

На правах рукописи



Наumenko Константин Николаевич

Роль РНК-связывающего белка YB-1 в регуляции
активности поли(ADP-рибоза)полимеразы 1

1.5.3 – молекулярная биология

Автореферат
диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Новосибирск 2023

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН

Научные руководители:

Лаврик Ольга Ивановна, д.х.н., профессор, академик РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, зав. лабораторией биоорганической химии ферментов.

Суханова Мария Владиславовна, к.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, с.н.с.

Официальные оппоненты:

Малыгин Алексей Аркадьевич, д.х.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, зав. лабораторией структуры и функции рибосом.

Гуляева Людмила Федоровна, д.б.н., профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», г. Новосибирск, зав. лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза.

Лябин Дмитрий Николаевич, д.б.н., Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт белка РАН, г. Пушкино, руководитель группы регуляции биосинтеза белка.

Защита состоится «16» июня 2023 г. в 10:00

На заседании диссертационного совета ИХБФМ.02.01 при Институте химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН по адресу: 630090, проспект академика Лаврентьева, 8, Новосибирск

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН и на сайте www.niboch.nsc.ru

Автореферат разослан мая 2023 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н., Пестряков П.Е.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. ДНК в организме человека постоянно находится под воздействием повреждающих экзогенных и эндогенных агентов. 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 [Vermeij W.P., et al., 2016]. В настоящее время стратегия противоопухолевой терапии направлена на повреждение ДНК в онкотрансформированных клетках. Повреждения, вызванные терапевтическими агентами, могут устраняться в процессе репарации ДНК, что обеспечивает устойчивость опухолевых клеток к терапии. Для повышения эффективности терапии часто используется комбинация генотоксических агентов с ингибиторами ферментов репарации [Sánchez-Pérez I., 2006]. Поэтому изучение молекулярных механизмов репарации ДНК является важной научно-практической задачей для разработки новых эффективных стратегий лечения онкологических заболеваний. Одним из ключевых регуляторов процессов репарации является поли(ADP-рибоза)полимераза 1 (PARP1) – белок, вовлеченный в процесс детекции разрывов ДНК за счет синтеза поли(ADP-рибозы) (PAR) в районе сайта повреждения ДНК. Синтез PAR является одним из наиболее ранних событий, происходящих в ходе клеточного ответа на повреждение ДНК [Caron M.C., et al., 2019]. Регуляторная функция в клетке, выполняемая PARP1 и PAR, очень многогранна, поэтому идентификация и изучение белков, влияющих на активность PARP1 и синтез PAR в ответ на генотоксический стресс, является важной задачей в современной биологии. В настоящее время многие РНК-связывающие белки рассматриваются как возможные участники поддержания стабильности генома, поскольку повышенное содержание определенных РНК-связывающих белков в онкотрансформированных клетках часто коррелирует с резистентностью опухолей к радио- и химиотерапии [Zhao Y., et al., 2022]. Кроме того, многие из них являются мишенями поли(ADP-рибозил)ирования или способны взаимодействовать с PAR [Ayyappan et al., 2021]. Одним из таких РНК-связывающих белков является мультифункциональный Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1). Ранее нами были установлены и количественно охарактеризованы белок-белковые взаимодействия YB-1 с PARP1 и была показана способность YB-1 модулировать каталитическую активность PARP1 [Alemasova E.E., et al., 2015, Alemasova E.E., et al., 2016]. Однако механизм стимуляции активности PARP1 белком YB-1 оставался невыясненным. Таким образом, изучение механизма регуляции активности PARP1 с участием YB-1 является актуальной задачей и представляет большой интерес для понимания роли РНК-связывающих белков в PARP1-зависимой регуляции стабильности генома.

Цель и задачи исследования. Целью данной работы являлось исследование механизма действия YB-1 в регуляции каталитической активности PARP1. В ходе работы были поставлены следующие задачи:

- 1) исследовать кинетику синтеза поли(ADP-рибозы) в присутствии YB-1 и уровень поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 и YB-1 в присутствии ДНК-структур, содержащих различные типы повреждений, а также мононуклеосом, содержащих поврежденную ДНК, для установления влияния структуры и типа повреждения ДНК-субстрата на функциональное взаимодействие YB-1 с PARP1;
- 2) для исследования роли отдельных доменов YB-1 в регуляции активности PARP1 получить и охарактеризовать мутантные формы YB-1, полностью или частично лишённые неупорядоченных доменов;
- 3) исследовать кинетику синтеза поли(ADP-рибозы) и поли(ADP-рибозил)ирование PARP1 в присутствии мутантных форм YB-1, а также эффективность формирования комплексов YB-1 и его мутантных форм с ДНК и поли(ADP-рибозой), для определения роли отдельных доменов YB-1 в регуляции PARP1-зависимого синтеза поли(ADP-рибозы);
- 4) получить и охарактеризовать мутантные формы PARP1, синтезирующие укороченный полимер ADP-рибозы с высокой или низкой степенью его ветвления;
- 5) оценить уровень синтеза поли(ADP-рибозы), катализируемого мутантными формами PARP1 в присутствии YB-1, определить уровень поли(ADP-рибозил)ирования мутантных форм PARP1 и YB-1, а также эффективность формирования комплексов YB-1 с полимерами ADP-рибозы различной структуры для оценки влияния структуры полимера на функциональное взаимодействие YB-1 с PARP1.

Научная новизна полученных результатов. Представленная работа является первым детальным исследованием механизма влияния РНК-связывающего белка YB-1 на активность PARP1. Установлено, что YB-1 способен регулировать активность PARP1 посредством формирования тройного комплекса YB-1•PARP1•ДНК или через взаимодействие YB-1 с автополи(ADP-рибозил)ированной формой PARP1. Проведенное исследование позволяет глубже понять молекулярный механизм регуляции активности PARP1 в присутствии белков, которые способны взаимодействовать как с повреждённой ДНК, так и поли(ADP-рибозой), формирующейся в процессе активации PARP1.

Практическая значимость работы. На сегодняшний день YB-1 рассматривается как прогностический маркер в отношении агрессивности течения ряда онкологических заболеваний и устойчивости опухолей к химиотерапии [Lim, J., et al., 2019]. Поэтому, непосредственное участие онкобелка YB-1 в регуляции активности фермента PARP1, ключевого фактора репарации ДНК, может играть важную роль в выживаемости злокачественно трансформированных клеток в условиях химио- или радиотерапии. Результаты, полученные в данной работе, могут иметь важное практическое значение для понимания механизмов развития резистентности клеток опухолей, а также создания новых методов в терапии онкологических заболеваний.

Положения, выносимые на защиту.

1. YB-1 увеличивает начальную скорость и суммарный выход реакции поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемой PARP1 или её мутантными формами.
2. YB-1 стимулирует активность PARP1 в присутствии ДНК-дуплексов, содержащих различные типы повреждений, нуклеосомных субстратов, плазмидной ДНК, ингибиторов активности PARP1 3-аминобензамида и олапариба.
3. С-концевой домен YB-1, содержащий четыре кластера положительно заряженных аминокислотных остатков, необходим для стимуляции активности PARP1. При делеции двух положительно заряженных кластеров не наблюдается влияния YB-1 на реакцию поли(ADP-рибозил)ирования. Последовательное укорочение С-концевого домена приводит к снижению сродства YB-1 к поврежденной ДНК и PAR.
4. YB-1 и PARP1 образуют комплекс в присутствии поврежденной ДНК. При образовании тройного комплекса PARP1•ДНК•YB-1, YB-1 становится преимущественной мишенью в реакции моно- и поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемой PARP1 или её мутантной формой.
5. YB-1 проявляет высокое сродство к PAR. YB-1, взаимодействуя с синтезируемым полимером ADP-рибозы в процессе авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1, способен ингибировать реакцию элонгации цепи. Кроме того, сродство YB-1 к PAR напрямую зависит от длины или степени разветвления полимера.

Вклад автора. Представленные экспериментальные данные получены либо автором, либо при его непосредственном участии на всех этапах исследований, включая планирование и проведение экспериментов, обработку, оформление и публикацию результатов. Данные с использованием метода флуоресцентной спектроскопии получены совместно с Т. А. Кургиной. Данные с использованием метода атомно-силовой микроскопии были получены совместно с к.б.н. М. В. Сухановой. Данные с использованием метода динамического светорассеяния были получены совместно с к.х.н. Р. О. Анарбаевым.

