

УДК 577.218

РЕМОДЕЛИРУЮЩИЙ ХРОМАТИН КОМПЛЕКС РВАФ УЧАСТВУЕТ В АКТИВАЦИИ И РЕПРЕССИИ ГЕНОВ ВОСПАЛЕНИЯ

© 2023 г. А. В. Феоктистов^{1,2,*}, академик РАН С. Г. Георгиева¹, Н. В. Сошникова^{1,2}

Поступило 10.08.2023 г.

После доработки 08.09.2023 г.

Принято к публикации 08.09.2023 г.

Ремоделирующий хроматин комплекс РВАФ является одним из важнейших регуляторов состояния хроматина и транскрипции генов у высших эукариот. В данной работе изучена роль РВАФ в регуляции NF-κB – зависимой и JAK/STAT – зависимой активации генов воспаления. Показано, что разрушение модуля РВАФ, отвечающего за его связывание с хроматином промотора гена, изменяет уровень транскрипции генов обоих путей. Показано, что РВАФ может быть как активатором, так и репрессором генов воспаления. Таким образом, РВАФ является одним из важных регуляторов экспрессии генов воспаления.

Ключевые слова: SWI/SNF, эукариотические факторы транскрипции, воспаление, NF-κB, JAK/STAT, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S2686738923600462, **EDN:** GPQOZU

Для начала транскрипции необходимо взаимодействие транскрипционного аппарата, включающего РНК полимеразу II, основные факторы транскрипции и другие регуляторы с промоторной областью гена. Однако возможность такого связывания зависит от плотности расположения нуклеосом на промоторе, которая регулируется комплексами ремоделинга хроматина. Данные комплексы могут перемещать и убирать нуклеосомы на промоторе, меняя тем самым его структуру с так называемой “закрытой” на “открытую” (высокая и более низкая плотность нуклеосом соответственно).

Комплексы типа SWI/SNF, изменяющие структуру хроматина на промоторе генов, играют одну из важнейших функций в активации транскрипции. SWI/SNF делятся на подсемейства, комплексы BAF и PBAF, имеющие одинаковую структуру, в которой можно выделить каталитический модуль, включающий АТФазу BRG1, модуль ARP, имеющий структурную функцию, и модуль, отвечающий за взаимодействие комплек-

са с хроматином [1]. Комплекс РВАФ отличается от BAF несколькими субъединицами модуля (специфическими субъединицами), ответственными за связывание с хроматином, что определяет избирательность его взаимодействия с хроматином, имеющим определенную эпигенетическую структуру (рис. 1а). Комплекс РВАФ является важнейшим коактивационным комплексом, реструктурирующим хроматин. У млекопитающих РВАФ вовлечен в активацию большого числа генов, участвуя в контроле таких процессов, как пролиферация, дифференцировка клеток и онкогенез [2].

Ряд данных показывает, что комплексы SWI/SNF играют важную роль в активации генов воспаления. В ряде работ было показано взаимодействие субъединиц комплексов с белками транскрипционных факторов группы NF-κB, играющими центральную роль в индуцибельной экспрессии воспалительных генов. Так, АТФазы Brg1 и Brm взаимодействуют с Rel-A и Rel-B [3]. Rel-B также взаимодействует с несколькими субъединицами, общими для BAF и PBAF комплексов: BAF170, BAF155 и BAF60. Нокдаун субъединиц комплекса влияет на транскрипцию ряда генов воспаления, таких как Il12b, Ifnb1, Saa3, Ccl5, Nos2, Il6, Il12b [4]. Участие подсемейства BAF в активации генов воспаления было показано в нескольких работах. Так, его специфические субъединицы BAF45B и BAF45C взаимодействуют с p50, а BAF250 участвует в активации транскрипции генов Il6, CXCL1, IL1A, IL1B, IL6

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

²Центр точного геномного редактирования и генетических технологий для биомедицины Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, Москва, Россия

*e-mail a.feo95@mail.ru



Рис. 1. (а) Структура РВAF комплекса. В таблице обозначены субъединицы модуля: общие для всех комплексов типа SWI/SNF и специфические, присутствующие только в РВAF. Показан модуль, в который они входят, и их функции. (б) Нокдаун специфической субъединицы РВAF, белка BAF200 (B200), по сравнению с контрольными клетками (Конт) приводит к деградации других субъединиц специфического модуля: BAF180, BRD7 и PHF10, но не общих субъединиц – BAF155 и BAF47 в клетках HEK293. Окраска антителами против тубулина использовалась как контроль нанесения белкового экстракта.

