

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Шубина Мария Юрьевна

**МЕХАНИЗМЫ НАКОПЛЕНИЯ ФИБРИЛЛАРИНА
В ЯДРЕ И ЯДРЫШКЕ**

03.03.04 – Клеточная биология, цитология, гистология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в отделе электронной микроскопии Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

- Научный руководитель** – ***Шеваль Евгений Валерьевич**, доктор биологических наук*
- Официальные оппоненты** – ***Исаев Николай Константинович**, доктор биологических наук, МГУ им.М.В. Ломоносова, биологический факультет, доцент кафедры клеточной биологии и гистологии*
- Бигильдеев Алексей Евгеньевич**, доктор биологических наук, ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, старший научный сотрудник лаборатории физиологии кроветворения*
- Рубцов Михаил Александрович**, кандидат биологических наук, МГУ им.М.В. Ломоносова, биологический факультет, ведущий научный сотрудник кафедры молекулярной биологии*

Защита диссертации состоится «17» декабря 2019 г. в 15:30 часов на заседании диссертационного совета МГУ.03.09 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, МГУ, д.1, стр.12, биологический факультет, ауд. М-1.

E-mail: dis_kalsov@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <http://istina.msu.ru/dissertations/243688605/>

Автореферат разослан «___» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Калистратова Е.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Фибрилларин (FBL) является эволюционно консервативным белком, который катализирует сайт-специфическое 2'-О-метилирование остатков рибозы в пре-рРНК, участвует в процессинге пре-рРНК (Tollervey et al., 1993) и регулирует транскрипцию рРНК, метилируя остаток глутамина в гистоне H2A (Tessarz et al., 2014; Loza-Muller et al., 2015). FBL играет ключевую роль в формировании и поддержании структурной целостности плотного фибриллярного компонента ядрышка (Wang et al., 2019). Накопленные за последние годы данные показали, что, будучи вовлеченным в биогенез рибосом, FBL может влиять на протекание множества клеточных процессов, включая развитие некоторых патологических процессов и динамику старение (Monaco et al., 2018; Shubina, Musinova & Sheval, 2018).

FBL содержит три домена: N-концевой GAR-домен (80 а.о.), обогащенный аминокислотными остатками глицина и аргинина (**g**lycine and **a**rginine-**r**ich domain), РНК-связывающий домен (~90 а.о.) и С-концевой α -спиральный домен (33 а.о.) (Aris & Blobel, 1991). Вместе РНК-связывающий и α -спиральный домены формируют S-аденозил-L-метионин (SAM)-зависимый метилтрансферазный домен, который катализирует 2'-О метилирование остатков рибозы, используя SAM в качестве донора метильной группы (Wang et al., 2000). Аминокислотная последовательность и пространственная (3D) структура метилтрансферазного домена высоко консервативна на протяжении эволюции, начиная от Архей и заканчивая человеком (Rodriguez-Corona et al., 2015). GAR-домен отсутствует у Архей и появляется только у эукариот (Amiri, 1994). У эукариот GAR-домен содержит несколько RGG-мотивов, чередующихся с остатками фенилаланина. Большинство аргининов в составе GAR-домена подвергаются посттрансляционному асимметричному диметилированию (Lischwe et al., 1985; Najbauers et al., 1993; Liu & Dreyfuss, 1995; Ai et al., 1999; Yagoub et al., 2015). Молекула человеческого фибрилларина характеризуется высокой степенью метилирования и содержит 4.1% N^G, N^G-диметиларгининов. Функции GAR-домен изучены слабо, хотя в последние годы были получены данные о его роли в формировании плотного фибриллярного компонента (Wang et al., 2019).

Имеющиеся данные позволяют предположить, что GAR-домен необходим для накопления фибрилларина в ядре и ядрышке (Snaar et al., 2000; Levitskiy et al., 2004). Известно, что в клетках эукариот за накопление белков в ядре могут отвечать сигналы ядерной локализации (NLS), которые узнаются специальными адаптерными белками-импортинами, осуществляющими их транспорт в ядро. За локализацию белков в ядрышке могут отвечать специальные аминокислотные последовательности, называемые сигналами

ядрышковой локализации (NoLS). Чаще всего NoLS представляют собой кластеры положительно заряженных аминокислот (аргининов и лизинов) на конце белка (Musinova et al., 2015). Поскольку GAR-домен обогащен положительно заряженными аминокислотными остатками аргинина, то нельзя исключить, что он может выполнять функции NLS и NoLS, т.е. функции, которые необходимы только в случае белков эукариот.

Степень разработанности темы. На сегодняшний день вопрос о роли основных структурных доменов FBL в обеспечении его специфической локализации внутри ядрышка остается нерешенным. Было показано, что GAR-домен необходим и достаточен для локализации гомолога FBL AtFbr1 из *Arabidopsis* в ядре (Pih et al., 2000). Было показано, что в клетках HeLa GAR-домен вместе с первым спейсером достаточен для перемещения FBL в ядрышко (Levitskiy et al., 2004). Кроме того, GAR-домен FBL из *Nicotiana benthamiana* (NbFib2) является важным и необходимым для накопления белка в ядрышке и тельцах Кахаля (Zheng et al., 2016). С другой стороны, Snaar и соавторы показали, что GAR-домен человеческого FBL не играет значительной роли в накоплении фибрилларина в ядрышке (Snaar et al., 2000). Также неясно, имеет ли какое-либо функциональное значение метилирование аргининов в составе GAR-домена фибрилларина. Таким образом, вопрос с помощью какого механизма происходит накопление FBL в ядре и ядрышке, а также о роли метилирования аргининов в этих процессах остается нерешенным.

Целью работы было изучение роли GAR-домена в накоплении фибрилларина в ядре и ядрышке.

Задачи:

1. Определить роль GAR-домена для функциональной активности фибрилларина.
2. Изучить роль GAR-домена в накоплении фибрилларина в ядре.
3. Изучить роль GAR-домена фибрилларина в накоплении белка в ядрышке.
4. Изучить роль метилирования аргининов в составе GAR- домена в накоплении фибрилларина в ядре и ядрышке.

Объект и предмет исследования. Основным объектом исследования была клеточная линия HeLa. Предмет исследования – функциональные характеристики GAR-домена в обеспечении специфической локализации FBL, а также функциональное значение метилирования аргининов в составе GAR-домена.

Научная новизна. В работе исследовали роль GAR-домена в обеспечении правильной локализации FBL и его функционирования. На дрожжевой модели показано, что GAR-домен FBL необходим для его функционирования. Показано, что накопление FBL в ядре зависит от GAR-домена, выполняющего роль NLS. В работе выдвинута и экспериментально обоснована гипотеза о существовании двух механизмов накопления FBL

в фокусах транскрипции, где GAR-домен отвечает за высоко динамическое накопление в гранулярном компоненте ядрышка, в то время как метилтрансферазный домен способствует медленному накоплению белка в плотном фибриллярном компоненте. Получены данные в пользу того, что электростатические взаимодействия GAR-домена с компонентами ядрышка определяют накопление фибрилларина в гранулярном компоненте ядрышка. Впервые исследована роль асимметричного диметилирования GAR-домена FBL. На дрожжевой модели было показано, что метилирование аргининов в GAR-доме играет важную роль в функционировании FBL. Впервые качественно и количественно показано, что метилирование аргининов в GAR-доме необходимо для выполнения им функции NLS, однако препятствует его взаимодействию с гранулярным компонентом ядрышка (т.е. функции NoLS).

