

УДК 577.122.2

ТОПОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ МОНОУБИКВИТИНИРОВАНИЯ ГИСТОНА H2A

© 2020 г. А. А. Кудряева^{1,*}, член-корреспондент РАН В. М. Липкин¹, А. А. Белогуров^{1,2}

Поступило 23.03.2020 г.

После доработки 15.04.2020 г.

Принято к публикации 15.04.2020 г.

Клеточный ответ на повреждение ДНК защищает генетическую информацию, хранящуюся в ДНК. Данный механизм клеточной защиты имеет первостепенное значение для предотвращения развития онкологических заболеваний и старения. Клеточный ответ на повреждение ДНК состоит из сложной сети механизмов, контролирующей прохождение по клеточному циклу, а также многочисленных путей репарации ДНК. Нарушение данного механизма является отличительной чертой опухолевых клеток и позволяет таким клеткам приобретать выгоды для них мутации, затрудняющие лечение. Ввиду сложности и многофакторности процесса репарации ДНК многие его стадии в настоящее время недостаточно изучены. Одним из таких процессов является механизм убиквитинирования гистонов вблизи двухцепочечных разрывов ДНК, что, как известно, является ключевой стадией привлечения факторов репарации к месту повреждения. В настоящей работе было показано исключительно важное значение остатка лизина K27 молекулы убиквитина в процессе моноубиквитинирования гистона H2A убиквитин-лигазой RNF168. Полученные данные свидетельствуют о направленной интенсивной диффузии убиквитина из цитоплазмы в ядро, при этом время достижения динамического равновесия составляет менее 10 мин. Проведенное сравнение скорости разрушения убиквитина дикого типа и его варианта с единственным функциональным остатком лизина K27 дает основание предположить высокую значимость депонирования убиквитина в виде ковалентного конъюгата с гистонами H2A в терминах стабильности всего клеточного пула убиквитина.

Ключевые слова: гистоны, убиквитин-лигазы, убиквитинирование, хроматин, репарация ДНК, двухцепочечные разрывы ДНК

DOI: 10.31857/S2686738920040125

Поддержание стабильности генома имеет важное значение для клеточного гомеостаза и сильно зависит от точности процесса репликации ДНК, сегрегации хромосом, а также репарации ДНК. Повреждения ДНК могут возникать под воздействием различных факторов: химических канцерогенов в окружающей среде; метаболитов, вырабатываемых кишечной микробиотой; свободных радикалов, продуцируемых активированными иммунными клетками – моноцитами и макрофагами; ультрафиолетового и ионизирующего излучения, а также некоторых фармацевтических препаратов, например, генотоксических противо-

опухолевых лекарств [1]. Эти и другие факторы приводят к мутациям генов и повреждениям хромосом. В зависимости от типа повреждения ДНК и стадии клеточного цикла для репарации задействуются различные ответные клеточные реакции [2]. Они имеют общий принцип действия: повреждение ДНК вызывает изменения в ее структуре или остановку репликации, что распознается сенсорными белками. Данные белки рекрутируют сигнальные и нижестоящие эффекторные белки, которые в свою очередь инициируют каскады, запускающие клеточные процессы для репарации повреждений ДНК или устранения клеток с непоправимыми изменениями. Репарация повреждений ДНК, в особенности двухцепочечных разрывов, которые считаются наиболее опасными, имеет решающее значение для поддержания целостности генома и клеточного гомеостаза [3]. Клеточный ответ на двухцепочечные разрывы ДНК требует сложного и многоступенчатого взаимодействия различных факторов, в числе которых посттрансляционные модифика-

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, Россия

² Московский Государственный Университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: anna.kudriaeva@gmail.com

ции хроматина и хроматин-ассоциированных белков.

Хроматин представляет из себя высококомпактизованную и динамическую структуру, которая регулирует доступность ДНК во время различных клеточных событий. Хроматин обычно существует в двух формах: плотно упакованного гетерохроматина и имеющего деспирализованные участки эухроматина. В состав хроматина входят ДНК, гистоны, негистоновые белки и РНК. Структура хроматина может регулироваться различными процессами, одним из которых является посттрансляционные модификации (ПТМ) гистонов [4].

