

*На правах рукописи*

КУЗЬМИНА ЮЛИЯ ЛЕОНИДОВНА

**Исследование роли коактиватора транскрипции SAYP в  
активации DHR3-зависимой транскрипции генов  
у *Drosophila melanogaster***

03.01.03 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва

2012

Работа выполнена в Лаборатории регуляции экспрессии генов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук.

**Научные руководители:**

кандидат физико-математических наук,  
Шидловский Юлий Валерьевич;  
кандидат биологических наук,  
Воробьева Надежда Евгеньевна.

**Официальные оппоненты:**

Головнин Антон Клеменсович,  
доктор биологических наук, ИБГ РАН, заведующий лабораторией;  
Панкратова Елизавета Владимировна,  
кандидат биологических наук, ИМБ РАН, старший научный сотрудник.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Защита состоится «16» апреля 2012 года в 11 часов на заседании Диссертационного совета 002.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биологии гена Российской академии наук по адресу: 119991, 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 «16» марта 2012 года.

**Ученый секретарь Диссертационного совета**

кандидат фармацевтических наук

Грабовская Любовь Сергеевна

## **I. Общая характеристика работы**

### ***Актуальность темы***

Сложная система клеточной коммуникации во многом определяется способностью клетки получать информацию из ее окружения и изменять свой метаболизм в ответ на поступающие сигналы. Возможность клеток реагировать на изменения окружающей среды является основой развития, репарации тканей, иммунитета и системы поддержания гомеостаза в целом. Нарушения клеточной сигнализации могут приводить к различным серьезным заболеваниям. Понимание механизмов передачи сигнала внутри клетки необходимы для разработки методов их лечения.

Передача сигнала в клетке осуществляется обычно через каскад биохимических реакций. В случае, когда конечным звеном каскада являются транскрипционные факторы, происходит изменение профиля экспрессии определенных генов-мишеней. Изменение профиля экспрессии влечет за собой изменения в метаболизме, строении и функциях клетки и определяет ее дальнейшую судьбу. В данном процессе одну из ключевых ролей играют различные транскрипционные факторы.

Транскрипционный аппарат клетки необычайно сложно устроен и данные о механизме его работы постоянно дополняются. Основной фермент транскрипционного аппарата – ДНК-зависимая РНК-полимераза. Для эукариотических клеток характерна специализация РНК полимераз, то есть транскрипция определенного типа генов осуществляется специальной РНК-полимеразой. Так, экспрессией генов, кодирующих мРНК, контролирует РНК-полимераза II. Несмотря на свое сложное строение, она не способна самостоятельно инициировать транскрипцию. Для этого ей необходимы многочисленные вспомогательные факторы.

На данный момент выделяют три условные группы факторов транскрипции: общие факторы транскрипции, необходимые для экспрессии

большинства генов, специфические факторы транскрипции (активаторы и репрессоры) и так называемые корегуляторы (коактиваторы и корепрессоры). Последние осуществляют связь между специфическими и общими факторами транскрипции, а также изменяют структуру хроматина. Традиционно биологические исследования сфокусированы на изучении отдельных частей транскрипционного аппарата. Знания об устройстве аппарата транскрипции важны как в теоретическом плане, так и для изучения патологий, связанных с нарушениями в его работе.

В данной работе были изучены функции коактиватора транскрипции РНК-полимеразы II SAYP в DHR3-зависимой транскрипции при активации части экдизонового каскада у *D. melanogaster*. Транскрипционный коактиватор SAYP и ядерный рецептор DHR3 незаменимы в развитии *D. melanogaster*, консервативны в эволюции и имеют гомологов в протеоме человека. Мутации данных белков вызывают тяжелые нарушения в развитии как *D. melanogaster*, так и человека. В частности, для гомолога SAYP, белка PNF10 человека показано участие в контроле пролиферации клеток.

#### ***Цели и задачи исследования***

Основной целью данной работы являлось изучение роли транскрипционного фактора SAYP как коактиватора транскрипции для ядерного рецептора DHR3.

