

УДК 577.21

# Белок CG9890 с доменами цинковых пальцев – новый компонент ENY2-содержащих комплексов дрозophilы

Н. А. Фурсова, Ю. В. Николенко, Н. В. Сошникова, М. Ю. Мазина, Н. Е. Воробьева, А. Н. Краснов\*

Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

\*E-mail: krasnov@genebiology.ru

Поступила в редакцию 18.05.2018

Принята к печати 28.09.2018

**РЕФЕРАТ** Ранее мы показали, что инсуляторный белок Su(Hw), содержащий домен цинковых пальцев, взаимодействует с ENY2 и привлекает ENY2-содержащие комплексы на Su(Hw)-зависимые инсуляторы дрозophilы, участвуя одновременно в регуляции транскрипции и позиционировании ориджинов репликации. В данной работе обнаружено, что ENY2 взаимодействует еще с одним белком – CG9890, который также содержит домен цинковых пальцев. Подтверждено взаимодействие ENY2 и CG9890. Показано, что белок CG9890 локализован в клеточном ядре и взаимодействует с белковыми комплексами SAGA, ORC, dSWI/SNF, TFIID, TPO.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ENY2, CG9890, дрозophilа, иммунопреципитация, цинковые пальцы.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** AMEX – комплекс экспорта мРНК из ядра в цитоплазму; ENY2 – enhancer of yellow 2; C2H2 – цинковые пальцы типа C2H2; SAGA – гистон-ацетилтрансферазный комплекс; SWI/SNF – комплекс ремоделирования хроматина; ORC – комплекс позиционирования точек начала репликации в геноме.

## ВВЕДЕНИЕ

Регуляция экспрессии генов эукариот – комплексный многофакторный процесс, который может происходить на нескольких последовательных этапах транскрипции (инициация и элонгация), процессинга мРНК, экспорта мРНК из ядра, трансляции и фолдинга белков [1]. Локальная структура хроматина, положение гена относительно функциональных ядерных компартментов и дальние взаимодействия регуляторных элементов являются дополнительным уровнем регуляции генетических процессов в контексте сложной организации генома эукариот в трехмерном пространстве ядра [2–4]. Белок ENY2 – мультифункциональный фактор, участвующий в различных стадиях экспрессии генов [5–15]. Разнообразные клеточные функции ENY2 определяются активностями тех белковых комплексов, в составе которых он обнаруживается. Так, ENY2 является субъединицей деубиквитирующего модуля SAGA – важного коактиватора транскрипции у дрозophilы [13, 16]. Этот комплекс обладает гистон-ацетилтрансферазной активностью. Вносимая им модификация узнается бромодоменами ремоделирующих хроматин комплексов семейства SWI/SNF, за счет чего происходит их привлечение на гены, регулируемые SAGA [17]. В результате активного ремоделирования структуры хроматина

происходит локальное удаление или дестабилизация нуклеосом, что создает благоприятные условия для связывания РНК-полимеразы и различных факторов транскрипции, необходимого для регуляции транскрипции [18, 19]. Кроме того, ENY2 обнаружен в составе комплекса AMEX, взаимодействующего с белками ядерной поры (NPC) и участвующего в экспорте мРНК из ядра [14]. Будучи общим компонентом двух указанных комплексов, ENY2 отвечает за локализацию части SAGA-регулируемых генов у ядерной поры, тем самым участвуя в создании локальных транскрипционно активных участков на периферии ядра. ENY2-зависимое позиционирование определенных генетических локусов вблизи NPC обеспечивает высокую скорость экспорта новосинтезированной РНК, что абсолютно необходимо при ответе на стресс или гормональный сигнал. Осуществляемое белком ENY2 привлечение комплексов, участвующих в создании участков локально открытого хроматина, играет важную роль в обеспечении барьерной активности Su(Hw)-зависимых инсуляторов [15]. Кроме того, Su(Hw) – первый белок высших эукариот, роль которого была показана в позиционировании ориджинов репликации в геноме дрозophilы [20, 21]. Привлечение комплексов SAGA и dSWI/SNF на сайты связывания этого белка приводит к образованию областей с низкой

локальной плотностью нуклеосом, что способствует связыванию комплекса ORC, ответственного за сборку преинициаторного комплекса репликации. По всей видимости, ENY2-содержащие комплексы принимают участие не только в регуляции экспрессии генов, но также важны для синхронизации транскрипции и репликации в ходе клеточного цикла.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Клеточные линии и трансфекция

В работе использовали линию клеток S2 *Drosophila melanogaster*. Трансфекцию клеток проводили при помощи Effectene Transfection Reagent (Qiagen) по протоколу производителя. Генетическая конструкция, использованная для трансфекции, кодировала белок CG9890, маркированный 3×FLAG-эпитопом.

