

УДК 577.21

У-ВОХ-СВЯЗЫВАЮЩИЙ БЕЛОК 1 (УВ-1) СПОСОБСТВУЕТ ДЕТЕКЦИИ ОБЪЕМНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК ФАКТОРОМ ХРС-HR23В*

© 2015 Е.Э. Фомина¹, П.Е. Пестряков¹, Е.А. Мальцева¹,
И.О. Петрусева¹, Д.А. Кретов², Л.П. Овчинников²,
О.И. Лаврик^{1,3,4**}

¹ *Институт химической биологии и фундаментальной
медицины СО РАН, 630090 Новосибирск;
электронная почта: lavrik@niboch.nsc.ru*

² *Институт белка РАН, 142290 Пушкино,
Московская область*

³ *Новосибирский государственный университет,
630090 Новосибирск*

⁴ *Алтайский государственный университет,
656049 Барнаул*

Поступила в редакцию 27.08.14
После доработки 10.10.14

Система эксцизионной репарации нуклеотидов (ЭРН) является одним из основных механизмов защиты ДНК клетки от повреждений, вызванных такими значимыми экологическими факторами, как ультрафиолетовое облучение, воздействие полициклических ароматических углеводородов, а также лекарственным воздействием противоопухолевых лекарств, например, препаратов цисплатины. Одним из основных компонентов ЭРН является фактор ХРС-HR23В, выполняющий ключевую роль на этапе узнавания повреждения ДНК. Связывание ХРС-HR23В с ДНК, содержащей разнообразные объемные повреждения, вызывающие нарушения структуры ДНК, являются основой широкой субстратной специфичности рассматриваемой системы репарации. К числу других белковых факторов, обладающих высоким сродством к поврежденной ДНК следует отнести мультифункциональный белок УВ-1. Участие УВ-1 в системе клеточного ответа на генотоксический стресс, его способность к взаимодействию с самым широким спектром поврежденных ДНК, вызывают интерес к его возможному участию и модулированию активности системы ЭРН на стадии узнавания и верификации повреждений. В данной работе были проанализированы функциональные взаимодействия белковых факторов ХРС-HR23В и УВ-1 при связывании с ДНК структурами, моделирующими ДНК, содержащую одиночные объемные повреждения, субстраты ЭРН, а также объемные повреждения в комбинации с апуриновыми/апиримидиновыми сайтами, совместно имитирующими кластерное повреждение. Полученные данные показывают, что белки УВ-1 и ХРС-HR23В способны стимулировать взаимную посадку на ДНК, содержащую объемное или кластерное повреждение, что свидетельствует о вероятном участии УВ-1 в регуляции репарации повреждений ДНК системой ЭРН.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эксцизионная репарация нуклеотидов, объемные повреждения ДНК, кластерные повреждения ДНК, ДНК-белковые комплексы, У-вох-связывающий белок 1 (УВ-1), ХРС-HR23В.

ДНК живой клетки человека постоянно подвергается воздействию экзогенных и эндогенных факторов, вызывающих ее повреждения. К числу основных систем, препятствующих возникновению мутаций посредством эффектив-

ного исправления повреждений, в первую очередь следует отнести эксцизионную репарацию оснований (ЭРО) и эксцизионную репарацию нуклеотидов (ЭРН) [1, 2]. Главная задача ЭРО – исправление повреждений, возникающих в ходе

Принятые сокращения: ЭРН – эксцизионная репарация нуклеотидов; ЭРО – эксцизионная репарация оснований; АП-сайт – апуриновый/апиримидиновый сайт; УВ-1 – У-вох-связывающий белок 1; ХРС – белковый фактор комплементационной группы С пигментной ксеродермы; HR23В – белок человека, гомологичный дрожжевому фактору репарации Rad23.

* Первоначально английский вариант рукописи был опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow), Papers in Press, BM 14-239, 25.01.2015.

** Адресат для корреспонденции.

окислительно-восстановительных реакций, затрагивающих гетероциклические основания молекулы ДНК, таких как спонтанная депуринизация, алкилирование, окисление или восстановление гетероциклических оснований. Субстратами второй системы – ЭРН, в первую очередь являются объемные повреждения, возникающие под действием химических канцерогенов, ультрафиолетового света, и даже некоторых лекарственных препаратов. Интересная особенность системы ЭРН – ее широчайшая субстратная специфичность, заключающаяся в способности исправлять повреждения самой разнообразной химической природы. Такое свойство связано с принципом детекции повреждений, ключевым фактором которой является белковый комплекс ХРС-НР23В, совместно с дополнительными белковыми факторами ХРА, РРА распознающий локальное нарушение двойной спирали ДНК вблизи повреждения [3, 4]. Подтверждением того, что ХРС-НР23В является основным компонентом сенсорно-верификационного ансамбля ЭРН, инициирующим сборку предрасщепляющего комплекса, служат эксперименты на клетках фибробластов человека [4]. Несмотря на ключевую роль ХРС-НР23В в системе ЭРН, ранее было показано, что он также физически взаимодействует с повреждениями ДНК, исправляемыми системой эксцизионной репарации оснований (ЭРО), к числу которых в первую очередь следует отнести апуриновые/апиримидиновые (АП-) сайты [5]. Такие наблюдения могут служить основанием для зачисления фактора ХРС-НР23В в список белков, опосредующих взаимодействие сенсорных компонентов ЭРН и ЭРО. Другим белком, участвующим в непосредственном взаимодействии с поврежденной ДНК, является мультифункциональный Y-бохсвязывающий белок YB-1 [6]. В нормальных условиях YB-1 локализован преимущественно в цитоплазме клетки, однако в условиях генотоксического стресса, вызванного самыми разнообразными факторами, например, УФ-облучением, обработкой митомицином С или цисплатином, большие количества YB-1 переходят в ядро [7–9]. Кроме того, YB-1 обладает повышенным сродством к поврежденной ДНК, содержащей АП-сайты или другие нарушения структуры, связывает одноцепочечную форму ДНК предпочтительнее, чем двухцепочечную [10–12]. Наконец, известно, что YB-1 физически и функционально взаимодействует с ключевыми белками и ферментами ЭРО, такими как АРЕ1, ДНК-полимераза β , ДНК-гликозилазы NEIL2 и NTH1 [7, 13–16]. Особенности внутриклеточной локализации и сеть функциональных взаимодействий позволяет рассматривать

YB-1 в качестве модулирующего компонента репаративных комплексов, обеспечивающего функциональную связь системы ЭРО с другими путями восстановления целостности ДНК. Имеющиеся данные литературы свидетельствуют, что YB-1 участвует в процессе репарации объемных повреждений ДНК, таких как циклобутан-пиримидиновые димеры, *цис*-платиновые аддукты и продукты взаимодействия ДНК с митомицином С [8, 17]. Подобная широкая специфичность как YB-1, так и ХРС-НР23В по отношению к спектру повреждений ДНК позволяет рассматривать белки в качестве участников репарации кластерных повреждений ДНК, состоящих из индивидуальных повреждений различной природы и структуры. В данной работе мы проанализировали возможность взаимодействия YB-1 и ХРС-НР23В с ДНК-структурами, содержащими одновременно такие повреждения, как АП-сайт и остаток флуоресцеина, модулирующий объемное повреждение ДНК.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Белки и олигонуклеотиды. Рекombинантные YB-1 и ХРС-НР23В были выделены и очищены согласно опубликованным протоколам [18, 19]. Рекombинантные АРЕ1 и урацил-ДНК-гликозилаза *E. coli* (Ung) были любезно предоставлены С.Н. Ходыревой (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск). В работе использована полинуклеотидкиназа фага Т4 производства «Биосан» (Россия). Последовательности использованных в работе олигонуклеотидов ODN1, ODN2 («Биосет», Россия) и ODN3 (любезно предоставленные В.Н. Сильниковым, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН) представлены в табл. 1.