Теоретическое и практическое значение. Полученные в работе данные расширяют знания о возможных механизмах возникновения и эволюции внутриядерной компартментализации при переходе от прокариот к эукариотам.

FBL является одной из мишеней аутоантител при системных аутоиммунных заболеваниях человека, а также вовлечен в процессы, связанные с раком и динамикой старения организма. Понимание механизмов накопления такого важного белка как FBL в фокусах его функционирования может иметь практическое значение при разработке таргетной терапии.

Методология и методы исследования. Проведенные в рамках данной работы исследования базируются на существующих проверенных методологических приемах научного познания. В работе использовались методы клеточной и молекулярной биологии, методы цито- и иммунофлуоресцентной микроскопии, прижизненного наблюдения с использованием современного оборудования, методы математического и статистического анализа. Полностью методология и методы исследования отражены в разделе «Материалы и методы».

Положения, выносимые на защиту:

1. GAR-домен фибрилларина интегрирует функции NLS и NoLS.
2. Метилирование аргининов в составе GAR-доме модулирует активность NLS и NoLS.

Личный вклад автора заключался в анализе литературных данных, планировании и постановке экспериментов, обработке полученных экспериментальных данных и их интерпретации, а также в подготовке публикаций по теме диссертации.

Степень достоверности результатов и апробация работы. В диссертационной работе представлены результаты, полученные различными методами молекулярной и клеточной биологии. Достоверность полученных данных подтверждается большим количеством

хорошо воспроизводимых результатов, а также их статистической значимостью. Результаты диссертационной работы были представлены на XVII всероссийском симпозиуме "Структура и функции клеточного ядра" (Санкт-Петербург, Россия, 2014), на II Всероссийской конференции "Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет" (2015), на XXVI Российской конференции по электронной микроскопии (РКЭМ-2016) (Зеленоград, Россия, 2016), на конференции "Клеточная биология: проблемы и перспективы" (Санкт-Петербург, Россия, 2017), на XXV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018» (Москва, 2018), на XVIII Всероссийском симпозиуме "Структура и функции клеточного ядра" (Санкт-Петербург, Россия, 2018), на 26th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus (Дижон, Франция, 2019). Также основные результаты работы были доложены на заседании кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ и на семинаре отдела электронной микроскопии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ, и 7 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 132 страницах и состоит из следующих разделов: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты исследования, Заключение, Выводы, Благодарности, Список литературы. Материал диссертации содержит 43 рисунка и 9 таблиц. Список литературы состоит из 170 цитируемых источников.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Культивирование эукариотических клеток. Клетки HeLa культивировали в среде DMEM (Панэко) с добавлением противомикробно-противогрибкового препарата (Gibco), 8%-ой эмбриональной телячьей сыворотки (HyTest) и *l*-глутамина (Панэко). Для проведения экспериментов клетки пересеивали на покровные стекла или чашки Петри с адгезивным покрытием.

Трансфекция. Трансфекцию выполняли непосредственно перед каждым экспериментом с использованием препарата Lipofectamine 2000 (Invitrogen) согласно инструкции производителя.

Конструирование плазмид. Для получения конструкторов различных белков в виде химерных белков с флуоресцентной белковой меткой использовали полимеразную цепную реакцию с использованием Pfu-полимеразы (Thermo). Лигирование производили с использованием T4-лигазы в соответствии с инструкцией производителя.

Ингибирование транскрипции. Для ингибирования транскрипции использовали антибиотик актиномицин D (0.1 мг/мл).

Микроскопия. Для проведения прижизненных наблюдений клетки рассаживали на чашки Петри со стеклянным дном. Наблюдения осуществляли на второй день после трансфекции. Для сохранения жизнеспособности клеток температура предметного столика и объектива микроскопа поддерживалась на уровне 37°C. Клетки фотографировали с использованием конфокальных микроскопов LSM510 (Carl Zeiss) и Nikon C2 (Nikon).

Восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания (FRAP). FRAP проводили при помощи конфокального микроскопа Nikon A1, оборудованного 60× Plan Apo объективом (NA 1.4) при 37°C. После 4-ого кадра с помощью лазера осуществляли обесцвечивание интересующей области. Для обработки результатов использовали макрос AutoFRAP для программы ImageJ, любезно предоставленный С.А. Голышевым. Данные обрабатывали с помощью программы Microsoft Excel.

Истощение клеточного пула АТФ. Истощение внутриклеточного АТФ проводили по описанному в литературе протоколу (Bhattacharya et al., 2006).

Ингибирование клеточных метилтрансфераз с помощью AdOx. Для ингибирования метилирования клетки инкубировали в среде DMEM с добавлением аденозин-2,3-дигидрохлорида (AdOx) (2 мкг/мл, Sigma).

Сайт-направленный мутагенез химерных белков. Сайт направленный мутагенез осуществляли при помощи Change-IT Multiple Mutation Site Directed Mutagenesis Kit (Affimetrix) согласно инструкции производителя.

Работа с пекарскими дрожжами *Saccharomyces cerevisiae*. Пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* растили на среде, содержащей 2% пептона, 2% глюкозы и 1% дрожжевого экстракта. Необходимые для исследования штаммы получали по стандартному протоколу за счет постановки гена под галактозный промотор с использованием ПЦР-продукта с плазмиды pFA6a-His3MX6-PGAL1 и последующей трансформацией дрожжей ПЦР-продуктом с помощью полиэтиленгликоля и литий-ацетатного буфера. Выживаемость клеток оценивали по числу КОЕ (колониеобразующих единиц), образованных на твердой селективной среде через двое-трое суток после истощения эндогенного дрожжевого фибрилларина.

Результаты исследования и их обсуждение

Роль GAR-домена в функционировании фибрилларина

GAR-домен необходим для функционирования фибрилларина

Для выявления участия GAR-домена в функциональной активности FBL мы использовали стандартный метод комплементации генов в дрожжевых клетках. Мы

проанализировали способность комплементировать нокдаун дрожжевого FBL (NOP1) с помощью человеческого FBL и его частей - GAR-домена и белка с делетированным GAR-доменом (Δ GAR) (рис. 1А). Мы поставили NOP1 под контролируемый галактозный (GAL) промотор, полученный штамм W303 P_{GAL} -NOP1 был трансформирован плазмидами, кодирующими полноразмерный человеческий FBL или отдельно его домены (GAR или Δ GAR) под контролем конститутивного глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназного (GPD) промотора (p416GPD-FBL, p416GPD-GAR и p416GPD- Δ GAR, соответственно). Также, штамм W303 P_{GAL} -NOP1 был трансформирован плазмидами p416GPD или p416GPD-NOP1 в качестве отрицательного и положительного контроля, соответственно. Экспрессия всех экзогенных белков была подтверждена с помощью ОТ-ПЦР (рис. 1Б).

