

УДК 577.218

ZAD-домен определяет ядерную локализацию инсуляторных белков *Drosophila melanogaster*

Н. А. Золотарев, О. Г. Максименко, П. Г. Георгиев, А. Н. Бончук*

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

*E-mail: errinaceus@rambler.ru

Поступила в редакцию 10.12.2015

Принята к печати 14.03.2016

РЕФЕРАТ Многие транскрипционные факторы с мотивами цинковых пальцев типа C2H2 содержат на N-конце характерный домен, названный ZAD (Zinc-finger Associated Domain), в котором четыре остатка цистеина координируют ион цинка. Показано, что некоторые ZAD-домены обладают способностью к гомодимеризации. Однако функциональная роль этого домена остается почти неизученной. Нами показано, что точечная мутация в ZAD-доме инсуляторного белка Zw5 нарушает его ядерную локализацию, не влияя на способность к димеризации. Установлено также, что ZAD-домены необходимы для ядерной локализации белков Pita и Grau. Таким образом, одна из функций ZAD-домена состоит в регуляции ядерной локализации транскрипционных факторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА инсуляторы, транскрипционные факторы, хроматин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ZAD – домен, ассоциированный с цинковыми пальцами (Zinc-finger Associated Domain); ИПТГ – изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид; ФМСФ – фенилметилсульфонилфторид.

ВВЕДЕНИЕ

Белки с ДНК-связывающим доменом «цинковые пальцы» C2H2-типа – самый обширный класс транскрипционных факторов у высших эукариот [1]. Обычно C2H2-домены формируют кластеры, часть из которых отвечает за высокоспецифичное связывание с ДНК. У членистоногих обнаружен подкласс транскрипционных факторов с цинковыми пальцами типа C2H2, представители которого на N-конце содержат специфичный домен, названный ZAD (Zinc-finger Associated Domain), в котором четыре остатка цистеина координируют ион цинка [2, 3]. В клетках *Drosophila melanogaster* насчитывается более 90 транскрипционных факторов (рис. 1) с доменами C2H2 и ZAD [3]. Геномы других представителей членистоногих могут кодировать от четырех (дафния обыкновенная) до 120 (малярийный комар) факторов этого класса. Кристаллическая структура ZAD-домена фактора Grauzone (Grau) показала, что он представляет собой димер (рис. 2А) [4]. Кроме того, *in vitro* показано, что ZAD-домены белков Serendipity-δ и Weckle также образуют димеры [5, 6]. До настоящего времени это семейство транскрипционных факторов остается почти неизученным, определена только функциональная роль некоторых из них [7–9]. Три транскрипционных фактора с ZAD-доменом (Pita, ZIPIC и Zw5) можно отнести к классу инсулятор-

ных белков (рис. 2Б) [10, 11]. Инсуляторами называют регуляторные элементы, которые блокируют взаимодействие между энхансером и промотором только в том случае, если находятся между ними [12, 13]. Недавно было показано, что инсуляторы могут участвовать в установлении дистанционных взаимодействий и организации архитектуры хромосом [14, 15]. Белок Zw5 обнаружен в составе инсулятора SCS, расположенного на границе кластера генов теплового шока 70 [10]. Белки Pita и ZIPIC исходно идентифицировали как партнеры инсуляторного белка CP190, который считается ключевым для формирования архитектуры хроматина [11]. Все инсуляторные белки связываются со специфическими нуклеотидными последовательностями длиной 9–15 п.н., мультипликация которых формирует эффективный инсулятор [10, 11, 16]. С помощью полногеномного анализа показано, что Zw5, Pita и ZIPIC преимущественно связываются с промоторами генов [11]. Предполагается, что ZAD-домен может участвовать в организации дистанционных взаимодействий между удаленными сайтами связывания одного и того же инсуляторного белка [15].