В ходе работы предполагалось решить следующие экспериментальные задачи:

- получить антитела к белку DHR3 и проверить их специфичность;
- проверить, ассоциированы ли белки SAYP и DHR3 в ядерном экстракте из эмбрионов и куколок *D. melanogaster*;
- сравнить профили экспрессии генов *DHR3* и *e(y)3* в развитии *D. melanogaster*;

- проверить генетическое взаимодействие мутаций генов *DHR3* и *e(y)3* в развитии *D. melanogaster*;
- изучить привлечение DHR3 на промоторы SAYP-зависимых генов в организме;
- подобрать условия для активации *DHR3* с помощью экдизона в культуре клеток S2 *D. melanogaster*;
- изучить транскрипцию и состояние промоторов SAYP-зависимых генов в культуре клеток при активации *DHR3*;
- исследовать привлечение SAYP и компонентов образуемого им комплекса на промотор DHR3-зависимого гена *ftz-fl* в культуре клеток при активации *DHR3*.

### ***Научная новизна и практическая ценность работы***

В данной работе изучена роль транскрипционного коактиватора SAYP в активации транскрипции генов экдизонового каскада. Показано, что SAYP в составе коактиваторного суперкомплекса BTFly взаимодействует с ядерным рецептором DHR3, участником данного сигнального пути. Взаимодействие исследуемых белков обнаружено как биохимически в ядерном экстракте на стадии эмбриона и куколки, так и в генетических экспериментах. Продемонстрировано, что SAYP важен для активации DHR3-зависимых генов.

В работе показано совместное участие активатора DHR3 и коактиватора SAYP в активации транскрипции нескольких генов, в частности, SAYP-зависимого гена *yellow*. Данные исследования говорят о наличии для DHR3 ранее неизвестных генов-мишеней.

Предложена модельная система и подобраны условия по активации *DHR3* в культуре клеток путем добавления в среду стероидного гормона экдизона. Показано, что при добавлении экдизона происходит повышение уровня транскрипции нескольких SAYP-зависимых генов.

Продemonстрировано, что SAYP важен для активированной транскрипции этих генов.

Привлечение на промотор гена *ftz-fl* ядерного рецептора DHR3 стимулирует привлечение SAYP, взаимодействующих с ним комплексов, а также РНК-полимеразы II.

Получены новые данные о работе экдизонового каскада, на основании чего предложен механизм действия ядерного рецептора DHR3.

Ввиду того, что транскрипционный коактиватор SAYP и ядерный рецептор DHR3 имеют гомологов в протеоме человека, изучение их функций на примере модельного объекта *D. melanogaster* поможет понять, как их гомологи функционируют в организме человека.

Исследования в области изучения взаимодействия данных белков могут иметь большое фундаментальное значение, а также практическое применение в медицине, фармакологии, биотехнологии и селекции.

#### ***Апробация работы***

Результаты работы были представлены автором на следующих конференциях: International Symposium “Control of gene expression and cancer” (Москва, 2010), XXIII Международная зимняя молодежная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва, 2011), VII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology” (Львов, 2011).

#### ***Публикации***

По теме диссертации опубликовано 7 печатных работ. Из них статей - 3; тезисов, докладов и материалов конференций - 4.

