

*На правах рукописи*

**ЖИГАЛОВА НАДЕЖДА АЛЕКСЕЕВНА**

**Функциональная значимость сумоилирования метил-ДНК-  
связывающего белка Каизо**

(03.01.03 – молекулярная биология)

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**МОСКВА-2010**

**Работа выполнена в лаборатории геномики и эпигеномики позвоночных  
Учреждения Российской академии наук Центр «Биоинженерия» РАН**

**Научные руководители:** кандидат биологических наук  
**Прохорчук Егор Борисович**  
кандидат физико-математических наук  
**Женило Светлана Валерьевна**

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук  
**Коробко Игорь Викторович**  
  
кандидат биологических наук  
**Саложин Сергей Владимирович**

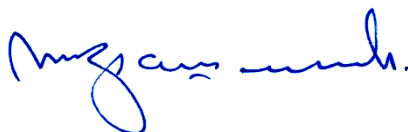
**Ведущая организация:**  
Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной биологии им. В.А.  
Энгельгардта РАН

Защита диссертации состоится «\_\_» октября 2010 г. в \_\_\_\_ часов на заседании Совета Д  
501.001.76 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Московском  
государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119992, Москва,  
Ленинские горы, МГУ, НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского,  
ауд. 536.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Биологического факультета МГУ  
имени М.В.Ломоносова.

Автореферат разослан «\_\_» сентября 2010г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат биологических наук



И.А. Крашенинников

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### Актуальность темы

Изучение механизмов регуляции генной активности является ключевой задачей в понимании того, как работает геном. Обратимые изменения активности генов называют «эпигенитическими». По современным представлениям эпигенетика- наука о надгенетических процессах функциональной геномики- в первую очередь рассматривает три класса явлений- метилирование ДНК, гистоновый код и регуляцию генома на уровне интерферирующих РНК. Все три механизма реализации генетической информации вовлечены, в частности у позвоночных организмов, в такие клеточные процессы, как ранний эмбриогенез и гаметогенез, дифференцировка, инактивация X-хромосомы, геномный импринтинг, онкологическая трансформация клеток. Например, нарушение метилирования ДНК может приводить к несвоевременной активации протоонкогенов, а аномально высокий уровень метилирования генов-супрессоров, подавляющих злокачественный рост, будет способствовать продвижению клеток по пути к трансформированному состоянию вплоть до метастазирования. Изучение метилирования ДНК является важным для понимания механизмов возникновения и развития различных заболеваний, а также может служить значимым маркером для ранней диагностики рака.

Метилирование ДНК может оказывать влияние на транскрипцию генов либо за счет изменения констант связывания белков транскрипционных активаторов с ранее неметилированной ДНК, либо за счет привлечения транскрипционных факторов, специфически взаимодействующих с метилированной ДНК. Последние могут входить в белковые комплексы с различными гистоновыми трансферазами и за счет них изменять состояние окружающего хроматина. Метил ДНК- связывающие белки классифицируются в семейства. Одно из них состоит из MBD-белков (MBD1, MBD2, MBD4, MeCP2) с характерным MBD (methyl binding domain) доменом, с помощью которого происходит связывание с одиночными метилированными CpG парами. Эти белки участвуют в контроле стабильности генома, раннем эмбриональном развитии, дифференцировке, созревании нейронов и др. Второе семейство состоит из Каизо и Каизо-подобных белков (Каизо, ZBTB4 и ZBTB38). В отличие от MBD белков Каизо взаимодействует с метилированными CGCG через три С-концевых «цинковых пальца» C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> типа. Некоторые исследователи приписывают Каизо способность связывать и неметилированные участки ДНК, содержащие консенсусную последовательность CTGCNA, однако, на сегодня нет веских данных экспериментов *in vivo* в поддержку этой гипотезы. Несмотря на общую доменную структуру белков

внутри обоих семейств функциональная значимость каждого белка в организме эукариот уникальна. При изучении свойств и MBD и Каизо подобных белков методами генетического нокаута было показано, что отсутствие одного белка или даже нескольких (Каизо, MeCP2, MBD2 и MBD1) белков не приводит к остановке эмбрионального развития у млекопитающих. На этом фоне контрастом выглядит эмбриональная летальность у мышей с отсутствующим геном поддерживающей метилтрансферазы Dnmt1. Таким образом, пока не установлена прямая связь между непреложной важностью самой модификации метилирования ДНК и ее белковыми спутниками, которые долгое время считались ключевыми в интерпретации метилирования и перевода этого сигнала от молекулы ДНК к непосредственному функционированию генома. В то время, как генетический нокаут Каизо у мышей не приводит к ярко выраженному фенотипу (только в случае Каизо<sup>-/-</sup> мышей в модели APC/Min была обнаружена их устойчивость к возникновению рака кишечника), у земноводных (на модели *Xenopus laevis*) Каизо необходим для нормального развития, и уменьшение его количества приводит к гибели эмбрионов. Тем не менее, обнаруженная роль Каизо в раке кишечника в модели APC/Min открывает новую принципиальную возможность его использования в качестве мишени в терапии онкологических заболеваний. Для достижения этой цели необходимо более глубокое понимание функциональной значимости Каизо в клетках млекопитающих.

Известно, что большое разнообразие функционально активных белков и транскрипционных факторов достигается в клетках эукариот и благодаря посттрансляционным модификациям (ПТМ). Каизо является репрессором транскрипции и, вероятно, как и все транскрипционные факторы, может подвергаться ПТМ, которые потенциально могут оказывать существенное влияние на его свойства и функции. В данной работе охарактеризовано сумоилирование Каизо. Сумоилирование представляет собой процесс ковалентного присоединения белка SUMO к лизину белков-субстратов за счет серии ферментативных реакций. Сумоилирование является малоизученной, но важной ПТМ у эукариот, поскольку может оказывать влияние на клеточную локализацию белков, ядерный транспорт, на спектр взаимодействующих белков и ко-факторов, на их связывание с ДНК, на контроль функций хроматина, и в частности на транскрипцию, репликацию, репарацию и организацию гетерохроматина. Таким образом, определение функциональной значимости сумоилирования метил-ДНК-связывающего белка Каизо позволит полнее раскрыть его роль в регуляции экспрессии генов мишеней.

## **Цель и задачи исследования**

Целью настоящей работы является изучение роли сумоилирования метил-ДНК-связывающего белка Каизо в связывании с ДНК, подавлении транскрипции и взаимодействии с белками ко-репрессорами.

Для этого в работе решались следующие задачи:

1. Определить, какие аминокислоты белка Каизо подвергаются сумоилированию.
2. Оценить влияние сумоилирования на клеточную локализацию Каизо и на его взаимодействие с белками ко-репрессорами.
3. Охарактеризовать влияние сумоилирования на репрессивные свойства белка Каизо.
4. Определить влияние сумоилирования на спектр участков связывания Каизо в полногеномном масштабе.

