

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА**

*На правах рукописи*



**Вирясова Галина Михайловна**

**Роль ремоделирующего хроматин комплекса РВАФ в процессе  
миелоидной дифференцировки клеток крови человека**

Специальности

02.00.10 – биоорганическая химия

03.01.03 - молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Работа выполнена в Научно-исследовательском институте физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова» (НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ) и в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН).

**Научные руководители:** **Судьина Галина Федоровна**  
доктор химических наук, профессор, ведущий научный сотрудник,  
НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ

**Сошникова Наталия Валерьевна**  
кандидат биологических наук, старший научный сотрудник, ИБГ РАН

**Официальные оппоненты:** **Белогуров Алексей Анатольевич**  
доктор химических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией белков гормональной регуляции, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

**Лагарькова Мария Андреевна**  
доктор биологических наук, профессор РАН, член-корр. РАН, руководитель лаборатории клеточной биологии, Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства

**Иванов Александр Владимирович**  
кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Защита диссертации состоится «17» декабря 2019 г. в 17.00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.02.03 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40, МГУ, Лабораторный корпус «А», аудитория 501.

E-mail: galina.viryasova@yandex.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/249192952/>

Автореферат разослан «\_\_\_» ноября 2019 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
кандидат химических наук, доцент



Смирнова И.Г.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Актуальность работы**

Клетки крови проходят сложный путь развития от образующихся в костном мозге предшественников до полностью дифференцированных клеток, таких как лимфоциты, моноциты, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы и эритроциты. Нейтрофилы являются важными клетками организма, обеспечивающими первичный неспецифический иммунный ответ. Дифференцировка нейтрофилов осуществляется в костном мозге из гематопозитических стволовых клеток по миелоидному пути. В ходе дифференцировки происходят изменения в экспрессии генов, которые приводят к значительной специализации клеток и изменению их морфологии. При нарушениях в процессах дифференцировки возникают трудноизлечимые заболевания, например, различные формы лейкозий.

Для поддержания правильной структуры хроматина в процессе деления клеток и их дифференцировки необходима корректная работа комплексов, ремоделирующих хроматин. Комплекс РВАФ, относящийся к семейству ремоделирующих комплексов SWI/SNF, осуществляет реструктурирование хроматина и является одним из наиболее важных мультибелковых комплексов, контролирующих транскрипцию генов и влияющих на дифференцировку клеток. Комплекс РВАФ состоит из 12 субъединиц. Состав входящих в него субъединиц отличается в разных тканях организма и определяет «паттерн» (набор) регулируемых им генов и программу развития организма.

В настоящее время активно изучается роль ремоделирующих хроматин комплексов в процессах дифференцировки клеток и развития организма. Несмотря на то, что дифференцировка стволовых клеток крови по миелоидному пути в нейтрофилы исследована достаточно подробно, существует всего несколько работ, в которых была рассмотрена роль комплекса РВАФ в этом процессе. Однако, без сомнения, функции этого комплекса важны для миелоидной дифференцировки. В частности, было показано, что доминантно-негативная экспрессия гена главной АТФазы комплекса (Brg1) замедляет скорость дифференцировки и появление специфических белков-маркеров. При отсутствии в миелобластах некоторых субъединиц комплекса ареста клеточного цикла, необходимого для дифференцировки, не происходит. Несколько больше известно про участие комплекса РВАФ в дифференцировке гематопозитических плюрипотентных клеток, где этот комплекс способствует прохождению каждой стадии, при этом изменяется экспрессия генов некоторых его субъединиц. Регуляция этих процессов пока изучена недостаточно. Интересно, что ремоделирующие хроматин комплексы могут способствовать активации и репрессии транскрипции одних и тех же генов на разных стадиях дифференцировки. Вероятно, это объясняется изменением состава субъединиц в комплексе в процессе развития, что было показано на примере дифференцировки предшественников нервных клеток в нейроны

головного мозга мыши. Альтернативные субъединицы РВАФ-комплекса могут быть как гомологами и продуктами разных генов, так и изоформами одного белка, и могут выполнять различные функции. Одна из субъединиц комплекса РВАФ, белок РНФ10, в клетках млекопитающих представлен четырьмя изоформами, с индивидуальными свойствами и доменной структурой. Известно, что некоторые изоформы РНФ10 стимулируют пролиферацию предшественников нейронов, фибробластов человека и клеточной культуры НЕК293, а другие – нет. Нокаут РНФ10 в клетках мыши элиминирует пул предшественников миелоцитов, но роль изоформ в этом процессе не изучалась (Krasteva *et al.*, 2017). Комплекс РВАФ и его субъединица РНФ10 необходимы для развития клеток организма, включая клетки крови, что объясняет актуальность данного исследования.

### **Степень разработанности проблемы**

На данный момент механизм участия ремоделирующего хроматин комплекса РВАФ в дифференцировке клеток крови и его роль в развитии различных заболеваний остаются не до конца изученными, но такие исследования имеют большое значение как для фундаментальной науки, так и для медицины. Понимание процессов, необходимых для правильного развития клеток крови, открывает широкие возможности как для улучшения диагностики различных патологий, так и для разработки более современных методов лечения заболеваний клеток крови, например, генной терапии. В рамках данной диссертационной работы была использована модельная система дифференцировки, включающая как клеточную линию (раковые промиелоциты HL-60), так и первичные клетки (нейтрофилы) человека, позволившая изучить количественный и качественный состав комплекса РВАФ, а также определить его роль в активации транскрипции генов, необходимых для развития клеток крови по миелоидному пути.

### **Цели и задачи работы**

Целью данной работы являлось изучение субъединичного состава комплекса РВАФ семейства SWI/SNF и его роли в активации транскрипции специфических генов в ходе миелоидной дифференцировки клеток крови человека.

Были сформулированы следующие задачи работы:

1. Охарактеризовать клеточную модель для изучения роли комплекса РВАФ в миелоидной дифференцировке.
2. Изучить уровень экспрессии генов субъединиц комплекса РВАФ на разных стадиях миелоидной дифференцировки.
3. Определить соотношения изоформ РНФ10 на разных стадиях миелоидной дифференцировки.
4. Изучить роль комплекса РВАФ и изоформ РНФ10 в регуляции транскрипции специфических миелоидных генов.

**Объект исследования** — ремоделирующий хроматин комплекс РВАФ.

**Предмет исследования** — функции и субъединичный состав комплекса РВАФ семейства SWI/SNF в активации транскрипции специфических генов в ходе миелоидной дифференцировки клеток крови человека.

### **Научная новизна**

Впервые показано, что в ходе дифференцировки промиелоцитов человека в нейтрофилы эффективность экспрессии генов субъединиц комплекса РВАФ, взаимодействующих с промоторами миелоидных генов, уменьшается. Изменяется также субъединичный состав комплекса РВАФ: изоформы субъединицы РНФ10, содержащие РНД-домен (Р-изоформы), заменяются на более короткую Ss-изоформу, в которой отсутствует домен РНД. Комплекс РВАФ, включающий Р-изоформы РНФ10, привлекается на промоторы специфических миелоидных генов белков семейства CD66 и гена белка Р21, отвечающего за выход клеток из клеточного цикла, в процессе активации их транскрипции. Доказано, что Р-изоформы необходимы для начала активной транскрипции генов, ответственных за дифференцировку, тогда как Ss-изоформы характерны для клеток, уже находящихся в терминальных стадиях развития.

### **Теоретическая значимость работы**

Определение состава и функций субъединиц комплекса РВАФ в процессе дифференцировки промиелоцитов человека в нейтрофилы является новым и актуальным исследованием, выполненным на мировом уровне, и вносит вклад в понимание механизмов развития и дифференцировки клеток крови человека.

Полученные в данной работе результаты следует учитывать в дальнейших экспериментальных исследованиях клеток крови и ремоделирующих хроматин белковых комплексов и можно использовать в образовательных курсах и практикумах для студентов и аспирантов высших учебных заведений.

### **Практическая значимость работы**

В данной диссертационной работе была выбрана и охарактеризована модель дифференцировки клеток крови по миелоидному пути *in vitro*, подходящая для изучения роли комплексов, ремоделирующих хроматин.

