

УДК 575.22:595.773.4

Sfmbt ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С БЕЛКОМ Hangover И СУБЪЕДИНИЦАМИ SWI/SNF-КОМПЛЕКСА У *Drosophila melanogaster*

© 2021 г. М. М. Ерохин¹, Ю. В. Шидловский¹, Д. В. Ломаев¹,
академик РАН П. Г. Георгиев¹, Д. А. Четверина^{1,*}

Поступило 23.04.2021 г.

После доработки 06.05.2021 г.

Принято к публикации 06.05.2021 г.

Белки группы Polycomb (PcG) представлены регуляторными комплексами, осуществляющими репрессию транскрипции. В настоящем исследовании методом аффинной очистки из ядерного экстракта с последующим высокоспецифичным пептидным секвенированием (IP/LC-MS) мы изучили интерактом фактора Sfmbt на эмбриональной стадии развития дрозофилы. В результате был обнаружен ряд ранее не охарактеризованных взаимодействий Sfmbt. В частности, основными партнерами Sfmbt являются ДНК-связывающий белок Hangover, а также компоненты SWI/SNF-комплекса ремоделеров хроматина.

Ключевые слова: *Drosophila*, Polycomb, PRE-элемент, репрессия транскрипции, SWI/SNF, Hangover

DOI: 10.31857/S2686738921050097

Репрессия транскрипции – сложно регулируемый процесс, который осуществляется многими факторами, в частности белками из группы Polycomb (PcG) [1–5]. Нарушения активности данных факторов наблюдаются при многих патологических состояниях, что повышает интерес к исследованиям в этой области [6–9]. PcG формируют несколько белковых комплексов (PRC1, PRC2, PhoRC), которые рекрутируются на специфические области хроматина, называемые Polycomb response elements (PREs). Комплекс PhoRC (Pho repressive complex), охарактеризованный у дрозофилы, содержит белок Sfmbt, а также ДНК-связывающий фактор Pho или его гомолог Phol. Несмотря на данные, согласно которым Pho/Phol необходимы для привлечения Sfmbt на хроматин, около 50% геномных областей, с которыми взаимодействует Sfmbt, не демонстрируют связывания Pho/Phol [10]. Таким образом, предполагается, что на ряд PRE-элементов Sfmbt рекрутируется за счет других ДНК-связывающих белков.

Структура Sfmbt и получение специфичных поликлональных антител

Белок Sfmbt имеет две основные изоформы длиной 1220 а.о. (изоформа Sfmbt-PB) и 868 а.о.

(изоформа Sfmbt-PA, рис. 1а). Обе изоформы содержат четыре MBT-повтора в середине белка (536–975 а.о. относительно изоформы B) и SAM-домен на С-конце (1140–1203 а.о. относительно изоформы B), однако изоформа Sfmbt-PA лишена N-концевого домена, имеющегося у Sfmbt-PB. Домен, содержащий четыре MBT-повтора, необходим для взаимодействия с ДНК-связывающими белками Pho и Phol, тогда как SAM-домен образует контакты с другим PcG-фактором – Scm [11].

Для получения поликлональных антител была создана конструкция для наработки антигена, соответствующего фрагменту С-конца белка Sfmbt (976–1139 а.о. изоформы B, рис. 1а). Данная область была выбрана в качестве антигена исходя из двух соображений. Во-первых, использованный участок присутствует в обеих изоформах Sfmbt. Таким образом, антитела, полученные к данной области, будут детектировать оба варианта белка Sfmbt. Во-вторых, участок между MBT-повторами и SAM-доменом уникален для Sfmbt и не содержит гомологий с другими белками. Полученная конструкция для наработки антигена была создана на основе вектора pET32a (Novagene) и содержала слитые в одну рамку считывания с фрагментом Sfmbt два шестикратных гистидиновых тага (6xHisTag, на N- и С-концах фрагмента Sfmbt), необходимые для последующей очистки антигена.

