

Российская Академия наук
Сибирское отделение
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины

На правах рукописи

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

Науменко Константин Николаевич

1.5.3 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

д.х.н., акад. РАН Лаврик Ольга Ивановна

к.б.н. Суханова Мария Владиславовна

Новосибирск 2023

Оглавление

Список сокращений	5
Введение	7
1. Функции и механизм действия PARP1 и её взаимодействие с РНК-связывающими белками (Обзор литературы)	12
1.1. Структура PARP1 и механизм реакции поли(ADP-рибозил)ирования	13
1.1.1. Доменная организация структуры PARP1	13
1.1.2. Поли(ADP-рибозил)ирование и метаболизм поли(ADP-рибозы)	14
1.1.3. Роль посттрансляционных модификаций в регуляции активности и функций PARP1	17
1.2. ДНК-зависимый синтез поли(ADP-рибозы): механизм реакции и регуляция автополи(ADP-рибозил)ирования PARP1	22
1.2.1. PARP1: активация в ответ на повреждение ДНК	22
1.2.3. ДНК-связывающие белки, как регуляторы активности PARP1	26
1.2.4. РНК-связывающие белки, как регуляторы активности PARP1	28
1.3. Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1): структурно-функциональная организация, регуляция функций и участие в ДНК- и РНК-зависимых процессах	33
1.3.1. Доменная организация структуры YB-1	33
1.3.2. Взаимодействие YB-1 с нуклеиновыми кислотами	34
1.3.3. Функции YB-1 в клетке и их регуляция	35
1.4. Заключение	40
2. Материалы и методы исследования	42
2.1. Материалы	42
2.1.1. Реактивы, радиоактивные материалы, препараты нуклеотидов и олигонуклеотидов	42
2.1.2. Ферменты и белки	45
2.1.3. Бактериальные штаммы и плазмидные ДНК	45
2.2. Методы исследования	45
2.2.1. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном геле	45
2.2.2. Электрофоретическое разделение белков по Лэммли	46
2.2.3. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в денатурирующем ПААГ	46

2.2.4. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в неденатурирующих условиях.....	46
2.2.5. Количественная обработка гелей	47
2.2.6. Получение ДНК-субстратов.....	47
2.2.7. Синтез радиоактивного NAD ⁺ и полимера ADP-рибозы	50
2.2.8. Определение концентрации белка по методу Брэдфорда	51
2.2.9. Определение концентрации препарата ДНК.....	51
2.2.10. Получение культуры клеток, трансформированной плазмидной ДНК	51
2.2.11. Получение ПЦР продуктов	51
2.2.12. Получение плазмид pLate51-YB-1, pLate51-YB-1(1-219), pLate31-YB-1(Δ 1), pLate31-YB-1(Δ 1-2), pLate31-YB-1(Δ 1-2-3), pLate31-CTD, кодирующих белок YB-1 или его мутантные формы.....	53
2.2.13. Выделение и очистка рекомбинантных белков YB-1, YB-1(1-219), YB-1(Δ 1), YB-1(Δ 1-2) или YB-1(Δ 1-2-3), CTD из биомассы клеток <i>E.coli</i>	54
2.2.14. Получение плазмид pET-32a-PARP1(Y986S), pET-32a-PARP1(Y986H), pET-32a-PARP1(G972R), pET-32a-PARP1(E988K), кодирующих мутантные формы белка PARP1	56
2.2.15. Выделение и очистка рекомбинантного белка PARP1 ^{wt} и её мутантных форм PARP1(Y986S), PARP1(Y986H), PARP1(G972R), PARP1(E988K)	56
2.2.16. Исследование взаимодействия YB-1 и его мутантных форм с поврежденной ДНК и нуклеосомной ДНК методом флуоресцентной спектроскопии.....	57
2.2.17. Исследование взаимодействия YB-1 и его мутантных форм с поли(ADP-рибозой) методом задержки в геле	58
2.2.19. Анализ активности PARP1 в присутствии YB-1 и его мутантных форм	59
2.2.20. Исследование уровня поли(ADP-рибозил)ирования белков	60
2.2.21. Измерение размера поли(ADP-рибозил)ированной PARP1 методом атомно-силовой микроскопии (АСМ)	60
2.2.22. Измерение гидродинамического радиуса поли(ADP-рибозил)ированных молекул PARP1 методом динамического светорассеяния (ДСР).....	61
3. Результаты и их обсуждение	62
3.1. YB-1 как фактор, стимулирующий активность PARP1	62
3.1.1. Стимуляция поли(ADP-рибоза)полимеразной активности PARP1 в присутствии YB-1	62

3.1.2. Влияние YB-1 на активность PARP1 в присутствии ДНК-дуплексов, содержащих различные типы повреждений	65
3.1.3. YB-1 стимулирует активность PARP1 в присутствии нуклеосомной ДНК.....	66
3.2. Механизмы YB-1-зависимой стимуляции активности PARP1	70
3.2.1. Сравнительный анализ влияния Mg ²⁺ , спермина, гистонов и YB-1 на активность PARP1	70
3.2.2. YB-1 стимулирует активность PARP1 в присутствии ингибиторов этого фермента.....	72
3.3. Участие различных доменов YB-1 в регуляции активности PARP1	73
3.3.1. Кластеры положительно заряженных аминокислот в С-концевом домене YB-1 играют ключевую роль в регуляции активности PARP1.....	76
3.4. Взаимодействие белков YB-1 и PARP1, опосредованное поврежденной ДНК	78
3.4.1. Кластеры положительно заряженных аминокислот в С-концевом домене YB-1 играют важную роль во взаимодействии с поврежденной ДНК	81
3.5. Взаимодействие белков YB-1 и PARP1, опосредованное PAR.....	82
3.5.1. Кластеры положительно заряженных аминокислот в С-концевом домене YB-1 играют важную роль во взаимодействии с PAR	83
3.5.2. YB-1 способен образовывать гетеромерный комплекс с PARP1 на PAR.....	85
3.5.3. Влияние YB-1 на длину синтезируемой поли(ADP-рибозы) в реакции авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1.....	86
3.5.4. Влияние структуры PAR на стимуляцию активности PARP1 в присутствии YB-1	92
Заключение	101
Выводы	103
Список литературы.....	104
Приложение	121

Список сокращений

A₂₆₀ – оптическая плотность

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

AP-сайт – апуриновый/апиримидиновый сайт

Ape1 – апуриновая/апиримидиновая эндонуклеаза 1 человека

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

ATP – аденозин-5'-трифосфат

BER – эксцизионная репарация оснований

CRS – сайт удержания в цитоплазме

CSD – домен холодового шока белка YB-1

CTD – C-концевой домен YB-1 (130-324)

FEN1 – флэп-эндонуклеаза 1

HEPES – N-[2-гидроксиэтил]пиперазин-N'-[2-этансульфоная кислота]

hnRNP – гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин

IDP – внутренне неупорядоченный белок

IDPR – внутренне неупорядоченная область (или участок) белка

LigI – ДНК-лигаза I

LigIII α – ДНК-лигаза III α

MDR1 – ген множественной лекарственной устойчивости

NAD⁺ – никотинамидадениндинуклеотид

NER – эксцизионная репарация нуклеотидов

NLS – сайт ядерной локализации

NMNAT – никотинамид мононуклеотид аденилилтрансфераза

PAR – поли(ADP-рибоза)

PARG – поли(ADP-рибоза)-гликогидролаза

PARP1 – поли(АДФ-рибоза)полимераза 1

PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток

PMSF – фенилметилсульфонилфторид

RBD – РНК-связывающий домен белка

RBP – РНК-связывающий белок

RNP – рибонуклеопротеиновый комплекс

RRM – РНК-распознающий мотив

SDS – додецилсульфат натрия

Tris – трис-гидроксиметил-аминометан

Udg – урацил-ДНК-гликозилаза E.coli

YB-1 – Y-бокс-связывающий белок 1

YB-1(1-219) – ядерная форма YB-1

XPA – фактор пигментной ксеродермы комплементационной группы А

XRCC1 – белок, продукт гена группы перекрёстной комплементации, ответственной за радиочувствительность клеток

БСА – бычий сывороточный альбумин

ДНКакт. – активированная ДНК (ДНК, обработанная ДНКазой I)

дцДНК – двухцепочечная ДНК

ДТТ – дитиотреитол

мРНК – матричная РНК

оцДНК – одноцепочечная ДНК

ПААГ – полиакриламидный гель

ПСА – персульфат аммония

ПТМ – посттрансляционная модификация белка

ТЕМЕД – N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин

ТХУ – трихлоруксусная кислота

УФ-свет – ультрафиолетовый свет

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота

Введение

Актуальность работы

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 [1]. 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 [2]. 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 [3]. 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 [4]. Кроме того, многие из них являются мишенями поли(ADP-рибозил)ирования или способны взаимодействовать с PAR [213]. 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 [5,6]. 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 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 авто-поли(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 [190-205]. 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-рибозилирования). 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.

Апробация работы. Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 статей, индексируемых в базах Web of Science и Scopus. Результаты работы были представлены на 6 международных и российских конференциях.

Статьи

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.

Тезисы конференций

К. Naumenko, E. Alemasova, O. Lavrik. Interaction of PARP1 and its regulatory protein, YB-1, is modulated by PAR // The 43rd FEBS Congress, 6-13 July 2018, Prague, Czech Republic.

К. Naumenko, E. Alemasova, O. Lavrik. Modulatory effect of PAR on PARP1-YB-1 interactions // *Bioinformatics of Genome Regulation and Structure\ Systems Biology*, 20-25 August 2018, Novosibirsk, Russia.

Науменко К. Н., Алемасова Е. Э., Лаврик О.И. Взаимодействие между PARP1 и его регуляторным белком YB-1 модулируется PAR // *Биотехнология — медицине будущего*, 29-2 июля 2019, Новосибирск.

Naumenko K.N., Sukhanova M.V., Alemasova E.E., Kurgina T.A., Kutuzov M.M., Lavrik O.I. Y-box-binding protein 1 as regulator of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity // *Systems Biology and Bioinformatics*, 14–20 September 2020, Republic of the *Crimea, Russia*.

Naumenko K.N., Sukhanova M.V., Hamon L., Kurgina T.A., Alemasova E.E., Kutuzov M.M., Pastre D., Lavrik O.I. Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity by Y-box-binding protein 1 // FEBS PARP2021, ADVANCED COURSE, PARP: Research on the family of poly(ADP-ribose) polymerases, 7 - 10 September 2021, Barcelona, Spain.

Naumenko K.N., Sukhanova M.V., Kurgina T.A., Anarbaev R.O., Alemasova E.E., Kutuzov M.M., Lavrik O.I. Regulation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 activity by Y-box-binding protein 1 // BGRS/SB-2022, 04-08 July 2022, Novosibirsk, Russia.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка литературы. 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.

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.

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

1. Функции и механизм действия PARP1 и её взаимодействие с РНК-связывающими белками (Обзор литературы)

Поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARPs) или ARTDs (Diphtheria toxin-like ADP-Ribosyl-transferases) образуют обширное семейство белков, насчитывающее 17 представителей, содержащих консервативный каталитический домен [7]. На сегодняшний день известно, что в клеточном ответе на повреждения ДНК участвуют только три представителя семейства – PARP1, PARP2, PARP3 [8]. PARP 1-3 – это ДНК-зависимые ферменты, которые активируются в присутствии поврежденной ДНК. Активируясь на повреждениях ДНК и используя в качестве субстрата NAD^+ , PARP1 и PARP2 катализируют синтез полимера ADP-рибозы, при этом осуществляя собственную ковалентную модификацию этим полимером – авто-поли(ADP-рибозил)ирование, а также модификацию других белков-акцепторов – транс-поли(ADP-рибозил)ирование. В отличие от PARP1 и PARP2, PARP3 катализирует моно(ADP-рибозил)ирование белков [9]. Из трех PARPs, активируемых поврежденной ДНК, PARP1 является наиболее изученным ферментом. PARP1 синтезирует до 90% всей клеточной поли(ADP-рибозы) (PAR) в ответ на повреждение ДНК и считается одним из ключевых регуляторов процесса репарации ДНК и целого ряда других клеточных процессов: транскрипции [10], репликации [11], формирования веретена деления [12] и формирования ядрышек [13]. С одной стороны, такая ковалентная модификация приводит к эффективной диссоциации белков из комплексов с ДНК или РНК, как результат электростатического отталкивания между PAR и нуклеиновыми кислотами. С другой стороны, синтез PAR можно рассматривать как сигнал, привлекающий белки в PARP1-зависимые клеточные процессы. В последнее время опубликовано множество данных, описывающих поли(ADP-рибозил)ирование различных белков-мишеней. В клетках человека было идентифицировано около 2389 белков, которые могут не только моно- или поли(ADP-рибозил)ироваться, но и напрямую взаимодействовать с поли(ADP-рибозой), синтезируемой PARPs *in vitro* и *ex vivo* [14-18]. Первоначально было показано, что предпочтительными мишенями для PARPs являются сами поли(ADP-рибоза)полимеразы и ДНК-связывающие белки, такие как гистоны и факторы репарации ДНК [15]. Позже, с использованием метода масс-спектрометрического анализа для идентификации белков, ассоциированных с поли(ADP-рибозой), было обнаружено, что многие РНК-связывающие белки поли(ADP-рибозил)ируются или взаимодействуют с поли(ADP-рибозой) в условиях генотоксического стресса [17-19]. Одним из потенциальных кандидатов на роль белка, локализующегося в месте повреждения ДНК PAR-зависимым путем и белка-акцептора PAR в условиях генотоксического стресса,

является мультифункциональный Y-бокс-связывающий белок (YB-1). YB-1 был открыт, как РНК-связывающий белок [20], однако позже была показана его ассоциация с ДНК- и PAR-зависимыми процессами [5,6].

В работах [5,17,19,213] была показана возможность поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 *in vitro* и *in vivo* за счет активности PARP1, в связи с чем возникло предположение о функциональном взаимодействии YB-1 и PARP1 на поврежденной ДНК.

В первой части настоящего обзора рассмотрены особенности структурной организации поли(ADP-рибоза)полимераз, на примере PARP1, синтеза и деградации поли(ADP-рибозы), и изложены современные представления о регуляции активности PARP1 за счет посттрансляционных модификаций и ДНК/РНК-связывающих белков. Во второй части обзора рассмотрены особенности структурной организации РНК-связывающего белка YB-1, его функции в РНК/ДНК-зависимых клеточных процессах.

1.1. Структура PARP1 и механизм реакции поли(ADP-рибозил)ирования

1.1.1. Доменная организация структуры PARP1

Фермент PARP1 человека состоит из 1014 аминокислотных остатков и в его структуре можно выделить следующие домены: ДНК-связывающий домен, домен аутомодификации, WGR-домен и каталитический домен, содержащий высококонсервативную последовательность «PARP signature» (Рис. 1.1).

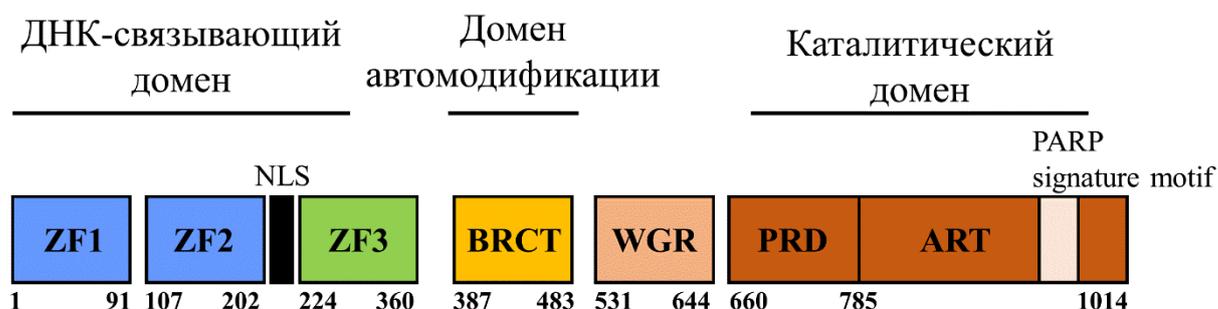


Рис. 1.1. Схематическое изображение доменной структуры PARP1. ZF 1-3 – «цинковые пальцы»; BRCT – мотив в домене аутомодификации, сходный с С-концевым доменом белка-супрессора рака молочной железы 1 (BRCA, breast cancer type 1 susceptibility protein), NLS (nuclear localization signal) – сигнал ядерной локализации и сайт расщепления каспазой 3, WGR – консервативный мотив с повышенным содержанием триптофана (W), глицина (G) и аргинина (R), PRD (PARP regulation domain) – регуляторный субдомен PARP1, ART (ADP-ribosyl transferase subdomain) - каталитический субдомен.

ДНК-связывающий домен содержит два «цинковых пальца» (ZF1 и ZF2, Zinc finger), которые принимают участие в распознавании ферментом ДНК-структур, причем ДНК-связывающая активность ZF2 примерно в 100 раз выше, чем у ZF1, поэтому ZF2 необходим для быстрой локализации PARP1 на повреждениях ДНК, а ZF1 играет важную роль в

регуляции сродства PARP1 к ДНК [21]. Было показано, что PARP1 с делецией ZF1 является неактивным ферментом [22]. «Цинковый палец» 3 (ZF3) опосредует междоменное взаимодействие между N- и C- концевыми частями PARP1, необходимое для ДНК-зависимой активации фермента [23]. В домене аутомодификации сосредоточено большинство сайтов ауто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 [24], кроме того, здесь находится мотив BRCT, который участвует в образовании белок-белковых контактов [25]. Мотив WGR, названный по входящим в его состав аминокислотным остаткам триптофана (W), глицина (G), аргинина (R), играет важную роль в ДНК-зависимой активации PARP1, поскольку делеция этого мотива приводит к образованию неактивной формы фермента [22]. Каталитический домен включает в себя аутоингибиторный HD субдомен (helical subdomain, HD) или иначе PARP1 регуляторный домен (PRD, PARP regulation domain) и (ADP-рибозил)трансферазный (ART, ADP-ribose transferase) субдомен, отвечающие за регуляцию связывания NAD⁺ и (ADP-рибозил)трансферазную активность фермента соответственно [26].

Для PARP1 при взаимодействии с ДНК-субстратом были описаны конформационные перестройки внутри молекулы белка, сопровождающиеся повышением сродства белка к NAD⁺ и синтезом PAR. Предполагается, что связывание ZF1 и ZF2 с поврежденной ДНК приводит к внутримолекулярному взаимодействию между каталитическим и ДНК-связывающим доменом. Следует отметить, что аутоингибиторный HD мотив (PRD (HD)) в каталитическом домене участвует в регуляции сродства белка к NAD⁺. Свободный фермент PARP1 обладает низким сродством к молекуле NAD⁺, однако при связывании с поврежденной ДНК, в каталитическом домене фермента происходят конформационные перестройки, аутоингибиторный субдомен теряет упорядоченную структуру, в результате чего происходит более эффективное связывание NAD⁺ в каталитическом домене и это ускоряет протекание реакции ауто-поли(ADP-рибозил)ирования [27].

1.1.2. Поли(ADP-рибозил)ирование и метаболизм поли(ADP-рибозы)

Поли(ADP-рибозил)ирование – это обратимая посттрансляционная модификация белков разветвленной полимерной цепью, состоящей из остатков ADP-рибозы (**Рис. 1.2**). Фермент PARP1 осуществляет две каталитические функции: NAD⁺-гликогидролазную и ADP-трансферазную. В результате гидролиза NAD⁺ образуется остаток ADP-рибозы, который далее используется в реакции синтеза поли(ADP-рибозы): NAD⁺ + X → ADP-5'-рибоза-1'-X + никотинамид, где X– это модифицируемая аминокислота (глутаминовая кислота, аспарагиновая кислота, аргинин, лизин, серин, аспарагин, треонин, цистеин,

тирозин) в составе белка (при инициации процесса) или 2'-гидроксильная группа ADP-рибозы (при элонгации цепи полимера). Остатки ADP-рибозы в линейном полимере соединены O-гликозидными связями, которые образуются между O-2' атомом рибозы, несущей аденин, и C-1_D атомом остатка рибозы следующего мономера. В точках ветвления полимера та же самая связь образуется между O-2_D и C-1_D атомами двух остатков рибозы (**Рис. 1.2**) [28,29].

Время деградации полимера ADP-рибозы в клетке составляет порядка 7-8 часов, в то время как после воздействия реагентов, повреждающих ДНК, период полураспада поли(ADP-рибозы) составляет менее одной минуты [30]. В клетке деградация полимера преимущественно осуществляется ферментом поли(ADP-рибоза)гликогидролазой (PARG). PARG проявляет как экзо-, так и эндогликозидазную активность, катализируя гидролиз O-гликозидных связей между структурными мономерами, что приводит к образованию свободных молекул олиго(ADP-рибозы), ADP-рибозы и моно(ADP-рибозил)ированного белка [31]. Деградация поли(ADP-рибозы) может осуществляться и по альтернативному пути с участием фермента (ADP-рибозил)гидролазы 3 (ARH3) [32,33], которая подобно PARG проявляет поли(ADP-рибоза)гликогидролазную активность, гидролизуя PAR до олиго- и моно(ADP-рибозы) и также оставляя моно(ADP-рибозил)ированный белок. Таким образом, PARG и ARH3 не способны катализировать расщепление сложноэфирной или кетоаминной связи между ADP-рибозой и аминокислотным остатком в белке-акцепторе. В этом случае остаточный мономер ADP-рибозы может быть удален специальными ферментами, такими как TARG1, MacroD1 и MacroD2 [34-37]. Остаток ADP-рибозы, ковалентно присоединенный к аминокислотному остатку аргинина, может быть удален с помощью (ADP-рибозил)гидролазы 1 (ARH1) [38]. Помимо этого, были идентифицированы ферменты NUDT16 (Nudix Hydrolase) [39] и ENPP1 (Ectonucleotide pyrophosphatase 1) [40], которые обладают фосфодиэстеразной активностью и расщепляют поли(ADP-рибозу) до мономеров с образованием фосфорилированной формы белка. Было установлено, что PARG более эффективно взаимодействует с разветвленным полимером ADP-рибозы по сравнению с ARH3 [41].

На **Рис. 1.2** представлена схема поли(ADP-рибозил)ирования белков, химическое строение поли(ADP-рибозы) и указаны основные ферменты, катализирующие её деградацию в клетке.

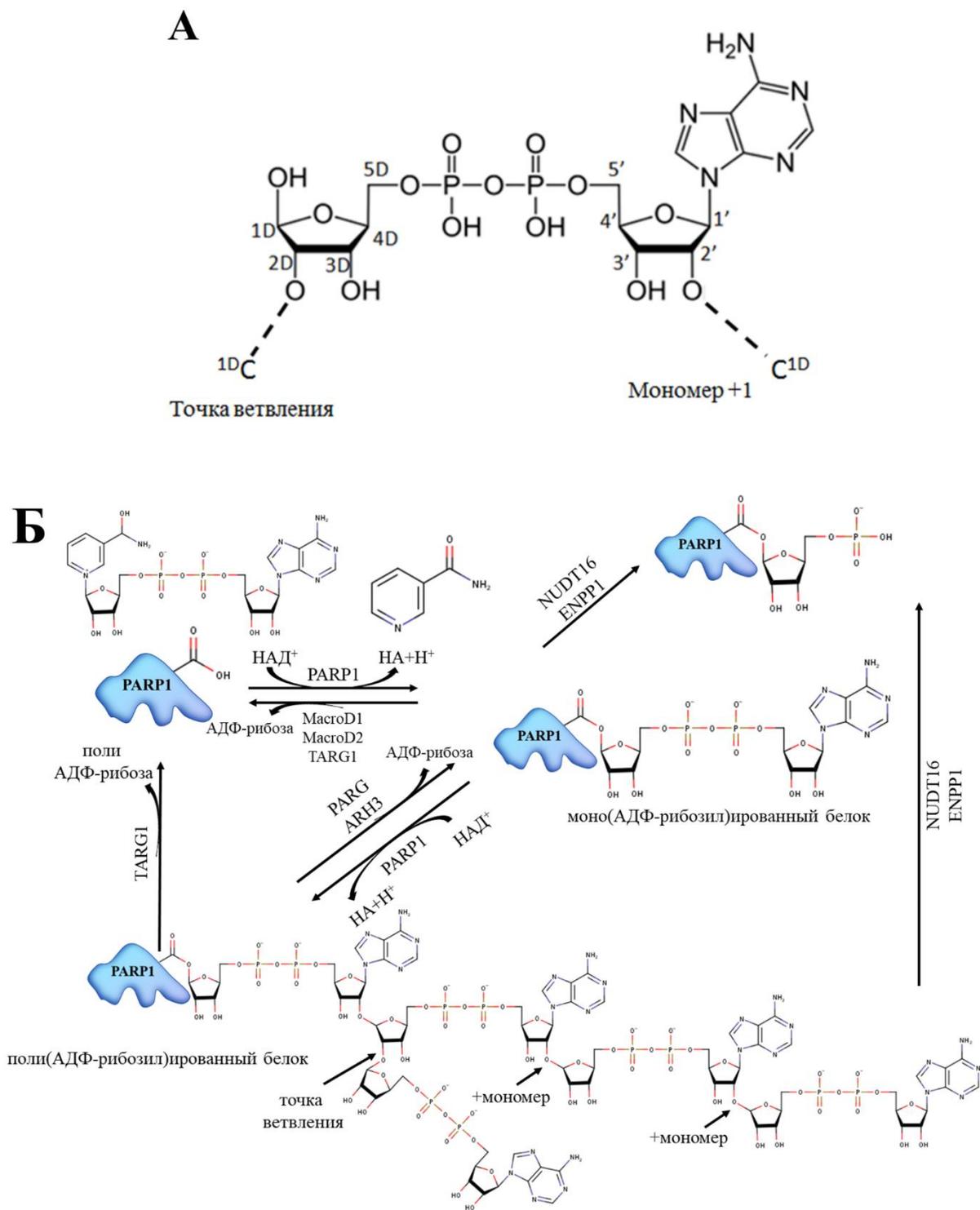


Рис. 1.2. А: строение мономера поли(ADP-рибозы) и обозначение связей остатков ADP-рибозы в линейной цепи полимера и точках ветвления [28,29].

Б: схема метаболизма поли(ADP-рибозы). Представлены ферменты, осуществляющие деградацию поли(ADP-рибозы) с образованием моно(ADP-рибозил)ированного белка-акцептора: PARG, ARH3, NUDT16, ENPP1 и ферменты, осуществляющие деградацию остаточного мономера ADP-рибозы: TARG1, MacroD1, MacroD2.

В настоящее время, на основании экспериментов *in vitro* и *ex vivo*, была выдвинута гипотеза о существовании “PAR кода” [42,43], согласно которой уровень синтеза PAR, длина и степень ветвления полимера могут быть важны для распознавания сигнала поли(ADP-рибозил)ирования белками, а также метаболизма PAR и NAD⁺. В пользу существования “PAR кода” свидетельствуют следующие аргументы:

- длина и степень разветвления полимера влияет на сродство многих белков к PAR и опосредует их избирательную локализацию в месте сигнала поли(ADP-рибозил)ирования. Так, было показано, что для гистонов [44], p53 [45], XPA [46] и Ape1 [47], сродство белков к поли(ADP-рибозе) может зависеть от длины и степени разветвленности этого полимера;
- синтез структурно-неоднородной PAR может регулировать концентрацию внутриклеточного NAD⁺, тем самым влияя на метаболические процессы внутри клетки [48];
- неоднородность структуры поли(ADP-рибозы) влияет на её катаболизм. Было показано, что длинные и неразветвленные молекулы PAR расщепляются PARC более эффективно, чем более короткие и линейные [49].

1.1.3. Роль посттрансляционных модификаций в регуляции активности и функций PARP1

В клетке PARP1 подвергается множественным посттрансляционным модификациям, поэтому предполагается, что регуляция активности и различных функций PARP1 осуществляется с помощью посттрансляционных модификаций этого белка. На сегодняшний день известно, что помимо поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 подвергается фосфорилированию, ацетилюрованию, метилированию, SUMOилированию и убиквитинилированию, а также моно(ADP-рибозил)ированию.

1.1.3.1. Фосфорилирование

Фосфорилирование PARP1 регулирует её каталитическую активность, стимулируя или ингибируя синтез поли(ADP-рибозы). Так, например, киназы ERK1/2 способствуют активации PARP1 посредством фосфорилирования по аминокислотным остаткам серина 372 и треонина 373 в домене аутомодификации [51]. Показано, что мутации S372A и T373A, вызывают снижение активности PARP1 после повреждения ДНК, тогда как фосфомиметики (S372E или T373E) с заменой 372 серина или 373 треонина на глутамат, обладают более высокой активностью, чем белок дикого типа, поэтому можно предположить, что фосфорилирование по этим сайтам необходимо для ДНК-зависимой

активации PARP1 в условиях генотоксического стресса [52]. Показано, что ингибирование ERK1/2-зависимого фосфорилирования PARP1 снижает уровень её активации после обработки культивируемых нейронов и астроцитов генотоксическими реагентами (N-метил-N-нитро-N-нитрозогуанидином (MNNG), N-метил-D-аспартатом (NMDA) или пероксинитритом, и увеличивает клеточную гибель [51].

Киназа CDK2 в комплексе с циклином E и рецептором прогестерона (PR) фосфорилирует аминокислотные остатки серина 785 и серина 786 в каталитическом домене PARP1 (Рис. 1.1), что приводит к активации фермента и увеличению уровня синтезируемой поли(ADP-рибозы) в клетках рака молочной железы при стимуляции прогестинном [53]. Предполагается, что фосфорилирование этих аминокислотных остатков приводит к изменению конформации NAD⁺-связывающего кармана внутри каталитического домена.

Рецепторная тирозинкиназа (c-Met) фосфорилирует PARP1 по аминокислотному остатку тирозина 907 в каталитическом домене [54]. Для C-Met-фосфорилированной формы PARP1 характерны более высокая ферментативная активность и изменение сродства связывания ингибиторов к данному ферменту. Таким образом, клетки опухоли становятся более чувствительными к ингибиторам PARP1 при обработке ингибиторами c-Met, а также c-Met-специфичной shPHK.

C-Jun N-концевая киназа 1 (JNK1, c-Jun N-terminal protein kinase) напрямую взаимодействует и катализирует фосфорилирование PARP1, способствуя её активации во время H₂O₂-индуцированной неапоптотической гибели клеток, однако сайты фосфорилирования пока еще не определены [55]. Нерецепторная тирозинкиназа Ttk (член семейства Tec-киназ) фосфорилирует PARP1 и фактор элонгации транскрипции EF1 α , образуя с этими белками тройной комплекс, специфически связывающийся с промотором гена IFN- γ *in vitro* [56]. Фосфорилирование PARP1, зависимое от инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-1), ингибирует её активность и приводит к усилению уровня экспрессии фактора роста эндотелия сосудов (VEGF, Vascular endothelial growth factor) [57]. Фосфорилирование PARP1 за счет активности протеинкиназы C (PKC, Protein Kinase C) приводит к уменьшению сродства PARP1 к ДНК и, как следствие, снижению интенсивности синтеза PAR.

Таким образом, фосфорилирование, как посттрансляционная модификация, оказывает модулирующее действие на каталитическую активность PARP1. Стимулирование активности PARP1 в результате фосфорилирования приводит к более эффективному ответу на генотоксический стресс и снижает уровень клеточной гибели при генотоксическом стрессе. Ингибирование активности PARP1 в результате фосфорилирования переключает целевой клеточный процесс на PARP1-независимый путь.

1.1.3.2. Метилирование

Метилирование PARP1, как посттрансляционная модификация, происходит в результате клеточного ответа на генотоксический стресс. В работе [58] была изучена возможность метилирования PARP1 лизин-специфической метилтрансферазой SMYD2 в системе *in vitro*. Методами ВЭЖХ в тандеме с масс-спектрометрией (LC-MS/MS) и секвенированием белка деградацией по Эдману было показано, что аминокислотный остаток лизина 528, расположенный в BRCT-домене, метилируется SMYD2. Было показано, что метилированная PARP1 проявляет значительно более высокую ферментативную активность, чем неметилированная форма фермента.

Также было показано, что лизин-специфическая метилтрансфераза SET7/9 метилирует PARP1 по аминокислотному остатку лизина 508, причем такая модификация в BRCT-домене может быть блокирована авто-поли(ADP-рибозил)ированием PARP1. Следует также отметить, что SET7/9-зависимое метилирование PARP1 стимулирует её активность [59].

Таким образом, на основании имеющихся данных можно заключить, что метилирование, как посттрансляционная модификация, оказывает стимулирующий эффект на каталитическую активность PARP1, что приводит к более эффективному клеточному ответу на генотоксический стресс.

1.1.3.3. Ацетилирование

Ацетилирование, как посттрансляционная модификация, опосредует функции PARP1 как регулятора транскрипции. Так, коактиватор транскрипции, комплекс p300/CBP, ацетилюет PARP1 по аминокислотным остаткам лизина 498, 505, 508, 521 и 524 в домене автомодификации (**Рис. 1.1**), как в системе *in vitro*, так и *in vivo* [60]. Показано, что ацетилирование этих остатков PARP1 необходимо для её взаимодействия с субъединицей p50 транскрипционного фактора NF-κB и его последующей коактивацией в ответ на воспалительные стимулы.

С использованием культивируемых кардиомиоцитов было показано, что ацетилирование PARP1 и её активация происходит после механического стресса и этот процесс независим от повреждения ДНК [61]. Деацетилаза гистонов - сиртуин 1 (SIRT1) может связываться с PARP1 и играть важную роль в регуляции деацетилирования PARP1 *in vivo*. SIRT1-зависимое деацетилирование PARP1 снижает её ферментативную активность. Сверхэкспрессия *SIRT1* также приводит к значительному снижению уровня мРНК *PARP1*, что наводит на мысль о том, что SIRT1 способен регулировать активность PARP1, как на посттрансляционном, так и на транскрипционном уровнях [61].

PARP1 может ацетилироваться лизиновой ацетилтрансферазой 2B (KAR2B или PCAF, P300/CBP-associated factor). Показано, что PCAF-опосредованное ацетилирование PARP1 приводит к стимуляции как авто-поли(ADP-рибозил)ирования, так и транс-поли(ADP-рибозил)ирования [61].

1.1.3.4. SUMOилирование и убиквитинилирование

В клетках эукариот модификация убиквитин-подобными белками SUMO регулирует активность многочисленных факторов и кофакторов в системе транскрипции [62]. Было показано, что PARP1 может регулировать активность многих транскрипционных факторов, влияя на их взаимодействия с промоторами генов [63]. Показано, что SUMOилирование модулирует свойства PARP1 как регулятора системы транскрипции. Лигаза SUMO E3 взаимодействует с PARP1 и опосредует поли-SUMOилирование PARP1 по аминокислотным остаткам лизина 203 и 486 в ответ на тепловой шок [64]. Такая модификация PARP1 необходима для полной активации промотора гена белка теплового шока HSP70.1. Методом иммунопреципитации хроматина было показано, что PARP1, PIAS4, SUMO2, а также убиквитин-конъюгирующий фермент E2 I (UBE2I) быстро колокализуются в промоторной области HSP70.1 при тепловом шоке. Кроме того, в ответ на тепловой шок, SUMOилированная PARP1 подвергается убиквитинилированию убиквитинлигазой RNF4, что регулирует стабильность PARP1, посредством контроля деградации SUMOилированной PARP1 [64].

Также PARP1 SUMOилируется белком SUMO3 и десумоилируется SENP1 и SENP3 по аминокислотному остатку лизина 486, который является также сайтом ацетилирования и поли(ADP-рибозил)ирования [65]. SUMOилирование по лизину 486 не влияет на авто-поли(ADP-рибозил)ирование PARP1, но тем не менее полностью ингибирует p300/CBP-зависимое ацетилирование этого белка. По сравнению с PARP1 дикого типа, мутантная форма PARP1, которая не подвергается SUMOилированию, является более эффективным коактиватором промотора гена HSP70.1, тем самым демонстрируя, что SUMOилирование PARP1 снижает её активность, как коактиватора транскрипции и регулятора экспрессии генов.

1.3.5. Поли(ADP-рибозил)ирование и моно(ADP-рибозил)ирование

Синтез поли(ADP-рибозы) и поли(ADP-рибозил)ирование белков является одной из наиболее быстрых реакций клетки в ответ на генотоксический стресс. Было показано, что в клетке преимущественной мишенью поли(ADP-рибозил)ирования являются сами поли(ADP-рибоза)полимеразы в процессе аутомодификации. Методами протеомного анализа было определено, что PARP1 может авто-поли(ADP-рибозил)ироваться по

аминокислотным остаткам аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты [66,67], лизина [22,66], аргинина [66,68], аспарагина [69], серина, треонина [70], цистеина [71] и тирозина [72]. Мишенью поли(ADP-рибозил)ирования являются преимущественно аминокислотные остатки в домене автомодификации PARP1 (**Рис. 1.1**) [67], однако такая модификация детектируется методами масс-спектрометрического анализа во всех доменах PARP1 [66,67]. Автомодификация PARP1 подавляет её ДНК-связывающую и каталитическую активность, приводит к её диссоциации из комплекса с ДНК и хроматином [73,74]. Показано, что авто-поли(ADP-рибозил)ирование PARP1 снижает её сродство к интактному хроматину, но не к нуклеосомным конструкциям, содержащими в своем составе протяженную линкерную ДНК [75]. Кроме того, модифицированная PARP1 обладает более высоким сродством к гистонам, чем немодифицированная PARP1, как в системе *in vitro*, так и *in vivo*, и может функционировать как фактор сборки нуклеосом *in vitro* [75].

Фактор поли(ADP-рибозил)ирования гистонов 1 (HPF1, Histone PARylation Factor 1) в настоящее время является единственным описанным белком, регулирующим специфичность поли(ADP-рибозил)ирования аминокислотных остатков самой PARP1 и гистонов [76]. HPF1 привлекается к местам повреждения ДНК PARP1-зависимым образом, причем этот процесс не зависит от каталитической активности PARP1. HPF1 и PARP1 могут формировать гибридный активный центр, в этом случае HPF1 посредством белок-белковых взаимодействий связывается с активированным каталитическим доменом PARP1 (т.е. когда субдомен HD находится в неструктурированном состоянии) [77,78]. Таким образом, HPF1 регулирует поли(ADP-рибозил)ирование гистонов и автомодификацию самой PARP1 [79]. В присутствии HPF1 специфичность действия PARP1 изменяется, и вместо аминокислотных остатков аспартата и глутамата, как это происходит в отсутствие HPF1, основными сайтами модификации становятся остатки серина [76].

Хроматин-ассоциированный белок SIRT6 (NAD-зависимая деацетилаза, сиртуин 6), обладающий деацетилазной и моно(ADP-рибозил)ирующей активностями, непосредственно связывается с PARP1 и моно(ADP-рибозил)ирует PARP1 по аминокислотному остатку лизина 521 [80]. Такая модификация стимулирует ферментативную активность PARP1 и способствует более эффективному протеканию процесса репарации двуцепочечных разрывов ДНК, возникающих при окислительном стрессе [80]. Мутантные формы SIRT6 (S56Y и G60A), обладающие только деацетилирующей активностью, не оказывают влияния на активность PARP1, тогда как форма SIRT6, обладающая только моно(ADP-рибозил)ирующей активностью (R65A), способна стимулировать активность PARP1.

По-видимому, регуляция активности PARP1 за счет посттрансляционных модификаций необходима для выполнения ферментом функций в определенном клеточном процессе, поскольку влияет на вовлеченность PARP1 в те или иные реакции.

1.2. ДНК-зависимый синтез поли(ADP-рибозы): механизм реакции и регуляция авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1

Обнаружение синтеза поли(ADP-рибозы) *in vivo* в ответ на появление разрывов в ДНК, послужило основой для предположения, что PARP1 активируется в ответ на генотоксический стресс [81]. Наиболее ранние доказательства, поддерживающие данную точку зрения, были получены еще в 60-е годы прошлого века, когда было показано, что в клетках, после воздействия ДНК-повреждающих агентов, наблюдается падение уровня NAD^+ [82]. Позднее было установлено, что уменьшение количества NAD^+ не связано с нарушением его биосинтеза в клетке, а обусловлено синтезом поли(ADP-рибозы), который катализирует PARP1 в ответ на повреждение ДНК [83].

1.2.1. PARP1: активация в ответ на повреждение ДНК

На сегодняшний день, PARP1 рассматривается как “молекулярный сенсор” разрывов ДНК и универсальный регулятор репарации ДНК [50]. Поврежденные основания и одноцепочечные разрывы ДНК являются основным типом повреждений, которые индуцируют синтез поли(ADP-рибозы) *in vivo*, что предполагает взаимосвязь активации PARP1 и процесса эксцизионной репарации оснований (BER, base excision repair) [50]. BER – один из основных путей репарации, направленный на исправление наиболее часто встречающихся повреждений ДНК – апуриновых/апиримидиновых сайтов и модифицированных оснований, подвергшихся окислению, дезаминированию или алкилированию [84]. В процессе BER возникают разрывы, поэтому в определенной степени репарация BER перекрывается с репарацией одноцепочечных разрывов ДНК [85]. Доказательство участия PARP1 в BER основывается на ряде фактов, полученных в экспериментах с использованием модельных мышей и клеточных линий, нокаутных по гену *PARP1*, а также анализу взаимодействия PARP1 с белками и ДНК-интермедиатами процесса репарации *in vivo* и в реконструированных системах *in vitro* [86].

В работах [87-89] методом гомологичной рекомбинации были получены первые линии модельных мышей, нокаутных по гену *PARP1*. Эти мыши были жизнеспособны и фертильны, что свидетельствовало о том, что вклад PARP1 в развитие и дифференцировку тканей мышей в нормальных условиях незначителен. Однако эти нокаутные мыши проявляли повышенную чувствительность к алкилирующим реагентам:

метилнитронитрозогуанидин (MNNG), метил-N-нитрозомочевине (MNU) и метилметансульфонату (MMS), а также γ -облучению, что являлось косвенным доказательством защитной роли PARP1 в условиях генотоксического воздействия.

Позже появились прямые доказательства локализации и активации PARP1 на сайтах повреждения ДНК на клеточном уровне. С использованием клеточных линий были исследованы кинетические параметры связывания PARP1 с повреждениями ДНК, индуцированными лазерной микрорадиацией [90]. В условиях, использованных для облучения, возникают различные повреждения ДНК, в частности, одно- и двуцепочечные разрывы ДНК и тиминовые димеры. PARP1 быстро накапливается и кратковременно связывается с районом поврежденной ДНК. Согласно полученным данным, PARP1 распознает возникающие повреждения ДНК и, в результате авто-поли(ADP-рибозил)ирования, привлекает другие белки репарации, в частности XRCC1, который является одним из основных факторов, регулирующих BER и репарацию одноцепочечных разрывов ДНК. Важность синтеза поли(ADP-рибозы) в качестве сигнальной молекулы для привлечения белков BER к участкам повреждения ДНК была также показана в работе [91], где было установлено, что в случае клеточных линий, дефектных по способности синтезировать полимер ADP-рибозы, значительно снижался уровень локализации XRCC1 в районах повреждения ДНК. Однако существуют данные, что репарация повреждений ДНК системой BER может осуществляться как PARP1-зависимым, так и PARP1-независимым путем, а также с участием ближайшего её гомолога PARP2 [92].

С использованием реконструированных систем *in vitro* было показано, что PARP1 эффективно взаимодействует с ДНК-интермедиатами BER, включая ДНК, содержащие апуриновые/апиримидиновые сайты, однонуклеотидные бреши или одноцепочечные разрывы, и с отдельными белками BER [93-99]. Кроме того, в реконструированных системах показано, что PARP1 способна модулировать активность ферментов, катализирующих основные стадии BER: ДНК-полимеразы β ($\text{pol } \beta$), апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы 1 (Ape1), флэп-эндонуклеазы 1 (FEN1), ДНК-лигазы III (DNA-ligase III α) [100-105]. В последнее время накапливается все больше данных об участии PARP1 в функционировании систем репарации двуцепочечных разрывов (DSBR, double-strand break repair) и эксцизионной репарации нуклеотидов (NER, Nucleotide excision repair) [86].