#### ***Объем и структура диссертации***

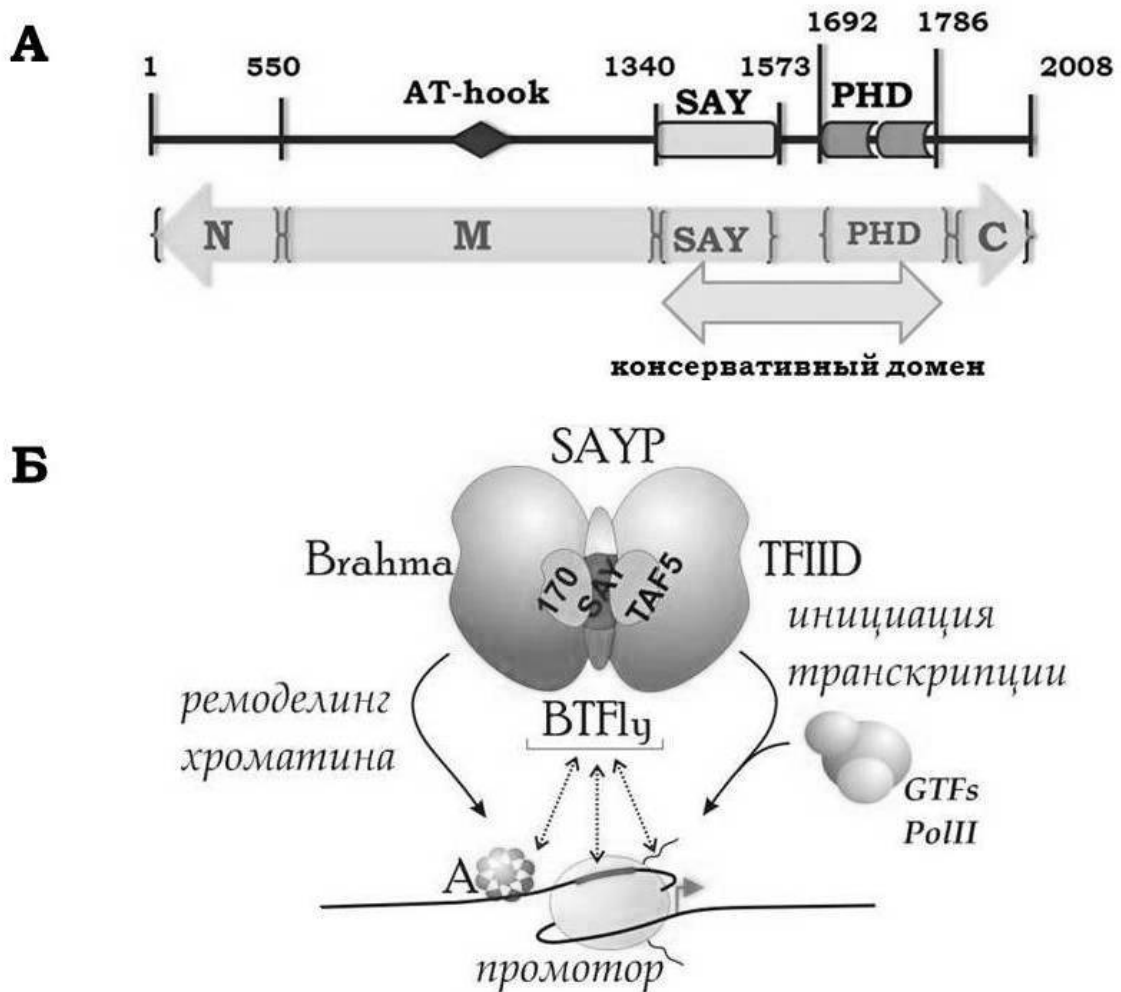
Диссертация изложена на 110 страницах и состоит из разделов: введение, обзор литературы, объект и задачи исследования, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, выводы, личный вклад автора, благодарности и список литературы. Диссертация содержит 25 рисунков. Библиография включает 150 источников.

## II. Результаты исследований

### *Введение*

Процесс активации транскрипции генов РНК-полимеразой II сложно организован и требует участия большого количества разнообразных ген-специфических активаторов. Активность и механизм действия последних определяется коактиваторами, которые обеспечивают слаженную работу компонентов транскрипционного аппарата.

Ранее, в нашей лаборатории был описан коактиватор транскрипции SAYP, кодируемый геном *e(y)3* у *D. melanogaster*. Данный белок необходим для развития и нормального функционирования организма уже на самых ранних стадиях эмбриогенеза. Экспериментально было показано, что SAYP имеет ядерную локализацию и продуцируется во многих тканях на всех стадиях развития *D. melanogaster*. Наибольший уровень SAYP наблюдается в эмбриогенезе, на стадии куколки и в репродуктивной системе взрослых самок. Среди многоклеточных SAYP имеет множество гомологов, для которых характерно наличие высококонсервативного SAY-домена, вовлеченного в активацию транскрипции, а также двух цинковых пальцев PHD-типа (**Рис. 1(А)**).