Апробация и публикации результатов. По результатам исследования опубликовано 5 статей, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Результаты, изложенные в диссертации, были представлены на конференциях: 43ем конгрессе FEBS (Прага, Чехия, 2018), BGRS/SB (Новосибирск, 2018), конференции «Биотехнология — медицине будущего» (Новосибирск, 2019), конференции SBB (Севастополь, 2020), конференции FEBS «PARP: Research on the family of poly(ADP-ribose) polymerases» (Барселона, Испания, 2021), BGRS/SB (Новосибирск, 2022).

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части, результатов и обсуждения, выводов, списка используемой литературы и приложения. Работа (без приложения) изложена на 120 страницах, включает 34 рисунка и 6 таблиц.

Список литературы содержит 236 литературных источника. Приложение на 5 страницах включает 4 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. YB-1 как фактор, стимулирующий активность PARP1

1.1. Стимуляция поли(ADP-рибоза)полимеразной активности PARP1 в присутствии YB-1

Ранее было показано, что в присутствии YB-1 наблюдается стимуляция активности PARP1, однако, влияние YB-1 на активность PARP1 не было детально исследовано в кинетическом режиме реакции поли(ADP-рибозил)ирования [Alemasova *et al.*, 2016]. Поэтому была проведена оценка влияния рекомбинантного YB-1 на каталитическую активность PARP1 при различных соотношениях концентраций этих белков. Было установлено, что при последовательном увеличении концентрации YB-1 в реакционной смеси происходит постепенное увеличение начальной скорости реакции поли(ADP-рибозил)ирования (**Рис. 1 А**) и возрастание уровня, как авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1, так и транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 (**Рис. 1 Б**).

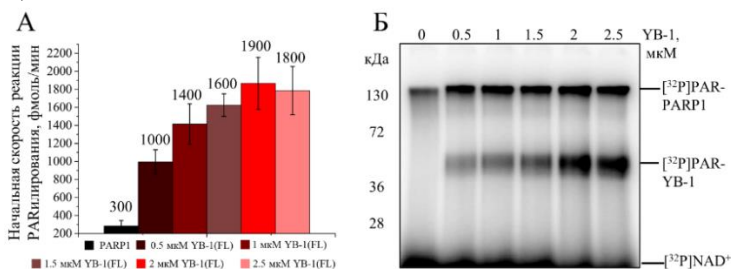


Рис. 1. Стимуляция активности PARP1 в зависимости от концентрации YB-1. **А:** начальные скорости реакции синтеза PAR (фмоль/мин) в присутствии различных концентраций YB-1(FL). Начальная скорость была получена из обработки индивидуальных кинетических кривых накопления продуктов реакции и представлена как среднее значение ($\pm$ стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов. **Б:** анализ авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 и транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 методом денатурирующего геле-электрофореза. Радиоавтограф 10% SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(ADP-рибозил)ирования. Реакционные смеси содержали 100 нМ PARP1, 10 мМ ЭДТА, 0,5 OD₂₆₀/мл ДНК_{акт} и YB-1(FL) в указанных концентрациях. Реакцию запускали добавлением NAD⁺ до конечной концентрации 20 мкМ (0,4 мКи [³²P]-меченого NAD⁺) с последующей инкубацией при 30°C в течение указанного времени (**А**) или 10 минут (**Б**).

1.2. Сравнительный анализ влияния Mg²⁺, спермина, гистонов и YB-1 на активность PARP1

Ранее было показано, что катионы Mg²⁺, а также ряд основных белков (гистоны) и полиамины, несущие положительно заряженные NH³⁺-группы, способны стимулировать активность PARP1 *in vitro* [Kun *et al.*, 2004]. Поэтому было изучено влияние YB-1 на активность PARP1 в сравнении с другими известными кофакторами реакции синтеза поли(ADP-рибозы), такими как Mg²⁺, спермин³⁺, гистон H1 и смесь коровых гистонов (H2A, H2B, H3 и H4)

(Рис. 2). Согласно полученным данным, YB-1, аналогично гистонам и полиаминам, способен стимулировать активность PARP1 в отсутствие катионов магния. Ряд увеличения активности PARP1 в зависимости от добавленного кофактора имеет следующий вид: гистон H1 > Mg^{2+} > коровье гистоны $\geq$ YB-1 > спермин (Рис. 2 Б). Таким образом, YB-1, как и гистоны, стимулирует аутомодификацию PARP1, что может указывать на сходство механизма стимуляции активности PARP1 в присутствии гистонов. Однако было обнаружено, что в отличие от гистонов [Messner S., et al., 2010], YB-1 является более эффективной мишенью в реакции трансмодификации (Рис. 2 А). Следовательно, влияние YB-1 на синтез PAR, катализируемый PARP1, включает два компонента: увеличение уровня аутомодификации самой PARP1 и высокий уровень транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1. Можно предположить, что YB-1, как и гистоны, способен участвовать в регуляции активности PARP1, дополнительно стимулируя синтез PAR, в том числе за счет авто- и транс-поли(ADP-рибозил)ирования.

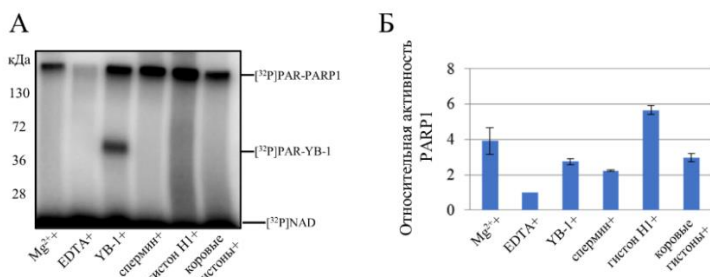


Рис. 2. Сравнительный анализ активности PARP1 в присутствии различных кофакторов: Mg^{2+} , YB-1, спермина, гистона H1 или коровьих гистонов. **А:** анализ продуктов модификации PARP1 методом денатурирующего геле-электрофореза. Радиоавтограф 10% SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(ADP-рибозил)ирования. **Б:** относительный уровень синтеза поли(ADP-рибозы) в присутствии различных кофакторов. На рисунке приведены средние значения ($\pm$ стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов. Активность PARP1 в отсутствие кофакторов была принята за 100%. Реакционные смеси содержали 100 нМ PARP1, 0,5 OD₂₆₀/мл ДНК_{акт}, 10 мМ ЭДТА или 5 мМ Mg^{2+} , или 1600 нМ YB-1, или 2 мМ спермин, или 54 мг/л гистон H1, или 54 мг/л коровьи гистоны. Реакцию запускали добавлением NAD^{+} до конечной концентрации 4 мкМ (0,4 мКи $[^{32}P]$ -меченого NAD^{+}) с последующей инкубацией в течение 15 минут при 37°C.

1.3. Влияние YB-1 на активность PARP1 в присутствии ДНК-дуплексов, содержащих различные типы повреждений

Оба белка YB-1 и PARP1 обладают повышенным сродством к поврежденной ДНК и её неканоническим структурам [Potaman, V.N., et al., 2005, Tanabe, Y., et al., 2015]. Наличие повреждений в ДНК (одно- и двуцепочечных разрывов), а также участков, отличающихся по структуре от канонической В-формы (в том числе, некомплементарных областей) может активировать PARP1 [Lonskaya, I., et al., 2005, Steffen, J.D., et al., 2016]. YB-1 обладает повышенным сродством к одноцепочечной ДНК и ДНК-структурам, содержащим участки неспаренных оснований [Gaudreault, I., et al., 2004]. Поэтому, при условии формирования тройного комплекса YB-1•PARP1•ДНК влияние YB-1 на активность PARP1 может зависеть от типа повреждения

