СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ *IN SILICO* МЕЙОТИЧЕСКОГО КОГЕЗИНА REC8 И ЕГО МИТОТИЧЕСКОГО ГОМОЛОГА RAD21

Гришаева Т.М., Богданов Ю.Ф., Дадашев С.Я.

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

Методами биоинформатики проведено сравнительное изучение когезинов группы Rec8/Rad21 у 6 видов, представляющих разные эукариотические таксоны. Различия между мейотическими (Rec8) и митотическими (Rad21) когезинами выявлены как внутри "консервативного" домена, так и за его пределами. Различается также вторичная структура этих групп белков. Полученные данные могут отражать различие функций, выполняемых митотическими и мейотическими когезинами.

Фундаментальной проблемой биоинформатики является соотношение структуры и функции биологических молекул. Хорошей моделью являются белки, выполняющие сходную функцию в разных биологических процессах у одного организма. В частности, важным процессом, предшествующим любому клеточному делению, является возникновение связи (когезии) между сестринскими хроматидами. Этот процесс происходит с участием специального типа белковых комплексов – когезинов. Часть когезинов является общей для митоза и мейоза. Другая часть митотических когезинов заменяется в мейозе сходными, но не идентичными белками. Так, SMC1 меняется на SMC1 β, Rad21 на REC8, Rec11 на STAG3.

В митозе связь сестринских хроматид полностью теряется к метафазе. В мейозе когезиновый комплекс ведет себя иначе. Это отличие состоит в том, что в метафазе I он не разрушается. Это обеспечивает совместное расхождение сестринских хроматид в первом мейотическом делении. Разрушение (программированный гидролиз) комплекса в районе центромеры происходит только во втором делении.

В профазе I белки когезинового «кора» хромосом взаимодействуют с аппаратом рекомбинации и способствуют синапсису между гомологичными хромосомами вместе со специфичными белками синаптонемного комплекса [1-4]. Формированию синаптонемного комплекса (СК) предшествует формирование проаксиальных элементов («коров» хромосомных осей) с участием мейотического когезина REC8 (гомолога митотического Rad21). Затем мейотический когезин SMC1β, когезин SMC3 и белки осевых элементов SCP2 и SCP3 формируют нормальный осевой элемент. В пахитене из двух осевых элементов и вновь собираемого центрального элемента формируется СК. В метафазе I SMC1β, SMC3, SCP2 и SCP3 исчезают из хромосомных плеч и собираются в районе центромер, оставаясь там до анафазы II. Напротив, REC8 сохраняется вдоль плеч хромосом до анафазы I, обеспечивая сестринскую хроматидную когезию, а рядом с центромерами - до анафазы II. Предполагается, что REC8 обеспечивает основу для формирования как осевых элементов, так и рекомбинационных комплексов [4].

Необходимо отметить, что мейотические когезины не замещают митотические в ходе мейоза, как считалось ранее, а сосуществуют в одних и тех же клетках. При этом комплекс SMC1β +SMC3 тесно связан с латеральными элементами СК, а комплекс SMC1α+SMC3 локализуется в петлях хроматина и лишь отдельными фокусами - в латеральных элементах [5]. То же относится и к когезинам REC8/Rad21 [6]. Разные когезиновые комплексы образуются и вдоль длины мейотической хромосомы. Так, у дрожжей *Schisosaccharomyces pombe* в плечах хромосом находится комплекс Rec8 и Rec11, а в центромерной области – Rec8 и Psc3 [7]. Из сказанного выше следует, что мейотические когезины появляются именно для специфической связи когезинового комплекса с белками СК, в первую очередь, с белками латеральных элементов СК.