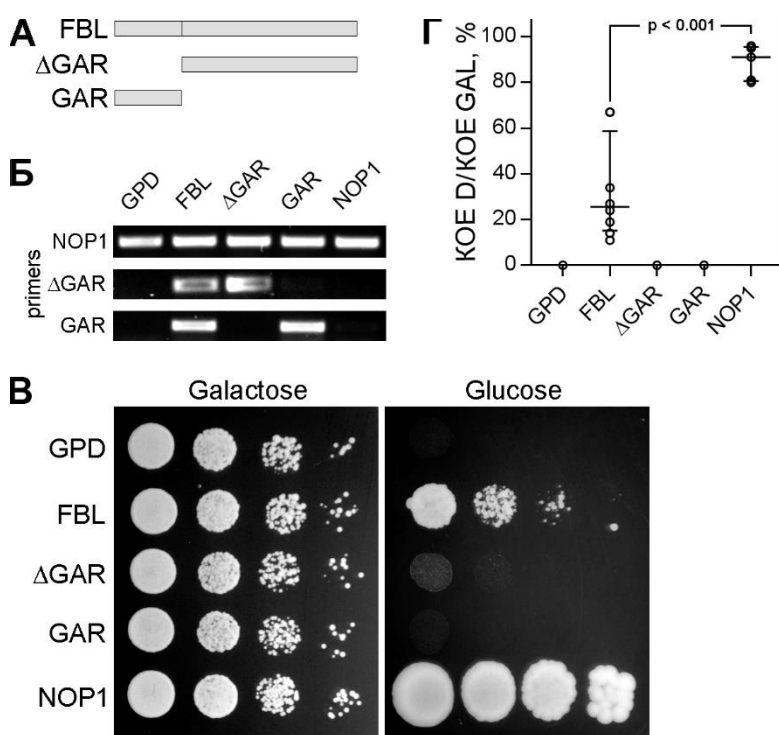


Рис. 1. GAR-домен необходим для функционирования FBL. (А) Схематическое изображение полноразмерного фибрилларина (FBL) и его доменов (Δ GAR, GAR). (Б) Детекция NOP1, FBL, Δ GAR и GAR транскриптов при помощи ОТ-ПЦР анализа в различных штаммах, коэкспрессирующих эндогенный NOP1 и экзогенные GPD-FBL, GPD- Δ GAR, GPD-GAR и GPD-NOP1 плазмиды. (В) Колонии клеток дрожжей, экспрессирующие GPD-FBL, GPD- Δ GAR, GPD-GAR, GPD-NOP1 или пустой вектор p416-

GPD на твердой среде с галактозой (левая панель) и глюкозой (правая панель). (Г) Выживаемость (KOE) клеток дрожжей, экспрессирующих GPD-FBL, GPD- Δ GAR, GPD-GAR, GPD-NOP1 или пустой вектор p416-GPD на среде с глюкозой в отсутствие экспрессии эндогенного NOP1. Выживаемость дрожжевых клеток каждого штамма оценивали как отношение KOE на среде с глюкозой к KOE на среде с галактозой (критерий Манн-Уитни).

Коэкспрессия человеческого FBL или его мутантных форм (GAR или Δ GAR) никак не отражалась на выживаемости дрожжевых клеток (рис. 1В, левая панель). В отсутствие галактозы в среде происходило ингибирование экспрессии эндогенного дрожжевого NOP1, что оказалось губительным для клеток дрожжей (рис. 1В, правая панель). Экспрессия полноразмерного человеческого фибрилларина спасала клетки от гибели - примерно 30%

клеток давали колонии (рис. 1В, правая панель, рис. 1Г). Ни GAR-домен, ни Δ GAR не спасали клетки от гибели. Следовательно, у дрожжей только полноразмерный человеческий фибрилларин может комплементировать дрожжевой NOP1, что косвенно свидетельствует о необходимости GAR-домена для функционирования FBL.

Роль GAR-домена в накоплении белка в ядре

FBL содержит NLS

FBL является относительно небольшим белком (34 кДа) и потенциально может проникать в ядро за счет диффузии. Для проверки наличия NLS в небольших белках к ним пришивают большой (>100 kDa) цитоплазматический белок. Чтобы проверить, содержит ли FBL в своем составе NLS, была сконструирована плазида, кодирующая полноразмерный FBL, слитый с геном β -галактозидазы (*lacZ*) и EGFP (FBL-LacZ-EGFP). LacZ-EGFP преимущественно имел цитоплазматическую локализацию (рис. 2А). FBL-LacZ-EGFP, напротив, имел ядерную локализацию, и эффективно накапливался внутри ядрышек (рис. 2А). Таким образом, в составе FBL присутствует функционально активный NLS.

GAR-домен выполняет функцию NLS

Чтобы понять, какой из доменов FBL содержит NLS, были сконструированы плазмиды, кодирующие FBL и его домены, слитые с EGFP (FBL-EGFP, GAR-EGFP и Δ GAR-EGFP). Полноразмерный FBL-EGFP преимущественно накапливался в ядрышке. Δ GAR-EGFP сходным образом накапливался в ядрышке, но также равномерно распределялся по нуклеоплазме и цитоплазме. GAR-EGFP локализовался преимущественно в ядрышке и нуклеоплазме (рис. 2Б). Таким образом, делеция GAR-домена приводит к нарушению ядерного импорта FBL, т.е. именно GAR-домен содержит в своем составе NLS.

Поскольку NLS-опосредованный транспорт белков в ядро является энергозависимым, были проведены эксперименты с истощением внутриклеточного пула АТФ. Для количественной оценки эффектов мы измеряли эффективность накопления белка в нуклеоплазме (отношение средней интенсивности флуоресценции EGFP в нуклеоплазме к средней интенсивности флуоресценции EGFP в цитоплазме - $F_{\text{nuc}}/F_{\text{cyt}}$). Истощение клеточного пула АТФ не влияло на локализацию EGFP, однако наблюдалось заметное ослабление накопления классического NLS из Т-антигена вируса SV40, слитого с EGFP (NLS^{SV40}-EGFP) (рис. 2В). В случае с GAR-доменом наблюдалось незначительное, но статистически достоверное снижение эффективности накопления в ядре. Таким образом, полученные данные говорят в пользу того, что GAR-домен выполняет функцию NLS, накапливая фибрилларин в ядре.

