Успехи биологической химии, т. 61, 2021, с. 155-202

КОНТРОЛЬ ГЕНОМА ЧЕРЕЗ ПРИЗМУ ВАРИАТИВНОСТИ ГИСТОН-МОДИФИЦИРУЮЩИХ УБИКВИТИН-ЛИГАЗ

©2021 г. А. В. БАЧЕВА¹*, Н. Н. ГОТМАНОВА¹*, А. А. БЕЛОГУРОВ^{1,2}, А. А. КУДРЯЕВА²

¹ Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Москва;

² Институт биоорганической химии РАН им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова, Москва

I. Введение. II. Регуляция клеточных процессов через убиквитинирование гистонов. III. Семейство RING E3 убиквитин-лигаз, задействованных в убиквитинировании гистонов. IV. Структурные особенности убиквитинирования гистонов. V. Аутоубиквитинирование RING E3-лигаз. VI. Неканонические убиквитиновые цепи в модификации гистонов. VII. RING E3-лигазные комплексы. VIII. Заключение.

І. ВВЕДЕНИЕ

Посттрансляционная модификация белков убиквитином – убиквитинирование – регулирует большое количество клеточных процессов, таких как деградация, сортировка, локализация белков, а также активация и репрессия их синтеза. Убиквитин представляет собой небольшой высококонсервативный белок, состоящий из 76 аминокислотных остатков. Среди них семь остатков лизина (К) в положениях 6, 11, 27, 29, 33, 48 и 63, а также N-концевая аминогруппа могут служить для присоединения последующих молекул убиквитина и образования полиубиквитиновых цепей различной длины и топо-

Принятые сокращения: ПТМ – посттрансляционная модификация, УПС – убиквитин-протеасомная система, Ub – убиквитин

Адрес для корреспонденции: anna.kudriaeva@gmail.com

Работа поддержана грантом РНФ №19-74-00139.

^{*}Авторы внесли одинаковый вклад в работу

А.В.Бачева	и	соавт.
------------	---	--------

логии [1]. Известно до 14 различных семейств убиквитина и убиквитин-подобных белков, различающихся по аминокислотной последовательности, но имеющих характерную пространственную укладку. Считается, что при помощи полиубиквитиновых цепочек, образованных через остатки К48 и/или К11, помечаются белки-мишени, подлежащие протеолитическому распаду под действием протеасомы. При этом моноубиквитинирование белков-мишеней также, как и образование убиквитиновых цепочек через другие остатки лизина, не является сигналом для деградации этих белков, а играет роль в регуляции других внутриклеточных процессов, таких как мембранный транспорт или передача сигнала. Однако есть данные о том, что и так называемое «неканоническое» убиквитинирование белка тоже может приводить к его деградации протеасомой [2, 3].

Помимо протеасомной деградации белков убиквитин участвует в модификации гистонов. Убиквитинирование гистонов является важнейшим эпигенетическим сигналом, задействованным главным образом в регуляции процессов транскрипции, репарации двуцепочечных разрывов ДНК и других. Интересно отметить, что впервые модификация белка убиквитином была показана Голдкнопфом и Бушем в 1977 году именно для гистона Н2А, еще до открытия убиквитин-протеасомного пути деградации [4]. Убиквитин ковалентно прикрепляется к белку-мишени с помощью последовательных действий сложной системы, состоящей из трех ферментов – Е1 (activating enzyme), E2 (conjugating enzyme) и убиквитин-лигазы E3. Фермент Е1 активирует убиквитин в процессе двустадийной АТФ-зависимой реакции, образуя высокоэнергетический Е1-убиквитин тиоэфирный комплекс, после чего активированный убиквитин переносится на убиквитин-конъюгирующий фермент Е2, и затем с помощью фермента ЕЗ-лигазы – на субстрат. Выделяют три семейства ЕЗ-лигаз: RING, HECT и RBR. Имеющие RING (Really Interesting New Gene) домен ЕЗ-лигазы, связывая Е2 и субстрат, сближают их на расстояние, достаточное для катализируемого ферментом Е2 переноса убиквитина на мишень. На убиквитин-лигазу с HECT (Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus) доменом Е2-лигаза переносит активированный убиквитин, при этом образуется высокоэнергетический ЕЗ-убиквитин переходный комплекс, и далее НЕСТ ЕЗ-лигаза самостоятельно катализируют перенос убиквитина на аминогруппу белка-мишени. Наконец, RBR-лигазы (RING-between RING-RING) функционально соответствуют промежуточному варианту НЕСТ- и RING-лигаз [5]. Ферменты ЕЗ имеют в своем составе особые связывающие области, которые обеспечивают взаимодействие с основными или объемными гидрофобными концевыми остатками аминокислот белкового суб-

страта, а также E2-связывающий домен. Из класса убиквитин-лигаз иногда выделяют E4-лигазы, осуществляющие исключительно удлинение убиквитиновых цепей.

Известно, что гистоны подвергаются убиквитинированию почти исключительно семейством RING E3-лигаз [6]. Функциональность лигаз этого семейства обеспечивается наличием консервативного цинк-связывающего домена – Cys–X2–Cys–X(9–39)–Cys–X(1–3)– His–X(2–3)–Cys–X2–Cys–X(4–48)–Cys–X2–Cys (где X – любая аминокислота). Несмотря на то, что RING E3-лигазы активно задействованы в важнейших клеточных процессах, структурные особенности данных ферментов, обеспечивающие их функциональность, а также механизмы их работы изучены недостаточно полно. В настоящем обзоре мы рассмотрим известные структурные особенности и механизмы работы RING E3-лигаз, задействованных в убиквитинировании гистонов.

II. РЕГУЛЯЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ ПРОЦЕССОВ ЧЕРЕЗ УБИКВИТИНИРОВАНИЕ ГИСТОНОВ

В эукариотических клетках хроматин построен из нуклеосом – комплексов ДНК и белка. Каждая нуклеосома состоит из 146 пар оснований ДНК, обернутых вокруг октамерного гистонового ядра, включающего две копии каждого гистона: H2A, H2B, H3 и H4. Нуклеосомы соединяются в цепочки с помощью линкерной ДНК и гистона H1 [7]. Хроматин представляет собой высокоорганизованную и динамическую структуру, которая регулирует доступность ДНК во время различных биологических событий, и обычно существует в двух формах: плотно упакованного гетерохроматина и слабо свернутого эухроматина. Высокоупорядоченная структура хроматина может регулироваться различными процессами, одним из которых являются посттрансляционные модификации (ПТМ) гистонов [8]. Концевые части гистонов выступают из гистонового ядра и открыты для ПТМ, причем модификации гистонов тесно коррелируют со многими биологическими процессами, включая клеточный ответ на повреждения ДНК (DDR, DNA damage response). В случае двуцепочечных разрывов ДНК модификации гистонов имеют решающее значение для генерации и регуляции клеточного ответа. Посредством ПТМ гистонов происходит разворачивание структуры хроматина, обеспечивающее доступ к ДНК для репарации; распространение сигнала о наличии разрыва, привлечение репарационных белков к месту повреждения, а также восстановление исходного состояния хроматина после устранения разрывов ДНК. Основными ПТМ

A.B.	Бачева	и	соавт.

субъединиц гистонов в ответ на двуцепочечные разрывы ДНК являются фосфорилирование, метилирование, ацетилирование, а также убиквитинирование.

Помимо репарации ДНК процесс убиквитинирования гистонов является частью различных клеточных механизмов, таких как регуляция транскрипции и поддержание стабильности генома. В отличие от других клеточных белков, убиквитинирование гистонов обычно не приводит к их деградации посредством 26S протеасомы. Известно, что ацетилированные гистоны подвергаются гидролизу протеасомой с альтернативным регулятором РА200 в соматических клетках [9].

Все четыре основных гистона H2A, H2B, H3 и H4, а также линкерный гистон H1, подвергаются убиквитинированию при повреждении ДНК и некоторых других клеточных процессах [10]. Основные сайты убиквитинирования гистонов, а также задействованные в процессе модификации Е3-лигазы указаны в Таблице и на рис. 1. Известно, что гистон H2A K119ub1 представляет собой наиболее распространенную фракцию из моноубиквитинированных гистонов.

В зависимости от того, какой именно гистон модифицируется, и по какому остатку лизина происходит модификация, активируются различные клеточные процессы. Известно, что гистон H2A K13/K15ub1 задействован в репарации ДНК путем NHEJ (негомологичного соединения концов), K119ub1 ассоциирован с репарацией ДНК, но при дифференцировке клеток содействует формированию компактного хроматина и репрессии транскрипции [14]; а модификация K127/129ub1 способствует резекции концов ДНК при репарации путем гомологичной рекомбинации (HR) [26], и вероятно необходима для репрессии сателлитных ДНК [25]. Н2В обычно моноубиквитинирован, в то время как H2A может быть как моно-, так и полиубиквитинирован. Моноубиквитинирование H2B (H2Bub1) является ключевой ПТМ, которая играет важную роль как в активации транскрипции, так и в подавлении роста опухолевых клеток [43, 44]. Модификации K34ub1 и K120ub1 гистона H2B, а также K31ub1 гистона H4 способствуют увеличению времени транскрипции и тем самым приводят к увеличению длины транскрипта [45, 46]. На данный момент до конца не определено, происходит ли убиквитинирование остатка К125 Н2В in vivo, поэтому функция этой модификации не ясна. Модификации K31ub1 гистона H4, а также K34ub1 и K120ub1 гистона H2A принимают участие в перекрестном взаимодействии гистонов и способствуют метилированию К4 и К79 гистона Н3. Модификация гистона H1 и его вариантов (H1.0, H1.1, H1.2 и H1.4) происходит по нескольким остаткам лизина и способствует репарации ДНК после повреждения УФ-излучением.

Гистон	Убиквити- нирован- ный оста- ток гистона	ЕЗ убиквитин-лигаза	Биологическая функция
	K13/K15	RNF8/168 [11, 12];	NHEJ-репарация ДНК
		PRC 1 (RING1B–BMI1) [13, 14]; RING1B/MEL18 [15];	HR-репарация ДНК, репрессия транскрипции генов при клеточной дифференцировке
		RING1A и RING1B [16];	Корректная репликация РСН-доменов
	K110/K120	CRLB4 ассоциирован с PRC2 [17];	Репрессия генов белков, участвую- щих в росте, пролиферации и миграции клеток (онкогенез)
H2AX	K119/K120	TRIM37 [18], а также MDM2, ассоциированные с PRC1 и PRC2 [19, 20];	Репрессия генов белков, подавляю- щих рост опухоли
		2A-HUB/hRUL138 [21];	Репрессия генов хемокинов в макро- фагах
		LASU1 (E3Histone, HUWE1) [22–24];	Деградация H2AX в протеасоме при нормальном развитии клетки
	K127/129	BRCA1/BARD1 [25, 26];	НR-репарация ДНК, способствует резекции концов ДНК
H2A.Z	K120/121	RING1B [27, 28];	Активация экспрессии некоторых генов, поддерживающих пластич- ность плюрипотентных эмбриональ- ных стволовых клеток, репрессия транскрипции генов PSA и KLK3
	K120	RNF20–RNF40 [29, 30];	Инициация и элонгация транскрип- ции, репликация и репарация ДНК, процессинг и экспорт РНК
H2B		MDM2 (Mouse Double Minute 2) [31];	Транскрипция, репликация и репара- ция ДНК
	К34	BRCA1-BARD1 [32]; BAF250B в комплексе с RBX1 [33];	Инициация и элонгация транскрип- ции
	K125	MSL2 [34]	Способствует метилированию Н3
	K79	CRL4DCAF8 [35];	Способствует метилированию Н3К9
НЗ	К14, К18, К23 и К27	UHRF1 [36–39];	Поддержание паттерна метилирова- ния дочерней цепи ДНК
		CUL4-DDB-ROC1 в комп- лексе с RBX1 [40];	Репарация ДНК
H4	K31	CUL4-DDB-ROC1 в комплексе с RBX1 [40];	Репарация ДНК
H1	Множество сайтов уби- квитиниро- вания	RNF8 [41, 42]; LASUI (E3Histone, HUWE1) [83];	Репарация ДНК после повреждения УФ-облучением

Таблица. Убиквитинирование гистонов с указанием сайтов модификации и физиологической значимости





Рис. 1. Основные представители семейства ЕЗ-лигаз, осуществляющие убиквитинирование гистонов.

Показаны как мультисубъединичные белковые комплексы (RBX1, UHRF1, PRC1), так и мономерные лигазы (MSL2, HUWE1) или каталитические RING-домены (RNF20 RING, MDM2 RING, RNF8/RNF168 RING, BRCA1/BARD1 RING, TRIM37 RING). Для каждой ЕЗ-лигазы указаны соответствующие остатки лизинов в гистонах, подвергающиеся убиквитинированию, а также биологическая роль вносимых ферментами модификаций.

III. СЕМЕЙСТВО RING ЕЗ УБИКВИТИН-ЛИГАЗ, ЗАДЕЙСТВОВАННЫХ В УБИКВИТИНИРОВАНИИ ГИСТОНОВ

RING-мотив впервые был описан в 1991 году [47], однако первое предположение, что белки, содержащие цинк-связывающий домен RING-типа, задействованы в убиквитинировании, было сделано только в 1997 году, когда был обнаружен RING-домен у Rad18 E3 убиквитин-лигазы [48]. Все члены семейства RING E3 убиквитин-лигаз содержат одноименный домен, который состоит из специфической последовательности остатков цистеина и гистидина. Эта последовательность, взаимодействуя с двумя ионами цинка, образует структурный мотив – цинковый палец [21, 22]. Общая схема данного структурного мотива представлена на рис 2.

В отличие от классических ДНК-связывающих цинковых пальцев, где остатки цистеина или гистидина располагаются последовательно, в структуре RING-доменов ЕЗ-лигаз полипептидная цепь делает петлю, так что сайты связывания цинка образуются перекрестными фрагментами цепи. Это приводит к образованию жесткой белковой глобулы, позволяя ЕЗ-лигазам одновременно взаимодействовать с комплексом E2-Ub и субстратом. Примечательной особенностью RING EЗ-лигаз является их тенденция к образованию гомо- и гетеродимеров. К гомодимерным RING EЗ убиквитин-лигазам относятся cIAP, RNF4,



Рис. 2. Структура RING-домена.

Вверху – консенсусная последовательность RING домена с цинксвязывающими аминокислотными остатками («Х» – любой остаток).

Внизу в центре – схематическое изображение структуры RING-домена с координированными ионами цинка.

Внизу слева и справа – разные фрагменты RING-домена RING-E3 убиквитин-лигазы RNF168 (Homo sapiens) (PDB: 4GB0), выделены остатки Cys16, Cys 19, Cys 31, His33, Cys 36, Cys 39, Cys 51, Cys 54.

А.В.Бачева и соавт.

BIRC7. IDOL. CHIP и Prp19. к гетеродимерным – BRCA-BARD1. Mdm2-MdmX (или HdmX/Hdm4 у человека) и RING1B-BMI1. Характерной особенностью гетеродимерных RING ЕЗ-лигаз является отсутствие активности одного из RING доменов (MDMX, BARD1, BMI1). В этом случае функция неактивного домена заключается в изменении конформации и/или стабилизации активного RING домена [49-51]. Некоторые комплексы, являющиеся представителями семейства RING E3 убиквитин-лигаз, могут состоять из нескольких белков, содержащих RING-домен. Например, в GID-убиквитин лигазный комплекс, состоящий из семи субъединиц, входят два белка, содержащих RING домен [52]. В состав мультисубъединичного убиквитинлигазного комплекса РЕХ, присутствующего у дрожжей, входят три белка, содержащие в своей последовательности RING домен [53, 54]. На настоящий момент конкретная функция каждого RING домена в таких комплексах неизвестна. Также существуют белки, содержащие в своей полипептидной последовательности несколько RING доменов. Например, белок Mindbomb имеет три RING домена в своей С-терминальной области. Эта крупная ЕЗ убиквитин-лигаза модифицирует Notch-лигандные белки Delta и Serrate, принимающие участие в клатрин-зависимом эндоцитозе [55].

