

УДК 577.29

## ПРОТИМОЗИН $\alpha$ ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С С-КОНЦЕВЫМ ДОМЕНОМ ГИСТОНА H1 И ДИССОЦИИРУЕТ КОМПЛЕКС ГИСТОНА H1 С ОПУХОЛЕВЫМ СУПРЕССОРОМ p53

© 2011 г. Н. И. Захарова<sup>1,2</sup>, В. В. Соколов<sup>2</sup>, А. А. Суворова<sup>2</sup>,  
А.-L. Shiau<sup>3</sup>, С.-L. Wu<sup>4</sup>, А. Г. Евстафьева<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Научно-исследовательский институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992

<sup>2</sup>Факультет биоинженерии и биоинформатики Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992

<sup>3</sup>Department of Microbiology and Immunology, National Cheng Kung University Medical College, Tainan, Taiwan

<sup>4</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, National Cheng Kung University Medical College, Tainan, Taiwan

Поступила в редакцию и принята к печати 17.02.2011 г.

Представлена П.М. Чумаковым

Недавно выявлен новый механизм регуляции активности опухолевого супрессора p53. Согласно этому механизму связывание линкерного гистона H1 с промоторами генов-мишеней p53 приводит к специфической репрессии p53-зависимой транскрипции. Однако неясно, каким образом можно “отключить” репрессию. Известно, что ядерный гистон-связывающий белок протимозин  $\alpha$  стимулирует активность p53. Нами установлено, что для этого эффекта важен гистон-связывающий домен протимозина  $\alpha$ . Следовательно, можно предположить, что протимозин  $\alpha$  стимулирует p53-зависимую транскрипцию путем разрушения репрессорного комплекса p53-гистон H1. В представленной работе показано, что протимозин  $\alpha$  взаимодействует с тем же самым С-концевым доменом гистона H1, что и p53. Следовательно, протимозин  $\alpha$  и p53 могут конкурировать за связывание с гистоном H1. Кроме того, протимозин  $\alpha$  и его производные, способные взаимодействовать с гистоном H1, вытесняют p53 из его комплекса с гистоном H1 *in vitro*. Стимуляция p53-зависимой транскрипции протимозином  $\alpha$  *in vivo* также коррелирует со способностью этого белка взаимодействовать с гистоном H1. Эктопическая экспрессия гистона H1 специфически подавляет стимулирующий эффект протимозина  $\alpha$  на транскрипцию p53-зависимого репортерного гена в культивируемых клетках человека. Эти результаты хорошо согласуются с предложенной моделью, в которой протимозин  $\alpha$  усиливает p53-регулируемую транскрипцию, вытесняя гистон H1 из репрессорного комплекса p53-гистон H1.

**Ключевые слова:** протимозин  $\alpha$ , опухолевый супрессор p53, гистон H1, p53-регулируемая транскрипция, белок-белковые взаимодействия.

PROTHYMOSIN  $\alpha$  INTERACTS WITH C-TERMINAL DOMAIN OF HISTONE H1 AND DISSOCIATES P53–HISTONE H1 COMPLEX, by N. I. Zakharova<sup>1,2</sup>, V. V. Sokolov<sup>2</sup>, A. A. Suvorova<sup>2</sup>, A.-L. Shiau<sup>3</sup>, C.-L. Wu<sup>4</sup>, A. G. Evstafieva<sup>1,2\*</sup> (<sup>1</sup>Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia, \*e-mail: evstaf@genebee.msu.ru; <sup>2</sup>Department of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow State University, Moscow, 119992 Russia; <sup>3</sup>Department of Microbiology and Immunology, <sup>4</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, National Cheng Kung University Medical College, Tainan, Taiwan). A novel mode of the tumor suppressor protein p53 regulation, mediated by recruitment of the linker histone H1 to the promoters of p53 target genes leading to specific repression of p53-dependent transcription, has recently been uncovered. Yet, how this repression could be relieved is not clear. Previously, a histone-binding nuclear protein prothymosin  $\alpha$  (ProTa) was shown to trigger a p53 response. The histone-binding region of ProTa was found to be essential for this effect, raising a possibility that ProTa stimulates p53-dependent transcription by dissociating the p53-histone H1 repressive complex. Here, we have shown that ProTa interacts with the same C-terminal domain of histone H1 as p53 does and, therefore, ProTa and p53 could compete for binding to histone H1. Furthermore, ProTa, when competent for histone H1 binding, is able to liberate p53 from the histone H1-p53 complex *in vitro*. *In vivo*, stimulation of p53-dependent transcription by ProTa correlates with ability of ProTa to interact with histone H1. Ectopic expression

Принятые сокращения: ProTa – протимозин  $\alpha$ ; ДСН – додецилсульфат натрия; ПААГ – полиакриламидный гель; NLS – сигнал ядерной локализации; CBP (CREB-binding protein) – коактиватор транскрипции, CREB-связывающий белок; GH1 – глобулярный домен гистона H1; а.о. – аминокислотный остаток, при цифре; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота; PMSF – фенилметилсульфонилфторид.

\* Эл. почта: evstaf@genebee.msu.ru

**of histone H1 or its C-terminal ProTa-binding domain specifically suppresses the stimulating effect of ProTa on transcription of the p53-responsive reporter gene in cultured cells. These results are consistent with the model that ProTa may enhance p53 transcription activity by displacement of histone H1 from p53-H1 repressive complex.**

**Keywords:** prothymosin  $\alpha$ , p53, histone H1, p53-dependent transcription, protein-protein interactions.

Опухолевый супрессор p53 — это фактор транскрипции, который активируется в ответ на различные клеточные стрессы, включая генотоксический стресс, и регулирует экспрессию генов, способных индуцировать остановку клеточного цикла или проапоптотическую клеточную смерть [1]. Мультикопийный ядерный белок протимозин  $\alpha$  (ProTa) стимулирует клеточное деление и обладает свойствами онкобелка [2, 3]; высокий уровень ProTa защищает клетки от апоптоза [4, 5]. Суперпродукция ProTa стимулирует транскрипционную активность p53, в то время как подавление экспрессии гена этого белка методом РНК-интерференции снижает активность p53 [6, 7]. Чтобы понять молекулярный механизм, посредством которого ProTa влияет на p53-зависимую транскрипцию, мы картировали сегмент, ответственный за этот эффект, в центральной “кислой” области ProTa (а.о. 52–82), состоящей из протяженных блоков остатков дикарбоновых аминокислот [7]. Двухчастный сигнал ядерной локализации (NLS), расположенный в С-концевой части белка, также оказался необходимым для стимулирующего эффекта.