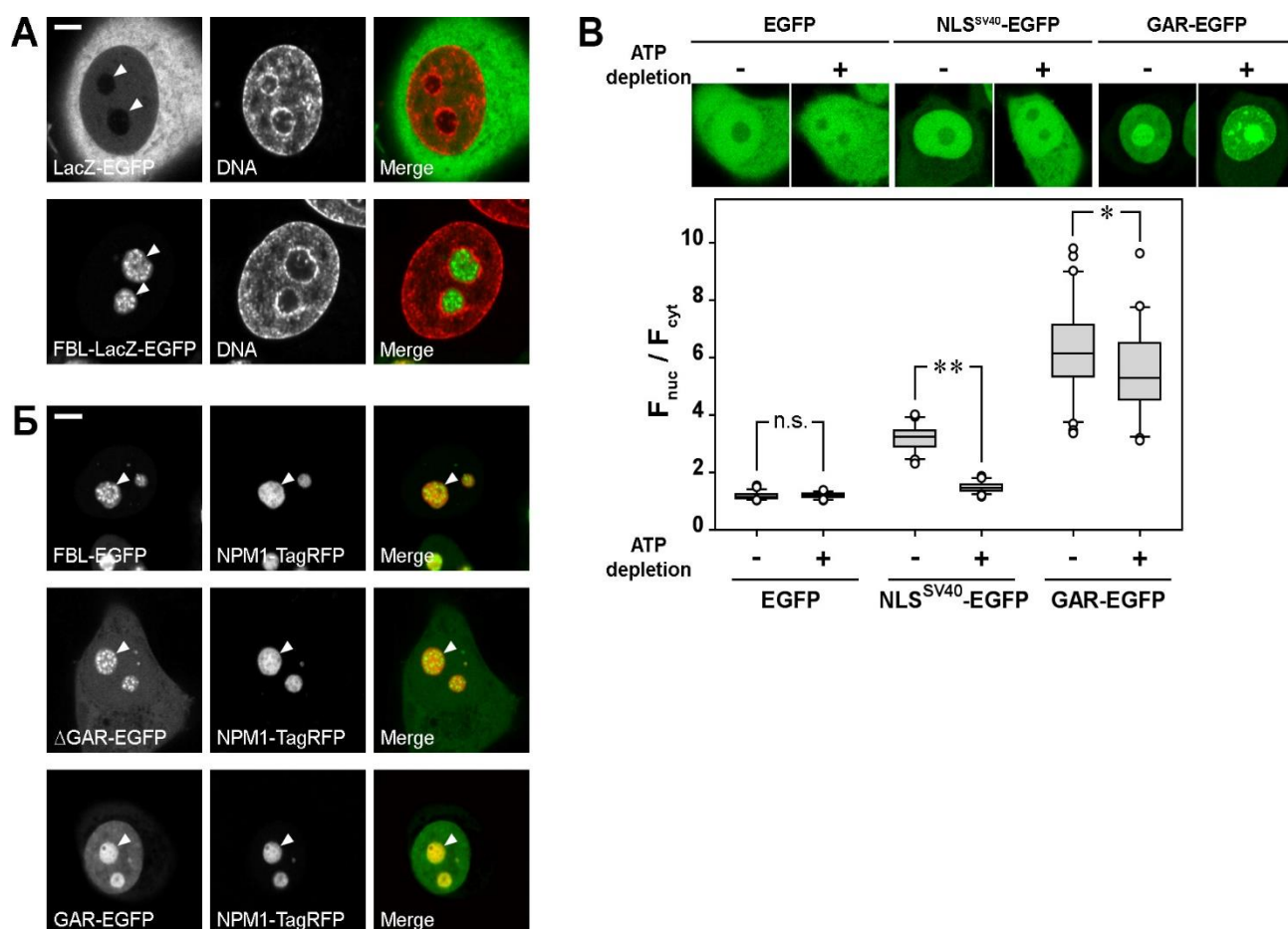


Рис. 2. GAR-домен содержит сигналы ядерной локализации (NLS). (А) Локализация LacZ-EGFP и FBL-LacZ-EGFP в клетках HeLa. Ядрышки обозначены треугольными стрелками. (Б) Локализация FBL-EGFP, ΔGAR-EGFP и GAR-EGFP в клетках HeLa. NPM1-TagRFP использовался в качестве маркерного белка гранулярного компонента ядрышка. (В) Эффективность накопления различных конструкций, слитых с EGFP, в ядре до и после истощения пула ATP (ATP depletion). По оси ординат отложена эффективность накопления, измеренное как отношение средней интенсивности флуоресценции в нуклеоплазме к таковой в цитоплазме. Медиана - линия внутри прямоугольника, межквартильный интервал - прямоугольник, 5%-95% интервал - вертикальная линия. n.s. - статистически не значимо; * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.001$ (критерий Манн-Уитни, $n > 50$). Масштабные линейки - 5 мкм.

Роль GAR-домена в накоплении белка в ядрышке

GAR-домен способствует накоплению FBL в гранулярном компоненте ядрышка

Детальный анализ локализации FBL, GAR и ΔGAR, слитых с EGFP, показал, что FBL-EGFP и ΔGAR-EGFP преимущественно локализовались в плотном фибриллярном компоненте ядрышка (ПФК) (рис. 3А). Помимо этого, FBL-EGFP детектировался в гранулярном компоненте (ГК) ядрышка, где он колокализовался с NPM1-TagRFP. Химерный белок ΔGAR-EGFP также выявлялся в ГК, однако, его содержание там было

меньше по сравнению с FBL-EGFP. GAR-EGFP, напротив, отсутствовал в фокусах транскрипции, накапливаясь в ГК ядрышка. Дополнительно мы проанализировали локализацию белков в клетках HeLa после ингибирования транскрипции актиномицином D (рис. 3Б). В таких клетках FBL-EGFP и Δ GAR-EGFP преимущественно локализовались в фибриллярной части сегрегировавших ядрышек, то есть в ПФК (для выявления которого мы коэкспрессировали FBL-TagRFP). GAR-EGFP колокализовался с NPM1-TagRFP в центральной части сегрегированных ядрышек, т.е. в гранулярном компоненте.

Таким образом, при анализе локализации фибрилларина мы установили, что FBL имеет двойную локализацию в ядрышке – в ПФК и в ГК, причем, по-видимому, за локализацию в ПФК отвечает метилтрансферазный домен, а за локализацию в ГК – GAR-домен. Если это так, то взаимодействия с ядрышком должно складываться из двух, различных по характеристикам взаимодействий. Для проверки этого предположения мы использовали метод FRAP.

Взаимодействие FBL с компонентами ядрышка

Метод FRAP позволяет выявить динамику обмена между двумя компартментами внутри клетки, причем, скорость обмена зависит от характеристик взаимодействия изучаемого вещества с компонентами клетки внутри и вне домена. Мы предположили, что при наличии двух локализаций внутри ядрышка FBL должен иметь и два разных по характеристикам способа взаимодействия с ядрышком. Действительно, после фотообесцвечивания флуоресценция FBL-EGFP сначала быстро восстанавливалась в гранулярном компоненте ядрышка, а затем происходило медленное восстановление флуоресценции в ПФК (рис. 3В). Восстановление флуоресценции Δ GAR-GFP после фотообесцвечивания детектировалось исключительно в ПФК. В случае GAR-домена наблюдалось быстрое и полное восстановление флуоресценции в ГК (рис. 3В). Таким образом, GAR-домен отвечает за высоко динамическое взаимодействие FBL с гранулярным компонентом ядрышка, в то время как Δ GAR обеспечивает относительно малодинамичное взаимодействие с плотным фибриллярным компонентом.

Анализ полученных кривых восстановления флуоресценции подтверждают полученный результат (рис. 3Г). Наиболее медленное восстановление наблюдалось в случае Δ GAR-GFP ($t_{1/2} \sim 21$ сек.), наиболее быстрое в случае GAR-EGFP ($t_{1/2} \sim 0.9$ сек.). Мы предположили, что кривую восстановления FBL-EGFP можно представить как взвешенную сумму двух кривых с медленной (Δ GAR-GFP) и быстрой (GAR-EGFP) динамиками: $\text{hat}\{FBL\} = a \cdot \Delta\text{GAR-EGFP} + b \cdot \text{GAR-EGFP}$. Действительно, полученная кривая практически полностью совпадала с экспериментальной кривой FBL-EGFP (рис. 3Д, Е), что также свидетельствует в пользу высказанного предположения.