и IL8. Однако роль РВAF в активации генов воспаления практически не изучена.

В настоящее время показано, что промоторы ряда генов раннего воспалительного ответа имеют более открытую структуру хроматина, чем промоторы поздних генов. Это делает их транскрипцию более независимой от необходимости ремоделирования хроматина (более подробная информация в обзоре [5]). Тем не менее комплекс РВAF был найден на промоторах ранних провоспалительных генов [6].

Данная работа была направлена на изучение роли РВAF в регуляции ранних генов воспаления, активирующихся сигнальным каскадом NF-κB и сигнальным путем JAK/STAT. Для работы была выбрана линия клеток HEK293, которая ранее эффективно использовалась другими авторами для изучения регуляции генов воспаления [7]. Была изучена транскрипция генов воспаления в норме и при связывании с их промотором РВAF, у которого был нарушен РВAF-специфический модуль, участвующий во взаимодействии с хроматином. Был проведен нокдаун компонента специфического модуля субъединицы BAF200. Клетки HEK293 были обработаны смесью трансфецирующего реагента Metafecten (Biontex) и короткими дуплексами РНК против BAF200 (BAF200_for: 5'-CAAGGGACUUCUGGCAAC-CAGGdTdT, BAF200_rev: 5'-CCUGGUUGC-CAGAAGUCCCUUGdTdT) или контрольными (Контр_for: 5'-AGGUCGAACUACGGGUCAAdT-dC, Контр_rev: 5'-UUGACCCGUAGUUCGACCU-dAdG) в течение 48 ч и затем клеточные лизаты про-

анализированы Вестер-блоттингом (рис. 1б). Антитела, использованные для детекции субъединиц, были ранее получены в нашей лаборатории и охарактеризованы [8, 9]. Наши эксперименты показали, что нокдаун BAF200 в клетках человека не влияет на каталитический модуль комплекса РВAF, но частично нарушает структуру модуля связывания хроматина, что приводит к деградации его компонентов, специфичных для РВAF: BAF180, BRD7 и PHF10. Как показано на рис. 1б, их уровень в клетке значительно понижается при нокдауне BAF200. В результате этого нарушается взаимодействие РВAF с хроматином на промоторах регулируемых генов [10].

Активацию транскрипции провоспалительных генов, зависящих от NF-κB сигнального пути, проводили добавлением к клеткам фактора некроза опухолей (ФНО) в количестве 20 нг/мл. Для работы были выбраны гены CXCL1, CXCL2, CXCL3, IL8, которые хорошо активируются при добавлении ФНО в клетках линии HEK293 (любезно предоставленной проф. И. Ронинсоном) [7]. Пик транскрипции этих генов достигается через один час после начала активации (рис. 2а). Поэтому все дальнейшие измерения проводили до активации транскрипции и через час после. Также с помощью иммунопреципитации хроматина мы показали локализацию BAF200 на промоторах данных генов без активации (рис. 2б). В основе этого эксперимента лежит осаждение изучаемого белка, взаимодействующего с хроматином, и предварительно сшитым с ним с помощью формальдегида, специфическими антителами.

