

На правах рукописи

Гурский Дмитрий Ярославович

**Изучение роли белка Sgf11 в транскрипции
и экспорте мРНК из ядра**

03.01.03 - Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2013

Работа выполнена в Лаборатории транскрипционных факторов эукариот Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук.

Научный руководитель: Копытова Дарья Владимировна,
кандидат биологических наук.

Официальные оппоненты: Головнин Антон Клеменсович, доктор биологических наук, заведующий Лабораторией молекулярной генетики дрозофилы Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук;

Шпиз Сергей Григорьевич, кандидат биологических наук, научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной генетики Российской академии наук.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Защита состоится «12» февраля 2013 года в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 002.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии гена Российской академии наук по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной биологии им В.А. Энгельгардта Российской академии наук, расположенной по адресу: 119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32.
Автореферат разослан «___» января 2013 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета

Кандидат фармацевтических наук

Грабовская Любовь Сергеевна

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Экспрессия генов является многостадийным процессом, включающим инициацию транскрипции, синтез мРНК, формирование мРНК частиц, их экспорт и трансляцию мРНК в цитоплазме. В эти процессы вовлечено большое количество различных факторов, однако механизмы сопряжения указанных этапов и взаимодействия различных факторов между собой остаются малоизученными. Ключевым этапом экспрессии генов является транскрипция. Транскрипция в современном понимании является совокупностью связанных между собой процессов, осуществляемых различными ферментативными системами и подверженных строгой многоуровневой регуляции.

Эукариотический геном характеризуется компактизацией ДНК в хроматин, который в настоящее время рассматривается как динамичная структура, принимающая участие в процессах транскрипции. Для осуществления эффективной транскрипции структура хроматина должна быть изменена, или «ремоделирована». Системы, обеспечивающие изменения структуры хроматина, играют ключевую роль в регуляции экспрессии генов. Различные пути ремоделинга хроматина реализуются мультибелковыми комплексами, которые модифицируют структуру хроматина, обеспечивая факторам транскрипционного аппарата РНК-полимеразы II доступ к гену. Тонким инструментарием регуляции динамики нуклеосом является многочисленная система модификаций гистонов, осуществляемая в течение транскрипционного цикла различными многофункциональными комплексами ремоделинга хроматина.

Компартментализация эукариотической клетки (разделение на ядро и цитоплазму) ведет к пространственному разделению важнейших этапов экспрессии генов (таких, как транскрипция и трансляция) и сложному процессу биогенеза мРНК частицы. В процессе созревания мРНК в ядре подвергается различным модификациям, включающим формирование Кэп – структуры (Cap) на 5'-конце мРНК, сплайсинг интронов, созревание 3'-конца мРНК и присоединение полиА-последовательности. В синтезе мРНК и контроле качества мРНК частиц задействована большая система белковых комплексов.

Одним из механизмов, обеспечивающих связь процессов формирования и экспорта мРНК частиц, является полифункциональность многих компонентов аппарата экспрессии генов и их существование в составе различных белковых комплексов. Примером подобной мультифункциональности является описанный ранее в нашей лаборатории транскрипционный коактиватор ENY2, входящий в состав гистонацетилтрансферазного

комплекса SAGA, комплекса элонгации транскрипции ТНО, комплекса экспорта мРНК AMEX [Kopytova et al. 2010, Kurshakova et al. 2007]. Показано, что белок ENY2 у дрожжей и человека входит в состав деубиквитиного модуля комплекса SAGA (DUBm), осуществляющего деубиквитинирование гистонов в процессе активации транскрипции. У дрозофилы существование эндогенного DUBm не было показано.

Помимо ENY2 в состав DUBm дрожжей входят также уSgf73, деубиквитиназа Ubp8/Nonstop и белок Sgf11. Недавние исследования у дрожжей показали, что уSgf11 физически взаимодействует с белком ENY2 в составе DUBm [Kohler et al. 2006, Rodriguez-Navarro et al. 2010]. Тем не менее, функция самого Sgf11 у дрожжей и человека, так же, как и у дрозофилы не была изучена.

Мы предположили, что, поскольку ENY2 участвует не только в активации транскрипции, но и в экспорте мРНК, Sgf11 может играть сходную роль в регуляции экспрессии генов. В настоящей работе были охарактеризованы молекулярные функции компонента комплекса SAGA, белка Sgf11.

Цель и задачи исследования

Целью данной работы было исследовать участие Sgf11 в процессах транскрипции и экспорта мРНК у *Drosophila melanogaster*.

В рамках выбранной цели в ходе исследования были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Показать существование деубиквитиного модуля комплекса SAGA у дрозофилы.
2. Определить участие Sgf11 и других компонентов DUBm в активации транскрипции на модельной системе гена теплового шока *hsp70*.
3. Изучить возможную роль Sgf11 в экспорте мРНК частиц. Изучить, взаимодействует ли Sgf11 с мРНК и факторами экспорта мРНК.
4. Идентифицировать белковые комплексы, в которые входит белок Sgf11.

В результате работы планировалось определить роль Sgf11 в регуляции экспрессии генов и предложить модель, описывающую механизм его действия.

Научная новизна и практическая значимость работы.

В настоящей работе впервые были охарактеризованы функции белка Sgf11 эукариот. Показано, что Sgf11 *D. melanogaster* вместе с белками ENY2 и Nonstop формируют субмодуль, интегрированный в DUBm комплекса SAGA. Показано, что Sgf11 ассоциирован с промотором SAGA-зависимого гена *hsp70* в составе DUBm. Кроме того, Sgf11, не ассоциированный с DUBm, привлекается в промоторную область после активации транскрипции РНК-зависимо.

Впервые было показано, что Sgf11 участвует в экспорте тотальной мРНК из ядра в цитоплазму. Он взаимодействует как с мРНК гена *hsp70*, так и с мРНК других генов. В ядре Sgf11 колокализуется с ядерной порой и взаимодействует с комплексом экспорта мРНК AMEX.

Впервые были проанализированы комплексы, содержащие Sgf11, и был обнаружен новый комплекс, включающий Sgf11 и Cbp80, компонент комплекса CBC, связывающего Кэп-структуру на 5'-конце мРНК. Было показано, что взаимодействие Sgf11 и Cbp80 существенно для участия Sgf11 в активации транскрипции *hsp70*.

На основании полученных результатов была предложена возможная модель, определяющая роль многофункционального белка Sgf11 в транскрипции и экспорте мРНК.

Роль мультифункциональных коактиваторных комплексов таких, как комплекс SAGA, в регуляции экспрессии генов в настоящий момент активно изучается. Основные комплексы и факторы транскрипции, так же, как механизм их действия, являются высоко консервативными в эволюции. Недавние исследования показали, что дефекты экспрессии компонентов деубиквитиназного модуля комплекса STAGA/TFTC, таких, как ATXN7 и Usp22, у млекопитающих могут не только приводить к нарушению в процессах транскрипции, но и обуславливают возникновение заболеваний нервной системы и злокачественных опухолей [Koutelou et al, 2010]. Поэтому наши данные, полученные на дрозофиле, играют важную роль в понимании механизма действия гомологов Sgf11 млекопитающих, в частности человека.

Апробация работы.

Результаты работы были доложены на международных конференциях: FEBS International Workshop «New Developments in RNA Biology» (Тавира, Португалия, 2012), FEBS Advanced Lecture Course «Sofia School of protein Science: Structure and dynamics of biological macromolecules» (София, Болгария, 2012), International Scientific Conference for Students and PhD Students «Youth and Progress of biology» (Львов, Украина, 2011), 11th Young Scientist Forum and 36d FEBS Congress «Biochemistry for Tomorrow's Medicine» (Турин, Италия, 2011), International Symposium «Control of gene expression and cancer» (Москва, Россия, 2010), а также на всероссийских конференциях.

Результаты этой работы также были представлены на международных конференциях соавторами данной работы.

Публикации

По теме диссертации опубликованы 10 печатных работ. Из них статей в рецензируемых журналах - 2; тезисов, докладов и материалов конференций - 8.

Структура и объем работы

Диссертация состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, экспериментальной части, содержащей разделы: объект и задачи исследования, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, а также выводов, благодарностей и списка цитируемой литературы, содержащего 319 ссылок. Работа изложена на 124 страницах текста, содержит 1 таблицу и 19 рисунков.

II. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение взаимодействия Sgf11 с компонентами SAGA DUBm.

Белок Sgf11 (196 а. к.) у дрозофилы имеет консервативную структуру и проявляет высокую степень гомологии с человеческим и дрожжевым белками, в особенности в домене «цинковых пальцев». Несмотря на высокую степень сходства, Sgf11 дрозофилы имеет более длинные С и N-концевые участки в сравнении с белком дрожжей, хотя, как и белок дрожжей, не содержит SCA7 – известного домена компонентов DUBm человека (Рис. 1А). Для того чтобы охарактеризовать взаимодействия Sgf11 с компонентами DUBm и коровыми компонентами SAGA, были получены и аффинно очищены специфические поликлональные кроличьи антитела против Sgf11 (полноразмерный белок) и Nonstop (фрагмент, соответствующий 1-160 а.к.). Аффинно-очищенные антитела к белку Nonstop распознавали в вестерн-блот анализе ядерного экстракта из эмбрионов дрозофилы белок, молекулярный вес которого соответствовал рассчитанному из аминокислотной последовательности белка Nonstop (Рис. 1Б).

Аффинно-очищенные антитела к Sgf11, полученные от обоих кроликов, узнавали две одинаковые близко идущие белковые полосы в вестерн-блот анализе, молекулярный вес которых соответствовал рассчитанному из аминокислотной последовательности Sgf11. Количественное соотношение данных полос зависело от условий приготовления белкового экстракта, что дало возможность предположить, что Sgf11 несет нестабильную модификацию. Обе белковые формы одинаково осаждались антителами (Рис. 1Б) и значительно истощались при нокдауне Sgf11 (Рис. 5А), что являлось доказательством того, что полученные антитела специфически узнают Sgf11.

