

СРАВНЕНИЕ КОНСЕРВАТИВНОСТИ КЛЮЧЕВЫХ БЕЛКОВ, УЧАСТВУЮЩИХ В МЕЙОТИЧЕСКОМ САЙЛЕНСИНГЕ ХРОМАТИНА, И ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЭТИХ ДАННЫХ В ИММУНОЦИТОХИМИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Гришаева Т.М.

ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, г. Москва

grishaeva@vigg.ru

Методами биоинформатики проанализированы некоторые параметры ключевых белков сайленсинга хроматина: SUMO1 (Small ubiquitin-related modifier 1, длина белка около 100 а.к.), ATR (серин-треониновая протеинкиназа, длина белка около 2600 а.к.) и гистона H2AX (длина 130-150 а.к.) у восьми модельных генетических видов от дрожжей до человека. Установлено, что наиболее консервативен гистон H2AX, довольно консервативен также белок SUMO1. Белки ATR сходны только в С-концевой части молекулы, составляющей около 1/3 её длины.

Сайленсинг хроматина, или подавление экспрессии генов, – это эпигенетический процесс регуляции генов. Сайленсинг может проходить как на уровне транскрипции, так и на посттранскрипционном уровне. Сайленсинг на уровне транскрипции происходит с помощью модификации гистонов, так что соответствующий участок ДНК становится недоступным для аппарата транскрипции [1]. В процессе мейоза гены также могут выключаться с помощью метилирования ДНК – это другой путь сайленсинга [2]. Механизмы сайленсинга генов могут быть частью эволюционно древней иммунной системы, защищающей от чужеродной ДНК.

В мейозе потребность в сайленсинге возникает, прежде всего, у видов с гетероморфными половыми хромосомами, которые по большей части остаются неспаренными [3]. Чтобы клетка прошла контрольный пункт и не реагировала на неспаренную ДНК, чтобы не происходила транскрипция с этих участков ДНК, включается механизм сайленсинга (meiotic sex chromosome inactivation, MSCI [4]). В этом процессе участвуют разные белки. Мейотический сайленсинг обнаружен в разных линиях развития эукариот: у грибов, червей, насекомых, птиц и млекопитающих. Механизм сайленсинга является общим для этих групп эукариот, но детали процесса могут различаться [5].

Основной задачей данного исследования являлся анализ консервативности ключевых белков сайленсинга мейотического хроматина методами биоинформатики.

Всего компьютерными методами было исследовано 26 белков. Это ортологи SUMO1 (Small ubiquitin-related modifier 1 длиной около 100 а.к.), ATR (серин-треониновой протеинкиназы размером около 2600 а.к.) и гистона H2AX длиной 130-150 а.к., который метилируется для осуществления процесса сайленсинга. Проведено сравнение аминокислотных последовательностей ортологов этих белков у грибов *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*, растения *Arabidopsis thaliana*, нематоды *Caenorhabditis elegans*, насекомого *Drosophila melanogaster*, рыбы *Danio rerio*, мыши *Mus musculus* и человека *Homo sapiens*. Гистон H2AX отсутствует в протеомах дрозофилы и дрожжей *S. pombe*. В этом случае мы сравнивали соответствующие белки других объектов (гистоны лягушки *Lithobates catesbeiana*, насекомого *Lygus hesperus*, амёбы *Dictyostelium fasciculatum*, гриба *Beauveria bassiana*). У арабидопсиса было взято два гистона из разных баз данных. Длина белка 130-150 а.к. (у гриба почти 500 а.к.).

Аминокислотные последовательности белков находили в базах данных UniProtKB/TrEMBL (<http://www.uniprot.org/>), NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>) и GeneCards (<http://www.genecards.org/cgi-bin/>). В ряде случаев эти базы данных противоречили друг другу, и мы исследовали несколько белков одного наименования.

Наличие консервативных функциональных доменов выявляли с помощью программы CDART (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>), набор и последовательность консервативных аминокислотных мотивов – с помощью программы MEME (<http://meme.nbcr.net/meme/tools/meme>). Для определения вторичной структуры использовали программу COILS (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html), изоэлектрические точки белков (pI) выявляли с помощью Compute pI/Mw tool (http://web.expasy.org/compute_pi/).

Один из четырёх использованных параметров белков оказался неинформативным. Вторичная структура, т.е. способность формировать альфа-спиральную конфигурацию, отсутствовала почти у всех изученных белков за исключением ATR арабидопсиса (один короткий альфа-спиральный участок в средней части молекулы) и дрозофилы (два коротких спиральных фрагмента ближе к С-концу).

