

БЕЛОК Paip2 *Drosophila melanogaster* СВЯЗЫВАЕТСЯ С БЕЛКОМ ENY2 И ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С КОМПЛЕКСОМ TREX-2 В СОСТАВЕ мРНК-ЧАСТИЦ ГИСТОНОВ

© 2024 г. М. М. Куршакова^{а, *}, А. Н. Краснов^б, Е. Н. Набирочкина^б, С. Г. Георгиева^а

^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^бИнститут биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

*e-mail: kursha@mail.ru

Поступила в редакцию 17.11.2023 г.

После доработки 24.12.2023 г.

Принята к публикации 08.01.2024 г.

Белок ENY2 — эволюционно консервативный мультифункциональный белок, входящий в состав нескольких комплексов, регулирующих различные этапы экспрессии генов. ENY2 входит в состав комплекса TREX-2, необходимого для экспорта большей части мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры у многих эукариот. Широкий спектр функций ENY2 позволяет предположить, что он может ассоциироваться и с другими белковыми факторами или комплексами. С целью поиска белков, взаимодействующих с ENY2, проведен скрининг кДНК-библиотеки в дрожжевой двугибридной системе. В результате найдено взаимодействие ENY2 с РНК-связывающим белком Paip2. Paip2 непосредственно связывается с ENY2 *in vitro* и взаимодействует с ENY2 *in vivo* на молекулярном и генетическом уровне. Paip2 способен ассоциировать с ENY2-содержащим комплексом TREX-2. Paip2 присутствует в локусе кластера генов гистонов, Paip2 и ENY2 совместно обнаружены в тельцах гистонов (histone locus body, HLB) — ядерных структурах, в которых происходит скоординированная транскрипция и процессинг мРНК гистонов. Paip2 вместе с ENY2 и другими белками комплекса TREX-2 ассоциирован с матричными рибонуклеопротеиновыми частицами (мРНК-частицами) гистонов. Нокдаун мРНК Paip2 приводит к уменьшению связывания субъединиц TREX-2 с мРНК гистонов. Таким образом, Paip2 можно считать новым белком-партнером ENY2 в составе комплекса TREX-2, который участвует в связывании TREX-2 с мРНК-частицами гистонов.

Ключевые слова: Paip2, ENY2, TREX-2, Xmas-2, HLB, ядерное тельце, гены гистонов, мРНК гистонов

DOI: 10.31857/S0026898424030095, **EDN:** JCDFDHO

ВВЕДЕНИЕ

Экспрессия генов включает этапы инициации транскрипции, синтеза и процессинга мРНК, образования зрелой мРНК-содержащей рибонуклеопротеиновой частицы (мРНК-частицы), экспорта мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры, трансляции в цитоплазме. Белок ENY2 (transcription and export complex 2 subunit) — эволюционно консервативный мультифункциональный

белок, участвующий в экспрессии генов на разных этапах [1, 2]. Белок ENY2 *Drosophila melanogaster*, также называемый e(y)2, как и его гомологи, — субъединица эволюционно консервативного ядерного комплекса TREX-2 (transcription and export complex 2), необходимого для экспорта большей части мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры у различных эукариот [3–8]. В составе TREX-2-комплекса человека ENY2 в двух копиях связывается с белком Xmas-2 — платформой для сборки комплекса [6]. TREX-2 взаимодействует с мРНК, ассоциирует с ядерными порами, а нокдаун его компонентов приводит к накоплению мРНК в ядре [9]. Нами был выделен совместный комплекс TREX-2 *Drosophila melanogaster* с белками комплекса инициации репликации (origin replication complex, ORC) и показано, что субъединицы ORC TREX-2-зависимым образом взаимодействуют с мРНК-частицами и участвуют в связывании рецептора экспорта NXF1 с мРНК [10]. В работах нашей группы и других исследователей было показано, что ENY2 также служит компонентом и других ядерных комплексов. ENY2 у многих

Сокращения: AD (activator domain) — активаторный домен; BD (DNA-binding domain) — ДНК-связывающий домен; CBP (cap-binding proteins) — кэпсвязывающие белки; CPRG (chlorophenol red-β-D-galactopyranoside) — хлорфеноло красный-β-D-галактопиранозид; DUB-модуль (deubiquitination module) — деубиквитинирующий модуль; HLB (histone locus body) — тельца гистонов локуса; ORC (origin replication complex) — комплекс инициации репликации; PABP (poly(A)-binding protein) — поли(А)-связывающий белок; RIP (RNA immunoprecipitation) — иммунопреципитация РНК-частиц; мРНК-частица — мРНК-содержащая рибонуклеопротеиновая частица; S2 ТЛ — тотальный лизат S2-клеток; ЯЭ — ядерный эмбриональный экстракт.

эукариот входит в состав деубиквитирующего модуля (DUB модуль) транскрипционного ко-активаторного ацетилтрансферазного комплекса SAGA [4, 11, 12], ENY2 модулирует деубиквитирующую активность комплекса [13]. DUB-модуль SAGA необходим для удаления моноубиквитина с остатка Lys120 гистона H2B на хроматине кодирующей части генов [13]. В состав DUB-модуля входят также белки Sgf11, Nonstop, причем ENY2 непосредственно связан с Sgf11 [11, 14]. С вовлеченностью в деубиквитинирование H2B, по-видимому, связано участие гомолога ENY2 у дрожжей, белка Sus1, в негативной регуляции длины теломер [15]. ENY2 также ассоциирован с комплексом ТНО (transcription and export complex), участвуя в его связывании с мРНК-частицами в ходе элонгации транскрипции [16]. ENY2 в составе TREX-2 связывается с белком Sgf11, который взаимодействует с комплексом кэпсвязывающих белков (cap-binding proteins, CBP) на 5'-конце мРНК [17].

Таким образом, ENY2 входит в состав нескольких комплексов, регулирующих различные стадии экспрессии генов. Широкий спектр функций ENY2 позволяет предположить, что этот белок взаимодействует и с другими белковыми факторами или комплексами. С целью идентифицировать новые белки-партнеры ENY2 мы провели скрининг кДНК-библиотеки из эмбрионов *D. melanogaster* в дрожжевой двугибридной системе и обнаружили взаимодействие ENY2 с РНК-связывающим белком Paip2.

PAIP2 (poly(A)-binding protein interacting protein 2) — специфичный для многоклеточных организмов белок, который впервые был описан как негативный регулятор трансляции [18]. PAIP2 взаимодействует непосредственно с поли(А)-связывающим белком PABP [19]. Ассоциация PAIP2 с PABP ингибирует связывание PABP с поли(А)-последовательностями мРНК, а также нарушает взаимодействие PABP с фактором eIF4G, что приводит к снижению интенсивности трансляции [20, 21], а также предотвращает терминацию трансляции мРНК [22]. PAIP2 может оказывать негативное влияние на трансляцию мРНК, лишенных поли(А)-последовательности [23]. Помимо участия в регуляции трансляции PAIP2 также играет роль в поддержании стабильности мРНК. Так, связываясь с 3'-нетранслируемой областью (3' UTR) мРНК VEGF, PAIP2 стабилизирует молекулу мРНК [24], а связываясь с 3'-UTR мРНК GLUT5, изменяет скорость ее распада [25]. Взаимодействие PAIP2 с мРНК Per1 и Per2 приводит к увеличению скорости их деградации в клетках нервной системы [26].

В геноме человека идентифицировано два паралога PAIP2: PAIP2A и PAIP2B [27], а в геноме *D. melanogaster* — один ген, Paip2, кодирующий белок с расчетной молекулярной массой 14 кДа. Как и его аналоги у млекопитающих, белок Paip2

D. melanogaster экспрессируется во многих тканях, взаимодействует с PABP в цитоплазме и ингибирует связывание PABP с поли(А)-последовательностями мРНК. Повышенная экспрессия Paip2 в пролиферирующих клетках крыловых дисков приводит к уменьшению размеров дисков из-за снижения числа клеток [28]. Ранее показано, что у *D. melanogaster* Paip2 присутствует не только в цитоплазме, но и в ядрах клеток различных тканей [29]. Paip2 детектируют в ряде локусов на политенных хромосомах из ядер клеток слюнных желез, в основном в междисках и пучках. Paip2 РНК-зависимым образом привлекается на хроматин в промоторные области активно транскрибируемых генов. Paip2 связывается с мРНК вблизи 5'-конца синтезирующихся транскриптов и ассоциирует с белком CBP80 — компонентом кэпсвязывающего комплекса CBP [30].