Одним из способов клеточной регуляции убиквитинирования является димеризация RING домена E3 убиквитин-лигаз. Например, в белке cIAP1 (Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 1) место, где происходит димеризация, обычно маскировано до тех пор, пока cIAP1 не свяжется с белком SMAC (Second Mitochondria-derived Activator of Caspases) или DIABLO (Direct IAP Binding protein with low pI). Такое взаимодействие вызывает конформационные изменения белковой молекулы cIAP1 и дальнейшую димеризацию RING домена, что в свою очередь приводит к связыванию с убиквитин-конъюгирующим ферментом E2 и последующему переносу убиквитина на RIPK1 (Receptor-interacting serine/threonine-protein kinase 1) [56].

ГИСТОН Н2А

RNF168/RNF8

Одной из наиболее хорошо изученных убиквитиновых меток при репарации двуцепочечные разрывов ДНК (DDR) является убиквитинирование гистонов, осуществляемое ЕЗ убиквитин-лигазами 8 и 168 (RNF8/RNF168). Известно, что в ответ на повреждение ДНК происходит фосфорилирование гистона γH2A.X, что привлекает белокмедиатор MDC1 к хроматину [57–59]. Затем MDC1 подвергается фосфорилированию посредством ATM (ataxia telangiectasia mutated)

киназы [60, 61], что в свою очередь содействует привлечению комплекса ЕЗ убиквитин-лигазы RNF8 и убиквитин-конъюгирующего фермента E2 UBC13. Известно, что RNF8 контролирует количество белков Ku80 и CHK2 в области двуцепочечного разрыва, модифицируя их К48 цепями убиквитина, и обеспечивая их своевременную деградацию [62]. Мутации, ухудшающие функционирование RNF8, вызывают длительное удерживание Ku80 в области разрыва, что нарушает процесс репарации по пути NHEJ. Долгое время считалось, что первой убиквитин-лигазой, привлекаемой в место повреждения ДНК, является RNF8, a RNF168 рекрутируется к месту разрыва только при наличии RNF8-зависимого убиквитинирования гистонов H2A/H2AX [63], взаимодействуя с убиквитинированным Н2А/Н2А.Х, и накапливаясь в местах разрыва. Однако, методом мутагенеза остатков лизина H2A было показано, что лигаза RNF8 неактивна по отношению неубиквитинированному H2A, тогда как RNF168 совместно с UBC13 специфически катализирует моноубиквитинирование гистонов по остаткам K13/15, но не K118/119, в том числе in vivo [11, 12]. Также продемонстрировано, что RNF8 способна наращивать полиубиквитиновые цепи на гистоне H2A при участии UBC13/MMS2, если имеется предварительное моноубиквитинирование белка лигазой RNF168 [11]. Предполагается, что RNF8 первоначально убиквитинирует не гистон Н2А, а другие белки, в том числе линкерный гистон H1, в местах повреждения ДНК [39], и уже это событие привлекает RNF168. В результате совместного действия убиквитин-лигаз RNF8 и RNF168 происходит активная модификация гистонов, что инициирует клеточный ответ на повреждение ДНК, стимулирует процессы восстановления ДНК и улучшает выживаемость после стресса [11, 63, 64]. Было также показано, что моноубиквитинирование гистонов H2A/H2A.X по K13/15 способствует убиквитин-зависимому привлечению факторов репарации – медиаторных белков BRCA1 и 53BP1 в места повреждения хроматина. Белок BRCA1 способствует восстановлению повреждений путем HR, в то время как привлечение 53BP1 останавливает удаление 5'-конца ДНК непосредственно рядом с повреждением, тем самым ограничивая HR и направляя восстановление двуцепочечных разрывов по подверженной ошибкам NHEJ репарации [64, 65]. При изучении того, какие из доменов лигазы RNF168 необходимы для ее участия в репарации разрывов ДНК, показано, что N-концевого фрагмента RNF168 (остатки 1-221 из 571 (www.uniprot.org/uniprot/Q8IYW5), в состав которого входит RING домен, достаточно для ингибирования HR в BRCA1-дефицитных клетках, причем функционирование RNF168 не зависит от вида пов-

A.B.	Бачева	и	соавт.

реждения ДНК [66]. Интересно отметить, что N-концевой фрагмент RNF168 не способен распознавать места двуцепочечных разрывов в ДНК, что подтверждает более ранние данные о том, что за это отвечает С-концевой фрагмент [67], но эффективно стимулирует накопление 53BP1 и участвует в модификации H2A/H2A.X. Для осуществления этих функций критически важен остаток R57 в RNF168.

Частота повреждений ДНК увеличивается во время онкогенеза. Так, в условиях связанного с раком убиквитинового голодания, возникающего вследствие эндогенного или вызванного лечением протеотоксического стресса, убиквитин-зависимое накопление 53ВР1 и BRCA1 в участках повреждения ДНК ослабляется или пропадает совсем. Были идентифицированы несколько раковых клеточных линий, в которых поддерживается нормальное рекрутирование 53ВР1 (что в целом не типично для опухолевых клеток) к сайтам повреждений в ДНК, несмотря на протеотоксический стресс [68]. Такой фенотип раковых клеток, как выяснилось, обусловлен повышенной экспрессией RNF168. Патологическое усиление биосинтеза RNF168 в раковых клетках может представлять собой адаптационный механизм, придающий устойчивость к ионизирующему излучению и ингибированию протеасомы.

Polycomb repressor complex 1 (RING1A–RING1B–BMI1)

Белки группы polycomb – эпигенетические регуляторы, модифицирующие гистоны, ремоделирующие хроматин и подавляющие активность множества генов, отвечающих за дифференцировку клеток. Существует два типа комплексов группы polycomb – ингибиторный комплекс 2 (Polycomb Repressive Complex 2, PRC2) катализирует триметилирование гистона H3 (H3K27Me3) и ингибиторный комплекс 1 (Polycomb Repressive Complex 1, PRC1), распознавая эту модификацию, катализирует моноубиквитинирование гистона Н2А. PRC1 представляет собой семейство многокомпонентных комплексов, в состав ядра которого входят белки RING1 (RING1A или RING1B) и один из белков PCGF (1-6, например PCGF4/BMI1), которые взаимодействуют через свои N-концевые RING-домены и обладают убиквитин-лигазной активностью. Гетеродимер RING1/ PCGF формирует каркас для сборки комплекса PRC1, при этом оба белка взаимодействуют с дополнительными компонентами PRC1 через свои С-концевые RAWUL (Ring finger And WD40 Ubiquitin-Like) домены. RING1 RAWUL-домен взаимодействует с белком CBX (Chromobox 2, 4, 6-8), который содержит хромодомен, распознающий модификацию НЗК27Ме3 [69].

Белок 1 интеграции вируса мышиного лейкоза (BMI1), входящий в состав PRC1 и содержащий RING-домен, одним из первых [70] привлекается к месту повреждения ДНК, и за накопление BMI1 в областях разрыва ответственен его RING-домен. В местах повреждения BMI1 образует гетеродимер с белком RING1B (RING2) [71], также являющегося часть комплекса PRC1, и осуществляется модификация гистона H2A/H2A.Х по остатку К119. Это запускает каскад убиквитинирования, который приводит к привлечению, накоплению и удержанию 53BP1 и BRCA1 в местах повреждений ДНК, что способствует корректному ответу на двуцепочечные разрывы ДНК и эффективной репарации ДНК. В отсутствие BMI1 снижается уровень модификации H2A K119ub1 и нарушается рекрутирование 53BP1 и BRCA1 в участки повреждения ДНК, что ведет к нарушению репарации по пути HR, накоплению клеток в G₂/M точке цикла и преждевременному клеточному старению. При одновременном отсутствии лигаз BMI1 и RNF8 клетки более чувствительны к ионизирующей радиации, чем при отсутствии только одной из лигаз. Это указывает на то, что BMI1 и RNF8 играют важные роли в убиквитинировании гистона H2A/H2A.Х и вносят совместный, но независимый вклад в эффективный ответ на двуцепочечные разрывы ДНК.

Функции комплексов Polycomb выходят за рамки их активности в качестве регуляторов транскрипции и белков, запускающих репарацию ДНК, и включают участие в процессах удвоения генома. На клеточной линии с инактивированными E3-лигазами RING1A и RING1B наблюдали сильное замедление элонгации репликации, остановку репликативных вилок и накопление клеток в средней и поздней S-фазе, а также увеличение числа двуцепочечных разрывов в PCH-доменах (pericentromeric heterocromatic domain) [16]. Показано, что инактивация RING1A и RING1B приводит к быстрому p21-зависимому аресту клеточного цикла, причем репликацию удается восстановить моноубиквитинированием гистонов H2A по K119 в PCH. Таким образом, функционирование RING1A и RING1B необходимо для корректной репликации PCH-доменов.

Некоторые данные показывают, что в целом репрессия генов и компактизация хроматина с участием комплекса PRC1 может не зависеть от наличия у RING1B каталитической активности (например, для *Drosophila* [72]). Исследование мышей с экспрессией каталитически неактивной RING1B, а также мышиных эмбриональных стволовых клеток (mESCs) (RING1B^{-/-}) показало, что нарушение регуляции экспрессии генов в mESCs (RING1B^{-/-}) является гораздо более выраженным, чем в случае аналогичной клеточной линии с каталитически неактивной RING1B^{IS3A/IS3A} [73]. В mESCs с генотипом

А.В.Бачева і	u	соавт.
--------------	---	--------

RING1В^{153A/153A} наблюдали некоторое снижение уровня модификации H3K27Me3, сопоставимое с mESCs (RING1B^{-/-}), что обусловлено слабым накоплением RING1B в сайтах начала транскрипции. Эти данные подтверждают модель положительной обратной связи в привлечении RING1B, частично опосредованную модификацией H2AK119ub1, а именно то, что убиквитин-лигазная активность RING1B является несущественной для раннего развития мышей – важно лишь наличие белка RING1B и его структурные особенности.

Белки группы polycomb участвуют и в других процессах. Известно, что инактивация одной Х-хромосомы у самок происходит во время ранних стадий развития, в результате чего неактивная хромосома покрывается некодирующим транскриптом гена Xist (X-inactivespecific transcript) и на нее привлекаются комплексы PRC1 и PRC2. Показано, что ЕЗ-лигазный комплекс, состоящий из белков SPOP и Cullin3, убиквитинирует BMI1 и macroH2A1 (вариант гистона H2A, который присутствует в части нуклеосом и подавляет транскрипцию), таким образом поддерживая депонирование macroH2A1 и стабильную инактивацию X-хромосомы [74]. Нокдаун генов SPOP и Cullin3 приводит к потере депонирования macroH2A1 в инактивированной хромосоме, доказывая участие не только PRC1, но и SPOP/Cullin3 в поддержании инактивации X-хромосомы в соматических клетках.

BRCA–BARD1

ЕЗ-лигазный гетерокомплекс BRCA1/BARD1, принимающий участие в ответе на повреждения ДНК и в репрессии районов сателлитных повторов ДНК, убиквитинирует гистон H2A по остаткам K127/129 как *in vitro*, так и *in vivo* [25]. Интересно отметить, что для модификации H2A необходимо и достаточно наличие RING-доменов BRCA1/BARD1.

Комплекс BRCA–BARD1, помимо H2A, также убиквитинирует macroH2A1 *in vitro* и *in vivo* [75]. Установлено, что модификация K123ub1 гистона macroH2A1 играет важную роль в репрессии транскрипции, поскольку экспрессия в первичных фибробластах человека мутантного macroH2A1, не способного убиквитинироваться, приводила к дефектам клеточного старения.

В нормальных неповрежденных клетках поддерживается постоянная довольно низкая концентрация гистона H2A.X. Была обнаружена E3 убиквитин-лигаза HUWE1 (LASU1), относящаяся к HECT-лигазам [22–24], полиубиквитинирующая гистон H2A.X и направляющая этот гистон на деградацию в протеасому. В случае появления двуцепочечных разрывов ДНК этот гистон фосфорилируется по S139, что приводит к его включению в хроматин и, как следствие, его стабилизации.

ГИСТОН Н2В

Убиквитин-лигазный комплекс RNF20/RNF40 состоит из двух гомологичных белков, RNF20 и RNF40, каждый из которых содержит С-концевой RING- домен. Эти два белка образуют гетеродимер, который является ключевой ЕЗ-лигазой, ответственной за модификацию гистона H2B K120ub1 в клетках млекопитающих. Данная модификация вовлечена в широкий спектр клеточных процессов, таких как перекрестные взаимодействия между гистонами, инициация и элонгация транскрипции, репликация и репарация ДНК, процессинг и экспорт РНК, а также необходима для дифференцировки стволовых клеток. Отсутствие модификации H2B K120ub1 наблюдается во многих, особенно агрессивных, видах рака [76]. Утрата моноубиквитинирования Н2В происходит в 77% случаев рака яичников и является достаточно ранним эпигенетическим нарушением. При исследовании того, каким образом ЕЗ-лигазы RNF20 и RNF40 влияют на уровень H2B K120ub1 на клеточной модели рака яичников, было выяснено, что снижение экспрессии этих лигаз in vitro меняло уровень модификации гистона. Однако на опухолевых тканях корреляция изменения уровня экспрессии ни одной из исследованных лигаз с уровнем H2B K120ub1 показана не была. Тем не менее известно, что отсутствие комплекса RNF20/RNF40 связано не только с различными типами опухолей, но и с хроническим воспалением. Причиной этого является усиление NF-кВ-сигнализации и снижение активности Т-клеток. Подавление экспрессии RNF20 и, как следствие, уровня моноубиквитинирования гистона Н2В приводит к рекрутированию р65-содержащих гомо- и гетеродимеров NF-кВ и репрессирует связывание гомодимеров р50 [77]. Это снижает уровень модификации H3K9Me3 в генах-мишенях NF-кВ, в основном в генах цитокинов, усиливая их транскрипцию. Гетерозиготные (RNF20^{+/-}) мыши также склонны к хроническому воспалению кишечника и колоректальному раку с повышенной активностью миелоидных супрессоров, способных подавлять противоопухолевую активность Т-клеток. Угнетение RNF20 приводит к аномально высокой экспрессии ряда провоспалительных генов, усиливаемой TNF-α (в мышиных колоноцитах, тонком кишечнике и лейкоцитах). У пациентов с колоректальным раком наблюдаются пониженные уровни мРНК RNF40/RNF20, что подтверждает клиническую значимость уровня экспрессии этой убиквитин-лигазы [71].

Одним из белков, регулирующих транскрипцию, является онкобелок Mdm2, E3 убиквитин-лигаза, участвующая в деградации p53. Mdm2 также способен моноубиквитинировать гистоны H2A и H2B (в

А.В.Бачева и соавт.