Для реконструированной системы *in vitro* показано, что PARP1 активируется в присутствии одно/двуцепочечных разрывов ДНК, апуриновых/апиримидиновых сайтов, а также её активация возможна при её взаимодействии с интактной ДНК, содержащей шпилечные или крестообразные структуры [106]. При более детальном анализе, с

использованием рекомбинантного белка PARP1 в системе *in vitro*, была проведена оценка суммарного уровня синтезируемой поли(ADP-рибозы) в присутствии модельных ДНК-субстратов, имитирующих различные типы повреждения (однонуклеотидную брешь, одноцепочечный разрыв, двуцепочечные разрывы, 3' или 5'-«свисающие» одноцепочечные участки ДНК, шпилечные структуры) [107]. Оказалось, что уровень активации PARP1, оцениваемый по суммарному выходу синтезируемой поли(ADP-рибозы), практически не зависит от структуры поврежденного ДНК-дуплекса.

На сегодняшний день, предполагается, что PARP1 может функционировать в виде мономерной и димерной формы в процессе собственной аутомодификации [108]. В пользу такой гипотезы говорят данные об олигомерном состоянии PARP1 в присутствии или отсутствии ДНК-субстрата [109]. Исследования *in vitro*, проведенные методами флуоресцентного титрования и гель-фильтрационной хроматографии в нативных условиях [110], анализ способности образовывать межмолекулярные сшивки под действием глутарового альдегида [110], а также измерение кинетических параметров реакции ДНК-зависимого авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 [111], показывают, что PARP1 взаимодействует с ДНК как гомодимер или мономер, а сама реакция аутомодификации может проходить межмолекулярно или внутримолекулярно.

Для PARP1 было показано, что гомодимерная форма белка является более эффективной при синтезе поли(ADP-рибозы), тогда как дальнейшая мультимеризация или, наоборот, диссоциация на мономеры приводит к значительному снижению ферментативной активности белка [110,111]. Еще одним косвенным доказательством в пользу того, что при ДНК-зависимой аутомодификации PARP1 функционирует как димер, является стехиометрия комплекса [PARP1]:[ДНК]. Было показано, что соотношение [PARP1]:[ДНК] равное 2:1 является оптимальным для активности фермента [112-114]. Димеризация PARP1 в присутствии и отсутствие ДНК была показана также методом динамического светорассеяния [109]. В тоже время существует большое количество экспериментальных данных *in vitro*, свидетельствующих о том, что основной каталитической единицей может являться мономер PARP1, который катализирует синтез поли(ADP-рибозы) и сам выступает в роли её акцептора [115-119].

В случае димеризации PARP1 было предложено три гипотетических механизма ДНК-зависимой аутомодификации (**Рис. 1.3**):

- внутримолекулярная реакция: каждый мономер PARP1 катализирует синтез поли(ADP-рибозы) и сам же выступает в роли её акцептора, димер PARP1 «функционально» симметричен;

- межмолекулярная реакция: оба мономера PARP1 одновременно катализируют синтез поли(ADP-рибозы), но в роли акцептора выступает соседний мономер, димер PARP1 «функционально» симметричен;
- межмолекулярная реакция: только один мономер PARP1 катализирует синтез поли(ADP-рибозы), а второй выступает в роли акцептора, димер PARP1 ассиметричен.

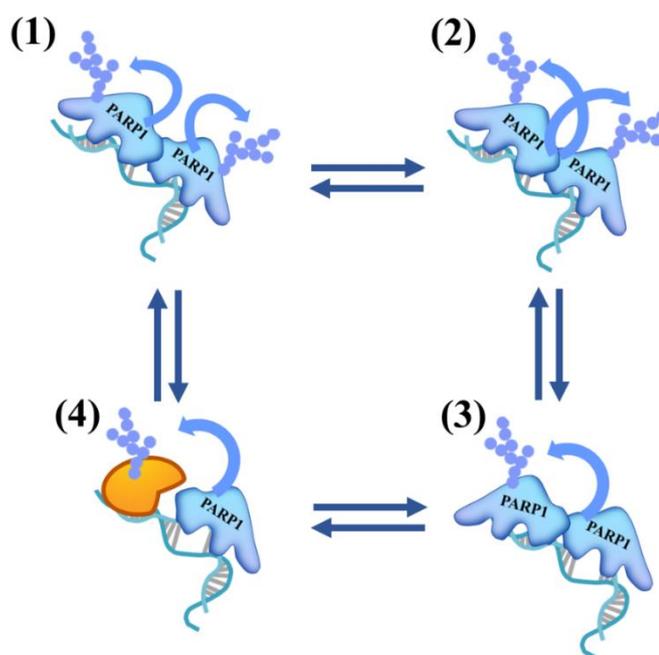


Рис. 1.3. Гипотетический механизм реакции авто-поли(ADP-рибозил)ирования и транс-поли(ADP-рибозил)ирования белков через образование димеров PARP1 или гетеродимеров соответственно.

- (1) внутримолекулярная реакция: каждый мономер PARP1 катализирует синтез поли(ADP-рибозы) и сам же выступает в роли её акцептора, димер PARP1 «функционально» симметричен;
- (2) межмолекулярная реакция: оба мономера PARP1 одновременно катализируют синтез поли(ADP-рибозы), но в роли акцептора выступает соседний мономер, димер PARP1 «функционально» симметричен;
- (3) межмолекулярная реакция: только один мономер PARP1 катализирует синтез поли(ADP-рибозы), а второй выступает в роли акцептора, димер PARP1 ассиметричен;
- (4) образование гетеродимера (транс-модификация белка-мишени).

Предположение о том, что аутомодификация PARP1 происходит межмолекулярно в ассиметричном димере двух полипептидов PARP1, согласуется со способностью PARP1 ковалентно модифицировать другие белки. Тогда логично предположить, что в ассиметричном гетеродимере, состоящем из мономера PARP1 и белка-мишени, может происходить преимущественная модификация белка-партнера, а сама PARP1 будет способна дольше оставаться в активном состоянии.

В настоящее время установлено, что многие ДНК- и РНК-связывающие белки подвергаются поли(ADP-рибозил)ированию и поэтому рассматриваются, не только как

субстраты PARP1, но и как потенциальные регуляторы её активности и уровня синтеза PAR в клетке [108].

1.2.3. ДНК-связывающие белки, как регуляторы активности PARP1

На сегодняшний день обнаружено несколько белков, которые участвуют в метаболизме ДНК, могут поли(ADP-рибозил)ироваться и (или) обладают PAR-связывающей активностью и способны регулировать активность PARP1.

Белок HMGN1 (high mobility group N1). Белок из группы ядерных негистоновых белков, содержащий в своем составе ДНК-связывающий домен HMG-box, является структурным белком хроматина, взаимодействует с нуклеосомами и поддерживает открытое состояние транскрибируемых генов [120]. HMGN1 влияет на взаимодействие факторов репарации ДНК с хроматином, обеспечивая доступ к поврежденной ДНК [120]. HMGN1 физически взаимодействует с PARP1 [120] и является её субстратом в реакции поли(ADP-рибозил)ирования [121]. С использованием клеточных линий, нокаутных по гену *HMGN1*, было показано, что в условиях генотоксического стресса, когда используются ДНК-повреждающие метилирующие агенты или лазерная микрорадиация, снижается уровень поли(ADP-рибозил)ирования белков-субстратов, в том числе самой поли(ADP-рибоза)полимеразы [120]. Данные по снижению уровня поли(ADP-рибозил)ирования были подтверждены в экспериментах с клеточными экстрактами [120]. С использованием рекомбинантных белков было установлено, что HMGN1 является белком-регулятором реакции поли(ADP-рибозил)ирования, стимулируя аутомодификацию PARP1 [120].

Белок ХРА (Xeroderma pigmentosum complementation group A). ДНК-связывающий белок, обеспечивающий множественные белок-белковые взаимодействия между факторами процесса эксцизионной репарации нуклеотидов (NER, Nucleotide Excision Repair), является необходимым для инициации репарации и выщепления конечного фрагмента ДНК, содержащего объемное повреждение [122]. Подавление экспрессии ХРА в клетках приводит к снижению эффективности репарации объемных повреждений ДНК [123]. В культуре клеток, где была проведена РНК-интерференция против гена *PARP1*, наблюдалось снижение скорости репарации повреждений системой NER [123]. С использованием клеточных линий, обработанных соединением АВТ888, которое является ингибитором активности поли(ADP-рибоза)полимераз, было показано, что локализация ХРА в индуцируемых лазером повреждениях ДНК напрямую зависит от синтеза поли(ADP-рибозы) [46]. Установлено, что за поли(ADP-рибоза)-зависимую локализацию ХРА отвечает короткий, высоко консервативный поли(ADP-рибоза)-связывающий мотив (PBM, PAR-binding motif) – последовательность из 20 аминокислотных остатков,

преимущественно состоящей из основных аминокислот [46]. В системе *in vitro*, с использованием рекомбинантных белков, было показано, что ХРА стимулирует активность PARP1, увеличивая суммарный выход реакции поли(ADP-рибозил)ирования [46]. Однако транс-модификацию ХРА ферментом PARP1 в этой системе детектировать не удалось.

Белок p53. Транскрипционный фактор p53, регулирующий клеточный цикл, состоит из следующих доменов: N-концевой трансактивационный домен (TAD, transactivation domain), ДНК-связывающий домен (DBD, DNA binding domain), домен тетрамеризации (TD, tetramerization domain) и многофункциональный C-концевой домен (CTD, C-terminal domain) [124]. CTD – это структурно неупорядоченный домен, состоящий преимущественно из основных аминокислотных остатков, который участвует в регуляции функций p53, включая транскрипционную активность, стабильность белка и привлечение белков-партнеров [124]. Домен CTD связывает одноцепочечную и двуцепочечную ДНК [125], а также было продемонстрировано его взаимодействие с РНК [126,127]. Кроме того, было обнаружено, что CTD обеспечивает связывание p53 с поли(ADP-рибозой) [124]. Связываясь с растущим полимером ADP-рибозы, ковалентно присоединенным к PARP1, p53 располагается в непосредственной близости от активного центра PARP1 и подвергается поли(ADP-рибозил)ированию. Предполагается, что модифицированные молекулы p53 диссоциируют из своих комплексов и новые немодифицированные молекулы p53 связываются с полимером ADP-рибозы на PARP1. В результате такого взаимодействия между p53 и PARP1 суммарный выход реакции поли(ADP-рибозил)ирования увеличивается в 1,5-2 раза [124]. Кроме того, авторами [124] было предположено, что по такому механизму могут функционировать все белки, содержащие в своем составе неупорядоченные домены, обогащенные основными аминокислотными остатками. С использованием химерного белка авторы продемонстрировали, что для белка, который не является субстратом для ковалентной модификации ферментом PARP1, наличие CTD p53 делает этот химерный белок мишенью для поли(ADP-рибозил)ирования.

Белок XRCC1 (X-ray repair cross complementing protein 1). Данный белок выполняет функцию «платформы» для сборки комплекса ферментов, катализирующих разные этапы процесса эксцизионной репарации оснований ДНК и одноцепочечных разрывов [128]. Белок-белковые взаимодействия организованы через различные домены этого белка. Так, N-концевой домен (NTD, N-terminal domain) XRCC1 обеспечивает взаимодействие с ДНК-полимеразой β , центральный с PARP1(PARP2), а C-концевой BRCT домен с ДНК-лигазой III [128]. Кроме того, для XRCC1 описано взаимодействие с полинуклеотид киназой 3'-фосфатазой (PNKP), апратаксином (APTX) и апратаксин- и PNKP-подобным фактором (APLF, aprataxin and PNKP like factor) [128] и тирозил-ДНК-фосфодиэстеразой 1 (Tdp1)

[129]. Связываясь с синтезируемым при активации PARP1(PARP2) полимером ADP-рибозы, XRCC1 быстро локализуется в местах повреждения ДНК [130], привлекая ферменты репарации, и тем самым способствует эффективному протеканию этого процесса [131,132]. Кроме того, для XRCC1 были детально охарактеризованы белок-белковые взаимодействия с PARP1. XRCC1 взаимодействует с PARP1 через центральный BRCT домен, а именно областью, включающую аминокислотные остатки 301-402. Для PARP1 было показано, что во взаимодействии с XRCC1 участвует ДНК-связывающий домен, но вклад отдельных цинковых пальцев (ZF1, ZF2, ZF3) оценен не был, а сам XRCC1 рассматривается, как негативный фактор регуляции авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 [132]. Так, например, увеличение содержания XRCC1 в клетках Cos-7 или HeLa резко снижает суммарный выход поли(ADP-рибозы) *ex vivo*. В системе *in vitro* также было показано, что XRCC1 является мишенью поли(ADP-рибозил)ирования и оказывает ингибирующий эффект на каталитическую активность PARP1, уменьшая количество синтезируемой поли(ADP-рибозы) [133].

1.2.4. РНК-связывающие белки, как регуляторы активности PARP1

В настоящее время известно, что многие РНК-связывающие белки могут быть поли(ADP-рибозил)ированы или взаимодействовать с поли(ADP-рибозой) в условиях генотоксического стресса. Однако, основной функцией этих белков является участие в метаболизме РНК. Большая часть РНК в клетке ассоциирована с РНК-связывающими белками (RBP, RNA binding protein) в форме РНП-комплексов (рибонуклеопротеидных), нарушения в формировании которых приводят к различным заболеваниям [134,135]. Взаимодействие РНК с РНК-связывающими белками необходимо для регуляции её метаболизма на всех этапах – от биогенеза до деградации, и РНК-связывающие белки выполняют ключевые функции в таких процессах, как транскрипция, сплайсинг пре-мРНК [136], полиаденилирование [137], экспорт в цитоплазму [138] и трансляция [139]. Также RBP участвуют в процессинге некодирующих РНК – микроРНК (miRNA) [140], циклических РНК (circRNA) [141] и длинных некодирующих РНК (lncRNA) [142].

На настоящий момент идентифицировано порядка 1500 RBP [143,144]. Большинство из них имеют мульти-доменное строение, при котором разнообразие распознаваемых последовательностей РНК достигается за счет различных комбинаций всего нескольких основных РНК-связывающих доменов (RBD, RNA binding domain) [145,146] (**Таблица 1.1**).

Таблица 1.1. Основные типы РНК-связывающих доменов.			
Название домена	Длина, а.о.	Семейства белков, содержащих домен	Топология
РНК-узнающий мотив (RRM, RNA Recognition Motif)	90	Белки трансляции, сплайсинга регуляторы факторы	$\beta\alpha\beta\beta\alpha$, две α -спирали окружают антипараллельный β -лист
КН-домен гомологии белка hnRNP К (KH, K homology)	70	Белки трансляции, сплайсинга регуляторы факторы	$\beta\alpha\beta\beta\alpha$, между двумя α -спиралями содержится консервативный РНК-связывающий мотив "GXXG"
Домен «цинковые пальцы» (ZnF, Zinc Finger)	30	Многие транскрипционные факторы	$\beta\beta\alpha$, ион Zn^{2+} координирует β -шпильку и α -спираль
РНК-связывающий домен Puf-белков (PUM, Pumillo-like repeat)	334	Белки трансляции регуляторы	$aaaaaaaa$, α -спирали формируют РНК-связывающую поверхность белка
Пентатрикопептидные повторы (PPR, Pentatricopeptide repeat)	$35*n$, $1 > n > 30$	Белки, участвующие в редактировании РНК	$\alpha\alpha$, две антипараллельные α -спирали
Домен PUA (PUA, Pseudouridine synthases and archaeosine transglycosylase)	66-98	РНК-модифицирующие белки	$\beta\alpha\beta\beta\beta\alpha\beta$, β -складки формируют псевдобочку, окруженную двумя α -спиралями

Домен гомологии с фактором сплайсинга Y521-B (YTH, Y521-B homology)	100-150	N ⁶ -метиладенозин-связывающие белки	$\alpha\beta\alpha\beta\beta\beta\beta\alpha$, шесть β -складок формируют β -бочку, окруженную пятью α -спиралями
дцРНК-связывающий домен (dsRBD, Double-stranded RNA Binding Domain)	65	РНКазы, РНКазы III (Dicer)	$\alpha\beta\beta\alpha$, β -складки формируют антипараллельный β -слой, окруженный α -спиралями
Домен холодового шока (CSD, Cold shock domain)	70	Белки холодового шока, Y-box-связывающие белки	$\beta\beta\beta\beta$, β -складки формируют β -бочку
S1-подобный домен (S1, Ribosomal S1-like)	70	Рибосомные белки, факторы инициации трансляции, РНКазы II, РНКазы Р	$\beta\beta\beta\beta$, антипараллельные β -складки формируют β -бочку
Sm домен и Sm-подобный домен (Sm/Lsm, Sm and Like-Sm)	80	Факторы сплайсинга, ассоциированные с малыми ядерными РНК U1	$\alpha\beta\beta\beta\beta\beta$, антипараллельные β -складки формируют изогнутый β -лист

Известно, что RBD также участвуют во взаимодействии с PAR [42]. Помимо классических RBD, важнейшую роль в распознавании РНК играют внутренне неупорядоченные области (IDR, Intrinsically disordered region), которых в РНК-связывающих белках присутствует существенно больше, чем в среднем по протеому [146,147]. Так, около 20% белков млекопитающих, идентифицированных как RBP, неупорядочены более чем на 80% [148]. Неупорядоченные области состоят из повторов аргинина/серина (RS-box), аргинина/глицина (RGG-box), участков, богатых аргинином/лизином или глицином (основные участки R/K и G-богатые домены), и других

коротких линейных мотивов, например, глутамин/глицин/серин/тирозин (QGSY-богатые домены). Как и классические RBD, участки с неупорядоченной структурой в РНК-связывающих белках организованы в виде доменов, повторяющихся неслучайным образом в пределах аминокислотной последовательности, и в некоторых случаях могут комбинироваться со структурированными доменами [146,148]. IDR домены РНК-связывающих белков помимо связывания РНК, способны взаимодействовать с поли(ADP-рибозой) [149].

В системе *in vitro* было показано, что многие РНК-связывающие белки, содержащие прионоподобные неупорядоченные домены, склонны к самоассоциации с образованием агрегатов, например, белки TDP-43 (TAR DNA-binding protein 43) [150,151], hnRNPA1 (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein A) [150], FUS (TLS) (Fused in Sarcoma/Translocated in LipoSarcoma) [152], EWS (EWSR1) (Ewing's sarcoma/Ewing Sarcoma breakpoint region 1), TAF15 (TATA-Box Binding Protein Associated Factor 15) [152]. Размер таких белковых агрегатов зависит от ионной силы раствора и концентрации белка [150]. Кроме того, поли(ADP-рибоза), добавленная к такой системе в увеличивающейся концентрации, стимулирует образование белковых агрегатов дозозависимым образом [150].

На клеточном уровне было показано, что локализация отдельных РНК-связывающих белков, например, FUS (TLS), EWS (EWSR1) и TAF15 [152], в сайтах геномных повреждений индуцируется синтезом поли(ADP-рибозы). Кроме того, сборка мультибелковых комплексов репарации вблизи повреждений ДНК может происходить с участием FUS (TLS), EWS (EWSR1) или TAF15, когда формирование «репаросомного» компартмента сопряжено с фазовым переходом типа жидкость-жидкость [152]. Это способствует компактизации поврежденной ДНК, а также удержанию в непосредственной близости концов разрыва ДНК, одновременно защищая их от гидролиза нуклеазами [152]. Для белка FUS (TLS) механизм образования PAR-зависимых компартментов был детально исследован в системе *in vitro* методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) [153]. Активируясь на поврежденной ДНК, PARP1 синтезирует полимер ADP-рибозы, ковалентно присоединенный к самой полимеразе, тем самым индуцируя взаимодействие FUS (TLS) с PAR и последующее формирование компартментов. В результате образуется компартмент, содержащий FUS (TLS), поли(ADP-рибозил)ированную PARP1 и поврежденную ДНК. Для объяснения роли эффекта компартментализации ДНК была выдвинута гипотеза, что, когда в присутствии поли(ADP-рибозы) и структурно неупорядоченных белков происходит компартментализация поврежденной ДНК, это способствует привлечению ферментов репарации в компартмент и более эффективному протеканию процесса репарации. В этой работе [153] также установлено, что формирование PAR-зависимых компартментов не

происходит в присутствии мутантных форм FUS (TLS), содержащих делеции RRG-обогащенных доменов или мутации в прионоподобном домене.

В работах [17,19], масс-спектрометрическими методами многие РНК-связывающие белки были идентифицированы как мишени поли(ADP-рибозил)ирования на уровне клеточных экстрактов. Однако для рекомбинантных белков в системе *in vitro* информация об их взаимодействии с PARP1 и PAR очень ограничена. Так в работах [150, 153] было показано, что FUS (TLS) и hnRNP A1 являются мишенями поли(ADP-рибозил)ирования, однако влияние этих белков на активность PARP1 изучено не было.

Компартментализация процесса репарации ДНК с участием РНК-связывающих белков, индуцируемая синтезом поли(ADP-рибозы) в месте повреждения ДНК, в большинстве современных работ описывается как основной механизм их взаимосвязи с активностью PARP1 [154,155]. Информация по альтернативному влиянию РНК-связывающих белков на процесс поли(ADP-рибозил)ирования практически отсутствует. В 2016 году белок Sam68 (Src-ассоциированный антиген митоза, массой 68 кДа) был идентифицирован как белок-регулятор PARP1 активности и синтеза поли(ADP-рибозы) [156]. Sam68 локализуется в повреждениях ДНК независимо от активности PARP1, поскольку обработка клеток ингибитором PARP1 PJ-34 не влияла на взаимодействие Sam68 с PARP1, что позволяет предположить, что привлечение Sam68 к участкам повреждения ДНК не зависит от синтеза поли(ADP-рибозы) в месте повреждения [156]. Sam68 значительно стимулирует активность PARP1 в присутствии поврежденной ДНК и было показано, что делеция Sam68 оказывает такое же влияние на репарацию ДНК, как дефицит или ингибирование PARP1 [156].

Таким образом, PAR-связывающие белки могут играть важную роль в реализации сигнала поли(ADP-рибозил)ирования. Поли(ADP-рибозу) можно рассматривать как сигнальную молекулу, способную влиять на перераспределение ДНК- и РНК-связывающих белков в клетке, что обеспечивает модуляцию многих клеточных процессов через привлечение белков-участников или изменения их свойств в результате поли(ADP-рибозил)ирования. В настоящее время с помощью протеомного анализа идентифицировано несколько тысяч белков, способных взаимодействовать с поли(ADP-рибозой). Однако для большинства из идентифицированных белков отсутствует или представлена в ограниченном виде информация об их влиянии на активность PARPs. Поэтому поиск новых мишеней поли(ADP-рибозил)ирования и белков, взаимодействующих с поли(ADP-рибозой) и способных модулировать активность PARP1, в настоящее время является актуальной задачей.

1.3. Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1): структурно-функциональная организация, регуляция функций и участие в ДНК- и РНК-зависимых процессах

Y-бокс-связывающий белок 1 (YB-1) является РНК-связывающим белком, который всё больше привлекает внимание исследователей в качестве потенциального участника поддержания стабильности генома [157]. Ранее было показано, что YB-1 в норме имеет цитоплазматическую локализацию, но может переходить в ядро в условиях генотоксического воздействия на клетки или при её злокачественной трансформации [158]. YB-1 проявляет повышенное сродство к повреждённой ДНК по сравнению с неповреждённой [159], способен физически взаимодействовать с рядом белков репарации ДНК, модулируя их активность [6]. Ранее в работе нашей лаборатории было показано, что YB-1 подвергается поли(ADP-рибозил)ированию и является преимущественной мишенью модификации в реакции поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемой PARP1 *in vitro* [5]. В составе YB-1 выделяют два структурно неупорядоченных домена (AP-домен и CTD домен), обеспечивающих высокое сродство к РНК и одноцепочечной ДНК (оцДНК) [160]. Протеомными методами YB-1 также был идентифицирован среди клеточных белков, связывающих поли(ADP-рибозу) [17,19], возможно, что YB-1 может локализоваться в месте повреждения ДНК PAR-зависимым образом.

1.3.1. Доменная организация структуры YB-1

YB-1 человека состоит из 324 аминокислотных остатков, преобладающими являются Arg (11,7%), Gly (12%), Pro (11%) и Glu (8,3%) [160]. В структуре белка выделяют три домена (Рис. 1.4).

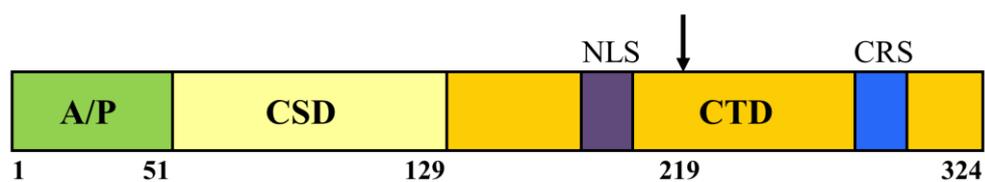


Рис. 1.4. Схематическое изображение доменной структуры YB-1. Цифры под рисунком обозначают позиции аминокислотных остатков. A/P – домен с высоким содержанием аланина (A) и пролина (P); CSD (Cold Shock Domain) – домен холодового шока; NLS (Nuclear Localization Signal) – сигнал ядерной локализации; CTD – С-концевой домен (C-terminal domain); CRS (Cytoplasmic Retention Site) – сайт удержания в цитоплазме. Сайт расщепления YB-1 20S-протеасомой обозначен стрелкой.

Н-концевой домен содержит в своем составе высокий процент аланина и пролина (отсюда его другое название – A/P-домен). Следующий за ним домен холодового шока (CSD, Cold Shock Domain) по аминокислотной последовательности на 44% идентичен последовательности белка холодового шока *E.coli* [161]. С-концевой домен белка (CTD, С-

terminal Domain) содержит чередующиеся кластеры положительно и отрицательно заряженных аминокислотных остатков. Молекулярная масса YB-1, определённая по аминокислотной последовательности, составляет приблизительно 36 кДа, но при анализе относительной электрофоретической подвижности в SDS-PAGE YB-1 мигрирует как белок с массой около 50 кДа, что объясняется чередующимися положительно и отрицательно заряженными кластерами аминокислот в структуре белка. Ещё одной особенностью YB-1 является высокая изоэлектрическая точка – около 9.5 [160]. Было показано, что YB-1 и его гомологи, выделенные из рибонуклеопротеиновых комплексов, после удаления из них мРНК, способны образовывать олигомеры массой до 800 кДа в широком диапазоне ионной силы раствора (50-400 мМ NaCl) [162]. По-видимому, олигомеризация YB-1 происходит за счёт взаимодействия противоположно заряженных аминокислотных кластеров С-концевых доменов разных молекул белка. N- и С-концевые домены - участки с нерегулярной вторичной структурой, возможно, что конформация этих доменов фиксируется только при связывании с лигандами и в комплексах с разными лигандами может быть различной.

В экспериментах с делеционными мутантами YB-1 было показано присутствие в молекуле этого белка двух последовательностей, отвечающих за его распределение между цитоплазмой и ядром – это сигнал ядерной локализации (NLS, Nuclear Localization Signal) между аминокислотными остатками 186 и 205 и сайт удержания в цитоплазме (CRS, Cytoplasmic Retention Site) между остатками 267 и 293 (**Рис. 1.4**) [163]. N-концевая часть белка также имеет небольшую тенденцию к ядерной локализации. Обычно эффект сайта CRS имеет больший вклад в определение места локализации YB-1, чем эффект NLS, и по этой причине YB-1 обычно располагается в цитоплазме.

1.3.2. Взаимодействие YB-1 с нуклеиновыми кислотами

Внутриклеточные функции YB-1 обусловлены его способностью связывать нуклеиновые кислоты. Сначала было обнаружено, что YB-1 проявляет повышенное сродство к Y-бок мотиву (ATTGG), содержащемуся в промоторных участках генов главного комплекса гистосовместимости класса II [164]. Позднее, при исследовании взаимодействия YB-1 с олигодезоксирибонуклеотидами, иммобилизованными на микрочипе, было обнаружено, что YB-1 отдает наибольшее предпочтение одноцепочечному мотиву GGGG, затем мотивам CACC и CATC в составе одно- и двуцепочечных олигонуклеотидов, и меньшее сродство белок проявляет к последовательностям, встречающимся в Y-боксах [165]. Также было показано, что YB-1 проявляет гораздо большее сродство к одноцепочечной, чем к двуцепочечной ДНК [166]. При связывании с двуцепочечной ДНК, YB-1 дестабилизирует её вторичную структуру, что

способствует значительному понижению температуры плавления двойных спиралей, на три порядка ускоряет образование двойных спиралей ДНК из взаимодополнительных цепей при физиологических условиях, а также катализирует обмен комплементарных цепей в несовершенных дуплексах до получения наиболее протяженных и совершенных двойных спиралей [165,167].

Было показано, что проксимальная часть СТД YB-1 является специфической для связывания ДНК. CSD также был идентифицирован как домен взаимодействующий с оцДНК, хотя его вклад в связывание такой ДНК не так существенен [168].

Функции YB-1 в сплайсинге, трансляции, стабилизации и упаковке мРНК определяются его способностью связывать РНК. Было показано, что YB-1 обладает высоким неспецифическим сродством к широкому спектру последовательностей РНК, однако к некоторым из них YB-1 проявляет предпочтение. При связывании с гомополирибонуклеотидами наибольшее сродство YB-1 наблюдалось к поли(G), затем, по мере убывания, к поли(U), поли(A) и поли(C). Константа диссоциации комплексов YB-1 с мРНК глобинов и 16S рРНК составляет 4×10^{-9} М [169,170].

Следует отметить, что методами масс-спектрометрического анализа YB-1 был идентифицирован как белок, способный специфически взаимодействовать с последовательностями 5'-ACCAGCCU-3', 5'-CAGUGAGC-3' и 5'-UAAUCCCA-3', наиболее часто встречающихся в экзосомальных мРНК. Идентификация YB-1 в экзосомах, секретлируемых 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 [171]

Считается, что за неспецифичное связывание с РНК отвечает СТД. Именно СТД обеспечивает высокое сродство YB-1 к нуклеиновым кислотам. За специфичное связывание с РНК отвечает домен CSD, а СТД и, возможно, А/Р-домен усиливают и стабилизируют это взаимодействие [172-174].

1.3.3. Функции YB-1 в клетке и их регуляция

В цитоплазме YB-1 является главным упаковочным белком мРНК (матричных рибонуклеопротеиновых комплексов), регулирует трансляцию мРНК и обеспечивает её стабильность. В регуляции трансляции основное значение имеет соотношение концентрации YB-1 к мРНК (YB-1/мРНК). При соотношениях YB-1/мРНК > 1 YB-1 ингибирует трансляцию на стадии инициации до присоединения малой субчастицы

рибосомы к мРНК. При соотношениях $YB-1/мРНК < 1$ YB-1 активирует трансляцию, способствуя образованию рибосомного 48S-инициаторного комплекса [160].

В ядре YB-1 принимает участие в регуляции транскрипции, сплайсинга пре-мРНК, репарации и репликации ДНК [160]. На данный момент известно, что YB-1 оказывает влияние на транскрипцию многих генов, причем это влияние может быть, как стимулирующим, например, гены циклинов и ген ДНК полимеразы α , так и ингибирующим, например, ген α -актина и коллагена типа $\alpha 1$ и $\alpha 2$ [160].

Участие YB-1 в репарации ДНК предполагается на основе данных о том, что белок обладает повышенным сродством к ДНК, содержащей апуриновые/апиримидиновые сайты [175], обработанной цисплатином [159] или содержащей неспаренные основания [159]. При связывании с такой поврежденной ДНК, YB-1 вызывает локальное плавление дуплексов, что способствует, по-видимому, более эффективному протеканию репарации ДНК [159]. Кроме того, YB-1 взаимодействует с различными репарационными белками и может влиять на активность некоторых из них. Было показано, что YB-1 взаимодействует со следующими белками: ДНК-гликозилазами NTH1 [176], NEIL2 [177] и ДНК-полимеразами β и δ [159, 177] в процессе эксцизионной репарации оснований (BER), белком MSH2 в репарации неправильно спаренных оснований ДНК (MMR, MisMatch Repair) [159] белками WRN и Ku80 в репарации двуцепочечных разрывов [159].

Таким образом, судя по спектру белков-партнеров, YB-1 может участвовать практически во всех типах репарации ДНК. В работах Алемасовой Е.Э. с соавторами было установлено, что YB-1 способен модулировать активность Ape1 и NEIL1 *in vitro* [178-180]. Была показана возможность участия YB-1 в процессе эксцизионной репарации нуклеотидов на стадии распознавания объемного повреждения ДНК, осуществляемого фактором XPC (Xeroderma Pigmentosum, Complementation Group C) [179, 181]. Основные функции YB-1 в клеточных процессах приведены в **Таблице 1.2**.

YB-1

Функции в ядре:

- Регуляция транскрипции
- Участие в репарации ДНК
- Участие в репликации ДНК
- Участие в сплайсинге пре-мРНК
- Участие в разборке ядрышек

Функции в цитоплазме:

- Основной упаковочный белок мРНК
- Стабилизация мРНК
- Регуляция трансляции

Внеклеточные функции:

- Сортинг экзосомальных мРНК и секреция в составе экзосом
- Секреция в условиях воспалительного стресса

Таблица 1.2. Основные функции YB-1 в клетке.

Как уже было отмечено выше, основная масса YB-1 находится в цитоплазме и ассоциирована с мРНК [182]. Однако, в ответ на некоторые вне- и внутриклеточные сигналы, YB-1 может перемещаться из цитоплазмы в ядро клетки (**Рис. 1.5**) [183].

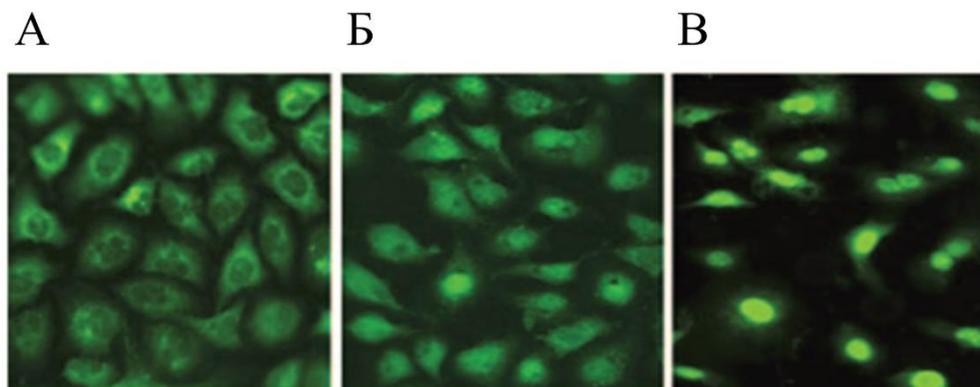


Рис. 1.5. Перемещение YB-1 в ядро при обработке клеток рака лёгкого человека линии A549, наблюдаемое при УФ-облучении или воздействии актиномицина D.

А: необработанные клетки; **Б:** после обработки УФ-светом; **В:** после обработки актиномицином D. Приведены данные конфокальной микроскопии с использованием флуоресцентномеченых антител против YB-1 [183].

Переход YB-1 из цитоплазмы в ядро наблюдается, во-первых, на границе фаз G1/S клеточного цикла: при этом YB-1 обеспечивает транскрипцию генов циклинов A и B1 [184]; во-вторых, при облучении клеток ультрафиолетовым светом [185], обработке ДНК-повреждающими химическими агентами [186], при окислительном стрессе [183] и в

результате воздействия повышенных температур [187]. В этих случаях YB-1 в ядре стимулирует транскрипцию генов множественной лекарственной устойчивости и, возможно, участвует в процессах репарации, таким образом, повышая выживаемость клеток. В-третьих, YB-1 обнаруживают в ядре после инфицирования клеток аденовирусами [188]. Наконец, переход YB-1 в ядро можно стимулировать некоторыми ростовыми факторами и цитокинами [189].

В клетках, подвергшихся раковой трансформации, белок YB-1 часто либо локализован в ядре, либо его содержание в клетках повышено. Многие исследователи рассматривают повышение уровня экспрессии *YB-1* или изменение его локализации не просто как следствие раковой трансформации клеток, а как одну из существенных причин этого явления [190]. В связи с этим YB-1 рассматривается в качестве прогностического маркера в отношении агрессивности течения заболевания и устойчивости опухолей к химиотерапии. Было показано, что ядерная локализация YB-1 ассоциирована со следующими типами опухолей: рак молочной железы [191-196], колоректальный рак [197-199], остеосаркома [200,201], глиобластома [202], рак мочевого пузыря [203], рак легкого [204], рак простаты [205].

На сегодняшний день установлено, что регуляция различных функций YB-1 в клетке осуществляется с помощью посттрансляционных модификаций этого белка, изменяющих физико-химические свойства YB-1, в том числе, его сродство к нуклеиновым кислотам. Например, фосфорилирование YB-1 [206,207] модулирует его свойства как транскрипционного фактора; ацетилирование YB-1 играет важную роль в секреции YB-1 из клетки [208]; частичный протеолиз YB-1 20S-протеасомой и образование укороченной ядерной формы белка (1-219 а.о.) происходит в условиях генотоксического стресса, и, вероятно, связан с непосредственным участием YB-1 в репарации ДНК [157]; убиквитинилирование YB-1 с последующим полным протеолизом 26S протеасомой, по-видимому, сопряжено с началом апоптоза [209].

В настоящий момент существуют данные *ex vivo* и *in vitro* о моно- или поли(ADP-рибозил)ировании YB-1 в клетках млекопитающих при отсутствии или в условиях генотоксического воздействия [210-212]. Согласно литературным данным (ADP-рибозил)ирование YB-1 может осуществляться как ядерными ферментами PARP1 и PARP2 [6], так и цитоплазматическим PARP10 [213] и PARP14 [212]. Однако, функциональная роль данной посттрансляционной модификации YB-1 на сегодняшний день не установлена. В настоящее время среди белков, которые поли(ADP-рибозил)ируются в ответ на повреждение ДНК, особое внимание уделяется РНК-связывающим белкам, как потенциальным участникам PARPs-зависимых процессов, таких как, репарация ДНК и

формирование стрессовых гранул в цитоплазме [153]. Поэтому изучение функционального взаимодействия YB-1 и PARP1 представляет интерес для понимания молекулярного механизма вовлечения РНК-связывающих белков в процесс PARP1-зависимого формирования клеточного ответа на генотоксический стресс. Механизмы регуляции активности PARP1 белком YB-1, который с одной стороны, поли(ADP-рибозил)ируется, а с другой стороны, связывается с поврежденной ДНК, возможно, могут распространяться и на другие РНК-связывающие белки, которые (ADP-рибозил)ируются в клетке в ответ на генотоксическое воздействие.

1.4. Заключение

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 [214]. В настоящее время поиск ингибиторов ключевых ферментов и факторов репарации ДНК является одним из перспективных направлений в создании эффективной терапии для лечения онкологических заболеваний. Важной фармакологической мишенью является PARP1, которая рассматривается, как ключевой регулятор процессов метаболизма ДНК в условиях генотоксического стресса. Ингибиторы PARP1 применяются как соединения, повышающие эффективность химио- и радиотерапии, а также как моноагенты для лечения опухолей с мутациями в генах *BRCA* [215]. Подход к использованию ингибиторов PARP1 в качестве монотерапии основан на том, что клетки, дефицитные по белкам-участникам репарации двуцепочных разрывов ДНК путем гомологичной рекомбинации, *BRCA1* и *BRCA2*, гиперчувствительны к ингибиторам PARP1. Ингибирование репарации одноцепочечных разрывов, регулятором которой является PARP1, приведет к образованию двуцепочечных разрывов, для репарации которых необходим процесс гомологичной рекомбинации, что при дефиците ключевых белков участников этого процесса вызовет гибель клетки. Использование ингибиторов PARP1 при наличии дефектов гомологичной рекомбинации является применением принципа синтетической летальности – когда мутация в одном из двух рассматриваемых генов не летальна, а мутации в обоих генах одновременно приводят к клеточной гибели. Таким образом, можно предположить, что и другие виды опухолей, имеющие дефекты гомологичной рекомбинации, могут откликнуться на лечение ингибиторами PARP1. В настоящее время, фармацевтическими компаниями проводятся клинические испытания целого ряда ингибиторов PARP1 [216]. Участие PARP1 в ключевых клеточных процессах, которые индуцируются в ответ на повреждение генома в клетке, в значительной степени стимулировало исследование механизмов регуляции активности этого белка, как в системе *in vitro*, так и *in vivo*.

На сегодняшний день многие детали, касающиеся роли белковых факторов в регуляции активности PARP1, остаются невыясненными. Мультифункциональный белок YB-1 физически взаимодействует с ферментами различных систем репарации ДНК, обнаруживается в составе стрессовых гранул и рассматривается в качестве прогностического маркера в отношении агрессивности течения онкологических заболеваний и устойчивости опухолей к химиотерапии [190-205]. В ходе исследований в нашей лаборатории было обнаружено, что YB-1 способен модулировать активность PARP1,

выступать в качестве акцептора поли(ADP-рибозы) и защищать PAR от гидролиза PARG, существенно продлевая время существования полимера *in vitro* [5,6]. Поэтому детальное изучение механизма взаимодействия PARP1 и YB-1, который с одной стороны является акцептором поли(ADP-рибозы), а с другой стороны эффективно связывает поли(ADP-рибозу), позволит определить ключевые особенности действия PAR-связывающих белков и роль неупорядоченных доменов в регуляции активности PARP1, а также выявить сходство молекулярных механизмов для взаимодействия PARP1 с белками-партнерами, способными осуществлять регуляцию её активности в условиях генотоксического воздействия.

2. Материалы и методы исследования

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы, радиоактивные материалы, препараты нуклеотидов и олигонуклеотидов

В работе использовали: акриламид (“AppliChem”, Германия), мочевины, формамид, 2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоновою кислоту (HEPES), персульфат аммония (ПСА) (“PanReac”, Испания), N,N'-метиленбисакриламид, трис(гидроксиметил)аминометан (Tris) (“Amresco”, США), N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин (ТЕМЕД) (“Helicon”, Россия), глицерин (“GERBU Biotechnik GmbH”, Германия), глицин (“MP Biomedicals”, США), додецилсульфат натрия (SDS) (“Fluka”, Швейцария), бумагу для хроматографии Whatman (“GE Healthcare”, США), аденозинтрифосфорную кислоту (АТФ) (“Thermo”, США), смесь фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1), никотинамидадениндинуклеотид (NAD⁺), ингибитор олапариб, ингибитор 3-аминобензамид, ингибитор PARG (PDD 00017273), β-никотинамидмононуклеотид, среду LB Broth (“Sigma-Aldrich”, США), смесь ингибиторов протеаз в таблетках "Complete mini EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail" ("Roche Applied Science", Германия).

Также в работе были использованы следующие реактивы: NaCl, KCl, имидазол, MgCl₂, Mg₂SO₄, NaOH, HCl, Na₂HPO₄, KH₂PO₄, (NH₄)₂SO₄, H₃BO₃, дитиотреитол (ДТТ), глюкоза, α-лактоза, агар, ампициллин, хлорамфеникол, фенилметилсульфонилфторид (PMSF), бензамидин, этанол, трихлоруксусная кислота (ТХУ), ЭДТА;

хроматографические сорбенты: Ni-NTA агароза, гепарин-сефароза, SP-сефароза, колонка MonoS 5/50, колонка Superdex 75pg 16/600 (“GE Healthcare”, США), оцДНК-целлюлоза (“Sigma-Aldrich”, США);

красители бромистый этидий (“Sigma-Aldrich”, США), GelRed (“Biotium”, США); [α-³²P]АТФ и [γ-³²P]АТФ с удельной активностью 1000 и 3000 Ки/ммоль соответственно, производства Лаборатории биотехнологии ИХБФМ СО РАН, Россия.