Целью данной работы было исследование найденного нами взаимодействие Paip2 *D. melanogaster* с ENY2. Показано, что Paip2 — функционально важный белок-партнер ENY2, взаимодействующий с ENY2-содержащим комплексом TREX-2. Обнаружено, что Paip2 присутствуют в локусе кластера генов гистонов на политенных хромосомах; Paip2 и ENY2 колокализуются в ядерном тельце HLB (histone locus body), с которым ассоциирован хроматин кластера и где происходит скоординированная с S-фазой активация транскрипции и процессинга мРНК около 100 копий репликативно-зависимых генов гистонов [31]. Продemonстрировано, что Paip2 вместе с субъединицами TREX-2 взаимодействует с мРНК-частицами, содержащими мРНК гистонов. Снижение уровня экспрессии Paip2 приводит к уменьшению связывания комплекса TREX-2 с мРНК гистонов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дрожжевая двугибридная система. Использовали двугибридную систему MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 2 (“Clontech”, США). Нуклеотидную последовательность, кодирующую полно-размерный белок ENY2, клонировали в одной рамке считывания с последовательностью ДНК-связывающего домена (DNA-binding domain, BD) LexA в плазмиде pBTM117с. Эту конструкцию использовали для скрининга кДНК-библиотеки, полученной из эмбрионов *D. melanogaster* и содержащей 10⁷ клонов в одной рамке считывания с последовательностью активаторного домена (activator domain, AD) GAL4 в плазмиде pACT2. Для скрининга использовали штамм Lc40c *Saccharomyces cerevisiae*. Ложнопозитивные клоны отсеивали по протоколу производителя. Экспрессию репортерного гена *LacZ* оценивали по активности кодируемой им β-галактозидазы в реакции расщепления субстрата (chlorophenol red-β-D-galactopyranoside, CPRG) в жидкой культуре по протоколу производителя. За

единицу активности (ед.) β -галактозидазы (GLb) принимали количество фермента, которое гидролизует 1 мкМ CPRG до хлорофенолового красного (chlorophenol red) и D-галактозы за 1 мин на 1 клетку. Для расчета использовали формулу ("Clontech"):

$$[\text{GLb}] (\text{ед.}) = 10^3 \cdot \text{OD}_{578} / (t \cdot V \cdot \text{OD}_{600}),$$

где t — время инкубации, мин; $V = 0.1 \cdot C$ — объем, мл (здесь: $C = 5$ мл); OD_{578} и OD_{600} — оптическая плотность раствора при длине волны 578 и 600 нм соответственно.

Генетическое скрещивание дрозофилы. Мутантная линия #13029 *Drosophila melanogaster* с генотипом $y[1]w[67c23]; P\{y[+mDint2]w[BR.E.BR.] = SUPor-P\} KG03704ry[506]$, содержащая инсерцию транспозона *KG03704* в промоторной области гена *Paip2*, была получена из коллекции Bloomington *Drosophila* Stock Center (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>). Мутантная линия $y[1]w[1]e(y)2[u1]/FM4$, несущая гипоморфную мутацию $e(y)2[u1]$ в гене, кодирующем белок ENY2, была описана ранее [32]. Для изучения взаимодействия *Paip2* и $e(y)2$ самок линии $y[1]w[1]e(y)2[u1]/FM4$ скрещивали с самцами линии #13029. Рассчитывали процент самцов с аномальной морфологией абдоминальных сегментов 9 и 10 в скрещиваниях и исходной линии $y[1]w[1]e(y)2[u1]/FM4$. Генетические скрещивания проводили при 25°C в трех повторях. Исследовали не менее 150 особей каждого генотипа.

Соосаждение рекомбинантных белков на глутатион-сефарозе. Нуклеотидная последовательность, кодирующая полноразмерный белок *Paip2*, была клонирована в одной рамке считывания с последовательностью гена глутатионтрансферазы (GST) в плазмиде pGEX5x-1. После экспрессии в *Escherichia coli* штамм BL21(DE3), 50–100 мкг рекомбинантных белков GST-*Paip2* или GST осаждали на глутатион-сефарозе 4B ("Sigma", США) и инкубировали со 100–200 мкг аффинно очищенного рекомбинантного белка ENY2-His₆.

Антитела. Использовали ранее полученные и охарактеризованные нами аффинно очищенные поликлональные кроличьи антитела к белкам ENY2 [32], Xmas-2 [4], PCID2 [33] и мышинные моноклональные антитела M2 к FLAG-эпиту ("Sigma"). Поликлональные антитела к *Paip2* получали от кроликов и мышей, иммунизированных аффинно очищенным белком, экспрессированным в векторе pET22b в безлактозной системе. Антитела очищали методом аффинной хроматографии с использованием конъюгированного с BrCN-активированной сефарозой 4B ("Sigma") *Paip2*. Моноклональные антитела к ламину Dm0 были получены из Developmental Studies Hybridoma Bank, созданного под эгидой NICHD и поддерживаемого The University of Iowa, Department of Biological Sciences (США).

Экстракты клеточных культур и эмбрионов дрозофилы. Ядерный экстракт (ЯЭ) из 0–12-часовых эмбрионов *D. melanogaster* получали с использованием 0.42 М раствора сульфата аммония, как описано ранее [34]. Клетки *D. melanogaster* линии Schneider 2 (S2) культивировали при 25°C в среде Schneider's Insect Medium ("Sigma"), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота ("HyClone", США). Тотальный лизат S2 клеток (S2 ТЛ) выделяли и проводили реакции коиммунопреципитации, как описано ранее [32].

Для осаждения РНП-частиц антителами (RNA immunoprecipitation, RIP) белки S2-клеток разделяли на ядерную и цитоплазматическую фракции в буфере, содержащем 40 мМ HEPES, pH 7.8, 2.5 мМ MgCl₂, 100 мМ NaCl, 1 мМ DTT и ингибиторы протеаз ("Roche", Швейцария). Для лизиса ядер использовали раствор WLB (10 мМ HEPES, pH 7.0, 100 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 25 мМ EDTA, 0.5% NP-40, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10% глицерин). Перед иммунопреципитацией экстракт обрабатывали 0.6 U/мл ДНКзы I.

Трансфекция клеток S2. Кодирующую полноразмерный белок *Paip2* нуклеотидную последовательность, в одной рамке считывания с тремя FLAG-эпитопами на N-конце, клонировали в вектор pAc5.1/V5-His ("Invitrogen", США). Трансфекцию S2-клеток проводили с использованием MACSfectin Reagent ("Miltenyi Biotec", Германия) по протоколу производителя.

Иммуноокрашивание политенных хромосом. Иммуноокрашивание политенных хромосом из ядер клеток слюнных желез личинок *D. melanogaster* проводили по методике J. Platero с соавт. [35]. Использовали аффинно очищенные кроличьи антитела к *Paip2*. В качестве вторичных использовали ослиные антитела против IgG кролика, конъюгированные с флуоресцентным красителем Cy3 ("Amersham", США). Хроматин окрашивали DAPI ("Sigma").

Иммуноокрашивание клеток S2. Клетки помещали на покровные стекла, дважды промывали PBS, 10 мин фиксировали в 3.7%-ном растворе параформальдегида, 5 мин пермеабилizовали в 0.2%-ном Triton X-100, 10 мин блокировали в 3%-ной суспензии сухого молока (все растворы готовили на PBS). Препараты инкубировали с аффинно очищенными мышинными антителами к *Paip2* и кроличьими антителами к ENY2. В качестве вторичных использовали ослиные антитела против IgG мыши, конъюгированные с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 488 ("Thermo Fisher Scientific", США), и ослиные антитела против IgG кролика, конъюгированные с флуоресцентным красителем Cy3 ("Amersham"). Антитела разводили в 3%-ной суспензии сухого молока в PBS и инкубировали с образцами в течение 60 мин при комнатной температуре. После инкубации как с первичными,

так и вторичными антителами клетки трижды промывали PBS (5 мин каждая промывка). Ядра клеток окрашивали DAPI. Препараты помещали в Vectashield Mounting Medium (“Vector Laboratories”, США) и анализировали на конфокальном микроскопе TCS SP2 или флуоресцентном микроскопе DMR/HC5 (“Leica Microsystems Inc.”, Германия) с объективом HCX PZ Fluotar $\times 100/1.3$. Результаты регистрировали с помощью цифровой камеры Leica DC350 F.

Флуоресцентная гибридизация *in situ* (FISH-гибридизация). FISH-гибридизацию РНК проводили, как ранее [4], с использованием Су3-меченого олиго-dT-зонда длиной 50 п.н. Для совмещенной с иммуноокрашиванием FISH-гибридизации с ДНК-зондом сначала проводили фиксацию и пермеабиллизацию S2-клеток, как при иммуноокрашивании. Клетки инкубировали в растворе 50%-ного формамида в буфере $2\times$ SSC в течение 5 мин при 95°C и затем в течение 5 мин при 4°C . После этого проводили дегидратацию клеток, последовательно промывая их 70, 90 и 100%-ным этанолом при 4°C . К дегидратированным клеткам добавляли гибридизационную смесь с биотинилированным ДНК-зондом. В качестве матрицы для получения зонда использовали последовательность гена *His3*, которую амплифицировали методом ПЦР, и вносили метку биотинилированного dUTP, используя для этого Biotin-Nick Translation Mix (“Roche”). Биотинилированную ДНК денатурировали в 25%-ном формамиде при 95°C в течение 5 мин и проводили гибридизацию в следующем буфере: $2\times$ SSC, 25% формамид, 10% декстрансульфат, 1 мг/мл дрожжевая тРНК, 0.5 мг/мл оцДНК — при 37°C в течение 18 ч. Не связавшийся с клетками зонд удаляли промыванием в растворе 50%-ного формамида в буфере $2\times$ SSC при 45°C , а затем в $0.1\times$ SSC при 55°C . Клетки инкубировали в блокирующем реагенте в течение 30 мин, а затем 60 мин с кроличьими антителами к Paip2. Детекцию FISH-сигнала *His3* проводили при помощи авидина, конъюгированного с флуоресцентным красителем Texas Red (“Invitrogen”), и меченных биотином моноклональных мышиных антител к авидину (“Vector Laboratories”). После трехкратного повторения обеих стадий на последнем этапе для детекции сигнала Paip2 использовали вторичные антитела против IgG кролика, конъюгированные с Alexa Fluor 488. Ядра клеток окрашивали DAPI. Препараты помещали в среду Vectashield Mounting Medium (“Vector Laboratories”) и анализировали на конфокальном микроскопе Leica TCS SP2.