Когезины являются довольно консервативными белками, но высокое сходство существует лишь в районе домена Rec8/Rad21. Например, REC-8 нематоды *C. elegans* сходен с Rec8p

Sacharomyces cerevisiae лишь на 41,6% (идентичен на 17, 3%) [8]. Анализ на уровне доменной организации показывает почти полное сходство белков группы Rad21/Rec8, поскольку все они содержат один и тот же когезиновый домен. Наличие этого домена позволяет предположить, что различие между белками Rad21 и Rec8 в пределах одного организма будут меньше, чем между одноименными белками у разных видов.

Для проверки этого предположения мы исследовали *in silico* следующие белки из группы Rec8: Rec8 дрожжей, Rec8-подобный белок мыши, REC8L1 человека (выбранный нами из предложенных программой BLAST в качестве гомологов мышиного белка), W02A2.6p нематоды (гомолог белков из группы Rad21/Rec8, названный REC-8 Pasierbek et al. [8]), первый вариант белка Syn1/Dif1 арабидопсиса [9]. Кроме того, мы провели поиск гомолога мышиного Rec8 в протеоме рыбы *Danio rerio* и обнаружили 8 разных белков, из которых выбрали один, аннотированный как мейоз-специфичный когезин. Все эти белки для удобства помечены на рисунках как Rec8. Для сравнения были взяты представители из группы Rad21: известные белки мыши и дрожжей, Rad21-подобный белок человека, Rad21-1 вариант 1 арабидопсиса (выбран нами из нескольких белков, аннотированных как гомологи Rad21), аннотированный в качестве Rad21 белок *D. rerio*, гипотетический белок нематоды, содержащий домен Rad21/Rec8.

На первом этапе с помощью программы TreeTop – Phylogenetic Tree Prediction из пакета GeneBee (Институт физико-химической биологии МГУ; http://www2.genebeemsu.su/services/phtree_reduced.html) мы проанализировали пригонку двух групп аминокислотных последовательностей. Наибольшее сходство наблюдалось в начальном отрезке белков размером около 80 а.к. и на концевом отрезке немного меньшего размера. Интересно, что белки Rad21 у разных организмов оказались более консервативными, чем Rec8, т.к. для них были выявлены некоторые общие мотивы. Для Rec8 общих мотивов не обнаружено. Программа CDART (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ Structure/lexington/lexington.cgi?cmd=rps) подтвердила полученные для Rad21 данные, выявив два домена Rad21/Rec8 – большего размера на N-конце белковой молекулы и меньшего – на C-конце. Выбранные нами из базы данных белки арабидопсиса и рыбы оказались полностью сходными по доменной организации с остальными белками из этой группы. Что касается белков Rec8, то все они также имели два этих домена за исключением белков нематоды и рыбы, у которых присутствовал лишь первый, больший домен Rad21/Rec8. Белок *D. rerio* аннотирован в базе данных NCBI именно как мейоз-специфичный когезин, а белок *C. elegans* выбран Pasierbek et al. [8] из четырех сходных белков на основе экспериментальных данных. Мы со своей стороны попытались найти гомолог дрожжевого Rec8 в протеоме нематоды с помощью программы BLAST (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/), однако не нашли ни одного кандидата.

Далее мы получили с помощью программы TreeTop филогенетические деревья как для целых молекул белков Rec8 и Rad21 (дерево1), так и отдельно для N-конца (200 а.к., дерево 2) и остальной части молекулы (дерево 3). На первом дереве все Rec8 группировались вместе, включая белок рыбы. Rad21 также входили в одну группу, кроме белка арабидопсиса, сближенного с Rec8 нематоды (рис.1). Дерево №2 показало бо̀льшую гомологию N-концевых доменов молекул, чем целых белков, так как даже Rad21 арабидопсиса группировался со своими гомологами (рис.2). C-концевые части молекул оказались более дивергированными за счет Rad21 *A. thaliana* (рис.3).

Таким образом, можно сделать заключение, что белки Rad21 и Rec8 формируют два отдельных подсемейства, отличающихся как по основному домену, так и по остальной части молекулы. Это свидетельствует, по нашему мнению, о существенном различии функций этих белков.

