БИОХИМИЯ, 2023, том 88, вып. 12, с. 2446 – 2456

УДК 577.12

ТОПОЛОГИЯ ПОЛИУБИКВИТИНОВЫХ ЦЕПЕЙ В ХРОМАТОСОМНОМ ОКРУЖЕНИИ УБИКВИТИН-ЛИГАЗЫ E3 RNF168

© 2023 А.А. Кудряева*, Л.А. Якубова, Г.А. Саратов, В.И. Владимиров, В.М. Липкин, А.А. Белогуров

Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия; электронная почта: anna.kudriaeva@gmail.com

Поступила в редакцию 03.05.2023
После доработки 19.07.2023
Принята к публикации 20.09.2023

Убиквитин-лигаза E3 RNF168 суперсемейства RING является важнейшим компонентом комплекса, осуществляющего убиквитинирование гистонов H2A/H2AX вблизи двуцепочечных разрывов ДНК, что является ключевой стадией привлечения факторов репарации к месту повреждения. В настоящей работе нами однозначно показано, что RNF168 не имеет природной способности непосредственно различать архитектуру полиубиквитиновых цепей, за исключением тропности двух её убиквитин-связывающих доменов UDM1/2 к убиквитинам, соединённым через аминокислотный остаток K63. Анализ внутриклеточного хроматосомного окружения полноразмерной RNF168 и её доменов методом лиганд-индуцированного резонансного переноса биолюминесценции выявил, что *C*-концевая часть UDM1 ассоциирована с K63-полиубиквитиновыми цепями; RING и *N*-концевая часть UDM2 стерически сближены с K63- и K48-убиквитиновыми цепями, в то время как *C*-концевая часть UDM1 колокализована со всеми возможными вариантами убиквитина. Полученные результаты совместно с имеющимися структурными данными позволяют выдвинуть гипотезу, что *C*-концевая часть UDM1 связывает K63-полиубиквитиновые цепи на линкерном гистоне H1; RING и *N*-концевая часть UDM2 находятся в центральной части нуклеосомы и сближены с H1 и K48-убиквитинированными альтернативными субстратами RNF168, возможно, деметилазами JMJD2A/B, в то время как *C*-концевая часть UDM1, вероятно, находится в области активированного остатка убиквитина, связанного с убиквитин-лигазой E2 в составе комплекса с RNF168. Резюмируя, наши данные могут объяснить наличие большого количества протяжённых неструктурированных участков в RNF168, которые потенциально необходимы этой E3-лигазе для корректного позиционирования доменов UDM1/2 с целью многоточечного взаимодействия со множеством партнёров в её динамическом хроматосомном окружении.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: убиквитин, убиквитиновые цепи, убиквитин-лигаза, гистоны, репарация ДНК, двуцепочечные разрывы ДНК, посттрансляционные модификации, NanoBRET.

DOI: 10.31857/S0320972523120084, **EDN:** NKVSRR

ВВЕДЕНИЕ

В каждой клетке высокоорганизованных многоклеточных организмов ежесекундно происходят десятки событий, повреждающих ДНК. Отсутствие репарации этих повреждений может привести к геномной нестабильности и злокачественной трансформации [1, 2]. Двуцепочечные разрывы ДНК (DSB) являются одними из наиболее опасных повреждений, поскольку их неправильная репарация может привести к фрагментации хромосом и неминуемой гибели клеток [3]. Существует два основных пути восстановления DSB: негомологичное соединение концов (NHEJ) и гомологичная рекомбинация (HR). Независимо от пути репарации, хроматин, окружающий место разрыва, должен быть ремоделирован, чтобы обеспечить доступ для белков репарации ДНК [4]. Ремоделирование хроматина играет важную роль в функционировании всех клеточных процессов с участием ДНК, включая транскрипцию, репли-

Принятые сокращения: ППР – поверхностный плазмонный резонанс; DSB – двуцепочечные разрывы ДНК; HR – гомологичная рекомбинация; LR – мотив, содержащий дипептид лейцин-аргинин; NanoBRET – биолюминесцентный резонансный перенос энергии с использованием люциферазы NanoLuc; NHEJ – негомологичное соединение концов.

* Адресат для корреспонденции.

кацию ДНК и репарацию ДНК, и состоит в согласованной передаче сигналов, обусловленной посттрансляционными модификациями гистонов, такими как фосфорилирование, метилирование, ацетилирование и убиквитинирование [5, 6].

Убиквитинирование – ковалентное присоединение убиквитина к субстратам – осуществляется при помощи системы, состоящей из трёх ферментов: E1 (убиквитин-активирующий фермент), E2 (убиквитин-конъюгирующий фермент) и убиквитин-лигазы E3. ε-Аминогруппы семи аминокислотных остатков лизина (K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63), входящих в состав убиквитина, позволяют ему образовывать изопептидные связи [7, 8]. Как правило, первый убиквитин присоединяется к остатку лизина, входящему в состав субстрата, с помощью *C*-концевого остатка глицина (G76). Дальнейший рост цепи обусловлен образованием изопептидных связей между внутренними остатками лизинов уже встроенного убиквитина и *C*-концевым остатком глицина нового убиквитина. Также возможно образование цепи через остаток M1 убиквитина. Параметры цепей крайне разнообразны: они могут быть как гомогенными, то есть образовывать связи через остатки лизинов в строго определённом положении, так и гетерогенными – комбинировать разные типы связей. Последние, в свою очередь, могут разветвляться посредством убиквитинирования сразу по нескольким сайтам. Считается, что значение сигнала убиквитинирования зависит от типа связи и длины убиквитиновой цепи [9]. Удаление этих сигналов осуществляется с помощью деубиквитинирующих ферментов (DUB). Функциональные роли убиквитиновых цепей, образованных через остатки лизина K48 и K63, достаточно хорошо изучены. K48-Убиквитинирование считается сигналом протеасомной деградации, тогда как K63-убиквитинирование обеспечивает белок-белковые взаимодействия в различных процессах, в том числе при репарации ДНК [10, 11]. Помимо важности K11 и M1 убиквитиновых связей в регуляции клеточного цикла и активации NF-κB [12, 13], мало что известно об убиквитин-лигазах, рецепторах убиквитина и функциях других неканонических цепей убиквитина (K6, K27, K29, K33).

Одной из основных функций убиквитинирования в репарации DSB является поддержание баланса между NHEJ и HR. Моноубиквитинирование гистонов H2A и H2AX по аминокислотным остаткам K13/K15 убиквитин-лигазой RNF168 содействует привлечению белка 53BP1, который способствует дальнейшей репарации DSB по пути NHEJ, в то время как опосредованное комплексом белков BRCA1–BARD1 моноубиквитинирование H2A по K125/K127 или K129 способствует замещению 53BP1 на BRCA1 и последующей резекции концов ДНК, что является первым этапом HR [14]. Поскольку все процессы требуют тонкой временной и пространственной настройки, множество убиквитин-лигаз и DUB задействовано в передаче сигналов о повреждении ДНК для обеспечения эффективной и точной репарации DSB [15].