## **Научная новизна и практическая значимость**

В представленной работе впервые в мире получены данные о функциональной важности сумоилирования Каизо. В работе продемонстрированы различные аспекты изменения свойств сумоилированного Каизо такие, как внутриклеточная локализация, транскрипционная активность, белок-белковые взаимодействия. Особенностью работы также является использование новейших методических подходов к изучению ДНК-связывающих свойств белка *in vivo* с привлечением геномного секвенирования на технологических платформах Next Generation Sequencing. Результаты работы могут быть использованы при создании метил ДНК связывающих смол на основе доменов «цинковые пальцы» Каизо. Эти смолы, наравне со смолами на основе MBD, находят свое применение в оценке уровня метилирования геномных районов, что является важной задачей в характеристике этиологии различных заболеваний, включая раковые и сердечно-сосудистые.

## **Апробация работы**

Полученные в диссертации результаты были представлены автором на следующих международных и российских конференциях: 13-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых (Москва, 2009), конференция «Горизонты нанобиотехнологии» (Звенигород, 2009).

**Личный вклад автора** заключается в проведении экспериментальных и теоретических исследований. Основные результаты работы получены лично автором при его

непосредственном участии в планировании и проведении экспериментов. Имена соавторов указаны в соответствующих публикациях.

## **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ, в том числе 1 статья в журнале, входящем в перечень ВАК.

## **Объем и структура диссертации**

Материалы диссертации изложены на \_\_\_\_ странице машинописного текста и включают \_\_\_\_ рисунков и \_\_\_\_ таблиц. Диссертация состоит из разделов: “Используемый список сокращений”, “Введение”, “Цель и задачи работы”, “Обзор литературы”, “Материалы и методы”, “Результаты и их обсуждение”, “Выводы”, “Список публикаций по теме диссертации”, “Список цитируемой литературы”, который содержит \_\_\_\_ отечественных и \_\_\_\_ иностранных источника.

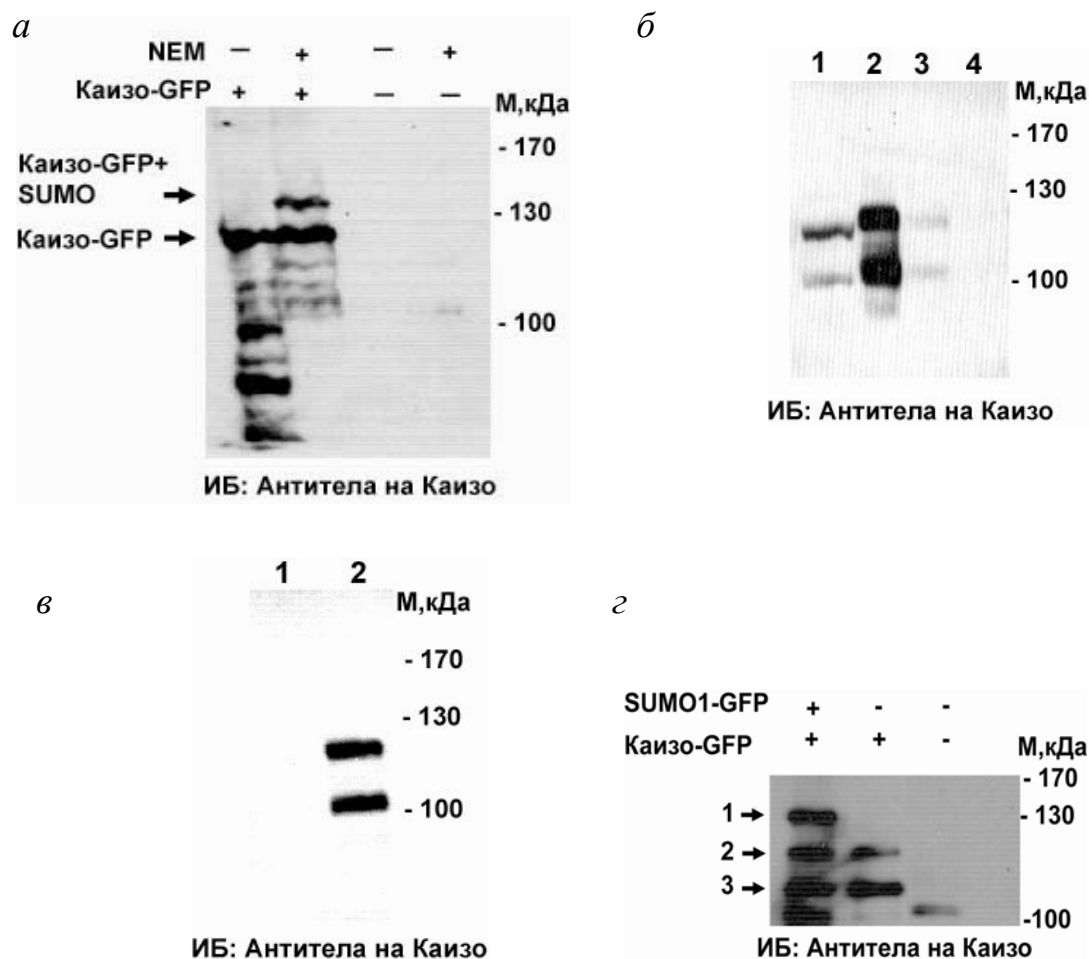
## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

### **1. Каизо подвергается посттрансляционной модификации сумоилированию**

#### **SUMO1.**

Ранее в нашей лаборатории было показано, что белок Каизо может обладать аномальной подвижностью в ПААГ в том случае, когда ядерные экстракты выделяли в присутствии ингибиторов протеаз NEM - N-этил малеимида («Sigma», США). Одним из возможных вариантов объяснения данного факта является наличие ПТМ, которая ведет к значительным изменениям в подвижности белка и стабилизируется ингибитором протеаз NEM. По литературным данным NEM используют в стабилизации убиквитин-подобных ПТМ, а именно, сумоилирования и убиквитинирования (Rosas-Acosta G. et al., Mol. & Cell. Proteomics, 2005).

Было решено проверить, может ли белок Каизо действительно подвергаться убиквитин-подобной ПТМ. Для этого были выделены ядерные экстракты из клеточной линии НЕК293 с добавлением или без добавления ингибитора протеаз - NEM. С помощью иммуноблоттинга (гибридизация с поликлональными антителами на Каизо) был детектирован Каизо-GFP размером 120кДа как в присутствии, так и в отсутствии NEM (рис. 1, *a*). И только в образце с добавлением ингибитора протеаз, появляется форма белка в районе 130кДа, что предполагает наличие убиквитин-подобной ПТМ белка Каизо (рис. 1, *a*).



**Рисунок 1. Каизо сумоилируется SUMO1.** *а* – Иммуноблоттинг (ИБ) ядерных экстрактов трансфицированных Каизо-GFP (+) и нетрансфицированных (-) из клеточной линии HEK293, полученных в присутствии (+) и отсутствии (-) ингибитора протеаз NEM (N-ethyl maleimide); *б, в* – Анализ ядерных экстрактов клеточной линии HEK293. Иммунопреципитация (ИП): *б* – 1-ядерные экстракты, 2-антитела на Каизо, 3-антитела на SUMO1, 4-антитела на SUMO2/3; *в* – 1- антитела на SUMO2/3, 2-антитела на SUMO1; *г* – Анализ клеточных лизатов HEK293, трансфицированных (+) и не трансфицированных (-) Каизо-GFP и SUMO1-GFP. На рис. 1, *г* стрелочками обозначены: 1-Каизо-GFP+SUMO1-GFP, 2- Каизо-GFP+SUMO1, 3- Каизо-GFP. ИБ: *а, б, в, г,* - поликлональные антитела на Каизо.