Иммуноокрашивание политенных хромосом дрозофилы показало, что Sgf11, как и Nonstop, присутствуют во многих сайтах (Рис. 1В, 3А), а следовательно, вовлечены в экспрессию большого количества генов.

В экспериментах по коиммунопреципитации антитела к Sgf11 соосаждали Nonstop из транскрипционно активного ядерного экстракта эмбрионов дрозофилы (Рис. 1Г). Более того,

антитела к Sgf11 и Nonstop соосаждали белок ENY2, подтверждая существование деубиквитиназного модуля у дрозофилы. Кроме этого, компоненты DUBm соосаждали Gcn5 (ацетилтрансферазная каталитическая субъединица dSAGA), таким образом подтверждая ассоциацию деубиквитиназного модуля с комплексом SAGA.

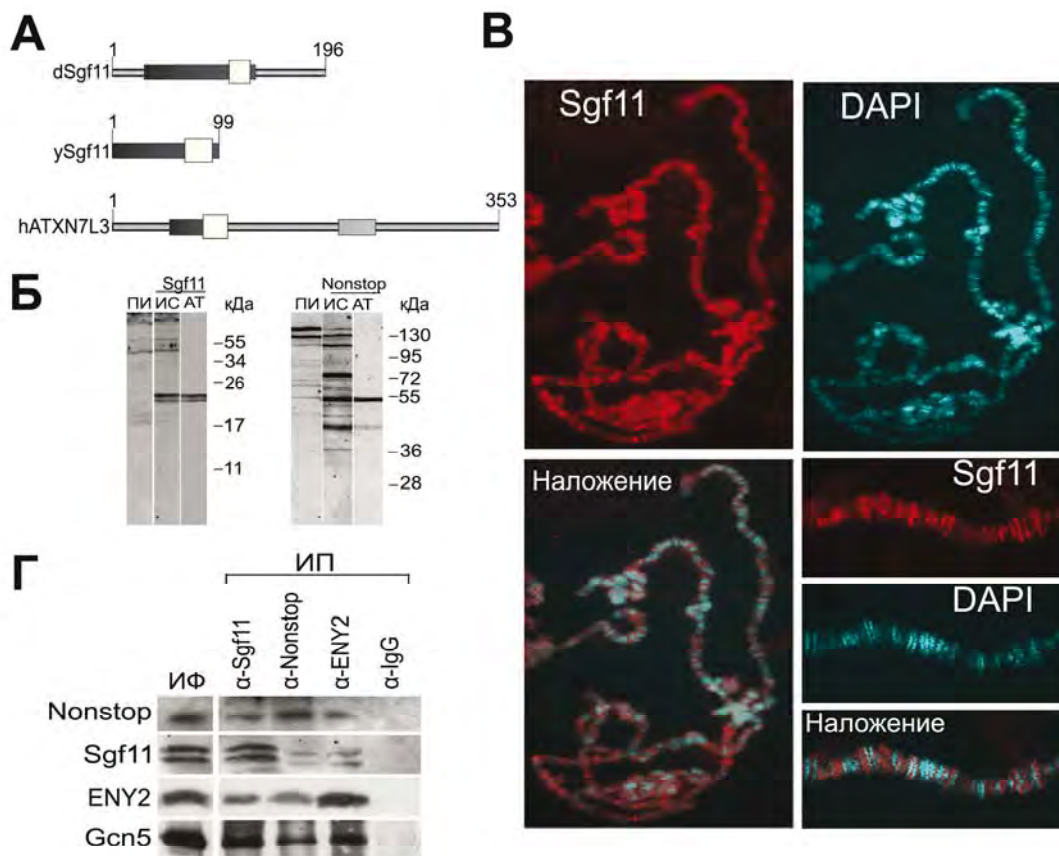


Рисунок 1. Взаимодействие Sgf11 с компонентами DUBm комплекса SAGA и его ассоциация с локусами активной транскрипции. **А.** Схематическое представление гомологов Sgf11 у дрозофилы (d), дрожжей (y), человека (h). Белым цветом обозначены участки гомологичных доменов, специфичных для Sgf11; тёмно-серым цветом обозначены эволюционно консервативные домены цинковых пальцев; светло-серым цветом обозначен домен SCA7, присутствующий лишь у человеческого гомолога. **Б.** Вестерн-блот анализ антител к компонентам DUBm, Sgf11 и Nonstop. Эмбриональный экстракт *D. melanogaster* был нанесен в широкую ячейку, после переноса белков мембрана была разрезана на полосы, каждая из которых была окрашена с использованием ПИ – преиммунной сыворотки, ИС – иммунной сыворотки, АТ – аффинно-очищенные антитела к Sgf11 и Nonstop. **В.** Sgf11 ассоциирован с локусами активной транскрипции на политенных хромосомах, полученных из слюнных желез личинок дрозофилы. Политенные хромосомы были окрашены антителами против Sgf11 и DAPI. На рисунке представлены хромосомы целиком (20x) и в увеличенном виде, также приведено наложение изображений. **Г.** Sgf11 взаимодействует с компонентами DUBm и Gcn5, каталитической субъединицей SAGA. На рисунке представлены результаты коиммунопреципитации (ИП) из ядерного экстракта эмбрионов дрозофилы с использованием антител против Sgf11, Nonstop, ENY2, а также против Gcn5 или IgG из преиммунной сыворотки. Результаты коиммунопреципитации сравнивали с исходной фракцией (ИФ), содержащей эквивалентное количество экстракта.

Sgf11 привлекается в промоторную область гена hsp70 при активации транскрипции, и его привлечение зависит от РНК

Роль Sgf11 в регуляции экспрессии генов изучали на модельной системе кластера генов теплового шока *hsp70*, поскольку, согласно ранее полученным данным, комплекс

SAGA принимает участие в их транскрипции [Lebedeva et al., 2005]. Кластер *hsp70* генов состоит из 6 копий безинтронного гена *hsp70*, синхронно активирующихся при тепловом шоке. Гены теплового шока относятся к ТАТА-содержащим генам и являются удобной моделью для исследования активации транскрипции, так как их экспрессия легко индуцируется тепловым воздействием [Voellmy et al., 2004].

Антитела против Sgf11 интенсивно окрашивали пуфы генов *hsp70* на политенных хромосомах слюнных желез личинок дрозофилы после теплового шока (Рис. 2А), что свидетельствовало об участии Sgf11 в индуцируемой транскрипции *hsp70* и подтверждало правильность выбранной модели. Уровень Sgf11 и других компонентов DUBm в промоторной области гена *hsp70* в культуре Schneider 2 (S2) эмбриональных клеток *D. melanogaster* был измерен до и после теплового шока методом иммунопреципитации хроматина (ChIP) с последующим анализом методом ПЦР в реальном времени с использованием праймеров к промоторной области *hsp70* гена. В качестве контроля измеряли уровень РНК-полимеразы II (PolII) до и после теплового шока (Рис. 2Б).

Пик PolII до и после теплового шока на промоторе гена был примерно одинаковым, что соответствовало литературным данным о том, что в отсутствие активации генов *hsp70*, РНК-полимераза II уже связана с его промотором (транскрипционная пауза PolII) [Nechaev et al., 2011]. Субъединицы деубиквитиназного модуля SAGA, ENY2 и Nonstop присутствовали в промоторной области в нормальных условиях, и их уровень умеренно увеличился при тепловом шоке (Рис. 2Б, 3Б). Следует отметить, что в случае Nonstop, каталитической субъединицы DUBm, мы наблюдали стабильно низкий сигнал в ChIP независимо от типа антител и условий иммунопреципитации; возможно, деубиквитиназа экранирована другими компонентами модуля, что затрудняет ее взаимодействие с антителами в условиях эксперимента (Рис. 3Б). Sgf11 как компонент деубиквитиназного модуля SAGA присутствовал на промоторе *hsp70* гена в нормальных условиях, однако, в отличие от ENY2 и Nonstop, его уровень значительно вырос после теплового шока (Рис. 2Б). Таким образом, значительная часть Sgf11 привлекается в промоторную область при активации транскрипции.

Часто в процессе активации экспрессии гена привлекаемые факторы транскрипции осуществляют взаимодействие с хроматином через растущий РНК-транскрипт. Чтобы определить, зависит ли привлечение субъединиц DUBm от РНК, хроматин перед иммунопреципитацией обрабатывали РНКазой А. Обработка РНКазой позволяет уменьшить количество белковых факторов, взаимодействующих с хроматином через РНК, и не влияет на прямые взаимодействия белков с хроматином [Abruzzi et al., 2004]. После

иммунопреципитации количество РНК-полимеразы на промоторе осталось неизменным, пик ENY2 в промоторной области также не менялся, что согласуется с ранее полученными данными [Корытова et al., 2010]. Пик деубиквитиказы Nonstop также не был чувствителен к обработке РНКазой (Рис. 3Б). Однако уровень Sgf11, рекрутируемого в промоторную область в условиях теплового шока, значительно понизился (Рис. 2Б). Таким образом, Sgf11 привлекается на промотор гена *hsp70* при активации транскрипции РНК-зависимо.

Мы показали, что привлечение Sgf11 в процессе активации транскрипции зависит от РНК. Поскольку Sgf11 является компонентом DUBm, рекрутинг Sgf11 при тепловом шоке также может быть обусловлен взаимодействием с другими компонентами DUBm - ENY2 и Nonstop. Данные иммунопреципитации хроматина из лизата S2 клеток при тепловом шоке в условиях нокдауна ENY2 и Nonstop методом РНК-интерференции свидетельствуют о том, что уровень Sgf11, привлекаемого в промоторную область гена при тепловом шоке, оставался практически неизменным. Небольшое увеличение сигнала ChIP в случае нокдауна ENY2 (Рис. 2В) можно объяснить лучшей доступностью белка Sgf11 для антител внутри DUBm, вследствие изменения его конформации в условиях нокдауна. Специфичность нокдауна компонентов DUBm проанализирована методами вестерн-блот анализа и ОТ-ПЦР в реальном времени (Рис. 2Г).

Таким образом, существует фракция Sgf11, не связанная с деубиквитиказным модулем SAGA и привлекаемая в процессе активации транскрипции через взаимодействие с растущим РНК-транскриптом.