### Антитела

Были использованы следующие антитела: полученные в нашей лаборатории поликлональные кроличьи антитела к GCN5, Xmas-2, OSA, N-концу TBP, Thos5, ORC2, ORC3, PB, Moira, любезно предоставленные L. Tora кроличьи антитела к ADA2b. Поликлональные антитела α-CG9890 получены из сыворотки крови кролика, иммунизированного полноразмерным белком CG9890, экспрессированным в *Escherichia coli*. Все кроличьи антитела были очищены. Концентрация всех антител, полученных в лаборатории, составляла около 1 мг/мл. Также использовали мышинные антитела против ламина Dm0 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Department of Biological Sciences), антитела к FLAG-эпитопу (Sigma), а также антитела к FLAG-эпитопу, конъюгированные с пероксидазой хрена. Разведение коммерческих антител 1 : 500, разведение антител, полученных в лаборатории, варьировало для получения оптимального сигнала на вестерн-блоте. В качестве вторичных антител использовали антитела козы или осла к иммуноглобулинам кролика и мыши, узнающие как полноразмерные иммуноглобулины, так и специфичные только к легким цепям антител (разведение 1 : 5000). Вторичные антитела были конъюгированы с пероксидазой хрена. Кроме того, для флуоресцентной микроскопии использовали вторичные антитела Cy3 и AlexaFluor™ 488 (разведение 1 : 500).

### Имунофлуоресцентная микроскопия клеток линии S2 *D. melanogaster*

Прикрепившиеся к покровным стеклам клетки линии S2 дважды промывали 1×PBS, фиксировали 3.7% ПФА (рН 7.5) в течение 10 мин, промывали

1×PBS 2 раза по 5 мин. Затем обрабатывали 0.2% раствором Triton X-100 в 1×PBS в течение 5 мин, промывали 1×PBS 2 раза по 5 мин, после чего в течение 10 мин инкубировали в 3% обезжиренном сухом молоке, разведенном в 1×PBS. Первичные антитела разводили в 3% молоке/PBS, препараты инкубировали с антителами (1 ч, комнатная температура, влажная камера). Использовали антитела мыши против ламина Dm0 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Department of Biological Sciences) в разведении 1 : 5000, поликлональные антитела кролика против CG9890 (разведение 1 : 1000). Препараты промывали 3 раза по 5 мин в 1×PBS, затем инкубировали со вторичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре во влажной камере, закрытой фольгой. В качестве вторичных антител использовали: антитела против IgG (H+L) кролика, конъюгированные с Cy3 (Amersham), антитела против IgG мыши, конъюгированные с AlexaFluor 488 (Molecular Probes) в разведении 1 : 500. Закрытые фольгой препараты промывали 3 раза по 5 мин в 1×PBS и инкубировали с DAPI (разведение 1 : 1000, Sigma) в течение 10 с. Препараты отмывали в течение 5 мин в 1×PBS. После высушивания покровное стекло заключали в трис-глицериновый буфер (Vectashield) на предметном стекле. Края покровного стекла покрывали лаком во избежание высыхания препарата и попадания иммерсии внутрь него. Препараты смотрели непосредственно после получения, используя световой микроскоп Leica. Использовали объектив ×100 с иммерсией. Обработку изображений проводили с помощью программы ImageJ.

### Имунопреципитация

Для выделения ядер клетки центрифугировали в течение 5 мин при 500g при +4°C. Осадок промывали 1 мл буфера LB cyto 3 (3 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM HEPES NaOH, pH 8.0) с добавлением бутирата натрия (ингибитор деацетилаз) до конечной концентрации 20 mM. Затем проводили повторное центрифугирование в тех же условиях, тщательно ресуспендировали осадок клеток в 200 мкл буфера LB cyto 3 с добавлением бутирата натрия до конечной концентрации 10 mM и ингибитора протеаз (Protease Inhibitor Cocktail (PIC), Roche). После чего инкубировали на льду в течение 15 мин. После центрифугирования избавлялись от супернатанта, и далее использовали только ядерную фракцию.