У млекопитающих были обнаружены три изоформы белка SUMO: SUMO1, SUMO2/3 (SUMO2 и SUMO3 гомологичные по строению, но не взаимозаменяемые изоформы). Для того чтобы определить, является ли модификация белка Каизо сумоилированием, был сделан иммунопреципитационный анализ ядерных экстрактов линии клеток HEK293 с использованием антител на SUMO1 и SUMO2/3. Результаты иммуноблоттинга показали, что полосы модифицированной и немодифицированной форм Каизо детектируются после иммунопреципитации с SUMO1 антителами, но не с SUMO2/3 в районе 100кДа и 120кДа (рис. 1, *б, в*).

Данный факт может быть интерпретирован следующим образом: 1) модифицированная форма Каизо – это сумоилированная SUMO1 форма белка Каизо, при этом благодаря способности Каизо димеризоваться при иммунопреципитации с антителами на SUMO1 была детектирована и немодифицированная форма белка; 2) обе формы Каизо, и модифицированная, и немодифицированная входят в белковый комплекс, в котором присутствует SUMO1. На основании этого было решено проверить, может ли белок Каизо модифицироваться SUMO1, а не SUMO2/3.

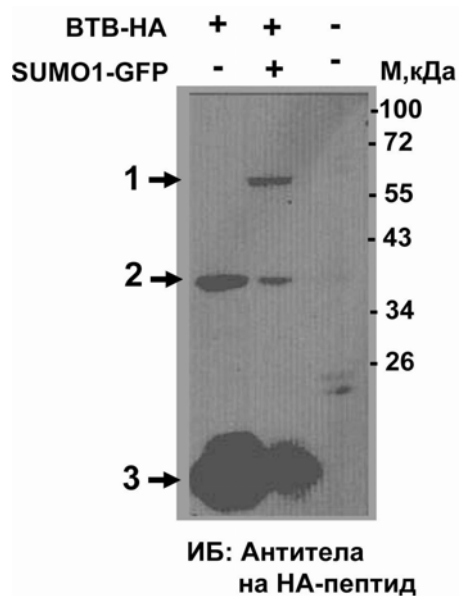
Для этого был дополнительно проведен анализ клеточных лизатов HEK293, трансфицированных только Каизо-GFP или совместно Каизо-GFP и SUMO1-GFP. Результаты иммуноблоттинга показали, что в случае совместной трансфекции Каизо-GFP и SUMO1-GFP появляется дополнительная полоса в районе между 130кДа и 170кДа (рис. 1, *з*), которая, по всей видимости, соответствует модифицированному белку Каизо-GFP + SUMO1-GFP. Таким образом, показано, что метил-ДНК-связывающий белок Каизо подвергается SUMO1-посттрансляционной модификации.

## **2. Сумоилированию подвергается ВТВ домен белка Каизо.**

Показано, что в транскрипционных факторах сайты сумоилирования могут располагаться как внутри функциональных доменов, так и за пределами функциональных последовательностей белков. N-концевой домен белка Каизо представлен репрессивным ВТВ/POZ доменом, принимающим участие в гомо- и гетеродимеризации, взаимодействии с белковыми факторами, а С-концевой домен «цинковые пальцы» отвечает за взаимодействие с белком p120 и за связывание с ДНК. Для определения домена белка Каизо, который подвергается сумоилированию, были получены конструкции с различными делециями в кДНК Каизо. При этом минимальная конструкция содержала только последовательность, кодирующую ВТВ домен Каизо. Полученные конструкции, в присутствии или отсутствии SUMO1-GFP, трансфицировали в линию клеток HEK293, затем иммунопреципитировали экстракты с НА-агарозой, и проводили иммуноблоттинг с НА-антителами. На рисунке 2 показано, что в случае трансфекции конструкции, содержащей ВТВ-домен, присутствуют две полосы: одна соответствует ВТВ-домениу белка Каизо (3, рис.2), а вторая, по всей видимости, его сумоилированной форме (2, рис.2). В присутствии же SUMO1-GFP можно наблюдать наличие дополнительной полосы в районе между 55кДа и 72кДа (1, рис.2), соответствующей ВТВ-SUMO1-GFP.

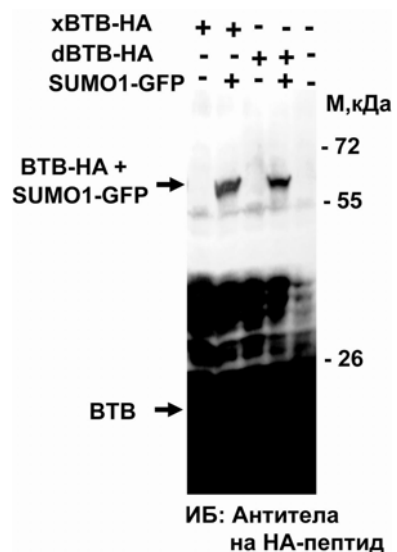
Таким образом, именно ВТВ домен белка Каизо подвергается SUMO1 модификации в клетках млекопитающих.





**Рисунок 2. ВТВ домен белка Каизо необходим для SUMO1 модификации.** Иммуноблоттинг (ИБ) ядерных экстрактов клеточной линии НЕК 293, трансфецированной (+) и не трансфецированной (-) конструкциями ВТВ-НА и SUMO1-GFP после иммунопреципитации с НА-агарозой. ИБ: антитела на НА- пептид. На рисунке цифрами и стрелочками указаны: 1 - ВТВ-НА + SUMO1-GFP, 2 – ВТВ + SUMO1, 3 – ВТВ.

Известно, что ВТВ/POZ транскрипционный фактор Каизо встречается в организме всех позвоночных животных от млекопитающих - *H. sapiens* до рыб - *D. rerio*. Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей белка Каизо разных позвоночных животных показал, что ВТВ домен высокоомологичен для человека, мыши, курицы, лягушки и рыбы. Для того чтобы определить, будут ли подвергаться сумоилированию ВТВ домены белка Каизо других позвоночных, были получены конструкции с С-концевым НА-пептидом содержащие последовательность, кодирующую ВТВ домен для *X. laevis* (земноводные - хВТВ-НА) и *D. rerio* (рыбы - dВТВ-НА). Конструкции хВТВ-НА и dВТВ-НА, в присутствии SUMO1-GFP или без SUMO1-GFP были трансфецированы в клеточную линию НЕК293. В результате иммуноблоттинга клеточных лизатов оказалось, что и ВТВ домен *X. Laevis*, и ВТВ домен *D. rerio* подвергаются SUMO1 модификации (рис. 3). Аналогичные данные были получены и для *M. musculus* (мышь - mВТВ-НА).