РНК-интерференция. РНК-интерференцию в S2-клетках проводили по опубликованному протоколу [36] с использованием 10–20 мкг дцРНК на 1×10^6 клеток. дцРНК синтезировали с помощью набора для транскрипции Transcript Aid T7 High Yield (“Thermo Fisher Scientific”) с ПЦР-продуктов, содержащих промотор для T7 РНК-полимеразы.

Экспрессию генов оценивали с помощью количественной ПЦР и иммуноблотинга. В качестве отрицательного контроля использовали дцРНК, соответствующую фрагменту мРНК зеленого флуоресцентного белка (GFP). Для синтеза ПЦР-продуктов использовали следующие олигонуклеотидные праймеры:

Paip2: 5'-GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAGTCTCTTCAACAACA-3' и

5'-GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACTGGCTTTATGAGGCAGGG-3';

e(y)2: 5'-GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGCACTTCCGGCGCAGTTGATC-3' и 5'-GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGGATTCGTCCTCTGGCTCA-3';

xmas-2: 5'-GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGACCTGCACCGTAAG-3' и

5'-GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCGGTTGTAGTTCATAG-3';

gfp: 5'-CGACTCACTATAGGGAGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGC-3' и

5'-CGACTCACTATAGGGAGAGATGCCGTTCTTCTGCTTGTCG-3'.

Иммунопреципитация мРНК-частиц. Иммунное соосаждение мРНК-частиц гистонов и контрольных генов (RIP-анализ) проводили, как описано ранее [37], без использования каких-либо сшивающих реагентов. Лизат ядер S2-клеток инкубировали в течение 1 ч при 4°C с антителами, связанными с protein(A)-сефарозой, в буфере NT2 (50 мМ Трис-HCl, pH 7.4, 150 мМ NaCl, 1 мМ MgCl_2 , 0.05% NP-40), содержащем 40 U/мл RiboLock (“Thermo Fisher Scientific”), 1% BSA и 1 мг/мл оцДНК. Сефарозу промывали буфером NT2, обрабатывали протеиназой К (“Thermo Fisher Scientific”), затем реактивом TRI Reagent (“Thermo Fisher Scientific”) для выделения РНК. РНК осаждали, обрабатывали ДНКазой I, синтезировали кДНК с использованием обратной транскриптазы RevertAid (“Thermo Fisher Scientific”). Обратную транскрипцию проводили с рассеянной затравкой. Уровни мРНК гистонов и контрольных генов определяли методом количественной ПЦР с использованием олигонуклеотидов к кодирующим частям генов гистонов; для *His2A*: 5'-GCTGAGGTTCTCGAGTTGGCT-3' и 5'-ATTGTGACGCCGGAGAGCAG-3'. Каждый эксперимент проводили в трех повторях. Данные представляли как среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Paip2 взаимодействует с ENY2 в дрожжевой двугибридной системе

С целью найти белки, взаимодействующие с ENY2, был проведен скрининг кДНК-библиотеки *D. melanogaster* в дрожжевой двугибридной системе MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 2 ("Clontech"). Последовательность, кодирующая ENY2, была клонирована в одной рамке считывания с последовательностью, кодирующей BD-домен фактора LexA. Эту конструкцию использовали для скрининга кДНК-библиотеки, содержащей 10^7 клонов в одной рамке считывания с последовательностью домена AD фактора GAL4. При связывании белков в двугибридной системе слитые с ними аминокислотные последовательности AD и BD также взаимодействуют и происходит активация транскрипции репортерных генов *LacZ* и *His3*. Ложнопозитивные клоны отсеивали по протоколу производителя ("Clontech"). Уровень активации репортерного гена *LacZ* оценивали по β -галактозидазной активности на субстрате CPRG. Было отобрано 12 положительных клонов и определена первичная структура их ДНК. Один из клонов содержал последовательность, кодирующую участок домена цинковых пальцев белка Su(Hw). Ранее мы подтвердили взаимодействие ENY2 и Su(Hw) в клетках *D. melanogaster* и показали его функциональное значение для барьерной и энхансерблокующей функций *gypsy*-инсулятора [38]. Один из наиболее эффективно взаимодействовавших с ENY2 клонов кодировал последовательность белка Paip2 (рис. 1а). При переклонировании нуклеотидных последовательностей ENY2 и Paip2 таким образом, чтобы ENY2 был слит с AD GAL4, а Paip2 с BD LexA, взаимодействие сохранялось на таком же высоком уровне. В качестве отрицательного контроля использовали показатель активации *LacZ* для не взаимодействующего с ENY2 фрагмента белка Su(Hw) (363–597 а.о.). Таким образом, Paip2 и ENY2 связывались в дрожжевой двугибридной системе независимо от того, с каким доменом, AD или BD, был слит каждый из белков.

Paip2 связывается с ENY2 in vitro

Результаты, полученные в двугибридном скрининге, подтверждены в экспериментах по коиммунопреципитации рекомбинантных белков Paip2 и ENY2. Нуклеотидную последовательность, кодирующую полноразмерный белок Paip2, клонировали в одной рамке считывания с GST-тегом. Рекомбинантный белок GST-Paip2 осаждали на глутатион-сефарозе, которую затем инкубировали с очищенным рекомбинантным белком ENY2-His₆. ENY2-His₆ связывался с сефарозой, конъюгированной с GST-Paip2, но не с GST-содержащей сефарозой (рис. 1б). На основании этих данных

можно сделать вывод о том, что Paip2 непосредственно связывается с ENY2.

Paip2 взаимодействует с ENY2 in vivo на молекулярном и генетическом уровне

С целью подтвердить взаимодействие Paip2 и ENY2 в системе *in vivo* мы получили и охарактеризовали антитела к Paip2 (рис. 1в). Антитела узнавали белок Paip2 как в тотальном лизате S2-клеток, так и в ядерном экстракте из эмбрионов *D. melanogaster* в виде двух близких по молекулярной массе форм — около 25 кДа. Вероятно, полоса Paip2 с меньшей электрофоретической подвижностью представляет собой модифицированный вариант белка. Ранее Z. Kachaev с соавт. [29], используя другие антитела к Paip2, детектировали такие же две формы белка в клетках *D. melanogaster*.

Взаимодействие Paip2 с ENY2 исследовали в экспериментах по коиммунопреципитации. Из литературы известно, что Paip2 локализуется как в ядре, так и в цитоплазме клеток, а белок ENY2 — преимущественно в ядре, где он концентрируется на ядерных порах [4]. Учитывая эти данные, для коиммунопреципитации мы использовали ядерный экстракт из эмбрионов дрозофилы (рис. 1г). Антитела к Paip2 и антитела к ENY2 осаждали соответствующие белки. ENY2 соосаждался в виде двух форм с молекулярной массой около 11 и 22 кДа, что отражает способность этого белка к димеризации. Антитела к Paip2 соосаждали ENY2, антитела к ENY2 — часть присутствующего в экстракте Paip2. На блоте две формы белка Paip2 детектировали под легкой цепью антител.

С целью более убедительно продемонстрировать взаимодействие исследуемых белков в S2-клетках мы создали генетическую конструкцию для сверхэкспрессии полноразмерного белка Paip2 с FLAG-эпитопом — Paip2-FLAG. Антитела к ENY2 эффективно соосаждали Paip2-FLAG из лизатов трансформированных S2-клеток (рис. 1д). Таким образом, Paip2 и ENY2 не только способны связываться *in vitro*, но и взаимодействуют в клетках *D. melanogaster*.

Взаимодействие Paip2 и ENY2 исследовано и генетическими методами на уровне целого организма *D. melanogaster*. Для этого использовали охарактеризованную нами ранее линию *D. melanogaster*, несущую гипоморфную мутацию *e(y)2[u1]* в гене *e(y)2*, расположенном на X-хромосоме и кодирующем белок ENY2 [32]. При этой мутации наблюдалось падение уровня экспрессии ENY2 в 4 раза. Гемизиготные самцы *e(y)2[u1]/Y* имели близкую к нормальной выживаемость (90%), но у 10% была нарушена морфология последних (9 и 10) абдоминальных сегментов. Гетерозиготных самок *D. melanogaster* с генотипом *e(y)2[u1]/FM4* скрещивали с самцами линии #13029, гомозиготными по мутации *KG03704* в гене *Paip2*, и затем анализировали