Убиквитин-лигаза E3 RNF168 – белок с ядерной локализацией длиной 571 а.о., является одним из основных участников в передаче сигнала при DDR (DNA damage response). Уровень RNF168 строго контролируется белками TRIP12 и UBR5, чтобы предотвратить чрезмерное усиление сигнала убиквитинирования [16]. Считается, что RNF168 способствует сборке K27-, K48- и K63-цепей, а также моноубиквитинированию [14, 17, 18]. Функциональные домены RNF168 достаточно подробно охарактеризованы: в *N*-концевой части располагается домен RING, ответственный за убиквитин-лигазную активность; в середине располагается домен UDM1 (Ub-dependent DSB recruitment module) и в *C*-концевой части – UDM2 (рис. 1). Считается, что домены UDM1 и UDM2 отвечают за распознавание убиквитиновых цепей, в первую очередь на гистонах вблизи двуцепочечных разрывов ДНК, и таким образом способствуют привлечению RNF168 к месту повреждения [6]. Функциональные домены RNF168 весьма консервативны среди позвоночных, гомология составляет от 35 до 95% [19].

На настоящий момент имеются довольно противоречивые данные о структуре убиквитиновых цепей, способных распознаваться полноразмерной RNF168 и ее функциональными доменами. В состав домена UDM1 входят три мотива: LRM1 (мотив LR, содержащий дипептид лейцин-аргинин), UMI (Ub-interacting motif [UIM] and MIU-related UBD) и MIU1 (motif interacting with Ub). UDM2 содержит UAD (ubiquitin-associated domain), MIU2 и мотив LRM2 (рис. 1). Считается, что убиквитин-лигаза E3 RNF168 распознает убиквитинированные белки с помощью трёх различных убиквитин-связывающих мотивов: MIU1, MIU2 и UMI. Мотив UMI домена UDM1 предпочтительно связывается с K63 убиквитиновыми цепями. В то же время мутация мотива MIU1 резко снижает связывание RNF168 с K48-цепями убиквитина [20]. Другое иссле-

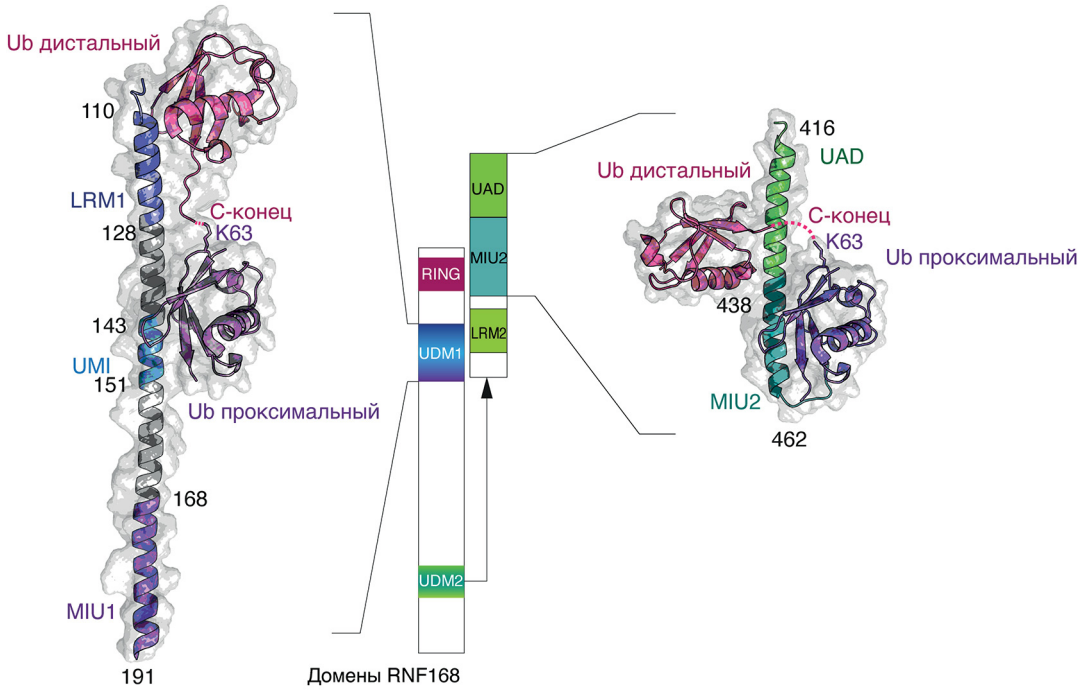

Рис. 1. Структурная организация и функциональные домены убиквитин-лигазы E3 RNF168

дование показало, что мотив MIU1 сам по себе проявляет сходную аффинность связывания с моноубиквитином, K48- и K63-цепями убиквитина [21]. Есть предположение, что более высокой аффинности связывания UMI с K63-цепями, по сравнению с MIU2, способствует мотив LRM1, несмотря на то что информация о способности его взаимодействия с убиквитиновыми цепями отсутствует [21]. Считается, что консервативный мотив LR необходим для привлечения лигаз RNF168 и RNF169 к убиквитинированному H2A и, возможно, способен связываться с H2A напрямую [22]. Интересно, что делеция мотива LRM2 домена UDM2, наоборот, способствует повышению сродства данного домена к K63 убиквитиновым цепям [21]. В настоящее время считается, что UDM1 и UDM2 взаимодействуют с различными K63-убиквитинированными мишенями: домен UDM1 способен распознавать убиквитинированные мишени, модифицированные убиквитин-лигазой RNF8, тогда как домен UDM2 распознает RNF168-опосредованные убиквитинированные мишени [19]. Функциональное различие между UDM1 и UDM2 может быть связано как с разными MIU-мотивами входящих в состав UDM, так и с консервативными LR-мотивами в их составе (LRM1 – в UDM1 и LRM2 – в UDM2) [21]. Есть данные, что полноразмерный белок RNF168 способен связываться K27-диубиквитином [17], однако в другой работе данная информация не была подтверждена [21].

Имеющиеся на настоящий момент литературные данные по характеру взаимодействия RNF168 и убиквитиновых цепей ограничены экспериментами *in vitro* или с использованием клеточных лизатов [20, 21, 23, 24]. В большинстве случаев в анализе используется ограниченный набор вариантов убиквитина. Более того, анализ делетированных доменов и изолированных небольших фрагментов RNF168 может иметь лишь отдалённое сходство с физиологическими процессами в клетке. В данной работе нами проведён исчерпывающий анализ параметров внутриклеточного связывания убиквитиновых цепей различного типа ветвления с убиквитин-лигазой RNF168 и её функциональными доменами с помощью метода лиганд-индуцированного резонансного переноса биолюминесценции с использованием люциферазы NanoLuc (NanoBRET).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение плазмид. Генетические конструкции, кодирующие функциональные домены убиквитин-лигазы RNF168 RING (1–110 а.о.), UDM1 (110–188 а.о.) и UDM2 (419–487 а.о.), слитные с Fc-доменом антитела IgG, а также содержащие лидерный пептид, направляющий синтезируемый белок во внеклеточную

среду для наработки белков в клетках млекопитающих HEK293F, были получены на основе вектора pFUSE (по сайтам рестрикции *EcoRI* и *NheI*). Генетические конструкции, кодирующие полноразмерную убиквитин-лигазу RNF168 и её функциональные домены RING, UDM1 и UDM2, слитные с белком HaloTag, и варианты убиквитина K0R K6/11/27/29/33/48/63, слитные с люциферазой NanoLuc и содержащие в своём составе единственный функциональный остаток лизина (для использования в методе NanoBRET), были получены на основе вектора pcDNA3 (по сайтам рестрикции *HindIII* и *XhoI*). Последовательности RNF168 RING (1–110 а.о.), UDM1 (110–188 а.о.) и UDM2 (419–487 а.о.) и полноразмерной RNF168 были амплифицированы с кДНК, полученной из клеток HEK293T. Последовательности NanoLuc и HaloTag были амплифицированы с плазмид pENTR4-HaloTag (Addgene, #29644) и pcDNA3.1 NL (Addgene; #113442) соответственно.

