.08.2014 и FEBS EMBO 2014 30.08.-4.09.2014 Paris, France.
- 8) **Alemasova E. E.**, Pestryakov P. E., Kretov D. A., Curmi P. A., Lavrik O. I. Interaction of BER factors with pleiotropic protein YB-1 in oxidative clustered DNA lesions repair // P. 11 (устный доклад). Представлен на конференции VII International Meeting From Molecular to Cellular Events in Human Pathologies 17-20.09.2014 Riga, Latvia.
- 9) **Alemasova E. E.**, Pestryakov P. E., Moor N. A., Zharkov D. O., Kretov D. A., Lavrik O. I. Multifunctional protein YB-1 as a potential regulator of the DNA clustered lesions repair // P. 34 (устный доклад). Представлен на конференции The Fourth Meeting of the CNRS Laboratoire International Associé NUCPROT 23-25.06.2015 Новосибирск, Россия.
- 10) **Алемасова Е. Э.**, Пестряков П. Е., Моор Н. А., Лаврик О. И. Мультифункциональный белок YB-1 в репарации кластерных повреждений ДНК // С. 176 (устный доклад) VII Российский симпозиум «Белки и пептиды» 12-17.07.2015 Новосибирск, Россия.
- 11) **Alemasova E. E.**, Pestryakov P. E., Naumenko K. N., Moor N. A., Lavrik O. I. Y-box-binding protein 1 as a non-canonical factor of DNA repair // P. 107 (постерный доклад + короткое устное сообщение). Представлен на конференции 10th Quinquennial Conference on Responses to DNA damage: from molecule to disease 17-22.04.2016 Egmond aan Zee, the Netherlands.
- 12) **Алемасова Е. Э.**, Пестряков П. Е., Науменко К. Н., Моор Н. А., Лаврик О. И. Мультифункциональный Y-бок-связывающий белок 1 как неканонический фактор репарации ДНК // С. 164 (устный доклад). Представлен на Международной конференции «Химическая биология-2016», посвященной 90-летию юбилею академика Д.Г.Кнорре 24-29.07.2016 Новосибирск, Россия.
- 13) **Alemasova E. E.**, Moor N. A., Naumenko K. N., Pestryakov P. E., Lavrik O. I. The functional interactions of pleiotropic protein YB-1 with key base excision repair factors // P. 29 (устный доклад).

доклад). Представлен на конференции The Tenth International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\Systems Biology 29.08.-2.09.2016 Новосибирск, Россия.

14) **Alemasova E. E.**, Naumenko K. N., Pestryakov P. E., Lavrik O. I. Production and purification of recombinant analog of Y-box binding protein // P. 51 (устный доклад). Представлен на конференции 25th Wilhelm Bernard Workshop on the cell nucleus 19-22.06.2017 Нижний Новгород, Россия.

15) **Alemasova E. E.**, Naumenko K. N. , Lavrik O. I. YB-1: a PARamount regulator // FEBS Journal. – 2017. – V. 284 (Suppl.1). – P. 73 (устный и постерный доклад). Представлен на конференции 42nd FEBS Congress 10-14.09.2017 Jerusalem, Israel.

Личный вклад автора. 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. Плазмиды для выделения рекомбинантных аналогов полноразмерного YB-1 и его ядерной формы сконструированы К. Н. Науменко. Выделение и очистка рекомбинантных белков YB-1 и YB-1(1-219) проведены совместно с К. Н. Науменко. Эксперименты по определению количественных характеристик взаимодействия YB-1 с APE1 и NΔ35-APE1 выполнены Н. А. Моор. Исследование физических взаимодействий YB-1 и YB-1(1-219) с белками BER проведено совместно с Н. А. Моор. Данные с использованием метода флуоресцентной спектроскопии получены совместно с Т. А. Кургиной. Эксперимент по исследованию взаимодействий YB-1 и PARP1 в режиме реального времени (рис. 33А), «реактивации» PARP1 (рис. 42А) и влиянию поли(АДФ-рибозы) на модификацию PARP1 и YB-1 (рис. 43) выполнены совместно с К. Н. Науменко.

Глава 1. ЭКСЦИЗИОННАЯ РЕПАРАЦИЯ ОСНОВАНИЙ ДНК ЭУКАРИОТ И ЕЁ РЕГУЛЯЦИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

В отличие от систем регуляции эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) или репарации двунитевых разрывов ДНК, молекулярные механизмы, обеспечивающие эффективность и точность процесса эксцизионной репарации оснований ДНК (BER), на настоящий момент изучены мало.

Предполагается, что регуляция BER происходит на нескольких уровнях, начиная от экспрессии генов и заканчивая посттрансляционными модификациями белков. Принимая во внимание тот факт, что ни один из известных механизмов регуляции сам по себе не способен модулировать активность всей системы BER, авторы [2] предложили гипотезу, согласно которой конечным результатом комбинации этих механизмов является *динамическая локализация белков BER в компартмент, содержащий повреждённую ДНК*. Несомненный интерес представляет тот факт, что данная идея была выдвинута по отношению к BER *Saccharomyces cerevisiae* [2] – одному из немногих представителей эукариот, у которого отсутствует активность поли(АДФ-рибоза)-полимеразы (PARP) [22]. Продукт активности этого фермента – поли(АДФ-рибоза) (PAR) – является уникальной регуляторной молекулой процесса BER. РНК-подобный полимер АДФ-рибозы вовлечён практически во все известные механизмы регуляции BER у эукариот и, в том числе, служит для привлечения ферментов репарации к сайту повреждения в ДНК. Согласно наиболее современным представлениям, синтез PAR в сайте повреждения ДНК локально изменяет физические свойства нуклеоплазмы, способствуя *динамичной компартментализации клетки без участия мембран* [23]. Как было показано, важную роль в этом процессе играют РНК-связывающие белки (RBP), вовлечённые в метаболизм РНК на различных этапах [23]. В последние годы RBP привлекают всё большее внимание исследователей как важнейшие участники поддержания геномной стабильности. Интересно, что среди всех систем репарации наибольшую сопряжённость с метаболизмом РНК демонстрирует именно BER. Таким образом, класс РНК-связывающих белков является привлекательным полем для идентификации новых регуляторных факторов этой системы репарации ДНК.

1.1. Основная схема процесса эксцизионной репарации оснований ДНК (BER)

1.1.1. Природа повреждения → выбор ДНК-гликозилазы

Уникальной особенностью эксцизионной репарации оснований (BER) (рис. 1) является

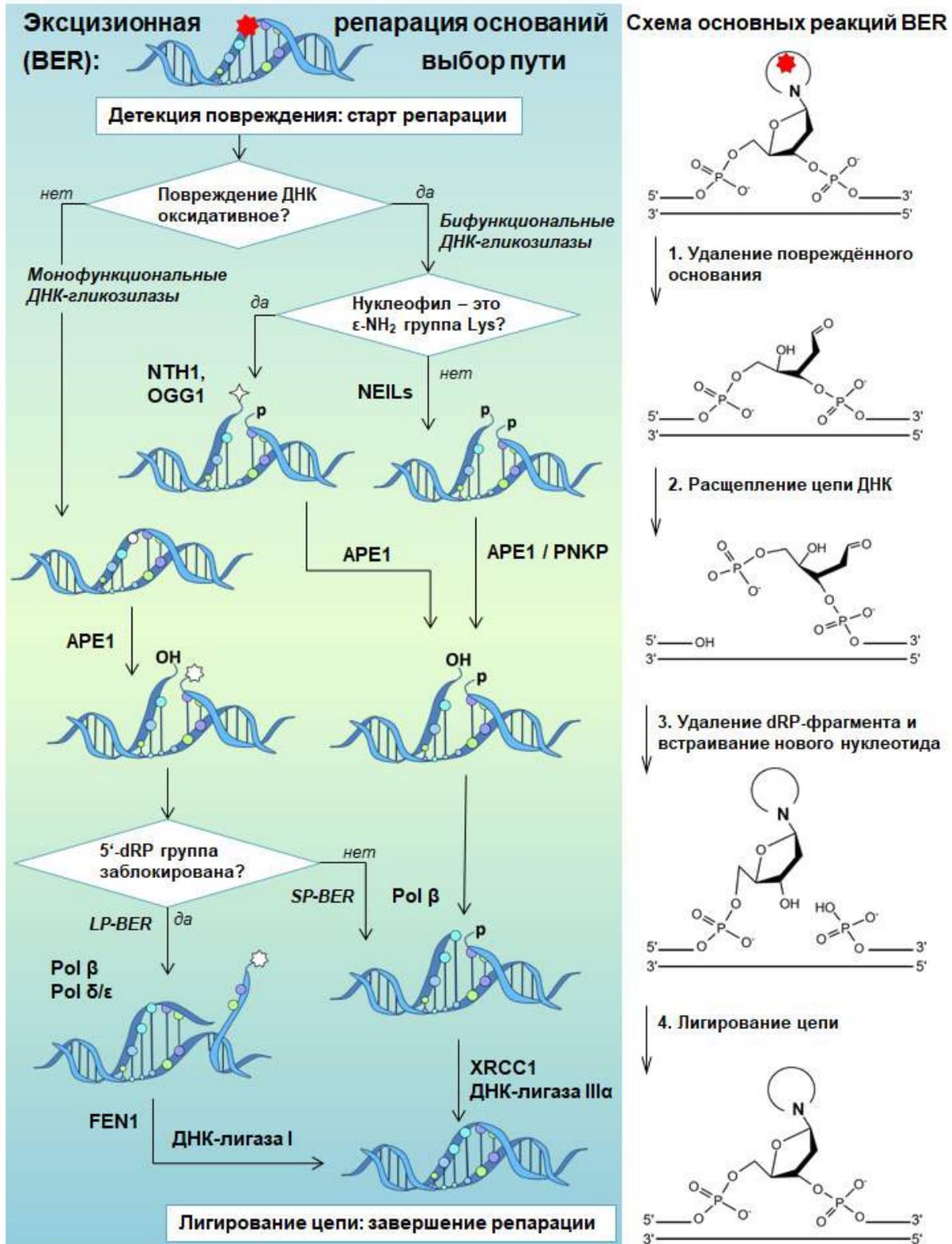


Рис. 1. Основная схема эксцизионной репарации оснований (BER).

наличие широкого спектра узкоспециализированных *ДНК-гликозилаз*, осуществляющих инициацию процесса в зависимости от индивидуального повреждения ДНК [24]. Все эти ферменты объединяет сходный механизм функционирования, при котором распознавание повреждённого основания ДНК происходит в специфичном «кармане» белка и сопровождается выворачиванием повреждённого дезоксирибонуклеотида из двойной спирали ДНК. Ориентация субстрата, необходимая для гидролиза *N*-гликозидной связи, достигается за счёт образования специфических контактов повреждённого основания и аминокислотных остатков на внутренней поверхности кармана белковой глобулы [25-28]. По этой причине мультиспецифичность, присущая многим ДНК-гликозилазам, часто коррелирует с низким числом оборотов этих ферментов [24]. Всего в клетках человека функционирует 11 ДНК-гликозилаз, 4 из которых удаляют некомплементарные урацил и тимин, 1 – алкилированные основания и 6 – защищают геном от оксидативных повреждений [29]. В последнюю группу входит уникальный фермент МУН, который единственный из всех ДНК-гликозилаз способен распознавать *неповреждённое* основание аденин в составе некомплементарной пары [30].

1.1.2. ДНК-гликозилаза → выбор пути расщепления цепи ДНК и процессинга концов разрыва

Именно ДНК-гликозилазы, как первые ферменты пути BER, определяют дальнейшее направление процесса репарации. *Монофункциональные* ДНК-гликозилазы, к которым относятся ферменты, распознающие урацил, тимин и алкилированные азотистые основания, для катализа используют активированную молекулу воды в качестве нуклеофила, атакующего С1' атом дезоксирибозы [24,31]. Реакция состоит только из одного этапа – расщепления *N*-гликозидной связи между повреждённым основанием и сахарофосфатным остовом ДНК. Апуриновые/апиримидиновые (AP-) сайты, которые образуются в результате реакции, далее процессируются ферментом AP-эндонуклеазой 1 (APE1). APE1 гидролизует фосфодиэфирную связь с 5' стороны от AP-сайта, оставляя одноцепочечный разрыв ДНК, фланкированный 3'-ОН и 5'-дезоксирiboфосфатной (dRP) группами [32] (рис. 2).

Бифункциональные ДНК-гликозилазы (к этой группе принадлежат все гликозилазы, специфичные к оксидативным повреждениям) осуществляют двухстадийный процесс, состоящий из удаления повреждённого основания и последующего процессинга AP-сайта посредством присущей этим ферментам AP-лиазной активности [24]. Реакция происходит через образование промежуточного основания Шиффа между С1' атомом и нуклеофилом, роль которого выполняет ϵ -NH₂-группа Lys (*β -элиминирование*) или N-концевого Pro белка (*$\beta\delta$ -элиминирование*) [31] (рис. 2). В результате реакции β -элиминирования образуется

одноцепочечный разрыв молекулы ДНК с фосфо- α,β -ненасыщенным альдегидным остатком (PUA) на 3'-конце [33]. На последующем этапе этот остаток удаляется фосфодиэстеразной активностью APE1 с формированием 3'-ОН группы, подходящей для осуществления катализа ДНК-полимеразой [33]. К ДНК-гликозилазам/AP-лиазам, осуществляющим катализ по такому механизму, относятся ферменты NTH1 и OGG1 млекопитающих [35,36]. Другой класс бифункциональных ДНК-гликозилаз, представленный белками семейства NEIL, катализирует две последовательных реакции β -элиминирования ($\beta\delta$ -элиминирование), приводящих к образованию однонуклеотидной брешы с фосфатами на 3'- и 5'-концах [37]. В этом случае 3'-ОН группа освобождается для дальнейшего процессинга активностью APE1 [38] или полинуклеотидкиназы/3'-фосфатазы (PNKP) [39].

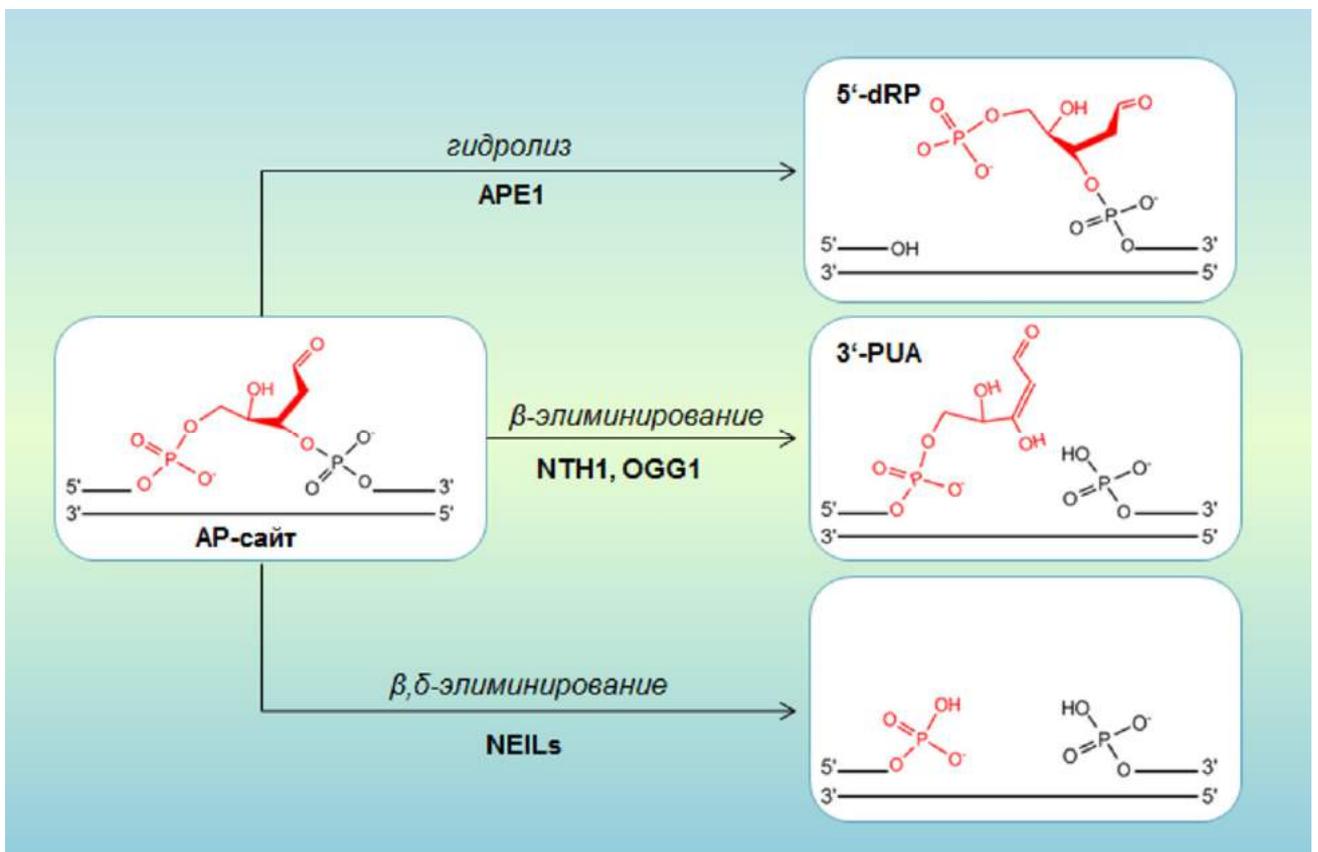


Рис. 2. Способы расщепления AP-сайтов. 5'-dRP – 5'-дезоксирибофосфатная группа; 3'-PUA – фосфо- α,β -ненасыщенный альдегидный остаток.

1.1.3. Фланкирующие группы → выбор ДНК-полимеразы и лигазы

После первых этапов BER возникает однонуклеотидная брешь, которая заполняется ДНК-полимеразой β (Pol β). Вариант BER, в котором происходит замена одного нуклеотида, называется «короткозаплаточный» BER (SP-BER) [40]. При этом Pol β способна удалять 5'-dRP группу (генерируемую в ходе гидролиза AP-сайта ферментом APE1) посредством присущей

этому ферменту dRP-лиазной активности [41]. В том случае, когда 5'-dRP группа модифицирована, заполнение бреши осуществляется с вытеснением цепи и размер встраиваемого участка может составлять 2-8 нуклеотидов [42]. «Длиннозаплаточный» BER (LP-BER) осуществляется белками, заимствованными из машины репликации запаздывающей цепи ДНК – Pol δ/ϵ и 5'-флэп эндонуклеазой 1 (FEN1) в присутствии ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA) и репликативного фактора C (RFC) [43]. Вариантом LP-BER является также путь «с трансляцией бреши», катализируемый Pol β в присутствии FEN1 [44]. В случае «короткозаплаточного» варианта BER репарацию ДНК завершает комплекс XRCC1-ДНК-лигаза III α (XRCC1-lig III α), сшивающий концы разрыва. На «длиннозаплаточном» пути действует ДНК-лигаза I (lig I) [45].

1.2. Регуляция процесса BER

В совокупности, на рис. 1 и 2 представлена достаточно полная схема эксцизионной репарации оснований ДНК; действительно, для реконструкции BER *in vitro* требуются всего 4-5 ключевых белков. Однако, иллюстрируя основные превращения повреждённой ДНК в ходе BER, эти схемы не учитывают тех белков, участие которых не является обязательным с точки зрения ферментативного катализа, но играет важнейшую регуляторную роль. Помимо химической природы повреждения (рис. 1) существует, по крайней мере, ещё несколько факторов, влияющих на различные этапы процесса BER и регулирующих активность ферментов этой системы репарации ДНК.

1.2.1. Пространственная регуляция BER

Ввиду цитотоксичности интермедиатов BER (AP-сайтов, одноцепочечных разрывов и др.), важным аспектом поддержания стабильности генома является защита ДНК-интермедиата от случайных взаимодействий внутри клетки. Защита промежуточного продукта может реализоваться за счёт *непрерывности* процесса репарации (по принципу «передачи эстафетной палочки», *hand-off* [46,47]) или посредством *изоляции* сайта повреждения в отдельный репарационный компартмент клетки (по механизму фазовых переходов биомолекул, *liquid demixing* (см. далее) и близкой гипотезы *BERocom* как динамичных мультибелковых ансамблей репарации [48]). Поскольку на данный момент не получено свидетельств в пользу ни одной из парадигм *in vivo*, предполагается, что предформированные комплексы белков осуществляют репарацию эндогенных повреждений ДНК, в то время как *hand-off* механизм с последовательным привлечением ферментов BER реализуется при репарации индуцированных повреждений [48]. При любой из альтернатив необходимо направленное привлечение и

удержание ферментов репарации возле сайта повреждения в ДНК, ключевую роль в которых играют белки XRCC1 и PARP1. Механизмы действия этих белков различны. XRCC1 способен физически взаимодействовать с большинством факторов BER, предоставляя «белковую платформу» (*scaffold*) для сборки ферментов репарации [49]. PARP1, в свою очередь, активируется при связывании повреждённой ДНК и синтезирует «третью нуклеиновую кислоту» – поли(АДФ-рибозу) (см. далее), одной из функций которой является привлечение ферментов репарации к месту повреждения. Хотя оба белка считаются, в первую очередь, сенсорами одноцепочечных разрывов ДНК [24], показана возможность их участия и на самых ранних этапах BER [50-52]. Недавно, белок-белковые взаимодействия в системе BER были оценены количественно и было показано, что XRCC1 и PARP1 вовлечены в такие взаимодействия, причём наиболее прочное взаимодействие наблюдалось в комплексе XRCC1 и ДНК-полимеразы β [53]. Предполагается, что XRCC1 и PARP1 участвуют в репарации повреждений пуриновых оснований и одноцепочечных разрывов ДНК, в то время как репарация пиримидиновых оснований осуществляется с привлечением только XRCC1 независимо от PARP1 [54].

Несмотря на то, что для разных ДНК-гликозилаз предпочтительными субстратами служат различные повреждения, области специфичности этих ферментов во многом перекрываются. Поэтому отсутствие одной гликозилазы, как правило, не является летальным, а выбор направления BER, инициируемый различными ДНК-гликозилазами, не может считаться абсолютным [24]. Существует гипотеза, что разные варианты BER в большей степени определяются фазой клеточного цикла и позицией повреждения в геноме [24]. Так, среди ДНК-гликозилаз, специфичных к окислительным повреждениям, OGG1 и NTH1 способны выщеплять повреждённое основание только из ДНК-дуплексов, в то время как для NEIL1 и NEIL2 предпочтительными являются односторонние участки ДНК, включая структуры вида «пузырь» и «вилка», имитирующие интермедиаты транскрипции и репликации [55]. По-видимому, белки NEIL1 и NEIL2 преимущественно вовлечены в репарацию окислительных повреждений ДНК в ходе транскрипции и репликации [24]. Кроме того, NEIL1 активируется в S-фазе клеточного цикла, в отличие от остальных гликозилаз [55] и взаимодействует с белком PCNA, модулирующим его функции [56]. Предполагается, что NEIL1 может играть ключевую роль в удалении повреждений матричной цепи ДНК перед началом репликации, инициируя так называемый *BER, ассоциированный с репликацией* (RA-BER) [55].

Наконец, недавние исследования показали, что выбор короткозаплаточного или длиннозаплаточного варианта BER регулируется позицией повреждения в хроматине. Из-за стерических препятствий повреждения ДНК, локализованные в корях нуклеосом, репарируются

преимущественно по пути SP-BER с участием Pol β – полимеразы млекопитающих, обладающей наименьшим размером [57].

1.2.2. Функциональная регуляция BER

В общем виде BER включает в себя три функциональных стадии: распознавание повреждения/разрезание цепи, процессинг концов разрыва ДНК и синтез /лигирование цепи. Процесс репарации ДНК с этой точки зрения может быть представлен в виде серии временных мультибелковых комплексов, собирающихся на месте повреждения [28]. Одним из важнейших механизмов регуляции BER является модуляция ферментативных активностей и белок-белковых взаимодействий внутри комплексов, ключевую роль в которой играют посттрансляционные модификации (PTM) белковых компонент. PTM белков во многом определяются статусом клетки и системами ответа на повреждение ДНК, обеспечивая эффективность и специфичность процесса репарации [58].

Модуляция активностей ферментов BER в результате ковалентного присоединения химических групп представляет собой пример прямой регуляции репарации ДНК посредством PTM. Модификации ДНК-гликозилаз могут регулировать инициацию BER. Так, фосфорилирование приводит к ускорению выщепления 8-оксогуанина из ДНК ферментом OGG1 в 2,5 раза [59], а также увеличивает каталитическую активность ДНК-гликозилаз MYN и Ung2 [60,61]. Напротив, ацетилирование NEIL2 ингибирует эксцизионную и AP-лиазную активности этого фермента [62]. Показано влияние PTM и на вторую стадию BER: ацетилирование ингибирует dRP-лиазную активность Pol β , нарушая формирование интермедиата реакции основания Шиффа, и соответственно, может функционировать как переключатель между SP-BER и LP-BER [63]. Наконец, на третьем этапе BER фосфорилирование Pol β способствует увеличению полимеразной активности белка [64]. Интересно, что метилирование Pol β приводит к стимуляции *процессивности* фермента, не влияя на скорость удаления dRP-фрагмента и застраивания бреши. Таким образом, данная PTM может служить для направления BER преимущественно по длиннозаплаточному пути [65].

Изменение интенсивности белок-белковых и белок-нуклеиновых взаимодействий в результате химических модификаций ферментов BER (не влияющих на каталитическую активность), а также PTM каркасных белков XRCC1 и PARP1, может модулировать состав и стехиометрию комплексов репарации и служит примером не прямой регуляции BER с участием PTM. Так, считается, что ацетилирование тимин-ДНК-гликозилазы (TDG) может предотвращать привлечение APE1 к месту повреждения, тем самым блокируя дальнейшее течение репарации [66]. SUMOилирование *in vitro* уменьшает сродство TDG к ДНК, ускоряя диссоциацию этого фермента с продукта реакции, AP-сайта [67]. Предполагается, что

ацетилирование другой ДНК-гликозилазы, OGG1, также служит для понижения сродства фермента к AP-сайту, тем самым стимулируя активность OGG1 по выщеплению повреждённого основания [68]. Деацетилирование APE1 способствует увеличению интенсивности взаимодействия APE1 и XRCC1 [69]. Наконец, фосфорилирование XRCC1 необходимо для совместной релокализации XRCC1 и PNLK в очаг репарации [70]. Как предполагается, после этого фосфорилированный XRCC1 эффективно диссоциирует с ДНК, что способствует более эффективному выполнению его функции по привлечению других ферментов репарации [71,72]. Более подробное описание роли РТМ в процессе BER можно найти в обзорах [26,58,73].

В некоторых случаях РТМ могут модулировать связывание ферментов BER с так называемыми *неканоническими белками*, которые представляют дополнительный уровень функциональной регуляции BER. Например, ацетилирование APE1 увеличивает связывание APE1 с белком YB-1 [13], который способен стимулировать активность ДНК-гликозилаз NEIL2 и NTH1 [14,15]. На настоящий момент показано участие в BER ряда неканонических белков [48].

Кроме того, недавно было установлено, что ДНК-интермедиаты BER также могут вносить свой вклад в регуляцию процесса репарации, изменяя интенсивность белок-белковых взаимодействий ключевых ферментов репарации. Предполагается, что таким образом может регулироваться сборка белковых ансамблей, специализированно осуществляющих процессинг конкретного интермедиата [53].

1.2.3. Количественная регуляция BER

В то время как недостаточная ёмкость систем репарации коррелирует с повышенным мутагенезом и хромосомными нарушениями в условиях ДНК-повреждающего стресса [74], сверхэкспрессия ферментов BER сопряжена с геномной нестабильностью вообще и обнаруживается в опухолевых клетках [75]. В связи с этим одним из важнейших аспектов контроля системы BER является регуляция концентрации активных молекул белков репарации в клетке.

Как известно на настоящий момент, генотоксический стресс не приводит к изменению уровней экспрессии ключевых ферментов BER [76]. В основе регуляции ёмкости BER, как предполагается, лежит механизм, предложенный Parsons с соавт. [77]. Согласно этому механизму, количество действующих ферментов BER определяется непосредственно уровнем повреждения ДНК таким образом, что скорость репарации повреждений становится равной скорости их возникновения [77]. Ключевую роль в этом процессе играет XRCC1-

опосредованная стабилизация Pol β и lig III α в комплексе с повреждённой ДНК [77]. Избыток ферментов репарации удаляется убиквитин-зависимой протеасомой [77].

Однако регуляции количества белков репарации без учёта их стехиометрического соотношения недостаточно в силу того, что изменение концентрации хотя бы одного из ключевых белков BER может нарушить баланс формирования функциональных комплексов при репарации повреждения [36]. В частности, для минимизации накопления токсичных одностранных разрывов ДНК активность APE1 должна строго соответствовать ёмкости последующих стадий репарации [76]. Недавно был установлен механизм обратной связи, при котором аккумуляция одноцепочечных разрывов ДНК в клетке запускает p53/Sp1-зависимое подавление экспрессии APE1 [76].

1.2.4. Универсальная регуляторная молекула. Регуляция внутри системы

В предыдущих разделах мы коротко рассмотрели основные механизмы регуляции процесса BER. В большинстве случаев эти механизмы так или иначе происходят с участием посттрансляционных модификаций белков репарации, имеющих столь множественные эффекты на свои мишени, что их классификация представляет непростую задачу. Так, при помощи PTM регулируется стабильность белков (*количественная регуляция*), их ферментативные активности и белок-белковые взаимодействия (*функциональная регуляция*), а также белок-нуклеиновые взаимодействия и внутриклеточная локализация [78] (*пространственная регуляция*). Однако самый масштабный пример мультифункциональной PTM и её роли в репарации ДНК представляет поли(АДФ-рибоз)илирование, катализируемое белками семейства PARP (см. далее). Эта уникальная PTM может вносить свой вклад в *количественную* регуляцию BER и играет ключевую роль в *пространственной* и *функциональной* регуляции этого процесса (рис. 3, [23,72,79-86]).

Таким образом, полимер PAR представляет собой уникальную регуляторную молекулу BER, способную функционировать как внутри системы BER (координируя действия основных ферментов репарации), так и за её пределами, привлекая дополнительные белки и регуляторы (неканонические белки BER, факторы ремоделинга хроматина и др.). Интересно, что BER в некотором смысле можно рассматривать как саморегулирующуюся систему, пронизанную сетью физических и функциональных взаимодействий между ключевыми белками этого пути. Например, OGG1 обладает очень слабой AP-лиазной активностью и высоким сродством к AP-сайту, в результате чего остаётся связанной с продуктом реакции после проявления ДНК-гликозилазной активности [87]. Было показано, что APE1 способна препятствовать ассоциации OGG1 с AP-сайтом после выщепления повреждённого основания, тем самым увеличивая оборотность фермента и стимулируя его активность до пяти раз [87]. ДНК-гликозилазы OGG1 и

NEIL1 способны физически взаимодействовать с ферментом PARP1 и стимулировать синтез поли(АДФ-рибозы), предположительно повышая устойчивость клеток к действию активных форм кислорода [88,89].

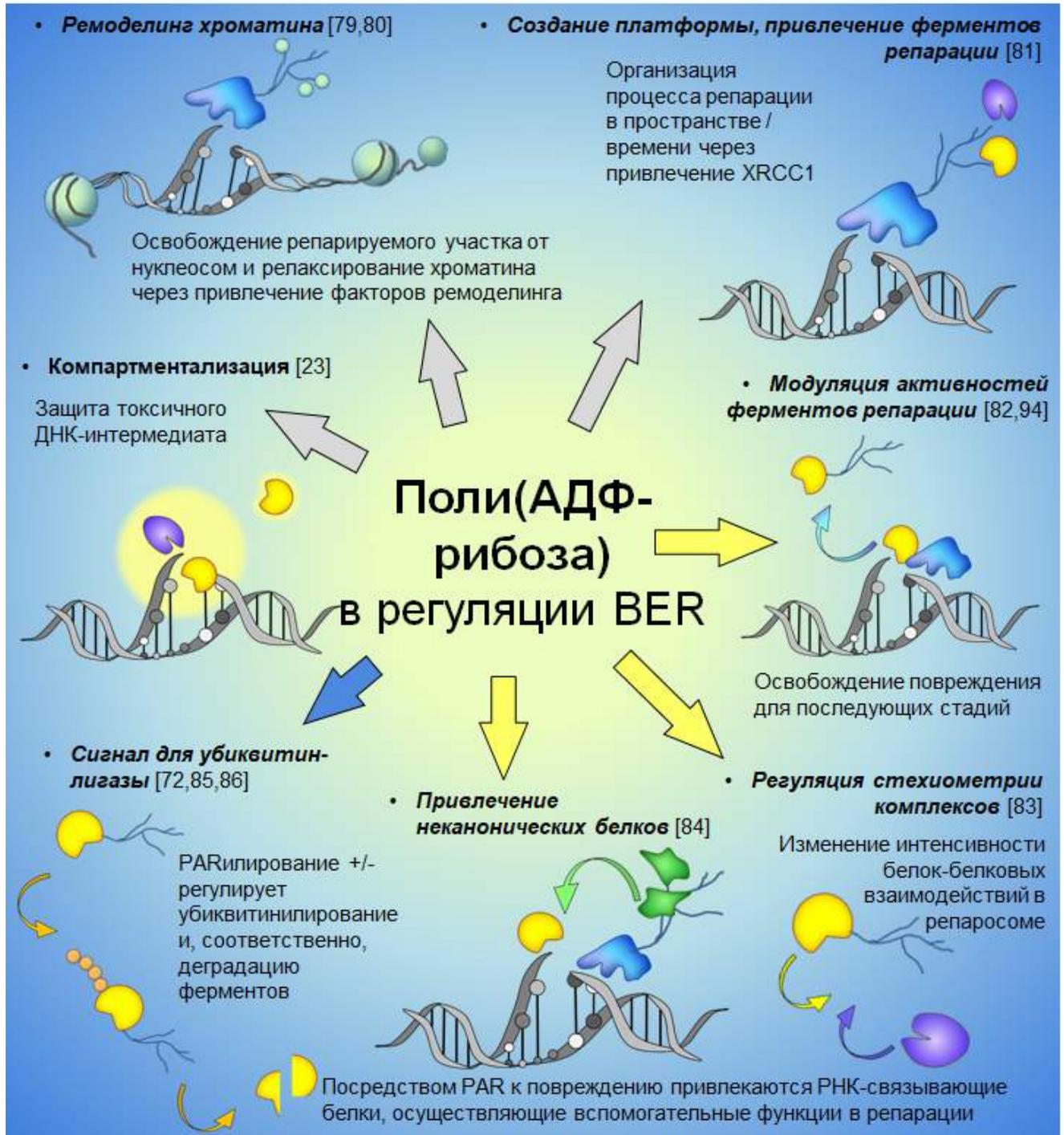


Рис. 3. Основные функции поли(АДФ-рибозы) (PAR) в регуляции процесса BER.  – пространственная регуляция;  – функциональная регуляция;  – количественная регуляция BER.

В свою очередь, PARP1 ингибирует активность OGG1 и NEIL1, что может иметь значение для удаления этих белков с ДНК-интермедиата после выполнения их функции [88,89]. С другой стороны, PARP1 способен взаимодействовать с AP-сайтами и может защищать эти токсичные промежуточные продукты BER до подходящего момента в инициации их репарации [52]. Очень любопытный пример представляет APE1, для которой показано физическое взаимодействие со следующим ферментом пути – ДНК-полимеразы β [90]. В зависимости от условий APE1 может стимулировать dRP-лиазную активность $\text{pol } \beta$ или активность этого фермента по вытеснению цепи, способствуя более эффективной репарации по пути SP-BER или LP-BER, соответственно (при этом присущая APE1 3'-5'-экзонуклеазная активность повышает точность синтеза при выборе любого из направлений) [90-93]. Присутствие PARP1 при этом ингибирует LP-BER, катализируемый $\text{pol } \beta$, не оказывая влияния на SP-BER [94]. Это регуляторное действие PARP1 ослабляется в условиях, способствующих проявлению PARP1 его каталитической активности [94].

1.3. BER в регуляции РНК

1.3.1. Ферменты BER в метаболизме РНК

Современные исследования дают всё больше свидетельств в пользу участия некоторых ферментов BER в метаболизме и системах контроля качества РНК. Несмотря на то, что многие белки BER, в частности, ДНК-гликозилазы OGG1 и NEIL1 [95,96] аккумулируются в ядрышке, предполагается, что их роль преимущественно сводится к репарации ДНК в рДНК локусе [97]. Однако локализация в ядрышке APE1, SMUG1 и PARP1, как установлено, имеет непосредственное отношение к функционированию этих ферментов в процессах, связанных с РНК (регуляция транскрипции и контроля качества рРНК, созревание рибосом). Эти три белка представляют наиболее яркий пример мультифункциональных ферментов, осуществляющих взаимосвязь репарации ДНК и метаболизма РНК.

APE1 участвует в регуляции транскрипции, модулируя связывание некоторых транскрипционных факторов со специфическими элементами в ДНК за счёт изменения состояния окисления-восстановления этих белков [98], и может осуществлять репрессию транскрипции в ответ на повышения уровня экстраклеточных ионов Ca^{2+} [99]. Установлена роль эндонуклеазной активности APE1 в регуляции экспрессии гена *c-myc* [100]. Наконец, показана ассоциация APE1 с 47S, 28S и 18S рРНК *in vivo*, а также способность этого белка регулировать уровень окисления рРНК в клетке [101].

ДНК-гликозилаза SMUG1 непосредственно взаимодействует с псевдоуридинсинтазой DKC1 [102] – ферментом, катализирующим модификацию специфичных остатков урацила в рРНК.

Оба белка локализуются в ядрышке и тельцах Кахаля – органеллах, где происходит биогенез рРНК и созревание некодирующих РНК, соответственно [97]. Показано, что SMUG1 связывается с 47S рРНК *in vivo*, а недостаток SMUG1 приводит к понижению экспрессии 28S, 18S и 5.8S рРНК в результате накопления дефектных молекул рРНК, которые деградируют [102]. Как и APE1, SMUG1 может участвовать в таком необычном процессе, как *репарация РНК* (см. далее).

PARP1 является базальным фактором транскрипции (TFIIС) и служит для ингибирования транскрипции на ДНК, содержащей разрывы цепей [103]. Этот фермент может выступать в качестве негативного регулятора транскрипции, препятствуя связыванию других факторов транскрипции с соответствующими последовательностями в ДНК посредством поли(АДФ-рибоз)илирования этих белков, или напротив, служить ко-активатором, физически взаимодействуя с рядом транскрипционных факторов [104]. Под транскрипционным контролем PARP1 находится его собственный ген – посредством авторегуляторной петли в клетке поддерживается постоянный уровень PARP1 [105].

Белки семейства PARP и, в частности, PARP1, вовлечены в регуляцию метаболизма РНК на разных уровнях (см. обзор [106]). В отсутствие стрессорного воздействия большая часть PARP1 и ядерной поли(АДФ-рибозы) локализована в ядрышке [107]. Нокдаун гена *PARP1* или ингибирование активности этого фермента приводят к фрагментации ядрышка, накоплению интермедиатов биогенеза рРНК и нарушению сборки полисом в цитоплазме [108]. В работе Воатам с соавт. предложена модель участия PARP1 в биогенезе рибосом [108]. Согласно этой модели, PARP1 аутомодифицируется при каждом акте старта транскрипции гена рДНК и далее выступает в качестве шаперона в ходе полного цикла созревания рибосомы в ядрышке. При этом молекула поли(АДФ-рибозы) организует в пространстве и времени процессинг и модификацию транскрибируемой рРНК с последующей загрузкой рибосомных белков [108]. Показано участие PARP1 в распределении белков между ядрышками и тельцами Кахаля [109]. PARP1 также регулирует транскрипцию рРНК, взаимодействуя с ядрышковым комплексом ремоделинга через некодирующую РНК, ассоциированную с промотором [110]. В условиях стрессорного воздействия на клетку PARP1 способен поли(АДФ-рибозил)ировать поли(А)-полимеразу (РАР), что приводит к нарушению процессинга 3'-конца пре-мРНК [111], необходимого для экспорта в цитоплазму [112]. Активация PARP1 при тепловом шоке может регулировать сплайсинг пре-мРНК посредством изменения динамики РНК-связывающих белков гетерогенных ядерных рибонуклеопротеинов (hnRNP) [113].

1.3.2. Повреждение РНК – спонтанное и...целенаправленное

Как и ДНК, РНК подвержена негативному действию эндо- и экзогенных факторов, индуцирующих возникновение химических повреждений молекулы. Модификации нуклеотидов РНК могут приводить к нарушению фундаментальных клеточных процессов, происходящих с участием РНК (что в некоторых случаях с успехом используется как стратегия для разработки «молекулярного оружия», см. далее). Как и в случае ДНК, накопление повреждений в РНК может быть сопряжено с развитием определённых патологий (так, установлена связь между накоплением оксидативных повреждений РНК и развитием нейродегенеративных заболеваний у человека [114]).

Ситуация усугубляется тем, что в азотистых основаниях РНК аккумулируется существенно больше повреждений, чем в ДНК в тех же условиях [115,116]. Например, в условиях оксидативного стресса, оксидативное повреждение РНК в 10-20 раз превышает повреждение ДНК [117]. РНК преимущественно существует в одноцепочечной форме, в которой Уотсон-Криковские поверхности азотистых оснований экспонированы и не защищены второй цепью, как в случае ДНК [118]. Более того, в отличие от ДНК, которая у эукариот плотно упакована в хроматин, РНК ассоциирована с белками в меньшей степени [118]. Наконец, локализация РНК в цитоплазме в непосредственной близости от митохондрий, делает её более подверженной действию активных форм кислорода [118]. Следует отметить, что внутриклеточный метаболизм нуклеиновых кислот как источник эндогенных повреждений также вносит различный вклад в модификацию структуры ДНК и РНК. Так, по сравнению с поразительной точностью репликации (которая, в совокупности с коррекцией мисматчей составляет $\sim 10^{-10}$ [119]), транскрипция ($\sim 10^{-5}$ [120]) и, особенно, сплайсинг пре-мРНК ($\sim 7 \times 10^{-3}$ [121]) являются достаточно ошибочными процессами. То, что эта ошибочность не только *не была* элиминирована, но поддерживалась, если не *совершенствовалась* в ходе естественного отбора, во многом обусловлено тем, что пострепликативные этапы процессинга генетической информации играют ключевую роль в создании «инновационного пространства» как источника полезных мутаций при адаптации к новым условиям среды [122,123].

Таким образом, повреждения могут возникать в РНК спонтанно (вследствие химической лабильности молекулы) и вероятно (вследствие запрограммированной неточности систем её процессинга). Однако есть и третья группа повреждений – те, которые целенаправленно вносятся в РНК активностью специализированных ферментов. На настоящий момент в эукариотических клетках идентифицировано около ста различных химических модификаций РНК [RNAMDB, <http://mods.rna.albany.edu/>]. Некоторые из них выполняют регуляторную роль: например, псевдоуридин, по-видимому, важен для структуры и функции рибосомных и малых ядерных РНК [124]. Модификации оснований, приводящие к изменению кодона, используются

для *редактирования* РНК. Одним из основных механизмов редактирования РНК является дезаминирование аденозина с образованием инозина («A-to-I editing»), катализируемый семейством белков ADAR (adenosine deaminase acting on RNA) [125]. Замечательной иллюстрацией действия этой системы служит *уникальный пример регуляции репарации ДНК посредством «переключения» специфичности ДНК-гликозилазы NEIL1* [126]. Вероятность дезаминирования аденозина в пре-мРНК NEIL1 существенно возрастает при воздействии на клетку интерферона α , приводя к появлению изоформы белка с аминокислотной заменой Lys→Arg в активном центре [126]. Изоформы NEIL1 различаются ДНК-гликозилазной активностью и специфичностью распознавания ряда повреждений ДНК [126]. Наибольшее количество и разнообразие химических модификаций азотистых оснований обнаруживается в тРНК [127]. Интересно, что ряд посттранскрипционных модификаций тРНК наблюдается в условиях стрессорного воздействия, и, как предполагается, может служить для модуляции кодон-антикодоновых взаимодействий при трансляции, представляя пример *тРНК-эпигенетики* [128].

Направленное повреждение РНК в некоторых случаях используется как сигнал для систем *контроля качества РНК*. В эукариотических клетках эти системы не только предотвращают накопление нефункциональных молекул РНК, но также регулируют метаболизм нормальных мРНК и подавляют вирусные и паразитические РНК [129]. В целом, РНК ввиду её повсеместной вовлечённости в жизненно необходимые клеточные процессы, является одной из любимых мишеней *ферментативных токсинов* в биологических конфликтах на всех уровнях жизни – начиная от взаимоотношений хищник-жертва и заканчивая экспансией мобильных генетических элементов внутри генома [130]. Например, фермент *рицин*, присутствующий в семенах *Ricinus communis*, защищает растение от поедания животными. В частности, этот РНК-токсин инактивирует рибосомы хищника посредством удаления остатка аденина из консервативной петли 28S рРНК [131]. Вообще, остановка трансляции в результате повреждения РНК может происходить и в том случае, когда мишенью ферментативного токсина является мРНК или тРНК [130]. Подобная стратегия позволяет получить двойное преимущество: быструю блокировку жизненно необходимых клеточных процессов и замедление всех аспектов репаративного ответа, которые зависят от стресс-индуцируемой трансляции [130].

1.3.3. Репарация РНК и BER

Совершенствование «молекулярного оружия», направленного на РНК, происходило одновременно с эволюцией белковых доменов, служащих для репарации РНК [130]. На настоящий момент подробно исследованы лигазные модули, нуклеотидилтрансферазы с РНК-

полимеразной активностью и ферменты, осуществляющие процессинг концов РНК. Однако остаётся открытым вопрос о существовании систем, исправляющих такие последствия воздействия РНК-токсинов как депуринизация и дезаминирование [130]. В отличие от ДНК, у РНК нет комплементарной цепи, которая может служить матрицей для ресинтеза исходной последовательности при репаративном процессе, поэтому существование механизмов репарации РНК аналогичных системам репарации ДНК маловероятно [97]. В любом случае, повреждённые молекулы РНК должны быть удалены из оборота, что требует участия белков, способных распознавать такие небольшие повреждения, как модификации азотистых оснований. Лучшими кандидатами на эту роль являются белки системы BER, в частности, ДНК-гликозилазы и APE1, для которых также показано участие в метаболизме РНК (см. ранее).

Открытие в 2003 г. ферментов, способных деметилировать метилированные основания в РНК [132], впервые продемонстрировавшее возможность прямого ферментативного исправления модификаций РНК, легло в основу сразу двух революционных гипотез – *РНК-эпигенетики* [133] и *репарации РНК*. Обратимая посттранскрипционная модификация РНК с участием ферментов аналогична эпигенетической регуляции ДНК и в настоящее время рассматривается как один из механизмов динамической регуляции экспрессии генов [133]. К сожалению, в настоящее время существует всего несколько примеров белков, активных по отношению к РНК, содержащим повреждённые основания. В частности, показана способность APE1 расщеплять AP-сайты в составе одноцепочечной AP-содержащей РНК [134]. Интересно, что в S-фазе клеточного цикла APE1 аккумулируется в ядрышке и взаимодействует с нуклеоплазмином 1 (NPM1). NPM1 способен стимулировать активность APE1 по отношению к AP-сайтам в ДНК и ингибировать активность фермента на AP-содержащих РНК-субстратах. Предполагается, что таким образом осуществляется тонкая регуляция функций APE1 в ядрышке: репарации AP-сайтов в рДНК, с одной стороны, и деградации повреждённой рРНК – с другой [101]. Оксидативный стресс нарушает ассоциацию APE1 с NPM1 [101], индуцируя релокализацию обоих белков в нуклеоплазму для участия в репарации ДНК [135].

Другим примером может служить ДНК-гликозилаза SMUG1, для которой была установлена способность удалять 5-гидроксиметилуридин из олигонуклеотидов РНК *in vitro*. Эксперименты *in vivo* показали повышенное содержание этого модифицированного основания в рРНК клеток после нокдауна гена *SMUG1* [102].

Наконец, неканонический белок BER YB-1 может вносить свой вклад в распознавание повреждённой РНК за счёт селективного связывания РНК, содержащей 8-оксогуанин. Это повреждение может возникать в РНК в условиях оксидативного стресса и приводить к ошибкам в процессе белкового синтеза. Предполагается, что YB-1, связывая повреждённую РНК, может выводить её из трансляции [136].

Таким образом, уникальная способность ДНК-гликозилаз распознавать даже незначительные химические модификации азотистых оснований нуклеиновых кислот может использоваться не только в репарации ДНК на первом этапе BER, но и играть важную роль для различения нормальных и дефектных молекул РНК в системах контроля качества РНК, однако эта область на данный момент исследована далеко не достаточно [97].

1.4. На стыке трёх нуклеиновых кислот: роль РНК-связывающих белков и поли(АДФ-рибозы) в репарации ДНК

Функционирование трёх важнейших нуклеиновых кислот клетки – ДНК, РНК и поли(АДФ-рибозы) (PAR) – тесно сопряжено и осуществляется при участии специализированных белков-посредников. Некоторые из ДНК-, РНК- и PAR-связывающих белков способны взаимодействовать сразу с несколькими типами полимеров. Как правило, такие белки содержат неупорядоченные элементы последовательности, позволяющие им подстраиваться под структуру определённого лиганда. Настоящий раздел обобщает наиболее современные представления о взаимосвязи трёх нуклеиновых кислот, реализуемой посредством взаимодействия с мультифункциональными белками клетки.

1.4.1. Интерференция транскрипции и репарации ДНК

Сопряжённость систем репарации ДНК и метаболизма РНК в клетке наглядно демонстрирует процесс BER, поскольку многие белки-участники этого пути исправления повреждений ДНК, включая APE1, SMUG1 и PARP1, вовлечены также в метаболизм РНК [137] (см. раздел 1.3). Очевидно, что транскрипционные факторы могут принимать опосредованное участие в репарации ДНК, контролируя экспрессию генов ферментов репарации [138]. Однако возможно и обратное: некоторые факторы репарации ДНК способны напрямую выступать в качестве ко-активаторов транскрипции [139]. Например, вовлечённый в BER фермент тимин-ДНК-гликозилаза (TDG) может стимулировать транскрипцию некоторых генов, привлекая ко-активаторы [140]. Этот фермент осуществляет динамическое деметилирование ДНК в промоторах молчащих генов и генов, включающихся на конкретном этапе развития, а также в энхансерах активных генов для быстрого транскрипционного ответа [141,142].

Как правило, репарация и транскрипция ДНК не происходят одновременно, по крайней мере, это справедливо для постоянно экспрессируемых генов домашнего хозяйства. Некоторые объёмные повреждения, блокируя движение РНК-полимеразы II, индуцируют систему эксцизионной репарации нуклеотидов (NER) (этот путь репарации называется репарацией, сопряжённой с транскрипцией, или TC-NER) [143]. Мутагенный потенциал других

повреждений ДНК минимизируется за счёт ингибирования транскрипции вблизи повреждения – например, подавление экспрессии генов наблюдается в процессе репарации оксидативных повреждений ДНК системой BER [144].

Для активации экспрессии генов развития и генов, экспрессия которых индуцируется внешним воздействием, напротив, требуется присутствие в промоторе временного повреждения ДНК, которое необходимо репарировать [139]. Важным механизмом регуляции экспрессии таких генов служат *паузы транскрипции*, вызванные остановкой РНК-полимеразы II в проксимальной области промотора [145]. При этом происходит инициация транскрипции, но элонгация останавливается на ранних этапах [146]. Для снятия «паузирования» РНК-полимеразы и элонгации транскрипции служат белки репарации ДНК и факторы ремоделинга хроматина. Например, эстрогеновый рецептор активизирует лизин-специфичную деметилазу 1 (LSD1), деметилирующую гистон H3. В ходе этого оксидативного процесса образуется пероксид водорода, превращающий близко расположенные гуанины в ДНК в 8-оксогуанин (8-охоG) [147]. При репарации 8-охоG ДНК-гликозилазами формируются одноцепочечные разрывы ДНК, на которых начинают действовать ДНК-эндонуклеазы, в том числе, топоизомераза ТороIIβ [148]. При экспрессии протяжённых генов топоизомераза ТороII вносит разрывы в молекулу ДНК не только в промоторах, но и в кодирующих участках генов, поддерживая элонгацию транскрипции [149]. Показано, что ингибирование топоизомераз снижает экспрессию протяжённых генов у дрожжей [150,151]. Считается, что образующиеся двухцепочечные разрывы релаксируют ДНК и способствуют привлечению сенсоров повреждений и факторов репарации (таких как PARP1 и ДНК-протеинкиназы), что приводит к организации оптимальной для активации транскрипции архитектуры хроматина [148]. Так, у человека разрывы ДНК и соответствующая им передача сигнала о повреждении ДНК необходимы для снятия паузы для РНК-полимеразы II с последующей элонгацией транскрипции генов, экспрессия которых индуцируется внешним воздействием [152]. Среди факторов ремоделинга хроматина, регулирующих паузы РНК-полимеразы II, был идентифицирован фермент PARP1. Считается, что PARP1 способствует элонгации транскрипции за счёт PAR-опосредованной разборки нуклеосом [153]. Однако, вероятно, что индуцируемый разрывами ДНК процесс поли(АДФ-рибозил)ирования вблизи промоторов генов необходим также для привлечения РНК-связывающих белков, важных для посадки РНК-полимеразы II (см. далее).

Интересно, что для активации репарации ДНК может использоваться *образование РНК-транскрипта в сайте повреждения ДНК*. Было показано, что спонтанно возникающие двухцепочечные разрывы ДНК индуцируют эктопическую транскрипцию, в результате которой синтезируются короткие некодирующие РНК (DSB-induced small RNAs, diRNA) размером ~21

нуклеотид [154]. Предполагается, что diRNA привлекают ферменты репарации двухцепочечных разрывов ДНК к сайтам повреждений, тем самым способствуя репарации [154]. Более того, недавно появились данные, указывающие на возможность *поли(АДФ-рибозил)ирования* ферментами PARP1 и PARP2 *концов разрывов ДНК* [155]. Не исключено, что этот процесс может вносить вклад как в ремоделинг хроматина, так и в репарацию ДНК [155].

Наконец, некоторые транскрипционные факторы способны напрямую участвовать в репарации ДНК [156]. Предположительно, в основе этого феномена лежит способность факторов транскрипции индуцировать локальную перестройку хроматина, стимулируя репарацию вблизи распознаваемых ими последовательностей в ДНК [157].

Таким образом, транскрипционные факторы способны обеспечивать дополнительный уровень стабильности генома. В разных тканях организма преобладают разные источники повреждений ДНК: высокий уровень метаболизма кислорода в нейронах приводит к образованию большого количества оксидативных повреждений ДНК, в то время как в клетках кожи наблюдается повышенный уровень повреждений ДНК, индуцированных УФ-светом [156]. Поскольку транскрипционные факторы регулируются экстраклеточными воздействиями и стресс-зависимыми сигнальными системами, они могут способствовать дополнительной защите ДНК определённого типа клеток [156]. В клетках, ввиду гетерогенности репарации по геному (существует градиент эффективности репарации транскрибируемой цепи ДНК, при этом репарация вблизи 5'-конца идёт быстрее, а к 3'-концу замедляется), факторы транскрипции способны обеспечивать дополнительный уровень защиты целостности ДНК ключевых промоторных и энхансерных элементов регулируемых ими генов [158].

1.4.2. «РНК-опероны» эукариот

В 1961 г. Ф. Жакоб и Ж. Моно предложили модель оперона, согласно которой у бактерий функционально взаимосвязанные структурные белки закодированы последовательно в одном участке ДНК. Их согласованная экспрессия приводит к синтезу полицистронной мРНК, при трансляции которой все компоненты мультибелкового ансамбля образуются одновременно и в непосредственной близости друг от друга, что способствует быстрой сборке функциональных структур. Позже анализ рибосомного профиля экспрессии генов по геному *E.coli* подтвердил эту гипотезу, продемонстрировав, что компоненты функциональных ансамблей синтезируются в точной пропорции согласно стехиометрии финального комплекса [159].

В геномах эукариот ДНК-опероны встречаются редко, и мРНК по большей части моноцистронны. Отказ от ДНК-оперонов у высших организмов может быть связан как с полярным эффектом нонсенс-мутаций, так и со сложностью регуляции синтеза мультифункциональных белков, содержание которых в протеомах эукариот значительно

возрастает по сравнению с прокариотами [160]. Поэтому координация экспрессии генов у эукариот частично осуществляется на посттранскрипционном уровне, когда мРНК, кодирующие функционально сопряжённые белки, объединяются в *РНК-опероны* (рис. 4), тем самым приобретая схожую организацию и направленность [161].