ДНК. В связи с этим представляло интерес исследовать активность PARP1 в присутствии YB-1 и одно- и двуцепочечных ДНК-структур, содержащих различные типы повреждений. Для этой цели были использованы ДНК-дуплексы, содержащие двуцепочечные разрывы (ds55, длиной 55 п.о.), разрыв (Nick, длиной 32 п.о.), однонуклеотидную брешь (Gap, длиной 32 п.о.), ДНК-шпильки (dumbbell, длиной 55 н.о.), неспаренные участки длиной 1 (mm55, длиной 55 п.о.), 5 (bubble 5, длиной 55 п.о.) или 17 (bubble 17, длиной 55 п.о.) нуклеотидных звеньев, свисающий одноцепочечный участок длиной 17 н.о. (3'-Recessed) и одноцепочечную ДНК (ss32, длиной 32 н.о.). Была проведена количественная оценка уровня синтеза поли(ADP-рибозы) и анализ поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 и YB-1 в присутствии различных ДНК-субстратов (Рис. 3). Согласно полученным данным, YB-1 практически не оказывает влияния на активность PARP1 только в присутствии одноцепочечной ДНК (ss32). Для всех остальных ДНК-структур показано, что YB-1 в значительной степени стимулирует активность PARP1, что сопровождается более высоким уровнем автомодификации PARP1 и интенсивным транс-поли(ADP-рибозил)ированием YB-1. Уровень стимуляции синтеза поли(ADP-рибозы) в присутствии YB-1 практически не зависит от типа нарушения регулярной структуры ДНК (неспаренные основания или одноцепочечные разрывы), что может быть следствием значительного вклада в общий уровень активации PARP1 концов ДНК-дуплексов и(или) небольшой разницы в сродстве YB-1 к указанным типам повреждения ДНК (Рис. 3 А, Б).

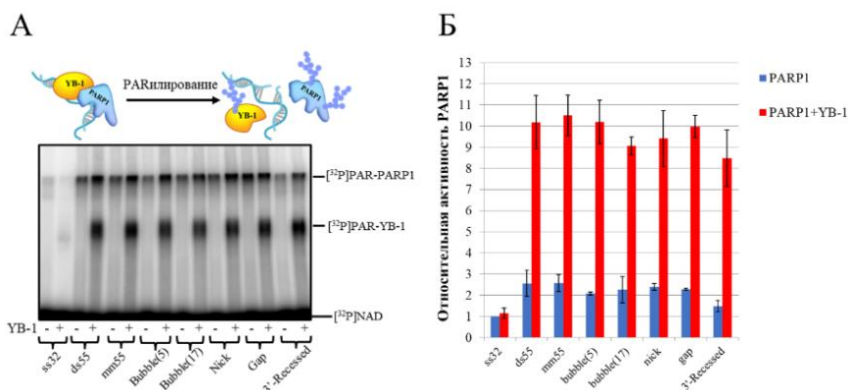


Рис. 3. Влияние YB-1 на активность PARP1 в присутствии различных ДНК-структур. **А:** анализ авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 и транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 методом денатурирующего геле-электрофореза. Радиоавтограф 10% SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(ADP-рибозил)ирования. **Б:** относительный уровень синтеза поли(ADP-рибозы). На рисунке приведены средние значения (± стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов. Активность PARP1 в присутствии ss32 была принята за 100%. Реакционные смеси содержали 100 нМ PARP1, 100 нМ ДНК-субстрат, 10 мМ ЭДТА, 1600 нМ YB-1. Реакцию запускали добавлением NAD⁺ до конечной концентрации 4 мкМ (0,4 мКи [³²P]-меченого NAD⁺) с последующей инкубацией в течение 10 минут при 37°C.

Таким образом, структурные особенности ДНК-субстрата оказывают слабое влияние на YB-1-зависимую стимуляцию активности PARP1.

1.4. YB-1 стимулирует активность PARP1 в присутствии нуклеосомной ДНК

В настоящее время большое количество исследований направлено на изучение влияния нуклеосомной организации на процесс активации PARP1, когда в качестве субстрата используется моонуклеосома [Sharma *et al.*, 2019, Kutuzov *et al.*, 2021]. Поэтому был проведен сравнительный анализ влияния YB-1 на активность PARP1 в присутствии моонуклеосом, содержащих однонуклеотидную брешь или без неё, или нуклеосомной ДНК длиной 147 пар оснований с однонуклеотидной брешью или без неё. Анализ влияния YB-1 на активность PARP1 проводили при времени инкубации, достаточном для выхода реакции поли(ADP-рибозил)ирования на плато в присутствии нуклеосомной ДНК и моонуклеосомы (Рис. 4).

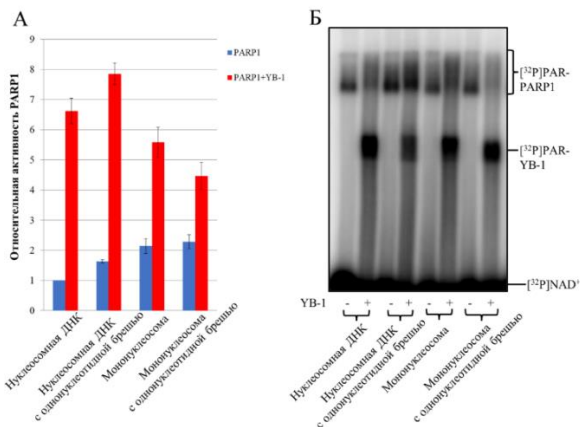


Рис. 4. Влияние YB-1 на активность PARP1 при использовании различных нуклеосомных субстратов. **А:** относительная активность PARP1. На рисунке приведены средние значения ($\pm$ стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов. Активность PARP1 в присутствии нуклеосомной ДНК была принята за 100%. **Б:** анализ авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 и транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 в присутствии различных нуклеосомных субстратов методом денатурирующего гель-электрофореза. Радиоавтограф 10% SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(ADP-рибозил)ирования. Реакционные смеси содержали 100 нМ PARP1, 100 нМ ДНК-субстрат, 10 мМ ЭДТА, 1600 нМ YB-1. Реакцию запускали добавлением NAD^+ до конечной концентрации 4 мкМ (0,4 мКи [³²P]-меченого NAD^+) с последующей инкубацией в течение 10 минут при 37°C.

Согласно полученным данным (Рис. 4), происходит как аутомодификация PARP1, так и трансмодификация YB-1, что говорит о функциональном взаимодействии PARP1 и YB-1 не только в случае свободной ДНК, но и моонуклеосомы (Рис. 4 Б). Для количественной оценки активности PARP1 в присутствии свободной ДНК и моонуклеосомы анализировали уровень синтеза PAR и поли(ADP-рибозил)ирование белков (Рис. 4 А). Согласно полученным данным, нуклеосомная ДНК, содержащая однонуклеотидную брешь, является более эффективным кофактором для активации PARP1, чем нуклеосомная ДНК без неё. Тогда как в случае моонуклеосомы не наблюдается выраженной зависимости уровня поли(ADP-рибозил)ирования белков от наличия повреждения в ДНК. Однако, YB-1 оказывает стимулирующий эффект на активность PARP1 на всех

используемых субстратах (Рис. 4 А). Эти данные дополнительно подтверждают тот факт, что YB-1 может функционировать как регулятор реакции поли(ADP-рибозил)ирования при использовании широкого спектра ДНК-субстратов, которые активируют PARP1.

1.5. YB-1 стимулирует активность PARP1 в присутствии ингибиторов этого фермента

Для того чтобы определить, насколько синтез PAR влияет на YB-1-зависимую регуляцию активности PARP1, был проведен эксперимент с использованием ингибиторов PARP1. Анализ влияния YB-1 на активность PARP1 проводили в присутствии ингибиторов этого фермента, используя концентрацию полумаксимального ингибирования (IC_{50}) и выше для 3-аминобензамида или олапариба (Рис. 5).

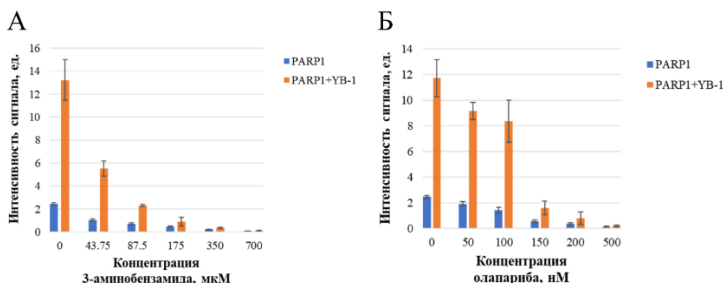


Рис. 5. Уровень синтеза поли(ADP-рибозы) при совместном присутствии YB-1 и ингибитора PARP1 3-аминобензамида (А) или олапариба (Б). На рисунке приведены средние значения ($\pm$ стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов. Реакционные смеси содержали 100 нМ PARP1, 100 нМ ДНК (Nick), 5 мМ Mg^{2+} , 1600 нМ YB-1 и 3-аминобензамид 87,5-2800 мкМ (А) или олапариб 50-500 нМ (Б). Реакцию запускали добавлением NAD^+ до конечной концентрации 4 мкМ (0,4 мкКи [^{32}P]-меченого NAD^+) с последующей инкубацией 5 минут при 37°C.