**Рис. 1. (А)** Структура белка SAYP. Указаны AT-hook, консервативный SAY-домен и PHD-домены. Показан размер белка (количество аминокислот). **(Б)** Структура коактиваторного суперкомплекса BTFly, состоящего из хроматин-ремоделирующего комплекса Brahma, фактора инициации транскрипции TFIIID и транскрипционного коактиватора SAYP. Активация транскрипции происходит при привлечении на промотор (Pr) коактиваторного комплекса BTFly, общих факторов транскрипции (GTFs), РНК-полимеразы II (Pol II) и специфических активаторов (A).

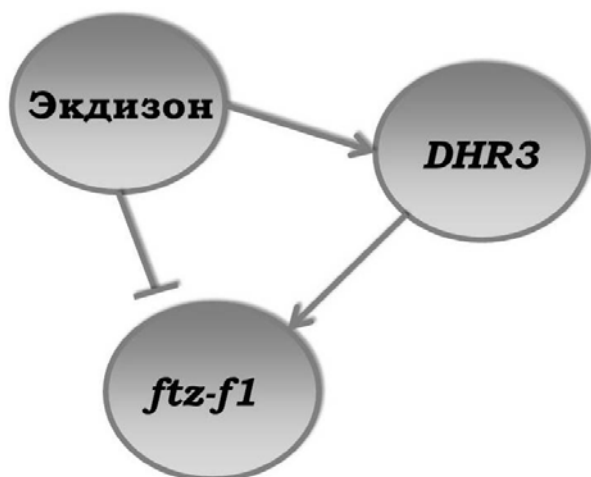
Ранее в нашей лаборатории было показано, что SAYP функционирует как компонент стабильного коактиваторного суперкомплекса BTFly, который также включает в себя хроматин-ремоделирующий комплекс Brahma и ключевой фактор инициации транскрипции TFIIID. Компоненты комплекса BTFly ассоциированы посредством взаимодействия субъединиц TAF5 (TFIIID) и BAP170 (Брахма) с активационным доменом SAY коактиватора SAYP (**Рис. 1 (Б)**).



ВТFly представляет собой функционально неделимый комплекс, который привлекается на промотор и активирует транскрипцию генов, контролируемых РНК-полимеразой II. В нашей лаборатории было показано, что SAУР колокализуется с РНК-полимеразой II во многих сайтах политенных хромосом *D. melanogaster*, таким образом, принимая участие в регуляции широкого спектра генов. Тем не менее, до недавнего времени конкретных активаторов, использующих данный механизм активации, найдено не было.

В данной работе описано взаимодействие коактиватора транскрипции SAУР с ядерным рецептором DHR3 (Hr46), кодируемым геном *DHR3 (Hr46)* у *D. melanogaster*. Транскрипция гена *DHR3* в организме насекомого активируется выбросом стероидного гормона 20-гидроксиэкдизона (далее экдизон) в составе экдизонового каскада. Экдизон запускает последовательную активацию транскрипции различных групп генов, в частности активацию гена *DHR3*, который в свою очередь активирует транскрипцию гена *ftz-f1* (Рис. 2).

Консервативный ядерный белок DHR3 относится к суперсемейству ядерных рецепторов, одному из крупнейших семейств транскрипционных активаторов. DHR3 продуцируется во многих тканях в эмбриогенезе, во время линек и в начале метаморфоза. Данный белок необходим для развития и жизнеспособности насекомого.

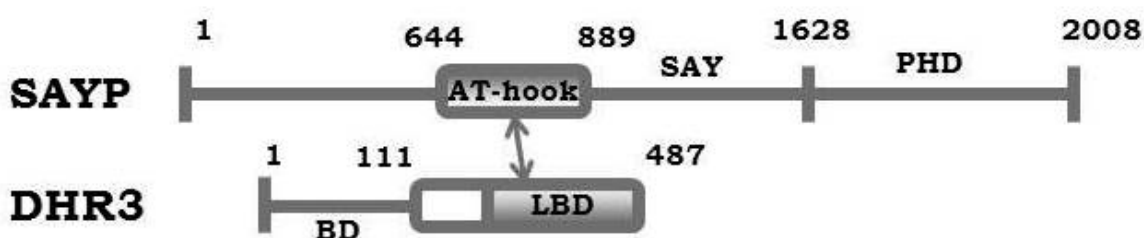


**Рис. 2.** Фрагмент экдизонового каскада у *D. melanogaster*. Выброс экдизона приводит к активации *DHR3*, который, в свою очередь, запускает активацию *ftz-f1*. Одновременно, высокая концентрация экдизона вызывает репрессию *ftz-f1*.