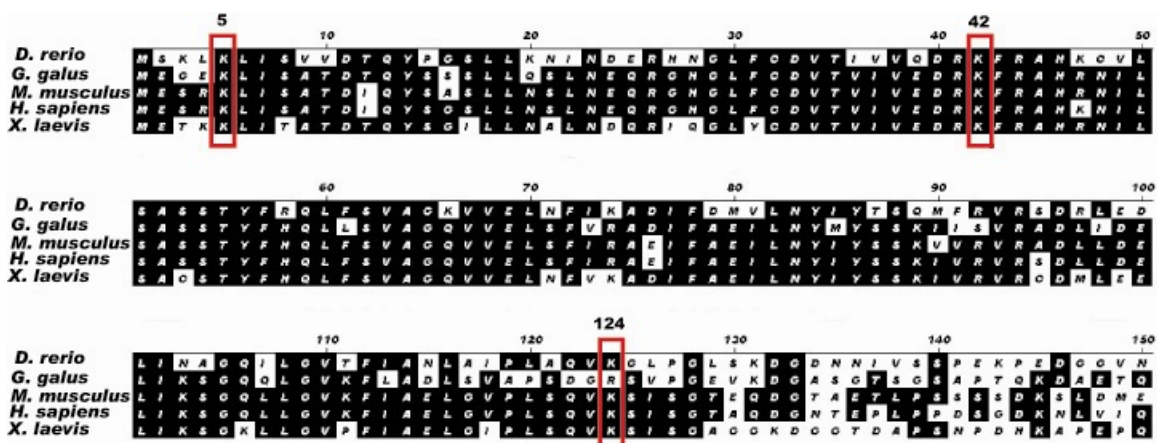


**Рисунок 3. Сумоилирование ВТВ домена белка Каизо является эволюционно консервативным событием.** Иммуноблоттинг (ИБ) анализ клеточных лизатов линии НЕК 293, трансфецированной (+) и нетрансфецированной (-) конструкциями хВТВ-НА, dВТВ-НА и SUMO1-GFP. Иммуноблоттинг (ИБ): антитела на НА-пептид.

Таким образом, сумоилирование ВТВ домена белка Каизо является эволюционно-консервативным событием.

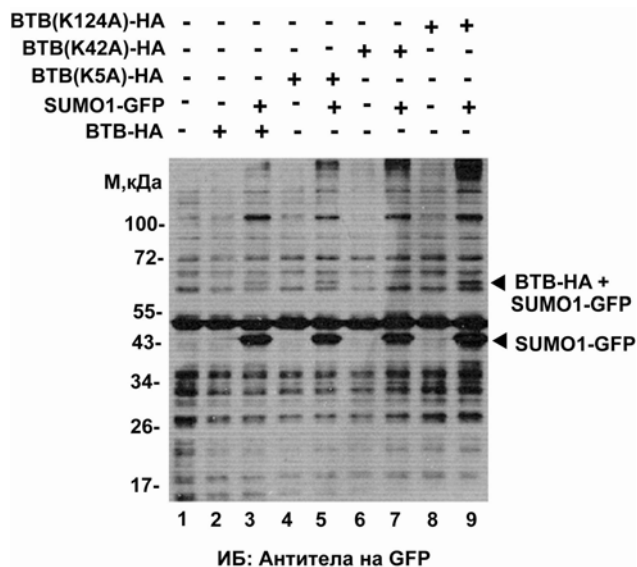
### 3. Определение сайта необходимого для сумоилирования ВТВ домена белка Каизо.

Далее необходимо было определить аминокислотный остаток, по которому Каизо сумоилируется. Известно, что для SUMO-модификации необходимо наличие аминокислоты лизина. Сумоилирование может осуществляться как по консенсусной последовательности – ψКХЕР, так и вне консенсусной последовательности. Поскольку выше было показано, что сумоилирование является эволюционно-консервативным событием, то в результате множественного выравнивания аминокислотных последовательностей ВТВ домена белка Каизо разных позвоночных животных, были выделены три консервативных лизина К-5, 42 и 124, как потенциальные сайты для сумоилирования (рис. 4).



**Рисунок 4. Множественное выравнивание аминокислотной последовательности ВТВ домена белка Каизо разных позвоночных животных. Прямоугольником выделены аминокислотные остатки- лизины, как предполагаемые сайты сумоилирования.**

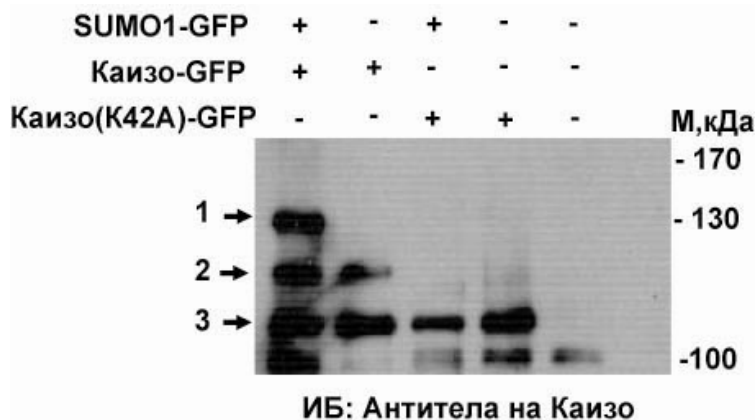
Были получены конструкции с НА-концевым пептидом и ВТВ доменом белка Каизо, содержащие точечные аминокислотные замены: ВТВ(К5А)-НА, ВТВ(К42А)-НА и ВТВ(К124А)-НА. При трансфекции этих конструкций в клеточную линию НЕК293 в присутствии или отсутствии SUMO1-GFP было показано, что для сумоилирования ВТВ домена белка Каизо необходим 42 лизин (рис. 5). Как видно на рисунке 5 отсутствие полосы в районе между 55кДа и 72кДа в дорожке 7 говорит о том, что при мутации 42 лизина ВТВ домен не может сумоилироваться.



**Рисунок 5.** Для сумоилирования ВТВ домена белка Каизо необходим 42 лизин. Иммуноблоттинг (ИБ) анализ клеточных лизатов HEK293, трансфицированных (+) и нетрансфицированных (-) конструкциями Каизо(K5A)-HA, Каизо(K42A)-HA, Каизо(K124A)-HA и SUMO1-GFP. ИБ: Антитела на GFP.

Таким образом, исходя из полученных данных, для сумоилирования ВТВ домена белка Каизо необходим 42 лизин.

Далее была получена конструкция с полноразмерной кДНК белка Каизо, содержащей нуклеотидные замены, приводящие к K42A мутации. Конструкции Каизо(K42A)-GFP и Каизо-GFP были трансфицированы в клеточную линию HEK293 в присутствии или отсутствии SUMO1-GFP. Иммуноблоттинг анализ клеточных лизатов показал, что при наличии мутации по 42 лизину Каизо представлен в клетке в единственной немодифицированной форме (3, рис.6), и добавление Sumo1 не оказывает влияния на подвижность белка. В то время как Каизо, способный сумоилироваться, представлен в виде двух форм, сумоилированной и несумоилированной (2,3, рис.6), а в присутствии Sumo1-GFP добавляется форма белка Каизо, сумоилированного экзогенным Sumo1 (1,2,3, рис.6). Что подтверждает тот факт, для сумоилирования белка Каизо необходим 42 лизин ВТВ домена



**Рисунок 6.** Внесение точечной аминокислотной замены K42A в полноразмерный белок Каизо приводит к потере сумоилирования. Иммуноблоттинг анализ клеточных лизатов HEK293, трансфицированных (+) и нетрансфицированных

конструкциями Каизо(K42A)-GFP, Каизо-GFP и SUMO1-GFP. ИБ: Антитела на Каизо. На рис. стрелочками обозначены: 1-Каизо-GFP+SUMO1-GFP, 2- Каизо-GFP+SUMO1, 3- Каизо-GFP.