В работе использовали следующее оборудование: хроматографы АКТА Start и АКТА Pure (“GE Healthcare”, США), спектрофотометр "Hitachi U-0080D" (Япония); рН-метр "OP 211/1" (Венгрия); счетчик радиоактивности "Электроника D2-10м" (Россия); микроцентрифугу "MiniSpin plus" (“Biosan”, Латвия); центрифугу "Avanti J-26 XPI" (“Beckman Coulter”, США), микротермостаты M208 (“БИС-Н”, Россия) и CH-100 (“Biosan”, Латвия); электрофорезные камеры (“Sigma-Aldrich” и “Cole-Parmer”, США), лазерный сканер Typhoon FLA9500 (“GE”, США), система гель-документирования Amersham Imager

600 (“GE”, США), сушилка для гелей Gel Dryer (“Cole-Parmer”, США), ультразвуковой дезинтегратор (“Bandelin”, Германия), микро-планшетный флуориметр CLARIOstar (“GMB Labtech GmbH”, Германия).

Реактивы отечественного производства были квалификации о.с.ч. Для приготовления всех буферных растворов и реакционных проб использовали дважды дистиллированную воду. Воду и все буферы подвергали стерилизации автоклавированием или фильтрованием через поливиниловый или нитроцеллюлозный фильтр (0,22 мкм) производства “Millipore” (США). Для осаждения олигонуклеотидного материала использовался перегнаный этанол.

В работе были использованы плазмидная ДНК рBR322 (“СибЭнзим”, Новосибирск) и синтетические олигодезоксирибонуклеотиды производства Лаборатории медицинской химии (ИХБФМ СО РАН, Россия) и “Биоссет” (Новосибирск, Россия) соответственно.

Последовательности использованных олигонуклеотидов приведены в Таблице 2.1.

Таблица 2.1. Последовательности олигодезоксирибонуклеотидов, использованных в работе.

Обозначение	Последовательность (5'→3')
woU	5'-cggta tccac caggt ctgag acaac gatga agccc aagcc agatg aaatg tagtc-3'
comp	5'-gacta cattt catct ggctt gggct tcate gttgt cccag acctg gtgga taccg-3'
mm	5'-gacta cattt catct ggctt gggct tcate gttgt cg cag acctg gtgga taccg-3'
Bub ₅	5'-cggta tccac caggt caC Uc tcaac gatga agccc aagcc agatg aaatg tagtc-3'
Bub ₅ -comp	5'- gactacatttcatctggcttggcttcategttgt tcgc agctcctggtgataaccg -3'
Bub ₁₇ **	5'-cggta tccac gtcca tac Uc tgtgt t gtga agccc aagcc agatg aaatg tagtc-3'
Bub ₁₇ -comp	5'-gactacatttcatctggcttggcttcate gttgttcgc agacctggtggataaccg-3'
An ₁	5'-ggaag acct gacgt tccc aactt tateg cc-3'
An ₂	5'-ggcga taaag ttggg-3'
An ₃ *	5'- p -aacgt caggg tctcc c-3'
An ₃₍₋₁₎ *	5'- p -aacgt caggg tctcc c-3'
An ₂₊₃	5'-ggcgattaagttgggaaacgtcaggggtctcc-3'
Nick dumbbell*	5'- p -cttcaagacggtttccgtcttcaagcgcctcaagctttgcttgaaggcg-3'
Gap dumbbell	5'- p -ttcgaagacggtttccgtcttcaagcgcctcaagctttgcttgaaggcg-3'
* p – фосфат; ** U – урацил	

Таблица 2.2. Последовательности праймеров для ПЦР, использованных в работе.

Обозначение	Последовательность
pLate51-YB-1-For	5'-ggatgatgatgacaagatgagcagcgaggccgagac-3'
pLate51-YB-1Rev	5'-ggagatgggaagtcattactcagccccgccctgctcag-3'
pLate51-YB-1(1-219)-Rev	5'-ggagatgggaagtcattagcaccctggtgtcagcacc-3'
pLate31-YB-1-For	5'-agaaggagatataactatgagcagcgaggccgagac-3'
pLate31-YB-1(Δ 1)-Rev	5'-gtggtggtgatggtgatggccactcggaggtggctgctgacc-3'
pLate31-YB-1(Δ 1-2)-Rev	5'-gtggtggtgatggtgatggccacctgttctcctgcaccctgg-3'
pLate31-YB-1(Δ 1-2-3)-Rev	5'-gtggtggtgatggtgatggccttgttggcctggccttcgg-3'
pLate31-CTD-For	5'-agaaggagatataactatgggagttccagtgcaagg-3'
pLate31-CTD-Rev	5'-gtggtggtgatggtgatggccctcagccccgccctgctcag-3'
Y986S-For*	5'- p -cctctctactatctaacgagtac-3'
Y986H-For*	5'- p -cctctctactacataacgagtac-3'
Y986S-Y986H-Rev*	5'- p -tgtcattcacaccagatgaaac-3'
G972R-For*	5'- p -gttctcttaggaccgggatttc-3'
G972R-Rev*	5'- p -gtctacaccatccagactaatg-3'
E988K-For*	5'- p -actatataacaagtacattgtctatg-3'
E988K-Rev*	5'- p -agagaggtgtcattcacacc-3'
603-Forward**	5'-accccagggac <u>u</u> tgaagtaataagg-3'
603-Reverse***	5'- FAM -cccagttcgcgcgccacc-3'
* p – фосфат, ** U – урацил, *** FAM – флуоресцеин	

2.1.2. Ферменты и белки

В работе были использованы бычий сывороточный альбумин (БСА) ("Sigma", США); лизоцим ("Amresco", США), рекомбинантный гистон H1 ("Sigma-Aldrich", США), ДНКаза I ("Thermo", США), бензоназа ("Novagen", Дания), протеиназа К ("СибЭнзим", Новосибирск), экзонуклеаза EhoI, ДНК-полимераза Q5 ("New England Biolabs", Великобритания).

Препараты белков апуриновой/апиримидиновой эндонуклеазы 1 (Ape1), полинуклеотидкиназы фага T4 (PNKP), никотинамид мононуклеотид аденилилтрансфераза (NMNAT) были любезно предоставлены д.х.н. Н.А. Моор, к.х.н. И.О. Петрусевой (ИХБФМ СО РАН) и к.х.н. С.И. Шрамм (Институт молекулярной генетики РАН) соответственно. Белковый препарат коровых гистонов (H2A, H2B, H3, H4) был любезно предоставлен к.х.н. М.М. Кутузовым (ИХБФМ СО РАН). Рекомбинантные урацил-ДНК-гликозилаза *E.coli* (Udg), ДНК-полимераза Taq и ДНК-лигаза фага T4 были любезно предоставлены д.б.н. С.Н. Ходыревой (ИХБФМ СО РАН). 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 (Институт белка РАН).

2.1.3. Бактериальные штаммы и плазмидные ДНК

Для наработки рекомбинантных белков использовали клетки *E.coli* BL21(DE3)GeneX, Rosetta2(DE3) или Rosetta2(DE3)pLysS ("Novagen", Дания). Для наработки плазмидной ДНК использовали клетки *E.coli* XLBlue. Компетентные клетки были приготовлены по методике [217].

Плазида, содержащая кДНК гена PARP1 человека на основе вектора pET-32 была любезно предоставлена М.С. Сато (Университет г. Лавалья, Канада). Плазида, содержащая кДНК гена YB-1 кролика на основе вектора pET-3 была любезно предоставлена д.б.н., академиком Л. П. Овчинниковым и к.б.н. Д.А. Кретовым.

2.2. Методы исследования

2.2.1. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в агарозном геле

Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот проводили в геле, содержащем 0,7% агарозу, 1xTAE (40 mM Tris, 20 mM уксусную кислоту, 1 mM ЭДТА). Электродный буфер содержал 1xTAE. Буфер для нанесения проб (5-кратный) содержал 50% глицерин, 0,01% бромфеноловый синий. Электрофорез проводили при напряжении в 150 Вольт (10 Вольт на сантиметр), за ходом электрофореза следили по миграции бромфенолового синего. Гели окрашивали красителем бромистым этидием или GelRed,

который добавляли в расплавленную агарозу перед заливкой геля в соотношении 1:10000. Положение нуклеиновых кислот определяли на системе гель-документирования Amersham Imager 600.

2.2.2. Электрофоретическое разделение белков по Лэммли

Гель-электрофорез белков в денатурирующих условиях проводили согласно [218] с модификациями. Перед нанесением на гель в пробы добавляли денатурирующий буфер Лэммли (4-кратный), содержащий 200 мМ Tris-HCl pH 6.8, 400 мМ 2-меркаптоэтанол, 4% SDS, 40% глицерин, 0,01% бромфеноловый синий и прогревали их в течение 5 минут при 95°C. Разделяющий гель содержал 10% акриламид, 0,2% бисакриламид, 0,4 М Tris-HCl pH 8.8, 0,1% SDS, 0,1% ТЕМЕД, 0,1% ПСА. Концентрирующий гель содержал 4% акриламид, 0,1% бисакриламид, 0,1 М Tris-HCl pH 6.8, 0,1% SDS, 0,1% ТЕМЕД, 0,1% ПСА. Электродный буфер содержал 1xTris-Gly (25 мМ Tris, 0,1 М глицин, 0,1 % SDS). Электрофорез проводили в вертикальных пластинах 11,5×8,5 см при силе тока 15 мА до вхождения образцов в разделяющий гель и далее при 25 мА. За ходом электрофореза следили по миграции маркерного красителя бромфенолового синего. Гели окрашивали 0,1% раствором Кумасси R-250 в 15% этаноле, 10% уксусной кислоте и 3% сульфате аммония в течение 30 минут, затем отмывали гель до осветления фона водой.

2.2.3. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в денатурирующем ПААГ

Гель-электрофорез нуклеиновых кислот в денатурирующих условиях проводили согласно [219] с модификациями. Перед нанесением на гель в образцы добавляли буфер нанесения (5-кратный), содержащий 95% формамид, 25 мМ ЭДТА, 0,01% ксиленцианоловый, 0,01% бромфеноловый синий и прогревали их в термостате при 95°C в течение 2 минут. Смесь для полимеризации геля содержала 1xТВЕ (50 мМ Tris, 50 мМ H₃BO₃, 1 мМ ЭДТА), 20% формамид, 1% бис-акриламид, 19% акриламид, 7 М мочевины, 0,1% ПСА, 0,1% ТЕМЕД. Электродным буфером служил 1xТВЕ. Электрофорез проводили до миграции бромфенолового синего на 3/4 пути.

2.2.4. Электрофоретическое разделение нуклеиновых кислот в неденатурирующих условиях.

Гель-электрофорез белков в нативных условиях проводили согласно [219] с модификациями. Перед нанесением на гель в пробы добавляли буфер нанесения (5-кратный), содержащий 20 мМ Tris-HCl pH 7.5, 25% глицерин, 0.01% бромфеноловый синий. Смесь для полимеризации геля содержала 1xТВЕ (50 мМ Tris, 50 мМ H₃BO₃, 1 мМ ЭДТА),

10% акриламид, 0,2% бисакриламид, 0,1% ПСА, 0,1% ТЕМЕД. Электродный буфер содержал 1xTBE. Электрофорез проводили в вертикальных пластинах 11,5×8,5 см при постоянном напряжении 200 В до миграции бромфенолового синего на 3/4 пути.

2.2.5. Количественная обработка гелей

Гели, содержащие радиоактивную метку, сушили и экспонировали в кассете с экраном для радиологии. Полученное изображение визуализировали сканированием на приборе Turphoon FLA9500. Распределение радиоактивности в геле анализировали с помощью программы "Quantity One" ("BioRad", США).

2.2.6. Получение ДНК-субстратов

2.2.6.1. Получение ДНК-дуплексов

ДНК-дуплексы получали путем смешивания комплементарных олигонуклеотидов в следующих соотношениях: ds55 (woU+Comp) при 1.0:1.2, mm55 (woU+mm) при 1.0:1.2, Bubble(5) (Bub₅+bub₅-comp) при 1.0:1.2, Bubble(17) (Bub₁₇+bub₁₇-comp) при 1.0:1.2, Nick (An₁+An₂+An₃) при 1.5:1:1, Gap (An₁+An₂+An₃₍₋₁₎) при 1.5:1:1, 3'-recessed (An₁+An₂) при 1.2:1 (Таблица 2.1). Реакционную смесь инкубировали в течение 5 минут при 95°C, а затем медленно охлаждали до комнатной температуры. Структуру ДНК Dumbbell получали лигированием структуры Nick dumbbell. Реакционная смесь содержала 50 мМ Tris-HCl pH 7.5, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 1 мМ АТФ, 1 ед./мкл ДНК-лигазы Т4 и 10 мкМ Nick dumbbell. Реакционную смесь инкубировали в течение ночи при комнатной температуре и осаждали добавлением этанола до 70% и ацетата натрия до 0,3 М с последующей инкубацией при -20°C. Осадок, отделенный центрифугированием, растворяли в воде.

Таблица 2.3 Обозначения и структуры ДНК-дуплексов, используемых в работе.

Условное обозначение, отжигаемые цепи	Схематическое изображение
ss32, An ₂₊₃	32 
ds55, woU+Comp	55 
Mm55, woU+mm, показана область неспаренных оснований, размером 1 н.о.	55 
Bubble(5), Bub ₅ +bub ₅ -comp, показана область неспаренных оснований, размером 5 н.о.	55 
Bubble(17), Bub ₁₇ +bub ₁₇ -comp, показана область неспаренных оснований, размером 17 н.о.	55 

Nick (одноцепочечный разрыв), An ₁ +An ₂ +An ₃	32 
Gap (однонуклеотидная брешь), An ₁ +An ₂ +An ₃₍₋₁₎	32 
3'-recessed с (5'-свисающий одноцепочечный участок длиной 17 н.о.), An ₁ +An ₂	32 
Dumbbell	55 
Nick dumbbell с одноцепочечным разрывом	55 
Gap dumbbell с однонуклеотидной брешью	55 
р – фосфат, ОН – гидроксильная группа	

2.2.6.2. Получение плазмидной ДНК, содержащей одноцепочечные разрывы (однонуклеотидные бреши)

Для получения плазмидной ДНК, содержащей однонуклеотидные бреши, плазмидную ДНК pBR322 (0,25 мг/мл) инкубировали при 70°C в течение 45 минут в буфере 20 мМ цитрат натрия pH 5,0, 200 мМ NaCl [220]. Реакцию останавливали добавлением равного объема 1 М Tris-HCl pH 8,0. Полученную плазмидную ДНК, содержащую апуриновые/апиримидиновые сайты, разбавляли до 29 нМ концентрации и инкубировали с 20 нМ ApeI в буфере 50 мМ Tris-HCl pH 8,0, 50 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂ в течение 1 часа при 37°C. ApeI инактивировали прогреванием при 65°C в течение 10 минут. Анализ плазмидной ДНК проводили в 0,7% агарозном геле (см. пункт 2.2.1) (Приложение 1).

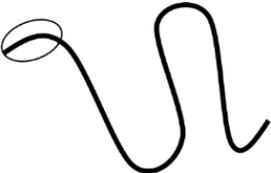
2.2.6.3. Получение мононуклеосомного субстрата

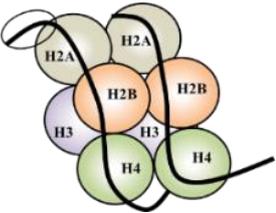
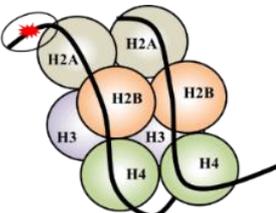
Для получения мононуклеосом использовали нуклеосом-позиционируемую последовательность 603 длиной 147 пар оснований (п.о.) [221]. Нуклеосомную ДНК длиной 147 п.о. получали при помощи ПЦР с использованием флуоресцентно меченых праймеров 603-Forward/603-Reverse (см. пункт 2.2.11.3). Для того, чтобы избавиться от избытка праймеров, полученные ПЦР-продукты обрабатывали экзонуклеазой ExoI в течение 2 часов при 37°C. Полученный образец переосаждали этиловым спиртом, осадок растворяли в воде. Сборку мононуклеосомного субстрата проводили методом солевого диализа, согласно [222]. Оптимальное соотношение коровые гистоны/ДНК определяли экспериментально. Для этого 0,1 мкМ нуклеосомную ДНК смешивали с коровыми гистонами при различных

соотношениях (1:0,15 – 1:0,55) в низкосолевом буфере (10 мМ Tris-HCl pH 7.5, 10 мМ NaCl, 0,2 мМ ЭДТА, 5 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% NP-40) и инкубировали в течение 15 минут при 37°C. Образование моонуклеосомы анализировали с помощью электрофореза в 4% полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях (см. пункт 2.2.4). Для препаративной наработки моонуклеосомы были выбраны условия, при которых анализируемая реакционная смесь при наименьшем молярном соотношении [коровые гистоны]/[ДНК] не содержала свободной ДНК. ДНК и коровые гистоны в соответствующем молярном соотношении смешивали в высокосолевом буфере, содержащем 2 М NaCl, и диализовали против буфера, содержащего 250 мМ NaCl, в течение 6 ч при 4°C. Затем диализовали против буфера, содержащего 10 мМ NaCl в течение ночи при 4°C при постоянном перемешивании. Эффективность сборки моонуклеосомы анализировали в 4% полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях (см. пункт 2.2.4) (Приложение 2).

Нуклеосомную ДНК и моонуклеосому, содержащие однонуклеотидную брешь, получали непосредственно перед проведением реакции поли(ADP-рибозил)ирования. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 40 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 1 мкМ нуклеосомную ДНК или 1 мкМ моонуклеосому. Реакцию инициировали добавлением Udg и Ape1 до конечной концентрации 50 и 20 нМ соответственно с последующей инкубацией при 37°C в течение 15 минут.

Таблица 2.4. Обозначения и структуры нуклеосомной ДНК и моонуклеосомы, используемых в работе.

Обозначение и последовательность в выделенной области	Схематическое изображение
<p>Нуклеосомная ДНК</p> <p>5' -ACCCCAGGGAC U TGAAGTAATAA-3'</p> <p>3' -TGGGGTCCCTG A АСТТСАТТАТТ-5'</p>	
<p>Нуклеосомная ДНК с однонуклеотидной брешью</p> <p>ОН Р</p> <p>5' -ACCCCAGGGAC TGAAGTAATAA-3'</p> <p>3' - TGGGGTCCCTGAАСТТСАТТАТТ-5'</p>	

<p style="text-align: center;">Мононуклеосома</p> <p>5' -ACCCCAGGGAC U TGAAGTAATAA-3'</p> <p>3' -TGGGGTCCCTG A АСТТСАТТАТТ-5'</p>	
<p style="text-align: center;">Мононуклеосома с однонуклеотидной брешью</p> <p style="text-align: center;">OH \ P</p> <p>5' -ACCCCAGGGAC TGAAGTAATAA-3'</p> <p>3' -TGGGGTCCCTGAАСТТСАТТАТТ-5'</p>	
<p>*- повреждение ДНК, овалом выделена область, где находится повреждение ДНК</p>	

2.2.7. Синтез радиоактивного NAD⁺ и полимера ADP-рибозы

Синтез [³²P]-меченого NAD⁺ проводили в реакционной смеси, содержащей 25 мМ Tris-HCl pH 7.5, 20 мМ MgCl₂, 2 мМ β-никотинамидмононуклеотид, 1 мМ АТФ, 0,5 мКи [α-³²P]АТФ и 5 мг/мл никотинамидмононуклеотид аденилилтрансферазы (NMNAT). После инкубации смеси в течение 1 часа при 37°C фермент NMNAT инактивировали нагреванием в течение 10 минут при 65°C, денатурированный фермент осаждали центрифугированием (12000 g, 10 минут, 4°C).

Синтез [³²P]-меченой поли(ADP-рибозы) ([³²P]PAR) проводили в реакционной смеси, содержащей 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 40 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl₂, 100 нМ ДНК Nick (Таблица 2.3), 200 нМ PARP1 или 500 нМ PARP1^{Y986S}, или PARP1^{Y986H}, или PARP1^{G972R} и 10 мкМ NAD⁺ (0,4 мКи [³²P]-меченого NAD⁺). Реакционную смесь инкубировали в течение 30 минут при 37°C. Далее реакционную смесь обрабатывали ДНКазой I (0.1 ед/мкл) в течение 10 минут при 37°C. Щелочной гидролиз поли(ADP-рибозы), ковалентно связанной с PARP1, осуществляли в реакционной смеси, содержащей 0,1 М NaOH с последующей инкубацией при 37°C в течение 40 минут. Реакцию останавливали добавлением HCl до конечной концентрации 0,1 М (pH 7.5). Образующиеся фракции PAR очищали экстракцией смесью фенол:хлороформ:изоамиловый спирт (25:24:1) и осаждали добавлением этанола до 70% и ацетата натрия до 0,3 М с последующей инкубацией при -20°C. Осадок, отделенный центрифугированием, растворяли в воде. Полученные суммарные препараты радиоактивно меченой PAR: PAR^{Y986S}, PAR^{Y986H} и PAR^{G972R} анализировали гель-электрофорезом в денатурирующем 20%-ом ПААГ (см. пункт 2.2.3) с последующей радиоавтографией (Приложение 3). Концентрацию [³²P]-меченого

PAR оценивали по количеству включенной [³²P]ADP-рибозы с учетом интенсивности сигнала и концентрации [³²P]NAD⁺.

2.2.8. Определение концентрации белка по методу Брэдфорда

Для определения концентрации белка в препарате смешивали реактив Брэдфорда (“Thermo”, США) с водой в соотношении 1:1 в суммарном объеме 2 мл и добавляли исследуемый раствор белка в объеме 5 мкл. После инкубации в течение 5 минут при комнатной температуре определяли оптическую плотность раствора на длине волны 595 нм на фотоколориметре («ЭКОТЕСТ-2020-4», Россия). Концентрацию белка рассчитывали на основе данных калибровочной кривой зависимости оптической плотности растворов БСА известной концентрации.

2.2.9. Определение концентрации препарата ДНК

Для определения концентрации препарата ДНК был произведен количественный анализ нуклеиновых кислот спектрофотометрическим методом. Определяли поглощение раствора на длинах волн 230 нм, 260 нм и 280 нм. Расчет концентрации производили исходя из того, что оптическая плотность препарата двуцепочечной ДНК на длине волны 260 нм, равная 1, соответствует концентрации ДНК 50 мкг/мл. Для выявления примесей белков в растворе ДНК, анализировали отношение оптической плотности раствора на длинах волн 260 и 280 нм ($R_{260/280}$). Для выявления низкомолекулярных примесей, анализировали отношение оптической плотности раствора на длинах волн 260 и 230 нм ($R_{260/230}$). Определение концентрации ДНК проводили на приборе SimpliNano (“GE Healthcare”, США).

2.2.10. Получение культуры клеток, трансформированной плазмидной ДНК

Трансформацию проводили с использованием химически компетентных клеток. Для этого в пробирку, содержащую 100 мкл суспензии клеток, добавляли 10 нг препарата плазмидной ДНК. Пробирку инкубировали 20 минут на льду и подвергали тепловому шоку в течение 2 минут при 42°C. Далее в пробирку добавляли 1 мл среды LB (триптон - 10 г/л, дрожжевой экстракт - 5 г/л, NaCl - 5 г/л). Суспензию инкубировали при 37°C в течение 1 часа при постоянном перемешивании. После инкубации клетки рассеивали на чашке Петри с заранее приготовленной агаризованной средой (среда LB, 1,5% бакто-агар), в которую был добавлен селективирующий антибиотик (конечная концентрация составляла 100 мкг/мл для ампициллина, 35 мкг/мл для хлорамфеникола) для селекции. Чашку термостатировали при 37°C в течении 16 часов.

2.2.11. Получение ПЦР продуктов

2.2.11.1. Получение ПЦР-продуктов для клонирования полноразмерного YB-1 и его делеционных мутантов

Реакционные смеси, общим объемом 50 мкл содержали: Q5-buffer (включает в себя буферные компоненты, дезоксинуклеотидтрифосфаты, MgCl₂), GC-энхансер (необходим для амплификации фрагментов ДНК, содержащих повышенное количество GC нуклеотидов), Q5 ДНК-полимеразу (1 единица активности), по 50 пМоль праймеров (**Таблица 2.2**) и ДНК матрицу. Был использован нижеследующий вариант проведения “touchdown” ПЦР:

I стадия – денатурация ДНК - 95°C в течение 3 минут; II стадия – 5 циклов: денатурация - 94°C в течение 15 секунд, отжиг – температура отжига праймеров (см. ниже) в течение 15 секунд, на этой стадии температура уменьшалась на 1 градус в каждом последующем цикле, элонгация - 72°C в течение 2 минут; III стадия – 20 циклов: денатурация - 94°C в течение 15 секунд, отжиг - температура отжига праймеров (см. ниже) в течение 15 секунд, элонгация - 72°C в течение 2 минут; IV стадия – финальная достройка - 72°C в течение 5 минут.

2.2.11.2. Получение ПЦР-продуктов для клонирования мутантных форм PARP1

Реакционные смеси, общим объемом 50 мкл содержали: Q5-buffer (включает в себя буферные компоненты, дезоксинуклеотидтрифосфаты, MgCl₂), Q5 ДНК-полимеразу (1 единица активности), по 50 пМоль праймеров (**Таблица 2.2**) и ДНК матрицу. Был использован нижеследующий вариант проведения “touchdown” ПЦР:

I стадия – денатурация ДНК - 95°C в течение 3 минут; II стадия – 5 циклов: денатурация - 94°C в течение 15 секунд, отжиг – температура отжига праймеров (см. ниже) в течение 15 секунд, на этой стадии температура уменьшалась на 1 градус в каждом последующем цикле, элонгация - 72°C в течение 5 минут; III стадия – 20 циклов: денатурация - 94°C в течение 15 секунд, отжиг - температура отжига праймеров (см. ниже) в течение 15 секунд, элонгация - 72°C в течение 5 минут; IV стадия – финальная достройка - 72°C в течение 10 минут.

2.2.11.3. Получение ПЦР-продукта нуклеосомной ДНК

Реакционные смеси, общим объемом 50 мкл содержали: 1x буфер для проведения ПЦР (50 mM Tris-HCl pH 8.8, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 0,2 mM каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 1,5 mM MgCl₂, 0,1% Tween 20), Taq ДНК-полимеразу (5 единиц активности), по 50 пМоль праймеров (**Таблица 2.2**) и ДНК матрицу. Был использован нижеследующий вариант проведения “touchdown” ПЦР:

I стадия – денатурация ДНК - 95°C в течение 3 минут; II стадия – 5 циклов: денатурация - 94°C в течение 15 секунд, отжиг – температура отжига праймеров (см. ниже) в течение 15 секунд, на этой стадии температура уменьшалась на 1 градус в каждом последующем цикле, элонгация - 72°C в течение 10 секунд; III стадия – 20 циклов: денатурация - 94°C в течение 15 секунд, отжиг - температура отжига праймеров (см. ниже) в течение 15 секунд, элонгация - 72°C в течение 10 секунд; IV стадия – финальная достройка - 72°C в течение 1 минуты.

В зависимости от использованной пары праймеров использовали разную температуру отжига: pLate51-YB-1-For/pLate51-YB-1Rev - 68°C первые 5 циклов, 70°C остальные циклы; pLate51-YB-1-For/pLate51-YB-1(1-219)-Rev - 67°C первые 5 циклов, 70°C остальные циклы; pLate31-YB-1-For/pLate31-YB-1(Δ 1)-Rev - 68°C первые 5 циклов, 70°C остальные циклы; pLate51-YB-1-For/pLate31-YB-1(Δ 1-2)-Rev - 67°C первые 5 циклов, 70°C остальные циклы; pLate31-YB-1-For/pLate31-YB-1(Δ 1-2-3)-Rev - 68°C первые 5 циклов, 70°C остальные циклы; pLate31-CTD-For/pLate31-CTD-Rev - 63°C первые 5 циклов, 65°C остальные циклы; Y986S-For/Y986S-Y986H-Rev - 58°C первые 5 циклов, 53°C остальные циклы; Y986H-For/Y986S-Y986H-Rev - 58°C первые 5 циклов, 53°C остальные циклы; G972R-For/G972R-Rev - 59°C первые 5 циклов, 54°C остальные циклы; E988K-For/E988K-Rev - 57°C первые 5 циклов, 52°C остальные циклы; 603-Forward/603-Reverse - 65°C первые 5 циклов, 60°C остальные циклы. Температуру плавления праймеров рассчитывали с использованием сервиса OligoAnalyzer tool (“IDT”, США).

Анализ продуктов производился в 0,7% агарозном геле.

2.2.12. Получение плазмид pLate51-YB-1, pLate51-YB-1(1-219), pLate31-YB-1(Δ 1), pLate31-YB-1(Δ 1-2), pLate31-YB-1(Δ 1-2-3), pLate31-CTD, кодирующих белок YB-1 или его мутантные формы

2.2.12.1. Создание протяженных 5'- и 3'- “липких концов” продукта ПЦР

ПЦР продукт, содержащий кодирующую транскрибируемую часть кДНК YB-1, YB-1(1-219) YB-1(Δ 1), YB-1(Δ 1-2), YB-1(Δ 1-2-3) или CTD, фланкированную специфичными нуклеотидными последовательностями, получали с использованием пар праймеров pLate51-YB-1-For/pLate51-YB-1Rev, pLate51-YB-1-For/pLate51-YB-1(1-219)-Rev, pLate31-YB-1-For/pLate31-YB-1(Δ 1)-Rev, pLate51-YB-1-For/pLate31-YB-1(Δ 1-2)-Rev, pLate31-YB-1-For/pLate31-YB-1(Δ 1-2-3)-Rev, pLate31-CTD-For/pLate31-CTD-Rev соответственно (Таблица 2.2). Полученный ПЦР-продукт осаждали добавлением этанола до 70% и ацетата натрия до 0,3 М с последующей инкубацией при – 20°C. Осадок, отделенный центрифугированием, растворяли в воде. Очищенный ПЦР-продукт добавляли к

реакционной смеси общим объемом 10 мкл, содержащей буферные компоненты (“LIC” буфер, система aLICator, “Thermo”, США) и 1 мкл ДНК-полимеразы фага T4 (1 ед. активности/мкл) и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Реакцию останавливали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 50 мМ.

2.2.12.2. Отжиг с векторами pLate51 или pLate31 и трансформация клеток *E.coli*

К полученным в предыдущем пункте реакционным смесям добавляли 0,02 пМоль линейризованной формы вектора pLate51 или pLate31 (система aLICator, “Thermo”, США), содержащей комплементарные “липкие” концы, перемешивали и инкубировали в течение 5 минут при комнатной температуре. Трансформацию клеток *E. coli* XLBlue полученными препаратами проводили согласно пункту 2.2.10. Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием набора Plasmid miniprep (“Евроген”, Россия). Характеризацию полученных препаратов плазмидной ДНК проводили согласно пункту 2.2.9.

2.2.13. Выделение и очистка рекомбинантных белков YB-1, YB-1(1-219), YB-1(Δ 1), YB-1(Δ 1-2) или YB-1(Δ 1-2-3), CTD из биомассы клеток *E.coli*

2.2.13.1. Нарботка биомассы клеток *E.coli*

Клетки *E.coli* Rosetta2(DE3), трансформированные pLate51-YB-1, pLate51-YB-1(1-219), pLate31-CTD или клетки *E.coli* BL21(DE3)GeneX, трансформированные pLate31-YB-1(Δ 1), pLate31-YB-1(Δ 1-2), pLate31-YB-1(Δ 1-2-3) растили в среде LB, содержащей 50 мМ Na₂HPO₄, 50 мМ KH₂PO₄, 25 мМ (NH₄)₂SO₄, 2 мМ MgSO₄, 0,5% глицерин, 0,05% глюкозу, 0,2% лактозу и селективные антибиотики (ампициллин (100 мкг/мл) для BL21(DE3)GeneX или ампициллин и хлорамфеникол (100 мкг/мл) для Rosetta2(DE3)) в течение 18 часов, при температуре 37°C и интенсивной аэрации (200 об/мин) до стационарной плотности клеточной культуры. Клетки собирали центрифугированием при 4°C (3000 g, 10 минут) и осажденные клетки хранили при -70°C. Выход биомассы 10 г/л.

2.2.13.2. Приготовление клеточного лизата

Клеточную биомассу ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 10% глицерин, 0,5 мМ PMSF, смесь ингибиторов протеаз и лизоцим в концентрации 1 мкг/мл из расчета 5 мл буфера на 1 г биомассы клеток. После инкубации на льду в течение 20 минут к смеси добавляли равный объем буферного раствора, содержащего 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 2 М NaCl, 2% NP-40, 10% глицерин, 10 мМ имидазол, 0,5 мМ PMSF и смесь ингибиторов протеаз. Суспензию обрабатывали в ультразвуковом дезинтеграторе при 40 кГц в течение 20 минут с охлаждением до 4°C. Полученный лизат центрифугировали при 30000 g в течение 30 минут в роторе Beckman JA 25.50.

2.2.13.3. Хроматографическое выделение белка

Супернатант наносили на колонку, содержащую в качестве сорбента 3 мл Ni-NTA-агарозы, уравновешенную буфером 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 0,1% NP-40, 10% глицерин, 5 mM имидазол. После нанесения носитель промывали буфером уравновешивания до стабилизации базовой линии. Хроматографическое разделение на Ni-NTA проводили в линейном градиенте концентрации имидазола (5 – 250 mM) в буфере 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 0,1% NP-40, 10% глицерин. Далее для очистки целевого белка проводили следующие стадии: катионообменную хроматографию на колонке MonoS 5/50 и гель-фильтрационную хроматографию на колонке Superdex 75pg 16/600 для выделения YB-1; катионообменную хроматографию на колонке MonoS 5/50 для выделения YB-1(1-219); аффинную хроматографию на колонке, содержащей в качестве сорбента гепарин-сефарозу для выделения YB-1(Δ 1), YB-1(Δ 1-2) и YB-1(Δ 1-2-3). Для выделения STD дополнительных хроматографических стадий не проводилось.

Фракции, содержащие целевой белок после хроматографии на Ni-NTA носителе, разбавляли в два раза буферным раствором, содержащим 20 mM HEPES-KOH pH 8.0, 0,1% NP-40, 10% глицерин, и наносили на колонку MonoS 5/50, уравновешенную буфером 20 mM HEPES-KOH pH 8.0, 0,5 M KCl, 0,1% NP-40, 10% глицерин. Хроматографическое разделение проводили в линейном градиенте концентрации KCl (0,5 – 2,0 M) в буфере 20 mM HEPES-KOH pH 8.0, 0,1% NP-40, 10% глицерин.

Фракции, полученные после хроматографии на MonoS 5/50, разбавляли в два раза буферным раствором, содержащим 20 mM HEPES-KOH pH 8.0, и наносили на колонку Superdex 75pg 16/600, уравновешенную 20 mM HEPES-KOH pH 8.0, 1 M KCl. Элюцию белка проводили в условиях изократической элюции в буфере 20 mM HEPES-KOH pH 8.0, 1 M KCl.

Фракции, содержащие YB-1(Δ 1), YB-1(Δ 1-2) или YB-1(Δ 1-2-3) после хроматографии на Ni-NTA носителе, разбавляли в два раза 20 mM Tris-HCl pH 8.0 и наносили на колонку, содержащую в качестве сорбента 3 мл гепарин-сефарозы, уравновешенную буфером 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,5 M NaCl. Хроматографическое разделение проводили в линейном градиенте концентрации NaCl (0,5 – 2,0 M) в буфере 20 mM Tris-HCl pH 8.0.

2.2.13.4. Получение концентрированного препарата YB-1

Фракции, содержащие наименьшее количество примесей, концентрировали с использованием концентратора Vivaspin 10K MWCO (“Sartorius”, Германия). Проводили

частичную замену буфера в получившемся препарате путем разбавления 20 мМ KH_2PO_4 - KOH pH 7.6, 0,5 М KCl с последующей ультрафильтрацией.

Содержание белка во фракциях по ходу очистки и чистоту конечного препарата определяли гель-электрофорезом по методике Лэммли (см. пункт 2.2.2). Концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорда (см. пункт 2.2.8).

2.2.14. Получение плазмид pET-32a-PARP1(Y986S), pET-32a-PARP1(Y986H), pET-32a-PARP1(G972R), pET-32a-PARP1(E988K), кодирующих мутантные формы белка PARP1

Для создания плазмид, содержащих в своем составе кДНК гена PARP1(Y986S), PARP1(Y986H) или PARP1(G972R) был использован метод сайт-направленного мутагенеза. С использованием праймеров, комплементарным целевым областям гена PARP1 дикого типа (PARP1wt) и содержащих в своем составе целевые замены, методом ПЦР была целиком амплифицирована последовательность плазмидной ДНК pET-32a-PARP1. Полученную двуцепочечную ДНК лигировали по тупым концам и проводили трансформацию клеток *E.coli* XLBlue. Методом секвенирования по Сэнгеру анализировали амплифицированную плазмидную ДНК на наличие ошибок.

2.2.15. Выделение и очистка рекомбинантного белка PARP1wt и её мутантных форм PARP1(Y986S), PARP1(Y986H), PARP1(G972R), PARP1(E988K)

2.2.15.1. Нарabотка PARP1wt, PARP1(Y986S), PARP1(Y986H), PARP1(G972R), PARP1(E988K) в клетках E.coli Rosetta2(DE3)pLysS

Трансформированные соответствующими плазмидами клетки *E.coli* Rosetta2(DE3)pLysS растили в среде LB, содержащей 50 мМ Na_2HPO_4 , 50 мМ KH_2PO_4 , 25 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2 мМ MgSO_4 , 0,5% глицерин, 0,05% глюкозу, 0,2% лактозу и селективные антибиотики ампициллин (100 мкг/мл) и хлорамфеникол (100 мкг/мл) в течение 18 часов при 37°C. После инкубации клетки осаждали центрифугированием при 3000 g, супернатант отбирали и осажденные клетки хранили при -70°C.

2.2.15.2. Приготовление клеточного лизата

Клетки ресуспендировали в буферном растворе, содержащем 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 10% глицерин, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 10 мМ имидазол, 0,5 мМ PMSF и смесь ингибиторов протеаз из расчета 5 мл буфера на 1г биомассы клеток *E.coli*. После инкубации на льду в течение 20 минут к смеси добавляли равный объем буферного раствора, содержащего 20 мМ Tris-HCl pH 8.0, 2 М NaCl , 2% NP-40, 10% глицерин, 2 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,5 мМ PMSF, смесь ингибиторов протеаз. Суспензию обрабатывали в

ультразвуковом дезинтеграторе при 40 кГц в течение 20 минут с охлаждением до 4°C. Полученный лизат центрифугировали при 30000 g в течение 30 минут в роторе Beckman JA 25.50.

2.2.15.3. Хроматографическое выделение белка

Супернатант наносили на колонку, содержащую в качестве сорбента 3 мл Ni-NTA-агарозы, уравновешенную буфером 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 M NaCl, 2 mM 2-меркаптоэтанол, 10% глицерин, 5 mM имидазол. После нанесения носитель промывали буфером уравновешивания до стабилизации базовой линии. Затем носитель промывали буфером 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,1 M NaCl, 2 mM 2-меркаптоэтанол, 10% глицерин, 5 mM имидазол до стабилизации базовой линии. Хроматографическое разделение на Ni-NTA проводили в линейном градиенте концентрации имидазола (5 – 250 mM) в буфере 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,1 M NaCl, 2 mM 2-меркаптоэтанол, 10% глицерин. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и наносили на колонку, содержащую в качестве сорбента 5 мл гепарин-сефарозы. Хроматографическое разделение на гепарин-сефарозе проводили в линейном градиенте концентрации NaCl (0,1 – 1,0 M) в буфере 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 7 mM 2-меркаптоэтанол, 10% глицерин. Фракции, содержащие целевой белок, объединяли и разбавляли в 10 раз буфером, содержащим 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 7 mM 2-меркаптоэтанол, 10% глицерин, и наносили на колонку, содержащую в качестве сорбента 5 мл оцДНК-целлюлозы. Хроматографическое разделение на оцДНК-целлюлозе проводили в линейном градиенте концентрации NaCl (0,1 - 1 M) в буфере 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 7 mM 2-меркаптоэтанол, 10% глицерин.

2.2.15.4. Получение концентрированного препарата PARP1

Фракции целевого белка, содержащие наименьшее количество примесей, концентрировали с использованием концентратора Vivaspin 10K MWCO (“Sartorius”, Германия). Проводили частичную замену буфера в получившемся препарате путем разбавления белка буфером, содержащем 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 0,3 M NaCl, 2 mM ДТТ, с последующей ультрафильтрацией.

Содержание белка во фракциях по ходу очистки и чистоту конечного препарата определяли гель-электрофорезом по методике Лэммли (см. пункт 2.2.2). Концентрацию белка измеряли по методу Брэдфорда (см. пункт 2.2.8).

2.2.16. Исследование взаимодействия УВ-1 и его мутантных форм с поврежденной ДНК и нуклеосомной ДНК методом флуоресцентной спектроскопии

Связывание YB-1 и его мутантных форм с поврежденной ДНК детектировали по изменению анизотропии флуоресценции ДНК-дуплекса (Nick) (Таблица 2.3), содержащего одноцепочечный разрыв [223]. Реакционные смеси, содержащие 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 40 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 мкг/мл БСА, 0–6000 нМ YB-1(FL) или YB-1(Δ1), или YB-1(Δ1-2), или 0–20000 нМ YB-1(Δ1-2-3) и 50 нМ FAM-меченый ДНК-дуплекс (Nick), готовили на льду в 384-луночном планшете, затем инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Количественную обработку экспериментальных данных выполняли в программе MARS Data analysis («GMB LabtechGmbH», Германия). Зависимость изменения анизотропии флуоресценции от концентрации белка была обработана с использованием уравнения: $F = F_0 + (F_\infty - F_0) / [1 + (EC_{50}/C)^n]$, 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. EC_{50} – концентрация белка, при которой $F - F_0 = (F_\infty - F_0)/2$, n – коэффициент Хилла.

Диссоциацию белков (PARP1 и YB-1) из комплекса с ДНК в ходе их поли(ADP-рибозил)ирования детектировали по изменению анизотропии флуоресценции FAM-меченой ДНК (Nick) или нуклеосомной ДНК (147 п.о.), или нуклеосомной ДНК (147 п.о.), содержащей однонуклеотидную брешь, или мононуклеосомы, или мононуклеосомы, содержащей однонуклеотидную брешь согласно [223]. Реакционные смеси, содержащие 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 40 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 нМ PARP1, 1600 нМ YB-1, 10 мМ ЭДТА и один из перечисленных ДНК-субстратов, готовили на льду в 384-луночном планшете, затем инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут. Запуск реакции поли(ADP-рибозил)ирования осуществляли добавлением NAD^+ . Измерение анизотропии флуоресценции проводилось в режиме кинетического сканирования. Значения величин, полученные для каждой лунки на одном шаге сканирования, соответствовали вычисленному среднему значению из 50 измерений (вспышек) прибора.

Измерение анизотропии флуоресценции 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 – 482 нм (фильтр 482-16 и дихроичный фильтр LP504), эмиссии – 530 нм (фильтр 530-40).