Разработана методика корректного цитофлуориметрического анализа и сравнения количества внутриклеточных белков в клетках линии HL-60 и выделенных из крови доноров нейтрофилов человека.

### **Методология диссертационного исследования**

При проведении экспериментов использовали современные методы биохимии, молекулярной и клеточной биологии. Работу с культурой

эукариотических клеток HL60 и выделение нейтрофилов человека из крови проводили в ламинарном шкафу для поддержания стерильных условий. Клетки анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа DMR/HC5 (Leica, Швейцария) и проточных цитофлуориметров Cytoflex (Beckman Coulter, США) и FC500 (Beckman Coulter, США). Гомогенность препаратов нуклеиновых кислот проверяли методом гель-электрофореза. Спектры поглощения водных растворов ДНК и РНК и концентрацию их фрагментов определяли на настольном спектрофотометре NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, США). ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) проводили на амплификаторе StepOnePlus (Applied Biosystems, США). Белки анализировали методами блот-гибридизации и ко-иммунопреципитации. Взаимодействие субъединиц комплекса РВАФ с промоторами специфических миелоидных генов оценивали методом хроматин-иммунопреципитации. Статистическую обработку данных выполняли в программах Microsoft Excel и GraphPad Prism методом ANOVA с последующим применением многопараметрического критерия Холм-Сидак.

### **Личный вклад автора**

Основная работа (ведение клеточных линий и выделение клеток, проточная цитофлуориметрия и флуоресцентная микроскопия, ПЦР и методы анализа субъединичного состава комплекса), обработка полученных данных и подготовка результатов к печати выполнены автором самостоятельно.

Планирование исследований, обсуждение и обобщение полученных данных, формулирование выводов и написание статей осуществлялись совместно с руководителями: в.н.с., д.х.н. Судьиной Г.Ф. (НИИ ФХБ имени Белозерского, МГУ имени М.В. Ломоносова) и с.н.с., к.б.н. Сошниковой Н.В. (ИБГ РАН).

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Разработана и охарактеризована клеточная модель миелоидной дифференцировки для изучения роли комплекса РВАФ в развитии клеток крови.
2. В процессе дифференцировки промиелоцитов в зрелые нейтрофилы происходит более чем десятикратное уменьшение экспрессии генов субъединиц ремоделирующего хроматин комплекса РВАФ в клетках.
3. Комплекс РВАФ в ходе миелоидной дифференцировки сохраняет свою целостность и локализуется совместно с активно транскрибирующей РНК-полимеразой II на промоторах специфических миелоидных генов.
4. В процессе миелоидной дифференцировки происходит изменение соотношения изоформ субъединицы RHF10: P-изоформы меняются на S-изоформы в составе комплекса РВАФ.

5. Комплекс РВАФ привлекается на промоторы специфических миелоидных генов *CD66a,b,d* и гена *p21* при их активации.
6. Изоформы субъединицы РНФ10, содержащие РНД-домены, в составе комплекса РВАФ привлекаются на промоторы специфических миелоидных генов в процессе их активации. В нейтрофилах Р-изоформы в комплексе РВАФ заменяются на Ss-изоформу, необходимую для поддержания стабильной транскрипции этих генов.

### **Апробация работы**

Результаты исследований в виде устных докладов были представлены на II и III Всероссийских конференциях по молекулярной онкологии, I Российско-японской конференции МГУ-Токиотех для молодых ученых «Белки, нуклеиновые кислоты и нуклеопротеиды», а также в форме стендового доклада на V Съезде физиологов СНГ, V Съезде биохимиков России. Работа была доложена на кафедре химии природных соединений Химического факультета МГУ, заседании Ученого совета НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского МГУ и межлабораторном семинаре ИБГ РАН.

### **Публикации**

Основные результаты диссертационной работы представлены в 3 публикациях в международных рецензируемых журналах, индексируемых в системах Web of Science и Scopus.

### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 123 страницах машинописного текста и включает следующие разделы: Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы, состоящий из 113 наименований. Работа содержит 41 рисунок и 6 таблиц.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

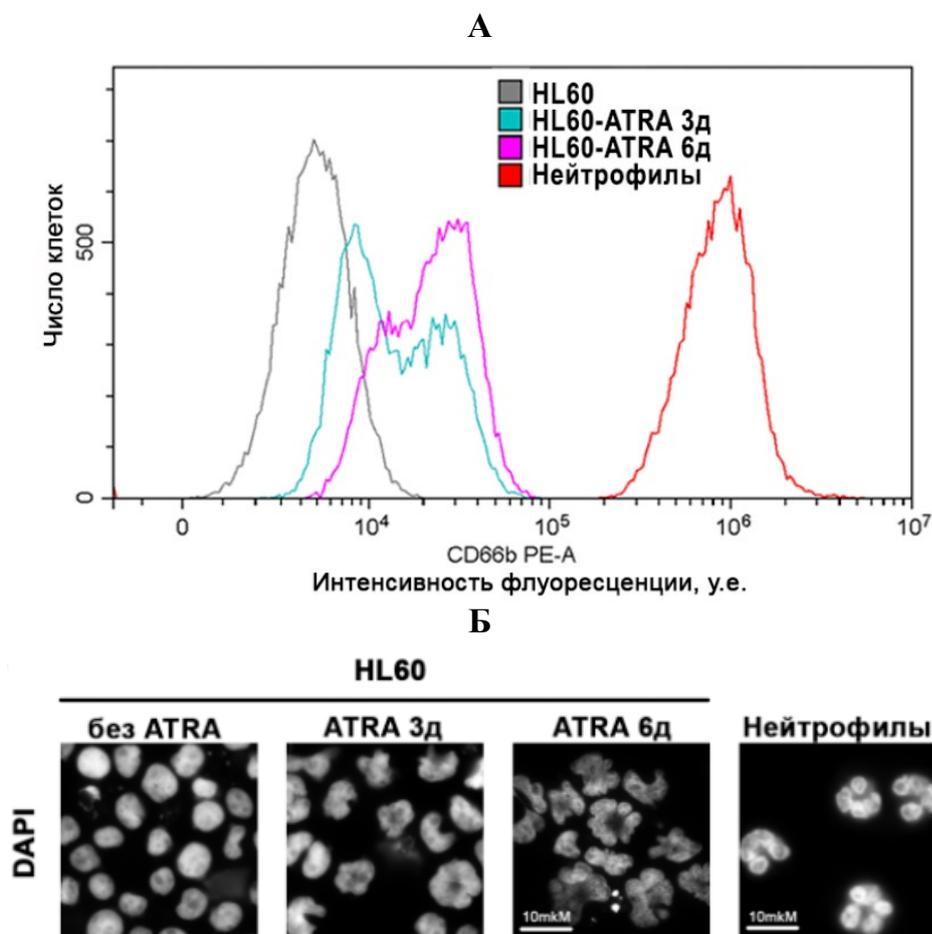
### **Модель дифференцировки клеток крови по миелоидному пути**

Для исследования роли ремоделирующего хроматин комплекса РВАФ в дифференцировке клеток крови была создана модельная система *in vitro*, состоящая из трех типов клеток: опухолевых промиелоцитов человека (клеточная линия HL60), дифференцирующихся под воздействием 2 мкМ *транс*-ретиноевой кислоты (АТРА), клеток HL60 и полностью дифференцированных нейтрофилов, выделенных из крови здоровых доноров. Подобраны оптимальные условия дифференцировки. Продемонстрировано, что в ходе миелоидной дифференцировки происходит увеличение эффективности экспрессии генов специфических маркеров CD66a,b,d (рис. 1А), отмечается выход клеток из пролиферативного цикла,

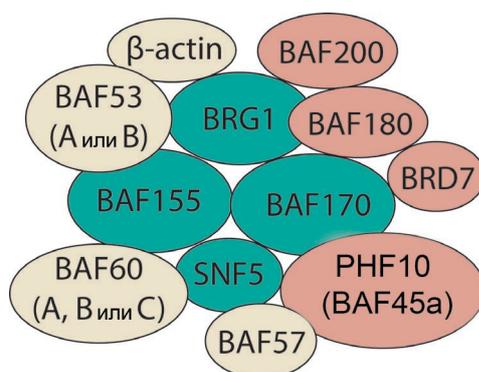
изменяется морфология ядра, которое приобретает характерную для нейтрофилов сегментность (рис. 1Б).