#### 4. Влияние сумоилирования на транскрипционную активность белка Каизо.

Поскольку сайт сумоилирования у Каизо картирован в ВТВ домене, который отвечает за репрессивные свойства, то важно понять, каким образом отсутствие сумоилирования будет отражаться на репрессивных свойствах белка Каизо. Для выполнения этого эксперимента были использованы иммортализованные фибробласты мыши с генетическим нокаутом гена *MBD2*. В таких клетках нарушено метил-зависимое подавление транскрипции, приводящее к тому, что экзогенные метилированные конструкции репрессируются лишь частично, оставляя возможности для дальнейшего понижения уровня их активности за счет введения дополнительных белковых факторов. Используя такой метил-зависимый репрессивный анализ, конструкции Каизо-GFP и Каизо(K42A)-GFP в концентрации 25нг и 75нг были трансфицированы в мышинные фибробласты *MBD2*<sup>-/-</sup> совместно с метилированной и неметилированной репортерной люциферазной конструкцией. Результаты измерения относительной люциферазной активности показали, что несумоилированная форма белка Каизо не теряет своих свойств транскрипционного репрессора (рис. 7, а).

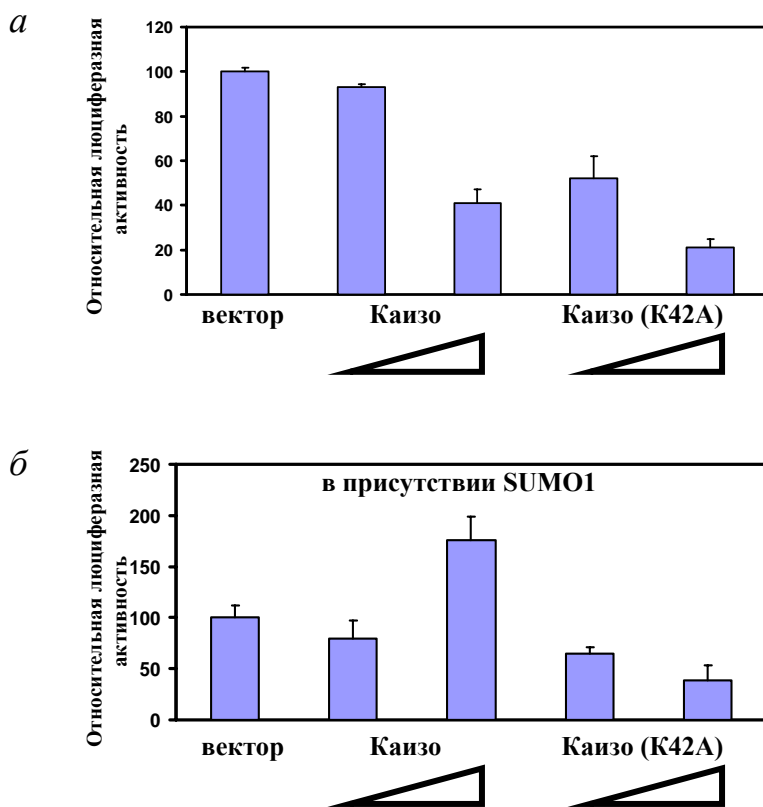


Рисунок 7. Сумоилирование Каизо приводит к потере репрессивных свойств белка. а, б - Приведены данные метил-зависимого репрессивного анализа. По оси у

отложена относительная люциферазная активность, по оси x – концентрации трансфецируемых плазмид. В первой колонке трансфекция пустого вектора; б - SUMO1-GFP трансфецировали в концентрации 50нг.

Добавление в данный метил-чувствительный эксперимент SUMO1-GFP в концентрации 50нг, привело к потере репрессивных свойств формы белка Каизо, способной сумоилироваться в отличие от несумоилированной формы Каизо(K42A), которая по-прежнему, независимо от присутствия SUMO1 является в данной модельной системе репрессором (рис. 7, б).

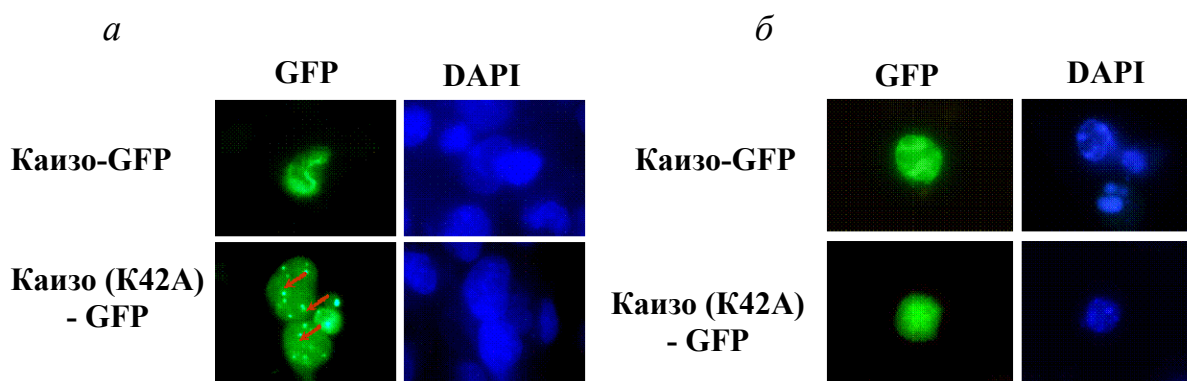
Таким образом, сумоилирование приводит к потере репрессивных свойств Каизо, а немодифицированная форма белка является репрессором.

## **5. Влияние сумоилирования на локализацию белка Каизо в клетках млекопитающих.**

Сумоилирование является важным для многих транскрипционных факторов. Так, данная ПТМ может влиять на локализацию белков в клетках позвоночных, определяя тем самым, их функциональную значимость.

Для того чтобы понять, как будет влиять сумоилирование на локализацию белка Каизо в клетке, конструкции Каизо-GFP и Каизо (K42A)-GFP были трансфецированы в клеточную линию человека HEK293. В результате иммунофлуорисцентного анализа было показано, что в отличие от белка Каизо, не содержащего мутацию, равномерно распределенного в ядре, локализация несумоилированной формы белка Каизо отличается от первой наличием ярко выраженного точечного распределения в ядре (рис. 8, а). Предполагая, что такая локализация немодифицированной формы белка Каизо может совпадать с гетерохроматином, конструкции Каизо-GFP и Каизо (K42A)-GFP были трансфецированы в мышинные фибробласты, так как покраска ядер мышинных клеток красителем DAPI позволяет наблюдать гетерохроматин. Однако оказалось, что и Каизо-GFP и Каизо (K42A) -GFP имеют одинаковое равномерное распределение в ядрах в мышинных фибробластах (рис. 8, б).