Изоэлектрические точки ортологов двух из трёх белков находились в довольно узких интервалах: белок SUMO1 оказался весьма кислым (pI от 4,62 до 5,34), а гистон H2AX, напротив, являлся щелочным (интервал pI от 9,83 до 10,83). Из общего ряда выделялся только гистон гриба *Beauveria bassiana* (pI=5,15).. Мы предположили, что этот белок не является истинным гистоном H2AX. Для ATR интервал значений pI был немного шире – от 6,62 до 8,54.

Таким образом, по этим двум параметрам белок ATR является менее консервативным, чем два других. Этот вывод подтвердился при изучении функциональных доменов и консервативных аминокислотных мотивов этих белков.

У большинства изученных видов гистон H2AX имеет один большой домен из суперсемейства H2, занимающий почти всю длину молекулы (Рис. 1). Немного видоизменён он у амёбы и насекомого. У гриба *Beauveria bassiana* имеется только фрагмент такого домена на С-конце белка. Видимо, гистон, аннотированный у этого вида как H2AX, таковым не является.

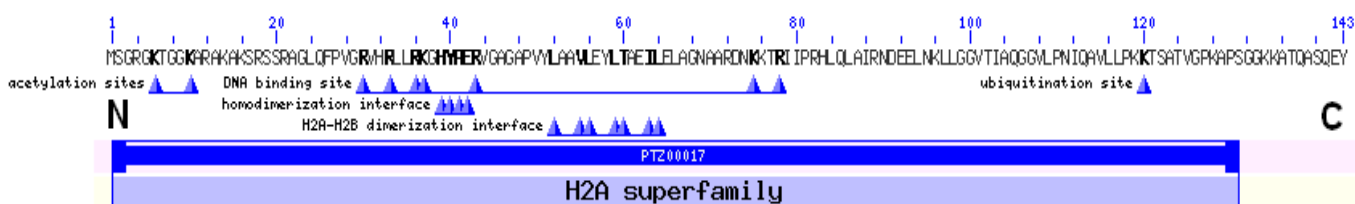


Рис.1. Функциональный домен в гистоне H2AX человека (синяя полоса) из суперсемейства H2A. Показана аминокислотная последовательность белка от N- к С-концу.

Набор и последовательность консервативных мотивов оказались практически идентичными для всех видов, кроме гриба (Рис. 2). Предыдущий вывод был подтверждён. Гистон H2AX оказался наиболее консервативным из трёх изученных белков. В базе данных GeneCards отмечено, что соответствующий ген присутствовал у предков всех эукариот.

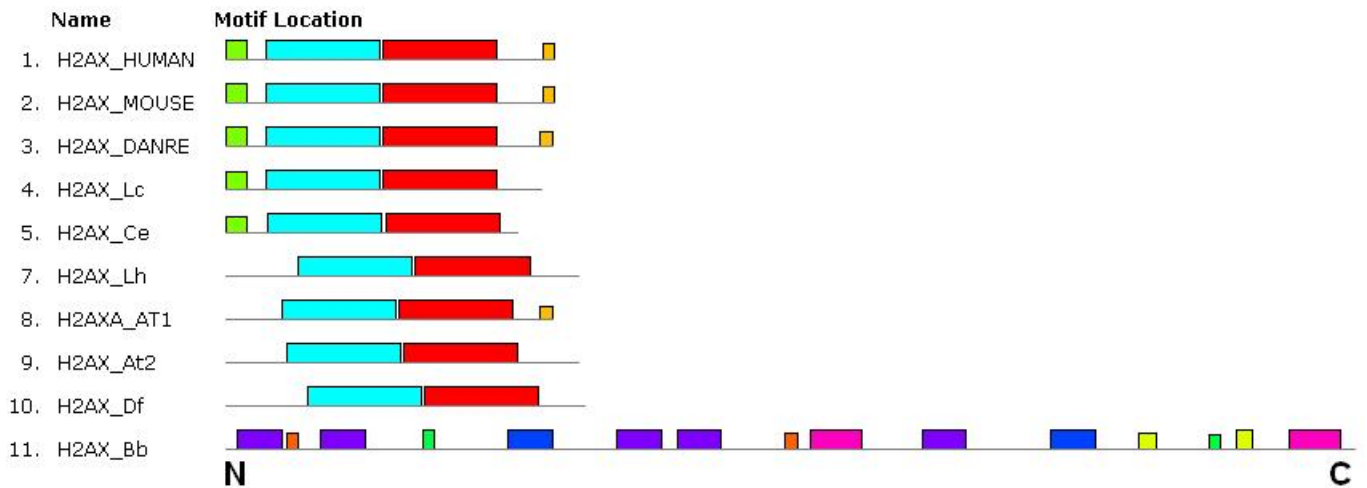


Рис.2. Набор и последовательность консервативных мотивов в гистонах H2AX человека (HUMAN), мыши (MOUSE), рыбы (DANRE), лягушки (Lc), нематоды (Ce), насекомого (Lh), арабидопсиса (At1, At2), амёбы (Df) и гриба (Bb). Показаны N- и C-концы молекул белка. Одинаковые мотивы обозначены одним цветом.