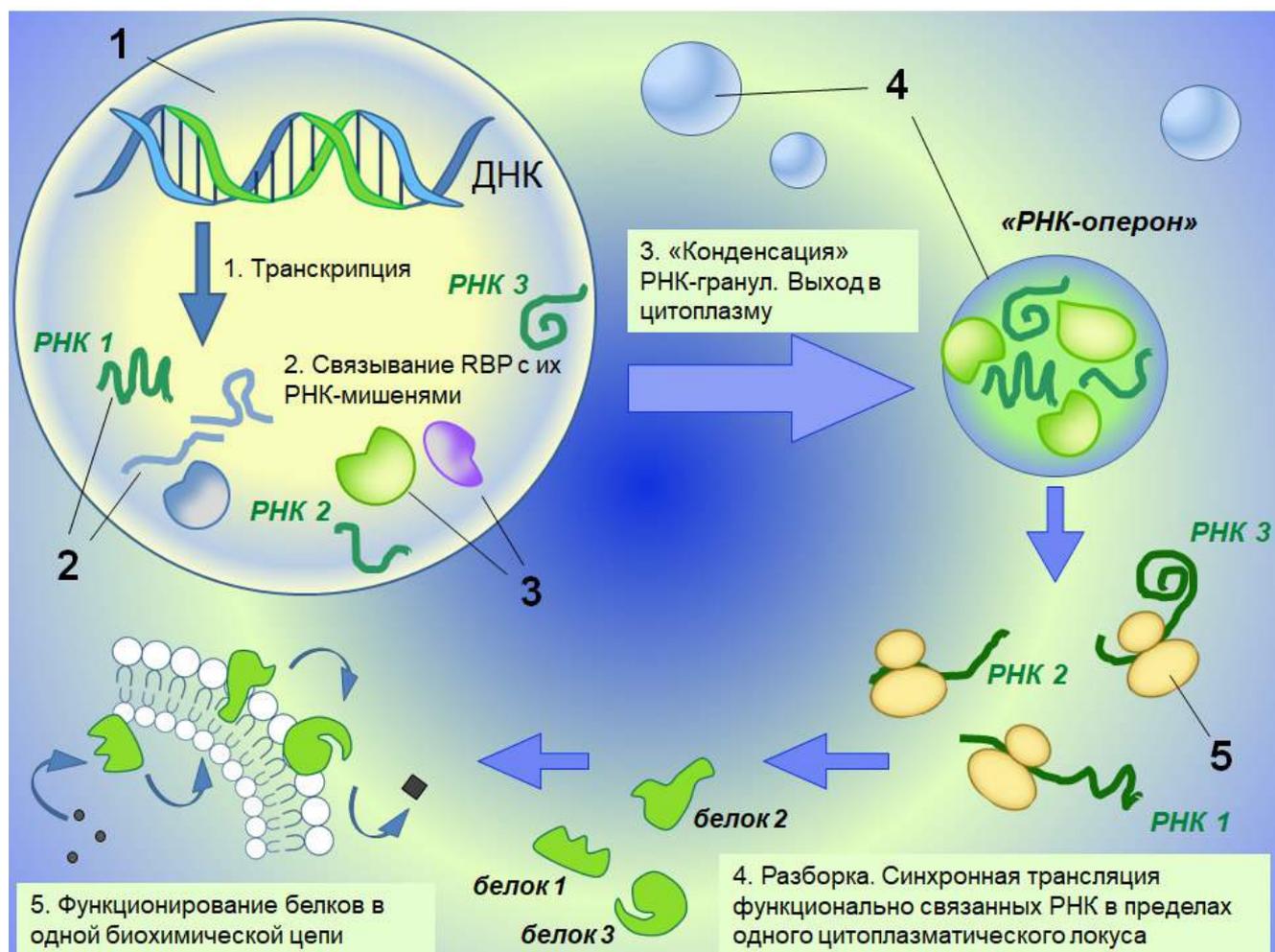


Рис. 4. «РНК-опероны» эукариотических клеток (схема). 1 – ядро клетки; 2 – пре-мРНК; 3 – РНК-связывающие белки; 4 – цитоплазматические RNP-гранулы («РНК-опероны»); 5 – рибосома. Схема иллюстрирует формирование и функционирование цитоплазматических рибонуклеопротеиновых комплексов функционально связанных мРНК и RBP («РНК-оперонов»), обеспечивающее локализованную в месте и времени трансляцию белковых компонент надмолекулярных ансамблей.

Главной структурно-функциональной единицей этого процесса являются многочисленные РНК-связывающие белки (RBP), которые распознают мотивы РНК и формируют рибонуклеопротеиновые (RNP) комплексы [162]. RNP-комплексы являются структурным выражением РНК-оперонов, позволяя функционально сопряжённым белкам, закодированным на разных мРНК, транслироваться синхронно в пределах одного цитоплазматического локуса [163]. Функционирование RNP-комплексов как независимых от окружения динамических компартментов клетки обеспечивается по механизму так называемого «разделения жидкостей»

(*liquid demixing*) [164-173], ключевую роль в которых играют неупорядоченные последовательности РНК-связывающих белков (см. далее).

1.4.3. Новые функции РНК-связывающих белков в ответе клетки на повреждение ДНК

В современных работах РНК-связывающие белки были идентифицированы как важнейшие участники поддержания стабильности генома [174].

Наличие в ДНК повреждений в целом приводит к подавлению экспрессии генов на разных уровнях. На самом первом уровне происходит ингибирование транскрипции и репрессия процессинга 3'-концов пре-мРНК [175,176]. Далее, снижение экспрессии функциональных продуктов многих генов осуществляется посредством переключения альтернативного сплайсинга пре-мРНК этих генов на варианты, содержащие преждевременные стоп-кодоны, и следовательно, подверженные нонсенс-опосредованной деградации мРНК [177,178]. Наконец, повреждение ДНК приводит к уменьшению стабильности многих мРНК [179] и ингибированию трансляции [180,181].

Однако, несмотря на общее снижение уровня экспрессии, существуют специальные механизмы, обеспечивающие достаточную экспрессию генов, продукты которых вовлечены в ответ клетки на повреждение ДНК. Так, репрессия трансляции при повреждении ДНК может не распространяться на мРНК, кодирующие белки-участники ответа на повреждение [182]. В соответствии с моделью РНК-оперонов, мРНК, которые кодируют функционально связанные белки, регулируются сопряжённо на посттранскрипционном уровне. Таким образом, отдельно взятый RBP может контролировать экспрессию целого ряда генов клеточного ответа на повреждение ДНК, как это наблюдается для РНК-связывающего белка NuR [183-185].

RBP могут регулировать транскрипцию и ремоделинг хроматина и способны напрямую участвовать в репарации ДНК [186,187]. При этом RBP локализуются вблизи сайтов повреждений ДНК [84,188,189], что может быть опосредовано их связыванием с короткими некодирующими РНК (ncRNA), локально синтезирующимися на повреждениях [154,186,190], или осуществляться по механизму, независимому от РНК (см. далее).

Транскрипция генов с высоким уровнем экспрессии или очень протяжённых иногда продолжается в S-фазе клеточного цикла [191], при этом могут формироваться РНК-ДНК гибриды (R-петли), которые служат причиной большого количества повреждений ДНК эндогенной природы [192]. Предотвращение образования R-петель происходит, в первую очередь, благодаря упаковке РНК-связывающими белками пре-мРНК в процессе её синтеза [193,194].

Важнейшую роль в ответе клетки на повреждение ДНК играет передача сигнала посредством РТМ белков. RBP представляют основную категорию белков, фосфорилирование [195,196] и поли(АДФ-рибозил)ирование [197] которых регулируются повреждением ДНК. Генотоксический стресс приводит также к повышению уровня ацетилирования некоторых RBP [198].

Наконец, повреждение ДНК индуцирует внутриклеточную релокализацию RBP из цитоплазмы в ядро и наоборот [199,200], что может быть важным для координации регуляции метаболизма РНК и репарации ДНК мультифункциональными RBP.

1.4.4. РНК-связывающие белки: модульное строение

Большая часть РНК клетки ассоциирована с РНК-связывающими белками в форме RNP-комплексов, нарушения в формировании которых приводят к различным заболеваниям [201,202]. Взаимодействие с RBP необходимо для регуляции метаболизма РНК на всех этапах от биогенеза до деградации, и РНК-связывающие белки выполняют ключевые функции в таких процессах, как сплайсинг пре-мРНК [203], полиаденилирование [204], экспорт в цитоплазму и трансляция. Также RBP участвуют в процессинге некодирующих РНК – микроРНК (miRNA), циклических РНК (circRNA) и lncRNA [205-207]. Таким образом, RBP являются важнейшими посттранскрипционными регуляторами генов.

На настоящий момент идентифицировано порядка 1500 RBP [208,209]. Большинство из них имеют модульное строение, при котором разнообразие распознаваемых последовательностей РНК достигается за счёт различных комбинаций всего нескольких основных РНК-связывающих доменов (RBD) [210]. Отдельные RBD, как правило, связывают короткие последовательности и обладают слабым сродством к РНК, однако, организация поверхности взаимодействия из множественных модулей позволяет достичь высокой аффинности и специфичности к РНК-мишени. Использование суперпозиции из слабых взаимодействий делает более простой регуляцию сборки и разборки RNP-комплексов, которая может осуществляться посредством РНК-подобного полимера поли(АДФ-рибозы) (см. далее) [211,212]. Причём, благодаря модульной структуре RBP, становится возможным распознавание последовательностей, принадлежащих разным молекулам РНК [210]. Замечательный пример достижения специфичного связывания с мишенью за счёт тандемных RBD представляют белки семейства Pumilio (Puf), у которых боковые радикалы трёх аминокислотных остатков каждого из восьми доменов образуют контакты с отдельным основанием РНК [213]. Этот «код» распознавания РНК может быть использован для конструирования белков, обладающих нужной специфичностью [214]. RBD, например, РНК-распознающий мотив (RRM), в некоторых случаях могут служить для взаимодействия РНК-связывающего белка с другими белками [215].

Недавно было обнаружено, что помимо классических RBD, важнейшую роль в распознавании РНК белками играют элементы последовательности с неупорядоченной структурой, которых в РНК-связывающих белках существенно больше, чем в среднем по протеому [216]. Так, около 20% белков млекопитающих, идентифицированных как RBP, неупорядочены более чем на 80% [217]. Как и классические RBD, участки с неупорядоченной структурой в РНК-связывающих белках организованы в виде модулей, повторяющихся неслучайным образом в пределах белковой последовательности, и в некоторых случаях могут комбинироваться с глобулярными доменами [217]. Следует отметить, что возникновение неупорядоченных последовательностей в RBP коррелирует с повышением сложности транскриптома в эволюции [218].

1.4.5. «Танцующие» белки, хамелеоны, 4D и «белковые облака»

Эти термины [219-222], появившиеся, чтобы охарактеризовать биологически активные белки, не имеющие определённой 3D структуры, отражают основные особенности неупорядоченных белков (*intrinsically disordered proteins*, IDP) и частей белков (*intrinsically disordered protein regions*, IDPR) – их высокую пластичность и динамику [223]. Поскольку 3D структура белка формируется за счёт различных нековалентных взаимодействий – водородных связей, гидрофобных взаимодействий, сил Ван-дер-Ваальса и др., неупорядоченность IDP, как и уникальная структура глобулярных белков, закодирована в их аминокислотной последовательности. Наличие большого числа нескомпенсированных заряженных групп в совокупности с пониженным содержанием гидрофобных аминокислотных остатков, как правило, приводят к отсутствию стабильной структуры белка в физиологических условиях [224]. В частности, в первичной последовательности IDP и IDPR преобладают аминокислотные остатки Pro, Arg, Gly, Gln, Ser, Glu, Lys и Ala и уменьшено количество Cys, Trp, Tyr, Phe, Ile, Leu, Val и Asn [225].

IDP частично приобретают определённую 3D структуру при изменении условий среды или при связывании с лигандом [226]. Так, их фолдингу способствуют: повышение температуры, усиливающее гидрофобные взаимодействия [227]; изменение pH, уменьшающее суммарный заряд белка [227]; а также наличие ионов, нейтрализующих электростатическое отталкивание между кластерами одноимённо заряженных аминокислотных остатков [228,229]. Внутри клетки неупорядоченные белки приобретают определённую структуру при связывании со специфичными мишенями и лигандами – небольшими молекулами, кофакторами, другими белками, нуклеиновыми кислотами, мембранами и т.д. [226,230].

Функции многих белков, особенно IDP, модулируются посредством РТМ, разнообразие которых в физиологических условиях достигает 300 [231]. При том, что в ДНК закодировано

всего 20 аминокислот, разнообразие аминокислотных остатков в белках, благодаря РТМ, превышает 140 [232]. Модификация белков посредством РТМ преимущественно осуществляется в неупорядоченных участках последовательности [233,234].

IDP и белки, содержащие IDPR, по-видимому, играют центральную роль в интерактомах [235]. Так, у высших эукариот около 30-40% белков содержат протяжённые IDPR [236], причём неупорядоченные белки выполняют ключевые функции в транскрипции и клеточных сигнальных каскадах [234]. В 2005 г. было впервые предположено, что *хабы* (узловые белки интерактомах) могут быть обогащены IDPR [237]. Многочисленные исследования позволили разделить хабы на две основные категории – стабильные и временные [238,239], первые из которых формируют *модули* – функциональные комплексы с высокой степенью взаимосвязанности белковых компонент (например, система инициации транскрипции), а вторые обеспечивают взаимодействия модулей между собой [240]. Оказалось, что только во второй категории хабов широко представлены IDPR [241], следовательно, роль IDP в интерактоме заключается именно в координации различных клеточных процессов [235].

В клетке существует множество способов функционирования неупорядоченных белков. IDPR вовлечены в автоингибирование ферментов, при этом переход между упорядоченным и неупорядоченным состоянием отдельных доменов белка действует как переключатель, активируя или ингибируя фермент [242]. Такой механизм, в частности, используется в репарации ДНК для активации фермента PARP1 и передачи сигнала о наличии повреждения в ДНК [243]. Другим интересным примером использования IDPR служит вовлечение IDPR-содержащих белков в системы контроля качества белков, при этом переход белковых шаперонов от упорядоченного к неупорядоченному состоянию является стресс-индуцируемым [244]. Считается, что IDP способны действовать как «молекулярные щиты», стерически ингибируя образование агрегатов других неупорядоченных белков в условиях стресса [245]. Неупорядоченные элементы последовательностей в белках также используются для регуляции тканеспецифичных сетей взаимодействий белков на уровне транскрипции. В работах Vuljan с соавт. [246] и Ellis с соавт. [247] было показано, что высокий процент IDPR в белках закодирован тканеспецифичными экзонами, остающимися после альтернативного сплайсинга [246]. Аналогично, тканеспецифичные экзоны кодируют существенную часть белковых сегментов, содержащих сайты РТМ и мотивы, служащие для связывания белков-партнеров [246]. Интересно, что белки, транслируемые с мРНК, обогащенных тканеспецифичными экзонами, занимают центральные позиции в интерактомах, взаимодействуя с различными партнерами в соответствующих тканях [246].

Наличие неконсервативных IDPR в структуре ранних ферментов BER млекопитающих является уникальной особенностью, отсутствующей у их гомологов из низших организмов [48].

IDPR ферментов репарации вовлечены в распознавание повреждений ДНК, взаимодействие с белковыми партнёрами; являются преимущественными акцепторами РТМ, регулирующими стабильность, ферментативную и ДНК-связывающую активности и внутриклеточную локализацию белков репарации, а также дают высшим организмам преимущество в размерах белков, освобождая пространство для динамики биомолекул внутри клетки [78,248-251].

Наконец, важнейшую роль IDP и IDPR играют в формировании динамических макромолекулярных структур клетки, в том числе, RNP-гранул и комплексов репарации ДНК.

1.4.6. Фазовые переходы биомолекул

Согласно современным представлениям, подробно изложенным в работах [165,166,169-171,173], разобщение биохимических процессов в клетке осуществляется посредством так называемых *фазовых переходов (phase transitions)* биомолекул (рис. 5).



Рис. 5. Фазовые переходы биомолекул. 1 – функциональные немембранные органеллы; 2 – патологические амилоидные агрегаты белков. Биомолекулы претерпевают фазовые переходы подобно воде. В состоянии «газа» биомолекулы распределены в плазме клетки, не взаимодействуя друг с другом. При повышении локальной концентрации мультивалентных и неупорядоченных белков происходит «расслоение» (*liquid demixing*) внутриклеточной плазмы с формированием немембранной органеллы, по поведению сходной с каплей жидкости [166-168]. Функционирование динамической немембранной органеллы реализуется за счёт множественных слабых взаимодействий образующих её биомолекул. Стабилизация связей биомолекул с переходом в «твёрдую фазу» приводит к формированию нефункциональных амилоидных агрегатов белков и может наблюдаться при патологических состояниях организма, таких как болезнь Альцгеймера [171].

В соответствии с этой парадигмой, образование немембранных компартментов клетки имеет сходные черты с формированием капель дисперсной фазы при расслоении эмульсии двух жидкостей, обладающих различными свойствами [164-166,252-254]. Ключевая роль в фазовых

переходах принадлежит неупорядоченным белкам [167], структурная пластичность которых позволяет им, приобретая различные конформации, вступать во множественные гомо- и гетерогенные взаимодействия [168]. Многие IDP содержат *домены низкой сложности* (LCD), имеющие тенденцию к энергетически выгодной агрегации с образованием мультимеров белков [169]. В результате «расслоения» внутриклеточной плазмы (*liquid demixing*) и отделения «дисперсной фазы» белки и взаимодействующие с ними лиганды оказываются в окружении, отличном от среды за пределами компартмента, что способствует локальному повышению концентраций реагирующих молекул и эффективному протеканию специфических биохимических реакций [170].

Образование RNP-комплексов является одним из важнейших примеров немембранной компартментализации посредством фазовых переходов мРНК и соответствующих им IDP-содержащих РНК-связывающих белков [163]. Присутствие РНК в этих комплексах необходимо для сохранения их «растворимости» [171,172], что, по-видимому, важно для последующей трансляции [163]. Однако, фазовые переходы могут осуществляться и независимо от РНК, только с участием белков – как, например, происходит при формировании centrosом (точек нуклеации сборки микротрубочек) [255]. Согласно Altmeyer с соавт., сборка мультибелковых комплексов репарации вблизи повреждений ДНК также может происходить по механизму фазового разделения, при котором формирование «репаросомного» компартмента в том числе способствует удержанию в непосредственной близости концов разрыва ДНК, одновременно защищая их от гидролиза нуклеазами [23,256].

Фазовый переход белков и нуклеиновых кислот с образованием динамических ансамблей может инициироваться локальным повышением концентрации компонент с последующей самоассоциацией [257] и происходить в ответ на изменения физических параметров микроокружения, таких как рН, ионная сила или температура [258]. Кроме того, некоторые биомолекулы способны выступать в качестве «ядер» нуклеации сборки мультибелковых комплексов с последующим локальным расслоением внутриклеточной плазмы на две жидкие фазы с различными свойствами [173].

Предпочтительными субстратами для нуклеации фазовых переходов являются одноцепочечные нуклеиновые кислоты – РНК [163,259] и одноцепочечная ДНК (оцДНК) [258]. Оба полимера обладают большей структурной гибкостью, чем двухцепочечная ДНК, и их общие свойства – отрицательный заряд и относительно низкая сложность в силу строения из ограниченного набора уникальных блоков [169] – напоминают характерные черты IDP. У высших организмов эволюция самоорганизации внутриклеточной плазмы достигает своего пика с появлением «третьей нуклеиновой кислоты», не несущей информационной нагрузки, обладающей предельно простой структурой из повторяющихся мономеров и имеющей очень

короткое время существования в клетке – это поли(АДФ-рибоза). Роль этой нуклеиновой кислоты может быть определяющей в регуляции фазовых переходов биомолекул в клетке и в организации специфических компартментов.

1.4.7. Поли(АДФ-рибоза) и поли(АДФ-рибозил)ирование

Поли(АДФ-рибоза) представляет собой линейную или разветвлённую полимерную цепь, состоящую из идентичных молекулярных блоков – единиц АДФ-рибозы, источником которых в процессе катализируемого PARP1 синтеза PAR служит НАД⁺ (рис. 6) [260]. В физиологических условиях PAR формирует динамичную мультиглобулярную структуру, зависящую от размера полимера, что может способствовать его «подстройке» при связывании различных лигандов [261]. Адениновые основания в поли(АДФ-рибозе), как в нуклеиновых кислотах, располагаются в *анти*-конформации, которая открыта для образования водородных связей и стекинг-взаимодействий [262]. Вторичная структура PAR в виде спирали, подтверждённая *in vitro* методом спектрального анализа [263], может формироваться при высокой ионной силе раствора (4М NaCl) либо, в физиологических условиях, при связывании с белками [262]. Согласно «интеркаляционной» модели, в ходе аутомодификации PARP1 растущая цепь поли(АДФ-рибозы) также находится в спиральной конформации и образует трёхспиральную структуру с В-формой ДНК [264]. Полимер PAR обладает отрицательным зарядом за счёт двух отрицательно заряженных фосфатных групп в каждом из мономеров (остатков АДФ-рибозы), в то время как РНК и оцДНК содержат лишь один отрицательный заряд на мономер (остаток нуклеотида) [265]. В отсутствие воздействий, индуцирующих повреждение ДНК, уровень PAR в клетках очень низкий, и (АДФ-рибоза) присутствует в форме достаточно стабильных (время полураспада $t_{1/2} \sim 7.7$ ч) моно- или олигомеров. Массированный локальный синтез высокодинамичного полимера PAR ($t_{1/2}$ менее 1 мин) индуцируется возникновением повреждения в ДНК [266-268]. Главной отличительной особенностью поли(АДФ-рибозы) от ДНК и РНК является то, что PAR участвует в посттрансляционной модификации белков.

По аналогии с ДНК и РНК, ферменты, ответственные за синтез PAR в клетках, были названы PAR-полимеразами (PARP). PARP1 является важнейшим представителем семейства белков со сходными каталитическими доменами, которое у человека насчитывает 17 белков [269]. Только четыре представителя этого класса обладают способностью к синтезу поли(АДФ-рибозы) – PARP1, PARP2 и две танкиразы [269,270]. Белки PARP1 и PARP2 играют важную роль в сохранении стабильности генома [271]. Танкиразы, способные синтезировать линейный PAR длиной до 20 мономеров АДФ-рибозы [272], функционируют при формировании веретена деления [273] и контролируют функции centrosомы [274].

Активация PARP1 происходит при связывании с экспонированными основаниями на концах разрыва ДНК [51]. Распознавание повреждения приводит к локальной перестройке автоингибиторного домена PARP1, который, приобретая неупорядоченную структуру, перестаёт препятствовать связыванию НАД⁺ в активном центре фермента для последующего синтеза поли(АДФ-рибозы) [243]. В результате интердоменных взаимодействий, привлекающих каталитический домен к месту повреждения ДНК, домен автомодификации

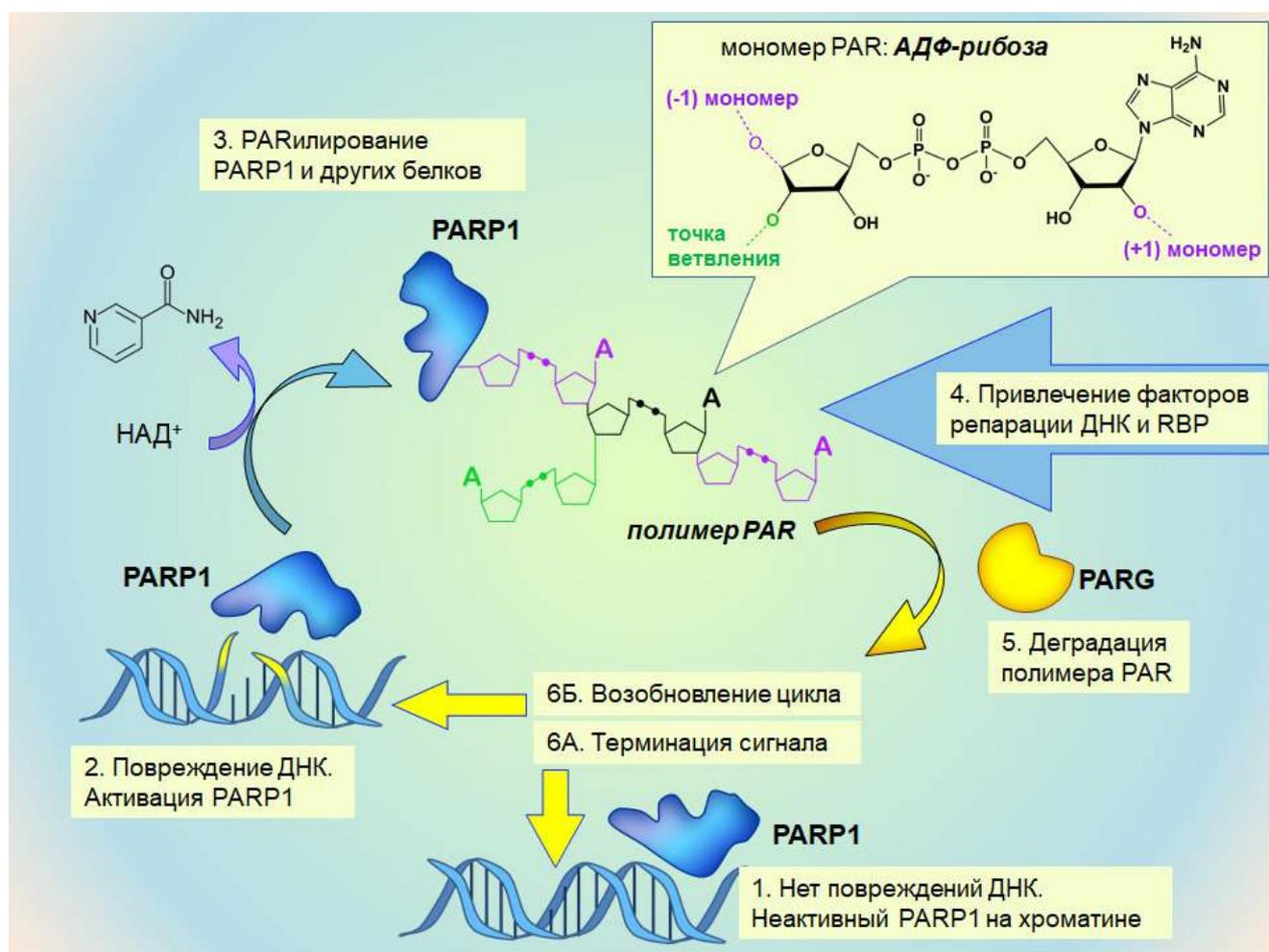


Рис. 6. PARP1-зависимая передача сигнала о повреждении ДНК (схема).

PARP1 оказывается поблизости от активного центра, открытый для *cis*-модификации [275]. Это объясняет тот факт, что преимущественной мишенью поли(АДФ-рибоз)илирования является сам PARP1 [265]. В PARP1, как и в модифицируемых им белках, установлено большое разнообразие (АДФ-рибоза)-акцепторных сайтов: Lys, Arg, Glu, Asp, Cys, Ser, Thr, Ser (фосфосерин, по фосфату) и Asn, хотя чаще в качестве акцепторов выступают заряженные аминокислотные остатки [276-279]. Принимая во внимание, что скорость-лимитирующей стадией синтеза PAR является расщепление НАД⁺, можно предположить, что присоединение АДФ-рибозы к белку-мишени в присутствии активированного PARP1 происходит по любому

подходящему аминокислотному остатку на экспонированной поверхности белка [256]. Специфичность PAR-опосредованной модуляции клеточных процессов при этом может достигаться за счёт разного локального окружения PARP1 и его мишени, а не за счёт специфичных сайтов модификации в белке [256].

Многие белки взаимодействуют с PAR нековалентно. Среди белков, ассоциированных с PAR и/или подвергающихся этой РТМ, идентифицированы некоторые факторы репарации ДНК, белки ремоделинга хроматина, RBP и транскрипционные факторы [18,197]. Многие функции, выполняемые PAR в клетках, реализуются посредством динамического взаимодействия поли(АДФ-рибозы) и PAR-связывающих белков. Перераспределение белков в клетке в результате локального синтеза PAR может влиять на пути передачи сигнала, ответ клетки на повреждение ДНК, регуляцию транскрипции, стабильность белков и определение судьбы клетки [280]. На настоящий момент описано несколько PAR-связывающих модулей в белках, структура которых варьирует от полностью упорядоченных доменов до IDPR, способных образовывать мультивалентные взаимодействия с полимером PAR [256].

PAR также может распознаваться РНК- и ДНК-связывающими мотивами белков [256]. Поскольку для организации макромолекулярных ансамблей в клетке важны не только специфичные взаимодействия, но и динамические изменения локальных концентраций взаимодействующих молекул, пики PARилирования вблизи повреждений ДНК могут конкурировать с РНК за связывание RBP, привлекая их к сайтам повреждений [281]. ДНК-связывающие домены ферментов репарации ДНК и транскрипционных факторов также могут способствовать PAR-зависимому привлечению этих белков к месту локализации повреждения в ДНК [282,283].

Недавно было показано, что PAR может выступать в качестве ядра нуклеации фазовых переходов РНК-связывающих белков FUS (TLS), EWS (EWSR1) и TAF15 в сайтах геномных повреждений [23]. Компартиментализация клетки, инициируемая PAR-зависимым разделом фаз, может лежать в основе ключевых функций этого полимера в различных процессах, связанных с ДНК и РНК: например, формирования стресс-гранул [284], ядрышек [108], сплайсосом [285] и транскриптомом [286]. Так, в случае регуляции транскрипции, фазовый переход FUS (TLS), EWS (EWSR1) и TAF15 на промоторах генов может обеспечивать платформу для посадки неупорядоченного С-концевого домена РНК-полимеразы II [287]. По-видимому, формирование PAR вблизи промоторов может способствовать транскрипции, особенно если принять во внимание, что в некоторых случаях повреждения ДНК специально вносятся в промоторы и кодирующие части генов [141,149,153].

Длительное существование PAR в клетке сопряжено с определёнными рисками, среди которых – снятие РНК- и ДНК-связывающих белков с их мишеней, возможность фазового

перехода динамических «капель» к нерастворимым агрегатам белков, которые наблюдаются при некоторых патологических состояниях организма [169], а также энергетический кризис, вызванный истощением запасов НАД⁺ [288]. Поэтому важную роль в системе поли(АДФ-рибозил)ирования играют ферменты, способные расщеплять PAR и удалять АДФ-рибозу с модифицированных белков [289]. Ключевым ферментом, деградирующим PAR в клетках, является поли(АДФ-рибоза)-гликогидролаза (PARG), которой присущи эндо- и экзогликогидролазная активности с преобладанием последней [290]. Поскольку для расщепления PAR требуется доступность полимера, PAR-связывающие белки потенциально могут препятствовать активности PARG в клетках. Так, PARG не может отщеплять проксимальный мономер АДФ-рибозы, что, предположительно, обусловлено стерическими затруднениями [291]. Для удаления АДФ-рибозы с моно(АДФ-рибозил)ированных белков существуют специализированные ферменты [292]. Динамическая регуляция уровня PAR в клетках может обеспечивать необходимый баланс РНК- и ДНК-белковых взаимодействий в различных системах.

1.5. Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1)

Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1) является классическим РНК-связывающим белком, всё больше привлекающим внимание исследователей как возможный участник поддержания стабильности генома. Впервые Y-бокс-связывающие белки были описаны в 70-х годах прошлого века как мажорные компоненты цитоплазматических RNP-комплексов птиц и млекопитающих [293,294]. Независимо, в 1988 г. эти белки были впервые идентифицированы как ДНК-связывающие белки, взаимодействующие с Y-бокс мотивом (5'-CTGATTGGYAA-3') – последовательностью, которая содержится в промоторных участках генов главного комплекса гистосовместимости класса II [295]. YB-1 является представителем наиболее изученного из трёх подсемейств Y-бокс-связывающих белков человека и выполняет самые разнообразные функции в соматических клетках [10].

1.5.1. Структурно-функциональная организация YB-1

Y-бокс-связывающий белок 1 человека состоит из 324 аминокислотных остатков, среди которых преобладают Arg (11.7%), Gly (12%), Pro (11%) и Glu (8.3%) [10]. Особенности YB-1 являются очень высокая изоэлектрическая точка (~9.5) [296] и аномальная электрофоретическая подвижность: обладая молекулярной массой порядка 36 кДа, YB-1 мигрирует в геле при SDS-электрофорезе как 50 кДа белок [10].

В белке выделяют три домена: N-концевой домен, богатый Ala и Pro (A/P-домен), домен холодного шока (CSD) и протяжённый C-концевой домен (CTD), содержащий чередующиеся кластеры положительно и отрицательно заряженных аминокислотных остатков [10] (рис. 7). Пространственная структура изолированного CSD, определённая методом ядерного магнитного резонанса [297], сходна со структурой бактериальных белков холодного шока и содержит консенсусные последовательности RNP1 и RNP2 [298], благодаря которым YB-1 может связываться с нуклеиновыми кислотами [299-301]. В отличие от белков холодного шока *E.coli*, температура плавления которых оценивается в 56°C [302], CSD обладает низкой стабильностью (при 25°C ~70% молекул в растворе находятся в нативном состоянии) [303], что связывают с наличием в CSD YB-1 длинной подвижной петли, отсутствующей у прокариот [297].

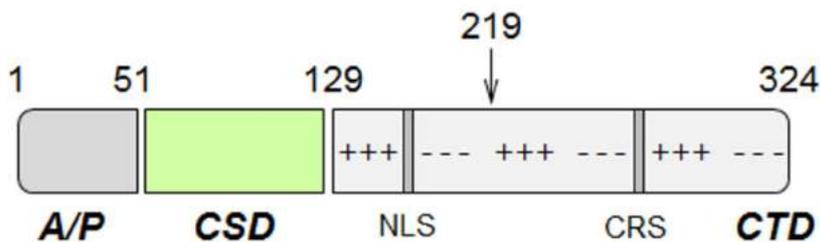


Рис. 7. Доменная организация белка YB-1. Цифры над рисунком обозначают позиции аминокислотных остатков. A/P – A/P-домен; CSD – домен холодного шока; NLS- сигнал ядерной локализации; CTD – C-концевой домен; CRS – сайт удержания в цитоплазме. Домены YB-1, обладающие неупорядоченной структурой, показаны серым цветом.

Согласно данным биоинформатического анализа и спектроскопии кругового дихроизма, A/P и CTD домены YB-1 обладают неупорядоченной структурой. Однако в CTD присутствует поли(L-пролиновая) спираль II типа [304], участие которой в межмолекулярном распознавании не требует существенного изменения конформации полипептидной цепи [305], и которая может служить для взаимодействия YB-1 с другими белками [306].

За распределение YB-1 внутри клетки ответственны сайт удержания в цитоплазме (*cytoplasmic retention signal*, CRS) между аминокислотными остатками 267 и 293 [5] и множественные сигналы ядерной локализации (*nuclear localization signal*, NLS): NLS-1 (149-155), NLS-2 (185-194) и NLS-3 (276-292) [307]. Согласно последним данным, YB-1 содержит предполагаемый PY-NLS (174-202) – последовательность, необходимую для транспортин-1-зависимого импорта YB-1 в ядро [308]. Интересно, что локализация PY-NLS в молекуле YB-1 соответствует неканоническому NLS (186-205), установленному первоначально с использованием делеционных мутантов YB-1 [5]. Так или иначе, в нормальных условиях CRS превалирует над NLS, способствуя удержанию YB-1 в цитоплазме [5]. Однако стрессорное

воздействие на клетку в определённых случаях может инициировать частичный протеолиз YB-1 в районе Glu219 20S протеасомой, при этом белок, лишённый CRS, локализуется в ядре [7,8].

Несмотря на преимущественно неупорядоченную структуру, YB-1 почти так же компактен как глобулярные белки [306]. Предполагается, что причиной этого может быть формирование солевых мостиков между положительно и отрицательно заряженными аминокислотными кластерами CTD YB-1 или стэкинг-взаимодействия гуанидиновой группы Arg с ароматическими кольцами Phe и Tyr [306].

1.5.2. Внутримолекулярные взаимодействия, олигомеризация и взаимодействия с другими белками

Методами коиммунопреципитации *in vivo* и осаждения рекомбинантным белком (pull-down) *in vitro* [309], а также с использованием гель-фильтрации [9] было показано, что полноразмерный YB-1 и его ядерная форма YB-1(1-219) имеют гомодимерную структуру. Согласно данным изотермической калориметрии (ИТС), эти гомодимеры связывают одну молекулу оцРНК преимущественно посредством CSD и C1 частей С-концевых доменов YB-1 (аминокислотные остатки 129-219, рис. 7) [9]. Авторы [9] показали, что *отсутствие C2 (220-324) CTD понижает сродство CSD YB-1 к оцРНК*, и таким образом, *расщепление YB-1 20S протеасомой может инактивировать связывание YB-1 с РНК и усиливать связывание с ДНК* одновременно с локализацией YB-1 в ядре клетки [9].

YB-1 способен формировать мультимерные комплексы различных типов [306]. В присутствии РНК YB-1 образует сферические частицы неуставленного строения, состоящие из 15-18 молекул [310]. Предполагается, что при этом CTD различных молекул YB-1 формируют ядро частицы, а CSD связаны с РНК на поверхности [306]. Было показано, что свободный YB-1 может формировать олигомеры со сходной структурой, имеющие молекулярную массу 800-1000 кДа [311]. В условиях высокой ионной силы YB-1 может обратимо образовывать амилоидные фибриллы [312]. В формировании β -складок ключевую роль играет CSD, а неупорядоченные А/Р и CTD домены YB-1 способны модулировать этот процесс: А/Р-домен стимулирует формирование фибрилл, проксимальная часть CTD подавляет этот процесс при любой ионной силе раствора, а дистальная часть CTD элиминирует ингибирующий эффект его проксимальной части исключительно в условиях высокой ионной силы [313]. Предрасположенность CSD к формированию фибрилл, по-видимому, можно объяснить низкой стабильностью этого домена (температура плавления CSD составляет около 39°C [304], поэтому в физиологических условиях большая часть CSD присутствует в денатурированном состоянии). Недавно было предложен механизм, согласно которому

способность YB-1 к мультимеризации может лежать в основе селекции мРНК и ДНК-молекул этим белком при реализации его функций в клетке [314] (см. далее).

На настоящий момент установлено физическое взаимодействие YB-1 со множеством различных белков. В частности, показаны белок-белковые взаимодействия YB-1 и ферментов разных систем репарации ДНК – эксцизионной репарации оснований (NEIL2 [14], APE1 [13], pol β [14], pol δ [12], PCNA [315], lig III α [14], мисматч-репарации (MSH2 [12]) и репарации двухцепочечных разрывов ДНК (Ku80 [12]). Во взаимодействии YB-1 с белками могут принимать участие все три домена YB-1 [10]. В некоторых случаях связывание с YB-1 может модулировать функции белка-партнёра. Например, как упоминалось ранее, YB-1 способен стимулировать активность ДНК-гликозилаз NEIL2 и NTH1 [14,15]. Недавно было установлено непосредственное взаимодействие YB-1 и ДНК-топоизомеразы 1 (TOPO1), которое усиливается при обработке клеток ингибитором TOPO1 камптотецином, и показана способность YB-1 стимулировать активность TOPO1 [17]. Связывание YB-1 с транскрипционным фактором p53 представляет один из примеров реципрокного взаимодействия, так как с одной стороны, приводит к стимуляции специфичного связывания p53 с его консенсусной последовательностью в ДНК, но с другой стороны, ингибирует связывание YB-1 с Y-боксом мотивом в промоторе гена множественной лекарственной устойчивости (*Multidrug resistance, MDR1*) [315].

Взаимодействие с белковыми партнёрами также может регулировать функции YB-1, в частности, опосредованные его связыванием с нуклеиновыми кислотами, а также внутриклеточную локализацию этого белка. Так, было показано, что APE1, преимущественно в ацетилированной форме, стабильно взаимодействует с YB-1 *in vivo* и увеличивает его сродство к Y-боксу элементу в промоторе гена *MDR1*, тем самым модулируя активность YB-1 как транскрипционного фактора [316]. В свою очередь, кислый белок YBAP1 (*Y-box protein-associated acidic protein, pI~4.4*) может способствовать перестройке RNP-комплексов в цитоплазме, образованных YB-1 и его РНК-мишенями [317]. Интересно, что во взаимодействии с YBAP1, регулирующем РНК-связывающую активность YB-1, участвует основной положительно заряженный СТД YB-1 [317]. Наконец, было установлено, что связывание YB-1 с несколькими белками, в том числе, p53, в районе NLS YB-1 (183-202) может играть ключевую роль в транслокации YB-1 в ядро и аккумуляции YB-1 в ядрах раковых клеток [318].

1.5.3. Взаимодействие с нуклеиновыми кислотами

YB-1 представляет замечательный пример мультиспецифичного белка, способного взаимодействовать с тремя нуклеиновыми кислотами клетки – ДНК, РНК и поли(АДФ-рибозой). При взаимодействии с ДНК [299,319] реализуется роль YB-1 в транскрипции [10] и

предполагаемое участие в репарации ДНК [12,319]. Под контролем YB-1 в качестве транскрипционного фактора находятся гены, экспрессия которых индуцируется внешним воздействием, и некоторые гены, продукты которых участвуют в репарации ДНК [10,320,321]. Как РНК-связывающий белок, YB-1 участвует в сплайсинге пре-мРНК [10,322], является мажорным белком RNP в цитоплазме [281], регулирует трансляцию мРНК [10,323] и может участвовать в отборе (*sorting*) молекул РНК, обладающих специфичными мотивами, для образования экзосом [324,325]. Установлено, что YB-1 взаимодействует с большим числом некодирующих РНК [326,327], обладает повышенным сродством к повреждённым ДНК и РНК [12,319,328], а также идентифицирован среди PAR-связывающих белков [18].

Сайты связывания ДНК и РНК в молекуле YB-1 различны. Методом изотермической калориметрии было установлено, что наибольшим сродством к оцРНК обладает CSD YB-1 [9]. В связи с тем, что наблюдалось ухудшение связывания YB-1(1-219) с оцРНК при высокой ионной силе раствора (500 мМ NaCl, по сравнению со 150 мМ NaCl), было предположено, что движущей силой этого процесса являются электростатические взаимодействия [9]. Проксимальная часть STD (C1) YB-1 была идентифицирована как специфический домен связывания ДНК, причём сродство C1 к оцДНК возрастало с увеличением концентрации соли в растворе, указывая на то, что данное взаимодействие не является электростатическим [9]. Авторы [9] показали, что для взаимодействия C1 YB-1 и оцДНК необходимо нарушение стэкинга азотистых оснований ДНК, как это имеет место при взаимодействии ДНК и SSB [329]. Одним из возможных механизмов связывания STD YB-1 и оцДНК, таким образом, может быть *катионное π -взаимодействие*, которое, в отличие от солевых мостиков, сохраняется в различных растворителях [330]. В комплексах нуклеиновых кислот и белков катионное π -взаимодействие реализуется с участием основных аминокислотных остатков (Lys, Arg) белка и пуриновых азотистых оснований нуклеиновой кислоты (А и G), причём наибольшая сила взаимодействия наблюдается для пары Arg-G [331]. Это предположение отчасти подтверждается теми фактами, что в STD YB-1 присутствует несколько Arg, а при анализе взаимодействия YB-1 с 8-звенными олигодезоксирибонуклеотидами, иммобилизованными на микрочип, было обнаружено, что к одноцепочечному мотиву GGGG в составе октануклеотида YB-1 проявляет значительно большее сродство, чем к последовательностям, встречающимся в Y-боксах [328]. Хотя специфичными участками связывания оцРНК и оцДНК являются CSD и C1 STD, соответственно, CSD также может вносить вклад во взаимодействие YB-1 с оцДНК, а STD – во взаимодействие с оцРНК (аминокислотные остатки 130-219) и регулировать стехиометрию связывания оцРНК (220-324 фрагмент STD) [9].

Сродство YB-1 к последовательностям нуклеотидов в ДНК убывает в ряду оцGGGG > оц(дц)CACC, оц(дц)CATC > CTGATTGGYYAA (Y-боксы) [328]. Во многих работах показано,

что YB-1 проявляет большее сродство к одноцепочечной форме ДНК, чем к двухцепочечной [332]. Специфичные последовательности для связывания YB-1 в РНК были идентифицированы в мРНК *YB-1* (5'-UCCA^A/G^CCA-3') [327], мРНК *протамина* (5'-UCCAUCA-3') [333] и других генов, а также РНК некоторых вирусов [334]. Недавно с использованием биоинформатического анализа последовательность 5'-ACCAGCCU-3' была идентифицирована среди мажорных структурных мотивов экзосомальных мРНК [324]. Методом точечного мутагенеза было установлено, что именно нуклеотиды С в третьем положении, А в четвёртом и С в шестом определяют повышенное сродство YB-1 к этим последовательностям [333]. Тем не менее, согласно новым данным, полученным Малыгиным с соавт., YB-1 способен специфически взаимодействовать также с последовательностями, не содержащими этих структурных элементов – 5'-CAGUGAGC-3' и 5'-UAAUCCCA-3' [324]. Наряду с вышеупомянутым мотивом 5'-ACCAGCCU-3', эти последовательности наиболее часто встречаются в экзосомальных мРНК [324]. Идентификация YB-1 в экзосомах, секретируемых клетками линии НЕК293, а также установление способности этого белка связываться со всеми тремя специфическими мотивами РНК в экстрактах клеток, позволили предположить роль YB-1 в селекции молекул мРНК для формирования экзосом [324].

В некоторых случаях специфическое распознавание последовательности может использоваться для YB-1-опосредованного привлечения факторов процессинга ДНК или РНК (например, при сплайсинге [10,335]) или обеспечивать более корректное распознавание этими белками их мишеней [10]. Связываясь с нуклеиновыми кислотами, YB-1 проявляет свойства ДНК- и РНК-шаперона [310,311,328,336]. При этом полярность эффекта (плавление/образование вторичной структуры ДНК или РНК) зависит от соотношения YB-1 и нуклеиновой кислоты [311]. Эта способность YB-1, по-видимому, может лежать в основе ряда механизмов регуляции метаболизма ДНК и РНК этим белком. Так, стабилизация/дестабилизация ДНК промоторных областей генов является распространённой стратегией функционирования YB-1 в качестве транскрипционного фактора [10], а стехиометрия YB-1 и его мРНК-мишени в цитоплазматических RNP-комплексах определяет трансляционный статус мРНК [310].

Для репрессии трансляции необходимо большое количество YB-1 (~1 молекула белка на 30 нуклеотидов) [337]. Недавно было показано, что такое соотношение в клетках может достигаться для определённых мРНК (например, мРНК *YB-1* [338]) за счёт их селективного распознавания и *кооперативного связывания* белком YB-1 [314]. Предполагается, что подобный механизм репрессии трансляции может быть общим для различных РНК-связывающих белков, т.к. способность к само-ассоциации широко распространена среди RBP, вероятно, в силу

высокой частоты встречаемости в последовательностях этих белков доменов низкой сложности и IDPR [217]. Так, мультимеризация на РНК-мишенях была показана ранее для ряда RBP, включая HuR и FUS [339-341]. Недавно было установлено, что присутствие в последовательности РНК специфических мотивов, характерных для экзосомальных мРНК (см. выше), способствует селективному распознаванию и кооперативному связыванию (5 моль белка на моль РНК) этой РНК белком YB-1 [325].

Также, если ранее оставалось неясным, каким образом YB-1, обладая низким сродством к дцДНК ($K_d \sim \mu\text{M}$ [332,342]), может конкурировать с ДНК-связывающими белками в ядре [20], авторы [314] предлагают альтернативную гипотезу, согласно которой YB-1 следует рассматривать не как изолированный белок, имеющий высокое сродство к специфическим сайтам ДНК, но как белок, способный мультимеризоваться при взаимодействии с определёнными ДНК-структурами, выступающими в качестве точек нуклеации (например, крестообразными структурами [314]). Энергетическое преимущество формирования мультимеров YB-1 на ДНК складывается из энергетической выгоды взаимодействий YB-1-ДНК и YB-1-YB-1 и существенно уменьшает вероятность вытеснения YB-1 другими белками [314]. Интересно, что YB-1 способен формировать мультимеры в участках взаимодействия двух различных молекул ДНК, удерживая их в непосредственной близости [314], и тем самым, способствовать/интерферировать с такими системами репарации ДНК, как гомологичная рекомбинация [343]. Сходная роль временного соединения концов двунитевых разрывов ДНК была предложена для длинных некодирующих РНК [344] и поли(АДФ-рибозы) [169].

1.5.4. YB-1 как молекулярный маркёр и мишень противоопухолевой терапии

Изучение механизмов онкогенеза является одним из приоритетных направлений медико-биологических исследований. Около 20 лет назад была впервые обнаружена корреляция между повышенным уровнем YB-1 и развитием опухолевого фенотипа клеток (содержание YB-1 в цитоплазме было повышено в 27 из 27 случаев рака молочной железы при том, что этот белок не детектировался в нормальной ткани органа) [19]. На настоящий момент не вызывает сомнений значительное изменение экспрессии YB-1 (на уровне мРНК и белка) в онкотрансформированных клетках. Эта корреляция настолько ярко выражена, что YB-1 предложен в качестве молекулярного маркёра диагностики определённых типов рака (в частности, рака молочной железы) [10,20]. Более того, во многих случаях наблюдается появление YB-1 в ядрах клеток или повышенное содержание этого белка в тканях, прилежащих к опухоли [10,345]. Эти изменения достигают максимума в агрессивных опухолях, устойчивых к химиопрепаратам и на последних стадиях заболевания [20].

К настоящему моменту были предприняты неоднократные попытки использовать YB-1 в качестве мишени противоопухолевой терапии [346-348]. Как считают многие исследователи, повышение уровня YB-1 и/или его ядерная локализация в онкотрансформированных клетках являются не следствием, а одной из существенных причин раковой трансформации. Показано, что в силу своей поразительной мультифункциональности YB-1 может вносить вклад *во все девять* «визитных карточек рака» (регуляторных путей канцерогенеза) Ханахана и Вайнберга [349,350], и поэтому может рассматриваться в качестве одного из ключевых регуляторов биологии раковых клеток [348]. Y-бокс элементы обнаружены в промоторных и энхансерных областях широкого спектра генов, которые сверхэкспрессируются при раке, включая ген множественной лекарственной устойчивости *MDR1* [20].

Приобретение раковыми клетками устойчивости к лекарственным препаратам является существенным препятствием при терапии онкологических заболеваний. Известно, что вероятность излечения различных видов рака без рецидивов после химиотерапии ниже в том случае, если YB-1 сверхэкспрессирован в клетках опухоли и/или локализован в ядре [351-355]. Согласно многочисленным данным, белок YB-1 снижает чувствительность клеток опухоли к химиопрепаратам различных классов [347,356-358]. Наиболее важной представляется способность YB-1 защищать от действия лекарств стволовые клетки, в том числе, стволовые клетки опухолей, что может лежать в основе рецидивов рака [21,356]. Молекулярные механизмы участия YB-1 в возникновении химиорезистентности раковых клеток на настоящий момент не изучены до конца. Предполагается, что YB-1 может либо действовать через белки, обеспечивающие развитие устойчивости к химиотерапии, либо сам принимает непосредственное участие в репарации ДНК и/или её регуляции [10]. В частности, показана корреляция сверхэкспрессии и/или ядерной локализации YB-1 с активацией гена *MDR1* [359-361]. Данные о непосредственном участии YB-1 в транскрипции *MDR1* противоречивы. Так, ряд работ свидетельствует о том, что YB-1 может стимулировать экспрессию репортёрных генов, находящихся под контролем промотора гена *MDR1* [11]. Однако YB-1 не обнаруживается в составе ДНК-белковых комплексов, собирающихся в ядерных экстрактах клеток на олигонуклеотидах, имитирующих промотор *MDR1* [362]. В работе [20] предложена альтернативная гипотеза, согласно которой YB-1 может локализоваться в области, близкой к промотору или другим регуляторным элементам гена *MDR1*, не за счёт связывания с ДНК, а посредством взаимодействия с пре-мРНК, синтезируемой с этого гена.

Заключение

Эволюционное увеличение сложности организмов коррелирует с развитием регуляторных систем. В то же время, ограничение размера клетки приводит к росту мультифункциональности

биополимеров. Мультифункциональность, то есть способность принимать участие в нескольких биохимических процессах, тесно связана со способностью взаимодействовать с различными партнёрами, структура большинства из которых строго детерминирована их функцией в клетке. Использование модульной структуры из блоков, обладающих разной специфичностью, не даёт полного решения этой проблемы, поскольку сохраняет ограничение на количество возможных взаимодействий. Изящное решение этой задачи было реализовано путём упрощения аминокислотной последовательности белков, приводящей к достижению максимальной структурной сложности [223,363]. Появление белков с неупорядоченной структурой позволило значительно расширить спектр возможных внутриклеточных взаимодействий за счёт уникальных биофизических особенностей этих представителей белкового царства [363]. Обладая мультивалентностью в сочетании с малым объёмом, неупорядоченные белки способны вовлекаться в самые разные клеточные процессы и образовывать узловые точки интерактомов, выступая в качестве ключевых регуляторных белков клетки.

Параллельно с преобразованием протеома, в ходе эволюции у высших эукариот появляется большое разнообразие некодирующих нуклеиновых кислот, служащих для регуляции базовых систем РНК- и ДНК-белковых взаимодействий. В поддержании стабильности генома этих организмов особое место занимает «третья нуклеиновая кислота» – поли(АДФ-рибоза), синтез которой из НАД⁺ стимулируется в присутствии повреждённой ДНК. Образование PAR, модулирующей взаимодействия РНК- и ДНК-связывающих белков с их мишенями, приводит к сборке специфических функциональных комплексов, необходимых для регуляции ключевых процессов клеточного метаболизма в условиях стрессорного воздействия.

Настоящая работа посвящена изучению роли мультифункционального РНК-связывающего белка YB-1 в регуляции эксцизионной репарации оснований ДНК. Мы исследовали как непосредственный регуляторный потенциал YB-1 в отношении ключевых ферментов BER (APE1, NEIL1 и pol β), так и способность YB-1 функционально взаимодействовать с PARP1, участвуя в центральной регуляторной системе BER – процессе поли(АДФ-рибозил)ирования.

Глава 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1. Материалы

В работе использовали N,N'-метиленбисакриламид (Amresco, США), акриламид (AppliChem, Германия), мочевины, формамид (PanReas, Испания), 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоновую кислоту (HEPES), персульфат аммония (ПСА) (PanReas AppliChem, ITW Inc.), тетраметилэтилендиамид (ТЕМЕД) (Helicon, Россия), глицерин (GERBU Biotechnik GmbH, Германия), трис(гидроксиметил)аминометан (Tris) (Amresco, США), глицин (MP Biomedicals, США), додецилсульфат натрия (SDS) (Fluka, Швейцария), диэтиламиноэтил целлюлозные (DEAE) фильтры DE-81 (Whatman, Великобритания), бумагу для хроматографии (GE Healthcare), аденозинтрифосфорную кислоту (АТФ), протеиназу К (СибЭнзим, Новосибирск), фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:10), бычий сывороточный альбумин (BSA), никотинамидадениндинуклеотид (НАД⁺), β-никотинамид мононуклеотид, N-сукцинимидный эфир 5(6)-карбоксихлорофлуоресцеина (FAM-SE), среду LB Broth (Sigma-Aldrich, США), [γ -³²P]АТФ, [α -³²P]АТФ (Лаборатория биотехнологии, ИХБФМ СО РАН), ДНКазу 1 (ThermoScientific, США), бензоназу (Novagen, Дания). Также в работе были использованы следующие реактивы: NaCl, KCl, имидазол, MgCl₂, NaOH, HCl, LiClO₄, Mg₂SO₄, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, H₃BO₃, 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота (MES), NaBH₄, дитиотреитол (DTT), глюкоза, α-лактоза, агар, ампициллин, фенилметилсульфонилфторид (PMSF), этанол, ацетон, трихлоруксусная кислота (ТХУ). Реактивы отечественного производства были квалификации о.с.ч. Для осаждения олигонуклеотидного материала использовался перегнанный этанол.

Мутантная форма YB-1, лишённая С-концевого домена (AP-CSD), была любезно предоставлена д.б.н., академиком Л. П. Овчинниковым и к.б.н. Д. А. Кретовым. Препараты p24, pol β, APE1 и укороченной формы APE1, лишённой 35 аминокислотных остатков с N-конца (NΔ35APE1) любезно предоставлены д.х.н. Н. А. Моор. Рекомбинантный PARP1 любезно предоставлен к.б.н. М. В. Сухановой. Препараты NEIL1, PARP2, PARP3, PARG, Ung, никотинамид мононуклеотид аденилтрансферазы (NMAT), а также полинуклеотид киназы фага T4 (PNK) для работы любезно предоставили д.б.н. Д. О. Жарков, к.х.н. М. М. Кутузов, к.х.н. Е. А. Белоусова, к.х.н. Е. С. Ильина, д.б.н. С. Н. Ходырева, к.х.н. С. И. Шрам и к.х.н. И. О. Петрусёва, соответственно. Плазмиды pLATE-51-YB-1 и pLATE-51-YB-1(1-219) для выделения

рекомбинантных аналогов полноразмерной и ядерной форм белка YB-1 были сконструированы и любезно предоставлены магистром К. Н. Науменко.

В работе использовали антитела против YB-1 (любезно предоставлены академиком Л. П. Овчинниковым и к.б.н. Д. А. Кретовым, изготовлены согласно [364]), антитела против поли(АДФ-рибозы) (Trevigen, США) и антитела против IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Биосан, Россия); а также хемилюменесцентный субстрат для пероксидазы хрена SuperSignal West Pico (ThermoScientific, США).

Олигонуклеотиды (табл. 1), использованные для создания модельных ДНК-структур (табл. 2), были сконструированы в Лаборатории медицинской химии ИХБФМ. Олигонуклеотид, содержащий остаток 5-(1,2-дигидроксиэтил)-урацила, синтезирован и любезно предоставлен к.х.н. Т. С. Зацепиным. Олигонуклеотид, содержащий остаток флуоресцеин-5(6)-карбоксамидокапроил-[5-(3-аминоаллил)-2'-дезоксиурацила], любезно предоставлен д.х.н. В. Н. Сильниковым. Активированную ДНК, суммарный препарат РНК клеток линии HeLa и олигорибонуклеотид oligoRNA любезно предоставили Н. Д. Гайко, к.х.н. М. М. Кутузов и к.х.н. Д. Е. Шарифулин, соответственно.