Для экспериментов, проведенных методом «задержки в геле», с целью визуализации ДНК цепь ODN1 была 5'-радиоактивно мечена с использованием полинуклеотидкиназы фага Т4 и [γ - 32 P]АТР (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН). Непрореагировавший [γ - 32 P]АТР удаляли из смеси путем гель-фильтрации на колонке MicroSpin G-25 («GE Healthcare Life Sciences», Швеция) согласно протоколу производителя. Для получения дуплексов олигонуклеотид ODN1 гибридизовали с комплементарной цепью ODN2 либо ODN3 в молярном соотношении 1 : 1,2. АП-сайты в ДНК-субстратах получали *in situ* непосредственно перед реакцией, инкубируя урацил-содержащие ДНК-субстраты с Ung (0,15 ед/пмоль ДНК) в течение 20 мин при 37° (условные обоз-

начения полученных дуплексов, а также их схематические изображения представлены в табл. 2).

В экспериментах по флуоресцентному титрованию в качестве репортерной группировки использовался остаток флуоресцеина в составе ДНК-структур (Bulk, AP-Bulk) (длины волн возбуждения и эмиссии флуорофора – 495 и 520 нм соответственно). Измерение анизотропии и интенсивности флуоресценции проводили в планшетах на приборе POLARstar Optima («BMG Labtech», Германия), значения величин, полученные для каждой реакционной смеси на одном шаге сканирования, соответствовало вычисленному среднему значению из 50 измерений прибора. Для повышения достоверности значений применяли режим кинетического сканирования, при котором весь планшет с серией реакционных проб сканировали 10 раз, а потом полученные значения усредняли для каждой экспериментальной пробы в серии.

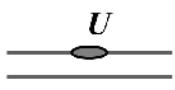
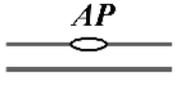
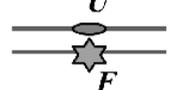
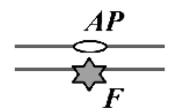
Определение доли активного белка в препаратах УВ-1 и ХРС-HR23В. Термином «активный белок» здесь и далее обозначается белок, способный связывать ДНК, а «суммарная концентрация белка» соответствует концентрации белка в препарате, определенной колориметрически по методу Брэдфорда. Для определения концентрации активного белка в препаратах УВ-1 и ХРС-HR23В было проведено титрование ДНК препаратом анализируемого белка в условиях стехиометрического связывания (предполагаемая концентрация активного белка и концентрация ДНК были не менее чем на порядок выше предполагаемой константы диссоциации комплекса белок-ДНК) согласно методике, описанной в [20]. В случае УВ-1 реакционные смеси (150 мкл) содержали стандартные буферные компоненты (буфер RB – 50 мМ Tris-HCl, 100 мМ NaCl, 5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, 0,6 г/л БСА), анализируемый белок в варьируемой суммарной концентрации и флуорес-

Таблица 1. Обозначения и последовательности олигонуклеотидов

ODN1	5'-STATGGCGAGGCGATTAAGTTGGGUAACGTCAGGGTCTTCCGAACGAC-3'
ODN2	5'-GTCGTTCGGAAGACCCTGACGTTGCCCAACTTAATCGCCTCGCCATAG-3'
ODN3	5'-GTCGTTCGGAAGACCCTGACGTFACCCAACTTAATCGCCTCGCCATAG-3'

Примечание: *U* – остаток 2'-дезоксисуридина; *F* – остаток флуоресцеин-5(6)-карбоксамидокапроил-[5-(3-аминоаллил)-2'-дезоксисуридина].

Таблица 2. Обозначения и структуры двухцепочечных олигонуклеотидов

Условное обозначение	Компоненты ДНК-структур	Обработка Ung	Схематическое изображение
Comp	ODN1 + ODN2	нет	
AP-Comp	ODN1 + ODN2	да	
Bulk	ODN1 + ODN3	нет	
AP-Bulk	ODN1 + ODN3	да	

Примечание: *U* – остаток 2'-дезоксисуридина; *F* – остаток флуоресцеин-5(6)-карбоксамидокапроил-[5-(3-аминоаллил)-2'-дезоксисуридина]; *AP* – АП-сайт.

центно меченую ДНК Bulk в концентрации 197 нМ. Инкубацию (10 мин) и измерение интенсивности и анизотропии флуоресценции реакционных смесей проводили при 25°. Анализ препарата ХРС-НР23В проводили аналогично, за исключением того, что концентрация ДНК-дуплекса Bulk составляла 10^{-8} М.

За связыванием белком флуоресцеинсодержащей ДНК следили по росту анизотропии флуоресценции в серии реакционных смесей, содержащих фиксированное количество ДНК и белок в варьируемой суммарной концентрации. Значение доли ДНК, находящейся в комплексе с активным белком, F_b для индивидуальной реакционной смеси рассчитывали по формуле (1) с учетом поправки на тушение флуорофора в процессе связывания [21]:

$$F_b = (A - A_f) / ((Q_b / Q_f)(A_b - A) + A - A_f), \quad (1)$$

где F_b – доля ДНК в комплексе с активным белком; A – наблюдаемая анизотропия флуоресценции; A_f и A_b – анизотропия флуоресценции свободной ДНК и ДНК, полностью связанной белком соответственно; Q_f и Q_b – удельная интенсивность флуоресценции свободной ДНК и ДНК, полностью связанной белком, соответственно. Измерение параметров A_f , Q_f , A_b и Q_b для полностью свободной и полностью связанной ДНК определяли в сериях из 5 независимых экспериментов и усредняли.

Падение интенсивности флуоресценции при связывании ХРС-НР23В с ДНК оказалось менее 10%, что позволяло принять $Q_f = Q_b$. Таким образом, для расчетов в этом случае формула (1) приобретала вид:

$$F_b = (A - A_f) / (A_b - A_f). \quad (2)$$

В условиях стехиометрического титрования зависимость F_b от суммарной концентрации анализируемого белка в смеси имеет линейный характер с выходом на плато (при достижении значения $F_b = 1$) в точке «эквивалентности», соответствующей полному связыванию заданного количества ДНК и определенной как точка пересечения касательных к линейным участкам графика. Эквиволярное содержание ДНК и активного белка в смеси в точке «эквивалентности» позволяет определить концентрацию активного белка в препарате. В дальнейших экспериментах по изучению комплексообразования УВ-1 и ХРС-НР23В с различными ДНК-структурами под термином «концентрация белка» понимали именно концентрацию активного белка в препаратах УВ-1 и ХРС-НР23В, определенную по вышеописанной методике.