2.2.17. Исследование взаимодействия YB-1 и его мутантных форм с поли(ADP-рибозой) методом задержки в геле

Реакционные смеси, содержащие 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 40 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 мкг/мл БСА, 60 нМ [^{32}P]-меченой PAR (см. пункт 2.2.7), 0-2000 нМ YB-1(FL) или 0-2000

нМ YB-1(Δ 1), или 0-10000 нМ YB-1(Δ 1-2), или 0-10000 нМ YB-1(Δ 1-2-3) инкубировали при 37°C в течение 5 минут. Затем в реакционные смеси добавляли буфер нанесения (5-кратный) 20 мМ Tris-HCl pH 7.5, 25% глицерин, 0.01% бромфеноловый синий и проводили электрофорез в неденатурирующих условиях в ПААГ при 4°C с последующей радиоавтографией. Для анализа комплексов YB-1(FL) и YB-1(Δ 1) с PAR использовали 5% ПААГ (акриламид/бис-акриламид в соотношении 37,5:1), для анализа комплексов YB-1(Δ 1-2) и YB-1(Δ 1-2-3) с PAR - 10% ПААГ (акриламид/бис-акриламид в соотношении 75:1) и 10% ПААГ (акриламид/бис-акриламид в соотношении 75:1) для анализа комплексов YB-1(FL) с PAR^{Y986S} или PAR^{Y986H}, или PAR^{G972R}.

Величину EC₅₀ для комплексов YB-1 и его мутантных форм с PAR определяли, рассчитывая интенсивность сигнала свободной и связанной поли(ADP-рибозы) с помощью программы Quantity One Basic с последующей аппроксимацией данных с использованием программного обеспечения SigmaPlot. Величина EC₅₀ обозначала концентрацию белка, при которой достигается половина от максимального насыщения его комплексов с PAR.

2.2.18. Фиксация белков, модифицированных поли(ADP-рибозой), трихлоруксусной кислотой

Фиксацию белков проводили путем нанесения реакционной смеси на хроматографическую бумагу Whatman (1 см x 1 см), предварительно пропитанную 10% трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Затем проводили отмывку бумаги для удаления молекул неизрасходованного NAD⁺ 3 раза по 5 мин в 5% растворе ТХУ, затем однократно в 90% этаноле для удаления остатков ТХУ. Перед определением радиоактивности образцов фильтры высушивали на воздухе.

2.2.19. Анализ активности PARP1 в присутствии YB-1 и его мутантных форм

Начальную скорость синтеза PAR в реакции, катализируемой PARP1 (или её мутантами) в присутствии или в отсутствие YB-1(FL) (или его мутантов) определяли исходя из кинетики включения [³²P]NAD⁺ в синтезируемый полимер ADP-рибозы. Реакционные смеси содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 40 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 мкг/мл БСА, 10 мМ ЭДТА, 100 нМ PARP1^{wt} или PARP1^{Y986S}, или PARP1^{Y986H}, или PARP1^{G972R}, 0,5–2,5 мкМ YB-1(FL) или 2,0 мкМ YB-1(Δ 1) или YB-1(Δ 1-2), или YB-1(Δ 1-2-3) и 0,5 OD₂₆₀/мл активированной ДНКазой I ДНК тимуса теленка (ДНК_{акт}). Реакцию синтеза PAR инициировали добавлением NAD⁺ до конечной концентрации 20 мкМ (0,4 мкКи [³²P]-меченого NAD⁺). Реакционные смеси инкубировали при 30°C и отбирали аликвоты через 1, 3, 5 и 10 минут. Реакцию останавливали перенесением аликвот реакционной смеси на

бумажный фильтр Whatman (1 см x 1 см), пропитанный 10%-ой трихлоруксусной кислотой (см. пункт **2.2.18**).

Количественную оценку интенсивности синтеза PAR оценивали по суммарной радиоактивности продуктов реакции радиоавтографией и последующим анализом в программе Quantity One Basic. На основании полученных данных строили график зависимости времени реакции поли(ADP-рибозил)ирования (t) от количества синтезированной поли(ADP-рибозы) (p) в программе Origin с использованием уравнения 1:

$$(1) [P] = [Pmax] * (1 - e^{-kt});$$

$$(2) \vartheta = \frac{d[P]}{dt} = k * [Pmax] * e^{-kt};$$

$$(3) \vartheta_0 = \frac{d[P]}{dt} = k * [Pmax]; \text{ при } t = 0$$

где $Pmax$ – максимальная концентрация продукта синтеза при $t \rightarrow \infty$, t – время, k – константа скорости первого порядка. Рассчитанные кинетические параметры $[Pmax]$ и k были использованы для расчета начальной скорости реакции (уравнение 3).

2.2.20. Исследование уровня поли(ADP-рибозил)ирования белков

Для определения относительного уровня авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1wt или её мутантных форм и транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1(FL) или его делеционного мутанта YB-1(Δ 1) анализировали интенсивность включения радиоактивной метки в белки (**Рис. 3.11 В, Рис. 3.28 В**) в программе Quantity One Basic. Оценивали суммарную интенсивность сигнала соответствующих дорожек на денатурирующем геле и интенсивность сигнала модифицированных белков. Относительный уровень поли(ADP-рибозил)ирования определяли как отношение интенсивности сигнала модифицированного белка к суммарной интенсивности сигнала дорожки.

2.2.21. Измерение размера поли(ADP-рибозил)ированной PARP1 методом атомно-силовой микроскопии (АСМ)

Реакционные смеси, содержащие 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 25 мМ NaCl, 10 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 40 нМ PARP1 или PARP1^{Y986S}, или PARP1^{Y986H}, или PARP1^{G972R}, 10 нг/мкл поврежденной плазмиды pBR322 и 560 нМ YB-1 или AP-CSD инкубировали 1 час при 37°C. Реакцию поли(ADP-рибозил)ирования инициировали добавлением NAD⁺ до конечной концентрации 0,25 мМ. Образцы разбавляли в 10 раз буфером, содержащим 12,5 мМ HEPES-NaOH pH 8.0, 12,5 мМ KCl и 1 мМ ДТТ, добавляли путресцин до конечной концентрации 2 мМ и наносили на поверхность свежесколотой слюды и инкубировали в течение 1 минуты. Поверхность слюды промывали 0,02% раствором уранилацетата, с последующей промывкой MilliQ водой (“Merck Millipore”, Германия) и высушивали на

воздухе. АСМ-исследования проводили в полуконтактном режиме на микроскопе Nanoscope V Multimode 8 (“Bruker”, США) на воздухе с использованием кантиливера Scanasyst-Air (“Bruker”, США) [224]. Регистрировали непрерывные кривые сила-расстояние с разрешением 2048x2048 пикселей при частоте 1.5 Гц при колебаниях иглы в вертикальном направлении с амплитудой 100–300 нм на низкой частоте (1–2 кГц). Размеры поли(ADP-рибозил)ированных белков определяли в программе ImageJ, площадь поли(ADP-рибозил)ированной молекулы рассчитывали согласно следующему уравнению: $S = \pi \cdot R_{\min} \cdot R_{\max}$, где R_{\min} и R_{\max} — большая и малая полуоси минимального эллипса, включающего поли(ADP-рибозил)ированный белок.

2.2.22. Измерение гидродинамического радиуса поли(ADP-рибозил)ированных молекул PARP1 методом динамического светорассеяния (ДСР)

Для определения гидродинамического радиуса (R_h) поли(ADP-рибозил)ированных молекул PARP1 проводили реакцию поли(ADP-рибозил)ирования. Все растворы предварительно пропускали через фильтр Millipore с диаметром пор 0,22 мкм. Реакционные смеси объемом 16 мкл, содержащие 25 мМ HEPES-NaOH pH 7.5, 100 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 10 мМ MgCl₂, 2,5 мкМ Nick и 2,5 мкМ PARP1_{wt} или PARP1^{Y986S}, или PARP1^{Y986H}, или PARP1^{G972R} инкубировали в течение 1 минуты при комнатной температуре непосредственно в кварцевой кювете (ZEN 2112 low volume). Реакцию синтеза PARP инициировали добавлением NAD⁺ до конечной концентрации 1 мМ. Измерение гидродинамического радиуса частиц, образующихся в ходе реакции, проводили каждые 3 мин после начала реакции поли(ADP-рибозил)ирования. После 40-минутной инкубации к реакционной смеси добавляли ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ.

Измерение автокорреляционной функции рассеянного света в образце проводили на приборе Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments Ltd., Великобритания). Обратный рассеянный свет от He/Ne-лазера мощностью 4 мВт (633 нм) собирали под углом 173° при температуре 25°C. Коэффициент диффузии (D) рассчитывали, используя программное обеспечение «Zetasizer Nano ZS software». Гидродинамический радиус частиц рассчитывали по формуле Стокса–Эйнштейна для сферических частиц: $R_h = (kT) / (6\pi \eta D)$, где D — коэффициент диффузии, определяемый ДСР, k — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура, η — динамическая вязкость растворителя, принятая за вязкость (0.8998 пПа) буферного раствора при 25°C.

3. Результаты и их обсуждение

3.1. YB-1 как фактор, стимулирующий активность PARP1

Ранее было показано, что YB-1 подвергается поли(ADP-рибозил)ированию *in vitro* и является преимущественной мишенью модификации в реакции поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемой PARP1 [5,6]. Регуляторная функция, выполняемая PARP1 в ответе клетки на повреждение ДНК очень многогранна, поэтому идентификация и изучение механизма действия белков, влияющих на активность PARP1 и синтез поли(ADP-рибозы) в условиях генотоксического стресса является актуальной задачей.

3.1.1. 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 [6]. На первом этапе данной работы было оценено влияние рекомбинантного YB-1 на каталитическую активность PARP1 при различных соотношениях концентраций этих белков и в присутствии активированной ДНКазой I ДНК тимуса теленка, содержащей различные типы повреждений, в том числе одно- и двуцепочечные разрывы. Поли(ADP-рибозил)ирование YB-1 и PARP1 анализировали в присутствии [³²P]-меченого NAD⁺ и детектировали по включению радиоактивной метки в белки в ходе ковалентного присоединения ADP-рибозы. Было установлено, что при последовательном увеличении концентрации YB-1 в реакционной смеси происходит постепенное увеличение начальной скорости реакции поли(ADP-рибозил)ирования (Рис. 3.1 А, Б) и возрастание уровня, как авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1, так и транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 (Рис. 3.1 В).

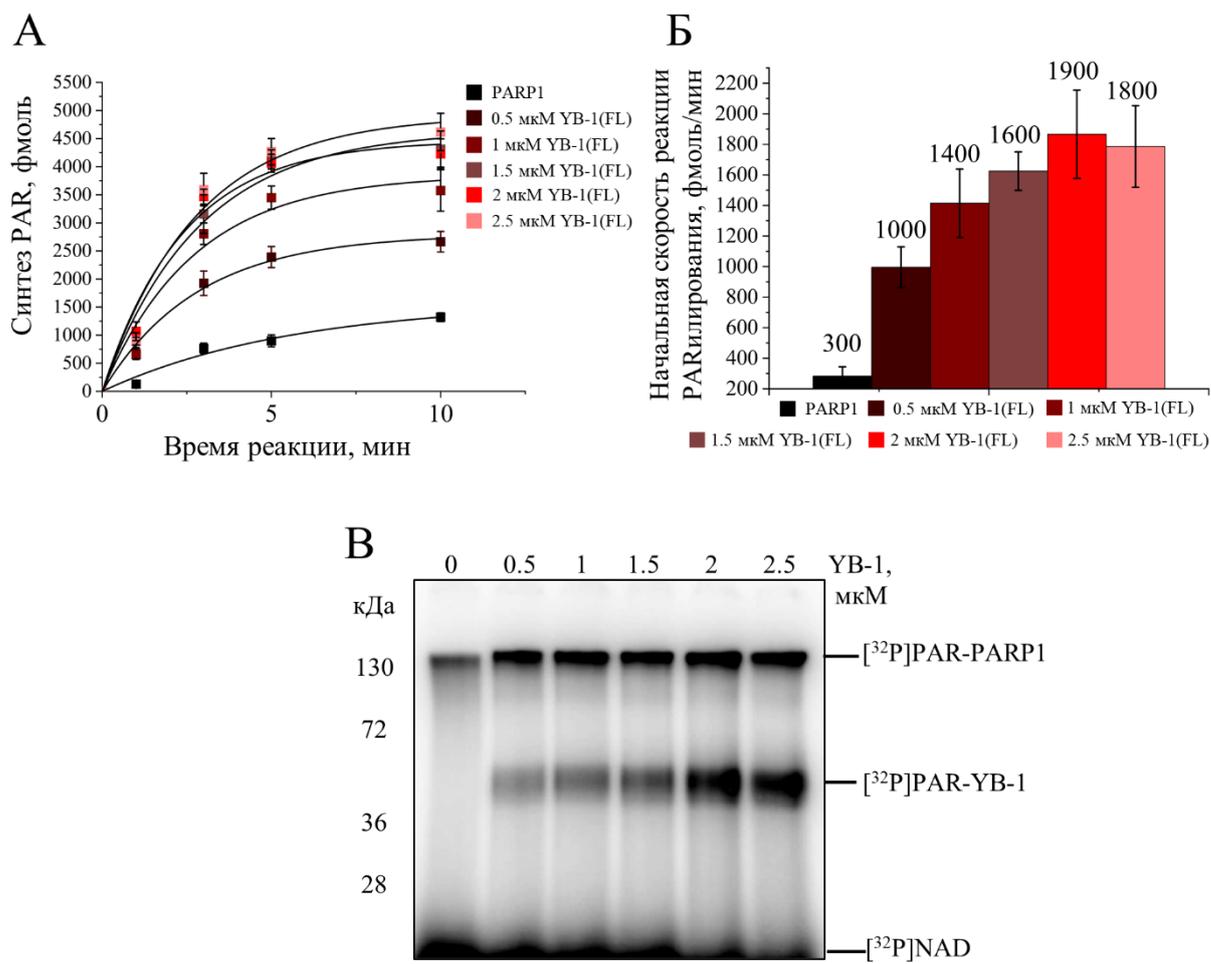


Рис. 3.1. Стимуляция активности PARP1 в зависимости от концентрации YB-1.

А: Кинетика синтеза PAR в присутствии различных концентраций YB-1(FL). Представлен график, суммирующий результаты трёх независимых экспериментов, выполненных с использованием метода ТХУ-мишеней (Материалы и методы 2.2.18).

Б: Анализ начальной скорости реакции синтеза PAR в присутствии различных концентраций YB-1(FL). Начальные скорости реакции поли(ADP-рибозил)ирования (фмоль/мин) были получены обработкой индивидуальных кривых (А) (Материалы и методы 2.2.19, уравнение 3) и представлены на рисунке как средние значения (\pm стандартное отклонение) для трёх независимых экспериментов.

В: Анализ авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 и транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 методом денатурирующего гель-электрофореза. Радиоавтограф 10% SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(ADP-рибозил)ирования.

Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 мкг/мл БСА, 10 мМ ЭДТА, 0,5 OD₂₆₀/мл ДНК_{акт}, 100 нМ PARP1 и YB-1(FL) в указанной концентрации. 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).

Эксперименты, проведенные в аналогичных условиях с использованием ядерного экстракта клеток HeLa, также показали, что в присутствии экзогенно добавленного YB-1

наблюдается увеличение уровня поли(ADP-рибозил)ирования белков экстракта и стимуляция PAR-синтезирующей активности белков ядерного экстракта (**Рис. 3.2**).

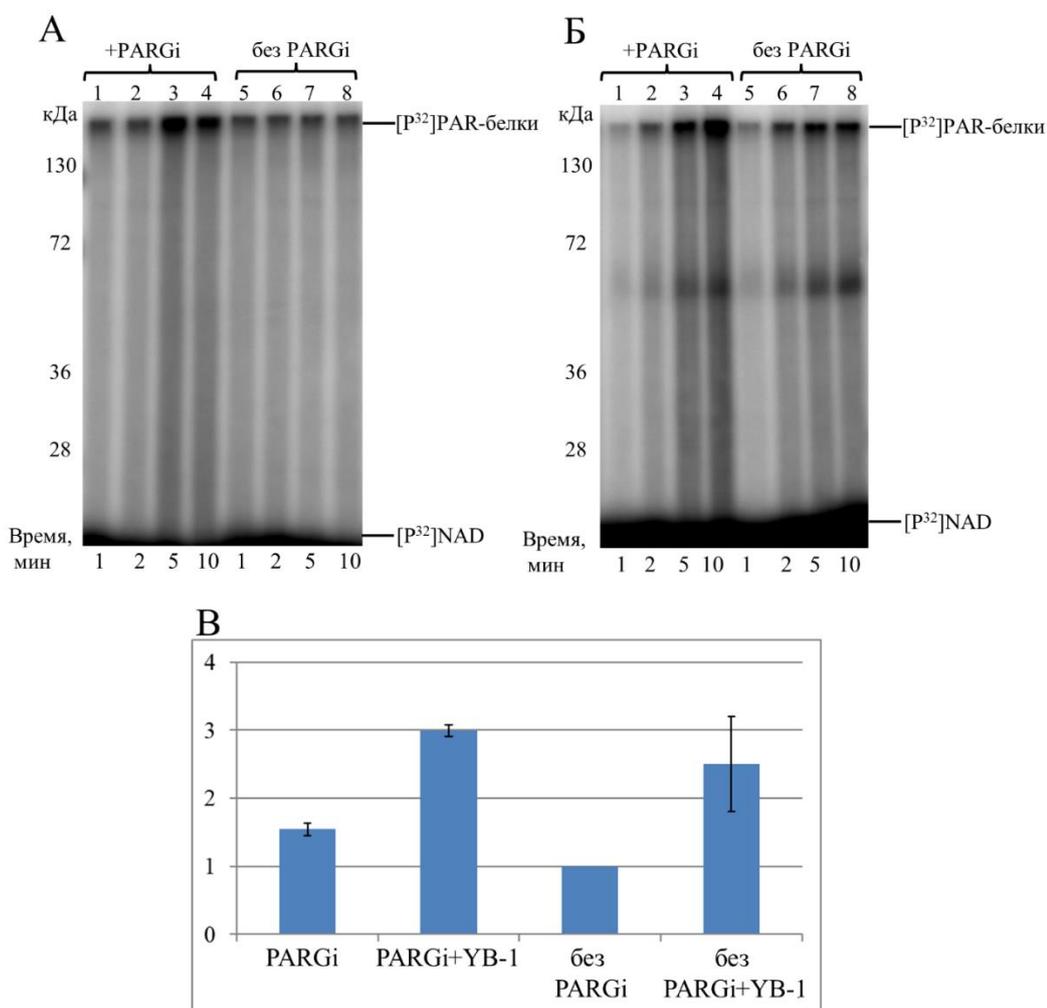


Рис. 3.2. Влияние YB-1 на реакцию поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемую белками ядерного экстракта HeLa.

А, Б: Анализ поли(ADP-рибозил)ирования белков экстракта в присутствии (**А**) и в отсутствие (**Б**) YB-1 и ингибитора PARG. Радиоавтограф 10% SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(ADP-рибозил)ирования белков экстракта.

В: Относительная эффективность синтеза поли(ADP-рибозы) в ядерном экстракте клеток HeLa в присутствии экзогенного YB-1. На рисунке приведены средние значения (\pm стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов, выполненных с использованием метода ТХУ-мишеней (Материалы и методы **2.2.18**). Активность PARPs в отсутствие ингибитора PARG была принята за 100%.

Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 5 мМ MgCl₂, 0,25 OD₂₆₀/мл ДНКакт, 1 мг/мл белков ядерного экстракта клеток HeLa, 1600 нМ YB-1 (**Б**) и 1 мкМ ингибитор PARG ((**А**) и (**Б**), дор. 1-4). 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.

На **Рис. 3.2. А** представлен спектр продуктов, которые накапливаются в реакционной смеси в отсутствие и в присутствии ингибитора PARG (PDD 00017273, PARGi) при времени

инкубации, достаточном для выхода реакции поли(ADP-рибозил)ирования в экстрактах на плато. Большинство поли(ADP-рибозил)ированных белков экстракта имеют низкую электрофоретическую подвижность, соответствующую молекулярной массе выше 130 кДа и останавливаются на границе концентрирующего и разделяющего гелей системы Лэммли. Уровень поли(ADP-рибозил)ирования белков был значительно ниже в отсутствие ингибитора поли(ADP-рибоза)гликогидролазы (PARG) (**Рис. 3.2 А дор. 1–4 и 5–8**). Кроме того, можно детектировать появление полосы, соответствующей поли(ADP-рибозил)ированному экзогенному YB-1, в присутствии или в отсутствие ингибитора PARG (PARGi) (**Рис. 3.2 Б**). Показано, что рекомбинантный YB-1, добавленный к реакционной смеси оказывает стимулирующий эффект, увеличивая как суммарный выход синтезируемой поли(ADP-рибозы) в экстракте (**Рис. 3.2 В**), так и образование высокомолекулярных продуктов реакции поли(ADP-рибозил)ирования (**Рис. 3.2 В**).

Таким образом, особенности YB-1-зависимой стимуляции реакции поли(ADP-рибозил)ирования, наблюдаемые в системе, реконструированной из рекомбинантных белков в целом схожи с эффектами, наблюдаемыми в системе, реконструированной с использованием белков ядерных экстрактов.

3.1.2. 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 [168,223,225]. Согласно литературным данным, наличие повреждений в ДНК (одно- и двуцепочечных разрывов), а также участков, отличающихся по структуре от канонической В-формы (в том числе, некоплементарных областей) может активировать PARP1 [106,119]. С другой стороны, YB-1 обладает повышенным сродством к одноцепочечной ДНК и ДНК-структурам, содержащим участки неспаренных оснований [159]. 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 одно- и(или) двуцепочечные разрывы (ds55, Nick или Gap), шпильки (dumbbell), неспаренные участки ДНК длиной 1 (mm55) 5, (bubble 5) или 17 (bubble 17) нуклеотидных звеньев или одноцепочечные участки (ss32, 3'-Recessed) (**Таблица 2.3**). 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. 3.3**). 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 аутомодификации PARP1 и интенсивным транс-поли(ADP-рибозил)ированием YB-1.

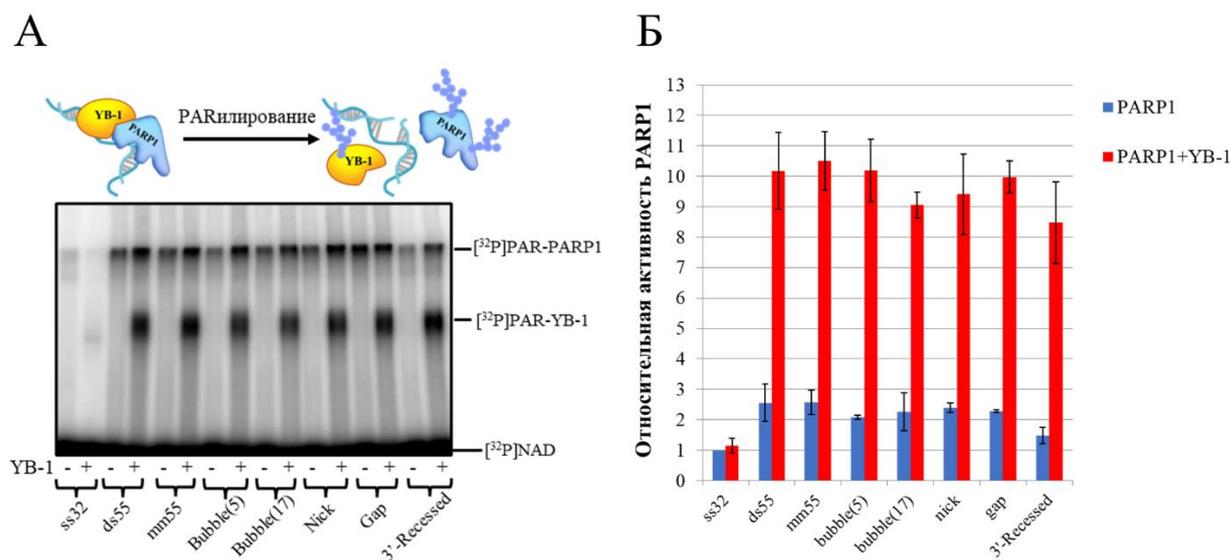


Рис. 3.3. Влияние YB-1 на активность PARP1 в присутствии различных ДНК-структур.

А: Анализ авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 и транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 методом денатурирующего гель-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 (\pm стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов, выполненных с использованием метода ТХУ-мишеней (Материалы и методы 2.2.18). Активность PARP1 в присутствии ss32 была принята за 100%. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 нМ PARP1, 100 нМ ДНК-субстрат (ss32, ds55, bubble(5), bubble(17), Nick, Gap, 3'-Recessed), 10 мМ ЭДТА, 1600 нМ YB-1. Реакцию запускали добавлением NAD^+ до конечной концентрации 4 мкМ (0,4 мкКи ^{32}P -меченого NAD^+) с последующей инкубацией в течение 10 минут при 37°C.

Следует также отметить, что 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 средстве YB-1 к указанным типам повреждения ДНК (Рис. 3.3 А, Б).

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

3.1.3. 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. В таких исследованиях

в качестве субстрата для PARP1 используется моонуклеосома [226,227]. Поэтому был проведен сравнительный анализ влияния YB-1 на активность PARP1 в присутствии набора модельных ДНК-структур (нуклеосомная ДНК длиной 147 пар оснований, нуклеосомная ДНК с однонуклеотидной брешью, моонуклеосома, моонуклеосома с однонуклеотидной брешью в нуклеосомной ДНК). На **Рис. 3.4** представлен анализ влияния YB-1 на активность PARP1 при времени инкубации, достаточном для выхода реакции поли(ADP-рибозил)ирования на плато в присутствии нуклеосомной ДНК и моонуклеосомы.

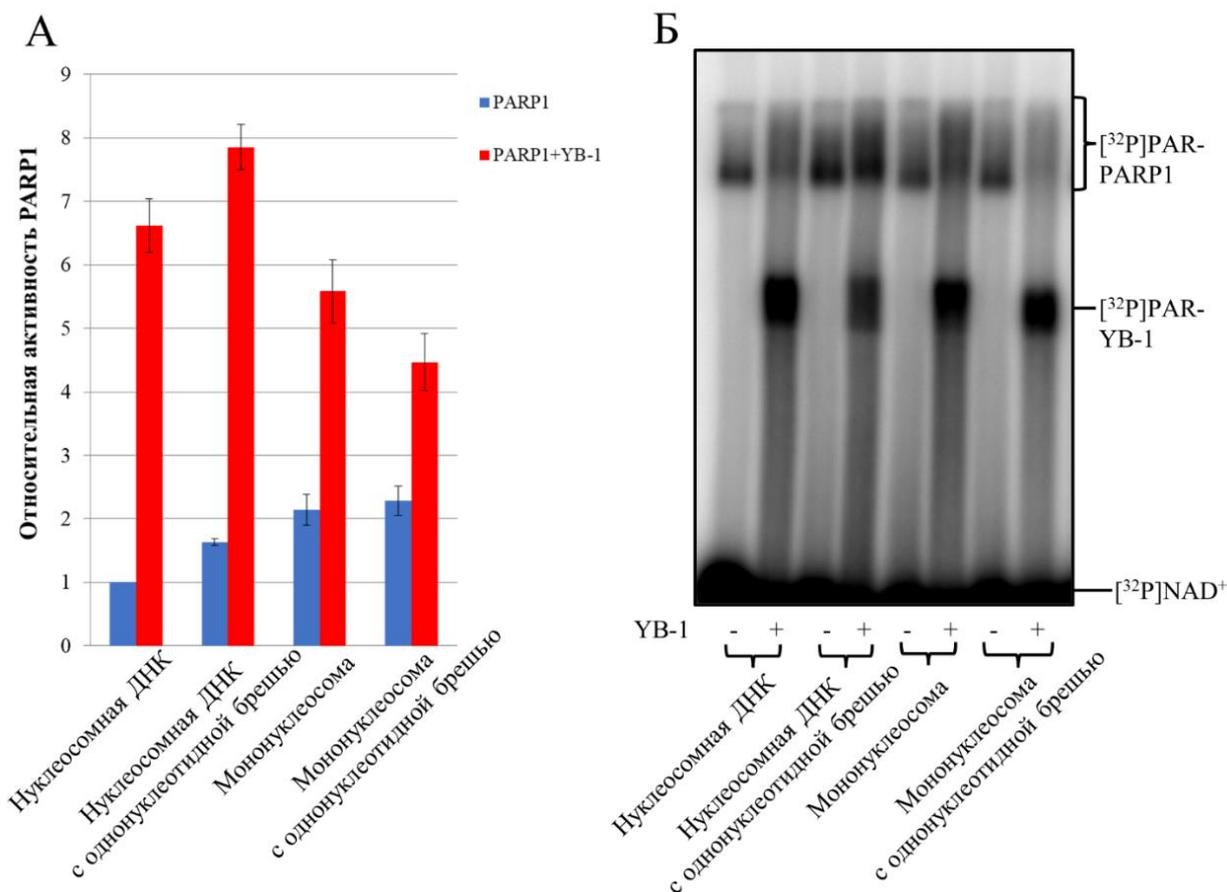


Рис. 3.4. Влияние YB-1 на активность PARP1 при использовании различных нуклеосомных субстратов. **А:** Относительная активность PARP1. На рисунке приведены средние значения (\pm стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов, выполненных с использованием метода ТХУ-мишеней (Материалы и методы 2.2.18). 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 объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 нМ PARP1, 100 нМ ДНК-субстрат (нуклеосомная ДНК, нуклеосомная ДНК с однонуклеотидной брешью, моонуклеосома, моонуклеосома, содержащая ДНК с однонуклеотидной брешью), 10 мМ ЭДТА, 1600 нМ YB-1. Реакцию запускали добавлением NAD^+ до конечной концентрации 4 мкМ (0,4 мкКи ^{32}P -меченого NAD^+) с последующей инкубацией в течение 10 минут при 37°C.

Согласно полученным данным, 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 мононуклеосомы (**Рис. 3.4 Б**). Для количественной оценки активности PARP1 в присутствии свободной ДНК и мононуклеосомы анализировали уровень синтеза PAR и поли(ADP-рибозил)ирование белков (**Рис. 3.4 А**). Согласно полученным данным, нуклеосомная ДНК, содержащая однонуклеотидную брешь, является более эффективным кофактором для активации PARP1, чем нуклеосомная ДНК без бреши. Тогда как в случае мононуклеосомы 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. 3.4 А**).

Активацию PARP1 в присутствии мононуклеосомного субстрата также изучали методом анизотропии флуоресценции (**Рис. 3.5**). Для того, чтобы детектировать диссоциацию поли(ADP-рибозил)ированных белков из комплекса с ДНК использовали флуоресцентно меченую нуклеосомную ДНК длиной 147 п.о. или мононуклеосому, собранную на основе такой ДНК, и анализировали изменение анизотропии флуоресценции после добавления белков в отсутствие и присутствии NAD^+ . При добавлении PARP1 и YB-1 к нуклеосомной ДНК или мононуклеосоме наблюдалось увеличение уровня анизотропии флуоресценции вследствие связывания белков с субстратом (**Рис. 3.5 А, Б**). При активации реакции поли(ADP-рибозил)ирования добавлением NAD^+ , детектировали изменения анизотропии флуоресценции. Видно, что при добавлении YB-1 происходит задержка освобождения ДНК из белковых комплексов. Такая временная задержка, с «лаг-периодом» от 200 до 400 секунд наблюдалась в случае нуклеосомной ДНК без повреждения и нуклеосомной ДНК, содержащей однонуклеотидную брешь, и достигала 600 секунд в случае мононуклеосом (**Рис. 3.5 А, Б**). Согласно данным, приведенным на **Рис. 3.4 Б**, YB-1, будучи предпочтительной мишенью модификации, влияет на авто-поли(ADP-рибозил)ирование PARP1 и замедляет диссоциацию PARP1 из комплекса с ДНК (**Рис. 3.5**). В случае нуклеосомной ДНК, содержащей однонуклеотидную брешь, по изменению анизотропии флуоресценции наблюдалась более эффективная диссоциация белков из комплекса с ДНК (**Рис. 3.5 А**). Это согласуется с тем, что на таком субстрате наблюдалось более интенсивное поли(ADP-рибозил)ирование как YB-1, так и PARP1 (**Рис. 3.4 Б**). Сходные данные были получены в экспериментах по активации PARP1 в присутствии мононуклеосом и YB-1, где добавление YB-1 к реакционной смеси снижало авто-поли(ADP-рибозил)ирование PARP1 на мононуклеосомах, содержащих поврежденную ДНК (**Рис. 3.4 Б**), тем самым замедляя диссоциацию белка из комплексов с ДНК (**Рис. 3.5 Б**).

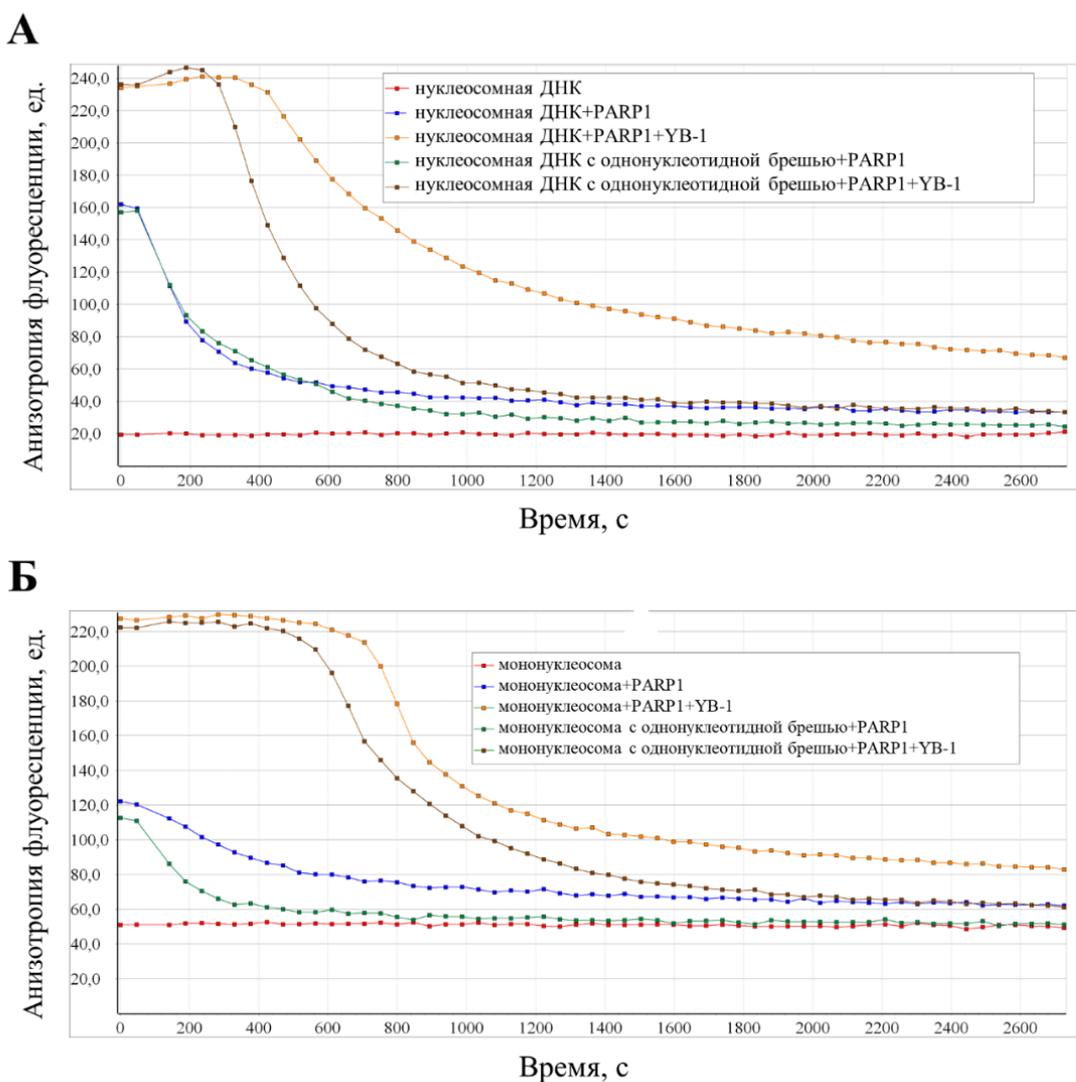


Рис. 3.5. Исследование комплексообразования PARP1 и YB-1 с нуклеосомной ДНК и мононуклеосомой методом анизотропии флуоресценции.

А: Изменения анизотропии флуоресценции в процессе диссоциации комплексов нуклеосомная ДНК•PARP1 и нуклеосомная ДНК•PARP1•YB-1 в результате поли(ADP-рибозил)ирования.

Б: Изменения анизотропии флуоресценции в процессе диссоциации комплексов мононуклеосома•PARP1 и мононуклеосома•PARP1•YB-1 в результате поли(ADP-рибозил)ирования.

Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 нМ PARP1, 100 нМ нуклеосомную ДНК или нуклеосомную ДНК с однонуклеотидной брешью, или мононуклеосому, содержащую ДНК без брешли, или мононуклеосому, содержащую ДНК с брешью, 10 мМ ЭДТА, 1600 нМ YB-1. Реакцию запускали добавлением NAD^+ до конечной концентрации 4 мкМ с последующей инкубацией при комнатной температуре в течение указанного времени.

Эти данные дополнительно подтверждают тот факт, что YB-1 может функционировать как регулятор реакции поли(ADP-рибозил)ирования с использованием широкого спектра ДНК-субстратов, которые активируют PARP1.

3.2. Механизмы YB-1-зависимой стимуляции активности PARP1

После обнаружения стимуляции активности PARP1 в присутствии YB-1 особый интерес представляет исследование молекулярных механизмов действия YB-1 на процесс поли(ADP-рибозил)ирования. Ранее полученные результаты позволяют предположить, что взаимодействие YB-1 с ДНК или PAR, формирующейся в процессе автомодификации PARP1, играет ключевую роль в YB-1-зависимой регуляции активности PARP1 [6]. YB-1 является белком с высоким содержанием положительно-заряженных аминокислотных остатков, поэтому можно предположить, что YB-1 может стимулировать активность PARP1 по механизму, предложенному для гистонов и полиаминов, которые связываются с ДНК или PAR, присоединенной к автомодифицированной PARP1, экранируют отрицательный заряд нуклеиновых кислот и препятствуют диссоциации автомодифицированного фермента из комплекса с ДНК, тем самым продлевая время активации PARP1 на ДНК [228].

Поэтому сравнительное исследование YB-1 и белковых факторов или соединений небелковой природы, взаимодействующих с нуклеиновыми кислотами, нейтрализующими отрицательные заряды фосфатов полинуклеотидных цепей и влияющими на активность PARP1, представляет отдельный интерес.

3.2.1. Сравнительный анализ влияния Mg^{2+} , спермина, гистонов и YB-1 на активность PARP1

Известно, что ионы металлов в белках и ферментах выполняют ряд каталитических и структурных функций [229]. Ионы могут принимать как непосредственное участие в биохимической реакции, так и косвенное, обеспечивая необходимую ориентацию субстратов или каталитических групп белка [229]. Из литературных данных известно, что катионы Mg^{2+} , а также ряд основных белков (гистоны) и полиамины, несущие положительно заряженные NH^{3+} -группы, способны стимулировать активность PARP1 *in vitro* [228]. Изоэлектрическая точка YB-1 лежит в области 9.5, поэтому в используемых условиях реакции значениях $pH=8.0$ он будет обладать положительным суммарным зарядом, и, следовательно, может влиять на активность PARP1 по механизму, сходному с действием положительно заряженных гистонов и полиаминов.

В ходе проделанной работы было изучено влияние YB-1 на активность PARP1 в сравнении с другими известными кофакторами реакции синтеза поли(ADP-рибозы), такими как Mg^{2+} , спермин³⁺, гистон H1 и смеси коровых гистонов (H2A, H2B, H3 и H4) (Рис. 3.6).

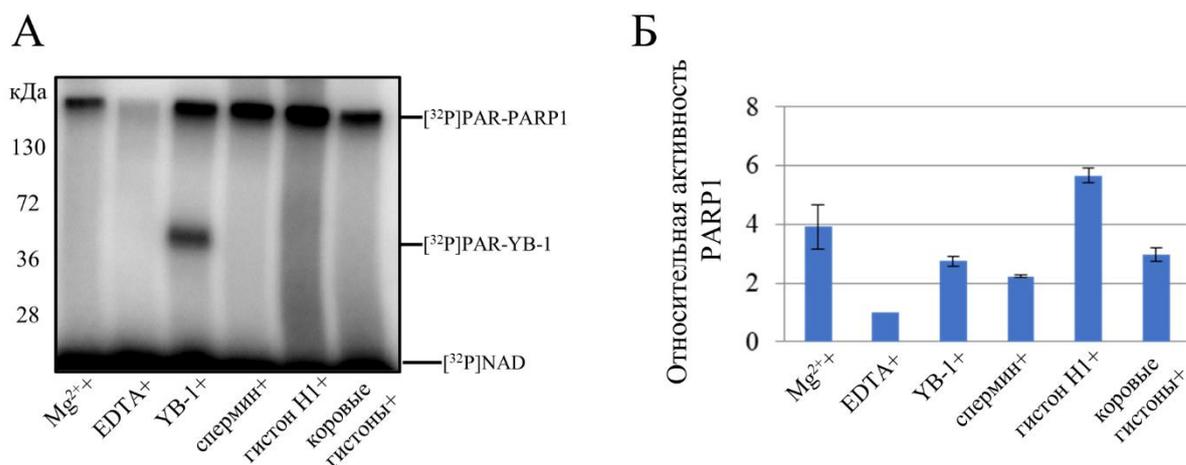


Рис. 3.6. Сравнительный анализ активности PARP1 в присутствии различных кофакторов: Mg²⁺, YB-1, спермина, гистона H1 или коровых гистонов.

А: Анализ продуктов модификации PARP1 методом денатурирующего гель-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, выполненных с использованием метода ТХУ-мишеней (Материалы и методы 2.2.18). Активность PARP1 в отсутствие кофакторов была принята за 100%.

Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 нМ PARP1, 0,5 OD₂₆₀/мл активированную ДНК, 10 мМ ЭДТА или 5 мМ Mg²⁺, или 1600 нМ YB-1, или 2 мМ спермин, или 54 мг/л гистона H1, или 54 мг/л коровых гистонов. Реакцию запускали добавлением NAD⁺ до конечной концентрации 4 мкМ (0,4 мкКи [³²P]-меченого NAD⁺) с последующей инкубацией в течение 15 минут при 37°C.

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 > Mg²⁺ > коровые гистоны \geq YB-1 > спермин (Рис. 3.6 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 [230], YB-1 является более эффективной мишенью в реакции трансмодификации (Рис. 3.6 А, Приложение 4). 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.

Суммируя полученные результаты, 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. Однако,

функциональное взаимодействие YB-1 и PARP1 может происходить не только в процессе образования тройного комплекса YB-1•ДНК•PARP1, но и за счет взаимодействия YB-1 с PAR, формирующейся в процессе авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1.

3.2.2. 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 ряд экспериментов с использованием ингибиторов активности PARP1. В качестве ингибиторов PARP1 применяются конкурентные аналоги NAD^+ , такие как 3-аминобензамид [231] и олапариб [232]. По механизму действия 3-аминобензамид и олапариб являются конкурентными ингибиторами PARP1. Производное никотинамида (3-аминобензамид) – исторически один из первых ингибиторов фермента PARP1, однако в связи с низкой эффективностью ($IC_{50} \sim 10$ мкМ) и высокой цитотоксичностью он мало пригоден для использования в противоопухолевой терапии [231]. В настоящее время олапариб ($IC_{50} \sim 1-5$ нМ) рассматривается как один из перспективных препаратов для лечения некоторых типов рака, в частности рака яичников и молочной железы [233,234].

Анализ влияния YB-1 на активность PARP1 проводили в присутствии ингибиторов, используя концентрацию полумаксимального ингибирования (IC_{50}) и выше для 3-аминобензамиды или олапариба (Рис. 3.7, 3.8).