Центральная “кислая” область ProTa вовлечена во взаимодействие с гистон-ацетилтрансферазами [8, 9] и гистонами, в частности, с линкерным гистон H1 [10–12]. Считается, что ProTa модулирует структуру хроматина, взаимодействуя с гистон H1 [11, 12], и даже выполняет функции шаперона линкерных гистонов, отвечающего как за удаление, так и за связывание гистона H1 при формировании нативной структуры хроматина [13]. Гистон H1 долгое время считался глобальным репрессором транскрипции. Однако более поздние данные свидетельствуют о том, что гистон H1 регулирует экспрессию не всех, а только некоторых генов, в частности, генов-мишеней p53 [14, 15]. Показано, что один из подтипов гистона H1, гистон H1.2, вместе с набором клеточных белковых кофакторов образует репрессорный комплекс, который связывается с p53 и подавляет p53-зависимую транскрипцию [14]. По-видимому, гистон H1 при этом прямо взаимодействует с p53, что блокирует опосредованное гистон-ацетилтрансферазами СВР/p300 ацетилирование хроматина на p53-зависимых промоторах.

ProTa не взаимодействует с p53 [6], но способен связываться с гистон H1, который, в свою очередь, взаимодействует с p53 и подавляет его транскрипционную активность. Следовательно, ProTa мог бы стимулировать p53-зависимую транскрипцию, разрушая репрессорный комплекс p53-гистон H1. Ранее сообщалось, что p53 и ProTa связываются с двумя разными доменами гистона H1 — с С-кон-

цевым ДНК-связывающим [14] и с центральным глобулярным [12] соответственно. Взаимодействие ProTa с положительно заряженным неструктурированным С-концевым доменом гистона H1 не анализировали. Принимая во внимание значительный отрицательный заряд ProTa, мы предположили, что этот белок должен взаимодействовать с С-концевым доменом гистона H1 и препятствовать таким образом образованию репрессорного комплекса с p53.

В настоящей работе мы проверили эту гипотезу. Показано, что: (1) ProTa и p53 взаимодействуют с одним и тем же С-концевым доменом гистона H1; (2) рекомбинантный ProTa и его производные, способные взаимодействовать с гистон H1, вытесняют p53 из его комплекса с гистон H1 *in vitro*; (3) эндогенный ProTa препятствует взаимодействию гистона H1 с p53 в лизатах клеток HeLa; (4) стимуляция p53-зависимой транскрипции протимозином  $\alpha$  коррелирует со способностью этого белка взаимодействовать с гистон H1; (5) эктопическая экспрессия гистона H1 специфически подавляет стимулирующий эффект ProTa на p53-зависимую транскрипцию *in vivo*. Эти результаты подтверждают предложенный нами механизм, согласно которому ProTa стимулирует транскрипционную активность p53, вытесняя гистон H1 из репрессорного комплекса.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Клеточные культуры; приготовление клеточного лизата, содержащего p53.** Клетки HeLa-B [16] выращивали на среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной сыворотки (“HyClone”). Для увеличения уровня эндогенного p53 клетки в течение 16 ч обрабатывали доксорубицином (“Sigma”) в концентрации 1 мкг/мл. Клетки ( $\sim 3 \times 10^6$ ) лизировали в течение 30 мин при 0°C в 500 мкл буфера EBC (50 мМ Трис-НСl, рН 8.0, 120 мМ NaCl, 0.5% NP-40, 1 мМ EDTA), содержащего 0.5 мМ PMSF, 2 мкг/мл апротинина и лейпептина. К лизатам добавляли глицерин до конечной концентрации 10%. Для удаления ProTa лизаты инкубировали с 50 мкг моноклональных антител к ProTa (2F11), связанных с 30 мкл белок А-агарозы (“Pierce”), при 0°C в течение 1 ч при постоянном помешивании. После центрифугирования в течение 5 мин отбирали супернатанты и хранили при –70°C.

**Количество ProTa** в лизатах анализировали методом фенольной экстракции, описанным ранее [17]. Аликвоты лизатов (100 мкл) экстрагировали смесью фенол–хлороформ (3 раза), добавляли ацетат натрия, рН 5.2, до конечной концентрации 0.3 М и осаждали трехкратным объемом 96%-ного этанола.

Образцы частично очищенного ProTa анализировали электрофорезом в 8%-ном ПААГ, содержащем 7 М мочевины (без ДСН). После проведения электрофореза гели окрашивали 0.2%-ным раствором метиленового синего в 0.04 М аммоний-ацетатном буфере (рН 5.0) в течение 5 мин и отмывали водой.

**Конструирование плазмид.** Конструирование плазмид рНТ15А [18], рНМ-ProTa (pcDNA4-enh-ProTa) [5] и рНР12А [17], кодирующих ProTa человека, описано ранее. Плазида рKS-ProTa  $\Delta$ (53–81) получена лигированием с сохранением рамки считывания двух фрагментов ДНК из рНТ15А, кодирующих ProTa(1–52) и ProTa(82–109), между HindIII- и SalI-сайтами вектора рBluescript II KS(-) (“Stratagene”). При конструировании плазмиды рНМ-ProTa  $\Delta$ (53–81), AсyI–XhoI-фрагмент из pcDNA4-enh-ProTa (270 п.н.), кодирующий ProTa(32–109), заменили на AсyI–XhoI-фрагмент (200 п.н.) из рKS-ProTa  $\Delta$ (53–81).

Чтобы получить плазмиду рНМ-ProTa-tag, кодирующую ProTa человека с His-тэгом, BamHI–EcoRI-фрагмент из рНТ15А (350 п.н.) встроили по тем же сайтам в вектор pcDNA4/HisMaxA (“Invitrogen”). Плазмиду рНМ-ProTa  $\Delta$ (7–51) получили, вырезав из плазмиды рНМ-ProTa-tag AсcI–AсcI-фрагмент (140 п.н.), кодирующий ProTa(7–51).

рЕТ-ProTa(1–52) и рЕТ-ProTa(1–82) получены лигированием фрагментов плазмиды рНТ15А, кодирующих аминокислотные остатки ProTa (1–52) и (1–82), в BamHI–HindIII- и BamHI–XhoI-сайты вектора рЕТ-28с(+) (“Novagen”) соответственно. рЕТ-ProTa(52–109) получена лигированием фрагмента, кодирующего ProTa(52–109), в EcoRI–SalI-сайты вектора рЕТ-28а(+) (“Novagen”).

Для получения плазмиды рНМ-H1.0 фрагмент BamHI–PstI из рQE32/H1 [19], кодирующий гистон H1.0 человека, лигировали по тем же сайтам в вектор pcDNA4/HisMax/A. Плазида рGEX-H1.0 получена встраиванием EcoRI–SalI-фрагмента из рQE32/H1 по тем же сайтам в вектор рGEX-4Т-1 (“Amersham Pharmacia Biotech”).

Для получения фрагментов ДНК, кодирующих гистон H1.2 человека, а также его N- и С-концевые участки H1.2(1–109) и H1.2(110–213), провели ПЦР на суммарной ДНК из клеток HeLa с праймерами (Dir.H1.2: 5'-GGAATTCAAC ATGTCCGAGA CTGCT-3', Rev.H1.2: 5'-GACTCGAGCT ATTTCT-TCTT GGGCGC-3'; Rev.H1.2-N: 5'-AGCTCGAGTC ACTTGAGTTT AAAGGAGCC-3'; Dir.H1.2-C: 5'-TAGAATTCAA CAAGAAGGCA GCCTC-3'). Фрагменты ДНК встроили по EcoRI–XhoI-сайтам в вектор рBluescript II KS(-), секвенировали и переклонировали в вектор pcDNA4/HisMax/A. В результате получили плазмиды рНМ-H1.2, рНМ-H1.2(1–109) и рНМ-H1.2(110–213) соответственно. Плазмиды рGEX-H1.2, рGEX-H1.2(1–109) и рGEX-H1.2(110–213) получили встраиванием соответствующих фрагментов ДНК по EcoRI–XhoI-сайтам в вектор рGEX-4Т-1.