Культивирование клеток млекопитающих. Клетки почки эмбриона человека HEK293T (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия) выращивали во флаконах для культивирования в среде DMEM («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки («Hyclone, Cytiva», США) и смеси антибиотиков (пенициллин – 100 мкг/мл, стрептомицин – 100 мкг/мл, гентамицин – 50 мкг/мл) при 37 °C в атмосфере 5% CO_2. Клетки HEK293F выращивали в колбах при постоянном перемешивании в среде Freestyle («Thermo Fisher Scientific», США) при 37 °C в атмосфере 5% CO_2.

Экспрессия RNF168 и её функциональных доменов в клетках млекопитающих HEK293F. Полученными плазмидами трансфицировали линию клеток HEK293F с использованием реагента PEI MAX («Polysciences, Inc.», США) и культивировали 96 ч. Очистку белков проводили с помощью магнитных частиц с иммобилизованным на них белком G («Thermo Fisher Scientific»).

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР). На оптическом чипе CM5 («Cytiva», США) с применением протокола NHS-EDC иммобилизовали диубиквитины, связанные через различные аминокислотные остатки лизина – K6, K11, K27, K29, K33, K48, K63 («UbiQ», Нидерланды). Производили инжекцию серии образцов белка-аналита (домены убиквитин-лигазы RNF168) в возрастающей концентрации (1–15 мкМ) на скорости 10 мкл/мин. После регистрации диссоциации межмолекулярных комплексов поверхность чипа обрабатывали регенерирующим раствором (10 мМ Gly-HCl, pH 2,5) в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин. Анализ выполняли с использованием SPR-биосенсора Biacore 8K («Cytiva»). Для определения динамических констант диссоциации (K_d) диаграммы ППР анализировали, применяя модель адсорбции Ленгмюра (одна молекула аналита взаимодействует с одной молекулой лиганда). Данные сенсограмм взаимодействий обрабатывали в программном комплексе Biacore Insight Evaluation Version 3.0.11.15423.

Иммуноблоттинг. Проводили гель-электрофорез белков в денатурирующих условиях (градиентный гель 4–20%) по Лэммли с использованием предокрашенного белкового маркера («Bio-Rad», США). Далее проводили перенос на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad») в течение 1 ч при силе тока 0,8 мА/см^2. По окончании процесса мембрану помещали в блокирующий раствор, содержащий 5% сухого молока в PBS, и инкубировали 1 ч. Гибридизацию с антителами anti-Flag-HRP («Sigma», США) или anti-Strep-HRP («Bio-Rad») проводили в конъюгатном буфере в течение 1 ч. Далее, после тщательной отмывки наносили проявляющий раствор Clarity Western ECL Substrate («Bio-Rad») и проявляли на ChemiDoc MP Imaging System («Bio-Rad»).

NanoBRET. Для проведения анализа методом NanoBRET использовали набор NanoBRET Nano-Glo («Promega», США), в соответствии с инструкциями производителя. Клетки HEK293T при плотности ~ 3×10^5 клеток на лунку котрансфицировали 200 нг плазмид NanoLuc-UbK0 K6/11/27/29/33/48/63 и HaloTag-RNF168/RING/UDM1/2 или RNF168/RING/UDM1/2-HaloTag или интактный HaloTag в соотношении 1 : 100 с использованием реагента трансфекции GenJect-39 («Molecta», Россия) в белых 96-луночных планшетах («Greiner», Германия). Через 24 ч после трансфекции к клеткам добавляли лиганд HaloTag NanoBRET 618 до конечной концентрации 100 нМ в среде DMEM Fluorobrite («Thermo Fisher Scientific»). Еще через 16 ч сигнал NanoBRET измеряли через 5 мин после добавления субстрата NanoLuc фуримазина в концентрации 10 мкМ с использованием микропланшетного ридера Tecan Spark Cyto 600 («Tecan», Германия) при 450/480 нм BP (люминесценция донора) и 610 нм LP (флуоресценция акцептора). Соотношения NanoBRET рассчитывали как частное 610 нм LP (испускание) / (450/480) нм BP (испускание) × 1000. Скорректированное соотношение NanoBRET

получали путём вычитания сигнала контроля, не содержащего акцепторного лиганда, а затем дополнительно проводили нормировку на сигнал NanoBRET в присутствии интактного HaloTag.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Домены RNF168 обладают ограниченной способностью распознавать диубиквитины различной топологии *in vitro*. Рекомбинантные домены UDM1/2 и RING, слитные с константным фрагментом антитела человека, были получены в клетках млекопитающих HEK293F. Анализ взаимодействия очищенных функциональных доменов RNF168 (рис. 2, *а*) методом ППР, представленный на рис. 2, *б*, свидетельствует об отсутствии значимого уровня их связывания с диубиквитинами с различным типом изопептидной связи за исключением домена UDM1 и диубиквитина, связанного через аминокислотный остаток K63 (K_d ~ 25 мкМ) (рис. 2, *в*). Данное наблюдение коррелирует с имеющимися литературными данными [20], где было продемонстрировано связывание diUb63 с транкированным вариантом домена UDM1 – LRM1-UMI, слитным с GST (K_d ~ 45 мкМ). Полученные сенсограммы однозначно свидетельствуют о низкой аффинности ($K_d \gg 100$ мкМ) всех остальных проанализированных пар, в том числе к диубиквитинам, образованным через аминокислотные остатки K27 и K48.

Хроматосомное окружение Е3-лигазы RNF168, выявленное методом лиганд-индуцированного резонансного переноса биолюминесценции. Относительно недавно была разработана новая система анализа внутриклеточных взаимодействий на основе биолюминесцентного резонансного переноса энергии – BRET-пара NanoLuc (460 нм) и HaloTag (618 нм) с расстоянием между пиками эмиссии и поглощения в 175 нм [25], названная авторами NanoBRET. Такой разрыв в максимумах свечения дает высокую чувствительность и низкий фоновый сигнал. Кроме того, данная система позволяет анализировать мультисубъединичные комплексы и взаимодействие крупных белков благодаря относительно большому для таких систем Фёрстеровскому радиусу, равному 6,97 нм, а экспериментально установленные рабочие дистанции находятся в диапазоне 3–10 нм [26]. В этой связи нами были созданы генетические конструкции, кодирующие варианты убиквитина только с одним функциональным остатком лизина (так называемые UbK0 с одной возвратной заменой R→K), слитные на *N*-конце с люциферазой NanoLuc. Модифицированный таким образом убиквитин имеет аналогичные способности образовывать полиубиквитиновые цепи по сравнению с убиквитином, фланкированным *N*-концевым FLAG-эпитопом (рис. 3, *а*). Дополнительно были созданы генетические конструкции, кодирующие полноразмерную RNF168, а также её функциональные домены UDM1/2 и RING, слитные либо с *N*-, либо с *C*-конца с белком HaloTag и содержащие Strep-эпитоп (рис. 3, *б*).