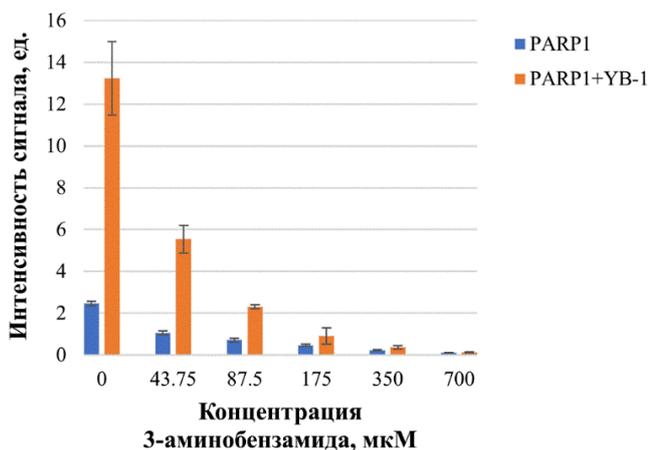


Рис. 3.7. Уровень синтеза поли(ADP-рибозы) при совместном присутствии YB-1 и ингибитора PARP1 3-аминобензамиды. На рисунке приведены средние значения (\pm стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов, выполненных с использованием метода ТХУ-мишеней (Материалы и методы 2.2.18). Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 нМ PARP1, 100 нМ ДНК (Nick), 5 мМ Mg^{2+} , 1600 нМ YB-1 и 3-аминобензамид в указанной концентрации. Реакцию запускали добавлением NAD^+ до конечной концентрации 4 мкМ (0,4 мкКи [^{32}P]-меченого NAD^+) с последующей инкубацией 5 минут при 37°C.

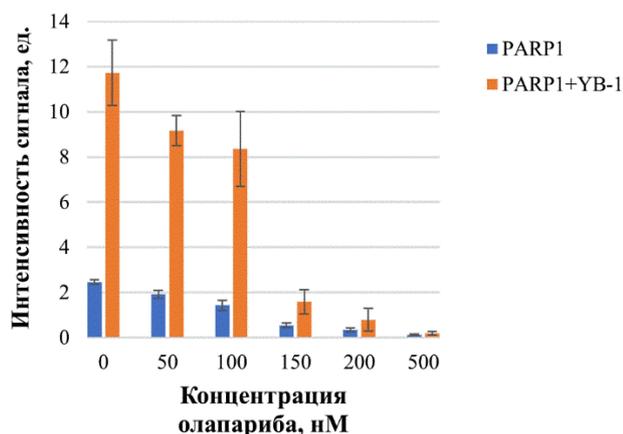


Рис. 3.8. Уровень синтеза поли(ADP-рибозы) при совместном присутствии YB-1 и ингибитора PARP1 олапариба. На рисунке приведены средние значения (\pm стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов, выполненных с использованием метода ТХУ-мишеней (Материалы и методы **2.2.18**). Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 нМ PARP1, 100 нМ ДНК (Nick), 5 мМ Mg²⁺, 1600 нМ YB-1 и олапариб в указанной концентрации. Реакцию запускали добавлением NAD⁺ до конечной концентрации 4 мкМ (0,4 мКи [³²P]-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 – 3-аминобензамида или олапариба около IC₅₀ (**Рис. 3.7, 3.8**). Однако, YB-1 не оказывал влияния на активность PARP1 в присутствии высоких концентраций тех же ингибиторов (**Рис. 3.7, 3.8**). Данный эффект можно объяснить зависимостью стимуляции активности PARP1 с помощью YB-1 от синтеза полимера ADP-рибозы, который блокируется при высоких концентрациях ингибиторов PARP1.

Учитывая ранее опубликованные данные о слабых белок-белковых взаимодействиях между PARP1 и YB-1 [6], 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 его эффективности взаимодействия с ДНК и PAR, хотя тип повреждения ДНК незначительно влиял на эффективность PARP1-зависимого поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 (**Рис. 3.3**).

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

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.), который содержит кластеры положительно- и отрицательно- заряженных аминокислот [168]. Поэтому представляло интерес детально изучить роль отдельных доменов YB-1 в стимуляции активности PARP1. Для этого были использованы укороченные мутантные формы YB-1: ядерная форма YB-1 (YB-1(1-219)) (1-219 а.о.) (pI=9,84), AP-CSD фрагмент (1-129 а.о.) (pI=6,58) и CTD-фрагмент (130-324 а.о.) (pI=9,51) (**Рис. 3.9 А**). В качестве ДНК-субстрата был использован ДНК(Nick) и ДНК-дуплексы со шпилечной структурой (dumbbell), содержащие одноцепочечный разрыв (Nick dumbbell) или однонуклеотидную брешь (Gap dumbbell) (**Таблица 2.3**). Обнаружено, что для самой PARP1 характерно увеличение активности в зависимости от типа субстрата (Nick > Nick dumbbell \geq Gap dumbbell > dumbbell) и уровень синтеза PAR был в два раза выше в присутствии ДНК(Nick), содержащей двуцепочечные разрывы (тупые концы) и одноцепочечный разрыв, чем на дуплексах со шпилечной структурой с одноцепочечным разрывом (**Рис. 3.9 Б**). Тем не менее, стимулирующий эффект полноразмерной формы YB-1 на активность PARP1 был более выражен в присутствии шпилечных ДНК-структур (**Рис. 3.9 Б**), поэтому далее было принято решение использовать данные ДНК для анализа функциональных взаимодействий между PARP1 и мутантными формами YB-1.

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. 3.9 Б и В**). Укороченная форма YB-1 (1-219 а.о.), которая содержит два кластера положительно заряженных аминокислот и CTD-фрагмент (130-324 а.о.) с четырьмя кластерами положительно заряженных аминокислот 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 превалирующей роли С-концевого домена YB-1 в регуляции активности PARP1 (**Рис. 3.9 Б и В**).

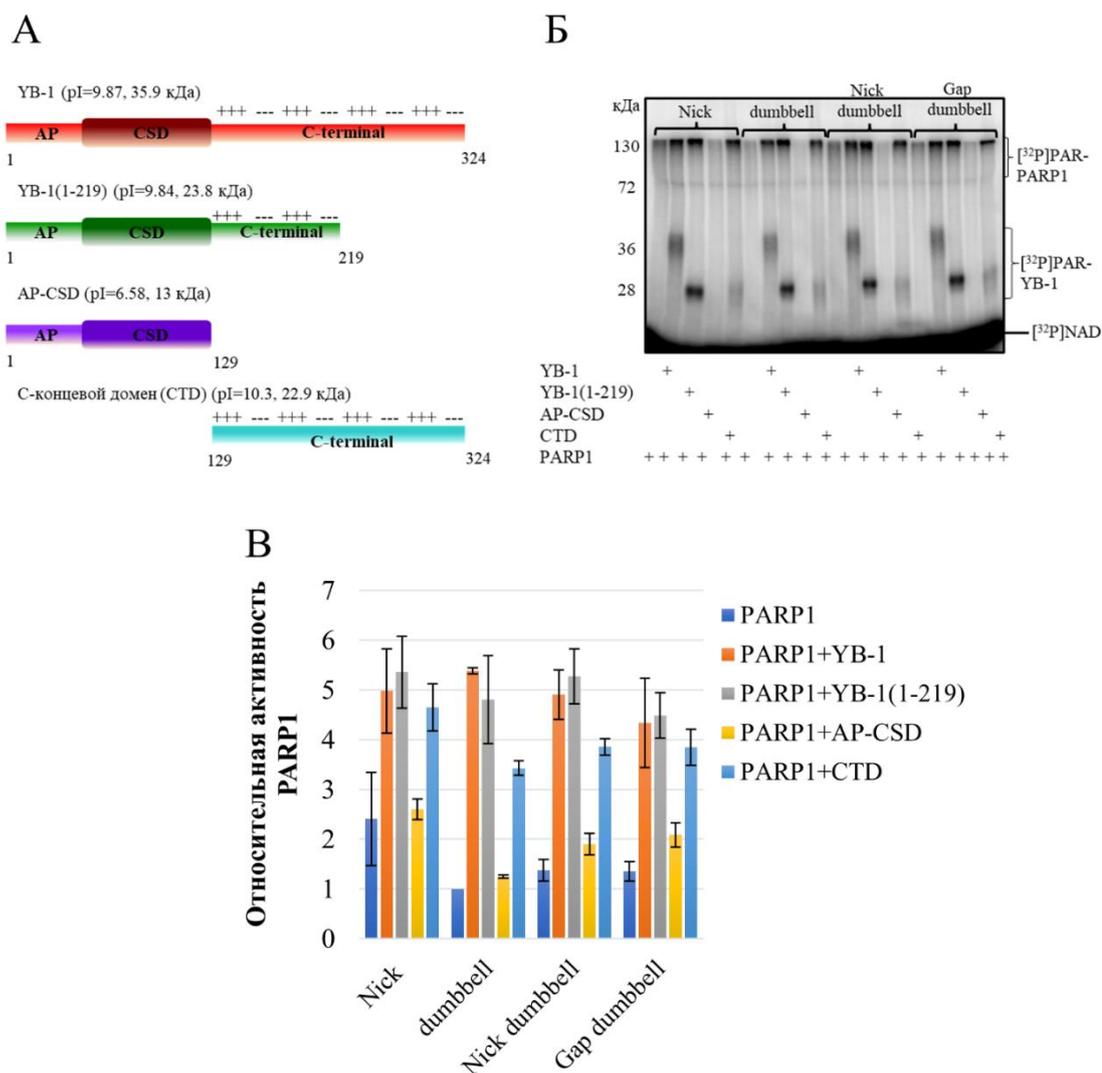


Рис. 3.9. С-концевой домен YB-1 необходим для стимуляции активности PARP1.

А: Схематическое изображение мутантных форм YB-1, использованных в работе.

Б: Анализ авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 и транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 в присутствии ДНК (Nick) и шпилечных ДНК-субстратов методом денатурирующего гель-электрофореза. Радиоавтограф 10% SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(ADP-рибозил)ирования.

В: 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, выполненных с использованием метода ТХУ-мишеней (Материалы и методы **2.2.18**). Активность PARP1 в присутствии Dumbbell ДНК была принята за 100%.

Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 нМ PARP1, 100 нМ ДНК-субстрат (Nick, Dumbbell, Gap Dumbbell, Nick Dumbbell), 10 мМ ЭДТА, 1600 нМ YB-1 или YB-1(1-219), или AP-CSD, или CTD. Реакцию запускали добавлением NAD^+ до конечной концентрации 4 мкМ (0,4 мКи ^{32}P -меченого NAD^+) с последующей инкубацией в течение 10 минут при 37°C.

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

Для более детальной характеристики роли С-концевого домена YB-1 в регуляции активности PARP1 были получены мутантные формы YB-1 с последовательно делектированными положительно заряженными кластерами в составе С-концевого домена, формы YB-1($\Delta 1$), YB-1($\Delta 1-2$) и YB-1($\Delta 1-2-3$) с делецией одного, двух и трех кластеров, соответственно (Рис. 3.10).

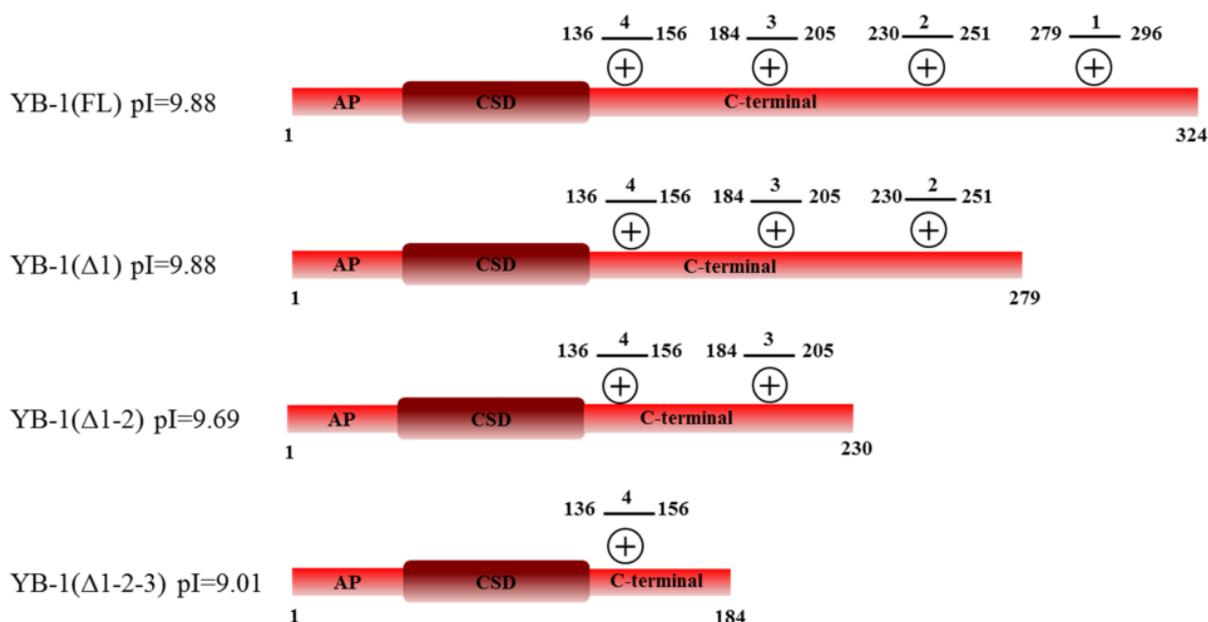


Рис. 3.10 Схематическое изображение доменной структуры полноразмерного белка YB-1(FL) и его делеционных мутантов.

Была проведена оценка влияния делеционных мутантов YB-1 на активность PARP1 (Рис. 3.11). Согласно полученным данным, полноразмерный YB-1 и мутант с делецией одного положительно заряженного кластера YB-1($\Delta 1$) оказывали в целом сходный стимулирующий эффект на уровень синтеза PAR и начальную скорость реакции поли(ADP-рибозил)ирования (Рис. 3.11 А, Б). Однако в отличие от YB-1, в присутствии YB-1($\Delta 1$) наблюдалось снижение уровня транс-поли(ADP-рибозил)ирования, что можно объяснить отсутствием, по крайней мере, одного из сайтов поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 по остатку глутамата (E319) находящегося в делектированной области С-концевого домена [213] (Рис. 3.11 В).

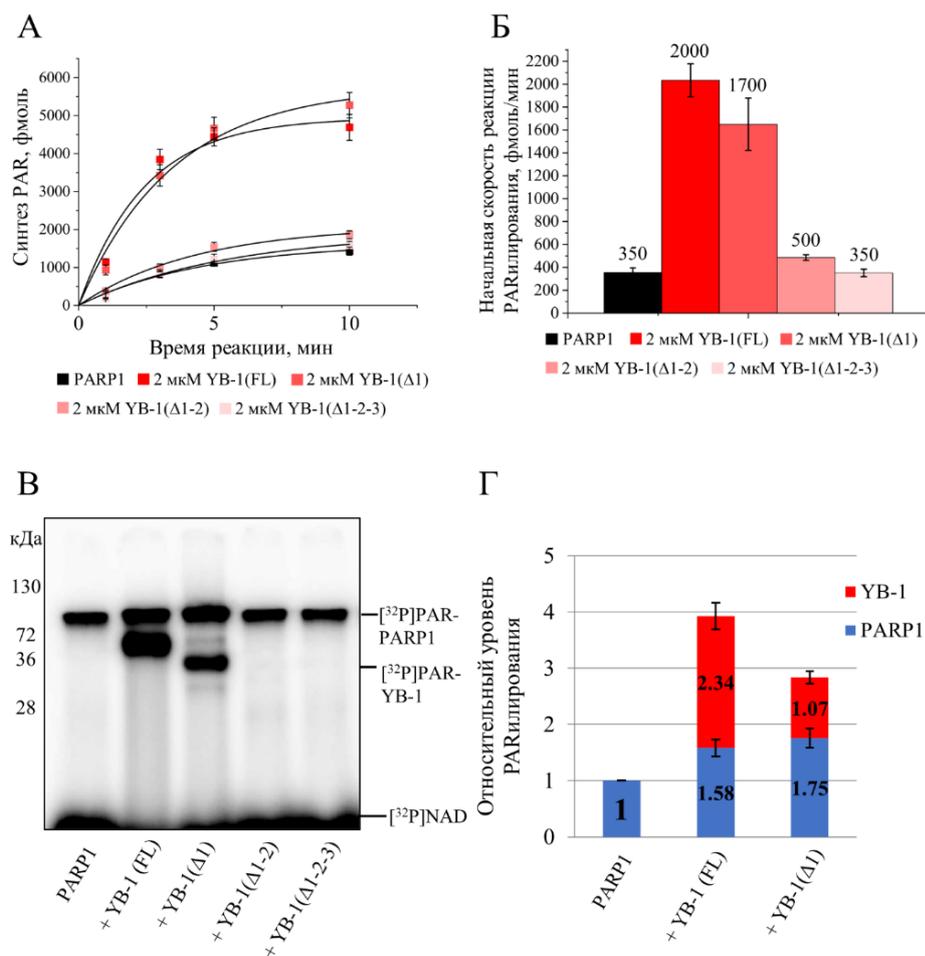


Рис. 3.11. Стимуляция активности PARP1 в присутствии делеционных мутантов YB-1.

А: Кинетика синтеза PAR в присутствии YB-1(FL) или его делеционных мутантов. Представлен график, суммирующий результаты трёх независимых экспериментов, выполненных с использованием метода ТХУ-мишеней (Материалы и методы **2.2.18**).

Б: Анализ начальной скорости синтеза PAR в присутствии YB-1(FL) или его делеционных мутантов. Начальные скорости реакции поли(ADP-рибозил)ирования (фмоль/мин) были получены обработкой индивидуальных кривых (А) (Материалы и методы **2.2.19**, уравнение 3) и представлены на рисунке как средние значения (\pm стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов.

В: 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.

Г: Диаграмма, отражающая относительные уровни авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 и транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 (Материалы и методы **2.2.20**). Активность PARP1 в отсутствие белков-кофакторов была принята за 100%.

Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 мкг/мл БСА, 10 мМ ЭДТА, 0,5 OD₂₆₀/мл ДНК_{акт}, 100 нМ PARP1 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 мкКи [³²P]-меченого NAD⁺) с последующей инкубацией при 30°C в течение указанного времени (А) или 10 минут (В).

Таким образом, YB-1($\Delta 1$) оказывал влияние на профиль поли(ADP-рибозил)ирования белков (Рис. 3.11 Г), изменяя его в сторону преимущественной модификации PARP1. Для двух других мутантов (YB-1($\Delta 1$ -2) и YB-1($\Delta 1$ -2-3)) стимулирующий эффект YB-1 на активность PARP1 практически не выявлялся (Рис. 3.11 А, Б). Кроме того, эти мутанты (YB-1($\Delta 1$ -2) и YB-1($\Delta 1$ -2-3)) не подвергались транс-поли(ADP-рибозил)ированию (Рис. 3.11 В). Полученные данные также указывают на существенную роль кластеров положительно заряженных аминокислот С-концевого домена YB-1 в регуляции реакции поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемой PARP1 (Рис. 3.9).

3.4. 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 [6]. На возможность формирования тройного комплекса YB-1•ДНК•PARP1 также указывают данные о том, что тип повреждения ДНК влияет на эффективность PARP1-зависимого поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 (Рис. 3.9). Для анализа образования комплексов YB-1 и PARP1 с поврежденной ДНК были использованы методы анизотропии флуоресценции и задержки в геле (Рис. 3.12).

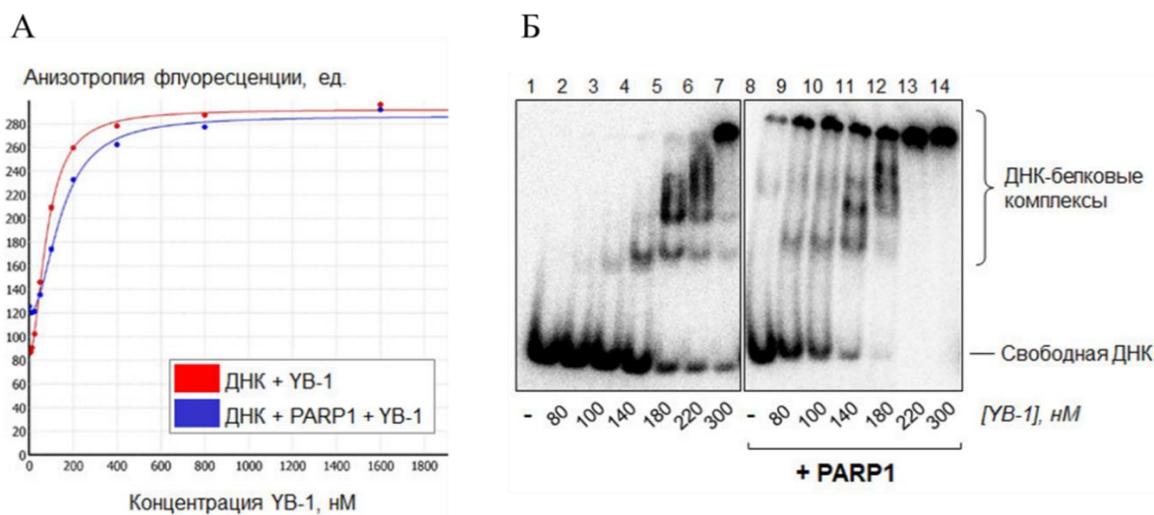


Рис. 3.12. YB-1 и PARP1 образуют гетеромерный комплекс на поврежденной ДНК.

А: Исследование формирования комплексов YB-1•ДНК и YB-1•PARP1•ДНК методом анизотропии флуоресценции. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, FAM-меченую 100 нМ ДНК (Nick), 200 нМ PARP1 и YB-1 в указанной концентрации.

Б: Исследование формирования комплексов YB-1•ДНК и YB-1•PARP1•ДНК методом задержки в геле. Радиоавтограф 10% ПААГ, в котором проводили разделение смесей, содержащих 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 нМ [³²P]-меченую ДНК (Nick), 200 нМ PARP1 (дор. 8-14) и YB-1 в указанной концентрации.

При добавлении YB-1 к ДНК, связанной с PARP1, было детектировано изменение уровня флуоресценции (**Рис. 3.12 А, синяя кривая**), что указывает на возможность формирования тройного комплекса YB-1•PARP1•ДНК.

Комплексообразование YB-1 с ДНК в присутствии и отсутствие PARP1 также анализировали методом задержки в геле. Результаты экспериментов по связыванию белков с ДНК методом задержки в геле показывают, что в свою очередь PARP1 стимулирует связывание YB-1 с ДНК (**Рис. 3.12 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. 3.12, дорожки 9-14**) показывает, что YB-1 выступает в качестве преимущественной мишени модификации (**Рис. 3.13**).

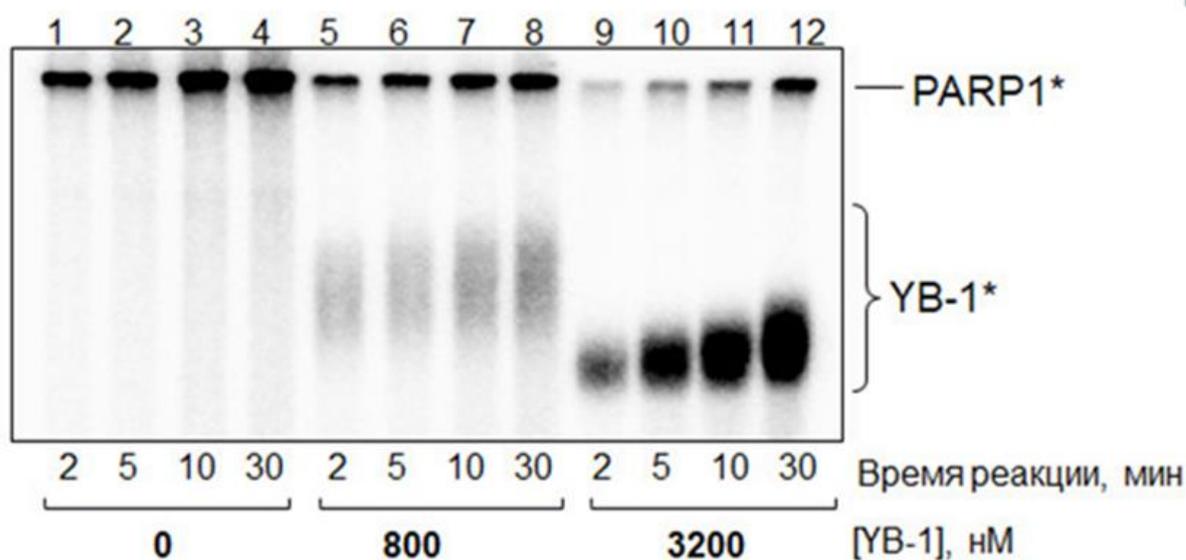


Рис. 3.13. YB-1 является преимущественной мишенью поли(ADP-рибозил)ирования при образовании тройного комплекса PARP1•ДНК•YB-1. Радиоавтограф 10% SDS-ПААГ, в котором проводилось разделение продуктов модификации белков. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 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 мкКи [^{32}P]-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. 3.14**).

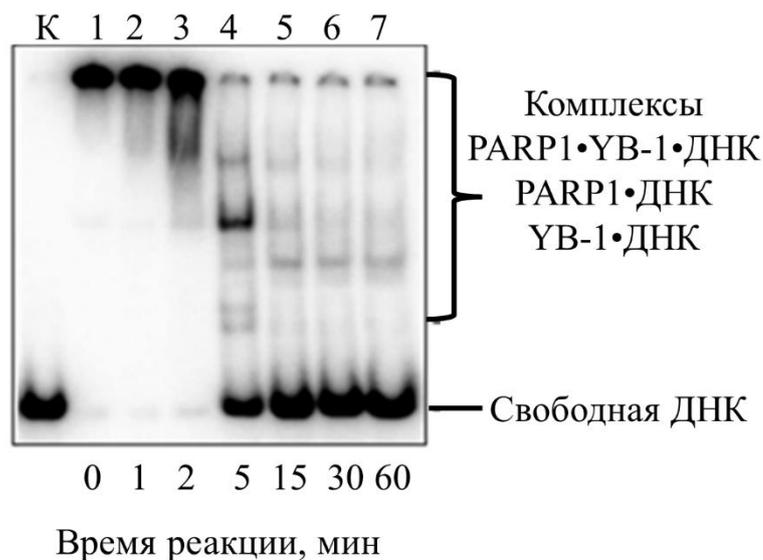


Рис. 3.14. Диссоциация YB-1 из комплекса с ДНК в результате его поли(ADP-рибозил)ирования. Радиоавтограф 10% ПААГ, в котором проводилось разделение комплексов YB-1•PARP1•ДНК в ходе поли(АДФ-рибозил)ирования методом задержки в геле. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 нМ PARP1, 1600 нМ YB-1, 100 нМ ДНК (Nick). Реакцию запускали добавлением NAD⁺ до конечной концентрации 400 мкМ (0,4 мКи [³²P]-меченого NAD⁺) с последующей инкубацией при 37°C в течение указанного времени. Реакцию останавливали добавлением олапариба до конечной концентрации 1 мкМ.

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

Следует отметить, что для транс-поли(ADP-рибозил)ирования некоторых белков, в частности, p53, необходимо их нековалентное взаимодействие с поли(ADP-рибозил)ированной PARP1 [124]. В случае YB-1 взаимодействие с PAR не является строго обязательным, поскольку модификация YB-1 может происходить при одновременном связывании этого белка и PARP1 с поврежденной ДНК. Доказательством этого может служить модификация YB-1 мутантной формой PARP1^{E988K}, способной катализировать только реакцию моно(ADP-рибозил)ирования белков (**Рис. 3.15**). Было показано, что в присутствии YB-1 происходит увеличение суммарного уровня ADP-рибозы, синтезируемой PARP1^{E988K}. Из полученных данных следует, что стимуляция активности PARP1 в присутствии YB-1 может происходить и в условиях, когда синтез поли(ADP-рибозы) не происходит и достаточно только моно(ADP-рибозил)ирования (МАРилирования). Эти данные также подтверждают 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, присоединенного к PARP1.

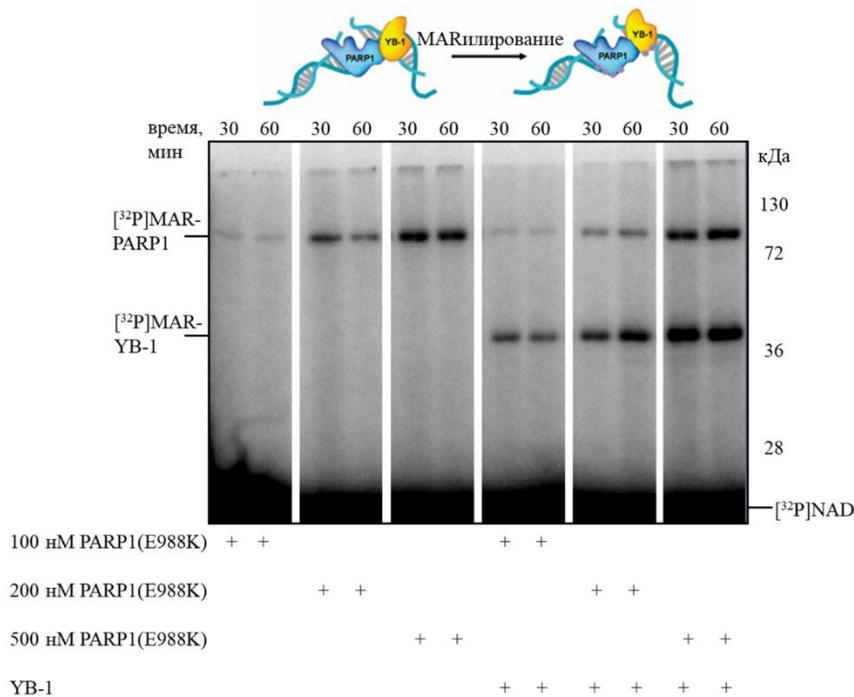


Рис. 3.15. Влияние YB-1 на моно(ADP-рибозил)ирующую активность PARP1^{E988K}. Радиоавтограф 10% SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов модификации PARP1^{E988K} и YB-1. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 нМ ДНК (Nick), 10 мМ ЭДТА, 1600 нМ YB-1 и PARP1^{E988K} в указанной концентрации. Реакцию запускали добавлением NAD⁺ до конечной концентрации 4 мкМ (0,4 мкКи [³²P]-меченого NAD⁺) с последующей инкубацией при 37°C в течение указанного времени.

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

Предполагается, что специфичность взаимодействия с нуклеиновыми кислотами определяется главным образом доменом холодового шока YB-1, в то время как С-концевой отвечает за неспецифическое связывание и обеспечивает высокое сродство белка к нуклеиновым кислотам [168]. Для анализа влияния STD на связывание с ДНК было оценено сродство полноразмерной YB-1(FL) и его С-концевых делеционных мутантов к ДНК с помощью метода анизотропии флуоресценции (**Рис. 3.16**). Согласно полученным данным, при постепенном укорочении С-концевого домена происходит постепенное снижение сродства YB-1 к ДНК и значение EC₅₀ для мутанта 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 гетеродимера PARP1•YB-1 на поврежденной ДНК. Так, для мутантной формы YB-1 с делецией трех кластеров положительно заряженных аминокислот, не влияющей на реакцию поли(ADP-

рибозил)ирования (Рис. 3.16) 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(Δ 1-2-3) не является мишенью поли(ADP-рибозил)ирования.

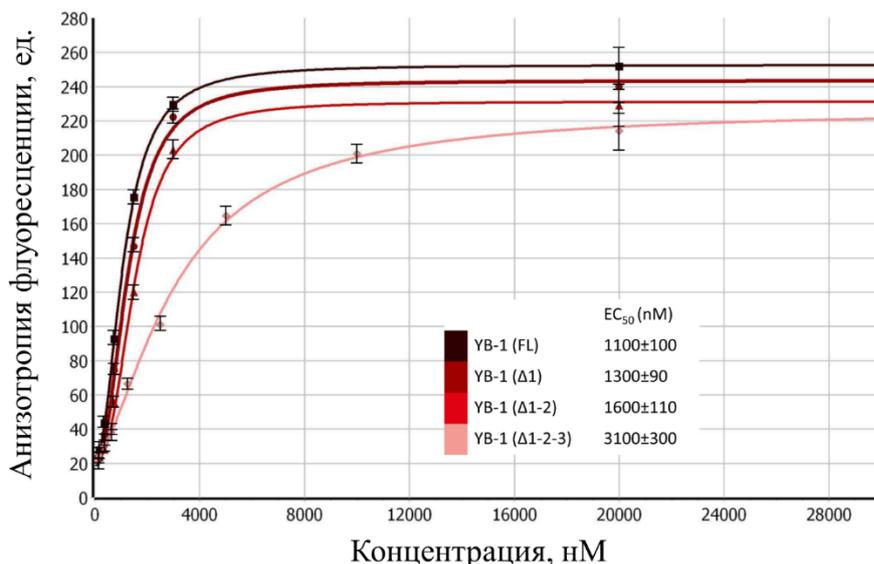


Рис. 3.16. Последовательное укорочение С-концевого домена снижает сродство YB-1 к поврежденной ДНК. Типичные кривые аннизотропии флуоресценции ДНК (FAM-Nick) в присутствии различных концентраций YB-1 или его делеционных мутантов. Реакционные смеси содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 мкг/мл БСА, 50 нМ ДНК (FAM-Nick), YB-1(FL) либо один из его мутантов с С-концевой делецией в указанных концентрациях.

Данные, полученные в настоящем разделе, свидетельствуют о том, что происходит образование тройного комплекса PARP1•YB-1•ДНК, в котором YB-1 является преимущественной мишенью поли(ADP-рибозил)ирования. Формирование тройного комплекса может происходить PAR-независимым образом, что является важной предпосылкой для функциональных взаимодействий этих белков в присутствии поврежденной ДНК и регуляции последующих стадий синтеза поли(АДФ-рибозы).

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

Многие ДНК/РНК-связывающие белки способны взаимодействовать с поли(ADP-рибозой) и PAR-связывающие домены в этих белках очень часто перекрываются с ДНК/РНК-связывающими доменами и могут быть как структурированными, так и неупорядоченными [134]. В структуре YB-1 выделяют два домена, которые участвуют в связывании с нуклеиновыми кислотами: домен холодного шока и С-концевой домен с кластерами положительно заряженных аминокислотных остатков. Таким образом, эти домены могут потенциально взаимодействовать с поли(ADP-рибозой), синтезируемой в процессе активации PARP1.

3.5.1. Кластеры положительно заряженных аминокислот в С-концевом домене YB-1 играют важную роль во взаимодействии с PAR

Результаты экспериментов по комплексообразованию YB-1 и PARP1 с поврежденной ДНК (Рис. 3.12, 3.13, 3.14) указывают на то, что формируется тройной комплекс YB-1•PARP1•ДНК. Однако, YB-1 также может взаимодействовать с поли(ADP-рибозой). Нами рассматривается гипотеза о том, что происходит диссоциация YB-1 из комплекса с ДНК для связывания с поли(ADP-рибозой) и участия в регуляции её синтеза. Для исследования способности поли(ADP-рибозы) конкурировать с ДНК за связывание белка YB-1, был получен очищенный препарат поли(ADP-рибозы) [41]. Эксперименты по анализу связывания YB-1 с ДНК в присутствии поли(ADP-рибозы) проводили методом задержки в геле. Было показано, что в присутствии поли(ADP-рибозы) уровень комплексообразования YB-1 с одноцепочечной (оцДНК) и двуцепочечной ДНК (дцДНК) значительно снижается (Рис. 3.17).

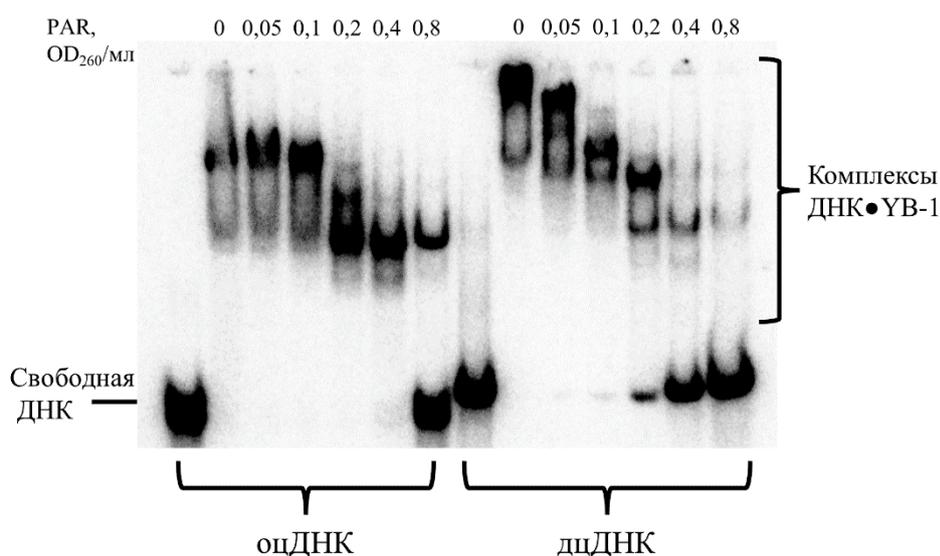


Рис. 3.17. Анализ взаимодействия YB-1 с оцДНК или дцДНК в присутствии поли(ADP-рибозы). Представлен радиоавтограф 10% ПААГ, в котором проводилось разделение продуктов реакции в нативных условиях. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 50 нМ [³²P]-меченую ДНК (ss32 или ds55 (Таблица 2.3)), 8 мМ MgCl₂, 1600 нМ YB-1 и поли(ADP-рибозу) в указанной концентрации. Реакцию комплексообразования проводили в течении 5 минут при 37°C.

Согласно данным, представленным в предыдущем разделе (Рис 3.11), С-концевой домен YB-1 играет ключевую роль в регуляции активности PARP1. Поэтому было проанализировано взаимодействие YB-1 и его делеционных мутантов с полимером ADP-рибозы. Методом задержки в геле сравнивали средство полноразмерной формы YB-1(FL) и его С-концевых делеционных мутантов к PAR (Рис. 3.18).

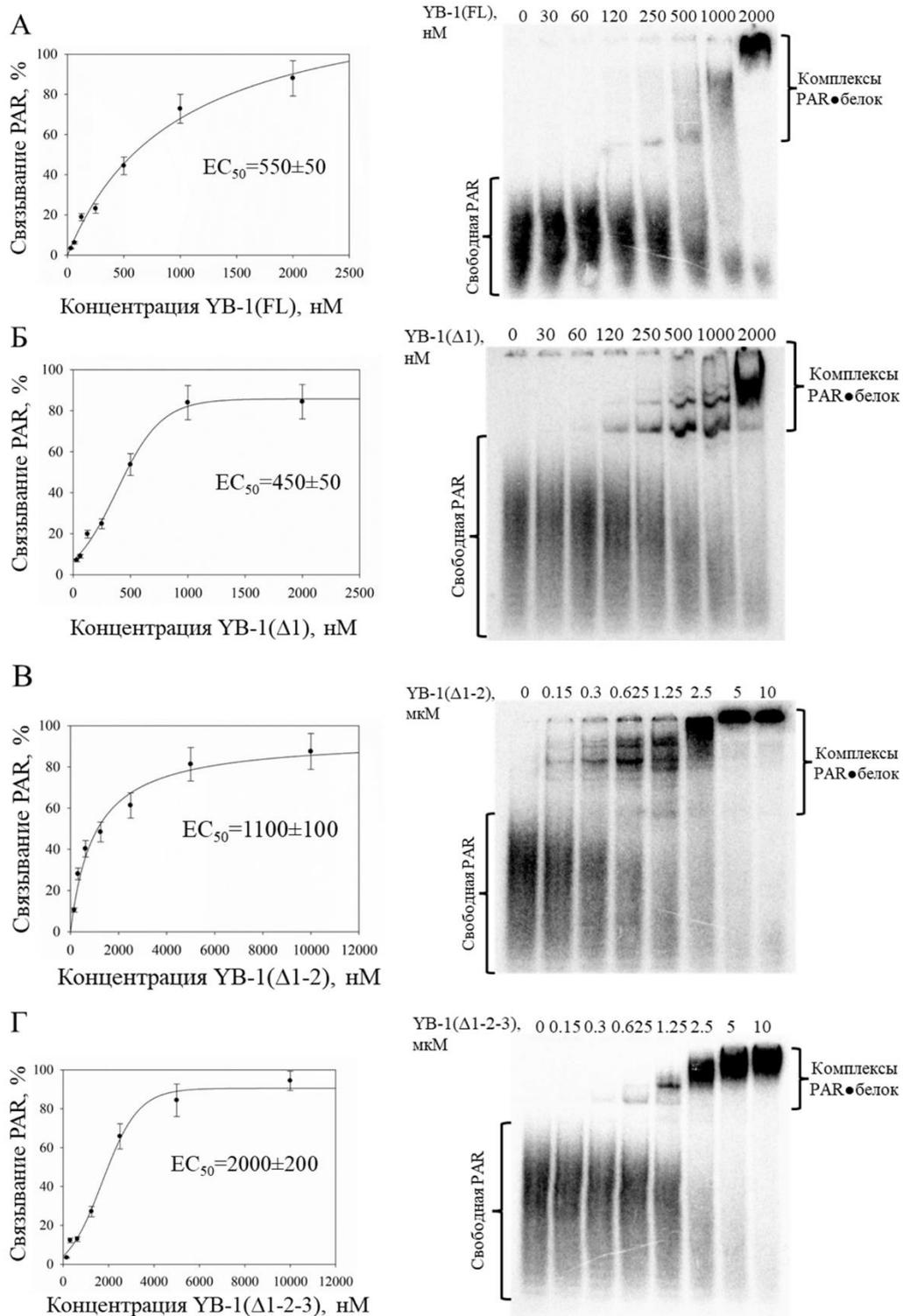


Рис. 3.18. Последовательное укорочение С-концевого домена снижает сродство YB-1 к PAR. Графики данных по связыванию YB-1 или его мутантов с PAR, построенные после анализа электрофореграмм задержки в геле. Реакционные смеси содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 мкг/мл БСА, 60 нМ [³²P]-меченой PAR и YB-1(FL) или один из его делеционных мутантов в указанных концентрациях. Сродство YB-1 к PAR определяли, как концентрацию YB-1 при которой 50% молекул PAR находится в комплексе (EC_{50}). Представлены радиоавтографы гелей, в которых проводилось разделение продуктов реакции в нативных условиях (Материалы и методы 2.2.17).

Можно видеть, что удаление двух или трех положительно заряженных кластеров С-концевого домена снижает способность YB-1 связывать поли(ADP-рибозу). Значения EC₅₀ для комплексов YB-1(FL)•PAR (Рис. 3.18 А) и YB-1(Δ1)•PAR (~500 нМ) (Рис. 3.18 Б) были соответственно в два или в четыре раза ниже, чем для комплексов YB-1(Δ1-2)•PAR (1100 нМ) (Рис. 3.18 В) и YB-1(Δ1-2-3)•PAR (2000 нМ) (Рис. 3.18 Г). Полученные данные свидетельствуют о том, что делеция по крайней мере двух положительно заряженных кластеров (231-304 а.о.) значительно снижает сродство YB-1 к PAR.