Одним из важнейших видов ПТМ гистоновых белков является убиквитинирование, которое, помимо репарации, участвует в большом количестве клеточных процессов, таких как деградация, сортировка, локализация, активация и репрессия синтеза белков. Известно до 14 различных семейств убиквитина и убиквитин-подобных белков, различающихся по аминокислотной последовательности, но имеющих характерную пространственную структуру. Ковалентное присоединение убиквитина к субстратам осуществляется при помощи системы, состоящей из трех ферментов – E1 (activating enzyme), E2 (conjugating enzyme) и убиквитин-лигазы E3. Специфичность модификации субстратов достигается за счет иерархичности системы убиквитинирования. Так, в клетках млекопитающих существует всего два типа убиквитин-активирующих ферментов E1 – Uba1 и Uba6, около 55 конъюгирующих ферментов E2 и около 600 убиквитин-лигаз E3 [5].

Существует множество способов модификации белков убиквитином, из которых выделяют моноубиквитинирование (одного или нескольких сайтов), а также полиубиквитинирование с разными параметрами связи и длинами убиквитиновых цепей [6]. Семь ε-аминогрупп аминокислотных остатков лизина (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63), входящих в состав убиквитина, позволяют ему образовывать изопептидные связи. Как правило, первый убиквитин присоединяется своей C-концевой карбоксильной группой к аминогруппе остатка лизина, входящего в полипептидную цепь субстрата. Дальнейший рост цепи обусловлен образованием изопептидных связей между внутренними аминокислотными остатками лизинов уже встроенного убиквитина и C-концевым остатком глицина нового убиквитина. Параметры цепей крайне разнообразны: они могут быть как гомогенными (то есть образовывать связи через аминокислотные остатки лизинов в строго определенном положении), так и гетерогенными (комбинировать разные типы связей), последние в свою очередь могут разветв-

ляться посредством убиквитинирования сразу по нескольким сайтам. Считается, что значение сигнала убиквитинирования зависит от типа связи и длины убиквитиновой цепи. Удаление этих сигналов осуществляется с помощью деубиквитирующих ферментов (DUB). Функциональные роли убиквитиновых цепей, образованных через аминокислотные остатки лизина K48 и K63 в составе убиквитина, достаточно хорошо изучены. K48-полиубиквитинирование считается сигналом протеасомной деградации, тогда как K63-убиквитинирование обеспечивает белок-белковые взаимодействия в различных процессах, в том числе при репарации ДНК [7]. Помимо важности K11 и M1 (линейные цепи, образованные через N-концевой метионин) убиквитиновых связей в регуляции клеточного цикла и активации NF-κB [8, 9], мало что известно о функциях других неканонических цепей убиквитина (K6, K27, K29, K33).

Сравнительно недавно стало известно о существенной роли убиквитинирования в некоторых механизмах репарации ДНК [10]. Так, активация серин/треониновой протеинкиназы, индуцированная двухцепочечными разрывами ДНК, вызывает каскад фосфорилирования и убиквитинирования белков, благодаря чему образуются супрамолекулярные комплексы, координирующие клеточный ответ на повреждения ДНК. При таком типе повреждения ДНК благодаря деятельности двух убиквитин-лигаз, RNF8 и RNF168, которые модифицируют гистоны хроматина H2A и H2A.X, а также гистон H1, в непосредственной близости от повреждения, к месту разрыва привлекаются различные факторы репарации. Модифицированные убиквитином белки в местах повреждения могут быть подвергнуты деубиквитинированию соответствующими ферментами [11]. Известно, что сайт моноубиквитинирования гистона H2A E3 лигазой RNF168 расположен в N-концевой части белка на аминокислотных остатках K13/K15 [12, 13], однако, убиквитинирование данного гистона может осуществлять и по остаткам K118/K119 [14]. Ранее было показано, что убиквитинирование по остаткам K13/K15 RNF168 осуществляет независимо от аминокислотного остатка K27 в составе убиквитина [15]. До сих пор неочевидно, почему для данной модификации столь существенен именно этот аминокислотный остаток в составе убиквитина.