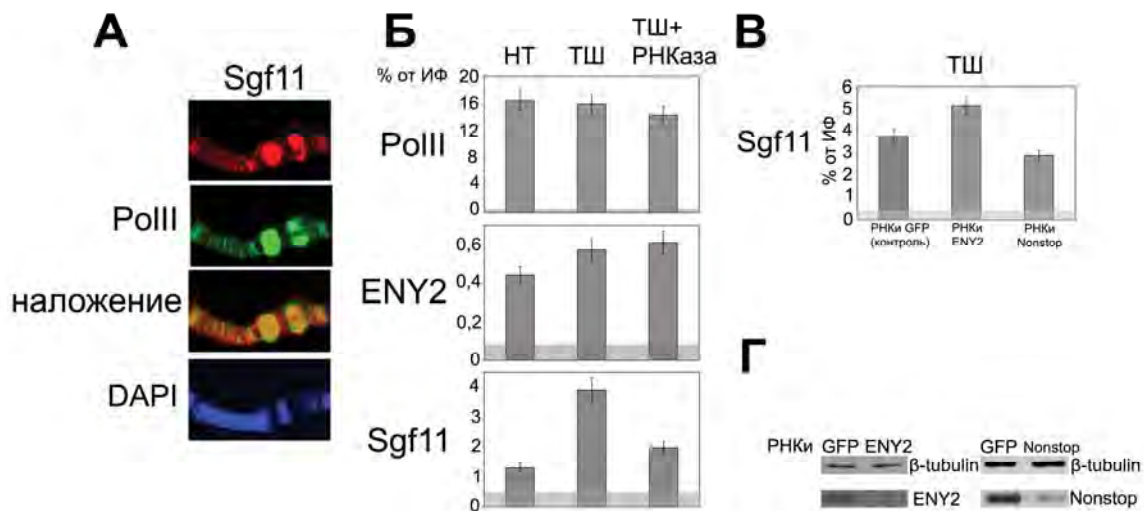


Рисунок 2. Sgf11 привлекается в промоторную область гена *hsp70* при активации транскрипции, и его привлечение зависит от РНК. **А.** Sgf11 привлекается в индуцированные тепловым шоком пуфы 87А, 87В гена *hsp70* на политенных хромосомах, выделенных из слюнных желез личинок дрозофилы. Хромосомы были окрашены антителами против Sgf11, PolII и DAPI (100x). **Б.** Уровень ассоциированного с промоторной областью *hsp70* Sgf11 сильно повышался при тепловом шоке и понижался при обработке РНКазой. Присутствие Sgf11, Pol II и ENY2 в промоторной области гена *hsp70* было проанализировано методом иммунопреципитации хроматина из лизатов S2-клеток при нормальной температуре (НТ) и в условиях теплового шока (ТШ), а также в лизатах, обработанных РНКазой (ТШ+РНКаза). Результаты представлены в процентах от исходной фракции (ИФ). Здесь и далее светло-серым цветом обозначен контроль значения сигнала ChIP - среднегеномное значение сигнала ChIP каждого изучаемого белка, полученное усреднением значений сигнала ChIP для трех точек произвольных некодирующих (межгенных) областей. **В.** Нокдауны компонентов DUBm не влияли на привлечение Sgf11 при тепловом шоке (ТШ). Уровень привлечения в промоторную область гена *hsp70* Sgf11 был измерен методом ChIP. **Г.** Специфичность нокдаунов компонентов DUBm. Здесь и далее нокдауны компонентов DUBm проводили методом РНК-интерференции. Уровни экспрессии белков проверяли в клетках, обработанных дцРНК GFP или дцРНК соответствующего белка методами ОТ-ПЦР и вестерн-блот анализа. В качестве контроля измеряли уровень тубулина (β -tubulin).

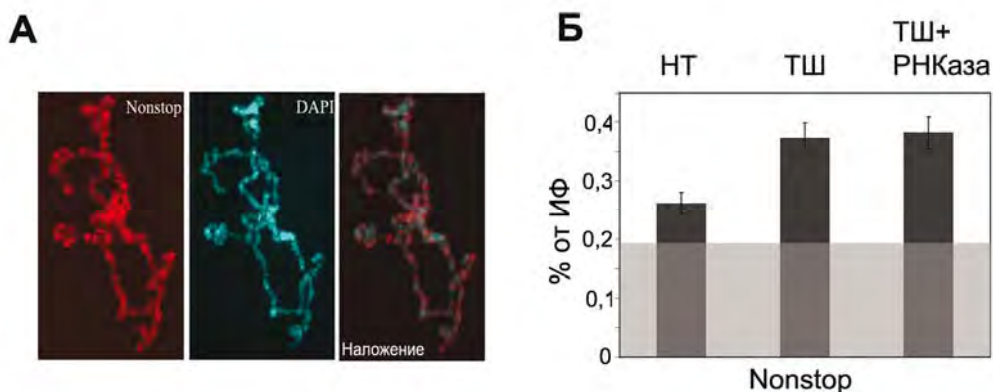


Рисунок 3. Nonstop ассоциирован со многими локусами активной транскрипции и присутствует в промоторной области гена *hsp70*. **А.** Nonstop ассоциирован с локусами активной транскрипции на политенных хромосомах, полученных из слюнных желез личинок дрозофилы. Политенные хромосомы были окрашены антителами против Nonstop и DAPI, также на рисунке представлено наложение изображений (20x). **Б.** Nonstop присутствует в промоторной области гена *hsp70*. Присутствие Nonstop в промоторной области гена *hsp70* было проанализировано методом иммунопреципитации хроматина из лизатов S2-клеток при нормальной температуре (НТ) и в условиях теплового шока (ТШ), а также в лизатах, обработанных РНКазой при тепловом шоке (ТШ+РНКаза). Результаты представлены в процентах от исходной фракции.

Sgf11 взаимодействует с мРНК индивидуальных генов и координирует общий экспорт мРНК.

Поскольку мы показали, что *Sgf11* привлекается в промоторную область гена *hsp70* при активации транскрипции РНК-зависимо, следующим нашим шагом было проверить способность *Sgf11* связывать мРНК индивидуальных генов. Наши эксперименты по коиммунопреципитации РНК (РИП) из лизата S2 клеток, подвергнутых тепловому шоку, показали, что антитела против *Sgf11* соосаждают значительное количество мРНК *hsp70*, как и антитела к *ENY2* и *Xmas-2*, компонентам комплекса экспорта мРНК АМЕХ (Рис. 4А). Антитела к *Sgf11*, *ENY2* и *Xmas-2* также эффективно соосаждали мРНК двух других произвольно выбранных генов: *Ras2* и *tubulin*, однако мы не обнаружили взаимодействия *Sgf11* с РНК гена малой ядерной РНК *U1* (Рис. 4Б). В качестве контроля использовали IgG из преиммунной сыворотки. Таким образом, *Sgf11* специфично связывает мРНК.

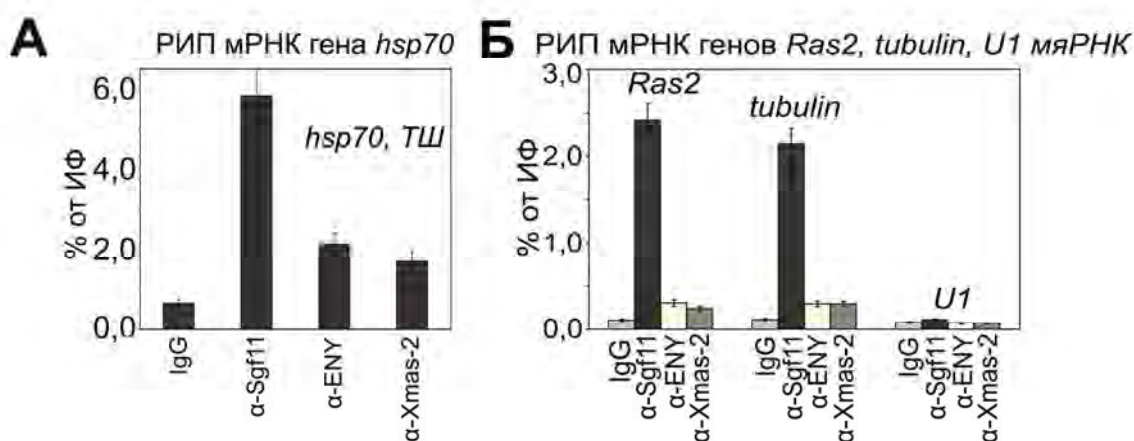


Рисунок 4. Взаимодействие *Sgf11* с РНК различных генов. А. *Sgf11* ассоциирован с мРНК *hsp70*. Иммунопреципитацию РНК *hsp70* проводили с использованием антител к *Sgf11* и к компонентам комплекса экспорта мРНК АМЕХ (*ENY2*, *Xmas-2*) из лизата S2-клеток, подвергнутых тепловому шоку. IgG из преиммунной сыворотки использовали в качестве отрицательного контроля. Результаты приведены в процентах от исходной фракции. Б. *Sgf11* связывает мРНК генов *ras* и *tubulin*. Иммунопреципитацию РНК генов *ras* и *tubulin* проводили с использованием антител к *Sgf11* и к компонентам комплекса экспорта мРНК АМЕХ (*ENY2*, *Xmas-2*) из лизата S2-клеток в нормальных условиях. мРНК гена мРНК *U1* использовали в качестве контроля связывания. Результаты приведены в процентах от исходной фракции.

Поскольку *Sgf11* связывает мРНК нескольких произвольно взятых генов, мы предположили, что он участвует в экспорте мРНК. Мы проверили влияние *Sgf11* на экспорт мРНК *hsp70* и общий экспорт мРНК. Для этого мы исследовали влияние нокдауна белка *Sgf11* (Рис. 5А) на экспорт мРНК в культуре S2 клеток, подвергнутых тепловому шоку. Распределение *hsp70* транскриптов между ядром и цитоплазмой детектировали методом флуоресцентной РНК *in situ* гибридизации (RNA FISH). Мы показали, что нокдаун *Sgf11* нарушает экспорт *hsp70* транскриптов и приводит к накоплению их в ядре (Рис. 5Б). Нарушения в экспорте мРНК наблюдалось в 70% изученных клеток, для примера, нокдаун

компонента комплекса общего экспорта мРНК АМЕХ, белка Xmas-2, приводит к нарушению в экспорте у 90% изучаемых клеток (Рис. 5Б, В).