Хотя биологическая роль в развитии организма *D. melanogaster* для DHR3 изучена хорошо, молекулярный механизм его действия был неизвестен.

**Белок DHR3 взаимодействует с компонентом высокомолекулярного комплекса *VTFLy* коактиватором SAYP на стадии эмбриона и куколки**

Для выявления возможных партнеров коактиватора транскрипции SAYP, ранее в нашей лаборатории был проведен двугибридный скрининг библиотеки кДНК эмбрионов *D. melanogaster*. Было обнаружено взаимодействие AT-hook домена белка SAYP с С-концевым участком ядерного рецептора DHR3, содержащим лиганд-связывающий домен (LBD) (Рис. 3). Таким образом, был обнаружен первый активатор транскрипции, взаимодействующий с коактиватором SAYP.

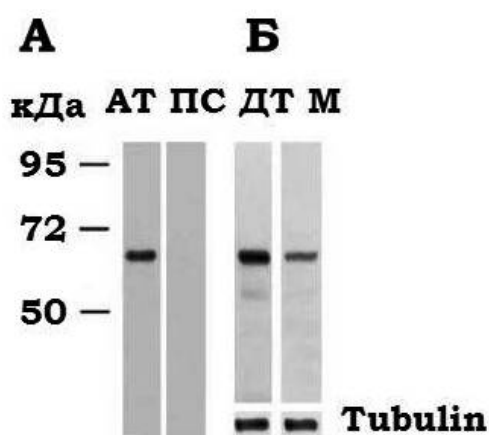


**Рис. 3.** Схематическое строение белков SAYP и DHR3. Цифрами указаны номера аминокислот. Для SAYP указаны консервативные домены: AT-hook, SAY и PHD. Стрелкой показано взаимодействие AT-домена SAYP и лиганд-связывающего (LBD) домена DHR3.

Первым этапом настоящей работы явилось изучение взаимодействия данных белков. Для изучения взаимодействия SAYP и DHR3 были получены и аффинно очищены поликлональные кроличьи антитела против белка DHR3. Учитывая, что данный белок продуцируется на стадии эмбриона, для Вестерн-блот анализа антител против DHR3 был использован эмбриональный ядерный экстракт *D. melanogaster* дикого типа (Рис. 4(A)). Было показано, что антитела детектируют одну полосу, молекулярная масса

которой около 65 кДа, что соответствует расчетной молекулярной массе белка DHR3 у *D. melanogaster*.

Специфичность данных антител была также проверена на препаратах слюнных желез предкуколок мух дикого типа и предкуколок мух, гомозиготных по гипоморфной мутации *DHR3*<sup>BG00585</sup> (Рис. 4(Б)). В мутантных мухах было показано снижение интенсивности полосы, узнаваемой антителами против DHR3.



**Рис. 4.** (А) Вестерн-блот анализ эмбрионального ядерного экстракта. Панель слева гибридована с антителами против DHR3 (АТ), панель справа – с преиммунной сывороткой (ПС). (Б) Вестерн-блот анализ препаратов слюнных желез предкуколок дикого типа (ДТ) и предкуколок мух, гомозиготных по гипоморфной мутации *DHR3*<sup>BG00585</sup> (М), окрашенных полученными антителами к DHR3. На нижней панели

представлено сравнение общего количество белка в исследуемых фракциях с помощью гибридизации с антителами против белка Tubulin.

Для проверки взаимодействия ядерного рецептора DHR3 с коактиватором транскрипции SAYP было проведено сравнение профилей элюции данных белков при хроматографическом разделении ядерного экстракта методом гель-фильтрации. Был использован ядерный экстракт из эмбрионов и куколок *D. melanogaster*, так как на этих стадиях развития детектируется наибольшее количество исследуемых белков.

