

УДК 577.218

КОНТАКТНОЕ ИНГИБИРОВАНИЕ ПРОЛИФЕРАЦИИ СОПРОВОЖДАЕТСЯ ЭКСПРЕССИЕЙ PHF10D СУБЪЕДИНИЦЫ РЕМОДЕЛИРУЮЩЕГО ХРОМАТИН КОМПЛЕКСА PBAF В КЛЕТОЧНЫХ ЛИНИЯХ МЫШИ И ЧЕЛОВЕКА

© 2024 г. Ю. П. Симонов¹, В. В. Татарский², академик РАН С. Г. Георгиева¹,
Н. В. Сошникова^{1,3, *}

Поступило 03.11.2023 г.

После доработки 17.11.2023 г.

Принято к публикации 17.11.2023 г.

Белок PHF10 входит в состав хроматин-ремоделирующего комплекса PBAF, регулирующего экспрессию широкого спектра генов в развивающемся и взрослом организме. PHF10 экспрессируется в виде нескольких изоформ, отличающихся доменной структурой. Изоформа PHF10A, содержащая С-концевой DPF-домен необходима для экспрессии генов пролиферации, функции остальных изоформ менее изучены. В данной работе мы установили, что при контактном ингибировании пролиферации клеток мыши и человека, прекращается экспрессия изоформы PHF10A и вместо нее экспрессируется изоформа PHF10D, не содержащая DPF-домен и 46 N-концевых аминокислот. Функция коротких PHF10D изоформ может быть связана с установлением межклеточных контактов.

Ключевые слова: Экспрессия генов, контактное ингибирование, ремоделинг хроматина, PBAF комплекс, PHF10, изоформы PHF10

DOI: 10.31857/S2686738924010211, **EDN:** KDLLXE

Комплексы семейства SWI/SNF (подсемейства BAF и PBAF) реструктурируют хроматин, используя энергию гидролиза АТФ. Комплексы перемещают нуклеосомы вдоль ДНК, увеличивая или уменьшая нуклеосомную плотность. Помимо основного фермента АТФазы комплексы содержат модуль для связывания нуклеосомы, ARP модуль и модуль, распознающий N-концевые последовательности гистонов (рис. 1, а) [1]. Субъединицы последнего определяет специфичность взаимодействия комплекса с хроматином. Например, комплекс подсемейства BAF включает субъединицу DPF3, которая

способна связывать H3K4me1. Эта модификация лизина N-конца гистона H3 является маркером энхансеров и, соответственно, рекрутирует комплексы BAF на энхансеры [2].

Данная работа посвящена изучению изоформ субъединицы PHF10 комплекса подсемейства PBAF. PHF10 экспрессируется в виде четырех изоформ, которые альтернативно включаются в состав модуля, распознающего модификации N-концов гистонов. Изоформы PHF10 отличаются N- и С-концевыми последовательностями (рис. 1, б). На С-конце двух из них (PHF10A и PHF10B изоформы) содержится DPF-домен, который, как было предсказано моделированием, по гомологии связывает H3K14ac модификацию [3]. В двух других изоформах (PHF10C и PHF10D) DPF заменен на PDSM-мотив, способный ковалентно присоединять SUMO1 убиквитин-подобный белок [4]. Также у двух изоформ (PHF10B и PHF10D) отсутствуют 46 N-концевых аминокислот. Изоформа PHF10A является активатором пролиферации и необходима для поддержания пролиферации нейрональных предшественников и фибробластов человека [5], а в дифференцированных нейронах мыши и нейтрофилах человека PHF10 представлен короткой

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

² Институт биологии гена Российской академии наук,
Москва, Россия

³ Центр точного геномного редактирования и
генетических технологий для биомедицины Института
молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта,
Москва, Россия

