

УДК 577.218

МУЛЬТИФУНКЦИОНАЛЬНЫЙ БЕЛОК ENY2 ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С РНК-ХЕЛИКАЗОЙ MLE

Ю. В. Николенко*, М. М. Куршакова, А. Н. Краснов

Представлено академиком РАН Г.П. Георгиевым 01.10.2019 г.

Поступило 01.10.2019 г.

Белок ENY2 *Drosophila melanogaster* ранее открыт и охарактеризован в нашей лаборатории [1, 2]. Обнаружено, что ENY2 входит в состав ряда мультисубъединичных комплексов и связывает различные этапы экспрессии генов [3–5]. Настоящая работа посвящена изучению взаимодействия ENY2 с РНК-хеликазой MLE. Данное взаимодействие подтверждено независимыми методами. Получены данные, свидетельствующие о том, что это взаимодействие консервативно в эволюции и важно для функционирования MLE в организмах как самцов, так и самок.

Ключевые слова: ENY2, MLE, РНК-хеликаза, экспрессия генов.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524896637-640>

ENY2 — это важный ядерный белок, который экспрессируется во всех тканях и на всех стадиях развития организма и консервативен у эукариот [1]. Было показано, что в организме *D. melanogaster* в составе разных мультисубъединичных комплексов он вовлечён в организацию транскрипционных доменов и модификацию хроматина, активацию и элонгацию транскрипции, экспорт мРНК из ядра и регуляцию пространственного расположения генов в ядре [2, 3, 5]. В нашей лаборатории был проведён двугибридный скрининг с целью поиска белковых партнёров ENY2. Одним из результатов скрининга стало обнаружение взаимодействия ENY2 и РНК-хеликазы MLE (Maleless). Настоящая работа посвящена изучению этого взаимодействия.

Примечательно, что, помимо взаимодействия ENY2 *D. melanogaster* (dENY2) с MLE, в параллельном эксперименте нами было обнаружено взаимодействие ENY2 человека (hENY2) с РНК-хеликазой А (RNA Helicase A, RHA), гомологом MLE у человека [6]. ENY2 — небольшой белок с массой ~10 кДа, в то время как обе обнаруженные хеликазы — мультисубъединичные белки большого размера. Поэтому первым этапом дальнейшей работы был анализ последовательностей, которые непосредственно взаимодействуют с ENY2. В обоих случаях это оказались последние ~100 аминокислотных остатков последовательности на С-концах хеликаз. Эти районы в обоих белках обогащены остатками глицина

и обладают высокой гомологией друг с другом, они не содержат известных доменов, и ранее их функция не была изучена (рис. 1а). Таким образом, в данной работе впервые было обнаружено, что С-концевые районы MLE и RHA отвечают за взаимодействие с ENY2.

Двугибридная система гетерологична для *D. melanogaster* и человека, однако консервативность обнаруженного взаимодействия свидетельствует в пользу его достоверности и потенциальной биологической важности.

Было предпринято дальнейшее изучение взаимодействия dENY2 и MLE. Для этой цели были получены поликлональные антитела кролика к белку MLE. Для получения антител был выбран участок MLE, не содержащий консервативных доменов и не перекрывающийся с районом, который взаимодействует с ENY2. Полученные нами антитела специфично узнавали в ядерном экстракте из эмбрионов *D. melanogaster* и специфично преципитировали белок с предсказанной для MLE молекулярной массой ~140 кДа [7].

При помощи антител к белку MLE и полученных ранее в нашей лаборатории антител к dENY2 мы поставили эксперименты по коиммунопреципитации. Полученные результаты подтверждают взаимодействие MLE и dENY2 в эмбриональном ядерном экстракте и в ядерном экстракте культуры клеток *D. melanogaster* Schneider2 (S2) (рис. 1б). Таким образом, мы подтвердили взаимодействие MLE и dENY2 в культуре клеток и в эмбрионах *D. melanogaster*.

