

УДК 571.21;579.23*315

ТРАНСКРИПЦИОННЫЙ ФАКТОР КАИЗО НЕ ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С 5-ГИДРОКСИМЕТИЛИРОВАННЫМИ ДНК В КОНТЕКСТЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ СТGCNA

© 2013 г. С. В. Женило, О. С. Мушарова, Е. Б. Прохорчук*

Центр “Биоинженерия” Российской академии наук, Москва 117312

Поступила в редакцию 23.11.2012 г.

Принята к печати 12.12.2012 г.

Ключевые слова: 5-гидроксиметилцитозин, транскрипционный фактор Каизо, метилирование ДНК.

TRANSCRIPTION FACTOR KAISO DOES NOT INTERACT WITH HYDROXYMETHYLATED DNA WITHIN CTGCNA SEQUENCE CONTEXT, by S. Zhenilo, O. Musharova, E. Prokhortchouk (Center “Bioengineering” Russian Academy of Sciences, Moscow, 117312, Russia; *e-mail: Prokhortchouk@biengi.ac.ru).

Keywords: 5-hydroxymethylcytosine, transcription factor Kaiso, DNA methylation.

DOI: 10.7868/S0026898413030191

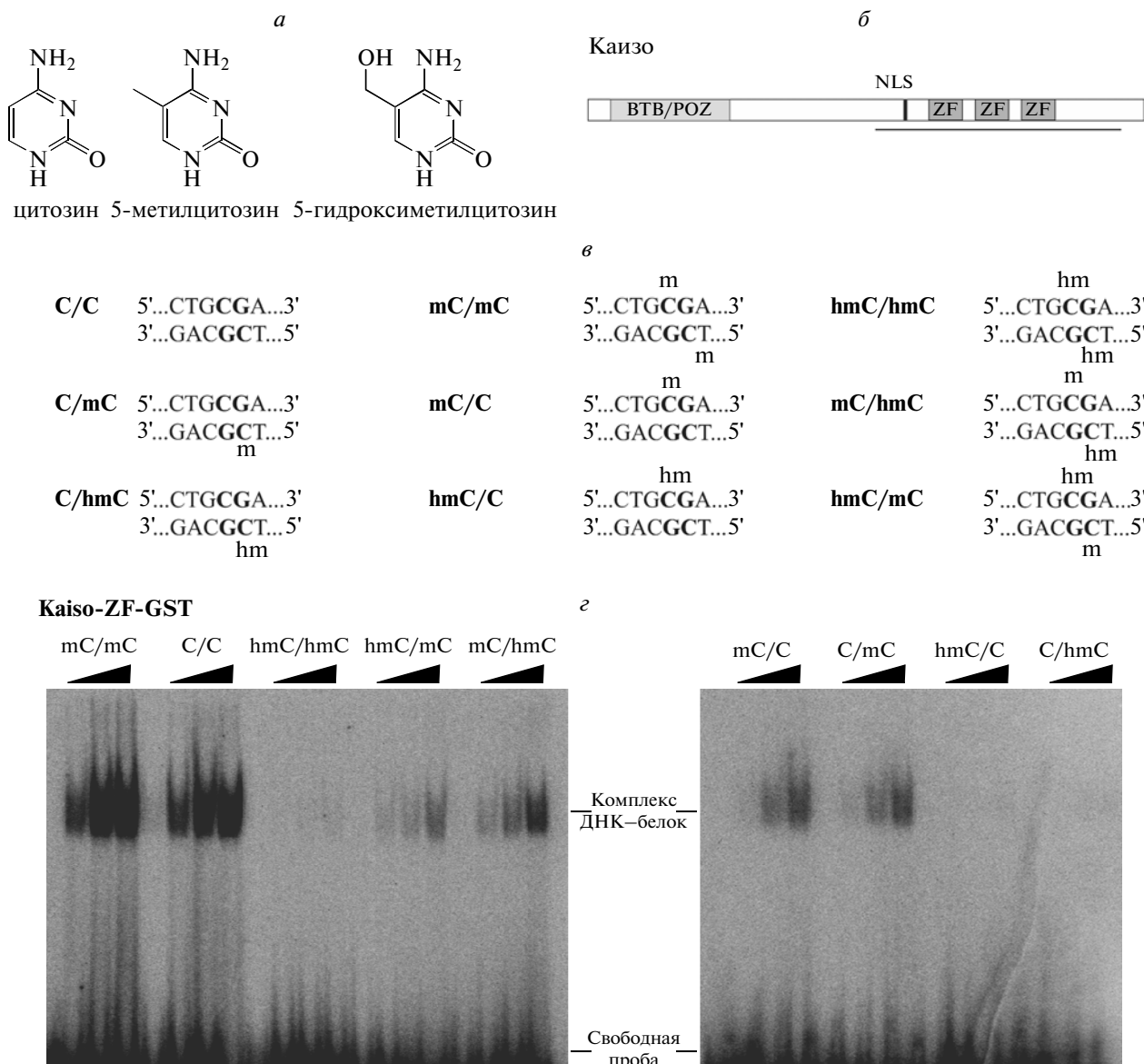
Метилирование ДНК – эпигенетическая модификация, одна из основных функций которой заключается в фиксации неактивного состояния генов. У высших эукариот метилирование ДНК играет важную роль в процессах регуляции транскрипции генов во время эмбрионального развития, X-инактивации, геномного импринтинга [1]. Метилирование ДНК у млекопитающих осуществляется в результате присоединения метильной группы к атому углерода в пятом положении пиримидинового кольца цитозина, в основном, в контексте CpG и катализируется ДНК-метилтрансферазами (DNMT) (рисунок а) [2]. В 2009 году в клетках Пуркиньи нашли еще одно азотистое основание – 5-гидроксиметилцитозин (5hmC) (рисунок а) – продукт окисления 5-метилцитозина (5mC) белками ТЕТ [3–5]. Исследования, направленные на определение типа клеток, для которых характерно присутствие гидроксиметилированной ДНК, и оценка количества 5hmC в них позволили выдвинуть две гипотезы [6]. Согласно первой гипотезе, 5hmC – это эпигенетическая модификация, за интерпретацию которой отвечают те или иные белковые факторы, остающиеся пока неизвестными и способствующие формированию определенной картины хроматина со своими транскрипционными свойствами. Согласно второй гипотезе, 5hmC, наряду с 5-формилцитозином и 5-карбоксицитозином, является лишь промежуточным состоянием при деметилировании ДНК, содержащей 5mC. Поиски белковых факторов – “переводчиков” с услов-