*E-mail: so2615nat@gmail.com

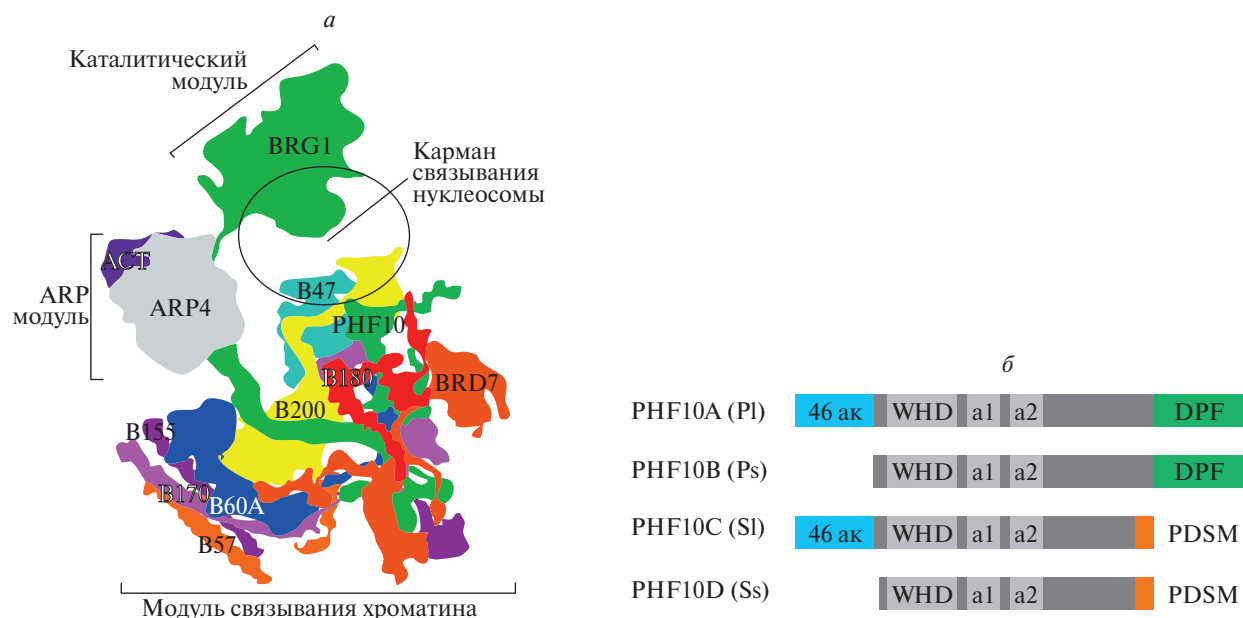


Рис. 1. (а) Схематичное изображение комплекса PBAF. Разными цветами указаны разные субъединицы и обозначены модули комплекса (адаптировано из [1]). (б) Доменная организация изоформ PHF10. Обозначены различные домены. Зеленым, синим и оранжевым указаны последовательности, которыми отличаются изоформы.

PHF10D изоформой, лишенной N-концевой последовательности и DPF-домена [6, 7]. В данной работе мы показали, что аналогичная смена изоформ происходит при контактном ингибировании роста в клетках человека и мыши различного происхождения.

Контактное ингибирование (торможение) пролиферации – фундаментальное свойство, при котором нормальные клетки прекращают делиться, когда занимают все пространство, отведенное им после достижения полной конfluэнтности [8]. При этом остановка деления и выход из клеточного цикла в организме также ассоциированы с дифференцировкой клеток. Однако, в отличие от дифференцировки, контактное ингибирование является обратимым в физиологических условиях, требующих быстрого роста и пролиферации клеток, таких как эмбриональное развитие, заживление ран или регенерация тканей. Патологически потеря контактного торможения приводит к неконтролируемому росту клеток (характерно для солидных опухолей) и увеличивает способность клеток проникать в ткани хозяина (как при метастазировании) [9]. В условиях *in vitro* при работе на клеточных линиях контактное ингибирование пролиферации возникает при достижении клетками высокой плотности роста.

В данной работе было изучено влияние контактного ингибирования пролиферации, возникающего при высокой плотности клеток, на экспрессию изоформ PHF10. Показано, что в immortalized мышечных фибробластах MEF и клеточной линии человека низкодифференцированной карциномы кишечника RKO при контактном торможении происходит снижение экспрессии изоформ PHF10A. При этом начинается интенсивная экспрессия самой короткой изоформы, PHF10D, у которой отсутствует DPF-домен и 46 N-концевых аминокислот. Замена изоформ в составе комплекса PBAF может влиять на паттерны ремоделируемых генов и функциональные особенности комплексов PBAF в пролиферативно активных и неактивных клетках.