Федеральное государственное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук,
Москва

*E-mail: julia.v.nikolenko@gmail.com

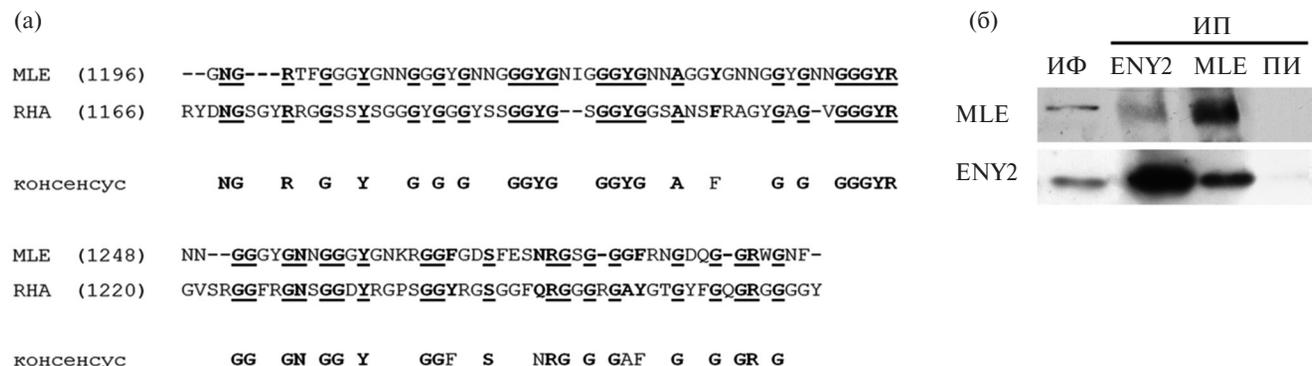


Рис. 1. Анализ взаимодействия ENY2 с MLE и RHA. а — последовательности MLE и RHA, взаимодействующие в двугибридной системе с dENY2 и hENY2 соответственно. 39,8% аминокислотных остатков идентичны. б — коиммунопреципитация белков dENY2 и MLE. Результаты вестерн-блот-анализа иммунопреципитированных белков (ИП) и эквивалентного количества эмбрионального ядерного экстракта (ИФ). ПИ — преимунная сыворотка (контроль иммунопреципитации).

Затем было исследовано взаимодействие MLE и dENY2 генетическими методами на уровне целого организма. Было изучено взаимное влияние мутаций в генах *e(y)2* и *mle*, которые кодируют изучаемые белки. Ген *e(y)2* расположен на X-хромосоме, что позволяет исследовать его в гемизиготном состоянии у самцов. В нашем распоряжении имелись линии *D. melanogaster* с мутациями *e(y)2[u1]* и *mle[9]*. *e(y)2[u1]* — слабая гипоморфная мутация, очень удобная для анализа, так как в гомо- и гемизиготном состоянии она обладает плейотропным эффектом и её фенотип был ранее подробно охарактеризован [1, 3]. К фенотипическим проявлениям мутации *e(y)2[u1]* относятся аномальное строение последних (9-го и 10-го) абдоминальных сегментов (присутствует у ~10% гемизиготных самцов) и широко расставленные крылья (присутствует у ~5% гемизигот-

ных самцов) (рис. 2а–г). Мутация *mle[9]* вызвана делецией в кодирующей области и приводит к потере функции белка, в гетерозиготном состоянии она не влияет на фенотип [8]. Были поставлены скрещивания, и в результате получены самцы с генотипом *e(y)2[u1]; mle[9]/+*, т.е. гемизиготные по мутации *e(y)2[u1]* и гетерозиготные по мутации *mle[9]*. Частота проявления (пенетрантность) мутантного фенотипа *e(y)2[u1]* у таких самцов возрастала в 8 раз и более по сравнению с исходной линией *e(y)2[u1]* и с контрольным скрещиванием (рис. 2д). Таким образом, взаимодействие ENY2 и MLE было подтверждено генетически *in vivo*.

Наиболее изученной функцией MLE к настоящему моменту является работа в составе комплекса дозовой компенсации [7, 9]. Этот рибонуклеопротеиновый комплекс связывается с многочисленными