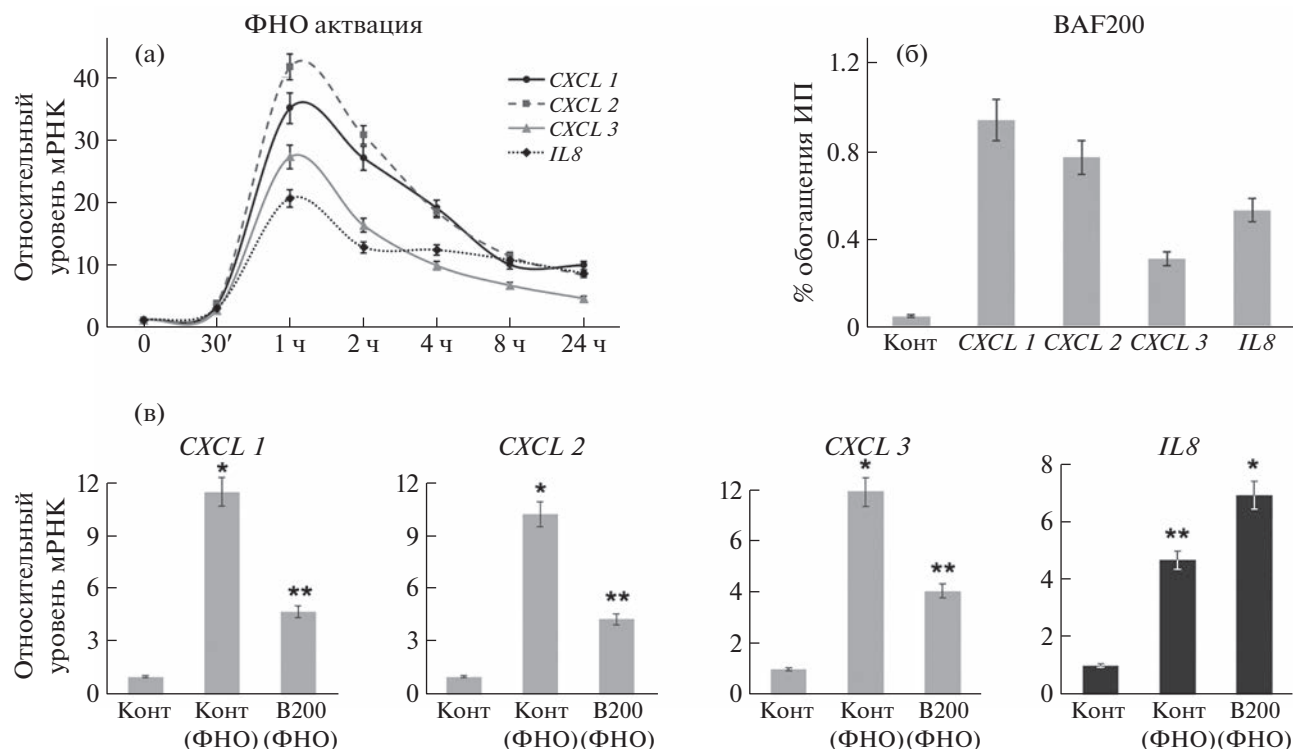


Рис. 2. (а) Активация генов воспаления *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3* и *IL8* в процессе активации NF-kB сигнального пути с помощью ФНО в течение 24 часов. (б) Показана локализация субъединицы BAF200 на промоторах изучаемых генов с помощью хроматин-иммунопреципитации. По оси у показаны проценты обогащения относительно вносимого материала (% обогащения ИП). Измерения проведены в 3 повторностях и представлены в виде среднее $\pm$ стандартное отклонение. (в) Уровень экспрессии генов *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3* и *IL8* без активации (Конт), при активации в течение одного часа (Конт (ФНО)) и при активации при нокдауне BAF200 (B200 (ФНО)) также в течение одного часа. По оси у показано изменение уровня РНК относительно контроля при нормировании на уровень экспрессии гена *RPLP0*. Во всех экспериментах измерения проведены в 3 повторностях и представлены в виде среднее $\pm$ стандартное отклонение. * — $p < 0.001$, ** — $p < 0.01$ по сравнению с контролем (однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественных сравнений Даннета).