Было установлено, что YB-1 способен поддерживать относительно высокие уровни синтеза PAR в реакционных смесях, содержащих концентрации ингибиторов PARP1 около IC_{50} . Однако, YB-1 не оказывал влияния на активность PARP1 в присутствии высоких концентраций тех же ингибиторов. Данный эффект можно объяснить зависимостью стимуляции активности PARP1 с помощью YB-1 от синтеза полимера ADP-рибозы, который блокируется при высоких концентрациях ингибиторов PARP1.

1.6. Участие различных доменов YB-1 в регуляции активности PARP1

Учитывая ранее опубликованные данные о слабых белок-белковых взаимодействиях между PARP1 и YB-1 [Alemasova et al., 2016], можно предположить две не исключаящие друг друга модели функционального взаимодействия PARP1 и YB-1: 1) формирование комплекса PARP1•YB-1 в присутствии поврежденной ДНК; 2) формирование комплекса YB-1•PAR в условиях авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1. Таким образом, способность YB-1 активировать PARP1 зависит от эффективности его

взаимодействия с ДНК и PAR, хотя тип повреждения ДНК незначительно влиял на эффективность PARP1-зависимого поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 (Рис. 3).

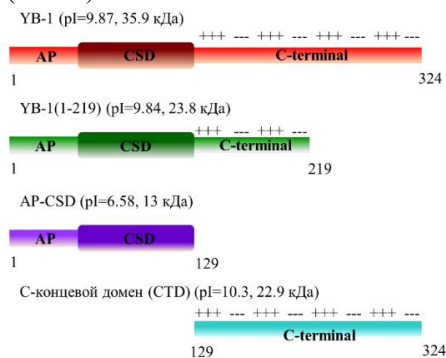


Рис. 6. Схематическое изображение мутантных форм YB-1, использованных в работе.

Согласно литературным данным, во взаимодействии с нуклеиновыми кислотами могут принимать участие домен холодового шока (CSD, 52-129 а.о.) и неструктурированный C-концевой домен (CTD, 130-324 а.о.) [Tanabe et al., 2015]. Для изучения роли отдельных доменов YB-1 в стимуляции активности PARP1 были использованы укороченные мутантные формы YB-1: ядерная форма YB-1 (YB-1 (1-219); AP-CSD фрагмент и CTD-фрагмент (Рис. 6). В качестве ДНК-субстрата была использована ДНК (Nick) и ДНК-дуплексы со шпильчатой структурой ДНК (dumbbell), содержащие одноцепочечный разрыв ДНК (Nick dumbbell) или однонуклеотидную брешь ДНК (Gap dumbbell). Согласно полученным данным, AP-CSD-фрагмент не поли(ADP-рибозил)ируется и практически не влияет на активность PARP1, однако отдельный CTD-фрагмент способен стимулировать активность PARP1 и модифицироваться (Рис. 7 А и Б).

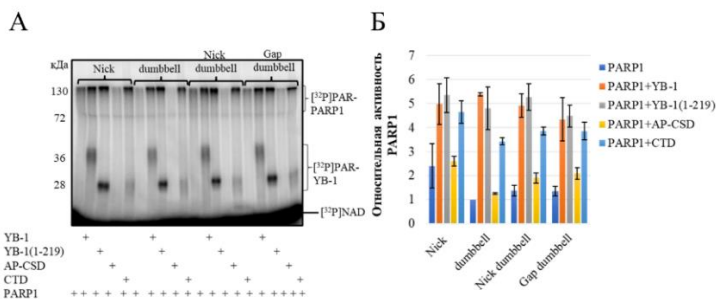


Рис. 7. C-концевой домен YB-1 необходим для стимуляции активности PARP1. **А:** анализ авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 и транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 в присутствии ДНК (Nick) и шпильчатых ДНК-субстратов методом денатурирующего гель-электрофореза. Радиоавтограф 10% SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(ADP-рибозил)ирования. **Б:** сравнение относительного уровня синтеза поли(ADP-рибозы) в присутствии YB-1 и его мутантных форм. На рисунке приведены средние значения ($\pm$ стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов. Активность PARP1 в присутствии Dumbbell ДНК была принята за 100%. Реакционные смеси содержали 100 нМ PARP1, 100 нМ ДНК-субстрат, 10 мМ ЭДТА, 1600 нМ YB-1 или его мутантную форму (YB-1(1-219), AP-CSD или CTD-фрагмент). Реакцию запускали добавлением NAD^+ до конечной концентрации 4 мкМ (0,4 мКи $[^{32}\text{P}]$ -меченого NAD^+) с последующей инкубацией в течение 10 минут при 37°C.

Ядерная форма YB-1, которая содержит часть CTD-фрагмента с двумя кластерами положительно заряженных аминокислотных остатков, и

полноразмерная форма белка с четырьмя кластерами положительно заряженных аминокислотных остатков оказывают в целом сходный стимулирующий эффект на активность PARP1, в то время как AP-CSD-фрагмент не оказывал заметного влияния на активность PARP1, что свидетельствует о преобладающей роли С-концевого домена YB-1 в регуляции активности PARP1 (**Рис. 7 А и Б**).

1.6.1. Кластеры положительно заряженных аминокислот в С-концевом домене YB-1 играют ключевую роль в регуляции активности PARP1

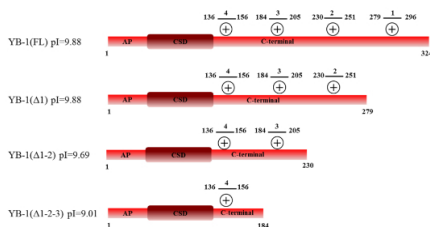


Рис. 8. Схематическое изображение доменной структуры полноразмерного белка YB-1(FL) и его делеционных мутантов.

соответственно (**Рис. 8**). Согласно полученным данным, полноразмерный YB-1 и его мутантная форма с делецией одного кластера YB-1(Δ1) оказывали в целом сходный стимулирующий эффект на уровень синтеза PAR и начальную скорость реакции поли(ADP-рибозил)ирования (**Рис. 9 А**).

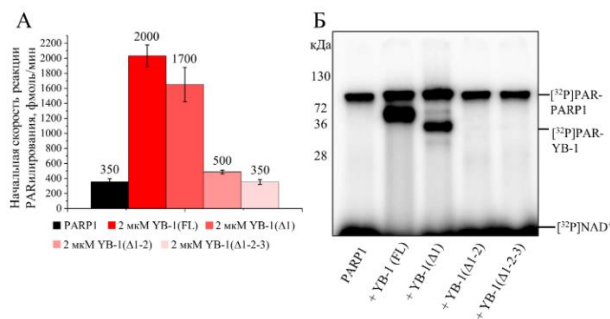


Рис. 9. Стимуляция активности PARP1 в присутствии мутантных форм YB-1 с делецией в CTD. **А:** начальные скорости реакции синтеза PAR (фмоль/мин) в присутствии YB-1(FL) или его мутантных форм. Начальная скорость была получена из обработки индивидуальных кинетических кривых накопления продуктов реакции и представлена как среднее значение ($\pm$ стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов. **Б:** анализ авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 и транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 в присутствии делеционных мутантов YB-1 методом денатурирующего гель-электрофореза. Радиоавтограф 15% SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(ADP-рибозил)ирования. Реакционные смеси содержали 100 нМ PARP1, 10 мМ ЭДТА, 0,5 OD₂₆₀/Мл ДНК_{акт} и 2 мкМ YB-1(FL) или YB-1(Δ1), или YB-1(Δ1-2), или YB-1(Δ1-2-3). Реакцию запускали добавлением NAD⁺ до конечной концентрации 20 мкМ (0,4 мКи [³²P]-меченого NAD⁺) с последующей инкубацией при 30°C в течение указанного времени (**А**) или 10 минут (**Б**).