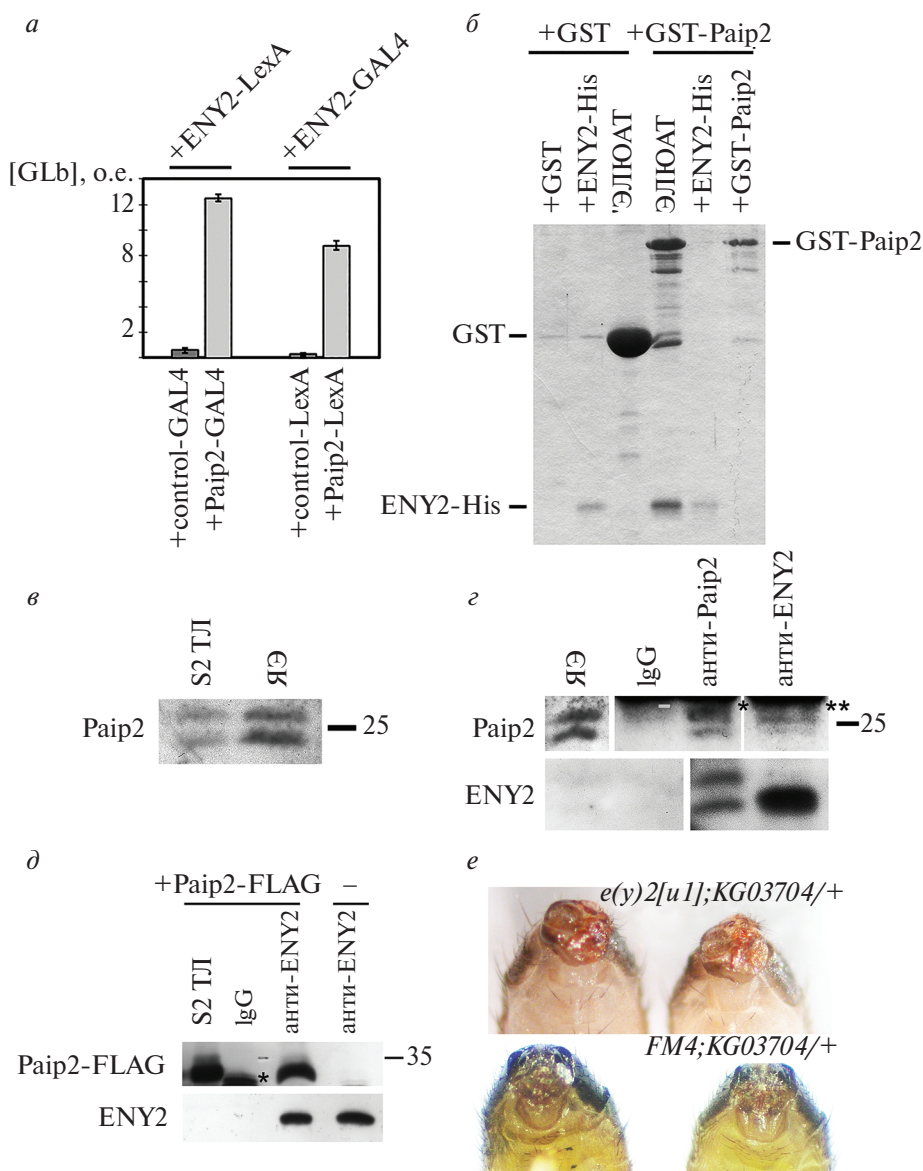


Рис. 1. Белки Paip2 и ENY2 взаимодействуют друг с другом. *а* – Активация репортерного гена *LacZ* при добавлении субстрата β -галактозидазы CPRG. Результаты представлены в виде относительных единиц активности (о.е.) β -галактозидазы [GLb] (рассчитаны как частное от деления полученных значений активности (е.а.) на общий множитель) для дрожжей, котрансформированных векторами, кодирующими ENY2-LexA и Paip2-GAL4, ENY2-LexA и control-GAL4, а также ENY2-GAL4 и Paip2-LexA, ENY2-GAL4 и control-LexA. *б* – Связывание аффинно очищенных рекомбинантных белков GST-Paip2 и ENY2-His₆ на глутатион-сефарозе. В качестве отрицательного контроля использован белок GST. *в* – Анализ специфичности антител. Иммуноблоттинг белков тотального лизата S2-клеток (S2 ТЛ) и ядерного экстракта (ЯЭ) из эмбрионов *D. melanogaster* с использованием антител кролика к Paip2. *г* – Анализ взаимодействия Paip2 с ENY2. Иммуноблоттинг белков, осажденных из тотальных лизатов S2-клеток антителами к Paip2 и ENY2, с использованием одноименных антител. Полосы, соответствующие легким цепям антител к Paip2 и ENY2, отмечены звездочками (* и ** соответственно). *д* – Анализ взаимодействия Paip2-FLAG и ENY2. Иммуноблоттинг белков, осажденных антителами к ENY2 из лизатов S2-клеток со сверхэкспрессией Paip2-FLAG с использованием антител к FLAG-эпиту и ENY2. *е* – Анализ взаимодействия Paip2 и ENY2 на генетическом уровне. Представлены фотографии абдоминальных сегментов самцов *D. melanogaster* с генотипом *e(y)2[u1];KG03704/+* (нарушенная морфология) и контрольных самцов с генотипом *FM4;KG03704/+* (нормальная морфология).

фенотип всех самцов первой генерации (F1). У самцов, гемизиготных по мутации *e(y)2[u1]* и гетерозиготных по мутации *KG03704*, была в 4 раза (до 40%) повышена частота встречаемости мутантного фенотипа — морфологически измененных абдоминальных сегментов, — характерного для линии *e(y)2[u1]*; при этом у самцов *FM4;KG03704/+* этот фенотип не встречался (рис. 1е). Таким образом, взаимодействие *Paip2* и *ENY2 in vivo* подтверждено генетическими методами, на основании чего можно сделать вывод, что белки *Paip2* и *ENY2* вместе участвуют в общем биологическом процессе в ходе развития дрозофилы.

*Paip2 взаимодействует с белками
ENY2-содержащего комплекса TREX-2*

Известно, что *Paip2* — РНК-связывающий белок, который взаимодействует с белками СВР80 [30], РАВР в составе мРНК-частиц как в ядре [28], так и в цитоплазме. В связи с этим интересно было проверить взаимодействие *Paip2* с *ENY2*-содержащим РНК-связывающим ядерным комплексом TREX-2, в состав которого также входят белки *Xmas-2* и *PCID2* [33, 38]. Проведена коиммунопреципитация белков из тотальных лизатов S2-клеток с использованием антител к *Paip2* и к субъединицам *ENY2*, *Xmas-2* и *PCID2* комплекса TREX-2 (рис. 2а). Все антитела осаждали одноименные белки, что подтверждает их специфичность. Антитела к *Paip2* осаждали две формы белка с молекулярной массой ~25 кДа и соосаждали *ENY2*, также в виде двух форм, и небольшую часть *Xmas-2*. По результатам электрофоретического разделения продуктов коиммунопреципитации и последующего иммуноблоттинга полоса, соответствующая форме *Paip2* с большей электрофоретической подвижностью, совпадала с легкой цепью антител, а форму *Paip2* с меньшей подвижностью детектировали немного выше. Антитела к *Xmas-2* частично соосаждали белки *Paip2* и *ENY2*. Антитела к *PCID2* и *Paip2* малоэффективно соосаждали друг друга. Таким образом, *Paip2* взаимодействует с TREX-2 комплексом, преимущественно связываясь с *ENY2* и *Xmas-2*. *Paip2*, по-видимому, ассоциирован только с небольшой долей TREX-2-комплексов в S2-клетках.

*Нокдаун Paip2 не влияет на общий экспорт
мРНК из ядра в цитоплазму*

Комплекс TREX-2 необходим для экспорта большей части мРНК из ядра в цитоплазму через ядерные поры: при снижении экспрессии его субъединиц *Xmas-2*, *ENY2* в клетках посредством РНК-интерференции происходит накопление мРНК в ядре [4]. Так как *Paip2* взаимодействует с субъединицами TREX-2, мы исследовали возможное участие *Paip2* в экспорте мРНК. С этой целью провели нокдаун *Paip2* в S2-клетках, используя технологию РНК-интерференции

(рис. 2б), и оценили его эффект на экспорт общей мРНК методом FISH-гибридизации РНК с Су3-меченым олиго-dT-зондом (рис. 2в). В контрольных клетках большую часть мРНК детектировали в цитоплазме. В клетках, где в качестве положительного контроля проводили нокдаун *Xmas-2* или *ENY2*, мРНК задерживалась в ядрах, то есть происходило нарушение общего экспорта мРНК. Нокдаун *Paip2* не приводил к накоплению мРНК в ядрах, что свидетельствует о том, что *Paip2* не является необходимым для экспорта большей части мРНК из ядра.

*Paip2 и ENY2 локализуются в локусе кластера
репликативнозависимых генов гистонов
на полигенных хромосомах и в HLB*

С целью поиска генов, потенциально регулируемых *Paip2*, исследовано распределение этого белка на полигенных хромосомах из ядер клеток слюнных желез личинок *D. melanogaster*. Ранее выявлено, что *Paip2* присутствует на полигенных хромосомах в ограниченном числе локусов [29], в то время как *ENY2* обнаружен в большей части эухроматиновых участков на всем протяжении полигенных хромосом [38]. Мы зарегистрировали сигнал *Paip2* в характерно расположенном локусе кластера репликативнозависимых генов гистонов: в 39D—39E участке хромосомы 2L, находящемся вблизи хромоцентра (рис. 3а). *ENY2* также присутствует в этом локусе [38]. У многоклеточных репликативнозависимые гены гистонов сгруппированы в кластер, состоящий из тандемных повторов, в геноме *D. melanogaster* их около 100 [31]. Каждый повтор содержит по одной копии каждого из генов гистонов: *His1*, *His2A*, *His2B*, *His3*, *His4*, — а их транскрипция идет с двух разнонаправленных промоторов, расположенных между генами *His2A* и *His2B* (*His2A/His2B*-промотор) и между *His3* и *His4* (*His3/His4*-промотор).