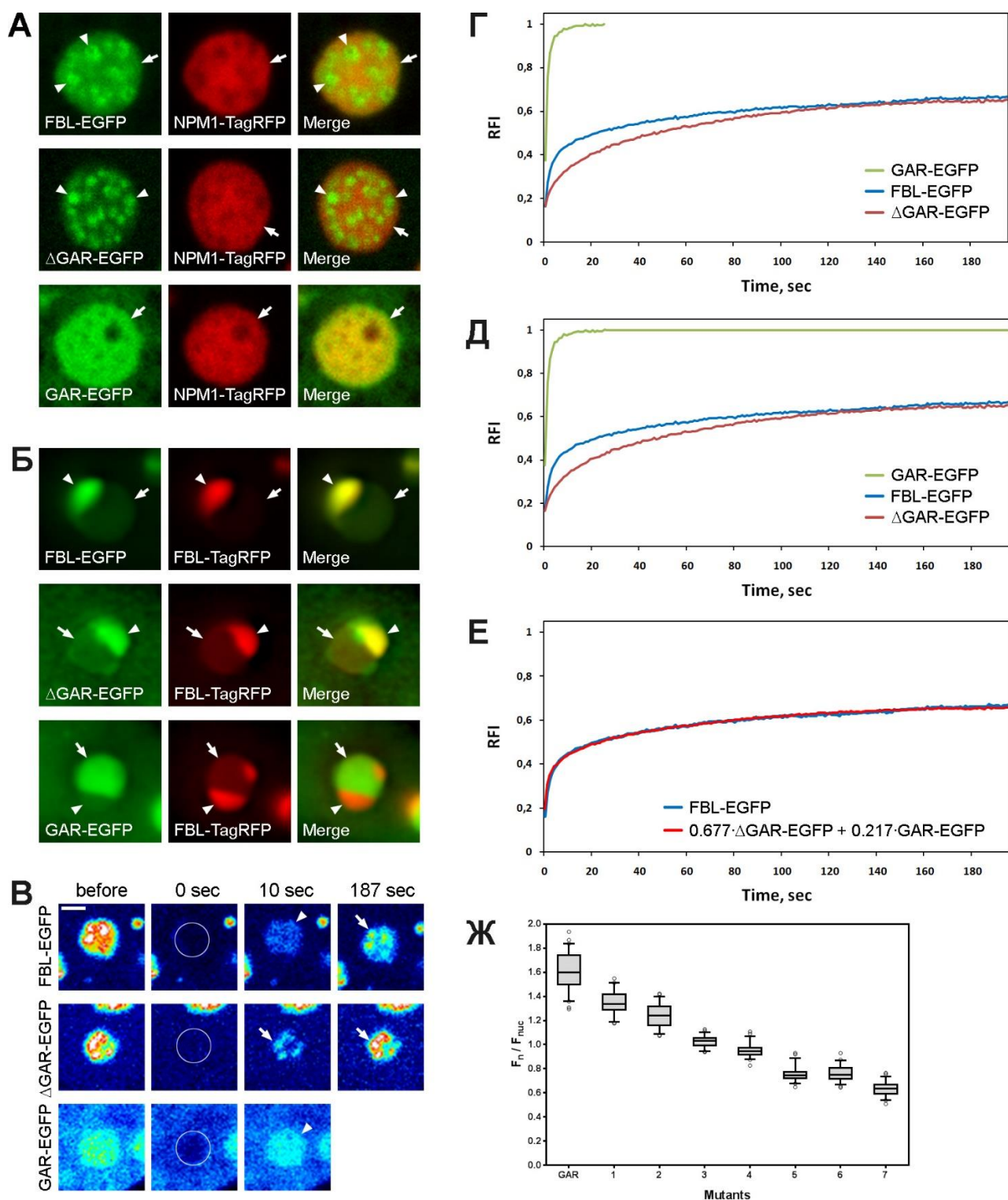


Рис. 3. GAR-домен содержит сигналы ядерной локализации (NoLS). (А) Локализация FBL-EGFP, Δ GAR-EGFP и GAR-EGFP в ядрышках клеток HeLa. NPM1-TagRFP использовался в качестве маркерного белка ГК ядрышка. Стрелками показан ГК ядрышка, треугольными стрелками – ПФК. **(Б)** Локализация FBL-EGFP, Δ GAR-EGFP и GAR-EGFP в ядрышках клеток HeLa после ингибирования транскрипции посредством актиномина D (0.1 мг/мл). FBL-TagRFP использовался в качестве маркерного белка ПФК ядрышка. **(В)** Подвижность FBL-EGFP, Δ GAR-

EGFP и GAR-EGFP, выявленная методом FRAP (псевдоцвета, теплые оттенки соответствуют большим значениям яркости, холодные – меньшим). (Г) Кривые восстановления флуоресценции для FBL-EGFP, Δ GAR-EGFP и GAR-EGFP после фотообесцвечивания в ядрышке. (Д) Кривые восстановления флуоресценции для FBL-EGFP, Δ GAR-EGFP и GAR-EGFP (экстраполированная кривая), которые использовались при построении кривой FBL-EGFP из кривых Δ GAR-EGFP и GAR-EGFP. (Е) Экспериментальные и реконструированные FRAP кривые для FBL-EGFP. (Ж) Зависимость эффективности накопления химерных белков GAR-(A1-A7)-EGFP от заряда в ядрышке. По оси абсцисс отложены различные конструкторы химерных белков, по оси ординат – эффективность накопления белков в ядрышке, измеренное как отношение средней интенсивности флуоресценции в ядрышке к таковой в нуклеоплазме.

Эффективность накопления GAR-домена в ядрышке пропорциональна числу положительно заряженных аргининов

Ранее было показано, что накопление белков в ГК может определяться электростатическими взаимодействиями между положительно заряженными участками белка и отрицательно заряженными компонентами ядрышка (Musinova et al., 2011; Savada and Bonham-Smith, 2013; Musinova et al., 2015; Martin et al., 2015). Этот механизм может реализовываться и в случае GAR-домена. Для проверки этого предположения мы измерили эффективность накопления мутантных форм GAR-домена с заменами положительно заряженных аргининов на нейтрально заряженные аланины (GAR-A1-7) (рис. 3Ж). Некоторые аминокислотные остатки объединялись в локусы для упрощения мутирования (всего 7 локусов) и ходе мутагенеза были последовательно заменены все аргинины на аланины в составе GAR-домена. Чем больше аргининов было заменено на незаряженные аминокислоты, тем меньше была эффективность накопления мутантного GAR-домена в ядрышке. Эти данные не противоречат идее о электростатическом механизме накопления, хотя и не могут служить прямым доказательством. Этот вопрос требует дополнительного анализа, что выходило за рамки задач данной работы.

Роль метилирования GAR-домена в накоплении белка в ядре и ядрышке

Метилирование аргининов влияет на функционирование белка

Для выявления вовлеченности метилирования аргининов в составе GAR-домена на функциональную активность FBL, дрожжевой штамм W303 P_{GAL}-NOP1 был трансформирован плазмидами, кодирующими мутантные формы полноразмерного FBL, где все аргинины в составе GAR-домена были заменены на положительно заряженные лизины (p416GPD-GAK-FBL) или на нейтрально заряженные аланины (p416GPD-GAA-

FBL). Экспрессия всех экзогенных белков была подтверждена с помощью ОТ-ПЦР (рис. 4А). Коэкспрессия дрожжевого NOP1 и человеческого фибрилларина или его мутантных форм (GAA-FBL, GAK-FBL) никак не отражалась на выживаемости дрожжей (рис. 4Б, левая панель). В отсутствие экспрессии эндогенного NOP1 на среде с глюкозой ни GAK-FBL, ни GAA-FBL функционально не могли заменить дрожжевой NOP1 и все клетки гибли (рис. 4Б, правая панель, рис. 4В). Таким образом, полученные данные косвенно указывают на необходимость метилирование аргининов в GAR-доме для функционирования FBL.