Определение параметров комплексообразования УВ-1 и ХРС-НР23В с флуоресцентными ДНК.

Для определения констант связывания УВ-1 и ХРС-НР23В с флуоресцентно меченой ДНК было проведено титрование ДНК препаратом анализируемого белка в условиях равновесного связывания (концентрации белка и ДНК меньше предполагаемой константы диссоциации комплекса белок-ДНК) согласно методике, описанной в [20]. Реакционные смеси (150 мкл) содержали буфер RB, анализируемый белок (диапазон варьируемых концентраций для УВ-1 составляет от 60 пМ до 375 нМ, для ХРС-НР23В – от 20 пМ до 125 нМ) и флуоресцентно меченую ДНК Bulk или AP-Bulk в концентрации 1,5 или 0,5 нМ (в экспериментах с УВ-1 или ХРС-НР23В соответственно). Инкубацию (10 мин) и измерение интенсивности и анизотропии флуоресценции реакционных смесей проводили при 25°.

За связыванием флуоресцеинсодержащей ДНК белком следили по росту анизотропии флуоресценции по мере увеличения концентрации белка в смеси. Для каждой экспериментальной точки по формулам (1) или (2) рассчитывали значение доли ДНК, находящейся в комплексе с белком, F_b и равновесную концентрацию комплекса ДНК с белком [ДНК*белок] = $F_b * V_0$, где V_0 – общая концентрация ДНК в смеси. Анализ изотерм связывания проводили в рамках модели, предполагающей существование одного сайта связывания белка с ДНК [21], согласно которой

$$[\text{ДНК*белок}] = 1/2 (A_0 + V_0 + K_d + ((A_0 + V_0 + K_d)^2 - 4A_0V_0)^{1/2}), \quad (3)$$

где A_0 и V_0 – общие концентрации активного белка и ДНК, K_d – константа диссоциации комплекса белка с ДНК. Аппроксимация данных титрования уравнением теоретической кривой (3) с определением параметра K_d проводилась методом нелинейной регрессии в программе OriginPro 8.0 («OriginLab», США).

Изучение комплексообразования белков УВ-1 и ХРС-НР23В с ДНК методом «задержки в геле».

Реакционные смеси (5 мкл), содержащие 25 мМ натрия фосфат, pH 7,5, 100 мМ NaCl, 2,5 мМ MgCl₂, 0,5 мМ ЭДТА, 0,1 г/л БСА, 8 нМ радиоактивно меченую ДНК и указанные концентрации исследуемых белков, инкубировали при 37° в течение 5 мин и анализировали с помощью электрофореза в неденатурирующих условиях при напряжении 10 В/см в 7%-ном полиакриламидном геле, уравновешенном 50 мМ Tris-боратным буфером (50 мМ Tris, 50 мМ H₃BO₃, 1 мМ ЭДТА, pH 8,3). Положение радиоактивно мече-

ной ДНК и белок-нуклеиновых комплексов определяли радиоавтографией с использованием прибора FX phosphorimager («BioRad», США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фактор XPC-HR23B является ключевым белком системы распознавания повреждений системы ЭРН. Считается, что именно XPC-HR23B в большинстве случаев отвечает за непосредственный поиск и взаимодействие с ДНК, несущей локальные нарушения в структуре двойной спирали, вызванные, как правило, объемными повреждениями ДНК. В числе других белков, взаимодействующих с характерными субстратами ЭРН, следует отметить другие компоненты этой системы – фактор DDB1-DDB2, специфически взаимодействующий с ДНК, поврежденной УФ-облучением, и белки стадии верификации повреждения – ХРА и РРА, долгое время претендовавшие на роль непосредственных сенсоров повреждений в ДНК [22]. В то же время известно, что некоторые другие белки, традиционно не относящиеся к системе репарации, способны к высокоаффинному связыванию поврежденной ДНК. Одним из наиболее интересных представителей этой группы является мультифункциональный белок YB-1 [6]. Повышенное сродство этого белка к ДНК, обработанной *cis*-платином и УФ-облучением, отмечено в экспериментах *in vitro* [7, 10, 12], а также участие YB-1 в ответе на обработку клеток этими повреждающими агентами *in vivo* [7, 23, 24], привлекает интерес к YB-1 как к дополнительному фактору, модулирующему активность системы ЭРН на этапе детекции повреждений. В настоящей работе функциональное взаимодействие YB-1 с XPC-HR23B было исследовано с использованием ДНК-субстратов, несущих нуклеотидный остаток, модифицированный флуоресцеиновой группировкой. Такая структура олигонуклеотидов позволяет использовать их в качестве модельного субстрата для системы ЭРН, поскольку находящийся в цепи ДНК остаток урацила, модифицированный введением флуоресцеиновой группировки, выступает в роли объемного повреждения [25, 26]. Дополнительно мы использовали ДНК-структуры, несущие одиночный АП-сайт или АП-сайт в комбинации с объемным повреждением, находящимся в противоположной цепи. В последнем случае в структуре олигонуклеотида находились два повреждения (разной химической природы), репарация в клетке которых обычно происходит двумя различными системами – ЭРН и ЭРО.

На первом этапе методом «задержки в геле» было показано, что в используемых условиях формируются два типа комплексов YB-1 с ДНК-структурами, не содержащими объемного повреждения (рис. 1, полосы Y_a и Y_b). Полученные данные можно интерпретировать так, что комплекс с более высокой электрофоретической подвижностью соответствует связыванию одной молекулы YB-1 с ДНК, а второй комплекс – связыванию двух молекул белка. Результаты свидетельствуют о том, что YB-1 обладает более высоким сродством к ДНК, содержащей АП-сайт (рис. 1, б), по сравнению с неповрежденным субстратом (рис. 1, а), что согласуется с данными литературы, свидетельствующими о взаимодействии YB-1 с ДНК-содержащей АП-сайт [11]. Более того, как было показано нами ранее, при формировании такого комплекса взаимодействие аминокислотной группы молекулы белка и альдегидной формы АП-сайта приводит к образованию основания Шиффа [5]. По-видимому, формированием ковалентной связи в этом случае и можно объяснить дополнительную стабилизацию образовавшегося комплекса YB-1 с АП-сайт-содержащей ДНК по сравнению с неповрежденным субстратом [5].