Чтобы определить, происходит ли изменение экспрессии изоформ PHF10 при контактном ингибировании пролиферации, была выбрана immortalized мышечная линия мышечных эмбриональных фибробластов MEF. Клетки данной линии при увеличении плотности выходят из клеточного цикла. Клетки MEF были рассажены в 60 мм чашки в плотности 100 000 клеток, и дальнейшее увеличение их плотности контролировали с помощью световой микроскопии (рис. 2, а). Клетки были собраны на первый, третий и на четвертый день после пасса-

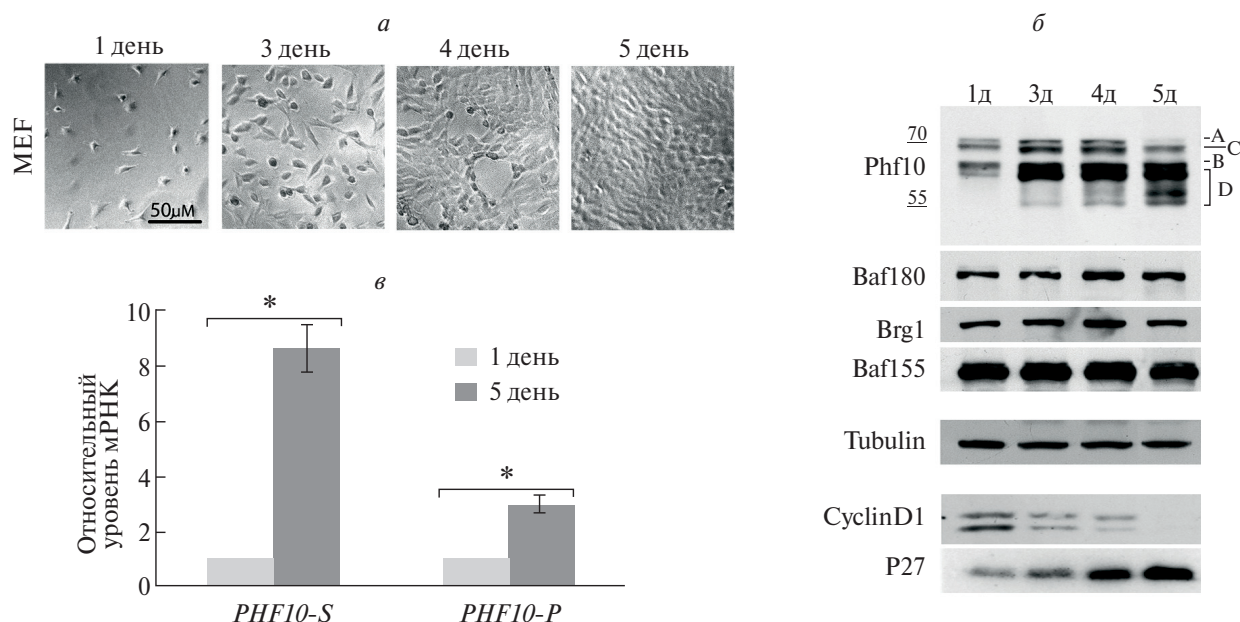


Рис. 2. (а) Мышьиные эмбриональные фибробласты MEF через 1, 3, 4 и 5 дней после пассажа на 60 мм чашки Петри. (б) Вестерн-блоттинг изоформ Phf10 (указаны справа на верхней панели), субъединиц комплекса PBAF: Baf180, Brg1, Baf155 в лизатах MEF, отобранных в различной плотности. Окрашивание антителами к б-тубулину использовали в качестве контроля нанесения. Изменение экспрессии Циклина Д1 (CyclinD1) и P27 характеризует свойство клеток пролиферировать. (в) Изменение уровня мРНК изоформ Phf10, содержащих DPF-домен (Phf10P = Phf10A + Phf10B) и содержащих PDSM-мотив (Phf10-S = Phf10C + Phf10D) на С-конце. 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. * — $p < 0.005$ сравнение с контролем (однофакторный дисперсионный анализ с критерием множественных сравнений Даннета).