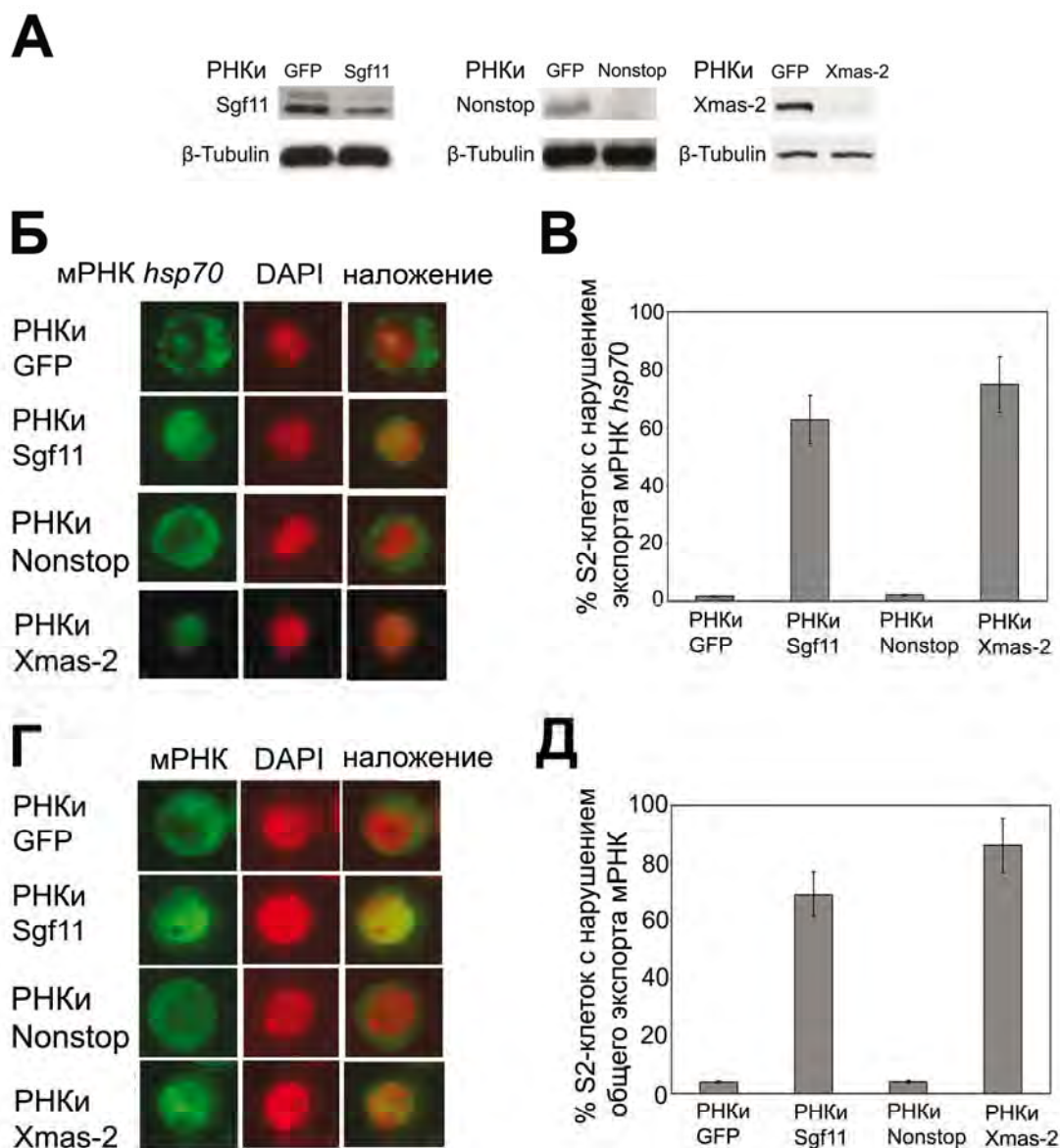


Рисунок 5. Влияние Sgf11 на экспорт мРНК из ядра в цитоплазму. А. Специфичность нокдаунов Sgf11, Nonstop и Xmas-2 в экспериментах, представленных на рисунках 5Б-Д по результатам вестерн-блот анализа S2-клеток. Б. Нокдаун Sgf11, но не Nonstop, нарушает экспорт мРНК *hsp70* в S2-клетках после теплового шока. Представлены результаты РНК *in situ* гибридизации в клетках с нокдауном Sgf11, Nonstop и положительный (нокдаун Xmas-2) и отрицательный (GFP) контроли. Зеленым цветом помечено окрашивание мРНК *hsp70*, красным – окрашивание клеточных ядер (DAPI) (1000x), также представлено наложение соответствующих изображений. В качестве зонда для мРНК *hsp70* использовалась проба, меченная Alexa-488. В. Количественное представление результатов, показанных на рисунке 5Б. Высота столбцов соответствует проценту клеток с нарушением экспорта мРНК *hsp70* (анализировали 200 клеток на один эксперимент по РНК-интерференции). Г. Нокдаун Sgf11, но не Nonstop, нарушает общий экспорт мРНК в S2-клетках. Представлены результаты РНК *in situ* гибридизации в клетках с нокдауном Sgf11, Nonstop и положительный (нокдаун Xmas-2) и отрицательный (GFP) контроли. Зеленым цветом обозначено окрашивание мРНК, красным цветом – окрашивание клеточных ядер (DAPI) (1000x), также представлено наложение соответствующих изображений. В качестве зонда к поли(А)-РНК использовали олиго(dT) пробу, меченную Cy3. Д. Количественное представление результатов, показанных на рисунке 5Г. Высота столбцов соответствует проценту клеток с нарушением общего экспорта мРНК (анализировали 200 клеток на один эксперимент по РНК-интерференции).

Поскольку уровень транскрипции гена *hsp70* в эксперименте не менялся (Рис. 6А), нарушения в экспорте могут быть обусловлены только нокдауном белка Sgf11. Следует отметить, что нокдаун белка Nonstop не оказывал влияния на экспорт транскриптов *hsp70*; таким образом, Sgf11 вовлечен в экспорт мРНК независимо от DUB модуля (Рис. 5Б). Далее мы изучили влияние Sgf11 на общий экспорт мРНК. Для этого в таких же условиях нокдауна Sgf11 мы анализировали распределение мРНК между ядром и цитоплазмой (флуоресцентная РНК *in situ* гибридизация с олиго(dT)-пробой). Мы наблюдали нарушение общего экспорта мРНК (Рис. 5Г, 6Б) и накопление ее в ядре в 65% изученных клеток, в качестве контроля использовали нокдаун белка Xmas-2 (нарушение экспорта в 75% изученных клеток) (Рис. 5Д). Следует отметить, что нокдаун компонента DUBm, Nonstop, не оказывал влияния на распределения поли(А)-РНК (Рис. 5Г), что позволяет с большой долей уверенности заключить: Sgf11 независимо от DUBm является новым фактором, координирующим общий экспорт мРНК в клетках.

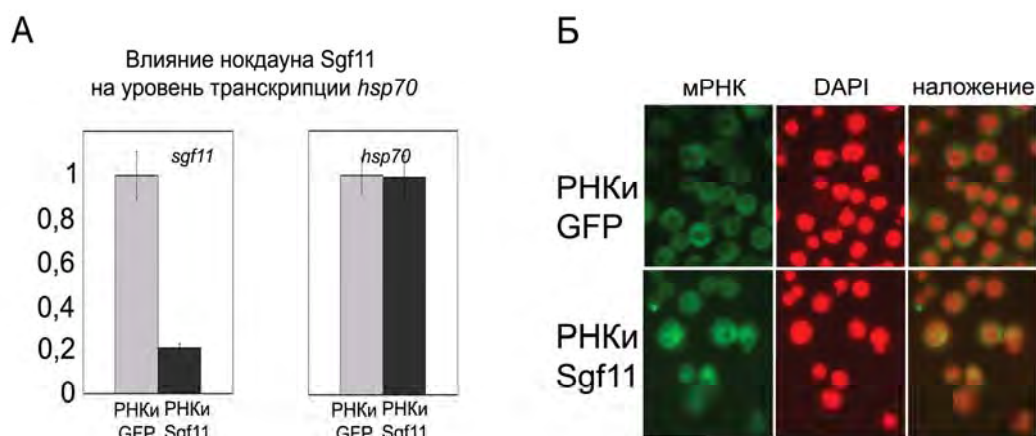


Рисунок 6. А. Нокдаун Sgf11 не оказывает влияния на уровень транскрипции гена *hsp70*. На первом рисунке приведено снижение количества транскриптов Sgf11 в результате РНК-интерференции, на втором рисунке приведен уровень транскрипции *hsp70* при нокдауне Sgf11 и в контрольных клетках. Количество Sgf11 *hsp70* транскриптов в S2-клетках, обработанных дцРНК GFP (контроль) или дцРНК Sgf11, при тепловом шоке было измерено методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровень транскрипции индивидуального гена в контрольных клетках был принят за единицу. **Б.** Эффект нарушения экспорта мРНК в клетках с нокдауном Sgf11 из эксперимента, представленного на рисунке 5Г, на примере нескольких (поле) клеток.