Наличие резонансного переноса биолюминесценции в случае коэкспрессии соответствующих пар означает стерическую сближенность определённых доменов RNF168 и полиубиквитиновых цепей определённого типа ветвления (рис. 3, *в*). Анализ уровня внутриклеточной флуоресценции котрансфецированных клеток (рис. 3, *г* и *д*) выявил повышенную ассоциацию *N*-концевой части домена UDM1 с K63-убиквитиновым цепям. Полноразмерная лигаза RNF168, слитная с HaloTag с *N*-конца, а также RING-домен продемонстрировали преимущественную сближенность с убиквитиновыми цепями, образованными через аминокислотные остатки K63 и K48. Анализ эффективности NanoBRET показал, что *C*-концевая часть домена UDM1 взаимодействует со всеми возможными убиквитиновыми цепями с некоторой повышенной тропностью к K48- и K63-цепям. *N*-Концевая часть UDM2-домена также имела повышенное сродство к полиубиквитиновым цепям, образованным через аминокислотные остатки K63 и K48, и менее выраженное – к K33-убиквитиновым цепям. *C*-Концевые части домена UDM2 и полноразмерной RNF168 не показали какого-либо достоверного сродства к убиквитиновым цепям. В случае UDM2-HaloTag это, возможно, связано с низким уровнем экспрессии данного слитного белка, выявленного по результатам иммуноблоттинга (рис. 3, *б*). Дополнительным фактором отсутствия сигнала может быть наличие слитного белка именно на *C*-конце UDM2, радикально влияющего на функционал этого домена RNF168, как это было нами показано в случае *in vitro* анализа (рис. 2, *б*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полноразмерный домен UDM1 (LRM-UMI-MIU1) показал достоверное сродство к K63-убиквитиновым цепям в *in vitro* системе (K_d ~ 25 мкМ), в отличие от домена UDM2 (UAD-MIU2-LRM2), для полноразмерного

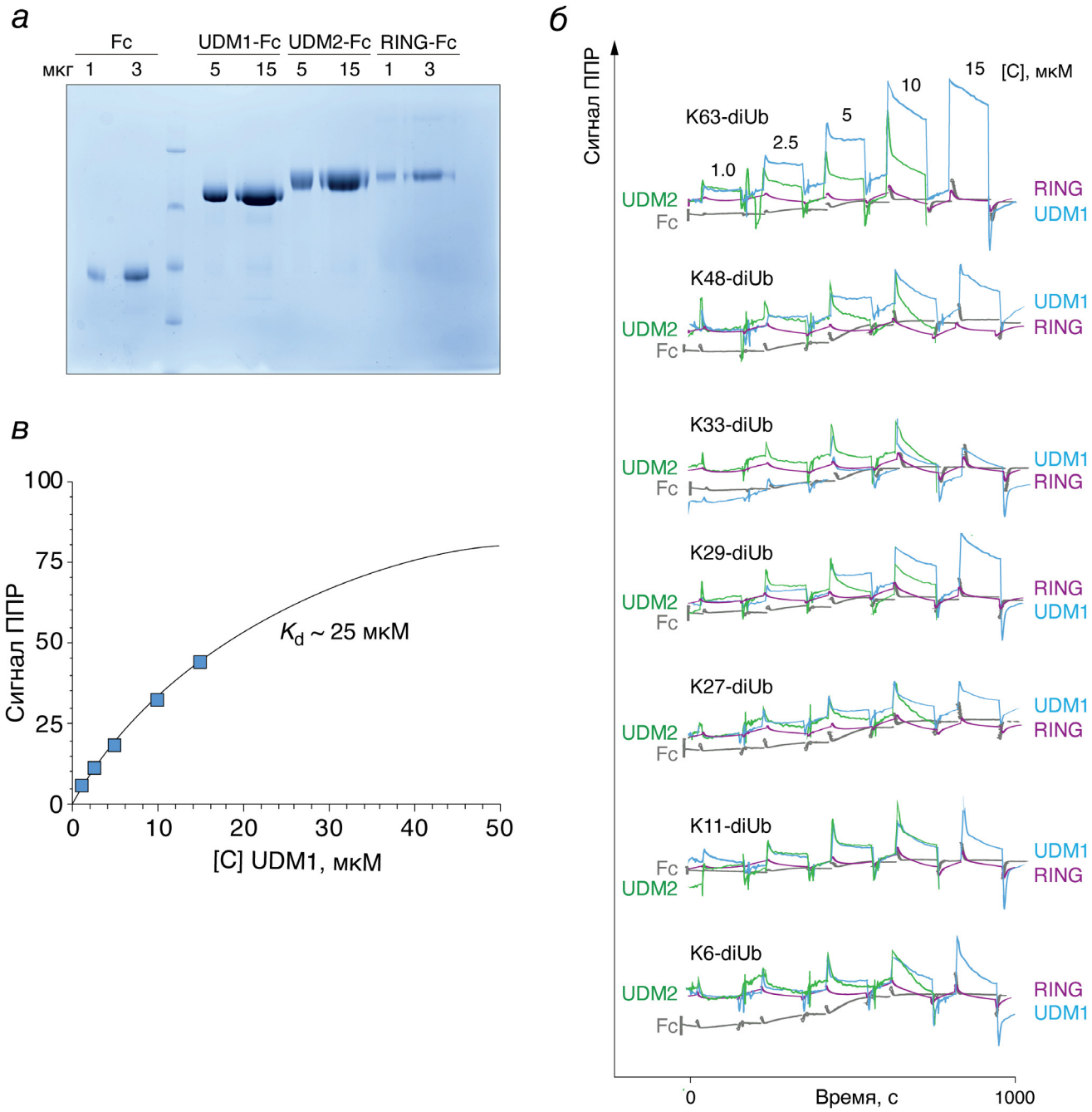

Рис. 2. Анализ взаимодействия доменов RNF168 с диубиквитинами методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР). *а* – Электрофореграмма очищенных белковых препаратов Fc и доменов RNF168 – UDM1/2 и RING, слитных с Fc. *б* – Анализ взаимодействия различных функциональных доменов RNF168 (UDM1, UDM2, RING) в различной концентрации (1–15 мкМ) с диубиквитинами с разным вариантом изопептидной связи (K6/K11/K27/K29/K33/K48/K63) методом ППР. *в* – Кривая титрования, отражающая взаимодействие между иммобилизованным на чипе K63-диубиквитином с UDM1-Fc

и транкированного варианта (UAD-MIU2) которого, слитного с *N*-конца с GST, также ранее было показано связывание с K63-цепями [21]. Возможно, присоединение Fc-фрагмента к *C*-концевой части домена UDM2 драматическим образом повлияло на способность UDM2 распознавать K63-цепи, учитывая тот факт, что удаление мотива LRM2 в *C*-концевой части UDM2 приводит к уменьшению соответствующего K_d [21].