ного языка гидроксиметилирования ДНК на язык клеточных функций, позволили определить, что SRA-домен метил-ДНК-связывающего белка UHRF1 способен распознавать и связывать ДНК, содержащую 5hmC. Функциональная значимость этого взаимодействия пока не установлена.

В представленной работе изучена способность метил-ДНК-связывающего белка Каизо распознавать и связывать гидроксиметилированную ДНК *in vitro*.

Метил-ДНК-связывающий белок Каизо – транскрипционный репрессор с двумя функциональными доменами: N-концевым ВТВ/POZ-доменом, вовлеченным в белок-белковые взаимодействия, и С-концевым, состоящим из трех “цинковых пальцев” C₂H₂-типа [9]. Домен типа “цинковые пальцы” обеспечивает его связывание с метилированными (mCpGpmCpG) и неметилированными ДНК, содержащими Каизо-связывающий сайт СТGCNA (далее КСС) [9, 10]. Для определения способности Каизо связывать гидроксиметилированную ДНК в клетках *Escherichia coli* UBS520BL получен рекомбинантный химерный белок, содержащий глутатион-S-трансферазный домен и домен “цинковые пальцы” белка Каизо мыши, Kaiso-ZF-GST (аминокислотные остатки 344–638) (рисунок б). В качестве ДНК-субстрата в опыте по задержке в геле использовали последовательность 5'-GGGCCGGAGCTGNGAGGGCAAGGACC, которая состоит из 26 н. и содержит КСС (CTGNGA), где N в каждой цепи заменен на цитозин, 5mC или 5hmC (рисунок в). Все олигонук-

* Эл. почта: Prokhortchouk@biengi.ac.ru



а – Структура цитозина, 5-метилцитозина, 5-гидроксиметилцитозина. *б* – Схематическое изображение белка Кайзо мыши. Участок белка, входящий в состав Kaiso-ZF-GST, подчеркнут. ZF – домен “цинковый палец”, NLS – сигнал ядерной локализации. *в* – Последовательности Кайзо-связывающего сайта, входящие в дуплексы для задержки ДНК-белковых комплексов в геле, содержащие 5-метилцитозин (mC), 5-гидроксиметилцитозин (hmC) и цитозин C в контексте CpG-динуклеотида. *г* – Задержка в геле ДНК-белковых комплексов дуплексов mC/mC, C/C, hmC/hmC, hmC/mC, mC/C, mC/hmC, C/mC с рекомбинантным белком Kaiso-ZF-GST (75, 150, 225, 300 нг).