¹ Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: daria.chetverina@gmail.com

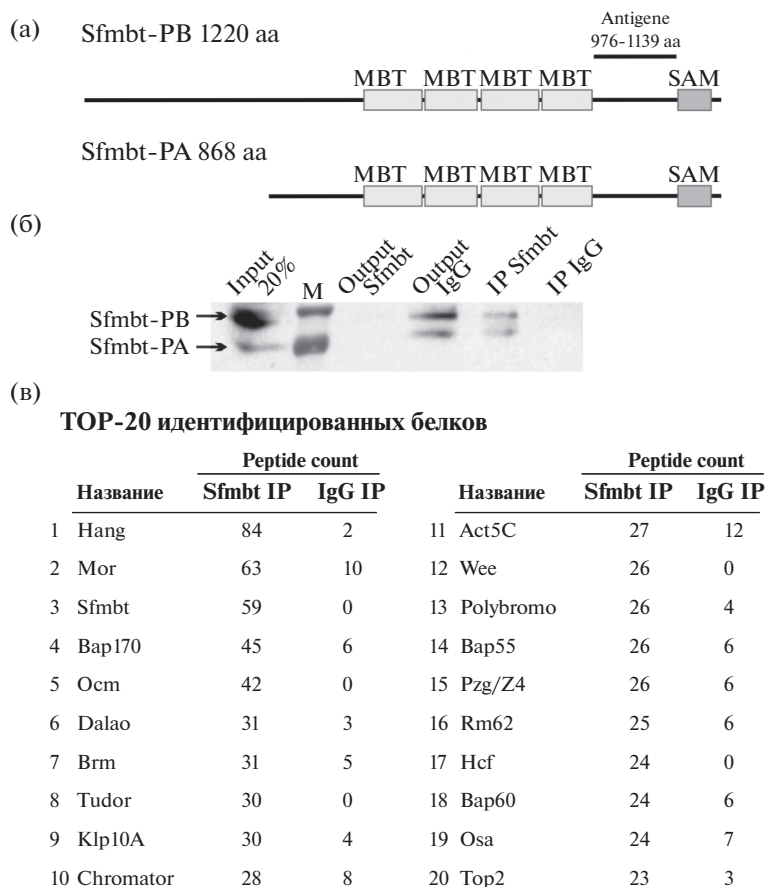


Рис. 1. (а) Структура белка Sfmibt у *Drosophila melanogaster* (показаны изоформы Sfmibt PB и PA). Серые прямоугольники – MBT-повторы, темно-серый прямоугольник – SAM-домен. Обозначенная область 976-1139 а.о. была использована в качестве антигена. (б) Результаты Western-блот-гибридизации, полученные при анализе алиquot очищенного комплекса Sfmibt. Стрелками указаны полосы, соответствующие изоформам PB и PA. Output – ядерный экстракт после инкубации с антителами против Sfmibt, либо против неспецифических антител (IgG). IP – элюированные пробы, полученные после инкубации с антителами против Sfmibt, либо против неспецифических антител (IgG). M – маркер длин, полосы соответствуют размерам 100 и 130 кДа. (в) 20 наиболее представленных белковых партнеров Sfmibt, идентифицированных в протеомном анализе. Показано число пептидов (peptide count) в случае иммунопреципитации с антителами против Sfmibt (столбец Sfmibt IP) и в случае использования неспецифических иммуноглобулинов (столбец IgG IP).

После наработки (в клетках *E. coli* BL21) и очистки (использована Ni Sepharose 6 Fast Flow, Sigma) антигена были проведены процедуры по иммунизации кроликов. Полученную сыворотку очищали с использованием исходного антигена, ковалентно пришитого к сефарозе CL-4B. Очищенные поликлональные антитела применяли для выделения белкового комплекса.

Очистка и анализ белкового комплекса Sfmibt

Для выявления белковых партнеров Sfmibt был применен метод иммунопреципитации из ядерного эмбрионального экстракта (возраст эмбрионов – 1–12 ч) с использованием полученных антител. Методы выделения ядерного экстракта и иммунопреципитации были подробно описаны ранее [12, 13].