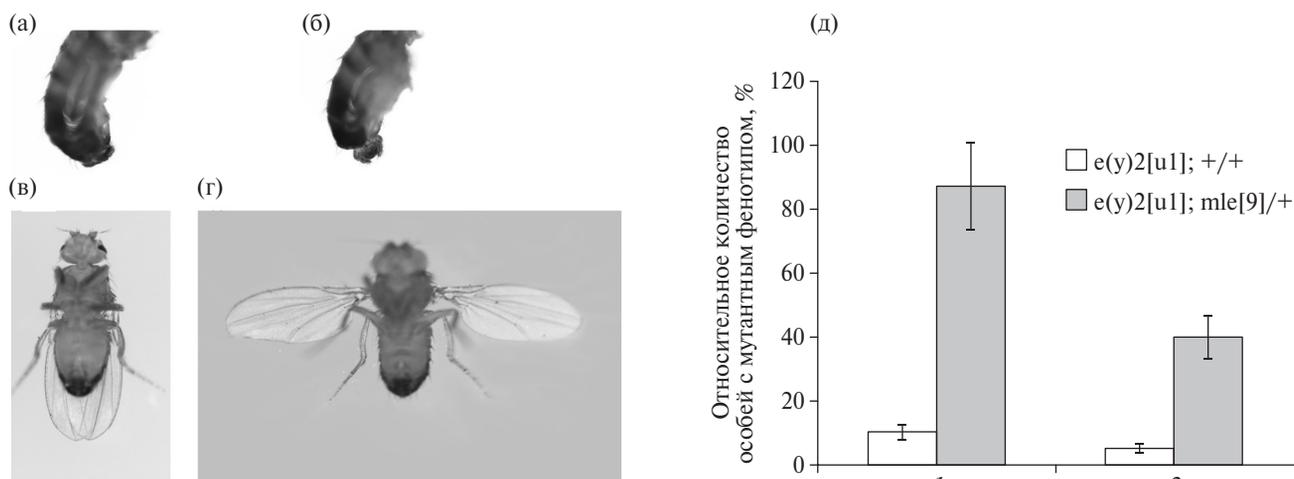


Рис. 2. ENY2 и MLE взаимодействуют *in vivo*. Фенотип мутации *e(y)2[u1]*: а, в — диккий тип, б — аномальное строение последних сегментов брюшка (разворот относительно продольной оси тела), г — широко расставленные крылья; д — пенетрантность мутации *e(y)2[u1]* резко возрастает под влиянием мутации *mle[9]* (1 — аномальное строение брюшка, 2 — широко расставленные крылья). Проанализировано не менее 200 самцов каждого генотипа.

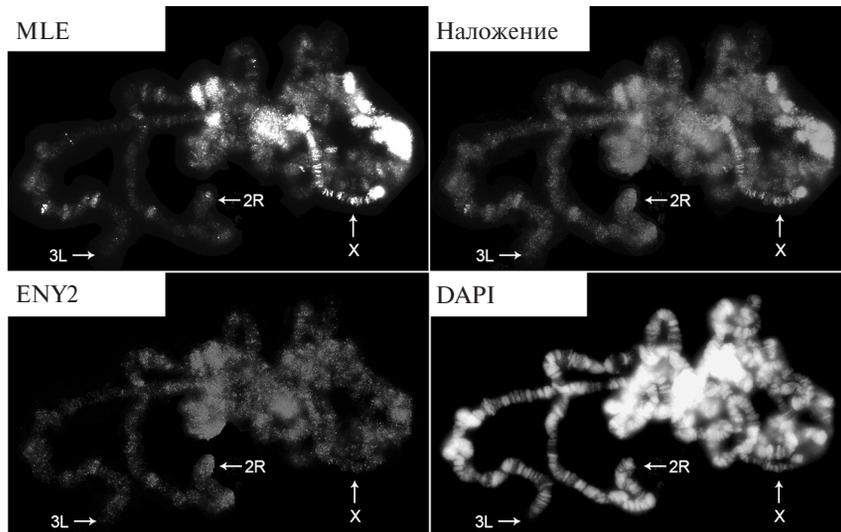


Рис. 3. Сайты колокализации ENY2 и MLE на политенных хромосомах самцов не соответствуют расположению комплекса дозовой компенсации на X-хромосоме, а распределены по всему геному.

сайтами на единственной X-хромосоме самцов и обеспечивает удвоение экспрессии её генов, что совершенно необходимо для выживания самцов. Однако MLE присутствует в соматических клетках как самцов, так и самок (т.е. вне комплекса дозовой компенсации), и за последние годы были получены данные о роли этого белка в процессах регуляции экспрессии генов, не связанных с дозовой компенсацией [10–12]. Поскольку dENY2 необходим в развитии как самцов, так и самок *D. melanogaster* [1], мы предположили, что обнаруженное нами взаимодействие важно для работы MLE вне комплекса дозовой компенсации.

Для проверки этой гипотезы мы поставили эксперимент по совместному окрашиванию антителами к MLE и ENY2 политенных хромосом из слюнных желез личинок *D. melanogaster* обоего пола. В полном согласии с опубликованными данными антитела к dENY2 связывались с многочисленными локусами активного хроматина по всему геному [1], основная часть MLE локализовалась на X-хромосоме самцов (в составе комплекса дозовой компенсации), а также MLE присутствовал в локусах активного хроматина на X-хромосомах самок и на аутосомах самцов и самок [10]. Анализ расположения сайтов колокализации MLE и ENY2 показал, что сайты колокализации не были сосредоточены на X-хромосоме самцов, но обнаруживались в активном хроматине и у самцов и у самок на всех хромосомах (рис. 3). Этот результат соответствует нашим ожиданиям и подтверждает гипотезу о том, что MLE и ENY2 совместно вовлечены в регуляцию экспрессии генов, не связанную с дозовой компенсацией.