В экспериментах, проведенных с использованием нуклеотидов, моделирующих ДНК, несущую объемное или кластерное повреждение, мы также отметили достаточно высокое сродство YB-1 к таким структурам (рис. 2). Кроме того, было отмечено появление дополнительных белок-нуклеиновых комплексов с более низкой электрофоретической подвижностью (ср. рис. 1 и 2, полосы Y_b). В условиях проделанных экспериментов мы наблюдали тушение флуоресцентного остатка, имитирующего объемное повреждение ДНК, при взаимодействии с белком, что позволяет предположить непосредственное взаимодействие белковой глобулы YB-1 с остатком флуоресцеина. По-видимому, дополнительные сформировавшиеся комплексы отличаются конформацией белка или ДНК от комплексов, детектируемых для олигонуклеотидов, не содержащих объемное повреждение, и вследствие этого могут обладать отличной от них электрофоретической подвижностью. С другой стороны, наблюдаемое явление может быть обусловлено различием в стехиометрии наблюдаемых комплексов за счет связывания третьей и четвертой молекул белка с модельными ДНК. При этом, как свидетельствуют результаты, формирование таких комплексов специфично именно для ДНК, содержащей аналог объемного или кластерного повреждения.

В использованных условиях фактор XPC-HR23B так же, как и YB-1, эффективно связыва-

вался со всеми модельными ДНК, использованными в работе (рис. 3 и 4). В ходе проведения экспериментов были детектированы, по край-

ней мере, два типа белок-нуклеиновых комплексов (рис. 3 и 4, полосы X_a и X_b), образуемых ХРС-HR23В со всеми использованными олиго-

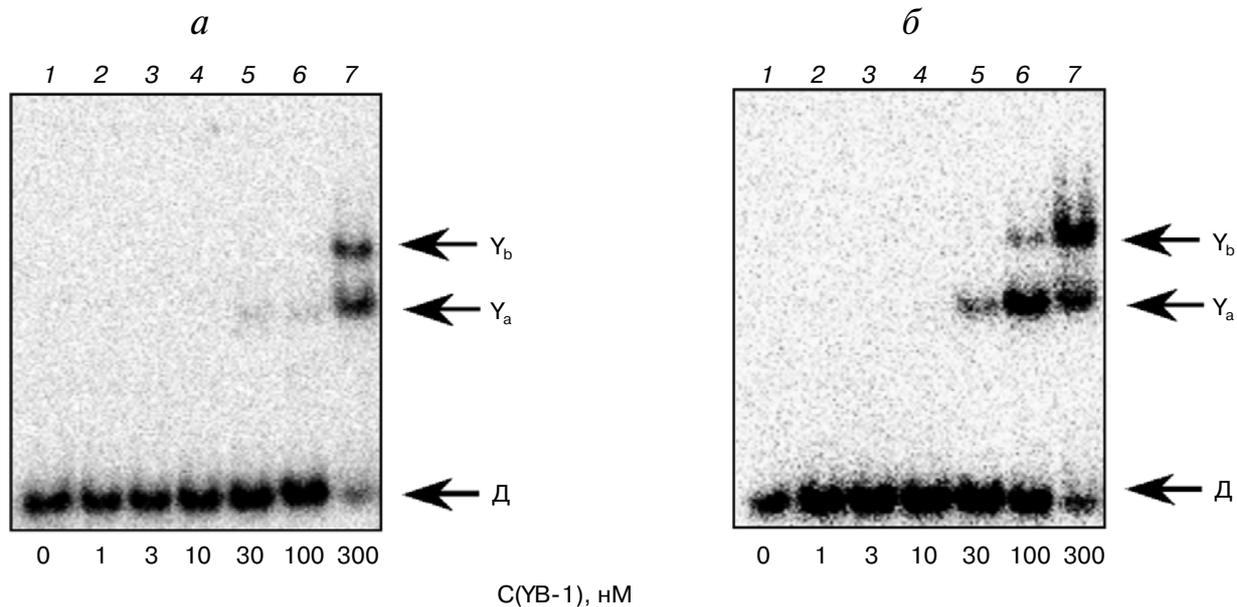


Рис. 1. Образование комплексов белка YB-1 с ДНК-структурами Comr (*a*) и AP-Comr (*b*). Представлены радиоавтографы разделения продуктов реакции в 7%-ном неденатурирующем ПААГ. Y_a , Y_b – комплексы YB-1 с ДНК; Д – свободная ДНК. Реакционные смеси (5 мкл) содержали стандартные компоненты реакционного буфера, 8 нМ радиоактивно меченую ДНК Comr (*a*) или AP-Comr (*b*), а также YB-1 в концентрациях, указанных под рис.

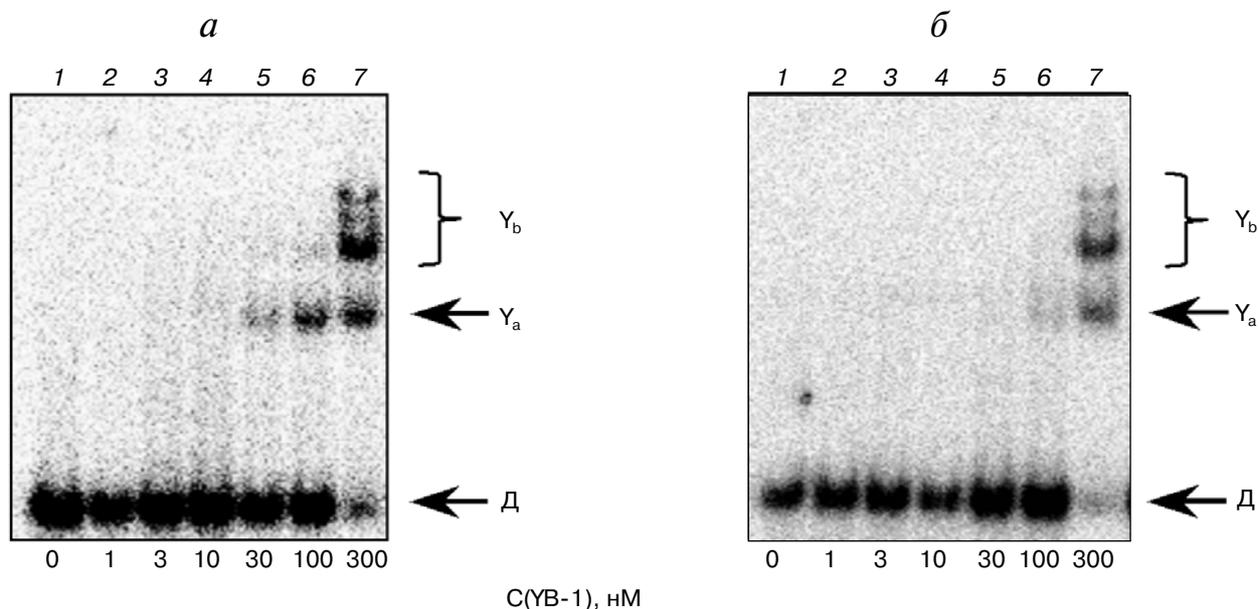


Рис. 2. Образование комплексов белка YB-1 с ДНК-структурами Bulk (*a*) и AP-Bulk (*b*). Представлены радиоавтографы разделения продуктов реакции в 7%-ном неденатурирующем ПААГ. Y_a , Y_b – комплексы YB-1 с ДНК; Д – свободная ДНК. Реакционные смеси (5 мкл) содержали стандартные компоненты реакционного буфера, 8 нМ радиоактивно меченую ДНК Bulk (*a*) или AP-Bulk (*b*), а также YB-1 в концентрациях, указанных под рис.