На рис. 1б показаны результаты вестерн-блот анализа, проведенного с использованием алиquotы материала, который в дальнейшем был проанализирован методом пептидного секвенирования LC-MS. Для окрашивания были использованы те же антитела, что и для иммунопреципитации. В элюате, полученном с использованием специфических антител, детектируются две полосы, соответствующие по молекулярным массам изоформам Sfmibt-PB и Sfmibt-PA (расчетные массы 134 и 96 кДа соответственно). При этом данные полосы отсутствуют в контрольном эксперименте, где в качестве неспецифических антител были использованы IgG неиммунизированного животного. Вместе с тем анализ экстракта после инкубации с антителами (Output) показывает истощение Sfmibt в случае использования специфических антител в сравнении с контрольными IgG.

(a)			(б)			(в)		
Субъединицы комплексов семейства SWI/SNF			Канонические комплексы Polycomb			Белки с мотивом ZnF C2H2-type		
Название	Peptide count		Название	Peptide count		Название	Peptide count	
	Sfmbt IP	IgG IP		Sfmbt IP	IgG IP		Sfmbt IP	IgG IP
Mor	63	10	Комплекс Pho RC			Hang	84	2
Dalao	31	3	Sfmbt	59	0	Pzg/Z4	26	6
Brm	31	5	Pho	0	0	Pep	12	0
Act5C	27	12	PhoI	0	0	Cg (Combgap)	10	2
Var55	26	6	Комплекс PRC1			CG8108	10	2
Var60	24	6	Sce/dRing	2	0	MEP-1	9	0
Субъединицы, специфичные для комплекса PVAR			Ph-p	0	0			
Var170	45	6	Ph-d	0	0			
Polybromo	26	4	Pc	0	0			
SAYP	9	0	Psc	0	0			
Субъединицы, специфичные для комплекса VAR			Комплекс PRC2					
Osa	24	7	E(z)	4	0			
			Esc	4	0			
			Su(z)12	0	0			
			CafI-55	7	0			

Рис. 2. Sfmbt взаимодействует с ремоделерами хроматина и ДНК-связывающими факторами. Представлены результаты протеомного анализа для компонентов хроматин-ремоделирующего комплекса SWI/SNF (а), PcG-репрессоров (б) и белков с ДНК-связывающими мотивами типа “цинковые пальцы” C2H2-типа (в). Остальные обозначения как на рис. 1.

На следующем этапе выделенный материал анализировали методом масс-спектрометрии LC-MS, позволяющим идентифицировать все представленные в иммунопреципитате пептиды. Анализ проводился, как подробно описано ранее [13], для идентификации пептидов использованы базы данных UniProt *Drosophila melanogaster* и DTASelect. На рис. 1в показаны 20 идентифицированных белков, показавших наибольший уровень обогащения при проведении масс-спектрометрических исследований. Для белка Sfmbt было выявлено 59 пептидов против 0 пептидов в контрольном образце с неспецифическими антителами. Это подтверждает высокую специфичность проведенной очистки. Среди основных партнеров Sfmbt выделяются субъединицы комплексов ремоделеров хроматина семейства SWI/SNF. Детальный поиск субъединиц ремоделеров показал, что в иммунопреципитате присутствуют все компоненты комплексов VAR и PVAR (рис. 2а).

На следующем этапе мы проверили, какие еще белки из группы Polycomb детектируются в интрактом Sfmbt (рис. 2б).