Таблица 1. Условные обозначения и последовательности олигонуклеотидов, использованных в работе. U – остаток урацила; X – остаток 5-(1,2-дигидроксиэтил)-урацила; F – флуоресцентная группировка. Синим цветом выделены последовательности, образующие некоплементарные области при отжиге с соответствующей цепью.

woU	5'-cggta tccac caggt ctgag acaac gatga agccc aagcc agatg aaatg tagtc-3'
U ₁₇	5'-cggta tccac caggt cUgag acaac gatga agccc aagcc agatg aaatg tagtc-3'
Comp	5'-gacta cattt catct ggctt gggct tcate gttgt cccag acctg gtgga taccg-3'
foU	5'-gacta cattt catct ggctt gggct tcate gttgt cXcag acctg gtgga taccg-3'
mm	5'-gacta cattt catct ggctt gggct tcate gttgt cgcag acctg gtgga taccg-3'
Bub ₅	5'-cggta tccac caggt cacUc tcaac gatga agccc aagcc agatg aaatg tagtc-3'
Bub ₁₇	5'-cggta tccac gtcca tacUc tgtgt tgtga agccc aagcc agatg aaatg tagtc-3'
Bub _L	5'-cggta tccac caggt ctgUc tgtta cgact tgggt aagcc agatg aaatg tagtc-3'
Bub _{L3}	5'-cggta tccac caggt cacUc tgtta cgact tggcc aagcc agatg aaatg tagtc-3'

Bub _{L-3}	5'-cggta tccac caggt ctgUg agtta cgact tcggt tccc agatg aaatg tagtc-3'
addU ₁₇	5'-a gacta cattt catct g-3'
oligoRNA	5'-gggaga aaaaag aaagaa auguuc uucuuc uaagaa gaaaga aaagaa aaagaa aaaaga caaaga cacgaa ggaaga-3'
An1	5'-ggaag accct gacgt tccc aactt tateg ccF-3'
An2	5'-ggcga taaag ttggg-3'
An3	5'-aacgt caggg tctcc c-3'
P3-1	5'-gacaa cgatg aagcc-3'
P3-2	5'-cggta tccac caggt ctg-3'
Matr-3	5'-ggctt catcg ttgtc tcaga cctgg tggat accg-3'

Состав основных буферных растворов, использованных в работе

1. Буфер Ni-A: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.5 M NaCl, 20 mM имидазол, 10 % глицерин, 0.1 % NP-40.
2. Буфер Ni-B: 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1.5 M NaCl, 500 mM имидазол, 10 % глицерин, 0.1 % NP-40.
3. Буфер ион-A: 20 mM Hepes-KOH pH 8.0, 10 % глицерин, 0.1 % NP-40.
4. Буфер ион-B: 20 mM Hepes-KOH pH 8.0, 2 M KCl, 10 % глицерин, 0.1 % NP-40.
5. Буфер для гель-фильтрации: 20 mM Hepes-KOH pH 8.0, 1 M KCl.
6. 10x TBE: 500 mM Tris-HCl pH 8.0, 500 mM H₃BO₃, 10 mM ЭДТА.
7. 10x Tris-Gly: 250 mM Tris, 2.5 M глицин, 1% SDS.
8. 1x буфер F1: 100 mM MES pH 7.0, 300 mM NaCl.
9. 1x буфер F2: 100 mM MES pH 7.0, 300 mM NaCl, 10 mM DTT.
10. 1x буфер F3: 50 mM Hepes-KOH pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM DTT.
11. 10x RBp1: 500 mM Tris-HCl pH 8.0, 400 mM NaCl, 10 mM DTT.
12. 10x RBp3: 200 mM Hepes-KOH pH 7.6, 500 mM KCl, 50 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 г/л BSA.
13. 10x RBa: 250 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 4 г/л BSA.
14. 10x RBd: 500 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, 5 mM ЭДТА, 10 mM DTT, 6 г/л BSA.
15. 1x TBS: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl.

16. 1x TBST: 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20.

17. 1x MSB: 0.2 M Gly-HCl pH 2.75, 0.1% SDS, 1% Tween 20.

2.2. Методики экспериментов

2.2.1. Электрофоретическое разделение белков

Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле (ПААГ), содержащем SDS (SDS-ПААГ) проводили в соответствии с [365]. Перед нанесением на гель в анализируемые образцы добавляли 5x денатурирующий буфер Леммли (156 mM Tris-HCl pH 6.8, 5% SDS, 5% β -меркаптоэтанол, 25% глицерин, 0.025% бромфеноловый синий) и прогревали их в течение 2 мин при 97°C. Концентрирующий гель содержал 4.5% акриламид, 0.125% N,N'-метиленбисакриламид, 0.124 M Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% ПСА, 0.1% ТЕМЕД. Разделяющий гель 1 (4%) содержал 4% акриламид, 0.1% N,N'-метиленбисакриламид, 0.375 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% ПСА, 0.1% ТЕМЕД. Разделяющий гель 2 (10%) содержал 10% акриламид, 0.14% N,N'-метиленбисакриламид, 0.47 M Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.1% ПСА, 0.1% ТЕМЕД. Электрофоретическое разделение образцов осуществляли в вертикальных пластинах 11.5×8.5×(0.05-0.1) см или 16.5×14.5×0.75 см с использованием 1x буфера Tris-Gly при силе тока 25 мА или 40 мА, соответственно. Гели окрашивали Кумасси (45% этанол, 10% уксусная кислота, 0.1% R250 Кумасси), сушили при помощи Gel Dryer («Cole-Parmer», Россия); положение белков, содержащих [α -³²P]-метку определяли радиоавтографией с использованием прибора Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare).

2.2.2. Электрофоретическое разделение олигонуклеотидов

Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в денатурирующих условиях осуществляли согласно [366] с модификациями. Перед нанесением на гель анализируемые образцы прогревали в течение 2 мин при 97°C с добавлением 5x денатурирующего буфера (формаид, 0.025% ксиленианоловый и 0.025% бромфеноловый синий). Денатурирующий ПААГ содержал 19% акриламид, 1% N,N'-метиленбисакриламид, 7 M мочевины, 0.1% ПСА, 0.1% ТЕМЕД. Электрофорез образцов проводили с использованием 1x TBE в качестве электродного буфера в вертикальных пластинах 44×19.5×0.035 см при мощности тока 30 Вт. Гели сушили при помощи Gel Dryer («Cole-Parmer», Россия), положение олигонуклеотидов, содержащих [γ -³²P]-метку, определяли радиоавтографией с использованием прибора Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare).

2.2.3. Анализ белок-нуклеиновых комплексов методом задержки в геле

Комплексообразование белков с ДНК (или поли(АДФ-рибозой), PAR) проводили в течение 5 мин при 37°C. Затем в реакционные смеси добавляли 5x буфер нанесения (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10% глицерин, 0.025% бромфеноловый синий) и наносили образцы на предварительно охлаждённый нативный ПААГ (7% акриламид, 0.09% N,N'-метиленбисакриламид, 0.5x TBE, 0.1% ПСА, 0.1% ТЕМЕД). Электрофоретическое разделение образцов проводили в вертикальных пластинах 11.5×8.5×(0.05-0.1) см или 16.5×14.5×0.75 см при напряжении ~ 10 В/см (4°C, 0.5x TBE). Гели сушили при помощи Gel Dryer («Cole-Parmer», Россия), положение олигонуклеотида (или PAR), содержащего радиоактивную метку, и белок-нуклеиновых комплексов определяли радиоавтографией с использованием прибора Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare).

2.2.4. Очистка олигонуклеотидов гель-электрофорезом

Очистку олигонуклеотидов проводили с помощью электрофоретического разделения в 20%-ом ПААГ. Нуклеотидный материал выделяли из соответствующего участка геля, локализованного по поглощению УФ-света на длине волны 254 нм, электроэлюцией на бумагу DE-81. Продукт элюировали с DE-81 3 порциями по 25 мкл раствора 4 M LiClO₄ (60°C). К элюату добавляли 800 мкл ацетона (4°C), смесь выдерживали при -40°C в течение ночи. Олигонуклеотидный материал осаждали (15 мин, 13000g, 4°C), трижды промывали ацетоном (4°C), подсушивали на воздухе и растворяли в воде до необходимой концентрации.

2.2.5. Получение олигонуклеотида, содержащего остаток 5-формилурацила, из предшественника

Окисление остатка 5-(1,2-дигидроксиэтил)-урацила в составе олигонуклеотида до 5-формилурацила (5-foU) осуществляли в смеси, содержащей 10 mM NaIO₄, 250 mM NaOAc, pH 4.0, в течение 1 ч при комнатной температуре [367]. Олигонуклеотидный материал высаживали в присутствии 2.3 M LiClO₄ и 90% ацетона при -20°C в течение ночи. Осадок центрифугировали (15 мин, 13000g, 4°C), трижды промывали ацетоном (4°C), подсушивали на воздухе и растворяли в воде до необходимой концентрации.

2.2.6. Получение олигонуклеотидов, содержащих [γ -³²P]-метку на 5'-конце

Введение радиоактивной метки на 5'-конец олигонуклеотидов проводили с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 как описано в [368]. Реакционные смеси объёмом 21.4 мкл содержали 1x буфер PNK (СибЭнзим), 20 единиц активности (е.а.) PNK, 2-5 МБк [γ -³²P]АТР и

500 пмоль олигонуклеотида для мечения. Реакцию проводили в течение 30 мин при 37°C, затем добавляли 10 е.а. PNK, АТР до 1 мМ и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Очистку олигонуклеотида, содержащего радиоактивную метку, от непрореагировавшего $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{АТР}$ осуществляли через колонку MicroSpin G-25 (GE HealthCare). Для этого предварительно ресуспендировали гель в колонке и удаляли буфер хранения (центрифугированием 2×1 мин при 725 g). Реакционную смесь наносили на хроматографическую смолу в центре колонки и элюировали в течение 1 мин при 725 g. Колонку трижды промывали водой (по 25 мкл); объединяли проскок и промывки, не содержащие свободной радиоактивной метки.

2.2.7. Получение двухцепочечных ДНК-структур

Для приготовления ДНК-дуплексов олигонуклеотид, содержащий радиоактивную либо флуоресцентную метку, и соответствующую комплементарную цепь смешивали в молярном соотношении 1:1.2 в воде. Конечный объем смеси составлял 25 мкл. Реакционную смесь инкубировали 5 мин при 97°C, затем медленно охлаждали до комнатной температуры. Условные обозначения и схематические изображения использованных в работе ДНК-дуплексов представлены в табл. 2.

Таблица 2. Условные обозначения и схематические изображения ДНК-дуплексов, использованных в работе. ● (U) – остаток урацила; ● (foU) – остаток формилурацила; ● (F) – флуоресцентная метка; ● – радиоактивная метка.

Условное обозначение, отжигаемые цепи	Схематическое изображение	Условное обозначение, отжигаемые цепи	Схематическое изображение
woU-Comp woU + Comp		Bub ₅ -Comp Bub ₅ + Comp	
U ₁₇ -Comp U ₁₇ + Comp		Bub ₁₇ -Comp Bub ₁₇ + Comp	
U ₁₇ -foU U ₁₇ + foU		Bub _L -Comp Bub _L + Comp	
U ₁₇ -mm U ₁₇ + mm		Bub _{L-3} -Comp Bub _{L-3} + Comp	
Nick An1 + An2 + An3		Bub _{L3} -Comp Bub _{L3} + Comp	

Nick-2 Matr-3 + P3-1 + P3-2		U ₁₇ -addU ₁₇ U ₁₇ + addU ₁₇	
--------------------------------	---	---	---

2.2.8. Введение флуоресцентной метки на 3'-конец U₁₇

Перед проведением реакции произвели отжиг олигонуклеотидов addU₁₇ и U₁₇ (согласно пункту 2.2.7.). Реакционная смесь объемом 100 мкл содержала 50 mM Tris-HCl, pH 8.6, 50 mM KCl, 6 mM MgCl₂, 4 мкМ ДНК-дуплекс U₁₇-addU₁₇, 12 мкМ Flu-12-dUTP и 8.4 мкМ pol β. Реакционную смесь инкубировали в течение 30 мин при 37°C, затем добавляли 100 мкл денатурирующего буфера и прогревали в течение 10 мин при температуре 97°C. Весь объем реакционной смеси наносили на препаративный 15%-ый ПААГ с 7 М мочевиной и проводили электрофоретическое разделение продуктов реакции (см. пункт 2.2.2.). Визуализацию продукта реакции в геле проводили с использованием прибора Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare). Полосу геля, содержащую элонгированный олигонуклеотид U₁₇^{Flu}, вырезали, продукт электроэлюировали в раствор, осаждали и растворяли в воде согласно пункту 2.2.4.

2.2.9. Получение апуриновых/апиримидиновых сайтов *in situ*

Апуриновые/апиримидиновые (AP-) сайты в олигонуклеотидах, содержащих остаток урацила, получали непосредственно перед проведением ферментативных реакций как описано ранее [369]. Реакционные смеси (25 мкл) содержали олигонуклеотид, 1x рабочий буфер RB, используемый в последующей реакции, а также урацил-ДНК-гликозилазу (Ung) (из расчёта 0.2 единиц активности (е.а.) на 1 пмоль двухцепочечной ДНК или 0.3 е.а. на 1 пмоль одноцепочечной ДНК). Реакцию проводили в течение 20 мин при 37°C. Далее в тексте ДНК-структуры с AP-сайтом, обозначаются добавлением приставки AP- к условному названию исходного урацил-содержащего олигонуклеотида.

2.2.10. Щелочной гидролиз AP-сайтов

Реакцию щелочного гидролиза AP-сайтов использовали для контроля выхода ДНК-гликозилазной реакции, катализируемой Ung (2.2.9.). Для этого в аликвоту реакционной смеси после (2.2.10.) добавляли 1/10 от объема 1 М NaOH, прогревали 5 мин при 97°C, затем нейтрализовали pH раствора добавлением эквивалентного количества 1 М HCl с прогреванием в течение 3 мин при 97°C.

2.2.11. Получение рекомбинантных аналогов полноразмерной и ядерной форм белка YB-1

Рекомбинантные аналоги полноразмерной и ядерной формы YB-1, несущие на N-конце гексагистидиновый пептид (his-tag) были получены по методике, разработанной магистром Науменко К. Н..

2.2.11.1. Выделение и очистка рекомбинантного белка his-tagYB-1

Рекомбинантный his-tagYB-1 был синтезирован с использованием плазмиды pLATE-51-YB-1 в *E. coli* (штамм *BL21(DE3)*). Клетки выращивали на среде для автоиндукции ZYP-5052 (1% триптон, 0.5% дрожжевой экстракт, 0.5% NaCl, 50 мМ Na₂HPO₄, 50 мМ KH₂PO₄, 25 мМ (NH₄)₂SO₄, 1 мМ Mg₂SO₄, 0.5% глицерин, 0.05% глюкоза, 0.2% лактоза) 18 часов. Полученную биомассу ресуспендировали в 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 1 мМ PMSF, добавляли лизоцим и инкубировали 20 мин на льду. Для разрушения мембран добавляли буфер 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 3 М NaCl, 2 % NP-40 в пропорции 1:1. Освободившуюся ДНК разрушали в ультразвуковом дезинтеграторе в течение 15 мин. Для осаждения клеточных мембран лизат клеток центрифугировали 30 мин при 30000 g в роторе JA-25.50 (Beckman).

1. **Металл-хелатная хроматография.** Никель-хелатную хроматографию проводили на приборе ÄCTA start (GE Healthcare). Супернатант наносили на колонку с носителем Ni-NTA, уравновешенную буфером Ni-A (см. раздел 2.1) и элюировали 50% буфером Ni-B (см. раздел 2.1). При этом элюция целевой фракции происходила в ходе ступенчатого градиента по имидазолу от 20 мМ (0% буфера B) до 250 мМ (50% буфер B).

2. **Ионообменная хроматография.** Элюированные пробы разбавляли в 4 раза буфером ион-А (см. раздел 2.1) и наносили на колонку 5-50 MonoS (GE HealthCare), уравновешенную 25% буфером ион-В (см. раздел 2.1). Ионообменную хроматографию проводили на приборе ÄCTA pure (GE Healthcare). Белок элюировали в ходе линейного градиента концентрации KCl от 0.5 М (25% буфер ион-В) до 2 М (100% буфер ион-В).

3. **Концентрирование образца для гель-фильтрации.** Полученные в ходе предыдущей хроматографии фракции белка объединяли (~ 2 мл), разбавляли в 2 раза 20 мМ Hepes-KOH pH 8.0 и наносили на колонку 5-50 MonoS (GE HealthCare), уравновешенную 25% буфером ион-В. Концентрирование образца проводили с использованием прибора ÄCTA pure (GE Healthcare) в ходе ступенчатого градиента концентрации KCl от 0.5 М (25% буфер ион-В) до 1.5 М (75% буфер ион-В).

4. **Гель-фильтрация.** Сконцентрированный образец (~700 мкл) наносили на колонку Superdex 16-600 (GE HealthCare), уравновешенную буфером для гель-фильтрации (см. раздел

2.1). Фракцию, содержащую чистый белок, (~3 мл) концентрировали на центрифуге Vivospin Turbo 15 (Sartorius) и диализовали против буфера 20 мМ KH_2PO_4 pH 7.6, 0.5 М КСl.

Концентрацию полученного YB-1 измеряли на приборе SimpliNano (Biochrom) по поглощению при 280 нм, принимая коэффициент экстинкции YB-1 равным $29340 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (рассчитан с помощью программы ExPASy ProtParam tool). Чистоту полученного препарата YB-1 подтверждали электрофорезом в 10% ПААГ в присутствии SDS (рис. 8А). В результате из 1.8 л биомассы (~16 г клеток) было выделено около 1.4 мг белка.

2.2.11.2. Выделение и очистка рекомбинантного белка his-tagYB-1(1-219)

Рекомбинантный his-tagYB-1(1-219) был синтезирован с использованием плазмиды pLATE-51-YB-1(1-219) в *E. Coli* (штамм *BL21(DE3)*). Нарботку биомассы для выделения белка и очистку целевого продукта осуществляли аналогично методике для полноразмерного YB-1 за исключением гель-фильтрации (4) и предшествующего подготовительного этапа (3). Концентрацию полученного YB-1(1-219) измеряли на приборе SimpliNano (Biochrom) по поглощению при 280 нм, принимая коэффициент экстинкции YB-1 равным $23380 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (рассчитан с помощью программы ExPASy ProtParam tool). Чистоту полученного препарата YB-1(1-219) подтверждали электрофорезом в 10% ПААГ в присутствии SDS (рис. 8Б). В результате из 1.8 л биомассы было выделено около 3.5 мг белка.

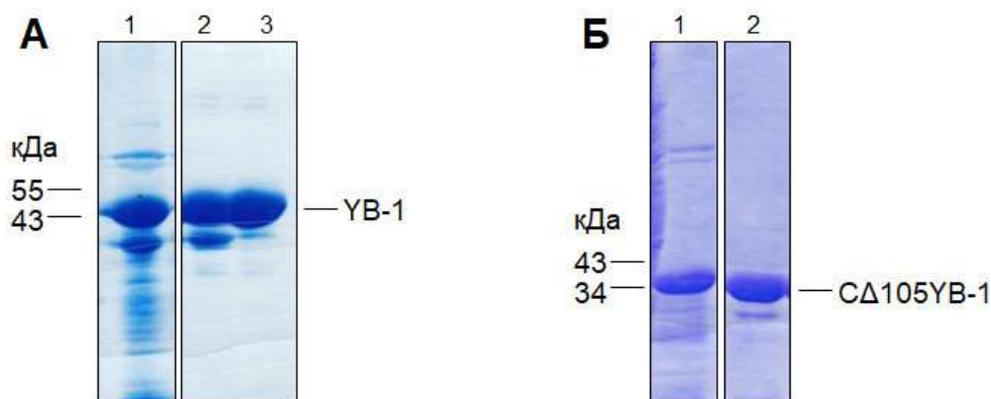


Рис. 8. Выделение рекомбинантного his-tagYB-1 (А) и his-tagYB-1(1-219) (Б). На рисунке представлены 10% SDS-ПААГ, окрашенные Кумасси, в которых проводили разделение образцов, отобранных на различных этапах хроматографической очистки белка. 1 – после Ni-NTA; 2 – после MonoS; 3 – после гель-фильтрации и концентрирования (для полноразмерного белка).

2.2.12. Мечение белков YB-1, YB-1(1-219), APE1 и NΔ35APE1 флуоресцентной меткой

Включение флуоресцентной метки в белки проводили в соответствии с [53]. Перед процедурой мечения белок диализовали против буфера F1 (в случае YB-1 и YB-1(1-219)) или F1

+ 2 mM DTT (для APE1 и NΔ35APE1, кроме последней промывки) с использованием VivaSpin микроконцентратора (Sartorius, Германия). К растворам белков добавляли N-гидроксисукцинимидный эфир 5(6)-карбоксихлорофлуоресцеина (FAM-SE), растворённый в DMSO. Реакционные смеси, содержащие 1x буфер F1, 100 μM белок и 160 μM FAM-SE, инкубировали в течение 17 ч при 4°C (в темноте). Реакцию останавливали добавлением четырёх объёмов буфера F2 с последующим центрифугированием в течение 15 мин (9500 rpm, 4°C). Супернатант диализовали против 2x буфера F3 до полного удаления свободного флуоресцеина. Меченые белки хранили при -20°C в 1x буфере F3 + 40% глицерин (белки YB-1 и YB-1(1-219), содержащие флуоресцентную метку, ввиду склонности к агрегации использовали не более чем в течение трёх дней). Степень включения FAM-SE в белки рассчитывали, исходя из концентрации белка и FAM-SE в конкретном образце. Стехиометрия мечения в используемых условиях не превышала 1. Концентрацию FAM-SE определяли спектрофотометрически, используя коэффициент поглощения $68 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ при 494 нм для 5(6)-FAM [370], концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорда [371].

2.2.13. Исследование белок-белковых взаимодействий методом флуоресцентного титрования

Для изучения связывания полноразмерного YB-1 и его ядерной формы YB-1(1-219) с белками BER использовали метод флуоресцентного титрования, описанный ранее [53]. Реакционные смеси (70 мкл) содержали 1x буфер F3, белок, содержащий флуоресцентную метку (FAM), в фиксированной концентрации 40 нМ и различные концентрации потенциального белка-партнёра. Измерение интенсивности флуоресценции и анализ полученных данных выполняли на приборе CLARIOstar с использованием программного обеспечения MARS Data Analysis Software (BMG LABTECH GmbH, Германия). Образцы облучали при 482 нм, интенсивность флуоресценции детектировали в максимуме эмиссии (530 нм). Полученные данные аппроксимировали четырёхпараметрическим уравнением (1):

$$F = F_0 + (F_\infty - F_0) / [1 + (EC_{50}/C)^n]$$

Формула 1. F – интенсивность флуоресценции раствора белка, содержащего флуоресцентную метку, при конкретной концентрации (C) белка-партнёра; F_0 – интенсивность флуоресценции при $C = 0$; F_∞ – интенсивность флуоресценции раствора FAM-белка при насыщении белком-партнёром; EC_{50} – концентрация белка-партнёра, при которой $F - F_0 = (F_\infty - F_0)/2$; n – коэффициент Хилла.

Для исследования влияния ДНК на белок-белковые взаимодействия, 40 нМ белок, содержащий флуоресцентную метку, предварительно смешивали с активированной ДНК (0.25 A_{260} ед./мл); интенсивность флуоресценции раствора белка, содержащего флуоресцентную метку, с ДНК была принята за F_0 .

2.2.14. Влияние YB-1 на расщепление AP-сайтов ферментами APE1 и NEIL1

Реакционные смеси (10 мкл) содержали 1х RВа, AP-сайт-содержащий ДНК-субстрат, APE1 (или $\Delta 35$ -APE1) / NEIL1 и YB-1 / его мутантные формы в варьруемой концентрации. Концентрации ДНК, фермента и время инкубации подбирались индивидуально в каждом конкретном случае. Исследование стимуляции активностей APE1 и NEIL1 белком YB-1 проводилось на линейных участках соответствующих кинетических кривых. Реакцию останавливали добавлением 1/10 от объёма 200 мМ NaBH₄ с прогреванием в течение 1.5 мин при 97°C. Олигонуклеотидный материал выделяли либо осаждением этанолом (1 мл) в присутствии 1 мкл 79.8 A_{260} ед./мл активированной ДНК (после обработки реакционной смеси протеиназой К, 30 мин при 37°C), либо экстракцией фенол:хлороформ:изоамиловым спиртом (25:24:1). Образцы анализировали согласно (2.2.2).

2.2.15. Изучение влияния YB-1 на dRP-лиазную активность pol β

Олигонуклеотид AP-U₁₇-Comp, содержащий флуоресцентную метку, введённую на 3'-конец (согласно пункту 2.2.8), инкубировали с 0.1 нМ APE1 в течение 5 мин при 37°C. Реакционные смеси (50 мкл) содержали 25 мМ натрия фосфат, pH 7.5, 100 мМ NaCl, 2.5 мМ MgCl₂, 0.5 мМ ЭДТА, 40 нМ ДНК, 1 мМ dGTP, 10 нМ pol β и YB-1 в концентрациях от 0 до 400 нМ. Пробы инкубировали в течение 5 мин при 37°C, реакцию останавливали добавлением 5.5 мкл 200 мМ NaBH₄ и прогреванием в течение 2 мин при 97°C. Олигонуклеотидный материал осаждали этанолом в присутствии активированной ДНК, образцы анализировали согласно (2.2.2).

2.2.16. Получение НАД⁺, содержащего [α -³²P]-метку

НАД⁺, содержащий радиоактивную метку, получали по методике, описанной ранее [372]. Реакционную смесь (50 мкл), содержащую 2 мМ β -никотинамид мононуклеотид, 1 мМ АТР, 10 МБк [α -³²P]АТР, 5 мг/мл NМАТ, 25 мМ Tris-HCl pH 7.5 и 20 мМ MgCl₂, инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Затем проводили денатурацию (3 мин при 97°C) и осаждение фермента, супернатант использовали в разбавлении 1:10 с немеченым НАД⁺, взятом в выбранной концентрации.

2.2.17. Поли(АДФ-рибозил)ирование ферментами PARP1 и PARP2

Поли(АДФ-рибозил)ирование белков проводили согласно [373] с модификациями. Реакционные смеси (10 мкл) содержали 1x RВр1, 5 мМ Mg²⁺ либо 10 мМ ЭДТА, 0.1-0.5 μМ PARP1 (или 0.5 μМ PARP2), 0-400 нМ ΥВ-1 и ДНК- (или РНК-) кофактор (в различных концентрациях в зависимости от реакции). Смешивание компонентов реакционных смесей осуществляли на льду, запуск реакции производили добавлением НАД⁺, содержащего радиоактивную метку, до конечной концентрации 2-500 μМ. Реакционные смеси инкубировали 0-60 мин при 37°C, реакцию поли(АДФ-рибозил)ирования останавливали либо прогреванием в течение 1.5 мин при 97°C, либо добавлением ингибитора PARP1 3-аминобензамида (до конечной концентрации 1мМ) или олапариба (до конечной концентрации 1 μМ). Для удаления поли(АДФ-рибозы) в реакционные смеси после остановки реакции добавляли PARG (до 0.1 μМ) и инкубировали в течение 2-60 мин при 37°C. Анализ образцов проводили согласно (2.2.1).

2.2.18. Подтверждение модификации ΥВ-1 методом иммунодетекции

Реакционную смесь после поли(АДФ-рибозил)ирования ΥВ-1 ферментом PARP1 (см. пункт 2.2.17) разделяли с помощью SDS-гель-электрофореза (согласно 2.2.1) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану в 192 мМ буфере Tris-Gly pH 7.5, содержащем 0.05% SDS и 10% EtOH, в течение 45 мин при силе тока 2 мА/см² геля. После этого нитроцеллюлозную мембрану выдерживали в буфере TBST + 5%-ое обезжиренное молоко в течение 1 ч и затем инкубировали в течение ночи при 4°C со специфичными антителами против ΥВ-1, разбавленными до титра 1:2000 в буфере TBST (+ 4% эмбриональная телячья сыворотка (FBS)). Мембрану отмывали 3×5 мин буфером TBST и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с конъюгатами антител против IgG кролика с пероксидазой хрена (разбавленными до титра 1:90000 в TBST + 4% FBS). Мембрану отмывали 3×5 мин буфером TBST и инкубировали с хемолуминесцентным субстратом пероксидазы хрена “SuperSignal West Pico Substrate” (Thermo Scientific, США). Положение анализируемых полос определяли экспозицией нитроцеллюлозной мембраны на рентгеновскую пленку, с последующей проявкой последней.

Затем производили иммунодетекцию с использованием антител к поли(АДФ-рибозе). Для этого мембрану последовательно промывали 2×15 мин в буфере MSB (на этом этапе происходит удаление предыдущих антител), 2×10 мин в TBS и 2×10 мин в TBST. Затем инкубировали мембрану в буфере TBST + 5%-ое обезжиренное молоко в течение 1 ч и повторяли все последующие этапы с использованием первичных антител к поли(АДФ-рибозе).

2.2.19. Получение поли(АДФ-рибозы)

Для получения полимера PAR свободного от белков-акцепторов и ДНК реакционную смесь после реакции поли(АДФ-рибозил)ирования (50 мкл), выполненной согласно (2.2.17), последовательно обрабатывали бензоназой (12.5 е.а. на 50 мкл исходной смеси, 5 мин при 37°C) и протеиназой К (в конечной концентрации 0.08 г/л, 40 мин при 37°C). Полимер PAR отделяли от белков и их фрагментов экстракцией фенол:хлороформ:изоамиловым спиртом (25:24:1) и дополнительно очищали осаждением этанолом. Осадок растворяли в 1x RBP1 до конечной концентрации 1 A₂₆₀ ед./мл. Следует отметить, что препарат PAR, приготовленный таким образом, представляет разнородную фракцию, в которой присутствует спектр продуктов реакции поли(АДФ-рибозил)ирования, имеющих различную длину и степень ветвления (рис. 9), поэтому определить молярную концентрацию полученного PAR не представляется возможным. Тем не менее, использование именно суммарного, нефракционированного препарата поли(АДФ-рибозы) в экспериментах по конкуренции PAR с нуклеиновыми кислотами за связывание YB-1, а также по влиянию PAR на активность PARP1, является наиболее обоснованным, поскольку данный препарат полностью соответствует набору продуктов, которые образуются в исследуемой реакции.

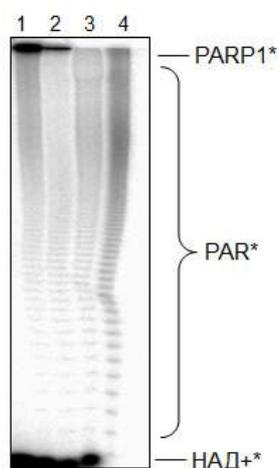


Рис. 9. Получение препарата поли(АДФ-рибозы). Представлен радиоавтограф ПААГ, содержащего 7 М мочевины. 1 – после реакции поли(АДФ-рибозил)ирования с использованием НАД⁺, несущего радиоактивную метку; 2 – после обработки образца бензоназой и протеиназой; 3 – после экстракции фенол:хлороформ:изоамиловым спиртом (25:24:1); 4 – после осаждения этанолом.

Для получения общей нуклеиновой фракции, присутствующей в реакции поли(АДФ-рибозил)ирования (PAR + ДНК), реакционную смесь (10 мкл) после реакции поли(АДФ-рибозил)ирования, выполненной согласно (2.2.17) инкубировали с протеиназой К (0.04 мг/мл, 1 ч при 37°C), затем ингибировали активность протеиназы К добавлением PMSF до конечной концентрации 5 мМ. Полученный препарат использовали для подтверждения связывания YB-1 с PAR на этапе элонгации, так как по соотношению PAR/ДНК данный препарат полностью имитирует условия реакции.

2.2.20. Исследование функциональных взаимодействий YB-1 и PARP1 методом флуоресцентной спектроскопии

Связывание PARP1 с повреждённой ДНК и его диссоциацию из комплекса с повреждённой ДНК в ходе аутомодификации детектировали по изменению анизотропии флуоресценции ДНК-дуплекса, содержащего разрыв (Nick), который выступал в качестве кофактора реакции поли(АДФ-рибоз)илирования (рис. 10) согласно [374]. Реакционные смеси (10 мкл), содержащие 1x буфер RBP1, 10 мМ ЭДТА, 10 или 100 нМ Nick, 200 нМ PARP1 и YB-1 в варьирующей концентрации, готовили на льду в 384-луночном планшете, затем инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин.

Измерение анизотропии флуоресценции в режиме кинетического сканирования проводили при 25°C на приборе CLARIOstar (BMG LABTECH GmbH, Германия); для обработки полученных данных использовали программное обеспечение MARS Data Analysis Software (BMG LABTECH GmbH, Германия). Длины волн света составили для возбуждения – 495 нм, эмиссии – 520 нм. Запуск реакции поли(АДФ-рибоз)илирования осуществляли добавлением НАД⁺ (до 500 μМ) в каждую реакцию смесь.

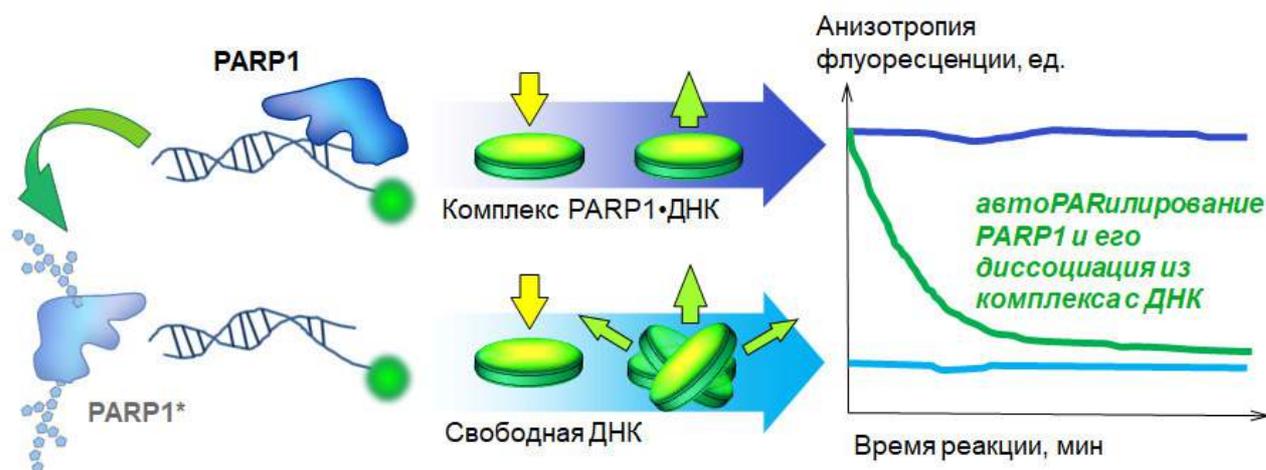


Рис. 10. Исследование активности PARP1 в режиме реального времени (метод флуоресцентной спектроскопии). Реакционные смеси, приготовленные в 384-луночном планшете, облучали поляризованным светом. Анизотропия флуоресценции (A) определялась как соотношение $A = (I_1 - I_2) / (I_1 + 2I_2)$, где I_1, I_2 – интенсивности света, испускаемого флуорофором вдоль различных осей поляризации. По уровню анизотропии флуоресценции можно оценить размеры комплекса, образованного белками и молекулой ДНК, содержащей флуоресцентную метку. Возбуждение флуорофора при облучении может происходить только в том случае, когда электрическое поле света ориентировано определённым образом относительно молекулы флуорофора. Значение анизотропии (A) максимально, когда связывание белков с молекулой ДНК, содержащей флуоресцентную метку, затрудняет вращение флуорофора и $I_1 \gg I_2$ (что соответствует случаю, когда PARP1 не

модифицирован, фиолетовая кривая). Минимальный уровень анизотропии наблюдается, когда флуорофор имеет высокую подвижность и $I_1 \sim I_2$. В наших условиях минимальный уровень анизотропии соответствует либо контрольному образцу, содержащему только ДНК (голубая кривая), либо ДНК, освободившейся в результате диссоциации из комплекса поли(АДФ-рибозил)ированного PARP1 (зелёная кривая). Метод позволяет детектировать в реальном времени связывание белков / их диссоциацию из комплексов с ДНК, содержащей флуоресцентную метку.

2.2.21. Исследование активности PARP1 с использованием ТХУ-фильтров

Реакцию поли(АДФ-рибозил)ирования в образцах, проведённую согласно (2.2.19), останавливали путём нанесения на мишени, вырезанные из бумаги для хроматографии (GE Healthcare), пропитанной 5% ТХУ (метод описан в [373]). Содержащий радиоактивную метку НАД⁺, не включившийся в полимеры PAR, удаляли последовательным отмыванием мишеней в 1×10 мин в 10% ТХУ, 3×5 мин в 5% ТХУ и 1×10 мин в этаноле. Мишени сушили, интенсивность синтеза PAR оценивали по суммарной радиоактивности продуктов радиоавтографией с использованием прибора Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare).

2.2.22. Ковалентная модификация ДНК ферментом PARP3

Метод ковалентной модификации ДНК ферментом PARP3 был разработан к.х.н. Белоусовой Е.А. (ЛБХФ, ИХБФМ СО РАН). Реакционные смеси (10 мкл) содержали 1х буфер RВр3, 20 нМ ДНК-дуплекс Nick-2, несущий радиоактивную метку, 2 мМ MgCl₂, 100 нМ PARP3, 200 μМ немеченый НАД⁺ и УВ-1 в варьируемой концентрации. Реакции проводили в течение 30 мин при 37°C; олигонуклеотидный материал отделяли от белков фенол-хлороформной экстракцией и анализировали согласно (2.2.2).

2.2.23. Определение K_M и k_{cat} AP-эндонуклеазной реакции

Реакционные смеси объёмом 3 мкл содержали 25 мМ натрия фосфат, pH 7.5, 100 мМ NaCl, 2.5 мМ MgCl₂, 0.5 мМ ЭДТА, 5 нМ AP-U₁₇-foU, содержащий радиоактивную метку, а также не несущий радиоактивной метки AP-U₁₇-foU до суммарных концентраций субстрата от 5 до 430 нМ. В реакционную смесь добавляли APE1 до конечной концентрации 0.2 нМ, инкубировали в течение 2 мин при температуре 37°C, реакцию останавливали добавлением 0.3 мкл 200 мМ NaBH₄ и 0.8 мкл денатурирующего буфера с прогреванием в течение 1 мин при 97°C. Для изучения влияния УВ-1 на величины K_M и k_{cat} AP-эндонуклеазной реакции, осуществляемой ферментом APE1, эксперимент проводили по той же схеме, но в реакционные смеси одновременно с APE1 добавляли 60 нМ УВ-1. Образцы анализировали согласно (2.2.2). По полученным данным строили зависимости скорости AP-эндонуклеазной реакции от суммарной

концентрации AP-U₁₇-foU. Скорость реакции (v) определяли как степень гидролиза AP-U₁₇-foU AP-эндонуклеазой в единицу времени (на линейном участке кинетической кривой). Константа Михаэлиса K_M была определена с использованием уравнения Михаэлиса-Ментен. Аппроксимация полученных данных уравнением теоретической кривой $K_M = \frac{V_{\max} \times S}{v} - S$, где S – концентрация AP-U₁₇-foU, проводилась методом нелинейной регрессии в программе OriginPro 8.6 («OriginLab», США). Средние ошибки аппроксимации не превышали 15%, величины достоверности аппроксимации (r^2) составили 0.98.

K_M при определённых условиях может рассматриваться как характеристика сродства фермента к субстрату [375]. Каталитическая константа k_{cat} отражает скорость превращения субстрата в продукт и может быть определена как отношение максимальной скорости реакции (V_{\max}) к концентрации АРЕ1 (E_0).

Глава 3. РОЛЬ МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНОГО БЕЛКА YB-1 В РЕГУЛЯЦИИ РЕПАРАЦИИ ДНК (РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ)

3.1. Исследование участия YB-1 в непосредственной регуляции системы BER

Отличительной чертой BER млекопитающих является привлечение ряда вспомогательных и неканонических белков, которые могут функционировать не только как ДНК-шапероны в сайтах повреждений, облегчая распознавание последних сенсорными белками, но и обеспечивать необходимые белок-белковые контакты для координации последовательных этапов процесса репарации ДНК [370]. В число белковых факторов, рассматриваемых в качестве неканонических участников BER, входит и YB-1 [370].

3.1.1. Физические взаимодействия YB-1 с белками BER

Ранее с использованием масс-спектрометрического анализа иммунокомплексов белков, несущих FLAG-пептид, YB-1 был идентифицирован как стабильный партнёр некоторых белков системы BER *in vivo*. В частности, были показаны физические взаимодействия YB-1 с AP-эндонуклеазой APE1 [13], ДНК-гликозилазой NEIL2 [14] и ДНК-полимеразой pol β [14,376], причём последнее прежде было установлено методом far-western блоттинга [14]. Интересно, что во многих случаях наряду с физическими взаимодействиями были показаны также функциональные взаимодействия YB-1 и его белковых партнёров.

В настоящей работе, чтобы исследовать и количественно охарактеризовать белок-белковые взаимодействия между YB-1 и ферментами BER, мы применили метод флуоресцентного титрования. С использованием YB-1, несущего флуоресцентную метку (FAM-YB-1), впервые были показаны физические взаимодействия YB-1 с поли(АДФ-рибоза)-полимеразами 1 и 2 (PARP1 и PARP2), а также ДНК-гликозилазой NEIL1. Метод также позволил детектировать и количественно охарактеризовать связывание YB-1 с ферментами APE1 и pol β , ранее установленное в работах [13,14].

Типичные кривые титрования представлены на рис. 11. Интенсивность флуоресценции FAM-YB-1 в присутствии pol β , PARP1, PARP2 и NEIL1 возрастала от 1.6 до 2.6 раз (табл. 3), указывая на изменение локального окружения флуорофора во время белок-белковых взаимодействий. Поскольку добавление APE1 не приводило к изменению интенсивности флуоресценции FAM-YB-1, для детекции физического взаимодействия YB-1 и APE1 была

использована содержащая флуоресцентную метку APE1 (FAM-APE1) либо её мутантная форма $\Delta 35$ APE1 (FAM- $\Delta 35$ APE1) (рис. 11E).

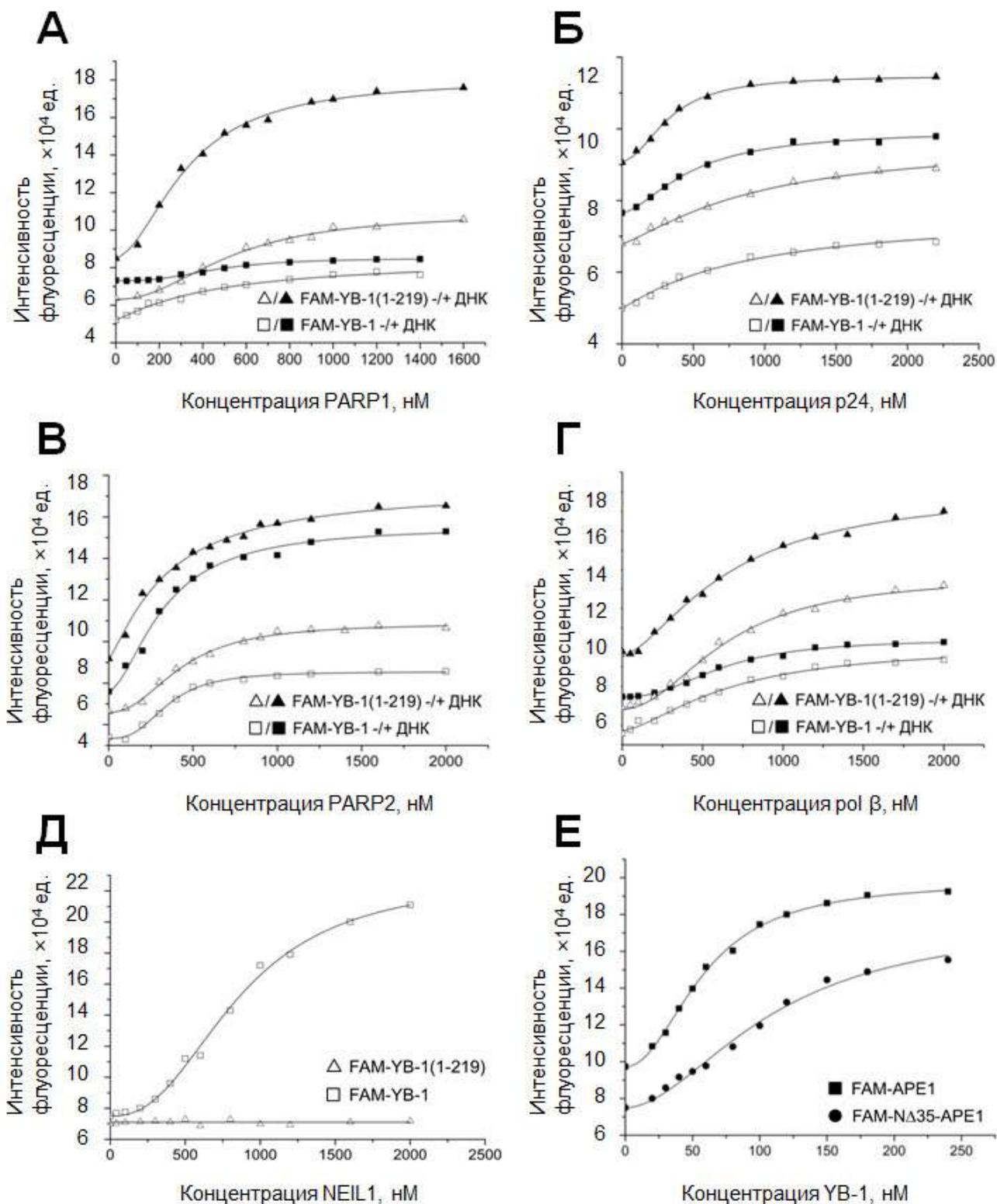


Рис. 11. Флуоресцентное титрование FAM-YB-1 и FAM-YB-1(1-219) с белками PARP1, p24, PARP2, pol β и NEIL1 (А-Д), а также FAM-APE1 и FAM- $\Delta 35$ APE1 с YB-1 (Е). Белок, несущий флуоресцентную метку (FAM-белок) (40 нМ) облучали светом на 482 нм в отсутствие или в

присутствии различных концентраций немеченого белка-партнёра. Соответствующие интенсивности флуоресценции были измерены на 520 нм. Для экспериментов (А-Г) измерения производили в отсутствие (белые точки) или в присутствии (чёрные точки) ДНК_{акт.}. Представленные кривые показывают наилучшее из трёх независимых экспериментов соответствие четырёхпараметрическому уравнению; $r^2 \geq 0.98$.

Согласно литературным данным, полноразмерный YB-1 может локализоваться в цитоплазме или ядре клетки [10]. Однако существует специфичная ядерная форма YB-1, укороченная с С-конца (YB-1(1-219)), возникновение которой наблюдается в условиях генотоксического воздействия на клетки [9]. Поскольку большая часть взаимодействий YB-1 с его белковыми партнёрами реализуется посредством С-концевого домена белка (CTD) [10], особый интерес представляло исследование вклада CTD YB-1 в связывание с факторами BER. Также принимая во внимание тот факт, что функциональные взаимодействия базальных факторов BER и вспомогательных белков должны происходить в ядре клетки в процессе репарации ДНК, мы сравнили FAM-YB-1 и FAM-YB-1(1-219) в экспериментах по флуоресцентному титрованию на предмет взаимодействия с белками BER (рис. 11А-Д).

Поскольку домены, отвечающие за физические взаимодействия YB-1 с белками APE1 и pol β , были детально исследованы ранее [13,14], мы сфокусировали внимание на взаимодействиях YB-1 с белками NEIL1, PARP1 и PARP2, установленных впервые. Нам не удалось детектировать связывание FAM-YB-1(1-219) и NEIL1 (рис. 11Д), что наводит на мысль о том, что физическое взаимодействие YB-1 и NEIL1 осуществляется, главным образом, посредством С-концевого фрагмента YB-1 (аминокислотные остатки 220-324). Сравнение параметров связывания, представленных в таблице 4, свидетельствует также о том, что этот фрагмент С-концевого домена YB-1 может вносить вклад в связывание с PARP1 и PARP2. Мы также установили, что С-концевой фрагмент YB-1 не влияет на связывание с pol β (табл. 4), что согласуется с данными других исследователей [14].

Таблица 3. Параметры белок-белковых взаимодействий, определённые методом флуоресцентного титрования. F_{∞}/F_0 – изменение интенсивности флуоресценции белка, содержащего флуоресцентную группу (FAM-белка), при насыщении раствора белком-партнёром; n – коэффициент Хилла.

Белок, содержащий флуоресцентную группу	Белок-партнёр	F_{∞}/F_0	n
FAM-YB-1	pol β	2.0 ± 0.4	1.4 ± 0.3
FAM-YB-1(1-219)	pol β	1.9 ± 0.2	1.7 ± 0.5
FAM-YB-1 + ДНК	pol β	1.4 ± 0.1	1.9 ± 0.5
FAM-YB-1(1-219) + ДНК	pol β	1.9 ± 0.2	1.6 ± 0.4
FAM-YB-1	PARP1	1.6 ± 0.2	1.1 ± 0.1

FAM-YB-1(1-219)	PARP1	1.7 ± 0.2	1.9 ± 0.2
FAM-YB-1 + ДНК	PARP1	1.2 ± 0.1	2.4 ± 0.5
FAM-YB-1(1-219) + ДНК	PARP1	2.1 ± 0.2	1.8 ± 0.2
FAM-YB-1	p24	1.5 ± 0.1	1.1 ± 0.2
FAM-YB-1(1-219)	p24	1.5 ± 0.1	1.3 ± 0.2
FAM-YB-1 + ДНК	p24	1.3 ± 0.2	1.6 ± 0.2
FAM-YB-1(1-219) + ДНК	p24	1.4 ± 0.2	1.8 ± 0.3
FAM-YB-1	PARP2	1.6 ± 0.3	2.2 ± 0.3
FAM-YB-1(1-219)	PARP2	1.7 ± 0.2	1.4 ± 0.3
FAM-YB-1 + ДНК	PARP2	1.9 ± 0.3	2.2 ± 0.4
FAM-YB-1(1-219) + ДНК	PARP2	1.9 ± 0.1	1.4 ± 0.2
FAM-YB-1	NEIL1	2.6 ± 0.4	2.1 ± 0.4
FAM-YB-1 + ДНК	YB-1	1.2 ± 0.1	2.1 ± 0.3
FAM-YB-1(1-219) + ДНК	YB-1(1-219)	2.1 ± 0.3	1.0 ± 0.1
FAM-APE1	YB-1	2.3 ± 0.4	1.8 ± 0.4
FAM-NΔ35APE1	YB-1	2.1 ± 0.2	1.8 ± 0.3

Анализ данных по связыванию YB-1 с белками BER методом нелинейной регрессии позволяет вычислить *коэффициенты Хилла* (n), которые характеризуют стехиометрию образующихся комплексов. Значения n , определённые в большинстве экспериментов, существенно превышали единицу (и располагались в диапазоне от 1.1 до 2.2) (табл. 3), что указывает на формирование мультимерных комплексов при взаимодействии YB-1 с различными белками-партнёрами. Большинство белков BER (в частности, APE1, PARP1, PARP2 и pol β) так же, как и сам YB-1, способны образовывать гомо-олигомеры [53,314,377], и их взаимодействие может приводить к сборке мультимерных ансамблей с различными стехиометрическими комбинациями компонент. Схемы реакций при таком сложно организованном характере связывания в реальности намного сложнее, чем схема реакции, описываемая 4-параметрической функцией, которая, тем не менее, может быть полезна для расчёта количественных характеристик макромолекулярных взаимодействий.

Таблица 4. Количественные характеристики взаимодействия YB-1 и YB-1(1-219) с белками BER, определённые методом флуоресцентного титрования. EC_{50} – концентрация белка-партнёра, при которой $F - F_0 = (F_\infty - F_0)/2$.

Белок, содержащий флуоресцентную группу	Белок-партнёр	EC_{50} , нМ
FAM-YB-1	pol β	670 ± 60

FAM-YB-1(1-219)	pol β	650 \pm 90
FAM-YB-1 + ДНК	pol β	660 \pm 80
FAM-YB-1(1-219) + ДНК	pol β	630 \pm 90
FAM-YB-1	PARP1	460 \pm 65
FAM-YB-1(1-219)	PARP1	510 \pm 65
FAM-YB-1 + ДНК	PARP1	470 \pm 89
FAM-YB-1(1-219) + ДНК	PARP1	310 \pm 28
FAM-YB-1	p24	840 \pm 80
FAM-YB-1(1-219)	p24	980 \pm 100
FAM-YB-1 + ДНК	p24	480 \pm 62
FAM-YB-1(1-219) + ДНК	p24	330 \pm 45
FAM-YB-1	PARP2	340 \pm 42
FAM-YB-1(1-219)	PARP2	420 \pm 48
FAM-YB-1 + ДНК	PARP2	340 \pm 35
FAM-YB-1(1-219) + ДНК	PARP2	320 \pm 32
FAM-YB-1	NEIL1	810 \pm 70
FAM-YB-1 + ДНК	YB-1	360 \pm 42
FAM-YB-1(1-219) + ДНК	YB-1(1-219)	310 \pm 37
FAM-APE1	YB-1	54 \pm 5
FAM-N Δ 35APE1	YB-1	110 \pm 12

Полученные данные свидетельствуют о том, что константы, характеризующие сродство YB-1 к белкам NEIL1, pol β , PARP1 и PARP2, лежат приблизительно в одном диапазоне (табл. 4) и примерно на порядок превышают параметры связывания, ранее определённые для различных пар базальных факторов BER [53]. Единственным исключением является низкое значение EC₅₀, характеризующее физическое взаимодействие YB-1 с мультифункциональным белком APE1 (табл. 4). Можно предположить, что полученный результат отображает взаимодействие YB-1 и APE1 в процессе транскрипции, особенно если принять во внимание тот факт, что ранее была показана сборка тройного комплекса, состоящего из ацетилированной APE1 (AcAPE1), YB-1 и p300, на промоторе гена MDR1 [13].

Ранее методом ко-иммунопреципитации было показано, что N-концевая часть APE1 (аминокислотные остатки 1-33), является необходимой для физического взаимодействия с YB-1 [14]. Однако мы наблюдали лишь двухкратное понижение сродства YB-1 к мутантной форме APE1 (N Δ 35APE1), лишённой первых 35 аминокислотных остатков, по сравнению с полноразмерной формой APE1 (рис. 11E; табл. 4). Это несоответствие можно объяснить тем,

что для картирования доменов взаимодействия YB-1 и APE1 в данном случае применялись различные методы. В отличие от ко-иммунопреципитации, метод флуоресцентного титрования, использованный в настоящей работе, позволяет детектировать непосредственные белок-белковые взаимодействия в условиях равновесия.

Для исследования возможного влияния ДНК на белок-белковые взаимодействия, измерения связывания YB-1 и YB-1(1-219) с белками $\text{rol } \beta$, PARP1 и PARP2 были выполнены в отсутствие и в присутствии активированной ДНК (ДНК_{акт}) (рис. 11А, В, Г). ДНК_{акт} содержит двухцепочечные разрывы, ники и «липкие» концы и может выступать в качестве ДНК-субстрата для $\text{rol } \beta$ и ДНК-интермедиата, распознаваемого и связываемого белками PARP1, PARP2 и YB-1. Связывание YB-1 с ДНК можно было наблюдать по увеличению интенсивности флуоресценции в нулевой точке (в отсутствие немеченого белка-партнёра). Последующее добавление немеченых белков к предформированному комплексу YB-1 с ДНК приводило к дальнейшему росту интенсивности флуоресценции, указывая на формирование тройных комплексов YB-1-(белок-партнёр)-ДНК. Присутствие ДНК не имело значимого эффекта на сродство YB-1 к $\text{rol } \beta$, PARP1 и PARP2, но приводило к увеличению сродства YB-1(1-219) к PARP1 и PARP2 (табл. 4). В случае PARP1, наблюдаемый эффект был дополнительно подтверждён установлением наличия физических взаимодействий YB-1 и YB-1(1-219) с ДНК-связывающим доменом PARP1 (p24) (рис. 11Б). При этом сродство обеих форм YB-1 к p24 было примерно в два раза ниже, чем сродство к PARP1, что наводит на мысль об участии дополнительных доменов PARP1 во взаимодействие с YB-1. Присутствие ДНК оказывало существенное влияние на взаимодействие p24 с YB-1 и YB-1(1-219) (с увеличением сродства в 1.7-3.4 раза), причём взаимодействие укороченной формы YB-1 с p24 более эффективно модулировалось присутствием ДНК (как и в случае с PARP1).

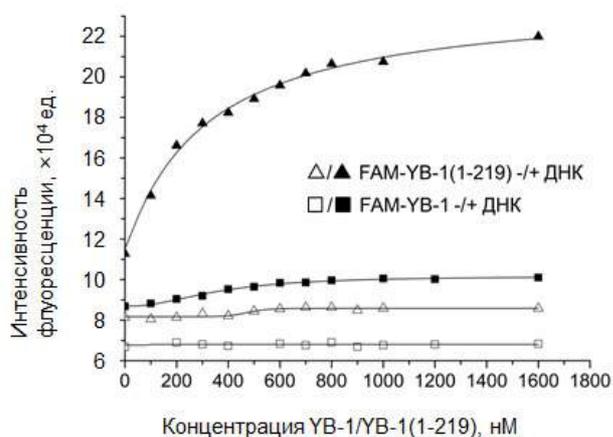


Рис. 12. Мультимеризация FAM-YB-1 и FAM-YB-1(1-219). Белок, несущий флуоресцентную группу (FAM) (40 нМ), облучали светом на 482 нм в отсутствие или в присутствии различных концентраций немеченого белка-партнёра. Соответствующие интенсивности флуоресценции были измерены на 520 нм. Измерения производили в отсутствие (белые точки) или в присутствии (чёрные точки) ДНК_{акт}. Представленные кривые показывают наилучшее из двух независимых экспериментов соответствие четырёхпараметрическому уравнению; $r^2 \geq 0.98$.