леотиды синтезированы в компании “Евроген”. Очистку белка и опыт по задержке ДНК-белкового комплекса проводили согласно [11].

Результаты опыта по задержке комплекса рекомбинантного белка Kaiso-ZF-GST с неметилированной пробой подтвердили способность “цинковых пальцев” белка Кайзо связывать данную последовательность (рисунок 2, левая панель), что согласуется с опубликованными ранее данными [10]. Замена цитозина в CpG-динуклеotide KCC на метилированный цитозин (CTGmCGA) не повлияла на способность Kaiso-ZF-GST связывать ДНК

(рисунок 2, левая панель). Однако при внесении 5hmC в Кайзо-связывающий сайт в составе CpG-динуклеотида цинковые пальцы Кайзо потеряли сродство к ДНК (рисунок 2, левая панель). Таким образом, внесение гидроксиметилированного цитозина в участок связывания белка Кайзо ингибирует его взаимодействие с ДНК.

Недавно определили распределение 5hmC в геноме. Оказалось, что 5hmC сконцентрирован: 1) в промоторах, в том числе в промоторах активно транскрибируемых генов; 2) в CpG-островках; 3) в генных районах, причем некоторые участки содер-

жат одновременно и 5mC, и 5hmC [12–14]. Более того, установлено, что гидроксиметилирование ДНК в генных участках коррелирует с экспрессией этих генов [13, 15–17]. Гены, промоторы которых содержат 5mC, чаще всего репрессированы. Однако одновременное присутствие 5hmC и 5mC в целом ряде случаев приводило к тому, что промотор становился активным [14, 15]. Данный факт может быть связан с тем, что, как известно, белки MBD-семейства (MBD1, MBD2, MBD4, MeCP2) взаимодействуют с метилированной ДНК. Внесение 5hmC в участки связывания влечет за собой полную потерю сродства этих белков к ДНК [8, 18, 19], что может приводить к нарушению установления транскрипционно неактивного состояния генов. Нам удалось показать, что присутствие 5hmC в составе Каизо-связывающих сайтов также подавляет связывание ДНК белком Каизо, что может способствовать изменению спектров белков-корепрессоров, привлекаемых к промоторам. Известно, что белок Каизо может взаимодействовать с ядерным корепрессором N-CoR, который участвует в формировании неактивного хроматина за счет деацетилазной активности белков, входящих с ним в один комплекс. Таким образом, потеря сродства Каизо к гидроксиметилированной ДНК может быть критичной для формирования закрытого хроматина.

Мы изучили также, как влияет присутствие 5hmC в составе одной из цепей дуплекса на связывание Каизо с ДНК. С этой целью использовали дуплексы, в которых одна цепь либо метилирована, либо неметилирована, а вторая содержит 5hmC в Каизо-связывающем сайте в составе CpG-динуклеотида. Внесение 5hmC в одну из цепей (hmC/C или C/hmC) приводит к практически полной потере сродства белка к ДНК (рисунок в, правая панель). В то же время сохраняется связывание Kaiso-ZF-GST с полуметилированной ДНК (mC/C, C/mC) и с полуметилированной/полугидроксиметилированной ДНК (hmC/mC) (рисунок з). Таким образом, присутствие полугидроксиметилированного дуплекса способствует ингибированию связывания Каизо с ДНК, в то время как сродство белка к ДНК сохраняется лишь в случае полуметилированной/полугидроксиметилированной последовательности (hmC/mC).

В настоящее время известно, что белки TET могут переводить метилированную (mC/mC), полуметилированную (mC/C), а также полугидроксиметилированную/метилированную (hmC/mC) ДНК в гидроксиметилированную (hmC/hmC) [4, 8]. Отметим также сравнимые величины сродства MeCP2 и MBD1 к полугидроксиметилированной/полуметилированной (hmC/mC) и метилированной ДНК [8], что, в свою очередь, может препятствовать привлечению TET-белков к ДНК и переходу 5mC в 5hmC. В данной работе нам удалось показать, что Каизо, так же как и белки