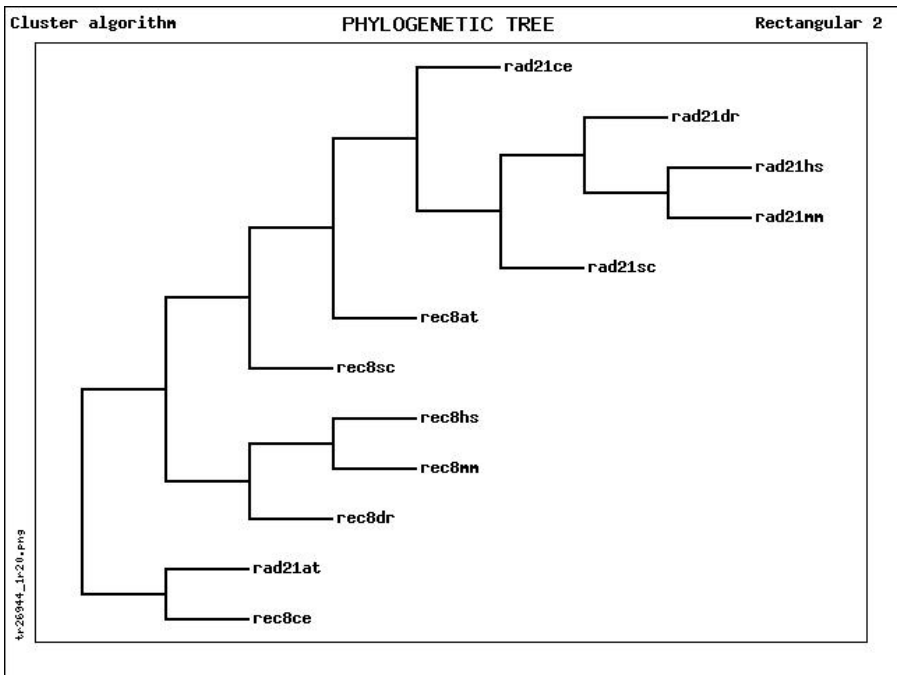

Рис.1. Филогенетическое древо, построенное для когезинов Rec8 и Rad21 у следующих видов: sc – Saccharomyces cerevisiae, ce – Caenorhabditis elegans, at – Arabidopsis thaliana, dr – Danio rerio, hs – Homo sapiens, mm – Mus musculus.