Таким образом, в мышинных и человеческих клетках немодифицированная форма Каизо локализуется по-разному. Такая разница в локализации может быть объяснена тем, что были выбраны различные модельные системы: с одной стороны раковые клетки, а с другой стороны иммортализованные фибробласты, либо же в рассмотренных организмах сумоилированная форма белка Каизо имеет различную локализацию.



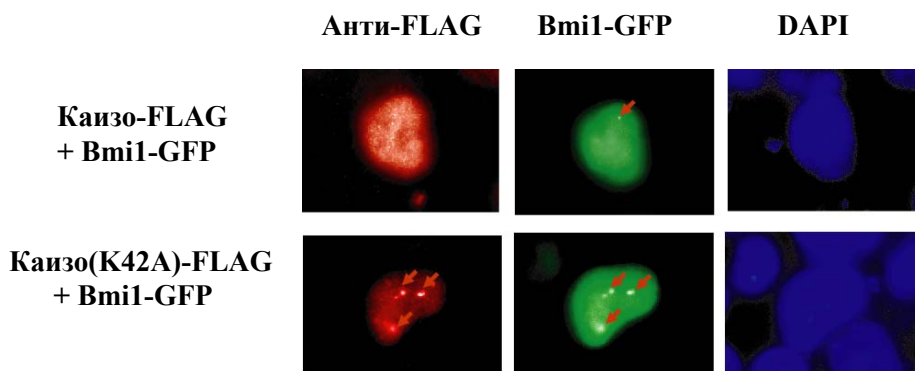
**Рисунок 8. Ядерная локализация белка Каизо и его немодифицированной формы.**  
*а*- Иммунофлуорисцентный анализ клеточной линии HEK293, трансфицированной конструкциями Каизо-GFP и Каизо(K42A)-GFP. Несумоилированная форма белка Каизо на фоне равномерного распределения имеет точечную локализацию. *б*- Иммунофлуорисцентный анализ мышинных фибробластов, трансфицированных конструкциями Каизо-GFP и Каизо(K42A)-GFP. И сумоилированная и несумоилированная формы белка Каизо равномерно распределены в ядре.

#### **6. Влияние SUMO1-модификации белка Каизо на его способность взаимодействовать с белками ко-репрессорами.**

Поскольку сумоилирование влияет на транскрипционную активность белка Каизо и на его локализацию, возможно, данная ПТМ также может влиять на взаимодействие Каизо с белками ко-репрессорами. Картина клеточной локализации немодифицированной формы белка Каизо очень похожа на внутриядерное распределение для белков, входящих в Поликомб группу - PcG (Polycomb group) комплекса. Для млекопитающих характерно два комплекса PcG белков: Поликомб репрессивный комплекс 1 – PRC1 (Polycomb repressive complex 1) (HPH, RING1, Bmi1) и Поликомб репрессивный комплекс 2 – PRC2 (Polycomb repressive complex 2) (EED, EZH2, YY1, SU(Z)12). Белки группы Поликомб принимают участие в подавлении транскрипции ряда генов в процессе эмбрионального развития и дифференцировки. Показано, что белки, относящиеся к Поликомб репрессивному комплексу 1 – PRC1 локализуются в ядре виде точек, названных PcG – тельцами. Например, белок Bmi1 входит в комплекс белков PRC1 и локализуется в ядре в составе PcG –телец в виде точеного распределения (Hernandes-Munoz I. et al., Mol. Cell Biol., 2005).

Предполагая, что несумоилированная форма белка Каизо может также локализоваться в виде PcG – телец, как и Bmi1, были получены следующие конструкции: Каизо-FLAG, Каизо(K42A)-FLAG и Bmi1-GFP, которые

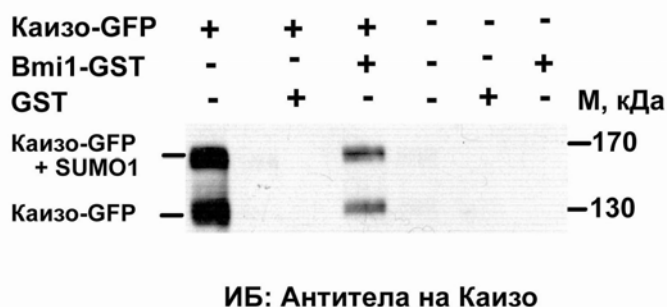
трансфецировали в клеточную линию HEK293. С помощью иммунофлуорисцентного анализа было показано, что немодифицированная форма белка Каизо колокализуется в ядре с Vmi1 в виде точек, которые являются PcG-тельцами (рис. 9). Таким образом, несумоилированная форма белка Каизо, обладающая репрессивными свойствами, входит в состав PcG-телец.



**Рисунок 9. Несумоилированная форма белка Каизо входит в состав PcG-телец.** Иммунофлуорисцентный анализ клеточной линии HEK293, трансфецированной Каизо-FLAG, Каизо(K42A)-FLAG и Vmi1-GFP. Для идентификации Каизо в иммунофлуорисцентном анализе использовали первичные антитела на пептид FLAG и вторичные антитела меченые Cy5 красителем флуорисцирующим красным цветом. Стрелками показаны PcG-тельца.

Однако стоит отметить, что и при трансфекции Каизо-FLAG с Vmi1-GFP может наблюдаться похожая картина, что подтверждает тот факт, что Каизо в клетке представлен в виде двух форм: модифицированной и немодифицированной.

По неопубликованным данным Каизо может напрямую взаимодействовать с Vmi1, поэтому было решено применить ко-преципитационный анализ (GST pull down анализ), в котором клеточные лизаты HEK293, трансфецированные Каизо-GFP, были преципитированны с Vmi1-GST. В результате данного эксперимента оказалось, что Каизо независимо от статуса сумоилирования может взаимодействовать с белком Vmi1 (рис. 10). Однако, сохраняется возможность, что сумоилированная форма белка Каизо взаимодействует с Vmi1 за счет димеризации с немодифицированной формой.



**Рисунок 10. Независимо от статуса сумоилирования Каизо взаимодействует с белком группы поликомб Vmi1.** Ко-преципитационный анализ белков Vmi1-GST с Каизо-GFP. Каизо-GFP трансфецировали в клеточную линию HEK293.

Таким образом, впервые показано, что немодифицированная форма белка Каизо может входить в состав PcG-телец и взаимодействовать напрямую с Bmi1.

Ранее было известно, что Каизо может входить и в другой репрессивный комплекс с N-CoR, для которого не описано характерных клеточных локализаций в виде точек. Однако было решено проверить, каким образом сумоилирование может оказывать влияние на это взаимодействие. Для этого по аналогии с Bmi1 был проведен ко-преципитационный анализ с N-CoR-GST, который также показал, что независимо от модификаций Каизо взаимодействует с N-CoR, однако количество белка Каизо, принимающего участие в этом комплексе крайне мало (данные не приведены).