В настоящей работе изучена точечная мутация в ZAD-доме белка Zw5, которая приводит к летальному фенотипу. Показано, что эта мутация нарушает ядерную локализацию белка Zw5. ZAD-

домены других двух белков, Pita и Grau, также нужны для ядерной локализации этих белков. Таким образом, одна из функций ZAD-домена состоит в регуляции ядерной локализации транскрипционных факторов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Экспрессия и очистка белков

ДНК, кодирующую ZAD-домен белка Zw5 (дикого типа и с заменой R14G) дрозофилы, клонировали в плазмиду pET32a(+) в рамке с шестью остатками гистидина и тиоредоксином. Плазмидами трансформировали компетентные клетки *Escherichia coli* штамма BL21(DE3). Экспрессию белка индуцировали 1 mM ИПТГ, перед индукцией добавляли 0.2 mM ZnCl₂, культуру инкубировали в течение ночи при 18°C на качалке. Бактериальные клетки разрушали ультразвуком в 50 mM HEPES-КОН-буфере pH 7.6, содержащем 500 mM NaCl, 20 mM имидазол, 5 mM β-меркаптоэтанол, 1 mM ФМСФ с добавлением 1 : 500 Proteinase inhibitor cocktail VII (Calbiochem). Белки выделяли из лизата бактериальных клеток с помощью аффинной хроматографии на Co-IDA-сефарозе. Элюцию проводили 50 mM HEPES-КОН-буфером pH 7.6, содержащем 500 mM NaCl, 250 mM имидазол, 5 mM β-меркаптоэтанол.

Химическая сшивка белков

После выделения белки диализовали против буфера PBS. К препаратам добавляли глутаральдегид до конечной концентрации 0.01 или 0.1%, инкубировали при комнатной температуре в течение 10–15 мин. Реакцию останавливали, добавляя глицин до концентрации 50 mM, и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. Продукты сшивки визуализировали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием серебром.

Окрашивание препаратов клеток S2

D. melanogaster

кДНК, кодирующие либо полноразмерные белки дикого типа, либо мутантные, клонировали в рамке с 3×FLAG-пептидом в плазмиду для транзientной экспрессии под контролем промотора гена актина 5С. Клетки трансфицировали по стандартной методике с помощью реагента Cellfectin (Invitrogen). Окрашивание проводили на 3-и сутки после трансфекции.

В 35-мм чашке Петри на покровное стекло наносили 1 мл суспензии S2-клеток. Инкубировали в течение ночи при 24°C для осаждения клеток на стекло. Среду с неприкрепленными клетками удаляли.

Все растворы наносили по стенке чашки, чтобы не смыть клетки со стекла. Инкубацию проводили при комнатной температуре на качалке с низкой скоростью.

Стекло промывали 1 мл фосфатно-солевого буфера (PBS) 2 раза по 5 мин. Клетки фиксировали 1 мл фиксирующего раствора (2% формальдегида, 50 mM MgCl₂ в PBS) в течение 20 мин. Промывали 1 мл PBS 3 раза по 5 мин. Для повышения проницаемости клеточных мембран клетки обрабатывали 1% раствором Triton X-100 в PBS в течение 10 мин. Промывали PBS (1 мл 3 раза по 5 мин). Инкубировали в блокирующем растворе (1% бычьего сывороточного альбумина (BSA), 0.05% Tween-20 в PBS) 2 раза по 30 мин. Инкубировали с 1 мл блокирующего раствора с первичными антителами (1 : 30 антиламин (из коллекции Университета Айовы), 1 : 300 анти-FLAG (Sigma)) в течение 1 ч. Промывали раствором 0.25% BSA, 0.05% Tween-20 в PBS (3 раза по 15 мин). Инкубировали с 1 мл блокирующего раствора с вторичными антителами, конъюгированными с флуорофором (Invitrogen), и TO-PRO-3 Iodide в течение 1 ч. Промывали раствором 0.25% BSA, 0.05% Tween-20 в PBS (3 раза по 15 мин). Промывали 1 мл PBS в течение 5 мин, промывали стекло водой, удаляли избыток воды. Добавляли среду Vectashield для закрепления на предметном стекле. Края покровного стекла покрывали лаком.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Летальная мутация в ZAD-домене белка Zw5 не влияет на его способность к димеризации