Осадок ядер растворяли в 500 мкл MN буфера III (20 mM HEPES KOH, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% NP40, 0.1 M KCl, pH 8.0) с добавлением бутирата натрия до конечной концентрации 20 mM (ингибитор деацетилаз) и ингибитора протеаз (PIC, Roche). ДНК фрагменти-

ровали, обрабатывая клетки ультразвуком (2 раза по 10 с, перерыв 1 мин, средняя мощность прибора) на льду. После ресуспендирования клетки инкубировали в течение 30 мин с 2 ед. ДНКазы I на льду и центрифугировали при 16 000g в течение 20 мин при +4°C.

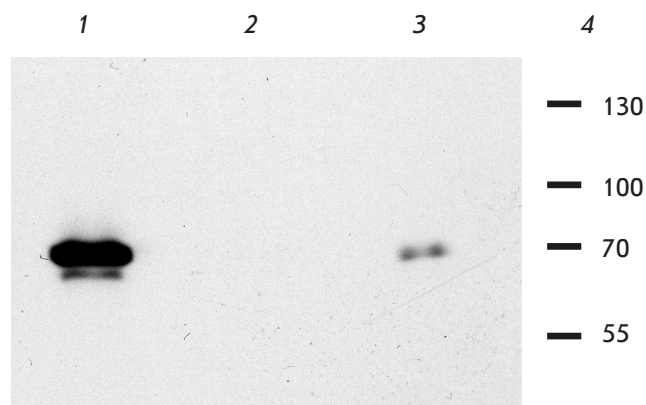
Для коиммунопреципитации использовали поликлональные антитела к белку CG9890 и иммуноглобулины сыворотки крови неиммунизированного кролика в качестве отрицательного контроля. Антитела были иммобилизованы на Mab-сефарозе.

Лизат клеток линии S2 (200 мл) инкубировали с 15 мкл 50% Mab-сефарозы с иммобилизованными на ней антителами в течение 3 ч на качалке при +4°C. Сефарозу отмывали буфером MN III (3 раза по 10 мин) при +4°C. Результаты анализировали с помощью вестерн-блотинга.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Анализ взаимодействия белков ENY2 и CG9890

Ранее с целью идентификации новых белковых партнеров ENY2 был проведен скрининг библиотеки кДНК эмбрионов дрозофилы в двугибридной дрожжевой системе. Идентифицировали более 10 взаимодействующих белков, часть из которых была изучена [11–15, 20–22]. В ходе скрининга выявили взаимодействие ENY2 с еще неохарактеризованным белком CG9890, изучению которого посвящена данная статья. Как предсказывает биоинформатический анализ аминокислотной последовательности CG9890, он относится к семейству белков, несущих домен цинковых пальцев C2H2 – самый часто встречающийся у эукариот ДНК-связывающий мотив [23]. Белки этого семейства вовлечены в разнообразные клеточные функции, что обеспечивается возможностью участия домена цинковых пальцев в специфическом узнавании не только ДНК, но также РНК и белков [24–26]. Для подтверждения взаимодействия белков ENY2 и CG9890 была создана генетическая конструкция для экспрессии белка CG9890, маркированного 3×FLAG-эпитопом. Создана линия клеток *S2 D. melanogaster*, экспрессирующая этот слитый белок, и проведена его иммунопреципитация из лизата клеток с использованием антител к белку ENY2 и неспецифических антител в качестве отрицательного контроля. Результаты иммунопреципитации анализировали с помощью вестерн-блотинга и детектировали с помощью антител к эпитопу 3×FLAG (Sigma). Как видно на *рис. 1*, антитела к белку ENY2 преципитируют белок 3×FLAG-CG9890 (дорожка 3), в то время как неспецифические антитела не преципитируют (дорожка 2). Таким образом подтверждено взаимодействие белков ENY2 и CG9890.