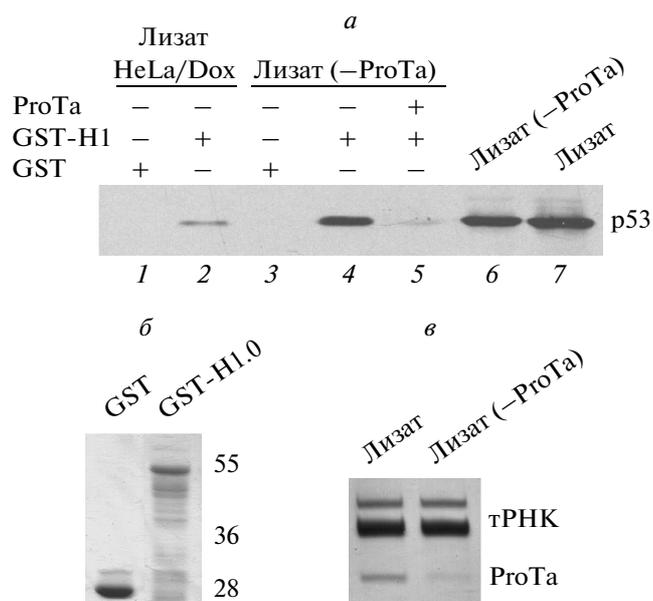
**Получение и очистка рекомбинантных белков.** ProTa человека выделяли из клеток *Escherichia coli* BL21(DE3)/рНР12А методом фенольной экстракции [17] и дополнительно очищали хроматографией на DE-52-целлюлозе. Производные ProTa с His-тэгом ProTa(1–52), ProTa(52–109), ProTa(1–82) выделяли из лизатов клеток *E. coli* BL21(DE3), трансформированных плазмидами рЕТ-ProTa(1–52), рЕТ-ProTa(52–109) и рЕТ-ProTa(1–82), соответственно, аффинной хроматографией на Ni-NTA-агарозе (“Qiagen”). К элюатам 100 мМ имидазолом добавили ацетат натрия (рН 5.2) до конечной концентрации 0.3 М, производные ProTa осаждали шестикратным объемом этанола, осадки промывали этанолом, высушивали и растворяли в буфере связывания. Рекомбинантные GST-H1.0, GST-H1.2, GST-H1.2(1–109), GST-H1.2(110–213) и GST экспрессировали в *E. coli* BL21(DE3)/рGEX-H1.0, рGEX-H1.2, рGEX-H1.2(1–109), рGEX-H1.2(110–213) и рGEX-4Т-1, соответственно, и очищали аффинной хроматографией на глутатион-сефарозе (“GE Healthcare”) по стандартной методике.

**Эксперименты по связыванию белков *in vitro*.** Комплексы гистон H1-p53 формировали согласно [14]. Аликвоты глутатион-сефарозы (10 мкл) со связанными с ней GST-H1 и GST (2–5 мкг) преинкубировали в растворе бычьего сывороточного альбумина 1 мг/100 мкл буфера связывания (25 мМ Трис-HCl, рН 8.0, 0.2 мМ EDTA, 150 мМ KCl, 20%-ный глицерин, 0.1% Nonidet P-40), при 0°C в течение 10 мин, затем промывали буфером связывания и инкубировали с 50–100 мкл клеточного лизата при 6°C в течение 1 ч при постоянном перемешивании. Смола промывали 4 раза буфером связывания при 0°C, кипятили в течение 3 мин в буфере нанесения образцов Лэммли для элюции связанных со смолой белков. Элюаты анализировали иммуноблотингом с антителами к р53.

В опытах по вытеснению р53 протимозином  $\alpha$  аликвоты комплекса гистон H1-p53 на глутатион-сефарозе инкубировали с рекомбинантным ProTa или его делеционными мутантами в 30 мкл буфера связывания при 6°C в течение 1 ч при постоянном перемешивании. Негативным контролем служили образцы, которые инкубировали только с буфером связывания. Количество р53, вытесненного из комплекса гистон H1-p53 и оставшегося на смоле, анализировали иммуноблотингом.

Количество ProTa и его производных, связавшихся и не связавшихся со смолой, оценивали иммуноблотингом с антителами к ProTa.

**Антитела и иммуноблотинг.** Использовали антитела к р53 (DO-1, “Santa Cruz Biotechnology Inc.”) и к Xpress (“Invitrogen”). Получение специфичных к ProTa моноклональных антител 4F4 (узнающих а.о. 52–87) и 2F11 (узнающих а.о. 1–31) описано ранее [20]. Белки фракционировали с помощью электрофореза в 12–18%-ном ДСН-ПААГ, после чего проводили иммуноблотинг либо в стандартных условиях, либо посредством переноса в “кислом” буфере с



**Рис. 1.** Взаимодействие p53-гистон H1 зависит от уровня ProTa в клеточном лизате. *a* – Иммуноблотованные на глутатион-сефарозе GST-H1.0 (2, 4, 5) или GST (1, 3) инкубировали с лизатом клеток HeLa, обработанных доксорубицином (лизат HeLa/Dox), или с лизатом с пониженным уровнем ProTa (лизат (-ProTa)). После интенсивных промывок связавшиеся со смолой белки анализировали иммуноблотингом с антителами к p53. В опыте по конкуренции рекомбинантный ProTa (10 мкг) добавляли к лизату с пониженным уровнем ProTa (5). 6, 7 – Аликвоты (15%) соответствующих лизатов. *б* – Электрофоретический анализ в ДСН-ПААГ иммобилизованных на глутатион-сефарозе GST и GST-H1.0; гель окрашивали красителем Кумасси. *в* – Электрофоретический анализ частично очищенных препаратов ProTa, выделенных из лизатов клеток HeLa или лизатов после удаления ProTa. Приведен фрагмент 8%-ного денатурирующего ПААГ, окрашенного метиленовым синим. Обозначены положения клеточной тРНК и ProTa. тРНК, присутствующая в препарате, служит контролем равного нанесения образцов на гель.

последующей фиксации глутаровым альдегидом, как описано ранее [20].