нуклеотидами, которые могут отличаться как стехиометрией связывания белка с ДНК, так и различиями в их конформации в формирующемся комплексе. Исследование взаимодействия индивидуальных белков с использованными ДНК-структурами позволяет в целом го-

ворить о более высокой ДНК-связывающей активности ХРС-HR23В по сравнению с УВ-1, что следует из сравнения концентрации того и другого белка, требуемой для связывания одинакового количества ДНК в одинаковых реакционных условиях (ср. рис. 1 и 3, а также рис. 2 и 4).

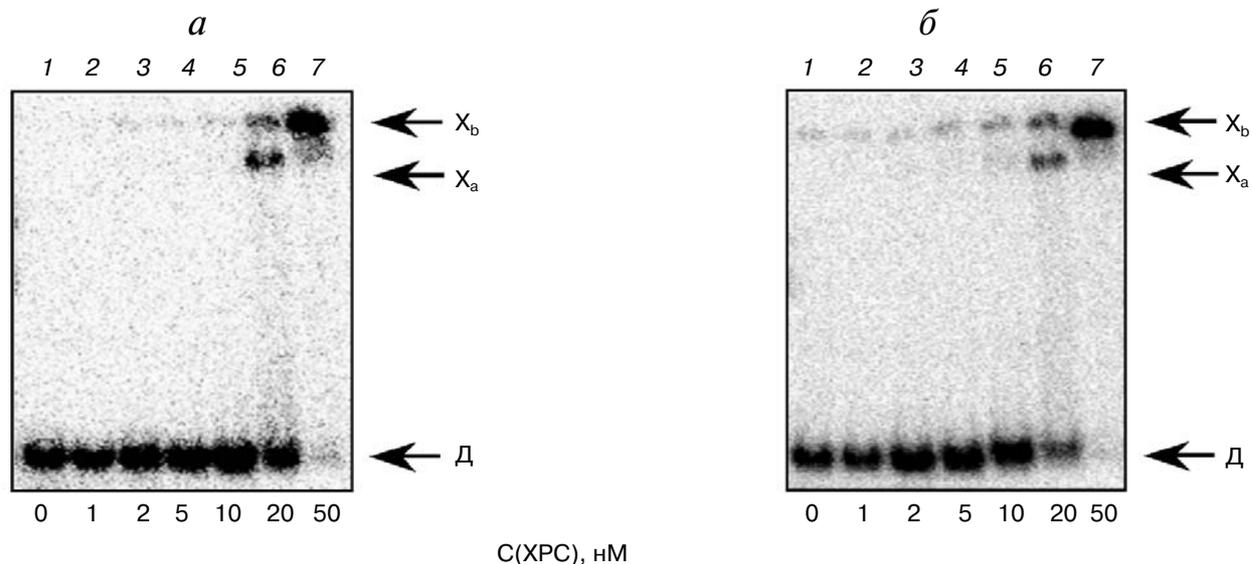


Рис. 3. Образование комплексов белка ХРС-HR23В с ДНК-структурами Comr (а) и AP-Comr (б). Представлены радиоавтографы разделения продуктов реакции в 7%-ном неденатурирующем ПААГ. X_a, X_б – комплексы ХРС-HR23В с ДНК; Д – свободная ДНК. Реакционные смеси (5 мкл) содержали стандартные компоненты реакционного буфера, 8 нМ радиоактивно меченую ДНК Comr (а) или AP-Comr (б), а также ХРС-HR23В в концентрациях, указанных под рис.

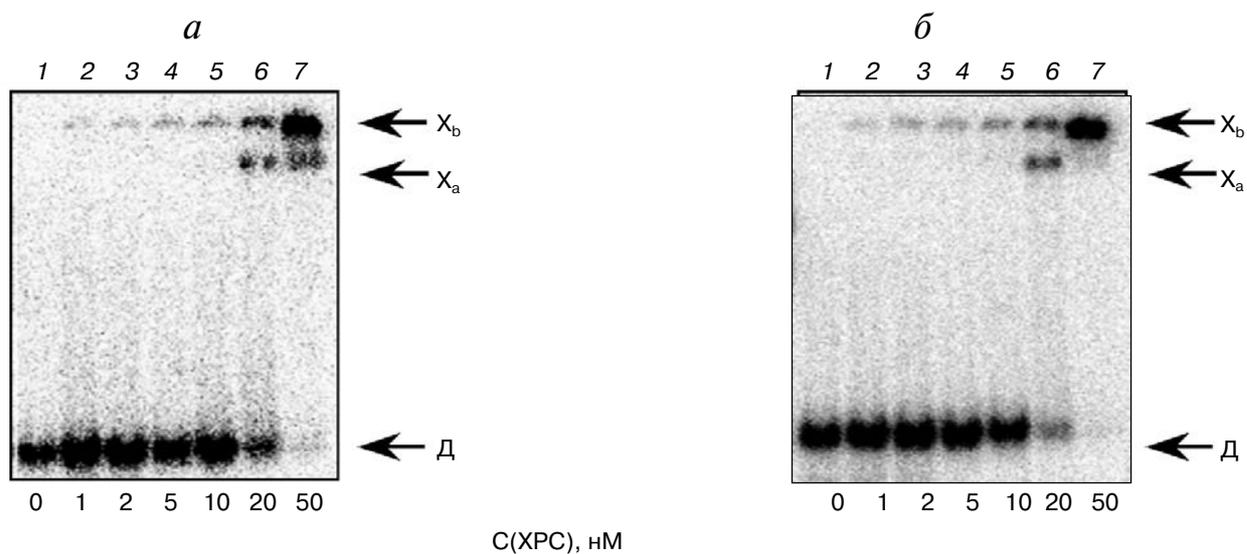


Рис. 4. Образование комплексов белка ХРС-HR23В с ДНК-структурами Bulk (а) и AP-Bulk (б). Представлены радиоавтографы разделения продуктов реакции в 7%-ном неденатурирующем ПААГ. X_a, X_б – комплексы ХРС с ДНК; Д – свободная ДНК. Реакционные смеси (5 мкл) содержали стандартные компоненты реакционного буфера, 8 нМ радиоактивно меченую ДНК Bulk (а) или AP-Bulk (б), а также ХРС-HR23В в концентрациях, указанных под рис.