**Рис. 1.** Проверка взаимодействия белков ENY2 и CG9890. Вестерн-блот-анализ коиммунопреципитации ENY2 и CG9890, маркированного эпитопом 3×FLAG, из лизата трансформированных клеток S2. Для иммунопреципитации использовали антитела к белку ENY2 и неспецифические антитела из предыдущей сыворотки (как негативный контроль). Вестерн-блотинг проводили с использованием антител к эпитопу 3×FLAG (Sigma). 1 – исходный лизат клеток; 2 – иммунопреципитация с использованием неспецифических антител; 3 – иммунопреципитация с использованием антител к ENY2; 4 – маркер молекулярной массы

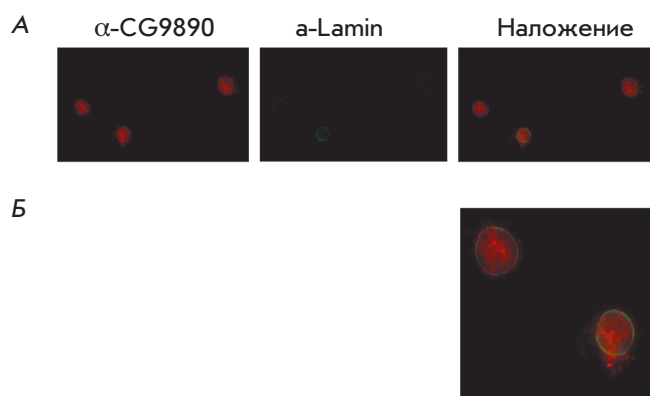
Для дальнейшего изучения CG9890 получены поликлональные антитела к этому белку и аффинно очищены на колонке, содержащей рекомбинантный белок CG9890. Анализ специфичности антител с помощью вестерн-блотинга показал, что данные антитела узнают полосу в районе 60 кДа, что близко к расчетной массе белка 53 кДа (данные не представлены).

### Изучение внутриклеточной локализации белка CG9890

Внутриклеточную локализацию белка CG9890 определяли с использованием иммуноокрашивания клеток линии S2 дрозофилы охарактеризованными нами поликлональными антителами. Результаты эксперимента представлены на *рис. 2*. В результате анализа серии микрофотографий установлено, что белок CG9890 локализуется преимущественно в клеточном ядре, хотя некоторое его количество присутствует и в цитоплазме.

### Анализ взаимодействий белка CG9890 с субъединицами ENY2-содержащих комплексов

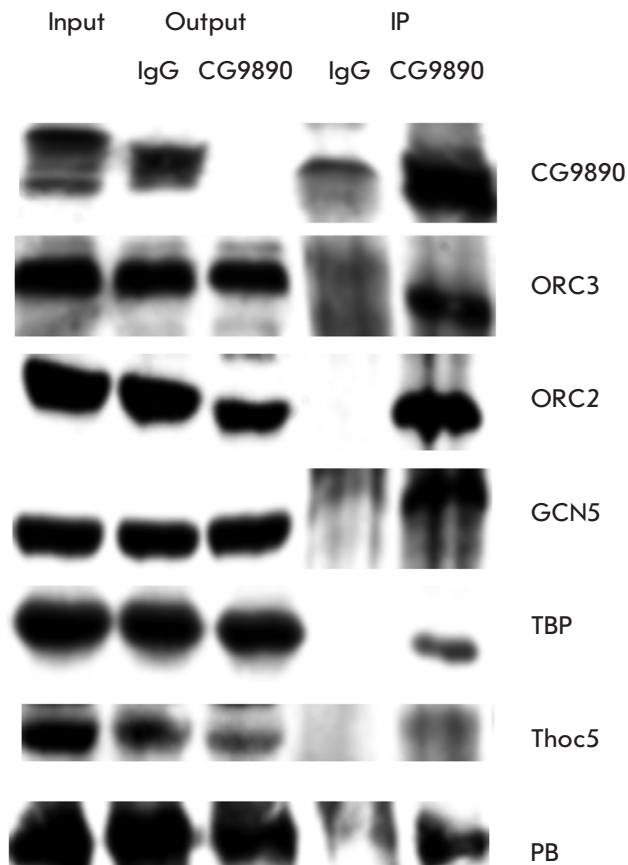
Так как было подтверждено взаимодействие белков ENY2 и CG9890, предположили, что CG9890 участвует в некоторых ENY2-зависимых процессах, а его взаимодействие с отдельными партнера-



**Рис. 2.** Иммуноокрашивание клеток линии S2 *D. melanogaster*, трансфицированных конструкцией 3×FLAG\_CG9890. А – для окрашивания использовали очищенные кроличьи поликлональные антитела к CG9890 (первая панель) и моноклональные антитела мыши к ламину (вторая панель). В качестве вторичных антител использовали антикроличьи антитела, конъюгированные с Cy3, и антимышьи антитела, конъюгированные с AlexaFluor 488. На третьей панели показано совмещенное изображение предыдущих панелей. Б – увеличенное изображение части третьей панели

ми ENY2 может определять механизм его функционирования в клетке. Для проверки данной гипотезы было решено исследовать, с какими субъединицами ENY2-содержащих комплексов взаимодействует белок CG9890. С этой целью проведен эксперимент по иммунопреципитации белков из лизата клеток S2 *D. melanogaster* поликлональными антителами α-CG9890 с последующим вестерн-блот-анализом, результаты которого представлены на рис. 3.