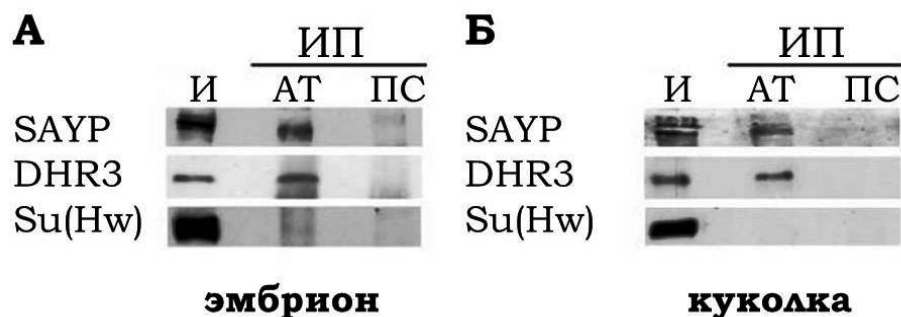


**Рис. 5.** Фракционирование ядерных экстрактов из эмбрионов (А) и куколок (Б) *D. melanogaster* методом гель-фильтрации на Superose 6. Указан исключенный объем (ИО) и калибровка колонки маркерами с известной молекулярной массой.

Ранее было показано, что при разделении ядерного экстракта в результате гель-фильтрации SAYP элюируется с колонки во фракциях 16-17 в составе высокомолекулярного комплекса VTFLy с молекулярной массой около 2 МДа.

Для белка DHR3 было детектировано два пика элюции (**Рис. 5**). Первый пик DHR3 в высокомолекулярной фракции (фракции 16-17) совпадает с пиком, содержащим SAYP. Второй (фракции 33-34), вероятно, представляет собой белок DHR3 в виде свободной низкомолекулярной формы. Результаты одинаковы как при разделении ядерного экстракта из эмбрионов (**Рис. 5(А)**), так и при использовании экстракта из куколок (**Рис. 5(Б)**). Таким образом, было показано, что DHR3 существует в организме не только в мономерном состоянии, но также и в составе высокомолекулярного комплекса, который по размеру соответствует комплексу, образуемому SAYP.

Для подтверждения взаимодействия данных белков во фракциях 16 и 17 была проведена их коиммунопреципитация (**Рис. 6**).

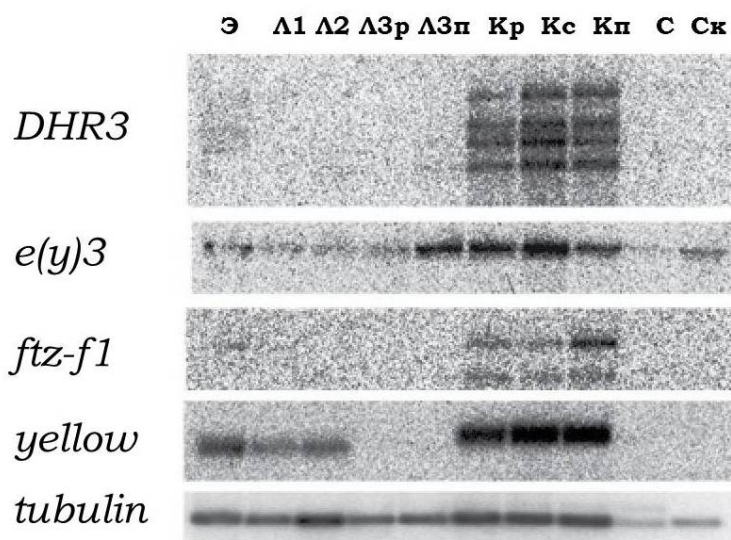


**Рис. 6.** Коиммунопреципитация компонентов высокомолекулярных фракций 16-17, полученных в результате гель-фильтрации из эмбрионального ядерного экстракта (**А**) и экстракта из куколок (**Б**). Коиммунопреципитация проводилась с помощью антител к белку DHR3 (АТ) и преиммунной сыворотки (ПС). Были проанализированы иммунопреципитированные белки и эквивалентное количество исходного экстракта (И). В качестве контроля использовалось окрашивание антителами к белку Su(Hw), который не взаимодействует с DHR3.