В совокупности, эти данные позволяют предположить, что ДНК-связывающий домен PARP1 (и вероятно, PARP2) принимает участие в физическом взаимодействии с С-концевым доменом YB-1. Следует также отметить, что константы, характеризующие самоассоциацию YB-1 и YB-1(1-219), были получены только в присутствии ДНК; изменение интенсивности флуоресценции в отсутствие ДНК было слишком незначительным, чтобы стало возможным количественно охарактеризовать данные по связыванию (табл. 4, рис. 12).

3.1.2. Функциональные взаимодействия YB-1 с белками BER

3.1.2.1. Влияние YB-1 на активность фермента APE1

APE1 является ключевым ферментом BER, осуществляющим превращение до 95% апуриновых/апиримидиновых (AP-) сайтов, возникающих при повреждении клеточной ДНК [32], и играет важную роль в регуляции экспрессии генов в условиях оксидативного стресса [378]. N-концевая часть APE1 (аминокислотные остатки ~1-35) имеет неупорядоченную структуру и выполняет регуляторную функцию в AP-эндонуклеазной реакции, катализируемой С-концевым каталитическим доменом белка [379]. В N-концевом фрагменте APE1 расположены пять остатков Lys, которые могут ацетилироваться [379]. Установлено, что заряд этих остатков Lys играет важную роль в регуляции AP-эндонуклеазной активности APE1 [379]. По этой причине, ионы металлов и белки-партнеры, взаимодействующие с N-концевой частью APE1, такие как XRCC1 [380], CSB [381] и NPM1 [101], могут модулировать каталитическую активность фермента. В предыдущей главе с использованием метода флуоресцентного титрования мы детектировали белок-белковое взаимодействие APE1 и YB-1. Ранее взаимодействие этих белков было установлено другими исследователями, причём картирование белковых доменов показало, что для физического взаимодействия APE1 и YB-1 важны N-концевая часть APE1 (аминокислотные остатки 1-33) и STD YB-1 (аминокислотные остатки 129-324) [13]. Также, согласно литературным данным, взаимодействие белков может усиливаться при генотоксическом стрессе, так как в этих условиях уровень ацетилирования APE1 возрастает [382], а YB-1 обладает более высоким сродством к ацетилированной форме APE1 [13]. Кроме того, для YB-1 показана стресс-индуцируемая транслокация из цитоплазмы в ядро [320,321], которая в некоторых случаях сопряжена с частичным протеолизом YB-1 с образованием специфичной ядерной формы белка – YB-1(1-219) [9]. Таким образом, можно предположить, что взаимодействие с YB-1 служит для регуляции функций APE1 в условиях ДНК-повреждающего воздействия.

3.1.2.1.1. Сравнение активности APE1 на различных ДНК-структурах

Согласно литературным данным, APE1 может проявлять выраженную AP-эндонуклеазную активность на одноцепочечных ДНК-субстратах, в некоторых случаях даже превышающую характерную для этого фермента AP-эндонуклеазную активность на двухцепочечных AP-ДНК [383]. Следует отметить, что активность APE1 в отношении одноцепочечных олигонуклеотидов в значительной степени зависит от нуклеотидной последовательности AP-содержащего субстрата и соответствующей ей вторичной структуры олигонуклеотида [384].

В настоящей работе нами были подобраны условия для AP-эндонуклеазной реакции на ДНК-дуплексах, содержащих области некомплементарных оснований – AP-Bub₅-Comp и AP-Bub₁₇-Comp (концентрация APE1 – 5 нМ, концентрации AP-Bub₅-Comp и AP-Bub₁₇-Comp – 40 нМ) (рис. 13В), а также для расщепления ферментом одноцепочечного AP-U₁₇ субстрата (концентрация APE1 – 30 нМ, концентрация AP-U₁₇ – 100 нМ) (рис. 13А), в которых скорости расщепления совпадали по порядку величины со скоростями расщепления дцДНК (олигонуклеотид AP-U₁₇-Comp) (концентрация APE1 = 0.2 нМ, концентрация дцДНК = 40 нМ) (рис. 13Б).

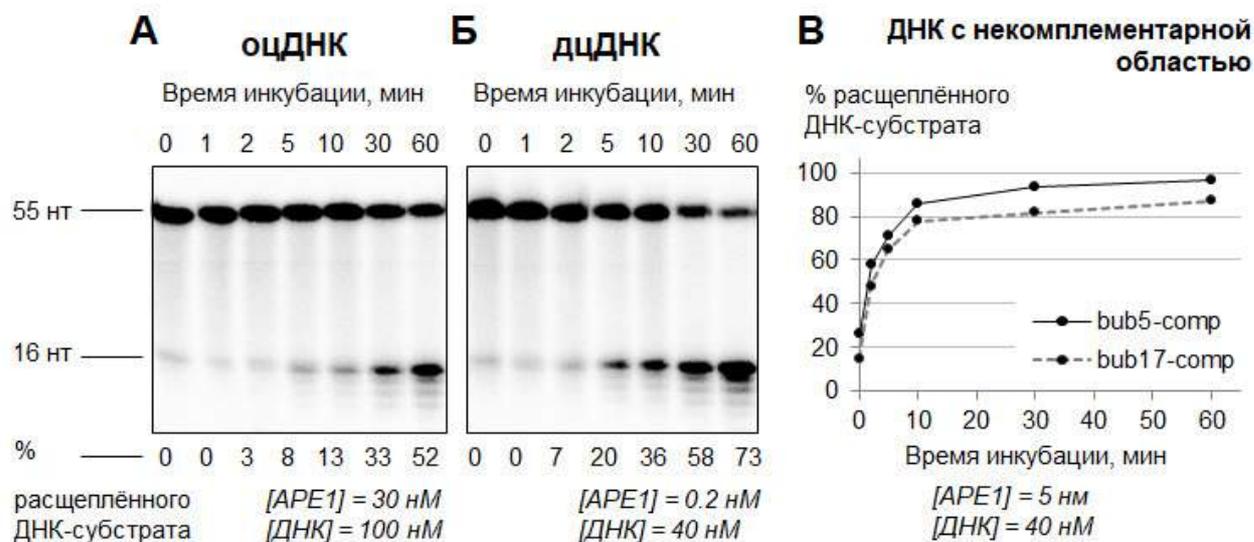


Рис. 13. Сравнение активности APE1 на различных ДНК-субстратах. А – AP-U₁₇ (100 нМ ДНК, 30 нМ APE1); Б – AP-U₁₇-Comp (40 нМ ДНК, 0.2 нМ APE1); В – AP-Bub₅-Comp и AP-Bub₁₇-Comp (40 нМ ДНК, 5 нМ APE1). Представлены радиоавтографы ПААГ, содержащих 7 М мочевины и 20% формамид, в которых проводили разделение продуктов реакции (А, Б), а также график накопления расщеплённого ДНК-субстрата от времени реакции (В).

Как следует из условий проведения реакций, AP-эндонуклеазная активность APE1 на одноцепочечном субстрате AP-U₁₇ выражена наиболее слабо среди всех ДНК-структур, использованных в работе. Кроме того, ДНК-дуплексы, содержащие «пузыри», также не

являются оптимальным субстратом для фермента. Анализ нуклеотидной последовательности U₁₇, использованного в работе в качестве одноцепочечного ДНК-субстрата, проведенный с использованием олигонуклеотидного калькулятора (<http://www.bio.bsu.by/molbiol/oligoalc.html>), показал, что формирование шпилечных и димерных структур в реакционной смеси термодинамически не выгодно для этого олигонуклеотида. Таким образом, данные, полученные в настоящей работе, свидетельствующие о том, что AP-эндонуклеазная активность APE1 по отношению к двухцепочечным субстратам выше активности, проявляемой ферментом на оцДНК, согласуются с результатами ранее проведенного анализа [385].

3.1.2.1.2. YB-1 стимулирует активность APE1 по расщеплению AP-сайтов в двухцепочечной ДНК при недостатке ионов магния

Как известно, APE1 является магний-зависимым ферментом, причем Mg²⁺ важен для различных этапов AP-эндонуклеазной реакции. Ионы Mg²⁺ принимают участие в стабилизации структуры активного центра APE1 и фермент-субстратного комплекса, а также необходимы для катализа [386]. Ранее было показано, что присутствие ЭДТА в реакционной смеси приводит к формированию апо-белка, не содержащего в активном центре ионов металлов, и полностью блокирует каталитическую активность APE1 [386]. По этой причине мы не могли исследовать влияние белка YB-1 на активность APE1 в расщеплении AP-сайтов в двухцепочечной ДНК в условиях полного отсутствия ионов Mg²⁺ / присутствии ЭДТА, т. к. добавление даже 0.2 мМ ЭДТА в реакционную смесь полностью ингибировало расщепление AP-сайтов (рис. 14, дор. 1).

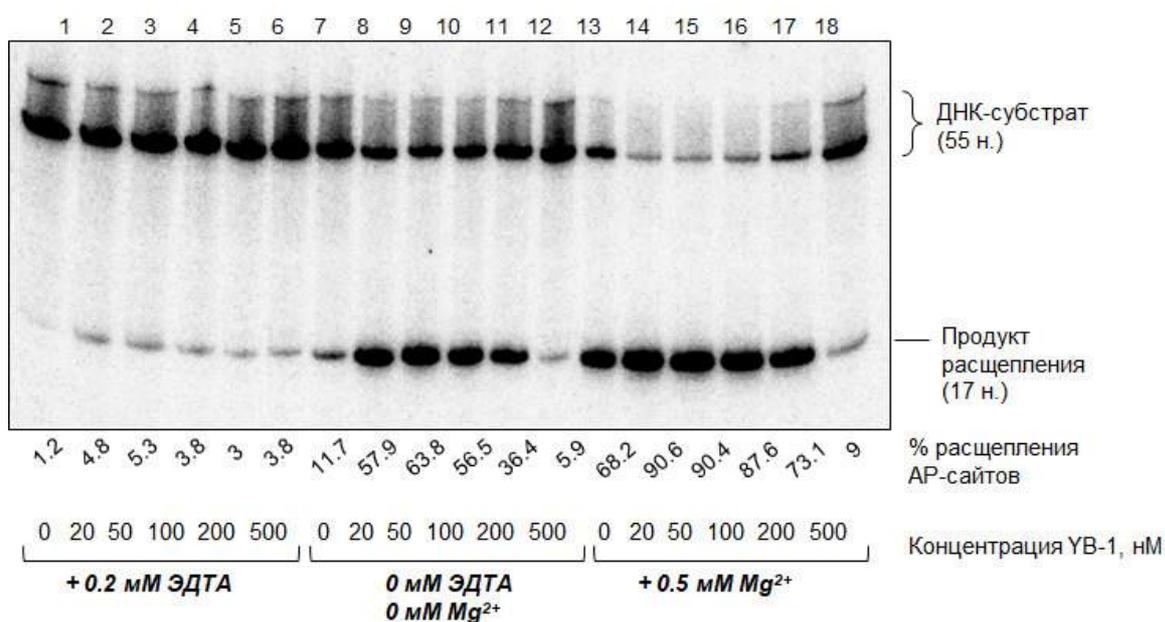


Рис. 14. YB-1 стимулирует активность APE1 в условиях недостатка ионов магния. Радиоавтограф

ПААГ, содержащего 7 М мочевины, в котором проводили разделение продуктов реакции расщепления 50 нМ AP-U₁₇-Comp 0.25 нМ APE1 (AP-эндонуклеазную реакцию проводили 10 мин при 37°C согласно пункту 2.2.14), выполненной в присутствии 0.2 мМ ЭДТА (дор. 1-6), без добавления ЭДТА и MgCl₂ (в качестве контроля в реакционную смесь добавляли соответствующее количество 1х рабочего буфера RВa) (дор. 7-12) или 0.5 мМ MgCl₂ (дор. 13-18). Концентрации YB-1 в реакционных смесях и проценты расщепления AP-сайтов в ДНК указаны под радиоавтографом геля.

Однако следовых количеств бивалентных ионов, вероятно, присутствующих в реактивах или препарате APE1, было достаточно для протекания AP-эндонуклеазной реакции (рис. 14, дор. 7; ни MgCl₂, ни ЭДТА не добавлялись в реакционную смесь). Мы обнаружили, что в этих условиях реакции YB-1 способен заметно стимулировать активность APE1 (рис. 14, дор. 7-12), в то время как в условиях, оптимальных для работы фермента (0.5 мМ Mg²⁺), влияние YB-1 было существенно слабее (рис. 14, дор. 13-18).

Исследуя эффект различных концентраций YB-1 на активность APE1 в расщеплении AP-сайтов в ДНК-дуплексе AP-U₁₇-Comp в отсутствие добавленного MgCl₂ в реакционной смеси (но без добавления ЭДТА), мы обнаружили поразительное сходство в характере влияния YB-1 и ионов магния (рис. 15, сравнить дор. 4-10 и 14-19).

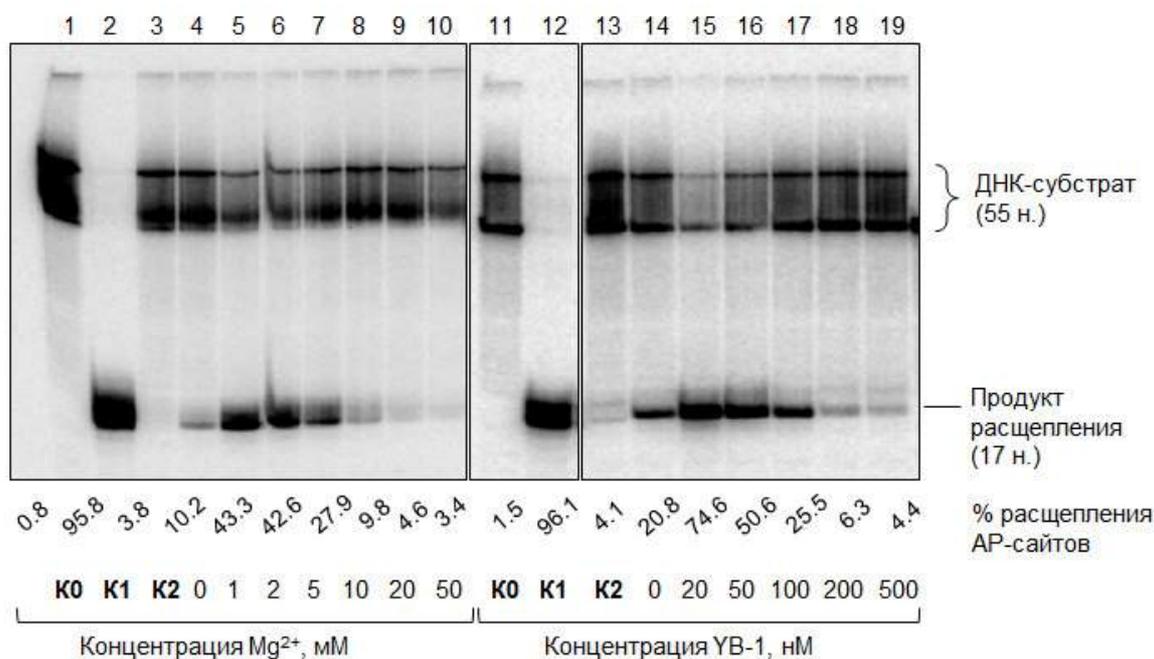


Рис. 15. Сравнение влияния ионов магния и белка YB-1 на активность APE1. Радиоавтографы ПААГ, содержащих 7 М мочевины, в которых проводили разделение продуктов реакции расщепления 50 нМ AP-U₁₇-Comp 0.25 нМ APE1 (10 мин при 37°C согласно пункту 2.2.14). AP-эндонуклеазную реакцию проводили в присутствии 0-50 мМ MgCl₂ (дор. 1-9) либо 0-500 нМ белка YB-1 (дор. 10-18). К0 – контроль ДНК; К1 – контроль выщепления урацила ферментом Ung (как описано в разделе 2.2.10); К2 – контроль неферментативной деградации AP-сайтов. Для контроля неферментативной деградации

АР-сайтов (K2) образец реакционной смеси получения АР-сайтов (как описано в разделе 2.2.9) инкубировали 10 мин при 37°C без добавления АРЕ1. Концентрации $MgCl_2$ / $YB-1$ в реакционных смесях и проценты расщепления АР-сайтов в ДНК указаны под радиоавтографами гелей.

Колоколообразная зависимость АР-эндонуклеазной активности АРЕ1 от концентрации ионов Mg^{2+} на двунитевых ДНК-субстратах была показана ранее [387]. Поскольку в присутствии 0.2 мМ ЭДТА $YB-1$ не восстанавливает активность АРЕ1 (рис. 14; сравнить дор. 1-6 и 7-12), этот белок не способен полностью выполнять роль ионов магния в АР-эндонуклеазной реакции. Действительно, было установлено, что ионы Mg^{2+} участвуют непосредственно в катализе [386]. На настоящий момент предложено два возможных механизма АР-эндонуклеазной реакции – с участием одной или двух молекул Mg^{2+} [388,389]. Согласно первой из них, в активном сайте фермента находится один ион магния, а реакция начинается с нуклеофильной атаки фосфатной группы, расположенной с 5'-стороны от АР-сайта, молекулой воды, координированной остатком Asp-210 [388]. Альтернативная гипотеза предполагает существование двух ионов магния в активном центре. Первый катион Mg^{2+} координирует ион гидроксида (ОН-), который осуществляет нуклеофильную атаку фосфата, находящегося с 5'-стороны от АР-сайта. Второй ион Mg^{2+} служит для нейтрализации заряда интермедиата реакции и/или стабилизирует О3'-уходящую группу [389].

Однако можно предположить, что $YB-1$ способен заменять функции ионов магния на этапах стабилизации АРЕ1 и/или фермент-субстратного комплекса. В пользу этого предположения свидетельствуют значения констант K_M и k_{cat} , найденные для АР-эндонуклеазной реакции в отсутствие $YB-1$ ($2.7 \pm 0.2 \cdot 10^{-7}$ М и $(2.5 \pm 0.2) \text{ сек}^{-1}$, соответственно ($r^2 = 0.98$); и в присутствии $YB-1$ (60 нМ) – ($1.4 \pm 0.2 \cdot 10^{-7}$ М и $(2.6 \pm 0.3) \text{ сек}^{-1}$, соответственно ($r^2 = 0.98$) (как описано в разделе 2.2.23).

Для того, чтобы исключить возможное присутствие ионов Mg^{2+} в препарате $YB-1$, аликвоту исходного раствора $YB-1$ инкубировали с 10 мМ ЭДТА и диализовали против буфера хранения $YB-1$. Полученный белок, а также буфер хранения были проанализированы на способность стимулировать активность АРЕ1 (рис. 16).

Мы обнаружили, что способность $YB-1$ стимулировать АР-эндонуклеазную реакцию сохранилась, несмотря на предварительную инкубацию препарата белка с ЭДТА (рис. 16, дор. 1-6), в то время как буфер, против которого диализовали $YB-1$ после инкубации с ЭДТА, не оказывал влияния на активность АРЕ1 (рис. 16, дор. 7-11). Полученный результат однозначно свидетельствует о том, что агентом, стимулирующим активность АРЕ1, в препарате $YB-1$ является непосредственно белок $YB-1$, а не возможная примесь ионов Mg^{2+} .

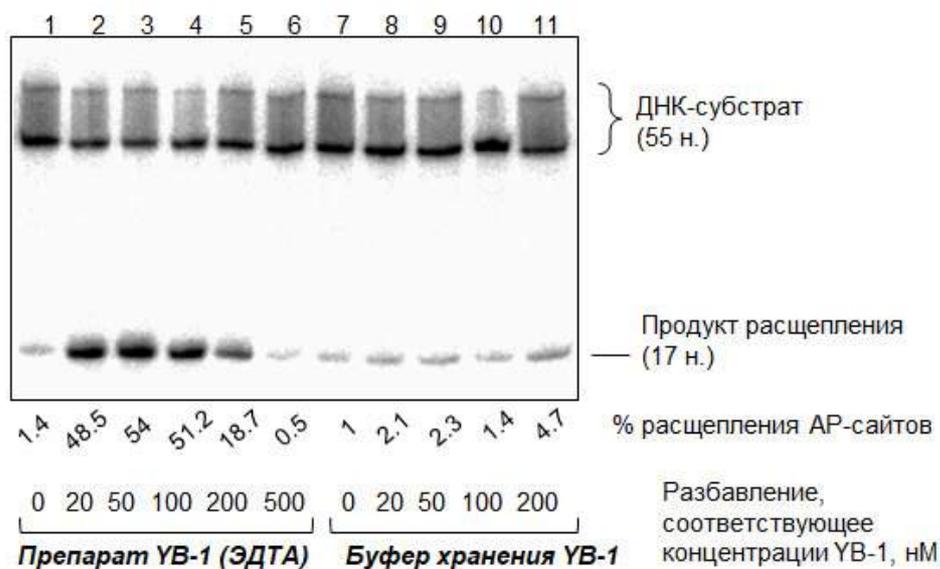


Рис. 16. Контрольный эксперимент, показывающий отсутствие ионов магния в препарате YB-1 / буфере хранения. Представлен радиоавтограф ПААГ, содержащего 7 М мочевины, в котором проводили разделение продуктов реакции расщепления 50 нМ AP-U₁₇-Comp 0.25 нМ APE1 (AP-эндонуклеазную реакцию проводили 10 мин при 37°C согласно пункту 2.2.14), выполненной в присутствии препарата YB-1_{ЭДТА} (дор. 1-6) либо буфера хранения YB-1, добавленного в пропорции, соответствующей пропорции белка YB-1_{ЭДТА} (дор. 7-11). Для получения препарата YB-1, очищенного от возможных примесей катионов магния (YB-1_{ЭДТА}), в образец YB-1 был добавлен ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ. После 30 мин инкубации в бане со льдом YB-1 диализовали против буфера хранения YB-1 (20 мМ КН₂РO₄, 0.5 М КСl, 20% глицерин). Концентрации YB-1 (нМ), соответствующие им разбавления буфера хранения YB-1 в реакционных смесях и проценты расщепления AP-сайтов в ДНК указаны под радиоавтографом геля.

3.1.2.1.3. Для стимуляции активности APE1 белком YB-1 необходимы N-концевая регуляторная область APE1 и C-концевой домен YB-1

Для исследования роли различных доменов белка YB-1 в регуляции активности APE1, мы использовали различные делеционные мутанты YB-1. Мы обнаружили, что YB-1, лишенный C-концевого домена (мутант AP-CSD), не способен стимулировать активность APE1, в отличие от YB-1 дикого типа и ядерной формы YB-1(1-219), у которой сохраняется часть STD (рис. 17). Таким образом, за наблюдаемый эффект стимуляции APE1 отвечает именно C-концевой домен YB-1.

Как упоминалось ранее, C-концевой домен YB-1 (аминокислотные остатки 130-324) считается необходимым для физического взаимодействия YB-1 и APE1 [13]. С другой стороны, проксимальная часть STD (130-219 аминокислотные остатки) YB-1 была идентифицирована как специфический домен связывания ДНК [8]. Недавно было установлено, что связывание YB-1 с молекулой ДНК осуществляется по механизму *π*-катионного взаимодействия [330], которое

в комплексах нуклеиновых кислот и белков реализуется с участием основных аминокислотных остатков (Lys, Arg) белка и пуриновых азотистых оснований нуклеиновой кислоты [331]. Интересно, что электростатические и π -катионные взаимодействия между азотистыми основаниями ДНК и растворенными катионами сходны с взаимодействиями внутри ДНК-белковых комплексов и, возможно, могут имитировать последние [390]. Можно предположить, что YB-1, взаимодействуя с поврежденной ДНК, может способствовать связыванию с ней фермента APE1 по механизму, сходному с действием катионов Mg^{2+} , и тем самым стимулировать протекание AP-эндонуклеазной реакции.

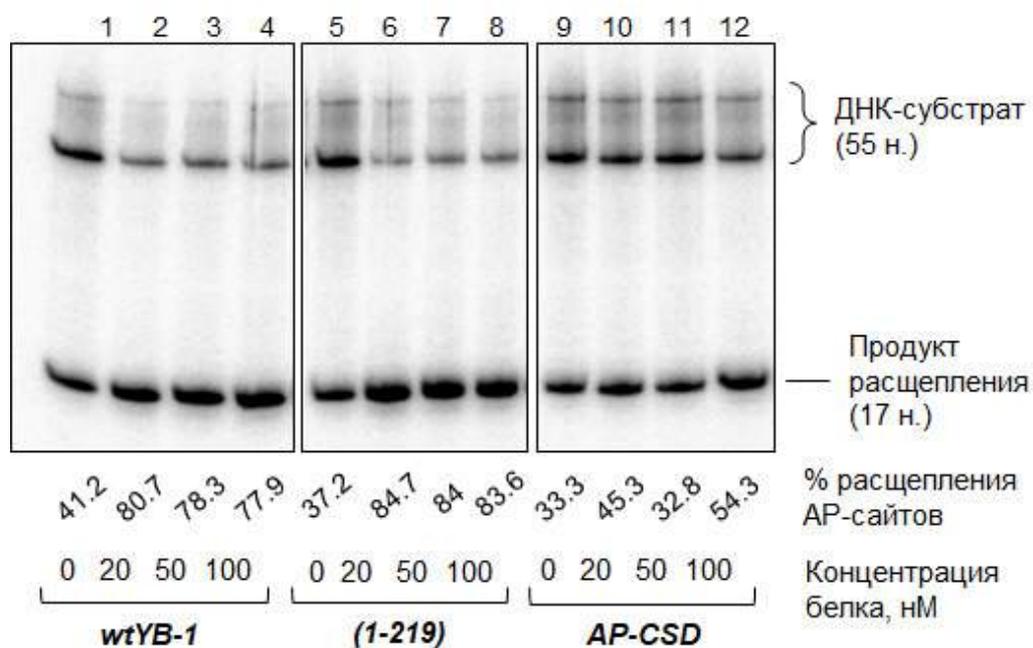


Рис. 17. Влияние мутантных форм YB-1 на активность APE1. Представлен радиоавтограф ПААГ, содержащего 7 М мочевины, в котором проводили разделение продуктов реакции расщепления 50 нМ AP-U₁₇-Comp 0.25 нМ APE1 (AP-эндонуклеазную реакцию проводили 10 мин при 37°C согласно пункту 2.2.14), выполненной в присутствии полноразмерного YB-1 (1-324) (дор. 1-4), ядерной формы YB-1(1-219) (дор. 5-8), либо мутантного белка, лишённого С-концевого домена (AP-CSD – 1-129 аминокислотные остатки) (дор. 9-12). Концентрации соответствующих мутантных форм YB-1 в реакционных смесях и проценты расщепления AP-сайтов в ДНК указаны под радиоавтографом геля.

Для исследования роли N-концевой регуляторной области APE1 в стимуляции активности этого фермента белком YB-1, нами была использована мутантная форма APE1, лишённая первых 35 аминокислотных остатков. Согласно данным, полученным в разделе 3.1.1, удаление N-концевого фрагмента APE1 (1-35 а.о.) не нарушает комплекса APE1 и YB-1, а только понижает его стабильность (табл. 4). Ранее было показано, что митохондриальная форма APE1 (mtAPE1), отличается от ядерной формы фермента делецией первых 33 аминокислотных

остатков, содержащих сигнал ядерной локализации (NLS) [391]. В соответствии с [391], AP-эндонуклеазная активность mtAPE1 примерно втрое выше, чем у полноразмерного белка. Действительно, активность мутантной формы NΔ35-APE1, использованной в настоящей работе, существенно превышала активность APE1, как следует из данных, представленных на рис. 18 (дор. 3) и рис. 15 (дор. 4). Несмотря на сохранение характерного профиля влияния ионов Mg^{2+} на активность фермента при укорочении APE1 (рис. 18, дор. 1-9), мы обнаружили, что YB-1 теряет способность стимулировать мутантный белок (рис. 18, дор. 10-18).

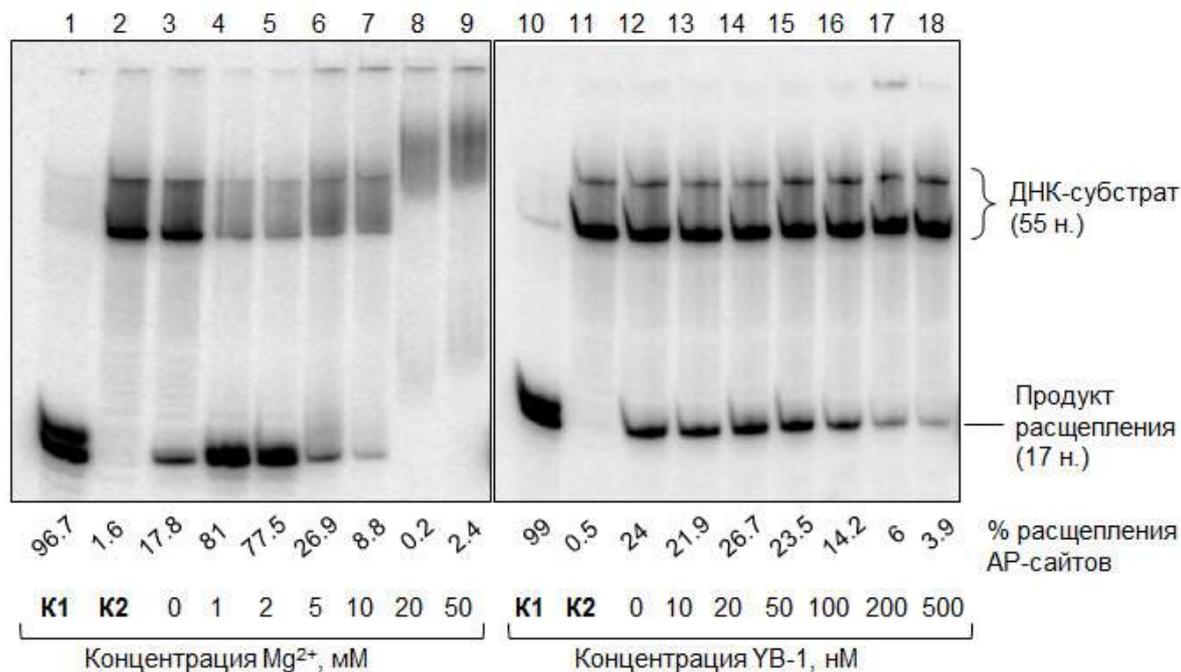


Рис. 18. Сравнение влияния ионов магния и белка YB-1 на активность NΔ35-APE1. Представлены радиоавтографы ПААГ, содержащих 7 М мочевины, в которых проводили разделение продуктов реакции расщепления 50 нМ AP-U₁₇-Сомр 0.1 нМ NΔ35-APE1 (5 мин при 37°C согласно пункту 2.2.14). AP-эндонуклеазную реакцию проводили в присутствии 0-50 мМ MgCl₂ (дор. 1-9) либо 0-500 нМ белка YB-1 (дор. 10-18). K1 – контроль выщепления урацила ферментом Ung (согласно разделу 2.2.10); K2 – контроль неферментативной деградации AP-сайтов. Для контроля неферментативной деградации AP-сайтов (K2) образец реакционной смеси получения AP-сайтов (как описано в разделе 2.2.9) инкубировали 5 мин при 37°C без добавления NΔ35-APE1. Концентрации MgCl₂ / YB-1 в реакционных смесях и проценты расщепления AP-сайтов в ДНК указаны под радиоавтографами гелей.

Таким образом, мы показали, что YB-1 или его ядерная форма YB-1(1-219) способны модулировать активность полноразмерной APE1 и, следовательно, могут быть вовлечены в регуляцию репарации ДНК в ядре при генотоксическом стрессе. Считается, что сверхэкспрессия APE1 в раковых клетках коррелирует с прогрессированием и

химиорезистентностью некоторых типов опухолей [392,393]. Мультифункциональный фермент APE1 может понижать чувствительность клеток к химиотерапии, участвуя в репарации ДНК или выполняя важные функции в регуляции транскрипции [378]. Установленная способность белка YB-1 стимулировать каталитическую активность APE1 по расщеплению AP-сайтов может способствовать репарации ДНК и, тем самым, вносить вклад в развитие устойчивости клеток опухоли к терапевтическим агентам. Ранее было показано, что YB-1 и APE1 (в ацетилированной форме) могут формировать комплекс на промоторе гена *MDR1* [13]. Можно предположить, что открытая нами способность YB-1 стабилизировать комплекс APE1 с ДНК-мишенью этого фермента может модулировать также коактиваторную функцию APE1 в процессе транскрипции, представляя еще один возможный путь участия онкобелка YB-1 в развитии устойчивости опухолей к химиотерапии.

3.1.2.1.4. YB-1 ингибирует активность APE1 по расщеплению AP-сайтов, локализованных в некомплементарных участках ДНК

Следует отметить, что несмотря на установленную способность YB-1 стимулировать активность APE1 по расщеплению AP-сайтов в двунитевых ДНК, присутствие высоких концентраций YB-1 ингибирует фермент (рис. 15, дор. 18,19). Сходный колоколообразный профиль влияния на активность APE1 от концентрации характерен для ионов Mg^{2+} (рис. 15, дор. 4-10). Можно предположить, что в случае магния, высокая концентрация этого катиона вызывает дестабилизацию В-формы ДНК, как это было показано для бивалентных катионов металлов [394]. В свою очередь, YB-1 также может способствовать локальному плавлению дуплекса в районе повреждения [311,328]. Поскольку AP-сайты в составе одноцепочечных фрагментов ДНК расщепляются ферментом APE1 значительно хуже, чем AP-сайты в двухцепочечных структурах, присутствие высоких концентраций ионов Mg^{2+} и белка YB-1 ингибирует активность APE1.

AP-сайты, которые образуются в однонитевых районах интермедиатов репликации и транскрипции в ходе метаболизма ДНК, представляют отдельную угрозу для клетки. В отсутствие комплементарной матрицы для ресинтеза ДНК, инициация репарации (расщепление цепи ДНК) может приводить к мутациям типа сдвига рамки считывания [395] и труднорепазируемым двунитевым разрывам молекулы ДНК [396]. Можно предположить, что отчасти это предотвращается за счёт значительно более слабой активности APE1 по отношению к AP-сайтам, локализованным в некомплементарных областях двойной спирали; тем не менее, нежелательная активность фермента на однонитевых ДНК-субстратах всё же не исключена (см. предыдущий раздел).

Мы установили, что YB-1 способен ингибировать расщепление ферментом APE1 AP-сайтов, расположенных в одноцепочечной ДНК или в некоплементарных участках ДНК-дуплексов (рис. 19). Поскольку YB-1 способен ингибировать также активность укороченной формы APE1, $\Delta 35$ APE1, можно заключить, что наблюдаемый эффект обусловлен связыванием YB-1 с ДНК, и не требует наличия N-концевой регуляторной области APE1. Действительно, согласно литературным данным, YB-1 предпочтительнее связывает одноцепочечную ДНК, чем двухцепочечную [328], что может быть причиной проявления ингибирующего действия YB-1 при более низких его концентрациях по сравнению с влиянием YB-1 на расщепление AP-сайтов в ДНК-дуплексах.

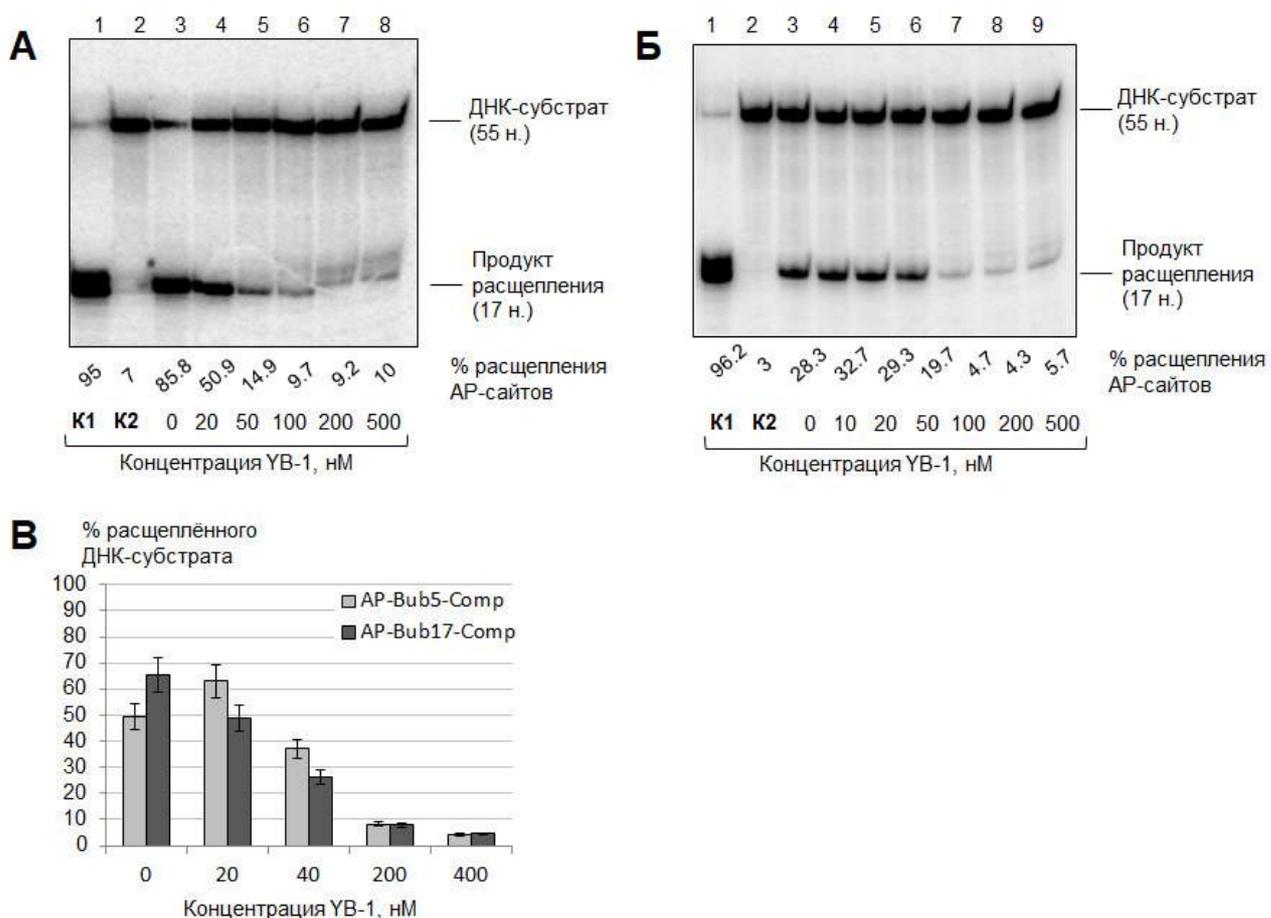


Рис. 19. Влияние YB-1 на расщепление AP-сайтов в одноцепочечных участках ДНК. А, Б. Представлены радиоавтографы ПААГ, содержащих 7 М мочевины, в которых проводили разделение продуктов реакции расщепления 50 нМ AP-U₁₇ 500 нМ APE1 (А) или 100 нМ $\Delta 35$ -APE1 (30 и 15 мин при 37°C согласно пункту 2.2.14, соответственно). K1 – контроль выщепления урацила ферментом Ung (согласно разделу 2.2.10); K2 – контроль неферментативной деградации AP-сайтов. Для контроля неферментативной деградации AP-сайтов (K2) образец реакционной смеси получения AP-сайтов (как описано в разделе 2.2.9) инкубировали 30 либо 15 мин при 37°C без добавления APE1 либо $\Delta 35$ -APE1, соответственно. Концентрации YB-1 в реакционных смесях и проценты расщепления AP-сайтов

в ДНК указаны под радиоавтографами гелей. В. Диаграмма, иллюстрирующая влияние YB-1 на активность APE1 по расщеплению AP-сайтов в некомплементарных областях ДНК-дуплексов AP-Bub₅-Comp и AP-Bub₁₇-Comp. По оси X – концентрация YB-1, по оси Y – процент расщеплённого ДНК-субстрата. Приведены планки погрешностей с указанием относительных ошибок 10%.

Установленная способность YB-1 ингибировать потенциально опасную активность APE1 по расщеплению AP-сайтов в одностранных фрагментах ДНК также может играть важную роль в регуляции репарации ДНК и обеспечивать дополнительный уровень устойчивости клеток к ДНК-повреждающему воздействию (особенно значимый для быстро пролиферирующих клеток с высокой скоростью метаболизма ДНК).

3.1.2.2. Влияние YB-1 на активность фермента 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 (см. раздел 1.1.2). В качестве примера одного из «дополнительных» факторов BER, с помощью которого может происходить расщепление AP-сайтов в ДНК, в настоящей работе мы рассмотрели бифункциональную ДНК-гликозилазу NEIL1. Этот фермент интересен ещё и тем, что его субстратная специфичность отличается от характерной для APE1 – в отличие от APE1, NEIL1 более эффективно расщепляет AP-сайты в одноцепочечных и частично некомплементарных фрагментах ДНК [45].

3.1.2.2.1. Сравнение активности NEIL1 на различных ДНК-структурах

Субстратные свойства одноцепочечных и частично некомплементарных олигонуклеотидов изучались ранее для суммарной реакции расщепления повреждённой ДНК, использующей N-гликозилазную и AP-лиазную активности NEIL1. В ходе нашей работы мы сфокусировали внимание на AP-лиазной активности NEIL1 и обнаружили, что для этой отдельно взятой активности NEIL1 одноцепочечные AP-ДНК также обладают лучшими субстратными свойствами (рис. 20). Концентрации ДНК и NEIL1 в экспериментах, проведённых как с одноцепочечным, так и с двухцепочечными ДНК-субстратами, составляли 40 нМ и 25 нМ, соответственно. AP-лиазная активность NEIL1 на ДНК-дуплексах, содержащих области некомплементарных оснований, в свою очередь, превышает активность фермента на одноцепочечных олигонуклеотидах (условия реакции на субстратах AP-Bub₅-Comp, AP-Bub₁₇-Comp, AP-Bub_L-Comp, AP-Bub_{L3}-Comp, AP-Bub_{L-3}-Comp: 40 нМ ДНК, 12.5 нМ NEIL1) (данные приведены в разделе 3.1.2.2.2, см. рис. 22 при нулевой концентрации YB-1).

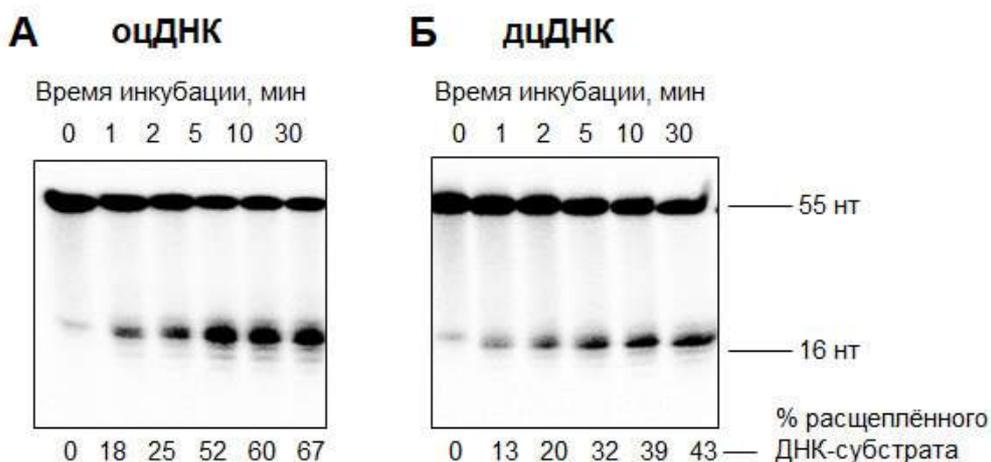


Рис. 20. Расщепление AP-сайтов в олигонуклеотидах AP-U₁₇ (А) и AP-U₁₇-Comp (Б) ферментом NEIL1. Радиоавтографы ПААГ, содержащих 7 М мочевины и 20% формамид, в которых проводили разделение продуктов AP-лиазной реакции (25 нМ NEIL1, 40 нМ AP-ДНК). Проценты расщеплённого ферментом ДНК-субстрата указаны под радиоавтографами гелей.

Нами было исследовано расщепление ферментом NEIL1 AP-сайтов, локализованных в пяти различных вариантах таких ДНК-структур – AP-Bub₅-Comp (некомплементарная область протяжённостью 5 п.н., AP-сайт в середине); AP-Bub₁₇-Comp, AP-Bub_L-Comp, AP-Bub_{L3}-Comp и AP-Bub_{L-3}-Comp (размер некомплементарной области – 17 п.н., AP-сайт находится в середине; в первом положении некомплементарной области; в третьем положении некомплементарной области; и в нерасплавленном участке за три п.н. до начала некомплементарной области соответственно). Из этих ДНК-субстратов наиболее предпочтительным для NEIL1 является AP-Bub₁₇-Comp; перемещение AP-сайта на край некомплементарной области ухудшает субстратные свойства. Наконец, ДНК-дуплекс с маленьким «пузырём» (5 п.н.) уступает по субстратным свойствам структурам, содержащим более протяжённую область некомплементарных нуклеотидов (17 п.н.).

3.1.2.2.2. Влияние YB-1 на расщепление AP-сайтов в ДНК ферментом NEIL1

В настоящей работе мы исследовали влияние YB-1 на AP-лиазную активность фермента NEIL1 по отношению к AP-сайтам, расположенным в различных ДНК-структурах. Было установлено, что YB-1 способен ингибировать расщепление ферментом NEIL1 AP-сайтов, локализованных в одноцепочечной ДНК, и стимулировать AP-лиазную активность фермента по отношению к двухцепочечной AP-сайт-содержащей ДНК (рис. 21). В отличие от влияния YB-1 на активность APE1 по отношению к AP-сайтам в ДНК-дуплексах (рис. 15, дор. 13-19), стимуляция белком YB-1 AP-лиазной активности фермента NEIL1 носит линейный, а не колоколообразный характер (рис. 21А).

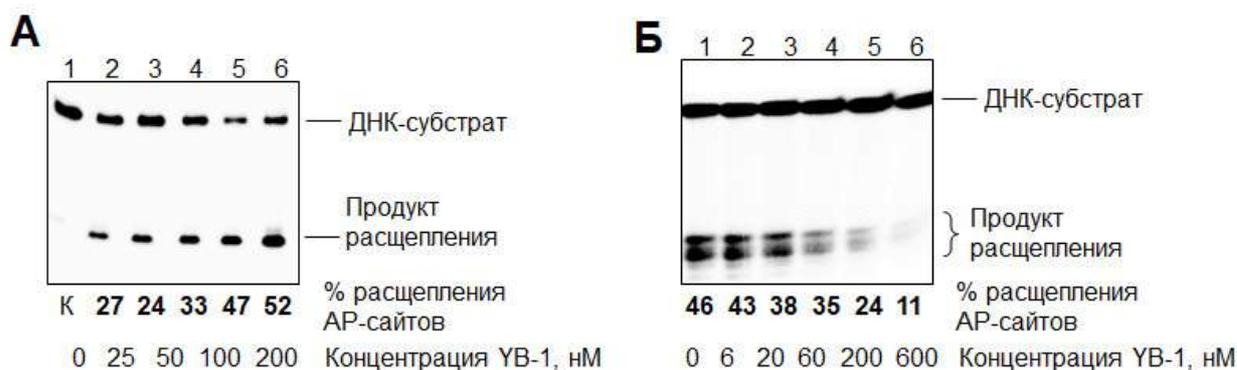


Рис. 21. Влияние YB-1 на активность NEIL1 по расщеплению AP-сайтов в двухцепочечной (А) и одноцепочечной ДНК (Б). Радиоавтографы ПААГ, содержащих 7 М мочевины и 20% формамид, в которых проводили разделение продуктов реакции расщепления ферментом NEIL1 AP-сайтов, расположенных в ДНК-структурах AP-U₁₇-Comp (А) и AP-U₁₇ (Б). Проценты расщепления AP-сайтов указаны под радиоавтографами гелей.

Отсутствие ингибирующего эффекта высоких концентраций YB-1 в противоположность данным, полученным для фермента APE1, в данном случае, вероятно, 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 [328], а также способности этого белка понижать температуру плавления двойных спиралей [311,328], можно предположить, что взаимодействуя с AP-ДНК, YB-1 способствует локальному плавлению дуплекса. Как было показано в настоящей работе, AP-ДНК с локальной вторичной структурой в виде «пузыря» является более предпочтительным субстратом для NEIL1 (см. раздел 3.1.2.2.1).

Затем нами было исследовано влияние полноразмерной формы YB-1 на расщепление ферментом NEIL1 AP-сайтов, расположенных в областях некомплементарных нуклеотидов в составе ДНК-структур AP-Bub₅-Comp, AP-Bub₁₇-Comp, AP-Bub_L-Comp, AP-Bub_{L3}-Comp и AP-Bub_{L-3}-Comp. Во всех случаях в присутствии YB-1 наблюдалось ингибирование AP-лиазной активности ДНК-гликозилазы NEIL1 (рис. 22).

Следует отметить, что ингибирующий эффект YB-1 выражен более заметно на структурах, содержащих протяжённые одноцепочечные области, – одноцепочечном олигонуклеотиде AP-U₁₇ и всех ДНК-дуплексах с «пузырём» размером 17 п.н. – чем на AP-Bub₅-Comp, где одноцепочечный фрагмент имеет длину всего 5 нуклеотидов (сравнить рис. 22 А и Б). В свою очередь, положение AP-сайта в области некомплементарных нуклеотидов не имеет решающего значения (рис. 22Б).

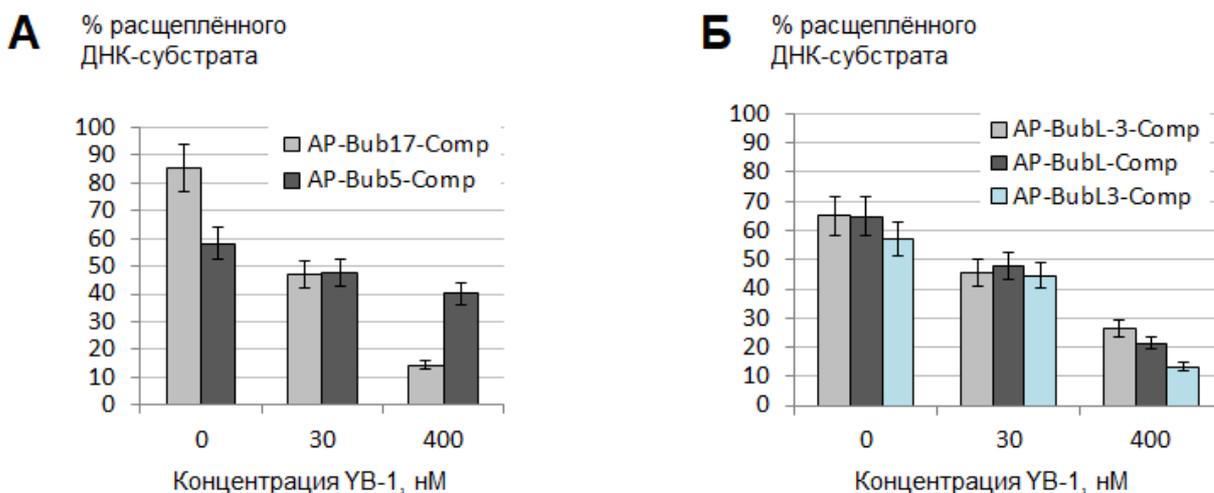


Рис. 22. Влияние YB-1 на активность NEIL1 по расщеплению AP-сайтов в некомplementарных областях ДНК-дуплексов разных размеров (А) и в зависимости от положения AP-сайта в некомplementарной области (Б). На рисунке представлены диаграммы. Реакционные смеси содержали 40 нМ радиоактивно меченные ДНК-структуры и 12.5 нМ NEIL1. По оси X – концентрация YB-1, по оси Y – процент расщеплённого ДНК-субстрата. Приведены планки погрешностей с указанием относительных ошибок 10%.

3.1.2.3. Влияние YB-1 на dRP-лиазную активность pol β

Несмотря на наличие физических взаимодействий, ранее не удалось детектировать влияние YB-1 на ДНК-полимеразную активность pol β [14]. В нашей работе мы сфокусировали внимание на 2'-дезоксирибозо-5'-фосфат (dRP) лиазной активности, присущей pol β [41]. Поскольку было обнаружено, что dRP-лиазная реакция является скоростью-лимитирующим этапом системы BER, была выдвинута гипотеза, согласно которой удаление dRP-фрагмента может играть существенную функциональную роль в регуляции процесса BER [397].

Для исследования влияния белка YB-1 на dRP-лиазную активность pol β , нами был сконструирован олигонуклеотид U_{17}^{Flu} , несущий флуоресцентную метку на 3'-конце dUrd-содержащей цепи (см. раздел 2.2.8). Мы обнаружили, что присутствие YB-1 в реакционной смеси ингибировало dRP-лиазную активность фермента на по отношению к ДНК-дуплексу AP- U_{17}^{Flu} -Comp, предварительно обработанному APE1 (рис. 23).

Вероятно, наблюдаемый эффект может быть обусловлен формированием тройного комплекса YB-1-pol β -ДНК (см. раздел 3.1.1) или повышенным сродством YB-1 к дезоксирибозофосфату [319], в результате которого YB-1 может конкурировать с pol β за dRP-фрагмент.

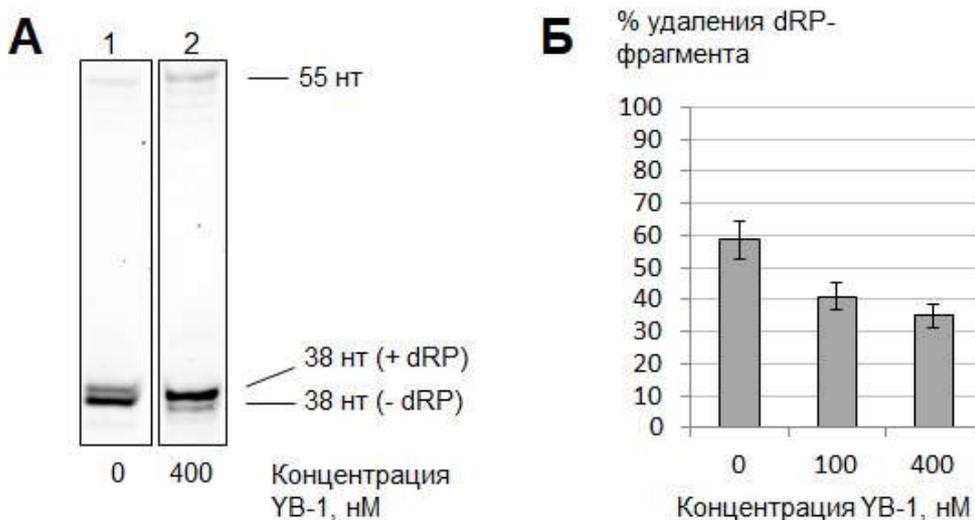


Рис. 23. Влияние YB-1 на dRP-лиазную активность pol β . А. Радиоавтограф ПААГ, содержащего 7 М мочевины и 20% формамид, в котором проводили разделение продуктов реакции удаления dRP-фрагмента из ДНК-структуры AP-U₁₇^{Flu}-Comp ферментом pol β . Перед добавлением pol β производили полное расщепление AP-сайтов в ДНК ферментом APE1. Б. Соответствующая диаграмма; приведены планки погрешностей с указанием относительных ошибок 10%.

В то время как способность YB-1 стимулировать активности APE1 и NEIL1 в ходе нормального процесса BER может служить для ускорения превращения цитотоксического интермедиата – AP-сайта, физиологический смысл ингибирования dRP-лиазной активности pol β белком YB-1 остаётся неясным. Необходимость в негативной регуляции dRP-лиазной активности pol β может возникать в специфических условиях, когда следующий интермедиат процесса BER, образующийся при заполнении бреши ДНК-полимеразной активностью pol β , неэффективно процессируется ДНК-лигазой ligIII α . Так или иначе, избыточное образование односторонних разрывов в ДНК может приводить к активации PARP1. Синтез белком PARP1 полимеров поли(АДФ-рибозы), в свою очередь, может способствовать диссоциации YB-1 из комплекса с повреждённой ДНК за счёт ковалентной модификации YB-1 ферментом PARP1 либо нековалентного связывания этим белком полимеров PAR (см. следующую главу) и, следовательно, супрессии негативной регуляторной функции YB-1.

Таким образом, в настоящей главе было показано, что мультифункциональный белок YB-1 способен вступать в физические взаимодействия с различными белками системы эксцизионной репарации оснований ДНК (APE1, NEIL1 и ДНК-полимераза β) и модулировать активность этих ферментов. Как было рассмотрено в обзоре литературы (глава 1), центральным регулятором процесса BER является белок PARP1 и катализируемая им реакция синтеза поли(АДФ-рибозы). В разделе 3.1.1. мы детектировали белок-белковое взаимодействие YB-1 с

PARP1 и PARP2. Исследование роли YB-1 в регуляции активности этих ферментов позволило установить множественные функции YB-1 в процессе поли(АДФ-рибозил)ирования и было рассмотрено далее в отдельной главе.

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

3.2.1. «Инициация»: взаимодействие YB-1 и PARP1, опосредованное ДНК

3.2.1.1. Белки YB-1 и PARP1 формируют гетеромерный комплекс с повреждённой ДНК

Одним из свидетельств в пользу формирования тройного комплекса YB-1-PARP1-ДНК являются данные, полученные методом флуоресцентного титрования. В соответствии с результатами, представленными в главе 3.1.1, PARP1 способен связываться не только с белком YB-1, но и с комплексом YB-1-ДНК, что можно детектировать по повышению интенсивности флуоресценции молекул FAM-YB-1, находящихся в комплексе с ДНК, при добавлении PARP1 (рис. 11А).