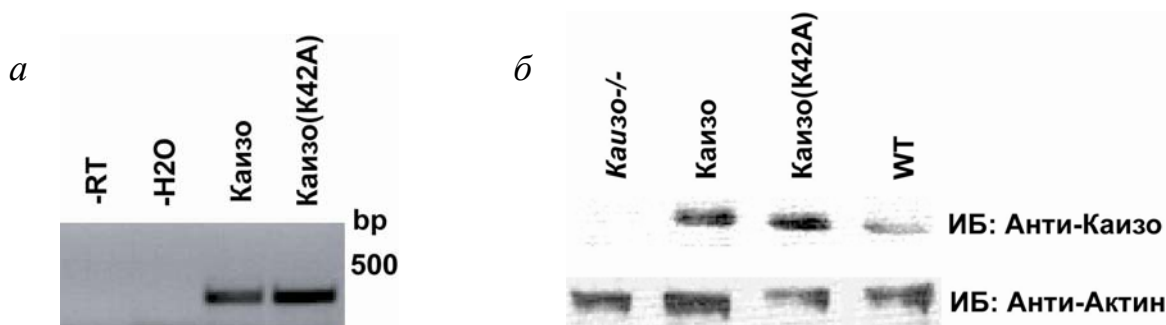
## **7. Анализ сайтов связывания сумоилированной и несумоилированной формы белка Каизо по мышинному геному.**

Поскольку с одной стороны немодифицированная форма белка Каизо не теряет репрессивных свойств, а с другой стороны при добавлении SUMO1 белок Каизо перестает быть репрессором, то возникает вопрос, за счет чего изменяются репрессивные свойства Каизо. Первое возможное объяснение – это изменение взаимодействия с белками ко-репрессорами, однако выше было показано, что белок Каизо взаимодействует с ко-репрессорами N-CoR и Bmi-1 независимо от сумоилирования, хотя при этом сохраняется возможность взаимодействия модифицированной формы с белками ко-репрессорами за счет димеризации с немодифицированной формой Каизо. Также возможно, Каизо входит и в другие репрессивные комплексы (пока не исследованные), для которых сумоилирование Каизо может быть критичным. С другой стороны, сохраняется возможность, что белок Каизо взаимодействует с различными участками ДНК в зависимости от наличия или отсутствия сумоилирования. Поэтому было решено определить влияние сумоилирования белка Каизо на связывание с ДНК в полногеномном масштабе, используя ChIP-seq метод.

Для этого с помощью вирусной инфекции были получены иммортализованные мышинные фибробласты *Каизо*-/- стабильно экспрессирующие 1) белок Каизо (способный сумоилироваться) и 2) несумоилированную форму белка Каизо (K42A). Методом РТ-ПЦР было подтверждено, что полученные клеточные линии экспрессируют мРНК Каизо (рис. 11, *a*). Анализ ядерных экстрактов, полученных из этих же клеток, также подтвердил экспрессию Каизо и Каизо (K42A). В качестве



контроля были использованы фибробласты *Kaizo*<sup>-/-</sup>, инфицированные пустым вектором (рис. 11, б).



**Рисунок 11. Анализ полученных клонов Каизо и Каизо (K42A).** а – RT-ПЦР кДНК мышинных фибробластов *Kaizo*<sup>-/-</sup>, стабильно экспрессирующих Каизо и Каизо (K42A) с праймеров на часть кДНК Каизо. б- Иммуноблоттинг (ИБ) ядерных экстрактов мышинных фибробластов *Kaizo*<sup>-/-</sup>, стабильно экспрессирующих Каизо и Каизо (K42A). Вверху ИБ с антителами на Каизо, внизу контроль – ИБ с антителами на Актин.

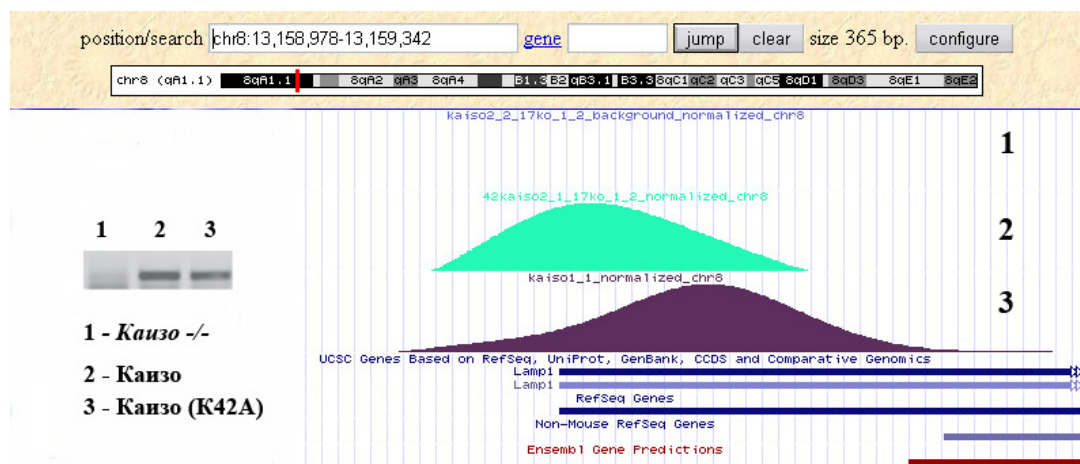
Полученные иммортализованные мышинные фибробласты *Kaizo*<sup>-/-</sup>, стабильно экспрессирующие белок Каизо и его несумоилированную форму, были использованы в иммунопреципитации хроматина с моноклональными антителами на данный белок. Пул ДНК, полученный в результате иммунопреципитации хроматина, использовали для получения библиотеки для секвенирования. Подготовленную геномную библиотеку декодировали на секвенаторе Genome Analyzer GA (“Illumina”, США), длина одного чтения составляла 36 нуклеотидов. Чтения, полученные в результате секвенирования картировали на мышинный геном (mm9 версия). Всего было прочитано 2 – 2,5 Гб, из которых около 1 Гб данных было откартировано на мышинный геном. Число картированных чтений на мышинный геном для клонов Каизо и Каизо (K42A) составило приблизительно 40 млн. Откартированные чтения использовали для поиска пиков, то есть районов, обогащенных чтениями. В качестве контроля были использованы данные, полученные для нокаутных иммортализованных фибробластов, идентифицированных контрольным вектором. Было получено: 391 участок для клеточной линии, экспрессирующей Каизо, и 378 участков для Каизо (K42A) (таблица 2). Средний размер пиков - около 500 пн. При сравнении пиков, полученных для обеих клеточных линий оказалось, что Каизо, способный сумоилироваться, и немодифицированная форма Каизо одинаково распределены по мышинному геному, причем 75% участков связывания приходятся на «СрG островки» (таблица 1, рис. 12).

Дальнейший анализ данных показал, что 70,8 % участков связывания с ДНК белка Каизо и его несумоилированной формы приходится на промоторы, 22,3 % на интроны и экзоны, 13,6% на межгенные районы и около 4% на 3'-концевые районы.

Такое распределение участков, обогащенных чтениями, совпадает с картиной связывания для транскрипционных факторов (таблица 2,3; рис. 12). Причем в случае участков, расположенных в «СрG островках», 84,6% пиков соответствуют промоторным областям (таблица 4). На рисунке 12, полученном в программе Genome Browser, приведен пример участков, обогащенных чтениями для Каизо и Каизо (K42A) для гена *Lamp1*, из которых видно, что белок Каизо независимо от статуса сумоилирования связывается с промоторной областью данного гена, расположенного в «СрG островке». В случае *Каизо*<sup>-/-</sup> клеток, инфицированных пустым вектором, не наблюдается каких-либо значимых пиков (рис. 12).