### Количественные изменения комплекса РВАФ при дифференцировке клеток крови

Ремоделирующий хроматин комплекс РВАФ, относящийся к семейству SWI/SNF, является мультисубъединичным. Его состав уникален в разных тканях организма и определяет набор («паттерн») регулируемых генов. Основная функция комплекса заключается в перемещении нуклеосом по ДНК для освобождения участков, содержащих промоторы нужных генов. Мы изучили ряд субъединиц комплекса РВАФ: BAF155, BRG1, BAF180, BAF200, BRD7 и PHF10 (рис. 2).

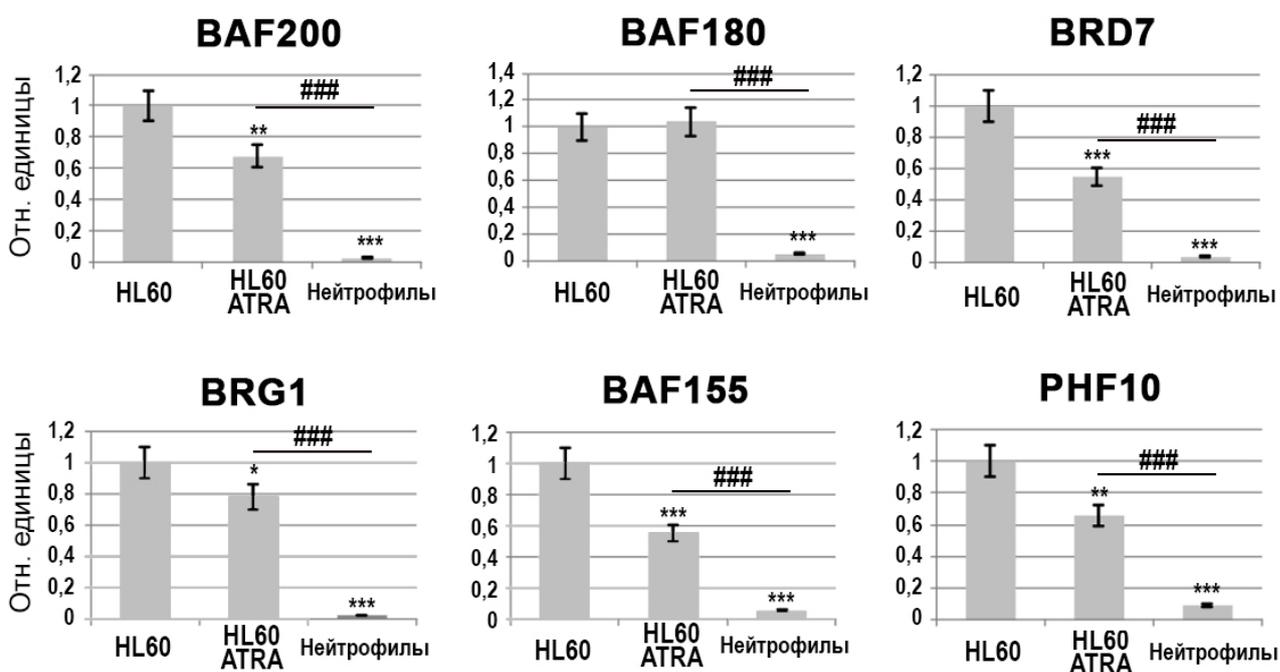


**Рис. 1.** Клетки линии HL60, контрольные и дифференцированные 2 мкМ АТРА, и нейтрофилы человека. Содержание маркера CD66b, оцененное по интенсивности флуоресценции антител с меткой PE; проточная цитофлуориметрия (А). Морфологические изменения ядер при миелоидной дифференцировке, визуализация клеточных ядер красителем DAPI; флуоресцентная микроскопия, 100х увеличение (Б). 3д, 6д — дифференцировка АТРА в течение 3 и 6 дней.



**Рис. 2.** Схематичное изображение субъединичного состава комплекса PBAF.

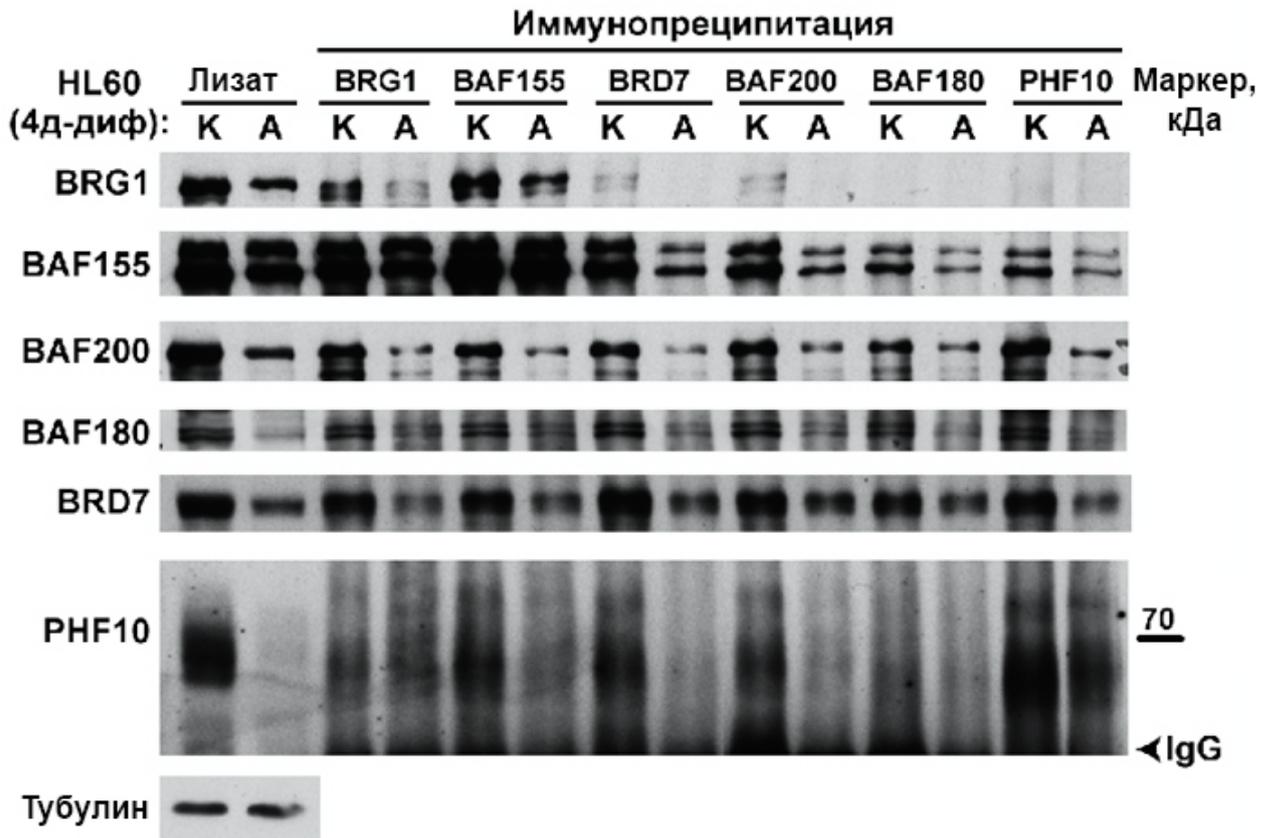
Методами ПЦР в реальном времени и проточной цитофлуориметрии было показано, что в ходе миелоидной дифференцировки происходит уменьшение эффективности экспрессии генов субъединиц BAF200, BAF180, BRD7, BRG1, BAF155, PHF10 комплекса PBAF: уменьшается соответствующее количество мРНК и белков (рис. 3).