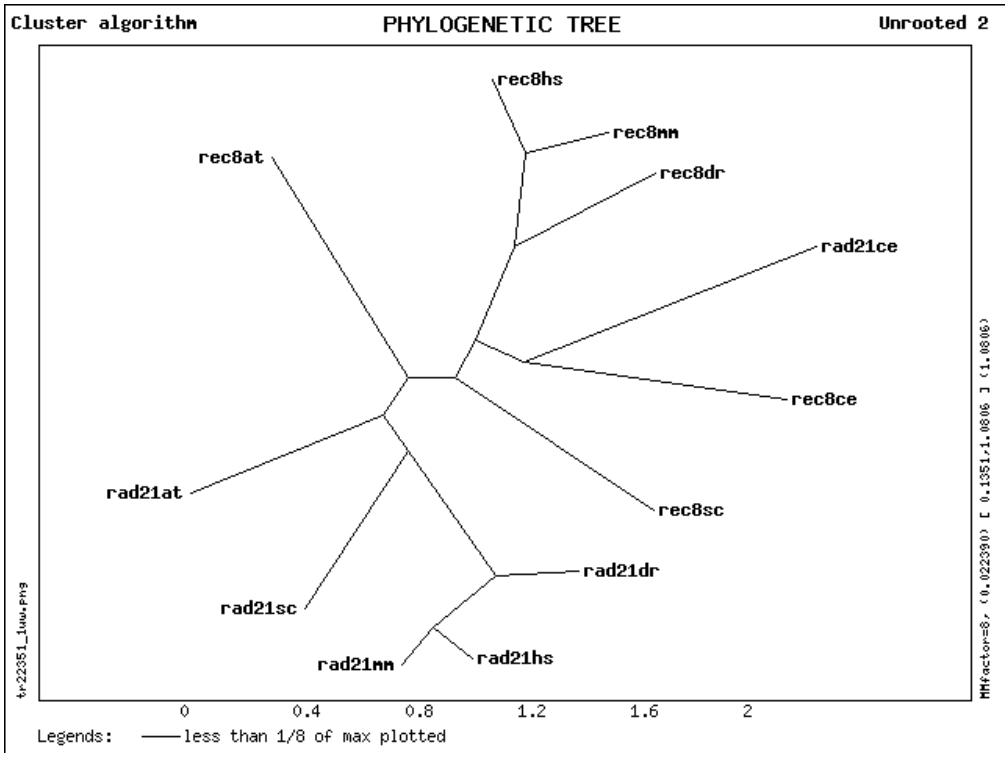

Рис.2. Филогенетическое древо, построенное для N-концевых фрагментов молекул когезинов Rec8 и Rad21 шести видов эукариот. Обозначения – как на рис. 1.

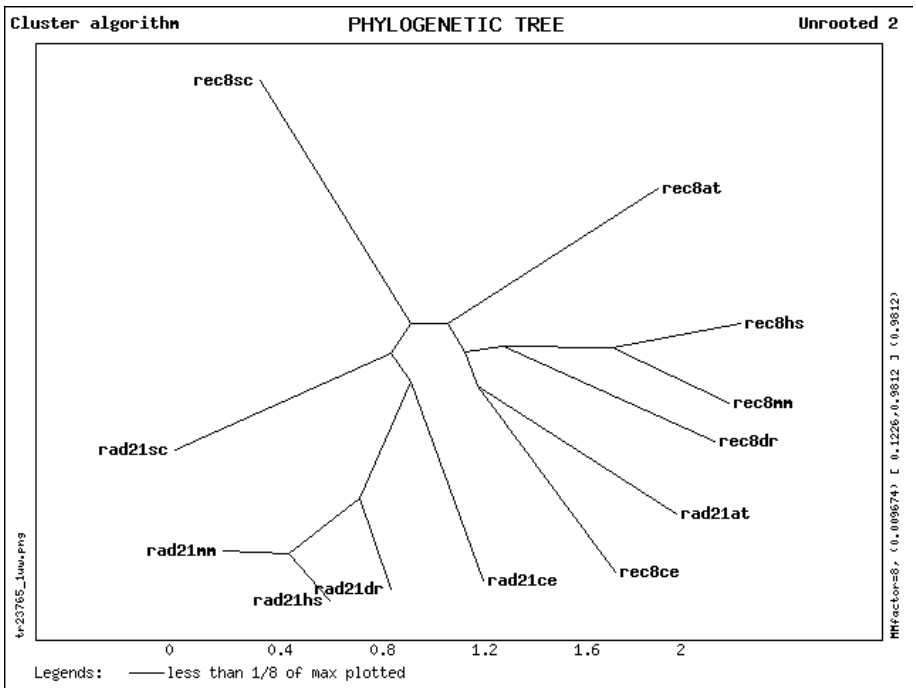

Рис.3. Филогенетическое древо, построенное для С-концевых фрагментов молекул когезинов Rec8 и Rad21 шести видов эукариот. Обозначения – как на рис. 1.

Для того, чтобы понять, в чем особенность мейотических когезинов этой группы по сравнению с митотическими, мы с помощью программы MEME (Multiple EM for Motif Elicitation, http://meme.sdsc.edu/meme/website/intro.html), проводящей поиск консенсусных последовательностей, проанализировали детальную структуру домена Rad21/Rec8 этих белков. Результат представлен на Рис 4. Все белки Rad21 имели почти идентичное строение домена Rad21/Rec8. В группе белков Rec8 наблюдалось гораздо большее разнообразие. Обязательным для всех этих когезинов являлось наличие мотива №1. Кроме выявленных ранее мотивов 1-3, было обнаружено наличие нескольких других мотивов, расположенных вразбивку.