Метод NanoBRET широко используется в биохимических исследованиях, так как он позволяет изучать взаимодействия белков в более естественных условиях в сравнении с искусственными *in vitro* системами. Это делает возможным выявить наиболее реалистичный

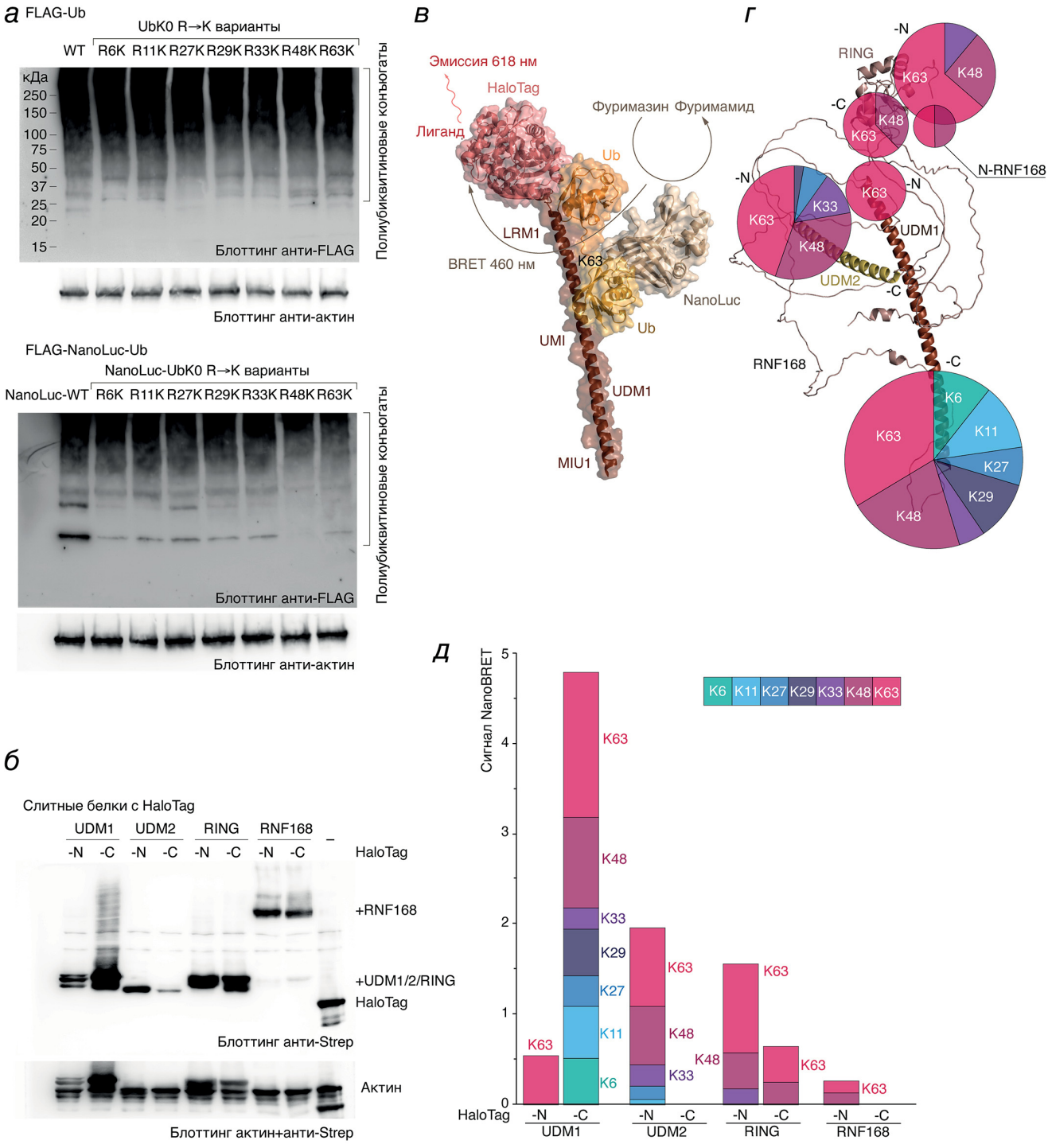

Рис. 3. Анализ убиквитинового окружения убиквитин-лигазы E3 RNF168 методом NanoBRET. *а* – Блоттинг лизатов клеток HEK293, трансфицированных кДНК, кодирующей FLAG-Ub и варианты FLAG-UbK0 R→K 6/11/27/29/33/48/63, а также NanoLuc-Ub и варианты NanoLuc-UbK0 R→K 6/11/27/29/33/48/63, с использованием антител против FLAG-эпитопа и актина. *б* – Блоттинг клеток HEK293, трансфицированных кДНК, кодирующей полноразмерную RNF168, а также её функциональные домены UDM1/2 и RING, слитные либо с *N*-, либо с *C*-конца с белком HaloTag. *в* – Схематическое представление принципа анализа убиквитинового окружения убиквитин-лигазы RNF168 методом NanoBRET. Использованы структуры домена UDM1 с K63 diUb (PDB 5XIS), люциферазы nLuc (PDB 7SNS) и белка HaloTag, связанного с лигандом тетраметилродамином (PDB 6U32). *г* и *д* – Диаграмма сближенности убиквитиновых цепей различной топологии с функциональными доменами убиквитин-лигазы RNF168 (предположительная структура на основе предсказания нейросети AlphaFold; идентификатор AF-Q8IYW5-F1), построенной по результатам NanoBRET. Площадь круга на панели (*г*) соответствует сумме всех сигналов NanoBRET (высоте столбика) на панели (*д*). Значения сигнала NanoBRET на панели (*д*) нормализовано на сигнал белка HaloTag без доменов RNF168, коэкспрессированного с соответствующим вариантом убиквитина