Образование гетеромерного комплекса белков с повреждённой ДНК также можно детектировать методами задержки в геле и флуоресцентной спектроскопии (рис. 24). В первом случае присутствие PARP1 в реакционной смеси стимулирует связывание YB-1 с ДНК, несущей радиоактивную метку. При этом формируются комплексы белков и ДНК, обладающие низкой подвижностью в геле, и, вероятно, соответствуют тройным комплексам YB-1-PARP1-ДНК (рис. 24А). Во втором случае добавление YB-1 к комплексу PARP1-ДНК приводит к росту анизотропии флуоресценции ДНК, несущей флуоресцентную метку, что указывает на формирование тройного комплекса (рис. 24Б, синяя кривая). Присутствие молекул PARP1 в этих комплексах можно подтвердить по реакции поли(АДФ-рибозил)ирования, детектируемой после добавления НАД⁺ в режиме кинетического сканирования (см. далее, раздел 3.2.1.4, рис. 33А, сравнить с рис. 33Б).

На данный момент нет однозначного ответа на вопрос, необходимо ли формирование димера PARP1 на повреждённой ДНК для аутомодификации фермента [398]. Одна из последних работ в этой области иллюстрирует возможность как внутримолекулярной активации PARP1, так и межмолекулярной активации двух молекул фермента в составе димера, указывая, что первый вариант является предпочтительным [398]. Существование каталитически активных димеров PARP1 наводит на мысль о возможной регуляции реакции поли(АДФ-рибозил)ирования путём замещения одной из молекул димера PARP1 белком-партнёром. Данное предположение

находит подтверждение в литературе как факт существования регуляторов активности PARP1, которые привлекаются к месту повреждения *независимо* от каталитической активности PARP1 [399].

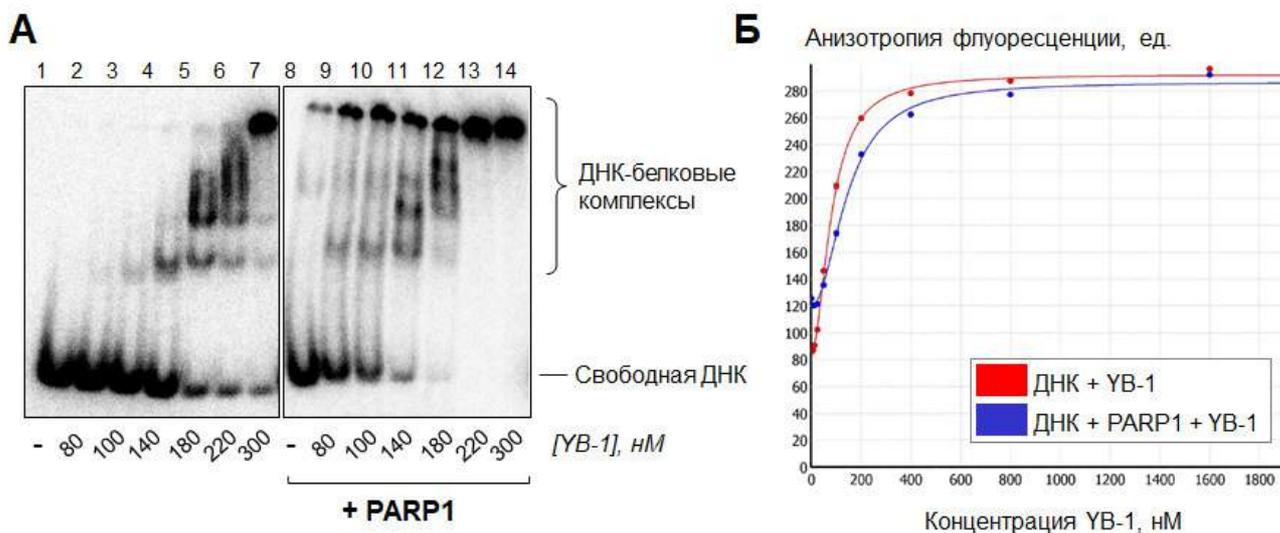


Рис. 24. А. Радиоавтограф нативного ПААГ, в котором проводили разделение образцов, содержащих 1x RBP1, 0 либо 200 нМ PARP1, 100 нМ несущий радиоактивную метку U₁₇-Comp и 0-300 нМ YB-1. Формирование и анализ комплексов YB-1-ДНК и YB-1-PARP1-ДНК проводили, как описано в разделе 2.2.3. Б. Исследование формирования комплексов YB-1-PARP1-ДНК методом флуоресцентной спектроскопии (согласно 2.2.20). Реакционные смеси содержали 1x RBP1, 200 нМ PARP1, 100 нМ Nick и 0-1000 нМ YB-1.

Установленное нами *PAR-независимое* связывание YB-1 с PARP1 в сайте повреждения ДНК является важной предпосылкой для функциональных взаимодействий этих белков на ранних стадиях синтеза поли(АДФ-рибозы).

3.2.1.2. Поли(АДФ-рибозил)ирование – новая посттрансляционная модификация YB-1

3.2.1.2.1. Поли(АДФ-рибозил)ирование YB-1 и его доказательства

Одним из основных видов ДНК-субстратов, используемых для исследования активности PARP1, служит ДНК, обработанная ДНКазой I (ДНК_{акт}) [400]. Наряду с ДНК_{акт} в настоящей работе в качестве ДНК-кофакторов PARP1 мы использовали различные ДНК-структуры. Так, ДНК-дуплекс AP-U₁₇-foU, имитирующий ДНК, содержащую множественные повреждения (кластер оксидативных повреждений + «тупые» концы), значительно активировал PARP1 (рис. 25). Для детекции реакции поли(АДФ-рибозил)ирования мы использовали НАД⁺, содержащий радиоактивную метку. В результате ковалентной модификации белков полимером PAR

радиоактивная метка включается в белки. Автополи(АДФ-рибозил)ирование PARP1 в условиях избытка НАД⁺ приводит к накоплению несущего радиоактивную метку продукта, детектируемого на границе гелей различной процентности (рис. 25А, дорожки 1-5, обозначен как PARP1*). Здесь и далее поли(АДФ-рибозил)ированные белки будем обозначать звёздочкой, т.е. PARP1* соответствует поли(АДФ-рибозил)ированному PARP1.

В присутствии YB-1 в реакционной смеси совместно с PARP1, НАД⁺ и повреждённой ДНК, с помощью SDS-гель-электрофореза и последующей радиоавтографии можно детектировать дополнительную полосу, ширина которой увеличивается с течением времени реакции (рис. 25А, дорожки 6-10), а интенсивность зависит от концентрации YB-1, использованной в эксперименте (рис. 25А, сравнить дорожки 11-13 и 8).

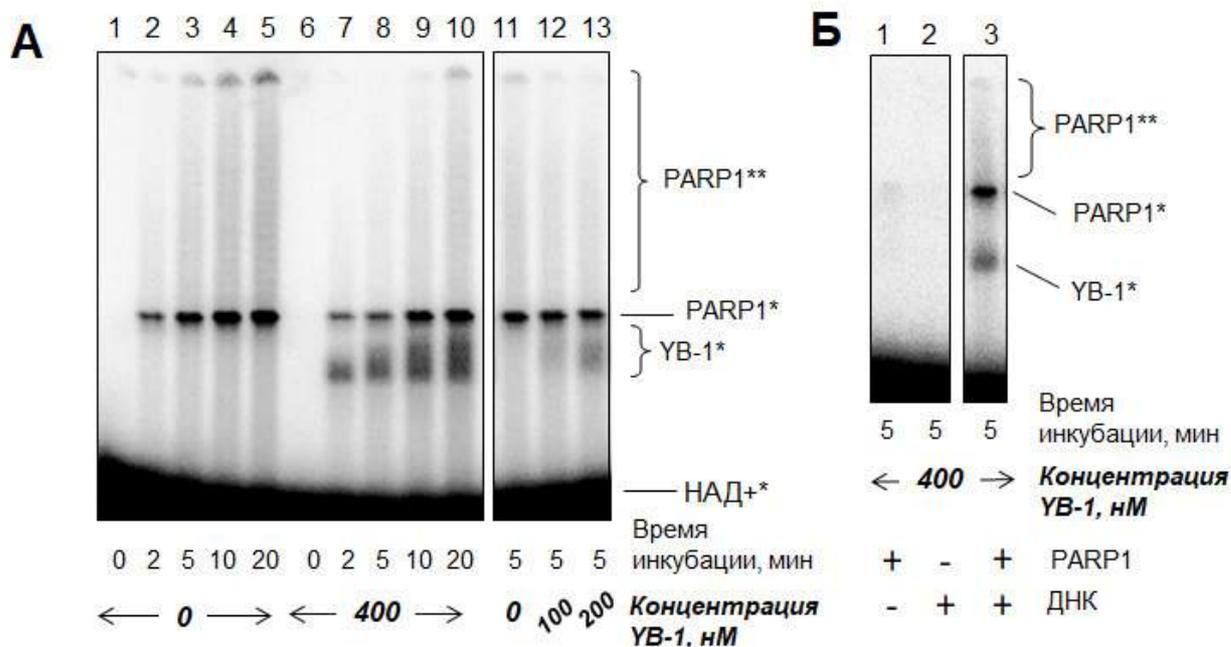


Рис. 25. Поли(АДФ-рибозил)ирование PARP1 и YB-1. А. Зависимость накопления продуктов реакции поли(АДФ-рибозил)ирования от времени реакции. Дорожки (1-5) – без YB-1; (6-10) – в присутствии 400 нМ YB-1. Б. Дополнительные контроли к экспериментам, представленным на Рис. 25А. (1) – Поли(АДФ-рибозил)ирование YB-1 и PARP1 в отсутствие повреждённой ДНК; (2) – контроль поли(АДФ-рибозил)ирования YB-1 без PARP1. На рисунке представлены радиоавтографы SDS-ПААГ, в которых проводили разделение продуктов реакции поли(АДФ-рибозил)ирования с использованием НАД⁺, содержащего радиоактивную метку (400 μМ, 1:10). Для активации PARP1 использовали 40 нМ AP-U₁₇-foU. Времена реакции поли(АДФ-рибозил)ирования и концентрации YB-1 в реакционной смеси указаны под радиоавтографами гелей.

Для доказательства того, что включение радиоактивной метки в белки действительно обусловлено синтезом ковалентно присоединённого полимера PAR, несущего радиоактивную

метку, продукты реакции поли(АДФ-рибозил)ирования были обработаны поли(АДФ-рибоза)-гликогидролазой PARG (рис. 26Б). PARG представляет собой основной фермент, ответственный за деградацию полимера PAR *in vivo* [290]. В присутствии PARG наблюдалось значительное уменьшение интенсивности полос на SDS-ПААГ, соответствующих поли(АДФ-рибозил)ированным белкам PARP1* и YB-1* (рис. 26Б).

Дальнейшее подтверждение модификации YB-1 было получено методом иммуноблоттинга с использованием антител, специфичных к PAR и YB-1 (рис. 26В). Чистый рекомбинантный YB-1, использованный в качестве контроля, распознавался антителами специфичными к YB-1, но не распознавался антителами специфичными к полимеру PAR (рис. 26В, сравнить дор. 3 на разных мембранах).

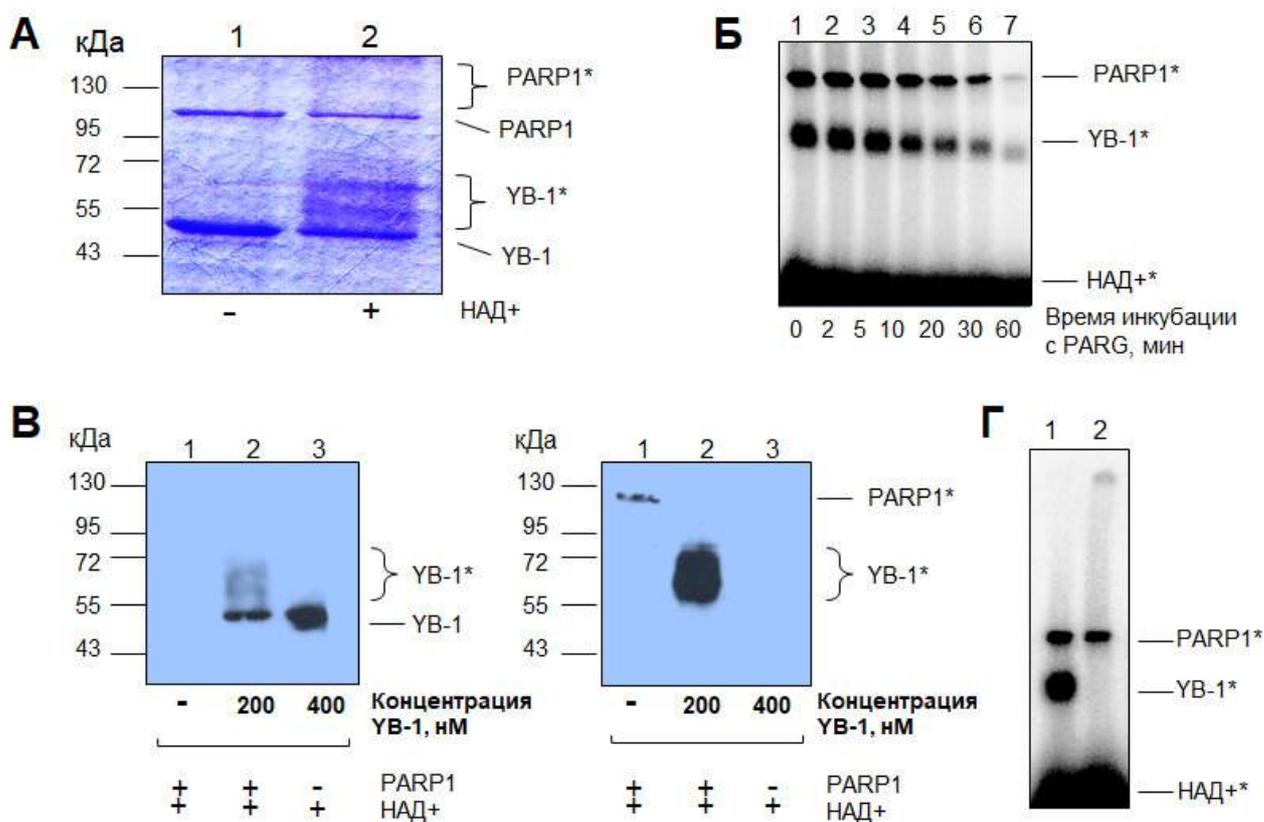


Рис. 26. Доказательства поли(АДФ-рибозил)ирования YB-1. А. SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(АДФ-рибозил)ирования YB-1 и PARP1 (окраска Кумасси). (1) – реакционная смесь не содержала NAD⁺; (2) – в присутствии NAD⁺ (400 μM). Для активации PARP1 использовали 40 нМ AP-U₁₇-foU. Слева указаны молекулярные массы, соответствующие расположению белковых маркёров PageRuler (Fermentas). Б. Деградация полимеров PAR ферментом PARG. Радиоавтограф SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции деградации поли(АДФ-рибозы) ферментом PARG. Времена инкубации с PARG смеси поли(АДФ-рибозил)ированных белков PARP1 и YB-1 указаны под радиоавтографом геля. В. Иммуноблот поли(АДФ-рибозил)ирования YB-1 с использованием антител, специфичных к YB-1 (первая

мембрана) и поли(АДФ-рибозе) (вторая мембрана). PARP1 и YB-1 были поли(АДФ-рибозил)ированы с использованием немеченого НАД⁺ (400 μ M) в присутствии 40 нМ AP-U₁₇-foU. (1) – автополи(АДФ-рибозил)ированный PARP1; (2) – поли(АДФ-рибозил)ирование PARP1 и YB-1 (200 нМ); (3) – контрольная смесь без PARP1, содержащая 400 нМ YB-1. Г. Доказательство ковалентного взаимодействия YB-1 и PAR. (1) – поли(АДФ-рибозил)ирование PARP1 и YB-1 (400 нМ). (2) – поли(АДФ-рибозил)ирование PARP1, YB-1 (400 нМ) добавляли в реакционную смесь после ингибирования активности PARP1 с использованием 3-аминобензамида.

Окраской геля Кумасси было установлено, что новая полоса действительно соответствует белку YB-1, ковалентно модифицированному полимером PAR (YB-1*). В условиях проведения эксперимента около 60-70% YB-1 поли(АДФ-рибозил)ируется, что можно оценить из интенсивности полос при окраске гелей Кумасси (рис. 26А). Следует отметить, что в отсутствие PARP1 или повреждённой ДНК, необходимой для активации PARP1, модификации YB-1 не наблюдается (рис. 25Б, дорожки 1, 2).

Необходимо принимать во внимание, что электрофоретическая подвижность YB-1 не соответствует его молекулярной массе (при М.в. \sim 36 кДа YB-1 мигрирует в SDS-ПААГ как белок, имеющий М.в. \sim 50 кДа) [10]. Тем не менее, как YB-1-специфичные, так и PAR-специфичные антитела детектировали размытую полосу (М.в. \sim 50-72 кДа), расположенную над полосой, соответствующей белку YB-1 (рис. 26В, дор. 2 на обеих мембранах), и представляющую собой спектр продуктов поли(АДФ-рибозил)ирования белка YB-1 (YB-1*), различающихся длиной/структурой присоединённых цепей PAR. Вероятно, поли(АДФ-рибозил)ирование YB-1 может понижать способность антител распознавать эпитопы белка-мишени, поскольку интенсивность размытой полосы, соответствующей YB-1* (рис. 26В, дор. 2), меньше, чем степень модификации, рассчитанная по окраске геля Кумасси (рис. 26А). PAR-специфичные антитела также реагируют с автополи(АДФ-рибозил)ированным PARP1 (рис. 26В, вторая мембрана, дор. 1). Низкую, по сравнению с YB-1*, интенсивность полос, соответствующих PARP1*, можно объяснить различием в размере белков (М.в. \sim 36 кДа для YB-1 и \sim 113 кДа для PARP1) – вследствие большого размера молекул PARP1 может происходить неполный перенос PARP1* на мембрану. Различие в длине и структуре присоединённых к белкам полимеров PAR также может оказывать существенное влияние. В то время как автомодификация PARP1, как показано, происходит длинными разветвлёнными полимерами PAR, содержащими более 200 мономеров АДФ-рибозы [401,402], цепи PAR, присоединённые к YB-1 могут достигать порядка 25 мономеров, как можно приблизительно оценить из молекулярной массы модифицированного YB-1*.

Многие белки способны связывать PAR нековалентно. В некоторых случаях это взаимодействие может быть настолько прочным, что комплексы не удаётся разрушить даже

добавлением хаотропных веществ, сильных кислот, детергентов и повышением ионной силы раствора [403]. Чтобы исключить возможность нековалентного взаимодействия YB-1 с поли(АДФ-рибозой), каталитическую активность PARP1 ингибировали после 5 мин реакции поли(АДФ-рибозил)ирования с использованием ингибитора PARP1 (3-аминобензамида). Затем в реакционную смесь добавляли YB-1 и дополнительно инкубировали пробу в течение 5 мин при 37°C (рис. 26Г, дор. 2). При этом не наблюдалось радиоактивной полосы, соответствующей поли(АДФ-рибозил)ированному YB-1* (рис. 26Г, сравнить дор. 1 и 2).

3.2.1.2.2. Модификация YB-1 ферментом PARP2

Среди белков, входящих в семейство PARP помимо PARP1, был описан только один белок – PARP2, способный катализировать синтез поли(АДФ-рибозы) в присутствии некоторых видов повреждений ДНК [404]. Для экспериментов с PARP2 мы использовали концентрацию PARP2, в пять раз превышающую концентрацию PARP1 в соответствующих экспериментах. Мы установили, что PARP2 также способен поли(АДФ-рибозил)ировать YB-1, однако с меньшей эффективностью, чем PARP1 (рис. 27).

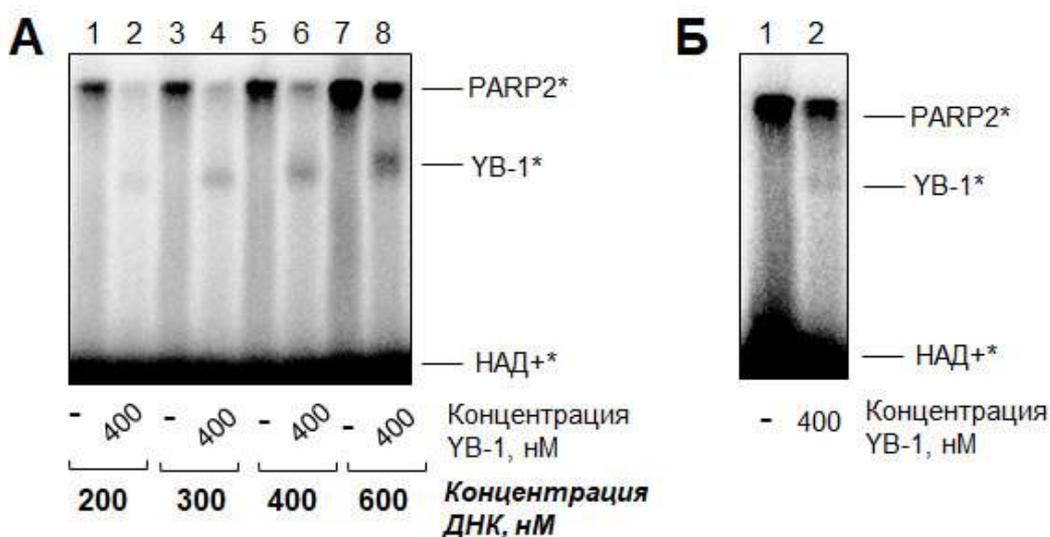


Рис. 27. Поли(АДФ-рибозил)ирование YB-1 ферментом PARP2 в присутствии активированной ДНК (А) и 40 нМ AP-U₁₇-foU (Б). Радиоавтографы SDS-ПААГ, в которых проводили разделение продуктов реакции поли(АДФ-рибозил)ирования YB-1 ферментом PARP2 с использованием НАД⁺, содержащего радиоактивную метку (400 μМ, 1:10). Концентрации YB-1 и активированной ДНК в реакционной смеси указаны под радиоавтографами гелей.

В целом, низкая по сравнению с PARP1 каталитическая активность PARP2 была отмечена при использовании различных ДНК-структур [373].

3.2.1.2.3. Модификация YB-1 ферментами PARP1 и PARP2 в присутствии РНК

Ранее было показано, что в присутствии РНК может происходить стимуляция активности ферментов PARP1 и PARP2 *in vitro* [405]. Также наблюдалось связывание PARP1 с РНК *in vivo* [406]. Поскольку большинство функций YB-1 в клетке связано с регуляцией метаболизма РНК (см. обзор [10]), исследование функциональных взаимодействий YB-1 и поли(АДФ-рибоза)-полимераз в присутствии РНК представляло отдельный интерес.

Мы обнаружили, что PARP1 и PARP2 способны поли(АДФ-рибозил)ировать YB-1 в присутствии как суммарной РНК клеток HeLa, так и олигонуклеотида oligoRNA, имитирующего мРНК, несмотря на то, что YB-1 выраженно ингибирует активности обеих поли(АДФ-рибоза)-полимераз (рис. 28).

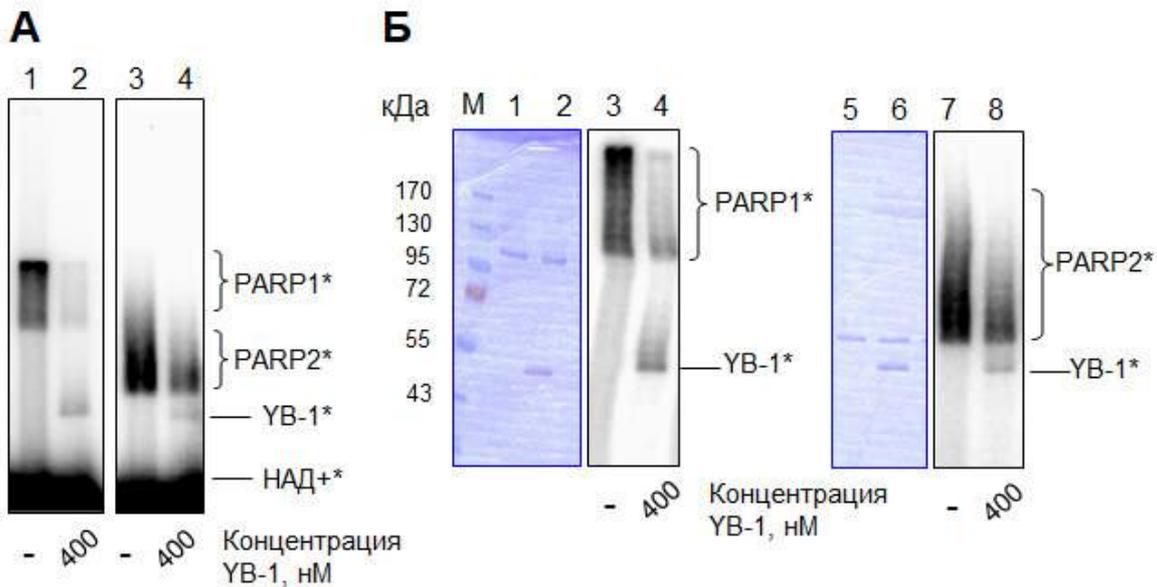


Рис. 28. Поли(АДФ-рибозил)ирование YB-1 в присутствии суммарной РНК клеток HeLa ($0.4 A_{260}$ ед./мл) (А) и 100 нМ oligoRNA (Б). Радиоавтографы SDS-ПААГ, в которых проводили разделение продуктов реакции поли(АДФ-рибозил)ирования YB-1 ферментами PARP1 и PARP2 с использованием НАД⁺, содержащего радиоактивную метку (2 μ М, 1:10) а также сами гели, окрашенные Кумасси (Б). М – белковые маркёры (PageRuler, Thermo Scientific). Концентрации YB-1 в реакционной смеси указаны под радиоавтографами гелей.

Как можно видеть на рис. 28Б (дорожки 3 и 4), длина полимеров PAR, ковалентно присоединённых к PARP1*, уменьшается в присутствии YB-1, что соответствует увеличению количества продуктов реакции автополи(АДФ-рибозил)ирования, имеющих высокую подвижность в геле. Наблюдаемый факт можно объяснить высоким сродством YB-1 к РНК ($K_d \sim$ нМ) [296,407], в результате чего этот белок может конкурировать с PARP1 за связывание РНК-лиганда, способствуя диссоциации PARP1 из комплекса с РНК и, тем самым, понижая

эффективность реакции поли(АДФ-рибозил)ирования. Не исключено, что поли(АДФ-рибозил)ирование YB-1 в присутствии РНК, может играть роль в регуляции РНК-зависимых функций этого белка.

3.2.1.2.4. Влияние поли(АДФ-рибозил)ирования на свойства YB-1

Ковалентная модификация отрицательно заряженным полимером PAR, как правило, приводит к изменению ДНК-связывающих свойств белков-мишеней поли(АДФ-рибозил)ирования [82]. В частности, в результате аутомодификации сам PARP1 диссоциирует из комплекса с повреждённой ДНК, поскольку присоединённый к нему полимер PAR вносит дополнительный заряд в эту структуру [408].

Методом задержки в геле можно детектировать связывание YB-1 с повреждённой ДНК (рис. 29А, дор. 1-5). В то время как присутствие PARP1 в реакционной смеси не нарушает формирования комплексов YB-1 с несущим радиоактивную метку олигонуклеотидом AP-U₁₇-foU (рис. 29А, дор. 6-10), присутствие PARP1 совместно с НАД⁺ приводит к исчезновению комплексов YB-1 с ДНК (рис. 29А, дор. 11-15).

Таким образом, поли(АДФ-рибозил)ирование YB-1 приводит к резкому уменьшению сродства этого белка к ДНК. В качестве дополнительного контроля, в реакционные смеси, соответствующие дорожкам (11-15) (рис. 29А), был добавлен PARG в присутствии ингибитора PARP1, 3-аминобензамида, и образцы были выдержаны в течение 1 ч при 37°C. В результате деградации PAR происходило частичное восстановление ДНК-связывающей активности YB-1 (рис. 29А, дор. 16-20). Следует учитывать тот факт, что из-за стерических препятствий PARG не способна удалять проксимальный мономер АДФ-рибозы с белков [291]. Это может объяснить различие в характере комплексов, детектируемых методом задержки в геле, при связывании ДНК немодифицированным белком YB-1 (рис. 29А, дор. 1-5) и YB-1 после модификации и последующего удаления полимера PAR (рис. 29А, дор. 16-20).

В результате поли(АДФ-рибозил)ирования YB-1 исчезает ингибирующий эффект высоких концентраций этого белка на активность APE1 по расщеплению AP-сайтов в составе двухцепочечных ДНК-структур (рис. 29Б). Этот факт служит дополнительным подтверждением того, что именно белок-нуклеиновые взаимодействия YB-1 с повреждённой ДНК вносят основной вклад в ингибирование активности APE1, наблюдаемое нами ранее (см. раздел 3.1.2.1.2, рис. 15, дор. 18, 19).

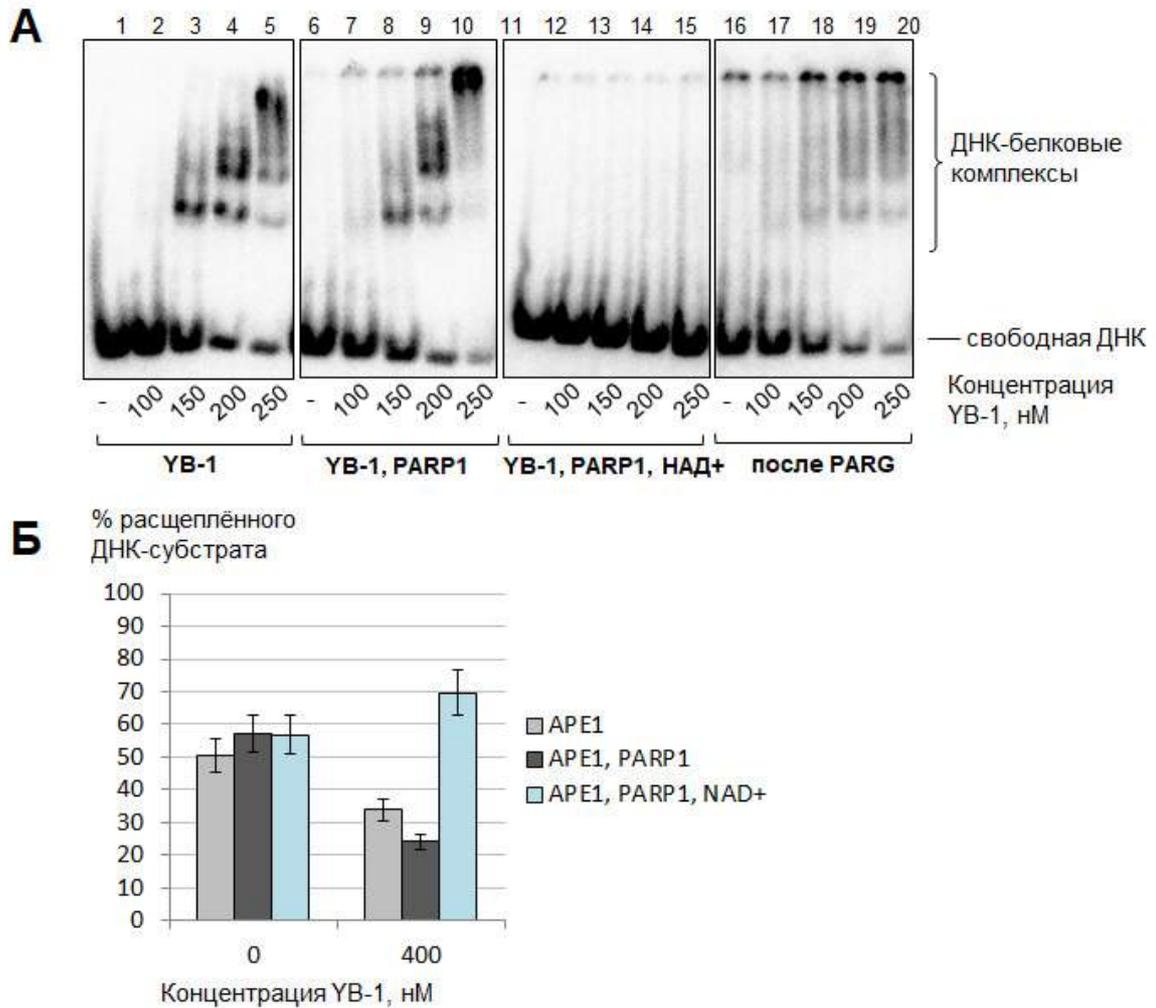


Рис. 29. Влияние поли(АДФ-рибозил)ирования на ДНК-связывающую активность YB-1. А. Радиоавтографы нативных ПААГ, в которых проводили разделение продуктов реакции связывания YB-1 с 40 нМ олигонуклеотидом AP-U₁₇-foU, несущим радиоактивную метку. Присутствие PARP1, NAD⁺ или PARG в реакционной смеси указано под соответствующими радиоавтографами. Б. Поли(АДФ-рибозил)ирование YB-1 приводит к элиминации ингибирующего действия этого белка на активность APE1 по расщеплению AP-сайта в составе ДНК-дуплекса AP-U₁₇-foU. Представлена диаграмма. По оси X – концентрация YB-1 ; по оси Y – процент расщеплённого ДНК-субстрата. Приведены планки погрешностей с указанием относительных ошибок 10%.

3.2.1.3. ДНК как регулятор функциональных взаимодействий YB-1 и поли(АДФ-рибоза)-полимераз

3.2.1.3.1. Влияние концентрации ДНК на взаимодействие YB-1 и PARP1

Несмотря на невысокое сродство YB-1 к ДНК ($K_d \sim \mu\text{M}$) [332,342], было предположено, что он может конкурировать с ДНК-связывающими ядерными белками в силу своей способности к формированию мультимеров в присутствии ДНК [314]. Действительно, данные по

флуоресцентному титрованию, полученные в настоящей работе (раздел 3.3.1), подтверждают, что за счёт гомоолигомеризации YB-1 может конкурировать с PARP1 за связывание ДНК-лиганда (значения EC_{50} , определённые для комплексов YB-1-YB-1 и YB-1-PARP1 в присутствии повреждённой ДНК составили 360 и 470 нМ, соответственно, см. табл. 4). Кроме того, мы показали, что YB-1 способен физически взаимодействовать с ДНК-связывающим доменом PARP1 (p24) (рис. 11Б, табл. 4). Белок-белковое взаимодействие PARP1 с YB-1, таким образом, может регулировать активность этого фермента, поскольку связывание с повреждённой ДНК необходимо для активации PARP1 [50].

Действительно, при высоком соотношении концентраций YB-1:ДНК ([YB-1]:[ДНК] ~10:1 и выше) белок YB-1 ингибирует активность PARP1, в результате чего понижается уровень не только аутомодификации этого фермента, но и уровень поли(АДФ-рибозил)ирования YB-1 (рис. 30А, дор. 1-6; рис. 30Б, дор. 1-6). Напротив, в присутствии избытка повреждённой ДНК YB-1 оказывает выраженный стимулирующий эффект на активность PARP1 (рис. 30А, дор. 9, 10; рис. 30Б, дор. 10-12). Подробно некоторые аспекты этого феномена, как и его возможные механизмы, будут изложены далее (раздел 3.2.2.3).

Интересно отметить, что в условиях избытка повреждённой ДНК в реакционной смеси, поли(АДФ-рибозил)ирование YB-1 «запаздывает» по сравнению с модификацией этого белка в случае ограниченного количества ДНК (рис. 30Б, сравнить дор. 3-5 и 9-11). Для того, чтобы поли(АДФ-рибозил)ирование YB-1 произошло, этот белок должен находиться в тройном комплексе с PARP1 и повреждённой ДНК. Формирование тройного комплекса, в свою очередь, зависит от концентраций индивидуальных компонент и их соотношения. В условиях ограниченного количества ДНК-кофактора (рис. 30Б, дор. 1-6), все молекулы повреждённой ДНК находятся в комплексах с PARP1; связывание YB-1 с бинарным комплексом PARP1-ДНК приводит к немедленному функциональному взаимодействию этого белка с PARP1, находящемся в активном (связанном с ДНК) состоянии. Следует отметить, что для эффективной модификации YB-1 необходимо присутствие этого белка в гетеромерном комплексе с PARP1 и ДНК именно на начальных стадиях синтеза поли(АДФ-рибозы) (см. далее раздел 3.2.2.3.3). Напротив, в условиях избытка повреждённой ДНК (рис. 30Б, дор. 7-12) может происходить независимое связывание PARP1 и YB-1 с различными молекулами ДНК, особенно если принять во внимание тот факт, что тенденция YB-1 к гомо-олигомеризации выше, нежели его сродство к PARP1 (табл. 4). По этой причине, в случае избытка повреждённой ДНК для взаимодействия YB-1 с молекулой ДНК, связанной PARP1, и формирования тройного комплекса, ведущего к PARилированию YB-1, требуются более высокие концентрации YB-1.

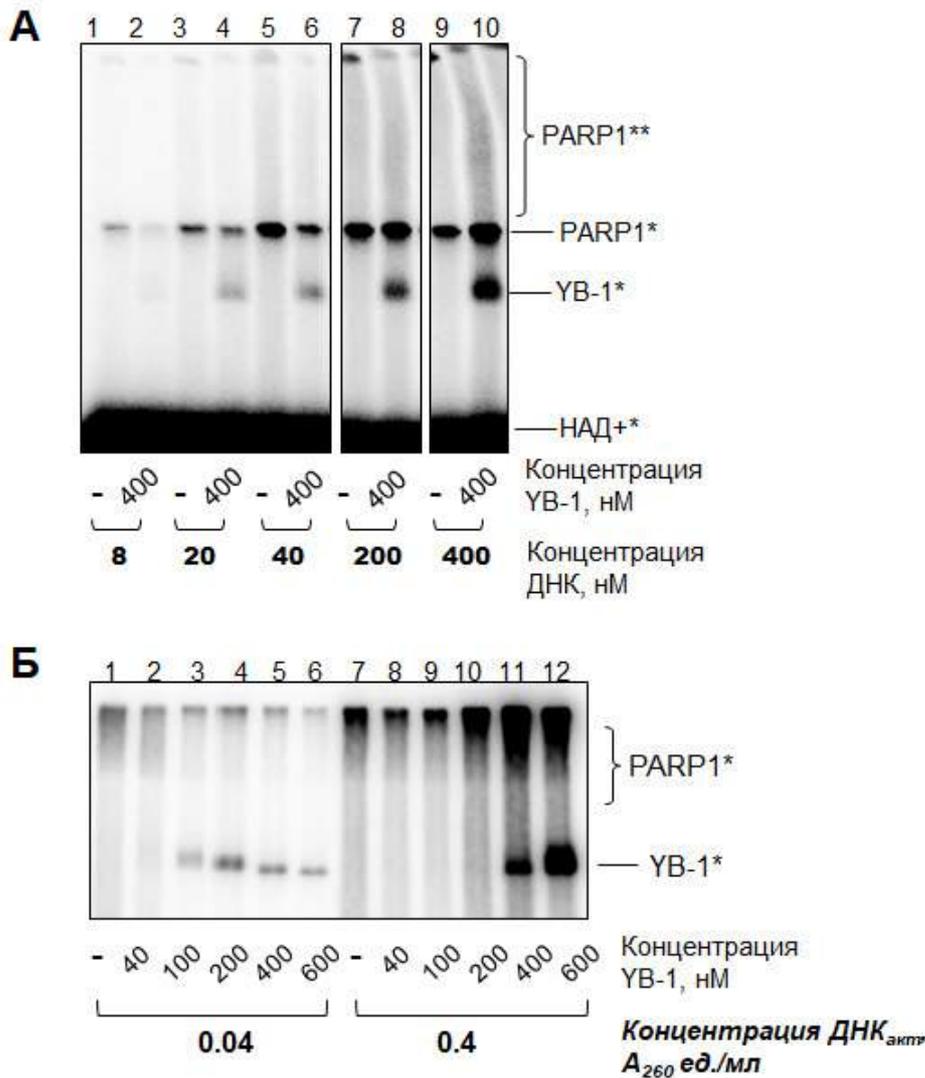


Рис. 30. Влияние YB-1 на активность PARP1 в присутствии различных концентраций олигонуклеотида AP-U₁₇-foU (А) и активированной ДНК (Б). Представлены радиоавтографы SDS-ПААГ, в которых проводили разделение продуктов реакции поли(АДФ-рибозил)ирования YB-1 ферментом PARP1 с использованием НАД⁺, содержащего радиоактивную метку (400 μМ, 1:10 (А) и 2 μМ, 1:10 (Б)). Концентрации YB-1 и повреждённой ДНК в реакционной смеси указаны под радиоавтографами гелей.

3.2.1.3.2. Влияние структуры ДНК на взаимодействие YB-1 и PARP1

Ранее было показано, что наличие в двойной спирали ДНК участков, отличающихся по структуре от канонической В-формы (в том числе, стабильных некомplementарных областей), может активировать PARP1 [51]. В связи с этим, одним из возможных механизмов стимуляции PARP1 в присутствии YB-1 может быть частичное плавление ДНК-дуплексов за счёт присущей YB-1 активности ДНК-шаперона [311,328].

Для проверки этой гипотезы, мы исследовали активность PARP1 на различных ДНК-структурах, в том числе, одностранных ДНК и ДНК-дуплексах, содержащих некомплементарные участки разных протяжённостей, в отсутствие и в присутствии YB-1 (рис. 31).

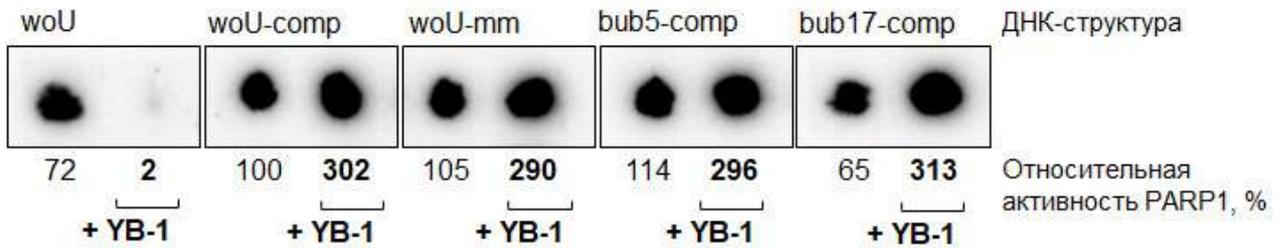


Рис. 31. Влияние структуры ДНК-кофактора на активность PARP1. Радиоавтографы ТХУ-мишеней, на которых производили остановку реакций поли(АДФ-рибозил)ирования PARP1, выполненных в присутствии различных ДНК-структур в отсутствие или в присутствии YB-1. Активность PARP1 на ДНК-дуплексе U₁₇-comp в отсутствие YB-1 принята за 100%.

Активность PARP1 в присутствии двухцепочечных ДНК-структур, содержащих некомплементарные области размером 1 и 5 н.п. (woU-mm и bub5-comp, соответственно), практически не отличалась от активности, проявляемой ферментом в присутствии нативной двухцепочечной ДНК (woU-comp, рис. 31). Вероятно, это можно объяснить тем, что основной вклад в активацию PARP1 вносят незащищённые двухцепочечные концы этих олигонуклеотидов. Активность PARP1 в присутствии ДНК-дуплекса, содержащего протяжённую некомплементарную область (17 н.п., bub17-comp), была даже ниже, чем активность фермента в присутствии полностью комплементарной ДНК (рис. 31). Способность YB-1 стимулировать синтез PAR практически не зависела от типа используемой двухцепочечной ДНК (рис. 31). Полученный результат свидетельствует о том, что YB-1-опосредованное плавление ДНК-дуплексов, даже если оно имеет место, не является причиной стимуляции PARP1 в присутствии YB-1.

При использовании одноцепочечной ДНК в качестве кофактора PARP1, YB-1 выраженно ингибировал активность фермента (woU, рис. 31). Интересно, что ингибирование реакции поли(АДФ-рибозил)ирования белком YB-1 во всех случаях коррелирует с очень низкой модификацией самого YB-1 (рис. 27, рис. 28, рис. 30Б (дор. 1-6), рис. 31 для оцДНК woU). Следует отметить, что эти феномены 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 и исчезновению конкуренции YB-1 и PARP1. Так, даже при высоком соотношении концентраций YB-1:ДНК ($[YB-1] \gg [ДНК]$), модификация YB-1 в

присутствии ДНК-дуплекса с течением времени приводит к истощению пула немодифицированного белка и освобождению ДНК (см. далее, раздел 3.2.1.4).

Способность YB-1 конкурировать с PARP1 за связывание повреждённой ДНК (одноцепочечной при любой концентрации и двухцепочечной в условиях её недостатка (см. пункт 3.2.1.3.1) может служить для регуляции синтеза поли(АДФ-рибозы) посредством изменения доступности ДНК-кофактора, необходимого для активации PARP1. Так, выведение из реакции одонитевых фрагментов ДНК – неэффективных для активации PARP1 – считается одним из механизмов стимуляции активности PARP1 полиаминами [409]. Однако, как будет показано в следующем разделе, YB-1 может также регулировать доступность акцептора модификации, когда в роли акцептора выступает сама молекула ДНК.

3.2.1.3.3. Влияние YB-1 на ковалентную модификацию ДНК ферментом PARP3

Одним из последних наиболее интересных открытий в области процесса поли(АДФ-рибозил)ирования было установление возможности ковалентной модификации *in vitro* концов разрыва молекулы ДНК с участием ферментов PARP1 и PARP2 [155]. Предполагается, что эта модификация может иметь непосредственное отношение к регуляции процесса репарации ДНК [169]. Помимо PARP1 и PARP2, в регуляции репарации ДНК может функционировать третий представитель семейства поли(АДФ-рибоза) полимераз – PARP3, для которого была показана активация в ответ на повреждение ДНК и способность катализировать реакцию моно(АДФ-рибозил)ирования белков [410].

Недавно Белоусовой Е. А. с соавт. [данные не опубликованы] была установлена способность PARP3 к модификации концов повреждённой ДНК, подобраны условия реакции, позволяющие получать до 70% модифицированного продукта, а также разработана эффективная методика детекции с использованием ДНК, несущей радиоактивную метку (PARP3 присоединяет к акцептору 1-2 мономера АДФ-рибозы по 5'-концевому фосфату. Удельной активности радиоактивно меченого НАД⁺ недостаточно для визуализации продуктов реакции) [данные не опубликованы]. С использованием разработанных условий реакции, белка PARP3 и ДНК-структуры, любезно предоставленных Белоусовой Е. А., мы исследовали влияние YB-1 на ковалентную модификацию ДНК ферментом PARP3 (рис. 32).

Нами было установлено, что YB-1 способен ингибировать активность фермента PARP3 при модификации олигонуклеотида Nick-2 (рис. 32А, дор. 6-8). Анализ реакционных смесей методом задержки в геле показал прямую аналогию между нарастанием ингибирующего эффекта с увеличением концентрации YB-1 (рис. 32А, дор. 3-8) и уменьшением количества свободной ДНК, не связанной в комплексы с YB-1 (рис. 32Б, дор. 1-6). В качестве дополнительного подтверждения природы наблюдаемого феномена, мы исследовали влияние

УВ-1 на активность PARP3 по модификации олигонуклеотида Nick-2 в присутствии oligoRNA, предполагая, что РНК должна служить достаточно эффективным конкурентом для связывания УВ-1 с ДНК. Действительно, в присутствии РНК сравнимый ингибирующий эффект достигался при существенно более высоких концентрациях УВ-1 (рис. 32А, сравнить дор. 6-8 и 12-14), что соответствует увеличению количества ДНК, не связанной УВ-1, в этих условиях (рис. 32Б, дор. 7-12).

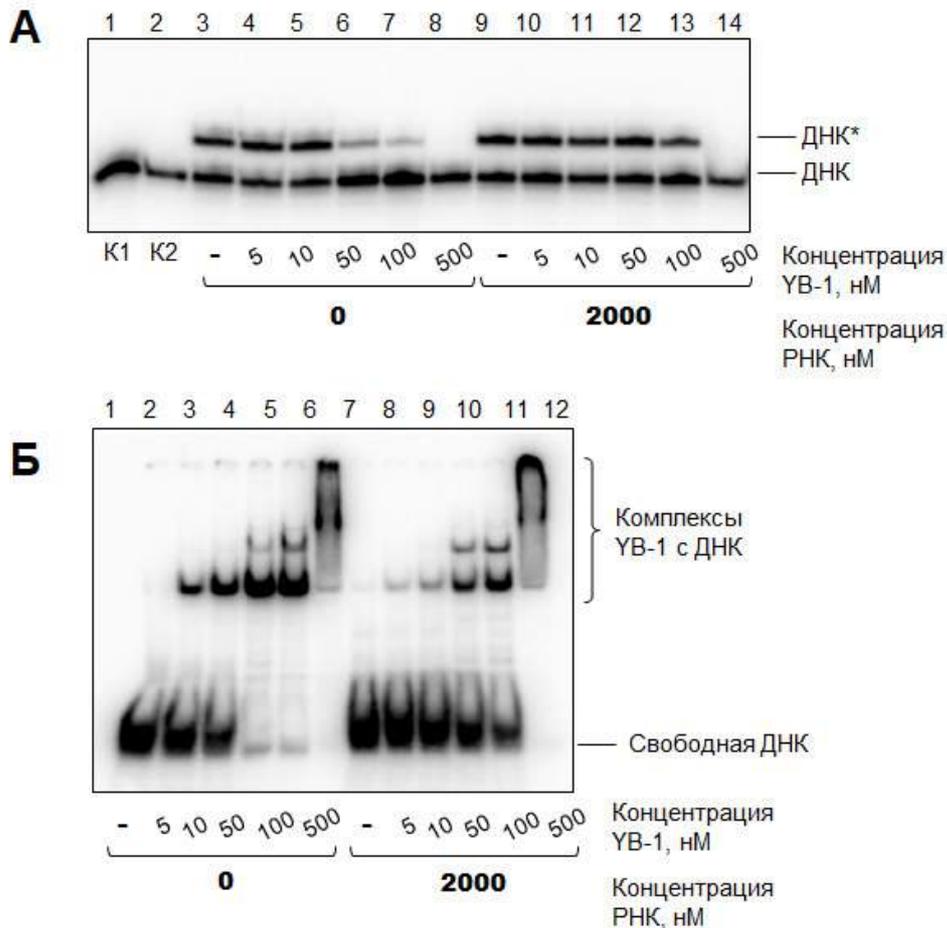


Рис. 32. Влияние УВ-1 на ковалентную модификацию ДНК ферментом PARP3. А. Радиоавтограф ПААГ, содержащего 7 М мочевины, в котором проводили разделение продуктов реакции модификации олигонуклеотида Nick-2, несущего радиоактивную метку, ферментом PARP3 в присутствии 200 μ М НАД⁺. K1 – контроль ДНК, K2 – контроль ДНК + 400 нМ УВ-1. (3-8) – без РНК, (9-14) – в присутствии 2000 нМ oligoRNA в качестве конкурента для связывания УВ-1. ДНК* соответствует Nick-2, модифицированному ферментом PARP3. Б. Исследование комплексообразования УВ-1 с Nick-2 в условиях реакции методом задержки в геле. (1-6) – без РНК, (7-12) – в присутствии 2000 нМ oligoRNA в качестве конкурента за связывание УВ-1.

Таким образом, УВ-1 способен ингибировать модификацию концов разрыва ДНК при связывании ДНК. Вероятно, в основе этого феномена лежит конкуренция УВ-1 и PARP3 за ДНК, препятствующая активации PARP3. Однако нельзя исключать возможность того, что УВ-

1 также способен выступать в качестве мишени моно(АДФ-рибозил)ирования ферментом PARP3. В этом случае причиной ингибирования модификации ДНК также может быть конкуренция YB-1 с ДНК за моно(АДФ-рибозу).

3.2.1.4. Исследование взаимодействий белков YB-1 и PARP1 в режиме реального времени

На данный момент существует несколько подходов для изучения активности PARP1 [411,412]. Все они (включая использование содержащего радиоактивную метку НАД⁺) основаны на определении количества синтезируемой поли(АДФ-рибозы) либо не прореагировавшего НАД⁺ и не позволяют непосредственно детектировать реакцию, катализируемую PARP1. Для исследования процесса поли(АДФ-рибозил)ирования в режиме реального времени в нашей лаборатории Анарбаевым Р. О. был разработан метод, основанный на флуоресцентной спектроскопии [374]. Данный метод позволяет осуществлять непрямую детекцию автополи(АДФ-рибозил)ирования PARP1 по изменению анизотропии флуоресценции ДНК-структуры, несущей флуоресцентную группу (см. раздел 2.2.20). В основе подхода лежит тот факт, что в ходе автомодификации PARP1 диссоциирует из комплекса с повреждённой ДНК за счёт электростатического отталкивания отрицательно заряженных ДНК и растущего полимера поли(АДФ-рибозы) [408].

Мы применили метод флуоресцентной спектроскопии для исследования функциональных взаимодействий белков YB-1 и PARP1. По изменению анизотропии флуоресценции ДНК-структуры Nick в нулевой точке можно судить об образовании комплекса PARP1 с ДНК (рис. 33А, серая кривая соответствует анизотропии флуоресценции свободной ДНК, светло-голубая – анизотропии флуоресценции ДНК, находящейся в комплексе с PARP1). При добавлении YB-1 в возрастающей концентрации наблюдается дополнительное увеличение анизотропии флуоресценции Nick, что указывает на формирование более сложных комплексов YB-1-PARP1-ДНК, предположительно, содержащих несколько молекул YB-1 (рис. 33А, синие кривые). Результаты аналогичного эксперимента по связыванию, выполненного в отсутствие НАД⁺, обсуждались ранее (раздел 3.2.1.1.). В настоящем случае реакционные смеси содержали НАД⁺, а измерение анизотропии флуоресценции проводилось в кинетическом режиме (0-30 мин). Падение уровня анизотропии в образцах, содержащих PARP1 и YB-1 до уровня, соответствующего свободной ДНК, свидетельствует о диссоциации белков из комплекса с ДНК в ходе реакции поли(АДФ-рибозил)ирования (рис. 33А, кривые, соответствующие 0-800 нМ YB-1).

Ранее мы показали, что при высоком соотношении концентраций YB-1: ДНК ([YB-1]:[ДНК] ~10:1 и выше) наблюдается ингибирование активности PARP1 на начальных этапах реакции (раздел 3.2.1.3.1). Методом флуоресцентной спектроскопии при высокой концентрации YB-1

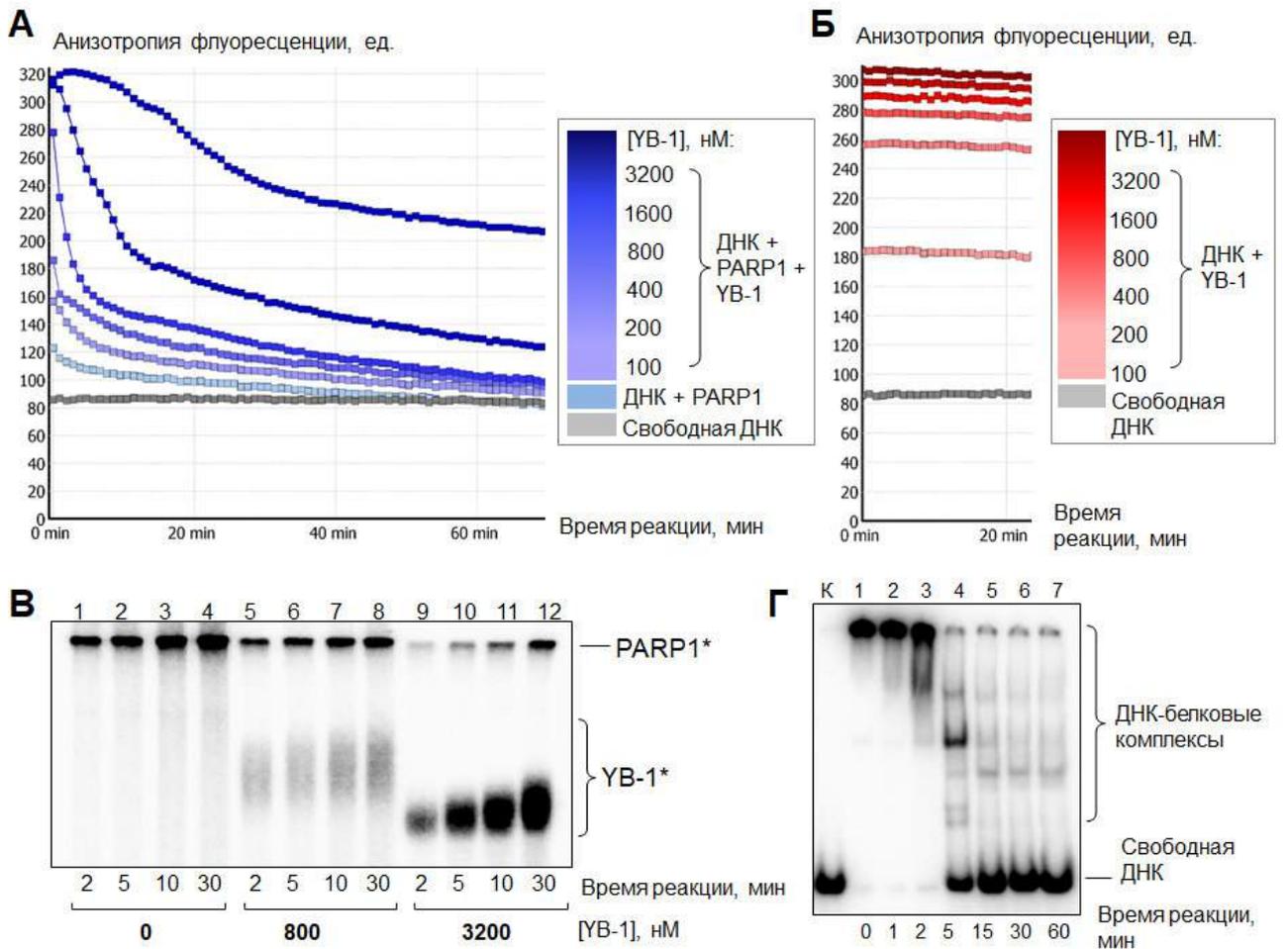


Рис. 33. Исследование взаимодействий белков YB-1 и PARP1 в режиме реального времени. А. «Лаг-период» освобождения ДНК в присутствии высоких концентраций YB-1. Представленные кривые иллюстрируют изменения анизотропии флуоресценции Nick, измеренные в режиме кинетического сканирования (согласно 2.2.20). Реакционные смеси содержали 1x RBP1, 200 нМ PARP1, 100 нМ Nick и 0-3200 нМ YB-1 (повышение концентрации YB-1 в реакционной смеси показано увеличением интенсивности цвета кривых). Процесс поли(АДФ-рибозил)ирования запускали добавлением немеченого НАД⁺ в 25 с реакции до конечной концентрации 500 μ М. Б. Контроль. Реакционные смеси содержали 1x RBP1, 100 нМ Nick и 0-3200 нМ YB-1 (повышение концентрации YB-1 в реакционной смеси показано увеличением интенсивности цвета кривых). Процесс поли(АДФ-рибозил)ирования запускали добавлением немеченого НАД⁺ в 25 с реакции до конечной концентрации 500 μ М. В. Радиоавтограф SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(АДФ-рибозил)ирования. Реакционные смеси были приготовлены аналогично (А), но реакцию запускали добавлением НАД⁺, содержащего радиоактивную метку. Г. Исследование диссоциации комплекса YB-1-PARP1-ДНК в ходе поли(АДФ-рибозил)ирования методом задержки в геле. Реакционные смеси содержали 1x RBP1, 40 нМ несущий радиоактивную метку Nick, 100 нМ PARP1, 400 нМ YB-1 и 500 μ М немеченый НАД⁺. К – контроль ДНК.