том числе *in vivo*), причем основным субстратом является H2B [31]. Mdm2 взаимодействует с хроматином в районе промоторов генов, активирующихся под действием p53 – в частности, с промотором p53-зависимого белка p21. Сверхэкспрессия Mdm2 приводит к усилению убиквитинирования гистона H2B вблизи этого p53-связывающего сайта и к подавлению транскрипции p21. Остатки лизина, которые подвергаются модификации, находятся в С-концевой области гистонов, и, вероятно, ими могут быть K120 и/или K125 [31].

Модификация гистонов важна также на стадии элонгации транскрипции. У млекопитающих доступ факторов транскрипции и других участников этого процесса к ДНК обеспечивается хроматин-ремоделирующими комплексами, например, SWI/SNF. Одним из аналогов SWI/SNF у человека является комплекс BAF (BRG1- or BRM-associated factors) или SWI/SNF-A, состоящий из по крайней мере 15 субъединиц, в том числе нескольких АТФаз, каркасных белков и белков, содержащих ДНК- и гистон-связывающие домены. При исследовании одной из субъединиц комплекса SWI/SNF-А человека, BAF250/ARID1, которая имеет две изоформы (BAF250a/ARID1a и BAF250b/ARID1b) [33], было показано, что изоформа BAF250b содержит BC-box мотив, имеющий консенсусную последовательность XLXXX(C,S) XXX(A,I,L,V). Этот мотив обеспечивает ассоциацию с элонгином С (Elo C), и, совместно с куллином 2 (Cul2) и Roc1 (в структуре которого есть RING-домен), BAF250b формирует ЕЗ-лигазный комплекс, вносящий модификацию H2B K120ub1 в нуклеосоме [78]. Мутации в BC-box мотиве BAF250b приводят к быстрой протеасомной деградации белка из-за аутоубиквитинирования. Мутации ортолога BAF250 у дрозофилы (D. Osa), равно как и подавление экспрессии BAF250 в культуре человеческих клеток, приводят к глобальному снижению убиквитинирования H2B и снижению уровня модификации H3K4Me3. Обнаруженная убиквитин-лигазная активность комплекса SWI/SNF-A доказывает, что не только обнаруженная ранее ЕЗ-убиквитин-лигаза RNF20/40 участвует в убиквитинировании гистона H2B, которое приводит к активации генов.

Белок MSL2, входящий в состав другого модифицирующего хроматин комплекса MOF-MSL, также является RING E3-лигазой [34]. Показано, что MSL2 совместно с MSL1 убиквитинирует гистон H2B по остатку K34, который находится в консервативной основной части «хвоста» гистона, причем другие белки (MOF и MSL3), также входящие в состав комплекса, не участвуют в этом процессе. Модификация H2B K34ub1 способствует дальнейшему метилированию гистона H3 по остаткам K4 и K79 (*in vitro* и *in vivo*). MSL1/MSL2 осуществляет убиквитинирование H2B K120ub1, уско-

ряя ассоциацию лигазы RNF20/RNF40 с хроматином. Активность MSL1/MSL2 важна для активации транскрипции генов HOXA9 и MEIS1 и эволюционно консервативна (аналогичный комплекс есть и у лягушки, и у дрозофилы). Кроме того, MOF-MSL комплекс демонстрирует 2 различных типа активности: ацетилирование H4 по K16 и убиквитинирование H2B K34ub1 посредством MOF и MSL2 субъединиц соответственно.

Убиквитин-лигазы, относящиеся к Cullin-RING ЕЗ-лигазам (CRL), представляют собой мультисубъединичные ферменты, которые используют белок куллин в качестве центрального каркаса для связывания фермента Е2 с субстратом. С-концевая часть куллина необходима для рекрутирования белка RING-Box (Rbx1 или Rbx2), который взаимодействует с Е2. N-концевая часть куллина связывается с другим адаптерным белком, содержащим домен, который взаимодействует с рядом вариабельных субстрат-связывающих субъединиц. специфичных для данного класса куллинов. Недавно был идентифицирован новый ЕЗ-убиквитин-лигазный комплекс CRL7^{SMU1}, относящийся к CRL [79]. В состав этого комплекса входят белки SMU1, DDB1, CUL7 и RNF40, причем белок SMU1 ассоциирует с остальными компонентами посредством LisH-домена. Субъединица SMU1 отвечает за узнавание субстрата и, связываясь с гистоном H2B, способствует модификации K120ub1 убиквитин-лигазой RNF40, входящей в состав комплекса CRL7^{SMU1}. Подавление экспрессии каждого из компонентов комплекса CRL7^{SMU} ведет к отсутствию модификации H2B K120ub1 в локусе основного компонента когезина SMC1a и, как следствие, к пониженной экспрессии самого SMC1a в клетках и к дефектам когезии сестринских хроматид в митозе [79].

ГИСТОН НЗ

Гистон H3, обладающий протяженным слабо структурированным N-концом, подвергается наиболее интенсивным ПТМ среди пяти основных гистонов. Убиквитинирование H3 осуществляется с помощью E3 убиквитин-лигаз разных типов (содержащих как RING, так и HECT домен). Так, известно, что белок Np95 мыши (у человека известен как ICPB90) необходим для регуляции клеточного цикла (в частности, для перехода клеток в S-фазу), однако длительность его экспрессии на протяжении фаз S/G2/M, вероятно, предполагает наличие у Np95 и других, ранее неизвестных функций. Было показано, что Np95 прочно связывается с гистоновым ядром *in vitro* и с хроматином линии эмбриональных фибробластов мыши NIH/3T3 [80]. За оба типа взаимодействия ответственен новый, ранее не известный SRA–YDG домен белка. При этом, высокая селективность

А.В.Бачева	и	соавт.
------------	---	--------

связывания Np95 обеспечивается за счет взаимодействия белка с N-концевой областью гистона H3. Установлено, что Np95 является RING E3-лигазой и специфично убиквитинирует гистон H3, хотя точные сайты модификации не указаны. По всей вероятности, убиквитин-лигазная активность может выполнять важную роль в функционировании Np95 как регулятора клеточного цикла.

Немаловажно, что убиквитинирование гистонов задействовано также в процессе V(D)J рекомбинации – перегруппировке фрагментов ДНК, необходимой для поддержания разнообразия рецепторов антигенов и формирования популяций В- и Т-лимфоцитов. Как in vitro, так и на модели мышиных лимфоцитов 103/Bcl-2/4 Pre-B продемонстрирована способность V(D)J-рекомбиназы RAG1, содержащей RING-домен, убиквитинировать широко распространенный в локусах рекомбинации вариант гистона Н3.3, ацетилированный и фосфорилированный по остатку S31 [81, 82]. Более того, инактивирующие мутации в RING-домене RAG1 нарушают процесс V(D)J рекомбинации, препятствуя лигированию концов ДНК. По данным масс-спектрометрического анализа, НЗ.3 подвергается преимущественно моноубиквитинированию рекомбиназой RAG1 – ди-, три- и полиубиквитиновые производные гистона представлены в незначительных количествах. Выявлено несколько вероятных сайтов моноубиквитинирования гистона НЗ.3 (К9, К18, К23, К79, К122), однако точные мишени модификации установить не удалось в силу наличия RAG1-независимого убиквитинирования. Помимо RINGдомена, для проявления E3-убиквитинлигазной активности RAG1 важны дополнительные N-концевые участки фермента (в составе первых 217 а. о.), предположительно обеспечивающие взаимодействие с H3.3. В свою очередь, для корректной модификации гистона необходимо посттрансляционное ацетилирование его нескольких N-концевых остатков лизина (К9, К18, К23).

Недавно было обнаружено, что ЕЗ убиквитин-лигазы также участвуют в поддержании корректного паттерна метилирования ДНК после репликации. Было показано, что белок UHRF1 является RING ЕЗ убиквитин-лигазой гистона НЗ, которая, взаимодействуя с Е2 убиквитин-конъюгирующим ферментом UbcH5a/UBE2D1, моноубиквитинирует НЗ по остаткам К14, К18, К23 и К27 [36–39]. Этот процесс происходит во время митоза, после удвоения ДНК. UHRF1 с помощью своего домена SRA распознает дочернюю цепь ДНК, в которой отсутствует C5-метилирование цитозинов, после чего связывается с гистоном H3K9Me2/3 с помощью домена Тюдор, и присоединяет убиквитин к остаткам лизина в N-концевой части гистона H3 (рис. 3). Такое убиквитинирование служит сигналом для



Рис. 3. Лигаза UHRF1 в комплексе с гистоном H3.

Слева – доменная структура лигазы UHRF1, взаимодействующей с N-концевой частью гистона H3. Зеленым цветом выделен PHD-домен, оранжевым – домен Тюдор, розовым – фрагмент гистона H3. Обозначен остаток H3K9Me3.

Справа – аминокислотные остатки в составе PHD-домена UHRF1, расположенные вблизи H3K9Me3.

привлечения ДНК-метилтрансферазы DNMT1, которая далее метилирует цитозины дочерней ДНК, что приводит к множеству разных событий, в том числе изменению доступности промоторов, супрессии онкогенов и т. д.

Белки гистонов кодируются множеством генов, поэтому существует вероятность наработки в клетке большего количества гистонов, чем необходимо для сборки хроматина. Была найдена RING ЕЗ убиквитин-лигаза Psh1, которая специфично модифицирует аналог гистона H3 в дрожжах – центромерный гистон Cse4 и направляет его на деградацию [77]. С помощью метода мутагенеза показано, что могут убиквитинироваться пять остатков лизина в H3: K4, K131, K155, K163 и К172, причем наиболее часто модифицируется К163. Также, по данным масс-спектрометрии, Psh1 способна аутоубиквитинироваться (примерно на 33%) по остатку К133. Активность фермента Psh1 в равной степени обеспечивается его RING-доменом и доменом «цинковый палец», однако для взаимодействия Psh1 с Cse4 критически необходим только RING-домен. Показано, что гистоновый шаперон Scm3 защищает Cse4 от убиквитинирования Psh1. При подавлении экспрессии Psh1 нарушается нормальная локализация Cse4, вследствие своей сверхэкспрессии он накапливается у рибосомальных ДНКповторов и эухроматиновых областей, и становится токсичным для

А.В.Бачева и	і соавт.
--------------	----------

клетки. Таким образом, ЕЗ убиквитин-лигаза Psh1 необходима для предотвращения неверной локализации гистона Cse4. В пекарских дрожжах *S. cerevisiae* обнаружили 4 новые RING ЕЗ лигазы, Pep5, Snt2, Hell и Hel2, которые вовлечены в убиквитинирование и последующую деградацию гистонов при их избыточной экспрессии [78]. Делеции этих лигаз делают дрожжевые клетки чувствительными к сверхэкспресии гистонов, в клетках происходит накопление гистонов на гистоновых шаперонах (Asf1). Все перечисленные лигазы используют один и тот же E2-фермент Ubc4. Для утилизации гистонов необходимы RING-домены Snt2, Hell и Hel2. Также показано, что мутации в Hel1, Hel2 и Pep5 придают клеткам чувствительность к ингибиторам репликации.

Убиквитин-лигазы с НЕСТ доменом также способны модифицировать гистон H3 [83]. Показано, что E3 убиквитин-лигаза NEDD4, ранее считавшаяся исключительно цитозольной, в присутствии глюкозы моноубиквитинирует гистон НЗ по остаткам К23/36/37, в результате чего специфически рекрутируется гистонацетилтрансфераза Gcn5, которая ацетилирует H3 по остаткам K9, K14 и K27. Было выявлено, что NEDD4 представлена как в цитоплазме, так и в ядре в нормальных условиях, причем обработка глюкозой клеток, лишенных глюкозы, повышала уровень клеточного кальция, что влекло за собой фосфорилирование тирозина NEDD4 и активацию этой Е3-лигазы. Полногеномный анализ иммунопреципитированного хроматина с последующим секвенированием показал, что ацетилирование НЗ по К9 происходит в точках старта транскрипции и в областях энхансеров IL1α, IL1β и GCLM (регуляторная субъединица глутамат-цистеинлигазы, катализирующей биосинтез глутатиона), что приводит к формированию и поддержанию популяции раковых клеток.

ГИСТОН Н4

Убиквитинирование H4 является модификацией, вовлеченной в разные клеточные процессы, в том числе в терминацию транскрипции, и осуществляется у дрожжей и человека по остаткам K31 или K91 [84]. Кроме того, показано, что H2A/H2A.X – не единственный гистон, который может быть убиквитинирован в ответ на двуцепочечные разрывы ДНК. Гистон H4 тоже избирательно моноубиквитинируется белком BBAP (белок, ассоциированный с В-лимфомой и белком BAL) по лизину 91 (H4 K91ub1), что способствует адекватному клеточному ответу на повреждения ДНК [85]. Также выявлена способность E3-убиквитин-лигазного комплекса CUL4-DDB-ROC1 (рис. 4) модифицировать гистоны H3 и H4 *in vitro* и в клетках HeLa [40]. В случае реконструированной нуклеосомы наблюдается неселективное поли-



173

Рис. 4. Структурная модель ЕЗ-убиквитин-лигазного комплекса CUL4–DDB– ROC1.

Белок CUL4A (выделен светло-коричневым цветом) своим N-концом связывается с адаптерным белком DDB1 (темно-коричневый), который, в свою очередь, привлекает субстраты для убиквитинирования. С-конец белка CUL4A взаимодействует с RING-доменом белка ROC1 (отмечен красным цветом), рекрутирующим и активирующим фермент E2.

Врезка – сборка каталитического ядра убиквитин-лигазы за счет погружения N-концевой β-цепи ROC1 в С-концевой глобулярный α/β-домен Cul1, с образованием межмолекулярного β-листа.

А.В.Бачева	и	соавт.
------------	---	--------

убиквитинирование всех четырех типов гистонов, в то время как в эукариотической системе HeLa работа комплекса CUL4-DDB-ROC1 приводит к появлению моноубиквитинированных производных (при этом, Н2А и Н2В модифицированы более интенсивно, чем Н3 и H4). Нокдаун куллинов CUL4A и CUL4B, а также адаптерного белка DDB1 в клетках HeLa приводит к заметному снижению содержания убиквитинированных форм Н3, что указывает на необходимость наличия данных компонентов в составе лигазного комплекса для его полноценного функционирования. При длительном воздействии УФ-излучения на клетки HeLa относительное содержание моноубиквитинированных форм НЗ и Н4 заметно возрастает. Этот результат указывает на возможное участие комплекса CUL4–DDB–ROC1 в клеточном ответе на повреждения ДНК, поскольку моноубиквитинирование гистонов ослабляет их взаимодействие с ДНК и облегчает привлечение компонентов системы репарации к месту повреждения.

Доказано, что вариант гистона Н1.2 специфично взаимодействует с Cul4A E3 убиквитин-лигазой (компонентом комплекса CUL4A–DDB1–ROC1) а также с комплексами элонгации транскрипции PAF1 [86]. Это взаимодействие приводит к активации транскрипции посредством индуцирования модификаций гистонов НЗ и Н4 (убиквитинирование H4 K31ub1 лигазой Cul4A, необходимое для последующего метилирования H3K4Me3 и H3K79Me2). Предполагается, что в случае убиквитинирования гистона Н4, вероятно, происходит своеобразное «нацеливание» Cul4A E3-лигазы на сайт модификации КЗ1 (либо ее дополнительная активация) путем взаимодействия фермента с H1.2. Для полной активации Cul4А-лигазы также необходимы адаптерный белок WDR5 и комплекс PAF1. Обнаружено несколько новых сайтов убиквитинирования в составе Н4 (а именно, К5, К8, K12, K16, K20), при этом инактивирующие мутации K20R либо K31R приводили к полной потере Cul4A-опосредованного убиквитинирования Н4.