***Sgf11* присутствует в ядерной и цитоплазматической фракции S2-клеток, колокализуется с комплексом ядерной поры и взаимодействует с комплексом общего экспорта мРНК AMEX**

Мы показали, что Sgf11 является звеном аппарата клеточного экспорта мРНК. Следующим шагом нашей работы было изучить, в каких клеточных компартментах локализуется Sgf11 для выполнения своих функций. Для этого мы изучали внутриклеточное распределение Sgf11 и другого компонента DUBm, белка Nonstop, методом

иммуноокрашивания S2-клеток. Оказалось, оба белка распределены в ядре в виде точечных структур и колокализуются с ядерной оболочкой (Рис. 7А, панели «а»-«г»), как это было показано ранее для других компонентов комплекса SAGA (Kurshakova et al., 2007). Совместное иммуноокрашивание S2-клеток антителами против Sgf11, Nonstop, с антителами к компоненту комплекса ядерной поры (NPC), показало совпадение сигналов компонентов DUBm и NPC на периферии ядра. Следует отметить, что в отличие от Nonstop, имевшего только ядерный сигнал окрашивания (Рис. 7А, панели «б» и «г»), Sgf11 имел точечное ядерно-цитоплазматическое окрашивание, таким образом, подтверждая существование Sgf11-содержащих комплексов, отличных от DUBm (Рис. 7А, панели «а» и «в»). Похожее ядерно-цитоплазматическое окрашивание демонстрировали ENY2 и Xmas-2, компоненты комплекса общего экспорта мРНК AMEX (Kurshakova et al., 2007) .

Для подтверждения результатов иммуноокрашивания лизат культуры S2-клеток фракционировали на ядерную и цитоплазматическую фракции и присутствие Sgf11 и Nonstop анализировали методом вестерн-блот анализа (Рис. 7Б). Nonstop, каталитическая субъединица DUB модуля, был обнаружен только в ядерной фракции, как и Gcn5, ацетилтрансферазная субъединица комплекса SAGA [Stern et al, 1999]. Уровни белка Sgf11, как и ENY2, были практически одинаковы в ядерной и цитоплазматической фракциях.

Таким образом, Sgf11 способен связывать мРНК, вовлечен в ее экспорт и колокализуется с NPC, и, следовательно, как компонент клеточного аппарата экспорта мРНК может взаимодействовать с другими элементами экспортной машины клетки. Мы провели эксперименты по коиммунопреципитации антителами против Sgf11 и Nonstop компонента комплекса AMEX белка Xmas-2. Антитела против Sgf11 преципитировали белок Xmas-2, в отличие от антител против Nonstop (Рис. 7В). Полученный результат свидетельствует о том, что именно Sgf11 независимо от DUBm взаимодействует с AMEX и влияет на клеточный экспорт мРНК. Для подтверждения непосредственного влияния Sgf11 на экспорт мРНК мы проверили влияние нокдауна Sgf11 (Рис. 7Г) на уровни экспрессии компонентов AMEX, Xmas-2 и ENY2. Мы показали, что нокдаун Sgf11 не влияет на уровни экспрессии компонентов AMEX, и, таким образом, нарушения экспорта мРНК при интерференции белка Sgf11 являются следствием падения уровня самого белка или следствием отсутствия взаимодействия между Sgf11 и его партнерами по экспорту мРНК.

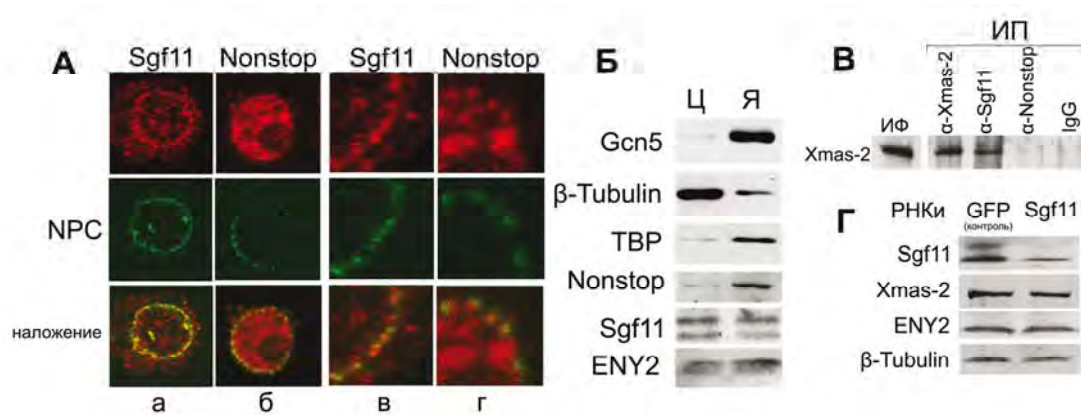


Рисунок 7. Изучение внутриклеточной локализации Sgf11 и взаимодействия с компонентами аппарата экспорта мРНК клетки. **А.** Sgf11 присутствует в виде точечных структур внутри клетки и колокализуется с NPC. На рисунке представлено иммуноокрашивание S2-клеток антителами к Sgf11 или Nonstop (красный цвет), и NPC (зеленый цвет), а также наложение изображений (1000 \times). Панели «в» и «г» отображают фрагменты белков при увеличении (10 \times 1000 \times). **Б.** Sgf11 присутствует и в ядре и в цитоплазме клетки, Nonstop – ядерный белок. На рисунке представлены результаты вестерн-блот анализа распределения Sgf11 и Nonstop между ядерной и цитоплазматической фракциями лизата S2-клеток. На гель наносились эквивалентные количества лизатов, и мембрана далее окрашивалась антителами к соответствующим белкам. Антитела против TBP и β -тубулина были использованы для контроля отсутствия загрязнения ядерной фракции цитоплазматическими белками и наоборот. **В.** Sgf11, но не Nonstop, взаимодействует с Xmas-2, компонентом комплекса экспорта мРНК AMEX. В экспериментах по иммунопреципитации антитела против Sgf11 сосаждали Xmas-2 из ядерного экстракта эмбрионов дрозофилы, в отличие от антител к Nonstop. Мембрану окрашивали антителами к Xmas-2. В качестве контроля использовали IgG из преиммунной сыворотки. **Г.** Нокдаун Sgf11 не влияет на уровень экспрессии компонентов комплекса AMEX в S2 клетках. На рисунке представлены результаты вестерн-блот анализа соответствующих лизатов (левые панели – контроль, правые панели - эксперимент).

Sgf11 присутствует в составе нескольких комплексов, выделенных из ядерного экстракта эмбрионов дрозофилы, и ассоциирован с белком комплекса, связывающего 5'-Кэп

Данные о том, что Sgf11 участвует в транскрипции гена *hsp70*, связывает мРНК и вовлечен в экспорт мРНК частиц независимо от DUBm SAGA, свидетельствуют о многофункциональности белка и предполагают многообразие комплексов, его содержащих. Для изучения комплексов, содержащих Sgf11, мы анализировали профили элюции Sgf11 и других компонентов DUBm после разделения белковых комплексов из ядерного эмбрионального экстракта на гель-фильтрационной колонке Superose 6. Исследование проводили методом вестерн-блот анализа. Чтобы идентифицировать пик, соответствующий комплексу SAGA, использовали антитела против его структурного компонента – белка Ada2b [Stern et al, 1999] (Рис. 8А). На профиле элюции белка ENY2 было выявлено несколько пиков, соответствующих различным комплексам, что согласуется с ранее полученными данными [Корытова et al., 2010]. Профили элюции Sgf11 и Nonstop содержали широкий пик в высокомолекулярной области (1.5-2МДа), совпадающий с пиком элюции Ada2b. Это свидетельствует о том, что в этих фракциях DUB модуль ассоциирован с комплексом SAGA. Однако мы наблюдали совпадающие пики элюции белков Sgf11, Nonstop

и ENY2 и в низкомолекулярной области (фракции 28-31) (Рис. 8А). Мы предположили, что этот пик может соответствовать DUBm, отделившемуся от SAGA. Коиммунопреципитация из указанных фракций показала, что антитела к Nonstop и ENY2 преципитируют Sgf11 и наоборот, что подтверждает существование обособленного DUBm в низкомолекулярных фракциях (Рис. 8Б).

Однако, как видно из результатов коиммунопреципитации из низкомолекулярных фракций, антитела против белков Nonstop и ENY2 не истощали полностью Sgf11 (Рис. 8Б). Похожие результаты наблюдались в экспериментах по коиммунопреципитации ENY2, компонента нескольких комплексов биогенеза и экспорта мРНК (Гурский и др., 2010). Таким образом, низкомолекулярные фракции содержат Sgf11, не интегрированный в DUBm, возможно, в составе нового неизвестного комплекса. Это согласуется с профилем элюции Sgf11, имеющим низкомолекулярный пик в области 33-35 фракции. Как видно из профилей элюции, белки Nonstop и ENY2 в этих фракциях отсутствуют (Рис. 8А). Для характеристики Sgf11-содержащего комплекса из 33-35 фракций была составлена многоступенчатая пошаговая схема очистки ядерного экстракта эмбрионов дрозофилы (Рис. 8В). На последней стадии фракции с MonoQ, содержащие Sgf11, сконцентрировали и нанесли на Superose 6 гель-фильтрационную колонку. После разделения на гель-фильтрационной колонке из низкомолекулярных фракций (33-35), содержащих изучаемый белок, была проведена иммунопреципитация на сефарозе с ковалентно пришитыми антителами к Sgf11. Масс-спектрометрический анализ полученных препаратов методом MALDI-TOF MS показал, что в низкомолекулярных фракциях Sgf11 ассоциирован с Cbp80, компонентом комплекса CBC, связывающего Кэп-последовательность на 5'-конце мРНК и вовлеченного в множество процессов, связанных с формированием и экспортом мРНК частиц [Cheng et al., 2006] (Рис. 8Г). Также в полученных препаратах был обнаружен актин, однако он присутствовал и в контрольном препарате (Рис. 8Г), поэтому его иммунопреципитация является результатом неспецифических взаимодействий.

Для изучения взаимодействий белков Sgf11 и Cbp80 мы получили и аффинно очистили специфические поликлональные антитела против Cbp80 (Рис. 9А). Профиль элюции Cbp80 на последней стадии очистки Sgf11-содержащих комплексов (гель-фильтрации) совпадал с профилем Sgf11 (Рис. 8Д). Результаты иммунопреципитации из ядерного эмбрионального экстракта свидетельствуют, что антитела к Cbp80 преципитируют Sgf11, но не преципитируют другие компоненты DUBm: Nonstop и ENY2 (Рис. 8Е). Таким образом, Sgf11 и Cbp80 находятся в составе одного комплекса, не связанного с DUBm.