MeCP2 и MBD1, сохраняет способность связываться с полугидроксиметилированной/метилированной ДНК (hmC/mC), следовательно, Каизо может участвовать в регуляции уровня 5hmC.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации (ГК 11.519.11.2026).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bird A. 2002. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **16**, 6–21.
2. Goll M.G., Bestor T.H. 2005. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 481–514.
3. Kriaucionis S., Heintz N. 2009. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science.* **324**, 929–930.
4. Tahiliani M., Koh K.P., Shen Y., Pastor W.A., Bandukwala H., Brudno Y., Agarwal S., Iyer L.M., Liu D.R., Aravind L., Rao A. 2009. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science.* **324**, 930–935.
5. Ito S., D'Alessio A.C., Taranova O.V., Hong K., Sowers L.C., Zhang Y. 2010. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature.* **466**, 1129–1133.
6. Branco M.R., Ficz G., Reik W. 2012. Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 7–13.
7. Frauer C., Hoffmann T., Bultmann S., Casa V., Cardoso M.C., Antes I., Leonhardt H. 2011. Recognition of 5-hydroxymethylcytosine by the Uhrf1 SRA domain. *PLoS One.* **6**, e21306.
8. Hashimoto H., Liu Y., Upadhyay A.K., Chang Y., Howerton S.B., Vertino P.M., Zhang X., Cheng X. 2012. Recognition and potential mechanisms for replication and erasure of cytosine hydroxymethylation. *Nucl. Acids Res.* **40**, 4841–4849.
9. Prokhortchouk A., Hendrich B., Jorgensen H., Ruzov A., Wilm M., Georgiev G., Bird A., Prokhortchouk E. 2001. The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev.* **15**, 1613–1618.
10. Daniel J.M., Spring C.M., Crawford H.C., Reynolds A.B., Baig A. 2002. The p120(ctn)-binding partner Kaiso is a bi-modal DNA-binding protein that recognizes both a sequence-specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucl. Acids Res.* **30**, 2911–2919.
11. Жигалова Н.А., Женило С.В., Айтхожина Д.С., Прохорчук Е.Б. 2010. Две функции домена “цинковые пальцы” метил-ДНК-связывающего белка Каизо. *Молекуляр. биология.* **44**, 263–274.
12. Szulwach K.E., Li X., Li Y., Song C.X., Han J.W., Kim S., Namburi S., Hermetz K., Kim J.J., Rudd M.K., Yoon Y.S., Ren B., He C., Jin P. 2011. Integrating 5-hydroxymethylcytosine into the epigenomic landscape of human embryonic stem cells. *PLoS Genet.* **7**, e1002154.
13. Wu H., D'Alessio A.C., Ito S., Wang Z., Cui K., Zhao K., Sun Y.E., Zhang Y. 2011. Genome-wide analysis of 5-hy-

- droxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes Dev.* **25**, 679–684.
14. Williams K., Christensen J., Pedersen M.T., Johansen J.V., Cloos P.A., Rappaport J., Helin K. 2011. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature*. **473**, 343–348.
 15. Ficiz G., Branco M.R., Seisenberger S., Santos F., Krueger F., Hore T.A., Marques C.J., Andrews S., Reik W. 2011. Dynamic regulation of 5-hydroxymethylcytosine in mouse ES cells and during differentiation. *Nature*. **473**, 398–402.
 16. Xu Y., Wu F., Tan L., Kong L., Xiong L., Deng J., Barbera A.J., Zheng L., Zhang H., Huang S., Min J., Nicholson T., Chen T., Xu G., Shi Y., Zhang K., Shi Y.G. 2011. Genome-wide regulation of 5hmC, 5mC, and gene expression by Tet1 hydroxylase in mouse embryonic stem cells. *Mol. Cell*. **42**, 451–464.
 17. Pastor W.A., Pape U.J., Huang Y., Henderson H.R., Lister R., Ko M., McLoughlin E.M., Brudno Y., Mahapatra S., Kapranov P., Tahiliani M., Daley G.Q., Liu X.S., Ecker J.R., Milos P.M., Agarwal S., Rao A. 2011. Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature*. **473**, 394–397.
 18. Valinluck V., Tsai H.H., Rogstad D.K., Burdzy A., Bird A., Sowers L.C. 2004. Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2). *Nucl. Acids Res.* **32**, 4100–4108.
 19. Jin S.G., Kadam S., Pfeifer G.P. 2010. Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nucl. Acids Res.* **38**, e125.
 20. Yoon H.G., Chan D.W., Reynolds A.B., Qin J., Wong J. 2003. N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol. Cell*. **12**, 723–734.