также обнаруживается «лаг-период» освобождения ДНК или задержка ДНК в комплексе с белками (0-5 мин от начала реакции) (рис. 33А, верхняя кривая). Наличие «лаг-периода» можно также детектировать методом задержки в геле с использованием несущей радиоактивную метку ДНК и немеченого НАД⁺ (рис. 33Г, дор. 1-3). Причина данного феномена состоит не в ингибировании PARилирования белков, о чём свидетельствует дальнейшее падение уровня анизотропии флуоресценции (после 5 мин реакции, рис. 33А). С наибольшей вероятностью, появление «лаг-периода» диссоциации комплексов при повышении концентрации YB-1 в реакционной смеси можно объяснить тем, что YB-1 в гетеромере с PARP1 является преимущественной мишенью для модификации. При этом аутомодификация PARP1 и, соответственно, его диссоциация из комплекса с ДНК может быть замедлена в силу статистически более частого присоединения мономеров (АДФ-рибозы) на посторонний избыточный акцептор – YB-1. В этом случае падение анизотропии флуоресценции будет детектироваться с того момента, когда равновесие между связыванием в комплекс (YB-1)_n-PARP1-Nick новых молекул YB-1 из раствора и диссоциацией поли(АДФ-рибозил)ированного YB-1 из комплекса сместится в сторону последней в результате истощения пула свободного немодифицированного YB-1.

Для подтверждения этой гипотезы мы воспроизвели эксперимент с использованием НАД⁺, содержащего радиоактивную метку, что позволило детектировать продукты модификации (рис. 33В). Действительно, в использованных условиях реакции YB-1 выступал в качестве преимущественной мишени поли(АДФ-рибозил)ирования, незначительно подавляя аутомодификацию PARP1 (рис. 33В, сравните дор. 1-4 и 9-12). Таким образом, при высоком соотношении концентраций YB-1:ДНК ($[YB-1] \gg [ДНК]$) понижение уровня аутоPARилирования PARP1 на ранних этапах реакции может происходить либо вследствие ингибирования каталитической активности PARP1, вызванного конкуренцией YB-1 и PARP1 за ДНК-лиганд (см. раздел 3.2.1.3.1), либо (если PARP1 активен) по причине конкуренции YB-1 и PARP1 за растущий полимер PAR.

3.2.2. «Элонгация» (ранние этапы): взаимодействие YB-1 и PARP1 посредством полимера PAR, ковалентно присоединённого к PARP1

3.2.2.1. Связывание YB-1 с поли(АДФ-рибозой)

Значимая часть функций процесса PARилирования в клетках реализуется посредством динамического взаимодействия PAR-связывающих белков и поли(АДФ-рибозы) [256]. К настоящему моменту установлено большое разнообразие PAR-связывающих мотивов в белках

– от полностью структурированных доменов до неупорядоченных последовательностей [256]. Особенно интересен тот факт, что полимер PAR может распознаваться даже каноническими ДНК- и РНК-связывающими мотивами, и следовательно, выступать в качестве эффективного временного конкурента функциональных ДНК- и РНК-мишеней некоторых белков в условиях резкого повышения его локальной концентрации [84,256]. Ранее YB-1 был идентифицирован среди PAR-связывающих белков [18]; кроме того, в структуре YB-1 присутствуют 2 РНК-связывающих мотива (RRM), которые могут функционировать в качестве PAR-связывающих модулей [256].

С использованием препарата PAR, приготовленного согласно (2.2.19), мы показали, что YB-1 действительно способен связывать поли(АДФ-рибозу). Следует отметить, что для данного эксперимента использовали препарат PAR, не обработанный бензолазой, который по соотношению PAR / ДНК полностью имитировал условия реакции. Несмотря на присутствие высокой концентрации ДНК в реакционной смеси, YB-1 образует комплексы с PAR, обладающие различной подвижностью в геле (рис. 34, дор. 1).

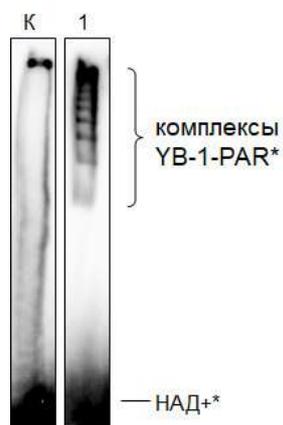


Рис. 34. Исследование комплексов YB-1 и PAR* методом задержки в геле, К – суммарный препарат PAR* (приготовленный согласно 2.2.19 без обработки реакционной смеси бензолазой, экстракции фенол:хлороформ:изоамиловым спиртом и высаживания этанолом). 1 – PAR* после 5 мин инкубации с 400 нМ YB-1.

3.2.2.2. Влияние YB-1 на активность PARG

Ранее было предположено, что PAR-связывающие белки могут препятствовать активности PARG, т.к. этому ферменту необходима доступность деградируемого полимера [256,291]. Действительно, мы обнаружили, что добавление YB-1 к PARP1* выражено ингибирует активность PARG, продлевая время существования поли(АДФ-рибозы) (рис. 35, сравнить дор. 1-5 и 6-10).

Для этого эксперимента была проведена реакция автополи(АДФ-рибозил)ирования PARP1 в присутствии 0.4 A₂₆₀ ед./мл ДНК_{акт.}, после чего активность PARP1 ингибировали добавлением 3-аминобензамида. После остановки реакции в образцы добавляли либо реакционный буфер (как контроль), либо YB-1 и выдерживали в течение 5 мин при 37°C. Наконец, в реакционные смеси добавляли PARG и в кинетическом режиме анализировали деградацию полимеров PAR,

присоединённых к аутомодифицированному PARP1. Следует отметить, что несмотря на присутствие ДНК в данном случае YB-1 связывается с поли(АДФ-рибозой), ковалентно присоединённой к PARP1 (рис. 34).

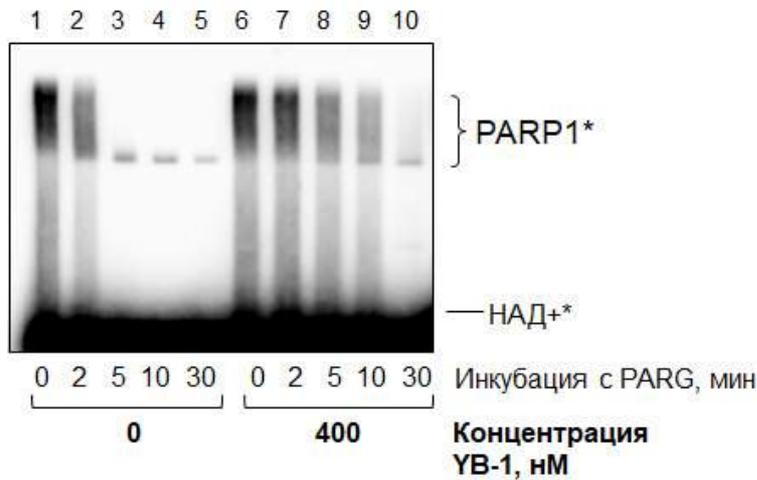


Рис. 35. Связывание YB-1 с полимером PAR* ингибирует активность PARG. Радиоавтограф SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов инкубации PARP1*, полученного в присутствии 0.4 A₂₆₀ ед./мл ДНК_{акт.}, 400 μМ НАД⁺ (1:10) и остановленного добавлением 3-аминобензамида, с ферментом PARG. (1-5) – без YB-1; (6-10) – в присутствии 400 нМ YB-1.

Данные, полученные в настоящем и предыдущем разделах, однозначно свидетельствуют о том, что на этапе элонгации большая часть молекул YB-1 диссоциирует из комплексов YB-1-ДНК и YB-1-PARP1-ДНК, релокализуясь на растущие цепи поли(АДФ-рибозы) и образуя сложные ансамбли YB-1-(PAR-PARP1*)-ДНК.

3.2.2.3. Стимуляция активности PARP1 белком YB-1 и её предполагаемый механизм

Несмотря на продолжительную историю исследования белков семейства PARP (с 1963 г. [413]), многие детали механизма поли(АДФ-рибозил)ирования до сих пор не вполне ясны. Так, было установлено, что повреждённая ДНК сама по себе не является эффективным кофактором PARP1, и для активации фермента требуются дополнительные *эффекторы* (агенты, стимулирующие активность PARP1 в присутствии повреждённой ДНК) [414]. К настоящему моменту показано, что активность PARP1 в присутствии ДНК стимулируют катионы [414], полиамины [409,414] и ряд основных белков (гистон H1 [414] (pI = 10.84), HMGN1 [415] (pI = 9.6), HMG2L1 [416] (pI = 9.35) и DDB2 [264] (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 [416]. Кроме того, общей чертой всех вышеупомянутых эффекторов PARP1 является положительный заряд.

Исключение составляет только PAR-связывающий белок ХРА ($pI = 6.3$), также способный стимулировать PARP1 [417]. Можно предположить, что действие этих агентов направлено на стабилизацию PARP1 в активном, связанном с ДНК состоянии на этапах «инициации» и «элонгации» процесса поли(АДФ-рибозил)ирования. В таком случае электростатические взаимодействия, опосредованные положительно заряженными эффекторами, могут рассматриваться как наиболее распространённый, но всё же частный случай взаимодействий, стабилизирующих комплекс PARP1 с ДНК. И незаряженные мультивалентные белки, способные связываться одновременно с PARP1 и ДНК (на этапе «инициации») / PAR и ДНК (в ходе «элонгации») также могут стабилизировать активную конформацию PARP1.

Особенностью белка YB-1 является необычно высокая изоэлектрическая точка ($pI(YB-1) = 9.87$), а также его неупорядоченная структура, благодаря которой YB-1 способен взаимодействовать с ДНК [8], PARP1 (глава 3.1.1) и поли(АДФ-рибозой) (раздел 3.2.2.1) (а также подвержен PTM [248] – включая поли(АДФ-рибозил)ирование (раздел 3.2.1.2)). В совокупности, все эти свойства делают YB-1 привлекательным кандидатом на роль эффектора PARP1.

Действительно, как мы уже наблюдали ранее, YB-1 способен стимулировать активность PARP1 (см. раздел 3.2.1.3.1). В настоящей главе мы подробно исследуем это свойство YB-1 и его возможные следствия.

3.2.2.3.1. YB-1 стимулирует активность PARP1 в отсутствие Mg^{2+} -ионов

Ранее было показано, что добавление в реакцию смесь ЭДТА препятствует активации PARP1 ионами Mg^{2+} и Ca^{2+} [414], что согласуется с результатами наших экспериментов (рис. 36, см. активность PARP1 в присутствии 5 мМ Mg^{2+} или 10 мМ ЭДТА).

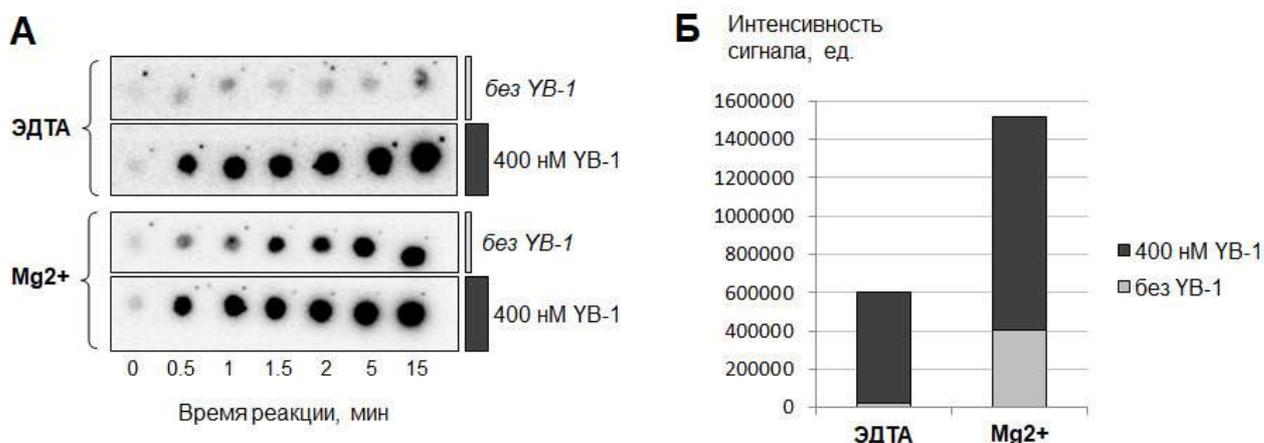


Рис. 36. YB-1 стимулирует активность PARP1 в отсутствие Mg^{2+} -ионов. А. Радиоавтографы ТХУ-мишеней, на которых производили остановку реакций поли(АДФ-рибозил)ирования PARP1,

выполненных в присутствии 10 мМ ЭДТА или 5 мМ Mg^{2+} в отсутствие или в присутствии YB-1. Эксперименты были выполнены и проанализированы параллельно. Б. Диаграмма, иллюстрирующая выход реакции поли(АДФ-рибозил)ирования, выполненной в присутствии 10 мМ ЭДТА или 5 мМ Mg^{2+} в отсутствие или в присутствии YB-1. Построение диаграммы производили по данным эксперимента (А) (взяты точки, соответствующие 15 мин реакции).

Согласно литературным данным, полиамины и гистоны могут функционировать независимо от присутствия ЭДТА, синергично с действием небольших концентраций бивалентных катионов и стимулировать активность PARP1 на три порядка эффективнее, чем последние [414]. Мы установили, что YB-1, подобно гистонам и полиаминам, может выступать в качестве активатора PARP1, более чем в 10^3 раз эффективного, чем катионы Mg^{2+} , и действовать независимо от присутствия ЭДТА (рис. 37).

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). Используя укороченные формы YB-1 – YB-1(1-219) и AP-CSD – мы установили, что для стимуляции активности PARP1 необходим С-концевой домен YB-1 или его проксимальная часть (129-219 аминокислотные остатки), то есть фрагмент белка, в основном несущий положительный заряд (рис. 37).

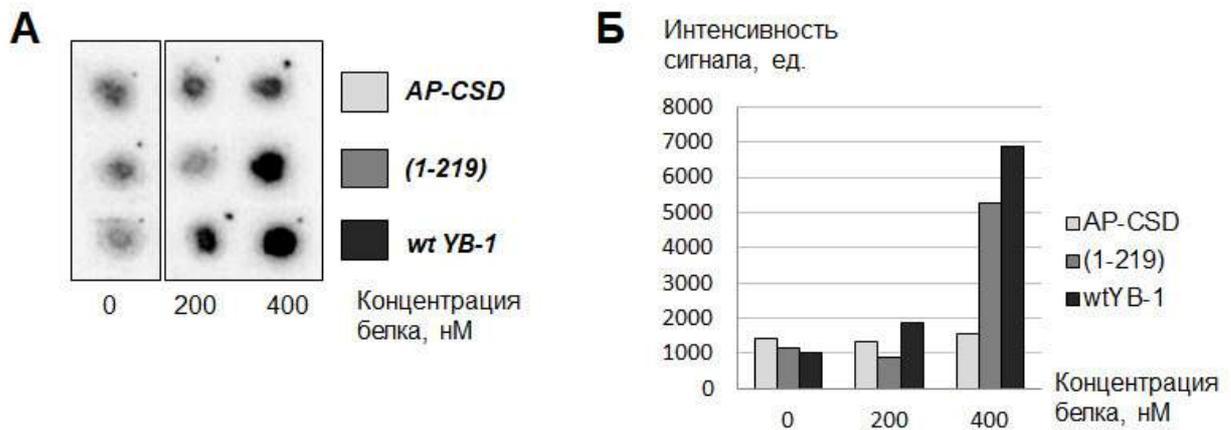


Рис. 37. С-концевой домен YB-1 необходим для стимуляции активности PARP1 этим белком. А. Радиоавтографы ТХУ-мишеней, на которых производили остановку реакций поли(АДФ-рибозил)ирования PARP1, выполненных в присутствии 10 мМ ЭДТА и 0-400 нМ различных мутантных форм YB-1. Эксперименты были выполнены и проанализированы параллельно. Б. Диаграмма, иллюстрирующая выход реакции поли(АДФ-рибозил)ирования, выполненной в присутствии различных концентраций мутантных форм YB-1. Построение диаграммы производили по данным эксперимента (А).

Следует отметить, что свойства ядерной формы YB-1 и в других аспектах процесса поли(АДФ-рибозил)ирования аналогичны свойствам полноразмерного белка, так как YB-1(1-219) физически взаимодействует с PARP1, в том числе, в присутствии ДНК (раздел 3.1.1), поли(АДФ-рибозил)ируется и стимулирует активность PARP1 (рис. 38А), а также способен связывать поли(АДФ-рибозу) (рис. 38Б, дор. 3). Напротив, мутант YB-1, полностью лишённый CTD (AP-CSD), не связывает поли(АДФ-рибозу) (рис. 38Б, дор. 4), не стимулирует активность PARP1 и не является мишенью для модификации (рис. 38В, дор. 4).

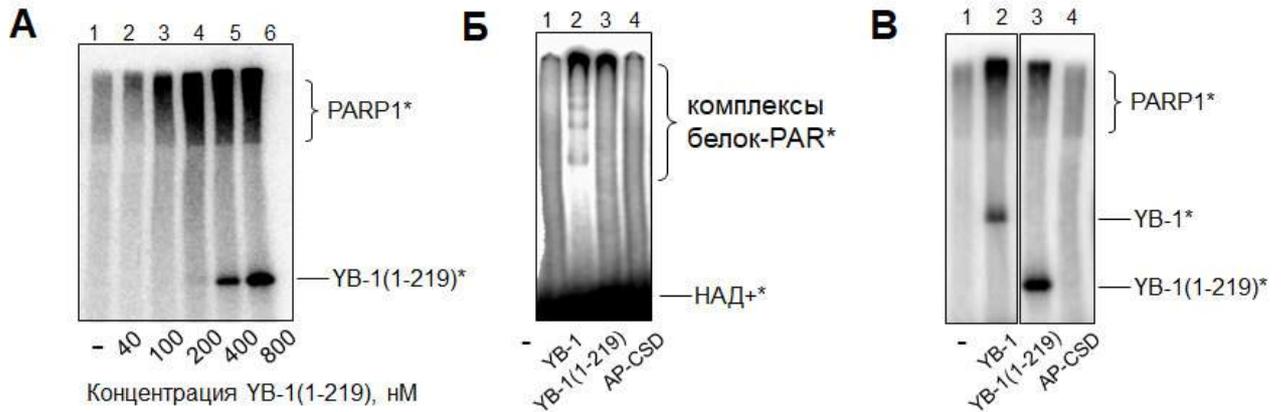


Рис. 38. Сравнение свойств мутантных форм YB-1 в процессе поли(АДФ-рибозил)ирования. А. YB-1(1-219) стимулирует активность PARP1 и является мишенью поли(АДФ-рибозил)ирования. Радиоавтограф SDS-ПААГ, в котором проводили разделения продуктов реакции поли(АДФ-рибозил)ирования, выполненной с использованием НАД⁺, содержащего радиоактивную метку. Б. Сравнение YB-1(1-219) и AP-CSD в отношении способности связывать поли(АДФ-рибозу). Радиоавтограф нативного ПААГ, в котором проводили разделения продуктов реакции связывания несущей радиоактивную метку поли(АДФ-рибозу) (PAR*) полноразмерной и ядерной формами белка YB-1. PAR* был приготовлен согласно 2.2.19. 1 – свободный PAR*; 2 – PAR* + 400 нМ YB-1; 3 – PAR* + 400 нМ YB-1(1-219); 4 – PAR* + 400 нМ AP-CSD. В. AP-CSD не стимулирует активность PARP1 и не является мишенью для модификации. Радиоавтограф SDS-ПААГ, в котором проводили разделения продуктов реакции поли(АДФ-рибозил)ирования, выполненной с использованием НАД⁺, содержащего радиоактивную метку. Реакции проводили: 1 – в отсутствие YB-1; 2 – в присутствии 600 нМ YB-1; 3 – в присутствии 1.2 μМ YB-1(1-219); 4 – в присутствии 1.2 μМ AP-CSD.

3.2.2.3.2. YB-1 стимулирует активность PARP1 в присутствии ингибиторов PARP1

Большинство стратегий противоопухолевой терапии нацелены на повреждение ДНК раковых клеток. Наибольшая эффективность терапии достигается за счёт комбинации ДНК-повреждающих агентов и ингибиторов ферментов репарации ДНК в клетках опухоли [4]. PARP1, обеспечивающий многоуровневую регуляцию репарации ДНК, является одной из наиболее перспективных мишеней [418]. Кроме того, в силу мультифункциональной роли

PARP1 в организме [419], ингибиторы этого фермента альтернативно могут быть использованы для терапии заболеваний не онкологической природы [420].

Первыми разработанными ингибиторами PARP1 были конкурентные аналоги НАД⁺, в частности, 3-аминобензамид (рис. 39) [421]. Относительно высокая величина IC₅₀ (~10 μM) [421] делает этот ингибитор мало пригодным для клинического использования. В настоящее время в противоопухолевой терапии преимущественно применяют *олапариб* и его аналоги. Долгое время рассматривался следующий механизм действия олапариба: с одной стороны, олапариб является конкурентным ингибитором PARP1, так как содержит никотинамидный фармакофор в своей структуре (рис. 39). С другой стороны, было показано, что олапариб препятствует диссоциации PARP1 из комплекса с повреждённой ДНК (*allosteric PARP1 trapping*), тем самым блокируя инициацию репарации ДНК [422]. Однако недавние исследования показали, что наблюдаемая задержка PARP1 на ДНК обусловлена ингибированием каталитической активности этого фермента [423].

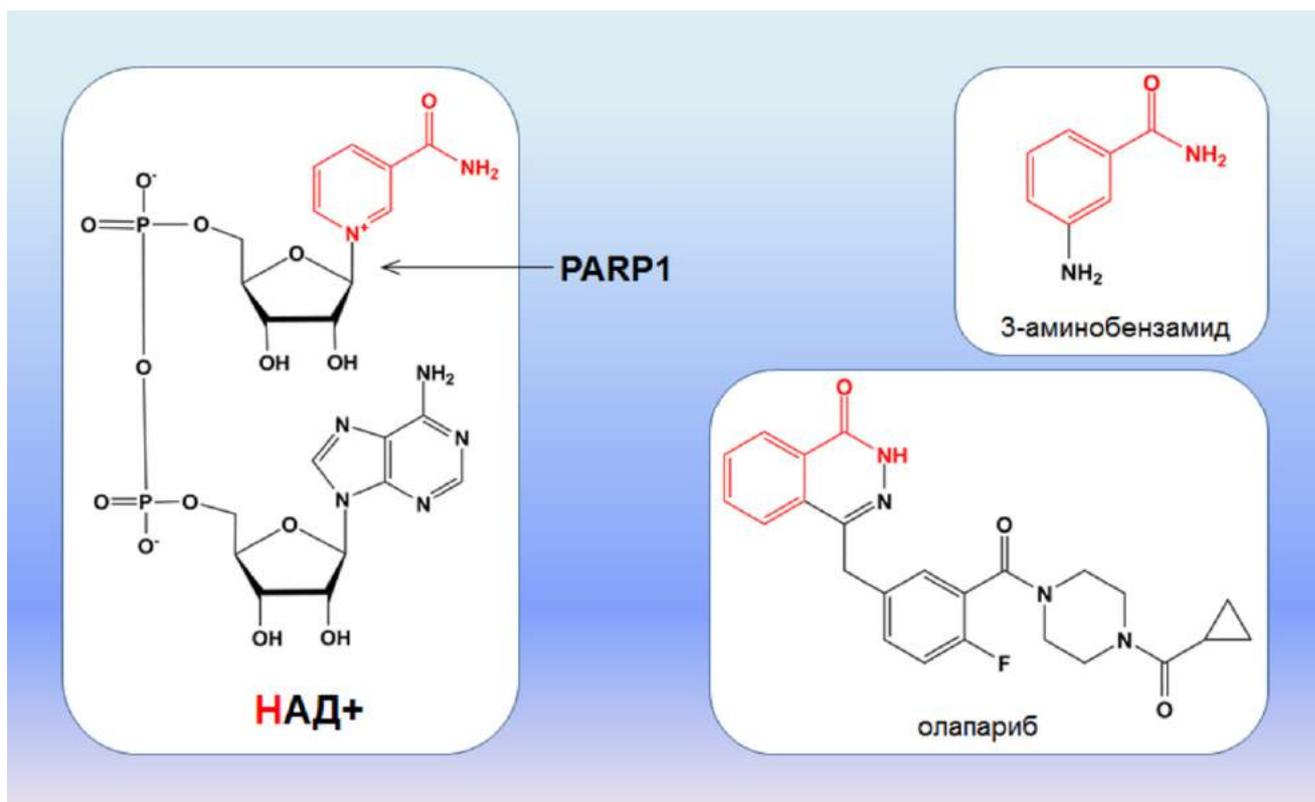


Рис. 39. Структуры НАД⁺ и его аналогов – ингибиторов PARP1. Никотинамид в составе НАД⁺ и никотинамидные фармакофоры в структуре ингибиторов выделены красным цветом.

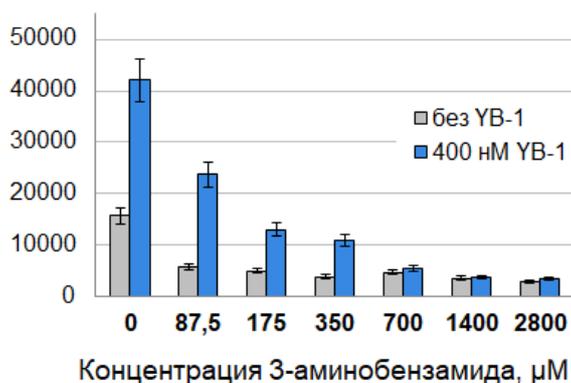
Наконец, для повышения эффективности терапии онкозаболеваний классическими ингибиторами PARP1, был предложен ещё один класс веществ – так называемые *лиганды, связывающие малую бороздку ДНК (minor groove binding ligands, MGBLs)* / небольшие ДНК-

связывающие молекулы (такие как бромистый этидий). Интеркалируя в ДНК, эти агенты нарушают связывание с ней PARP1, тем самым препятствуя активации фермента [424].

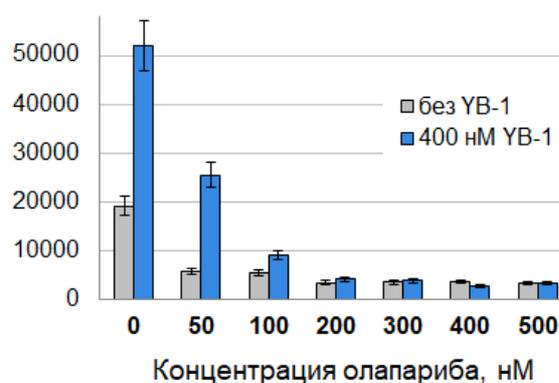
К сожалению, несмотря на появление новых препаратов, нацеленных на подавление активности PARP1, в настоящий момент остаётся нерешённой проблема развития резистентности раковых клеток к действию терапевтических агентов [418]. Возможные механизмы возникновения устойчивости клеток опухоли к ингибиторам PARP1 и способы её преодоления активно исследуются [425].

Мы показали, что YB-1 способен поддерживать относительно высокие уровни поли(АДФ-рибозил)ирования в реакционных смесях, содержащих низкие концентрации ингибиторов PARP1 различной природы – конкурентных (0-350 μM 3-аминобензамида, рис. 40А и 0-100 нМ олапариба, рис. 40Б), а также малых ДНК-связывающих молекул (0-50 мг/л EtBr, рис. 40В). 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 ингибиторов PARP1 ($\geq 350 \mu\text{M}$ 3-аминобензамида, рис. 40А; $\geq 100 \text{ нМ}$ олапариба, рис. 40Б; $\geq 200 \text{ мг/л}$ EtBr, рис. 40В).

А Интенсивность сигнала, ед.



Б Интенсивность сигнала, ед.



В Интенсивность сигнала, ед.

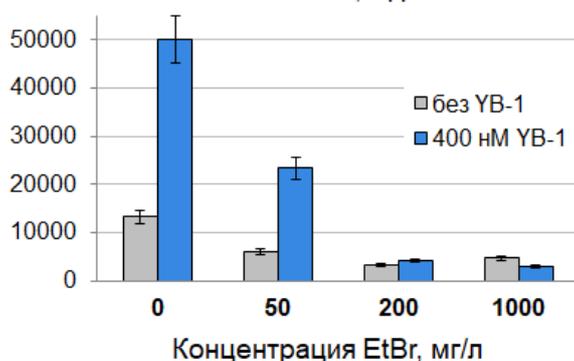


Рис. 40. YB-1 стимулирует активность PARP1 в присутствии ингибиторов PARP1: 3-аминобензамида (А), олапариба (Б) и бромистого этидия (EtBr) (В). Представлены диаграммы, построенные по данным

анализа радиоавтографов ТХУ-фильтров, на которых проводили остановку реакций поли(АДФ-рибозил)ирования PARP1. Реакционные смеси содержали 100 нМ Nick, 100 нМ PARP1, 0 или 400 нМ YB-1, 5 mM MgCl₂, 2 μM содержащий радиоактивную метку НАД⁺ и ингибитор PARP1 в варьирующей концентрации. Приведены планки погрешностей с указанием относительных ошибок 10%.

Полученные результаты представляют особый интерес, поскольку они впервые иллюстрируют взаимосвязь некоторых феноменов, исследованных ранее. Нарушение регуляции PARP1 с повышенной активностью этого фермента и увеличенным содержанием в клетках поли(АДФ-рибозил)ированных белков наблюдалось в клетках, устойчивых к цисплатине [426]. Несмотря на то, что молекулярные механизмы, лежащие в основе повышенной активности PARP1 в цисплатина-резистентных клетках оставались неизвестными [427], было показано, что применение олапариба способствует увеличению чувствительности раковых клеток к воздействию этого генотоксического агента [426]. Интересно, что также была установлена повышенная чувствительность к цисплатине у клеточных линий, несущих только один из аллелей гена *YB-1* (*YB-1*^{+/-}), по сравнению с клетками *YB-1*^{+/+} [356]. На основании полученных данных, можно предположить, что повышенная активность PARP1 в клетках, устойчивых к действию цисплатины, может быть связана с влиянием онкобелка YB-1, стимулирующего PARP1. В этом случае эффективное применение ингибиторов PARP1 [426] согласуется с нашими результатами, полученными для высоких концентраций ингибиторов (Рис. 40, ≥ 350 μM 3-аминобензамид, ≥ 100 нМ олапариб, ≥ 200 мг/л EtBr).

Несмотря на распространённое представление о том, что сверхэкспрессия / повышенная активность белка-мишени в большинстве случаев коррелирует с чувствительностью, а не резистентностью клеток к конкретному препарату, существует несколько примеров обратного [428]. В частности, Gilabert с соавт. наблюдали устойчивость к олапарибу у линии клеток, отличавшихся наиболее высоким уровнем сверхэкспрессии PARP1 [428]. Для объяснения данного феномена, авторы предположили, что повышенная активность PARP1 может способствовать более эффективной репарации ДНК, и следовательно – обеспечивать бóльшую устойчивость к ДНК-повреждающим агентам, включая олапариб [428]. По мнению авторов, для эффективного ингибирования сверхэкспрессированного белка-мишени в таких случаях необходимы более высокие концентрации лекарственного препарата [428]. Действительно, в соответствии с нашими данными, YB-1 способен понижать эффективность действия ингибиторов PARP1, использованных в концентрациях, недостаточных для полного ингибирования каталитической функции PARP1 (0-87.5 μM 3-аминобензамид, 0-150 нМ олапариб, 0-125 мг/л EtBr, рис. 40).

На основании результатов, полученных в настоящей главе, 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. 41).

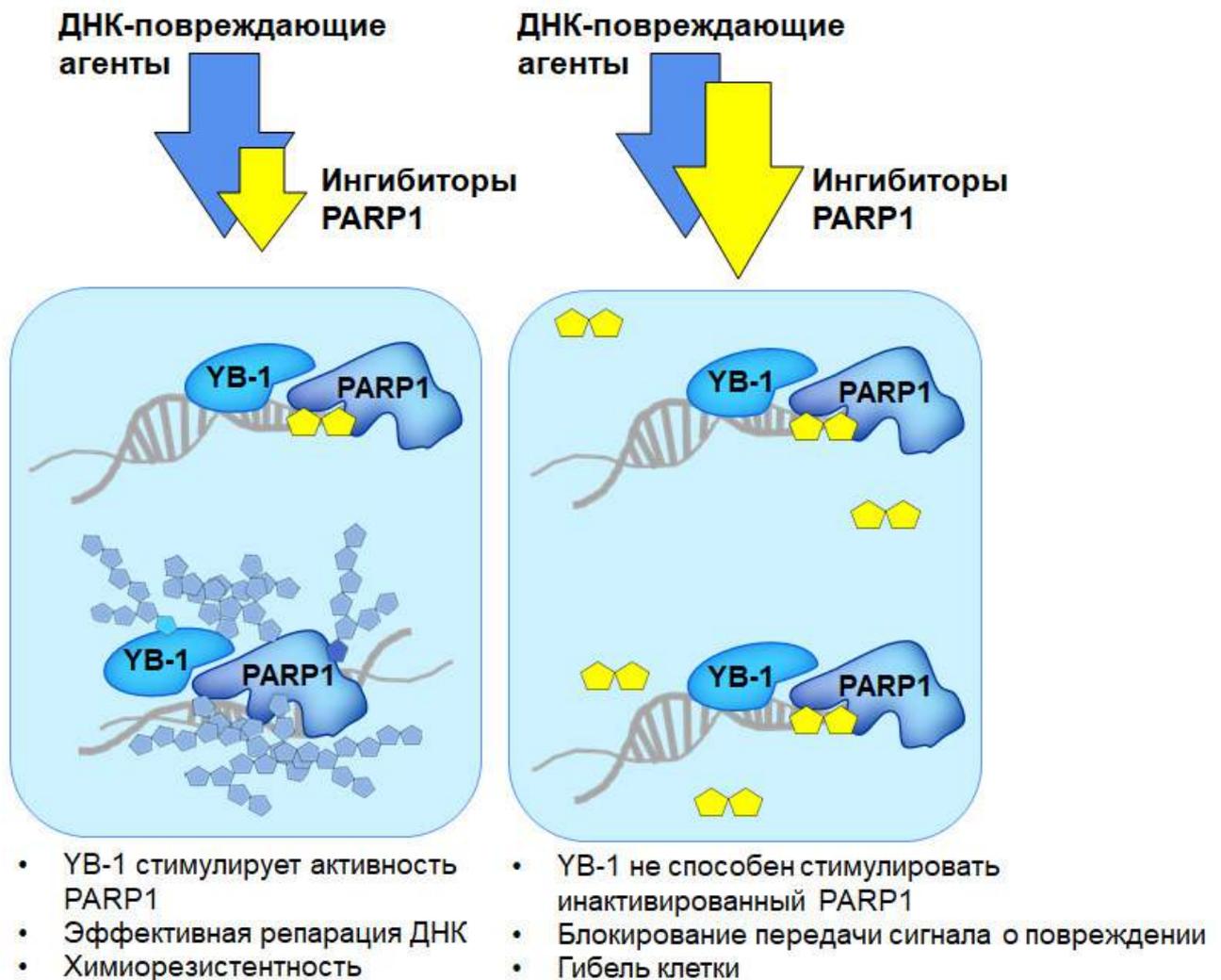


Рис. 41. Применение ингибиторов PARP1 в терапии опухолей, сверхэкспрессирующих YB-1 (схема).

3.2.2.3.3. Роль связывания YB-1 с поли(АДФ-рибозой) в стимуляции PARP1

В предисловии к разделу 3.2.2.3. мы обсуждали гипотезу о том, что возможная роль эффекторов PARP1 в реакции поли(АДФ-рибозил)ирования заключается в стабилизации каталитически активного комплекса PARP1 с повреждённой ДНК. Можно предположить, что ковалентного присоединения даже коротких цепей поли(АДФ-рибозы) к белку PARP1 в ходе аутомодификации достаточно для его диссоциации из комплекса с ДНК под действием

электростатического отталкивания одноимённо заряженных полимеров ДНК и PAR. Положительно заряженные молекулы (Ca^{2+} - и Mg^{2+} -ионы, полиамины [414], белки с высокой рI, например, гистоны [264,414-416]) или ДНК- и PAR-связывающие белки, такие как ХРА [417], позволяют модифицированному PARP1 дольше пребывать в активном, связанном с ДНК состоянии, увеличивая продолжительность периода «элонгации». Действительно, согласно литературным данным, гистоны увеличивают среднюю длину полимеров PAR, синтезируемых PARP1 [429].

Можно предположить, что если эта гипотеза верна, то белок YB-1, добавленный после выхода на плато реакции автоPARилирования PARP1, будет стимулировать повторное связывание PARP1* с ДНК, вызывая частичную «реактивацию» фермента с генерацией дополнительного количества PAR. Для проверки этого предположения, мы провели реакцию автомодификации PARP1 в условиях отсутствия катионов магния (10 мМ ЭДТА) и белков-эффекторов 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 1x 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 наблюдалась «реактивация» PARP1, отсутствующая в контроле (рис. 42А). Связывание YB-1 с PARP1* и ДНК с последующей «реактивацией» процесса поли(АДФ-рибозил)ирования также можно детектировать в режиме реального времени с использованием метода флуоресцентной спектроскопии (рис. 42Б).

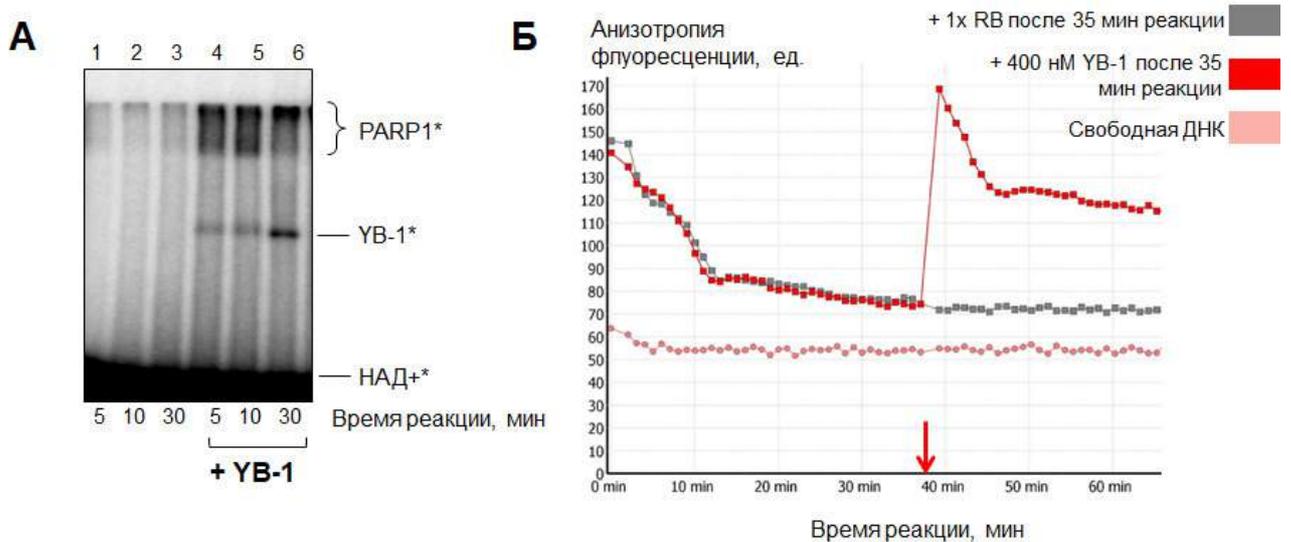


Рис. 42. «Реактивация» PARP1 белком YB-1. А. Радиоавтограф SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(АДФ-рибозил)ирования. Реакционные смеси содержали 1x RBp1, 10 мМ ЭДТА, 10 нМ Nick, 4 μM содержащий радиоактивную метку НАД⁺ и 200 нМ PARP1. После 20

мин реакции в образцы добавляли либо 1x RBP1 в качестве контроля (дор. 1-3) либо YB-1 до конечной концентрации 400 нМ (дор. 4-6). Затем смеси дополнительно выдерживали 5-30 мин при 37°C. Б. «Реактивация» PARP1 белком YB-1, исследованная в режиме реального времени. Представленные кривые показывают изменения анизотропии флуоресценции Nick, измеренные в режиме кинетического сканирования. Реакционные смеси содержали 1x RBP1, 10 мМ ЭДТА, 10 нМ Nick и 200 нМ PARP. Запуск реакции поли(АДФ-рибозил)ирования осуществляли добавлением немеченого НАД+ до конечной концентрации 500 μМ (в нулевой момент времени). После 35 мин реакции в образцы добавляли либо 1xRBP1 в качестве контроля (серая кривая), либо YB-1 до конечной концентрации 400 нМ (красная кривая). Момент добавления RBP1 / YB-1 показан красной стрелкой. Анизотропии флуоресценции свободного Nick соответствует розовая линия.

Следует отметить, что модификация YB-1 «реактивированным» PARP1 была достаточно слабой (рис. 42А, дор. 4-6), свидетельствуя о том, что для эффективного поли(АДФ-рибозил)ирования YB-1 необходимо его присутствие в изначальном гетеромерном комплексе с PARP1 и ДНК на этапе инициации. В данном же эксперименте YB-1 преимущественно связан не с ДНК, а с полимерами PAR, ковалентно присоединёнными к PARP1 (согласно результатам, представленным в разделе 3.2.2.2, рис. 34), и, следовательно, локализован относительно далеко от активного центра фермента. Для дополнительного подтверждения этой гипотезы, мы проверили, будет ли присутствие поли(АДФ-рибозы) на этапе формирования комплекса YB-1 с PARP1 и ДНК приводить к нарушению физических и функциональных взаимодействий этих белков, в частности, понижая уровень модификации YB-1 (см. далее, раздел 3.2.3).

3.2.3. «Элонгация» (поздние этапы) и «терминация»: взаимодействие YB-1 и PARP1 посредством свободного полимера АДФ-рибозы

До сих пор мы исследовали функциональные взаимодействия YB-1 и PARP1 в замкнутой системе, подразумевая возможность вовлечения белка YB-1 в процесс поли(АДФ-рибозил)ирования на начальных этапах. Однако если локальный синтез PAR служит импульсом для релокализации YB-1 к сайту повреждения, в соответствии с гипотезой о возможном привлечении PAR-связывающих белков для участия в репарации ДНК [81,84], то по крайней мере для первого цикла PARилирования следует учитывать влияние PAR, уже синтезированного к моменту взаимодействия YB-1 и PARP1.

3.2.3.1. Поли(АДФ-рибоза) как регулятор функциональных взаимодействий YB-1 и PARP1

Суммарный препарат PAR, свободной от ДНК-кофактора, был получен, как описано в разделе 2.2.19, и добавлен в реакционные смеси, в которых проводили реакции поли(АДФ-

рибозил)ирования PARP1 в отсутствие / в присутствии YB-1 (рис. 44А). Следует отметить, что в этом эксперименте для активации PARP1 мы использовали ДНК в низкой концентрации (10 нМ), чтобы получить высокое соотношение концентраций YB-1:ДНК ($[YB-1] \gg [ДНК]$) и тем самым иметь возможность наблюдать весь спектр регуляции функциональных взаимодействий YB-1 и PARP1 полимером PAR. Как мы показали ранее, при высоком соотношении концентраций YB-1:ДНК белок YB-1 ингибирует активность PARP1, конкурируя с ферментом за ДНК (раздел 3.2.1.3.1). Это ингибирующее действие YB-1 может сниматься с течением времени реакции, если поли(АДФ-рибозил)ирование YB-1 приводит к его диссоциации из комплекса с ДНК (глава 3.2.1.4). В используемых условиях реакции модификация YB-1 была достаточно слабой, указывая на ингибирование активности PARP1 белком YB-1 (рис. 43А, дор. 6).

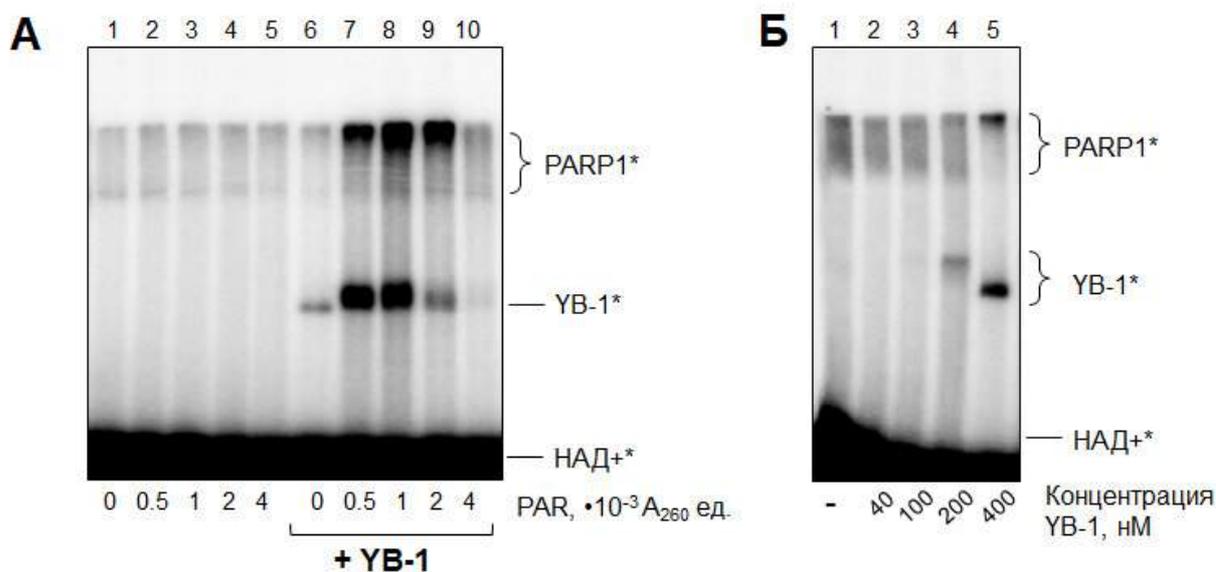


Рис. 43. Поли(АДФ-рибоза) как регулятор взаимодействий YB-1 и PARP1. А. Радиоавтограф SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(АДФ-рибозил)ирования. Реакционные смеси содержали 10 нМ Nick, 200 нМ PARP1, 0 или 400 нМ YB-1, 10 мМ ЭДТА, 4 μ М содержащий радиоактивную метку НАД⁺ и 0-0.004 A_{260} ед./мл PAR, приготовленного согласно 2.2.19. Реакции проводили в течение 10 мин при 37°C. Б. Радиоавтограф SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(АДФ-рибозил)ирования. Реакционные смеси содержали 10 нМ Nick, 200 нМ PARP1, 0-400 нМ YB-1, 10 мМ ЭДТА и 4 μ М содержащий радиоактивную метку НАД⁺. Реакции проводили в течение 10 мин при 37°C.

Принимая во внимание более высокое сродство YB-1 к поли(АДФ-рибозе) по сравнению с ДНК (раздел 3.2.2.1), мы предположили, что при добавлении в реакционную смесь свободных полимеров PAR мы будем наблюдать эффекты, связанные с регуляцией числа молекул YB-1, вовлеченных в реакцию. Действительно, в присутствии небольших концентраций поли(АДФ-

рибозы) мы детектировали усиление функциональных взаимодействий белков YB-1 и PARP1 – модификации YB-1 ферментом PARP1 и YB-1-опосредованной стимуляции активности PARP1 (рис. 43А, дор. 7, 8) – что можно объяснить удалением из реакции избыточных молекул YB-1, ингибирующих активность PARP1.

Напротив, присутствие высокой концентрации PAR приводило к нарушению функциональных взаимодействий белков, как было предположено ранее (раздел 3.2.2.3.3). При этом наблюдалось исчезновение радиоактивной полосы, соответствующей модифицированному YB-1 (рис. 43А, дор. 10).

Логично предположить, что если роль PAR действительно заключается только в оптимизации стехиометрии комплексов YB-1-PARP1-ДНК за счёт связывания избыточных молекул YB-1, то сходное с рис. 43А (дор. 6-8) изменение профиля функциональных взаимодействий белков должно наблюдаться и без добавления поли(АДФ-рибозы) при понижении концентрации YB-1 в реакционной смеси. Однако это не так (рис. 44Б). Следует отметить также то, что сама по себе поли(АДФ-рибоза) не влияет на активность PARP1 в отсутствие YB-1 (рис. 43А, дор. 1-5). Таким образом, мы обнаружили, что молекула PAR способна регулировать взаимодействия белков YB-1 и PARP1. При этом ни белок YB-1, ни свободные цепи PAR, *но их синергичное действие* приводит к стимуляции активности PARP1. Данный феномен не противоречит ранее полученным результатам (раздел 3.2.2.3), поскольку *эндогенная* поли(АДФ-рибоза) как продукт каталитической активности PARP1 всегда присутствует в реакции поли(АДФ-рибозил)ирования. В этом смысле, стимуляцию активности PARP1 белком YB-1 в ходе «элонгации», подробно исследованную в пункте 3.2.2.3.3, можно рассматривать как частный случай стимуляции PARP1 парой YB-1 + PAR. Интересным следствием этого гипотетического механизма является следующее заключение: *в присутствии PAR-зависимых эффекторов реакция поли(АДФ-рибозил)ирования может рассматриваться как автокаталитический процесс.*

В качестве потенциального механизма данного явления можно предположить, что поли(АДФ-рибоза) и YB-1 способны формировать мультимолекулярные ансамбли, включающие PARP1 и повреждённую ДНК, сходным образом с процессом компартментализации нуклеоплазмы без участия мембран, движущей силой которого являются PAR и IDP [23]. Ранее была выдвинута идея, что PAR может действовать как «молекулярный клей», увеличивающий время пребывания белков и интенсивность взаимодействий в динамических комплексах [256]. Согласно литературным данным, белок YB-1 не только обладает неупорядоченной структурой [306], но и может способствовать сборке надмолекулярных ансамблей, включающих нуклеиновые кислоты [294,430]. Так, YB-1 является одним из мажорных компонентов РНК-гранул [294] и, как это было показано методом атомно-

силовой микроскопии, может индуцировать объединение и параллельную укладку двух взаимодействующих молекул ДНК в точке перекреста [314].

Таким образом, в настоящем разделе мы рассмотрели роль YB-1 на этапе «элонгации» процесса поли(АДФ-рибозил)ирования в общем случае, т. е. когда продукт реакции – поли(АДФ-рибоза) – существует не только в связанном с PARP1 состоянии, но и в свободной форме / на других акцепторах. Накопление высоких концентраций PAR может рассматриваться как этап «терминации» реакции, при этом эффективность катализа (синтеза PAR) значительно понижается ввиду разобщения фермента (PARP1) и эффектора (YB-1) продуктом реакции. В этом смысле, *в присутствии PAR-зависимых эффекторов реакция поли(АДФ-рибозил)ирования является не только автокаталитическим процессом, но и регулируется по принципу обратной связи, то есть при накоплении большого количества продукта реакции происходит торможение его синтеза.* Окончательная «терминация» реакции наступает в результате действия фермента PARG, который возвращает комплекс белков и ДНК к исходному состоянию.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в настоящей работе, позволили идентифицировать Y-боксы-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 белков этих классов 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, обеспечивающей координацию и регуляцию функций узкоспециализированных ферментов, имеющих упорядоченную структуру. Множественные взаимодействия YB-1 с факторами BER, детектированные в настоящей работе, являются характерными для структурно неупорядоченных белков. В связи с установленной ролью IDPR ферментов репарации ДНК в формировании репарационных ансамблей [370], можно предположить, что YB-1 как вспомогательный белок может служить для стабилизации 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 его от деградации ферментом PARG, 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 [211,430], ядрышки [108,431], регуляция топологического статуса ДНК с участием TOPO1 [17,432,433], а также веретено деления [273,434]. 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 pol β) 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 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.

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ

5-foU – 5-формилуридин

8-охоG – 8-оксогуанин

A₂₆₀ ед. – оптическая единица

A/P-домен – N-концевой домен YB-1 (1-51), богатый аланином и пролином

AP-сайт – апуриновый/апиримидиновый сайт

APЕ1 – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 человека

AP-CSD – мутантная форма YB-1, лишённая C-концевого домена

АТР – аденозин-5'-трифосфат

BER – эксцизионная репарация оснований

BSA – бычий сывороточный альбумин

C1 – проксимальная (130-219) часть C-концевого домена YB-1

C2 – дистальная (220-324) часть C-концевого домена YB-1

CRS – сайт удержания в цитоплазме

CSD – домен холодового шока белка YB-1

CTD – C-концевой домен белка YB-1 (аминокислотные остатки 130-324)

dGTP – дезоксигуанозин-5'-трифосфат

dRP – дезоксирибозофосфатная группа

DTT – дитиотреитол

FAM-YB-1 (YB-1(1-219), APЕ1, NΔ35APЕ1) – белок YB-1 (YB-1(1-219), APЕ1, NΔ35APЕ1), несущий флуоресцентную группу (FAM)

FAM-SE – N-гидроксисукцинимидный эфир 5(6)-карбоксифлуоресцеина

FEN1 – флэп-эндонуклеаза 1

Flu-12-dUTP – 5-{3-[6-(карбоксиамидофлуоресцеинил)амидокапромоил]аллил}-2'-дезоксиуридин-5'-трифосфат

Hepes – N-[2-гидроксиэтил]пиперазин-N'-[2-этансульфоновая кислота]

his-tag – гексагистидиновый пептид

hnRNP – гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин

IDP – белок, имеющий неупорядоченную структуру

IDPR – фрагмент белка, имеющий неупорядоченную структуру

K_d – константа диссоциации

LigI – ДНК-лигаза I

LigIIIα – ДНК-лигаза IIIα

LP-BER – «длиннозаплаточный» вариант BER

MDR1 – ген множественной лекарственной устойчивости

MES – 2-(*N*-морфолино)этансульфоновая кислота
 MGBL – лиганд, связывающий малую бороздку ДНК
 MSH2 – MutS гомолог 2
 МУН – человеческий гомолог MutY ДНК-гликозилазы *E. coli*
 NEIL1, 2, 3 – Nei-подобные ДНК-гликозилазы 1, 2, 3
 NER – эксцизионная репарация нуклеотидов
 NLS – сайт ядерной локализации
 NMAT – никотинамид мононуклеотид аденилтрансфераза
 NTH1 – человеческий гомолог эндонуклеазы III *E. coli*
 NΔ35-APC1 – укороченная форма APC1, лишённая 35 аминокислотных остатков с N-конца
 OGG1 – 8-оксогуанин ДНК-гликозилаза человека
 p24 – протеолитический фрагмент PARP1
 PAR – поли(АДФ-рибоза)
 PARG – поли(АДФ-рибоза)-гликогидролаза
 PARP1, 2, 3 – поли(АДФ-рибоза)-полимераза 1, 2, 3
 PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток
 PMSF – фенилметилсульфонилфторид
 PNK – полинуклеотид киназа фага T4
 PNKP – полинуклеотидкиназа/3'-фосфатаза человека
 pol α, β, δ, ε – ДНК-полимераза α, β, δ, ε
 PTM – посттрансляционная модификация белка
 PUA – фосфо-α,β-ненасыщенный альдегидный остаток
 r^2 – коэффициент детерминации
 RA-BER – вариант BER, ассоциированный с репликацией
 RB – рабочий буфер
 RBD – РНК-связывающий домен белка
 RBP – РНК-связывающий белок
 RFC – репликативный фактор C
 RNP-комплекс (гранула) – рибонуклеопротеиновый комплекс (гранула)
 RPA – репликативный белок A
 RRM – РНК-распознающий мотив
 SDS – додецилсульфат натрия
 SMUG1 – урацил-ДНК-гликозилаза, специфичная к одноцепочечной ДНК
 SP-BER – «короткозаплаточный» вариант BER
 SSB – белок, связывающий однострессовую ДНК

TC-NER – вариант NER, сопряжённый с транскрипцией
 TDG – тимин-ДНК-гликозилаза
 TFIIIC – транскрипционный фактор IIC
 TOPO1 – ДНК-топоизомераза 1
 ТопоII β – ДНК-топоизомераза II β
 Tris – трис-гидроксиметил-аминометан
 Ung – урацил-ДНК-гликозилаза *E.coli*
 Ura – урацил
 YB-1 – Y-бокс-связывающий белок 1
 YB-1(1-219) – Y-бокс-связывающий белок 1, укороченный с C-конца (ядерная форма YB-1)
 XPA, C – фактор пигментной ксеродермы комплементарной группы A, C
 XRCC1 – белок, продукт гена группы перекрёстной комплементарности, ответственной за радиочувствительность клеток
 АДФ-рибоза – аденозиндифосфат рибоза
 е.а. – единица активности
 ДНК_{акт.} – активированная ДНК (ДНК, обработанная ДНКазой I)
 дцДНК – двухцепочечная ДНК
 ИХБФМ – Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН
 ЛБХФ – Лаборатория биоорганической химии ферментов
 мРНК – матричная РНК
 НАД⁺ – никотинамидадениндинуклеотид
 оцДНК – одноцепочечная ДНК
 оцРНК – одноцепочечная РНК
 ПААГ – полиакриламидный гель
 пре-мРНК – предшественник мРНК
 ПСА – персульфат аммония
 рДНК – рибосомная ДНК
 рРНК – рибосомная РНК
 ТЕМЕД – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин
 тРНК – транспортная РНК
 ТХУ – трихлоруксусная кислота
 УФ-свет – ультрафиолетовый свет
 ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает искреннюю признательность коллективу лаборатории биоорганической химии ферментов ИХБФМ СО РАН за ценные советы и поддержку во время выполнения представленной работы. Особую благодарность автор выражает Науменко Константину Николаевичу, от начала и до конца разработавшему методику получения основного белка работы, УВ-1, за помощь при освоении техник наработки и выделения белка, а также содействие при выполнении ряда экспериментов. Автор отдельно благодарит д.х.н. Нину Александровну Моор за чуткое руководство при освоении метода получения флуоресцентно меченых белков и исследования белок-белковых взаимодействий, ценные консультации при постановке экспериментов и активное участие при подготовке совместной публикации, текст которой вошёл в настоящую работу. Также отдельная благодарность Кургиной Татьяне Андреевне за совместно проведённые эксперименты по флуоресцентной спектроскопии.