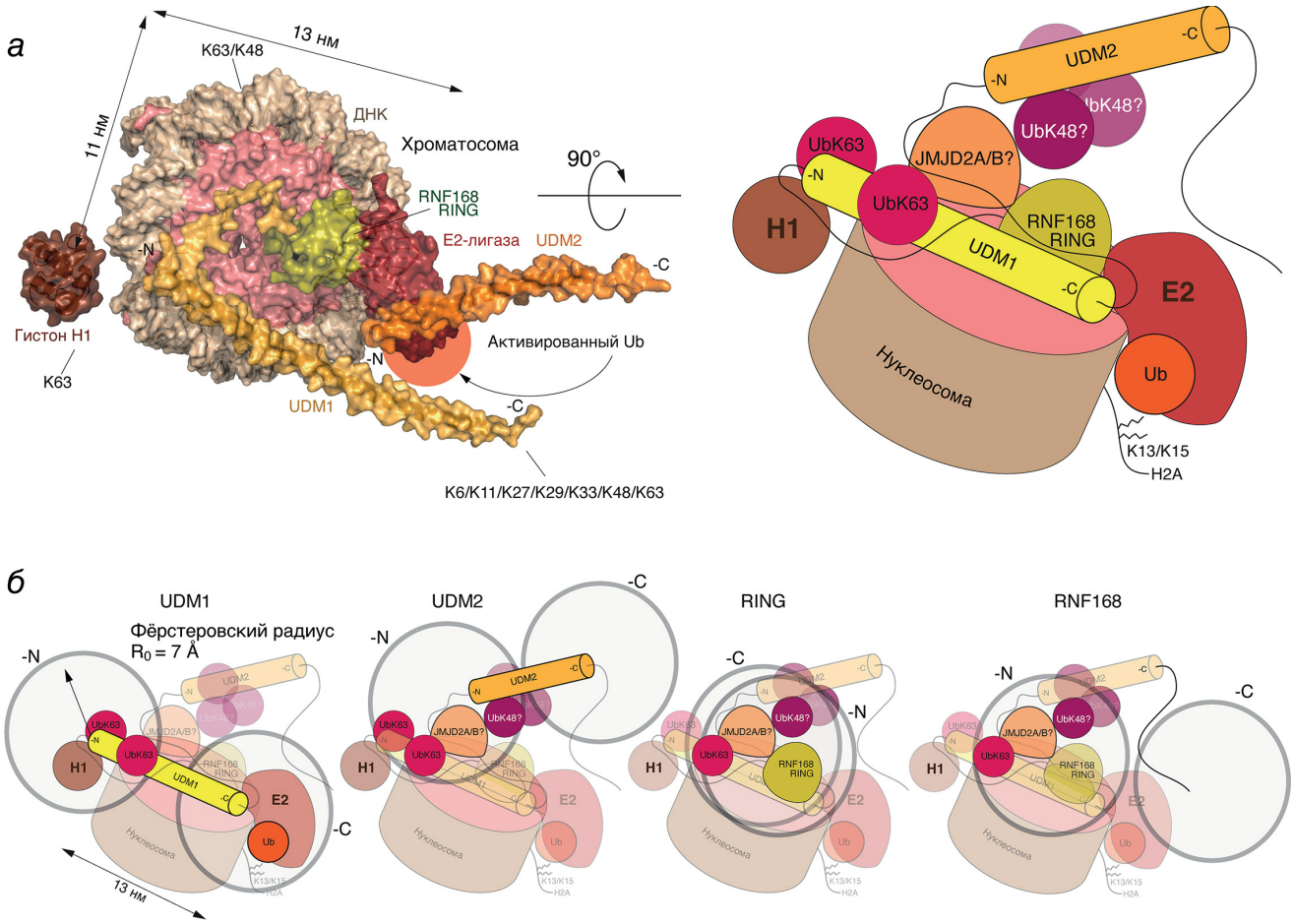

Рис. 4. Предположительная конфигурация убиквитинового окружения лигазы RNF168 в контексте хроматосомы. *а* – Левая модель выполнена на основе предложенной структуры комплекса RING-домена убиквитин-лигазы RNF168 (оливковый) с нуклеосомой (розовый и серый) и убиквитин-лигазой UbcH5c (красный) (PDBDEV_00000029, [24]). В структуру дополнительно добавлены домены UDM1 (желтый) и UDM2 (золотой) лигазы RNF168, а также глобулярный домен гистона H1B из структуры 5NL0 [27]. Указаны положения активированного убиквитина (тёмно-оранжевый) и зоны локализации вариантов убиквитинов по результатам NanoBRET. Правая модель схематически дополнена полиубиквитиновыми цепями, а также деметилазой JMJD2A/B. *б* – Возможные конформации расположения полноразмерной RNF168, а также её функциональных доменов UDM1/2 и RING, слитных либо с *N*-, либо с *C*-конца с белком HaloTag в контексте хроматосомы с учетом Фёрстеровского радиуса сигнала NanoBRET

сценарий взаимодействия белков, что улучшает понимание многих биологических процессов. Данный метод также может использоваться для *ex vivo* скрининга потенциальных лекарственных препаратов, которые могут влиять на белок-белковые взаимодействия. В целом, на настоящий момент метод NanoBRET является одним из наиболее мощных инструментов для изучения белковых взаимодействий в живых клетках. В этой связи мы решили использовать метод NanoBRET для изучения внутриклеточного убиквитинового окружения убиквитин-лигазы E3 RNF168. Полученные данные потенциально могли бы свидетельствовать о способности RNF168 распознавать те или иные цепи, а также о топологии окружающих её цепей. Учитывая линейные размеры нуклеосомы (рис. 4, *а*) [27] и рабочие расстояния системы NanoBRET (3–10 нм), можно говорить о том, что наблюдаемые нами сигналы являются достоверными.

На основании наших данных и предложенной на настоящий момент структуры комплекса нуклеосомы и RING-домена RNF168 [23], можно предположить, что UDM1-домен RNF168 располагается параллельно спиралям цепи ДНК вокруг нуклеосомы, пересекая её от одного полюса до другого (рис. 4, *а* и *б*).

N-Концевая часть домена UDM1 содержит мотивы LRM1 и UMI, в *C*-концевой части расположен мотив MIU1. Исходно считалось, что LRM1 распознает RNF8-опосредованно убиквитинированные белки [28]. Дальнейшие исследования показали, что LRM1 в UDM1 может взаимодействовать с линкерным гистоном H1 [29]. Вместе с тем показано,

что лигаза RNF169, содержащая данный мотив, с H1 не взаимодействует, что свидетельствует о неполном понимании функционала LRM1. Существуют данные, что домен UDM1 лигазы RNF168, содержащий как LRM1, так и UMI, проявляет более сильную аффинность к убиквитиновым цепям, образованным через остаток K63, чем только UMI [21]. Данное наблюдение указывает на то, что LRM1 может иметь вспомогательную роль при взаимодействии RNF168 с K63-цепями, это полностью согласуется с полученными нами данными о высокой специфичности *N*-концевой части UDM1 именно к K63-цепям, вероятно, расположенным на гистоне H1 [20] (рис. 4). *C*-Концевая часть UDM1, которая, по нашим данным, распознает все виды убиквитиновых цепей, скорее всего, расположена вблизи E2-лигазы, удерживаемой RNF168, которая физически переносит убиквитин на *N*-концевую часть H2A/H2AX (рис. 4). Вероятнее всего, сигнал NanoBRET, который мы фиксируем с конструкцией UDM1-HaloTag, – это тиоэфирный конъюгат любого из вариантов убиквитина, слитного с NanoLuc, и E2.

N-Концевая часть домена UDM2, исходя из наших данных, более подвижна и может быть расположена как поблизости от *N*-концевой части RING, рядом с K63-убиквитинированным H1, так и находиться ортогонально и выше UDM1 вблизи K48-цепей, связанных с альтернативными субстратами RNF168. В случае *C*-концевой локализации HaloTag нам не удалось зафиксировать достоверного сигнала NanoBRET, что, возможно, связно с удалённостью *C*-концевой части UDM2 от убиквитиновых цепей. Также это наблюдение может быть объяснено низким уровнем экспрессии данного слитного белка или нарушением функционала UDM2 в целом вследствие наличия HaloTag на *C*-конце.