Данное предположение было проверено для флуоресцеинсодержащих ДНК-структур методом флуоресцентного титрования. Вычисленные из изотерм связывания белков с ДНК-субстратами значения констант диссоциации комплексов представлены в табл. 3. Как видно, оба белка обладают очень низкими значениями констант диссоциации комплексов с ДНК, содержащей единичный аналог объемного повреждения, что вполне достаточно для эффективного взаимодействия с такой ДНК на этапе поиска повреждения в ДНК. Эксперименты по определению констант диссоциации комплексов белков с ДНК, имитирующей кластерное повреждение ДНК, увенчались успехом только для YB-1. Высокая приборная погрешность работы в указанном диапазоне не позволила достоверно количественно охарактеризовать взаимодействие XPC-HR23В с «кластерно-поврежденной» ДНК, однако, предварительный анализ изотерм связывания показал, что ожидаемое значение константы диссоциации для таких комплексов будет еще ниже, чем для ДНК, содержащей одиночный «объемный» аддукт. В отличие от XPC-HR23В сродство YB-1 к ДНК AP-Bulk оказалось ниже, чем для Bulk. Таким образом, несмотря на низкие значения констант диссоциации для комплексов рассматриваемых белков с поврежденными ДНК, следует сказать о заметных различиях во взаимодействии. В соответствии с устоявшейся точкой зрения, на стадии детекции повреждения системой NER XPC-HR23В исполняет роль сенсора областей двойной спирали ДНК, существенно дестабилизированных наличием повреждений [3]. Подобный эффект ранее наблюдался в случае, когда в модельную ДНК рядом с аналогом объемного повреждения вводили неканоническую пару нуклеотидов [25]. Наличие АП-сайта, по-видимому, также вносит дополнительные возмущения в структуру ДНК, что и отражается в уменьшении константы диссоциации соответствующих комплексов. С другой стороны, взаимодействие YB-1 с рассматриваемыми структурами и индивидуальными повреждениями в составе кластера носит, по-видимому, другой характер, что находит отражение в относительном снижении сродства белка к кластерному повреждению. Таким образом, и с точки зрения абсолютного значения констант связывания с флуоресцеинсодержащей ДНК, и с точки зрения универсальности взаимодействия с дуплекс-дестабилизированными участками ДНК, XPC-HR23В имеет преимущество перед YB-1, что вполне согласуется с его ключевой ролью в системе детекции повреждений, исправляемых по пути ЭРН.

Таблица 3. Значение констант диссоциации комплексов XPC и YB-1 с ДНК, имитирующей объемное повреждение

Модельная ДНК	Белок	Константа диссоциации комплекса, нМ
Bulk	YB-1	$1,25 \pm 0,17$
Bulk	XPC-HR23B	$0,297 \pm 0,50$
AP-Bulk	YB-1	$2,09 \pm 0,16$
AP-Bulk	XPC-HR23B	н.и.

Примечание: н.и. — не измерена.

Для определения функциональных взаимодействий между факторами YB-1 и XPC-HR23В нами были проведены эксперименты, в которых связывание XPC-HR23В с ДНК Bulk, содержащей объемное повреждение, происходило в отсутствие (рис. 5, а) или в присутствии 10 нМ (рис. 5, б), 100 нМ (рис. 5, в) или 300 нМ (рис. 5, г) YB-1. Анализ результатов показывает, что в условиях, когда присутствие 10 нМ YB-1 в реакционной смеси не приводит непосредственно к формированию комплексов YB-1 с ДНК (см. рис. 5, б, дорожка 1), белок, однако, стимулирует образование комплексов XPC-HR23В • Bulk (полосы X_а, X_б, для ср. рис 5, а и б, дорожки 5 и б). Более высокие концентрации YB-1 (100 и 300 нМ) приводили к формированию комплексов YB-1 с ДНК разной электрофоретической подвижностью (рис. 5, в и г, комплексы Y_а и Y_б), которые не образуются в тех же условиях без XPC-HR23В (для ср. рис. 5, в, дорожки 1 и 5, б), что говорит о стимулировании ДНК-связывающей активности YB-1 белком XPC-HR23В. В этих же условиях можно предположить также формирование тройного комплекса XPC-HR23В • YB-1 • ДНК (полосы Z_а), который в используемых условиях разделения продуктов реакции не отличим по подвижности от комплексов XPC-HR23В • ДНК (X_б). В присутствии 100 и 300 нМ YB-1 полосы указанной электрофоретической подвижности возникают при существенно меньшей концентрации XPC-HR23В в реакционной смеси, чем в отсутствие YB-1 (для ср. рис. 5, а, дорожка 7, рис. 5, в, дорожка б и рис. 5, г, дорожка 3). Аналогичные результаты были получены и для ДНК-структуры, содержащей кластерное повреждение AP-Bulk (данные не приведены).

Таким образом, полученные данные показывают, что белки YB-1 и XPC-HR23В обладают высоким сродством к ДНК, содержащим аналог «объемного» повреждения ДНК, и, кроме того,

способны стимулировать взаимную посадку на ДНК, содержащую объемное или кластеризованное повреждение. Природа такого влияния может быть обусловлена физическим взаимодействием между факторами YB-1 и XPC-HR23B, результатом которого является сформированный белок-белковый комплекс, более эффективно распознающий повреждение ДНК. Другим объяснением может служить взаимовлияние, опосредованное белок-нуклеиновыми взаимодействиями, в пользу чего свидетельствуют

значения констант диссоциации комплексов YB-1 и XPC-HR23B с поврежденной ДНК, лежащие в наномолярном и субнаномолярном диапазонах. В ходе таких взаимодействий один из белков, связываясь с ДНК индивидуально, изменяет либо свою конформацию, либо конформацию ДНК-лиганда на более предпочтительную для стабильного связывания другого белка. При этом в ряде случаев первый белок вытесняется из тройного комплекса за счет конкуренции за ДНК-лиганд. Описанные взаимодей-