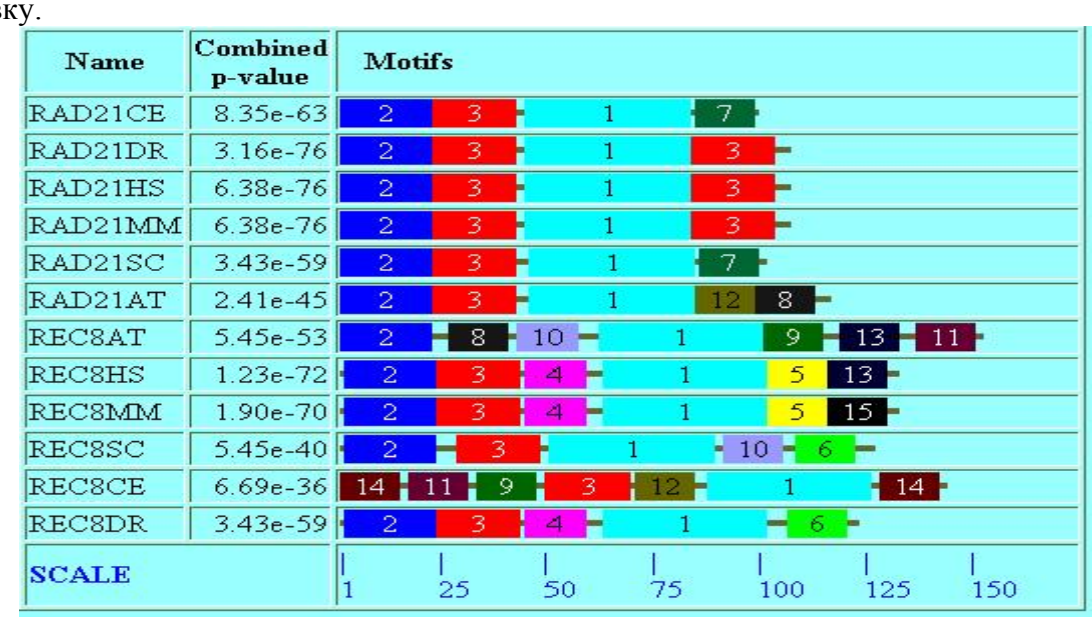

Рис.4. Консервативные мотивы в домене Rec8/Rad21 изученных когезинов. Обозначения как на рис.1.

Мы получили другую группу филогенетических деревьев, включив в анализ белок C(2)M дрозофилы, предположительно являющийся белком латерального элемента синаптонемного комплекса дрозофилы. Этот белок относится к семейству α-клейсинов, в которое входит и

Rec8 [10]. Правда, авторы отмечают, что C(2)M - сильно дивергированный клейсин, по целому ряду признаков не выполняющий роль когезина. Наши исследования подтверждают эти данные, т.к. мы не обнаружили в составе этого белка известных консервативных доменов, а на филогенетических деревьях он не группировался ни с одним представителем семейства Rad21/Rec8.

Мы с помощью программы ISREC (пакет BCM Search Launcher, http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/struc-predict.html) проанализировали также вторичную структуру REC8 и Rad21 у разных организмов, представляющих разные таксономические группы. Результат получился довольно неожиданным (рис.5).