Для двух других мутантных форм YB-1 (YB-1(Δ 1-2) и YB-1(Δ 1-2-3)) стимулирующий эффект на активность PARP1 практически не выявлялся (**Рис. 9 А**). Кроме того, YB-1(Δ 1-2) и YB-1(Δ 1-2-3) не подвергались транс-поли(ADP-рибозил)ированию (**Рис. 9 Б**). Полученные данные указывают на существенную роль кластеров положительно заряженных аминокислот С-концевого домена YB-1 в регуляции реакции поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемой PARP1.

2. Взаимодействие белков YB-1 и PARP1, опосредованное поврежденной ДНК

Ранее методом флуоресцентного титрования было показано и количественно охарактеризовано физическое взаимодействие YB-1 с PARP1, причем такие белок-белковые взаимодействия могут быть стабилизированы в присутствии поврежденной ДНК [Alemasova, E.E., et al., 2016]. На возможность формирования тройного комплекса YB-1•ДНК•PARP1 также указывают данные о том, что структура ДНК влияет на эффективность PARP1-зависимого поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 (**Рис. 3, 7**). Для анализа образования комплексов YB-1 и PARP1 с поврежденной ДНК были использованы методы флуоресцентного титрования и задержки в геле (**Рис. 10**).

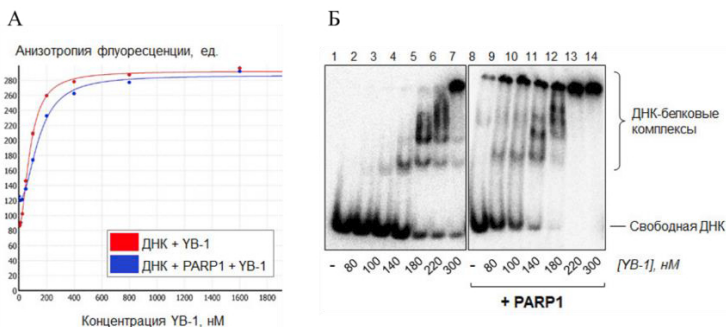


Рис. 10. YB-1 и PARP1 образуют гетеромерный комплекс на поврежденной ДНК. **А:** изменение анизотропии флуоресценции FAM-меченого ДНК-дуплекса при формировании комплексов YB-1•ДНК (красная кривая) и YB-1•PARP1•ДНК (синяя кривая). **Б:** исследование формирования комплексов YB-1•ДНК и YB-1•PARP1•ДНК методом задержки в геле. Радиоавтограф 10% ПААГ, в котором проводили разделение комплексов YB-1 и PARP1 с ДНК. Реакционные смеси содержали 100 нМ FAM-меченую (**А**) или [32 P]-меченую (**Б**) ДНК (Nick), 0-1600 нМ (**А**) или 80-300 нМ (**Б**) YB-1 и 200 нМ PARP1.

При добавлении YB-1 к смеси, содержащей ДНК или ДНК и PARP1, были детектированы различия в изменении уровня флуоресценции (**Рис. 10 А, синяя кривая**), что указывает на возможность формирования тройного комплекса YB-1•PARP1•ДНК. Результаты экспериментов по связыванию белков с ДНК методом задержки в геле показывают, что в свою очередь PARP1 стимулирует связывание YB-1 с ДНК (**Рис. 10 Б**). При этом детектируются ДНК-белковые комплексы, обладающие низкой электрофоретической подвижностью в геле, в том числе соответствующие

тройному комплексу YB-1•PARP1•ДНК. Анализ поли(ADP-рибозил)ирования белков в условиях эффективного образования комплекса YB-1•ДНК•PARP1 (Рис. 10 Б, дорожки 9-14) показывает, что YB-1 выступает в качестве преимущественной мишени модификации (Рис. 11).

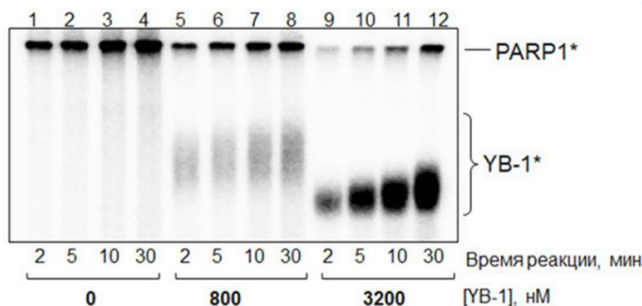


Рис. 11. YB-1 является преимущественной мишенью поли(ADP-рибозил)ирования в условиях эффективного образования тройного комплекса PARP1•ДНК•YB-1. Радиоавтограф 10% SDS-ПААГ, в котором проводилось разделение продуктов модификации белков. Реакционные смеси содержали 200 нМ PARP1, 100 нМ ДНК (Nick), 10 мМ ЭДТА, 800 или 3200 нМ YB-1. Реакцию запускали добавлением NAD⁺ до конечной концентрации 4 мкМ (0,4 мКи [³²P]-меченого NAD⁺) с последующей инкубацией при 37°C в течение 10 минут

Кроме того, поли(ADP-рибозил)ирование YB-1 резко уменьшает сродство этого белка к ДНК (Рис. 12).

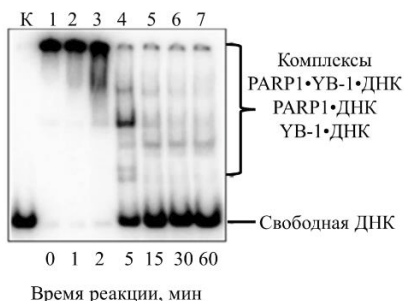


Рис. 12. Диссоциация YB-1 из комплекса с ДНК в результате его поли(ADP-рибозил)ирования. Радиоавтограф 10% ПААГ, в котором проводилось разделение комплексов YB-1•PARP1•ДНК в ходе поли(ADP-рибозил)ирования методом задержки в геле. Реакционные смеси содержали 100 нМ PARP1, 1600 нМ YB-1, 100 нМ [³²P]-меченую ДНК (Nick). Реакцию запускали добавлением NAD⁺ до конечной концентрации 400 мкМ с последующей инкубацией при 37°C в течение указанного времени. Реакцию останавливали добавлением олапариба до конечной концентрации 1 мкМ.

синтеза поли(ADP-рибозы) не происходит. Эти данные также указывают на то, что образование тройного комплекса PARP1•YB-1•ДНК является важным фактором для стимуляции активности PARP1, хотя нельзя полностью исключить возможного взаимодействия с остатком ADP-рибозы,

На основании данных, представленных на Рис. 5, можно предположить, что для транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 необходимо его нековалентное взаимодействие не только с ДНК, но и с PAR. Однако для YB-1 взаимодействие с PAR не является строго обязательным, поскольку модификация YB-1 может происходить в присутствии мутантной формы PARP1^{E988K}, которая катализирует только моно(ADP-рибозил)ирование белков [Rolli *et al.*, 1997] (Рис. 13). Из полученных данных следует, что для стимуляции активности PARP1 в присутствии YB-1 достаточно только моно(ADP-рибозил)ирования, когда

присоединенным к PARP1. Таким образом, YB-1 образует тройной комплекс с PARP1 и поврежденной ДНК и является основной мишенью поли(ADP-рибозил)ирования при активации PARP1.

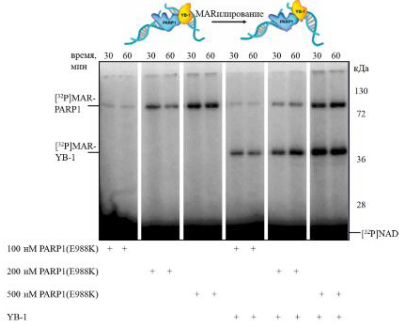


Рис. 13. Влияние YB-1 на моно(ADP-рибозил)ирующую активность PARP1^{E988K}. Радиоавтограф 10% SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов модификации PARP1^{E988K} и YB-1. Реакционные смеси содержали 100-500 нМ PARP1^{E988K}, 100 нМ ДНК (Nick), 10 мМ ЭДТА, 1600 нМ YB-1. Реакцию запускали добавлением NAD⁺ до конечной концентрации 4 мкМ (0,4 мКи [³²P]-меченого NAD⁺) с последующей инкубацией при 37°C в течение указанного времени.