3.5.2. YB-1 способен образовывать гетеромерный комплекс с PARP1 на PAR

Связывание YB-1 с PAR, показанное в предыдущем разделе (Рис. 3.18), позволяет сделать вывод о сопоставимом с ДНК и, возможно, более высоком сродстве YB-1 к PAR. Ранее способность PAR конкурировать с одноцепочечной и двуцепочечной ДНК, а также РНК за связывание YB-1 была показана непосредственно с использованием очищенного препарата PAR. Поли(ADP-рибозил)ирование является одним из самых быстрых ответов на генотоксический стресс, поэтому формирование гетеродимера YB-1•PARP1 на поврежденной ДНК, до синтеза поли(ADP-рибозы), может быть затруднено из-за пространственной отдаленности, так как YB-1 является преимущественно цитоплазматическим белком в клетке. Поэтому был проведен эксперимент по «реактивации» авто-поли(ADP-рибозил)ированной PARP1 после её диссоциации из комплекса с ДНК. Связывание YB-1 с PAR стабилизирует каталитически активный комплекс PARP1 с ДНК в ходе элонгации (Рис. 3.19 Б). Модификация YB-1 «реактивированным» PARP1 была достаточно слабой (Рис. 3.19 А), свидетельствуя о том, что для эффективного поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 необходимо его присутствие в начальном гетеромерном комплексе с PARP1 и ДНК, либо ограничение синтеза протяженных молекул PAR при автомодификации PARP1. Присутствие YB-1 в реакции как раз может служить препятствием для элонгации PAR в результате его связывания с синтезируемым полимером (ADP-рибозы) и последующим укорочением длины этого полимера [88].

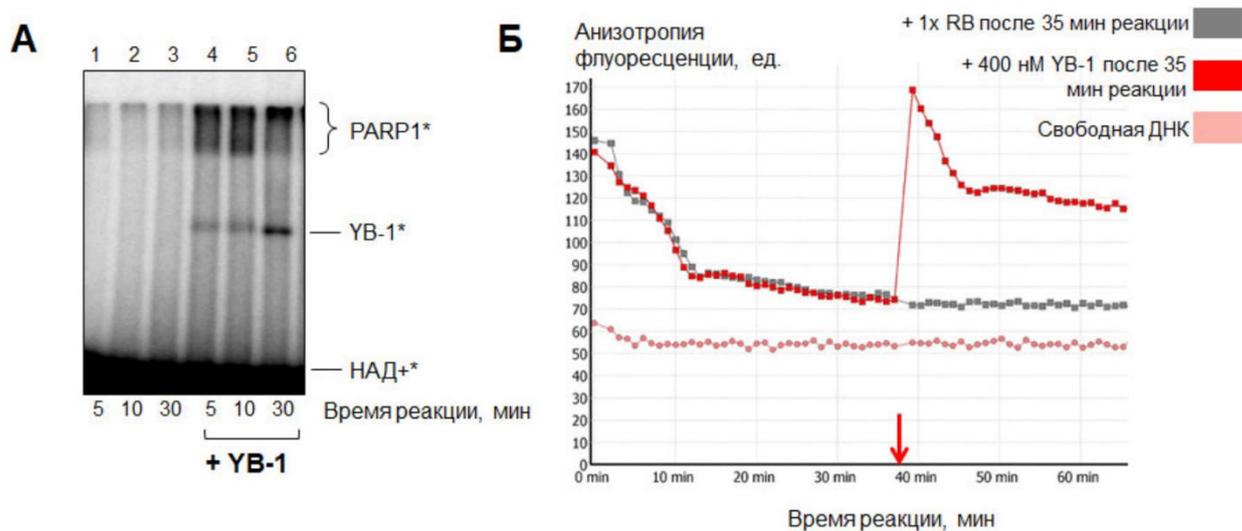


Рис. 3.19. Реактивация авто-поли(ADP-рибозил)ированной PARP1 в присутствии YB-1.

А: Анализ авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 и транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 методом денатурирующего геля-электрофореза. Радиоавтограф 10% SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов модификации PARP1 и YB-1. Реакционные смеси содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 10 нМ ДНК (Nick), 200 нМ PARP1, 10 мМ ЭДТА. Реакцию запускали добавлением NAD^+ до конечной концентрации 4 мкМ (0,4 мкКи ^{32}P -меченого NAD^+) с последующей инкубацией при 37°C. Через 20 мин после начала реакции к реакционной смеси добавляли 1× реакционный буфер (50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ) (дор. 1–3) или YB-1 до конечной концентрации 1600 нМ (дор. 4–6) и дополнительно инкубировали 5, 10 или 30 мин при 37°C.

Б: Представленные кривые иллюстрируют изменение анизотропии флуоресценции ДНК (FAM-Nick). Реакционные смеси содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 200 нМ PARP1, 10 нМ FAM-меченую ДНК (Nick) и 10 мМ ЭДТА. Реакцию запускали добавлением NAD^+ до конечной концентрации 500 мкМ. Через 35 мин после начала реакции в образцы добавляли 1× реакционный буфер (50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ) (серая кривая) или YB-1 до конечной концентрации 1600 нМ (красная кривая) и дополнительно инкубировали при 37°C в течение указанного времени.

3.5.3. 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. Продукты реакции авто-поли(ADP-рибозил)ирования были проанализированы с помощью метода атомно-силовой микроскопии (АСМ). Для того, чтобы избежать проблем с морфологической идентификацией PAR и ДНК-дуплексов на поверхности слюды, мы использовали плазмидную ДНК pBR322, содержащую однонуклеотидные разрывы, в качестве субстрата для активации PARP1. Предварительно, была проведена оценка уровня синтеза поли(ADP-рибозы), синтезируемой PARP1 в присутствии белка YB-1 и поврежденной плазмидной ДНК (**Рис. 3.20**).

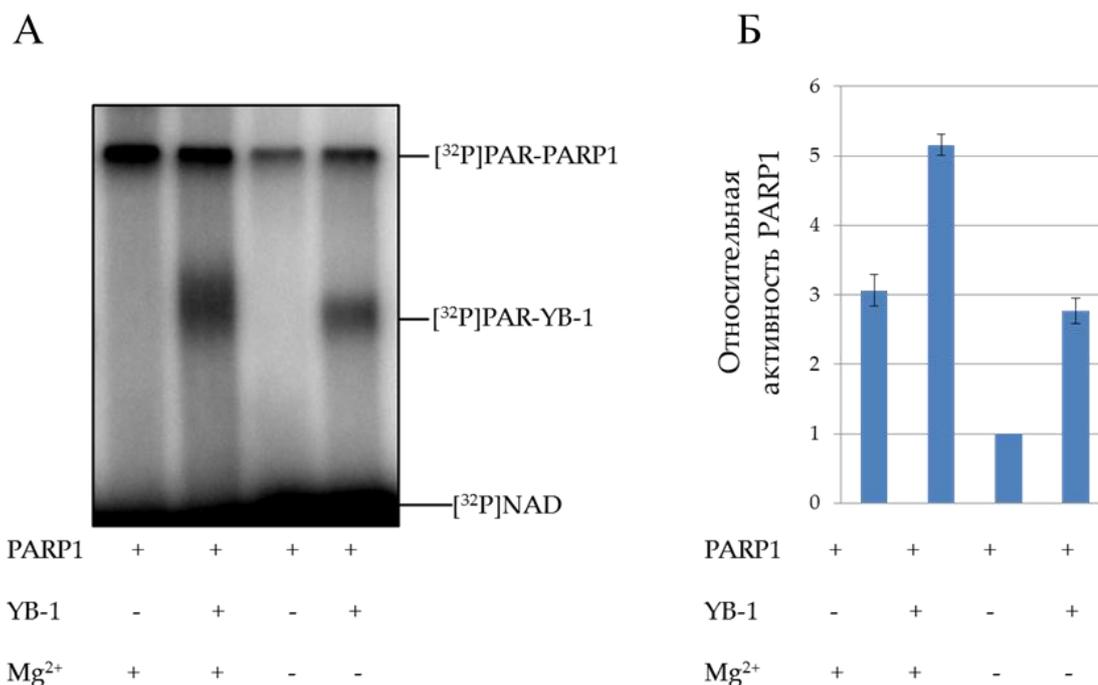


Рис. 3.20. YB-1 стимулирует активность PARP1 в присутствии поврежденной плазмидной ДНК.

А: Анализ авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 и транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 методом денатурирующего гель-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 (\pm стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов, выполненных с использованием метода ТХУ-мишеней (Материалы и методы 2.2.18). Активность PARP1 в отсутствие Mg²⁺ и YB-1 была принята за 100%.

Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 30 нМ PARP1, 3 нМ поврежденную плазмидную ДНК, 5 мМ Mg²⁺ или 10 мМ ЭДТА, 560 нМ YB-1. Реакцию запускали добавлением NAD⁺ до конечной концентрации 4 мкМ (0,4 мкКи [³²P]-меченого NAD⁺) с последующей инкубацией в течение 30 минут при 37°C.

Было показано, что в присутствии поврежденной плазмидной ДНК YB-1 стимулирует активность PARP1 и является мишенью поли(ADP-рибозил)ирования (**Рис. 3.20 А, Б**). Для того, чтобы оценить размер модифицированной PARP1 в присутствии кофакторов (Mg²⁺ или YB-1) и поврежденной плазмидной ДНК проводили анализ реакционных смесей после инкубации с NAD⁺ методом АСМ [42]. Анализируя полученные изображения оценивали размеры поли(ADP-рибозил)ированных молекул PARP1 для четырех реакционных систем: в присутствии Mg²⁺ (**Рис.3.21 А**) или YB-1 (**Рис.3.21 Г**), в присутствии Mg²⁺ и YB-1 (**Рис.3.21 Б**), без кофакторов (**Рис.3.21 В**).

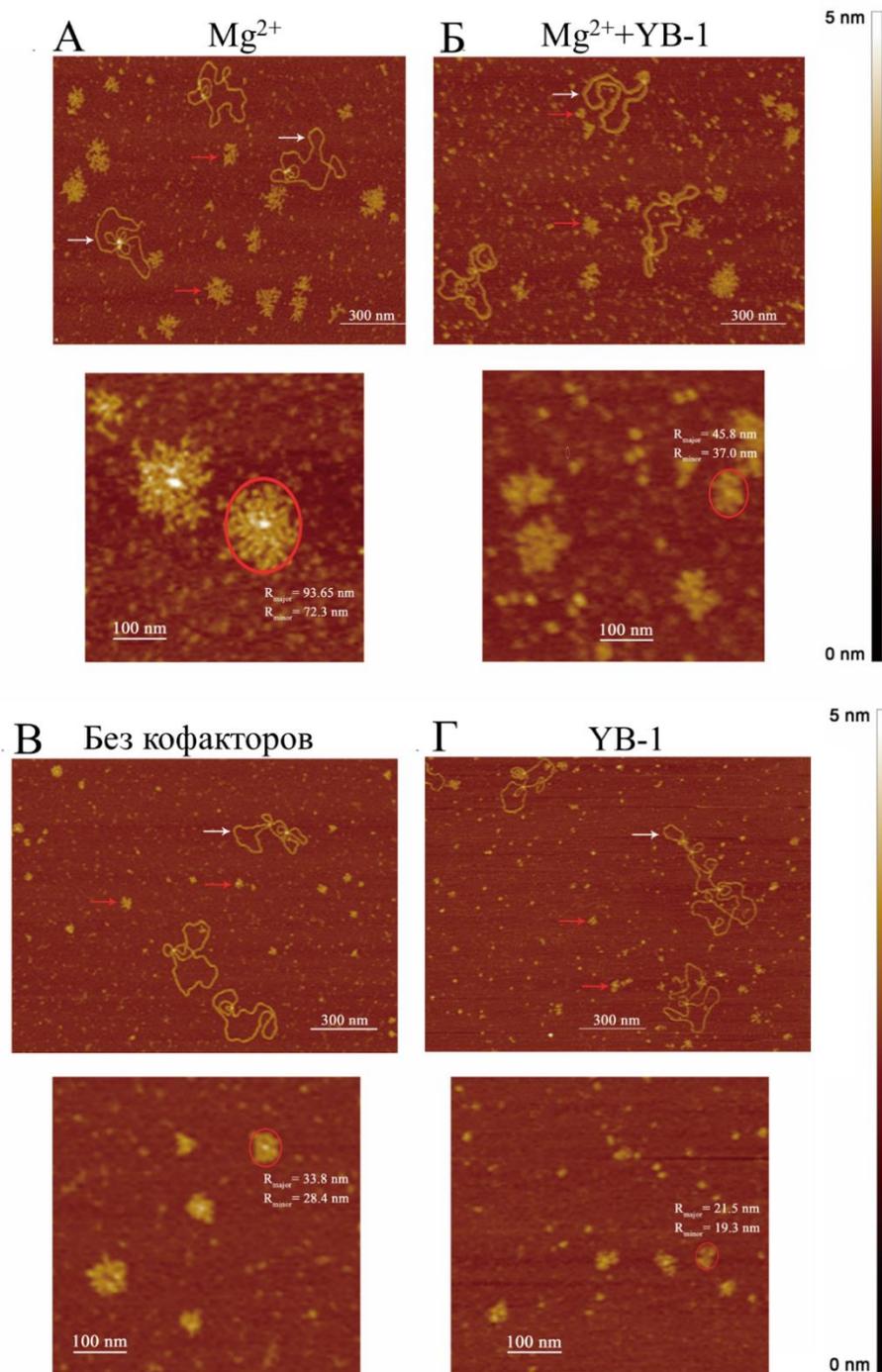


Рис. 3.21. АСМ-изображения поли(АДР-рибозил)ированной PARP1 в присутствии различных кофакторов. Показано авто-поли(АДР-рибозил)ирование PARP1 в присутствии Mg^{2+} (А), в присутствии Mg^{2+} и YB-1 (Б), без кофакторов (В) или в присутствии YB-1 (Г) (Материалы и методы 2.2.21). В верхней части приведены АСМ-изображения поли(АДР-рибозил)ированной PARP1, иммобилизированной на поверхности слюды. Белыми стрелками обозначены молекулы плазмидной ДНК, красными стрелками обозначены поли(АДР-рибозил)ированные белки. Масштаб сканирования: 300 нм по оси X и Y и 5 нм по оси Z. В нижней части приведены увеличенные изображения поли(АДР-рибозил)ированной PARP1. Для оценки площади молекулы модифицированного белка использовали два радиуса эллипса, окружающего поли(АДР-рибозил)ированную PARP1.

На **Рис. 3.22** представлено распределение размеров модифицированных молекул PARP1, наблюдаемых в присутствии Mg^{2+} , Mg^{2+} и $YB-1$, $YB-1$ или в отсутствие обоих кофакторов.

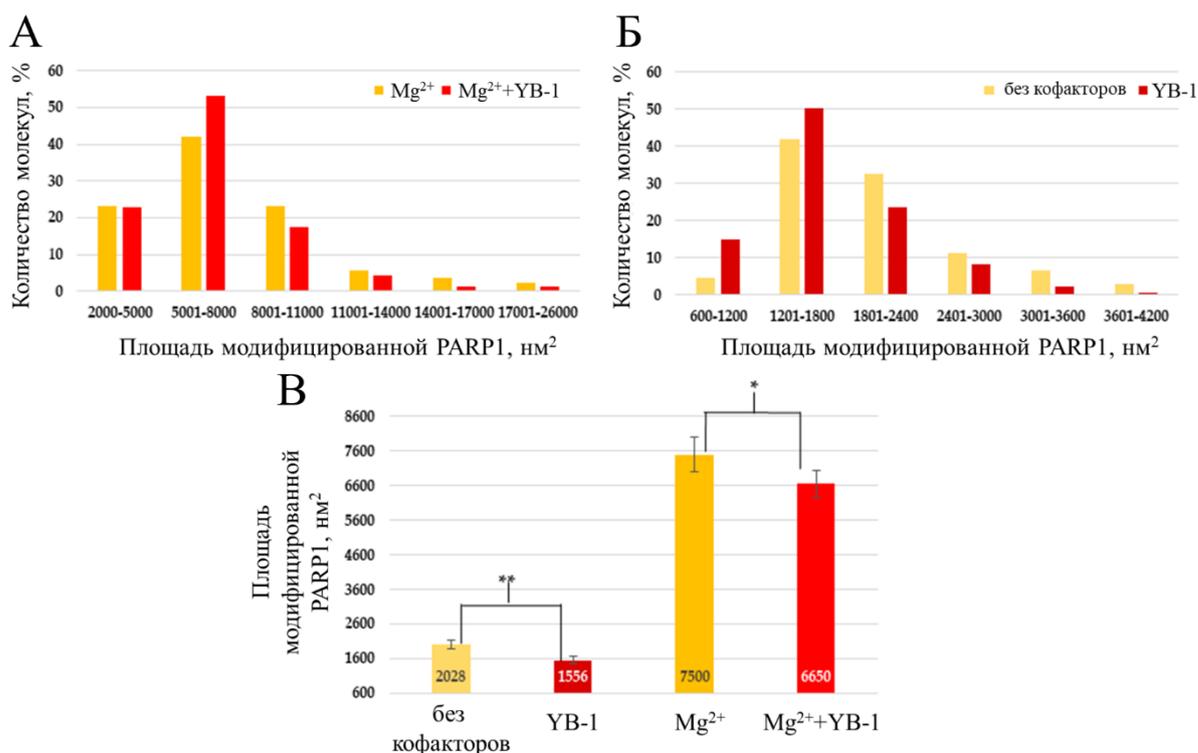


Рис. 3.22. Анализ размеров поли(ADP-рибозил)ированной PARP1 в присутствии Mg^{2+} (**А**), Mg^{2+} и $YB-1$ (**А**), $YB-1$ (**Б**), в отсутствие кофакторов (**Б**) методом АСМ (**Рис. 3.21**). На гистограммах представлено процентное содержание модифицированных молекул. Количество проанализированных 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 $YB-1$. Для оценки площади молекул был выбран эллипс, центр которого совпадал с центром поли(ADP-рибозил)ированной молекулы. Размеры модифицированного PARP1 менее 600 nm^2 не учитывались.

В: средний размер модифицированных молекул PARP1.

Показано, что в присутствии ионов Mg^{2+} удастся зарегистрировать модифицированные молекулы размером до 26000 nm^2 (**Рис. 3.22 А**). При одновременном добавлении Mg^{2+} и $YB-1$ к реакционной смеси наблюдается уменьшение среднего размера модифицированных молекул до 6650 nm^2 (**Рис. 3.22 В**). Установлено, что в случае Mg^{2+} -зависимого синтеза распределение размеров модифицированных молекул смещено в сторону образования более протяжённых полимеров ADP-рибозы (**Рис. 3.22 А**). Добавление $YB-1$ к Mg^{2+} -зависимой системе ингибировало элонгацию поли(ADP-рибозы) (**Рис. 3.22 Б**). В отсутствие ионов Mg^{2+} , размер поли(ADP-рибозил)ированных молекул не превышал 4200 nm^2 (**Рис. 3.22 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. 3.22 В**). Таким образом, из полученных данных следует, что присутствие YB-1 в реакционной смеси оказывает ингибирующий эффект на длину синтезируемого полимера ADP-рибозы.

Полученный результат хорошо согласуется с тем, что YB-1 способен ингибировать активность фермента поли(ADP-рибоза)гликогидролазы (PARG), которая катализирует гидролиз поли(ADP-рибозы) [6,15], поскольку, как для деградации поли(ADP-рибозы) PARG, так и для её элонгации PARP1, необходима доступность полимера. Ограничение длины цепей PAR, ковалентно присоединенных к PARP1, в присутствии YB-1 может приводить к тому, что при релокализации из комплексов с ДНК на растущую цепь PAR, молекулы YB-1 тем не менее оказываются в непосредственной близости от активного центра фермента, с одной стороны препятствуя дальнейшей элонгации цепи поли(ADP-рибозы), и с другой стороны по-прежнему, выступая в качестве эффективной мишени для реакции трансмодификации.

В качестве дополнительного контроля были проведены эксперименты с укороченной формой YB-1 AP-CSD, которая не поли(ADP-рибозил)ируется и не влияет на активность PARP1 (**Рис. 3.9**). Размеры поли(ADP-рибозил)ированных молекул PARP1 также оценивали с помощью изображений АСМ, полученных для AP-CSD фрагмента, обладающего низким сродством к PAR (**Рис. 3.23 А**).

На **Рис. 3.23** представлено распределение размеров модифицированных молекул PARP1, наблюдаемых в присутствии Mg^{2+} (**Рис. 3.23 В**), Mg^{2+} и AP-CSD (**Рис. 3.23 В**), AP-CSD (**Рис. 3.23 Б**) или в отсутствие обоих кофакторов (**Рис. 3.23 Б**). Было установлено, что добавление AP-CSD к реакционной смеси не влияло на длину синтезируемого полимера ADP-рибозы, как в случае Mg^{2+} -зависимой системы, так и в отсутствие ионов Mg^{2+} (**Рис. 3.23 Г**). Следовательно, С-концевой домен YB-1, по-видимому, может играть важную роль в регуляции активности PARP1, в частности, влияя на размер PAR, синтезируемой PARP1 в ходе автомодификации (**Рис. 3.22, 3.23**). Такой эффект можно объяснить тем, что YB-1, взаимодействуя с синтезируемым полимером ADP-рибозы, способен ингибировать его дальнейшую элонгацию.

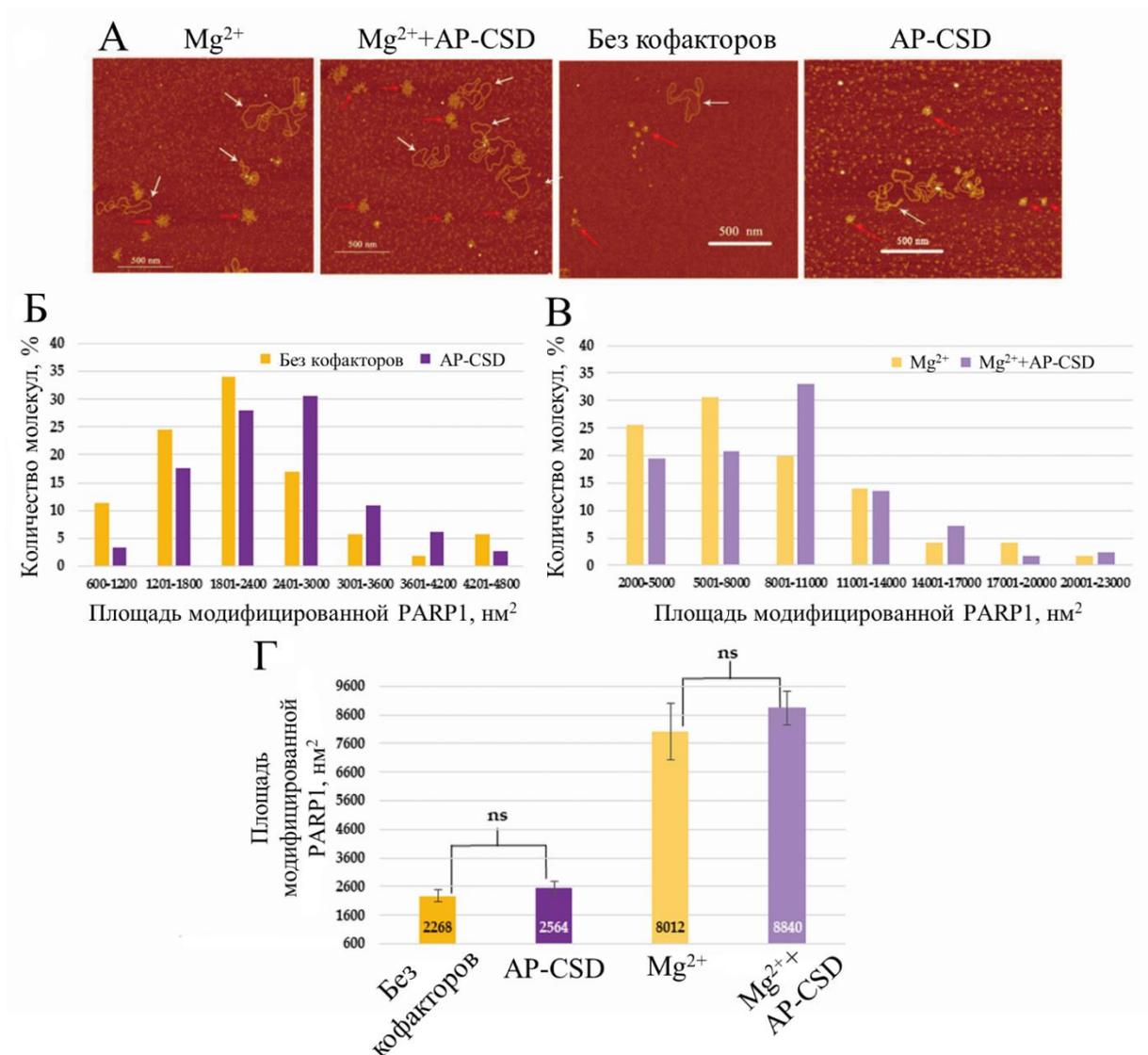


Рис. 3.23. Анализ размеров поли(ADP-рибозил)ированной PARP1 в присутствии AP-CSD фрагмента YB-1. (А) АСМ-изображения поли(ADP-рибозил)ированной PARP1 в присутствии различных кофакторов (Материалы и методы 2.2.21). Белыми стрелками обозначены молекулы плазмидной ДНК, красными стрелками обозначены поли(ADP-рибозил)ированные белки. Масштаб сканирования: 500 нм по оси X и Y; 5 нм по оси Z. (Б, В) Анализ размеров поли(ADP-рибозил)ированной PARP1 в присутствии Mg^{2+} (Б), Mg^{2+} и AP-CSD (В), AP-CSD (Б), в отсутствие кофакторов (Б) методом АСМ. На гистограммах представлено процентное содержание модифицированных молекул. Количество проанализированных поли(ADP-рибозил)ированных молекул: 89 в случае Mg^{2+} , 84 в случае Mg^{2+} и фрагмента AP-CSD, 82 в случае отсутствия кофакторов и 93 в случае фрагментов AP-CSD. Для оценки площади молекул был выбран эллипс, центр которого совпадал с центром поли(ADP-рибозил)ированной молекулы. Размеры модифицированной PARP1 менее 600 nm^2 не учитывались.

Г: Средний размер модифицированных молекул PARP1.

На основании результатов, представленных в предыдущих разделах, возможно предположить существование определенного механизма влияния YB-1 на общий выход

реакции поли(ADP-рибозил)ирования. Связываясь своим С-концевым доменом с растущим полимером ADP-рибозы в процессе автомодификации PARP1, YB-1 поли(ADP-рибозил)ируется и ингибирует удлинение растущего полимера ADP-рибозы. Таким образом, YB-1 может блокировать удлинение цепи PAR и одновременно действовать как мишень транс-поли(ADP-рибозил)ирования, что может говорить о том, что связывание YB-1 с PAR происходит в непосредственной пространственной близости от каталитического центра PARP1. Такая модель согласуется с наблюдаемым преимущественным транс-поли(ADP-рибозил)ированием YB-1. Наблюдаемый эффект показывает, что взаимодействие YB-1 с PAR вносит существенный вклад в регуляцию активности PARP1.

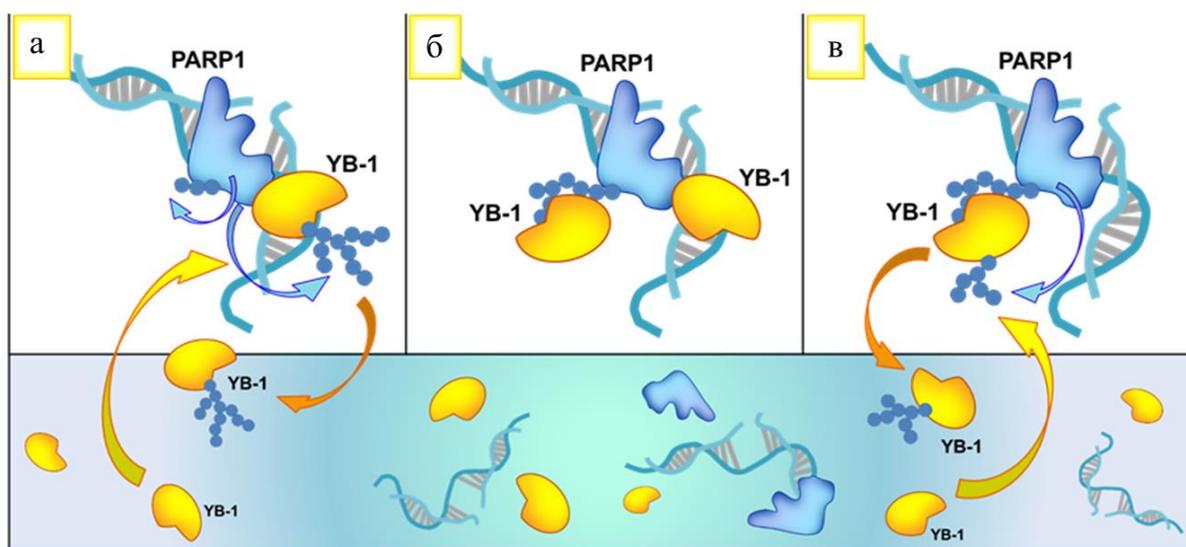


Рис. 24. Модель механизма регуляции активности PARP1 белком YB-1.

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 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 синтеза PAR.

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

Как уже упоминалось в предыдущих разделах (3.3.1), делеция двух или трех положительно заряженных аминокислотных кластеров в CTD нивелирует влияние YB-1 на

активность PARP1. С использованием делеционных мутантов YB-1 было показано, что с увеличением аффинности к PAR наблюдается увеличение суммарного уровня поли(ADP-рибозил)ирования, в том числе транс-поли(ADP-рибозил)ирования (**Рис. 3.11, 3.18**). Можно предположить, что комплексообразование YB-1 с синтезируемым полимером ADP-рибозы играет ключевую роль в регуляции активности PARP1 в присутствии YB-1. Для того, чтобы выяснить влияние структуры PAR на YB-1-зависимую регуляцию активности PARP1, были использованы мутантные формы PARP1, синтезирующие короткие (PARP1^{Y986S}), короткие гиперразветвленные (PARP1^{Y986H}) или короткие гипоразветвленные (PARP1^{G972R}) полимеры ADP-рибозы [235]. Поскольку PARP1^{G972R}, PARP1^{Y986S} и PARP1^{Y986H} преимущественно синтезируют цепи PAR с одинаковой длиной цепи, но с различной частотой ветвления, эти мутантные формы PARP1 хорошо подходят для изучения роли степени разветвленности и длины PAR в сравнении с PARP1 дикого типа (PARP1wt).

Так, для многих клеточных процессов роль PARP1 и синтезируемой поли(ADP-рибозы) была детально изучена, особенно для процессов репарации ДНК и канцерогенеза. Однако роль гетерогенности PAR остается неизвестной. Важность структуры поли(ADP-рибозы) в клеточных процессах была показана в работе [236]. Влияние мутантных форм PARP1 на физиологию клетки, а именно на выживаемость, деление, смену фаз клеточного цикла было исследовано с использованием клеточной линии HeLa, нокаутной по гену *PARP1* и временно экспрессирующей мутантные формы гена *PARP1*: *PARP1*^{G972R}, *PARP1*^{Y986S} или *PARP1*^{Y986H}. Было показано, что наработка белка PARP1^{Y986S} лишь незначительно влияла на клеточную физиологию, в то время как наработка PARP1^{G972R} оказывала значительный эффект на жизнеспособность клеток, увеличивая их чувствительность к воздействию генотоксических агентов. Клетки, нарабатывающие PARP1^{Y986H}, в целом практически не отличались от клеток, синтезирующих белок дикого типа.

Кроме того, в этой работе были исследованы кинетические параметры связывания мутантов PARP1 с повреждениями ДНК, индуцированных лазерной микрорадиацией. PARP1wt и PARP1^{Y986H} быстро накапливаются и кратковременно связываются с местом повреждения, в то время как кинетика диссоциации PARP1^{G972R} и PARP1^{Y986S} была замедлена. Таким образом, диссоциация PARP1 с ДНК может зависеть не только от синтеза поли(ADP-рибозы), но и от структуры этого полимера. Вероятно, что короткие и линейные полимеры ADP-рибозы не могут обеспечивать эффективное электростатическое отталкивание от поврежденной ДНК, в то время как высокий уровень ветвления, по-видимому, компенсирует уменьшенную длину цепи PAR, способствуя эффективной

диссоциации авто-поли(ADP-рибозил)ированной PARP1 из комплекса с поврежденной ДНК.

3.5.4.1 Характеризация мутантов PARP1

Ранее, структура полимера ADP-рибозы, синтезируемая этими мутантами PARP1^{G972R}, PARP1^{Y986S} или PARP1^{Y986H} была охарактеризована методами двумерной тонкослойной хроматографии, ВЭЖХ анализом и UPLC хроматографией в тандеме с МС/МС анализом [235,236]. Было установлено, что по сравнению с PARP1 дикого типа 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.

В качестве дополнительной характеристики структуры синтезируемых полимеров ADP-рибозы был проведен анализ авто-поли(ADP-рибозил)ированных белков PARP1^{wt}, PARP1^{Y986S}, PARP1^{Y986H} и PARP1^{G972R} методами атомно-силовой микроскопии и светорассеяния (**Рис. 3.25** и **Рис. 3.26**). Из анализа продуктов активации PARP1 и её мутантов методом АСМ на уровне индивидуальных молекул была проанализирована морфология PAR, синтезируемой этими белками (**Рис. 3.25**). Все внесенные точечные мутации PARP1 приводят к изменению морфологии авто-поли(ADP-рибозил)ированных молекул PARP1. Так, для PARP1^{wt} площадь поли(ADP-рибозил)ированной молекулы была больше, чем для модифицированных молекул в случае мутантных белков. Этот вывод согласуется с биохимическими данными, указывающими на то, что все эти мутации PARP1 приводят к синтезу PAR с более короткой длиной цепи по сравнению с диким типом [235,236]. Из изображений, полученных с помощью АСМ видно, что поли(ADP-рибозил)ированная PARP1^{wt} имеет звездообразную структуру (**рис. 3.25 А**), тогда как автомодифицированная PARP1^{Y986S} имеет неопределенную форму и гораздо меньший размер молекул PAR (**Рис. 3.25 Б**). Поли(ADP-рибозил)ированные молекулы PARP1^{Y986H}, синтезирующие гиперразветвленный PAR, выглядят как небольшие сфероподобные структуры с плотно упакованными полимерными цепями (**Рис. 3.25 В**). Мы не наблюдали заметных различий в морфологии между авто-поли(ADP-рибозил)ированными PARP1^{Y986S} и PARP1^{G972R}. Форма и размер этих молекул были схожими.

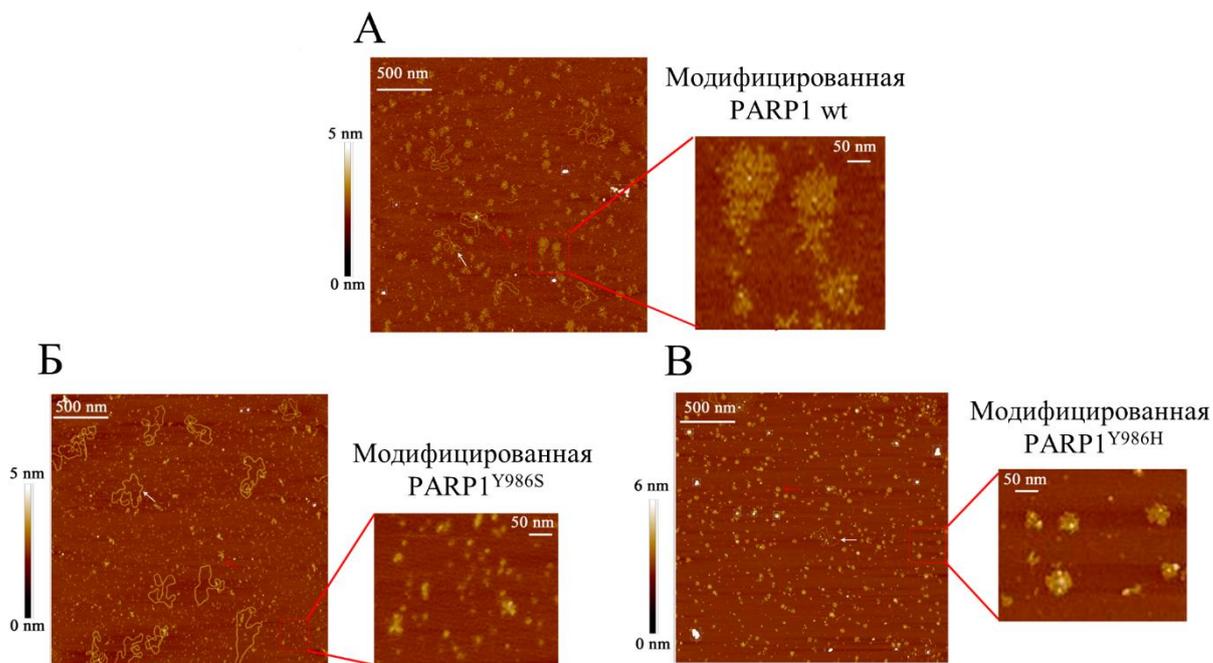


Рис. 3.25. АСМ-визуализация поли(ADP-рибозил)ированных молекул PARP1wt (А) или её мутантных форм: PARP1^{Y986S} (Б) или PARP1^{Y986H} (В). Красным прямоугольником обозначена увеличенная область, иллюстрирующая индивидуальные авто-поли(ADP-рибозил)ированные молекулы. Белые стрелки указывают на молекулы плазмидной ДНК, а красные стрелки указывают на поли(ADP-рибозил)ированные белки. Масштаб сканирования: 500 нм по оси X и Y, 5 нм по оси Z для PARP1wt и PARP1^{Y986S} и 6 нм по оси Z для для PARP1^{Y986H}.

Дополнительно, оценка размера поли(ADP-рибозил)ированных молекул была проведена методом динамического рассеяния света (DLS, dynamic light scattering). Оценивали гидродинамический радиус (R_h) модифицированной PARP1wt и её мутантов (PARP1^{Y986S} и PARP1^{Y986H}) (Рис. 3.26). До начала реакции поли(ADP-рибозил)ирования значения R_h составили ~ 10 нм как для PARP1wt, так и для её мутантов (Рис.3.26 А). Активация PARP1wt и её мутантов, обнаруженная с помощью DLS, позволила нам определить средние значения R_h для поли(ADP-рибозил)ированных белков после инкубации в присутствии NAD^+ (Рис. 3.26 Б). Поли(ADP-рибозил)ирование белков увеличивало их размер и, соответственно, увеличивало R_h (10–18–26 нм; Рис. 3.26 А, Б). $R_h \sim 26$ нм был определен для авто-поли(ADP-рибозил)ированной PARP1wt и R_h 22,6 и 18,5 нм для автомодифицированных мутантов PARP1^{Y986H} и PARP1^{Y986S} соответственно (Рис. 3.26 Б). Таким образом, значения R_h поли(ADP-рибозил)ированных белков были выше соответствующих значений, измеренных для белков до инициации синтеза PAR (Рис. 3.26 А). Для PARP1^{Y986S} и PARP1^{Y986H} наблюдалось 1,5- и 2,3-кратное увеличение значений R_h соответственно, тогда как для PARP1wt характерно 2,6-кратное увеличение значения R_h

после поли(ADP-рибозил)ирования. Полученные данные свидетельствуют о том, что мутант PARP1^{Y986S} синтезирует более короткие цепи PAR по сравнению с PARP1^{wt} и PARP1^{Y986H}. Таким образом, как результаты измерения АСМ-изображений модифицированных белков, так и измерения DLS указывают на морфологические различия между молекулами PARP1 дикого типа и мутантами.

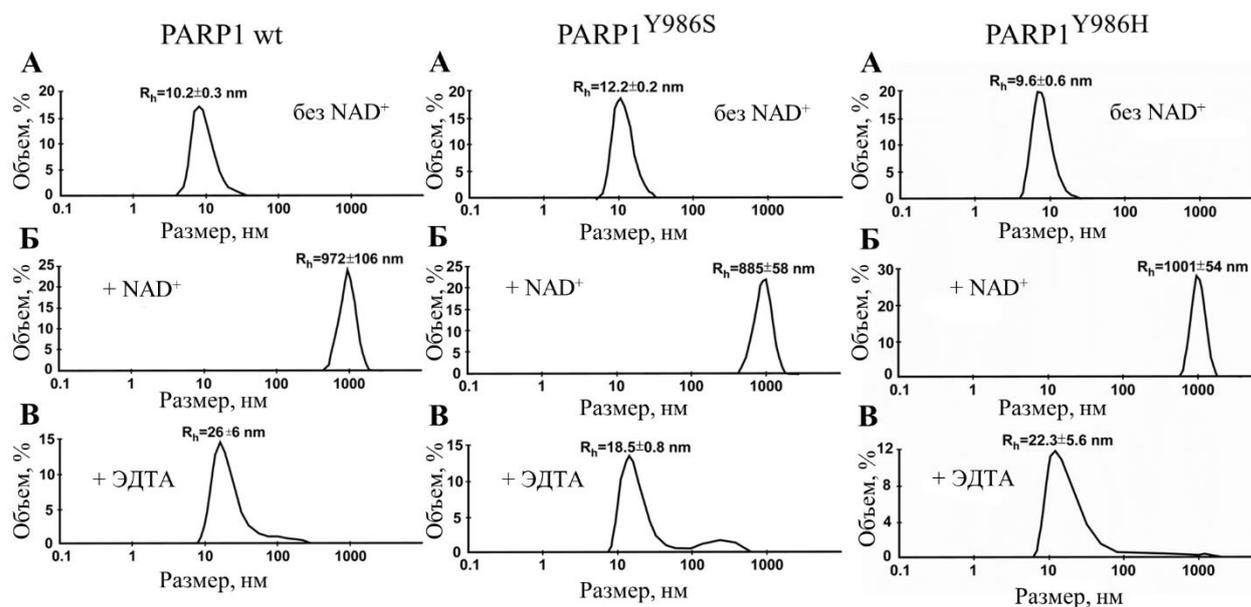


Рис. 3.26. Распределение размеров поли(ADP-рибозил)ированной PARP1^{wt} и её мутантных форм по объему. Значения гидродинамического радиуса (R_h) измеряли для отдельных белков до (А), после 40-минутной инкубации в присутствии NAD⁺ (Б) и после добавления ЭДТА (В). Реакционные смеси содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 2,5 мкМ PARP1^{wt} или PARP1^{Y986S}, или PARP1^{Y986H}, 2,5 мкМ ДНК (Nick), 10 мМ MgCl₂ и 1 мМ NAD⁺ (где указано). Агрегация авто-поли(ADP-рибозил)ированной PARP1 при синтезе PAR опосредована ионами Mg²⁺, которые стабилизируют межмолекулярный контакт между соседними поли(ADP-рибозил)ированными молекулами [109]. Чтобы разрушить ассоциацию молекул автомодифицированной PARP1 в присутствии Mg²⁺ добавляли ЭДТА до конечной концентрации 10 мМ и определяли размер поли(ADP-рибозил)ированных молекул белка (В). Значения R_h представляют собой среднее значение (\pm стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов.

3.5.4.2. Определение сродства YB-1 к разным типам PAR

Для проверки гипотезы о том, что структура синтезированной PAR может влиять на эффективность связывания YB-1 была проведена наработка препаративных количеств полимера ADP-рибозы, синтезированного PARP1^{wt} или одной из её мутантных форм PARP1^{Y986S}, PARP1^{Y986H} и PARP1^{G972R} (Материалы и методы 2.2.7, Приложение 3).

Методом задержки в геле оценивали сродство полноразмерной формы YB-1(FL) к полученным препаратам PAR (Рис. 3.27).