Ген *dwg* (*deformed wings*), кодирующий белок Zw5, экспрессируется преимущественно в процессе эмбриогенеза. Описано много мутаций в гене *dwg*, которые имеют летальный фенотип, что предполагает важную роль Zw5 в эмбриональном развитии. Одна из охарактеризованных мутаций, *dwg*⁸ или *zw5*^{62jl}, приводит к замене аргинина на глицин в положении 14 (R14G) ZAD-домена [10]. Эта рецессивная мутация летальна на личиночной стадии. Для доказательства того, что именно мутация *zw5*^{62jl} отвечает за летальный фенотип, получена конструкция, в которой ген *dwg* находится под контролем промотора гена *hsp83*. В качестве репортера для идентификации трансформантов использовали ген *white*, который определяет пигментацию глаз. В результате трансформации в эмбрионы дрозофилы получены четыре трансгенные линии с одной инсерцией конструкции. Все трансгены комплементировали летальный фенотип мутации *zw5*^{62jl}, что подтверждает роль этой мутации в проявлении летального фенотипа.

Таким образом, точечная мутация в ZAD-домене приводит к полной инактивации функциональной ак-

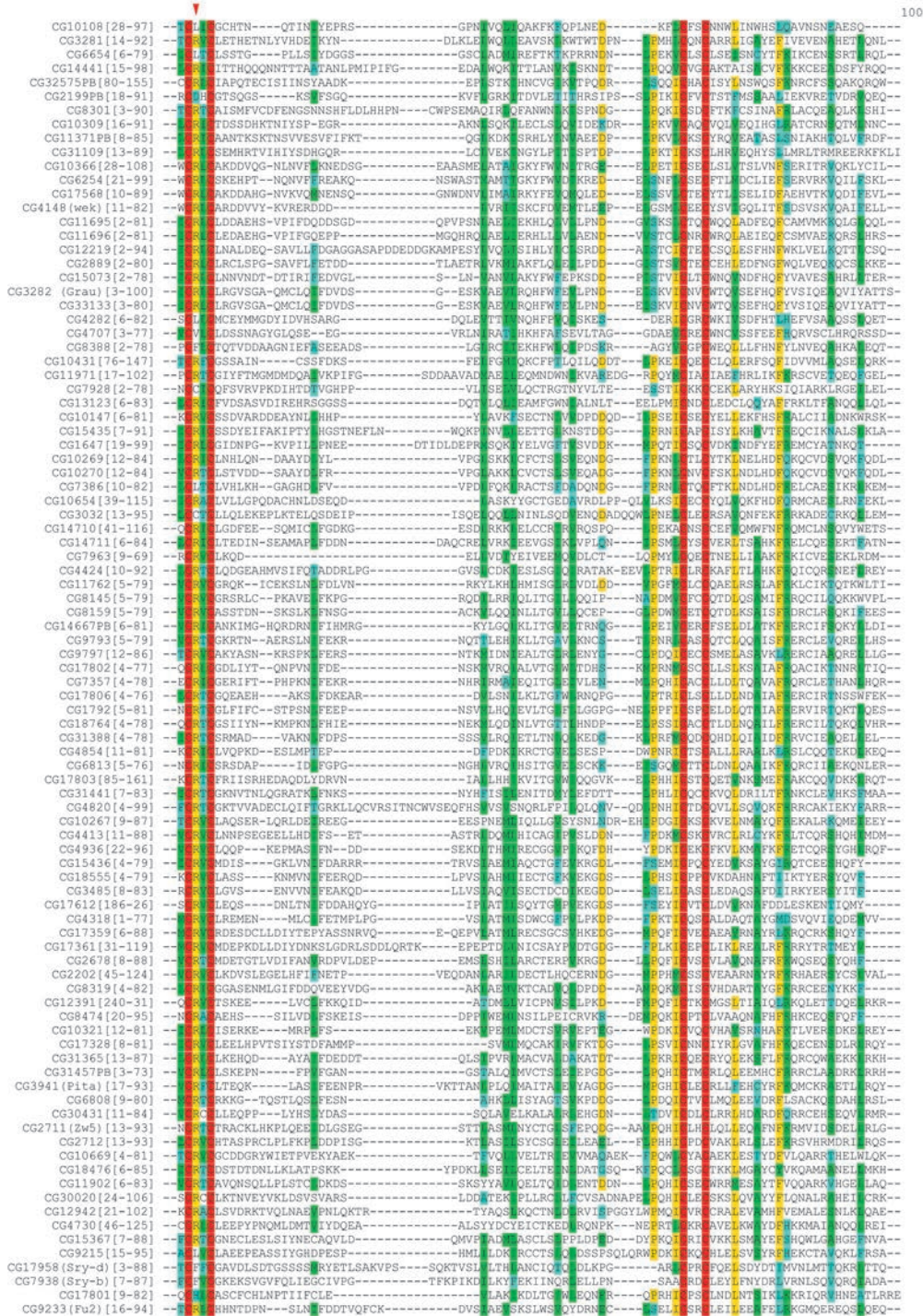


Рис. 1. Выравнивание аминокислотных последовательностей ZAD-доменов *Drosophila*. Стрелкой показано положение консервативного остатка аргинина

тивности Zw5. Из этого можно сделать вывод о важности R14 в составе ZAD-домена. Выравнивание последовательностей ZAD-доменов различных белков показало, что большинство ZAD-доменов содержат остаток аргинина в положении 14 (рис. 1). Из 93 кодируемых геномом *Drosophila* транскрипционных факторов с ZAD-доменом аргинин в положении 14

(R14) найден у 81, у пяти аргинин заменен на лейцин, в трех – на фенилаланин, в двух – на цистеин, в одном – на аспарат и гистидин. Ранее предположили, что R14 участвует в димеризации ZAD-домена [4], поскольку он (R5 у белка Grau) вовлечен в формирование водородных связей с Q74 (рис. 2A), хотя эти остатки являются лишь небольшой ча-