формы YB-1(Δ1-2-3) (3100 нМ) было в три раза выше, чем для YB-1(FL) (1100 нМ). Этот эксперимент подтверждает предположение о том, что для стимуляции активности PARP1 является важным образование тройного комплекса PARP1•YB-1•ДНК. Так, для мутантной формы YB-1 с делецией трех кластеров положительно заряженных аминокислот, не влияющей на реакцию поли(ADP-рибозил)ирования (Рис. 9), характерно резкое снижение сродства к поврежденной ДНК. Таким образом, в случае этой формы не происходит формирование тройного комплекса PARP1•YB-1•ДНК и YB-1(Δ1-2-3) не является мишенью поли(ADP-рибозил)ирования.

Таблица 1. Значения EC ₅₀ (нМ) для комплексов YB-1(FL) и его мутантных форм с ДНК (Nick).			
YB-1(FL)	YB-1(Δ1)	YB-1(Δ1-2)	YB-1(Δ1-2-3)
1100 ± 100	1300 ± 90	1600 ± 110	3100 ± 300
Значения EC ₅₀ были определены из данных по связыванию YB-1(FL) или его мутантных форм с ДНК методом флуоресцентного титрования и соответствуют концентрации белка, при которой F – F ₀ = (F _∞ – F ₀)/2, где F ₀ , F и F _∞ – интенсивность флуоресценции раствора FAM–меченой ДНК в отсутствие белка, в присутствии белка в данной (C) и насыщающей концентрации соответственно.			

3. Взаимодействие белков YB-1 и PARP1, опосредованное PAR

3.1. Поли(ADP-рибоза) конкурирует с одноцепочечной (оцДНК) и двуцепочечной ДНК (дцДНК) за связывание с YB-1

2.1. Кластеры положительно заряженных аминокислот в С-концевом домене YB-1 играют важную роль во взаимодействии с поврежденной ДНК

Предполагается, что С-концевой домен YB-1 отвечает за неспецифическое связывание и обеспечивает высокое сродство белка к нуклеиновым кислотам [Bader et al., 2005]. Для анализа влияния СТД на связывание с ДНК было оценено сродство к ДНК полноразмерного YB-1(FL) и его С-концевых делеционных мутантов (Таблица 1). Согласно полученным данным, при постепенном укорочении С-концевого домена происходит снижение сродства YB-1 к ДНК: значение EC₅₀ для мутантной

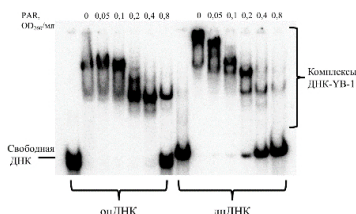


Рис. 14. Анализ взаимодействия УБ-1 с оцДНК или дцДНК в присутствии поли(АДР-рибозы). Представлен радиоавтограф 10% ПААГ, в котором проводилось разделение продуктов реакции в нативных условиях. Реакционные смеси содержали 1600 нМ УБ-1, 50 нМ [³²P]-меченую ДНК (одноцепочечную (оц) длиной 32 н.о. или двуцепочечную (дц) длиной 55 п.о.) и PAR в указанной концентрации.

уровень комплексообразования УБ-1 с одноцепочечной (оцДНК) и двуцепочечной ДНК (дцДНК) значительно снижается (**Рис. 14**).

В структуре УБ-1 выделяют два домена, которые участвуют в связывании с нуклеиновыми кислотами, домен холодового шока и С-концевой домен (**Рис. 6**) [Tanabe et al., 2015], таким образом, эти домены могут потенциально взаимодействовать с поли(АДР-рибозой), синтезируемой в процессе активации PARP1.

3.2. Последовательное укорочение С-концевого домена снижает сродство УБ-1 к поли(АДР-рибозе)

Согласно данным, представленным в предыдущих разделах (**Рис. 7, 9**), С-концевой домен УБ-1 играет ключевую роль в регуляции активности PARP1. Поэтому было проанализировано взаимодействие УБ-1 и его делеционных мутантов с полимером АДР-рибозы (**Таблица 2**). Делеция двух или трех кластеров положительно заряженных аминокислот С-концевого домена снижает способность УБ-1 связывать поли(АДР-рибозу). Значения EC₅₀ для комплексов УБ-1(FL)•PAR и УБ-1(Δ1)•PAR (~500 нМ) были соответственно в два или в четыре раза ниже, чем для комплексов УБ-1(Δ1-2)•PAR (1100 нМ) и УБ-1(Δ1-2-3)•PAR (2000 нМ) (**Таблица 2**). Полученные данные свидетельствуют о том, что делеция по крайней мере двух кластеров значительно снижает сродство мутантной формы УБ-1 к PAR.

Таблица 2. Значения EC ₅₀ (нМ) для комплексов УБ-1(FL) и его мутантных форм с поли(АДР-рибозой).			
УБ-1(FL)	УБ-1(Δ1)	УБ-1(Δ1-2)	УБ-1(Δ1-2-3)
550 ± 50	450 ± 50	1100 ± 100	2000 ± 200
Значения EC ₅₀ были определены из данных по связыванию УБ-1(FL) или его мутантных форм с [³² P]-меченой PAR методом задержки в геле и соответствуют концентрации белка, при которой 50% молекул PAR находятся в комплексе, представлены как среднее значение (± стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов.			

Результаты экспериментов по комплексообразованию УБ-1 и PARP1 с поврежденной ДНК (**Рис. 10-12**) указывают на то, что формируется тройной комплекс УБ-1•PARP1•ДНК. Однако многие ДНК/РНК-связывающие белки способны взаимодействовать с поли(АДР-рибозой) [Lukong et al., 2008]. Для исследования способности поли(АДР-рибозы) конкурировать с ДНК за связывание белка УБ-1 был получен очищенный препарат поли(АДР-рибозы). Было показано, что в присутствии поли(АДР-рибозы)

3.3. Влияние YB-1 на длину синтезируемой поли(ADP-рибозы) в реакции авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1

Связывание YB-1 с поли(ADP-рибозой), формирующейся в процессе активации PARP1 может оказывать влияние на характер образования продуктов этой реакции. Для того, чтобы оценить влияние YB-1 на синтез PAR, размеры поли(ADP-рибозил)ированной PARP1 были проанализированы методом атомно-силовой микроскопии (АСМ). На **Рис. 15** представлено распределение размеров модифицированных молекул PARP1, наблюдаемых в присутствии Mg^{2+} , Mg^{2+} и YB-1, YB-1 или в отсутствие кофакторов. Анализ АСМ изображений показал, что молекулы модифицированного белка достаточно гетерогенны по размерам (**Рис. 15 А, Б**). В присутствии ионов Mg^{2+} удастся зарегистрировать модифицированные молекулы размером до 26000 нм² (**Рис. 15 А**). В отсутствие ионов Mg^{2+} , размер поли(ADP-рибозил)ированных молекул не превышал 4200 нм² (**Рис. 15 Б**). Добавление YB-1 к Mg^{2+} -зависимой системе ингибировало элонгацию поли(ADP-рибозы) (**Рис. 15 Б**). Для YB-1-зависимой реакции и для реакции в отсутствие кофакторов (Mg^{2+} или YB-1) средний размер модифицированного PARP1 составил 1556 и 2028 нм² соответственно (**Рис. 15 В**). Таким образом, из полученных данных следует, что присутствие YB-1 в реакционной смеси оказывает ингибирующий эффект на длину синтезируемого полимера ADP-рибозы в процессе авто-модификации PARP1.