RING-домен, обусловливающий сближение субстрата и E2-лигазы, предположительно, расположен в центральной части нуклеосомы. Он напрямую взаимодействует с основным субстратом убиквитин-лигазы RNF168 – гистоном H2A [30], поэтому в относительной близости от RING могут находиться K63-убиквитиновые цепи, расположенные на гистонах H1 или H2A, либо, предположительно, K48-цепи на деметилазах JMJD2A и JMJD2B, которые также являются субстратами RNF168 [31].

Характер убиквитинового окружения *N*-концевой части полноразмерной RNF168 схож с RING-доменом (преимущественно K63- и K48-содержащие полиубиквитиновые цепи), что соотносится с *N*-концевой позицией этого домена в структуре RNF168. *C*-Концевая часть, по-видимому, сильно удалена от убиквитиновых цепей, так как сигнал NanoBRET в этом случае отсутствует.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование метода NanoBRET позволило впервые изучить внутриклеточное убиквитиновое окружение убиквитин-лигазы E3 RNF168, одного из ключевых участников репарации двуцепочечных разрывов ДНК. Предполагается, что с гистоном H1, модифицированным K63-убиквитиновыми цепями, связывается *N*-концевая часть домена UDM1, в то время как его *C*-концевая часть находится диаметрально противоположно вблизи активированного остатка моноубиквитина, связанного тиоэфирной связью с убиквитин-лигазой E2, удерживаемой RNF168. RING-домен, как и *N*-концевая часть UDM2, находятся в центральной части нуклеосомы и, предположительно, стерически сближены с K48- и K63-убиквитиновыми цепями, находящимися на линкерном гистоне H1 и деметилазах JMJD2A/B. Полученные данные могут объяснить наличие большого количества протяжённых неструктурированных участков в RNF168, которые потенциально необходимы этой E3-лигазе для корректного позиционирования доменов UDM1/2 с возможностью многоточечного взаимодействия со множеством её хроматосомных партнёров и динамического переключения между ними.

Вклад авторов. А.А. Кудряева, А.А. Белогуров – концепция и руководство работой; А.А. Кудряева, Л.А. Якубова, Г.А. Саратов, В.И. Владимиров – проведение экспериментов; А.А. Кудряева, В.М. Липкин, А.А. Белогуров – обсуждение результатов исследования; А.А. Кудряева, А.А. Белогуров – написание текста; А.А. Кудряева, А.А. Белогуров – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-74-10154).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khanna, K. K., and Jackson, S. P. (2001) DNA double-strand breaks: Signaling, repair and the cancer connection, *Nat. Genet.*, **27**, 247-254, doi: 10.1038/85798.
2. Jackson, S. P., and Bartek, J. (2009) The DNA-damage response in human biology and disease, *Nature*, **461**, 1071-1078, doi: 10.1038/nature08467.
3. Ceccaldi, R., Rondinelli, B., and D'Andrea, A. D. (2016) Repair pathway choices and consequences at the double-strand break, *Trends Cell Biol.*, **26**, 52-64, doi: 10.1016/j.tcb.2015.07.009.
4. Price, B. D., and D'Andrea, A. D. (2013) Chromatin remodeling at DNA double-strand breaks, *Cell*, **152**, 1344-1354, doi: 10.1016/j.cell.2013.02.011.
5. Kim, J. J., Lee, S. Y., and Miller, K. M. (2019) Preserving genome integrity and function: the DNA damage response and histone modifications, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **54**, 208-241, doi: 10.1080/10409238.2019.1620676.
6. Bacheva, A. V., Gotmanova, N. N., Belogurov, A. A., and Kudriaeva, A. A. (2021) Control of genome through variative nature of histone-modifying ubiquitin ligases, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, S71-S95, doi: 10.1134/S0006297921140066.
7. Ciechanover, A. (2015) The unravelling of the ubiquitin system, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, **16**, 322-324, doi: 10.1038/nrm3982.
8. Kudriaeva, A. A., and Belogurov, A. A. (2019) Proteasome: a nanomachinery of creative destruction, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 159-192, doi: 10.1134/S0006297919140104.
9. Kudriaeva, A. A., Livneh, I., Baranov, M. S., Ziganshin, R. H., Tupikin, A. E., Zaitseva, S. O., Kabilov, M. R., Ciechanover, A., and Belogurov, A. A. Jr. (2021) In-depth characterization of ubiquitin turnover in mammalian cells by fluorescence tracking, *Cell. Chem. Biol.*, **28**, 1192-1205, doi: 10.1016/j.chembiol.2021.02.009.
10. Chen, Z. J., and Sun, L. J. (2009) Nonproteolytic functions of ubiquitin in cell signaling, *Mol. Cell*, **33**, 275-286, doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.014.
11. Jackson, S. P., and Durocher, D. (2013) Regulation of DNA damage responses by ubiquitin and SUMO, *Mol. Cell*, **49**, 795-807, doi: 10.1016/j.molcel.2013.01.017.
12. Iwai, K., and Tokunaga, F. (2009) Linear polyubiquitination: a new regulator of NF-κB activation, *EMBO Rep.*, **10**, 706-713, doi: 10.1038/embor.2009.144.
13. Matsumoto, M. L., Wickliffe, K. E., Dong, K. C., Yu, C., Bosanac, I., Bustos, D., Phu, L., Kirkpatrick, D. S., Hymowitz, S. G., Rape, M., Kelley, R. F., and Dixit, V. M. (2010) K11-linked polyubiquitination in cell cycle control revealed by a K11 linkage-specific antibody, *Mol. Cell*, **39**, 477-484, doi: 10.1016/j.molcel.2010.07.001.
14. Uckelmann, M., and Sixma, T. K. (2017) Histone ubiquitination in the DNA damage response, *DNA Repair (Amst)*, **56**, 92-101, doi: 10.1016/j.dnarep.2017.06.011.
15. Nishi, R. (2017) Balancing act: To be, or not to be ubiquitylated, *Mutat. Res.*, **803-805**, 43-50, doi: 10.1016/j.mrfmmm.2017.07.006.
16. Gudjonsson, T., Altmeyer, M., Savic, V., Toledo, L., Dinant, C., Grøfte, M., Bartkova, J., Poulsen, M., Oka, Y., Bekker-Jensen, S., Mailand, N., Neumann, B., Heriche, J. K., Shearer, R., Saunders, D., Bartek, J., Lukas, J., and Lukas, C. (2012) TRIP12 and UBR5 suppress spreading of chromatin ubiquitylation at damaged chromosomes, *Cell*, **150**, 697-709, doi: 10.1016/j.cell.2012.06.039.
17. Gatti, M., Pinato, S., Maiolica, A., Rocchio, F., Prato, M. G., Aebersold, R., and Penengo, L. (2015) RNF168 promotes noncanonical K27 ubiquitination to signal DNA damage, *Cell Rep.*, **10**, 226-238, doi: 10.1016/j.celrep.2014.12.021.
18. Kudriaeva, A. A., Lipkin, V. M., and Belogurov, A. A. (2020) Topological features of histone H2A monoubiquitination, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **493**, 193-197, doi: 10.1134/S1607672920040079.
19. Kelliher, J., Ghosal, G., and Leung, J. W. C. (2022) New answers to the old RIDDLE: RNF168 and the DNA damage response pathway, *FEBS J.*, **289**, 2467-2480, doi: 10.1111/febs.15857.
20. Pinato, S., Gatti, M., Scandiuzzi, C., Confalonieri, S., and Penengo, L. (2011) UMI, a novel RNF168 ubiquitin binding domain involved in the DNA damage signaling pathway, *Mol. Cell. Biol.*, **31**, 118-126, doi: 10.1128/mcb.00818-10.
21. Takahashi, T. S., Hirade, Y., Toma, A., Sato, Y., Yamagata, A., Goto-Ito, S., Tomito, A., Nakada, S., and Fukai, S. (2018) Structural insights into two distinct binding modules for Lys63-linked polyubiquitin chains in RNF168, *Nat. Commun.*, **9**, 170, doi: 10.1038/s41467-017-02345-y.
22. Kitevski-LeBlanc, J., Fradet-Turcotte, A., Kukic, P., Wilson, M. D., Portella, G., Yuwen, T., Panier, S., Duan, S., Canny, M. D., van Ingen, H., Arrowsmith, C. H., Rubinstein, J. L., Vendruscolo, M., Durocher, D., and Kay, L. E. (2017) The RNF168 paralog RNF169 defines a new class of ubiquitylated histone reader involved in the response to DNA damage, *Elife*, **6**, e23872, doi: 10.7554/eLife.23872.
23. Pinato, S., Scandiuzzi, C., Arnaudo, N., Citterio, E., Gaudino, G., and Penengo, L. (2009) RNF168, a new RING finger, MIU-containing protein that modifies chromatin by ubiquitination of histones H2A and H2AX, *BMC Mol. Biol.*, **10**, 55, doi: 10.1186/1471-2199-10-55.
24. Horn, V., Uckelmann, M., Zhang, H., Eerland, J., Aarsman, I., le Paige, U. B., Davidovich, C., Sixma, T. K.,