На сегодняшний день существует широкий набор методов визуализации белков в живой клетке, но, несмотря на это, поиски альтернативных способов не прекращаются. Относительно недавно был предложен метод сайт-специфического внутриклеточного мечения белков PRIME (PRobe Incorporation Mediated by Enzymes), основой которого является модифицированная липоат-лигаза типа A (LplA), содержащая три мутации

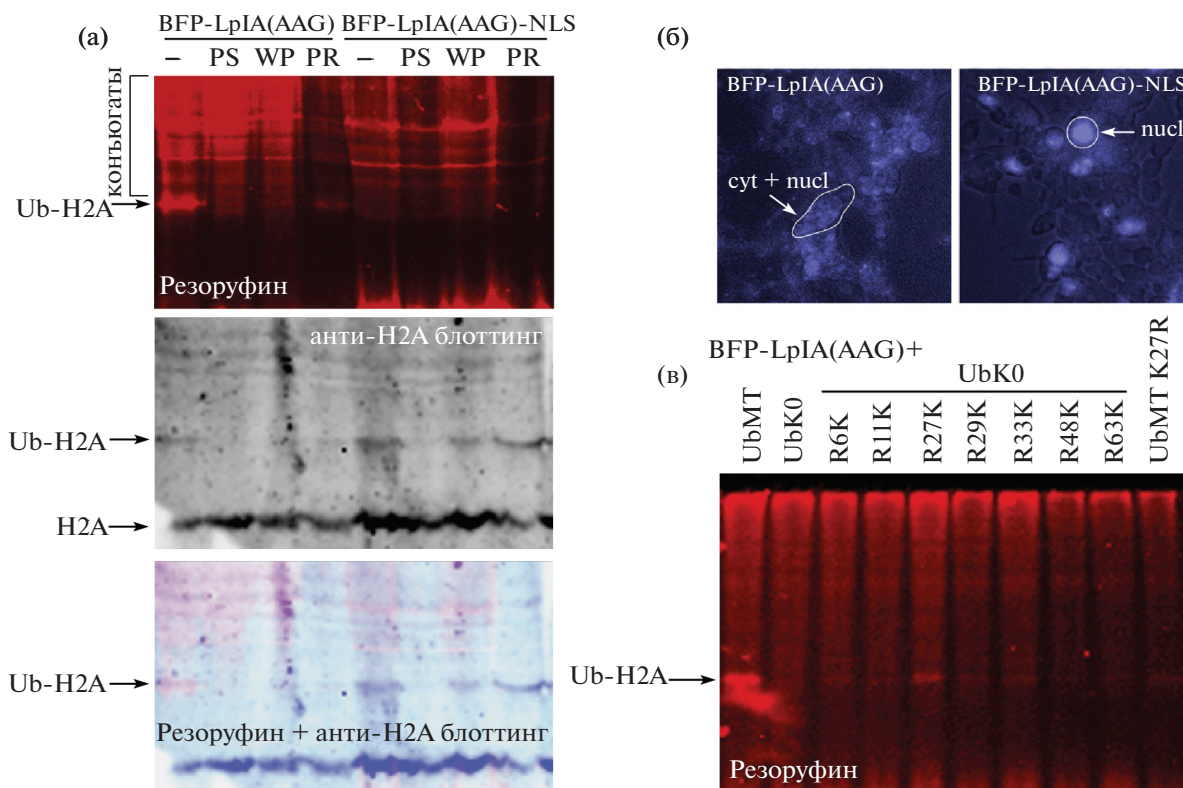


Рис. 1. (а) Клетки HEK293, экспрессирующие Ub и BFP-LpIA(AAG) с NLS (nuclear localization signal) или без него, инкубировали с ДМСО (–), ингибитором протеасомы PS-341 (PS) или ингибиторами DUB PR-619 (PR) и WP1130 (WP), а затем обрабатывали резоруфином. Лизаты клеток разделяли в ПААГ, далее детектировали флуоресценцию или проводили иммуноблоттинг с использованием антител против гистона H2A. Нижняя панель демонстрирует совмещение данных флуоресцентного анализа и иммуноблоттинга. Моноубиквитинированный гистон обозначен как Ub-H2A. (б) Флуоресцентная микроскопия клеток, коэкспрессирующих Ub и BFP-LpIA(AAG) или BFP-LpIA(AAG)-NLS, в синей области видимого спектра. (в) Клетки HEK293, коэкспрессирующие различные варианты Ub совместно с BFP-LpIA(AAG), обрабатывали резоруфином. Лизаты клеток разделяли в ПААГ, далее анализировали интенсивность флуоресценции в геле.