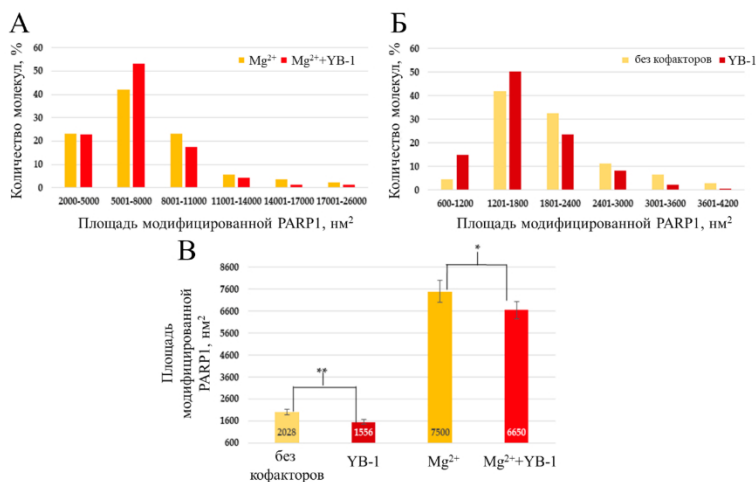


Рис. 15. Анализ размеров поли(ADP-рибозил)ированной PARP1 в присутствии Mg^{2+} (**А**), Mg^{2+} и YB-1 (**А**), YB-1 (**Б**), в отсутствие кофакторов (**Б**) методом АСМ. На гистограммах представлено процентное содержание модифицированных молекул. Количество проанализированных поли(ADP-рибозил)ированных молекул: 91 в случае Mg^{2+} , 81 в случае Mg^{2+} и YB-1, 133 в случае отсутствия кофакторов и 145 в случае YB-1. **В**: средний размер модифицированных молекул PARP1. Для оценки площади модифицированного белка использовали минимальный и максимальный размеры (нм) радиусов эллипса, окружающего поли(ADP-рибозил)ированную молекулу на АСМ-изображении.

Таким образом, можно предположить, что YB-1 связывается с растущим полимером ADP-рибозы в процессе автомодификации PARP1 и ингибирует его элонгацию. Наблюдаемый эффект показывает, что взаимодействие YB-1 с PAR вносит существенный вклад в регуляцию активности PARP1.

3.4. Влияние структуры PAR на стимуляцию активности PARP1 в присутствии YB-1

3.4.1. Характеризация мутантов PARP1

Для того, чтобы выяснить влияние структуры PAR на YB-1-зависимую регуляцию активности PARP1, были использованы мутантные формы PARP1: PARP1^{Y986S}, PARP1^{Y986H}, PARP1^{G972R}. По сравнению с PARP1 дикого типа (PARP1wt) PARP1^{Y986S} синтезирует короткие и умеренно разветвленные (количество точек ветвления увеличено в два раза), PARP1^{Y986H} синтезирует короткие и разветвленные (количество точек ветвления увеличено в 16 раз), PARP1^{G972R} синтезирует короткие гипоразветвленные (количество точек ветвления меньше в 1,5 раза) полимеры ADP-рибозы [Rolli, V., et al., 1997]. Методом АСМ нами были проанализированы морфологические особенности авто-поли(ADP-рибозил)ированных молекул PARP1wt, PARP1^{Y986S}, PARP1^{Y986H} и PARP1^{G972R} (Рис. 16). Из АСМ-изображений видно, что поли(ADP-рибозил)ированная PARP1wt имеет большой размер и звездообразную структуру (рис. 16 А), тогда как модифицированная PARP1^{Y986S} имеет неопределенную форму и гораздо меньший размер молекул (Рис. 16 Б). Модифицированные молекулы PARP1^{Y986H} выглядят как небольшие сфероподобные структуры с плотно упакованными полимерными цепями (Рис. 16 В). Поли(ADP-рибозил)ированные PARP1^{Y986S} и PARP1^{G972R} имеют сопоставимые размеры и схожую морфологию (данные не представлены).

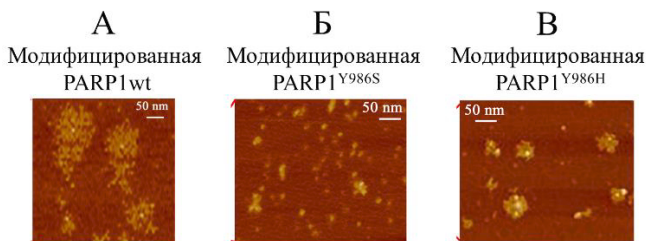


Рис. 16. АСМ-визуализация поли(ADP-рибозил)ированных молекул PARP1wt (А) или её мутантных форм PARP1^{Y986S} (Б) и PARP1^{Y986H} (В). Масштаб сканирования: 500 нм по оси X и Y, 5 нм по оси Z для PARP1wt и PARP1^{Y986S}, 6 нм по оси Z для PARP1^{Y986H}.

Таким образом, все внесенные точечные мутации PARP1 приводят к значительному изменению в морфологии авто-поли(ADP-рибозил)ированных молекул.

3.4.2. Определение сродства YB-1 к разным типам поли(ADP-рибозы)

Для проверки гипотезы о том, что эффективность связывания YB-1 с PAR зависит от структуры синтезированного полимера, нами было оценено сродство полноразмерной формы YB-1(FL) к препаратам PAR, полученным за счет активности PARP1 wt или одной из её мутантных форм (**Таблица 3**).

Таблица 3. Значения EC_{50} (нМ) для комплексов YB-1(FL) с PAR, синтезированной PARP1 wt или мутантными формами этого белка.			
PARwt	PAR ^{Y986S}	PAR ^{Y986H}	PAR ^{G972R}
550 ± 50	1000 ± 100	750 ± 75	500 ± 50
Значения EC_{50} были определены из данных по связыванию YB-1(FL) с [³² P]-меченой PAR методом задержки в геле и соответствуют концентрации белка, при которой 50% молекул PAR находятся в комплексе, представлены как среднее значение (± стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов.			

Согласно полученным данным, YB-1 связывается с более высоким сродством к длинному регулярно разветвленному PAR (PARwt), чем к короткому регулярно разветвленному (PAR^{Y986S}) или короткому гиперразветвленному (PAR^{Y986H}) полимеру, но имеет сравнимую аффинность связывания с PARwt и коротким гипоразветвленным полимером (PAR^{G972R}) (**Таблица 3**). Таким образом, структура PAR, её длина и количество точек ветвления, могут оказывать влияние на эффективность комплексообразования YB-1 с PAR.

3.4.3. YB-1 стимулирует активность мутантов PARP1, синтезирующих разветвленные или линейные PAR

Структура PAR также может оказывать влияние на YB-1-зависимую стимуляцию активности PARP1, поэтому было оценено влияние YB-1(FL) на активность мутантных форм PARP1 (**Рис. 17**).

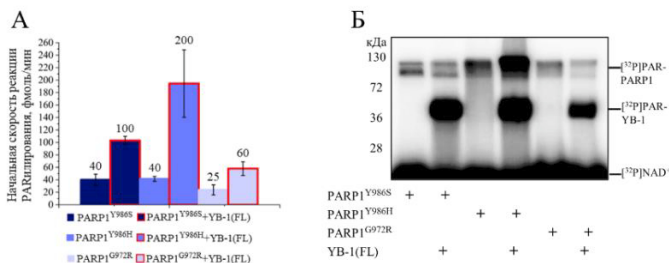


Рис. 17. YB-1 стимулирует активность мутантных форм PARP1. **А:** начальные скорости реакции синтеза PAR (фмоль/мин) мутантами PARP1 в присутствии YB-1(FL). Начальная скорость была получена из обработки индивидуальных кинетических кривых накопления продуктов реакции и представлена как среднее значение (± стандартное) отклонение для трех независимых экспериментов. **Б:** анализ авто-поли(ADP-рибозилирования) YB-1 методом денатурирующего гель-электрофореза. Радиоавтограф 10% SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(ADP-рибозилирования). Реакционные смеси содержали 100 нМ PARP1^{Y986S} или PARP1^{Y986H}, или PARP1^{G972R}, 10 мМ ЭДТА, 0,5 OD₂₆₀/мл ДНК_{акт}, и 2 мкМ YB-1(FL). Реакцию запускали добавлением NAD⁺ до конечной концентрации 20 мкМ (0,4 мКи [³²P]-меченого NAD⁺) с последующей инкубацией при 30°C в течение указанного времени.

Как и в случае PARP1 дикого типа, YB-1 стимулировал активность её мутантных форм, повышая скорость суммарного синтеза PAR в 2,5 раза для PARP1^{Y986S} и PARP1^{Y986H} и в 4,5 раза для PARP1^{G972R} (Рис. 17 А). Следует также отметить, что транс-поли(ADP-рибозил)ирование YB-1 наблюдалось в случае всех мутантов PARP1 (Рис. 17 Б). В случае PARP1^{Y986S} и PARP1^{G972R} уровень поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 был значительно выше, чем уровень авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1, достигая 87% и 83% от общей модификации белков (Рис. 17 Б). В тоже время для PARP1^{wt} и PARP1^{Y986H} уровень транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 составлял 60% и 62.5%, соответственно (Рис. 17 Б).