ГИСТОН Н1

Ранние исследования убиквитинирования линкерного гистона H1 на модели дрозофилы [87–89] позволили установить, что ключевую роль в модификации выполняет самая большая субъединица TAF_{II}250 белкового комплекса TBP-TAF_{II}, хотя сайты убиквитинирования определены не были. По результатам экспериментов *in vitro* было показано, что TAF_{II}250 обладает двумя типами активности – E1-убиквитин-активирующей и E2-убиквитин-конъюгирующей, при этом активные центры фермента расположены в С-концевой области белка.



Рис. 5. Ленточная модель структуры С-концевого каталитического HECT домена ЕЗ-лигазы HUWE1 в разных проекциях.

Было установлено, что ЕЗ убиквитин-лигаза RNF8 в тандеме с Е2 UBC13 обеспечивают специфичное K63-полиубиквитинирование H1 гистонов в местах двуцепочечных разрывов в ДНК [42]. Модификация является ключевым событием в DDR, и далее распознается лигазой RNF168, которая взаимодействует с убиквитиновыми цепями посредством домена UDM1, убиквитинирует H2A по K13/15 и, возможно, другие белки, что служит ранним сигналом для запуска системы репарации ДНК и амплификации ответа на повреждения. Механизмы убиквитинирования гистона H1 в ответ на УФ-индуцированные повреждения ДНК исследованы довольно подробно [90]. В частности, ключевую роль в модификации H1 убиквитином играет HECT E3-лигаза HUWE1 (рис. 5). В случае повреждения ДНК на первом этапе данный фермент вносит в H1 моноубиквитиновые метки, которые служат «затравками» для дальнейшего формирования полиубиквитиновых цепей другой E3-лигазой, RNF8.

Убиквитинирование гистона H1, по-видимому, является одной из первых ПТМ, возникающих при клеточном ответе на УФ-повреждения ДНК. С помощью масс-спектрометрического анализа были определены остатки лизина, подвергающиеся модификации у нескольких белков семейства гистонов H1. Это остатки К82 для H1.0; К64, К75, К120 и К129 для H1.1; К17, К21, К34, К46, К64, К75, К97 и К106 для H1.2; К17, К21, К34, К46, К64, К75, К97 и К106 для H1.4; К34, К46, К64, К75, К97 и К106 для H1.3; К97 и К106 для H1.5. Анализ данных выявил, что в среднем в каждом гистоне одновременно модифицировано по 2–3 остатка лизина. Показано также, что нокдаун лигазы HUWE1 в клетках остеосаркомы U2OS вызывает сбои рекрутирования RNF168 и 53BP1 (но не RNF8) к местам двуцепочечных разрывов в ДНК.

А.В.Бачева	и	соавт.
------------	---	--------

Таким образом, большинство известных на данный момент убиквитин-лигаз, модифицирующих гистоны, содержат RING домен. В то же время встречаются и единичные упоминания HECT-E3-лигаз [90]. Поскольку убиквитинирование играет важную роль в обеспечении клеточного ответа на стресс, вызванный повреждением ДНК, а также во многих других процессах, необходимо точно настроить каскады убиквитинирования гистонов. Действительно, исследования показали, что убиквитинирование гистонов регулируется несколькими механизмами. Доступность гистонов для Е3 убиквитин-лигаз может быть ограничена образованием структуры хроматина более высокого порядка [91]. Кроме того, убиквитинированые продукты в местах повреждения могут быть деубиквитинированы с помощью соответствующих ферментов [92].

IV. СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ УБИКВИТИНИРОВАНИЯ ГИСТОНОВ

Во многих случаях ЕЗ-лигазы собираются в мультимерные комплексы для усиления специфичности и расширения пула субстратов убиквитинирования [93, 94]. Известно несколько доменов, таких как F-Box, SOCS-box, β-домены, повторы WD40, ankyrin, Kelch, WW и RLD, и некоторые другие, которые способствуют взаимодействию белков и сборке многокомпонентных ЕЗ убиквитин-лигаз [95]. Димерные RING ЕЗ-лигазы могут быть разделены на два структурных класса [96] – димеры типа I, обычно это гетеродимеры, с длинными альфаспиральными хвостами, взаимодействующими при димеризации (например, BRCA1–BARD1, PRC1, лигаза RING1A/B-BMI1/MEL-18 и Rad18) и димеры типа II, чаще гомодимеры, с переплетающимися С-концевыми фрагментами (такие как cIAP, RNF4, BIRC7, IDOL, Mdm2-MdmX). Одно из первых свидетельств того, что ЕЗ убиквитинлигазы, содержащие RING домен, нередко функционируют в виде димера, опубликовано в работе [97]. Показано in vitro, что N-концевой домен белка BARD1 (остатки 8-142), чей RING-домен лишен убиквитин-лигазной активности, значительно усиливает как моноубиквитинирующую (в отношении H2A), так и аутоубиквитинирующую активность стабильного N-концевого RING домена E3-лигазы BRCA1 (110 аминокислотных остатков). Результаты исследований мутантных форм показывают, что усиление активности BRCA1 E3-лигазы с помощью BARD1 зависит от прямого контакта белков. С использованием мутантов Ub K48A и K63A, было обнаружено, что BARD1 стимулирует образование как К48, так и К63 уби-



Рис. 6. Взаимодействие доменов гетеродимерных ЕЗ лигаз.

а) Структура комплекса ВМІ1–RING1В. Белок ВМІ1 показан оранжевым цветом, RING1В – голубым, ионы Zn – светло-голубым.

б) Структура комплекса RING-доменов BRCA1 и BARD1. BRCA1 показан синим цветом, BARD1 – желтым.

в) Суперпозиция структур комплексов BMI1-RING1B и BRCA1-BARD1.

квитиновых цепей. Также обнаружено, что коэкспрессия BRCA1 и BARD1 в клетках увеличивает количество и стабильность обоих белков.

ЕЗ-лигазная активность PRC1-комплексов, а именно убиквитинирование гистона H2A K119ub1, обеспечивается субъединицей RING1 A/B в комплексе с одним из шести PCGF белков, наиболее изученным из которых является BMI1 (PCGF4), и E2-лигазой UbcH5c. Кристаллическая структура полноразмерного BMI1-RING1В была изучена в 2006 году [98]. Показано, что RING1В взаимодействует с BMI1 двумя фрагментами белковой структуры – RING доменом и протяженным слабо структурированным N-концевым участком. При сравнении полученной структуры с ранее опубликованной структурой комплекса RING-доменов BRCA1 и BARD1 [50], было обнаружено, что RING домены в комплексе BMI1-RING1B расположены похожим на комплекс BRCA1-BARD1 образом, хотя детальные конформации и остатки, опосредующие межмолекулярные взаимодействия, различаются. Наиболее существенные различия в этих двух структурах обнаруживаются между N-концевыми областями RING1В и BRCA1 и С-концевыми областями BMI1 и BARD, которые участвуют в межмолекулярных взаимодействиях. Основное отличие заключается в отсутствии у BRCA1 протяженного N-конца, что приводит к изменению расположения С-концевой α-спирали BARD1 (рис. 6, а, б, в).

Белок RING1В тесно взаимодействует с ВМІ1 (остатки 1–102) своим RING-доменом (остатки 30–115), и обхватывает его своим

А.В.Бачева и соавт.



Рис. 7. Модель комплекса лигазы ВМІ1-RING1В с нуклеосомой и опосредованная ВМІ1–RING1В стабилизация Е2-фермента UbcH5с при контакте с гистоном H2A. ВМІ1 выделен оранжевым цветом, RING1В – синим, UbcH5с – зеленым, ядро нуклеосомы – розовым, фрагмент ДНК в составе нуклеосомы – коричневым.

протяженным N-концом (остатки 5–30), причем общая площадь контактов довольно обширна (рис. 7). Комплекс связывается с нуклеосомой со стороны белка BMI1, а с ферментом E2 – RING-доменом белка RING1B, и, таким образом, BMI1–RING1B стабилизирует взаимодействие E2-фермента с нуклеосомой для эффективного переноса убиквитина. Перечисленные контакты синергически стимулируют активность E3-лигазного комплекса.

Белки комплекса PRC1 с помощью своих RING доменов также могут взаимодействовать с белками Cbx, которые участвуют в связывании PHK и нуклеосомы. Разрешена структура C-концевой области RING1B [99], и показано наличие убиквитин-подобной укладки в структуре RAWUL-домена и консервативной области на внешней поверхности этого домена (α1 спираль–β2 тяж). Выявлено, что мутация консервативного Y262 в RAWUL-домене нарушает его взаимодействие с Cbx. На основании кристаллической структуры и анализа влияния мутаций определены остатки в составе RAWUL-домена, участвующие в двух конкурирующих процессах – взаимодействии с Cbx-белками и димеризации UBL-доменов. Эти участки поверхности консервативны среди RING белков семейства PRC1, что предполагает наличие общего механизма гомо-/гетеродимеризации RING-доменов и их взаимодействия с Cbx. В случае взаимодействия RING1B с Cbx7, образование гетеродимера более

вероятно, чем гомодимеризация RING1B (Kd 9,2 нМ против 200 мкМ, соответственно). Таким образом, RAWUL-домен RING1B служит адаптером для связывания компонентов PRC1-комплекса с нуклеосомой.

Модификации остатков К15, К119 и К129 гистона Н2А привлекают разные группы белков. Так, ЕЗ-убиквитин-лигаза RING1B/BMI1 убиквитинирует К119, что приводит к подавлению экспрессии генов, а E3-убиквитин-лигазы RNF168 и BRCA1/BARD1 модифицируют Н2А по остаткам К13/15 и К125/127/129, соответственно, что является ключевым событием при репарации разрывов ДНК. Считается, что баланс между этими модификациями определяет выбор между двумя путями репарации двуцепочечных разрывов – HR и NHEJ. Структурные особенности лигаз, обеспечивающие специфичность к разным сайтам убиквитинирования, не до конца выяснены. Все опубликованные структуры комплексов нуклеосом с убиквитин-лигазами демонстрируют похожую модель распознавания нуклеосом, где кластер положительно заряженных аминокислотных остатков ЕЗлигаз функционирует в качестве молекулярного якоря для связывания с кислым районом на поверхности гистонов в нуклеосоме, причем вторичная структура участка с основными остатками отличается у разных лигаз. У гистона Н2А важнейшей частью кислого участка является остаток E92 (в H2AX), ведущая роль которого в убиквитинировании H2A и H2AX (K13/K15 для RNF168 и K118/K119 для RING1B/BMI1) доказана, поскольку мутации в этом участке предотвращают убиквитинирование in vitro и in vivo, нарушается ответ на двуцепочечные разрывы, прекращается рекрутирование 53BP1 и BRCA1 к местам разрывов [100].

Анализ структуры комплекса RING1B–BMI1–UbcH5c, связанного с минимальным субстратом, H2A/H2B нуклеосомой [101] продемонстрировал, что за специфичность связывания отвечают участки гистонов, расположенные далеко от сайтов убиквитинирования (рис. 8). Показано, что интерфейс взаимодействия RING1B-нуклеосома довольно протяженный и в него входят остатки отрицательно заряженной области H2A (E61, E64, D72, N89, D90 и E92, а также E105 и H109), контактирующие с положительно заряженной областью RING1B, так называемым «аргининовым якорем» (K65, R81, K85, K93, V95, K97 и R98). Контакт «аргининового якоря» на поверхности лигазы с кислой областью поверхности H2A/H2B, присутствует во многих известных кристаллических структурах комплексов белков, связанных с нуклеосомой. RING1B и BMI1 в составе димерной E3-лигазы связываются с поверхностью нуклеосомы, в том числе с кислым участком, и ориентируют E2-фермент UbcH5c для убикви-





Рис. 8. Убиквитин-лигаза PRC1 в комплексе с H2A/H2B нуклеосомой и E2 ферментом.

Вверху: интерфейс взаимодействия комплекса BMI1-RING1B-UbcH5c с H2A/H2B нуклеосомой. Протяженная область контактов показана пунктиром (справа).

Внизу: расположение каталитического C85 в составе UbcH5c по отношению к С-концевой области гистона H2A, несущей остаток K119 (показан справа).

ВМІ1 выделен оранжевым цветом, RING1B – синим, UbcH5c – зеленым, ядро нуклеосомы – розовым, фрагмент ДНК в составе нуклеосомы – коричневым.

тинирования H2A K119ub1, причем UbcH5c также непосредственно контактирует с нуклеосомной ДНК. Интерфейс взаимодействия BMI1 с нуклеосомой не столь протяженный, как в случае RING1B и основной вклад в формирование E3-лигазного комплекса с нуклеосомой вносит взаимодействие RING1B-H2A, в то время как BMI1 усиливает активность RING1B и способствует правильной ориентации молекулы убиквитина относительно остатка K119. Вся эта сложная сеть взаимодействий приводит к селективному убиквитинированию K119 гистона H2A.

Интересно отметить, что канонические лигазные комплексы белков PRC1 (RING1A/B) с PCGF1 либо PCGF4 (BMI1) обладают низкой убиквитинирующей активностью, в то время как неканонические (например, RING1B–PCGF5) демонстрируют высокую активность, хотя различаются всего в двух местах на поверхности контакта [102]. Некоторые отличия между структурами комплексов наблюдаются в N-концевой области, а именно в тяже β1 и непосредственно следующей за ним спирали α1, но их влияние на активность незначительно. Существенные различия присутствуют в спирали α3, взаимодействующей с убиквитином, где в случае белков PCGF2/4 два противоположно заряженных остатка К73 и D77 образуют солевой мостик между собой (поскольку боковые радикалы і и і+4 остатка находятся один над другим в альфа-спирали), препятствуя эффективному переносу убиквитина. На основании молекулярного моделирования предсказано, что остаток E77 PCGF5, но не D77 PCGF4, взаимодействует с K11 или K33 убиквитина. Ионная связь K73–D77 стерически мешает близкому подходу убиквитина и ограничивает способность D77 участвовать во взаимодействиях с K11 и K33, что также может объяснить различия в активности данных комплексов. Показано, что замена K73R, встречающаяся в более активных PCGF, значительно активирует и PCGF4. Низкая активность RING1B-PCGF4 компенсируется высокой константой связывания с субстратом, а именно с кислой областью нуклеосомы (для неканонических PCGF связывание не столь прочное, т.к. у них вместо основных остатков присутствуют кислые), таким образом различие в активности PRC1-комплексов обеспечивается именно типом PCGF (1-6), но не RING1 (Алибо В). В отсутствие RING1 А/В белки PCGF не обладают ЕЗ-лигазной активностью.

Ключевой заряженный остаток RING доменов RNF8, RNF168 и RING1B, который определяет, распознаются ли нуклеосомные белки, находится сразу после последнего цистеина, входящего в RING домен, и принадлежит N-концевой аргинин-богатой спирали, входящей в этот домен [11, 103]. Такими остатками оказались положительно заряженные R57 и K93 в RNF168 и RING1B, соответственно, и отрицательно заряженный D443 в RNF8 (рис. 9).

Показано, что мутант RNF168 R57D не способен убиквитинировать гистоны, но катализирует образование K63 цепей убиквитина в районе двуцепочечных разрывов [11]. Обнаружено, что кислая область на поверхности H2A/H2B не только необходима для активности комплекса RNF168/UbcH5c, но и способствует селективному переносу Ub от E2 именно на K13/K15 [103, 104]. На основании данных,





(a) RNF8 RING домен

Рис. 9. Структура RING-доменов ЕЗ-лигаз RNF8 и RNF168.