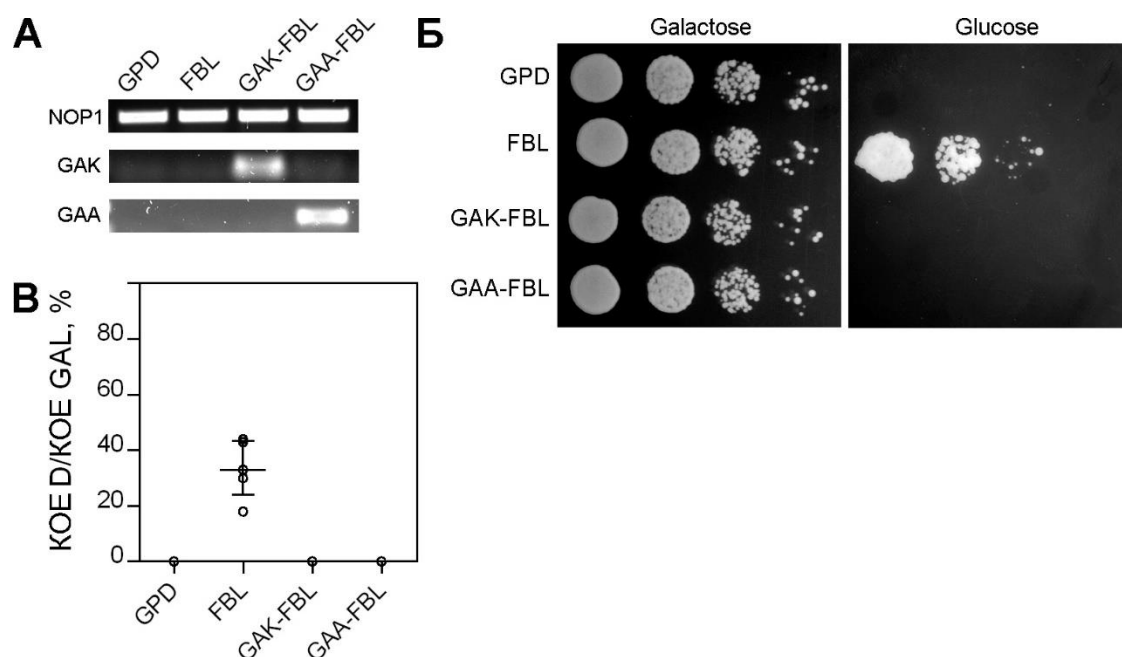


Рис. 4. Метилирование аргининов необходимо для функционирования FBL. (А) Детекция транскриптов NOP1, FBL, GPD-GAK-FBL и GPD-GAA-FBL при помощи ОТ-ПЦР анализа в различных штаммах, коэкспрессирующих эндогенный NOP1 и экзогенные GPD-FBL, GPD-GAK-FBL или GPD-GAA-FBL. (Б) Колонии клеток дрожжей, экспрессирующие GPD-FBL, GPD-GAK-FBL, GPD-GAA или пустой вектор p416-GPD на твердой среде с галактозой (левая панель) и глюкозой (правая панель). (Г) Выживаемость клеток дрожжей, экспрессирующих GPD-FBL, GPD-GAK-FBL, GPD-GAA или пустой вектор p416-GPD на среде с глюкозой в отсутствие экспрессии эндогенного NOP1. Выживаемость дрожжевых клеток каждого штамма оценивали как отношение KOE на среде с глюкозой к KOE на среде с галактозой.

Метилирование GAR-домена необходимо для выполнения им функции NLS

Чтобы исследовать влияние метилирования аргининов в составе GAR-домена на ядерный импорт FBL, клетки HeLa обрабатывали ингибитором метилирования AdOx. Для проверки эффективности такой обработки мы получили линию клеток, экспрессирующих FBL-FLAG. Экспрессированный FBL-FLAG был иммунопреципитирован из контрольных

клеток и из клеток, росших в течении 3-х суток в присутствии AdOx (рис. 5А). Полоса FBL-FLAG была идентифицирована на электрофорезе (подтверждение с помощью MALDI MS), причем в случае контрольной культуры полоса на электрофорезе и иммуноблоттинге (рис. 5Б) была несколько выше, чем в случае культуры, обработанной AdOx. Это может быть связано с деметилированием белка. Для прямого подтверждения белки обрабатывали Lys-C протеазой, которая должна была отщеплять N-концевой район FBL, который затем выявлялся с помощью MALDI MS (рис. 5В). В контроле был выявлен пептид с MS+ 7284, что соответствует сумме предсказанных MW+ 1-77 аминокислот FBL (6892) с дополнительными 14 диметилами ($14 \cdot 28 = 392$). Это свидетельствует о том, что первые 14 аргининов в составе GAR-домена были диметилированы. Дополнительно на спектре выявлялся второй пик (MW+ 8012), который, по-видимому, соответствует неполному протеолизу FBL (1-84 аминокислоты FBL - предсказанная MW+ 7620+14·28). После обработки AdOx выявлялся только один пик с MW+ 6892, что соответствует полностью деметилированному фрагменту GAR-домена (1-77 а.а.). Таки образом, обработка AdOx эффективно ингибирует метилирование GAR-домена в клетках HeLa.

Ингибирование белковых метилтрансфераз с помощью AdOx снижало эффективность накопления GAR-домена в ядре (рис. 5Г). Также мы использовали мутант, в котором все аргинины были заменены на лизины (GAR-K7). В этом случае наблюдалось еще большее ослабление накопления в ядре по сравнению с AdOx. В обоих случаях истощение пула АТФ не влияло на накопление белка в ядре (рис. 5Г), т.е. энергозависимая компонента накопления в ядре исчезала. Таким образом, метилирование аргининов необходимо для выполнения GAR-доменом функции NLS.

Метилирование аргининов в составе GAR-домена затрудняет выполнение им функции NoLS

После обработки клеток HeLa AdOx эффективность накопления GAR-домена в ядрышке увеличилась в два раза по сравнению с необработанными клетками (рис. 5Д). Мутантный неметируемый GAR-K7 также накапливался в ядрышке сильнее по сравнению с контролем. Таким образом, метилирование аргининов снижает эффективность накопления GAR-домена в ядрышке.