ми. После осаждения, элюции и восстановления формальдегидных сшивок белки деградируют с помощью протеиназы К, а фрагменты ДНК выделяют и используют в качестве матрицы для количественной ПЦР в режиме реального времени со специфическими праймерами к определенному участку генома. Уровень транскрипции генов до активации, после активации ФНО и после активации на фоне нокдауна *BAF200* также измеряли методом количественной ПЦР в режиме реального времени. Экспрессию анализируемых генов нормировал на экспрессию гена *RPLP0*. Уровень транскрипции генов повышался примерно на порядок или больше после активации транскрипции. Нокдаун *BAF200* приводил к значительному падению уровня мРНК генов *CXCL1*, *CXCL2*, *CXCL3*, что показывает, что РВАФ является их коактиватором (рис. 2в). Уровень мРНК *IL8*, наоборот, понижался при нокдауне.

Аналогичные эксперименты были проведены на генах JAK/STAT зависимого пути *IFIT1*, *IFITM2*, *ISGF3G*. Активацию проводили добавлени-

ем к клеткам НЕК293 интерферона-А (ИФ) (1000 U/мл). В данном случае измерения проводили через 20 ч после начала активации, так как согласно нашим данным именно в это время достигается пик транскрипции изучаемых нами генов (рис. 3а). На промоторах этих генов BAF200 также локализуется в норме (рис. 3б). Наши результаты показали, что, в то время как все гены эффективно активировались добавлением ИФ, уровень мРНК генов *IFIT1*, *IFITM2* падал от нокдауна BAF200 примерно в два раза. Однако транскрипция гена *ISGF3G* вырастала примерно в 1.5 раза (рис. 3в).

Таким образом, наши результаты показывают, что РВАФ в зависимости от гена, на котором он присутствует, способен как стимулировать, так и подавлять его активацию. Можно предположить, что различное влияние РВАФ на транскрипцию обусловлено различной структурой хроматина промоторов ранних генов. На промоторе с более плотной организацией нуклеосом транскрипция не будет активироваться в отсутствие ремоделли-

