

ОНКОГЕН *c-MYC* КОНТРОЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ RHF10, СУБЪЕДИНИЦЫ РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО ХРОМАТИН КОМПЛЕКСА PBAF, В КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ SW620

Е. В. Татарский, академик РАН Г. П. Георгиев, Н. В. Сошникова*

Поступило 17.10.2018 г.

В активации экспрессии генов эукариот широкое участие принимает мультибелковый комплекс PBAF(SWI/SNF), меняющий структуру хроматина. Специфическим компонентом данного комплекса является белок RHF10, участвующий в привлечении комплекса на хроматин. Мы показали, что экспрессия RHF10 в клетках разных линий активируется онкогеном *c-MYC*. Поскольку RHF10 стимулирует пролиферацию клеток, его *c-MYC*-зависимая активация в раковых клетках должна приводить к увеличению скорости их деления.

Ключевые слова: RHF10, *c-MYC*, хроматин-ремоделирующий комплекс SWI/SNF, PBAF, BAF.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524845633-636>

Активация экспрессии генов — это сложный многостадийный процесс. В нём участвуют как отдельные белки-активаторы транскрипции, так и большие мультибелковые регуляторные комплексы, являющиеся транскрипционными коактиваторами. Все они привлекаются на хроматин для инициации процесса транскрипции и взаимодействуют между собой.

Изменение активности генов сопровождается изменением нуклеосомной плотности его хроматина. Этот процесс называется ремоделированием хроматина и осуществляется за счёт привлечения на промоторы генов мультибелковых комплексов, ремоделирующих хроматин. Ремоделирующий хроматин комплекс SWI/SNF перемещает нуклеосомы относительно ДНК за счёт гидролиза АТФ. Его основная коровая субъединица — Brg1/Brm — обладает АТФазной активностью. Семейство SWI/SNF состоит из двух подсемейств, комплексов BAF и PBAF. Комплексы BAF и PBAF состоят из более десятка субъединиц, основная часть которых одинакова у двух комплексов. Однако каждый комплекс имеет и уникальные (специфические) субъединицы, которые участвуют в связывании комплекса с хроматином [1].

Специфические субъединицы комплекса PBAF объединены в отдельный модуль. Субъединицы этого модуля PBAF имеют домены, узнающие модифицированные N-концевые

последовательности гистонов, и таким образом отвечают за связывание ремоделирующего комплекса с хроматином. Одной из субъединиц специфического модуля PBAF является белок RHF10. Он наиболее нестабилен среди всех субъединиц PBAF комплекса и наиболее сложно регулируем [2, 3].

Белок RHF10 представлен в клетках млекопитающих в виде четырёх изоформ, и включение разных изоформ в состав комплекса PBAF определяет его функции [4]. Изоформы RHF10 отличаются доменной структурой и паттернами фосфорилирования. Фосфорилирование определяет различную стабильность различных изоформ RHF10, их свойства и, как следствие, функции всего комплекса PBAF, который содержит соответствующие изоформы [2, 5]. Было показано [6, 7], что “длинная” изоформа RHF10, содержащая PHD-домены, необходима для пролиферации предшественников нейронов и промиелоцитов.

Повышенная экспрессия RHF10 наблюдается почти во всех онкотрансформированных клеточных линиях, которые культивируются в лабораторных условиях. Многие из этих линий также содержат повышенный уровень онкогена *c-MYC*, который является одним из генов раннего ответа и мощным активатором транскрипции генов пролиферации. Мы предположили, что белок *c-MYC*, как транскрипционный активатор, может стимулировать транскрипцию изоформ RHF10. Проверка этого предположения и составила предмет настоящего исследования.