**Рис. 3.** Относительные количества мРНК субъединиц комплекса PBAF в контрольных и дифференцированных клетках HL60, а также в нейтрофилах человека; ПЦР в реальном времени. Данные нормированы на количество мРНК белка RPLP0. Представлены усредненные значения  $\pm$  стандартное отклонение для пяти независимых экспериментов. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,005$  в сравнении с контролем; ####  $p < 0,005$  для отмеченных пар данных (1-way ANOVA, критерий Холм-Сидак).

### Целостность и локализация комплекса РВАФ в клетках крови

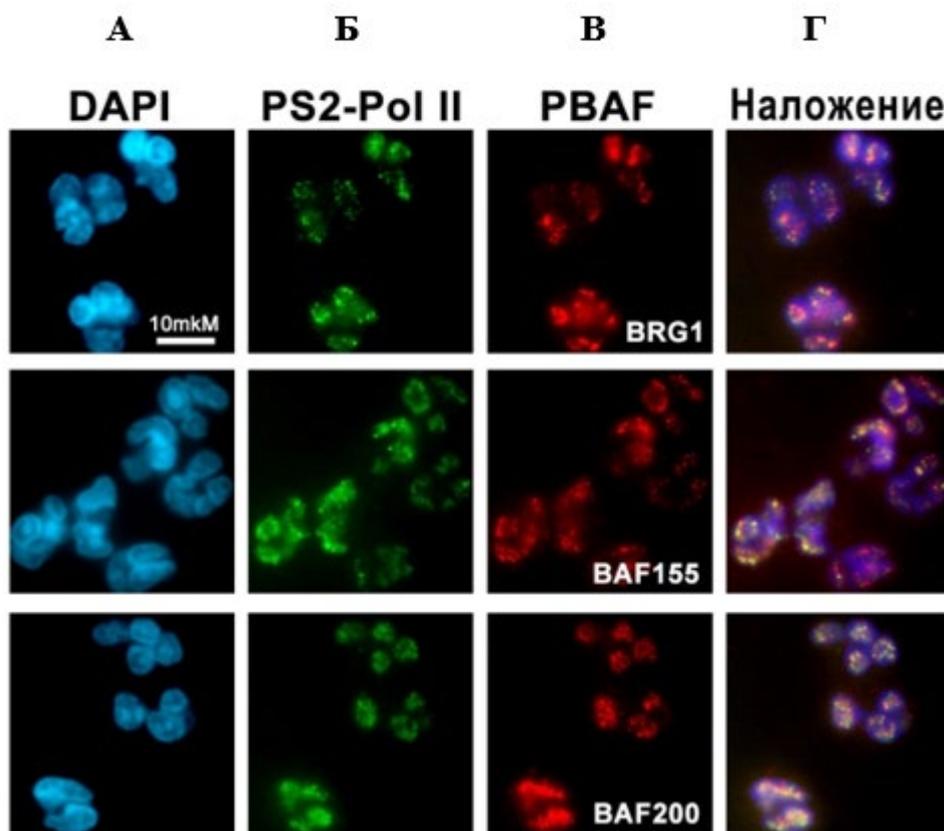
Комплекс РВАФ сохраняет свою целостность в ходе дифференцировки, что было подтверждено методом ко-иммунопреципитации в клетках HL60 (рис. 4). Комплекс РВАФ осаждали из клеточных лизатов с помощью специфичных антител к соответствующим субъединицам. При сохранении состава комплекса соосаждается не только та субъединица, которая связывается с соответствующими антителами, но и остальные, взаимодействующие с ней.



**Рис. 4.** Результаты ко-иммунопреципитации субъединиц комплекса РВАФ из одинаковых количеств лизатов контрольных (К) и дифференцированных (А) клеток линии HL60. Антитела, специфичные к субъединицам комплекса, указаны над дорожками, соосаждающиеся субъединицы отмечены слева. Белки в полученных пробах разделяли методом гель-электрофореза, а затем идентифицировали методом вестерн-блоттинга с помощью соответствующих антител. IgG — иммуноглобулин G кролика, 4д-диф — дифференцировка 2 мкМ АТРА в течение 4 дней.

Методом флуоресцентной микроскопии с помощью специфичных антител было показано, что активная фосфорилированная РНК-полимераза II (PS2-Pol II) и субъединицы комплекса РВАФ (BRG1, BAF155, BAF200, BAF180, BRD7, PHF10)

колокализуются в районах открытого хроматина ядер нейтрофилов человека (рис. 5).



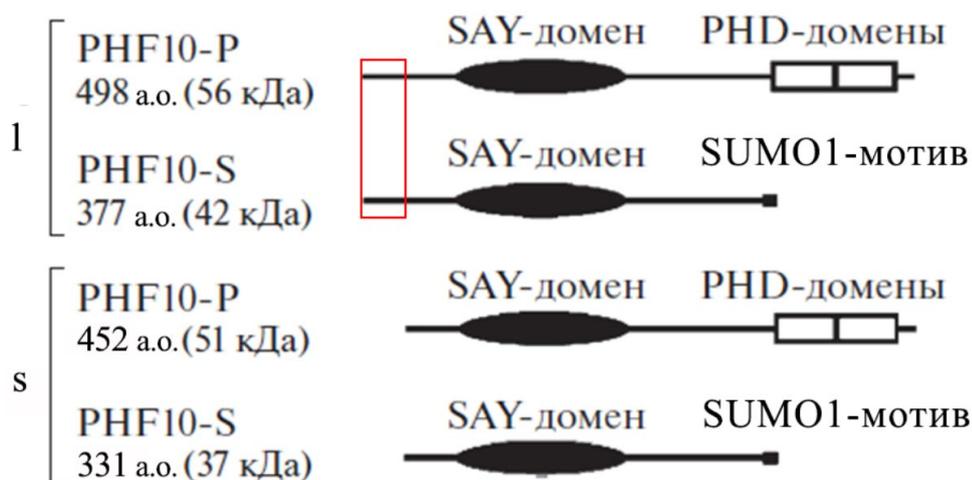
**Рис. 5.** Флуоресцентная микроскопия. Окрашивание ядер нейтрофилов DAPI (А), антителами к PS2-РНК-полимеразе II с флуоресцентной меткой Су3 (Б) и антителами к субъединицам комплекса PBAF с флуоресцентной меткой AlexaFluor488 (В). Результаты наложения трех изображений представлены справа (Г). 100х увеличение.

#### **Соотношение изоформ субъединицы RNF10 комплекса PBAF меняется в ходе миелоидной дифференцировки**

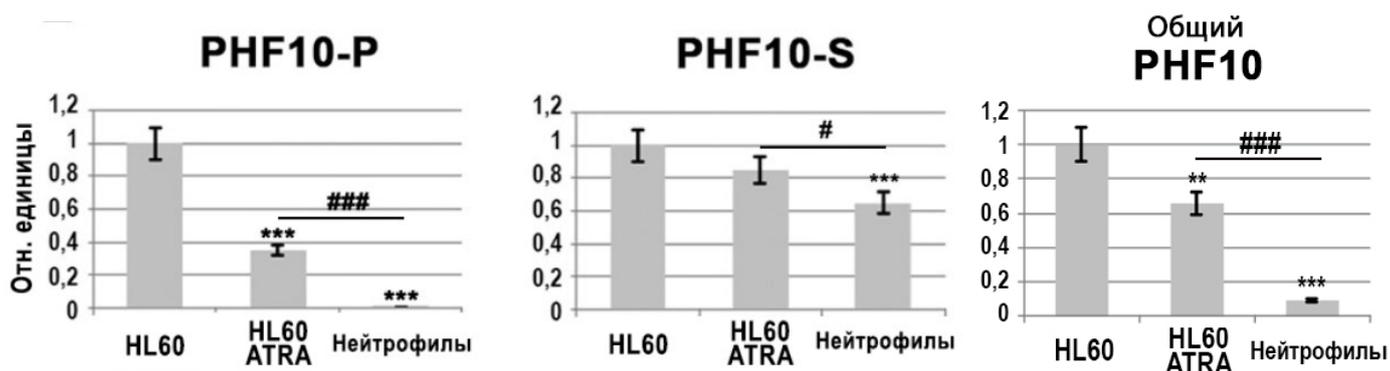
Субъединицы ремоделирующего хроматин комплекса PBAF имеют различные функциональные особенности. Субъединица RNF10 вместе с белками BAF200, BRD7, BAF180 входит в модуль комплекса, отвечающий за связывание всего ремоделирующего комплекса PBAF с хроматином (Hodges *et al.*, 2016). Известно, что RNF10 присутствует в предшественниках нейронов и в гематopoэтических стволовых клетках. Ранее было показано, что субъединица RNF10 содержит 4 изоформы, различающиеся по структуре и функциям (Breshalov *et al.*, 2014). Схематически они представлены на рис. 6.