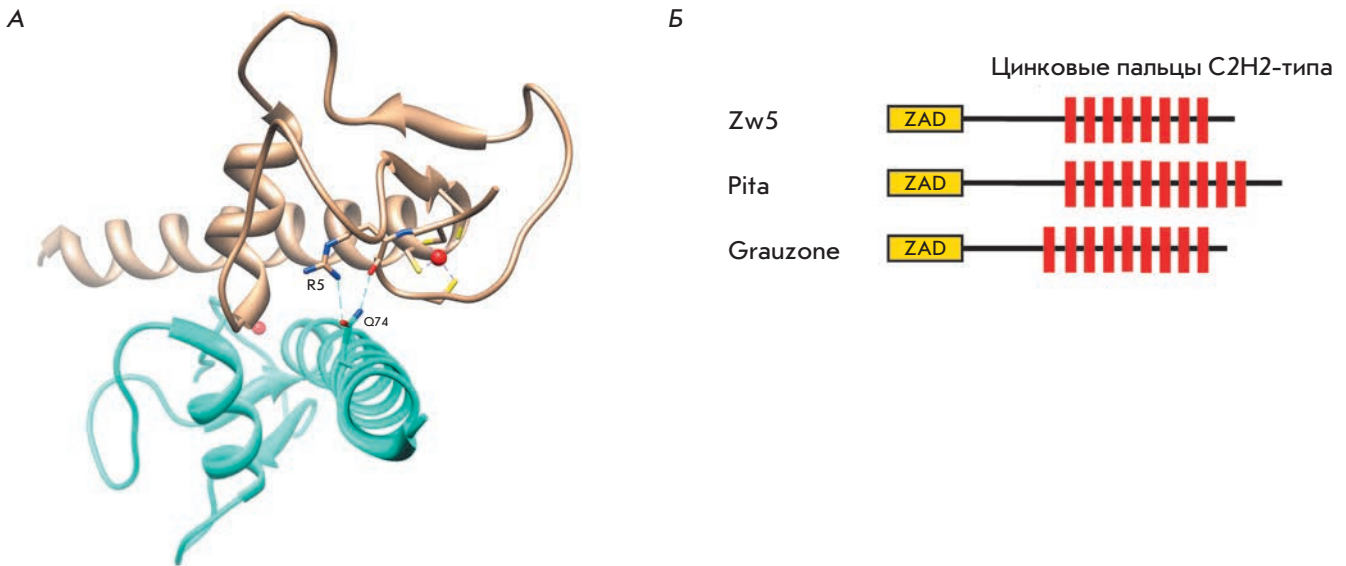


Рис. 2. А – структура димера ZAD-домена белка Grauzone (1PZW в базе PDB). Показано формирование водородных связей между R5 (остаток, гомологичный R14 в белке Zeste-white 5) и Q74, а также четыре консервативных цистеина, координирующие атом цинка. Б – доменная структура белков Zeste-white 5, Pita и Grauzone

стью протяженного интерфейса димеризации двух ZAD-доменов. С целью проверки этого предположения в векторе рЕТ32a(+) клонировали кДНК, кодирующие домены ZAD^{wt} и ZAD^{R14G}, слитые с тиоредоксином, и экспрессировали их в клетках *E. coli*. Оказалось, что мутантный ZAD-домен выделяется в существенно меньших количествах по сравнению с доменом дикого типа. Это может свидетельствовать о меньшей стабильности и нарушении правильной конформации мутантного ZAD-домена, экспрессируемого в бактериях.

Для сравнения димеризации нормального и мутантного ZAD-домена был проведен опыт по сшиванию ZAD-доменов с помощью глутаральдегида. Как видно из рис. 3, в концентрации 10 мкМ оба ZAD-домена с примерно одинаковой эффективностью образуют димеры. Таким образом, точечная мутация R14G не влияет на способность ZAD-домена белка Zw5 к димеризации *in vitro*, однако нельзя исключить возможности снижения стабильности димеров при низких концентрациях белка в клетке.

ZAD-домены нужны для ядерной локализации белков в культуре клеток S2

Установлено, что у мутантного ZAD-домена сохранена способность к димеризации, поэтому следующей задачей стало изучение распределения нормального и мутантного белков Zw5 в S2-клетках дрозофилы. С этой целью созданы векторы экспрессии, в которых гены, кодирующие нормальный и мутантный белки Zw5, слитые с эпитопом 3×FLAG, находились

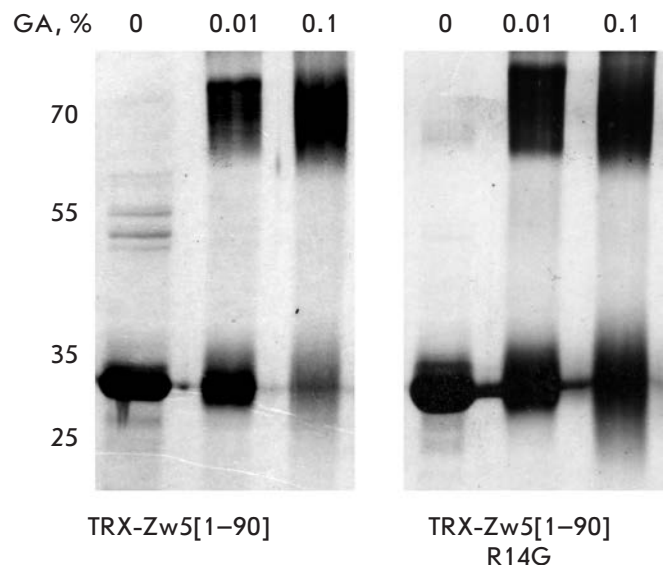


Рис. 3. Результаты химической сшивки при помощи глутаральдегида (GA) ZAD-домена белка Zw5 дикого типа и содержащего мутацию R14G, слитых с тиоредоксином (TRX). Концентрация белка 10 мкМ