в активном центре E20A/F147A/H149G [далее LpIA(AAG)], способная ковалентно присоединять молекулу низкомолекулярного флуорофора резоруфина (ex/em 560/585 нм) к аминокислотной последовательности (ligase acceptor peptide, LAP), слитной с белком-мишенью [16]. Следуя вышеописанной методологии, последовательности ДНК, кодирующие убиквитин в единой рамке считывания с пептидом LAP (LAP-Ub), были интегрированы в лентивирусный вектор, кодирующий слитный белок BFP-LpIA(AAG), где BFP – мономерный вариант синего флуоресцентного белка. Последовательности LAP-Ub и BFP-LpIA(AAG) переместились сайтом внутренней посадки рибосомы (IRES, Internal Ribosome Entry Site), и находились под контролем CMV промотора. При этом пептид LAP был сопряжен с N-концом убиквитина, что, согласно имеющимся литературным данным, не должно драматически повлиять на физиологические свойства последнего [17]. С-конец белка был

сохранен в нативной форме, чтобы обеспечить рекомбинантному LAP-Ub все функции Ub дикого типа.

Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие LAP-Ub (все дальнейшие варианты Ub содержали LAP и далее обозначаются как Ub) и ZsGreen-LpIA(AAG), инкубировали с 5 мкМ резоруфина в течение 20 мин. Затем клетки многократно промывали средой DMEM для удаления непрореагировавшего субстрата. Увеличение концентрации флуорофора и времени инкубации затрудняет процесс вымывания несвязавшегося резоруфина из клеток, что, в свою очередь, осложняет интерпретацию результатов. Отмытые клетки лизировали, далее лизаты анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) с последующей визуализацией флуоресценции в геле, а также иммуноблоттинга (рис. 1а). При анализе массового распределения полиубиквитиновых конъюгатов, была зафиксирована интенсивная полоса с массой около 25 кДа, которая была идентифицирована как моноубиквитинирован-