В результате проведенных экспериментов обнаружено взаимодействие белка CG9890 с белками, входящими в состав различных ENY2-содержащих комплексов. В частности, с субъединицами ORC2 и ORC3 комплекса ORC, участвующего в позиционировании ориджинов репликации. Также обнаружены взаимодействия с такими белками, принимающими участие в регуляции транскрипции, как TBP (субъединица комплекса TFIID – функционального партнера ENY2), GCN5 (субъединица гистон-ацетилаз феразного комплекса SAGA, содержащего ENY2), Thoc5 (субъединица ENY2-содержащего комплекса ТНО, участвующего в формировании мРНК и элонгации транскрипции). Факт взаимодействия CG9890 с комплексами, вовлеченными в транскрипцию, согласуется с данными о ядерной локализации этого белка. Также нами выявлено взаимодействие CG9890 с белком Polybromo (PB) – субъединицей ремодели-



**Рис. 3.** Коиммунопреципитация белка CG9890 с субъединицами ENY2-содержащих комплексов. Для иммунопреципитации использовали антитела к белку CG9890 и неспецифические антитела из предыммунной сыворотки (как негативный контроль). Input – 2.5% исходного лизата клеток; Output – несвязавшаяся фракция лизата после инкубации с неспецифическими антителами (IgG) или антителами к белку CG9890; IP – 10% элюата с сефарозы (IgG или CG9890). Субъединицы ENY2-содержащих комплексов детектировали с помощью вестерн-блотинга с использованием соответствующих антител (указаны справа)

рующего хроматин комплекса dSWI/SNF, необходимого для создания области открытого хроматина при активации промотора. Взаимодействие с белком Xmas-2 (комплекс AMEX) показать не удалось (данные не представлены). Таким образом, CG9890 взаимодействует с транскрипционными комплексами, вовлеченными в инициацию и элонгацию транскрипции, но не с комплексом AMEX, связанным с экспортом мРНК из ядра в цитоплазму, что указывает на участие CG9890 в первых стадиях транскрипционного цикла.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее мы обнаружили, что инсульторный белок Su(Hw), содержащий домен цинковых пальцев, взаимодействует с ENY2 и привлекает ENY2-содержащие комплексы на Su(Hw)-зависимые инсульторы дрозофилы, участвуя одновременно и в регуляции транскрипции, и в позиционировании ориджинов репликации. В данной работе нами выявлено взаимодействие ENY2 еще с одним белком – CG9890, который, как и Su(Hw), содержит домен цинковых пальцев. По аналогии с Su(Hw) мы предполагаем, что CG9890 является ДНК-связывающим белком, который привлекает ENY2-содержащие комплексы на свои сайты связывания, организуя таким образом регуляторные элементы генома, необходимые для функционирования клетки. Нами показано, что белок CG9890 локализован в ядре клетки. Подтверждено взаимодействие ENY2

и CG9890. Биохимическими методами выявлена связь белка CG9890 с ENY2-содержащими комплексами SAGA, ORC, dSWI/SNF, TFIID и TPOC. Взаимодействие с белком Xmas-2 (комплекс AMEX) показать не удалось. Таким образом, CG9890 взаимодействует с комплексами, вовлеченными в инициацию и элонгацию транскрипции, но не с комплексом AMEX, участвующим в экспорте мРНК из ядра в цитоплазму, что указывает на «работу» CG9890 на первых стадиях транскрипционного цикла. Кроме того, CG9890 взаимодействует с комплексом ORC, необходимым для позиционирования точек начала репликации. ●

*Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 17-04-02193.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Orphanides G., Reinberg D. // Cell. 2002. V. 108. № 4. P. 439–451.
- Maksimenko O., Georgiev P. // Front. Genet. 2014. V. 5. P. 28.
- van Bommel J.G., Pagie L., Braunschweig U., Brugman W., Meuleman W., Kerkhoven R.M., van Steensel B. // PLoS One. 2010. V. 5. № 11. P. e15013.
- Rando O.J., Chang H.Y. // Annu. Rev. Biochem. 2009. V. 78. P. 245–271.
- Mardanov P.V., Krasnov A.N., Kurshakova M.M., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G. // Genetika. 2005. V. 41. № 4. P. 536–541.
- Krasnov A.N., Kurshakova M.M., Ramensky V.E., Mardanov P.V., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G. // Nucl. Acids Res. 2005. V. 33. № 20. P. 6654–6661.
- Georgieva S.G., Nabirochkina E.N., Pustovoitov M.V., Krasnov A.N., Soldatov A.V. // Genetika. 2001. V. 37. № 1. P. 18–23.
- Orlova A.V., Kopytova D.V., Krasnov A.N., Nabirochkina E.N., Pliyev Y.V., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. // Dokl. Biochem. Biophys. 2010. V. 434. P. 227–231.
- Kopytova D.V., Orlova A.V., Krasnov A.N., Gurskiy D.Y., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Shidlovskii Y.V., Georgieva S.G. // Genes Dev. 2010. V. 24. № 1. P. 86–96.
- Kopytova D.V., Krasnov A.N., Orlova A.V., Gurskiy D.Y., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. // Cell Cycle. 2010. V. 9. № 3. P. 479–481.
- Kurshakova M.M., Kopytova D.V., Nabirochkina E.N., Soshnikova N.V., Georgieva S.G., Krasnov A.N. // Genetika. 2009. V. 45. № 3. P. 330–335.
- Kurshakova M.M., Kopytova D.V., Nabirochkina E.N., Nikolenko Iu V., Shidlovskii Iu V., Georgieva S.G., Krasnov A.N. // Genetika. 2009. V. 45. № 10. P. 1332–1340.
- Zhao Y., Lang G., Ito S., Bonnet J., Metzger E., Sawatsubashi S., Suzuki E., Le Guezennec X., Stunnenberg H.G., Krasnov A., et al. // Mol. Cell. 2008. V. 29. № 1. P. 92–101.
- Kurshakova M.M., Krasnov A.N., Kopytova D.V., Shidlovskii Y.V., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Spehner D., Schultz P., Tora L., Georgieva S.G. // EMBO J. 2007. V. 26. № 24. P. 4956–4965.
- Kurshakova M., Maksimenko O., Golovnin A., Pulina M., Georgieva S., Georgiev P., Krasnov A. // Mol. Cell. 2007. V. 27. № 2. P. 332–338.
- Helmlinger D., Tora L. // Trends Biochem. Sci. 2017. V. 42. № 11. P. 850–861.
- Baker S.P., Grant P.A. // Oncogene. 2007. V. 26. № 37. P. 5329–5340.
- Mazina M.Y., Nikolenko Y.V., Krasnov A.N., Vorobyeva N.E. // Genetika. 2016. V. 52. № 2. P. 164–169.
- Krasnov A.N., Mazina M.Y., Nikolenko J.V., Vorobyeva N.E. // Cell Biosci. 2016. V. 6. P. 15.
- Vorobyeva N.E., Mazina M.U., Golovnin A.K., Kopytova D.V., Gurskiy D.Y., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Georgiev P.G., Krasnov A.N. // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41. № 11. P. 5717–5730.
- Mazina M., Vorob'eva N.E., Krasnov A.N. // Tsitologiya. 2013. V. 55. № 4. P. 218–224.
- Krasnov A.N., Vorobyeva N.E., Mazina M.Y. // Dokl. Biochem. Biophys. 2018. V. 479. № 1. P. 80–82.
- Razin S.V., Borunova V.V., Maksimenko O.G., Kantidze O.L. // Biochemistry (Mosc.). 2012. V. 77. № 3. P. 217–226.
- Brayer K.J., Segal D.J. // Cell Biochem. Biophys. 2008. V. 50. № 3. P. 111–131.
- Brown R.S. // Curr. Opin. Struct. Biol. 2005. V. 15. № 1. P. 94–98.
- Fedotova A.A., Bonchuk A.N., Mogila V.A., Georgiev P.G. // Acta Naturae. 2017. V. 9. № 2. P. 47–58.