Институт биологии гена
Российской Академии наук, Москва

*E-mail: so2615nat@gmail.com

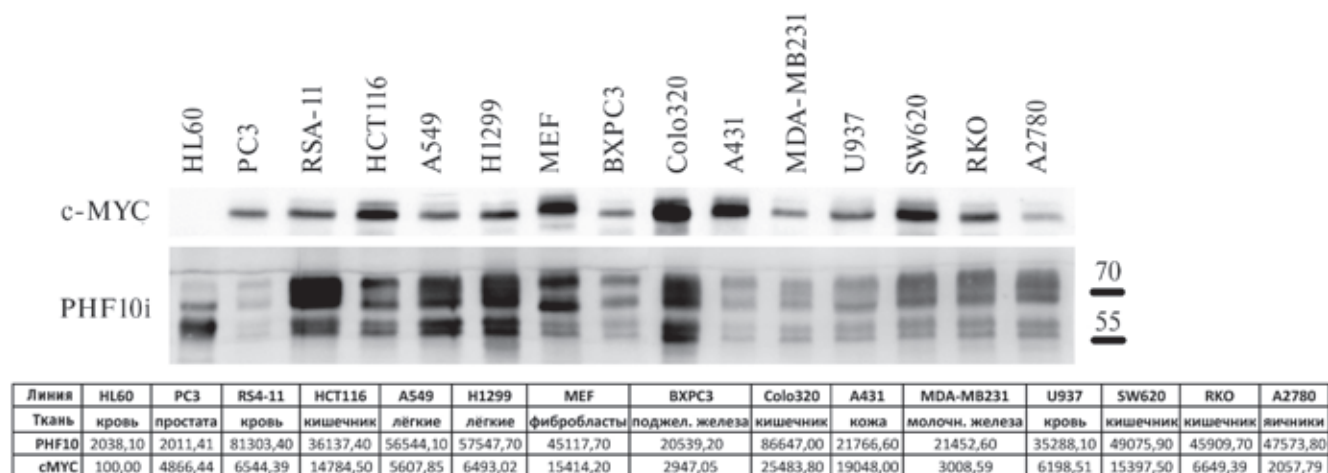


Рис. 1. Анализ экспрессии онкогена *c-MYC* и изоформ PNF10 в разных клеточных линиях. На двух верхних панелях — иммуноблоты лизатов клеточных линий. Для окрашивания использовали антитела против общего PNF10 (PNF10i) и против *c-MYC* (слева от панелей). По 30 мкг общего белка наносили в каждую лунку. На нижней панели — степень окраски антителами экспрессии PNF10 и *c-MYC* с помощью ImageJ для каждой клеточной линии. Также указано происхождение клеточных линий.

На первом этапе работы методом иммуноблоттинга мы определили уровень экспрессии изоформ PNF10 и онкогена *c-MYC* в пятнадцати онкотрансформированных клеточных линиях разного происхождения (рис. 1). Интенсивность окраски изоформ PNF10 и продукта онкогена *c-MYC*, выявленных с помощью специфических антител, оценили с помощью денситометрического анализа с использованием программного обеспечения ImageJ. Между экспрессией *c-MYC* и изоформами

PNF10 мы наблюдали положительную корреляцию (коэффициент рангов Спирмена составил 0,478, $n = 15$, $p = 0,073$). Таким образом, онкоген *c-MYC* может активировать экспрессию изоформ PNF10.

Далее в одной из описанных линий (SW620 рака кишечника) мы осуществили нокдаун онкогена *c-MYC* с помощью вектора pGPV. Для этого фрагмент двухцепочечной ДНК клонировали по сайтам рестрикции BamHI и EcoRI под промотор H1. При транскрипции РНК-полимеразой III

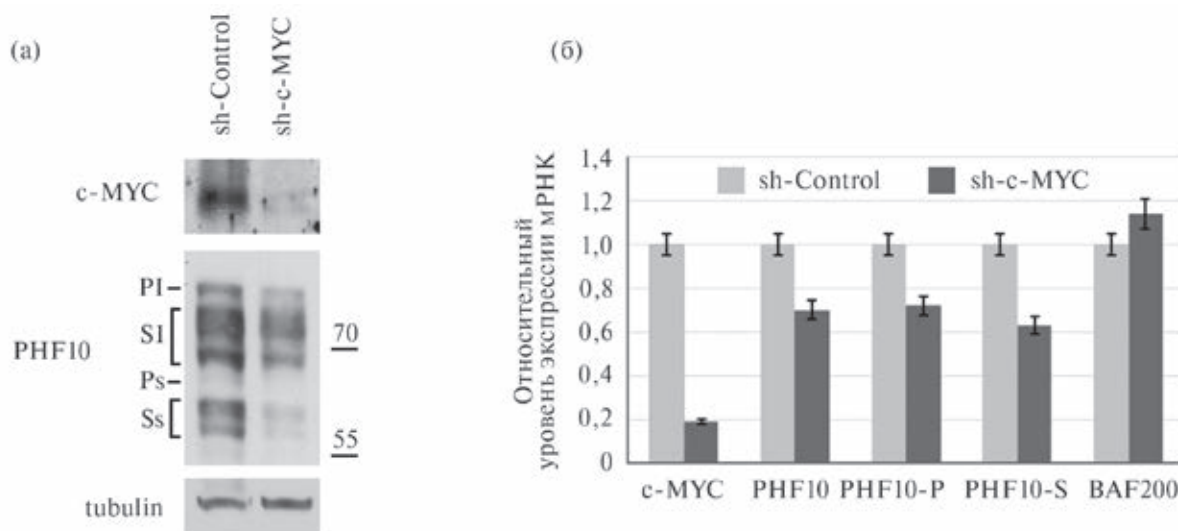


Рис. 2. Анализ уровня экспрессии в клетках линии SW620-shcMYC и контрольной линии SW620. sh-Control — контрольные клетки, трансформированные “пустой” плазмидой; sh-c-MYC — клетки, трансформированные плазмидой для стабильной экспрессии sh-c-MYC-pGPV. (а) — иммуноблоты лизатов клеток. Окрашивание антителами против тубулина (Tubulin) — контроль нанесения одинакового количества лизатов. PI, SI, Ps, Ss — изоформы PNF10, имеющие подвижность в районе 55 и 70 кДа. (б) — относительный уровень экспрессии РНК PNF10 и *c-MYC* в линиях SW620 с нокдауном MYC (*sh-c-MYC*) по сравнению с контрольными линиями. Нормирование проводили относительно экспрессии гена тубулина. мРНК субъединицы BAF200 комплекса PBAF измеряли для определения уровня экспрессии гена, который не зависел от *c-MYC*.