под контролем актинового промотора. Этими векторами трансфицировали клетки S2, и определяли распределение белков с использованием антител к эпитопу 3×FLAG, ламину и красителя TO-PRO-3 Iodide, который окрашивает ДНК (рис. 4). Белок Zw5-3×FLAG локализуется преимущественно

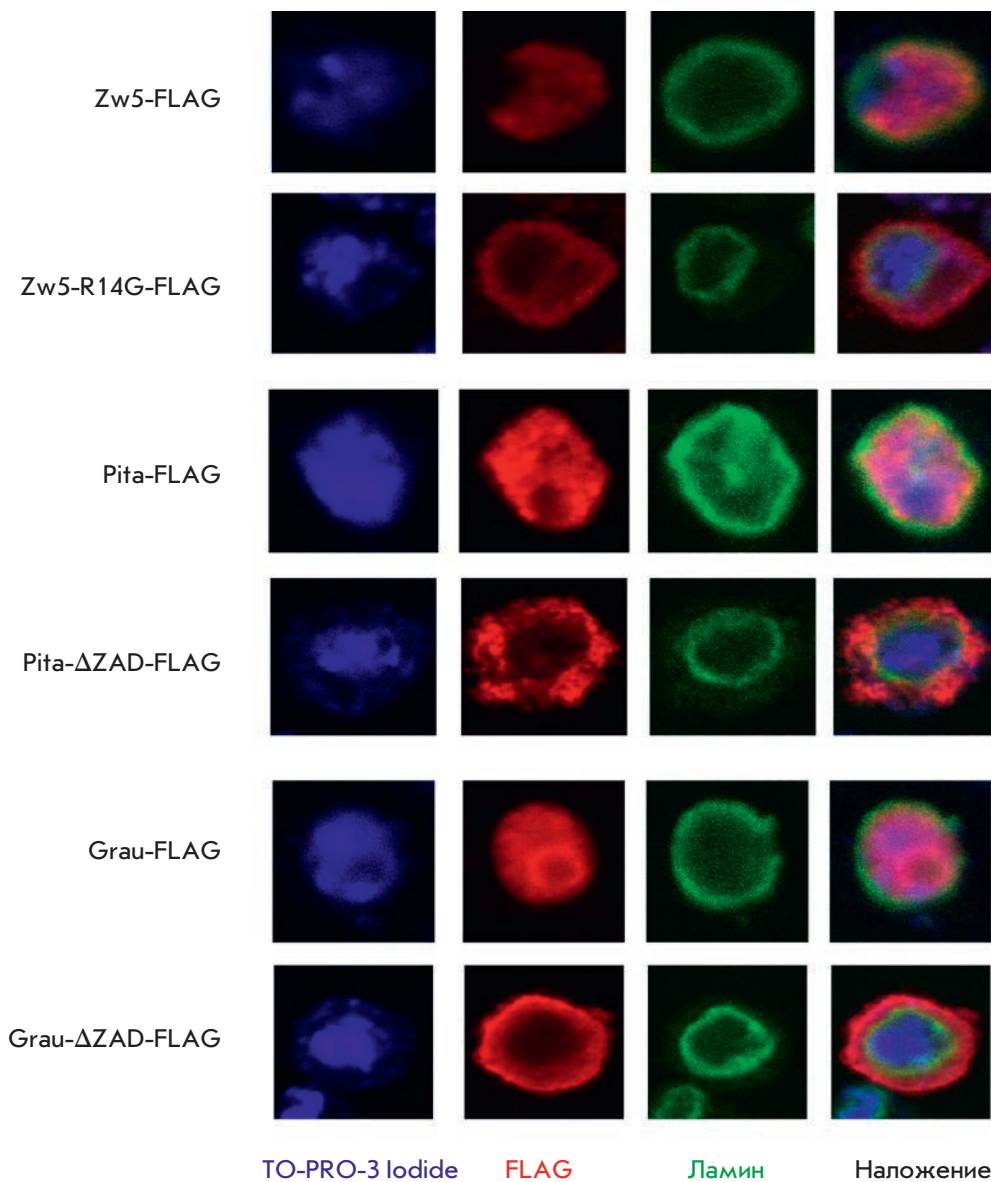


Рис. 4. Иммуноцитохимическое окрашивание S2-клеток, экспрессирующих белки с нарушенным ZAD-доменом и белки дикого типа, слитые с 3×FLAG-пептидом

в ядре. Неожиданно оказалось, что белок Zw5^{R14G}-3×FLAG находится почти исключительно в цитоплазме. Таким образом, точечная мутация нарушает ядерную локализацию белка Zw5, что объясняет летальный эффект аллеля *zw5*^{62jl}. По данным сервиса NucPred [17], белок Zw5 не содержит выраженных сигналов ядерной локализации.

Для выяснения роли ZAD-домена в ядерной локализации белков использовали два других хорошо изученных белка с ZAD-доменом: Pita и Grau [4, 8, 11]. Эти белки имеют одинаковую структуру, сходную с Zw5: ZAD-домен находится на N-конце, и группа доменов цинковых пальцев типа C2H2 образует кластер на C-конце (рис. 2Б). Показано, что домены типа «цинковые пальцы» могут определять ядерную локализацию белков [18, 19]. Согласно данным програм-

мы NucPred [17], Pita не имеет выраженных сигналов ядерной локализации (NLS), а у Grauzone выраженный NLS находится в центральной части (170–190 аминокислот). Сервис PredictProtein [20] предсказывает ядерную локализацию всех трех белков с низкой степенью значимости у Zw5 и Pita и с высокой – у Grauzone.