Взаимодействие Sgf11 и Cbp80 в составе найденного комплекса может

осуществляться напрямую или посредством взаимодействия с другими компонентами комплекса, утерянными в процессе очистки вследствие своего малого молекулярного веса. Наиболее вероятным примером такого белка может служить другой, не менее важный компонент комплекса CBC – Cbp20. Для того чтобы проверить взаимодействие Sgf11 с Cbp20, рекомбинантный Sgf11, несущий в себе FLAG-эпитоп, был коэкспрессирован с Cbp20 или Cbp80, содержащими HA-эпитоп, в культуре S2-клеток. В экспериментах по коиммунопреципитации из лизата S2-клеток антитела против FLAG соосаждали HA-содержащий Cbp80, и наоборот, не соосаждали HA-содержащий Cbp20 (Рис. 8Ж). Таким образом, белок Sgf11 не взаимодействует с другим компонентом комплекса CBC - Cbp20, и взаимодействие между Sgf11 и Cbp80 в обнаруженном нами комплексе является прямым.

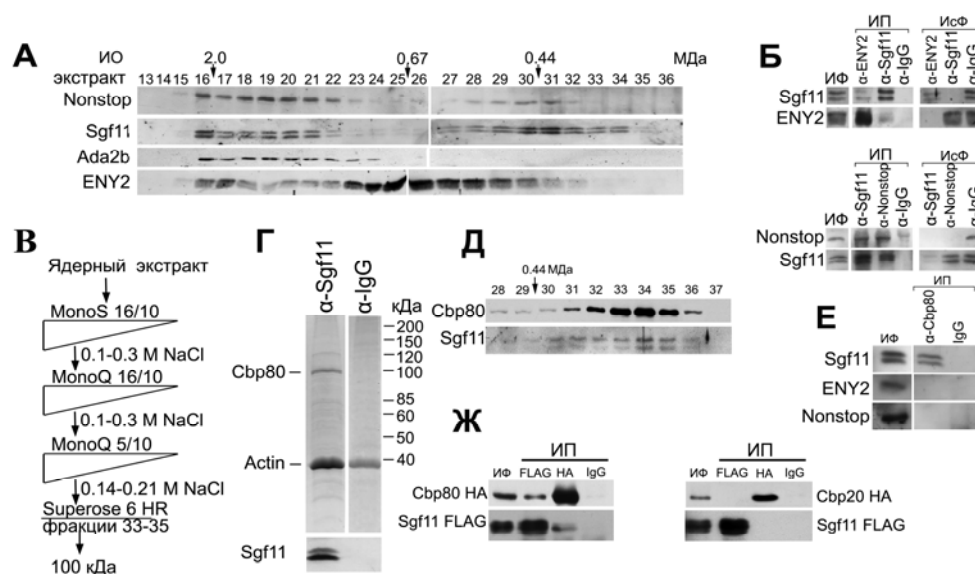


Рисунок 8. Очистка и анализ Sgf11-содержащих комплексов. А. Sgf11 и Nonstop содержатся в низкомолекулярных фракциях, не содержащих коровых субъединиц SAGA. На рисунке приведено фракционирование ядерного экстракта эмбрионов дрозофилы на гель-фильтрационной колонке Superose 6 (ИО – Исключенный Объем). Б. Sgf11, Nonstop, и ENY2 взаимодействуют в низкомолекулярных фракциях. Эксперименты по коиммунопреципитации из низкомолекулярных фракций (№28-31) ядерного эмбрионального экстракта проводилась с использованием антител против Sgf11, Nonstop, ENY2 и IgG из преиммунной сыворотки. Результаты коиммунопреципитации (ИП) сравнивали с исходной фракцией (ИФ), содержащей эквивалентное количество экстракта, также приведена истощенная исходная фракция (ИсФ). В. Схема очистки Sgf11-содержащих комплексов. На каждой стадии белки элюировались градиентом NaCl, и фракции анализировались на присутствие Sgf11 методом вестерн-блот анализа. Фракции, соответствующие пику элюции Sgf11 (при указанных концентрациях NaCl), были собраны и нанесены на следующую колонку. Г. Очистка Sgf11-содержащего комплекса из фракций 33-35 (около 100кДа). Элюат после колонки с иммуносорбентом нанесли на 9% SDS-ПААГ-электрофорезный гель, окрасили Кумасси; далее образцы проанализировали методом масс-спектрометрии (MALDI-TOF). Контроль иммунопреципитации для того же образца с использованием преиммунной сыворотки IgG показан справа. На нижних секциях показаны результаты вестерн-блот анализа образца Sgf11-содержащего комплекса и контроль присутствия в иммунопреципитации Sgf11. Д. Профили элюции Sgf11 и Cbp80 совпадают на финальной стадии очистки (гель-фильтрации на Superose 6). Е. Cbp80 не взаимодействует с другими компонентами DUBm (ENY2, Nonstop). На рисунке представлены результаты иммунопреципитации антителами против Cbp80 компонентов DUBm из ядерного экстракта эмбрионов дрозофилы. Ж. Рекомбинантный белок Sgf11 взаимодействует напрямую с Cbp80, но не с Cbp20. Эксперименты по коиммунопреципитации проводили с использованием антител к последовательностям FLAG и HA из лизата S2-клеток. Мембрану в процессе вестерн-блот анализа окрашивали указанными антителами против FLAG и HA. На гель наносили 10% исходной фракции и 50% иммунопреципитата.

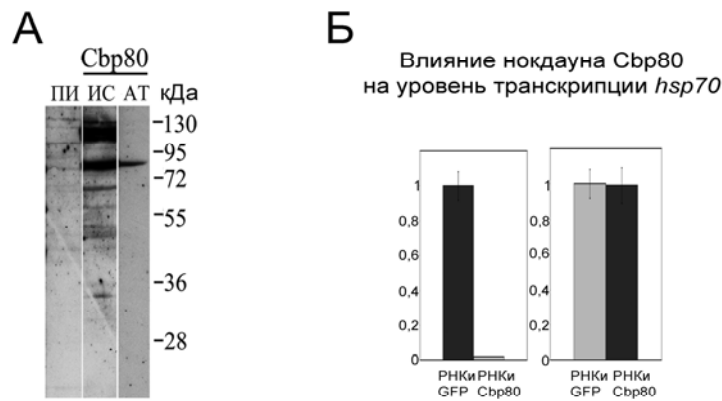


Рисунок 9. А. Вестерн-блот анализ антител против Cbp80. Эмбриональный экстракт *D. melanogaster* был нанесен в широкую ячейку, после переноса белков мембрана была разрезана на полосы, каждая из которых была окрашена с использованием ПИ – преиммунной сыворотки, ИС – иммунной сыворотки, АТ – аффинно очищенные антитела к Cbp80. Б. Нокдаун Cbp80 не оказывает влияния на уровень транскрипции гена *hsp70*. Количество *hsp70* транскриптов в S2-клетках, обработанных дцРНК GFP (контроль) или дцРНК Cbp80, при тепловом шоке было измерено методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Уровень транскрипции индивидуального гена в контрольных клетках был принят за единицу.

Cbp80 необходим для привлечения Sgf11 в промоторную область гена *hsp70*

Мы показали, что Sgf11 взаимодействует с компонентом комплекса CBC, Cbp80. С целью установить значение этого взаимодействия методом иммунопреципитации хроматина мы проанализировали привлечение Cbp80 в промоторную область гена *hsp70* в нормальных условиях и при тепловом шоке. Оказалось, что количество ассоциированного с промотором Cbp80 увеличивается при тепловом шоке и значительно уменьшается при обработке экстракта РНКазой А (Рис. 10А). Таким образом, как и Sgf11, Cbp80 привлекается РНК-зависимо.

Тот факт, что Sgf11 и Cbp80 взаимодействуют, а также то, что одна из фракций Sgf11 привлекается при активации транскрипции РНК-зависимо, - все это заставляет предположить, что ассоциация Sgf11 с промотором *hsp70* может зависеть от Cbp80. Для проверки данной гипотезы мы провели эксперименты по иммунопреципитации хроматина за антитела против PolII, Sgf11, различных компонентов SAGA, а также против компонента комплекса элонгации транскрипции ТНО, Thoc5, в условиях нокдауна Cbp80 при тепловом шоке (Рис. 9Б, 10Б). Комплекс ТНО был выбран, поскольку из литературных данных известно, что в ходе транскрипции он ассоциирован с растущим мРНК транскриптом через Cbp80 [Cheng et al., 2006]. Следует отметить, что нокдаун Cbp80 не оказывал влияния ни на уровни экспрессии указанных факторов, ни на уровень транскрипции гена *hsp70* (Рис. 9Б, 10В-Ж) Как видно из полученных результатов, понижение (падение) уровня Cbp80 не оказывало влияния на привлечение ассоциированных с промотором компонентов SAGA и не

изменяло уровня PolII в промоторной области гена (Рис. 10В-Д). Количество Thoc5 в промоторной области уменьшилось более чем в два раза (Рис. 10Е), что соответствует литературным данным о его взаимодействии с белком Cbp80 [Cheng et al., 2006]. Уровень компонента DUBm ENY2 не изменился (Рис. 10Д). В соответствии с данными, полученными у дрожжей, Sus1, гомолог ENY2, интегрирован в DUBm через взаимодействие с ySgf11. Однако уровень Sgf11, привлекаемого в промоторную область при тепловом шоке, в условиях нокдауна Cbp80 также уменьшился более чем в два раза (Рис. 10Ж). Таким образом, уровень Sgf11, ассоциированного с DUBm, остался неизменным, и взаимодействие Cbp80-Sgf11 существенным образом влияет на привлечение Sgf11 при активации транскрипции гена *hsp70*.