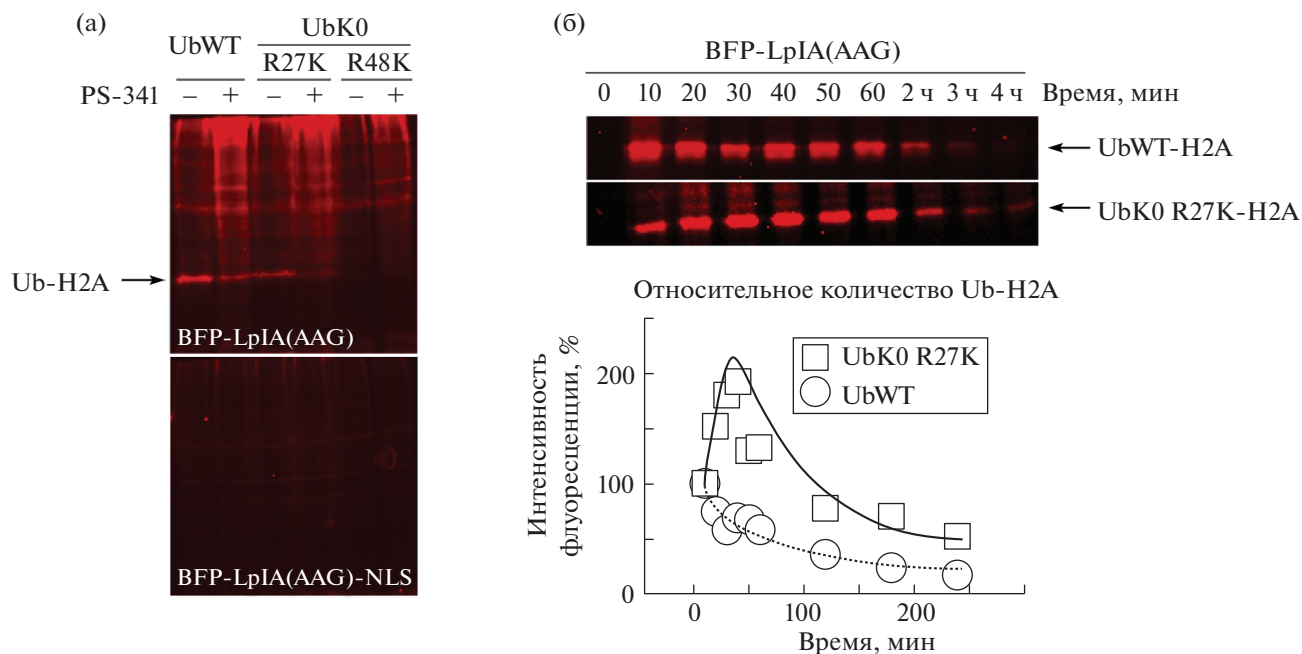


Рис. 2. (а) Клетки HEK293, коэкспрессирующие Ub, UbK0 K27, UbK0 K48 совместно с BFP-LpIA(AAG) с NLS (nuclear localization signal) или без него, обрабатывали резорфурином. Лизаты клеток разделяли в ПААГ, далее анализировали интенсивность флуоресценции в геле. (б) Клетки, стабильно экспрессирующие Ub WT и UbK0 R27K, обрабатывали резорфурином, лизировали в указанные временные промежутки, лизаты разделяли в ПААГ, далее анализировали интенсивность флуоресценции в геле. График демонстрирует интенсивность флуоресценции полосы, соответствующей конъюгатам UbK0 R27K-H2A и UbWT-H2A, в зависимости от времени.

ный гистон H2A/H2A.X [15] (рис. 1а). Распределение интенсивности флуоресценции свидетельствует, что гистон H2A акцептирует на себя до 10% меченого резорфурином убиквитина.

Использование лигазы LpIA(AAG) с сигналом ядерной локализации (рис. 1б, BFP-LpIA(AAG)-NLS, NLS – nuclear localization signal) показало, что BFP-LpIA(AAG)-NLS была практически не способна модифицировать рекомбинантный Ub (рис. 1а). Данное наблюдение свидетельствует, что H2A подвергается модификации Ub, меченым резорфурином, который диффундирует из цитоплазмы. При дополнительной обработке клеток ингибитором протеасомы PS-341, аналогично работе [18], нами было обнаружено усиление активности деубиквитирующих ферментов в отношении убиквитинированного гистона (рис. 1а). В то время как обработка ингибиторами DUB PR-619 и WP1130 скорее всего приводит к перераспределению убиквитина на альтернативные мишени и, как следствие, к уменьшению интенсивности полосы, соответствующей убиквитинированному гистону H2A.

Для изучения особенностей внутриклеточного убиквитинирования гистона H2A были созданы варианты убиквитина, содержащие только по одному функциональному аминокислотному остатку лизина из семи, остальные аминокислотные остатки лизина были заменены на аргинин. Та-

ким образом, в нашем распоряжении было 10 различных вариантов убиквитина: дикий тип убиквитина Ub WT, UbK0 (все семь функциональных аминокислотных остатков лизина заменены на аргинины) и варианты K0 с возвратными заменами UbK0 R6K, UbK0 R11K, UbK0 R27K, UbK0 R29K, UbK0 R33K, UbK0 R48K, UbK0 R63K. Обработка клеток линии HEK293 резорфурином, коэкспрессирующих данные варианты убиквитина с BFP-LpIA(AAG), и последующий анализ флуоресценции в ПААГ выявил, что полоса, соответствующая гистону H2A, была обнаружена только в случае варианта UbK0 R27K (рис. 1в), что соотносится с ранее опубликованными данными [15]. Для дополнительного подтверждения функциональной значимости аминокислотного остатка лизина K27 в составе убиквитина в процессе модификации гистона H2A, нами был создан вариант убиквитина дикого типа, в котором на аргинин был заменен исключительно остаток K27 – UbWT K27R. Анализ интенсивности полосы, соответствующей конъюгату Ub-H2A, подтвердил исключительно важное значение лизина K27 в процессе моноубиквитинирования гистона H2A (рис. 1в).