 а) Ленточная модель структуры (слева), карта поверхности (в центре) и суперпозиция обеих моделей (справа) для гомодимерного RING-домена RNF8.
Мономеры обозначены разными цветами (зеленый и оранжевый). Внизу представлена поверхность контакта мономеров.

б) Ленточная модель структуры (вверху справа) и наложенная на нее карта поверхности с распределением заряда (в центре справа) RING-домена RNF168. Рамкой выделена область взаимодействия RING-домена RNF168 с кислым участком нуклеосомы (подробнее внизу справа).

Ионы цинка представлены в виде зеленых/оранжевых (а) или синих (б) шаров. Показаны заряженные остатки D443 и R57 в составе RNF8 и RNF168 соответственно, критически важные для распознавания гистонов H2A/H2B.

полученных при изучении взаимодействия RING-домена RNF168 с димером H2A/H2B методами ЯМР, масс-спектрометрии с кросслинкингом и сайт-направленного мутагенеза, определены аминокислотные остатки гистонов, участвующие во взаимодействии с RNF168: это L22, Q23, E63, D89, E90, E91, L92, и N93 гистона H2A и район Е102 – Т116 в гистоне Н2В [103]. Необходимо отметить, что перечень ключевых остатков по данным ЯМР и приведенным выше данным PCA комплекса RING1B-BMI1-UbcH5c, связанного с Н2А/Н2В [101], несколько отличаются. Это может быть связано как с различием лигаз, так и с разными методиками эксперимента. Также методом ЯМР доказано, что для взаимодействия с кислыми областями гистонов ключевыми остатками N-концевой альфаспирали RING-домена RNF168 являются не только R57, но также R63 и R67 [103]. Сравнение структуры комплекса E2 (UbcH5c)–E3 (RNF168)-нуклеосома с другими структурами E3–E2~Ub показало, что в данном случае образуется закрытый комплекс, где C-конец Ub связан с E2 и считается напряженным, тем самым активируя тиоэфирную связь между С-концом Ub и каталитическим цистеином фермента E2 и способствуя переносу Ub на субстрат. Для селективной модификации определенных остатков лизина гистонов крайне важно расположение поверхностей лигазы и нуклеосомы друг относительно друга. Обнаружено, что RING домен ЕЗ-лигазы RNF168 повернут на 180° на поверхности нуклеосомы по сравнению с расположением аналогичного RING-домена лигазы PRC1, убиквитинирующей H2A по остатку K119, то есть RING домен RNF168 контактирует с противоположной (относительно кислой области) стороной нуклеосомы, что и объясняет разницу в специфичности этих ЕЗ-лигаз. Молекулярной основой этой разницы в способе связывания является разная ориентация основных районов двух RING-доменов (противоположное направление полипептидной цепи) относительно сайта связывания Е2, а также разная форма поверхности и отличающееся распределение заряда. В частности, область вокруг аргининового якоря, а именно вокруг остатков R91 в RING1B и R55 в RNF168, более электроотрицательна в RING1B, по сравнению с RNF168, из-за присутствия двух остатков глутаминовой кислоты на поверхности. А противоположная сторона молекулы RNF168 менее электроположительна, главным образом из-за присутствия Е45. В результате, основная область поверхности RNF168 имеет форму стержня, а поверхность RING1В обладает почти квадратной формой.

Положительно заряженный участок RNF168 взаимодействует с областью вокруг остатка E55 H2A, таким образом заполняя отри-

А.В.Бачева и соавт.

цательно заряженную канавку, образованную спиралями H2A $\alpha 2$ и H2B αC . В случае RING1B фермент не контактирует с областью вокруг остатка E55 H2A. Вместо этого ключевой для связывания с нуклеосомой остаток R81 RING1B взаимодействует снаружи щели между $\alpha 2$ - αC с остатком D72 гистона H2A. В RNF168 присутствие E45 около этой позиции способствует взаимодействию с K105 гистона H2B на противоположной стороне щели. Таким образом, набор пространственных различий (разный общий заряд и линейное/ квадратное распределение оснOвной поверхности вокруг якорного аргинина) ответственен за изменение режима связывания и разную специфичность лигаз. В то же время нельзя забывать, что RING1B, в отличие от RNF168, связывается с поверхностью нуклеосомы в виде гетеродимера с BMI1, причем BMI1 преимущественно связывается с H3/H4.

RNF168 распознает убиквитинированные белки с помощью трех различных убиквитин-связывающих доменов (UBD): MIU 1, MIU2 (motif interacting with Ub) и UMI (Ub-interacting motif [UIM]- and MIU-related UBD) [105]. UMI и MIU1 включены в модуль, называемый UDM (Ub-dependent DSB recruitment module) 1, который расположен в N-концевой части RNF168. MIU2 содержится в модуле UDM2, который расположен в C-концевой части RNF168 (рис. 10). В настоящее время постулируется, что UDM1 и UDM2 взаимодействуют с различными убиквитинированными мишенями: UDM1 узнает полиубиквитинированные мишени, модифицированные RNF8, тогда как UDM2 распознает RNF168-зависимые моноубиквитинированные мишени. Функциональное различие между UDM1 и UDM2 может быть связано с разными консервативными мотивами в их составе (LRMs).

Разрешена кристаллическая структура комплексов UDM1 с димером K63–Ub2, а также С-концевого фрагмента UDM2 и K63–Ub2 [105]. Установлено, что во вторичной структуре доменов UDM1 и UDM2 содержатся альфа-спиральные участки. На клетках остеосаркомы U2OS показано, что мутации в UDM2 препятствуют накоплению RNF168 в области двуцепочечных разрывов, а в UDM1 – практически не влияют. Отсюда следует, что мотив UDM2, взаимодействуя с убиквитиновыми цепями, вносит основной вклад в привлечение RNF168, причем в большей степени за счет мотива MIU2, чем UAD. UMI вносит вклад в накопление RNF168 только в отсутствие функционального UDM2.

Дрожжевая E3 убиквитин-лигаза Bre1 (ортолог человеческой RNF20/40) в тандеме с E2-Ub-переносящим белком Rad6 моноубиквитинируют гистон H2B по остатку K123. Как данный комплекс





Рис. 10. Функциональные мотивы в структуре RNF168 человека.

RING-домен (малиновый прямоугольник); UDM1-домен (синий прямоугольник), в состав которого входят LRM1, UMI и MIU1 мотивы (обозначены лавандовым, голубым и фиолетовым цветом); UDM2-домен (зеленый прямоугольник), в состав которого входят UAD (Ub-associated domain) и MIU2 (обозначены на схеме и в структуре ярко-зеленым и бирюзовым цветом), и LRM2 мотив (обозначен зеленым прямоугольником); а также PALB2-взаимодействующий домен (PID) показанный светло-коричневым прямоугольником. Два остатка убиквитина (Ub), взаимодействующие с UDM-доменами, обозначены фиолетовым и розовым цветом (ближний и дальний Ub, соответственно).

А.В.Бачева и соавт.

связывает нуклеосому, долгое время оставалось неясным, как и то, почему происходит моноубиквитинирование конкретно этого остатка лизина. Было показано, что взаимодействие Bre1 с Rad6 необходимо и достаточно для связывания с нуклеосомой [106]. При этом, RING домен Bre1 необходим для убиквитинирования H2A, но необязателен для взаимодействия Bre1-Rad6. За это взаимодействие ответственны N-концевой Rad6-связывающий домен Bre1 (RBD) и ключевой остаток K31 в составе Bre1. Кроме того, показана роль RING домена Brel в корректном позиционировании Rad6 над остатком K123. Интересно отметить, что у этой лигазы, как и у RNF168 и RING1B, есть кластер основных аминокислотных остатков, вовлеченных во взаимодействие RING-домена Bre1 с поверхностью нуклеосомы. Химерная конструкция Rad6-Bre1RING значительно превосходит полноразмерный комплекс по активности, при этом проигрывая в селективности убиквитинирования, так как помимо К123, обнаружены несколько моноубиквитинированных и полиубиквитинированные формы H2B. Модификации гистонов с участием Bre1/Rad6 важны *in vivo*, поскольку инактивирующие мутации в Bre1, но не замена H2B К123А, приводили к серьезным дефектам роста дрожжей – возможно, Bre1 имеет и другие, неизученные мишени убиквитинирования. Кроме того, методами кросс-линкинга и последующей масс-спектрометрии доказано наличие кратковременного динамического взаимодействия Bre1-Rad6, а также определены ключевые аминокислотные остатки в интерфейсе взаимодействия нуклеосомы, Brel и Rad6 in vitro [107]. Интерфейс был предварительно смоделирован суперпозицией кристаллических структур Brel и Rad6. Лигаза Brel своим RING доменом, содержащим остатки R679 и R681, взаимодействует с кислыми участками нуклеосомы, а именно с остатком Е116 Н2В, вследствие чего каталитический остаток C88 Rad6 образует прямой контакт с остатком К123 гистона Н2В. Интересно отметить, что деубиквитиназный комплекс SAGA (Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase), связываясь своим аргининовым кластером в составе цинкового пальца Sfg11 с той же кислой областью нуклеосомы, конкурирует с Bre1 за эту область.

Анализ кристаллической структуры RING домена RNF20 показал, что лигаза функционирует как гомодимер, взаимодействуя с конъюгатами Ube2B–Ub [108]. Димеризация является важным этапом процесса, поскольку один мономер образует контакт с E2, а другой стабилизирует убиквитин в закрытой конформации. Путем сайт-направленного мутагенеза остатков в составе E3–E2 и E3–Ub интерфейсов были определены ключевые области взаимодействия между RING-доменом RNF20 и E2–Ub, ими оказались контакты

N961 RNF20 с R95 Ube2B и Q954 RNF20 с N65 Ube2B, причем остаток N65 Ube2B является неконсервативным в других E2 ферментах, следовательно, взаимодействие этого остатка с Q954 RNF20 является характерной чертой данного комплекса и отличием от других RING-E2–Ub. Показано, что комплекс взаимодействует с кислой областью нуклеосомы, а также, что RING-домены RNF20 и RNF40 *in vitro* формируют стабильный гетеродимер, обладающий E3 убиквитин-лигазной активностью. Связывание RING-домена RNF20 с E2-ферментом Ube2B высокоспецифично (подобно Rad18), но весьма слабо (из-за отсутствия противоположно заряженных остатков; повидимому, области вне RING-домена дополнительно усиливают взаимодействие). Оптимальное позиционирование убиквитина в комплексе RNF20(RING)2-Ube2B-Ub обеспечено взаимодействием с С-концевым тирозином Y973 одного и K959 другого RING-домена, причем ключевым остатком убиквитина в данном взаимодействии является ЕЗ4.

Уже упоминавшийся выше белок UHRF1 является E3 убиквитинлигазой, в состав которого входит пять функциональных доменов, в том числе RING домен. Этот фермент катализирует моноубиквитинирование по остаткам K14, K18, K23 и K27 на N-конце гистона H3, с которым взаимодействует своим PHD-доменом (plant homeodomain) [39]. Все пять доменов UHRF1 функционируют в тандеме для модификации H3, предопределяемой профилем метилирования ДНК. Домен UBL взаимодействует с поверхностью E2 фермента Ube2D, противоположной активному центру. RING-домен в составе лигазы имеет более низкую аффинность (K_D около 90 мкМ) к Ube2D, чем UBL (K_D примерно в шесть раз ниже), однако UBL не оказывает влияния на E3-лигазную активность комплекса. Таким образом, в этом комплексе два домена для связывания с E2, и E2 с этими доменами взаимодействует разными областями (рис. 11).

Для активности комплекса важны оба домена и контакт E2 с ними, и при удалении UBL UHRF1 теряет свойства убиквитин-лигазы. При этом оба домена выполняют свою функцию независимо друг от друга. Основной вклад в связывание E2 (и в оптимальное расположение остатка убиквитина по отношению к мишени) вносит UBL, в то время как RING непосредственно присоединяет остаток убиквитина к гистону. Показано, что другие домены UHRF1 в кооперации с UBL также необходимы для корректного распознавания паттерна метилирования ДНК и позиционирования убиквитина вблизи H3. Интересно, что UBL домены из других E3-лигаз взаимодействуют с Ube2D в составе данного комплекса схожим образом.





188

Рис. 11. Механизм убиквитинирования гистона H3 мультидоменной E3-лигазой UHRF1.

a) В отсутствие хроматина UHRF1 имеет компактную доменную организацию. ДНК-связывающий модуль (SRA) и RING-домен объединены посредством линкера PBR, который присоединен к гистон-связывающему сайту в домене Тюдор (TTD). RING- и UBL-домены одновременно контактируют с Ube2D–Ub.

б) При связывании с ДНК UHRF1 принимает более развернутую конформацию для эффективного взаимодействия TTD и PHD с гистоном H3, а также для переноса убиквитина на гистон.

E2-фермент Ube2D выделен голубым цветом, остаток убиквитина и PHD-домен – розовым, домен UBL – оранжевым, домен Тюдор – лиловым, SRA (SET and RING-Associated)-домен – фиолетовым, RING-домен с PBR (Poly-Basic Region)-линкером – бордовым, гистон H3 – серым. Схематично показана двойная спираль полуметилированной ДНК (he5mC DNA).

Другие лигазы, например, относящиеся к семейству BIRC RING-E3 лигаз, куда входит в том числе BIRC7, RNF4 и Rad18, формируют функциональный гомодимер. Димеризация происходит посредством RING–RING контактов, а также взаимодействий остатков, фланкирующих N- и C-концевые области домена RING. Изучение структуры комплекса BIRC7–UbcH5b–ub показано, что димер RINGдомена взаимодействует с UbcH5b и стабилизирует убиквитин со стороны C-конца [109]. Важную роль в стабилизации убиквитина играют гидрофобные остатки I44 и I36, взаимодействующие с α2- и α3-спиралями UbcH5b и димером BIRC7. RNF4, также относящаяся к семейству BIRC, гомодимерная RING E3-лигаза, убиквитинирует полисумоилированные белки. Показано, что RNF4 прочно связывает конъюгат UbcH5a–Ub, но слабо связывает свободный UbcH5a [110].

При изучении структуры комплекса RNF4–UbcH5A установлено, что E2-фермент связан с одной субъединицей RNF4, в то время как присоединенный тиоэфирной связью убиквитин связан с другой субъединицей. Ключевую роль играет гидрофобный остаток I44 убиквитина, взаимодействуя с консервативным тирозином, находящимся в области контакта RING-доменов гомодимерного комплекса. Интересно, что важность остатка I44 убиквитина также отмечалась при связывании с UIM мотивами белка RAP80, играющего ключевую роль в рекрутировании комплекса Abraxas–BRCC36–BRCA1–BARD при повреждении ДНК [111].

Таким образом, можно выделить несколько структурных особенностей ЕЗ-лигаз гистонов: они формируют функциональный гомоили гетеродимер, и взаимодействуют с гистонами либо с помощью «аргининового якоря», образуя ионные контакты с отрицательно заряженной частью поверхности гистона, либо через гидрофобные взаимодействия.