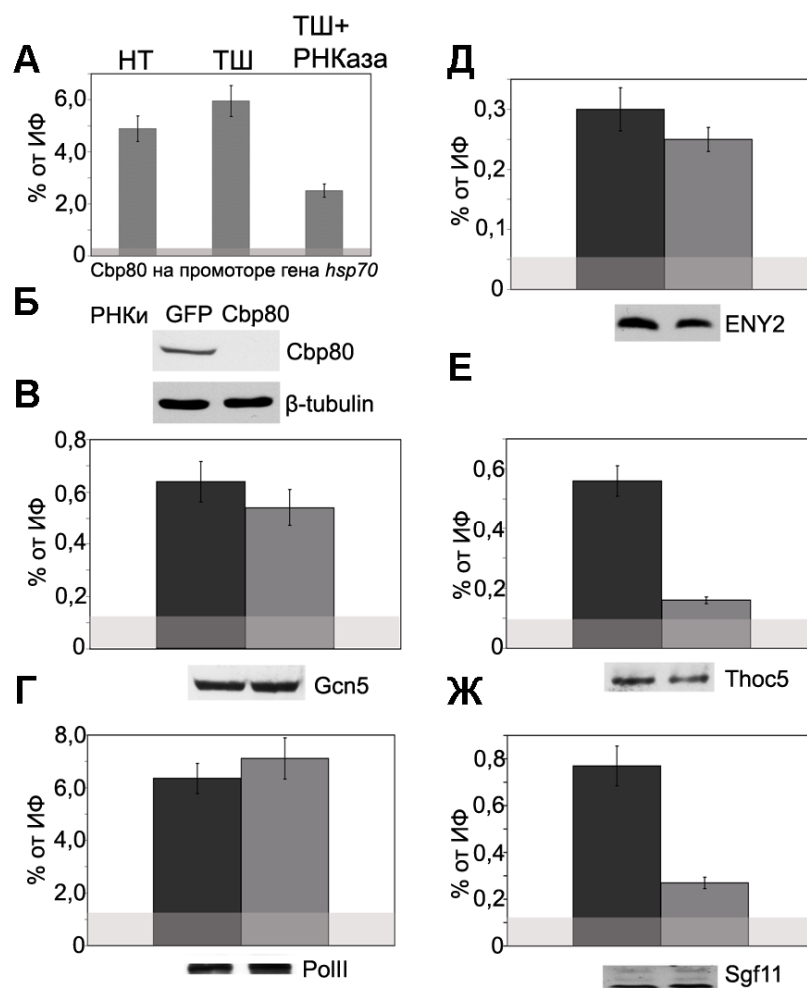


Рисунок 10. Cbp80 необходим для привлечения Sgf11 в область гена *hsp70A*. Cbp80 привлекается на промотор гена *hsp70* РНК-зависимо. Уровень Cbp80 на промоторе *hsp70* гена был измерен методом иммунопреципитации хроматина из лизата S2-клеток при нормальной температуре (НТ) и при тепловом шоке (ТШ), а также при тепловом шоке из лизата S2-клеток, обработанного РНКазой (ТШ+РНКаза). **Б.** Специфичность нокдауна Cbp80. **В-Ж.** Влияние нокдауна Cbp80 на привлечение в промоторную область Sgf11 и других факторов транскрипции. Уровни привлечения соответствующих факторов в промоторную область *hsp70* были измерены методом иммунопреципитации хроматина из лизата S2-клеток, подвергнутого тепловому шоку. Сигнал измеряли в лизатах с нокдауном Cbp80 и в контрольных лизатах. Для каждого эксперимента приведены результаты вестерн-блот анализа уровня экспрессии соответствующего фактора.

III. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Транскрипционный комплекс SAGA участвует во многих процессах в ходе экспрессии генов. Открытие деубиквитиназной активности SAGA DUBm существенным образом расширило круг процессов, в которые вовлечены его компоненты. Было показано, что они могут являться многофункциональными и связывать процессы транскрипции и клеточного экспорта мРНК из ядра [Rodriguez- Navarro et al., 2009; Копытова et al., 2010,].

Структура DUBm установлена лишь у дрожжей [Kohler et al., 2010], однако он играет важную роль и в других организмах. Показано, что компоненты DUBm человека являются прогностическими маркерами некоторых видов опухолей [Piao et al., 2012; Armakolas et al., 2012], а также вызывают нервно-паралитические заболевания (спинно-мозжечковая атаксия типа 7) [Baker et al., 2007]. Однако функции и молекулярный механизм действия компонентов DUBm остается малоизученным.

Целью данной работы было изучить участие белка Sgf11 в процессах транскрипции и экспорта мРНК.

Мы показали, что Sgf11 взаимодействует с деубиквиназой Nonstop и с белком ENY2, а также ассоциирован с гистонацетилтрансферазой Gcn5, каталитической субъединицей комплекса SAGA. Таким образом, у дрозофилы существует DUBm, входящий в состав комплекса SAGA, компонентом которого является Sgf11. Однако наши результаты также указывали на то, что Sgf11 может входить в другие комплексы, не связанные с DUBm.

Для изучения участия Sgf11 в транскрипции был выбран модельный ген *hsp70*. Результаты иммунопреципитации хроматина показали, что Sgf11 ассоциирован с промоторной областью гена, как и остальные компоненты DUBm. Однако, в отличие от них, дополнительная фракция Sgf11 привлекается при активации транскрипции, и ее привлечение зависит от РНК. В соответствии с этими данными, наши эксперименты по иммунопреципитации РНК показали, что Sgf11 связывает мРНК *hsp70*, а также мРНК других генов. При этом способность связывать мРНК у Sgf11 даже выше, чем у компонентов комплекса экспорта мРНК AMEX.

Способность белка Sgf11 связывать мРНК свидетельствовала о его принадлежности к аппарату формирования и экспорта мРНК частиц. На примере РНК гена *hsp70*, а также на примере тотальной мРНК мы показали, что Sgf11 важен для экспорта общей мРНК. При этом нокдаун Sgf11 приводил к нарушениям в экспорте мРНК практически в той же степени, как и нокдаун Xmas-2, компонента комплекса экспорта мРНК AMEX. Мы также обнаружили взаимодействие Sgf11 с белком Xmas-2. Как и компоненты комплекса AMEX, Sgf11

колокализовался с комплексом ядерной поры. Таким образом, Sgf11 напрямую участвует в функционировании аппарата экспорта мРНК.

Как показали наши данные, Sgf11 может содержаться в нескольких комплексах. Профиль элюции Sgf11-содержащих комплексов на гель-фильтрационной колонке, как и ожидалось, содержал несколько пиков. В низкомолекулярной области был обнаружен новый комплекс, содержащий Sgf11 и Cbp80, компонент комплекса CBC, связывающего Кэп-структуру на 5'-конце мРНК. Новый комплекс не содержал других компонентов DUBm. Взаимодействие Sgf11 и Cbp80 было подтверждено в коиммунопреципитации.

Мы также показали, что взаимодействие Sgf11 и Cbp80 является прямым и не опосредовано другими компонентами CBC или DUBm. Кроме того, привлечение Cbp80 в промоторную область, как и в случае Sgf11, зависело от РНК. При активации транскрипции привлечение Sgf11, не связанного с DUBm, в промоторную область гена существенным образом зависело от Cbp80.

Известно, что Cbp80 функционирует, как «платформа», для посадки различных факторов биогенеза и экспорта мРНК частиц [Luna et al., 2010], в то время как другая субъединица CBC, белок Cbp20, связывает Cap. Так, показано, что Cbp80 ассоциирован с ТНО, компонентом комплекса элонгации транскрипции и экспорта (TREX) через адаптерный белок Aly [Cheng et al., 2006]. Таким образом, Cbp80 может взаимодействовать с аппаратом формирования и экспорта мРНК частиц на разных стадиях экспрессии гена, и его ассоциация с Sgf11 может играть ключевую роль в этих процессах.

Следует отметить, что поведение другого компонента DUBm, его каталитической субъединицы Nonstop, в наших экспериментах кардинально отличалось от поведения Sgf11. Количество ассоциированного с промотором *hsp70* белка Nonstop практически не менялось при тепловом шоке, его привлечение не зависело ни от РНК, ни от Cbp80, и его нокдаун не оказывал влияние на распределение мРНК в клетке. Это также свидетельствует о том, что Sgf11 вовлечен в общий экспорт мРНК независимо от DUBm.

Вполне вероятно, что взаимодействие между Sgf11, ассоциированным с Cbp80 на 5'-конце транскрипта, и комплексом AMEX является ключевым для осуществления эффективного экспорта мРНК частиц. Sgf11 локализован в клетке в виде точечных структур, присутствующих и в ядре и в цитоплазме, и его распределение похоже на распределение компонентов комплекса AMEX [Kurshakova et al., 2007]. В то же время известно, что CBC в ходе формирования и экспорта мРНК частицы остается связанным с ней вплоть до замены его на фактор eIF4E/G в цитоплазме [Lejeune et al., 2002], являясь, таким образом, интегральным компонентом мРНК частицы. Возможно, Sgf11 также ассоциирован с мРНК

частицей и, как и AMEX, в составе мРНК частицы выходит в цитоплазму, где осуществляет дальнейшую регуляцию экспрессии мРНК. Функции Sgf11 в цитоплазме в настоящее время изучаются [Nakamura et al., 2011].

Интересно, что несколько субъединиц DUBm вовлечены в клеточный экспорт не в составе модуля, а по отдельности. Так ENY2 входит состав ТНО-комплекса элонгации транскрипции и в комплекс AMEX [Корытова et al., 2010]. Есть данные об усилении дефектов экспорта мРНК в фенотипах мутантов по ENY2/ Sus1 в случае делеции Sgf11 у дрожжей [Kohler et al., 2006; Kohler et al., 2008].

Таким образом, мы показали, что Sgf11 в клетке функционирует в составе DUBm комплекса SAGA. В то же время другая фракция формирует комплекс с Cbp80, привлекается в промоторную область гена в процессе активации транскрипции и ассоциирована с растущим транскриптом. Этот Sgf11 взаимодействует с комплексом AMEX и вовлечен в последовательный экспорт зрелых мРНК частиц в цитоплазму (Рис. 11).