**Трансфекция и измерение активности репортерных генов.** Клетки HeLa выращивали на 12-луночных планшетах до 40–50% монослоя и трансфицировали с помощью реагента ExGen 500 (“Fermentas”) по методике производителя. В смесь добавляли репортерные плазмиды – p53RE-luc (0.1 мкг), кодирующую ген люциферазы светлячков под контролем чувствительных к p53 элементов [7], pcDNA4/HisMax/lacZ (“Invitrogen”) (0.3 мкг), кодирующую ген β-галактозидазы под контролем конститутивного цитомегаловирусного промотора, а также векторы для экспрессии производных ProTa (pHM-ProTa, pHM-ProTa Δ(53–81), pHM-ProTatag, pHM-ProTa Δ(7–51)) и/или производных гистона H1 (pHM-H1.0, pHM-H1.2, pHM-H1.2(1–109) и

pHM-H1.2(110–213)). Общее количество плазмидной ДНК при трансфекции доводили до 2 мкг, добавляя пустой вектор. Клетки лизировали через 44 ч после трансфекции в репортерном лизисном буфере (Luciferase Assay System, “Promega”), люциферазную и β-галактозидазную активность измеряли, как описано ранее [7]. Люциферазную активность нормировали по активности β-галактозидазы в том же самом лизате. Для каждого измерения использовали не менее трех повторностей, данные представляли как средние значения со стандартными отклонениями.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### Образование комплекса p53-гистон H1 зависит от концентрации ProTa

Способность ProTa вытеснять гистон H1 из комплекса с p53 мы проверяли, изучая белок-белковые взаимодействия *in vitro*. Работу проводили с двумя изоформами гистона H1 – H1.0 (специфичной для соматических клеток) и H1.2 (одной из пяти основных изоформ). Рекомбинантный гистон H1, слитый с глутатион-S-трансферазой (GST), продуцировали в бактериальных клетках и выделяли аффинной хроматографией на глутатион-сефарозе. Связанный с глутатион-сефарозой белок инкубировали с p53-содержащим клеточным лизатом. Принимая во внимание, что выделенный недавно из клеток линии HeLa репрессорный комплекс гистона H1 содержал множество клеточных регуляторных факторов [14], мы использовали суммарную белковую фракцию клеток HeLa в качестве источника p53 и других белков для образования комплекса. Уровень p53 в клетках HeLa повышали посредством обработки доксорубицином.

Связавшиеся белки анализировали иммуноблотингом с использованием специфичных к p53 антител. Оказалось, что p53 взаимодействует с GST-H1.0, но не с GST (рис. 1*a, б*). Интересно, что связывание p53 с иммобилизованным на смоле гистон H1.0 усиливалось, когда концентрация ProTa в клеточном лизате, служившем источником p53, была значительно снижена с помощью антител к ProTa (рис. 1*a, 4*; а также рис. 1*в*). Напротив, добавление рекомбинантного ProTa к лизату с пониженной концентрацией ProTa подавляло образование комплекса гистон H1-p53 (рис. 1*a, 5*). Аналогичные результаты получены и при использовании гистона H1.2 (не показано). Эти данные указывают на то, что ProTa конкурирует с p53 за связывание с гистон H1, а эндогенный ProTa может препятствовать образованию комплекса p53-гистон H1 в суммарном клеточном лизате.

### ProTa и p53 взаимодействуют с одним и тем же C-концевым доменом гистона H1

Для идентификации фрагментов гистона H1, участвующих во взаимодействии с p53 и ProTa, на

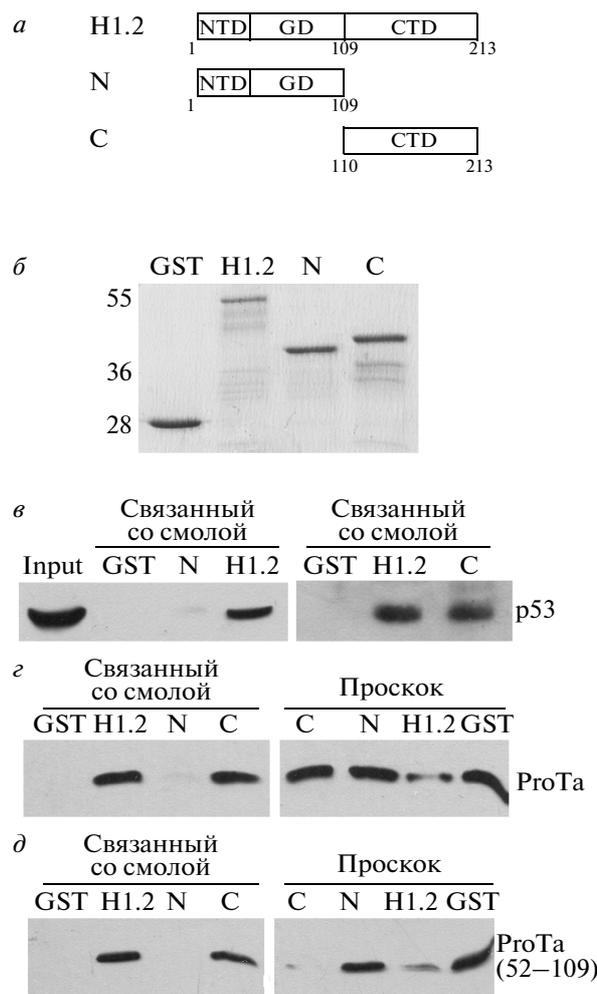
глутатион-сефарозе иммобилизовали рекомбинантные белки GST-H1.2(1–109), содержащий N-концевой и центральный глобулярный домены гистона H1.2 (а.о. 1–109), и GST-H1.2(110–213), содержащий С-концевой домен гистона H1.2 (а.о. 110–213) (рис. 2а,б), после чего методом иммуноблоттинга изучали связывание p53 и ProTa. Как и в опытах с рекомбинантным p53 [14], p53 из лизата клеток HeLa, обработанных доксорубицином, связывался с С-концевым доменом гистона H1, но не с его N-концевым или центральным доменом (рис. 2в).

Далее мы анализировали взаимодействие ProTa с иммобилизованными на смоле производными гистона H1. Подобно p53, ProTa эффективно связывался с гистоном H1.2 и его С-концевым доменом, но не с N-концевым и глобулярными доменами (рис. 2з). Такие же результаты получены, когда вместо интактного белка использовали укороченный ProTa(52–109), содержащий центральный кислый домен, ответственный за связывание гистона H1 (рис. 2д). Не связавшиеся белки также анализировали методом иммуноблоттинга. Связывание ProTa с гистоном H1.2 сопровождалось соответствующим уменьшением количества этого белка во фракции несвязавшихся белков (“проскок”), тогда как связывание ProTa с С-концевым доменом гистона H1.2 было менее эффективным (рис. 2е). Тем не менее, ProTa(52–109) удалось практически полностью удалить из фракции супернатанта, когда количество иммобилизованного С-концевого домена гистона H1.2 в 2.5 раза превышало количество полного гистона H1 (рис. 2д).