Показано, что антитела против DHR3 в фракциях 16 и 17 как из эмбрионального ядерного экстракта, так и из экстракта из куколок, соосаждают SAYP. Таким образом, в высокомолекулярных фракциях ядерный рецептор DHR3 ассоциирован с SAYP. Возможно, ассоциация с комплексом BTFly может объяснять миграцию DHR3 в составе высокомолекулярного комплекса на стадии эмбриона и куколки в ходе развития организма *D. melanogaster*.

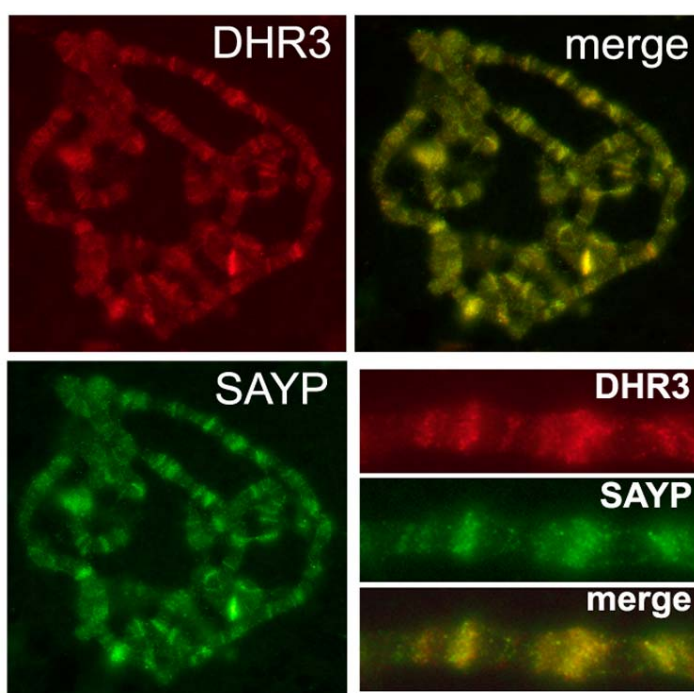
### ***Гены $e(y)3$ и DHR3 имеют схожий профиль экспрессии в ходе развития *Drosophila****

Для сравнения транскрипционной активности генов  $e(y)3$  и DHR3 был проведен Нозерн-блот анализ их экспрессии на разных стадиях развития *D. melanogaster* (**Рис. 7**).



**Рис. 7.** Сравнительный Нозерн-блот анализ профилей экспрессии генов *DHR3*, *e(y)3*, *ftz-f1*, *yellow* на разных стадиях развития *D. melanogaster*: Э – эмбрион, Л1 – личинка первого возраста, Л2 – личинка второго возраста, Л3р – личинка третьего возраста ранняя, Л3п – личинка третьего возраста поздняя, Кр – куколка ранняя, Кс – куколка средняя, Кп – куколка поздняя, С – взрослые самцы, Ск – взрослые самки. В качестве контроля предоставлен профиль экспрессии гена *tubulin*.

Показано, что пик экспрессии обоих генов, а также SAYP-зависимого гена *yellow*, приходится на эмбриональную стадию и стадию средней куколки. Схожий профиль экспрессии генов *DHR3* и *e(y)3* в развитии организма может говорить об участии кодируемых ими белков в одних процессах. В частности, в регуляции экспрессии гена *yellow*, для которого на этих стадиях развития показан пик экспрессии.