Белок SUMO1, по данным сайта GeneCards, отсутствует у арабидопсиса, дрозофилы и дрожжей *S. pombe*. Однако в других базах данных белки для арабидопсиса и дрожжей аннотированы, и мы включили их в анализ. В молекулах этого белка найден один домен, занимающий почти всю молекулу (Рис. 3). При этом у дрожжей *S. pombe* присутствовал другой домен, хотя и принадлежащий к этому же семейству.

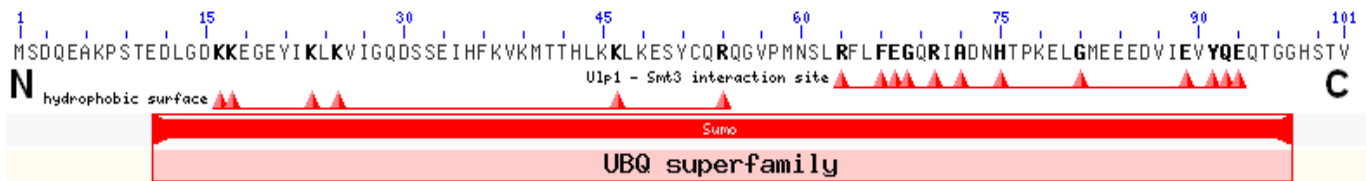


Рис.3. Функциональный домен в белке SUMO1 человека (красная полоса) из суперсемейства убиквитинов (UBQ). Показана аминокислотная последовательность белка от N- к C-концу.

По набору консервативных мотивов все изученные белки оказались более сходными. Различались только N-концевые участки молекул (Рис. 4).

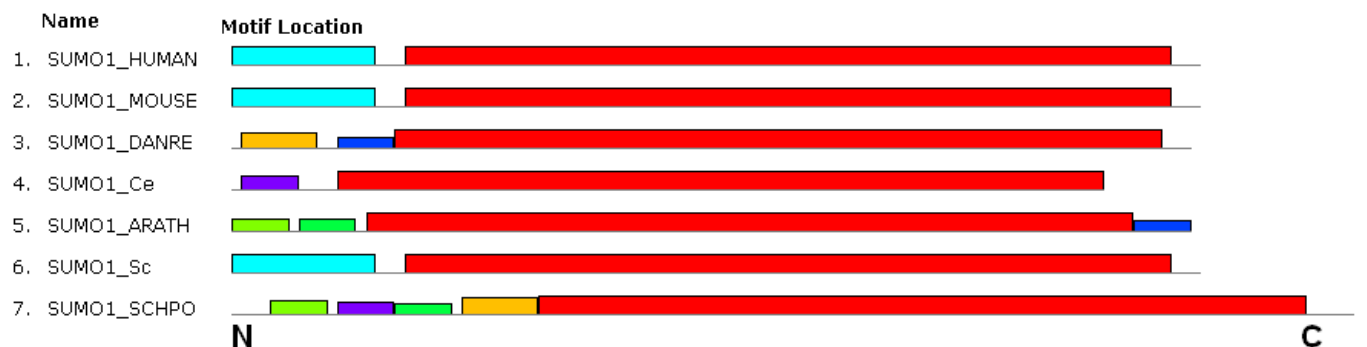


Рис.4. Набор и последовательность консервативных мотивов в белках SUMO1 человека (HUMAN), мыши (MOUSE), рыбы (DANRE), нематоды (Ce), растения (ARATH), дрожжей *S. cerevisiae* (Sc) и *S. pombe* (SCHPO). Показаны N- и C-концы молекул белка. Одинаковые мотивы обозначены одним цветом.

Таким образом, SUMO1 также является довольно консервативным белком.

Перейдём теперь к белку ATR, известному также как атаксия-телеангиэктазия и Rad3-родственный белок. Его ортологи различались уже на уровне функциональных доменов (разное количество доменов и разный их размер). Сходными в этом отношении оказались только представители позвоночных, а также дрозофила (4 домена, рис. 5).