Затем мы исследовали распределение *Paip2* и *ENY2* в S2-клетках, используя совместное иммуноокрашивание клеток соответствующими антителами. *Paip2*, как и ожидалось, локализовался как в цитоплазме, так и в ядрах клеток (рис. 3б, верхняя панель). *ENY2*, как было показано ранее [4], сконцентрирован на ядерных порах, что соответствует ассоциированным с ядерными порами TREX-2-комплексам. Окрашивание антителами к *Paip2* не выявляло ярких сигналов на ядерной оболочке, хотя точечные сигналы *Paip2* детектировали в области ядерных пор. В ядре регистрировали яркий сигнал *Paip2*, напоминающий внутриядерное тельце. Антитела к *ENY2* также окрашивали точечные области в ядре, с паттерном, характерным для внутриядерного распределения транскрипционных факторов (рис. 3б, нижняя панель). При наложении микрофотографий анти-*Paip2* и анти-*ENY2* наблюдаемый яркий сигнал *Paip2*

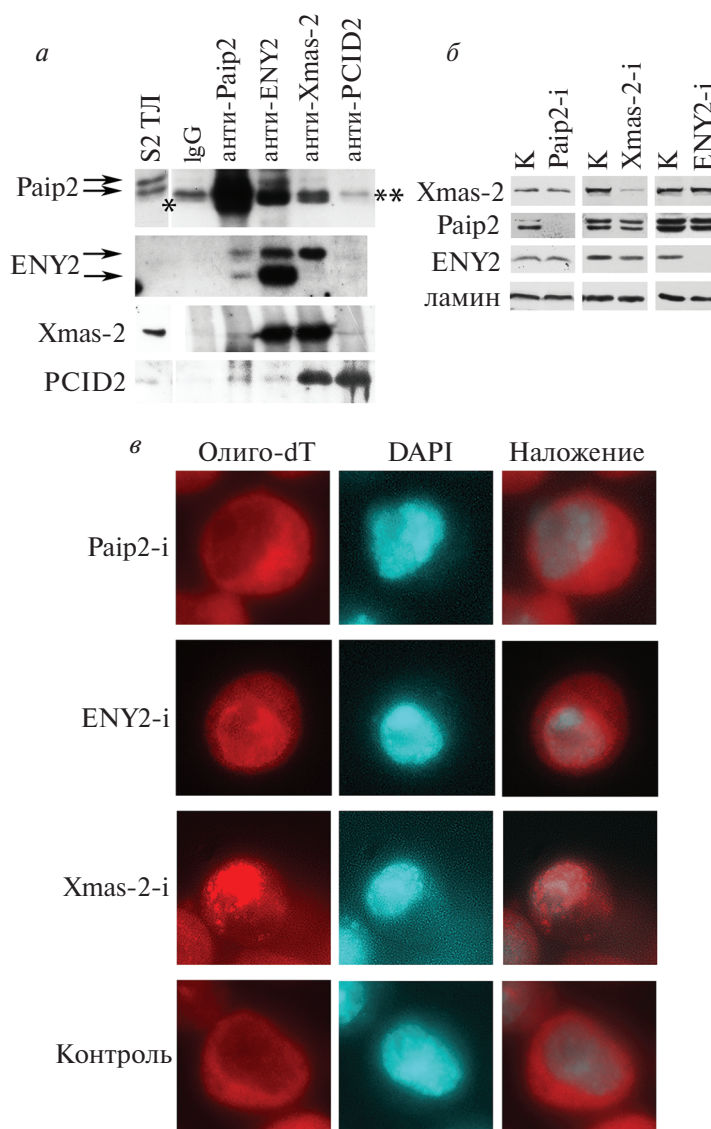


Рис. 2. Paip2 взаимодействует с белковым комплексом TREX-2. *а* – Иммуноблоттинг белков, осажденных из лизатов S2-клеток антителами к Paip2 и к субъединицам ENY2, Xmas-2 и PCID2 комплекса TREX-2. Указаны детектируемые белки. Полосы, соответствующие сигналам от легких цепей антител, отмечены по краям блота звездочками: *слева и **справа. *б* – Иммуноблоттинг лизатов S2-клеток с нокдауном Paip2, Xmas-2, ENY2 в результате РНК-интерференции (Paip2-i, Xmas-2-i, ENY2-i соответственно) и контрольной РНК-интерференции с дцРНК к мРНК GFP (К) с использованием антител к одноименным белкам. В качестве выравнивающего контроля использовали окрашивание антителами к ламину Dm0. *в* – Распределение мРНК в S2-клетках при нокдауне Paip2, ENY2, Xmas-2 в результате РНК-интерференции (Paip2-i, ENY2-i, Xmas-2-i соответственно) и контрольных клетках с РНК-интерференцией с дцРНК к мРНК GFP (контроль). FISH-гибридизацию РНК S2-клеток проводили с Cy3-меченым oligo-dT-зондом. Ядра клеток окрашены DAPI.

совпадал с одним из ярких сигналов ENY2 в ядре, то есть в этой области ядра эти два белка находятся вместе.

В связи с тем, что Paip2 детектировали в локусе кластера репликативнозависимых генов гистонов на политенных хромосомах, мы предположили, что наблюдаемый в ядрах яркий точечный сигнал Paip2 соответствует HLB. HLB представляет собой ядерное тельце, которое ассоциировано с хроматином кластера репликативнозависимых генов гистонов

и содержит специфические факторы, необходимые для скоординированных с S-фазой процессов транскрипции и процессинга мРНК гистонов [31]. При совместном использовании двух технологий: иммуноокрашивании S2-клеток антителами к Paip2 и FISH-гибридизации с ДНК-зондом к последовательности гена *His3* (рис. 3*в*) – яркий точечный внутриядерный сигнал Paip2 совпадал с *His3* FISH-сигналом. Следовательно, окрашиваемое антителами к Paip2 ядерное тельце представляет собой HLB. Таким образом, показано, что Paip2

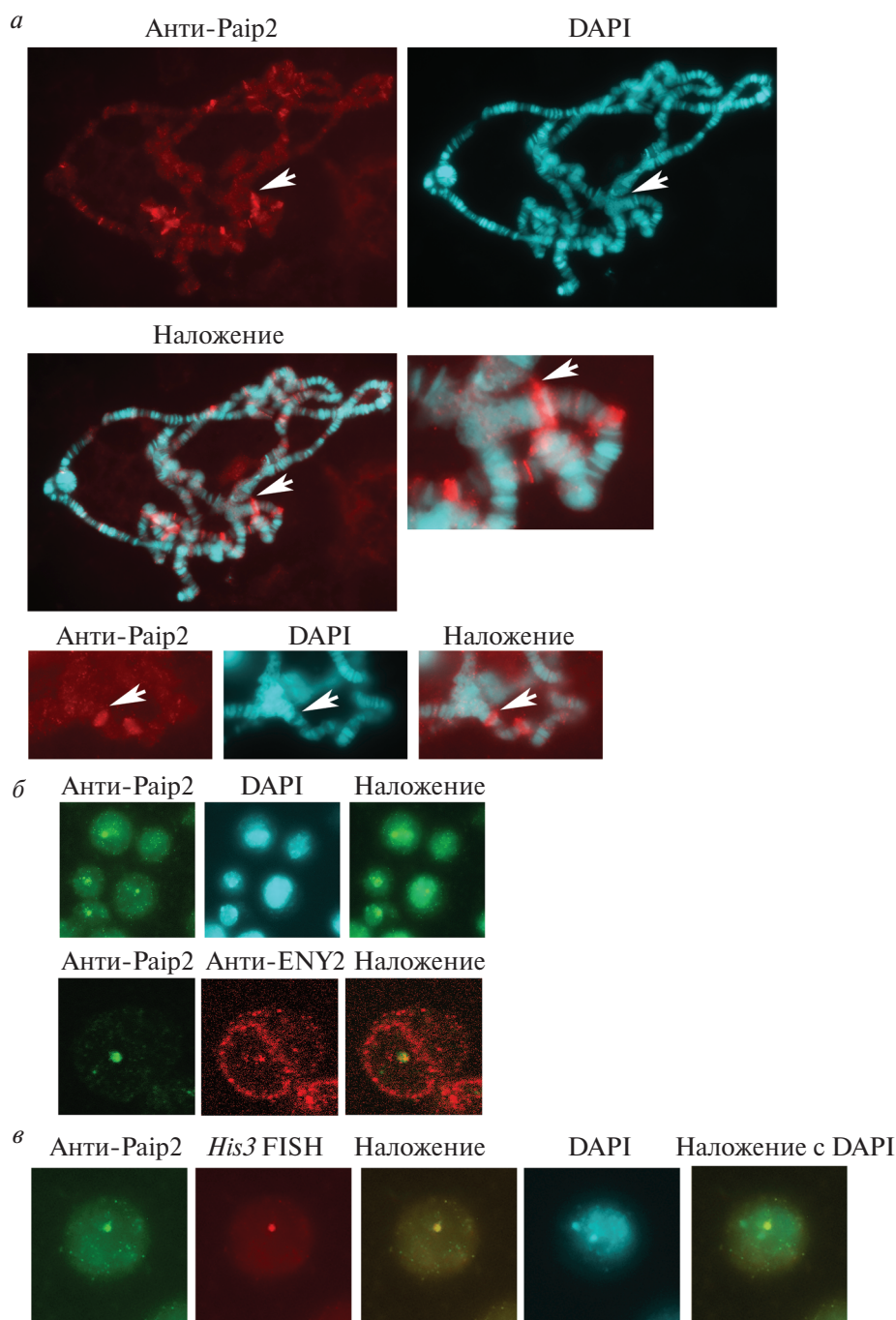


Рис. 3. Paip2 и ENY2 локализуются в локусе кластера репликативнозависимых генов гистонов. *a* – Иммуноокрашивание политенных хромосом из ядер слюнных желез личинок *D. melanogaster* с использованием антител к Paip2. Для окрашивания ДНК использовали DAPI. Локус кластера репликативнозависимых генов гистонов указан стрелкой. Приведено увеличенное изображение окрашенного локуса. *б* – Иммуноокрашивание S2-клеток с использованием в качестве первичных мышиных антител к Paip2 и кроличьих антител к ENY2. Ядра клеток окрашены DAPI. *в* – FISH-гибридизация S2-клеток с *His3*-зондом, совмещенная с иммуноокрашиванием антителами к Paip2. Ядра клеток окрашены DAPI.