and van Ingen, H. (2019) Structural basis of specific H2A K13/K15 ubiquitination by RNF168, *Nat. Commun.*, **10**, 1751, doi: 10.1038/s41467-019-09756-z.
25. Machleidt, T., Woodroofe, C. C., Schwinn, M. K., Méndez, J., Robers, M. B., Zimmerman, K., Otto, P., Daniels, D. L., Kirkland, T. A., and Wood, K. V (2015) NanoBRET – a novel BRET platform for the analysis of protein-protein interactions, *ACS Chem. Biol.*, **10**, 1797-1804, doi: 10.1021/acschembio.5b00143.
26. Weihs, F., Wang, J., Pfleger, K. D. G., and Dacres, H. (2020) Experimental determination of the bioluminescence resonance energy transfer (BRET) Förster distances of NanoBRET and red-shifted BRET pairs, *Anal. Chim. Acta X.*, **6**, 100059, doi: 10.1016/j.acax.2020.100059.
27. Bednar, J., Garcia-Saez, I., Boopathi, R., Cutter, A. R., Papai, G., Reymer, A., Syed, S. H., Lone, I. N., Tonchev, O., Crucifix, C., Menoni, H., Papin, C., Skoufias, D. A., Kurumizaka, H., Lavery, R., Hamiche, A., Hayes, J. J., Schultz, P., Angelov, D., Petosa, C., and Dimitrov, S. (2017) Structure and dynamics of a 197 bp nucleosome in complex with linker histone H1, *Mol. Cell*, **66**, 384-397.e8, doi: 10.1016/j.molcel.2017.04.012.
28. Panier, S., Ichijima, Y., Fradet-Turcotte, A., Leung, C. C. Y., Kaustov, L., Arrowsmith, C. H., and Durocher, D. (2012) Tandem protein interaction modules organize the ubiquitin-dependent response to DNA double-strand breaks, *Mol. Cell*, **47**, 383-395, doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.045.
29. Thorslund, T., Ripplinger, A., Hoffmann, S., Wild, T., Uckelmann, M., Villumsen, B., Narita, T., Sixma, T. K., Choudhary, C., Bekker-Jensen, S., and Mailand, N. (2015) Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage, *Nature* **527**, 389-393, doi: 10.1038/nature15401.
30. Mattiroli, F., Uckelmann, M., Sahtoe, D. D., van Dijk, W. J., and Sixma, T. K. (2014) The nucleosome acidic patch plays a critical role in RNF168-dependent ubiquitination of histone H2A, *Nat. Commun.*, **5**, 3291, doi: 10.1038/ncomms4291.
31. Mallette, F. A., and Richard, S. (2012) K48-linked ubiquitination and protein degradation regulate 53BP1 recruitment at DNA damage sites, *Cell Res.*, **22**, 1221-1223, doi: 10.1038/cr.2012.58.

TOPOLOGY OF UBIQUITIN CHAINS IN THE E3 UBIQUITIN LIGASE RNF168 CHROMATOSOME ENTOURAGE

A. A. Kudriaeva*, L. A. Yakubova, G. A. Saratov, V. I. Vladimirov, V. M. Lipkin, and A. A. Belogurov, Jr.

Shemyakin & Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia; e-mail: anna.kudriaeva@gmail.com

Genome stability is critical for normal functioning of cells and depends on accuracy of DNA replication, chromosome segregation, and DNA repair. Cellular defense mechanisms against DNA damage are important for preventing the development of cancer and aging. The E3 ubiquitin ligase RNF168 of the RING superfamily is an essential component of the complex responsible for the ubiquitination of H2A/H2A.X histones near DNA double-strand breaks, which is a key step in attracting repair factors to the injury site. In this study, we unequivocally showed that RNF168 does not have ability to directly distinguish the architecture of polyubiquitin chains, except for tropism of its two ubiquitin-binding domains UDM1/2 to K63 ubiquitin chains. Analysis of the intracellular chromatosomal environment of full-length RNF168 and its domains by ligand-induced bioluminescence resonance energy transfer (BRET) revealed that the C-terminal part of UDM1 is associated with K63 ubiquitin chains; RING and the N-terminal part of UDM2 are sterically close to K63- and K48- ubiquitin chains, while the C-terminal part of UDM1 is colocalized with all possible ubiquitin variants. Our observations together with the available structural data suggest that the C-terminal part of UDM1 binds K63 polyubiquitin chains on linker histone H1; RING and the N-terminal part of UDM2 are located in the central part of the nucleosome and sterically close to H1 and K48-ubiquitinated alternative substrates of RNF168, such as JMJD2A/B demethylases, while the C-terminal part of UDM1 is in the region of an activated ubiquitin residue associated with E2 ubiquitin ligase, engaged by RNF168.

Keywords: ubiquitin, ubiquitin chains, ubiquitin ligase, histones, DNA repair, double-strand breaks, post-translational modifications, NanoBRET