Таким образом, можно заключить, что структура синтезируемой PAR (длина и количество точек ветвления) может влиять на YB-1 зависимую стимуляцию активности поли(ADP-рибозил)ирования, приводя к перераспределению между уровнями авто- и транс-поли(ADP-рибозил)ирования белков.

На основании полученных нами данных предложен молекулярный механизм, обеспечивающий способность РНК(PAR)-связывающего белка YB-1 стимулировать активность PARP1 (Рис. 18).

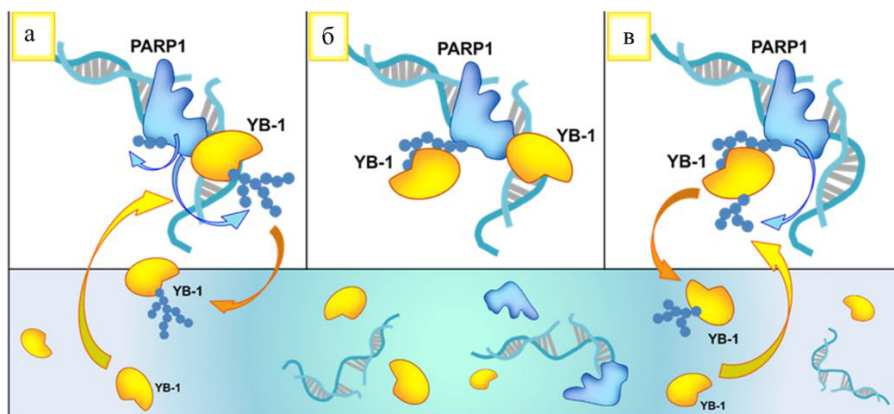


Рис. 18. Модель механизма регуляции активности PARP1 белком YB-1.

А: Образование гетеромерного комплекса PARP1•YB-1 с поврежденной ДНК. В тройном комплексе YB-1 является преимущественной мишенью поли(ADP-рибозил)ирования, в то же время происходит автомодификация PARP1.

Б: Образование комплекса YB-1 с поли(ADP-рибозой), ковалентно присоединенной к PARP1. При достижении полимером достаточной длины, взаимодействие YB-1 с PAR преобладает над формированием гетеромерных комплексов YB-1•PARP1 на ДНК.

В: Связываясь с PAR, ковалентно присоединенной к PARP1, YB-1 препятствует элонгации полимера. Модифицированные молекулы YB-1 диссоциируют из комплексов с PAR, и новые немодифицированные молекулы YB-1 связываются с молекулой PAR на PARP1. Диссоциация поли(ADP-рибозил)ированных молекул и последующее связывание немодифицированных молекул увеличивает число оборотов реакции поли(ADP-рибозил)ирования.

Заключение

На сегодняшний день РНК-связывающие белки рассматриваются как возможные участники поддержания стабильности генома. Детальное понимание путей регуляции PARP1 и, особенно, её стимуляции внутриклеточными белками, могут иметь важнейшее значение для разработки и использования ингибиторов PARP1 в противоопухолевой терапии. В химиорезистентных опухолевых клетках наблюдается значительное повышение уровня белка YB-1, а также его преимущественная ядерная локализация, поэтому в настоящее время YB-1 является молекулярным маркером в диагностике и возможной мишенью в терапии онкологических заболеваний. В связи с тем, что PARP1 является важнейшей мишенью для фармакологического воздействия в терапии онкозаболеваний, исследование механизма стимуляции активности PARP1 другими белками имеет значительный научный интерес и практическую значимость. На основании результатов, полученных в рамках настоящей работы, предложен механизм влияния YB-1 на реакцию поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемую PARP1. Детальное понимание механизмов регуляции PARP1 и, особенно, стимуляции её активности может иметь важнейшее значение для PARP1-направленной терапии и разработки ингибиторов данного фермента. Мы полагаем, что механизмы стимуляции PARP1, подобные обнаруженному нами для YB-1, могут иметь место и в случае других РНК(PAR)-связывающих белков для которых уже установлено их поли(ADP-рибозил)ирование и/или взаимодействие с PAR.

Работа поддержана грантом Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2020-773).

Выводы

1. Мультифункциональный белок YB-1 способен стимулировать активность поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 (PARP1) в присутствии поврежденной ДНК, как свободной, так и в составе моонуклеосом, увеличивая начальную скорость реакции и суммарный выход реакции поли(ADP-рибозил)ирования. Показано, что YB-1 снижает эффективность ингибиторов активности PARP1 3-аминобензамида и олапариба. Установлено, что в тройном комплексе (PARP1•поврежденная ДНК•YB-1) YB-1 становится преимущественной мишенью в реакции моно- и поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемой мутантной формой PARP1^{E988K} или белком дикого типа соответственно.
2. Неструктурированный С-концевой домен YB-1, содержащий четыре кластера положительно заряженных аминокислот, играет ключевую роль в регуляции активности PARP1. Установлено, что поэтапное удаление данных кластеров снижает сродство YB-1 к поврежденной ДНК и поли(ADP-рибозе). Делеционные формы YB-1, в которых отсутствует С-концевой домен или удалено два кластера положительно заряженных аминокислот, не способны

стимулировать активность PARP1 и подвергаться транс-поли(ADP-рибозил)ированию.

3. Методами атомно-силовой микроскопии и динамического светорассеяния установлены морфологические различия между молекулами PARP1 дикого типа, синтезирующими длинные регулярно разветвленные фрагменты PAR и мутантными формами PARP1, синтезирующими короткие PAR с высокой или низкой степенью ветвления.

4. Показано, что YB-1 при взаимодействии с синтезируемым полимером ADP-рибозы в процессе авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 способен ингибировать элонгацию цепи. Установлено, что YB-1 стимулирует активность мутантных форм PARP1, синтезирующих короткие полимеры ADP-рибозы с высокой или низкой степенью ветвления. Сродство YB-1 к короткому регулярно разветвленному или гиперразветвленному PAR ниже, чем к длинному регулярно разветвленному или короткому гипоразветвленному полимеру. Изменения длины и степени разветвления синтезированной поли(ADP-рибозы) в процессе автомодификации мутантных форм PARP1 сопровождаются изменением относительного уровня транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1.

Список публикаций по теме диссертации

1. Alemasova, E.E., **Naumenko, K.N.**, Pestryakov, P.E., Lavrik, O.I. Production, purification of the recombinant analog of Y-box-binding protein 1 and its interaction with poly(ADP-ribose), RNA, single- and double-stranded DNAs // *Biopolymers and Cell*, 2017. Vol. 33. P. 214–220.
2. Alemasova, E.E., **Naumenko, K.N.**, Kurgina, T.A., Anarbaev, R.O., Lavrik, O.I. The multifunctional protein YB-1 potentiates PARP1 activity and decreases the efficiency of PARP1 inhibitors // *Oncotarget*, 2018. Vol. 9, № 34. P. 23349-23365.
3. **Naumenko K.N.**, Sukhanova M.V., Hamon L., Kurgina T.A., Alemasova E.E., Kutuzov M.M., Pastré D., Lavrik O.I. Regulation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 Activity by Y-Box-Binding Protein 1 // *Biomolecules*, 2020. Vol. 10, № 9. P. 1325.
4. **Naumenko K.N.**, Sukhanova M.V., Hamon L., Kurgina T.A., Anarbaev R.O., Mangerich A., Pastré D., Lavrik O.I. The C-Terminal Domain of Y-Box Binding Protein 1 Exhibits Structure-Specific Binding to Poly(ADP-Ribose), Which Regulates PARP1 Activity // *Front Cell Dev Biol*, 2022. Vol. 10. P. 831741.
5. Алемасова, Е.Э., **Науменко К.Н.**, Суханова М.В., Лаврик О.И. Роль YB-1 в регуляции процесса поли(АДФ-рибозил)ирования, катализируемого поли(АДФ-рибоза)полимеразами // *Успехи биологической химии*, 2022. Vol. 62. P.63-98.