с этого промотора образуется двухцепочечная РНК (*shcMYC*), которая складывается в шпильку, далее процессируется клеточными эндонуклеазами и инициирует процесс РНК-интерференции. Для доставки вектора с целевыми шпильками против онкогена *c-MYC* использовали вирусные частицы, которые собирали предварительно в клетках НЕК293-Т. После трансдукции клеток SW620 собранными вирусными частицами проводили отбор клеток стабильно экспрессирующих необходимую конструкцию на антибиотике пурамицине.

После получения стабильно экспрессирующих *shcMYC* линий SW620 клетки мы оценили уровень экспрессии *c-MYC* по сравнению с контрольными клетками и влияние снижения экспрессии *c-MYC* на RNF10 (рис. 2). С помощью иммуноблоттинга мы оценили изменения экспрессии белков *c-MYC* и изоформ RNF10 (рис. 2а). При нокдауне с помощью векторов рGPV количество активатора *c-MYC* существенно снизилось в клетках SW620, что также привело к снижению количества изоформ RNF10 (рис. 2а).

Относительный уровень экспрессии мРНК онкогена *c-MYC* падал примерно в пять раз, что приводило к снижению экспрессии общего RNF10 и изоформ RNF10-P, RNF10-S по отдельности примерно на 30% (рис. 2б). Экспрессия другой субъединицы RBAF — комплекса BAF200 — не изменилась при подавлении *c-MYC* и определялась на уровне контроля. Таким образом, онкоген *c-MYC* действительно является активатором изоформ RNF10 в клетках линии SW620.

При различных онкотрансформациях клеток экспрессия онкогена *c-MYC* часто бывает повышена. Как активатор *c-MYC* стимулирует экспрессию ряда генов пролиферации (*CyclinD2*, *CyclinE1*, *CyclinA2*), как репрессор подавляет экспрессию блокаторов клеточного цикла (*p21/Cip*, *p15/INK4b*). Это ведёт к увеличению уровня пролиферации

клеток. Также *c-MYC* ингибирует транскрипцию генов *N-cadherin* и интегринов, что снижает адгезивные способности клеток и усиливает злокачественность опухоли и метастазирование [8].

Ранее было показано, что сверхэкспрессия RNF10 способствует прогрессии клеточного цикла [4]. Включаясь в состав комплекса RBAF, он привлекает РНК-полимеразу II на промоторы генов пролиферации [4]. При дополнительной стимуляции гена *RNF10* белком *c-MYC* уровень RNF10 в клетке может расти, что дополнительно будет способствовать делению клеток.

Таким образом, совместная повышенная экспрессия RNF10 и *c-MYC* в клетках может приводить к усиленной пролиферации онкотрансформированных клеток относительно действия каждого из факторов по отдельности.

Источник финансирования. Работа была поддержана грантом Программы фундаментальных исследований Президиума РАН “Наноструктуры: физика, химия, биология, основы технологий”.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wu J.I. // Acta. Biochim. Biophys. Sin. 2012. V. 44. P. 54–69.
2. Tatarskiy V.V., Simonov Y.P., Shcherbinin D.S. // Sci. Rept. 2017. V. 7. P. 5645–5648.
3. Азиева А.М., Шейнов А.А., Галкин Ф.А. и др. // ДАН. 2018. Т. 479. № 1. С. 66–68.
4. Brechalov A.V., Georgieva S.G., Soshnikova N.V. // Cell. Cycle. 2014. V. 13. P. 1970–1979.
5. Бречалов А.В., Валиева М.Е., Георгиева С.Г. и др. // Молекуляр. биология. 2015. Т. 50. № 1. С. 1–7.
6. Lessard J., Wu J.I., Ranish J.A. // Neuron. 2007. V. 55. P. 201–215.
7. Krasteva V., Crabtree G.R., Lessard J.A. // Exp. Hematol. 2017. V. 48. P. 58–71.
8. Miller M.D., Thomas S.D., Islam A. // Clin. Cancer Res. 2012. V. 18. P. 5546–5553.

ONCOGENE *c-MYC* CONTROLS THE EXPRESSION OF PHF10 SUBUNIT OF PBAF CHROMATIN REMODELING COMPLEX IN SW620 CELL LINE

Eu. V. Tatarskiy, Academician of the RAS G. P. Georgiev, N. V. Soshnikova

Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Received October 17, 2018

The PBAF(SWI/SNF) multiprotein complex, which changes the chromatin structure, is widely involved in the regulation of eukaryotic gene expression. A specific component of this complex is the PHF10 protein, which is involved in recruiting this complex to chromatin. We showed that the PHF10 expression in cells of different lines is activated by the *c-MYC* oncogene. Since PHF10 stimulates cell proliferation, its *c-MYC*-dependent activation in cancer cells should lead to an increase in their proliferation rate.

Keywords: PHF10, *c-MYC*, chromatin-remodelling complex SWI/SNF, PBAF, BAF.