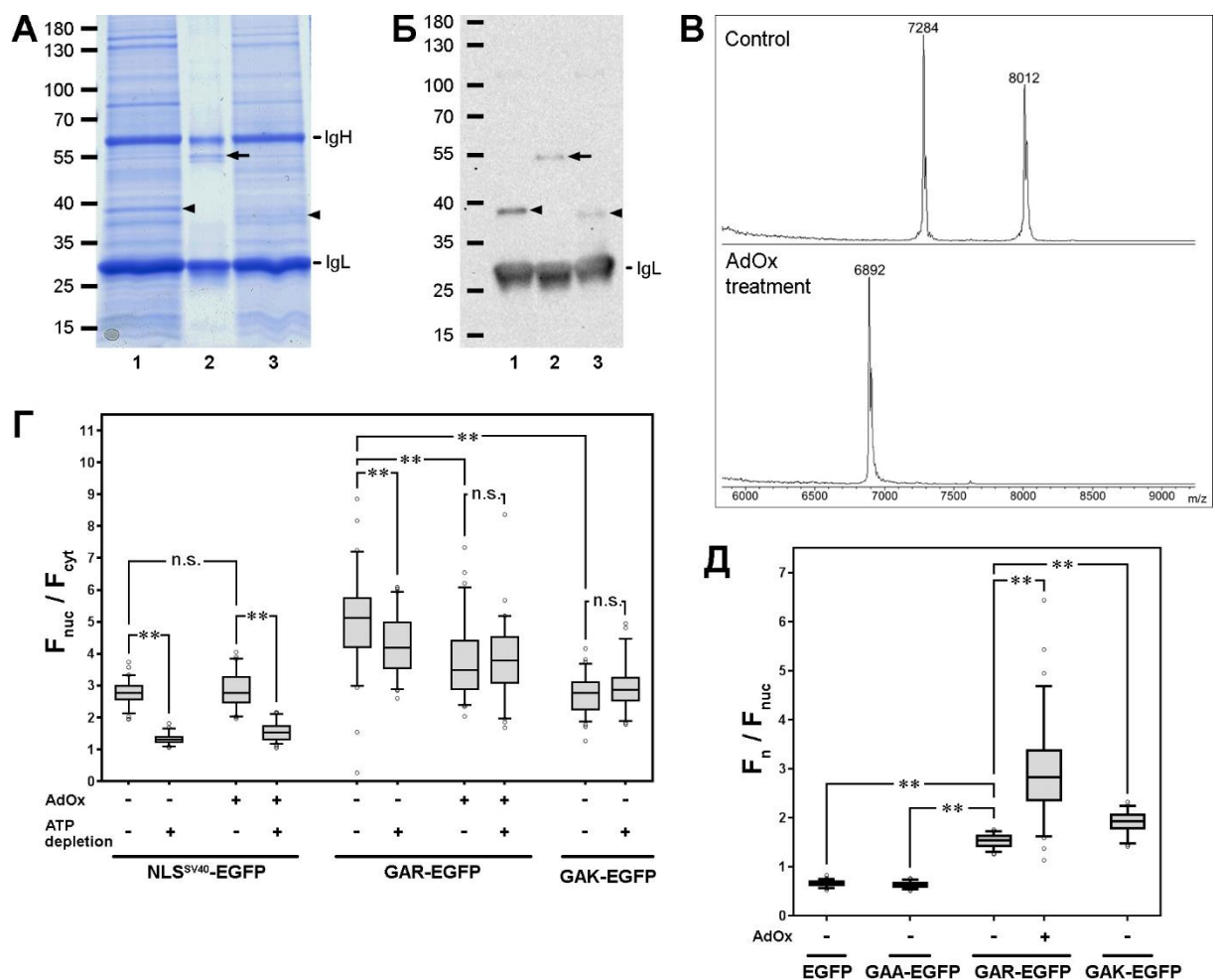


Рис. 5. Метилирование аргининов в составе GAR-домена влияет на локализацию FBL. (А) Электрофоретический анализ проб, полученных в ходе иммунопреципитации FBL-FLAG из контрольных клеток и в клеток, обработанных ингибитором метилирования AdOx (окраска Кумасси). Полоса, соответствующая FBL, отмечена треугольной стрелкой. Стрелкой отмечен контрольный FLAG-BAP белок с MW 49.3 kDa. Дорожки: 1 – клетки HeLa, экспрессирующие FBL-FLAG, 2 – белок FLAG-BAP, 3 – клетки HeLa, экспрессирующие FBL-FLAG после обработки AdOx. (Б) Результаты детекции FBL-FLAG с помощью вестерн-блот анализа (антитела против FLAG). (В) Спектры фрагментации FBL, расщепленного Lys-C протеазой в контрольных клетках (верхняя панель) или в клетках, обработанных AdOx (нижняя панель). (Г) Эффективность накопления различных конструкторов, слитых с EGFP, в ядре до и после обработки AdOx. По оси ординат – эффективность накопления в ядре, измеренная как отношение средней интенсивности флуоресценции в нуклеоплазме к таковой в цитоплазме. Медиана – линия внутри прямоугольника, межквартильный интервал (25-75 %) – прямоугольник, 5%-95% интервал – вертикальная линия. n.s. – статистически не значимо; ** – $p < 0.001$ (критерий Манн-Уитни, $n > 50$). (Д) Влияние метилирования аргининов на эффективность накопления GAR-домена в ядрышке. По оси ординат – эффективность накопления в ядрышке, измеренная как отношение средней интенсивности флуоресценции в ядрышке к таковой в нуклеоплазме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные продемонстрировали необходимость GAR-домена для функционирования FBL. Накопление небольших белков (<40-60 кДа) в ядре, которые свободно диффундируют через ядерные поры, может быть опосредовано либо активным ядерным импортом, либо взаимодействием с компонентами ядра. В ходе исследования было показано, что в случае с FBL за счет GAR-домена, по-видимому, реализуются оба механизма. Так, при ингибировании активного ядерного импорта (истощение пула АТФ) происходило снижение накопления классического NLS^{SV40}-EGFP в ядре до уровня EGFP, однако в случае с GAR-EGFP мы детектировали незначительное, хотя и статистически достоверное снижение эффективности накопления. Это говорит о том, что активный импорт отвечает только за часть накопления в ядрышке. Важной особенностью этого энергозависимого накопления была необходимость метилирования остатков аргинина внутри GAR-домена для импорта. Таким образом, GAR-домен функционирует как NLS, активность которого зависит от метилирования аргининов в его составе. Вторая, независимая от энергии компонента накопления реализуется за счет взаимодействия с ядерными структурами, а именно с гранулярным компонентом ядрышек. Эксперименты с FRAP показали, что удержание белка внутри гранулярного компонента опосредовано чрезвычайно динамичными взаимодействиями GAR-домена с компонентами данного компартмента ядрышка. Механизм удержания белка в гранулярном компоненте схож с NoLS-опосредованным накоплением внутри ядрышка. Было показано, что накопление белка в гранулярном компоненте ядрышек может быть обусловлено наличием участков в белке, обогащенных положительно заряженными аминокислотными остатками (NoLS), которые электростатически взаимодействуют с компонентами ядрышек (Musinova et al., 2011; Savada and Bonham-Smith, 2013; Musinova et al., 2015; Martin et al., 2015). При замене заряженных аргининов на незаряженные аланины (R→A) эффективность накопления GAR-домена в ядрышке уменьшалась, более того, уменьшение накопления зависело от количества мутированных положительно заряженных аминокислот. Это косвенно свидетельствует пользу того, что именно электростатические взаимодействия GAR-домена с компонентами ядрышка определяют накопление FBL в ядрышке. Эксперименты с ингибированием белкового метилирования показывают, что метилирование подавляет накопление фибрилларина в ядрышке за счет GAR-домена. Само по себе метилирование не изменяет заряд модифицированного аминокислотного остатка, однако увеличивает его размер и гидрофобность (Pahlich, Zakaryan & Gehring, 2006; Bedford & Clarke, 2009), что может приводить к снижению накопления в ядрышке. GAR-домен с заменами всех аргининов на лизины (R→K) накапливался в ядрышке намного сильнее по сравнению с

неизмененным GAR-доменом. То есть метилирование аргининов в GAR-домене оказывает модулирующее действие, оно необходимо для функционирования GAR-домена в качестве NLS, однако снижает его эффективность в качестве NoLS.