В итоге в данной работе было обнаружено и подтверждено при помощи разных подходов взаимодействие ENY2 и MLE у *D. melanogaster*. Были получены данные, что это взаимодействие консервативно в эволюции и не связано с дозовой компенсацией.

MLE и RHA относятся к консервативному семейству DEhN box-содержащих РНК-хеликаз, способных расплетать двуцепочечную РНК и РНК–ДНК гибриды и ремоделировать шпильки в одноцепочечной РНК. Разными группами учёных для MLE было показано участие в таких процессах, как сплайсинг [11], процессинг РНК в ходе РНК-интерференции [13], взаимодействие с комплексом ремоделирования хроматина NURD [12]. Для RHA также было показано участие в широком спектре процессов регуляции экспрессии генов, в том числе в процессах злокачественной трансформации клеток и в патогенезе ВИЧ-инфекции [14, 15]. В каком или каких процессах важна роль обнаруженного нами взаимодействия MLE и ENY2 и каков механизм их совместной работы — предмет дальнейшего изучения.

Конфликт интересов отсутствует.

Источники финансирования. Работа поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований 18–04–01019 и программой “Постгеномные технологии и перспективные решения в биомедицине”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Georgieva S., Nabirochkina E., Dilworth F.J., et al. // Mol Cell Biol. 2001. V. 2. № 15. P. 5223–5231.

2. Kopytova D.V., Krasnov A.N., Orlova A.V., et al. // Cell Cycle. 2010. V. 9. № 3. P. 479–81.
3. Kopytova D.V., Orlova A.V., Krasnov A.N., et al. // Genes Dev. 2010. V. 24. № 1. P. 86–96.
4. Krasnov A.N., Mazina M.Y., Nikolenko J.V., et al. // Cell Biosci. 2016. V. 6. P. 15.
5. Gurskiy D., Orlova A., Vorobyeva N., et al. // Nucleic Acids Research. 2012. V. 40. № 21. P. 10689–10700.
6. Lee C.G., Hurwitz J. // J. Biol. Chem. 1993. V. 268. P. 16822–16830.
7. Kuroda M.I., Kernan M.J., Kreber R., et al. // Cell. 1991. V. 66. № 5. P. 935–947.
8. Kernan M.J., Kuroda M.I., Kreber R., et al. // Cell. 1991. V. 66. № 5. P. 949–959.
9. Morra R., Yokoyama R., Ling H., et al. // Epigenet. Chromatin. 2011. V. 4. № 6.
10. Kotlikova I.V., Demakova O.V., Semeshin V.F., et al. // Genetics. 2006. V. 172. № 2. P. 963–974.
11. Reenan R.A., Hanrahan C.J., Ganetzky B. // Neuron. 2000. V. 25. P. 139–149.
12. Cugusi S., Kallappagoudar S., Ling H., et al. // Mol. Cell Proteomics. 2015. V. 14. № 6. P. 1478–1488.
13. Cugusi S., Li Y., Jin P., et al. // PLoS Genet. 2016. V. 12. № 1.
14. Boeras I., Song Z., Moran A., et al. // J. Mol. Biol. 2016. V. 428. № 11. P. 2418–2429.
15. Fidaleo M., De Paola E., Paronetto M.P. // Oncotarget. 2016. V. 7. № 19. P. 28711–28723.

MULTIFUNCTIONAL ENY2 PROTEIN INTERACTS WITH RNA HELICASE MLE

J. V. Nikolenko, M. M. Kurshakova, A. N. Krasnov

Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Presented by Academician of the RAS G.P. Georgiev October 1, 2019

Received October 1, 2019

ENY2 protein of *Drosophila melanogaster* was previously discovered and characterized in our laboratory [1]. It was found that ENY2 is a subunit of several multiprotein complexes and connects various stages of gene expression [2–4]. This work is devoted to studying the interaction of ENY2 with RNA helicase MLE. This interaction was confirmed by independent methods. Data were obtained indicating that this interaction is conserved in evolution and is important for the functioning of MLE in both sexes.

Keywords: ENY2, MLE, RNA helicase, gene expression.