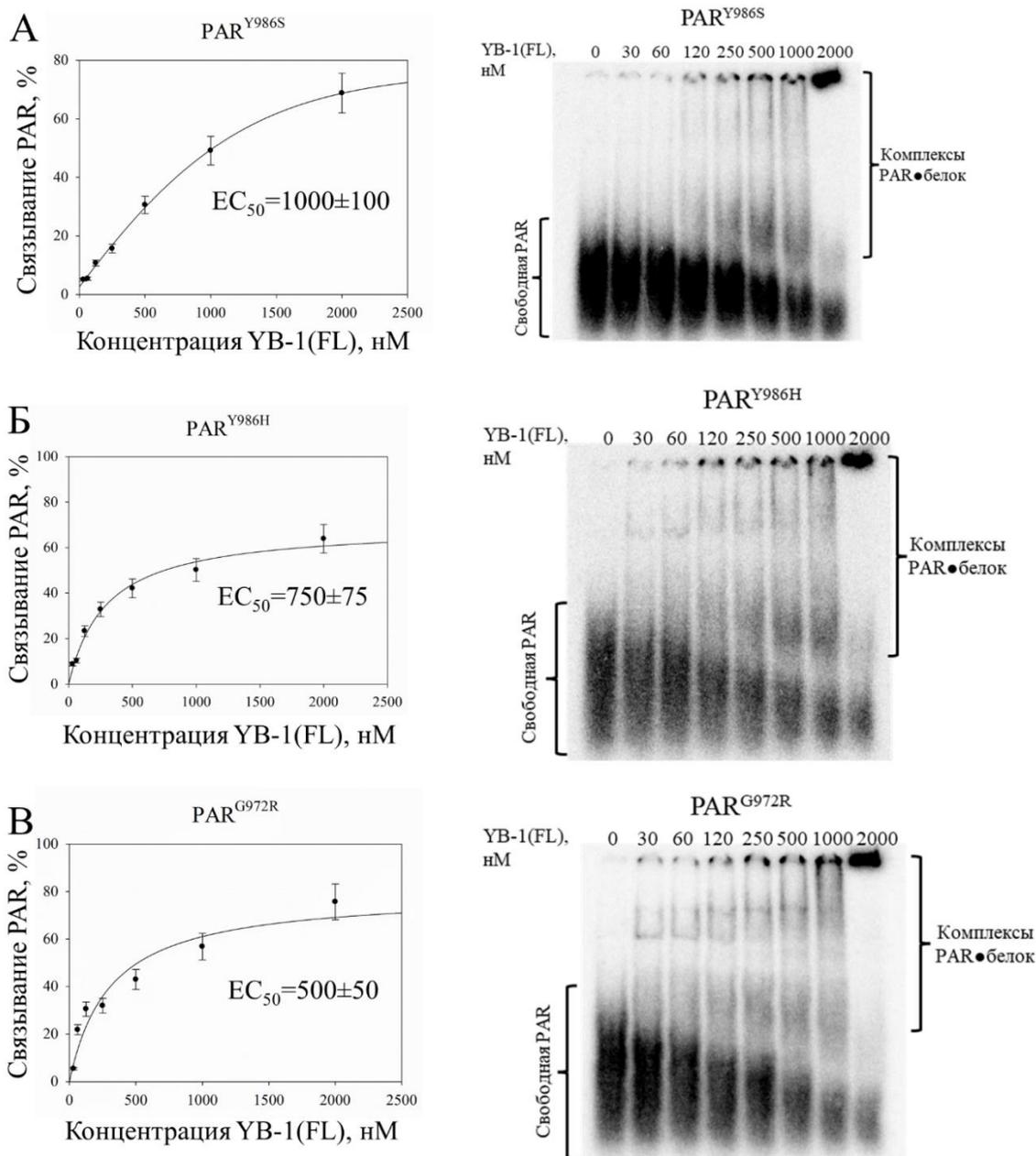


Рис. 3.27. Сродство YB-1 к PAR, синтезированной мутантами PARP1. Представлены данные по связыванию YB-1 с PAR, синтезированной мутантами PARP1, построенные на основании анализа электрофореграмм задержки в геле. Реакционные смеси содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 мкг/мл БСА, 60 нМ [³²P]-меченой PAR и YB-1(FL) в указанных концентрациях. Сродство YB-1 к PAR определяли, как концентрацию YB-1 при которой 50% молекул PAR находится в комплексе с YB-1 (EC₅₀). Представлены радиоавтографы гелей, в которых проводилось разделение продуктов реакции в нативных условиях (Материалы и методы 2.2.17).

Значения EC₅₀ для комплексов YB-1(FL)•PAR^{Y986S} (1000 нМ) (**Рис. 3.27 А**) и YB-1(FL)•PAR^{Y986H} (750 нМ) (**Рис. 3.27 Б**) были соответственно в два и в полтора раза ниже, чем для комплексов YB-1(FL)•PAR^{wt} (550 нМ) (**Рис. 3.18 А**). YB-1 связывается с более высокой аффинностью к длинному регулярно разветвленному полимеру ADP-рибозы, чем

к короткому регулярно разветвленному ($\text{PAR}^{\text{Y986S}}$) или короткому гиперразветвленному ($\text{PAR}^{\text{Y986H}}$) полимеру, но имеет сравнимую аффинность связывания с PAR, продуцируемой PARP1wt, и короткой гипоразветвленной $\text{PAR}^{\text{G972R}}$ (500 нМ) (**Рис. 3.27 В**).

Таким образом, структура PAR, её длина и количество ветвлений, могут оказывать влияние на эффективность комплексообразования YB-1 с PAR.

3.5.4.3. YB-1 стимулирует активность мутантов PARP1, синтезирующих разветвленные или линейные полимеры ADP-рибозы

Для количественной оценки активности мутантных форм PARP1 сравнивали скорость реакции поли(ADP-рибозил)ирования на начальном участке. Из полученных данных следует, что для $\text{PARP1}^{\text{Y986S}}$, $\text{PARP1}^{\text{Y986H}}$, $\text{PARP1}^{\text{G972R}}$ скорость реакции на начальном участке составляет 31%, 32%, 18,75% от скорости реакции, катализируемой PARP1wt, соответственно (**Рис. 3.28 А, Б**). Далее была проведена оценка влияния YB-1(FL) на активность мутантов PARP1 (**Рис. 3.28**). Добавление YB-1 стимулировало активность мутантов PARP1, тем самым повышая скорость суммарного синтеза PAR в 2,5 раза для $\text{PARP1}^{\text{Y986S}}$ и $\text{PARP1}^{\text{Y986H}}$ и в 4,5 раза для $\text{PARP1}^{\text{G972R}}$ (**Рис. 3.28 А, Б**). Следует также отметить, что транс-поли(ADP-рибозил)ирование YB-1 наблюдалось в случае всех мутантов PARP1 (**Рис. 3.28 В**). Согласно полученным данным, в случае $\text{PARP1}^{\text{Y986S}}$ и $\text{PARP1}^{\text{G972R}}$ 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. 3.28 Г**). В тоже время для PARP1wt и $\text{PARP1}^{\text{Y986H}}$ уровень транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 составлял 60% и 62.5%, соответственно (**Рис. 3.28 Г**).

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 (**Рис. 3.29**).

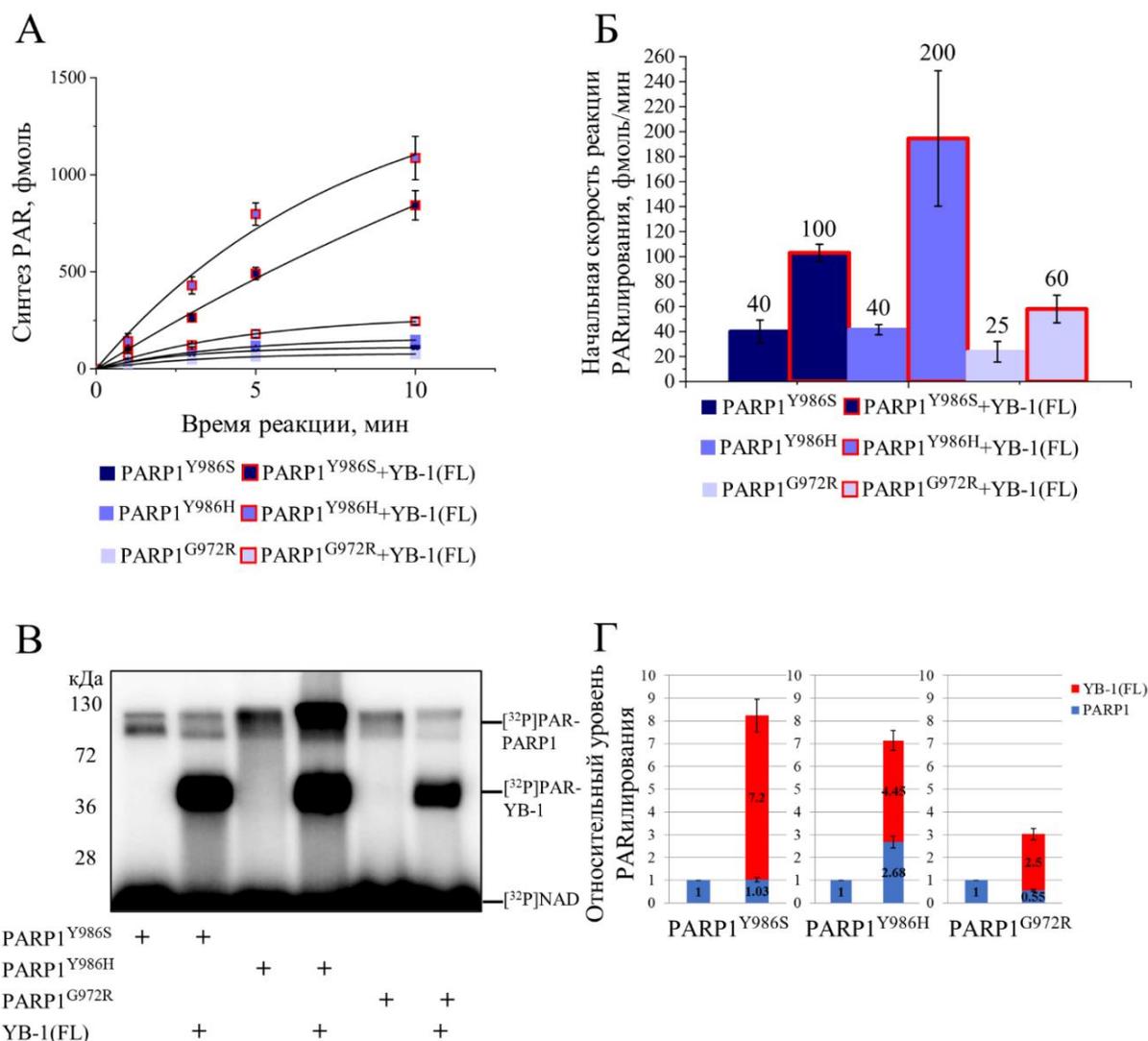


Рис. 3.28. YB-1 стимулирует активность мутантных форм PARP1.

А: Кинетика синтеза PAR мутантами PARP1 в присутствии YB-1(FL). Представлен график, суммирующий результаты трёх независимых экспериментов, выполненных с использованием метода ТХУ-мишени (Материалы и методы 2.2.18). **Б:** Анализ начальной скорости синтеза PAR мутантами PARP1 в присутствии YB-1(FL). Начальные скорости реакции поли(ADP-рибозил)ирования (фмоль/мин) были получены обработкой индивидуальных кривых (А) (Материалы и методы 2.2.19, уравнение 3) и представлены на рисунке как средние значения (\pm стандартное отклонение) для трех независимых экспериментов. **В:** Анализ авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 и транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 методом денатурирующего гель-электрофореза. Радиоавтограф 10% SDS-ПААГ, в котором проводили разделение продуктов реакции поли(ADP-рибозил)ирования. **Г:** Диаграмма, отражающая относительные уровни авто-поли(ADP-рибозил)ирования мутантов PARP1 и транс-поли(ADP-рибозил)ирования YB-1 (Материалы и методы 2.2.20). Активность мутантов PARP1 в отсутствие белков-кофакторов была принята за 100%. Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 мкг/мл БСА, 10 мМ ЭДТА, 0,5 OD₂₆₀/мл ДНК_{акт}, 100 нМ PARP1^{Y986S} или PARP1^{Y986H}, или PARP1^{G972R} и 2 мкМ YB-1(FL). Реакцию запускали добавлением NAD⁺ до конечной концентрации 20 мкМ (0,4 мкКи [³²P]-меченого NAD⁺) с последующей инкубацией при 30°C в течение указанного времени.

Полученные данные подтверждают гипотезу существования “PAR-кода” для белков, участвующих в ответе на генотоксический стресс (Обзор литературы, 1.1.2) [42,43]:

- PARP1 это мультифункциональный белок и можно предположить, что в зависимости от конкретного клеточного процесса PARP1 способна синтезировать определенный тип структуры поли(ADP-рибозы), тем самым привлекая в первую очередь белки, которые обладают наибольшим сродством к данному типу полимера. Так, в случае YB-1 показана зависимость его аффинности к поли(ADP-рибозе) от её структуры.
- Синтезируя определенный тип структуры поли(ADP-рибозы), PARP1 способна таким образом регулировать уровень авто- и транс- поли(ADP-рибозил)ирования. Так, в случае YB-1, при синтезе короткого полимера происходит перераспределение в сторону реакции транс-поли(ADP-рибозил)ирования. При преимущественной модификации YB-1 происходит ингибирование авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1.

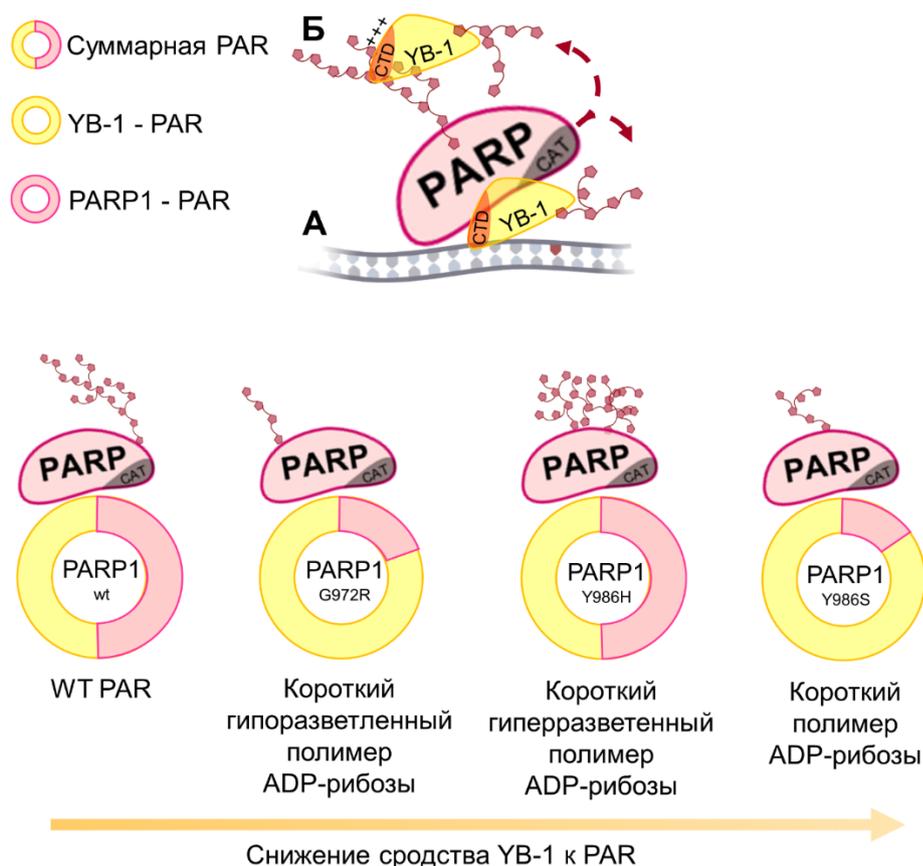


Рис. 3.29. Влияние различной длины и частоты ветвления PAR, синтезируемой мутантными формами PARP1 на сродство YB-1 к PAR, величину авто-поли(ADP-рибозил)ирования PARP1 (выделено розовым цветом) и транс-поли(ADP-рибозил)ирование (выделено желтым цветом) при стимуляции активности PARP1 в тройном комплексе «PARP1•YB-1•поврежденная ДНК» (А), а также при взаимодействии YB-1 с PAR через его С-концевой домен (CTD) (Б).

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. На основании результатов, полученных в рамках настоящей работы предложен механизм влияния YB-1 на реакцию поли(ADP-рибозил)ирования, катализируемую PARP1. 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 создания онкопрепаратов, подавляющих её активность, исследование механизмов стимуляции активности PARP1 другими белками имеет значительный интерес и практическую значимость. На основании полученных нами результатов мы предлагаем следующий механизм стимуляции активности PARP1 в присутствии РНК(PAR)-связывающего белка YB-1. На первом этапе формируется гетеродимер YB-1•PARP1 на поврежденной ДНК (Рис. 3.12, 3.13, 3.15), причем на эффективность образования гетеродимера влияет тип поврежденной ДНК (Рис. 3.3, 3.4, 3.5, 3.9). В тройном комплексе YB-1•PARP1•поврежденная ДНК происходит поли(ADP-рибозил)ирование обоих белков, причем YB-1 является преимущественной мишенью в этой реакции (Рис. 3.13). Модифицированный YB-1 диссоциирует из комплекса с PARP1 и ДНК (Рис. 3.14) и замещается немодифицированной молекулой. Таким образом, YB-1, выступая в качестве основного акцептора PAR на этапе диссоциации, удаляет PAR – продукт реакции, что приводит к увеличению числа оборотов и стимуляции процесса поли(ADP-рибозил)ирования. При достижении на автомодифицированной PARP1 достаточной длины, взаимодействие YB-1 с PAR преобладает над формированием гетеротримерных комплексов YB-1•PARP1•ДНК. Связываясь своим неупорядоченным С-концевым доменом с молекулами PAR, ковалентно присоединенными к PARP1 (Рис. 3.18), YB-1 поли(ADP-рибозил)ируется и ингибирует элонгацию растущего полимера ADP-рибозы (Рис. 3.22). Ограничение длины синтезируемой PAR позволяет приходящим из раствора молекулам YB-1 локализоваться вблизи активного центра PARP1, подвергаться поли(ADP-рибозил)ированию, многократно повторяя цикл ассоциации-модификации-диссоциации. Выступая в качестве эффективного акцептора в реакции поли(ADP-рибозил)ирования, YB-

1 повышает число оборотов реакции, катализируемой PARP1, и увеличивает общий выход реакции поли(ADP-рибозил)ирования (Рис. 3.1, 3.11, 3.28).

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.

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 мононуклеосом, 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, играют 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 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. Vol. 56. P. 427-45.
2. Sánchez-Pérez I. DNA repair inhibitors in cancer treatment // *Clin Transl Oncol*, 2006. Vol. 8, № 9. P.642-6.
3. Caron M.C., Sharma A.K., O'Sullivan J., Myler L.R., Ferreira M.T., Rodrigue A., Coulombe Y., Ethier C., Gagné J.P., Langelier M.F., Pascal J.M., Finkelstein I.J., Hendzel M.J., Poirier G.G., Masson J.Y. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 antagonizes DNA resection at double-strand breaks // *Nat Commun*, 2019. Vol 10, № 1. P. 2954.
4. Zhao Y., Mir C., Garcia-Mayea Y., Paciucci R., Kondoh H., LLeonart M.E. RNA-binding proteins: Underestimated contributors in tumorigenesis // *Semin Cancer Biol*, 2022. Vol. 86, № 3. P. 431-444.
5. 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-ribosyl)ation as a new posttranslational modification of YB-1 // *Biochimie*, 2015. Vol. 119. P. 36-44.
6. 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. Vol. 1864, № 12. P. 1631-1640.
7. Lüscher B., Ahel I., Altmeyer M., Ashworth A., Bai P., Chang P., Cohen M., Corda D., Dantzer F., Daugherty M.D., Dawson T.M., Dawson V.L., Deindl S., Fehr A.R., Feijs K.L.H., Filippov D.V., Gagné J.P., Grimaldi G., Guettler S., Hoch N.C., Hottiger M.O., Korn P., Kraus W.L., Ladurner A., Lehtiö L., Leung A.K.L., Lord C.J., Mangerich A., Matic I., Matthews J., Moldovan G.L., Moss J., Natoli G., Nielsen M.L., Niepel M., Nolte F., Pascal J., Paschal B.M., Pawłowski K., Poirier G.G., Smith S., Timinszky G., Wang Z.Q., Yélamos J., Yu X., Zaja R., Ziegler M. ADP-ribosyltransferases, an update on function and nomenclature // *FEBS J*, 2022. Vol. 289, № 23. P. 7399-7410.
8. Schreiber V., Dantzer F., Ame J.C., de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule // *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006. Vol. 7, № 7. P. 517-28.
9. Rouleau M., McDonald D., Gagné P., Ouellet M.E., Droit A., Hunter J.M., Dutertre S., Prigent C., Hendzel M.J., Poirier G.G. PARP-3 associates with polycomb group bodies and with components of the DNA damage repair machinery // *J Cell Biochem*, 2007. Vol. 100, № 2. P. 385-401.
10. Beneke S. Regulation of chromatin structure by poly(ADP-ribosyl)ation // *Front Genet*, 2012. Vol. 3. P. 169.
11. Hanzlikova H., Caldecott K.W. Perspectives on PARPs in S Phase // *Trends Genet*, 2019. Vol. 35, № 6. P. 412-422.
12. Chang, P., Jacobson, M.K., Mitchison, T.J. Poly(ADP-ribose) is required for spindle assembly and structure // *Nature*, 2004. Vol. 432, № 7017. P. 645-649.
13. 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. Vol. 8, № 1. P. e1002442.

14. Viveló, C.A., Wat, R., Agrawal, C., Tee, H.Y., Leung, A. K. ADPriboDB: The database of ADP-ribosylated proteins // *Nucleic Acids Res*, 2017. Vol. 45, № D1. P. D204-D209.
15. Tallis, M., Morra, R., Barkauskaite, E., Ahel, I. Poly(ADP-ribosyl)ation in regulation of chromatin structure and the DNA damage response // *Chromosoma*, 2014. Vol. 123, № 1-2. P. 79-90.
16. 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. Vol. 275, № 52. P. 40974-80.
17. 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. Vol. 36, № 22. P. 6959-76.
18. 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. Vol. 52, № 2. P. 272-85.
19. Gagné, J.P., Pic, E., Isabelle, M., Krietsch, J., Ethier, C., Paquet, E., Kelly, I., Boutin, M., Moon, K.M., Foster, L.J., Poirier, G.G. Quantitative proteomics profiling of the poly (ADP-ribose)-related response to genotoxic stress // *Nucleic Acids Res*, 2012. Vol. 40, № 16. P. 7788-805.
20. 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. Vol. 18, № 1. P. 84-88.
21. Langelier, M., Planck, J., Roy, S., Pascal, J. Crystal structures of poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) zinc fingers bound to DNA: structural and functional insights into DNA-dependent PARP-1 activity // *J Biol Chem*, 2011. Vol. 286, № 12. P. 10690-701.
22. Altmeyer M., Messner S., Hassa P.O., Fey M., Hottiger M.O. Molecular mechanism of poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites // *Nucleic Acids Res*, 2009. Vol. 37, № 11. P. 3723-38.
23. Langelier, M., Servent, K., Rogers, E., Pascal, J. A third zinc-binding domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 coordinates DNA-dependent enzyme activation // *J Biol Chem*, 2008. Vol. 283, № 7. P. 4105-14.
24. Desmarais, Y., Menard, L., Lagueux, J., Poirier, G.G. Enzymological properties of poly(ADP-ribose)polymerase: characterization of automodification sites and NADase activity // *Biochim Biophys Acta*, 1991. Vol. 1078, № 2. P. 179-86.
25. Bork, P., Hofmann, K., Bucher, P., Neuwald, A.F., Altschul, S.F., Koonin, E.V. A superfamily of conserved domains in DNA damage-responsive cell cycle checkpoint proteins // *FASEB J*, 1997. Vol. 11, № 1. P. 68-76.
26. Eustermann, S., Wu, W.F., Langelier, M.F., Yang, J.C., Easton, L.E., Riccio, A.A., Pascal, J.M., Neuhaus, D. Structural basis of detection and signaling of DNA Single-Strand breaks by human PARP-1 // *Mol Cell*, 2015. Vol. 60, № 5. P. 742-754.
27. Dawicki-McKenna, J., Langelier, M., DeNizio, J., Riccio, A., Cao, C., Karch, K., McCauley, M., Steffen, J., Black, B., Pascal, J. PARP-1 activation requires local unfolding of an autoinhibitory domain // *Mol. Cell*, 2015. Vol. 60, № 5. P. 755-68.
28. Miwa, M., Saito, H., Sakura, H., Saikawa, N., Watanabe, F., Matsushima, T., Sugimura, T. A ¹³C NMR study of poly(adenosine diphosphate ribose) and its monomers: evidence of alpha-(1"

- leads to 2') ribofuranosyl ribofuranoside residue // *Nucleic Acids Res*, 1977. Vol. 4, № 11. P. 3997-4005.
29. Miwa, M., Ishihara, M., Takishima, S., Takasuka, N., Maeda, M., Yamaizumi, Z., Sugimura, T., Yokoyama, S., Miyazawa, T. The branching and linear portions of poly(adenosine diphosphate ribose) have the same alpha(1' leads to 2') ribose-ribose linkage // *J Biol Chem*, 1981. Vol. 256, № 6. P. 2916-2921.
30. Alvarez-Gonzalez, R., Althaus, F.R. Poly(ADP-ribose) catabolism in mammalian cells exposed to DNA-damaging agents // *Mutat Res*, 1989. Vol. 218, № 2. P. 67-74.
31. Meyer, R.G., Meyer-Ficca M.L., Jacobson E.L., Jacobson M.K. Human poly (ADP-ribose) glycohydrolase (PARG) gene and the common promoter sequence it shares with inner mitochondrial membrane translocase 23(TIM23) // *Gene*, 2003. Vol. 314. P. 181-190.
32. Oka, S., Kato, J., Moss, J. Identification and characterization of a mammalian 39-kDa poly(ADPribose)glycohydrolase // *J Biol Chem*, 2006. Vol. 281, № 2. P. 705-13.
33. Mashimo, M., Moss, J. Functional Role of ADP-Ribosyl-Acceptor Hydrolase 3 in poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 Response to Oxidative Stress // *Curr Protein Pept Sci*, 2016. Vol. 17, № 7. P. 633-640.
34. 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. Vol. 58, № 6. P. 935-46.
35. Sharifi, R., Morra, R., Appel, D., Tallis, M., Chioza, B., Jankevicius, G., Simpson, M., Matic, I., Ozkan, E., Golia, B., Schellenberg, M., Weston, R., Williams, J., Rossi, M., Galehdari, H., Krahn, J., Wan, A., Trembath, R., Crosby, A., Ahel, D., Hay, R., Ladurner, A., Timinszky, G., Williams, S., Ahel, I. Deficiency of terminal ADP-ribose protein glycohydrolase TARG1/C6orf130 in neurodegenerative disease // *EMBO J*, 2013. Vol. 32, № 9. P. 1225-37.
36. Rosenthal, F., Feijs, K., Frugier, E., Bonalli, M., Forst, A., Imhof, R., Winkler, H., Fischer, D., Caffisch, A., Hassa, P., Lüscher, B., Hottiger, M. Macrodomein-containing proteins are new mono-ADP-ribosylhydrolases // *Nat Struct Mol Biol*, 2013. Vol. 20, № 4. P. 502-7.
37. Jankevicius, G., Hassler, M., Golia, B., Rybin, V., Zacharias, M., Timinszky, G., Ladurner, A. A family of macrodomain proteins reverses cellular mono-ADP-ribosylation // *Nat Struct Mol Biol*, 2013. Vol. 20, № 4. P. 508-14.
38. Kato, J., Zhu, J., Liu, C., Moss, J. Enhanced sensitivity to cholera toxin in ADP-ribosylarginine hydrolase-deficient mice // *Mol Cell Biol*, 2007. Vol. 27, № 15. P. 5534-43.
39. Palazzo, L., Thomas, B., Jemth, A.-S., Colby, T., Leidecker, O., Feijs, K., Zaja, R., Loseva, O., Puigvert, J., Matic, I., Helleday, T., Ahel, I. Processing of protein ADP-ribosylation by Nudix hydrolases // *Biochem J*, 2015. Vol. 468, № 2. P. 293-301.
40. Palazzo, L., Daniels, C., Nettleship, J., Rahman, N., McPherson, R., Ong, S.-E., Kato, K., Nureki, O., Leung, A., Ahel, I. ENPP1 processes protein ADP-ribosylation in vitro. *FEBS J*, 2016. Vol. 283, № 18. P. 3371-3388.
41. Rack, J.G.M., Liu, Q., Zorzini, V., Voorneveld, J., Ariza, A., Honarmand Ebrahimi, K., Reber, J.M., Krassnig, S.C., Ahel, D., van der Marel, G.A., Mangerich, A., McCullagh, J.S.O., Filippov, D.V., Ahel, I. Mechanistic insights into the three steps of poly(ADP-ribosylation) reversal // *Nat Commun*, 2021. Vol. 12, № 1. P. 4581.
42. Teloni F., Altmeyer M. Readers of poly(ADP-ribose): designed to be fit for purpose // *Nucleic Acids Res*, 2016. Vol. 44, № 3. P. 993-1006.

43. Maluchenko, N.V., Koshkina, D.O., Feofanov, A.V., Studitsky, V.M., Kirpichnikov, M.P. Poly(ADP-Ribosyl) Code Functions // *Acta Naturae*, 2021. Vol. 13, № 2. P. 58-69.
44. Panzeter, P.L., Realini, C.A., Althaus, F.R. Noncovalent interactions of poly(adenosine diphosphate ribose) with histones // *Biochemistry*, 1992. Vol. 31, № 5. P. 1379-85.
45. Fahrner, J., Kranaster, R., Altmeyer, M., Marx, A., Bürkle, A. Quantitative analysis of the binding affinity of poly(ADP-ribose) to specific binding proteins as a function of chain length // *Nucleic Acids Res*, 2007. Vol. 35, № 21. P. e143.
46. 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. Vol. 281, № 16. P. 3625-41.
47. Moor, N.A., Vasil'eva, I.A., Kuznetsov, N.A., Lavrik, O.I. Human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 is modified in vitro by poly(ADP-ribose) polymerase 1 under control of the structure of damaged DNA // *Biochimie*, 2020. Vol. 168. P. 144-155.
48. Hurtado-Bagès, S., Knobloch, G., Ladurner, A.G., Buschbeck, M. The taming of PARP1 and its impact on NAD⁺ metabolism // *Mol Metab*, 2020. Vol. 38. P. 100950.
49. Hatakeyama, K., Nemoto, Y., Ueda, K., Hayaishi, O. Purification and characterization of poly(ADP-ribose) glycohydrolase. Different modes of action on large and small poly(ADP-ribose) // *J Biol Chem*, 1986. Vol. 261, № 32. P. 14902-11.
50. D'Amours, D., Desnoyers, S., D'Silva, I., Poirier, G.G. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions // *Biochem J*, 1999. Vol. 342, № 2. P. 249-68.
51. Kauppinen, T., Chan, W., Suh, S., Wiggins, A., Huang, E., Swanson, R. Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2 // *Proc Natl Acad Sci*, 2006. Vol. 103, № 18. P. 7136–7141.
52. Cohen-Armon, M., Visochek, L., Rozensal, D., Kalal, A., Geistrikh, I., Klein, R., Bendetz-Nezer, S., Yao, Z., Seger, R. DNA-independent PARP-1 activation by phosphorylated ERK2 increases Elk1 activity: a link to histone acetylation // *Mol Cell*, 2007. Vol. 25, № 2. P. 297-308.
53. Wright, R., Castellano, G., Bonet, J., Le Dily, F., Font-Mateu, J., Ballaré, C., Nacht, S., Soronellas, D., Oliva, B., Beato, M. CDK2-dependent activation of PARP-1 is required for hormonal gene regulation in breast cancer cells // *Genes Dev*, 2012. Vol. 26, № 17. P. 1972-83.
54. Du, Y., Yamaguchi, H., Wei, Y., Hsu, J., Wang, H.-L., Hsu, Y.-H., Lin, W.-C., Yu, W.-H., Leonard, P., Lee, G., Chen, M.-K., Nakai, K., Hsu, M.-C., Chen, C.-T., Sun, Y., Wu, Y., Chang, W.-C., Huang, W.-C., Liu, C.-L., Chang, Y.-C., Chen, C.-H., Park, M., Jones, P., Hortobagyi, G., Hung, M.-C. Blocking c-Met-mediated PARP1 phosphorylation enhances anti-tumor effects of PARP inhibitors // *Nat Med*, 2016. Vol. 22, № 2. P. 194-201.
55. Zhang, S., Lin, Y., Kim, Y.-S., Hande, M., Liu, Z.-G., Shen, H.-M. c-Jun N-terminal kinase mediates hydrogen peroxide-induced cell death via sustained poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation // *Cell Death Differ*, 2007. Vol. 14, № 5. P. 1001-10.
56. Maruyama, T., Nara, K., Yoshikawa, H., Suzuki, N. Txk, a member of the non-receptor tyrosine kinase of the Tec family, forms a complex with poly(ADP-ribose) polymerase 1 and elongation factor 1alpha and regulates interferon-gamma gene transcription in Th1 cells // *Clin Exp Immunol*, 2007. Vol. 147, № 1. P. 164-75.
57. Beckert, S., Farrahi, F., Ghani, P., Aslam, R., Scheuenstuhl, H., Coerper, S., Königsrainer, A., Hunt, T., Hussain, Z. IGF-I-induced VEGF expression in HUVEC involves phosphorylation and

- inhibition of poly(ADP-ribose)polymerase // *Biochem Biophys Res Commun*, 2006. Vol. 341, № 1. P. 67-72.
58. Piao, L., Kang, D., Suzuki, T., Masuda, A., Dohmae, N., Nakamura, Y., Hamamoto, R. The histone methyltransferase SMYD2 methylates PARP1 and promotes poly(ADP-ribosylation) activity in cancer cells // *Neoplasia*, 2014. Vol. 16, № 3. P. 257-64, 264.e2.
59. Kassner, I., Andersson, A., Fey, M., Tomas, M., Ferrando-May, E., Hottiger, M. SET7/9-dependent methylation of ARTD1 at K508 stimulates poly-ADP-ribose formation after oxidative stress // *Open Biol*, 2013. Vol. 3, № 10. P. 120173.
60. Hassa, P., Haenni, S., Buerki, C., Meier, N., Lane, W., Owen, H., Gersbach, M., Imhof, R., Hottiger, M. Acetylation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by p300/CREB-binding protein regulates coactivation of NF-kappaB-dependent transcription // *J Biol Chem*, 2005. Vol. 280, № 49. P. 40450-64.
61. Rajamohan, S., Pillai, V., Gupta, M., Sundaresan, N., Birukov, K., Samant, S., Hottiger, M., Gupta, M. SIRT1 promotes cell survival under stress by deacetylation-dependent deactivation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 // *Mol Cell Biol*, 2009. Vol. 29, № 15. P. 4116-29.
62. Gill, G. Something about SUMO inhibits transcription // *Curr Opin Genet Dev*, 2005. Vol. 15, № 5. P. 536-41.
63. Hassa, P.O., Covic, M., Bedford, M.T., Hottiger, M.O. Protein arginine methyltransferase 1 coactivates NF-kappaB-dependent gene expression synergistically with CARM1 and PARP1 // *J Mol Biol*, 2008. Vol. 377, № 3. P. 668-78.
64. Martin, N., Schwamborn, K., Schreiber, V., Werner, A., Guillier, C., Zhang, X.-D., Bischof, O., Seeler, J.-S., Dejean, A. PARP-1 transcriptional activity is regulated by sumoylation upon heat shock // *EMBO J*, 2009. Vol. 28, № 22. P. 3534-48.
65. Messner, S., Schuermann, D., Altmeyer, M., Kassner, I., Schmidt, D., Schär, P., Müller, S., Hottiger, M. Sumoylation of poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibits its acetylation and restrains transcriptional coactivator function // *FASEB J*, 2009. Vol. 23, № 11. P. 3978-89.
66. Daniels, C., Ong, S., Leung, A. Phosphoproteomic approach to characterize protein mono- and poly(ADP-ribosylation) sites from cells // *J Proteome Res*, 2014. Vol. 13, № 8. P. 3510-22.
67. Gagné, J.P., Ethier, C., Defoy, D., Bourassa, S., Langelier, M., Riccio, A., Pascal, J., Moon, K., Foster, L., Ning, Z., Figeys, D., Droit, A., Poirier, G. Quantitative site-specific ADP-ribosylation profiling of DNA-dependent PARPs // *DNA Repair (Amst)*, 2015. Vol. 30. P. 68-79.
68. Laing, S., Koch-Nolte, F., Haag, F., Buck, F. Strategies for the identification of arginine ADP-ribosylation sites // *J Proteomics*, 2011. Vol. 75, № 1. P. 169-76.
69. Manning, D., Fraser, B., Kahn, R., Gilman, A. ADP-ribosylation of transducin by islet-activation protein. Identification of asparagine as the site of ADP-ribosylation // *J Biol Chem*, 1984. Vol. 259, № 2. P. 749-56.
70. Cervantes-Laurean, D., Loflin, P., Minter, D., Jacobson, E., Jacobson, M. Protein modification by ADP-ribose via acid-labile linkages // *J Biol Chem*, 1995. Vol. 270, № 14. P. 7929-36.
71. McDonald, L., Moss, J. Enzymatic and nonenzymatic ADP-ribosylation of cysteine // *Mol Cell Biochem*, 1994. Vol. 138, № 1-2. P. 221-6.
72. Leslie Pedrioli, D., Leutert, M., Bilan, V., Nowak, K., Gunasekera, K., Ferrari, E., Imhof, R., Malmström, L., Hottiger, M. Comprehensive ADP-ribosylome analysis identifies tyrosine as an ADP-ribose acceptor site // *EMBO Rep*, 2018. Vol. 19, № 8. P. e45310.

73. Tulin, A., Spradling, A. Chromatin loosening by poly(ADP)-ribose polymerase (PARP) at *Drosophila* puff loci // *Science*, 2003. Vol. 299, № 5606. P. 560-2.
74. Wacker, D., Ruhl, D., Balagamwala, E., Hope, K., Zhang, T., Kraus, W. The DNA binding and catalytic domains of poly(ADP-ribose) polymerase 1 cooperate in the regulation of chromatin structure and transcription // *Mol Cell Biol*, 2007. Vol. 27, № 21. P. 7475-85.
75. Muthurajan, U., Hepler, M., Hieb, A., Clark, N., Kramer, M., Yao, T., Luger, K. Automodification switches PARP-1 function from chromatin architectural protein to histone chaperone // *Proc Natl Acad Sci*, 2014. Vol. 111, № 35. P. 12752-7.
76. Bonfiglio, 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. Vol. 65, № 5. P. 932-940.e6.
77. Sun, F., Zhao, P., Zhang, N., Kong, L., Wong, C., Yun, C. HPF1 remodels the active site of PARP1 to enable the serine ADP-ribosylation of histones // *Nat Commun*, 2021. Vol. 12, № 1. P. 1028.
78. Suskiewicz, M., Zobel, F., Ogden, T., Fontana, P., Ariza, A., Yang, J., Zhu, K., Bracken, L., Hawthorne, W., Ahel, D., Neuhaus, D., Ahel, I. HPF1 completes the PARP active site for DNA damage-induced ADP-ribosylation // *Nature*, 2020. Vol. 579, № 7800. P. 598-602.
79. Kurgina, T., Moor, N., Kutuzov, M., Naumenko, K., Ukraintsev, A., Lavrik, O. Dual function of HPF1 in the modulation of PARP1 and PARP2 activities // *Commun Biol*, 2021. Vol. 4, № 1. P. 1259.
80. Mao, Z., Hine, C., Tian, X., Van Meter, M., Au, M., Vaidya, A., Seluanov, A., Gorbunova, V. SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1 // *Science*, 2011. Vol. 332, № 6036. P. 1443-6.
81. Juarez-Salinas, H., Sims, J.L., Jacobson, M.K. Poly(ADP-ribose) levels in carcinogen-treated cells // *Nature*, 1979. Vol. 282, № 5740. P. 740-1.
82. Chambon, P., Weill, J.D., Mandel, P. Nicotinamide mononucleotide activation of new DNA-dependent polyadenylic acid synthesizing nuclear enzyme // *Biochem Biophys Res Commun*, 1963. Vol. 11. P. 39-43.
83. Paine, A.J., Allen, C.M., Durkacz, B.W., Shall, S. Evidence that poly(ADP-ribose) polymerase is involved in the loss of NAD from cultured rat liver cells // *Biochem J*, 1982. Vol. 202, № 2. P. 551-3.
84. 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. Vol. 18, № 1. P. 27-47.
85. Caldecott, K.W. Mammalian DNA base excision repair: Dancing in the moonlight // *DNA Repair (Amst)*, 2020. Vol. 93. P. 102921.
86. Ходырева, С.Н., Лаврик, О.И. Поли(ADP-рибоза)полимераза 1 – ключевой регулятор репарации ДНК // *Молекулярная Биология*, 2016. Vol. 50, № 4. P. 655-673.
87. Masutani, M., Nozaki, T., Nishiyama, E., Shimokawa, T., Tachi, Y., Suzuki, H., Nakagama, H., Wakabayashi, K., Sugimura, T. Function of poly(ADP-ribose) polymerase in response to DNA damage: gene-disruption study in mice // *Mol Cell Biochem*, 1999. Vol. 193, № 1-2. P. 149-52.
88. Wang, Z.Q., Auer, B., Stingl, L., Berghammer, H., Haidacher, D., Schweiger, M., Wagner, E.F. Mice lacking ADPRT and poly(ADP-ribosylation) develop normally but are susceptible to skin disease // *Genes Dev*, 1995. Vol. 9, № 5. P. 509-20.

89. de Murcia, J.M., Niedergang, C., Trucco, C., Ricoul, M., Dutrillaux, B., Mark, M., Oliver, F.J., Masson, M., Dierich, A., LeMeur, M., Walztinger, C., Chambon, P., de Murcia G. Requirement of poly(ADP-ribose) polymerase in recovery from DNA damage in mice and in cells // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. Vol. 94, № 14. P. 7303-7.
90. Mortusewicz, O., Amé, J.-C., Schreiber, V., Leonhardt, H. Feedback-regulated poly(ADP-ribose) polymerase-1 is required for rapid response to DNA damage in living cells // *Nucleic Acids Res*, 2007. Vol. 35, № 22. P. 7665-75.
91. Hanzlikova, H., Gittens, W., Krejcikova K., Zeng, Z., Caldecott, K.W. Overlapping roles for PARP1 and PARP2 in the recruitment of endogenous XRCC1 and PNKP into oxidized chromatin // *Nucleic Acids Res*, 2017. Vol. 45, № 5. P. 2546-2557.
92. 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. Vol. 43, № 8. P. 4028-38.
93. Lavrik, O.I., Prasad, R., Sobol, R., Horton, J., Ackerman, E., Wilson, S. Photoaffinity labeling of mouse fibroblast enzymes by a Base Excision Repair intermediate: evidence for the role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in DNA repair // *J Biol Chem*, 2001. Vol. 276, № 27. P. 25541-8.
94. Cistulli, C., Lavrik, O.I., Prasad, R., Hou, E., Wilson, S. AP endonuclease and poly (ADP-ribose) polymerase-1 interact with the same base excision repair intermediate // *DNA Repair (Amst.)*, 2004. Vol. 3, № 6. P. 581-91.
95. Khodyreva, S.N., Prasad, R., Ilina, E.S., Sukhanova, M.V., Kutuzov, M.M., Liu, Y., Hou, E.W., Wilson, S., 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 U S A*, 2010. Vol. 107, № 51. P. 22090-5.
96. Kutuzov, M.M., Ilina, E.S., Sukhanova, M.V., Pyshnaya, I.A., Pyshnyi, D.V., Lavrik, O.I., Khodyreva, S.N. Interaction of poly(ADP-ribose) polymerase 1 with apurinic/aprimidinic sites within clustered DNA damage // *Biochemistry (Mosc)*, 2011. Vol. 76, № 1. P. 147-56.
97. 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. Vol. 43, № 12. P. 6009-22.
98. Sukhanova, M.V., Abrakhi, S., Joshi, V., Pastre, D., Kutuzov, M.M., Anarbaev, R.O., Curmi, P., Hamon, L., Lavrik, O.I. Single molecule detection of PARP1 and PARP2 interaction with DNA strand breaks and their poly(ADP-ribose) polymerase-1 using high-resolution AFM imaging // *Nucleic Acids Res*, 2016. Vol. 44, № 6. P. e60.
99. Sukhanova, M.V., Hamon, L., Kutuzov, M.M., Joshi, V., Abrakhi, S., Dobra, I., Curmi, P., Pastre, D., Lavrik, O.I. A single-molecule atomic force microscopy study of PARP1 and PARP2 recognition of base excision repair DNA intermediates // *J Mol Biol*, 2019. Vol. 431, № 15. P. 2655-2673.
100. Prasad, R., Lavrik, O.I., Kim, S.J., Kedar, P., Yang, X.P., Vande Berg, B.J., Wilson, S. DNA polymerase beta-mediated long patch base excision repair. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 stimulates strand displacement DNA synthesis // *J Biol Chem*, 2001. Vol. 276, № 35. P. 32411-4.
101. Sukhanova, M.V., Khodyreva, S.N., Lebedeva, N.A., Prasad, R., Wilson, S., Lavrik, O.I. Human base excision repair enzymes apurinic/aprimidinic endonuclease 1 (APE1), DNA polymerase beta and poly(ADP-ribose) polymerase 1: interplay between strand-displacement DNA synthesis and proofreading exonuclease activity // *Nucleic. Acids Res*, 2005. Vol. 33, № 4. P. 1222-9.