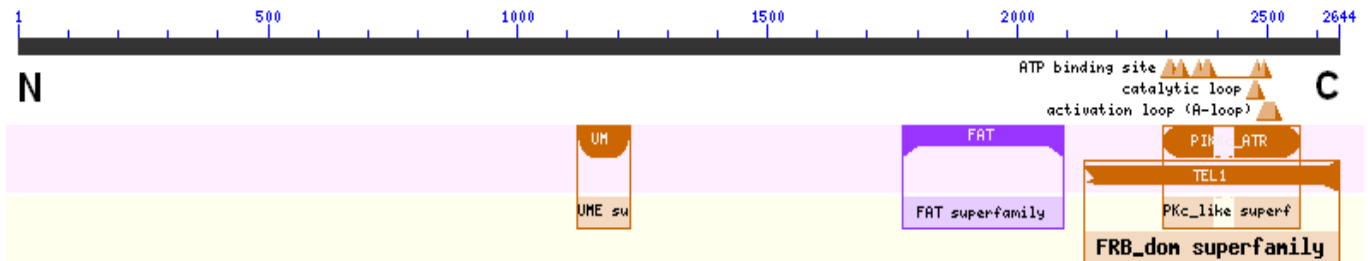


Рис.5. Функциональные домены в белке ATR человека. Показана аминокислотная последовательность белка от N- к C-концу.

У арабидопсиса выявлено три из четырёх доменов, у нематоды и дрожжей – по одному, но они разные.

По набору и последовательности консервативных аминокислотных мотивов N-концевые фрагменты белков ATR сходны только у позвоночных, средняя часть молекулы не имеет сходства, и лишь C-концевые мотивы присутствуют у всех изученных видов, хотя их набор слегка различается (Рис. 6).

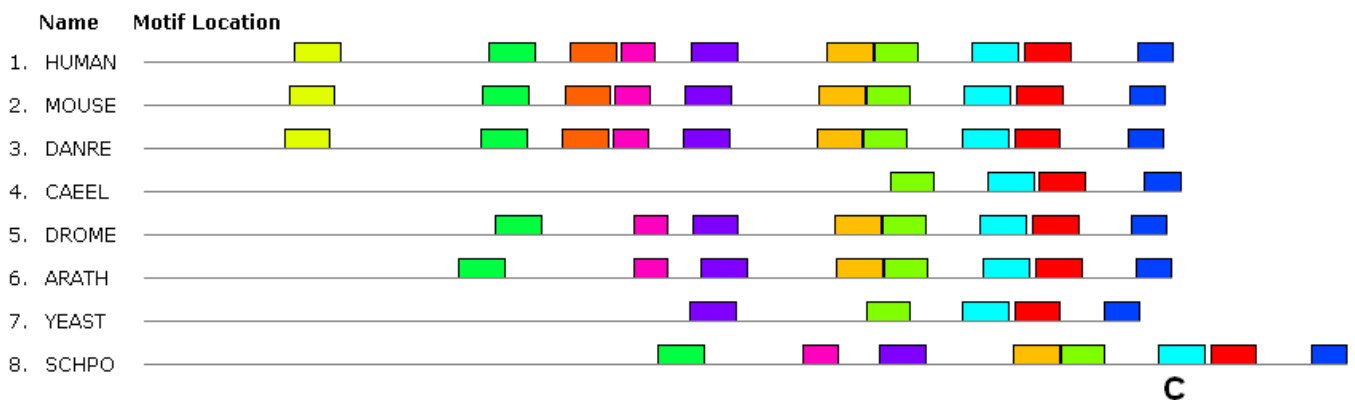


Рис.6. Набор и последовательность консервативных мотивов в белках ATR человека (HUMAN), мыши (MOUSE), рыбы (DANRE), нематоды (CAEEL), дрозофилы (DROME), растения (ARATH), дрожжей *S. cerevisiae* (YEAST) и *S. pombe* (SCHPO). Показан C-концевой фрагмент молекул белка длиной около 1000 а.к. Одинаковые мотивы обозначены одним цветом.

Таким образом, белок ATR является наименее консервативным из трёх изученных белков сайленсинга мейотического хроматина.

В заключение следует подчеркнуть практическую значимость полученных результатов. В нашей лаборатории, где проводятся иммуноцитохимические исследования на клетках млекопитающих, пресмыкающихся, растений и грибов, важно подобрать антитела, подходящие к разным объектам (видам), поскольку это дорогостоящие реактивы. Знание расположения и размеров консервативных мотивов помогает сделать этот выбор, потому что

антитела подбираются на основе сходства аминокислотных последовательностей в белках-ортологах.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 16-04-01447а.

Литература

1. <https://ru.wikipedia.org/wiki/>
2. Bourc'his D., Bestor T.H. Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L // *Nature*. 2004. V.431. P.96-99.
3. Burgoyne P.S. Genetic homology and crossing over in the X and Y chromosomes of Mammals // *Hum. Genet.* 1982. V.61. #2. P.85-90.
4. Turner J.M. Meiotic sex chromosome inactivation // *Development*. 2007. V.34. #10. P.1823-1831.
5. Daish T.J. Lack of sex chromosome specific meiotic silencing in platypus reveals origin of MSCI in therian mammals // *BMC Biology*. 2015. V. 13. P.106-118.