Целью данного этапа нашей работы являлся анализ количества всех четырех изоформ субъединицы RNF10 и определение их роли в миелоидной дифференцировке клеток. Методом ПЦР были изучены изменения в количестве

мРНК как субъединицы PHF10 в целом, так и отдельно ее P- и S-изоформ при дифференцировке промиелоцитов в нейтрофилы (рис. 7).



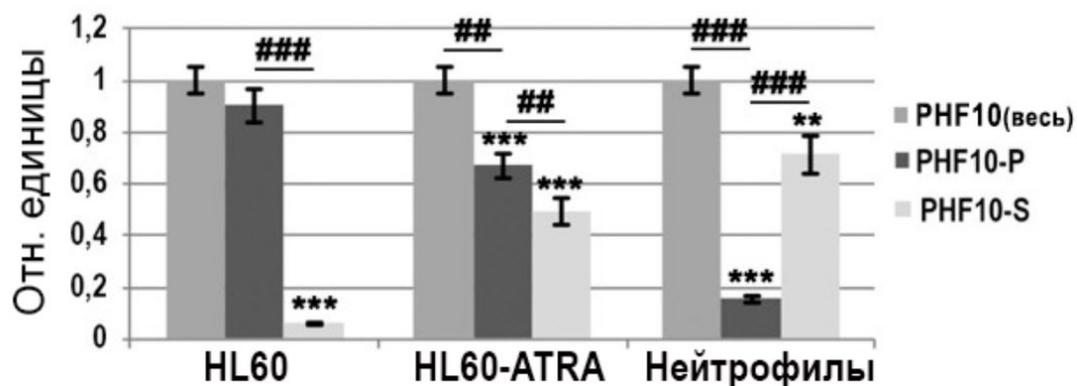
**Рис. 6.** P- и S-изоформы субъединицы PHF10 комплекса PBAF, отличающиеся наличием PHD-домена или SUMO-мотива на С-конце белковой глобулы, а также протяженностью аминокислотной последовательности на N-конце (Breachalov *et al.*, 2016).



**Рис. 7.** Относительные количества мРНК P- и S-изоформ субъединицы PHF10 комплекса PBAF в контрольных и дифференцированных клетках HL60, а также в нейтрофилах человека. Данные нормированы на количество мРНК белка RPLP0. Представлены усредненные значения  $\pm$  стандартное отклонение для пяти независимых экспериментов. \*\*\*  $p < 0,005$  в сравнении с контролем; ###  $p < 0,005$  для отмеченных пар данных (1-way ANOVA, критерий Холм-Сидак).

Несмотря на уменьшение общего количества мРНК субъединицы PHF10, уровень мРНК ее изоформ меняется по-разному. В активно пролиферирующих клетках преобладают P-изоформы, но в процессе выхода их из клеточного цикла и миелоидной специализации количество мРНК P-изоформ начинает уменьшаться, а эффективность образования транскриптов S-изоформ, напротив, увеличивается

(рис. 8). В нейтрофилах человека преимущественно образуются транскрипты S-изоформ с эффективностью до 80% от суммарной транскрипции гена субъединицы PHF10.



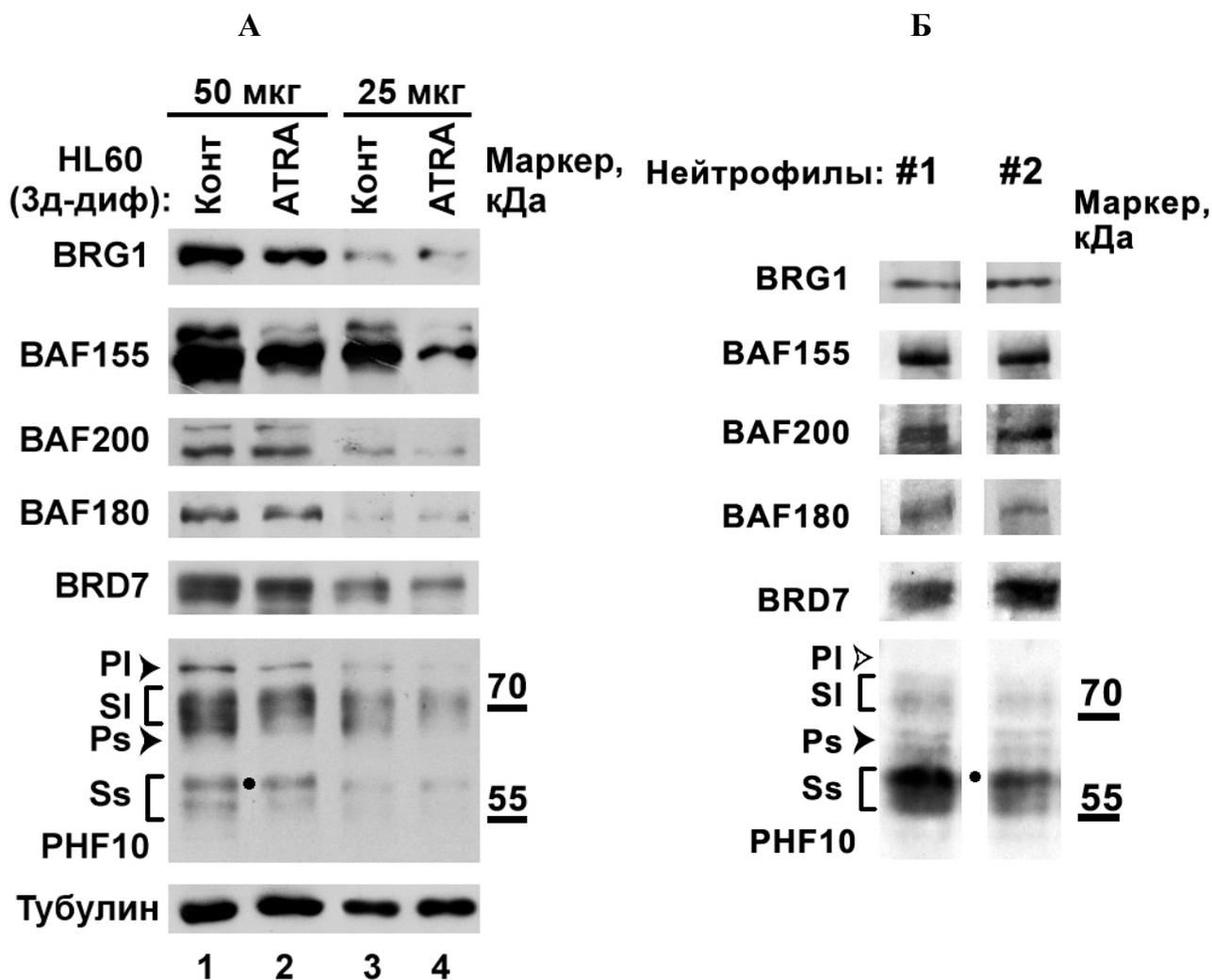
**Рис. 8.** Относительные количества общей мРНК субъединицы PHF10 комплекса PBAF и ее P- и S-изоформ в контрольных HL60, дифференцированных клетках HL60 и нейтрофилах человека. Данные нормированы относительно количества мРНК общего белка PHF10 в каждом типе клеток. Представлены усредненные значения  $\pm$  стандартное отклонение для пяти независимых экспериментов. \*\*\*  $p < 0,005$  относительно контроля; ##  $p < 0,01$ , ###  $p < 0,005$  для отмеченных пар данных (2-ways ANOVA, критерий Холм-Сидак).