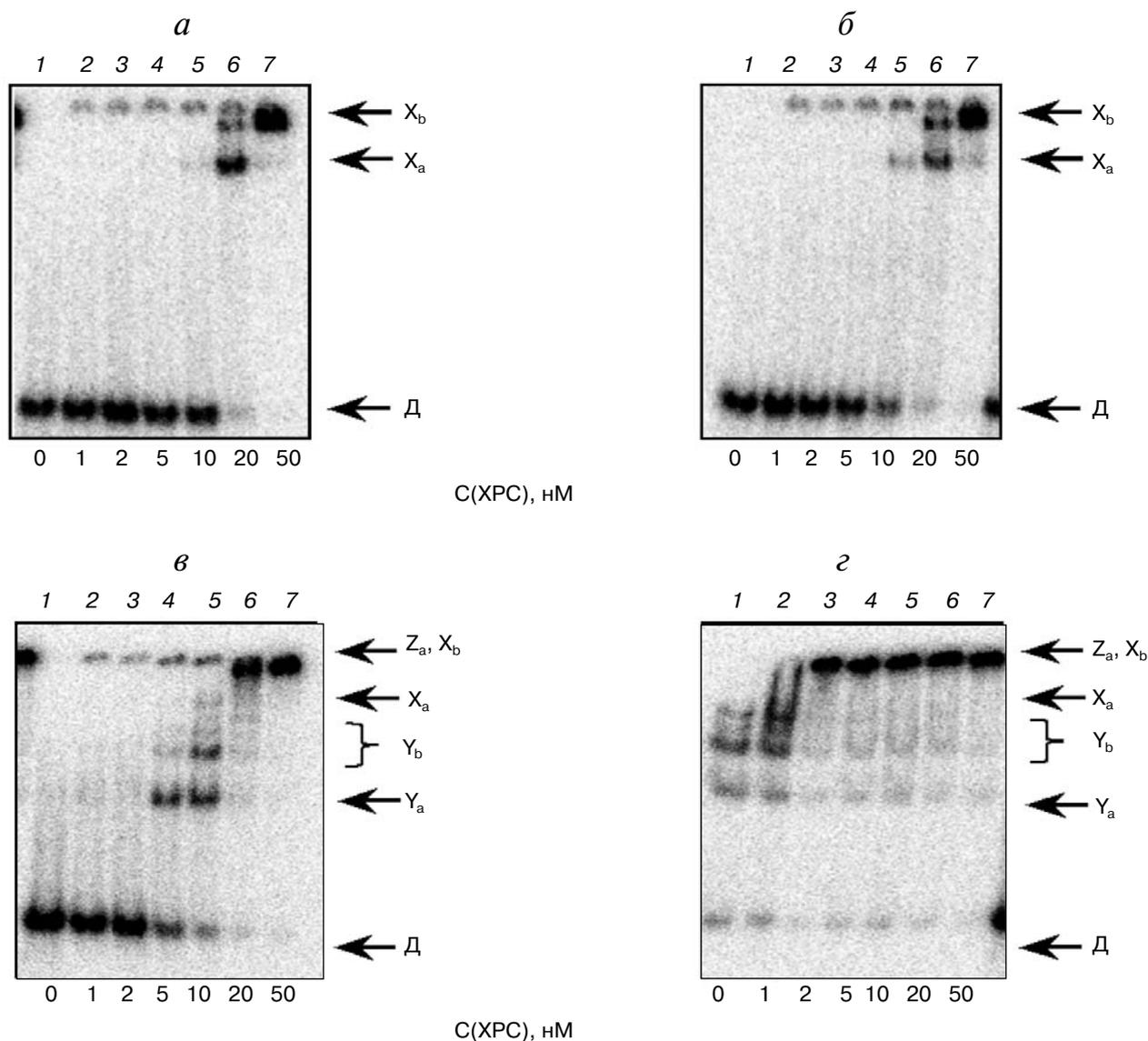


Рис. 5. Связывание XPC-HR23B с ДНК-структурой Bulk в отсутствие (*a*) и в присутствии различающихся концентраций YB-1 (*б, в, г*). Представлены радиоавтографы разделения продуктов реакции в 7%-ном неденатурирующем ПААГ. X_a, X_b – комплексы XPC-HR23B с ДНК; Y_a, Y_b – комплексы YB-1 с ДНК; Д – свободная ДНК. Реакционные смеси (5 мкл) содержали стандартные компоненты реакционного буфера, 8 нМ радиоактивно меченую ДНК Bulk, YB-1 в концентрациях 0 нМ (*a*), 10 нМ (*б*), 100 нМ (*в*), 300 нМ (*г*), а также XPC-HR23B в концентрациях, указанных под рис.

ствия приводят к своеобразной передаче ДНК-лиганда от белка к белку в ходе процесса репарации, аналогично тому, как основана передача поврежденной ДНК от стадии первичного узнавания повреждений к стадии его верификации в системе NER [3, 27]. Обнаруженная способность мультифункционального белка YB-1 влиять на ключевой фактор начальных этапов NER — XPC-HR23В, наряду со способностью YB-1 непосредственно взаимодействовать с поврежденными ДНК и компонентами белковых ансамблей [6, 12, 28], участвующих в других путях репарации, позволяет говорить о вероятной модулирующей роли YB-1 в регуляции нескольких процессов репарации между собой. К числу таких процессов, несомненно, следует отнести

процессы эксцизионной репарации оснований, репарации неканонических пар нуклеотидов и негомологичного соединения концов [7, 15, 16], что позволяет говорить о решающей роли YB-1 в системах, связанных с сохранением целостности и реализации генетической информации.

Авторы выражают благодарность Каору Сугасаве (Kaoru Sugawara, Biosignal Research Center, Kobe University, Kobe, Japan) за предоставление рекомбинантных ДНК, кодирующих субъединицы XPC и HR23В.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант 14-24-00038) и РНФ (грант 14-04-00268).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lindahl, T., and Wood, R.D. (1999) Quality Control by DNA Repair, *Science*, **286**, 1897–1905.
- Scharer, O.D. (2003) Chemistry and biology of DNA repair, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **42**, 2946–2974.
- Sugasawa, K., Okamoto, T., Shimizu, Y., Masutani, C., Iwai, S., and Hanaoka, F. (2001) A multistep damage recognition mechanism for global genomic nucleotide excision repair, *Genes Dev.*, **15**, 507–521.
- Völker, M., Mone, M.J., Karmakar, P., Van Hoffen, A., Schul, W., Vermeulen, W., Hoeijmakers, J.H.J., Van Driel, R., Van Zeeland, A.A., and Mullenders, L.H.F. (2001) Sequential assembly of the nucleotide excision repair factors *in vivo*, *Mol. Cell*, **8**, 213–224.
- 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., and Lavrik, O.I. (2012) Effect of the multifunctional proteins RPA, YB-1, and XPC repair factor on AP site cleavage by DNA glycosylase NEIL1, *J. Mol. Recognit.*, **25**, 224–233.
- Eliseeva, I.A., Kim, E.R., Guryanov, S.G., Ovchinnikov, L.P., and Lyabin, D.N. (2011) Y-box-binding protein 1 (YB-1) and its functions, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 1402–1433.
- Das, S., Chattopadhyay, R., Bhakat, K.K., Boldogh, I., Kohno, K., Prasad, R., Wilson, S.H., and Hazra, T.K. (2007) Stimulation of NEIL2-mediated oxidized base excision repair via YB-1 interaction during oxidative stress, *J. Biol. Chem.*, **282**, 28474–28484.
- Cohen, S.B., Ma, W., Valova, V.A., Algie, M., Harfoot, R., Woolley, A.G., Robinson, P.J., and Braithwaite, A.W. (2010) Genotoxic stress-induced nuclear localization of oncoprotein YB-1 in the absence of proteolytic processing, *Oncogene*, **29**, 403–410.
- Koike, K., Uchiumi, T., Ohga, T., Toh, S., Wada, M., Kohno, K., and Kuwano, M. (1997) Nuclear translocation of the Y-box binding protein by ultraviolet irradiation, *FEBS Lett.*, **417**, 390–394.
- Gaudreault, I., Guay, D., and Lebel, M. (2004) 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.*, **32**, 316–327.
- Hasegawa, S.L., Doetsch, P.W., Hamilton, K.K., Martin, A.M., Okenquist, S.A., Lenz, J., and Boss, J.M. (1991) DNA binding properties of YB-1 and dbpA: binding to doublestranded, single-stranded, and abasic site containing DNAs, *Nucleic Acids Res.*, **19**, 4915–4920.
- Ise, T., Nagatani, G., Imamura, T., Kato, K., Takano, H., Nomoto, M., Izumi, H., Ohmori, H., Okamoto, T., Ohga, T., Uchiumi, T., Kuwano, M., and Kohno, K. (1999) Transcription factor Y-box binding protein 1 binds preferentially to cisplatin-modified DNA and interacts with proliferating cell nuclear antigen, *Cancer Res.*, **59**, 342–346.
- Marenstein, D.R., Ocampo, M.T., Chan, M.K., Altamirano, A., Basu, A.K., Boorstein, R.J., Cunningham, R.P., and Teebor, G.W. (2001) Stimulation of human endonuclease III by Y box-binding protein 1 (DNA-binding protein B). Interaction between a base excision repair enzyme and a transcription factor, *J. Biol. Chem.*, **276**, 21242–21249.
- Chattopadhyay, R., Das, S., Maiti, A.K., Boldogh, I., Xie, J., Hazra, T.K., Kohno, K., Mitra, S., and Bhakat, K.K. (2008) Regulatory role of human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in YB-1-mediated activation of the multidrug resistance gene MDR1, *Mol. Cell Biol.*, **28**, 7066–7080.
- Prasad, R., Williams, J.G., Hou, E.W., and Wilson, S.H. (2012) Pol β associated complex and base excision repair factors in mouse fibroblasts, *Nucleic Acids Res.*, **40**, 11571–11582.
- Kim, E.R., Selyutina, A.A., Buldakov, I.A., Evdokimova, V., Ovchinnikov, L.P., and Sorokin, A.V. (2013) The proteolytic YB-1 fragment interacts with DNA repair machinery and enhances survival during DNA damaging stress, *Cell Cycle*, **12**, 3791–3803.
- Ohga, T., Koike, K., Ono, M., Makino, Y., Itagaki, Y., Tanimoto, M., Kuwano, M., and Kohno, K. (1996) Role of the human Y box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mitomycin C, and ultraviolet light, *Cancer Res.*, **56**, 4224–4228.
- Silivanova, O.M., Guryanov, S.G., Enin, G.A., Skabkin, M.A., Ovchinnikov, L.P., and Serdyuk, I.N. (2010) YB-1 is capable of forming extended nanofibrils, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 115–120.