102. Sukhanova, M.V., Khodyreva, S.N., Lavrik, O.I. Poly(ADP-ribose) polymerase 1 regulates activity of DNA polymerase beta in long patch base excision repair // *Mutat Res*, 2010. Vol. 685, № 1-2. P. 80-9
103. Prasad, R., Dyrkheeva, N., Williams, J., Wilson, S. Mammalian base excision repair: functional partnership between PARP-1 and APE1 in AP-site repair // *PLoS One*, 2015. Vol. 10, № 5. P. e0124269.
104. Moor, N.A., Vasil'eva, I.A., Kuznetsov, N.A., Lavrik, O.I. Human apurinic/aprimidinic endonuclease 1 is modified in vitro by poly(ADP-ribose) polymerase 1 under control of the structure of damaged DNA // *Biochimie*, 2020. Vol. 168. P. 144-155.
105. Leppard, J., Dong, Z., Mackey, Z., Tomkinson, A. Physical and functional interaction between DNA ligase IIIalpha and poly(ADP-Ribose) polymerase 1 in DNA single-strand break repair // *Mol Cell Biol*, 2003. Vol. 23, № (16). P. 5919-27.
106. 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. Vol. 280, № 17. P. 17076-83.
107. Langelier, M., Riccio, A., Pascal, J. PARP-2 and PARP-3 are selectively activated by 5' phosphorylated DNA breaks through an allosteric regulatory mechanism shared with PARP-1 // *Nucleic Acids Res*, 2014. Vol. 42, № 12. P. 7762-75.
108. Alessova, E.E., Lavrik, O.I. Poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1: reaction mechanism and regulatory proteins // *Nucleic Acids Res*, 2019. Vol. 47, № 8. P. 3811-3827.
109. Vasil'eva, I.A., Anarbaev, R.O., Moor, N.A., Lavrik, O.I. Dynamic light scattering study of base excision DNA repair proteins and their complexes // *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2019. Vol. 1867, № 3. P. 297-305.
110. Bauer, P.I., Buki, K.G., Hakam, A., Kun, E. Macromolecular association of ADP-ribosyltransferase and its correlation with enzymic activity // *Biochem J*, 1990. Vol. 270, № 1. P. 17-26.
111. Mendoza-Alvarez, H., Alvarez-Gonzalez, R. Poly(ADP-ribose) polymerase is a catalytic dimer and the automodification reaction is intermolecular // *J Biol Chem*, 1993. Vol. 268, № 30. P. 22575-80.
112. Pion, E., Ullmann, G., Amé, J.-C., Gérard, D., de Murcia, G., Bombarda, E. DNA-induced dimerization of poly(ADP-ribose) polymerase-1 triggers its activation // *Biochemistry*, 2005. Vol. 44, № 44. P. 14670-81.
113. Ali, A., Timinszky, G., Arribas-Bosacoma, R., Kozlowski, M., Hassa, P., Hassler, M., Ladurner, A., Pearl, L., Oliver, A. The zinc-finger domains of PARP1 cooperate to recognize DNA strand breaks // *Nat Struct Mol Biol*, 2012. Vol. 19, № 7. P. 685-692.
114. Panzeter, P., Althaus, F. DNA strand break-mediated partitioning of poly(ADP-ribose) polymerase function // *Biochemistry*, 1994. Vol. 33, № 32. P. 9600-5.
115. Lilyestrom, W., van der Woerd, M.J., Clark, N., Luger, K. Structural and biophysical studies of human PARP-1 in complex with damaged DNA // *J Mol Biol*, 2010. Vol. 395, № 5. P. 983-94.
116. Langelier, M.F., Planck, J.L., Roy, S., Pascal, J.M. Structural basis for DNA damage-dependent poly(ADP-ribosyl)ation by human PARP-1 // *Science*, 2012. Vol. 336, № 6082. P. 728-32.

117. Eustermann, S., Videler, H., Yang, J.C., Cole, P.T., Gruszka, D., Veprintsev, D., Neuhaus, D. The DNA-binding domain of human PARP-1 interacts with DNA single-strand breaks as a monomer through its second zinc finger // *J Mol Biol*, 2011. Vol. 407, № 1. 149-70.
118. Langelier, M.F., Ruhl, D.D., Planck, J.L., Kraus, W.L., Pascal, J.M. The Zn³ domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction // *J Biol Chem*, 2010. Vol. 285, № 24. P. 18877-87.
119. 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. Vol. 44, № 20. P. 9771-9783.
120. Masaoka, A., Gassman, N., Kedar, P., Prasad, R., Hou, E., Horton, J., Bustin, M., Wilson, S. HMGN1 protein regulates poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) self-PARylation in mouse fibroblasts // *J Biol Chem*, 2012. Vol. 287, № 33. P. 27648-58.
121. Tanuma, S., Johnson, G. ADP-ribosylation of nonhistone high mobility group proteins in intact cells // *J Biol Chem*, 1983. Vol. 258, № 7. P. 4067-70.
122. Gillet, L., Schäfer, O. Molecular mechanisms of mammalian global genome nucleotide excision repair // *Chem Rev*, 2006. Vol. 106, № 2. P. 253-76.
123. King, B., Cooper, K., Liu, K., Hudson, L. Poly(ADP-ribose) contributes to an association between poly(ADP-ribose) polymerase-1 and xeroderma pigmentosum complementation group A in nucleotide excision repair // *J Biol Chem*, 2012. Vol. 287, № 47. P. 39824-33.
124. Fischbach, A., Krüger, A., Hampp, S., Assmann, G., Rank, L., Hufnagel, M., Stöckl, M., Fischer, J., Veith, S., Rossatti, P., Ganz, M., Ferrando-May, E., Hartwig, A., Hauser, K., Wiesmüller, L., Bürkle, A., Mangerich, A. The C-terminal domain of p53 orchestrates the interplay between non-covalent and covalent poly(ADP-ribosylation) of p53 by PARP1 // *Nucleic Acids Res*, 2018. Vol. 46, № 2. P. 804-822.
125. Laptenko, O., Tong, D., Manfredi, J., Prives, C. The Tail That Wags the Dog: How the Disordered C-Terminal Domain Controls the Transcriptional Activities of the p53 Tumor-Suppressor Protein // *Trends Biochem Sci*, 2016. Vol. 41, № 12. P. 1022-1034.
126. Zotchev, S., Protopopova, M., Selivanova, G. P53 C-terminal interaction with DNA ends and gaps has opposing effect on specific DNA binding by the core // *Nucleic Acids Res*, 2000. Vol. 28, № 20. P. 4005-12.
127. Mosner, J., Mummenbrauer, T., Bauer, C., Sczakiel, G., Grosse, F., Deppert, W. Negative feedback regulation of wild-type p53 biosynthesis // *EMBO J*, 1995. Vol. 14, № 18. P. 4442-9.
128. Caldecott, K. XRCC1 protein; Form and function // *DNA Repair (Amst)*, 2019. Vol. 81. P. 102664.
129. 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. Vol. 43, № 12. P. 6009-22.
130. Hanzlikova, H., Gittens, W., Krejčíkova, K., Zeng, Z., Caldecott, K.W. Overlapping roles for PARP1 and PARP2 in the recruitment of endogenous XRCC1 and PNKP into oxidized chromatin // *Nucleic Acids Res*, 2017. Vol. 45, № 5. P. 2546-2557.
131. Breslin, C., Hornyak, P., Ridley, A., Rulten, S., Hanzlikova, H., Oliver, A., Caldecott, K. The XRCC1 phosphate-binding pocket binds poly (ADP-ribose) and is required for XRCC1 function // *Nucleic Acids Res*, 2015. Vol. 43, № 14. P. 6934-44.

132. Polo, L., Xu, Y., Hornyak, P., Garces, F., Zeng, Z., Hailstone, R., Matthews, S., Caldecott, K., Oliver, A., Pearl, L. Efficient Single-Strand Break Repair Requires Binding to Both Poly(ADP-Ribose) and DNA by the Central BRCT Domain of XRCC1 // *Cell Rep*, 2019. Vol. 26, № 3. P. 573-581.
133. Masson, M., Niedergang, C., Schreiber, V., Muller, S., Menissier-de Murcia, J., de Murcia, G. XRCC1 is specifically associated with poly(ADP-ribose) polymerase and negatively regulates its activity following DNA damage // *Mol Cell Biol*, 1998. Vol. 18, № 6. P. 3563-71.
134. Lukong, K., Chang, K-W., Khandjian, E., Richard, S. RNA-binding proteins in human genetic disease // *Trends Genet*, 2008. Vol. 24, № 8. P. 416-25.
135. Cooper, T., Wan, L., Dreyfuss, G. RNA and disease // *Cell*, 2009. Vol. 136, № 4. P. 777-93.
136. Braunschweig, U., Gueroussov, S., Plocik, A., Graveley, B., Blencowe, B. Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways // *Cell*, 2013. Vol. 152, № 6. P. 1252-69.
137. Shi, Y., Manley, J. The end of the message: multiple protein-RNA interactions define the mRNA polyadenylation site // *Genes Dev*, 2015. Vol. 29, № 9. P. 889-97.
138. Sloan, K., Gleizes, P.-E., Bohnsack, M. Nucleocytoplasmic Transport of RNAs and RNA-Protein Complexes // *J Mol Biol*, 2016. Vol. 428, № 10 Pt A. P. 2040-59.
139. Thelen, M., Kye, M. The Role of RNA Binding Proteins for Local mRNA Translation: Implications in Neurological Disorders // *Front Mol Biosci*, 2020. Vol. 6. P. 161.
140. Ha, M., Kim, V. Regulation of microRNA biogenesis // *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. Vol. 15, № 8. P. 509-24.
141. Rinn, J. lncRNAs: linking RNA to chromatin // *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014. Vol. 6, № 8. P. a018614.
142. Lasda, E., Parker, R. Circular RNAs: diversity of form and function // *RNA*, 2014. Vol. 20, № 12. P. 1829-42.
143. Gerstberger, S., Hafner, M., Tuschl, T. A census of human RNA-binding proteins // *Nat Rev Genet*, 2014. Vol. 15, № 12. P. 829-45.
144. Neelamraju, Y., Hashemikhabir, S., Janga, S. The human RBPome: from genes and proteins to human disease // *J Proteomics*, 2015. Vol. 127, № Pt A. P. 61-70.
145. Lunde, B., Moore, C., Varani, G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function // *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. Vol. 8, № 6. P. 479-90.
146. Corley, M., Burns, M., Yeo, G. How RNA-Binding Proteins Interact with RNA: Molecules and Mechanisms // *Mol Cell*, 2020. Vol. 78, № 1. P. 9-29.
147. Järvelin, A., Noerenberg, M., Davis, I., Castello, A. The new (dis)order in RNA regulation // *Cell Commun Signal*, 2016. Vol. 14. P. 9.
148. Castello, A., Fischer, B., Eichelbaum, K., Horos, R., Beckmann, B., Strein, C., Davey, N., Humphreys, D., Preiss, T., Steinmetz, L., Krijgsveld, J., Hentze, M. Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins // *Cell*, 2012. Vol. 149, № 6. P.1393-406.
149. Alemasova, E.E., Lavrik, O.I. At the interface of three Nucleic Acids: The role of RNA-binding proteins and poly(ADP-ribose) in DNA repair // *Acta Naturae*, 2017. Vol. 9, № 2. P. 4-16.

150. Duan, Y., Du, A., Gu, J., Duan, G., Wang, C., Gui, X., Ma, Z., Qian, B., Deng, X., Zhang, K., Sun, L., Tian, K., Zhang, Y., Jiang, H., Liu, C., Fang, Y. PARylation regulates stress granule dynamics, phase separation, and neurotoxicity of disease-related RNA-binding proteins // *Cell Res*, 2019. Vol. 29, № 3. P. 233-247.
151. McGurk, L., Gomes, E., Guo, L., Mojsilovic-Petrovic, J., Tran, V., Kalb, R., Shorter, J., Bonini, N. Poly(ADP-Ribose) Prevents Pathological Phase Separation of TDP-43 by Promoting Liquid Demixing and Stress Granule Localization // *Mol Cell*, 2018. Vol. 71, № 5. P. 703-717.
152. Altmeyer, M., Neelsen, K., Teloni, F., Pozdnyakova, I., Pellegrino, S., Grøfte, M., Rask, M.-J., Streicher, W., Jungmichel, S., Nielsen, M., Lukas, J. Liquid demixing of intrinsically disordered proteins is seeded by poly(ADP-ribose) // *Nat Commun*, 2015. Vol. 6. P. 8088.
153. Singatulina, A., Hamon, L., Sukhanova, M.V., Desforgues, B., Joshi, V., Bouhss, A., Lavrik, O.I., Pastré, D. PARP-1 Activation Directs FUS to DNA Damage Sites to Form PARG-Reversible Compartments Enriched in Damaged DNA // *Cell Rep*, 2019. Vol. 27, № 6. P. 1809-1821.e5.
154. Aguzzi, A., Altmeyer, M. Phase Separation: Linking Cellular Compartmentalization to Disease // *Trends Cell Biol*, 2016. Vol. 26, № 7. P. 547-558.
155. Leung, A. Poly(ADP-ribose): A Dynamic Trigger for Biomolecular Condensate Formation. *Trends Cell Biol*, 2020. Vol. 30, № 5. P. 370-383.
156. Sun, X., Fu, K., Hodgson, A., Wier, E., Wen, M., Kamenyeva, O., Xia, X., Koo, L., Wan, F. Sam68 Is Required for DNA Damage Responses via Regulating Poly(ADP-ribosylation) // *PLoS Biol*, 2016. Vol. 14, № 9. P. e1002543.
157. 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. Vol. 12, № 24. P. 3791-803.
158. Bader, A.G., Vogt, P.K. Inhibition of protein synthesis by Y box-binding protein 1 blocks oncogenic cell transformation // *Mol Cell Biol*, 2005. Vol. 25, № 6. P. 2095-2106.
159. 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. Vol. 32, № 1. P. 316-27.
160. Eliseeva, I.A., Kim, E.R., Guryanov, S.G., Ovchinnikov, L.P., Lyabin, D.N. Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions // *Biochemistry (Moscow)*, 2011. Vol. 76, № 13. P. 1402-1433.
161. Goldstein, J., Pollitt, N.S., Inouye, M. Major cold shock protein of *Escherichia coli* // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. Vol. 87, № 1. P. 283-287.
162. 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 // *Biol Chem*, 1995. Vol. 270, № 7. P. 3186-3192.
163. Bader, A.G., Vogt, P.K. Inhibition of protein synthesis by Y box-binding protein 1 blocks oncogenic cell transformation // *Mol Cell Biol*, 2005. Vol. 25, № 6. P. 2095-2106.
164. 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 U S A*, 1988. Vol. 85, № 19. P. 7322-7326.
165. 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. Vol. 324, № 1. P. 73-87.
166. 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. Vol. 29, № 5. P. 1200-1207.
167. 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 // *Biol Chem*, 2001. Vol. 276, № 48. P. 44841-44847.
168. 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. Vol. 11, № 9. P. 2441-8.
169. Minich, W., Maidebura, I., Ovchinnikov, L.P. Purification and characterization of the major 50-kDa repressor protein from cytoplasmic mRNP of rabbit reticulocytes // *Eur J Biochem*, 1993. Vol. 212, № 3. P. 633-8.
170. Minich, W., Ovchinnikov, L.P. Role of cytoplasmic mRNP proteins in translation // *Biochimie*, 1992. Vol. 74, № 5. P. 477-83.
171. Kossinova, O.A., Gopanenkov, 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 Proteins Proteom*, 2017. Vol. 1865, № 6. P. 664-673.
172. Manival, X., Ghisolfi-Nieto, L., Joseph, G., Bouvet, P., Erard, M. RNA-binding strategies common to cold-shock domain- and RNA recognition motif-containing proteins // *Nucleic Acids Res*, 2001. Vol. 29, № 11. P. 2223-33.
173. Bouvet, P., Matsumoto, K., Wolffe, A. Sequence-specific RNA recognition by the *Xenopus* Y-box proteins. An essential role for the cold shock domain // *J Biol Chem*, 1995. Vol. 270, № 47. P. 28297-303.
174. Matsumoto, K., Meric, F., Wolffe, A. Translational repression dependent on the interaction of the *Xenopus* Y-box protein FRGY2 with mRNA. Role of the cold shock domain, tail domain, and selective RNA sequence recognition // *J Biol Chem*, 1996. Vol. 271, № 37. P. 22706-12.
175. 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. Vol. 19, № 18. P. 4915-4920.
176. 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 // *Biol Chem*, 2001. Vol. 276, № 24. P. 21242-321249.
177. 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 // *Biol Chem*, 2007. Vol. 282, № 39. P. 28474-28484.
178. Pestryakov, P., Zharkov, D.O., Grin, I., Fomina, E.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. Vol. 25, № 4. P. 224-33.
179. 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. Vol. 28, № 2. P. 117-23.
180. Alemasova, E.E., Naumenko, K.N., Moor, N.A., Lavrik, O.I. Y-Box-Binding Protein 1 Stimulates Abasic Site Cleavage // *Biochemistry (Mosc)*, 2017. Vol. 82, № 12. P. 1521-1528.
181. Fomina, E.E., Pestryakov, P.E., Maltseva, E.A., Petruseva, I.O., Kretov, D.A., Ovchinnikov, L.P., Lavrik, O.I. Y-box binding protein 1 (YB-1) promotes detection of DNA bulky lesions by XPC-HR23B factor // *Biochemistry (Mosc)*, 2015. Vol. 80, № 2. P. 219-227.
182. Mordovkina, D., Lyabin, D., Smolin, E., Sogorina, E., Ovchinnikov, L.P., Eliseeva, I. Y-Box Binding Proteins in mRNP Assembly, Translation, and Stability Control // *Biomolecules*, 2020. Vol. 10, № 4. P. 591.
183. Rush, J., Moritz, A., Lee, K.A., Guo, A., Goss, V.L., Spek, E.J., Zhang, H., Zha, X.M., Polakiewicz, R.D., Comb, M.J. Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells // *Nat Biotechnol*, 2005. Vol. 23, № 1. P. 94-101.
184. Cohen, S.B., Ma, W., Valova, V.A., Algie, M., Harfoot, R., Woolley, A.G., Robinson, P.J., Braithwaite, A.W. Genotoxic stress-induced nuclear localization of oncoprotein YB-1 in the absence of proteolytic processing // *Oncogene*, 2010. Vol. 29, № 3. P. 403-410.
185. Jurchott, K., Bergmann, S., Stein, U., Walther, W., Janz, M., Manni, I., Piaggio, G., Fietze, E., Dietel, M., Royer, H.D. YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression // *Biol Chem*, 2003. Vol. 278, № 30. P. 27988-27996.
186. 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. Vol. 417, № 3. P. 390-394.
187. 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 // *Cancer Res*, 2005. Vol. 11, № 24. P. 8837-8844.
188. Stein, U., Jurchott, K., Walther, W., Bergmann, S., Schlag, P.M., Royer, H.D. Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistance-related ABC transporters // *Biol Chem*, 2001. Vol. 276, № 30. P. 28562-28569.
189. Holm, P.S., Bergmann, S., Jurchott, K., Lage, H., Brand, K., Ladhoff, A., Mantwill, K., Curiel, D.T., Dobbstein, M., Dietel, M., Gansbacher, B., Royer, H.D. YB-1 relocates to the nucleus in adenovirus-infected cells and facilitates viral replication by inducing E2 gene expression through the E2 late promoter // *Biol Chem*, 2002. Vol. 277, № 12. P. 10427-10434.
190. Dolfini, D., Mantovani, R. Targeting the Y/CCAAT box in cancer: YB-1 (YBX1) or NF-Y? // *Cell Death Differ*, 2013. Vol. 20, № 5. P. 676-85.
191. Castellana, B., Aasen, T., Moreno-Bueno, G., Dunn, S., Ramón y Cajal, S. Interplay between YB-1 and IL-6 promotes the metastatic phenotype in breast cancer cells // *Oncotarget*, 2015. Vol. 6, № 35. P. 38239-56.
192. Cho, K., Jeong, B., Park, C., Lee, H. The YB-1/EZH2/amphiregulin signaling axis mediates LPA-induced breast cancer cell invasion // *Arch Pharm Res*, 2019. Vol. 42, № 6. P. 519-530.

193. Dahl, E., En-Nia, A., Wiesmann, F., Krings, R., Djudjaj, S., Breuer, E., Fuchs, T., Wild, P., Hartmann, A., Dunn, S., Mertens, P. Nuclear detection of Y-box protein-1 (YB-1) closely associates with progesterone receptor negativity and is a strong adverse survival factor in human breast cancer // *BMC Cancer*, 2009. Vol. 9. P. 410.
194. Lim, J., Nair, S., Shyamasundar, S., Chua, P., Muniyasamy, U., Matsumoto, K., Gunaratne, J., Bay, B. Silencing Y-box binding protein-1 inhibits triple-negative breast cancer cell invasiveness via regulation of MMP1 and beta-catenin expression // *Cancer Lett*, 2019. Vol. 452. P. 119-131.
195. Saji, H., Toi, M., Saji, S., Koike, M., Kohno, K., Kuwano, M. Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human breast carcinoma // *Cancer Lett*, 2003. Vol. 190, № 2. P. 191-7.
196. Wu, J., Lee, C., Yokom, D., Jiang, H., Cheang, M., Yorida, E., Turbin, D., Berquin, I., Mertens, P., Iftner, T., Gilks, C., Dunn, S. Disruption of the Y-box binding protein-1 results in suppression of the epidermal growth factor receptor and HER-2 // *Cancer Res*, 2006. Vol. 66, № 9. P. 4872-9.
197. Nagasu, S., Sudo, T., Kinugasa, T., Yomoda, T., Fujiyoshi, K., Shigaki, T., Akagi, Y. Y box binding protein 1 inhibits apoptosis and upregulates EGFR in colon cancer // *Oncol Rep*, 2019. Vol. 41, № 5. P. 2889-2896.
198. Shibao, K., Takano, H., Nakayama, Y., Okazaki, K., Nagata, N., Izumi, H., Uchiumi, T., Kuwano, M., Kohno, K., Itoh, H. Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase II alpha genes in human colorectal carcinomas // *Int J Cancer*, 1999. Vol. 83, № 6. P. 732-7.
199. Shiraiwa, S., Kinugasa, T., Kawahara, A., Mizobe, T., Ohchi, T., Yuge, K., Fujino, S., Katagiri, M., Shimomura, S., Tajiri, K., Sudo, T., Kage, M., Kuwano, M., Akagi, Y. Nuclear Y-Box-binding Protein-1 Expression Predicts Poor Clinical Outcome in Stage III Colorectal Cancer // *Anticancer Res*, 2016. Vol. 36, № 7. P. 3781-8.
200. Fujiwara-Okada, Y., Matsumoto, Y., Fukushima, J., Setsu, N., Matsuura, S., Kamura, S., Fujiwara, T., Iida, K., Hatano, M., Nabeshima, A., Yamada, H., Ono, M., Oda, Y., Iwamoto, Y. Y-box binding protein-1 regulates cell proliferation and is associated with clinical outcomes of osteosarcoma // *Br J Cancer*, 2013. Vol. 108, № 4. P. 836-47.
201. Oda, Y., Sakamoto, A., Shinohara, N., Ohga, T., Uchiumi, T., Kohno, K., Tsuneyoshi, M., Kuwano, M., Iwamoto, Y. Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma // *Clin Cancer Res*, 1998. Vol. 4, № 9. P. 2273-7.
202. Gao, Y., Fotovati, A., Lee, C., Wang, M., Cote, G., Guns, E., Toyota, B., Faury, D., Jabado, N., Dunn, S. 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. Vol. 8, № 12. P. 3276-84.
203. Sengupta, S., Mantha, A., Mitra, S., Bhakat, 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. Vol. 30, № 4. P. 482-93.
204. Jiang, L., Yuan, G.-L., Liang, Q.-L., Zhang, H.-J., Huang, J., Cheng, S.-A., Peng, X.-X. Positive expression of Y-box binding protein 1 and prognosis in non-small cell lung cancer: a meta-analysis // *Oncotarget*, 2017. Vol. 8, № 33. P. 55613-55621.
205. Shiota, M., Takeuchi, A., Song, Y., Yokomizo, A., Kashiwagi, E., Uchiumi, T., Kuroiwa, K., Tatsugami, K., Fujimoto, N., Oda, Y., Naito, S. Y-box binding protein-1 promotes castration-

- resistant prostate cancer growth via androgen receptor expression // *Endocr Relat Cancer*, 2011. Vol. 18, № 4. P. 505-17.
206. Higashi, K., Inagaki, Y., Fujimori, K., Nakao, A., Kaneko, H., Nakatsuka, I. Interferon-gamma interferes with transforming growth factor-beta signaling through direct interaction of YB-1 with Smad3 // *Biol Chem*, 2003. Vol. 278, № 44. P. 43470-43479.
207. Olsen, J.V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., Mortensen, P., Mann, M. Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks // *Cell*, 2006. Vol. 127, № 3. P. 635-648.
208. Molina, H., Horn, D.M., Tang, N., Mathivanan, S., Pandey, A. Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry // *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. Vol. 104, № 7. P. 2199-2204.
209. Frye, B.C., Halfter, S., Djudjaj, S., Muehlenberg, P., Weber, S., Raffetseder, U., En-Nia, A., Knott, H., Baron, J.M., Dooley, S., Bernhagen, J., Mertens, P.R. Y-box protein-1 is actively secreted through a non-classical pathway and acts as an extracellular mitogen // *EMBO Rep*, 2009. Vol. 10, № 7. P. 783-789.
210. Carter-O'Connell, I., Jin, H., Morgan, R.K., David, L.L., Cohen, M.S. Engineering the substrate specificity of ADP-ribosyltransferases for identifying direct protein targets // *J Am Chem Soc*, 2014. Vol. 136, № 14. P. 5201-4.
211. Zhen, Y., Zhang, Y., Yu, Y. A Cell-Line-Specific Atlas of PARP-Mediated Protein Asp/Glu-ADP-Ribosylation in Breast Cancer // *Cell Rep*, 2017. Vol. 21, № 8. P. 2326-2337.
212. Carter-O'Connell, I., Vermehren-Schmaedick, A., Jin, H., Morgan, R.K., David, L.L., Cohen, M.S. Combining Chemical Genetics with Proximity-Dependent Labeling Reveals Cellular Targets of Poly(ADP-ribose) Polymerase 14 (PARP14) // *ACS Chem Biol*, 2018. Vol. 13, № 10. P. 2841-2848.
213. Ayyappan, V., Wat, R., Barber, C., Vivel, C.A., Gauch, K., Visanpattanasin, P., Cook, G., Sazeides, C., Leung, A.K.L. ADPriboDB 2.0: an updated database of ADP-ribosylated proteins. *Nucleic Acids Res*, 2021. Vol. 49, № D1. P. D261-D265.
214. Swartzlander, D., Bauer, N., Corbett, A., Doetsch, P. Regulation of base excision repair in eukaryotes by dynamic localization strategies // *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2012. Vol. 110. P. 93-121.
215. Rios, J., Puhalla, S. PARP inhibitors in breast cancer: BRCA and beyond // *Oncology (Williston Park)*, 2011. Vol. 25, № 11. P. 1014-25.
216. Klinakis, A., Karagiannis, D., Rampias, T. Targeting DNA repair in cancer: current state and novel approaches // *Cell Mol Life Sci*, 2020. Vol. 77, № 4. P. 677-703.
217. Green, M.R., Sambrook, J. The Inoue Method for Preparation and Transformation of Competent *Escherichia coli*: "Ultracompetent" Cells // *Cold Spring Harb Protoc*, 2020. Vol. 2020, № 6. P. 101196.
218. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature*, 1970. Vol. 227, № 5259. P. 680-5.
219. Ямщиков В. Ф. Методы молекулярной генетики и генной инженерии // под ред. Салганика Р. И. М.: Наука, 1990. – С. 28.
220. Lindahl, T., Andersson, A. Rate of chain breakage at apurinic sites in double-stranded deoxyribonucleic acid // *Biochemistry*, 1972. Vol. 11, № 19. P. 3618-23.

221. Lowary, P.T., Widom, J. New DNA sequence rules for high affinity binding to histone octamer and sequence-directed nucleosome positioning // *J Mol Biol*, 1998. Vol. 276, № 1. P. 19-42.
222. Kutuzov, M.M., Kurgina, T.A., Belousova, E.A., Khodyreva, S.N., Lavrik, O.I. Optimization of nucleosome assembly from histones and model DNAs and estimation of the reconstitution efficiency // *Biopolym Cell*, 2019. Vol. 35. P. 91–98.
223. 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. Vol. 545. P. 91-97.
224. Révet, B., Fourcade, A. Short unligated sticky ends enable the observation of circularised DNA by atomic force and electron microscopies // *Nucleic Acids Res*, 1998. Vol. 26, № 9. P. 2092-7.
225. Potaman, V.N., Shlyakhtenko, L.S., Oussatcheva, E.A., Lyubchenko, Y.L., Soldatenkov, V.A. Specific binding of poly(ADP-ribose) polymerase-1 to cruciform hairpins // *J Mol Biol*, 2005. Vol. 348, № 3. P. 609-15.
226. Sharma, D., De Falco, L., Padavattan, S., Rao, C., Geifman-Shochat, S., Liu, C.F., Davey, C.A. PARP1 exhibits enhanced association and catalytic efficiency with γ H2A.X-nucleosome // *Nat Commun*, 2019. Vol. 10, № 1. P. 5751.
227. Kutuzov, M.M., Belousova, E.A., Kurgina, T.A., Ukraintsev, A.A., Vasil'eva, I.A., Khodyreva, S.N., Lavrik, O.I. The contribution of PARP1, PARP2 and poly(ADP-ribosylation) to base excision repair in the nucleosomal context // *Sci Rep*, 2021. Vol. 11, № 1. P. 4849.
228. 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. Vol. 43, № 1. P. 210-6.
229. Andreini, C., Bertini, I., Cavallaro, G., Holliday, G.L., Thornton, J.M. Metal ions in biological catalysis: from enzyme databases to general principles // *J Biol Inorg Chem*, 2008. Vol. 13, № (8). P. 1205-18.
230. Messner, S., Altmeyer, M., Zhao, H., Pozivil, A., Roschitzki, B., Gehrig, P., Rutishauser, D., Huang, D., Cafilisch, A., Hottiger, M.O. PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails // *Nucleic Acids Res*, 2010. Vol. 38, № 19. P. 6350-62.
231. Curtin, N.J., Szabo, C. Therapeutic applications of PARP inhibitors: anticancer therapy and beyond // *Mol Aspects Med*, 2013. Vol. 34, № 6. P. 1217-56.
232. 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. Vol. 13, № 11. P. 1465-77.
233. Thorsell, A.G., Ekblad, T., Karlberg, T., Löw, M., Pinto, A.F., Trésaugues, L., Moche, M., Cohen, M.S., Schüler, H. Structural Basis for Potency and Promiscuity in Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP) and Tankyrase Inhibitors // *J Med Chem*, 2017. Vol. 60, № 4. P. 1262-1271.
234. Wilson, A.J., Sarfo-Kantanka, K., Barrack, T., Steck, A., Saskowski, J., Crispens, M.A., Khabele, D. Panobinostat sensitizes cyclin E high, homologous recombination-proficient ovarian cancer to Olaparib // *Gynecol Oncol*, 2016. Vol. 143, № 1. P. 143-151.

235. Rolli, V., O'Farrell, M., Ménissier-de Murcia, J., de Murcia, G. Random mutagenesis of the poly(ADP-ribose) polymerase catalytic domain reveals amino acids involved in polymer branching // *Biochemistry*, 1997. Vol. 36, № (40). P. 12147-54.
236. Aberle, L., Krüger, A., Reber, J.M., Lippmann, M., Hufnagel, M., Schmalz, M., Trussina, I.R.E.A., Schlesiger, S., Zübel, T., Schütz, K., Marx, A., Hartwig, A., Ferrando-May, E., Bürkle, A., Mangerich, A. PARP1 catalytic variants reveal branching and chain length-specific functions of poly(ADP-ribose) in cellular physiology and stress response // *Nucleic Acids Res*, 2020. Vol. 48, № 18. P. 10015-10033.

Российская Академия наук
Сибирское отделение
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт химической биологии и фундаментальной медицины

На правах рукописи

Приложение к работе

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

Науменко Константин Николаевич

1.5.3 – молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Научные руководители:

д.х.н., акад. РАН Лаврик Ольга Ивановна

к.б.н. Суханова Мария Владиславовна

Новосибирск 2023

Приложение 1

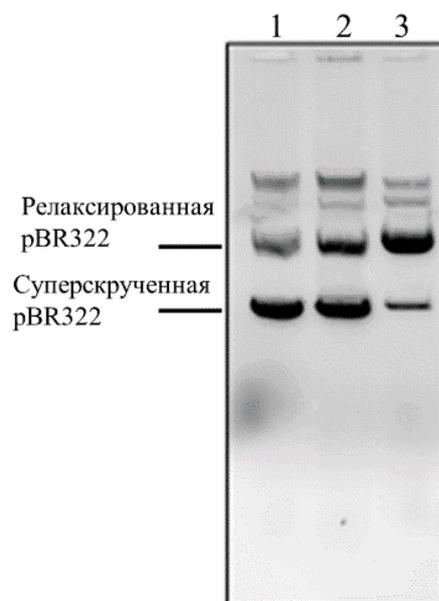


Рис. 1. Электрофоретический анализ плазмиды pBR322, содержащей одноцепочечные разрывы. Дорожка 1: интактная плазмида pBR322, дорожка 2: плазмида pBR322 после обработки цитратом натрия, дорожка 3: плазмида pBR322 после обработки цитратом натрия и Apel.

Приложение 2

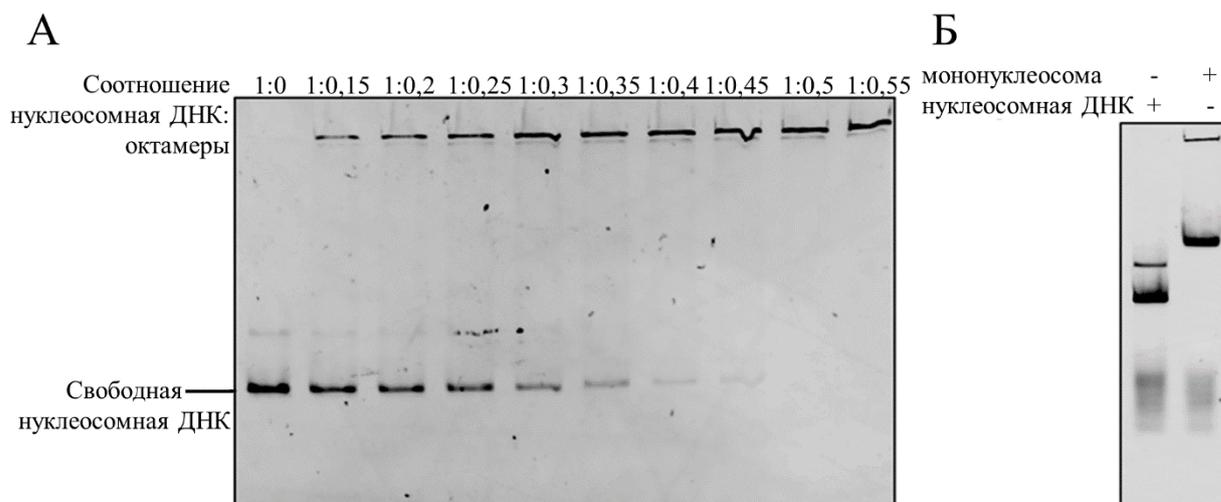


Рис. 2. Сборка мононуклеосомного субстрата.

А: Определение оптимального соотношения коровые гистоны/ДНК для препаративной сборки мононуклеосомы. Электрофоретическая подвижность флуоресцентно меченых продуктов после предварительной сборки мононуклеосомы из нуклеосомной ДНК и октамеров гистонов в соотношениях от 1,00:0,15 до 1,00:0,55 в 4% полиакриламидном геле в неденатурирующих условиях.

Б: Анализ препарата мононуклеосомы после препаративной сборки. Электрофоретическая подвижность флуоресцентно меченых продуктов после предварительной сборки мононуклеосомы из нуклеосомной ДНК и октамеров гистонов в соотношении 1,00:0,45.

Приложение 3

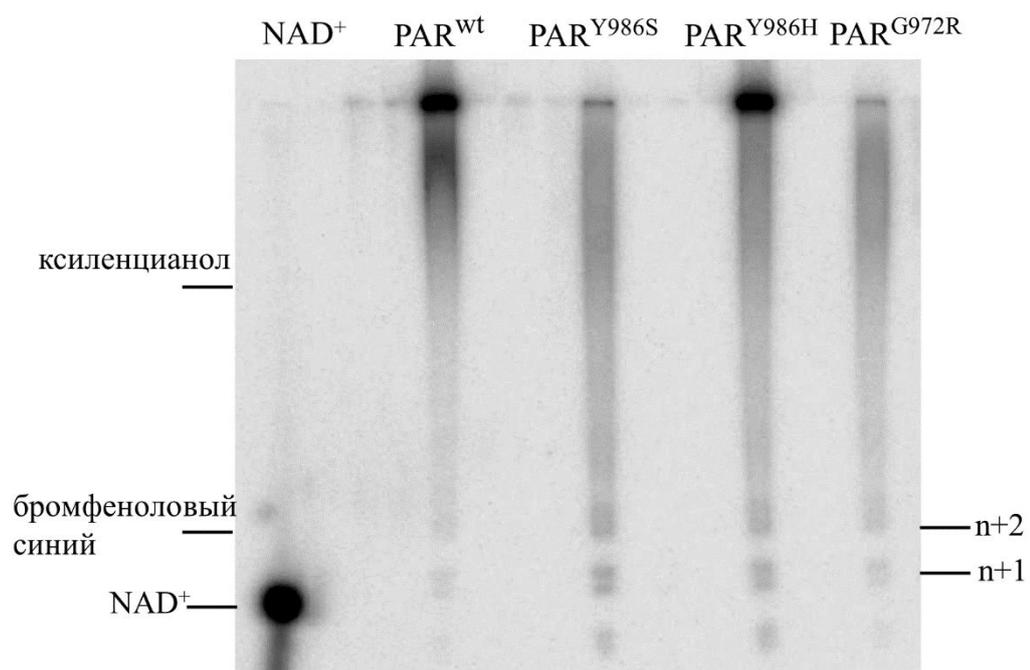


Рис. 3. Радиоавтограф денатурирующего электрофореза, в котором проводилось разделение суммарного полимера ADP-рибозы, полученного после реакции автомодификации PARP1^{wt}, PARP1^{Y986S}, PARP1^{Y986H}, PARP1^{G972R}.

Приложение 4

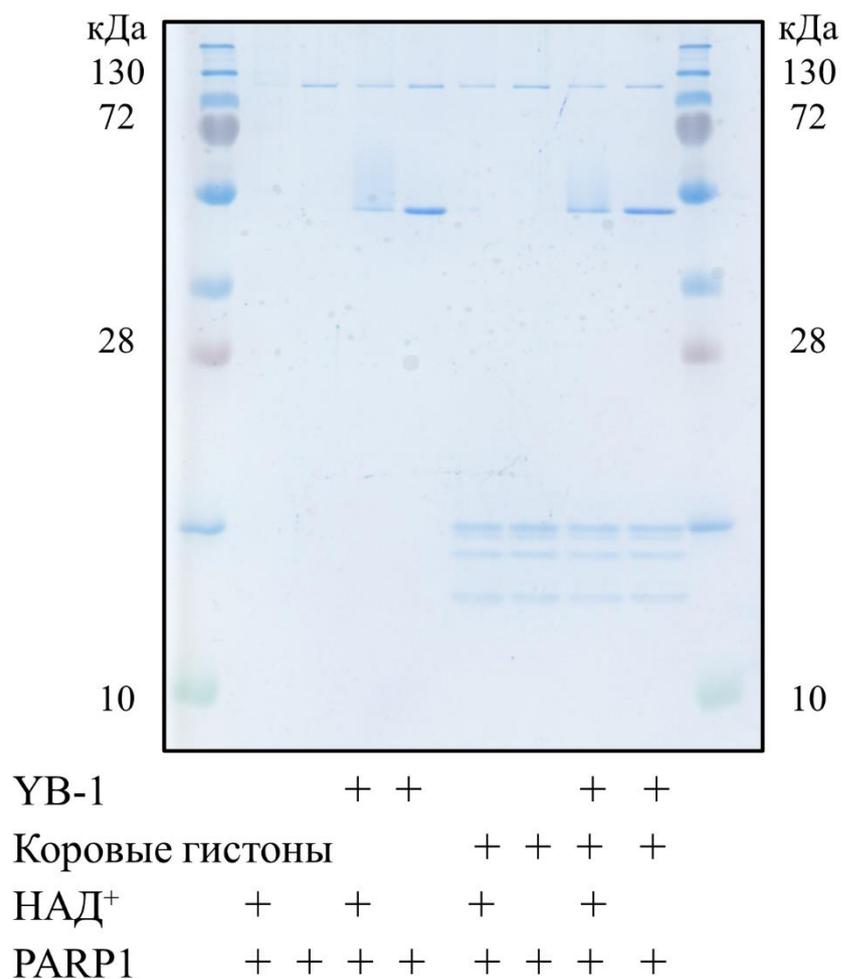


Рис. 4. Анализ активности PARP1 в присутствии YB-1 и коровых гистонов. Анализ продуктов модификации PARP1 методом денатурирующего гель-электрофореза. 10% SDS-ПААГ (окраска Кумасси), в котором проводили разделение продуктов реакции поли(ADP-рибозил)ирования.

Реакционные смеси объемом 10 мкл содержали 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 50 мМ NaCl, 1 мМ ДТТ, 100 нМ PARP1, 100 нМ ДНК (Nick), 10 мМ ЭДТА, 1600 нМ YB-1, 54 мг/л коровых гистонов. Реакцию запускали добавлением NAD⁺ до конечной концентрации 4 мкМ с последующей инкубацией в течение 10 минут при 37°C.