Для того, чтобы показать, что полученные данные коррелируют с количеством этих белков в клетках в ходе дифференцировки, мы использовали метод вестерн-блоттинга, результаты представлены на рис. 9. Количество субъединиц BRG1, BAF155, BAF200, BAF180 и BRD7 комплекса PBAF в клетках HL60 уменьшается в результате дифференцировки 2 мкМ АТРА, что подтверждает обнаруженные нами ранее закономерности. Для субъединицы PHF10 отмечается содержание всех четырех изоформ в контрольных клетках HL60. В нейтрофилах человека фосфорилированная Ss-изоформа присутствует в большом избытке, а P-изоформы почти отсутствуют (рис. 9). Во время дифференцировки клеток крови по миелоидному пути содержащая PHD-домен длинная изоформа PHF10-P1 заменяется на короткую Ss-изоформу, в которой этот домен отсутствует.

### **Роль комплекса PBAF в активации специфических генов дифференцировки клеток крови по миелоидному пути**

Методом хроматин-иммунопреципитации мы подтвердили, что РНК-полимераза II совместно с субъединицей общего фактора транскрипции TFIIID белком TAF5, привлекается на промоторы генов *CD66a,b,d* и *P21* в процессе их активации при дифференцировке клеток линии HL60. При активации

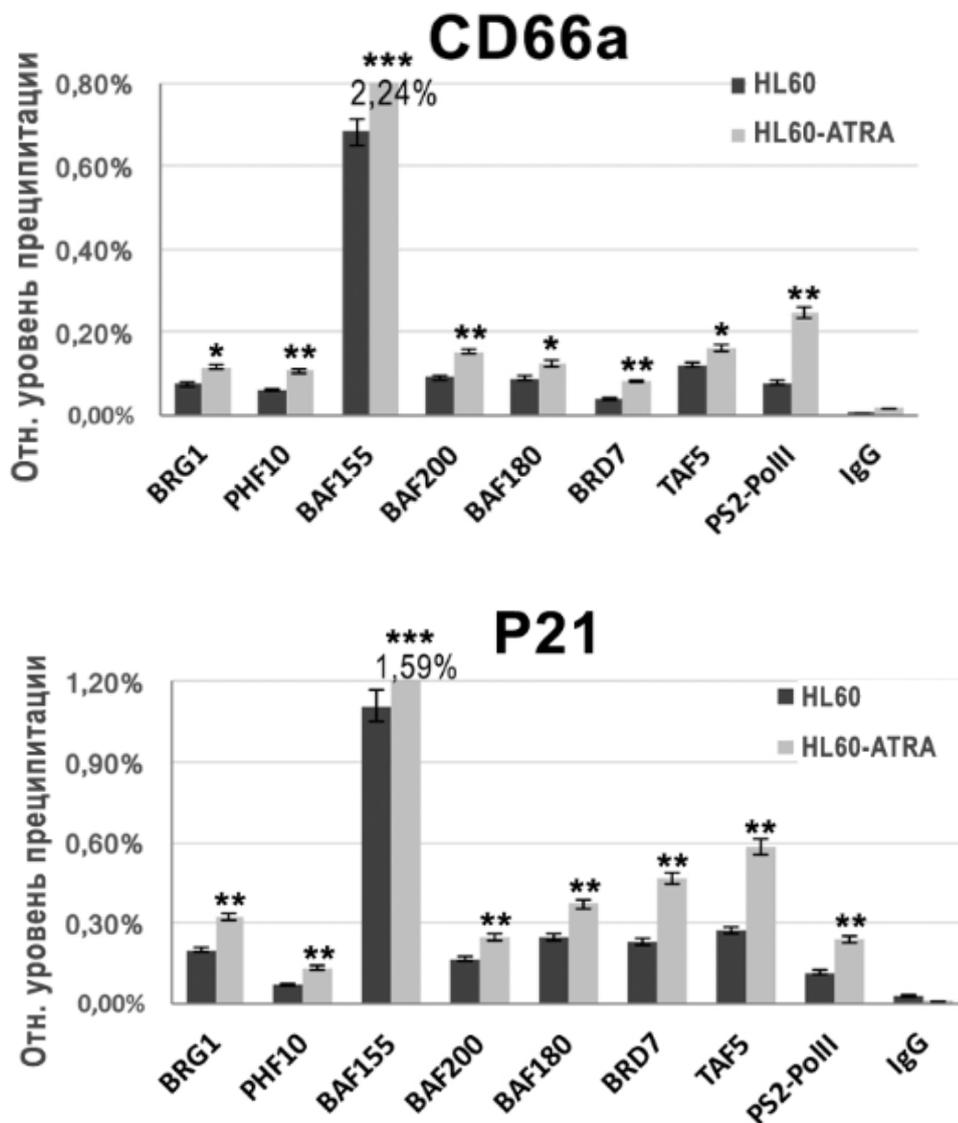
специфических миелоидных генов комплекс РВAF также привлекается на их промоторы (рис. 10).



**Рис. 9.** Анализ изоформ субъединицы РНF10 методом вестерн-блоттинга (PI – длинная Р-изоформа, Ps – короткая Р-изоформа, SI – длинная S-изоформа, Ss – короткая S-изоформа), а также субъединиц BRG1, BAF155, BAF200, BAF180 и BRD7 комплекса РВAF в контрольных и дифференцированных клетках HL60 (А) и в нейтрофилах человека (Б). В качестве внутреннего контроля использован тубулин. Использовали 50 мкг (дорожки 1, 2) и 25 мкг (дорожки 3, 4) экстракта белков клеток HL60. Зд-диф — дифференцировка 2 мкМ АТРА в течение трех дней.

Мы показали, что как коровые субъединицы (BRG1, BAF155), так и специфические (BAF200, BAF180, BRD7 и РНF10) привлекаются на промоторы генов рецепторов CD66a,b,d, а также гена ингибитора циклин-зависимых киназ P21. Это говорит о том, что комплекс РВAF может быть коактиватором,

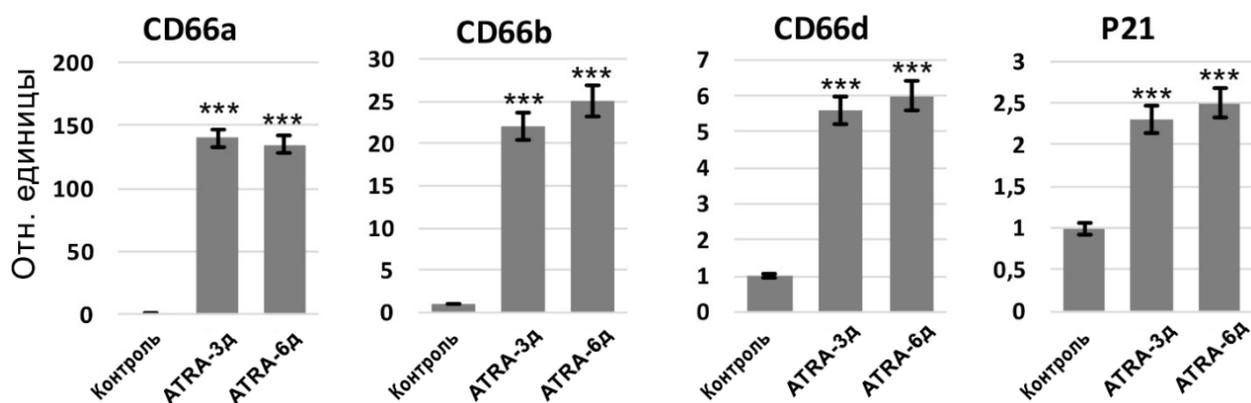
необходимым для регуляции транскрипции соответствующих генов миелоидного развития.