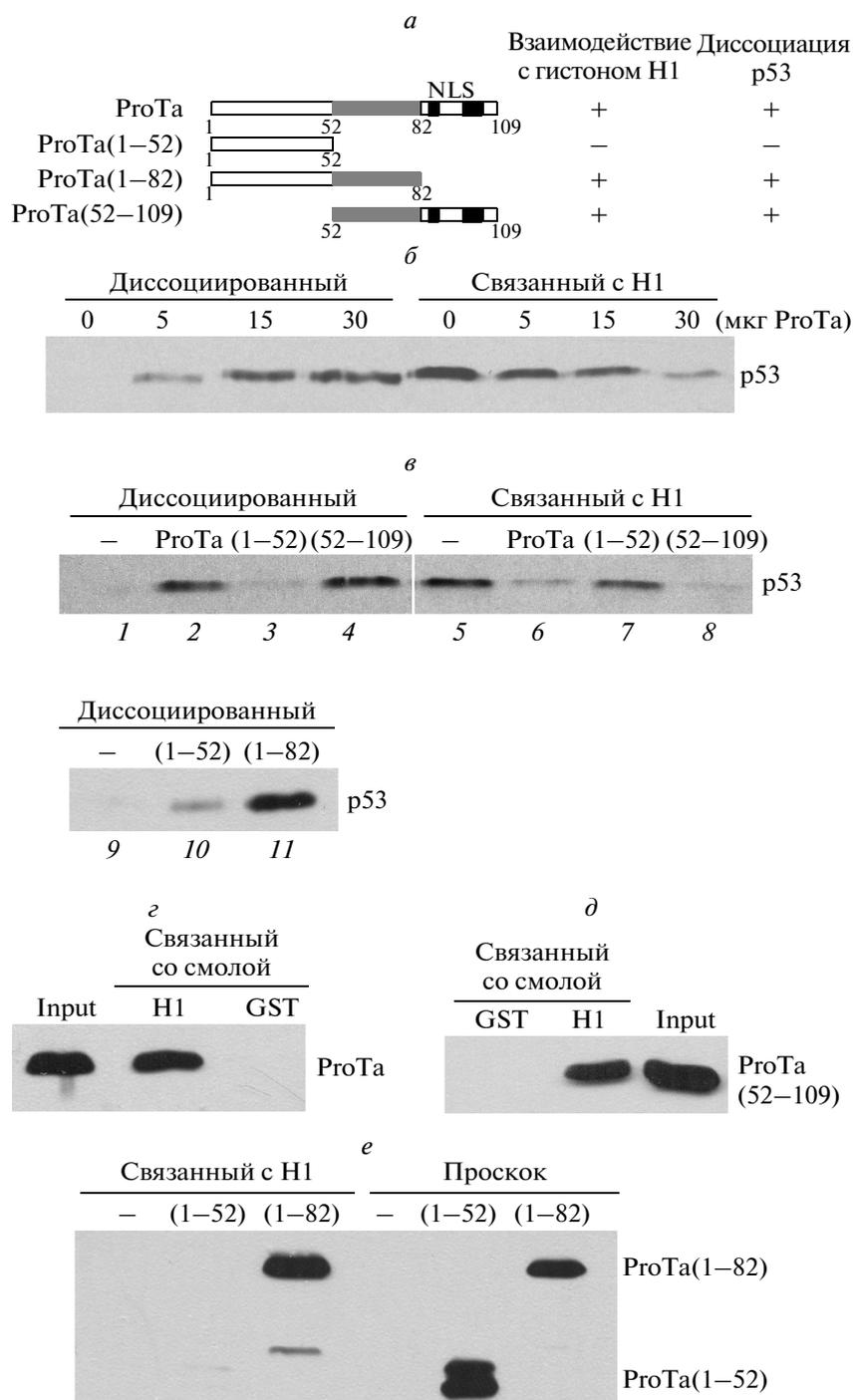
Таким образом, ProTa и p53 взаимодействуют с одним и тем же С-концевым доменом гистона H1.2 и, следовательно, потенциально способны конкурировать за связывание с гистоном H1.

### ProTa диссоциирует комплекс p53-гистон H1

Может ли ProTa вытеснить p53 из уже существующего комплекса p53-гистон H1? Для ответа на этот вопрос связанный с глутатион-сефарозой комплекс обрабатывали рекомбинантным ProTa или его делеционными мутантами (рис. 3а). Количество p53, перешедшего в раствор и оставшегося связанным со смолой, анализировали иммуноблоттингом. Наблюдали дозозависимое вытеснение протимозином  $\alpha$  белка p53 из комплекса и одновременное уменьшение количества p53, оставшегося связанным с гистоном H1 на смоле (рис. 3б). При обработке комплекса только буфером связывания, использованным в качестве негативного контроля, или укороченным ProTa(1–52), неспособным взаимодействовать с гистоном H1, в элюатах обнаружены только следовые количества p53 (рис. 3б, в). Напротив, укороченные белки ProTa(52–109) и ProTa(1–82), способные эффективно взаимодействовать с гистоном H1, как и интактный ProTa, эффективно вытесняли p53 из комплекса с гистоном H1 (рис. 3в).



**Рис. 2.** ProTa и p53 взаимодействуют с одним и тем же С-концевым доменом гистона H1.2. а – Схематическое изображение производных гистона H1.2. NTD, GD и CTD – N-концевой, глобулярный и С-концевой домены гистона H1.2 соответственно. б – Электрофоретический анализ в ДСН-ПААГ иммобилизованных на глутатион-сефарозе GST, GST-H1.2 (H1.2), GST-H1.2(1–109) (N) и GST-H1.2(110–213) (C); гель окрашивали красителем Кумасси. в – Связанные со смолой белки (представленные в б), 2 мкг каждого) инкубировали с лизатом клеток HeLa/Dox с пониженным уровнем ProTa. Связавшиеся белки анализировали иммуноблоттингом с антителами к p53. Input – аликвота (15%) взятого в опыт лизата. г – Связанные со смолой белки (представленные в б), 2 мкг каждого) инкубировали с 1 мкг ProTa в 30 мкл буфера связывания в течение 1 ч при 6°C. После промывки количество ProTa, связанного со смолой и оставшегося в растворе (проскок), анализировали “кислым” иммуноблоттингом с антителами к ProTa (2F11). д – Связанные со смолой белки: 5 мкг GST, 2 мкг GST-H1.2 (H1.2), 5 мкг GST-H1.2(1–109) (N) или 5 мкг GST-H1.2(110–213) (C) инкубировали с 1 мкг ProTa(52–109) в 30 мкл буфера связывания в течение 1 ч при 6°C. После промывки количество ProTa(52–109), связанного со смолой и оставшегося в растворе (проскок), анализировали иммуноблоттингом с антителами к ProTa (4F4).