жа, а также на пятый день (когда клетки достигли полной конfluence). Экспрессию изоформ Phf10, других белков комплекса PBAF и маркеров клеточного цикла (циклин Д и P27) анализировали на Вестерн-блоте (эксперимент был проведен в двух повторностях). С увеличением плотности в клетках прекращалась экспрессия циклина Д (CyclinD), который вместе с CDK4,6-киназами стимулирует прогрессию клеточного цикла, и увеличивалась экспрессия P27 — ингибитора CyclinD-CDK4,6. Смещение равновесия экспрессии в сторону P27 характеризует клетки в состоянии временной остановки пролиферации (quiescence) [10]. В делящихся клетках MEF через день после пассажа экспрессировались Phf10A, Phf10B и на небольшом уровне Phf10C (рис. 2, б). Однако уже на третий день, параллельно с началом возникновения контактов между клетками (рис. 2, а) наблюдалось сильное увеличение экспрессии Phf10D. При достижении клетками полной конfluence на пятый день экспрессия Phf10A прекращалась, немного возрастала Phf10B и очень сильно возросла экспрессия

Phf10D изоформы (на вестерне они визуализируется в виде нескольких полос, так как изоформы Phf10 интенсивно фосфорилируются) (рис. 2, б). Экспрессия других субъединиц PBAF комплекса — специфической субъединицы Baf180 и коровых субъединиц Brg1 и Baf155 не менялась (рис. 2, б).

Изменение экспрессии изоформ Phf10 подтверждаются измерением уровня РНК методом количественной ПЦР, выполненным на матрице кДНК с суммарной клеточной мРНК. Используемые праймеры позволяют отличить суммарное количество транскриптов DPF-содержащих изоформ Phf10A и Phf10C (вместе обозначаются как Phf10-P) от транскриптов изоформ Phf10B и Phf10D (вместе обозначаются как Phf10-S), не содержащих DPF-домен. Экспрессии транскриптов, кодирующих изоформы Phf10-S увеличивались более чем в восемь раз, а транскриптов, кодирующих Phf10-P, примерно в три раза за счет Phf10B-изоформ (рис. 2, в).

Таким образом, в клетках MEF при ингибировании пролиферации, вызванным контактными тор-

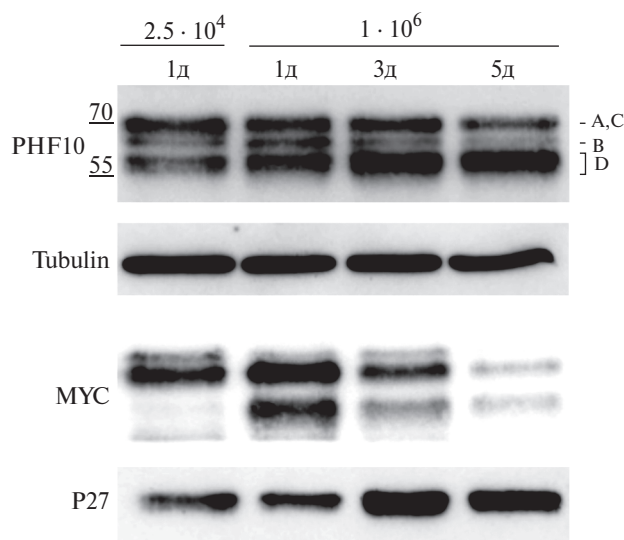


Рис. 3. Вестерн-блоттинг изоформ PHF10 (указаны справа на верхней панели) в лизатах клеток RKO, отобранных в различной плотности. Окрашивание антителами к β -тубулину использовали в качестве контроля нанесения. Изменение экспрессии MYC и P27 характеризуют свойство клеток пролиферировать.

можением, прекращается экспрессия Phf10A и начинается активная экспрессия Phf10D изоформы.

Чтобы понять является ли переключение изоформ при контакдном ингибировании процессом, происходящим в различных клетках и у различных видов млекопитающих, мы выбрали линию низкодифференцированной карциномы кишечника человека RKO (ATCC CRL-2577). Эта линия не дифференцируется, но при достижении высокой плотности останавливается в делении и выходит в состояние временной остановки пролиферации. Клетки были рассажены на 60 мм чашки Петри с более низкой и более высокой плотностью: в количестве 250 000 и 1 млн клеток на чашку. Клетки, рассаженные в высокой плотности, растили еще пять дней, анализируя экспрессию PHF10 и других факторов методом Вестерн-блоттинга (эксперимент был проведен два раза).