кДНК, кодирующие белки Grau и Pita с ZAD-доменом и без него, были слиты с эпитопом 3×FLAG и встроены в экспрессионный вектор под контролем актинового промотора (Act5C). Полученными конструкциями трансфицировали клетки S2, распределение белков изучали на препаратах с использованием антител к эпитопу 3×FLAG и ламину (рис. 4). Белки Pita-3×FLAG и Grau-3×FLAG находятся преимущественно в ядре. Окрашивание эндогенных

белков Grau, Zw5 и Pita (данные не представлены) выявило их равномерное ядерно-цитоплазматическое распределение. Делеция ZAD-домена приводила к локализации FLAG-антител преимущественно в цитоплазме, что объясняется потерей способности белков без ZAD-домена попадать в ядро клеток (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные нами результаты предполагают, что точечная замена аргинина на глицин в положении 14 (R14G) ZAD-домена нарушает ядерную локализацию белка Zw5. R14 в ZAD-доме Zw5 соответствует пятому аминокислотному остатку ZAD-домена Grau. Согласно данным рентгеноструктурного анализа, боковая цепь этого остатка экспонирована наружу и в то же время способна к образованию водородной связи с Q74 [4]. На основе этого авторы статьи [4] предположили, что аргинин-5 участвует в димеризации ZAD-домена Grau. Однако, согласно нашим результатам, аргинин-14 в составе ZAD-домена Zw5 не нужен для димеризации белка. Вероятно, структура ZAD-доменов может значительно различаться, что объясняет, почему ZAD-домены предпочтительно гомодимеризуются (неопубликованные данные).

Предполагаемая локализация аргинина-14 на поверхности ZAD-домена может объяснить роль этого остатка во взаимодействии с белками, которые регулируют импорт в ядро. У белков Pita и Grau ZAD-домены гомологичны между собой и с ZAD-доменом

Zw5 не более чем на 58%. Однако эти ZAD-домены также необходимы для локализации соответствующих белков в ядре.