**Рис. 10.** Данные хроматин-иммунопреципитации по взаимодействию субъединиц РВАF-комплекса (BRG1, PHF10, BAF155, BAF200, BAF180, BRG7), фосфорилированной РНК-полимеразы II (PS2-Pol II) и субъединицы TAF5 фактора инициации транскрипции TFIID с промоторами генов *CD66a*, *CD66b*, *CD66d* и *P21* в контрольных и дифференцированных АТРА в течение трех дней клетках линии HL60. Данные нормированы на объем исходного клеточного лизата до добавления специфических антител. IgG — иммуноглобулины. Представлены усредненные значения  $\pm$  стандартное отклонение для четырех независимых экспериментов. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,005$  относительно контроля (2-ways ANOVA, критерий Холм-Сидак).

В ходе дифференцировки происходит активация транскрипции специфических генов *p21*, *CD66a,b,d*, они активно транскрибируются к третьему

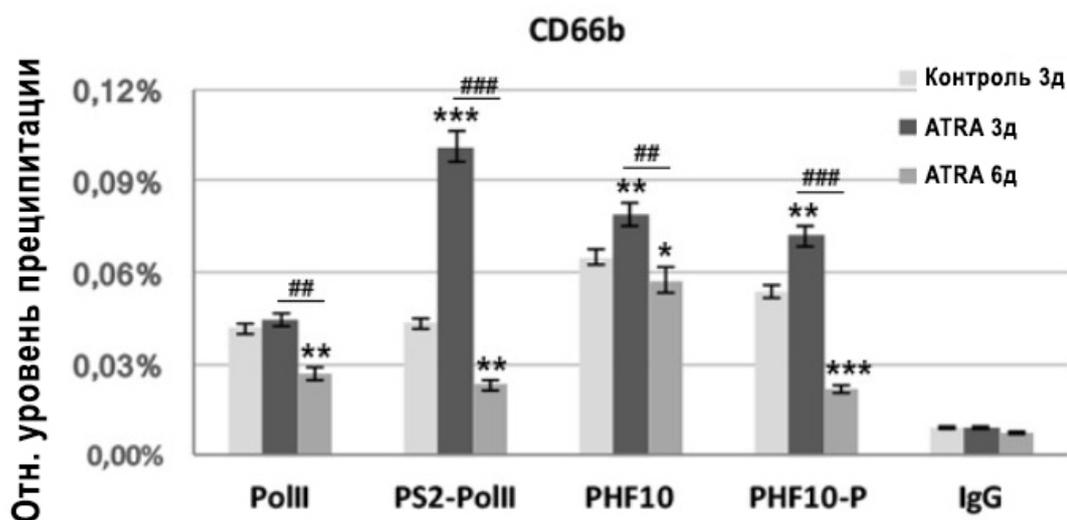
дню дифференцировки. Дальнейшее увеличение эффективности транскрипции не наблюдается, эти гены стабильно транскрибируются вплоть до шестого дня дифференцировки (рис. 11). Таким образом, в клетке реализуются две задачи, необходимые для дифференцировки: активация транскрипции миелоидных генов и поддержание транскрипции на стабильном уровне.



**Рис. 11.** Относительные количества мРНК маркеров CD66a, CD66b, CD66d и ингибитора циклин-зависимых киназ P21 в контрольных и дифференцированных 2 мкМ АТРА клетках HL60 на третий и шестой день дифференцировки. Данные нормированы на мРНК белка RPLP0. Представлены усредненные значения  $\pm$  стандартное отклонение для пяти независимых экспериментов. \*\*\*  $p < 0,005$  в сравнении с контролем; ###  $p < 0,005$  для отмеченных пар данных (1-way ANOVA, критерий Холм-Сидак).

Субъединица PHF10 привлекается на промоторы генов *CD66a,b,d* и *P21* при миелоидной дифференцировке клеток крови. Методом хроматин-иммунопреципитации мы проанализировали взаимодействие изоформ субъединицы PHF10 с промоторами специфических миелоидных генов на третий и шестой день дифференцировки клеток HL60 при воздействии 2 мкМ АТРА (рис. 12). Исходя из изменения соотношения общего количества PHF10 и Р-изоформ мы определили, что на поздних стадиях дифференцировки на промоторах генов *CD66a,b,d* и *P21* происходит почти полная замена Р-изоформ субъединицы PHF10 на S-изоформы.

Р-изоформы субъединицы PHF10, содержащие PHD-домен, привлекаются на промоторы генов, необходимых для миелоидной дифференцировки, когда требуется их быстрая активация, но заменяются на Ss-изоформы на более поздних стадиях, когда клетке необходимо поддерживать стабильный уровень транскрипции этих генов.



**Рис. 12.** Данные хроматин-иммунопреципитации по взаимодействию субъединицы PHF10 и ее изоформ (P-изоформы отмечены как PHF10-P) комплекса PBAF, РНК-полимеразы II (Pol II) и фосфорилированной РНК-полимеразы II (PS2-Pol II) с промоторами генов *CD66a*, *CD66b*, *CD66d* и *P21* в контрольных и дифференцированных АТРА клетках линии HL60 в течение трех (3д) и шести (6д) дней. Данные нормированы на объем исходного клеточного лизата до добавления специфических антител. IgG — иммуноглобулины. Представлены усредненные значения  $\pm$  стандартное отклонение для четырех независимых экспериментов. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*  $p < 0,005$  относительно контроля, ###  $p < 0,005$  для отмеченных пар данных (2-ways ANOVA, критерий Холм-Сидак).

### Заключение

В работе исследована роль ремоделирующего хроматин комплекса PBAF семейства SWI/SNF в развитии клеток крови человека по миелоидному пути. На примере дифференцировки *транс*-ретиноевой кислотой клеточной линии HL60 острого промиелоцитарного лейкоза и ее сравнения с нейтрофилами человека, выделенными из крови здоровых доноров, была создана модель для изучения миелогенеза *in vitro*.

В ходе проведенного исследования мы продемонстрировали, что экспрессия генов белковых субъединиц ремоделирующего хроматин комплекса PBAF значительно снижается. Субъединица PHF10 может быть представлена в четырех изоформах, отличающихся наличием PHD-доменов или SUMO1-конъюгирующих мотивов (P- и S-изоформы, соответственно) и наличием или отсутствием (l и s, соответственно) N-концевых последовательностей аминокислотных остатков, что было показано ранее (Breachalov *et al.*, 2014).

Нами установлено, что в ходе дифференцировки клеток в нейтрофилы P-изоформа субъединицы PHF10 комплекса PBAF, содержащая PHD-домен,