FBL осуществляет свои функции, локализуясь в ПФК ядрышка, и данная специфическая его локализация не зависит от GAR-домена. Однако, неспецифическая аккумуляция фибрилларина в ГК ядрышка за счет GAR-домена может быть биологически значимой, так как увеличивается вероятность взаимодействия с функциональными сайтами в ПФК ядрышка.

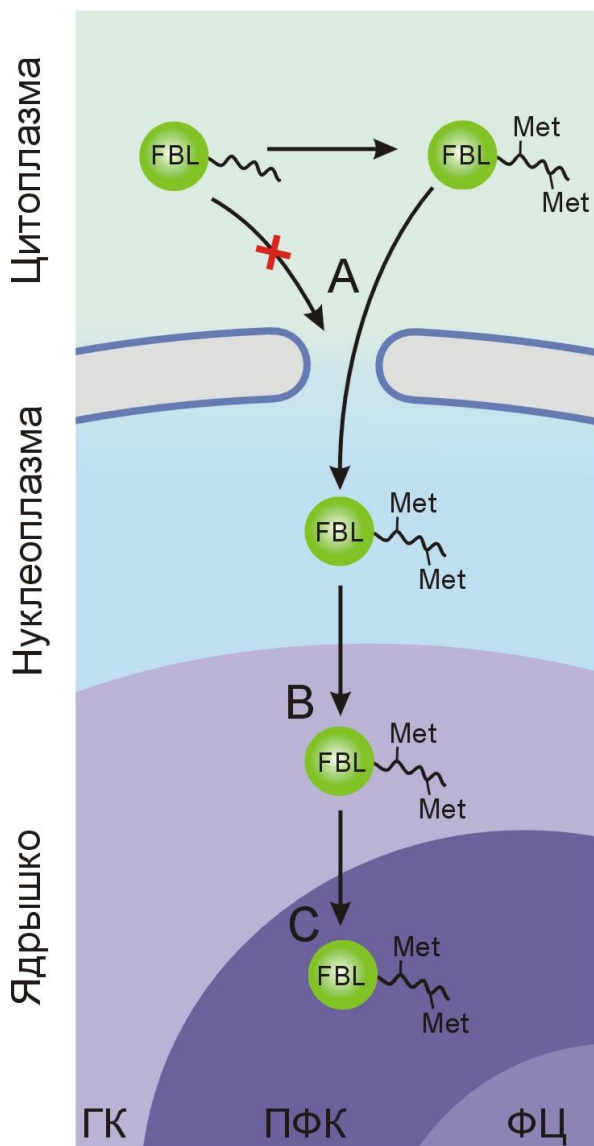


Рис. 6. Схематическое изображение последовательных стадий накопления FBL в сайтах транскрипции (в ПФК). (A) Метилирование остатков аргинина в составе GAR-домена способствует ядерному импорту молекул FBL. **(B)** Динамическое накопление FBL, опосредованное GAR-доменом, приводит к его накоплению в ГК ядрышек. **(C)** FBL локализуется в транскрипционных сайтах пре-рРНК в ПФК.

По результатам проведенного исследования можно утверждать, что появление GAR-домена при переходе от Архей к эукариотам было необходимо для эффективного накопления белка в ядре и в ядрышке. Именно за счет данного свойства GAR-домена реализуется, как мы предполагаем, последовательный двухступенчатый механизм накопления фибрилларина в сайтах функционирования (рис. 6).

ВЫВОДЫ

1. В модели комплементации нокаутированного дрожжевого фибрилларина показано, что GAR-домен необходим для функциональной активности фибрилларина.
2. GAR-домен обеспечивает импорт фибрилларина в ядро, выполняя функцию сигнала ядерной локализации (NLS).
3. GAR-домен способствует высоко динамическому накоплению фибрилларина в ядрышке за счет взаимодействия с компонентами ядрышка, выполняя функцию сигнала ядрышковой локализации (NoLS).
4. Метилирование аргининов в GAR-домене необходимо для выполнения им функции NLS, однако препятствует его взаимодействию с гранулярным компонентом ядрышка, т.е. выполнению функции NoLS.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ имени М.В. Ломоносова

1. Лисицына О.М., Мусинова Я.Р., **Шубина М.Ю.**, Поляков В.Ю., Шеваль Е.В. Роль интерфазных проядрышек в восстановлении структуры ядрышка после обратимой гипотонической обработки // Известия РАН. Серия биологическая. 2013. № 6, с. 750-753. Импакт-фактор (WOS) – 0,379.
2. **Шубина М.Ю.**, Мусинова Я.Р., Шеваль Е.В. Ядрышковая метилтрансфераза фибрилларин: эволюция структуры и функции // Биохимия. 2016. том 81, №9, с. 1187-1197. Импакт-фактор (WOS) – 1,886.
3. **Shubina M.Y.**, Musinova Y.R., Sheval E.V. Proliferation, cancer, and aging – novel functions of the nucleolar methyltransferase fibrillarin? // Cell Biology International. 2018. том 42, № 11, с. 1463-1466. Импакт-фактор (WOS) – 2,127.

Тезисы докладов и стендовых сообщений

1. **Шубина М.Ю.**, Мусинова Я.Р., Шеваль Е.В. Роль GAR-домена в обеспечении ядрышковой локализации фибрилларина. В сборнике Тезисы докладов и сообщений XVII всероссийского симпозиума "Структура и функции клеточного ядра", том 56, тезисы, с. 692-692, 2014.

2. **Шубина М.Ю.**, Мусинова Я.Р., Шеваль Е.В. GAR-домен фибрилларина отвечает за накопление белка в гранулярном компоненте ядрышка. II Всероссийская конференция “Внутриклеточная сигнализация, транспорт, цитоскелет”, Цитология, 2015, том 57, № 9, с. 666-667.
3. **Шубина М.Ю.** Вклад GAR-домена в накопление фибрилларина в ядре и ядрышке. XXVI Российская конференция по электронной микроскопии (РКЭМ-2016), Зеленоград, Россия, 30 мая - 3 июня 2016.
4. **Шубина М.Ю.**, Мусинова Я.Р., Курнаева М.А. Сравнительный анализ механизмов действия сигналов ядерной и ядрышковой локализации. Конференция "Клеточная биология: проблемы и перспективы", Санкт-Петербург, Россия, 2-5 октября 2017.
5. **Шубина М.Ю.** Роль GAR-домена в накоплении фибрилларина в ядре и ядрышке. XXV Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2018», МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия, 9-13 апреля 2018.
6. **Шубина М.Ю.**, Арифалин Е.А., Цитрина А.А., Мусинова Я.Р., Шеваль Е.В. Роль GAR-домена фибрилларина в накоплении белка в ядре. XVIII Всероссийский симпозиум "Структура и функции клеточного ядра", Санкт-Петербург, Россия, 16-18 октября 2018.
7. Lisitsyna O.M., Kurnaeva M.A., **Shubina M.Y.**, Arifulin E.A., Musinova Y.R., Mironov A.A., Sheval E.V. Origin and evolution of nuclear localization signals. 26th Wilhelm Bernhard Workshop on the Cell Nucleus, Дижон, Франция, 20-24 мая 2019.