Были найдены два белка, входящих в состав комплекса PRC2 (E(z) и Caf55), и один белок из комплекса PRC1 (Sce/dRING). Интересно, что ни белок Pho, ни белок PhoI, не детектировались в выделенном комплексе. Полученные данные

предполагают, что использованные нами антитела преципитируют Sfmbt в составе отличного от описанного ранее PhoRC комплекса. В данном комплексе также могут находиться компоненты с ДНК-связывающей активностью, необходимые для рекрутирования Sfmbt на хроматин. Предполагается, что основную роль в привлечении PcG-комплексов у дрозофилы играют белки с мотивами “цинковые пальцы” C2H2-типа [14]. Поэтому на следующем этапе мы провели поиск таких факторов в списке идентифицированных белков (рис. 2в). Самое большое число пептидов (84) соответствовало белку Hang (Hangover). Данный фактор содержит в своем составе 19 мотивов типа “цинковые пальцы” C2H2-типа. Кроме того, среди обнаруженных белков присутствовал фактор Combgap (Cg), для которого ранее были показаны связывание с PRE-элементами и взаимодействие с PcG-репрессорами [15].

Идентифицированные ДНК-связывающие белки потенциально могут принимать участие в привлечении Sfmbt в определенные локусы генома, однако конкретную роль выявленных факторов в процессах рекрутирования Sfmbt (как и, возможно, других PcG-репрессоров) предстоит установить в будущем.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 18-74-10091.

В работе была использована инфраструктура ЦКП ИБГ РАН и Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chetverina D.A., Elizar'ev P.V., Lomaev D.V., et al. // Russian Journal of Genetics. 2017. V. 53. № 2. P. 157–177.
2. Schuettengruber B., Bourbon H.M., Di Croce L., et al. // Cell. 2017. V. 171. № 1. P. 34–57.
3. Kassis J.A., Kennison J.A., Tamkun J.W. // Genetics. 2017. V. 206. № 4. P. 1699–1725.
4. Cheutin T., Cavalli G. // Crit Rev Biochem Mol Biol. 2019 V. 54 № 5. P. 399–417.
5. Kuroda M.I., Kang H., De S., Kassis J.A. // Annu. Rev. Biochem. 2020. V. 89. P. 235–253.
6. Chetverina D.A., Lomaev D.V., Erokhin M.M. // Acta Naturae. 2020. V. 12. № 4. P. 66–85.
7. Chetverina D.A., Lomaev D.V., Georgiev P. G., et al. // Russian Journal of Genetics. 2021. V. 57. № 3. P. 258–272.
8. Varlet E., Ovejero S., Martinez A.M., et al. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21 № 21. P. 8047.
9. Piunti A., Shilatjard A. // Nat Rev Mol Cell Biol. 2021.
10. Oktaba K., Gutiérrez L., Gagneur J., et al., // Dev Cell. 2008 V. 15. № 6. P. 877–889.
11. Frey F., Sheahan T., Finkl K., et al., // Genes Dev. 2016. V. 30 № 9. P. 1116–1127.
12. Shaposhnikov A.V., Lebedeva L.A., Chernioglo E.S., et al. // Bioorg Khim. 2016. V. 42. P. 712–721.
13. Lomaev D., Mikhailova A., Erokhin M., et al. // PLoS ONE. 2017. V. 12. e0173602.
14. Erokhin M., Georgiev P., Chetverina D. // Epigenomes. 2018. V. 2. № 1. P. 1–24.
15. Ray P., De S., Mitra A., et al., // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. № 14. P. 3826–3831.

Sfmbt CO-PURIFIES WITH HANGOVER AND SWI/SNF-REMODELERS IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

M. M. Erokhin^a, Y. V. Shidlovskii^a, D. V. Lomaev^a,
Academician of the RAS P. G. Georgiev^a, and D. A. Chetverina^{a,*}

^a Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: daria.chetverina@gmail.com

Polycomb group (PcG) proteins are chromatin-associated factors involved in the repression of gene transcription. In the present study, we characterized the interactome of the Sfmbt factor at the embryonic stage of development. For this the Sfmbt protein complex was affinity purified from the nuclear extract and followed by highly specific peptide sequencing (IP/LC-MS). As a result, a number of previously uncharacterized Sfmbt interactions were discovered. In particular, Sfmbt Top-interacting proteins include DNA-binding protein Hangover and components of the SWI/SNF family of chromatin remodelers.

Keywords: *Drosophila*, Polycomb, PRE-element, repression of transcription, SWI/SNF, Hangover