**Таблица 1. Анализ полученных данных на Genome Analyzer GA (“Illumina”, США).**

	клон Каизо	клон Каизо (K42A)	Каизо <sup>-/-</sup> фибробл асты
Число картированных ридов на мышинный геном (млн)	38.99	47	38
Число участков обогащенных чтениями	391	378	—
Средний размер пиков (кластеров), bp (медиана)	517 (443)	457 (361)	—
% чтений, попавших в кластеры	1.7%	1.4%	—
% «СрG островков»	75%	74.2%	—



**Рисунок 12. Пример распределения Каизо и Каизо (K42A) в промоторной области гена *Lamp1*.** На рисунке представлены данные, полученные в программе Genome Browser для гена *Lamp1*. Белок Каизо и его несумоилированная (клон Каизо (K42A)) форма связываются с промоторной областью гена *Lamp1*, содержащего «СрG островок». Слева на рисунке представлены данные ПЦР, после иммунопреципитации хроматина с антителами на Каизо.

**Таблица 2. Распределение участков, обогащенных чтениями по мышинному геному. В столбце -мышинный геном- представлено распределение всех чтений, откартированных на геном мыши.**

	клон Каизо	клон Каизо (K42A)	Мышинный геном
<b>Межгенные районы</b>	<b>13.6%</b>	<b>13.9%</b>	<b>51.5%</b>
<b>Интроны и Экзоны</b>	<b>22.3%</b>	<b>18.5%</b>	<b>45.2%</b>
<b>Промоторы</b>	<b>70.8%</b>	<b>72.0%</b>	<b>1.9%</b>
<b>3' - концевые районы</b>	<b>3.8%</b>	<b>3.9%</b>	<b>1.9%</b>

**Таблица 3. Распределение участков связывания белка Каизо по мышинному геному в зависимости от наличия «СрG островков».**

	«СрG островки»	не «СрG островки»
<b>Промоторы</b>	<b>84.60%</b>	<b>31.00%</b>
<b>Интроны и Экзоны</b>	<b>19.90%</b>	<b>29.90%</b>
<b>Межгенные районы</b>	<b>5.10%</b>	<b>39.20%</b>
<b>3'-концевые районы</b>	<b>2.70%</b>	<b>7.20%</b>

Далее было решено проанализировать нуклеотидный состав полученных участков, чтобы выявить с какой последовательностью ДНК связываются обе формы Каизо *in vivo* (с Каизо связывающим сайтом - CTGCNA, или же с CGCG). Для этого было проанализировано распределение CG, CGCG и CTGCNA в районе +/- 100 нуклеотидов вокруг пика связывания белка Каизо, что не выявило существенного обогащения по последовательности CTGCNA. Численные значения распределения приведены в Таблицах 4 и 5.

Таким образом, *in vivo* белок Каизо в основном связывается с участками, расположенными в промоторных областях генов, содержащих «СрG островки», при этом связывание обеих форм белка Каизо (как белка Каизо, так и его несумоилированной формы) с геномными последовательностями мыши одинаково. Эти данные позволяют предположить, что сумоилирование скорее влияет на взаимодействие ВТВ домена белка Каизо с белками ко-репрессорами, что подтверждается экспериментом по трансфекции в мышинные фибробласты в метил-зависимом эксперименте, нежели на связывание Каизо с сайтами геномной ДНК.

**Таблица 4. Представленность CG, CGCG, CTGCNA в участках связывания белка (100 пар вокруг пика) Каизо в различных районах генома, совпадающих с «СрG островками».**

	<b>CG</b>	<b>CGCG</b>	<b>CTGCNA</b>
<b>все районы</b>	<b>96.6%</b>	<b>52.0%</b>	<b>20.0%</b>
<b>районы промоторов</b>	<b>100.0%</b>	<b>58.6%</b>	<b>19.7%</b>
<b>районы генов</b>	<b>93.2%</b>	<b>43.8%</b>	<b>23.5%</b>
<b>межгенные районы</b>	<b>87.2%</b>	<b>27.2%</b>	<b>20.0%</b>
<b>3'-концевые районы</b>	<b>100.0%</b>	<b>41.1%</b>	<b>17.6%</b>

**Таблица 5. Представленность CG, CGCG, CTGCNA в участках связывания белка (100 пар вокруг пика)Каизо в зависимости от наличия «СрG островков».**

	<b>CG</b>	<b>CGCG</b>	<b>CTGCNA</b>
<b>«СрG островки» (293 района)</b>	<b>100.0%</b>	<b>62.6%</b>	<b>19.1%</b>
<b>не «СрG островки» (98 районов)</b>	<b>86.7%</b>	<b>21.4%</b>	<b>23.4%</b>

## ВЫВОДЫ

1. Определено, что метил-ДНК-связывающий белок Каизо подвергается сумоилированию по 42 лизину в ВТВ домене.
2. Показано, что несумоилированная форма белка Каизо на фоне диффузного ядерного распределения имеет точечную локализацию, которая совпадает с локализацией белка Vmi1 Поликомб комплекса (PcG) в клетках линии НЕК 293.
3. Установлено, что в системе *in vitro* Каизо взаимодействует с Vmi1 и с NCoR.
4. Определено, что сумоилирование Каизо приводит к снижению репрессивной активности белка, а несумоилированная форма сохраняет репрессивные свойства.
5. Показано, что сумоилирование не влияет на спектр участков связывания Каизо в мышинном геноме, и обе формы белка преимущественно связываются с промоторными областями, расположенными в «CpG островах».

## СПИСОК РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Жигалова Н.А., Женило С.В., Айтхожина Д.С., Прохорчук Е.Б. Две функции домена «цинковые пальцы» метил-ДНК-связывающего белка Каизо.// Молекулярная биология. - 2010 - Т. 44 - С. 263-274.
2. Жигалова Н.А., Женило С.В., Прохорчук Е.Б. Изучение посттрансляционных модификаций метил-ДНК-связывающего белка Каизо.// 13-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых. 28 сентября -2 октября. 2009 - С. 15-16.
3. Жигалова Н.А., Женило С.В., Прохорчук Е.Б. Изучение посттрансляционных модификаций метил-ДНК-связывающего белка Каизо.// Горизонты нанобиотехнологии. Материалы всероссийской научной школы для молодежи. 12 -16 октября. 2009 - С. 36-37.
4. Жигалова Н.А., Прохорчук Е.Б. Восстановление волосяного покрова *de novo* у мышей с дефектом гена Каизо после повреждения кожи. // V Московский международный конгресс «Биотехнология: состояние и перспективы развития». 16-20 марта. 2009 - С.230-231.
5. Zhigalova N, Prokhortchouk E. Hair follicle regeneration *de novo* in adult Kaiso-deficient mice skin after wounding. // Benzon symposium No.55. Transcription, chromatin and disease. Copenhagen, Denmark. August 18-21. 2008 - P.70.
6. Zhigalova N.A., Zhenilo S.V., Prokhortchouk E.B. Kaiso is a bifunctional methyl-DNA-binding protein. The fourth Moscow international congress. // Biotechnology: state of the art and prospects of development. March, 12-16.2007 - P.160.