локализуется в локусе кластера генов гистонов на политенных хромосомах и в HLB. Белок ENY2 также детектировали в этом локусе и в HLB.

Paip2 и TREX-2 ассоциированы с мРНК-частицами гистонов

На основании полученных результатов можно предположить, что Paip2 способен связываться с ENY2-содержащим комплексом TREX-2 и также вовлечен в регуляцию кластера генов гистонов. Недавно нами показано [39], что TREX-2 ассоциирован с мРНК-частицами гистонов и участвует в экспорте мРНК гистонов из ядра. Учитывая эти данные и РНК-связывающие свойства Paip2, мы исследовали взаимодействие Paip2 с мРНК-частицами гистонов. Для анализа использовали метод RIP с антителами к Paip2 и к субъединицам Xmas-2, PCID2, ENY2 комплекса TREX-2. Антитела к Paip2, наряду с антителами к белкам TREX-2, соосаждали мРНК гистонов. На рис. 4а представлены результаты для мРНК гистона H2A. Таким образом, белок Paip2 может ассоциировать с мРНК-частицами гистонов. Ранее показано, что Paip2 также взаимодействует с CBP-комплексом [30] и, по нашим данным, соосаждается с белком Sgf11, который совместно с ENY2 связывается с CBP [17]. Из литературы известно, что Sgf11—CBP входит в состав мРНК-частиц на ранних этапах элонгации транскрипции, а комплекс TREX-2 связывается с мРНК на более поздних, предшествующих экспорту мРНК из ядра, этапах созревания [16]. Следовательно, мРНК-частицы гистонов, осажденные антителами к Paip2, могут представлять смесь различных типов мРНК-частиц: ранних и поздних.

С целью понять, совместно ли Paip2 и TREX-2 привлекаются на мРНК гистонов, был проведен RIP-анализ с антителами к Paip2 и субъединицам TREX-2 при нокдауне Paip2 в S2-клетках (рис. 4б). Как видно из рис. 4в, при нокдауне Paip2 количество Paip2, Xmas-2, PCID2, ENY2, ассоциированных с мРНК гистонов, уменьшалось примерно в 2 раза. Аналогично при нокдауне Xmas-2, структурообразующей субъединицы комплекса TREX-2, количество Paip2, связанного с мРНК гистонов, снижалось примерно в 2 раза (рис. 4г); при этом уменьшалось и количество ассоциированных с мРНК гистонов компонентов TREX-2: как самого Xmas-2, так и ENY2. Таким образом, как нокдаун Paip2, так и нокдаун Xmas-2 приводят к снижению содержания белка Paip2 и субъединиц TREX-2 в мРНК-частицах гистонов. На основании этих данных можно предположить, что Paip2 и TREX-2-комплекс ассоциируют с мРНК-частицами гистонов кооперативным образом. Paip2 может опосредовать взаимодействие TREX-2 с мРНК гистонов, а TREX-2 — стабилизировать взаимодействие Paip2 с мРНК гистонов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенного нами поиска белков, связывающихся с ENY2 *D. melanogaster*, в дрожжевой двугибридной системе найден новый партнер ENY2 — белок Paip2. Paip2 непосредственно связывается с ENY2 и вместе с ним вовлечен в общий процесс в ходе развития дрозофилы. Кроме того, Paip2 взаимодействует с некоторой частью ENY2-содержащих TREX-2-комплексов в клетках *D. melanogaster*. Показано, что при этом Paip2 не влияет на экспорт большей части мРНК и присутствует на политенных хромосомах в ограниченном числе локусов. Учитывая, что комплекс TREX-2 участвует в экспорте основной части мРНК из ядра в цитоплазму, мы предполагаем, что Paip2 в ядре взаимодействует с TREX-2 в регуляции экспорта ограниченного набора мРНК, кодируемых определенными генами.

Белок Paip2 *D. melanogaster* котранскрипционно входит в состав мРНК-частиц и ассоциирован с CBP80, РНК-зависимо привлекаясь на хроматин генов *hsp70*, *DHR3*, *DHR4* и участвуя в регуляции инициации транскрипции и ранней элонгации [29, 30]. Ранее нами показано, что ENY2 через взаимодействие с Sgf11 непосредственно связывается с белком CBP80, ассоциированным с 5'-кэпированным концом мРНК, и участвует в привлечении TREX-2 в мРНК-частицы [17]. Можно предположить, что в ходе созревания мРНК-частиц белок Paip2 взаимодействует как с ENY2-связывающим комплексом CBP—Sgf11, так и с ENY2-содержащим TREX-2. Через ENY2—Sgf11 Paip2 ассоциирует с мРНК-частицей гистонов на раннем этапе элонгации транскрипции, котранскрипционно связываясь с CBP-комплексом на 5'-конце РНК. На более позднем этапе созревания мРНК-частицы Paip2 может участвовать в привлечении комплекса TREX-2 на мРНК [17].

Ранее показано, что TREX-2 необходим для экспорта большинства поли(А)-содержащих мРНК [9], но недавно мы показали, что общий комплекс TREX-2—ORC также ассоциирован с единственными неполиаденилируемыми мРНК в клетке — мРНК, которые кодируются репликативнозависимыми генами гистонов [39]. Белки комплекса TREX-2—ORC связываются с мРНК гистона H3 в 3'-концевой части кодирующей области. Нокдаун Xmas-2, Ogc3, субъединиц TREX-2—ORC, участвующих в связывании с мРНК-частицами основного рецептора экспорта NXF1 [10], вызывает нарушения экспорта мРНК гистонов только в небольшой части клеток. Это можно объяснить тем, что в экспорте мРНК гистонов участвуют альтернативные адаптеры NXF1: SR (serine rich)-белки 9G8 и SRp20 [40] и основной экспортный адаптер ALYREF [41]. Мы обнаружили, что Paip2 наряду с ENY2 присутствует на хроматине в локусе кластера генов гистонов и локализуется в HLB, регулируя экспрессию кластера. Paip2 вместе

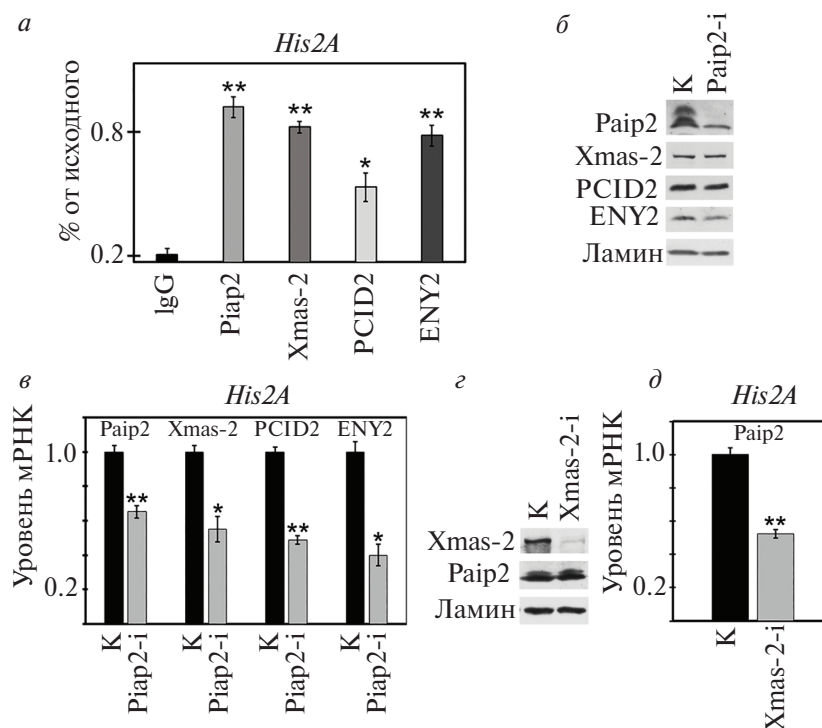


Рис. 4. Белок Paip2 ассоциирован с мРНК-частицами гистонов. *а* – Результаты иммунопреципитации мРНК *His2A* из ядерной фракции S2-клеток антителами к Paip2 и субъединицам Xmas-2, PCID2, ENY2 комплекса TREX-2. В качестве отрицательного контроля использованы IgG кролика. Результаты иммунопреципитации РНК (RIP) представлены в процентах от исходного количества. *б* – Иммуноблотинг лизатов S2-клеток с нокдауном Paip2 (Paip2-i), а также GFP в качестве отрицательного контроля (К). Используются антитела к Paip2, Xmas-2, PCID2 и ENY2. В качестве внутреннего контроля использовано окрашивание антителами к ламину Dm0. *в* – Результаты иммунопреципитации мРНК *His2A* антителами к Paip2, Xmas-2, PCID2, ENY2 при нокдауне Paip2. Представлены уровни мРНК *His2A*, осажденной антителами из экстрактов с нокдауном Paip2 (Paip2-i), нормализованные относительно уровня мРНК *His2A*, осажденной из экстрактов с нокдауном GFP, принятого за единицу (К). *г* – Иммуноблотинг лизатов S2-клеток с нокдауном Xmas-2 (Xmas-2-i) и нокдауном GFP в качестве отрицательного контроля (К) с использованием антител к Xmas-2 и Paip2. В качестве внутреннего контроля использовано окрашивание антителами к ламину Dm0. *д* – Результаты иммунопреципитации мРНК-частиц гена *His2A* антителами к Paip2 при нокдауне Xmas-2. Представлены уровни мРНК *His2A*, осажденной антителами из экстрактов с нокдауном Xmas-2 (Xmas-2-i), нормализованные относительно уровня мРНК *His2A*, осажденной из экстрактов с нокдауном GFP, принятого за единицу (К). Все данные на графиках представлены как среднее значение $\pm$ SD; для сравнения данных контроля и эксперимента использован *t*-критерий Стьюдента; **p*-value < 0.05, ***p*-value < 0.01.