Обработка резорфурином клеток линии HEK293, коэкспрессирующих варианты Ub дикого типа, Ub R48K и UbK0 R27K вместе с BFP-LpIA(AAG)-NLS, подтвердили ранее обнаружен-

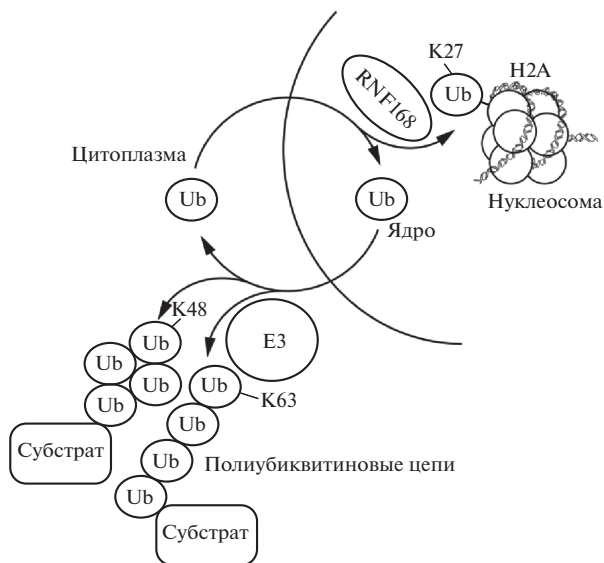


Рис. 3. Убиквитин-лигазы цитоплазматической и ядерной локализации конкурируют между собой за пул убиквитина, интенсивно обменивающийся между ядром и цитоплазмой, при этом аминокислотный остаток K27 в составе убиквитина вероятно структурно необходим в процессе моноубиквитинирования гистона H2A E3 лигазой RNF168.

ный феномен отсутствия мечения всех вариантов Ub, включая вариант K27, в ядре (рис. 2а). Наиболее разумным объяснением данного факта является стерическая недоступность Ub в составе конъюгата Ub-H2A для его модификации флуорофором. Проведенное сравнение скорости накопления и последующего высвобождения убиквитина дикого типа и варианта UbK0 R27K (рис. 2б) из ковалентного конъюгата с гистона H2A выявило факт усиленного депонирования убиквитина в виде ковалентного конъюгата с H2A в случае UbK0 R27K. При этом динамическое равновесие между цитоплазматическим и ядерным пулом убиквитина достигалось за времена менее 10 мин.

Таким образом, в настоящей работе была продемонстрирована структурная значимость аминокислотного остатка K27 в составе убиквитина в процессе убиквитинирования гистона H2A. Полученные данные вместе с опубликованными ранее [18] позволяют предположить, что убиквитин-лигазы цитоплазматической и ядерной локализации конкурируют между собой за пул убиквитина, постоянно обменивающийся между ядром и цитоплазмой (рис. 3). Наличие только одного функционального аминокислотного остатка лизина K27 в составе убиквитина в значительной степени смещает данное равновесие в сторону образования ковалентного конъюгата с гистона H2A.

Изученные фундаментальные аспекты моноубиквитинирования гистона H2A в значительной