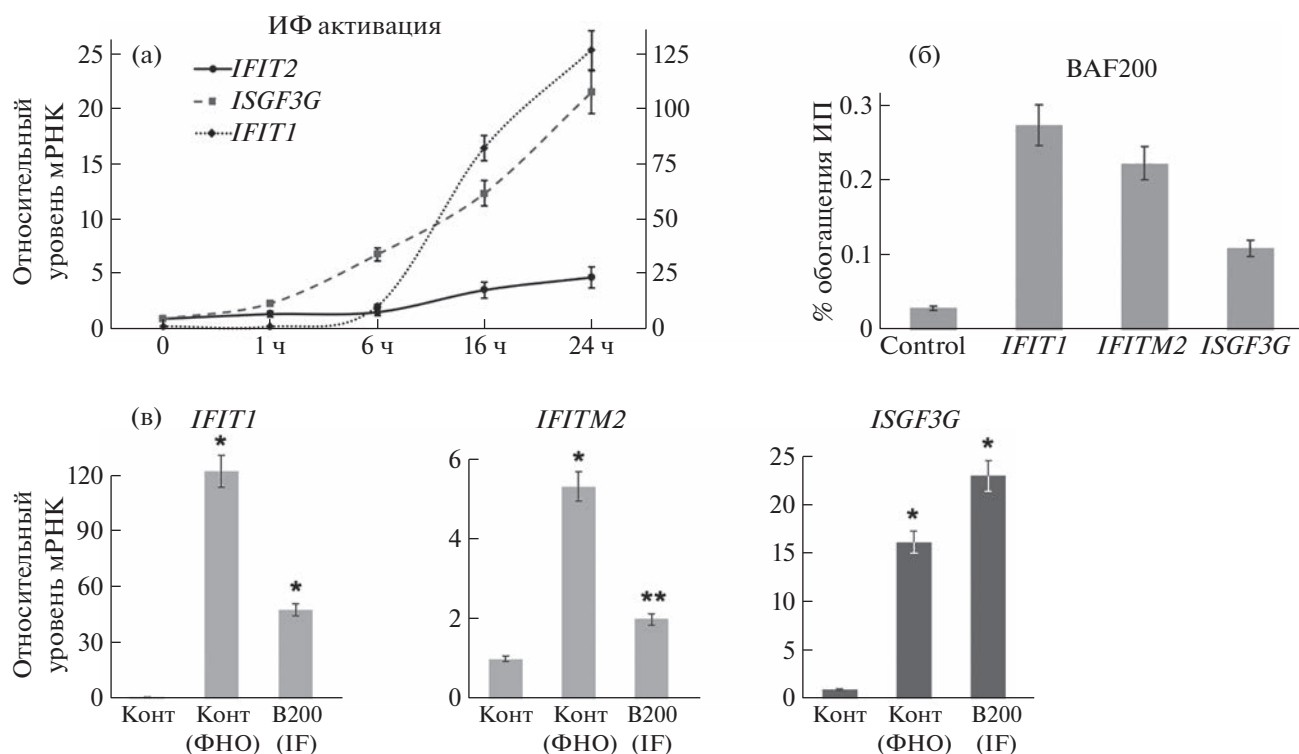


Рис. 3. (а) Активация генов воспаления *IFIT1*, *IFIT2* и *ISGF3G* в процессе активации JAK/STAT сигнального пути с помощью ИФ в течение 24 ч. По оси Y справа показан относительный уровень активации генов *IFIT2* и *ISGF3G*, по оси слева — уровень активации для гена *IFIT1*. (б) Показана локализация субъединицы BAF200 на промоторах изучаемых генов с помощью хроматин-иммунопреципитации. По оси Y показаны проценты обогащения относительно вносимого материала (% обогащения ИП). Измерения проведены в 3 повторностях и представлены в виде среднее $\pm$ стандартное отклонение. (в) Уровень экспрессии генов *IFIT1*, *IFIT2* и *ISGF3G* без активации (Конт), при активации в течение двадцати четырех часов (Конт (ИФ)) и при активации при нокдауне *BAF200* (B200 (ИФ)) также в течение двадцати четырех часов. По оси Y показано изменение уровня РНК относительно контроля при нормировании на уровень экспрессии гена *RPLP0*. Во всех экспериментах измерения проведены в 3 повторностях и представлены в виде среднее $\pm$ стандартное отклонение. * — $p < 0.001$, ** — $p < 0.01$ по сравнению с контролем (однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественных сравнений Даннета).

рования хроматина и нарушение взаимодействия комплекса с хроматином промотора приведет к значительному понижению транскрипции [11]. Наоборот, на открытых промоторах ремоделирование хроматина не является необходимым условием для начала транскрипции. В этом случае присутствие комплекса на промоторе может мешать связыванию других активаторов транскрипции, а его уход приводит к повышению транскрипционного уровня гена. То есть в данном случае РВАФ не позволяет генам активироваться неограниченно и важен для поддержания транскрипции на уровне, необходимом для координированной экспрессии генов воспаления.

Также можно предположить, что РВАФ ограничивает транскрипцию ряда генов воспаления за счет привлечения других регуляторных факторов. Так было показано, что в местах двойных разрывов ДНК субъединицы РВАФ, белки BRD7 и BAF180 фосфорилируются и привлекают в дан-

ный локус ингибиторы транскрипции, репрессивные комплексы Polycomb, PRC1 и PRC2 [12].