Уже через сутки после пассажа роста в клетках, высаженных с более высокой плотностью, наблюдали повышенную экспрессию PHF10D по сравнению с клетками низкой плотности (рис. 3, сравните $2.5 \cdot 10^4$ и $1 \cdot 10^6$ через 1 день). С течением времени в клетках, высаженных в высокой плотности, увеличивалась экспрессия ингибитора пролиферации P27 и падала экспрессия транскрипционного фактора MYC, который стимулирует транскрипцию генов, отвечающих за прохождение G/S «чекпойнта»

и прогресс клеточного цикла (рис. 3) [11]. Это указывает, что в клетках RKO при увеличении плотности наблюдалась остановка пролиферации. Экспрессия PHF10D увеличивалась уже через трое суток после пассажа (сравните $1 \cdot 10^6$ через 1 и 3 дня), а через пять дней PHF10D становились преобладающими среди всех изоформ PHF10. Экспрессия PHF10A, C и B уменьшалась в клетках RKO, находящихся в контактном ингибировании по сравнению с пролиферирующими клетками. Таким образом, в культуре клеток человека, как и в фибробластах мыши при возникновении контактного ингибирования начинается интенсивная экспрессия PHF10D изоформы и происходит заметное снижение экспрессии PHF10A и PHF10C-изоформ.

Механизмы, управляющие контактным ингибированием, во многом не изучены, однако известно, что в ответ на механический сигнал, генерируемый «тянущими силами» внеклеточного матрикса, или при образовании плотных межклеточных контактов (tight junction и adherent junction), или при взаимодействии клеток, опосредованном е-кадгеринами (e-cadherins), активируется сигнальный путь Hippo, в процессе реализации которого киназы LATS1/2, MST1/2 фосфорилируют транскрипционные факторы YAP/TAZ, которые перемещаются из ядра в цитоплазму и деградируют. При этом часть генов ингибируется, часть активируется [12–14]. В ядре YAP/TAZ взаимодействуют с TEAD транскрипционными факторами, и совместно стимулируют экспрессию генов, отвечающих за рост клеток и организма, и ингибируют проапоптотические гены [12].

Наши результаты показывают, что при увеличении плотности клеток и контактном ингибировании пролиферации происходит изменение экспрессии изоформ PHF10: в клетках сильно падает уровень изоформы PHF10A и начинается экспрессия изоформы PHF10D, которая становится доминантной. Таким образом, в PBAF происходит замена изоформ, так как ранее мы показали, что все изоформы PHF10 включаются в комплекс. Изоформы PHF10D структурно сильно отличаются от PHF10A (рис. 1, б), у PHF10D отсутствует DPF-домен, участвующий во взаимодействии с гистонами. Изоформы также отличаются паттернами фосфорилирования, что указывает на их различную регуляцию. Ранее нами и другими исследователями было установлено, что длинная DPF-содержащая изоформа PHF10A необходима для пролиферации клеток [4, 5, 15]. В частности, комплекс PBAF, содержащий PHF10A, является коактиватором транскрипционного фактора MYC, который необходим для активации генов S-фазы и прогрессии клеточного цикла [11]. Возможно, комплекс PBAF, включающий PHF10A-изоформу, также является коактиватором YAP/TAZ транскрипционных факторов. Было по-