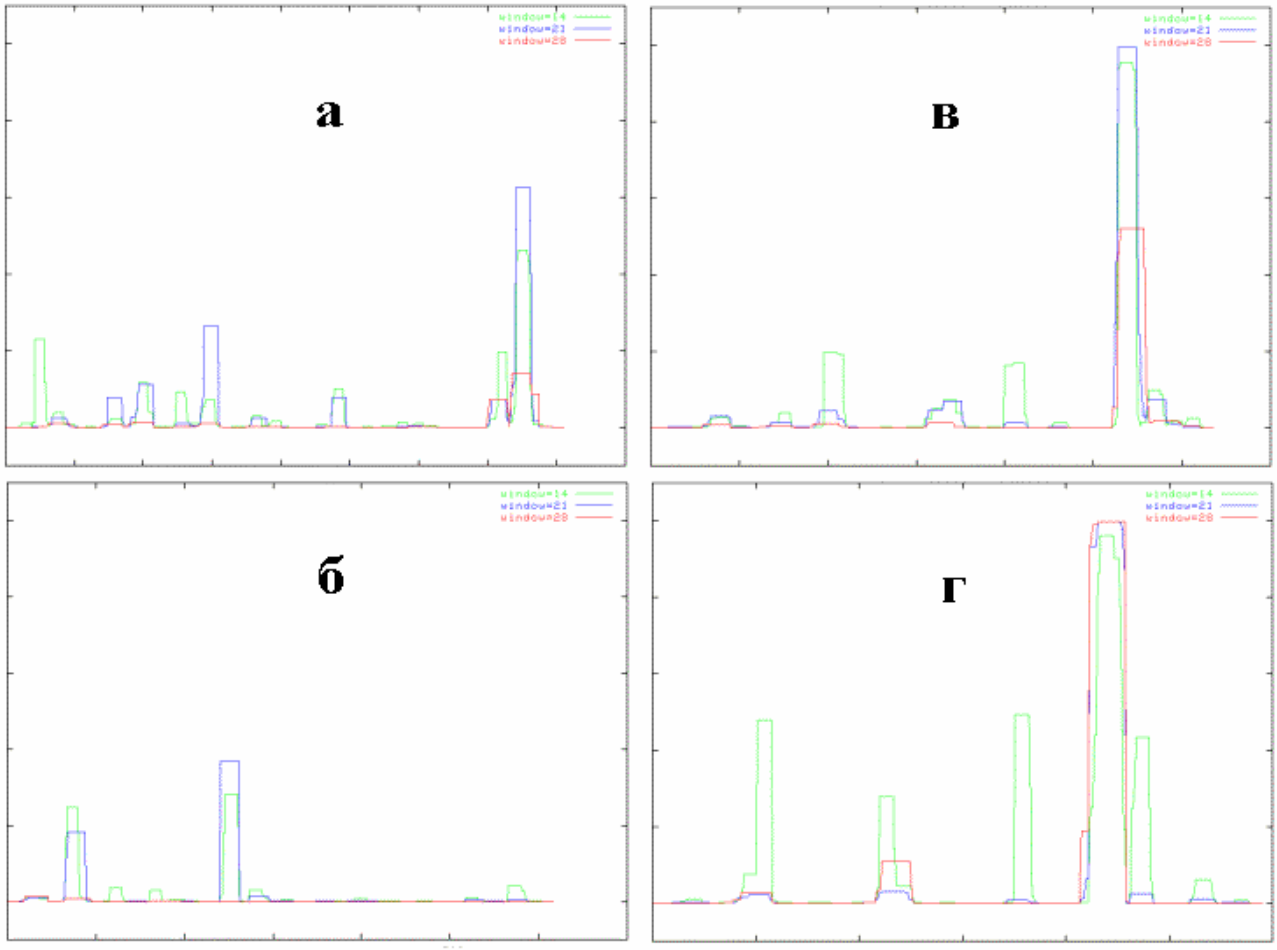

Рис.5. Вероятность формирования альфа-спиральной структуры аминокислотной последовательностью когезинов Rad21 (а) и Rec8 (б) A. thaliana, Rad21 (в) и Rec8 (г) Mus musculus. Разным цветом обозначены разные "окна" при машинном анализе последовательности.