Автор выражает глубокую признательность своему научному руководителю, к.х.н. Пестрякову Павлу Ефимовичу, за обучение всем методикам экспериментальной практики, которыми автор на настоящий момент владеет, поддержку и помощь при освоении навыков осмысления и представления полученных данных.

Особую благодарность автор выражает зав. лаборатории биоорганической химии ферментов и основному научному руководителю, д.х.н. чл.-корр. РАН Лаврик Ольге Ивановне, за всестороннюю поддержку, искреннее внимание к данной работе, активное участие и воодушевляющие консультации при обсуждении полученных результатов и помощь при подготовке всех публикаций автора.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vermeij W. P., Hoeijmakers J. H., Pothof J. Genome Integrity in Aging: Human Syndromes, Mouse Models, and Therapeutic Options // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 2016. – V. 56 – P. 427-445.
2. Swartzlander D. B., Bauer N. C., Corbett A. H., Doetsch P. W. Regulation of base excision repair in eukaryotes by dynamic localization strategies // *Prog Mol Biol Transl Sci.* – 2012. – V. 110 – P. 93-121.
3. Kelley M. R., Kow Y. W., Wilson D. M. 3rd. Disparity between DNA base excision repair in yeast and mammals: translational implications // *Cancer Res.* – 2003. – V. 63 (3) – P. 549-554.
4. Sánchez-Pérez I. DNA repair inhibitors in cancer treatment // *Clin Transl Oncol.* – 2006. – V. 8 (9) – P. 642-646.
5. Bader A. G., Vogt P. K. Inhibition of protein synthesis by Y box-binding protein 1 blocks oncogenic cell transformation // *Mol Cell Biol.* – 2005. – V. 2 (6) – P. 2095-2106.
6. Gunasekaran V. P., Nishi K., Sivakumar D., Sivaraman T., Mathan G. Identification of 2,4-dihydroxy-5-pyrimidinyl imidothiocarbamate as a novel inhibitor to Y box binding protein-1 (YB-1) and its therapeutic actions against breast cancer // *Eur J Pharm Sci.* – 2017. – V. 0987 (17) – P. 30511-30520.
7. Kim E. R., Selyutina A. A., Buldakov I. A., Evdokimova V., Ovchinnikov L. P., Sorokin A. V. The proteolytic YB-1 fragment interacts with DNA repair machinery and enhances survival during DNA damaging stress // *Cell Cycle.* – 2013. – V. 12 (24) – P. 3791-3803.
8. Tanabe Y., Nagatoishi S., Tsumoto K. Thermodynamic characterization of the interaction between the human Y-box binding protein YB-1 and nucleic acids // *Mol Biosyst.* – 2015. – V. 11 (9) – P. 2441-2448.
9. Sorokin A. V., Selyutina A. A., Skabkin M. A., Guryanov S. G., Nazimov I. V., Richard C., Th'ng J., Yau J., Sorensen P. H., Ovchinnikov L. P., Evdokimova V. Proteasome-mediated cleavage of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNA-damage stress response // *EMBO J.* – 2005. – V. 24 (20) – P. 3602-3612.
10. Елисеева И. А., Ким Е. Р., Гурьянов С. Г., Овчинников Л. П., Лябин Д. Н. Y-бок-связывающий белок 1 (YB-1) и его функции // *Успехи биол. хим.* – 2011. – Т. 51 – С. 65-132.
11. Ohga T., Uchiumi T., Makino Y., Koike K., Wada M., Kuwano M., Kohno K. Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene // *J Biol Chem.* – 1998. – V. 273 (11) – P. 5997-6000.
12. Gaudreault I., Guay D., Lebel M. YB-1 promotes strand separation in vitro of duplex DNA containing either mispaired bases or cisplatin modifications, exhibits endonucleolytic activities and binds several DNA repair proteins // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32 (1) – P. 316-327.

13. Sengupta S., Mantha A. K., Mitra S., Bhakat K. K. Human AP endonuclease (APE1/Ref-1) and its acetylation regulate YB-1-p300 recruitment and RNA polymerase II loading in the drug-induced activation of multidrug resistance gene MDR1 // *Oncogene*. – 2011. – V. 30 (4) – P. 482-493.
14. Das S., Chattopadhyay R., Bhakat K. K., Boldogh I., Kohno K., Prasad R., Wilson S. H., Hazra T. K. Stimulation of NEIL2-mediated oxidized base excision repair via YB-1 interaction during oxidative stress // *J Biol Chem*. – 2007. – V. 282 (39) – P. 28474-28484.
15. Marenstein D. R., Ocampo M. T., Chan M. K., Altamirano A., Basu A. K., Boorstein R. J., Cunningham R. P., Teebor G. W. Stimulation of human endonuclease III by Y box-binding protein 1 (DNA-binding protein B). Interaction between a base excision repair enzyme and a transcription factor // *J Biol Chem*. – 2001. V. 276 (24) – P. 21242-21249.
16. Ise T., Nagatani G., Imamura T., Kato K., Takano H., Nomoto M., Izumi H., Ohmori H., Okamoto T., Ohga T., Uchiumi T., Kuwano M., Kohno K. Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen // *Cancer Res*. – 1999. – V. 59 (2) – P. 342-346.
17. Wu Y., Wang K.Y., Li Z., Liu Y.P., Izumi H., Uramoto H., Nakayama Y., Ito K., Kohno K. (2014) Y-box binding protein 1 enhances DNA topoisomerase 1 activity and sensitivity to camptothecin via direct interaction. *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 33, 112.
18. Gagné J. P., Isabelle M., Lo K. S., Bourassa S., Hendzel M. J., Dawson V. L., Dawson T. M., Poirier G. G. Proteome-wide identification of poly(ADP-ribose) binding proteins and poly(ADP-ribose)-associated protein complexes // *Nucleic Acids Res*. – 2008. – V. 36 (22) – P. 6959-6976.
19. Bargou R. C., Jürchott K., Wagener C., Bergmann S., Metzner S., Bommert K., Mapara M. Y., Winzer K. J., Dietel M., Dörken B., Royer H. D. Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression // *Nat Med*. – 1997. – V. 3 (4) – P. 447-450.
20. Dolfini D., Mantovani R. Targeting the Y/CCAAT box in cancer: YB-1 (YBX1) or NF-Y? // *Cell Death Differ*. – 2013. – V. 20 (5) – P. 676-685.
21. To K., Fotovati A., Reipas K. M., Law J. H., Hu K., Wang J., Astanehe A., Davies A. H., Lee L., Stratford A. L., Raouf A., Johnson P., Berquin I. M., Royer H. D., Eaves C. J., Dunn S. E. Y-box binding protein-1 induces the expression of CD44 and CD49f leading to enhanced self-renewal, mammosphere growth, and drug resistance // *Cancer Res*. – 2010. – V. 70 (7) – P. 2840-2851.
22. Tao Z., Gao P., Liu H. W. Studies of the expression of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 in *Saccharomyces cerevisiae* and identification of PARP-1 substrates by yeast proteome microarray screening // *Biochemistry*. – 2009. – V. 48 (49) – P. 11745-11754.

23. Altmeyer M., Neelsen K. J., Teloni F., Pozdnyakova I., Pellegrino S., Grøfte M., Rask M. B., Streicher W., Jungmichel S., Nielsen M. L., Lukas J. Liquid demixing of intrinsically disordered proteins is seeded by poly(ADP-ribose) // *Nat Commun.* – 2015. – V. 6 – 8088.
24. Hegde M. L., Hazra T. K., Mitra S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells // *Cell Res.* – 2008. – V. 18 (1) – P. 27-47.
25. Huffman J. L., Sundheim O., Tainer J. A. DNA base damage recognition and removal: new twists and grooves // *Mutat. Res.* – 2005. – V. 577 (1-2) – P. 55-76.
26. Wallace S. S. DNA glycosylases search for and remove oxidized DNA bases // *Environ Mol Mutagen.* – 2013. – V. 54 (9) – P. 691-704.
27. Yang W. Structure and mechanism for DNA lesion recognition // *Cell Res.* – 2008. V. 18 (1) – P. 184-197.
28. Hitomi K., Iwai S., Tainer J. A. The intricate structural chemistry of base excision repair machinery: implications for DNA damage recognition, removal, and repair // *DNA Repair (Amst.)* – 2007. – V. 6 (4) – P. 410-428.
29. Jacobs A. L., Schär P. DNA glycosylases: in DNA repair and beyond // *Chromosoma.* – 2012. – V. 121 (1) – P. 1-20.
30. McGoldrick J. P., Yeh Y. C., Solomon M., Essigmann J. M., Lu A. L. Characterization of a mammalian homolog of the *Escherichia coli* MutY mismatch repair protein // *Mol Cell Biol.* – 1995. – V. 15 (2) – P. 989-996.
31. McCullough A. K., Dodson M. L., Lloyd R. S. Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures // *Annu Rev Biochem.* – 1999. – V. 68 – P. 255-285.
32. Khodyreva S. N., Lavrik O. I. New Players in Recognition of Intact and Cleaved AP Sites: Implication in DNA Repair in Mammalian Cells // *DNA Repair, selected topics.* – 2011. – Ch. 14 – P. 305-330.
33. McCullough A. K., Dodson M. L., Lloyd R. S. Initiation of base excision repair: glycosylase mechanisms and structures // *Annu Rev Biochem.* – 1999. – V. 68 – P. 255-285.
34. Castillo-Acosta V. M., Ruiz-Pérez L. M., Yang W., González-Pacanowska D., Vidal A. E. Identification of a residue critical for the excision of 3'-blocking ends in apurinic/aprimidinic endonucleases of the Xth family // *Nucl Acids Res.* – 2009. – V. 37 (6) – P. 1829-1842.
35. Ikeda S., Biswas T., Roy R., Izumi T., Boldogh I., Kurosky A., Sarker A. H., Seki S., Mitra S. Purification and characterization of human NTH1, a homolog of *Escherichia coli* endonuclease III. Direct identification of Lys-212 as the active nucleophilic residue // *Biol Chem.* – 1998. – V. 273 – P. 21585-21593.
36. Krokan H. E., Nilsen H. E., Skorpen F., Otherlei M., Slupphaug G. Base excision repair of DNA in mammalian cells // *FEBS Lett.* – 2000. – V. 476 – P. 73-77.

37. Zharkov D. O., Shoham G., Grollman A. P. Structural characterization of the Fpg family of DNA glycosylases // *DNA Repair*. – 2003. – V. 2 – P. 839-862.
38. Takao M., Kanno S., Kobayashi K., Zhang Q. M., Yonei S., van der Horst G. T., Yasui A. A back-up glycosylase in Nth1 knock-out mice is a functional Nei (endonuclease VIII) homologue // *Biol Chem*. 2002. – V. 277 (44) – P. 42205-42213.
39. Habraken Y., Verly W. G. Further purification and characterization of the DNA 3'-phosphatase from rat-liver chromatin which is also a polynucleotide 5'-hydroxyl kinase // *Biochemistry*. – 1988. – V. 171 – P. 59-66.
40. Kubota Y., Nash R. A., Klungland A., Schär P., Barnes D. E., Lindahl T. Reconstitution of DNA base excision-repair with purified human proteins: interaction between DNA polymerase beta and the XRCC1 protein // *EMBO J*. – 1996. – V. 15 (23) – P. 6662-6670.
41. Matsumoto Y., Kim K. Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair // *Science*. – 1995. – V. 269 (5224) – P. 699-702.
42. Frosina G., Fortini P., Rossi O., Carrozzino F., Raspaglio G., Cox L. S., Lane D. P., Abbondandolo A., Dogliotti E. Two pathways for base excision repair in mammalian cells // *J Biol Chem*. – 1996. – V. 271 (16) – P. 9573-9578.
43. Podlutzky A. J., Dianova I. I., Podust V. N., Bohr V. A., Dianov G. L. Human DNA polymerase beta initiates DNA synthesis during long-patch repair of reduced AP sites in DNA // *EMBO J*. – 2001. – V. 20 (6) – P. 1477-1482.
44. Liu Y., Beard W. A., Shock D. D., Prasad R., Hou E. W., Wilson S. H. DNA polymerase beta and flap endonuclease 1 enzymatic specificities sustain DNA synthesis for long patch base excision repair // *J Biol Chem*. – 2005. – V. 280 (5) – P. 3665-3674.
45. Dianov G. L., Hübscher U. Mammalian base excision repair: the forgotten archangel // *Nucleic Acids Res*. – 2013. – V. 41 (6) – P. 3483-3490.
46. Wilson S. H., Kunkel T. A. Passing the baton in base excision repair // *Nat Struct Biol*. – 2000. – V. 7 (3) – P. 176-178.
47. Prasad R., Shock D. D., Beard W. A., Wilson S. H. Substrate channeling in mammalian base excision repair pathways: passing the baton // *J Biol Chem*. – 2010. – V. 285 (52) – P. 40479-40488.
48. Hegde M. L., Izumi T., Mitra S. Oxidized base damage and single-strand break repair in mammalian genomes: role of disordered regions and posttranslational modifications in early enzymes // *Prog Mol Biol Transl Sci*. – 2012. – V. 110 – P. 123-153.
49. Caldecott K. W. XRCC1 and DNA strand break repair // *DNA Repair (Amst)*. – 2003. – V. 2 (9) – P. 955-969.

50. Wiederhold L., Leppard J. B., Kedar P., Karimi-Busheri F., Rasouli-Nia A., Weinfeld M., Tomkinson A. E., Izumi T., Prasad R., Wilson S. H., Mitra S., Hazra T. K. AP endonuclease-independent DNA base excision repair in human cells // *Mol Cell*. – 2004. – V. 15 (2) – P. 209-220.
51. Lonskaya I., Potaman V. N., Shlyakhtenko L. S., Oussatcheva E. A., Lyubchenko Y. L., Soldatenkov V. A. Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by DNA structure-specific binding // *J Biol Chem*. – 2005. – V. 280 (17) – P. 17076-17083.
52. Khodyreva S. N., Prasad R., Ilina E. S., Sukhanova M. V., Kutuzov M. M., Liu Y., Hou E. W., Wilson S. H., Lavrik O. I. Apurinic/aprimidinic (AP) site recognition by the 5'-dRP/AP lyase in poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2010. – V. 107 (51) – P. 22090-22095.
53. Moor N. A., Vasil'eva I. A., Anarbaev R. O., Antson A. A., Lavrik O. I. Quantitative characterization of protein-protein complexes involved in base excision DNA repair // *Nucleic Acids Res*. – 2015. – V. 43 (12) – P. 6009-6022.
54. Reynolds P., Cooper S., Lomax M., O'Neill P. Disruption of PARP1 function inhibits base excision repair of a sub-set of DNA lesions // *Nucleic Acids Res*. – 2015. – V. 43 (8) – P. 4028-4038.
55. Dou H., Mitra S., Hazra T. K. Repair of oxidized bases in DNA bubble structures by human DNA glycosylases NEIL1 and NEIL2 // *J Biol Chem*. – 2003. – V. 278 (50) – P. 49679-49684.
56. Dou H., Theriot C. A., Das A., Hegde M. L., Matsumoto Y., Boldogh I., Hazra T. K., Bhakat K. K., Mitra S. Interaction of the human DNA glycosylase NEIL1 with proliferating cell nuclear antigen. The potential for replication-associated repair of oxidized bases in mammalian genomes // *J Biol Chem*. – 2008. – V. 283 (6) – P. 3130-3140.
57. Meas R., Smerdon M. J. Nucleosomes determine their own patch size in base excision repair // *Sci Rep*. – 2016. – V. 6 – P. 27122.
58. Almeida K. H., Sobol R. W. A unified view of base excision repair: lesion-dependent protein complexes regulated by post-translational modification // *DNA Repair (Amst)* – 2007. – V. 6 (6) – P. 695-711.
59. Hu J., Imam S. Z., Hashiguchi K., de Souza-Pinto N. C., Bohr V. A. Phosphorylation of human oxoguanine DNA glycosylase (α -OGG1) modulates its function // *Nucleic Acids Res*. – 2005. – V. 33 (10) – P. 3271-3282.
60. Lu X., Bocangel D., Nannenga B., Yamaguchi H., Appella E., Donehower L. A. The p53-induced oncogenic phosphatase PPM1D interacts with uracil DNA glycosylase and suppresses base excision repair // *Mol Cell*. – 2004. – V. 15 (4) – P. 621-634.
61. Parker A. R., O'Meally R. N., Sahin F., Su G. H., Racke F. K., Nelson W. G., DeWeese T. L., Eshleman J. R. Defective human MutY phosphorylation exists in colorectal cancer cell lines with wild-type MutY alleles // *J Biol Chem*. – 2003. – V. 278 (48) – P. 47937-47945.

62. Bhakat K. K., Hazra T. K., Mitra S. Acetylation of the human DNA glycosylase NEIL2 and inhibition of its activity // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32 (10) – P. 3033-3039.
63. Hasan S., El-Andaloussi N., Hardeland U., Hassa P. O., Bürki C., Imhof R., Schär P., Hottiger M. O. Acetylation regulates the DNA end-trimming activity of DNA polymerase beta // *Mol Cell.* – 2002. – V. 10 (5) – P. 1213-1222.
64. Luo Y., Ji X., Ling F., Li W., Zhang F., Cao G., Chen J. Impaired DNA repair via the base-excision repair pathway after focal ischemic brain injury: a protein phosphorylation-dependent mechanism reversed by hypothermic neuroprotection // *Front Biosci.* – 2007. – V. 12 – P. 1852-1862.
65. El-Andaloussi N., Valovka T., Toueille M., Steinacher R., Focke F., Gehrig P., Covic M., Hassa P. O., Schär P., Hübscher U., Hottiger M. O. Arginine methylation regulates DNA polymerase beta // *Mol Cell.* – 2006. – V. 22 (1) – P. 51-62.
66. Tini M., Benecke A., Um S. J., Torchia J., Evans R. M., Chambon P. Association of CBP/p300 acetylase and thymine DNA glycosylase links DNA repair and transcription // *Mol Cell.* – 2002. – V. 9 (2) – P. 265-277.
67. Hardeland U., Steinacher R., Jiricny J., Schär P. Modification of the human thymine-DNA glycosylase by ubiquitin-like proteins facilitates enzymatic turnover // *EMBO J.* – 2002. – V. 21 (6) – P. 1456-1464.
68. Bhakat K. K., Mokkalapati S. K., Boldogh I., Hazra T. K., Mitra S. Acetylation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by p300 and its role in 8-oxoguanine repair in vivo // *Mol Cell Biol.* – 2006. – V. 26 (5) – P. 1654-1665.
69. Yamamori T., DeRicco J., Naqvi A., Hoffman T. A., Mattagajasingh I., Kasuno K., Jung S. B., Kim C. S., Irani K. SIRT1 deacetylates APE1 and regulates cellular base excision repair // *Nucleic Acids Res.* – 2010. – V. 38 (3) – P. 832-845.
70. Loizou J. I., El-Khamisy S. F., Zlatanou A., Moore D. J., Chan D. W., Qin J., Sarno S., Meggio F., Pinna L. A., Caldecott K. W. The protein kinase CK2 facilitates repair of chromosomal DNA single-strand breaks // *Cell.* – 2004. – V. 117 (1) – P. 17-28.
71. Ström C. E., Mortusewicz O., Finch D., Parsons J. L., Lagerqvist A., Johansson F., Schultz N., Erixon K., Dianov G. L., Helleday T. CK2 phosphorylation of XRCC1 facilitates dissociation from DNA and single-strand break formation during base excision repair // *DNA Repair (Amst).* – 2011. – V. 10 (9) – P. 961-969.
72. Wei L., Nakajima S., Hsieh C. L., Kanno S., Masutani M., Levine A. S., Yasui A., Lan L. Damage response of XRCC1 at sites of DNA single strand breaks is regulated by phosphorylation and ubiquitylation after degradation of poly(ADP-ribose) // *J Cell Sci.* – 2013. – V. 126 (Pt 19) – P. 4414-4423.

73. Carter R. J., Parsons J. L. Base Excision Repair, a Pathway Regulated by Posttranslational Modifications // *Mol Cell Biol.* – 2016. – V. 36 (10) – P. 1426-1437.
74. Cabelof D. C., Guo Z., Raffoul J. J., Sobol R. W., Wilson S. H., Richardson A., Heydari A. R. Base excision repair deficiency caused by polymerase beta haploinsufficiency: accelerated DNA damage and increased mutational response to carcinogens // *Cancer Res.* – 2003. – V. 63 (18) – P. 5799-5807.
75. Albertella M. R., Lau A., O'Connor M. J. The overexpression of specialized DNA polymerases in cancer // *DNA Repair (Amst)* – 2005. – V. 4 (5) – P. 583-593.
76. Poletto M., Legrand A. J., Fletcher S. C., Dianov G. L. p53 coordinates base excision repair to prevent genomic instability // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44 (7) – P. 3165-3175.
77. Parsons J. L., Tait P. S., Finch D., Dianova I. I., Allinson S. L., Dianov G. L. CHIP-mediated degradation and DNA damage-dependent stabilization regulate base excision repair proteins // *Mol Cell.* – 2008. – V. 29 (4) – P. 477-487.
78. Seet B. T., Dikic I., Zhou M. M., Pawson T. Reading protein modifications with interaction domains // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2006. – V. 7 (7) – P. 473-483.
79. Muthurajan U. M., Hepler M. R., Hieb A. R., Clark N. J., Kramer M., Yao T., Luger K. Automodification switches PARP-1 function from chromatin architectural protein to histone chaperone // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2014. – V. 111 (35) – P. 12752-12757.
80. Gottschalk A. J., Timinszky G., Kong S. E., Jin J., Cai Y., Swanson S. K., Washburn M. P., Florens L., Ladurner A. G., Conaway J. W., Conaway R. C. Poly(ADP-ribosylation) directs recruitment and activation of an ATP-dependent chromatin remodeler // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2009. – V. 106 (33) – P. 13770-13774.
81. Li M., Yu X. Function of BRCA1 in the DNA damage response is mediated by ADP-ribosylation // *Cancer Cell.* – 2013. – V. 23 (5) – P. 693-704.
82. Yoshihara K., Itaya A., Tanaka Y., Ohashi Y., Ito K., Teraoka H., Tsukada K., Matsukage A., Kamiya T. Inhibition of DNA polymerase alpha, DNA polymerase beta, terminal deoxynucleotidyl transferase, and DNA ligase II by poly(ADP-ribosylation) reaction in vitro // *Biochem Biophys Res Commun.* – 1985. – V. 128 (1) – P. 61-67.
83. Pleschke J. M., Kleczkowska H. E., Strohm M., Althaus F. R. Poly(ADP-ribose) binds to specific domains in DNA damage checkpoint proteins // *J Biol Chem.* – 2000. – V. 275 (52) – P. 40974-40980.
84. Rulten S. L., Rotheray A., Green R. L., Grundy G. J., Moore D. A., Gómez-Herreros F., Hafezparast M., Caldecott K. W. PARP-1 dependent recruitment of the amyotrophic lateral sclerosis-associated protein FUS/TLS to sites of oxidative DNA damage // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42 (1) – P. 307-314.

85. Oberoi J., Richards M. W., Crumpler S., Brown N., Blagg J., Bayliss R. Structural basis of poly(ADP-ribose) recognition by the multizinc binding domain of checkpoint with forkhead-associated and RING Domains (CHFR) // *J Biol Chem.* – 2010. – V. 285 (50) – P. 39348-39358.
86. Guettler S., LaRose J., Petsalaki E., Gish G., Scotter A., Pawson T., Rottapel R., Sicheri F. Structural basis and sequence rules for substrate recognition by Tankyrase explain the basis for cherubism disease // *Cell.* – 2011. – V. 147 (6) – P. 1340-1354.
87. Hill J. W., Hazra T. K., Izumi T., Mitra S. Stimulation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by AP-endonuclease: potential coordination of the initial steps in base excision repair // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29 – P. 430-438.
88. Hooten N. N., Kompaniez K., Barnes J., Lohani A., Evans M. K. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) binds to 8-oxoguanine-DNA glycosylase (OGG1) // *J Biol Chem.* – 2011. – V. 286 (52) – P. 44679-44690.
89. Hooten N. N., Fitzpatrick M., Kompaniez K., Jacob K. D., Moore B. R., Nagle J., Barnes J., Lohani A., Evans M. K. Coordination of DNA repair by NEIL1 and PARP-1: a possible link to aging // *Aging (Albany NY).* – 2012. – V. 4 (10) – P. 674-685.
90. Bennett R. A., Wilson D. M. 3rd, Wong D., Demple B. Interaction of human apurinic endonuclease and DNA polymerase beta in the base excision repair pathway // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1997. – V. 94 (14) – P. 7166-7169.
91. Sukhanova M. V., Khodyreva S. N., Lebedeva N. A., Prasad R., Wilson S. H., Lavrik O. I. Human base excision repair enzymes apurinic/apyrimidinic endonuclease1 (APE1), DNA polymerase beta and poly(ADP-ribose) polymerase 1: interplay between strand-displacement DNA synthesis and proofreading exonuclease activity // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33 (4) – P. 1222-1229.
92. Liu Y., Prasad R., Beard W. A., Kedar P. S., Hou E. W., Shock D. D., Wilson S. H. Coordination of steps in single-nucleotide base excision repair mediated by apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 and DNA polymerase beta // *J Biol Chem.* – 2007. – V. 282 (18) – P. 13532-13541.
93. Jiricny J. An APE that proofreads // *Nature.* – 2002. – V. 415 (6872) – P. 593-594.
94. 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. 80-89.
95. Luna L., Rolseth V., Hildrestrand G. A., Otterlei M., Dantzer F., Bjørås M., Seeberg E. Dynamic relocalization of hOGG1 during the cell cycle is disrupted in cells harbouring the hOGG1-Cys326 polymorphic variant // *Nucleic Acids Res.* – 2005. – V. 33 (6) – P. 1813-1824.
96. Morland I., Rolseth V., Luna L., Rognes T., Bjørås M., Seeberg E. Human DNA glycosylases of the bacterial Fpg/MutM superfamily: an alternative pathway for the repair of 8-oxoguanine and other oxidation products in DNA // *Nucleic Acids Res.* – 2002. – V. 30 (22) – P. 4926-4936.

97. Jobert L., Nilsen H. Regulatory mechanisms of RNA function: emerging roles of DNA repair enzymes // *Cell Mol Life Sci.* – 2014. – V. 71 (13) – P. 2451-2465.
98. Xanthoudakis S., Miao G., Wang F., Pan Y. C., Curran T. Redox activation of Fos-Jun DNA binding activity is mediated by a DNA repair enzyme // *EMBO J.* – 1992. – V. 11 (9) – P. 3323-3335.
99. Okazaki T., Chung U., Nishishita T., Ebisu S., Usuda S., Mishiro S., Xanthoudakis S., Igarashi T., Ogata E. A redox factor protein, refl, is involved in negative gene regulation by extracellular calcium // *J Biol Chem.* – 1994. – V. 269 (45) – P. 27855-27862.
100. Barnes T., Kim W. C., Mantha A. K., Kim S.E., Izumi T., Mitra S., Lee C. H. Identification of Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (APE1) as the endoribonuclease that cleaves c-myc mRNA // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – V. 37 (12) – P. 3946-3958.
101. Vascotto C., Fantini D., Romanello M., Cesaratto L., Deganuto M., Leonardi A., Radicella J. P., Kelley M. R., D'Ambrosio C., Scaloni A., Quadrioglio F., Tell G. APE1/Ref-1 interacts with NPM1 within nucleoli and plays a role in the rRNA quality control process // *Mol Cell Biol.* – 2009. – V. 29 (7) – P. 1834-1854.
102. Jobert L., Skjeldam H.K., Dalhus B., Galashevskaya A., Vågbø C. B., Bjørås M., Nilsen H. The human base excision repair enzyme SMUG1 directly interacts with DKC1 and contributes to RNA quality control // *Mol Cell.* – 2013. – V. 49 (2) – P. 339-345.
103. Slattery E., Dignam J. D., Matsui T., Roeder R. G. Purification and analysis of a factor which suppresses nick-induced transcription by RNA polymerase II and its identity with poly(ADP-ribose) polymerase // *J Biol Chem.* – 1983. – V. 258 (9) – P. 5955-5959.
104. Beneke S. Regulation of chromatin structure by poly(ADP-ribosyl)ation // *Front Genet.* – 2012. – V. 3 – 169.
105. Vidaković M., Gluch A., Qiao J., Oumard A., Frisch M., Poznanović G., Bode J. PARP-1 expression in the mouse is controlled by an autoregulatory loop: PARP-1 binding to an upstream S/MAR element and to a novel recognition motif in its promoter suppresses transcription // *J Mol Biol.* – 2009. – V. 388 (4) – P. 730-750.
106. Bock F. J., Todorova T. T., Chang P. RNA regulation by Poly(ADP-ribose) polymerases // *Mol Cell.* – 2015. – V. 58 (6) – P. 959-969.
107. Rancourt A., Satoh M. S. Delocalization of nucleolar poly(ADP-ribose) polymerase-1 to the nucleoplasm and its novel link to cellular sensitivity to DNA damage // *DNA Repair (Amst).* – 2009. – V. 8 (3) – P. 286-297.
108. Boamah E. K., Kotova E., Garabedian M., Jarnik M., Tulin A. V. Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 (PARP-1) Regulates Ribosomal Biogenesis in Drosophila Nucleoli // *PLoS Genet.* – 2012. – V. 8 (1) – e1002442.

109. Kotova E., Jarnik M., Tulin A. V. Poly (ADP-ribose) polymerase 1 is required for protein localization to Cajal body // *PLoS Genet.* – 2009. – V. 5 (2) – e1000387.
110. Guetg C., Scheifele F., Rosenthal F., Hottiger M. O., Santoro R. Inheritance of silent rDNA chromatin is mediated by PARP1 via noncoding RNA // *Mol Cell.* – 2012. – V. 45 (6) – P. 790-800.
111. Di Giammartino D. C., Shi Y., Manley J. L. PARP1 represses PAP and inhibits polyadenylation during heat shock // *Mol Cell.* – 2013. – V. 49 (1) – P. 7-17.
112. Vinciguerra P., Stutz F. mRNA export: an assembly line from genes to nuclear pores // *Curr Opin Cell Biol.* – 2004. – V. 16 (3) – P. 285-292.
113. Ji Y., Tulin A. V. Poly(ADP-ribosyl)ation of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins modulates splicing // *Nucleic Acids Res.* – 2009. – V. 37 (11) – P. 3501-3513.
114. Nunomura A., Moreira P. I., Takeda A., Smith M. A., Perry G. Oxidative RNA damage and neurodegeneration // *Curr Med Chem.* – 2007. – V. 14 (28) – P. 2968-2975.
115. Hofer T., Seo A. Y., Prudencio M., Leeuwenburgh C. A method to determine RNA and DNA oxidation simultaneously by HPLC-ECD: greater RNA than DNA oxidation in rat liver after doxorubicin administration // *Biol Chem.* – 2006. – V. 387 (1) – P. 103-111.
116. Nunomura A., Perry G., Pappolla M. A., Wade R., Hirai K., Chiba S., Smith M. A. RNA oxidation is a prominent feature of vulnerable neurons in Alzheimer's disease // *J Neurosci.* – 1999. – V. 19 (6) – P. 1959-1964.
117. Li Z., Wu J., Deleo C. J. RNA damage and surveillance under oxidative stress // *IUBMB Life.* – 2006. V. 58 (10) – P. 581-588.
118. Simms C. L., Zaher H. S. Quality control of chemically damaged RNA // *Cell Mol Life Sci.* – 2016. – V. 73 (19) – P. 3639-3653.
119. McCulloch S. D., Kunkel T. A. The fidelity of DNA synthesis by eukaryotic replicative and translesion synthesis polymerases // *Cell Res.* – 2008. – V. 18 (1) – P. 148-161.
120. Sydow J. F., Cramer P. RNA polymerase fidelity and transcriptional proofreading // *Curr Opin Struct Biol.* – 2009. – V. 19 (6) – P. 732-739.
121. Pickrell J. K., Pai A. A., Gilad Y., Pritchard J. K. Noisy splicing drives mRNA isoform diversity in human cells // *PLoS Genet.* – 2010. – V. 6 (12) – e1001236.
122. Moura G. R., Carreto L. C., Santos M. A. Genetic code ambiguity: an unexpected source of proteome innovation and phenotypic diversity // *Curr Opin Microbiol.* – 2009. – V. 12 (6) – P. 631-637.
123. Magnuson B., Bedi K., Ljungman M. Genome stability versus transcript diversity // *DNA Repair (Amst).* – 2016. – V. 44 – P. 81-86.
124. Hamma T., Ferré-D'Amaré A. R. Pseudouridine synthases // *Chem Biol.* – 2006. – V. 13 (11) – P. 1125-1135.

125. Schaub M., Keller W. RNA editing by adenosine deaminases generates RNA and protein diversity // *Biochimie*. – 2002. – V. 84 (8) – P. 791-803.
126. Yeo J., Goodman R. A., Schirle N. T., David S. S., Beal P. A. RNA editing changes the lesion specificity for the DNA repair enzyme NEIL1 // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2010. – V. 107 (48) – P. 20715-20719.
127. Phizicky E. M., Alfonzo J. D. Do all modifications benefit all tRNAs? // *FEBS Lett*. – 2010. – V. 584 (2), 265-271.
128. Hou Y. M., Gamper H., Yang W. Post-transcriptional modifications to tRNA--a response to the genetic code degeneracy // *RNA*. – 2015. – V. 21 (4) – P. 642-644.
129. Doma M. K., Parker R. RNA quality control in eukaryotes // *Cell*. – 2007. – V. 131 (4) – P. 660-668.
130. Burroughs A. M., Aravind L. RNA damage in biological conflicts and the diversity of responding RNA repair systems // *Nucleic Acids Res*. – 2016. – V. 44 (18) – P. 8525-8555.
131. Stirpe F., Battelli M. G. Ribosome-inactivating proteins: progress and problems // *Cell Mol Life Sci*. – 2006. – V. 63 (16) – P. 1850-1866.
132. Aas P. A., Otterlei M., Falnes P. O., Vågbø C. B., Skorpen F., Akbari M., Sundheim O., Bjørås M., Slupphaug G., Seeberg E., Krokan H. E. Human and bacterial oxidative demethylases repair alkylation damage in both RNA and DNA // *Nature*. – 2003. – V. 421 (6925) – P. 859-863.
133. He C. Grand challenge commentary: RNA epigenetics? // *Nat Chem Biol*. – 2010. – V. 6 (12) – P. 863-865.
134. Berquist B. R., McNeill D. R., Wilson D. M. 3rd. Characterization of abasic endonuclease activity of human Ape1 on alternative substrates, as well as effects of ATP and sequence context on AP site incision // *J Mol Biol*. – 2008. – V. 379 (1) – P. 17-27.
135. Antoniali G., Lirussi L., Poletto M., Tell G. Emerging roles of the nucleolus in regulating the DNA damage response: the noncanonical DNA repair enzyme APE1/Ref-1 as a paradigmatical example // *Antioxid Redox Signal*. – 2014. – V. 20 (4) – P. 621-639.
136. Hayakawa H., Uchiumi T., Fukuda T., Ashizuka M., Kohno K., Kuwano M., Sekiguchi M. Binding capacity of human YB-1 protein for RNA containing 8-oxoguanine // *Biochemistry*. – 2002. – V. 41 (42) – P. 12739-12744.
137. Vohhodina J., Harkin D. P., Savage K. I. Dual roles of DNA repair enzymes in RNA biology/post-transcriptional control // *Wiley Interdiscip Rev RNA*. – 2016. [Epub ahead of print].
138. Goodwin J. F., Schiewer M. J., Dean J. L., Schrecengost R. S., de Leeuw R., Han S., Ma T., Den R. B., Dicker A. P., Feng F. Y., Knudsen K. E. A hormone-DNA repair circuit governs the response to genotoxic insult // *Cancer Discov*. – 2013. – V. 3 (11) – P. 1254-1271.

139. Fong Y. W., Cattoglio C., Tjian R. The intertwined roles of transcription and repair proteins // *Mol Cell*. – 2013. – V. 52 (3) – P. 291–302.
140. Chen D., Lucey M. J., Phoenix F., Lopez-Garcia J., Hart S. M., Losson R., Buluwela L., Coombes R. C., Chambon P., Schär P., Ali S. T:G mismatch-specific thymine-DNA glycosylase potentiates transcription of estrogen-regulated genes through direct interaction with estrogen receptor alpha // *J Biol Chem*. – 2003. – V. 278 (40) – P. 38586–38592.
141. Shen L., Wu H., Diep D., Yamaguchi S., D'Alessio A. C., Fung H. L., Zhang K., Zhang Y. Genome-wide analysis reveals TET- and TDG-dependent 5-methylcytosine oxidation dynamics // *Cell*. – 2013. – V. 153 (3) – P. 692–706.
142. Cortellino S., Xu J., Sannai M., Moore R., Caretti E., Cigliano A., Le Coz M., Devarajan K., Wessels A., Soprano D., Abramowitz L. K., Bartolomei M. S., Rambow F., Bassi M. R., Bruno T., Fanciulli M., Renner C., Klein-Szanto A. J., Matsumoto Y., Kobi D., Davidson I., Alberti C., Larue L., Bellacosa A. Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair // *Cell*. – 2011. – V. 146 (1) – P. 67–79.
143. Mellon I., Hanawalt P. C. Induction of the *Escherichia coli* lactose operon selectively increases repair of its transcribed DNA strand // *Nature*. – 1989. – V. 342 (6245) – P. 95–98.
144. Khobta A., Epe B. Interactions between DNA damage, repair, and transcription // *Mutat Res*. – 2012. – V. 736 (1-2) – P. 5–14.
145. Adelman K., Lis J. T. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans // *Nat Rev Genet*. – 2012. – V. 13 (10) – P. 720-731.
146. Jonkers I., Lis J. T. Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II // *Nat Rev Mol Cell Biol*. – 2015. – V. 16 (3) – P. 167-177.
147. Perillo B., Ombra M. N., Bertoni A., Cuzzo C., Sacchetti S., Sasso A., Chiariotti L., Malorni A., Abbondanza C., Avvedimento E.V. DNA oxidation as triggered by H3K9me2 demethylation drives estrogen-induced gene expression // *Science*. – 2006. – V. 319 (5860) – P. 202–206.
148. Ju B. G., Lunnyak V. V., Perissi V., Garcia-Bassets I., Rose D. W., Glass C. K., Rosenfeld M. G. A topoisomerase IIbeta-mediated dsDNA break required for regulated transcription // *Science*. – 2006. – V. 312 (5781) – P. 1798–1802.
149. Bunch H., Lawney B. P., Lin Y. F., Asaithamby A., Murshid A., Wang Y. E., Chen B. P., Calderwood S. K. Transcriptional elongation requires DNA break-induced signalling // *Nat Commun*. – 2015. – V. 6 – 10191.
150. Joshi R. S., Piña B., Roca J. Topoisomerase II is required for the production of long Pol II gene transcripts in yeast // *Nucleic Acids Res*. – 2012. – V. 40 (16) – P. 7907-7915.
151. Pedersen J. M., Fredsoe J., Roedgaard M., Andreasen L., Mundbjerg K., Kruhøffer M., Brinch M., Schierup M. H., Bjergbaek L., Andersen A. H. DNA Topoisomerases maintain promoters in a state

- competent for transcriptional activation in *Saccharomyces cerevisiae* // *PLoS Genet.* -2012. – V. 8 (12) – e1003128.
152. Bunch H. Role of genome guardian proteins in transcriptional elongation // *FEBS Lett.* – 2016. – V. 590 (8) – P. 1064-1075.
153. Petesch S. J., Lis J. T. Overcoming the nucleosome barrier during transcript elongation // *Trends Genet.* – 2012. – V. 28 (6) – P. 285-294.
154. Francia S., Michelini F., Saxena A., Tang D., de Hoon M., Anelli V., Mione M., Carninci P., d'Adda di Fagagna F. Site-specific DICER and DROSHA RNA products control the DNA-damage response // *Nature.* – 2012. – V. 488 (7410) – P. 231–235.
155. Talhaoui I., Lebedeva N. A., Zarkovic G., Saint-Pierre C., Kutuzov M. M., Sukhanova M. V., Matkarimov B. T., Gasparutto D., Saparbaev M. K., Lavrik O. I., Ishchenko A. A. Poly(ADP-ribose) polymerases covalently modify strand break termini in DNA fragments in vitro // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44 (19) – P. 9279-9295.
156. Malewicz M., Perlmann T. Function of transcription factors at DNA lesions in DNA repair // *Exp Cell Res.* – 2014. – V. 329 (1) – P. 94–100.
157. Frit P., Kwon K., Coin F., Auriol J., Dubaele S., Salles B., Egly J. M. Transcriptional activators stimulate DNA repair // *Mol Cell.* – 2002. – V. 10 (6) – P. 1391-1401.
158. Tu Y., Tornaletti S., Pfeifer G. P. DNA repair domains within a human gene: selective repair of sequences near the transcription initiation site // *EMBO J.* – 1996. – V. 15 (3) – P. 675-683.
159. Li G. W., Burkhardt D., Gross C., Weissman J. S. Quantifying absolute protein synthesis rates reveals principles underlying allocation of cellular resources // *Cell.* – 2014. – V. 157 (3) – P. 624-635.
160. Keene J. D., Tenenbaum S. A. Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons // *Mol Cell.* – 2002. – V. 9 (6) – P. 1161-1167.
161. Keene J. D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events // *Nat Rev Genet.* – 2007. – V. 8 (7) – P. 533-543.
162. Mitchell S. F., Parker R. Principles and properties of eukaryotic mRNPs // *Mol Cell.* – 2014. – V. 54 (4) – P. 547-558.
163. Nielsen F. C., Hansen H. T., Christiansen J. RNA assemblages orchestrate complex cellular processes // *Bioessays.* – 2016. – V. 38 (7) – P. 674-681.
164. Kato M., Han T. W., Xie S., Shi K., Du X., Wu L. C., Mirzaei H., Goldsmith E. J., Longgood J., Pei J., Grishin N. V., Frantz D. E., Schneider J. W., Chen S., Li L., Sawaya M. R., Eisenberg D., Tycko R., McKnight S. L. Cell-free formation of RNA granules: low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels // *Cell.* – 2012. – V. 149 (4) – P. 753-767.
165. Hyman A. A., Simons K. Cell biology. Beyond oil and water: phase transitions in cells // *Science.* – 2012. – V. 337 (6098) – P. 1047-1049.

166. Weber S. C., Brangwynne C. P. Getting RNA and protein in phase // *Cell*. – 2012. – V. 149 (6) – P. 1188–1191.
167. Uversky V. N., Kuznetsova I. M., Turoverov K. K., Zaslavsky B. Intrinsically disordered proteins as crucial constituents of cellular aqueous two phase systems and coacervates // *FEBS Lett*. – 2015. – V. 589 (1) – P. 15-22.
168. Li P., Banjade S., Cheng H. C., Kim S., Chen B., Guo L., Llaguno M., Hollingsworth J. V., King D. S., Banani S. F., Russo P. S., Jiang Q. X., Nixon B. T., Rosen M. K. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins // *Nature*. – 2012. – V. 483 (7389) – P. 336-340.
169. Aguzzi A., Altmeyer M. Phase Separation: Linking Cellular Compartmentalization to Disease // *Trends Cell Biol*. – 2016. – pii: S0962-8924(16)00043-X.
170. Brangwynne C. P. Phase transitions and size scaling of membrane-less organelles // *J Cell Biol*. – 2013. – V. 203 (6) – P. 875–881.
171. Elbaum-Garfinkle S., Brangwynne C. P. Liquids, Fibers, and Gels: The Many Phases of Neurodegeneration // *Dev Cell*. – 2015. – V. 35 (5) – P. 531-532.
172. Zhang H., Elbaum-Garfinkle S., Langdon E. M., Taylor N., Occhipinti P., Bridges A. A., Brangwynne C. P., Gladfelter A. S. RNA Controls PolyQ Protein Phase Transitions // *Mol Cell*. – 2015. – V. 60 (2) – P. 220-230.
173. Hyman A. A., Weber C. A., Jülicher F. Liquid-liquid phase separation in biology // *Annu Rev Cell Dev Biol*. – 2014. – V. 30 – P. 39-58.
174. Dutertre M., Lambert S., Carreira A., Amor-Gu eret M., Vagner S. DNA damage: RNA-binding proteins protect from near and far // *Trends Biochem Sci*. – 2014. – V. 39 (3) – P. 141-149.
175. Kleiman F. E., Manley J. L. The BARD1–CstF-50 interaction links mRNA 3'-end formation to DNA damage and tumor suppression // *Cell*. – 2001. – V. 104 – P. 743-753.
176. Mirkin N., Fonseca D., Mohammed S., Cevher M. A., Manley J. L., Kleiman F. E. The 3' processing factor CstF functions in the DNA repair response // *Nucleic Acids Res*. – 2008. – V. 36 (6) – P. 1792-1804.
177. Dutertre M., Sanchez G., Barbier J., Corcos L., Auboeuf D. The emerging role of pre-messenger RNA splicing in stress responses: sending alternative messages and silent messengers // *RNA Biol*. – 2011. – V. 8 (5) – P. 740-747.
178. Ip J.Y., Schmidt D., Pan Q., Ramani A. K., Fraser A. G., Odom D. T., Blencowe B. J. Global impact of RNA polymerase II elongation inhibition on alternative splicing regulation // *Genome Res*. – 2011. – V. 21 (3) – P. 390-401.
179. Fan J., Yang X., Wang W., Wood W. H. 3rd, Becker K. G., Gorospe M. Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2002. – V. 99 (16) – P. 10611-10616.

180. Braunstein S., Badura M. L., Xi Q., Formenti S. C., Schneider R. J. Regulation of protein synthesis by ionizing radiation // *Mol Cell Biol.* – 2009. – V. 29 (21) – P. 5645-5656.
181. Kruiswijk F., Yuniati L., Magliozzi R., Low T. Y., Lim R., Bolder R., Mohammed S., Proud C. G., Heck A. J., Pagano M., Guardavaccaro D. Coupled activation and degradation of eEF2K regulates protein synthesis in response to genotoxic stress // *Sci Signal.* – 2012. – V. 5 (227) – ra 40.
182. Powley I. R., Kondrashov A., Young L. A., Dobbyn H. C., Hill K., Cannell I. G., Stoneley M., Kong Y. W., Cotes J. A., Smith G. C., Wek R., Hayes C., Gant T. W., Spriggs K. A., Bushell M., Willis A. E. Translational reprogramming following UVB irradiation is mediated by DNA-PKcs and allows selective recruitment to the polysomes of mRNAs encoding DNA repair enzymes // *Genes Dev.* – 2009. – V. 23 (10) – P. 1207-1220.
183. Mazan-Mamczarz K., Galbán S., López de Silanes I., Martindale J. L., Atasoy U., Keene J. D., Gorospe M. RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2003. – V. 100 (14) – P. 8354-8359.
184. Glorian V., Maillot G., Polès S., Iacovoni J. S., Favre G., Vagner S. HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis // *Cell Death Differ.* – 2011. – V. 18 (11) – P. 1692-1701.
185. Wang W., Furneaux H., Cheng H., Caldwell M. C., Hutter D., Liu Y., Holbrook N., Gorospe M. HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light // *Mol Cell Biol.* – 2000. – V. 20 (3) – P. 760-769.
186. Hung T., Wang Y., Lin M. F., Koegel A. K., Kotake Y., Grant G. D., Horlings H. M., Shah N., Umbricht C., Wang P., Wang Y., Kong B., Langerød A., Børresen-Dale A. L., Kim S. K., van de Vijver M., Sukumar S., Whitfield M. L., Kellis M., Xiong Y., Wong D. J., Chang H. Y. Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters // *Nat Genet.* – 2011. – V. 43 (7) – P. 621-629.
187. Hegde M. L., Banerjee S., Hegde P. M., Bellot L. J., Hazra T. K., Boldogh I., Mitra S. Enhancement of NEIL1 protein-initiated oxidized DNA base excision repair by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (hnRNP-U) via direct interaction // *J Biol Chem.* – 2012. – V. 287 (41) – P. 34202-34211.
188. Anantha R. W., Alcivar A. L., Ma J., Cai H., Simhadri S., Ule J., König J., Xia B. Requirement of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C for BRCA gene expression and homologous recombination // *PLoS One.* – 2013. – V. 8 (4) – e61368.
189. Hong Z., Jiang J., Ma J., Dai S., Xu T., Li H., Yasui A. The role of hnRPU1 involved in DNA damage response is related to PARP1 // *PLoS One.* – 2013. – V. 8 (4) – e60208.
190. Wei W., Ba Z., Gao M., Wu Y., Ma Y., Amiard S., White C. I., Rendtlew Danielsen J. M., Yang Y. G., Qi Y. A role for small RNAs in DNA double-strand break repair // *Cell.* – 2012. – V. 149 (1) – P. 101-112.

191. Azvolinsky A., Giresi P. G., Lieb J. D., Zakian V. A. Highly transcribed RNA polymerase II genes are impediments to replication fork progression in *Saccharomyces cerevisiae* // *Mol Cell*. – 2009. – V. 34 (6) – P. 722-734.
192. Aguilera A., García-Muse T. R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability // *Mol Cell*. – 2012. – V. 46 (2) – P. 115-124.
193. Tuduri S., Crabbé L., Conti C., Tourrière H., Holtgreve-Grez H., Jauch A., Pantesco V., De Vos J., Thomas A., Theillet C., Pommier Y., Tazi J., Coquelle A., Pasero P. Topoisomerase I suppresses genomic instability by preventing interference between replication and transcription // *Nat Cell Biol*. – 2009. – V. 11 (11) – P. 1315-1324.
194. Drolet M. Growth inhibition mediated by excess negative supercoiling: the interplay between transcription elongation, R-loop formation and DNA topology // *Mol Microbiol*. – 2006. – V. 59 – P. 723-730.
195. Bennetzen M. V., Larsen D. H., Bunkenborg J., Bartek J., Lukas J., Andersen J. S. Site-specific phosphorylation dynamics of the nuclear proteome during the DNA damage response // *Mol Cell Proteomics*. – 2010. – V. 9 (6) – P. 1314-1323.
196. Bensimon A., Schmidt A., Ziv Y., Elkon R., Wang S. Y., Chen D. J., Aebersold R., Shiloh Y. ATM-dependent and -independent dynamics of the nuclear phosphoproteome after DNA damage // *Sci Signal*. – 2010. – V. 3 (151) – rs3.
197. Jungmichel S., Rosenthal F., Altmeyer M., Lukas J., Hottiger M. O., Nielsen M. L. Proteome-wide identification of poly(ADP-Ribosyl)ation targets in different genotoxic stress responses // *Mol Cell*. – 2013. – V. 52 (2) – P. 272-285.
198. Beli P., Lukashchuk N., Wagner S. A., Weinert B. T., Olsen J. V., Baskcomb L., Mann M., Jackson S. P., Choudhary C. Proteomic investigations reveal a role for RNA processing factor THRAP3 in the DNA damage response // *Mol Cell*. – 2012. – V. 46 (2) - P. 212-225.
199. Koike K., Uchiumi T., Ohga T., Toh S., Wada M., Kohno K., Kuwano M. Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation. // *FEBS Lett*. – 1997. – V. 417 (3) – P. 390-394.
200. Cammas A., Lewis S. M., Vagner S., Holcik M. Post-transcriptional control of gene expression through subcellular relocalization of mRNA binding proteins // *Biochem Pharmacol*. – 2008. – V. 76 (11) – P. 1395-1403.
201. Lukong K. E., Chang K. W., Khandjian E. W., Richard S. RNA-binding proteins in human genetic disease // *Trends Genet*. – 2008. – V. 24 (8) – P. 416-425.
202. Cooper T. A., Wan L., Dreyfuss G. RNA and disease // *Cell*. – 2009. – V. 136 (4) – P. 777-793.
203. Braunschweig U., Gueroussov S., Plocik A. M., Graveley B. R., Blencowe B. J. Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways // *Cell*. – 2013. – V. 152 (6) – P. 1252-1269.

204. Shi Y., Manley J. L. The end of the message: multiple protein-RNA interactions define the mRNA polyadenylation site // *Genes Dev.* – 2015. – V. 29 (9) – P. 889-897.
205. Ha M., Kim V. N. Regulation of microRNA biogenesis // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2014. – V. 15 (8) – P. 509-524.
206. Rinn J. L. lncRNAs: linking RNA to chromatin // *Cold Spring Harb Perspect Biol.* – 2014. – V. 6 (8).
207. Lasda E., Parker R. Circular RNAs: diversity of form and function // *RNA.* – 2014. – V. 20 (12) – P. 1829-1842.
208. Gerstberger S., Hafner M., Tuschl T. A census of human RNA-binding proteins // *Nat Rev Genet.* – 2014. – V. 15 (12) – P. 829-845.
209. Neelamraju Y., Hashemikhabir S., Janga S. C. The human RBPome: from genes and proteins to human disease // *J Proteomics.* – 2015. – V. 127 (Pt A) – P. 61-70.
210. Lunde B. M., Moore C., Varani G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2007. – V. 8 (6) – P. 479-490.
211. Leung A. K., Vyas S., Rood J. E., Bhutkar A., Sharp P. A., Chang P. Poly(ADP-ribose) regulates stress responses and microRNA activity in the cytoplasm // *Mol Cell.* – 2011. – V. 42 (4) – P. 489-499.
212. Leung A., Todorova T., Ando Y., Chang P. Poly(ADP-ribose) regulates post-transcriptional gene regulation in the cytoplasm // *RNA Biol.* – 2012. – V. 9 (5) – P. 542-548.
213. Wang X., McLachlan J., Zamore P. D., Hall T. M. Modular recognition of RNA by a human pumilio-homology domain // *Cell.* – 2002. – V. 110 (4) – P. 501-512.
214. Cheong C. G., Hall T. M. Engineering RNA sequence specificity of Pumilio repeats // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2006. – V. 103 (37) – P. 13635-13639.
215. Kielkopf C. L., Rodionova N. A., Green M. R., Burley S. K. A novel peptide recognition mode revealed by the X-ray structure of a core U2AF35/U2AF65 heterodimer // *Cell.* – 2001. – V. 106 (5) – P. 595-605.
216. Järvelin A. I., Noerenberg M., Davis I., Castello A. The new (dis)order in RNA regulation // *Cell Commun Signal.* – 2016. – V. 14 – P. 9.
217. Castello A., Fischer B., Eichelbaum K., Horos R., Beckmann B. M., Strein C., Davey N. E., Humphreys D. T., Preiss T., Steinmetz L. M., Krijgsveld J., Hentze M. W. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins // *Cell.* – 2012. – V. 149 (6) – P. 1393-1406.
218. Beckmann B. M., Horos R., Fischer B., Castello A., Eichelbaum K., Alleaume A. M., Schwarzl T., Curk T., Foehr S., Huber W., Krijgsveld J., Hentze M. W. The RNA-binding proteomes from yeast to man harbour conserved enigmRBPs // *Nat Commun.* – 2015. – V. 6 – 10127.
219. Livesay D. R. Protein dynamics: dancing on an ever-changing free energy stage // *Curr Opin Pharmacol.* – 2010. – V. 10 (6) – P. 706-708.