Интересно, что с помощью биоинформатических подходов сигналы ядерной локализации были предсказаны в средней части Grau и не найдены в составе белков Pita и Zw5. При этом белок Pita представлен в клетках в виде двух изоформ, которые различаются наличием первых 60 аминокислот, входящих в состав ZAD-домена [по данным Flybase]. Согласно экспериментальным данным, локализация транскрипционных факторов с ZAD-доменом в клетке подвержена сложной регуляции. Так, изменение ядерно-цитоплазматической локализации белка Weckle в процессе развития было показано ранее [6]. ZAD-содержащий белок Trade Embargo, который связывается с хроматином, равномерно распределен между ядром и цитоплазмой [21].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашей работы показывают, что ядерно-цитоплазматическое распределение ZAD-содержащих транскрипционных факторов, по всей видимости, имеет важное регуляторное значение, а ZAD-домены играют ключевую роль в этом процессе. ●

*Работа выполнена при поддержке Российского
научного фонда (проект № 14-24-00166).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Разин С.В., Борунова В. В., Максименко О.Г., Кантидзе О.Л. // *Биохимия*. 2012. Т. 77. С. 277–288.
2. Chung H.R., Schafer U., Jackle H., Bohm S. // *EMBO Rep.* 2002. V. 3. P. 1158–1162.
3. Chung H.R., Lohr U., Jackle H. // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. P. 1934–1943.
4. Jauch R., Bourenkov G.P., Chung H.R., Urlaub H., Reidt U., Jackle H., Wahl M.C. // *Structure*. 2003. V. 11. P. 1393–1402.
5. Payre F., Buono P., Vanzo N., Vincent A. // *Mol. Cell Biol.* 1997. V. 17. P. 3137–3145.
6. Chen L.Y., Wang J.C., Hyvert Y., Lin H.P., Perrimon N., Imler J.L., Hsu J.C. // *Curr. Biol.* 2006. V. 16. P. 1183–1193.
7. Li J., Gilmour D.S. // *EMBO J.* 2013. V. 32. P. 1829–1841.
8. Page A.R., Kovacs A., Deak P., Torok T., Kiss I., Dario P., Bastos C., Batista P., Gomes R., Ohkura H., et al. // *EMBO J.* 2005. V. 24. P. 4304–4315.
9. Gibert J.M., Marcellini S., David J.R., Schlotterer C., Simpson P. // *Dev. Biol.* 2005. V. 288. P. 194–205.
10. Gaszner M., Vazquez J., Schedl P. // *Genes Dev.* 1999. V. 13. P. 2098–2107.
11. Maksimenko O., Bartkuhn M., Stakhov V., Herold M., Zolotarev N., Jox T., Buxa M. K., Kirsch R., Bonchuk A., Fedotova A., et al. // *Genome Res.* 2015. V. 25. P. 89–99.
12. Kyrchanova O., Georgiev P. // *FEBS Lett.* 2014. V. 588. P. 8–14.
13. Matzat L.H., Lei E.P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1839. P. 203–214.
14. Maksimenko O., Georgiev P. // *Front. Genet.* 2014. V. 5. P. 28.
15. Sexton T., Cavalli G. // *Cell.* 2015. V. 160. P. 1049–1059.
16. Kyrchanova O., Chetverina D., Maksimenko O., Kullyev A., Georgiev P. // *Nucleic Acids Res.* 2008. V. 36. P. 7019–7028.
17. Brameier M., Krings A., MacCallum R.M. // *Bioinformatics.* 2007. V. 23. P. 1159–1160.
18. Ito T., Azumano M., Uwatoko C., Itoh K., Kuwahara J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 380. P. 28–32.
19. Bruening W., Moffett P., Chia S., Heinrich G., Pelletier J. // *FEBS Lett.* 1996. V. 393. P. 41–47.
20. Rost B., Yachdav G., Liu J. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. P. W321–326.
21. Lake C.M., Nielsen R.J., Hawley R.S. // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. P. e1002005.