V. АУТОУБИКВИТИНИРОВАНИЕ RING ЕЗ-ЛИГАЗ

Интересной особенностью многих ЕЗ убиквитин-лигаз является их способность к аутоубиквитинированию, роль которой не всегда понятна. Этот процесс был обнаружен для убиквитин-лигазной субъединицы BAF250b хроматин-ремоделирующего комплекса SWI/ SNF [33], дрожжевой ЕЗ убиквитин-лигазы Psh1 центромерного гистона Cse4 [112], для комплекса BRCA1/BARD1 [97, 113], для E3-лигазы UHRF1, модифицирующий гистон H3 [37], а также для других ферментов. Например, димер RING1B/BMI1 катализирует не только моноубиквитинирование Н2А, но и собственное полиубиквитинирование [114], при этом BMI1 не способен аутоубиквитинироваться вне комплекса. Показано, что RING-опосредованное аутоубиквитинирование не требуется для протеасомной деградации BMI1 и RING1B, а RING домены обоих белков способствуют их ассоциации и стабилизации и защищают друг друга от деградации. В составе димера лигаза RING1В способна генерировать разные нетипичные К6-, К48-, К27-полиубиквитиновые цепи, а BMI1 контролирует эту активность, способствуя моноубиквитинированию Н2А. Лигаза RNF168 также способна аутоубиквитинироваться, образуя, главным образом, К27-убиквитиновые цепи (в меньшей степени К63-цепи) [115]. Предполагается, что аутоубиквитинирование иногда все же влечет за собой протеасомную деградацию фермента [113], что в случае BRCA1, характеризующейся низкой экспрессией, может

А.В.Бачева и	соавт.
--------------	--------

приводить к катастрофическим последствиям для клетки. Для UHRF1 контролирующей привлечение метил-трансферазы DNMT1 путем убиквитинирования гистона H3 [36], был выявлен молекулярный переключатель, при связывании с родительской ДНК изменяющий активность убиквитин-лигазы на аутоубиквитинирующую [37].

VI. НЕКАНОНИЧЕСКИЕ УБИКВИТИНОВЫЕ ЦЕПИ В МОДИФИКАЦИИ ГИСТОНОВ

Убиквитинирование регулирует различные клеточные процессы путем создания гибкой белок-белковой коммуникационной системы с восемью структурно и функционально различными цепями, соединенными через различные аминокислотные остатки (N-конец (M1), K6, K11, K27, K29, K33, K48 и K63). Убиквитинирование гистонов, в частности гистонов H2A/H2A.X, является одним из основных сигналов активации системы репарации ДНК при ее повреждении. Было установлено, что за этот процесс в том числе отвечает убиквитинлигаза RNF168, при этом считается, что гистон маркируется не только К63-цепями убиквитина, но и крайне редко встречающейся полиубиквитиновой цепью, образованной через остаток К27. Тем не менее, причины эволюционного предпочтения данной лигазой именно этого типа цепей до сих пор неизвестны. Для выяснения того, могут ли убиквитин-лигазы RNF8 и RNF168 катализировать образование разных убиквитиновых цепей, авторы работы [62] использовали клеточные линии, экспрессирующие мутант убиквитина с единственным лизином К48 или К63 и специфические антитела. Было продемонстрировано эндогенное образование К48-цепей в местах двуцепочечных разрывов с помощью MIU доменов RNF168, которые взаимодействуют с К48-связанными убиквитиновыми цепями и стабилизируют их в клетке. Показано, что RNF8 также формирует К48-цепи, что приводит к деградации меченого убиквитином субстрата в протеасоме, в то время как RNF168, взаимодействуя с E2-лигазой UBC13, синтезирует в основном К63-убиквитиновые цепи. Интересно, что RNF168 распознает цепи убиквитина, связанные как через К48, так и через К63. Это свойство RNF168 позволяет ей распознавать свои собственные продукты и, таким образом, запускать петлю положительной обратной связи для дальнейшего стимулирования накопления К63-связанных цепей убиквитина на участках двуцепочечных разрывов, что важно для привлечения 53BP1, BRCA1, и других белков репарации. Структурные мотивы, участвующие в распознавании К63-убиквитиновых цепей RNF168

изучались в работе [105]. Специфичность для K63-диубиквитиновых цепей обеспечивается одновременным связыванием ближнего (посредством MIU2) и дальнего (посредством N-концевой области UDM2 – UAD) убиквитина. Ключевым фактором для специфичности взаимодействия является расстояние между UAD и MIU2. В составе UDM1, LRM1-мотив обеспечивает специфичность распознавания K63-цепей убиквитин-связывающим доменом MIU1. При этом, K63-diUb не может одновременно взаимодействовать с UMI и MIU1. Методом поверхностного плазмонного резонанса показано, что C-концевая область UDM2 (в отличие от UAD) не требуется для специфичного связывания K63-убиквитиновых цепей.

Убиквитин-лигаза RNF168 в комплексе с E2-конъюгирующим ферментом UbcH5с может стимулировать формирование еще одного типа неканонических конъюгатов убиквитина, связанных через К27, с гистоном H2A/H2A.X по K13/K15, и убиквитинированный таким образом гистон критически необходим для DDR и может быть непосредственно распознан другими медиаторами DDR [115]. С помощью сайт-направленного мутагенеза различных остатков лизина в составе убиквитина на клеточной модели НЕК293Т показано, что остаток К27 убиквитина специфично задействован в моно-, ди-, три- и полиубиквитинировании гистонов при участии Е3-убиквитин-лигазы RNF168. К27 убиквитинирование гистонов является их основной модификацией при ответе клетки на двуцепочечные разрывы ДНК, этот сигнал является универсальным и узнается белками 53BP1, Rap80, RNF168, RNF169, а мутации K27 убиквитина препятствуют рекрутированию 53BP1 и BRCA1 к местам двуцепочечных разрывов. Нокдаун убиквитина драматически ухудшает рекрутирование компонентов системы репарации ДНК (53ВР1 и BRCA1) к месту разрыва, не влияя на уровень фосфорилирования гистонов H2A. Предполагается, что тип образующихся убиквитиновых цепей контролирует не ЕЗ, а Е2-конъюгирующий фермент.

Подтверждением этой гипотезы может служить то, что в клетках U2OS и HEK293T в ответ на двуцепочечные разрывы происходит образование и другого типа неканонических конъюгатов убиквитина, связанных между собой через K11, с гистоном H2A/H2A.X [116]. Такой тип убиквитиновых цепей (K11) является одним из самых распространенных, но его роль в DDR до конца не выяснена. Ферменты Ube2S (E2 лигаза) и RNF8 (но не APC/C (anaphase promoting complex/ cyclosome) RING-E3-лигаза) взаимодействуют и ATM-зависимым образом катализируют это убиквитинирование вблизи разрыва. Деубиквитиназа Cezanne удаляет убиквитиновые конъюгаты по завер-

А.В.Бачева и соавт.

шении репарации, таким образом вместе эти ферменты отвечают за формирование на поврежденном хроматине и разборку конъюгатов убиквитина, связанных через К11. Причем К11 конъюгаты формируются так же часто, как и К63 или К48 конъюгаты.

Интересно, что отсутствие K11 убиквитиновых конъюгатов не влияет на рекрутирование 53ВР1 и BRCA1. Считается, что роль K11 конъюгатов убиквитина заключается в регуляции сайленсинга транскрипции при повреждении ДНК, что происходит независимо от формирования K63-связанных цепей убиквитина лигазой RNF8 и привлечения 53ВР1 и Abraxas/BRCA1-А комплекса для запуска репарации.

С помощью тест-системы на основе различных димеров убиквитина и их негидролизуемых аналогов, методами SILAC и массспектрометрии удалось показать некоторые закономерности взаимодействия белков с полиубиквитиновыми цепями в зависимости от типа убиквитин-связывающего домена(ов) и их расположения в структуре белка [117]. Например, белки с тандемными убиквитин-взаимодействующими мотивами (tUIM) предпочтительно связываются с K48- и K63-диубиквитиновыми фрагментами, в то время как убиквитин-связывающие белки, содержащие цинковые пальцы, схожим образом взаимодействуют как с моноубиквитином, так и со всеми типами убиквитиновых димеров (такое отсутствие селективности можно объяснить тем, что С-концевая область убиквитина образует множество контактов со связывающим карманом белков). В случае убиквитин-связывающих белков с двумя или более tUIM, селективность взаимодействия с тем или иным убиквитиновым димером (diUb) определяется длиной α-спирального линкера между тандемными мотивами и ориентацией мотивов по отношению к линкеру. Так, для взаимодействия с K63 diUb оптимальная длина линкера фиксирована и составляет 9-10 а. о., а при связывании К48 diUb может варьировать в пределах от 4 до 11 а. о. Среди белков, содержащих консервативные убиквитин-связывающие мотивы в различных типах клеток (42% от всех убиквитин-связывающих белков в клетках ESCs, NPCs и HeLa), большинство (85%) селективно взаимодействуют с димерами К48, К63 или Met1. Обнаружено, что две деубиквитиназы, UCHL3 и USP40, селективно связывают K27 diUb и UCHL3 способна in vivo регулировать длину К27-полиубиквитиновых цепей, наращиваемых RNF168, причем в данном процессе важен нуклеофильный остаток С95 в активном центре деубиквитиназы. Исследование принципов молекулярного узнавания К27-цепей убиквитина деубиквитиназой UCHL3 проведено с помощью набора

димеров K27 diUb, модифицированных FRET-парой по различным аминокислотным остаткам [118]. Показано, что в составе комплекса UCHL3 взаимодействует с обоими мономерами убиквитина, и ключевую роль играет солевой мостик между остатками R72 проксимального убиквитина и D33 UCHL3. Второй убиквитин взаимодействует с UCHL3 посредством гидрофобного Ile44 и водородных связей.

При индукции повреждений ДНК доксорубицином в клетках HeLa выявлена группа белков, взаимодействующих с K6 diUb, в нее входят факторы, участвующие в NF-кВ сигнальном пути, а также E3 HECT-лигаза UBR5, контролирующая убиквитинирование разных белков в ответ на повреждения ДНК и деубиквитиназа VCPIP1, активность которой на протяжении клеточного цикла регулируется фосфорилированием [117]. Интересно, что на связь атипичных K6-связанных конъюгатов убиквитина с DDR также указывали другие авторы [119]. RING-убиквитин-лигаза BRCA1/BARD1 может формировать K6-убиквитиновые цепи *in vitro* и в системах сверхэкспрессии. Также показано, что УФ излучение увеличивает эндогенное образование K6-убиквитиновых цепей, катализируемое BRCA1 [120].

VII. RING ЕЗ-ЛИГАЗНЫЕ КОМПЛЕКСЫ

Интересно отметить, что RING E3-лигазы могут функционировать не только в виде димеров, но и в составе сложных комплексов. Например, деубиквитиназа USP7 стабилизирует RNF168 [121], причем удаление USP7 из комплекса приводит к нарушению моноубиквитинирования H2A и УФ-индуцированного γH2A.X, а также к снижению уровней белков BMI1, RNF168 и BRCA1. Делеция USP7 также уменьшает количество островков моноубиквитинированного H2A и полиубиквитинированного H2AX, индуцированных УФ- либо ионизирующим излучением (равно как и подавляет рекрутирование BRCA1 и 53PB1 к этим островкам). Сверхэкспрессия USP7 дикого типа, но не мутанта, лишенного способности связывать RNF168, предотвращает УФ-индуцированную деградацию RNF168.

Ингибиторный комплекс PRC2 также использует взаимодействие с другими белками для функционирования. Продемонстрирована важная роль кофактора Jarid2 в обеспечении контакта PRC2 с H2A K119ub1, идентифицирован мотив взаимодействия с убиквитином на N-конце Jarid2, и показано, что этот домен способствует локализации PRC2 на модификации H2A K119ub1 как *in vitro*, так и *in vivo* [122]. Таким доменом оказался N-концевой UIM-домен, и доказано, что

А.В.Бачева	и	соавт.
------------	---	--------

Jarid2 посредством UIM рекрутирует комплекс PRC2 к H2A K119ub1 (в т.ч., в составе Xist-зависимых доменов) *in vitro* и *in vivo*. Эти результаты показывают критическую функцию Jarid2 и определяют ключевой механизм взаимодействия PRC1 и PRC2, приводящего к образованию гетерохроматина в генах-мишенях во время развития и клеточной дифференцировки.

VIII. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Убиквитинирование гистонов при участии специализированных RING E3 лигаз является одним из ключевых эпигенетических сигналов, контролирующих целый ряд важнейших процессов в клетке - от запуска системы репарации ДНК до регуляции транскрипции различных групп генов. Структурное и функциональное разнообразие ЕЗ убиквитин-лигаз, модифицирующих гистоны, обусловлено первостепенной ролью этих ферментов в модуляции широкого спектра клеточных событий. На сегодняшний день подробно охарактеризованы многие представители семейства ЕЗ RING-лигаз: определены их субстраты и точные сайты модификации, выявлены компоненты сложных белковых комплексов, в составе которых активны данные убиквитин-лигазы, а также получены структурные данные, позволяющие в ряде случаев составить детальную картину взаимодействий между ферментом и нуклеосомой. В то же время, некоторые аспекты функционирования RING ЕЗ лигаз остаются малоизученными. Так, не всегда возможно установить корреляцию между структурными особенностями ферментов и их селективностью по отношению к различным сайтам убиквитинирования. Очевидно, нам предстоит более детально выявить влияние различных субъединиц ЕЗ убиквитин-лигазных комплексов на активность и субстратную специфичность данных ферментов, а также прояснить биологическую роль аутоубиквитинирования некоторых RING ЕЗ-лигаз. Детальное исследование механизмов убиквитинирования гистонов и глубинное осознание его физиологической роли в поддержании гомеостаза как отдельных клеток, так и всего организма в целом остро необходимо для разработки новых терапевтических подходов для лечения социально значимых заболеваний, в первую очередь злокачественной трансформации.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

ЛИТЕРАТУРА

- Pierce, N.W., Kleiger, G., Shan, S., Deshaies, R. J. (2009). Detection of sequential polyubiquitylation on a millisecond timescale. *Nature*, 462 (7273), 615–619.
- Ohtake, F., Tsuchiya, H., Saeki, Y., Tanaka, K. (2018). K63 ubiquitylation triggers proteasomal degradation by seeding branched ubiquitin chains. *Proceedings of the National Academy* of Sciences of the United States of America, 115 (7), E1401–E1408.
- 3. Yau, R., Rape, M. (2016). The increasing complexity of the ubiquitin code. *Nature Publishing Group*, **18** (6), 579–586.
- Goldknopf, I.L., Busch, H. (1977). Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate protein A24. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74 (3), 864–868.
- Eisenhaber, B., Chumak, N., Eisenhaber, F., Hauser, M.-T. (2007). The ring between ring fingers (RBR) protein family. *Genome Biology*, 8 (3), 209.
- Marsh, D.J., Dickson, K.A. (2019). Writing histone monoubiquitination in human malignancy–The role of RING finger E3 ubiquitin ligases. *Genes*, 10 (1), 67.
- 7. Sulli, G., Di Micco, R., Di Fagagna, F.D.A. (2012). Crosstalk between chromatin state and DNA damage response in cellular senescence and cancer. *Nature Reviews Cancer*, **12** (10), 709–720.
- Rossetto, D., Truman, A.W., Kron, S.J., Côté, J. (2010). Epigenetic modifications in double-strand break DNA damage signaling and repair. *Clinical Cancer Research*, 16 (18), 4543–4552.
- Qian, M.-X., Pang, Y., Liu, C.H., Haratake, K., Du, B.-Y., Ji, D.-Y.,... Qiu, X.-B. (2013). Acetylation-mediated proteasomal degradation of core histones during DNA repair

and spermatogenesis. *Cell*, **153** (5), 1012–1024.