19. Nishi, R., Okuda, Y., Watanabe, E., Mori, T., Iwai, S., Masutani, C., Sugawara, K., and Hanaoka, F. (2005) Centrin 2 stimulates nucleotide excision repair by interacting with xeroderma pigmentosum group C protein, *Mol. Cell Biol.*, **25**, 5664–5674.
20. Kim, C., Paulus, B.F., and Wold, M.S. (1994) Interactions of human replication protein A with oligonucleotides, *Biochemistry*, **33**, 14197–14206.
21. Lundblad, J.R., Lurance, M., and Goodman, R.H. (1996) Fluorescence polarization analysis of protein-DNA and protein-protein interactions, *Mol. Endocrinol.*, **10**, 607–612.
22. Rechkunova, N.I., Krasikova, Y.S., and Lavrik, O.I. (2011) Nucleotide excision repair: DNA damage recognition and preincision complex assembly, *Biochemistry (Moscow)*, **76**, 24–35.
23. Ohga, T. (1998) Direct Involvement of the Y-box Binding Protein YB-1 in Genotoxic Stress-induced Activation of the Human Multidrug Resistance 1 Gene, *J. Biol. Chem.*, **273**, 5997–6000.
24. Yahata, H., Kobayashi, H., Kamura, T., Amada, S., Hirakawa, T., Kohno, K., Kuwano, M., and Nakano, H. (2002) Increased nuclear localization of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **128**, 621–626.
25. Krasikova, Y.S., Rechkunova, N.I., Maltseva, E.A., Petrusseva, I.O., Silnikov, V.N., Zatsepina, T.S., Oretskaya, T.S., Scharer, O.D., and Lavrik, O.I. (2008) Interaction of nucleotide excision repair factors XPC-HR23B, XPA, and RPA with damaged DNA, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 886–896.
26. Krasikova, Y.S., Rechkunova, N.I., Maltseva, E.A., Petrusseva, I.O., and Lavrik, O.I. (2010) Localization of xeroderma pigmentosum group A protein and replication protein A on damaged DNA in nucleotide excision repair, *Nucleic Acids Res.*, **38**, 8083–8094.
27. Maria Berra, C., de Oliveira, C.S., Machado Garcia, C.C., Reily Rocha, C.R., Koch Lerner, L., de Andrade Lima, L.C., da Silva Baptista, M., and Martins Menck, C.F. (2013) Nucleotide excision repair activity on DNA damage induced by photoactivated methylene blue, *Free Radic Biol. Med.*, **61C**, 343–356.
28. De Souza-Pinto, N.C., Mason, P.A., Hashiguchi, K., Weissman, L., Tian, J., Guay, D., Lebel, M., Stevnsner, T.V., Rasmussen, L.J., and Bohr, V.A. (2009) Novel DNA mismatch-repair activity involving YB-1 in human mitochondria, *DNA Repair (Amsterdam)*, **8**, 704–719.

Y-BOX BINDING PROTEIN 1 (YB-1) PROMOTES DETECTION OF DNA BULKY LESIONS BY XPC-HR23B FACTOR

**E. E. Fomina¹, P. E. Pestryakov¹, E. A. Maltseva¹,
I. O. Petrusseva¹, D. A. Kretov², L. P. Ovchinnikov²,
O. I. Lavrik^{1,3,4*}**

¹ *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine,
Siberian Division, Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk 630090, Russia; fax: +7(383)363-5153,
E-mail: lavrik@niboch.nsc.ru*

² *Institute for Protein Research, Russian Academy of Sciences,
Pushchino 142290, Moscow region, Russia*

³ *Novosibirsk State University, Novosibirsk 630090, Russia*

⁴ *Altai State University, Barnaul 656049, Russia*

Received July 27, 2014

Revision received October 10, 2014

Nucleotide excision repair (NER) is one of the main mechanisms protecting cellular DNA from lesions caused by such significant environmental factors as UV irradiation, exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, and medical treatment by several antitumor drugs, e.g. cisplatin. One of the major NER components is XPC-HR23B, the key factor during the damage recognition step of repair. Binding of XPC-HR23B to DNAs that contain different bulky lesions impairing the structure of DNA are the basis for the wide substrate specificity of this DNA repair pathway. Multifunctional protein YB-1 is among the other protein factors that has high affinity towards damaged DNA. YB-1 is involved in the cellular response to genotoxic stress, possess the ability to interact with damaged DNA harboring lesions of various origin, which pinpoints its putative involvement as a modulatory factor in DNA damage recognition and verification steps of NER. In the present work, we assayed functional interactions of protein factors XPC-HR23B and YB-1 upon binding to DNA structures mimicking damaged DNA containing single bulky lesions as substrates of NER, and bulky lesions combined with abasic sites as an example of clustered lesions. The results indicate that YB-1 and XPC-HR23B stimulate each other in binding to DNA containing bulky or clustered lesions, which suggests the involvement of YB-1 in the regulation of the NER mechanism of DNA repair.

Key words: nucleotide excision repair, bulky DNA lesions, clustered DNA lesions, DNA–protein complexes, Y-box binding protein 1 (YB-1), XPC-HR23B