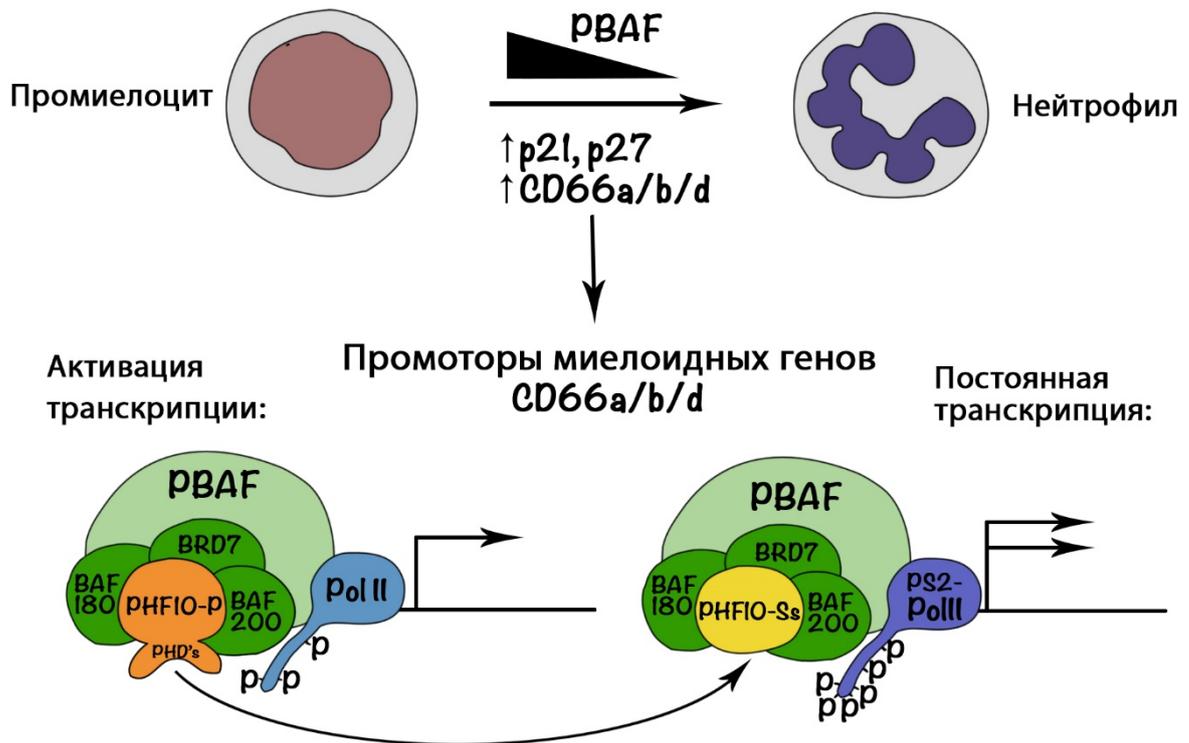
заменяется на более короткую Ss-изоформу, в которой домен PHD отсутствует. Ранее было показано, что PHF10-P1 активирует клеточный цикл и привлекает Pol II к промоторам регулирующих пролиферацию генов (Breachalov *et al.*, 2014). Наши результаты подтверждают и дополняют эти данные: мы продемонстрировали, что PHF10-P1 синтезируется в активно пролиферирующих миелоидных предшественниках, но количество этой субъединицы существенно снижается с началом дифференцировки. В результате P1-изоформа отсутствует в полностью дифференцированных нейтрофилах.

Проведенное исследование показывает, что транскрипционный комплекс РНК-полимеразы II связывается с промоторами специфических миелоидных генов в пролиферирующих клетках-предшественниках, когда транскрипция этих генов еще не происходит. Согласно результатам хроматин-иммунопреципитации PHD-содержащие изоформы субъединицы PHF10 вместе с остальными субъединицами комплекса РВАФ связываются с промоторами генов *CD66a,b,d* и *P21* до начала активации их транскрипции. На более поздних стадиях, когда гены, необходимые для миелоидной дифференцировки, уже стабильно транскрибируются, Р-изоформы заменяются на PHF10-Ss. Фосфорилирование обеспечивает высокую стабильность и функциональность PHF10-Ss (Tatarskiy *et al.*, 2017). Мы предполагаем, что PHD-содержащие изоформы необходимы для ремоделирования хроматина при инициации транскрипции, когда гены, отвечающие за пролиферацию и дифференцировку, быстро меняют свой транскрипционный статус.

Как Р-, так и S-изоформы субъединицы PHF10 консервативны в клетках млекопитающих (Breachalov *et al.*, 2014), что подтверждает их важную функцию в регуляции транскрипции. Учитывая, что PHF10 является частью специального модуля РВАФ, который участвует в распознавании целевых генов в хроматине, мы считаем, что смена изоформ PHF10 влияет на эффективность транскрипции. Кроме того, известно, что PHD-домены разных белков взаимодействуют с различным образом модифицированными гистонами (Sanchez & Zhou, 2011), (Musselman & Kutateladze, 2009). В ходе данной работы было показано, что на уже активированных генах с постоянной транскрипцией PHD-содержащие изоформы заменяются на изоформы PHF10-S. Это подтверждает тот факт, что PHD-домены необходимы для ремоделирования нуклеосом, сопровождающего активацию транскрипции, но они не требуются для поддержания транскрипции уже активированных генов (рис. 13).

Транскрипция генов, кодирующих белки p21, p16, циклины D1 и E1, напрямую контролируется субъединицами комплексов семейства SWI/SNF, к которому относится и РВАФ, а изменения в аминокислотных последовательностях разных субъединиц этого комплекса характерны для разных видов онкологических процессов (Vradii *et al.*, 2006).

## Миелоидная дифференцировка



**Рис. 13.** Схематичное изображение роли комплекса PBAF и его субъединиц в миелоидной дифференцировке клеток крови, показанной в рамках данной работы.

Таким образом, показанное нами изменение состава изоформ субъединицы PHF10 в комплексе PBAF, которое сопровождается переходом от пролиферирующих миелоидных клеток крови к нейтрофилам, представляет часть общего механизма регуляции транскрипции и ремоделирования хроматина в дифференцировке клеток человека.

## ВЫВОДЫ

1. Разработана и охарактеризована клеточная модель миелоидной дифференцировки для изучения роли комплекса РВАФ в развитии клеток крови.
2. В процессе дифференцировки промиелоцитов в зрелые нейтрофилы происходит более чем десятикратное уменьшение экспрессии генов субъединиц ремоделирующего хроматин комплекса РВАФ в клетках.
3. Комплекс РВАФ в ходе миелоидной дифференцировки сохраняет свою целостность и локализуется совместно с активно транскрибирующей РНК-полимеразой II на промоторах специфических миелоидных генов.
4. В процессе миелоидной дифференцировки происходит изменение соотношения изоформ субъединицы РНФ10: Р-изоформы меняются на S-изоформы в составе комплекса РВАФ.
5. Комплекс РВАФ привлекается на промоторы специфических миелоидных генов *CD66a,b,d* и гена *p21* при их активации.
6. Изоформы субъединицы РНФ10, содержащие РНД-домены, в составе комплекса РВАФ привлекаются на промоторы специфических миелоидных генов в процессе их активации. В нейтрофилах Р-изоформы в комплексе РВАФ заменяются на Ss-изоформу, необходимую для поддержания стабильной транскрипции этих генов.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в базах данных Web of Science и Scopus, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.02.03 по специальностям 02.00.10 – биоорганическая химия и 03.01.03 – молекулярная биология (химические науки):

1. *Viryasova G.M., Tatarskiy 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 // *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 2019. V. 1866 (12), P. 118525. IF = 4,739.
2. *Viryasova G.M., Golenkina E.A., Tatarskii V.V., Galkin I.I., Sud'ina G.F., Soshnikova N.V.* An optimized permeabilization step for flow cytometry analysis of nuclear proteins in myeloid differentiation of blood cells into neutrophils // *MethodsX*. 2019. V. 6, P. 360-367. IF = 1,69.
3. *Golenkina E.A., Viryasova G.M., Galkina S.I., Gaponova T.V., Sud'ina G.F., Sokolov A.V.* Fine regulation of neutrophil oxidative status and apoptosis by ceruloplasmin and its derivatives // *Cells*. 2018. V. 7(1), P. E8. IF = 5,656.

### Тезисы докладов и материалы конференций:

1. *Вирясова Г.М., Георгиева С.Г., Судьина Г.Ф., Сошникова Н.В.* Роль изменений в ремоделирующем хроматин комплексе РВАФ в процессе дифференцировки клеток крови. // III Всероссийская конференция по молекулярной онкологии, Москва, Россия, 6-8 декабря 2017. Успехи молекулярной онкологии. Т. 4, С. 67-68.
2. *Вирясова Г.М., Сошникова Н.В., Георгиева С.Г., Судьина Г.Ф., Симонов Ю.П.* Переключение экспрессии изоформ субъединицы РНФ10 ремоделирующего хроматин комплекса РВАФ в процессе дифференцировки клеток крови. // II Всероссийская конференция по молекулярной онкологии, Москва, Россия, 6-8 декабря 2016. Успехи молекулярной онкологии. Т. 3, С. 36-37.
3. *Вирясова Г.М., Судьина Г.Ф., Сошникова Н.В., Георгиева С.Г.* Роль ремоделирующего хроматин комплекса SWI/SNF при дифференцировке клеток крови по миелоидному пути. // V Съезд физиологов СНГ, V Съезд Биохимиков России, Сочи, Россия, 4-8 октября 2016. Специальный выпуск журнала *Acta Naturae*. Т. 2, С. 7-8.