**Рис. 3.** ProTa и его мутанты, способные взаимодействовать с гистоном H1, вытесняют p53 из комплекса p53-гистон H1. *a* – Схематическое изображение мутантных форм ProTa. Серым выделена область ProTa, обогащенная остатками дикарбоновых аминокислот. Сигнал ядерной локализации (NLS) выделен черным. *б, в* – Вытеснение протимозином  $\alpha$  (*б*) и его производными (*в*) p53 из комплекса с гистоном H1. Иммунизированный комплекс p53-гистон H1.0 инкубировали с указанными количествами ProTa (*б*) или с 10 мкг полноразмерного ProTa, ProTa(1-52), ProTa(52-109), ProTa(1-82) (*в*) в 30 мкл буфера связывания в течение 1 ч при 6°C. Количество p53, элюированного в раствор (Диссоциированный) и оставшегося связанным со смолой (Связанный с H1), анализировали иммуноблотингом с антителами к p53. *г, д* – Связывание ProTa и ProTa(52-109) с гистоном H1. GST-H1.0 либо GST, иммобилизованные на глутатион-сефарозе (2 мкг), инкубировали с 1 мкг ProTa (*г*) либо ProTa(52-109) (*д*) в 30 мкл буфера связывания в течение 1 ч при 6°C. Количество ProTa и ProTa(52-109), связанного со смолой, анализировали иммуноблотингом в “кислых” условиях с антителами к ProTa (2F11 или 4F4 соответственно). Input – соответствующая аликвота ProTa либо ProTa(52-109). *е* – Связывание ProTa(1-52) и ProTa(1-82) с гистоном H1. GST-H1.0, иммобилизованный на глутатион-сефарозе (2 мкг), инкубировали с 1 мкг ProTa(1-52) или ProTa(1-82) в 30 мкл буфера связывания, либо только с буфером связывания в течение 1 ч при 6°C. Количество производных ProTa, связанных со смолой (связанный с H1) и оставшихся в растворе (проскок), анализировали иммуноблотингом с антителами к ProTa (2F11).

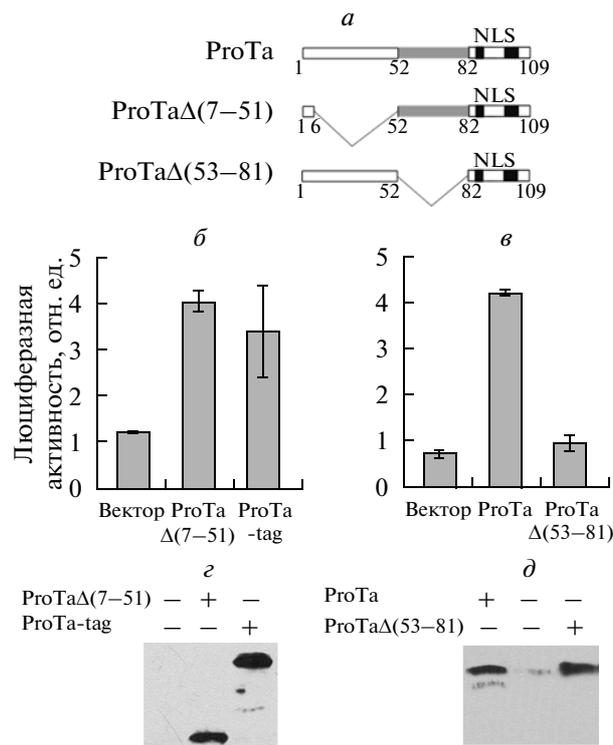
Способность ProTa, ProTa(52–109) и ProTa(1–82), но не ProTa(1–52) взаимодействовать с иммобилизованным гистоном H1 показана методом иммуноблотинга с использованием моноклональных антител к N-концевой или центральной части ProTa (рис. 3*з–е*). Таким образом, центральная “кислая” область ProTa, содержащая а.о. 52–82, действительно отвечает за взаимодействие с гистонов H1. Следовательно, только ProTa, способный взаимодействовать с гистонов H1, вытесняет p53 из комплекса с гистонов H1.

**Стимуляция p53-зависимой транскрипции коррелирует со способностью ProTa взаимодействовать с гистонов H1**

Ранее мы показали, что в клетках HeLa суперпродукция ProTa человека стимулирует экспрессию p53-регулируемого репортерного гена [7]. Какую роль в этом играет взаимодействие ProTa-гистон H1, мы выясняли с использованием двух новых делеционных мутантов ProTa, отличающихся по способности связываться с гистонов H1. Влияние производных ProTa на p53-зависимую транскрипцию анализировали с помощью репортерного гена люциферазы светлячков под контролем содержащего p53-чувствительные элементы промотора [7].

За взаимодействие с гистонов H1 отвечает центральная часть ProTa (а.о. 52–82), поэтому мы изучили необходимость этого фрагмента для стимуляции p53-зависимой транскрипции и его достаточность (в сочетании с двухчастным NLS, а.о. 87–104). Делеционный мутант ProTa  $\Delta(7-51)$ , почти полностью лишенный N-концевой половины белка, но содержащий центральную “кислую” область и NLS (рис. 4*а*), стимулировал p53-зависимую транскрипцию так же, как и полноразмерный ProTa (рис. 4*б*). Напротив, ProTa  $\Delta(53-81)$  без центрального “кислого” участка (рис. 4*а*) потерял способность активировать p53, при том что эффективность его экспрессии сравнима с эффективностью экспрессии полноразмерного ProTa (рис. 4*в*).

Уровень экспрессии делеционных мутантов ProTa  $\Delta(7-51)$  и ProTa  $\Delta(53-81)$  анализировали иммуноблотингом в специальных условиях (электроперенос при кислых значениях pH и фиксация белков на мембране глутаровым альдегидом [20]), использованных для преодоления пониженной способности ProTa связываться с мембранами (рис. 4*г, д*). К нашему удивлению, электрофоретические подвижности ProTa  $\Delta(53-81)$  и полноразмерного ProTa оказались одинаковыми (рис. 4*д*). Однако эти два белка можно легко различить по их способности связываться с моноклональными антителами. В отличие от ProTa, взаимодействующего с антителами к его N-концевой (2F11) и центральной (4F4) части, мутант ProTa  $\Delta(53-81)$  связывался с моноклональными антителами 2F11 (рис. 4*д*), но не 4F4 (не показано). Вероятно, уменьшение молекулярной массы этого делеционного мутанта компенсируется сни-