- Thompson, L.L., Guppy, B.J., Sawchuk, L., Davie, J.R., McManus, K.J. (2013). Regulation of chromatin structure via histone posttranslational modification and the link to carcinogenesis. *Cancer and Metastasis Reviews*, **32** (3–4), 363–376.
- Mattiroli, F., Vissers, J.H.A., Van Dijk, W.J., Ikpa, P., Citterio, E., Vermeulen, W., ... Sixma, T.K. (2012). RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling. *Cell*, **150** (6), 1182–1195.
- Gatti, M., Pinato, S., Maspero, E., Soffientini, P., Polo, S., Penengo, L. (2012). A novel ubiquitin mark at the N-terminal tail of histone H2As targeted by RNF168 ubiquitin ligase. *Cell Cycle*, **11** (13), 2538–2544.
- Ginjala, V., Nacerddine, K., Kulkarni, A., Oza, J., Hill, S.J., Yao, M., ... Ganesan, S. (2011). BMI1 Is Recruited to DNA Breaks and Contributes to DNA Damage-Induced H2A Ubiquitination and Repair. *Molecular and Cellular Biology*, **31** (10), 1972–1982.
- Khan, A.A., Lee, A.J., Roh, T.-Y. (2015). Polycomb group protein-mediated histone modifications during cell differentiation. *Epigenomics*, 7 (1), 75–84.
- Elderkin, S., Maertens, G.N., Endoh, M., Mallery, D.L., Morrice, N., Koseki, H., ... Hiom, K. (2007). A Phosphorylated Form of Mel-18 Targets the Ring1B Histone H2A Ubiquitin Ligase to Chromatin. *Molecular Cell*, 28 (1), 107–120.
- 16. Bravo, M., Nicolini, F., Starowicz, K., Barroso, S., Calés, C., Aguilera, A., Vidal, M. (2015). Polycomb RING1A- and RING1B-dependent histone H2A monoubiquitylation at pericentromeric regions promotes S-phase progression. *Journal of Cell Science*, **128** (19), 3660–3671.

А.В.Бачева и соавт.

- Hu, H., Yang, Y., Ji, Q., Zhao, W., Jiang, B., Liu, R., ... Gong, Y. (2012). CRL4B Catalyzes H2AK119 Monoubiquitination and Coordinates with PRC2 to Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell*, 22 (6), 781–795.
- Bhatnagar, S., Gazin, C., Chamberlain, L., Ou, J., Zhu, X., Tushir, J. S., ... Green, M. R. (2014). TRIM37 is a new histone H2A ubiquitin ligase and breast cancer oncoprotein. *Nature*, 516 (729), 116–120.
- Wienken, M., Dickmanns, A., Nemajerova, A., Kramer, D., Najafova, Z., Weiss, M., ... Dobbelstein, M. (2016). MDM2 Associates with Polycomb Repressor Complex 2 and Enhances Stemness-Promoting Chromatin Modifications Independent of p53. *Molecular Cell*, **61** (1), 68–83.
- Wienken, M., Moll, U.M., Dobbelstein, M. (2017). Mdm2 as a chromatin modifier. *Journal of molecular cell biology*, 9 (1), 74–80.
- Zhou, W., Zhu, P., Wang, J., Pascual, G., Ohgi, K.A., Lozach, J., ... Rosenfeld, M.G. (2008). Histone H2A Monoubiquitination Represses Transcription by Inhibiting RNA Polymerase II Transcriptional Elongation. *Molecular Cell*, 29 (1), 69–80.
- 22. Liu, Z., Oughtred, R., Wing, S.S. (2005). Characterization of E3Histone, a Novel Testis Ubiquitin Protein Ligase Which Ubiquitinates Histones. *Molecular and Cellular Biology*, **25** (7), 2819–2831.
- Atsumi, Y., Minakawa, Y., Ono, M., Dobashi, S., Shinohe, K., Shinohara, A., ... Yoshioka, K. (2015). ATM and SIRT6/SNF2H Mediate Transient H2AX Stabilization When DSBs Form by Blocking HUWE1 to Allow Efficient γH2AX Foci Formation. *Cell Reports*, **13** (12), 2728–2740.
- 24. Choe, K.N., Nicolae, C.M., Constantin, D., Imamura Kawasawa, Y., Delgado-Diaz, M.R., De, S., ... Moldovan, G. (2016). UWE1 interacts with PCNA to alleviate replication stress. *EMBO reports*, **17** (6), 874–886.

- 25. Kalb, R., Mallery, D.L., Larkin, C., Huang, J.T.J., Hiom, K. (2014). BRCA1 Is a Histone-H2A-Specific Ubiquitin Ligase. *Cell Reports*, 8 (4), 999–1005.
- Densham, R.M., Garvin, A.J., Stone, H.R., Strachan, J., Baldock, R.A., Daza-Martin, M., ... Morris, J.R. (2016). Human BRCA1–BARD1 ubiquitin ligase activity counteracts chromatin barriers to DNA resection. *Nature Structural Molecular Biology*, 23 (7), 647–655.
- 27. Ku, M., Jaffe, J.D., Koche, R.P., Rheinbay, E., Endoh, M., Koseki, H., ... Bernstein, B.E. (2012). H2A.Z landscapes and dual modifications in pluripotent and multipotent stem cells underlie complex genome regulatory functions. *Genome Biology*, **13** (10), R85.
- Draker, R., Sarcinella, E., Cheung, P. (2011). USP10 deubiquitylates the histone variant H2A.Z and both are required for androgen receptormediated gene activation. *Nucleic Acids Research*, **39** (9), 3529–3542.
- 29. Moyal, L., Zhang, Y., Lerenthal, Y., McCord, R.P., Gana-Weisz, M., ... Shiloh, Y. (2011). Requirement of ATM-Dependent Monoubiquitylation of Histone H2B for Timely Repair of DNA Double-Strand Breaks. *Molecular Cell*, **41** (5), 529–542.
- Nakamura, K., Kato, A., Kobayashi, J., Yanagihara, H., Sakamoto, S., Oliveira, D.V.N.P., ... Komatsu, K. (2011). Regulation of Homologous Recombination by RNF20-Dependent H2B Ubiquitination. *Molecular Cell*, **41** (5), 515–528.
- Minsky, N., Oren, M. (2004). The RING domain of Mdm2 mediates histone ubiquitylation and transcriptional repression. *Molecular Cell*, 16 (4), 631–639.
- 32. Thakar, A., Parvin, J.D., Zlatanova, J. (2010). BRCA1/BARD1 E3 Ubiquitin Ligase Can Modify Histones H2A and H2B in the Nucleosome Particle. *Journal of Biomolecular Structure* and Dynamics, 27 (4), 399–405.

- 33. Li, X.S., Trojer, P., Matsumura, T., Treisman, J.E., Tanese, N. (2010). Mammalian SWI/SNF-A Subunit BAF250/ARID1 Is an E3 Ubiquitin Ligase That Targets Histone H2B. *Molecular and Cellular Biology*, **30** (7), 1673–1688.
- 34. Wu, L., Zee, B.M., Wang, Y., Garcia, B.A., Dou, Y. (2011). The RING Finger Protein MSL2 in the MOF Complex Is an E3 Ubiquitin Ligase for H2B K34 and Is Involved in Crosstalk with H3 K4 and K79 Methylation. *Molecular Cell*, **43** (1), 132–144.
- 35. Li, G., Ji, T., Chen, J., Fu, Y., Hou, L., Feng, Y., ... Cang, Y. (2017). CRL4 DCAF8 Ubiquitin Ligase Targets Histone H3K79 and Promotes H3K9 Methylation in the Liver. *Cell Reports*, **18** (6), 1499–1511.
- 36. Harrison, J.S., Cornett, E.M., Goldfarb, D., DaRosa, P.A., Li, Z. M., Yan, F., ... Rothbart, S.B. (2016). Hemi-methylated DNA regulates DNA methylation inheritance through allosteric activation of H3 ubiquitylation by UHRF1. *eLife*, 5.
- Vaughan, R.M., Dickson, B.M., Whelihan, M.F., Johnstone, A.L., Cornett, E.M., Cheek, M.A., ... Rothbart, S.B. (2018). Chromatin structure and its chemical modifications regulate the ubiquitin ligase substrate selectivity of UHRF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115** (35), 8775–8780.
- 38. Foster, B.M., Stolz, P., Mulholland, C.B., Montoya, A., Kramer, H., Bultmann, S., Bartke, T. (2018). Critical Role of the UBL Domain in Stimulating the E3 Ubiquitin Ligase Activity of UHRF1 toward Chromatin. *Molecular Cell*, **72** (4), 739–752.e9.
- DaRosa, P.A., Harrison, J.S., Zelter, A., Davis, T.N., Brzovic, P., Kuhlman, B., Klevit, R.E. (2018).
 A Bifunctional Role for the UHRF1 UBL Domain in the Control of Hemimethylated DNA-Dependent Histone Ubiquitylation. *Molecular Cell*, 72 (4), 753–765.e6.

- 40. Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H.-Y. Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., ... Zhang, Y. (2006). Histone H3 and H4 Ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 Ubiquitin Ligase Facilitates Cellular Response to DNA Damage. *Molecular Cell*, **22** (3), 383–394.
- 41. Huen, M.S.Y., Grant, R., Manke, I., Minn, K., Yu, X., Yaffe, M.B., Chen, J. (2007). RNF8 Transduces the DNA-Damage Signal via Histone Ubiquitylation and Checkpoint Protein Assembly. *Cell*, **131** (5), 901–914.
- Thorslund, T., Ripplinger, A., Hoffmann, S., Wild, T., Uckelmann, M., Villumsen, B., ... Mailand, N. (2015). Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature*, **527** (7578), 389–393.
- 43. Davie, J.R., Murphy, L.C. (1990). Level of Ubiquitinated Histone H2B in Chromatin Is Coupled to Ongoing Transcription. *Biochemistry*, **29** (20), 4752–4757.
- 44. Davie, J.R., Murphy, L.C. (1994). Inhibition of transcription selectively reduces the level of ubiquitinated histone H2B in chromatin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **203** (1), 344–350.
- Li, B., Carey, M., Workman, J.L. (2007). The Role of Chromatin during Transcription. *Cell*, **128**, 707–719.
- Belotserkovskaya, R. (2003). FACT Facilitates Transcription-Dependent Nucleosome Alteration. *Science*, **301** (5636), 1090–1093.
- Freemont, P. S., Hanson, I. M., Trowsdale, J. (1991). A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell*, 64 (3), 483–484.
- 48. Bailly, V., Lauder, S., Prakash, S., Prakash, L. (1997). Yeast DNA Repair Proteins Rad6 and Rad18 Form a Heterodimer That Has Ubiquitin Conjugating, DNA Binding, and ATP Hydrolytic Activities. *Journal* of Biological Chemistry, **272** (37), 23360–23365.

А.В.Бачева и соавт.

- 49. Joukov, V., Chen, J., Fox, E.A., Green, J.B.A., Livingston, D.M. (2001). Functional communication between endogenous BRCA1 and its partner, BARD1, during Xenopus laevis development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98** (21), 12078–12083.
- 50. Brzovic, P.S., Rajagopal, P., Hoyt, D.W., King, M.C., Klevit, R.E. (2001). Structure of a BRCA1-BARD1 heterodimeric RING-RING complex. *Nature Structural Biology*, 8 (10), 833–837.
- 51. Christensen, D.E., Brzovic, P.S., Klevit, R.E. (2007). E2-BRCA1 RING interactions dictate synthesis of mono- or specific polyubiquitin chain linkages. *Nature Structural and Molecular Biology*, **14** (10), 941–948.
- 52. Menssen, R., Schweiggert, J., Schreiner, J., Kušević, D., Reuther, J., Braun, B., Wolf, D.H. (2012). Exploring the topology of the gid complex, the E3 ubiquitin ligase involved in catabolite-induced degradation of gluconeogenic enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, **287** (30), 25602–25614.
- 53. Williams, C., van den Berg, M., Geers, E., Distel, B. (2008). Pex10p functions as an E3 ligase for the Ubc4p-dependent ubiquitination of Pex5p. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **374** (4), 620–624.
- 54. Platta, H.W., El Magraoui, F., Bäumer, B.E., Schlee, D., Girzalsky, W., Erdmann, R. (2009). Pex2 and Pex12 Function as Protein-Ubiquitin Ligases in Peroxisomal Protein Import. *Molecular and Cellular Biology*, **29** (20), 5505–5516.
- 55. Lai, E.C., Roegiers, F., Qin, X.L., Jan, Y.N., Rubin, G.M. (2005). The ubiquitin ligase Drosophila Mind bomb promotes Notch signaling by regulating the localization and activity of Serrate and Delta. *Development*, **132** (10), 2319–2332.

- 56. Dueber, E.C., Schoeffler, A.J., Lingel, A., Elliott, J.M., Fedorova, A.V., Giannetti, A.M., ... Fairbrother, W.J. (2011). Antagonists induce a conformational change in cIAP1 that promotes autoubiquitination. *Science*, **334** (6054), 376–380.
- 57. Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., Bonner, W.M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *Journal of Biological Chemistry*, **273** (10), 5858–5868.
- Burma, S., Chen, B.P., Murphy, M., Kurimasa, A., Chen, D.J. (2001). ATM Phosphorylates Histone H2AX in Response to DNA Double-strand Breaks. *Journal of Biological Chemistry*, 276 (45), 42462–42467.
- 59. Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M. A., Celeste, A., ... Chen, J. (2006). MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATMdependent DNA damage signals. *Molecular Cell*, **21** (2), 187–200.
- 60. Kolas, N.K., Chapman, J.R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F.D., ... Durocher, D. (2007). Orchestration of the DNAdamage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science*, **318** (5856), 1637–1640.
- Matsuoka, S., Ballif, B.A., Smogorzewska, A., McDonald, E.R., Hurov, K.E., Luo, J., ... Elledge, S.J. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, **316** (5828), 1160–1166.
- 62. Feng, L., Chen, J. (2012). The E3 ligase RNF8 regulates KU80 removal and NHEJ repair. *Nature Structural and Molecular Biology*, **19** (2), 201–206.
- 63. Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., Lukas, J., ... Lukas, C. (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell*, **136** (3), 435–446.

- 64. Stewart, G.S., Panier, S., Townsend, K., Al-Hakim, A.K., Kolas, N.K., Miller, E.S., ... Durocher, D. (2009). The RIDDLE Syndrome Protein Mediates a Ubiquitin-Dependent Signaling Cascade at Sites of DNA Damage. *Cell*, **136** (3), 420–434.
- 65. Wu, J., Huen, M.S.Y., Lu, L.-Y., Ye, L., Dou, Y., Ljungman, M., ... Yu,X. (2009). Histone Ubiquitination Associates with BRCA1-Dependent DNA Damage Response. *Molecular and Cellular Biology*, **29** (3), 849–860.
- 66. Muñoz, M.C., Yanez, D.A., Stark, J.M. (2014). An RNF168 fragment defective for focal accumulation at DNA damage is proficient for inhibition of homologous recombination in BRCA1 deficient cells. *Nucleic Acids Research*, **42** (12), 7720–7733.
- 67. Pinato, S., Gatti, M., Scandiuzzi, C., Confalonieri, S., Penengo, L. (2011). UMI, a Novel RNF168 Ubiquitin Binding Domain Involved in the DNA Damage Signaling Pathway. *Molecular and Cellular Biology*, **31** (1), 118–126.
- 68. Chroma, K., Mistrik, M., Moudry, P., Gursky, J., Liptay, M., Strauss, R., ... Bartek, J. (2017). Tumors overexpressing RNF168 show altered DNA repair and responses to genotoxic treatments, genomic instability and resistance to proteotoxic stress. *Oncogene*, **36** (17), 2405–2422.
- Chittock, E.C., Latwiel, S., Miller, T.C.R., Müller, C.W. (2017). Molecular architecture of polycomb repressive complexes. *Biochemical Society Transactions*, 45 (1), 193–205.
- Borsos, B.N., Majoros, H., Pankotai, T. (2020). Ubiquitylation-Mediated Fine-Tuning of DNA Double-Strand Break Repair. *Cancers*, **12** (6), 1617.
- Ismail, H., Andrin, C., McDonald, D., Hendzel, M.J. (2010). BMI1mediated histone ubiquitylation promotes DNA double-strand break repair. *Journal of Cell Biology*, **191** (1), 45–60.