Полученные нами данные о функциях белка Sgf11 дрозофилы позволят в будущем установить механизм работы и роль компонентов DUBm млекопитающих и, в частности, у человека.

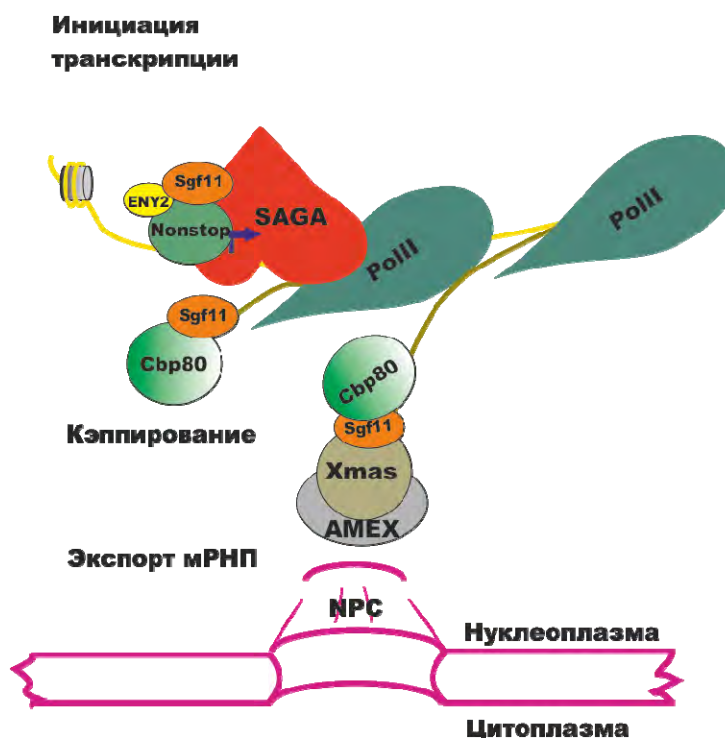


Рисунок 11. Sgf11 участвует в различных этапах экспрессии генов в ядре. Sgf11 ассоциирован с промотором гена *hsp70* как компонент DUBm комплекса SAGA. При активации транскрипции дополнительная фракция Sgf11 привлекается в промоторную область через взаимодействие с компонентом комплекса белков, связывающих Cap (Cbp80), и вновь синтезируемым транскриптом. Sgf11 ассоциирован с мРНК частицей, взаимодействует с комплексом экспорта мРНК AMEX, связанным с ядерной порой, и необходим для осуществления экспорта мРНК из ядра в цитоплазму.

IV. ВЫВОДЫ

1. Показано существование DUBm у *D. melanogaster*, содержащего белки Sgf11, ENY2 и Nonstop и ассоциированного с транскрипционным комплексом SAGA.
2. Установлено, что транскрипционный фактор Sgf11 ассоциирован с промотором гена *hsp70* в составе DUBm. В то же время Sgf11, не входящий в DUBm, привлекается на ген РНК-зависимо после активации транскрипции.
3. Выявлено, что Sgf11 необходим для общего экспорта мРНК из ядра и взаимодействует с мРНК различных генов.
4. Показано, что Sgf11 присутствует в ядре и цитоплазме клетки, колокализуется с комплексом ядерной поры и взаимодействует с комплексом общего экспорта мРНК AMEX.
5. Очищен новый белковый комплекс, в составе которого Sgf11 взаимодействует с Cbp80, белком комплекса, связывающего Кэп-структуру.
6. Показано, что Cbp80 необходим для привлечения Sgf11 в промоторную область гена *hsp70* при активации транскрипции. Привлечение Cbp80 на промотор, так же, как и привлечение Sgf11, зависит от вновь синтезированной РНК.

V. СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ.

Статьи:

1. Gurskiy D.Y., Orlova A.V., Vorobyeva N.E., Nabirochkina E.N., Krasnov A.N., Shidlovskii Y.V., Georgieva S.G., Kopytova D.V. 2012. The DUBm subunit Sgf11 is required for mRNA export and interacts with Cbp80 in Drosophila. **Nucleic Acid Research**, 40 (21): 10689-700.
2. Бречалов А.В., Гурский Д.Я., Георгиева С.Г., Шидловский Ю.В. 2011. Функционирование комплексов макромолекул на последовательных стадиях экспрессии генов как самосогласованных молекулярных машин. **Биофизика**, 56 (5): 831-839.

Тезисы докладов:

1. Gurskiy D.Y., Kopytova D.V., Georgieva S.G. Sgf11 a component of histone – deubiquitination module of SAGA complex is essential for general mRNA export. FEBS International Workshop «New Developments in RNA Biology». Tavira, Portugal, September 1-4, 2012, Abstract book p. 68.
2. Gurskiy D.Y., Kopytova D.V., Georgieva S.G. A component of histone – deubiquitination module of SAGA complex is essential for general mRNA export. FEBS Advanced Lecture Course «Sofia School of protein Science: Structure and dynamics of biological macromolecules». Sofia, Bulgaria, September 9-14, 2012, Abstract book p. 67.
3. Gurskiy D.Y., Kopytova D.V, Georgieva S.G. Studying the role of SAGA deubiquitination module in transcription regulation. 11th Young Scientist Forum and 36d FEBS Congress «Biochemistry for Tomorrow's Medicine». Torino, Italy, June 25-30, 2011, **FEBS Journal**, 2011, 278 (sup.1): 459.
4. Gurskiy D.Y., Krasnov A.N., Kopytova D.V. Studying the role of SAGA deubiquitination module in transcription regulation. VII International Scientific Conference for Students and PhD Students «Youth and Progress of biology». Lviv, Ukraine, April 5-8, 2011, Abstract book, p. 304.
5. Gurskiy D.Y., Krasnov A.N., Kopytova D.V. Studying the role of SAGA deubiquitination module in transcription regulation. International Symposium «Control of gene expression and cancer», Moscow, Russia, June 21-25, 2010, Abstract book, p.64.
6. Гурский Д.Я., Куршакова М.М., Копытова Д.В., Георгиева С.Г. Новый фактор транскрипции *D. melanogaster* входит в состав комплекса, связывающегося с ядерной порой и отвечающего за транспорт мРНК. XXII Зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии». Москва, Россия, 8-11 февраля, 2010, Сборник тезисов, стр. 34.
7. Гурский Д.Я., Куршакова М.М., Копытова Д.В., Георгиева С.Г. Новый фактор транскрипции *D. melanogaster* - E(y)2 входит в состав комплекса, отвечающего за транспорт мРНК. Всероссийская научная школа для молодежи «Горизонты нанобиотехнологии». Звенигород, Россия, 12 - 16 октября, 2009, Сборник тезисов, стр. 30.
8. Гурский Д.Я., Куршакова М.М., Копытова Д.В., Георгиева С.Г. Новый фактор транскрипции *D. melanogaster* - E(y)2 входит в состав комплекса, связывающегося с ядерной порой и отвечающего за транспорт мРНК. IV Российский симпозиум «Белки и пептиды». Казань, Россия, 23-26 июня, 2009, Сборник тезисов, стр. 336.

VI. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.

Ada2b	<u>A</u> lteration/ <u>D</u> eficiency in <u>A</u> ctivation complex <u>2b</u>	Компонент комплекса SAGA
Aly	<u>A</u> lways ear <u>L</u> Y	Адаптер экспорта мРНК частиц
AMEX	<u>A</u> nchoring and <u>M</u> RNA <u>E</u> Xport	Комплекс экспорта мРНК у дрозофилы
CBC	<u>C</u> ap- <u>B</u> inding <u>C</u> omplex	Комплекс белков, связывающих Кэп-последовательность
Cbp80	<u>C</u> ap- <u>B</u> inding <u>P</u> rotein <u>80</u>	Кэп-связывающий белок 80
Cbp20	<u>C</u> ap- <u>B</u> inding <u>P</u> rotein <u>20</u>	Кэп-связывающий белок 20
DUBm	<u>D</u> e <u>U</u> biquitination <u>M</u> odule	Деубиквитиновый модуль комплекса SAGA
ENY2	<u>E</u> Nhancer of <u>Y</u> ellow <u>2</u>	Компонент комплексов SAGA, AMEX, THO у дрозофилы
Gcn5	<u>G</u> eneral <u>C</u> ontrol <u>N</u> onderepressible <u>5</u>	Каталитическая субъединица комплекса SAGA
GFP	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein	Зеленый флуоресцентный белок
<i>hsp70</i>	<u>H</u> eat <u>S</u> hock <u>P</u> rotein <u>70</u> gene	Кластер генов теплового шока
mRNP (мРНК)	<u>M</u> essenger <u>R</u> ibo <u>N</u> ucleo <u>P</u> rotein	Рибонуклеопротеиновая частица
NPC	<u>N</u> uclear <u>P</u> ore <u>C</u> omplex	Комплекс ядерной поры
SAGA	<u>S</u> pt- <u>A</u> da- <u>G</u> cn5- <u>A</u> cetyltransferase	Гистонацетилазный комплекс
Sgf11, 29, 73	<u>S</u> AGA-associated <u>F</u> actor 11, 29, 73	Компонент DUBm SAGA
Sus1	<u>S</u> l gene <u>U</u> pstream of <u>y</u> Sa <u>1</u>	Компонент DUBm SAGA и комплекса экспорта мРНК у дрожжей
TBP	<u>T</u> ATA – box <u>B</u> inding <u>P</u> rotein	Белок, связывающий ТАТА – элемент
Ubp8	<u>U</u> biquitin-specific processing <u>P</u> rotease <u>8</u>	Каталитическая субъединица yDUBm
Usp22	<u>U</u> biquitin- <u>S</u> pecific <u>P</u> eptidase <u>22</u>	Каталитическая субъединица hDUBm
Xmas-2	<u>X</u> -linked <u>M</u> Ale <u>S</u> terile-2	Компонент комплекса AMEX у дрозофилы
THO	suppressor of the <u>T</u> ranscriptional defect of <u>H</u> pr1 by <u>O</u> verexpression	Комплекс элонгации транскрипции

Для заметок