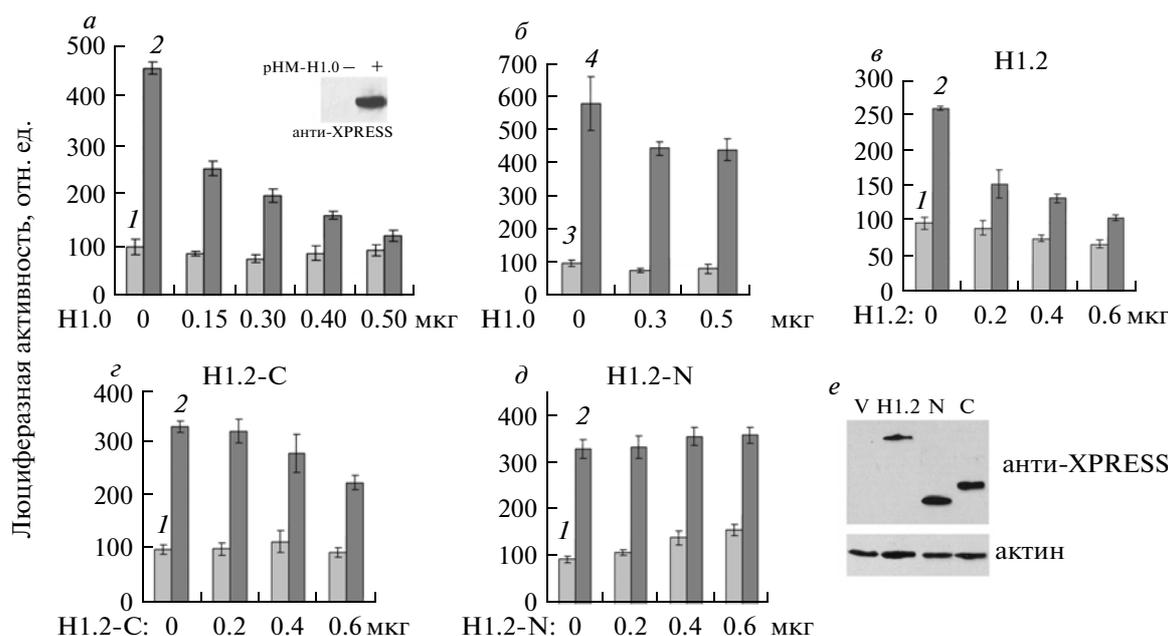
**Рис. 4.** Влияние удаления N-концевой и центральной области на способность ProTa активировать p53-регулируемый репортерный ген. *а* – Схематическое изображение делеционных мутантов ProTa. Серым выделена область ProTa, обогащенная остатками дикарбоновых аминокислот. Сигнал ядерной локализации (NLS) выделен черным. *б* – Люциферазная активность лизатов клеток HeLa после трансфекции смесью репортерных плазмид и либо пустым вектором (вектор), либо плазмидами, экспрессирующими ProTa с His-тэгом (ProTa-tag) или ProTa  $\Delta(7-51)$ . *в* – Люциферазная активность лизатов клеток HeLa после трансфекции смесью репортерных плазмид и либо пустым вектором (вектор), либо плазмидами, экспрессирующими ProTa или ProTa  $\Delta(53-81)$ . *з* – Эктопическую экспрессию ProTa с His-тэгом и ProTa  $\Delta(7-51)$  (из опыта, приведенного на панели *б*) анализировали иммуноблотингом в “кислых” условиях с антителами к ProTa (4F4). *д* – Эктопическую экспрессию ProTa и ProTa  $\Delta(53-81)$  (из опыта, приведенного на панели *в*) анализировали иммуноблотингом в “кислых” условиях с антителами к ProTa (2F11).

жением общего отрицательного заряда после удаления “кислого” домена.

Мы делаем вывод, что стимуляция p53-зависимой транскрипции коррелирует со способностью ProTa взаимодействовать с гистонов H1.

**Эктопическая экспрессия гистона H1 предотвращает стимуляцию p53-зависимой транскрипции протимозином  $\alpha$**

Если способность ProTa стимулировать p53-регулируемую транскрипцию зависит от его взаимодействия с гистонов H1, которое приводит к диссоциа-



**Рис. 5.** Влияние эктопической экспрессии гистона Н1 на р53-зависимую транскрипцию. *а* – Эктопическая экспрессия гистона Н1.0 подавляет ProTa-стимулированную транскрипцию р53-регулируемого репортера. Люциферазная активность лизатов клеток HeLa после трансфекции смесью репортерных плазмид, 1.1 мкг либо рНМ-ProTa (+ProTa), либо пустого вектора (–ProTa), и указанными количествами рНМ-Н1.0. Эктопическую экспрессию гистона Н1.0 с Xpress-эпитопом анализировали иммуноблоттингом с антителами, специфичными к Xpress. 1 – –ProTa; 2 – +ProTa. *б* – Эктопическая экспрессия гистона Н1.0 не подавляет транскрипцию р53-зависимого репортерного гена, активированную доксорубицином. Люциферазная активность лизатов клеток HeLa, трансфицированных указанными количествами рНМ-Н1.0 и репортерными плазмидами, после обработки доксорубицином (+Dox) в концентрации 1 мкг/мл в течение 16 ч либо без обработки (–Dox). 3 – –Dox, 4 – +Dox. *в–д* – Влияние эктопической экспрессии гистона Н1.2, его N-концевой части Н1.2(1–109) (Н1.2-Н) и С-концевого домена (Н1.2-С) на уровень ProTa-стимулированной транскрипции р53-регулируемого репортерного гена. Люциферазная активность лизатов клеток HeLa, трансфицированных репортерными плазмидами, 1.1 мкг либо рНМ-ProTa (+ProTa), либо пустого вектора (–ProTa) и указанными количествами плазмид, экспрессирующих гистон Н1.2 или его производные Н1.2-Н или Н1.2-С. *е* – Лизаты клеток HeLa, экспрессирующих гистон Н1.2 (Н1.2), Н1.2-Н (Н) и Н1.2-С (С) из опытов, показанных на панелях *в–д*, анализировали методом иммуноблоттинга с антителами анти-Xpress (верхняя панель) и к актину (нижняя панель). V – Лизат контрольных клеток, трансфицированных пустым вектором.

ции репрессорного комплекса р53-Н1, то эктопическая экспрессия гистона Н1 должна препятствовать этому эффекту. Это предположение проверяли с помощью р53-зависимого репортерного гена. Гистон Н1.0 с тэгом Xpress синтезировали в клетках HeLa (рис. 5а). В соответствии с данными [6, 7], суперпродукция ProTa стимулировала экспрессию р53-регулируемого репортерного гена. Оказалось, что коэкспрессия гистона Н1.0 с ProTa дозозависимо подавляет способность ProTa стимулировать р53-зависимую транскрипцию (рис. 5а). Влияние эктопической экспрессии гистона Н1.0 на активированную доксорубицином транскрипцию р53-регулируемого репортерного гена, оцененное в контрольном опыте, оказалось незначительным (рис. 5б).

Коэкспрессия гистона Н1.2 с ProTa также дозозависимо подавляла стимуляцию р53-зависимой транскрипции протимозином  $\alpha$  (рис. 5в). Более слабый ингибирующий эффект оказывала эктопическая экспрессия С-концевого домена гистона Н1.2, способного взаимодействовать с р53 и ProTa (рис. 5г), но не N-концевого фрагмента (содержа-

щего N-концевой и глобулярный домены гистона Н1.2), неспособного взаимодействовать с р53 и ProTa (рис. 5д). Уровни экспрессии N- и С-концевого фрагментов были сходными и не меньшими, чем у полноразмерного гистона Н1.2 (рис. 5е).

Следует отметить, что при высоком уровне эктопической экспрессии гистона Н1 в клетках HeLa наблюдается подавление транскрипции как с р53-зависимого, так и с конститутивного цитомегаловирусного промотора, контролирующего в наших опытах экспрессию репортерного гена *lacZ*, использованного для нормирования р53-зависимой транскрипции. В опытах, приведенных на рис. 5, эктопическая экспрессия гистона Н1 не достигала уровня, достаточного для подавления глобальной транскрипционной активности в клетках HeLa.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что уровень р53-регулируемой транскрипции, стимулированной ProTa, зависит от внутриклеточной концентрации гистона Н1, и подтверждают модель, в соответствии с которой ProTa усиливает тран-



активности p53, опосредованной привлечением репрессорного комплекса гистона H1 к промоторам генов-мишеней p53.