с субъединицами комплекса TREX-2 ассоциирует с мРНК-частицами гистонов. Нокдаун Paip2 приводит к уменьшению связывания TREX-2 с мРНК гистонов и, следовательно, может вызывать нарушение ее экспорта из ядра и тем самым влиять на уровень гистонов в цитоплазме. Экспрессия генов гистонов четко коррелирует с репликацией ДНК. Даже незначительные изменения в синтезе гистонов приводят к повреждениям ДНК, нарушениям клеточного цикла и пролиферации клеток [31].

Недавно показано, что у человека экспрессия ENY2 значительно повышена при различных онкологических заболеваниях, таких как рак яичника [42] и гепатоцеллюлярная карцинома [43]. Повышенная экспрессия ENY2 может способствовать пролиферации, миграции и инвазии клеток рака молочной железы [43, 44]. ENY2 проявляет двойственную роль при различных видах злокачественных опухолей, в одних случаях способствуя,

а в других замедляя их развитие. ENY2 может служить потенциальным диагностическим и прогностическим биомаркером течения заболевания [45]. Интересно, что у человека PAIP2 также вовлечен в пролиферацию и дифференцировку клеток [28]. Экспрессия PAIP2 повышена в тканях и в клетках рака молочной железы. PAIP2, как и ENY2, способствует пролиферации и инвазии клеток рака молочной железы, причем уровень экспрессии обоих белков увеличивается по мере развития опухоли [46]. Также было показано, что экспрессия главного кластера генов гистонов значительно повышена в модели прогрессии рака молочной железы на основе клеток MCF10A человека [47]. Выявленное нами взаимодействие между ENY2 и Paip2 *D. melanogaster*, эволюционная консервативность системы регуляции экспрессии репликативнозависимых генов гистонов [31], повышенная экспрессия кластера гистоновых генов в клетках рака молочной железы,

схожие паттерны экспрессии ENY2 и PAIP2 в клетках рака молочной железы позволяют предположить, что в клетках человека ENY2 и PAIP2 также могут совместно участвовать в регуляции экспрессии генов гистонов. Возможно, что в клетках рака молочной железы повышенная экспрессия ENY2 и PAIP2 способствует увеличению экспорта мРНК гистонов из ядра. Это приводит к повышенному синтезу гистонов, что необходимо для активной пролиферации клеток.

Дрожжевой двугибридный скрининг, эксперименты по *in vitro* связыванию белков были выполнены при поддержке гранта РНФ № 20-14-00269 (Краснов А.Н.), все остальные эксперименты были выполнены при финансовой поддержке гранта РНФ № 22-24-00721 (Куршакова М.М.).

В соответствии с п. 3 главы 1 Директивы 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях, требования биоэтики не распространяются на объект данного исследования (*Drosophila melanogaster*). Антитела от кроликов и мышей получены нами в виварии Института биологии гена Российской академии наук, имеющем все необходимые сертификаты для проведения работ с животными. При проведении иммунизации были соблюдены все этические нормы работы с животными.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kopytova D.V., Krasnov A.N., Orlova A.V., Gurskiy D. Ya., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. (2010) ENY2: couple, triple...more? *Cell Cycle*. **9**, 479–481.
- Galán A., Rodríguez-Navarro S. (2012) Sus1/ENY2: a multitasking protein in eukaryotic gene expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **47**, 556–568.
- Fischer T. (2002) The mRNA export machinery requires the novel Sac3p-Thp1p complex to dock at the nucleoplasmic entrance of the nuclear pores. *EMBO J.* **21**, 5843–5852.
- Kurshakova M.M., Krasnov A.N., Kopytova D.V., Shidlovskii Y.V., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Spehner D., Schultz P., Tora L., Georgieva S.G. (2007) SAGA and a novel *Drosophila* export complex anchor efficient transcription and mRNA export to NPC. *EMBO J.* **26**, 4956–4965.
- Lu Q., Tang X., Tian G., Wang F., Liu K., Nguyen V., Kohalmi S.E., Keller W.A., Tsang E.W., Harada J.J., Rothstein S.J., Cui Y. (2009) Arabidopsis homolog of the yeast TREX-2 mRNA export complex: components and anchoring nucleoporin: TREX-2 mRNA export complex. *Plant J.* **61**, 259–270.
- Jani D., Lutz S., Hurt E., Laskey R.A., Stewart M., Wickramasinghe V.O. (2012) Functional and structural characterization of the mammalian TREX-2 complex that links transcription with nuclear messenger RNA export. *Nucleic Acids Res.* **40**, 4562–4573.
- Ellisdon A.M., Dimitrova L., Hurt E., Stewart M. (2012) Structural basis for the assembly and nucleic acid binding of the TREX-2 transcription-export complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **19**, 328–336.
- Wickramasinghe V.O., Stewart M., Laskey R.A. (2010) GANP enhances the efficiency of mRNA nuclear export in mammalian cells. *Nucleus*. **1**, 393–396.
- Stewart M. (2019) Structure and function of the TREX-2 complex. *Subcell. Biochem.* **93**, 461–470. doi: 10.1007/978-3-030-28151-9_15
- Kopytova D., Popova V., Kurshakova M., Shidlovskii Y., Nabirochkina E., Brechalov A., Georgiev G., Georgieva S. (2016) ORC interacts with THSC/TREX-2 and its subunits promote Nxf1 association with mRNP and mRNA export in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* **44**, 4920–4933.
- Zhao Y., Lang G., Ito S., Bonnet J., Metzger E., Sawat-subashi S., Suzuki E., Le Guezennec X., Stunnenberg H.G., Krasnov A., Georgieva S.G., Schüle R., Takeyama K., Kato S., Tora L., Devys D. (2008) A TIFC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, co-activates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol. Cell.* **29**, 92–101.
- Pfah A., Bruckmann A., Nazet J., Merkl R., Grasser K.D. (2018) The adaptor protein ENY2 is a component of the deubiquitination module of the *Arabidopsis* SAGA transcriptional co-activator complex but not of the TREX-2 complex. *J. Mol. Biol.* **430**, 1479–1494.
- Atanassov B.S., Mohan R.D., Lan X., Kuang X., Lu Y., Lin K., McIvor E., Li W., Zhang Y., Florens L., Byrum S.D., Mackintosh S.G., Calhoun-Davis T., Koutelou E., Wang L., Tang D.G., Tackett A.J., Washburn M.P., Workman J.L., Dent S.Y. (2016) ATXN7L3 and ENY2 coordinate activity of multiple H2B deubiquitinases important for cellular proliferation and tumor growth. *Mol. Cell.* **62**, 558–571.
- Ellisdon A.M., Jani D., Köhler A., Hurt E., Stewart M. (2010) Structural basis for the interaction between yeast Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase (SAGA) complex components Sgf11 and Sus1. *J. Biol. Chem.* **285**, 3850–3856.
- Galán A., García-Oliver E., Nuño-Cabanes C., Rubinstein L., Kupiec M., Rodríguez-Navarro S. (2018) The evolutionarily conserved factor Sus1/ENY2 plays a role in telomere length maintenance. *Curr. Genet.* **64**, 635–644.
- Kopytova D.V., Orlova A.V., Krasnov A.N., Gurskiy D. Ya., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Shidlovskii Y.V., Georgieva S.G. (2010) Multifunctional factor ENY2 is associated with the THO complex and promotes its recruitment onto nascent mRNA. *Genes Dev.* **24**, 86–96.
- Gurskiy D., Orlova A., Vorobyeva N., Nabirochkina E., Krasnov A., Shidlovskii Y., Georgieva S., Kopytova D. (2012) The DUBm subunit Sgf11 is required for mRNA export and interacts with Cbp80 in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res.* **40**, 10689–10700.
- Khaleghpour K., Svitkin Y.V., Craig A.W., DeMaria C.T., Deo R.C., Burley S.K., Sonenberg N. (2001) Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. *Mol. Cell.* **7**, 205–216.
- Kozlov G., De Crescenzo G., Lim N.S., Siddiqui N., Fantus D., Kahvejian A., Trempe J.F., Elias H., Ekiel I., Sonenberg N., O'Connor-McCourt M., Gehring K. (2004) Structural basis of ligand recognition by PABC, a highly specific peptide-binding domain found in poly(A)-binding protein and a HECT ubiquitin ligase. *EMBO J.* **23**, 272–281.
- Khaleghpour K., Kahvejian A., De Crescenzo G., Roy G., Svitkin Y.V., Imataka H., O'Connor-McCourt M., Sonenberg N. (2001) Dual interactions of the translational repressor Paip2 with poly(A) binding protein. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5200–5213.