- 72. Pengelly, A.R., Kalb, R., Finkl, K., Müller, J. (2015). Transcriptional repression by PRC1 in the absence of H2A monoubiquitylation. *Genes and Development*, **29** (14), 1487–1492.
- Illingworth, R.S., Moffat, M., Mann, A.R., Read, D., Hunter, C.J., Pradeepa, M.M., ... Bickmore, W.A. (2015). The E3 ubiquitin ligase activity of RING1B is not essential for early mouse development. *Genes and Development*, **29** (18), 1897–1902.
- 74. Hernández-Muñoz, I., Lund, A. H., Van Der Stoop, P., Boutsma, E., Muijrers, I., Verhoeven, E., ... Van Lohuizen, M. (2005). Stable X chromosome inactivation involves the PRC1 Polycomb complex and requires histone MACROH2A1 and the CULLIN3/SPOP ubiquitin E3 ligase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, **102** (21), 7635–7640.
- Kim, B.J., Chan, D.W., Jung, S.Y., Chen, Y., Qin, J., Wang, Y. (2017). The Histone Variant MacroH2A1 Is a BRCA1 Ubiquitin Ligase Substrate. *Cell Reports*, **19** (9), 1758–1766.
- 76. Dickson, K.A., Cole, A.J., Gill, A.J., Clarkson, A., Gard, G.B., Chou, A., ... Marshs, D.J. (2016). The RING finger domain E3 ubiquitin ligases BRCA1 and the RNF20/ RNF40 complex in global loss of the chromatin mark histone H2B monoubiquitination (H2Bub1) in cell line models and primary high-grade serous ovarian cancer. *Human Molecular Genetics*, **25** (24), 5460–5471.
- 77. Tarcic, O., Pateras, I.S., Cooks, T., Shema, E., Kanterman, J., Ashkenazi, H., ... Oren, M. (2016). RNF20 Links Histone H2B Ubiquitylation with Inflammation and Inflammation-Associated Cancer. *Cell Reports*, 14 (6), 1462–1476.
- Zheng, N., Schulman, B.A., Song, L., Miller, J.J., Jeffrey, P.D., Wang, P., ... Pavletich, N.P. (2002). Structure of the Cull-Rbx1-Skp1-F boxSkp2 SCF

ubiquitin ligase complex. *Nature*, **416** (6882), 703–709.

- 79. Shah, V.J., Maddika, S. (2018). CRL7SMU1 E3 ligase complex-driven H2B ubiquitylation functions in sister chromatid cohesion by regulating SMC1 expression. *Journal of cell science*, **131** (8).
- Citterio, E., Papait, R., Nicassio, F., Vecchi, M., Gomiero, P., Mantovani, R., ... Bonapace, I.M. (2004). Np95 Is a Histone-Binding Protein Endowed with Ubiquitin Ligase Activity. *Molecular and Cellular Biology*, 24 (6), 2526–2535.
- Jones, J.M., Bhattacharyya, A., Simkus, C., Vallieres, B., Veenstra, T. D., Zhou, M. (2011). The RAG1 V (D)J recombinase/ubiquitin ligase promotes ubiquitylation of acetylated, phosphorylated histone 3.3. *Immunology Letters*, **136** (2), 156–162.
- Grazini, U., Zanardi, F., Citterio, E., Casola, S., Goding, C.R., McBlane, F. (2010). The RING Domain of RAG1 Ubiquitylates Histone H3: A Novel Activity in Chromatin-Mediated Regulation of V (D)J Joining. *Molecular Cell*, **37** (2), 282–293.
- Zhang, X., Li, B., Rezaeian, A.H., Xu, X., Chou, P.-C., Jin, G., ... Lin, H.-K. (2017). H3 ubiquitination by NEDD4 regulates H3 acetylation and tumorigenesis. *Nature Communications*, 8 (1), 14799.
- 84. Osley, M.A., Fleming, A.B., Kao, C.F. (2006). Histone ubiquitylation and the regulation of transcription. *Results and Problems in Cell Differentiation*, 41, 47–75.
- Yan, Q., Dutt, S., Xu, R., Graves, K., Juszczynski, P., Manis, J.P., Shipp, M. A. (2009). BBAP Monoubiquitylates Histone H4 at Lysine 91 and Selectively Modulates the DNA Damage Response. *Molecular Cell*, **36** (1), 110–120.
- 86. Kim, K., Lee, B., Kim, J., Choi, J., Kim, J.-M., Xiong, Y., ... An, W. (2013). Linker Histone H1.2 Coo-

perates with Cul4A and PAF1 to Drive H4K31 Ubiquitylation-Mediated Transactivation. *Cell Reports*, **5** (6), 1690–1703.

- Ruppert, S., Wang, E. H., Tjian, R. (1993). Cloning and expression of human TAFII250: A TBP-associated factor implicated in cell-cycle regulation. *Nature*, **362** (6416), 175–179.
- 88. O'Brien, T., Tjian, R. (2000). Different functional domains of TAFII250 modulate expression of distinct subsets of mammalian genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97** (6), 2456–2461.
- Pham, A.D., Sauer, F. (2000). Ubiquitin-activating/conjugating activity of TAF (II)250, a mediator of activation of gene expression in Drosophila. *Science*, 289 (5488), 2357–2360.
- 90. Mandemaker, I.K., Van Cuijk, L., Janssens, R.C., Lans, H., Bezstarosti, K., Hoeijmakers, J.H., ... Marteijn, J.A. (2017). DNA damage-induced histone H1 ubiquitylation is mediated by HUWE1 and stimulates the RNF8-RNF168 pathway. *Scientific Reports*, 7 (1).
- 91. Gudjonsson, T., Altmeyer, M., Savic, V., Toledo, L., Dinant, C., Grøfte, M., ... Lukas, C. (2012). TRIP12 and UBR5 suppress spreading of chromatin ubiquitylation at damaged chromosomes. *Cell*, **150** (4), 697–709.
- 92. Mosbech, A., Lukas, C., Bekker-Jensen, S., Mailand, N. (2013). The deubiquitylating enzyme USP44 counteracts the DNA double-strand break response mediated by the RNF8 and RNF168 ubiquitin ligases. *Journal of Biological Chemistry*, 288 (23), 16579–16587.
- 93. Lydeard, J.R., Schulman, B.A., Harper, J.W. (2013). Building and remodelling Cullin-RING E3 ubiqui tin ligases. *EMBO Reports*, **14** (12), 1050–1061.
- 94. Zimmerman, E.S., Schulman, B.A., Zheng, N. (2010). Structural as

sembly of cullin-RING ubiquitin ligase complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, **20** (6), 714–721.

- Petroski, M.D., Deshaies, R.J. (2005). Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6 (1), 9–20.
- 96. Metzger, M.B., Pruneda, J.N., Klevit, R.E., Weissman, A.M. (2014). RING-type E3 ligases: Master manipulators of E2 ubiquitin-conjugating enzymes and ubiquitination. *Biochimica et Biophysica Acta* (*BBA*) – *Molecular Cell Research*, **1843** (1), 47–60.
- 97. Xia, Y., Pao, G.M., Chen, H.W., Verma, I.M., Hunter, T. (2003). Enhancement of BRCA1 E3 ubiquitin ligase activity through direct interaction with the BARD1 protein. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (7), 5255–5263.
- Li, Z., Cao, R., Wang, M., Myers, M.P., Zhang, Y., Xu, R.M. (2006). Structure of a Bmi-1-Ring1B polycomb group ubiquitin ligase complex. *Journal of Biological Chemistry*, 281 (29), 20643–20649.
- 99. Bezsonova, İ., Walker, J.R., Bacik, J.P., Duan, S., Dhe-Paganon, S., Arrowsmith, C.H. (2009). Ring1B contains a ubiquitin-like docking module for interaction with Cbx proteins. *Biochemistry*, **48** (44), 10542–10548.
- 100. Leung, J.W., Agarwal, P., Canny, M.D., Gong, F., Robison, A.D., Finkelstein, I.J., ... Miller, K.M. (2014). Nucleosome Acidic Patch Promotes RNF168- and RING1B/ BMI1-Dependent H2AX and H2A Ubiquitination and DNA Damage Signaling. *PLoS Genetics*, **10** (3).
- McGinty, R.K., Henrici, R.C., Tan, S. (2014). Crystal structure of the PRC1 ubiquitylation module bound to the nucleosome. *Nature*, **514** (7524), 591–596.

- 102. Taherbhoy, A.M., Huang, O.W., Cochran, A.G. (2015). BMI1-RING1B is an autoinhibited RING E3 ubiquitin ligase. *Nature Communications*, 6.
- 103. Horn, V., Uckelmann, M., Zhang, H., Eerland, J., Aarsman, I., le Paige, U.B., ... van Ingen, H. (2019). Structural basis of specific H2A K13/K15 ubiquitination by RNF168. *Nature Communications*, **10** (1).
- 104. Mattiroli, F., Uckelmann, M., Sahtoe, D.D., van Dijk, W.J., Sixma, T.K. (2014). The nucleosome acidic patch plays a critical role in RNF168-dependent ubiquitination of histone H2A. *Nature communications*, 5, 3291.
- 105. Takahashi, T.S., Hirade, Y., Toma, A., Sato, Y., Yamagata, A., Goto-Ito, S., ... Fukai, S. (2018). Structural insights into two distinct binding modules for Lys63-linked polyubiquitin chains in RNF168. *Nature Communications*, 9 (1).
- 106. Turco, E., Gallego, L.D., Schneider, M., Köhler, A. (2015). Monoubiquitination of histone H2B is intrinsic to the Bre1 RING domain-Rad6 interaction and augmented by a second Rad6-binding site on Bre1. *Journal of Biological Chemistry*, **290** (9), 5298–5310.
- 107. Gallego, L.D., Steger, M.G., Polyansky, A.A., Schubert, T., Zagrovic, B., Zheng, N., ... Köhler, A. (2016). Structural mechanism for the recognition and ubiquitination of a single nucleosome residue by Rad6-Bre1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **113** (38), 10553–10558.
- 108. Foglizzo, M., Middleton, A.J., Day, C.L. (2016). Structure and Function of the RING Domains of RNF20 and RNF40, Dimeric E3 Ligases that Monoubiquitylate Histone H2B. *Journal of Molecular Biology*, **428** (20), 4073–4086.

А.В.Бачева и соавт.

- 109. Dou, H., Buetow, L., Sibbet, G.J., Cameron, K., Huang, D.T. (2012). BIRC7-E2 ubiquitin conjugate structure reveals the mechanism of ubiquitin transfer by a RING dimer. *Nature Structural and Molecular Biology*, **19** (9), 876–883.
- 110. Plechanovová, A., Jaffray, E.G., McMahon, S.A., Johnson, K.A., Navrátilová, I., Naismith, J.H., Hay, R.T. (2011). Mechanism of ubiquitylation by dimeric RING ligase RNF4. Nature Structural and Molecular Biology, 18 (9), 1052–1059.
- 111. Sato, Y., Yoshikawa, A., Mimura, H., Yamashita, M., Yamagata, A., Fukai, S. (2009). Structural basis for specific recognition of Lys 63-linked polyubiquitin chains by tandem UIMs of RAP80. *EMBO Journal*, **28** (16), 2461–2468.
- 112. Hewawasam, G., Shivaraju, M., Mattingly, M., Venkatesh, S., Martin-Brown, S., Florens, L., ... Gerton, J.L. (2010). Psh1 Is an E3 Ubiquitin Ligase that Targets the Centromeric Histone Variant Cse4. *Molecular Cell*, **40** (3), 444–454.
- Stewart, M.D., Duncan, E.D., Coronado, E., DaRosa, P.A., Pruneda, J.N., Brzovic, P.S., Klevit, R.E. (2017). Tuning BRCA1 and BARD1 activity to investigate RING ubiquitin ligase mechanisms. *Protein Science*, 26 (3), 475–483.
- 114. Ben-Saadon, R., Zaaroor, D., Ziv, T., Ciechanover, A. (2006). The Polycomb Protein Ring1B Generates Self Atypical Mixed Ubiquitin Chains Required for Its In Vitro Histone H2A Ligase Activity. *Molecular Cell*, 24 (5), 701–711.
- 115. Gatti, M., Pinato, S., Maiolica, A., Rocchio, F., Prato, M.G., Aebersold, R., Penengo, L. (2015). RNF168 Promotes Noncanonical K27 Ubiquitination to Signal DNA Damage. *Cell Reports*, **10** (2), 226–238.

- 116. Paul, A., Wang, B. (2017). RNF8and Ube2S-Dependent Ubiquitin Lysine 11-Linkage Modification in Response to DNA Damage. *Molecular Cell*, **66** (4), 458–472.e5.
- 117. Zhang, X., Smits, A.H., van Tilburg, G.B.A., Jansen, P.W. T.C., Makowski, M.M., Ovaa, H., Vermeulen, M. (2017). An Interaction Landscape of Ubiquitin Signaling. *Molecular Cell*, 65 (5), 941–955.e8.
- 118. Pan, M., Zheng, Q., Ding, S., Zhang, L., Qu, Q., Wang, T., ... Liu, L. (2019). Chemical Protein Synthesis Enabled Mechanistic Studies on the Molecular Recognition of K27-linked Ubiquitin Chains. *Angewandte Chemie*, **131** (9), 2653–2657.
- 119. Kulathu, Y., Komander, D. (2012). Atypical ubiquitylation – the unexplored world of polyubiquitin beyond Lys48 and Lys63 linkages. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **13** (8), 508–523.
- 120. Elia, A.E.H., Boardman, A.P., Wang, D.C., Huttlin, E.L., Everley, R.A., Dephoure, N., ... Elledge, S.J. (2015). Quantitative Proteomic Atlas of Ubiquitination and Acetylation in the DNA Damage Response. *Molecular Cell*, **59** (5), 867–881.
- 121. Zhu, Q., Sharma, N., He, J., Wani, G., Wani, A.A. (2015). USP7 deubiquitinase promotes ubiquitindependent DNA damage signaling by stabilizing RNF168. *Cell Cycle*, 14 (9), 1413–1425.
- 122. Cooper, S., Grijzenhout, A., Underwood, E., Ancelin, K., Zhang, T., Nesterova, T.B., ... Brockdorff, N. (2016). Jarid2 binds mono-ubiquitylated H2A lysine 119 to mediate crosstalk between Polycomb complexes PRC1 and PRC2. Nature Communications, 7.