В целом способность формировать альфа-спиральную конфигурацию на отдельных участках молекул этих белков у разных организмов сильно различалась. В пределах же одного организма вторичная структура Rad21 и Rec8 либо различалась (у арабидопсиса (рис. 5 а, б), рыбы *D. rerio*), либо была довольно сходной (у млекопитающих (рис. 5 в, г), нематоды, дрожжей). Полученные результаты свидетельствуют о полифункциональности изученных белков-когезинов. Для успешной работы таких белков важно взаимодействие как с субстратом, что обеспечивает функциональный домен, так и с другими белками, за что могут отвечать (прямо или косвенно) участки альфа-спиральной конфигурации. Такая структура является особенностью сложных многофункциональных белков, принимающих участие в формировании мультипротеиновых комплексов типа когезинового. Выявленные

нами различия митотического когезина Rad21 и его мейотического гомолога Rec8 могут свидетельствовать о специфичности субстрата и партнеров у этих двух групп белков.

Таким образом, нами на конкретном примере показаны принципы реорганизации доменной структуры белков при выполнении одной и той же функции в разных клеточных процессах у одного и того же организма.

Литература

1. *Klein F., Mahr P., Galova M., Buonomo S.B.C., Michaelis C., Nairz K., Nasmyth K.* A central role for cohesions in sister chromatid cohesion, formation of axial elements, and recombination during yeast meiosis // Cell. 1999. V.98. P.91-103.
2. *Eijpe M., Heyting C., Gross B., Jessberger R.* Association of mammalian SMC1 and SMC3 proteins with meiosis chromosomes and synaptonemal complexes // J. Cell Sci. 2000. V.113. P.673-682
3. *Pelttary J., Hoja M.-R., Yuan L., Liu J.-G., Brundell E., Moens P., Santucci-Darmanin S., Jessberger R., Barbero J.L., Heyting C., Höög C.* A Meiotic Chromosomal Core Consisting of Cohesin Complex Proteins Recruits DNA Recombination Proteins and Promotes Synapsis in the Absence of an Axial Element in Mammalian Meiotic Cells // Mol. Cell. Biol. 2001. V.21. P.5667–5677.
4. *Eijpe M., Offenberg H., Jessberger R., Revenkova E., Heyting C.* Meiotic cohesin REC8 marks the axial elements of rat synaptonemal complexes before cohesins SMC1 and SMC3 // J. Cell Biol. 2003. V.160. P.657–670.
5. *Prieto I., Pezzi N., Buesa J.M., Kremer L., Barthelemy I., Carreiro C., Roncal F., Martinez A., Gomez L., Fernandez R., Martinez-A C., Barbero J.L.* STAG2 and Rad21 mammalian mitotic cohesins are implicated in meiosis // EMBO reports. 2002. V.3. P.543-550.
6. *Revenkova E., Jessberger R.* Keeping sister chromatids together: cohesins in meiosis // Reproduction. 2005. V.130. P.783-790.
7. *Kitajima T.S., Yokobayashi S., Yamamoto M., Watanabe Y.* Distinct Cohesin Complexes Organize Meiotic Chromosome Domains // Science. 2003. V.300. P.1152 – 1155.
8. *Pasierbek P., Jantsch M., Melcher M., Schleiffer A., Schweizer D.,Loidl J.* Meiotic chromosome pairing and disjunction cohesion protein with functions in Caenorhabditis elegans // Genes and Dev. 2001. V.15. P.1349-1360.
9. *Caryl A.P., Jones G.H.,Franklin F.C.H.* Dissecting plant meiosis using Arabidopsis thaliana mutants // J. Exp. Bot. 2003. V.54. P.25-38.
10. *Heidmann D., Horn S., Heidmann S., Schleiffer A., Nasmyth K., Lehner C.F.* The Drosophila meiotic kleisin C(2)M functions before the meiotic divisions // Chromosoma. 2004. V.113. P.177-187.