казано, что функция коротких PHF10D-изоформ может связана с дифференцировкой нейрональных и миелиодных клеток и понижение ее уровня ведет в этих клетках к понижению транскрипции генов участвующих в дифференцировке [6, 7]. Учитывая результаты данной работы, можно предположить, что в ряде клеток PHF10D может также отвечать за установлением межклеточных контактов. Включение PHF10D-изоформы в состав PBAF-комплекса позволяет ему связываться с хроматином генов, активно транскрибирующихся в конечно-дифференцированных непродлиферирующих клетках, устанавливающих большое количество контактов с соседними клетками.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Данная работа была поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований (№ 21-14-00258) и грантом № CRP/22/014.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen K., Yuan J., Sia Y., Chen Z. Mechanism of action of the SWI/SNF family complexes // *Nucleus*. 2023. V. 14.
2. Local A., Huang H., Albuquerque C. P., Singh N., Lee A. Y., Wang W., Wang C., Hsia J. E., Shiau A. K., Ge K., Corbett K. D., Wang D., Zhou H., Ren B. Identification of H3K4me1-associated proteins at mammalian enhancers // *Nat. Genet.* 2018. V. 50. P. 73–82.
3. Chugunov A. O., Potapova N. A., Klimenko N. S., Tatarskiy V. V., Georgieva S. G., Soshnikova N. V. Conserved Structure and Evolution of DPF Domain of PHF10-The Specific Subunit of PBAF Chromatin Remodeling Complex // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22.
4. Brechalov A. V., Georgieva S. G., Soshnikova N. V. Mammalian cells contain two functionally distinct PBAF complexes incorporating different isoforms of PHF10 signature subunit // *Cell Cycle*. 2014. V. 13. P. 1970–1979.
5. Lessard J., Wu J. I., Ranish J. A., Wan M., Winslow M. M., Staahl B. T., Wu H., Aebersold R., Graef I. A., Crabtree G. R. An essential switch in subunit composition of a chromatin remodeling complex during neural development // *Neuron*. 2007. V. 55. P. 201–215.
6. Viryasova G. M., Tatarskiy Jr V. V., Sheynov A. A., Tatarskiy E. V., Sud'ina G. F., Georgieva S. G., Soshnikova N. V. PBAF lacking PHD domains maintains transcription in human neutrophils // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* 2019. V. 1866. P. 118525.
7. Soshnikova N. V., Azieva A. M., Klimenko N., Khamidullina A. I., Feoktistov A. V., Sheynov A. A., Brechalov A. V., Tatarskiy V. V., Georgieva S. G. A novel chromatin-remodeling complex variant, dcPBAF, is involved in maintaining transcription in differentiated neurons // *Front. Cell Dev. Biol.* 2023. V. 11. P. 1271598.
8. Eagle H., Levine E. M. Growth regulatory effects of cellular interaction // *Nature*. 1967. V. 213. P. 1102–1106.
9. McClatchey A. I., Yap A. S. Contact inhibition (of proliferation) redux // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2012. V. 24. P. 685–694.
10. Fan Y., Meyer T. Molecular control of cell density-mediated exit to quiescence // *Cell Rep.* 2021. V. 36. P. 109436.
11. Benaud C. M., Dickson R. B. Adhesion-regulated G1 cell cycle arrest in epithelial cells requires the downregulation of c-Myc // *Oncogene*. 2001. V. 20. P. 4554–4567.
12. Gumbiner B. M., Kim N.-G. The Hippo-YAP signaling pathway and contact inhibition of growth // *J. Cell Sci.* 2014. V. 127. P. 709–717.
13. Aragona M., Panciera T., Manfrin A., Giullitti S., Michielin F., Elvassore N., Dupont S., Piccolo S. A mechanical checkpoint controls multicellular growth through YAP/TAZ regulation by actin-processing factors // *Cell*. 2013. V. 154. P. 1047–1059.
14. Zeng Q., Hong W. The emerging role of the hippo pathway in cell contact inhibition, organ size control, and cancer development in mammals // *Cancer Cell*. 2008. V. 13. P. 188–192.
15. Banga S. S., Peng L., Dasgupta T., Palejwala V., Ozer H. L. PHF10 is required for cell proliferation in normal and SV40-immortalized human fibroblast cells // *Cytogenet. Genome Res.* 2009. V. 126. P. 227–242.

CONTACT INHIBITION OF PROLIFERATION IS ACCOMPANIED BY EXPRESSION OF THE PHF10D SUBUNIT OF THE CHROMATIN REMODELING COMPLEX PBAF IN MOUSE AND HUMAN CELL LINES

Yu. P. Simonov^a, V. V. Tatarskiy^b, academician of the RAS S. G. Georgieva^a, N. V. Soshnikova^{a,c, #}

^a*Department of Transcription Factors, Engelhardt Institute of Molecular Biology,
Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

^b*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

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

[#]*E-mail: so2615nat@gmail.com*

PHF10 is a subunit of the PBAF complex, which regulates the expression of many genes in developing and maturing organisms. PHF10 has four isoforms that differ in domain structure. The PHF10A isoform, containing a DPF domain at the C-terminus and 46 amino acids at the N-terminus, is necessary for the expression of gene proliferation; the functions of the other isoforms are less studied. In this work, we have established that upon contact inhibition of mouse and human cell proliferation caused by the establishment of a tight junction and adherence junction between cells, the expression of the PHF10A isoform stops and instead the PHF10D isoform is expressed, which does not contain DPF-domain and N-terminal sequence. The function of the PHF10D isoform may be associated with the establishment of intercellular contacts.

Keywords: Gene expression, contact inhibition, chromatin remodeling, PBAF complex, PHF10 isoforms