Для некоторых генов раннего воспалительного ответа было показано, что их промоторы имеют открытую структуру хроматина и нокдаун АТФаз Brg1 и Brgm не имеет значительного влияния на уровень их транскрипции [6]. Если структура промоторов исследованных нами генов также является открытой, можно предположить, что РВАФ на их промоторах имеет функции, отличные от ремоделинга хроматина. Действительно, как было показано ранее, только часть субъединиц РВАФ необходимо для ремоделинга *in vitro* [14]. Функции большинства субъединиц комплекса в регуляции транскрипции *in vivo* остаются неизвестными.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа была поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 21-14-00258).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yuan J. *et al.*, Structure of human chromatin-remodeling PBAF complex bound to a nucleosome, // *Nature*, 2022. V. 605. P. 166–171.
2. Centore R.C. *et al.*, Mammalian SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes: Emerging Mechanisms and Therapeutic Strategies, // *Trends in Genetics*, 2020. V. 36. № 12. P. 936–950.
3. Ishizaka A. *et al.*, Double plant homeodomain (PHD) finger proteins DPF3a and -3b are required as transcriptional co-activators in SWI/SNF complex-dependent activation of NF- κ B RelA/p50 heterodimer, // *Journal of Biological Chemistry*, 2012. V. 287. № 15. P. 11924–11933.
4. Ramirez-Carrozzi V.R. *et al.*, A unifying model for the selective regulation of inducible transcription by CpG islands and nucleosome remodeling // *Cell*, 2009. V. 138. № 1. P. 114–128.
5. Gioacchino Natoli, NF- κ B and chromatin: ten years on the path from basic mechanisms to candidate drugs // *Immunological Reviews*, 2012. V. 246. № 1. P. 183–192.
6. Ramirez-Carrozzi V.R. *et al.*, Selective and antagonistic functions of SWI/SNF and Mi-2 β nucleosome remodeling complexes during an inflammatory response // *Genes & Development*, 2006. V. 20. P. 282–296.
7. Chen M. *et al.*, CDK8/19 Mediator kinases potentiate induction of transcription by Nf κ B // *PNAS*, 2017. V. 114. № 38. P. 10208–10213.
8. Tatarskiy V.V. *et al.*, Stability of the PHF10 subunit of PBAF signature module is regulated by phosphorylation: role of β -TrCP // *Scientific Reports*, 2017. V. 7. P. 5645.
9. Brechalov A.V. *et al.*, Mammalian cells contain two functionally distinct PBAF complexes incorporating different isoforms of PHF10 signature subunit // *Cell Cycle*, 2014. V. 13. № 12. P. 1970–1979.
10. Soshnikova N.V. *et al.*, PHF10 subunit of PBAF complex mediates transcriptional activation by MYC // *Oncogene*, 2021. V. 40. № 42. P. 6071–6080.
11. Vorobyeva N.E. *et al.*, Transcription coactivator SAYP combines chromatin remodeler Brahma and transcription initiation factor TFIID into a single supercomplex // *PNAS*, 2009. V. 106. № 27. P. 11049–11054.
12. Min S. *et al.*, Transcriptional regulation and chromatin dynamics at DNA double-strand breaks // *Experimental & Molecular Medicine*, 2022. V. 54. P. 1705–1712.
13. Musladin S. *et al.*, The RSC chromatin remodeling complex has a crucial role in the complete remodeler set for yeast PHO5 promoter opening // *Nucleic Acids Research*, 2014. V. 42. № 7. P. 4270–4282.

CHROMATIN REMODELING COMPLEX PBAF ACTIVATES AND REPRESSES INFLAMMATORY GENES

A. V. Feoktistov^{a,b,#}, Academician of the RAS S. G. Georgieva^a, and N. V. Soshnikova^{a,b}

^aEngelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^bCenter for Precision Genome Editing and Genetic Technologies for Biomedicine, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail a.feo95@mail.ru

The PBAF chromatin remodeling complex regulates chromatin state and gene transcription in higher eukaryotes. In this work, we studied the role of PBAF in the regulation of NF- κ B- and JAK/STAT-dependent activation of inflammatory genes. We performed knockdown of specific module subunit BAF200 resulted in destruction of the entire PBAF specific module and changed the level of the genes transcription of both pathways. PBAF can be both an activator and a repressor of inflammatory genes. Thus, PBAF is one of the important regulators of inflammatory gene expression.

Keywords: SWI/SNF, eukaryotic transcription factors, inflammation, NF- κ B, Jak/STAT, gene expression