21. Karim M.M., Svitkin Y.V., Kahvejian A., De Crescenzo G., Costa-Mattioli M., Sonenberg N. (2006) A mechanism of translational repression by competition of Paip2 with eIF4G for poly(A) binding protein (PABP) binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **103**, 9494–9499.
22. Ivanov A., Shuvalova E., Egorova T., Shuvalov A., Sokolova E., Bizyaev N., Shatsky I., Terenin I., Alkalaeva E. (2019) Polyadenylate-binding protein-interacting proteins PAIP1 and PAIP2 affect translation termination. *J. Biol. Chem.* **294**, 8630–8639.
23. Polacek C., Friebe P., Harris E. (2009) Poly(A)-binding protein binds to the non-polyadenylated 3' untranslated region of dengue virus and modulates translation efficiency. *J. Gen. Virol.* **90**, 687–692.
24. Onesto C., Berra E., Grépin R., Pagès G. (2004) Poly(A)-binding protein-interacting protein 2, a strong regulator of vascular endothelial growth factor mRNA. *J. Biol. Chem.* **279**, 34217–34226.
25. Gouyon F., Onesto C., Dalet V., Pages G., Leturque A., Brot-Laroche E. (2003) Fructose modulates GLUT5 mRNA stability in differentiated Caco-2 cells: role of cAMP-signaling pathway and PABP (polyadenylated-binding protein)-interacting protein (Paip) 2. *Biochem. J.* **375**, 167–174.
26. Alvarez-Saavedra M., Antoun G., Yanagiya A., Oliva-Hernandez R., Cornejo-Palma D., Perez-Iratxeta C., Sonenberg N., Cheng H.-Y.M. (2011) miRNA-132 orchestrates chromatin remodeling and translational control of the circadian clock. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 731–751.
27. Berlanga J.J., Baass A., Sonenberg N. (2006) Regulation of poly(A) binding protein function in translation: characterization of the Paip2 homolog, Paip2B. *RNA*. **12**, 1556–1568.
28. Roy G., Miron M., Khaleghpour K., Lasko P., Sonenberg N. (2004) The *Drosophila* poly(A) binding protein-interacting protein, dPaip2, is a novel effector of cell growth. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 1143–1154.
29. Kachaev Z.M., Lebedeva L.A., Kozlov E.N., Toropygin I.Y., Schedl P., Shidlovskii Y.V. (2018) Paip2 is localized to active promoters and loaded onto nascent mRNA in *Drosophila*. *Cell Cycle*. **17**, 1708–1720.
30. Kachaev Z.M., Lebedeva L.A., Shaposhnikov A.V., Moresco J.J., Yates J.R., Schedl P., Shidlovskii Y.V. (2019) Paip2 cooperates with Cbp80 at an active promoter and participates in RNA polymerase II phosphorylation in *Drosophila*. *FEBS Lett.* **593**, 1102–1112.
31. Duronio R.J., Marzluff W.F. (2017) Coordinating cell cycle-regulated histone gene expression through assembly and function of the Histone Locus Body. *RNA Biol.* **14**, 726–738.
32. Georgieva S., Nabirochkina E., Dilworth F.J., Eickhoff H., Becker P., Tora L., Georgiev P., Soldatov A. (2001) The novel transcription factor e(y)2 interacts with TAF_{II}40 and potentiates transcription activation on chromatin templates. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5223–5231.
33. Glukhova A.A., Kurshakova M.M., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Kopytova D.V. (2021) PCID2, a subunit of the *Drosophila* TREX-2 nuclear export complex, is essential for both mRNA nuclear export and its subsequent cytoplasmic trafficking. *RNA Biol.* **18**, 1969–1980.
34. MacAlpine D.M., Rodríguez H.K., Bell S.P. (2004) Coordination of replication and transcription along a *Drosophila* chromosome. *Genes Dev.* **18**, 3094–3105.
35. Platero J.S., Sharp E.J., Adler P.N., Eissenberg J.C. (1996) *In vivo* assay for protein-protein interactions using *Drosophila* chromosomes. *Chromosoma*. **104**, 393–404.
36. Clemens J.C., Worby C.A., Simonson-Leff N., Muda M., Maehama T., Hemmings B.A., Dixon J.E. (2000) Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 6499–6503.
37. Baroni T.E., Chittur S.V., George A.D., Tenenbaum S.A. (2008) Advances in RIP-chip analysis: RNA-binding protein immunoprecipitation-microarray profiling. *Methods Mol. Biol.* **419**, 93–108.
doi: 10.1007/978-1-59745-033-1_6
38. Kurshakova M., Maksimenko O., Golovnin A., Pulina M., Georgieva S., Georgiev P., Krasnov A. (2007) Evolutionarily conserved E(y)2/Sus1 protein is essential for the barrier activity of Su(Hw)-dependent insulators in *Drosophila*. *Mol. Cell.* **27**, 332–338.
39. Kurshakova M.M., Yakusheva Y.A., Georgieva S.G. (2024) TREX-2-ORC complex of *D. melanogaster* participates in nuclear export of histone mRNA. *Dokl. Biochem. Biophys.* **514**, 11–15.
<https://doi.org/10.1134/S160767292370059X>
40. Huang Y., Steitz J.A. (2001) Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Mol. Cell.* **7**, 899–905.
41. Fan J., Wang K., Du X., Wang J., Chen S., Wang Y., Shi M., Zhang L., Wu X., Zheng D., Wang C., Wang L., Tian B., Li G., Zhou Y., Cheng H. (2019) ALYREF links 3'-end processing to nuclear export of non-polyadenylated mRNAs. *EMBO J.* **38**, e99910.
42. De Marco C., Zoppoli P., Rinaldo N., Morganello S., Morrello M., Zuccalà V., Carriero M.V., Malanga D., Chirillo R., Bruni P., Malzoni C., Di Vizio D., Venturella R., Zullo F., Rizzuto A., Ceccarelli M., Ciliberto G., Viglietto G. (2021) Genome-wide analysis of copy number alterations led to the characterisation of PDCD10 as oncogene in ovarian cancer. *Transl. Oncol.* **14**, 101013.
43. Li J.-H., Tao Y.F., Shen C.H., Li R.D., Wang Z., Xing H., Ma E.S., Xue H.Y., Zhang Q.B., Ma Z.Y., Wang Z.X. (2022) Integrated multi-omics analysis identifies ENY2 as a predictor of recurrence and a regulator of telomere maintenance in hepatocellular carcinoma. *Front. Oncol.* **12**, 939948.
44. Xie G., Yang H., Ma D., Sun Y., Chen H., Hu X., Jiang Y., Shao Z. (2019) Integration of whole-genome sequencing and functional screening identifies a prognostic signature for lung metastasis in triple-negative breast cancer. *Int. J. Cancer.* **145**, 2850–2860.
45. Chen Q., Shi X., Bao Y., Sun G., Wu S., Chen Y. (2023) An integrative analysis of enhancer of yellow 2 homolog (ENY2) as a molecular biomarker in pan-cancer. *Funct. Integr. Genomics.* **23**, 72.
46. Wang C., Jiang X., Qi J., Xu J., Yang G., Mi C. (2022) PAIP2 is a potential diagnostic and prognostic biomarker of breast cancer and is associated with immune infiltration. *Front. Genet.* **13**, 1009056.
47. Fritz A.J., Ghule P.N., Boyd J.R., Tye C.E., Page N.A., Hong D., Shirley D.J., Weinheimer A.S., Barutcu A.R., Gerrard D.L., Fietze S., van Wijnen A.J., Zaidi S.K., Imbalzano A.N., Lian J.B., Stein J.L., Stein G.S. (2018) Intracellular and higher-order chromatin organization of the major histone gene cluster in breast cancer. *J. Cell. Physiol.* **233**, 1278–1290.

Paip2 PROTEIN OF *Drosophila melanogaster* BINDS ENY2 PROTEIN AND INTERACTS WITH TREX-2 COMPLEX IN HISTONE mRNP PARTICLES

M. M. Kurshakova^{1, *}, A. N. Krasnov², E. N. Nabirochkina², S. G. Georgieva¹

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: kursha@mail.ru

ENY2 is an evolutionarily conserved multifunctional protein that is a member of several complexes regulating different stages of gene expression. ENY2 is a subunit of the TREX-2 complex, which is necessary for the export of bulk mRNA from the nucleus to the cytoplasm through the nuclear pores in many eukaryotes. The wide range of ENY2 functions suggests that it may also associate with other protein factors or complexes. Aiming to search for proteins that interact with ENY2, a cDNA library was screened in a yeast two-hybrid system. As a result, ENY2 was found to interact with the RNA-binding protein Paip2. Paip2 directly binds to ENY2 *in vitro* and interacts with ENY2 *in vivo* at the molecular and genetic level. Paip2 is capable to associate with the ENY2-containing TREX-2 complex. We found that Paip2 protein is present at the histone gene cluster locus, both Paip2 and ENY2 are detected at the histone locus body (HLB), a nuclear structure where coordinated histone mRNA transcription and processing take place. Paip2 and the subunits of the TREX-2 complex associate with histone mRNP particles. RNA-interference knockdown of Paip2 results in decreased binding of TREX-2 subunits to histone mRNPs. Thus, Paip2 is a new partner protein of ENY2 within the TREX-2 complex and participates in TREX-2 binding to histone mRNPs.

Keywords: Paip2, ENY2, TREX-2, Xmas-2, HLB, nuclear body, histone genes, histone mRNA