В настоящей работе показано, что онкобелок PтoTa может усиливать транскрипционную активность p53, вытесняя линкерный гистон H1 из репрессорного комплекса p53-гистон H1. Можно только догадываться о возможной биологической роли такого регуляторного механизма. Известно, что экспрессия p53-зависимых генов регулируется на многих уровнях. Один из многочисленных способов такой регуляции состоит в подавлении транскрипции репрессорным комплексом гистона H1. Так как риск онкотрансформации особенно велик для активно пролиферирующих клеток, в таких клетках желательнее держать p53 в дерепрессированном состоянии, чтобы иметь возможность быстрой активации p53 при поступлении тревожного сигнала. Возможно, высокий уровень PтoTa в активно пролиферирующих клетках обеспечивает частичное освобождение p53 от репрессии гистон H1-содержащим комплексом.

Мы благодарны П.М. Чумакову за постоянную поддержку.

Эта работа выполнена при финансовой помощи Российского фонда фундаментальных исследований (10-04-92007-ННС а и 09-04-01246-а), программ Министерства образования и науки Российской Федерации (Госконтракты П334 и 14.740.11.0168) и гранта National Science Council (Taiwan) NSC 99-2923-B-006-003-MY3.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чумаков П.М. 2007. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме. *Успехи биол. химии* **47**, 3–52.
2. Letsas K.P., Frangou-Lazaridis M. 2006. Surfing on prothymosin alpha proliferation and anti-apoptotic properties. *Neoplasma*. **53**, 92–96.
3. Vartapetian A.B., Uversky V.N. 2003. Prothymosin alpha: a simple yet mysterious protein. In *Protein structures: kaleidoscope of structural properties and functions*. Trivandrum, India: Research Signpost. 223–237.
4. Jiang X., Kim H.E., Shu H., Zhao Y., Zhang H., Kofron J., Donnelly J., Burns D., Ng S.C., Rosenberg S., Wang X. 2003. Distinctive roles of PHAP proteins and prothymosin-alpha in a death regulatory pathway. *Science*. **299**, 223–226.
5. Evstafieva A.G., Belov G.A., Rubtsov Y.P., Kalkum M., Joseph B., Chichkova N.V., Sukhacheva E.A., Bogdanov A.A., Pettersson R.F., Agol V.I., Vartapetian A.B. 2003. Apoptosis-related fragmentation, translocation, and properties of human prothymosin alpha. *Exp. Cell Res.* **284**, 211–223.
6. Kobayashi T., Wang T., Maezawa M., Kobayashi M., Ohnishi S., Hatanaka K., Hige S., Shimizu Y., Kato M., Asaka M., Tanaka J., Imamura M., Hasegawa K., Tanaka Y., Brachmann R.K. 2006. Overexpression of the oncoprotein prothymosin alpha triggers a p53 response that involves p53 acetylation. *Cancer Res.* **66**, 3137–3144.
7. Захарова Н.И., Соколов В.В., Рудько В.В., Мельников С.В., Вартапетян А.Б., Евстафьева А.Г. 2008. Влияние протимозина  $\alpha$  и его мутантов на функционирование опухолевого супрессора p53. *Молекуляр. биология*. **42**, 673–684.
8. Karetsova Z., Kretsovali A., Murphy C., Tsolas O., Papamarcaki T. 2002. Prothymosin alpha interacts with the CREB-binding protein and potentiates transcription. *EMBO Rep.* **3**, 361–366.
9. Subramanian C., Hasan S., Rowe M., Hottiger M., Orre R., Robertson E.S. 2002. Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C and prothymosin alpha interact with the p300 transcriptional coactivator at the CH1 and CH3/HAT domains and cooperate in regulation of transcription and histone acetylation. *J. Virol.* **76**, 4699–4708.
10. Papamarcaki T., Tsolas O. 1994. Prothymosin alpha binds to histone H1 *in vitro*. *FEBS Lett.* **345**, 71–75.
11. Díaz-Jullien C., Pérez-Estévez A., Covelo G., Freire M. 1996. Prothymosin alpha binds histones *in vitro* and shows activity in nucleosome assembly assay. *Biochim. Biophys. Acta.* **1296**, 219–227.
12. Karetsova Z., Sandaltzopoulos R., Frangou-Lazaridis M., Lai C.Y., Tsolas O., Becker P.B., Papamarcaki T. 1998. Prothymosin alpha modulates the interaction of histone H1 with chromatin. *Nucl. Acids Res.* **26**, 3111–3118.
13. George E.M., Brown D.T. 2010. Prothymosin alpha is a component of a linker histone chaperone. *FEBS Lett.* **584**, 2833–2836.
14. Kim K., Choi J., Heo K., Kim H., Levens D., Kohno K., Johnson E.M., Brock H.W., An W. 2008. Isolation and characterization of a novel H1.2 complex that acts as a repressor of p53-mediated transcription. *J. Biol. Chem.* **283**, 9113–9126.
15. Nishiyama M., Oshikawa K., Tsukada Y., Nakagawa T., Iemura S., Natsume T., Fan Y., Kikuchi A., Skoultchi A.I., Nakayama K.I. 2009. CHD8 suppresses p53-mediated apoptosis through histone H1 recruitment during early embryogenesis. *Nat. Cell. Biol.* **11**, 172–182.
16. Tolskaya E.A., Romanova L.I., Kolesnikova M.S., Ivannikova T.A., Smirnova E.A., Raikhlin N.T., Agol V.I. 1995. Apoptosis-inducing and apoptosis-preventing functions of poliovirus. *J. Virol.* **69**, 1181–1189.
17. Evstafieva A.G., Chichkova N.V., Makarova T.N., Vartapetian A.B., Vasilenko A.V., Abramov V.M., Bogdanov A.A. 1995. Overproduction in *Escherichia coli*, purification and properties of human prothymosin alpha. *Eur. J. Biochem.* **231**, 639–643.
18. Evstafieva A.G., Belov G.A., Kalkum M., Chichkova N.V., Bogdanov A.A., Agol V.I., Vartapetian A.B. 2000. Prothymosin alpha fragmentation in apoptosis. *FEBS Lett.* **467**, 150–154.
19. Chichkova N.V., Evstafieva A.G., Lyakhov I.G., Tsvetkov A.S., Smirnova T.A., Karapetian R.N., Karger E.M., Vartapetian A.B. 2000. Divalent metal cation binding properties of human prothymosin  $\alpha$ . *Eur. J. Biochem.* **267**, 4745–4752.
20. Sukhacheva E.A., Evstafieva A.G., Fateeva T.V., Shakulov V.R., Efimova N.A., Karapetian R.N., Rubtsov Y.P., Vartapetian A.B. 2002. Sensing prothymosin alpha origin, mutations and conformation with monoclonal antibodies. *J. Immunol. Meth.* **266**, 185–196.
21. McBryant S.J., Xu Lu, Hansen J.C. 2010. Multifunctionality of the linker histones: an emerging role for protein-protein interactions. *Cell Res.* **20**, 519–528.
22. Catez F., Ueda T., Bustin M. 2006. Determinants of histone H1 mobility and chromatin binding in living cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **13**, 305–310.