220. Uversky V. N. A protein-chameleon: conformational plasticity of alpha-synuclein, a disordered protein involved in neurodegenerative disorders // *J Biomol Struct Dyn.* – 2003. – V. 21 (2) – P. 211-234.
221. Tsvetkov P., Asher G., Paz A., Reuven N., Sussman J. L., Silman I., Shaul Y. Operational definition of intrinsically unstructured protein sequences based on susceptibility to the 20S proteasome // *Proteins.* – 2008. – V. 70 (4) – P. 1357-1366.
222. Dunker A. K., Uversky V. N. Drugs for 'protein clouds': targeting intrinsically disordered transcription factors // *Curr Opin Pharmacol.* – 2010. – V. 10 (6) – P. 782-788.
223. Uversky V. N. Dancing Protein Clouds: The Strange Biology and Chaotic Physics of Intrinsically Disordered Proteins // *J Biol Chem.* – 2016. – V. 291 (13) – P. 6681-6688.
224. Uversky V. N., Gillespie J. R., Fink A. L. Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? // *Proteins.* – 2000. – V. 41 (3) – P. 415-427.
225. Dunker A. K., Lawson J. D., Brown C. J., Williams R. M., Romero P., Oh J. S., Oldfield C. J., Campen A. M., Ratliff C. M., Hipps K. W., Ausio J., Nissen M. S., Reeves R., Kang C., Kissinger C. R., Bailey R. W., Griswold M. D., Chiu W., Garner E. C., Obradovic Z. Intrinsically disordered protein // *J Mol Graph Model.* – 2001. – V. 19 (1) – P. 26-59.
226. Uversky V. N. What does it mean to be natively unfolded? // *Eur J Biochem.* – 2002. – V. 269 (1) – P. 2-12.
227. Uversky V. N., Li J., Fink A. L. Evidence for a partially-folded intermediate in α -synuclein fibrillation // *J Biol Chem.* – 2001. – V. 276 – P. 10737-10744.
228. Goto Y., Takahashi N., Fink A. L. Mechanism of acid-induced folding of proteins // *Biochemistry.* – 1990. – V. 29 (14) – P. 3480-3488.
229. Fink A. L., Calciano L. J., Goto Y., Kurotsu T., Palleros D. R. Classification of acid denaturation of proteins: intermediates and unfolded states // *Biochemistry.* – 1994. – V. 33 (41) – P. 12504-12511.
230. Uversky V. N., Narizhneva N. V. Effect of natural ligands on the structural properties and conformational stability of proteins // *Biochemistry (Mosc).* – 1998. – V. 63 (4) – P. 420-433.
231. Witze E. S., Old W. M., Resing K. A., Ahn N. G. Mapping protein post-translational modifications with mass spectrometry // *Nat Methods.* – 2007. – V. 4 (10) – P. 798-806.
232. Walsh C. T., Garneau-Tsodikova S., Gatto G. J. Jr. Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications // *Angew Chem Int Ed Engl.* – 2005. – V. 44 (45) – P. 7342-7372.
233. Dunker A. K., Brown C. J., Obradovic Z. Identification and functions of usefully disordered proteins // *Adv Protein Chem.* – 2002. – V. 62 – P. 25-49.

234. Xie H., Vucetic S., Iakoucheva L. M., Oldfield C. J., Dunker A. K., Obradovic Z., Uversky V. N. Functional anthology of intrinsic disorder. 3. Ligands, post-translational modifications, and diseases associated with intrinsically disordered proteins // *J Proteome Res.* – 2007. – V. 6 (5) – P. 1917-1932.
235. Cumberworth A., Lamour G., Babu M. M., Gsponer J. Promiscuity as a functional trait: intrinsically disordered regions as central players of interactomes // *Biochem J.* – 2013. – V. 454 (3) – P. 361-369.
236. Ward J. J., Sodhi J. S., McGuffin L. J., Buxton B. F., Jones D. T. Prediction and functional analysis of native disorder in proteins from the three kingdoms of life // *J Mol Biol.* – 2004. – V. 337 (3) – P. 635-645.
237. Dunker A. K., Cortese M. S., Romero P., Iakoucheva L. M., Uversky V. N. Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks // *FEBS J.* – 2005. – V. 272 (20) – P. 5129-5148.
238. Ekman D., Light S., Björklund A. K., Elofsson A. What properties characterize the hub proteins of the protein-protein interaction network of *Saccharomyces cerevisiae*? // *Genome Biol.* – 2006. – V. 7 (6) – R45.
239. Higurashi M., Ishida T., Kinoshita K. Identification of transient hub proteins and the possible structural basis for their multiple interactions // *Protein Sci.* – 2008. – V. 17 (1) – P. 72-78.
240. Patil A., Kinoshita K., Nakamura H. Domain distribution and intrinsic disorder in hubs in the human protein-protein interaction network // *Protein Sci.* – 2010. – V. 19 (8) – P. 1461-1468.
241. Singh G. P., Ganapathi M., Dash D. Role of intrinsic disorder in transient interactions of hub proteins // *Proteins.* – 2007. – V. 66 (4) – P. 761-765.
242. Trudeau T., Nassar R., Cumberworth A., Wong E. T., Woollard G., Gsponer J. Structure and intrinsic disorder in protein autoinhibition // *Structure.* – 2013. – V. 21 (3) – P. 332-341.
243. Dawicki-McKenna J. M., Langelier M. F., DeNizio J. E., Riccio A. A., Cao C. D., Karch K. R., McCauley M., Steffen J. D., Black B. E., Pascal J. M. PARP-1 Activation Requires Local Unfolding of an Autoinhibitory Domain // *Mol Cell.* – 2015. – V. 60 (5) – P. 755-768.
244. Tapley T. L., Körner J. L., Barge M. T., Hupfeld J., Schauerte J. A., Gafni A., Jakob U., Bardwell J. C. Structural plasticity of an acid-activated chaperone allows promiscuous substrate binding // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2009. – V. 106 (14) – P. 5557-5562.
245. Chakrabortee S., Tripathi R., Watson M., Schierle G. S., Kurniawan D. P., Kaminski C. F., Wise M. J., Tunnaclyffe A. Intrinsically disordered proteins as molecular shields // *Mol Biosyst.* – 2012. – V. 8 (1) – P. 210-219.
246. Buljan M., Chalancon G., Eustermann S., Wagner G. P., Fuxreiter M., Bateman A., Babu M. M. Tissue-specific splicing of disordered segments that embed binding motifs rewires protein interaction networks // *Mol Cell.* – 2012. – V. 46 (6) – P. 871-883.

247. Ellis J. D., Barrios-Rodiles M., Colak R., Irimia M., Kim T., Calarco J. A., Wang X., Pan Q., O'Hanlon D., Kim P. M., Wrana J. L., Blencowe B. J. Tissue-specific alternative splicing remodels protein-protein interaction networks // *Mol Cell*. – 2012. – V. 46 (6) – P. 884-892.
248. Hegde M. L., Hazra T. K., Mitra S. Functions of disordered regions in mammalian early base excision repair proteins // *Cell Mol Life Sci*. – 2010. – V. 67 (21) – P. 3573-3587.
249. Mittag T., Kay L. E., Forman-Kay J. D. Protein dynamics and conformational disorder in molecular recognition // *J Mol Recognit*. – 2010. – V. 23 (2) – P. 105-116.
250. Gunasekaran K., Tsai C. J., Kumar S., Zanuy D., Nussinov R. Extended disordered proteins: targeting function with less scaffold // *Trends Biochem Sci*. – 2003. – V. 28 (2) – P. 81-85.
251. Krueger K. E., Srivastava S. Posttranslational protein modifications: current implications for cancer detection, prevention, and therapeutics // *Mol Cell Proteomics*. – 2006. – V. 5 (10) – P. 1799-1810.
252. Brangwynne C. P., Eckmann C. R., Courson D. S., Rybarska A., Hoege C., Gharakhani J., Jülicher F., Hyman A. A. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation // *Science*. – 2009. – V. 324 (5935) – P. 1729-1732.
253. Brangwynne C. P., Mitchison T. J., Hyman A. A. Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2011. – V. 108 (11) – P. 4334-4339.
254. Han T. W., Kato M., Xie S., Wu L. C., Mirzaei H., Pei J., Chen M., Xie Y., Allen J., Xiao G., McKnight S. L. Cell-free formation of RNA granules: bound RNAs identify features and components of cellular assemblies // *Cell*. – 2012. – V. 149 (4) – P. 768-779.
255. Zwicker D., Decker M., Jaensch S., Hyman A. A., Jülicher F. Centrosomes are autocatalytic droplets of pericentriolar material organized by centrioles // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2014. – V. 111 (26) – P. 2636-2645.
256. Teloni F., Altmeyer M. Readers of poly(ADP-ribose): designed to be fit for purpose // *Nucleic Acids Res*. – 2016. – V. 44 (3) – P. 993-1006.
257. Weber S. C., Brangwynne C. P. Inverse size scaling of the nucleolus by a concentration-dependent phase transition // *Curr Biol*. – 2015. – V. 25 (5) – P. 641-646.
258. Nott T. J., Petsalaki E., Farber P., Jervis D., Fussner E., Plochowitz A., Craggs T. D., Bazett-Jones D. P., Pawson T., Forman-Kay J. D., Baldwin A. J. Phase transition of a disordered nuage protein generates environmentally responsive membraneless organelles // *Mol Cell*. – 2015. – V. 57 (5) – P. 936-947.
259. Shevtsov S. P., Dundr M. Nucleation of nuclear bodies by RNA // *Nat Cell Biol*. – 2011. – V. 13 (2) – P. 167-173.

260. Bürkle A. Poly(ADP-ribose). The most elaborate metabolite of NAD⁺ // FEBS J. – 2005. – V. 272 (18) – P. 4576-4589.
261. D'Annessa I., Coletta A., Desideri A. Geometrical constraints limiting the poly(ADP-ribose) conformation investigated by molecular dynamics simulation // Biopolymers. – 2014. – V. 101 (1) – P. 78-86.
262. Schultheisz H. L., Szymczyna B. R., Williamson J. R. Enzymatic synthesis and structural characterization of ¹³C, ¹⁵N-poly(ADP-ribose) // J Am Chem Soc. – 2009. – V. 131 (40) – P. 14571-14578.
263. Minaga T., Kun E. Spectral analysis of the conformation of polyadenosine diphosphoribose. Evidence indicating secondary structure // J Biol Chem. – 1983. – V. 258 (2) – P. 725-730.
264. Robu M., Shah R. G., Petitelerc N., Brind'Amour J., Kandan-Kulangara F., Shah G. M. Role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in the removal of UV-induced DNA lesions by nucleotide excision repair // Proc Natl Acad Sci USA. – 2013. – V. 110 (5) – P. 1658-1663.
265. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G. G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions // J Biol Chem. – 1999. – V. 342 (Pt 2) – P. 249-268.
266. Wielckens K., George E., Pless T., Hilz H. Stimulation of poly(ADP-ribosyl)ation during Ehrlich ascites tumor cell "starvation" and suppression of concomitant DNA fragmentation by benzamide // J Biol Chem. – 1983. – V. 258 (7) – P. 4098-4104.
267. Kreimeyer A., Wielckens K., Adamietz P., Hilz H. DNA repair-associated ADP-ribosylation in vivo. Modification of histone H1 differs from that of the principal acceptor proteins // J Biol Chem. – 1984. – V. 259 (2) – P. 890-896.
268. Alvarez-Gonzalez R., Althaus F. R. Poly(ADP-ribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA-damaging agents // Mutat Res. – 1989. – V. 218 (2) – P. 67-74.
269. Bock F. J., Chang P. New directions in poly(ADP-ribose) polymerase biology // FEBS J. – 2016. – V. 283 (22) – P. 4017-4031.
270. Hottiger M. O., Hassa P. O., Lüscher B., Schüler H., Koch-Nolte F. Toward a unified nomenclature for mammalian ADP-ribosyltransferases // Trends Biochem Sci. – 2009. – V. 35 (4) – P. 208-219.
271. Beck C., Robert I., Reina-San-Martin B., Schreiber V., Dantzer F. Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3 // Exp Cell Res. – 2014. – V. 329 (1) – P. 18-25.
272. Cook B. D., Dynek J. N., Chang W., Shostak G., Smith S. Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres // Mol Cell Biol. – 2002. – V. 22 (1) – P. 332-342.
273. Chang P., Coughlin M., Mitchison T. J. Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function // Nat Cell Biol. – 2005. – V. 7 (11) – P. 1133-1139.

274. Ozaki Y., Matsui H., Asou H., Nagamachi A., Aki D., Honda H., Yasunaga S., Takihara Y., Yamamoto T., Izumi S., Ohsugi M., Inaba T. Poly-ADP ribosylation of Miki by tankyrase-1 promotes centrosome maturation // *Mol Cell*. – 2012. – V. 47 (5) – P. 694-706.
275. Langelier M. F., Planck J. L., Roy S., Pascal J. M. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosylation) by human PARP-1 // *Science*. – 2012. – V. 336 (6082) – P. 728-732.
276. Daniels C. M., Ong S. E., Leung A. K. The Promise of Proteomics for the Study of ADP-Ribosylation // *Mol Cell*. – 2015. – V. 58 (6) – P. 911-924.
277. Altmeyer M., Messner S., Hassa P. O., Fey M., Hottiger M. O. Molecular mechanism of poly(ADP-ribosylation) by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites // *Nucleic Acids Res*. – 2009. – V. 37 (11) – P. 3723-3738.
278. Zhang Y., Wang J., Ding M., Yu Y. Site-specific characterization of the Asp- and Glu-ADP-ribosylated proteome // *Nat Methods*. – 2013. – V. 10 (10) – P. 981-984.
279. Hottiger M. O. Nuclear ADP-Ribosylation and Its Role in Chromatin Plasticity, Cell Differentiation, and Epigenetics // *Annu Rev Biochem*. – 2015. – V. 84 – P. 227-263.
280. Krietsch J., Rouleau M., Pic É., Ethier C., Dawson T. M., Dawson V. L., Masson J. Y., Poirier G. G., Gagné J. P. Reprogramming cellular events by poly(ADP-ribose)-binding proteins // *Mol Aspects Med*. – 2013. – V. 34 (6) – P. 1066-1087.
281. Krietsch J., Caron M. C., Gagné J. P., Ethier C., Vignard J., Vincent M., Rouleau M., Hendzel M. J., Poirier G. G., Masson J. Y. PARP activation regulates the RNA-binding protein NONO in the DNA damage response to DNA double-strand breaks // *Nucleic Acids Res*. – 2012. – V. 40 (20) – P. 10287-10301.
282. Zhang F., Shi J., Chen S. H., Bian C., Yu X. The PIN domain of EXO1 recognizes poly(ADP-ribose) in DNA damage response // *Nucleic Acids Res*. – 2015. – V. 43 (22) – P. 10782-10794.
283. Izhar L., Adamson B., Ciccia A., Lewis J., Pontano-Vaites L., Leng Y., Liang A. C., Westbrook T. F., Harper J. W., Elledge S. J. A Systematic Analysis of Factors Localized to Damaged Chromatin Reveals PARP-Dependent Recruitment of Transcription Factors // *Cell Rep*. – 2015. – V. 11 (9) – P. 1486-1500.
284. Isabelle M., Gagné J. P., Gallouzi I. E., Poirier G. G. Quantitative proteomics and dynamic imaging reveal that G3BP-mediated stress granule assembly is poly(ADP-ribose)-dependent following exposure to MNNG-induced DNA alkylation // *J Cell Sci*. – 2012. – V. 125 (Pt 19) – P. 4555-4566.
285. Ji Y., Tulin A. V. Post-transcriptional regulation by poly(ADP-ribosylation) of the RNA-binding proteins // *Int J Mol Sci*. – 2013. – V. 14 (8) – P. 16168-16183.
286. Kraus W. L., Hottiger M. O. PARP-1 and gene regulation: progress and puzzles // *Mol Aspects Med*. – 2013. – V. 34 (6) – P. 1109-1123.

287. Kwon I., Kato M., Xiang S., Wu L., Theodoropoulos P., Mirzaei H., Han T., Xie S., Corden J. L., McKnight S. L. Phosphorylation-regulated binding of RNA polymerase II to fibrous polymers of low-complexity domains // *Cell*. – 2013. – V. 155 (5) – P. 1049-1060.
288. Andrabi S. A., Umanah G. K., Chang C., Stevens D. A., Karuppagounder S. S., Gagné J. P., Poirier G. G., Dawson V. L., Dawson T. M. Poly(ADP-ribose) polymerase-dependent energy depletion occurs through inhibition of glycolysis // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2014. – V. 111 (28) – P. 10209-10214.
289. Barkauskaite E., Jankevicius G., Ahel I. Structures and Mechanisms of Enzymes Employed in the Synthesis and Degradation of PARP-Dependent Protein ADP-Ribosylation // *Mol Cell*. – 2015. – V. 58 (6) – P. 935-946.
290. Barkauskaite E., Brassington A., Tan E. S., Warwicker J., Dunstan M. S., Banos B., Lafite P., Ahel M., Mitchison T. J., Ahel I., Leys D. Visualization of poly(ADP-ribose) bound to PARG reveals inherent balance between exo- and endo-glycohydrolase activities // *Nat Commun*. – 2013. – V. 4 – 2164.
291. Dunstan M. S., Barkauskaite E., Lafite P., Knezevic C. E., Brassington A., Ahel M., Hergenrother P. J., Leys D., Ahel I. Structure and mechanism of a canonical poly(ADP-ribose) glycohydrolase // *Nat Commun*. – 2012. – V. 3 – 878.
292. Jankevicius G., Hassler M., Golia B., Rybin V., Zacharias M., Timinszky G., Ladurner A. G. A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-ribosylation // *Nat Struct Mol Biol*. – 2013. – V. 20 (4) – P. 508-514.
293. Morel C., Kayibanda B., Scherrer K. Proteins associated with globin messenger RNA in avian erythroblasts: Isolation and comparison with the proteins bound to nuclear messenger-like RNA // *FEBS Lett*. – 1971. – V. 18 (1) – P. 84-88.
294. Blobel G. Protein tightly bound to globin mRNA // *Biochem Biophys Res Commun*. – 1972. – V. 47 (1) – P. 88-95.
295. Didier D. K., Schiffenbauer J., Woulfe S. L., Zacheis M., Schwartz B. D. Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex class II Y box // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1982. – V. 85 (19) – P. 7322-7326.
296. Minich W. B., Maidebura I. P., Ovchinnikov L. P. Purification and characterization of the major 50-kDa repressor protein from cytoplasmic mRNP of rabbit reticulocytes // *Eur J Biochem*. – 1993. – V. 212 (3) – P. 633-638.
297. Kloks C. P., Spronk C. A., Lasonder E., Hoffmann A., Vuister G. W., Grzesiek S., Hilbers C. W. The solution structure and DNA-binding properties of the coldshock domain of the human Y-box protein YB-1 // *J Mol Biol*. – 2002. – V. 316 – P. 317-326.

298. Landsman D. RNP-1, an RNA-binding motif is conserved in the DNA-binding cold shock domain // *Nucleic Acids Res.* – 1992. – V. 20 (11) – P. 2861-2864.
299. Tafuri S. R., Wolffe A. P. DNA binding, multimerization, and transcription stimulation by the *Xenopus* Y box proteins in vitro // *New Biol.* – 1992. – V. 4 (4) – P. 349-359.
300. Bouvet P., Matsumoto K., Wolffe A. P. Sequence-specific RNA recognition by the *Xenopus* Y-box proteins. An essential role for the cold shock domain // *J Biol Chem.* – 1995. – V. 270 (47) – P. 28297-28303.
301. Lodomery M., Sommerville J. Binding of Y-box proteins to RNA: involvement of different protein domains // *Nucleic Acids Res.* – 1994. – V. 22 (25) – P. 5582-5589.
302. Petrosian S. A., Makhatadze G. I. Contribution of proton linkage to the thermodynamic stability of the major cold-shock protein of *Escherichia coli* CspA // *Protein Sci.* – 2000. – V. 9 (2) – P. 387-394.
303. Kloks C. P., Tessari M., Vuister G. W., Hilbers C. W. Cold shock domain of the human Y-box protein YB-1. Backbone dynamics and equilibrium between the native state and a partially unfolded state // *Biochemistry.* – 2004. – P. 43 (31) – P. 10237-10246.
304. Guryanov S. G., Filimonov V. V., Timchenko A. A., Melnik B. S., Kihara H., Kutysenko V. P., Ovchinnikov L. P., Semisotnov G. V. The major mRNP protein YB-1: structural and association properties in solution // *Biochim Biophys Acta.* – 2012. – V. 1834 – P. 559-567.
305. Rath A., Davidson A. R., Deber C. M. The structure of «unstructured» regions in peptides and proteins: role of the polyproline II helix in protein folding and recognition // *Biopolymers.* – 2005. – V. 80 – P. 179-185.
306. Lyabin D. N., Eliseeva I. A., Ovchinnikov L. P. YB-1 protein: functions and regulation // *Wiley Interdiscip Rev RNA.* – 2014. – V. 5 (1) – P. 95-110.
307. van Roeyen C. R., Scurt F. G., Brandt S., Kuhl V. A., Martinkus S., Djurdjaj S., Raffetseder U., Royer H. D., Stefanidis I., Dunn S. E., Dooley S., Weng H., Fischer T., Lindquist J. A., Mertens P. R. Cold shock Y-box protein-1 proteolysis autoregulates its transcriptional activities // *Cell Commun Signal.* – 2013. – V. 11 – 63.
308. Mordovkina D. A., Kim E. R., Buldakov I. A., Sorokin A. V., Eliseeva I. A., Lyabin D. N., Ovchinnikov L. P. Transportin-1-dependent YB-1 nuclear import // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2016. – V. 480 (4) – P. 629-634.
309. Izumi H., Imamura T., Nagatani G., Ise T., Murakami T., Uramoto H., Torigoe T., Ishiguchi H., Yoshida Y., Nomoto M., Okamoto T., Uchiumi T., Kuwano M., Funa K., Kohno K. Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'→5' exonuclease activity // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29 (5) – P. 1200-1207.
- 300.

310. Skabkin M. A., Kiselyova O. I., Chernov K. G., Sorokin A. V., Dubrovin E. V., Yaminsky I. V., Vasiliev V. D., Ovchinnikov L. P. Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1 // *Nucleic Acids Res.* – 2004. – V. 32 (18) – P. 5621-5635.
311. Evdokimova V. M., Wei C. L., Sitikov A. S., Simonenko P. N., Lazarev O. A., Vasilenko K. S., Ustinov V. A., Hershey J. W., Ovchinnikov L. P. The major protein of messenger ribonucleoprotein particles in somatic cells is a member of the Y-box binding transcription factor family // *J Biol Chem.* – 1995. – V. 270 (7) – P. 3186-3192.
312. Selivanova O. M., Guryanov S. G., Enin G. A., Skabkin M. A., Ovchinnikov L. P., Serdyuk I. N. YB-1 is capable of forming extended nanofibrils // *Biochemistry (Mosc).* – 2010. – V. 75 (1) – P. 115-120.
313. Guryanov S. G., Selivanova O. M., Nikulin A. D., Enin G. A., Melnik B. S., Kretov D. A., Serdyuk I. N., Ovchinnikov L. P. Formation of amyloid-like fibrils by Y-box binding protein 1 (YB-1) is mediated by its cold shock domain and modulated by disordered terminal domains // *PLoS One.* – 2012. – V. 7 (5) – e36969.
314. Kretov D. A., Curmi P. A., Hamon L., Abrakhi S., Desforges B., Ovchinnikov L. P., Pastré D. mRNA and DNA selection via protein multimerization: YB-1 as a case study // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43 (19) – P. 9457-9473.
315. Okamoto T., Izumi H., Imamura T., Takano H., Ise T., Uchiumi T., Kuwano M., Kohno K. Direct interaction of p53 with the Y-box binding protein, YB-1: a mechanism for regulation of human gene expression // *Oncogene.* – 2000. – V. 19 (54) – P. 6194-6202.
316. Chattopadhyay R., Das S., Maiti A. K., Boldogh I., Xie J., Hazra T. K., Kohno K., Mitra S., Bhakat K. K. Regulatory role of human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in YB-1-mediated activation of the multidrug resistance gene MDR1 // *Mol Cell Biol.* – 2008. – V. 28 (23) – P. 7066-7080.
317. Matsumoto K., Tanaka K. J., Tsujimoto M. An acidic protein, YBAP1, mediates the release of YB-1 from mRNA and relieves the translational repression activity of YB-1 // *Mol Cell Biol.* – 2005. – V. 25 (5) – P. 1779-1792.
318. Tanaka T., Ohashi S., Kobayashi S. Four nucleocytoplasmic-shuttling proteins and p53 interact specifically with the YB-NLS and are involved in anticancer reagent-induced nuclear localization of YB-1 // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2016. – V. 478 (3) – P. 1363-1369.
319. Hasegawa S. L., Doetsch P. W., Hamilton K. K., Martin A. M., Okenquist S. A., Lenz J., Boss J. M. DNA binding properties of YB-1 and dbpA: binding to double-stranded, single-stranded, and abasic site containing DNAs // *Nucleic Acids Res.* – 1991. – V. 19 (18) – P. 4915-4920.
320. En-Nia A., Yilmaz E., Klinge U., Lovett D. H., Stefanidis I., Mertens P. R. Transcription factor YB-1 mediates DNA polymerase alpha gene expression // *J Biol Chem.* – 2005. – V. 280 (9) – P. 7702-7711.

321. Lasham A., Moloney S., Hale T., Homer C., Zhang Y. F., Murison J. G., Braithwaite A. W., Watson J. The Y-box-binding protein, YB1, is a potential negative regulator of the p53 tumor suppressor // *J Biol Chem.* – 2003. – V. 278 (37) – P. 35516-35523.
322. Soop T., Nashchekin D., Zhao J., Sun X., Alzhanova-Ericsson A. T., Björkroth B., Ovchinnikov L., Daneholt B. A p50-like Y-box protein with a putative translational role becomes associated with pre-mRNA concomitant with transcription // *J Cell Sci.* – 2003. – V. 116 (Pt 8) – P. 1493-1503.
323. Evdokimova V. M., Kovrigina E. A., Nashchekin D. V., Davydova E. K., Hershey J. W., Ovchinnikov L. P. The major core protein of messenger ribonucleoprotein particles (p50) promotes initiation of protein biosynthesis in vitro // *J Biol Chem.* – 1998. – V. 273 (6) – P. 3574-3581.
324. Kossinova O. A., Gopanenko A. V., Tamkovich S. N., Krasheninina O. A., Tupikin A. E., Kiseleva E., Yanshina D. D., Malygin A. A., Ven'yaminova A. G., Kabilov M. R., Karpova G. G. Cytosolic YB-1 and NSUN2 are the only proteins recognizing specific motifs present in mRNAs enriched in exosomes // *Biochim Biophys Acta.* – 2017. – V. 1865 (6) – P. 664-673.
325. Yanshina D. D., Kossinova O. A., Gopanenko A. V., Krasheninina O. A., Malygin A. A., Ven'yaminova A. G., Karpova G. G. Structural features of the interaction of the 3'-untranslated region of mRNA containing exosomal RNA-specific motifs with YB-1, a potential mediator of mRNA sorting // *Biochimie.* – 2018. – V. 144 – P. 134-143.
326. Liu T. T., Arango-Argoty G., Li Z., Lin Y., Kim S. W., Dueck A., Ozsolak F., Monaghan A. P., Meister G., DeFranco D. B., John B. Noncoding RNAs that associate with YB-1 alter proliferation in prostate cancer cells // *RNA.* – 2015. – V. 21 (6) – P. 1159-1172.
327. Wu S. L., Fu X., Huang J., Jia T. T., Zong F. Y., Mu S. R., Zhu H., Yan Y., Qiu S., Wu Q., Yan W., Peng Y., Chen J., Hui J. Genome-wide analysis of YB-1-RNA interactions reveals a novel role of YB-1 in miRNA processing in glioblastoma multiforme // *Nucleic Acids Res.* – 2015. – V. 43 (17) – P. 8516-8528.
328. Zasedateleva O. A., Krylov A. S., Prokopenko D. V., Skabkin M. A., Ovchinnikov L. P., Kolchinsky A., Mirzabekov A. D. Specificity of mammalian Y-box binding protein p50 in interaction with ss and ds DNA analyzed with generic oligonucleotide microchip // *Mol Biol.* – 2002. – V. 324 (1) – P. 73-87.
329. Kozlov A. G., Lohman T. M. Adenine base unstacking dominates the observed enthalpy and heat capacity changes for the Escherichia coli SSB tetramer binding to single-stranded oligoadenylates // *Biochemistry.* – 1999. – V. 38 (22) – P. 7388-7397.
330. Gallivan J. P., Dougherty D. A. A Computational Study of Cation- π Interactions vs Salt Bridges in Aqueous Media: Implications for Protein Engineering // *J Am Chem Soc.* – 2000. – V. 122 (5) – P. 870-874.

331. Borozan S. Z., Dimitrijevic B. P., Stojanovic S. D. Cation- π interactions in high resolution protein-RNA complex crystal structures // *Comput Biol Chem.* – 2013. – V. 47 – P. 105-112.
332. Izumi H., Imamura T., Nagatani G., Ise T., Murakami T., Uramoto H., Torigoe T., Ishiguchi H., Yoshida Y., Nomoto M., Okamoto T., Uchiumi T., Kuwano M., Funa K., Kohno K. Y box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'→5' exonuclease activity // *Nucleic Acids Res.* – 2001. – V. 29 (5) – P. 1200-1207.
333. Giorgini F., Davies H. G., Braun R. E. MSY2 and MSY4 bind a conserved sequence in the 3' untranslated region of protamine 1 mRNA in vitro and in vivo // *Mol Cell Biol.* – 2001. – V. 21 (20) – P. 7010-7019.
334. Paranjape S. M., Harris E. Y box-binding protein-1 binds to the dengue virus 3'-untranslated region and mediates antiviral effects // *J Biol Chem.* – 2007. – V. 282 (42) – P. 30497-30508.
335. Skoko N., Baralle M., Buratti E., Baralle F. E. The pathological splicing mutation c.6792C>G in NF1 exon 37 causes a change of tenancy between antagonistic splicing factors // *FEBS Lett.* – 2008. – V. 582 (15) – P. 2231-2236.
336. Skabkin M. A., Evdokimova V., Thomas A. A., Ovchinnikov L. P. The major messenger ribonucleoprotein particle protein p50 (YB-1) promotes nucleic acid strand annealing // *J Biol Chem.* – 2001. – V. 276 (48) – P. 44841-44847.
337. Nekrasov M. P., Ivshina M. P., Chernov K. G., Kovrigina E. A., Evdokimova V. M., Thomas A. A., Hershey J. W., Ovchinnikov L. P. The mRNA-binding protein YB-1 (p50) prevents association of the eukaryotic initiation factor eIF4G with mRNA and inhibits protein synthesis at the initiation stage // *J Biol Chem.* – 2003. – V. 278 (16) – P. 13936-13943.
338. Skabkina O. V., Lyabin D. N., Skabkin M. A., Ovchinnikov L. P. YB-1 autoregulates translation of its own mRNA at or prior to the step of 40S ribosomal subunit joining // *Mol Cell Biol.* – 2005. – V. 25 (8) – P. 3317-3323.
339. Schwartz J. C., Wang X., Podell E. R., Cech T. R. RNA seeds higher-order assembly of FUS protein // *Cell Rep.* – 2013. – V. 5 (4) – P. 918-925.
340. Fialcowitz-White E. J., Brewer B. Y., Ballin J. D., Willis C. D., Toth E. A., Wilson G. M. Specific protein domains mediate cooperative assembly of HuR oligomers on AU-rich mRNA-destabilizing sequences // *J Biol Chem.* – 2007. – V. 282 (29) – P. 20948-20959.
341. Toba G., White K. The third RNA recognition motif of Drosophila ELAV protein has a role in multimerization // *Nucleic Acids Res.* – 2008. – V. 36 (4) – P. 1390-1399.
342. MacDonald G. H., Itoh-Lindstrom Y., Ting J. P. The transcriptional regulatory protein, YB-1, promotes single-stranded regions in the DRA promoter // *J Biol Chem.* – 1995. – V. 270 (8) – P. 3527-3533.

343. Li X., Heyer W. D. Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance // *Cell Res.* – 2008. – V. 18 (1) – P. 99-113.
344. Khanduja J. S., Calvo I. A., Joh R. I., Hill I. T., Motamedi M. Nuclear Noncoding RNAs and Genome Stability // *Mol Cell.* – 2016. – V. 63 (1) – P. 7-20.
345. Kosnopfel C., Sinnberg T., Schitteck B. Y-box binding protein 1--a prognostic marker and target in tumour therapy // *Eur J Cell Biol.* – 2014. – V. 93 (1-2) – P. 61-70.
346. Law J. H., Li Y., To K., Wang M., Astanehe A., Lambie K., Dhillon J., Jones S. J., Gleave M. E., Eaves C. J., Dunn S. E. Molecular decoy to the Y-box binding protein-1 suppresses the growth of breast and prostate cancer cells whilst sparing normal cell viability // *PLoS One.* – 2010. – V. 5 (9) – e12661.
347. Gao Y., Fotovati A., Lee C. Wang M., Cote G., Guns E., Toyota B., Faury D., Jabado N., Dunn S. E. Inhibition of Y-box binding protein-1 slows the growth of glioblastoma multiforme and sensitizes to temozolomide independent O6-methylguanine-DNA methyltransferase // *Mol Cancer Ther.* – 2009. – V. 8 (12) – P. 3276-3284.
348. Lasham A., Print C. G., Woolley A. G., Dunn S. E., Braithwaite A. W. YB-1: oncoprotein, prognostic marker and therapeutic target? // *Biochem J.* – 2013. – V. 449 (1) – P. 11-23.
349. Hanahan D., Weinberg R. A. The hallmarks of cancer // *Cell.* – 2000. – V. 100 (1) – P. 57-70.
350. Hanahan D., Weinberg R. A. Hallmarks of cancer: the next generation // *Cell.* – 2011. – V. 144 (5) – P. 646-674.
351. Shibahara K., Sugio K., Osaki T., Uchiumi T., Maehara Y., Kohno K., Yasumoto K., Sugimachi K., Kuwano M. Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small cell lung cancer // *Clin Cancer Res.* – 2001. – V. 7 (10) – P. 3151-3155.
352. Janz M., Harbeck N., Dettmar P., Berger U., Schmidt A., Jürchott K., Schmitt M., Royer H. D. Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumor biologic factors HER2, uPA and PAI-1 // *Int J Cancer.* – 2002. – V. 97 (3) – P. 278-282.
353. Xu W., Zhou L., Qin R., Tang H., Shen H. Nuclear expression of YB-1 in diffuse large B-cell lymphoma: correlation with disease activity and patient outcome // *Eur J Haematol.* – 2009. – V. 83 (4) – P. 313-319.
354. Kashihara M., Azuma K., Kawahara A., Basaki Y., Hattori S., Yanagawa T., Terazaki Y., Takamori S., Shirouzu K., Aizawa H., Nakano K., Kage M., Kuwano M., Ono M. Nuclear Y-box binding protein-1, a predictive marker of prognosis, is correlated with expression of HER2/ErbB2 and HER3/ErbB3 in non-small cell lung cancer // *J Thorac Oncol.* – 2009. – V. 4 (9) – P. 1066-1074.

355. Kamura T., Yahata H., Amada S., Ogawa S., Sonoda T., Kobayashi H., Mitsumoto M., Kohno K., Kuwano M., Nakano H. Is nuclear expression of Y box-binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma? // *Cancer*. – 1999. – V. 85 (11) – P. 2450-2454.
356. Shibahara K., Uchiumi T., Fukuda T., Kura S., Tominaga Y., Maehara Y., Kohno K., Nakabeppu Y., Tsuzuki T., Kuwano M. Targeted disruption of one allele of the Y-box binding protein-1 (YB-1) gene in mouse embryonic stem cells and increased sensitivity to cisplatin and mitomycin C // *Cancer Sci*. – 2004. – V. 95 (4) – P. 348-353.
357. Schittek B., Psenner K., Sauer B., Meier F., Iftner T., Garbe C. The increased expression of Y box-binding protein 1 in melanoma stimulates proliferation and tumor invasion, antagonizes apoptosis and enhances chemoresistance // *Int J Cancer*. – 2007. – V. 120 (10) – P. 2110-2110.
358. Chatterjee M., Rancso C., Stühmer T., Eckstein N., Andrulis M., Gerecke C., Lorentz H., Royer H. D., Bargou R. C. The Y-box binding protein YB-1 is associated with progressive disease and mediates survival and drug resistance in multiple myeloma // *Blood*. – 2008. – V. 111 (7) – P. 3714-3722.
359. Fujita T., Ito K., Izumi H., Kimura M., Sano M., Nakagomi H., Maeno K., Hama Y., Shingu K., Tsuchiya S., Kohno K., Fujimori M. Increased nuclear localization of transcription factor Y-box binding protein 1 accompanied by up-regulation of P-glycoprotein in breast cancer pretreated with paclitaxel // *Clin Cancer Res*. – 2005. – V. 11 (24 Pt 1) – P. 8837-8844.
360. Giménez-Bonafé P., Fedoruk M. N., Whitmore T. G., Akbari M., Ralph J. L., Ettinger S., Gleave M. E., Nelson C. C. YB-1 is upregulated during prostate cancer tumor progression and increases P-glycoprotein activity // *Prostate*. – 2004. – V. 59 (3) – P. 337-349.
361. Oda Y., Ohishi Y., Saito T., Hinoshita E., Uchiumi T., Kinukawa N., Iwamoto Y., Kohno K., Kuwano M., Tsuneyoshi M. Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase II alpha expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma // *J Pathol*. – 2003. – V. 199 (2) – P. 251-258.
362. Sundseth R., MacDonald G., Ting J., King A. C. DNA elements recognizing NF-Y and Sp1 regulate the human multidrug-resistance gene promoter // *Mol Pharmacol*. – 1997. – V. 51 (6) – P. 963-971.
363. Uversky V. N. Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins // *Biochim Biophys Acta*. – 2013. – V. 1834 (5) – P. 932-951.
364. Davydova E. K., Evdokimova V. M., Ovchinnikov L. P., Hershey J. W. B. Overexpression in COS cells of p50, the major core protein associated with mRNA, results in translation inhibition // *Nucleic Acids Res*. – 1997. – V. 25 – P. 2911-2916.
365. Laemmli U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*. – 1970. – V. 227. – P. 680-685.

366. Ямщиков В. Ф. Методы молекулярной генетики и генной инженерии // под ред. Салганика Р. И.. М.: Наука, 1990. – С. 28.
367. Zatsepin T. S., Stetsenko D. A., Arzumanov A. A., Romanova E. A., Gait M. J., Oretskaya T. S. Synthesis of peptide-oligonucleotide conjugates with single and multiple peptides attached to 2'-aldehydes through thiazolidine, oxime, and hydrazine linkages // *Bioconjug Chem.* – 2002. – V. 13 (4) – P. 822-830.
368. Ямщиков В. Ф. Методы молекулярной генетики и генной инженерии // под ред. Салганика Р. И.. М.: Наука, 1990. – С. 145–154.
369. Prasad R., Beard W. A., Strauss P. R., Wilson S. H. Human DNA polymerase beta deoxyribose phosphate lyase. Substrate specificity and catalytic mechanism // *J Biol Chem.* – 1998. – V. 273 (24) – P. 15263-15270.
370. Dutta A., Yang C., Sengupta S., Mitra S., Hegde M. L. New paradigms in the repair of oxidative damage in human genome: mechanisms ensuring repair of mutagenic base lesions during replication and involvement of accessory proteins // *Cell Mol Life Sci.* – 2015. – V. 72 (9) – P. 1679-1698.
371. Bradford M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // *Anal Biochem.* – 1976. – V. 72 – P. 248-254.
372. Maltseva E. A., Rechkunova N. I., Sukhanova M. V., Lavrik O. I. // Poly(ADP-ribose) Polymerase 1 Modulates Interaction of the Nucleotide Excision Repair Factor XPC-RAD23B with DNA via Poly(ADP-ribosylation). *J Biol Chem.* – 2015. – V. 290 (36) – P. 21811-21820.
373. Kutuzov M. M., Khodyreva S. N., Amé J. C., Ilina E. S., Sukhanova M. V., Schreiber V., Lavrik O. I. Interaction of PARP-2 with DNA structures mimicking DNA repair intermediates and consequences on activity of base excision repair proteins // *Biochimie.* – 2013. – V. 95 (6) – P. 1208-1215.
374. Kurgina T. A., Anarbaev R. O., Sukhanova M. V., Lavrik O. I. A rapid fluorescent method for the real-time measurement of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity // *Anal Biochem.* – 2018. – pii: S0003-2697 (17) – P. 30548-30561.
375. Лаврик О. И., Дырхеева Н. С. Основы ферментативного катализа, Новосибирск, РИО НГУ, 2012.
376. Prasad R., Williams J. G., Hou E. W., Wilson S. H. Pol β associated complex and base excision repair factors in mouse fibroblasts // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – V. 40 (22) – P. 11571-11582.
377. Schreiber V., Amé J. C., Dollé P., Schultz I., Rinaldi B., Fraulob V., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-2 (PARP-2) is required for efficient base excision DNA repair in association with PARP-1 and XRCC1 // *J Biol Chem.* – 2002. – V. 277 (25) – P. 23028-23036.

378. Tell G., Quadrifoglio F., Tiribelli C., Kelley M. R. The Many Functions of APE1/Ref-1: Not Only a DNA Repair Enzyme // *Antioxid Redox Signal* – 2009. – V. 11 (3) – P. 601-620.
379. Fantini D., Vascotto C., Marasco D., D'Ambrosio C., Romanello M., Vitagliano L., Pedone C., Poletto M., Cesaratto L., Quadrifoglio F., Scaloni A., Radicella J. P., Tell G. Critical lysine residues within the overlooked N-terminal domain of human APE1 regulate its biological functions // *Nucleic Acids Res* – 2010. – V. 38 (22) – P. 8239-8256.
380. Vidal A. E., Boiteux S., Hickson I. D., Radicella J. P. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions // *EMBO J* – 2001. – V. 20 (22) – P. 6530-6539.
382. Wong H. K., Muftuoglu M., Beck G., Imam S. Z., Bohr V. A., Wilson D. M. 3rd. Cockayne syndrome B protein stimulates apurinic endonuclease 1 activity and protects against agents that introduce base excision repair intermediates // *Nucleic Acids Res.* – 2007. – V. 35 (12) – P. 4103-4113.
383. Lirussi L., Antoniali G., Vascotto C., D'Ambrosio C., Poletto M., Romanello M., Marasco D., Leone M., Quadrifoglio F., Bhakat K. K., Scaloni A., Tell G. Nucleolar accumulation of APE1 depends on charged lysine residues that undergo acetylation upon genotoxic stress and modulate its BER activity in cells // *Mol Cell Biol* – 2012. – V. 23 (20) – P. 4079-4096.
384. Marenstein D. R., Wilson D. M. 3rd, Teebor G. W. Human AP endonuclease (APE1) demonstrates endonucleolytic activity against AP sites in single-stranded DNA // *DNA Repair (Amst)*. – 2004. – V. 3 (5) – P. 527-533.
385. Fan J., Matsumoto Y., Wilson D. M. 3rd. Nucleotide sequence and DNA secondary structure, as well as replication protein A, modulate the single-stranded abasic endonuclease activity of APE1 // *Biol Chem.* – 2006. – V. 281 (7) – P. 3889-3898.
381. Wilson D. M. 3rd. Ape1 Abasic Endonuclease Activity is Regulated by Magnesium and Potassium Concentrations and is Robust on Alternative DNA Structures // *Mol Biol.* – 2005. – V. 345 (5) – P. 1003-1014.
386. Miroshnikova A. D., Kuznetsova A. A., Vorobjev Y. N., Kuznetsov N. A., Fedorova O. S. Effects of mono- and divalent metal ions on DNA binding and catalysis of human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 // *Mol Biosyst.* – 2016. – V. 12 (5) – P. 1527-1539.
387. Barzilay G., Mol C. D., Robson C. N., Walker L. J., Cunningham R. P., Tainer J. A., Hickson I. D. Identification of critical active-site residues in the multifunctional human DNA repair enzyme HAP1 // *Nat Struct Biol.* – 1995. – V. 2 (7) – P. 561-568.
388. Mol C. D., Izumi T., Mitra S. and Tainer J. A. DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 and DNA repair coordination // *Nature.* – 2000. – V. 403 – P. 451-456.

389. Beernink P. T., Segelke B. W., Hadi M. Z., Erzberger J. P., Wilson D. M. 3rd and Rupp B. Two divalent metal ions in the active site of a new crystal form of human apurinic/apyrimidinic endonuclease, Ape1: implications for the catalytic mechanism // *J Mol Biol.* – 2001. – V. 307 – P. 1023-1034.
390. Stewart M., Dunlap T., Dourlain E., Grant B., McFail-Isom L. Cations form sequence selective motifs within DNA grooves via a combination of cation-pi and ion-dipole/hydrogen bond interactions // *PLoS One.* – 2013. – V. 8 (8) – e71420.
391. Chattopadhyay R., Wiederhold L., Szczesny B., Boldogh I., Hazra T. K., Izumi T., Mitra S. Identification and characterization of mitochondrial abasic (AP)-endonuclease in mammalian cells // *Nucleic Acids Res.* – 2006. – V. 34 (7) – P. 2067-2076.
392. Wen X., Lu R., Xie S., Zheng H., Wang H., Wang Y., Sun J., Gao X., Guo L. APE1 overexpression promotes the progression of ovarian cancer and serves as a potential therapeutic target // *Cancer Biomark.* – 2016. – V. 17 (3) – P. 313-322.
393. Al-Attar A., Gossage L., Fareed K. R., Shehata M., Mohammed M., Zaitoun A. M., Soomro I., Lobo D. N., Abbotts R., Chan S., Madhusudan S. Human apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE1) is a prognostic factor in ovarian, gastro-oesophageal and pancreatico-biliary cancers // *Br J Cancer.* – 2010. – V. 102 (4) – P. 704-709.
394. Duguid J., Bloomfield V. A., Benevides J., Thomas G. J. Jr. Raman spectroscopy of DNA-metal complexes. I. Interactions and conformational effects of the divalent cations: Mg, Ca, Sr, Ba, Mn, Co, Ni, Cu, Pd, and Cd // *Biophys J.* – 1993. – V. 65 (5) – P. 1916-1928.
395. Zhao X., Krishnamurthy N., Burrows C. J., David S. S. Mutation versus repair: NEIL1 removal of hydantoin lesions in single-stranded, bulge, bubble, and duplex DNA contexts // *Biochemistry.* – 2010. – V. 49 (8) – P. 1658-1666.
396. Jackson S. P. Detecting, signalling and repairing DNA double-strand breaks // *Biochem Soc Trans.* – 2001. – V. 29 (Pt 6) – P. 655-661.
397. Srivastava D. K., Berg B. J., Prasad R., Molina J. T., Beard W. A., Tomkinson A. E., Wilson S. H. Mammalian abasic site base excision repair. Identification of the reaction sequence and rate-determining steps // *J Biol Chem.* – 1998. – V. 273 (33) – P. 21203-21209.
398. Steffen J. D., McCauley M. M., Pascal J. M. Fluorescent sensors of PARP-1 structural dynamics and allosteric regulation in response to DNA damage // *Nucleic Acids Res.* – 2016. – V. 44 (20) – P. 9771-9783.
399. Bonfiglio J. J., Fontana P., Zhang Q., Colby T., Gibbs-Seymour I., Atanassov I., Bartlett E., Zaja R., Ahel I., Matic I. Serine ADP-Ribosylation Depends on HPF1 // *Mol Cell.* – 2017. – V. 65 (5) – P. 932-940.

400. Dantzer F., Amé J. C., Schreiber V., Nakamura J., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation during DNA damage and repair // *Methods Enzymol.* – 2006. – V. 409 – P. 493-510.
401. Miwa M., Saikawa N., Yamaizumi Z., Nishimura S., Sugimura T. Structure of poly(adenosine diphosphate ribose): identification of 2'-[1"-ribosyl-2"-(or 3")-(1"-ribosyl)]adenosine-5',5",5"-tris(phosphate) as a branch linkage // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1979. – V. 76 – P. 595-599.
402. Juarez-Salinas H., Levi V., Jacobson E. L., Jacobson M. K. Poly(ADP-ribose) has a branched structure in vivo // *J Biol Chem.* – 1982. – V. 257 – P. 607-609.
403. Panzeter P. L., Realini C. A., Althaus F. R. Noncovalent interactions of poly(adenosine diphosphate ribose) with histones // *Biochemistry.* – 1992. – V. 31 (5) – P. 1379-1385.
404. Amé J. C., Rolli V., Schreiber V., Niedergang C., Apiou F., Decker P., Muller S., Höger T., Ménissier-de Murcia J., de Murcia G. PARP-2, A novel mammalian DNA damage-dependent poly(ADP-ribose) polymerase // *J Biol Chem.* – 1999. – V. 274 – P. 17860-17868.
405. Léger K., Bär D., Savić N., Santoro R., Hottiger M. O. ARTD2 activity is stimulated by RNA // *Nucleic Acids Res.* – 2014. – V. 42 (8) – P. 5072-5082.
406. Matveeva E., Maiorano J., Zhang Q., Eteleeb A. M., Convertini P., Chen J., Infantino V., Stamm S., Wang J., Rouchka E. C., Fondufe-Mittendorf Y. N. Involvement of PARP1 in the regulation of alternative splicing // *Cell Discovery.* – 2016. – V. 2 – 15046.
407. Wei W. J., Mu S. R., Heiner M., Fu X., Cao L. J., Gong X. F., Bindereif A., Hui J. YB-1 binds to CAUC motifs and stimulates exon inclusion by enhancing the recruitment of U2AF to weak polypyrimidine tracts // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – V. 40 (17) – P. 8622-8636.
408. Ogata N., Ueda K., Kawaichi M., Hayaishi O. Poly(ADP-ribose) synthetase, a main acceptor of poly(ADP-ribose) in isolated nuclei // *J Biol Chem.* – 1981. – V. 256 – P. 4135-4137.
409. Tanaka Y. Effect of Polyamines on Two Types of Reaction of Purified Poly(ADP-Ribose) Polymerase I // *J Biochem.* – 1982. – V. 91 – P. 2029-2037.
410. Rouleau M, McDonald D, Gagné P, Ouellet M, Droit A, Hunter J, Dutertre S, Prigent C, Hendzel M, Poirier G. PARP-3 associates with polycomb group bodies and with components of the DNA damage repair machinery // *J Cell Biochem.* – 2007. – V. 100 (2) – P. 385-401.
411. Putt K. S., Hergenrother P. J. An enzymatic assay for poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) via the chemical quantitation of NAD⁺: application to the high-throughput screening of small molecules as potential inhibitors // *Anal Biochem.* – 2004. – V. 326 (1) – P. 78-86.
412. Zhang J. Use of biotinylated NAD to label and purify ADP-ribosylated proteins // *Methods Enzymol.* – 1997. – V. 280 – P. 255-265.

413. Chambon P., Weill J. D., Mandel P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme // *Biochem. Biophys. Res Commun.* – 1963. – V. 11 – P. 39-43.
414. Kun E., Kirsten E., Mendeleyev J., Ordahl C. P. Regulation of the enzymatic catalysis of poly(ADP-ribose) polymerase by dsDNA, polyamines, Mg²⁺, Ca²⁺, histones H1 and H3, and ATP // *Biochemistry.* – 2004. – V. 43 (1) – P. 210-216.
415. Masaoka A., Gassman N. R., Kedar P. S., Prasad R., Hou E. W., Horton J. K., Bustin M., Wilson S. H. HMGN1 protein regulates poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) self-PARYlation in mouse fibroblasts // *J Biol Chem.* – 2012. – V. 287 (33) – P. 27648-27658.
416. Kalisch T. (2013) Biochemical and functional characterization of a new partner of poly(ADP-ribose) polymerase I: high-mobility group containing protein 2-like 1 (Thesis).
417. Fischer J. M., Popp O., Gebhard D., Veith S., Fischbach A., Beneke S., Leitenstorfer A., Bergemann J., Scheffner M., Ferrando-May E., Mangerich A., Bürkle A. Poly(ADP-ribose)-mediated interplay of XPA and PARP1 leads to reciprocal regulation of protein function // *FEBS J.* – 2014. – V. 281 (16) – P. 3625-3641.
418. Davar D., Beumer J. H., Hamieh L., Tawbi H. Role of PARP inhibitors in cancer biology and therapy // *Curr Med Chem.* – 2012. – V. 19 (23) – P. 3907-3921.
419. Gibson B. A., Kraus W. L. New insights into the molecular and cellular functions of poly(ADP-ribose) and PARPs // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2012. – V. 13 (7) – P. 411-424.
420. Berger N. A., Besson V. C., Boulares A. H., Bürkle A., Chiarugi A., Clark R. S., Curtin N. J., Cuzzocrea S., Dawson T. M., Dawson V. L., Haskó G., Liaudet L., Moroni F., Pacher P., Radermacher P., Salzman A. L., Snyder S. H., Soriano F. G., Strosznajder R. P., Sümegi B., Swanson R. A., Szabo C. Opportunities for repurposing of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors for the therapy of non-oncological diseases // *Br J Pharmacol.* – 2017. (в печати)
421. Curtin N., Szabo C. Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond // *Mol Aspects Med.* – 2013. – V. 34 (6) – P. 1217-1256.
422. Murai J., Huang S., Das B., Renaud A., Zhang Y., Doroshow J., Ji J., Takeda S., Pommier Y. Trapping of PARP1 and PARP2 by Clinical PARP Inhibitors // *Cancer Res.* – 2012. – V. 72 (21) – P. 5588-5599.
423. Hopkins T. A., Shi Y., Rodriguez L. E., Solomon L. R., Donawho C. K., DiGiammarino E. L., Panchal S. C., Wilsbacher J. L., Gao W., Olson A. M., Stolarik D. F., Osterling D. J., Johnson E. F., Maag D. Mechanistic Dissection of PARP1 Trapping and the Impact on In Vivo Tolerability and Efficacy of PARP Inhibitors // *Mol Cancer Res.* – 2015. – V. 13 (11) – P. 1465-1477.

424. Kirsanov K. I., Kotova E., Makhov P., Golovine K., Lesovaya E. A., Kolenko V. M., Yakubovskaya M. G., Tulin A. V. Minor groove binding ligands disrupt PARP-1 activation pathways // *Oncotarget*. – 2014. – V. 5 (2) – P. 428-437.
425. Kim Y., Kim A., Sharip A., Sharip A., Jiang J., Yang Q., Xie Y. Reverse the Resistance to PARP Inhibitors // *Int J Biol Sci*. – 2017. – V. 13 (2) – P. 198-208.
426. Prasad C. B., Prasad S. B., Yadav S. S., Pandey L. K., Singh S., Pradhan S., Narayan G. Olaparib modulates DNA repair efficiency, sensitizes cervical cancer cells to cisplatin and exhibits anti-metastatic property// *Sci Rep*. – 2017. – V. 7 (1) – P. 12876.
427. Michels J., Vitale I., Galluzzi L., Adam J., Olaussen K. A., Kepp O., Senovilla L., Talhaoui I., Guegan J., Enot D. P., Talbot M., Robin A., Girard P., et al // Cisplatin resistance associated with PARP hyperactivation. – *Cancer Res*. – 2013. – V. 73 (7) – P. 2271-2280.
428. Gilibert M., Launay S., Ginstier C., Bertucci F., Audebert S., Pophillat M., Toiron Y., Baudelet E., Finetti P., Noguchi T., Sobol H., Birnbaum D., Borg J. P., Charafe-Jauffret E., Gonçalves A. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) overexpression in human breast cancer stem cells and resistance to olaparib // *PLoS One*. – 2014. – V. 9 (8) – e104302.
429. Okayama H., Edson C. M., Fukushima M., Ueda K., Hayaishi O. Purification and properties of poly(adenosine diphosphate ribose) synthetase // *J Biol Chem*. – 1977. – V. 252 (20) – P. 7000-7005.
430. Yang W. H., Bloch D. B. Probing the mRNA processing body using protein macroarrays and "autoantigenomics" // *RNA*. – 2007. – V. 13 (5) – P. 704-712.
431. Gonda K., Wudel J., Nelson D., Katoku-Kikyo N., Reed P., Tamada H., Kikyo N. Requirement of the protein B23 for nucleolar disassembly induced by the FRGY2a family proteins // *J Biol Chem*. – 2006. – V. 281 (12) – P. 8153-8160.
432. Das S. K., Rehman I., Ghosh A., Sengupta S., Majumdar P., Jana B., Das B. B. Poly(ADP-ribose) polymers regulate DNA topoisomerase I (Top1) nuclear dynamics and camptothecin sensitivity in living cells // *Nucleic Acids Res*. – 2016. – V. 44 (17) – P. 8363-8375.
433. Malanga M., Althaus F. R. Poly(ADP-ribose) reactivates stalled DNA topoisomerase I and Induces DNA strand break resealing // *J Biol Chem*. – 2004. – V. 279 (7) – P. 5244-5248.
434. Kawaguchi A., Asaka M. N., Matsumoto K., Nagata K. Centrosome maturation requires YB-1 to regulate dynamic instability of microtubules for nucleus reassembly // *Sci Rep*. – 2015. – V. 5 – 8768.