степени детализируют сигнальную роль данной модификации в процессе репарации ДНК.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была поддержана проектом РНФ № 19-74-00139 “Изучение топологической предпочтительности модификации гистона H2A/H2A.X убиквитин-лигазой RNF168”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Roos W.P., Thomas A.D., Kaina B.* // Nat. Rev. Cancer. 2016. V. 16. № 1. P. 20–33.
2. *Shaltiel I.A., Krenning L., Bruinsma W., Medema R.H.* // J. Cell Sci. 2015. V. 128. № 4. P. 607–620.
3. *Jackson S.P., Bartek J.* // Nature. 2009. V. 461. № 7267. P. 1071–1078.
4. *Dabin J., Fortuny A., Polo S.E.* Epigenome Maintenance in Response to DNA Damage //Mol. Cell. 2016. V. 62. № 5. P. 712-27. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.006>.
5. *Berndsen C.E., Wolberger C.* // Nat. Struct. Mol. Biol. 2014. V. 21. № 4. P. 301–307.
6. *Kudriaeva A.A., Belogurov A.A.* // Biochem. 2019. V. 84. № Suppl 1. P. 159–192.
7. *Jackson S.P., Durocher D.* // Mol. Cell. 2013. V. 49. № 5. P. 795–807.
8. *Iwai K., Tokunaga F.* // EMBO Rep. 2009. V. 10. № 7. P. 706–713.
9. *Matsumoto M.L., Wickliffe K.E., Dong K.C., Yu C., Bosanac I., Bustos D., Phu L., Kirkpatrick D.S., Hymowitz S.G., Rape M., et al.* // Mol. Cell. 2010. V. 39. № 3. P. 477–484.
10. *van Attikum H., Gasser S.M.* // Trends Cell Biol. 2009. V. 19. № 5. P. 207–217.
11. *Mosbech A., Lukas C., Bekker-Jensen S., Mailand N.* // J. Biol. Chem. 2013. V. 288. № 23. P. 16579–16587.
12. *Gatti M., Pinato S., Maspero E., Soffientini P., Polo S., Penengo L.* // Cell Cycle. 2012. V. 11. № 13. P. 2538–2544.
13. *Mattiroli F., Vissers J.H.A., Van Dijk W.J., Ikpa P., Citterio E., Vermeulen W., Marteijn J.A., Sixma T.K.* // Cell. 2012. V. 150. № 6. P. 1182–1195.
14. *Wilson M.D., Benlekbir S., Fradet-Turcotte A., Sherker A., Julien J.P., McEwan A., Noordermeer S.M., Sicheri F., Rubinstein J.L., Durocher D.* // Nature. 2016. V. 536. № 7614. P. 100–103.
15. *Gatti M., Pinato S., Maiolica A., Rocchio F., Prato M.G., Aebbersold R., Penengo L.* // Cell Rep. 2015. V. 10. № 2. P. 226–238.
16. *Uttamapinant C., White K.A., Baruah H., Thompson S., Fernández-Suárez M., Puthenveetil S., Ting A.Y.* // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2010. V. 107. № 24. P. 10914–9.
17. *Shabek N., Herman-Bachinsky Y., Ciechanover A.* // Proc. Natl. Acad. Sci. 2009. V. 106. № 29. P. 11907–11912.
18. *Dantuma N.P., Groothuis T.A.M., Salomons F.A., Neefjes J.* // J. Cell Biol. 2006. V. 173. № 1. P. 19–26.

TOPOLOGICAL FEATURES OF HISTONE H2A MONOUBIQUITINATION

A. A. Kudriaeva^{a,#}, Corresponding member of the RAS V. M. Lipkin^a, and A. A. Belogurov, Jr.^{a,b}

^a *Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^b *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: anna.kudriaeva@gmail.com*

The cellular response to DNA damage protects the essential information stored in the genome. This mechanism is crucial in terms of the prevention of the cancer and aging progression. The DNA damage response (DDR) consists of a complex network controlling the cell cycle, as well as the multiple mechanisms of the DNA repair. The DDR disruption is a cornerstone feature of the tumor cells, which allows it to enhance beneficial mutations that prevent successful treatment. The important checkpoints of the DDR are currently poorly understood due to the complexity and diversity of the DNA repair machinery. Histone ubiquitination is intensively involved in the repair of the double-stranded DNA breaks. This post-translational modification is known to be a key factor in the recruitment of the repair factors to the DNA damage site. Here the crucial role of the ubiquitin lysine residue K27 in the process of histone H2A monoubiquitination mediated by the ubiquitin ligase RNF168 has been showed. Presented data suggest forced and intensive diffusion of ubiquitin from the cytoplasm to the nucleus, which is characterized by the dynamic equilibrium less than 10 minutes. The comparison of the rate of turnover of the wild-type ubiquitin and its variant with a single functional lysine residue K27 suggests an important role of the deposition of ubiquitin as a covalent conjugate with histone H2A in terms of the stability of the entire ubiquitinome pool.

Keywords: histones, ubiquitin ligases, ubiquitination, chromatin, DNA repair, double-stranded DNA breaks