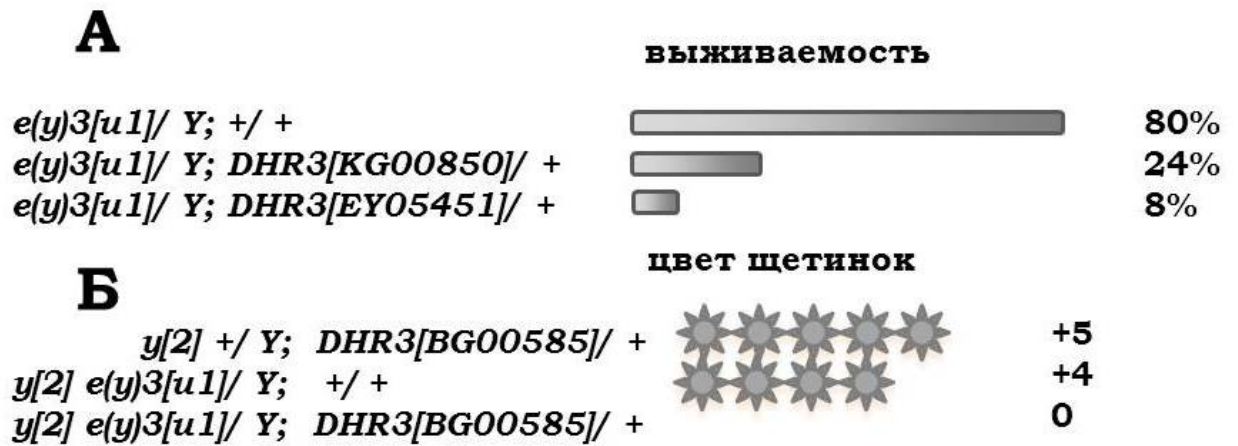
**Рис. 8.** Иммуноцитохимическое окрашивание препаратов политенных хромосом предкуколок *D. melanogaster* антителами против *DHR3* и SAYP. Показана колокализация детектируемых сайтов.

Совместное участие в регуляции транскрипции схожего набора генов также подтверждается экспериментами по иммуноокрашиванию препаратов политенных хромосом слюнных желез предкуколок *D. melanogaster* антителами против SAYP и DHR3. Было обнаружено, что SAYP и DHR3 имеют множество сайтов колокализации (**Рис. 8**). Возможно, DHR3 совместно с SAYP регулирует транскрипцию многих генов-мишеней в организме *Drosophila*, в том числе ранее неизвестных для DHR3 и SAYP.

### ***Гены $e(y)3$ и DHR3 взаимодействуют в ходе развития *Drosophila****

Для выявления взаимодействия  $e(y)3$  и DHR3 в ходе развития *D. melanogaster* были проведены генетические эксперименты по скрещиванию мух, несущих мутации исследуемых генов.

Ранее, для самцов мух, гемизиготных по мутации  $e(y)3^{ul}$ , было показано снижение выживаемости до 80% по сравнению с контрольной линией. В ходе нашей работы были поставлены скрещивания мух, несущих мутацию  $e(y)3^{ul}$  и мух, мутантных по гену DHR3 (линии **13150** (Bloomington)  $y^1$ ;  $P\{SUPor-P\}Hr46^{KG00850}/CyO$ ;  $ry^{506}$  и **15950** (Bloomington)  $y^1 w^{67c23}$ ;  $P\{EPgy2\}Hr46^{EY05451}$ ). Было проанализировано потомство от проведенных скрещиваний. Для самцов в F1, несущих одновременно гемизиготную мутацию  $e(y)3^{ul}$  и мутацию  $Hr46^{KG00850}$  в гетерозиготе, было показано снижение выживаемости до 24% по сравнению с контрольной линией, а для самцов, несущих одновременно гемизиготную мутацию  $e(y)3^{ul}$  и  $Hr46^{EY05451}$  в гетерозиготе – снижение выживаемости до уровня 8%. Таким образом, сочетание мутаций генов  $e(y)3$  и DHR3 существенно влияет на выживаемость мутантных мух (**Рис. 9(A)**).



**Рис. 9.** Выживаемость (А) и цвет щетинок (Б) мух, несущих мутации генов *e(y)3* и *DHR3*.

Изначально мутация *e(y)3<sup>u1</sup>* была обнаружена вследствие ее влияния на экспрессию аллеля *y<sup>2</sup>* гена *yellow* в щетинках. Частичное снижение экспрессии гена *e(y)3* при мутации *u1* имеет слабое влияние на экспрессию аллеля *y<sup>2</sup>* гена *yellow* в щетинках, вызывая снижение пигментации с +5 до +4.

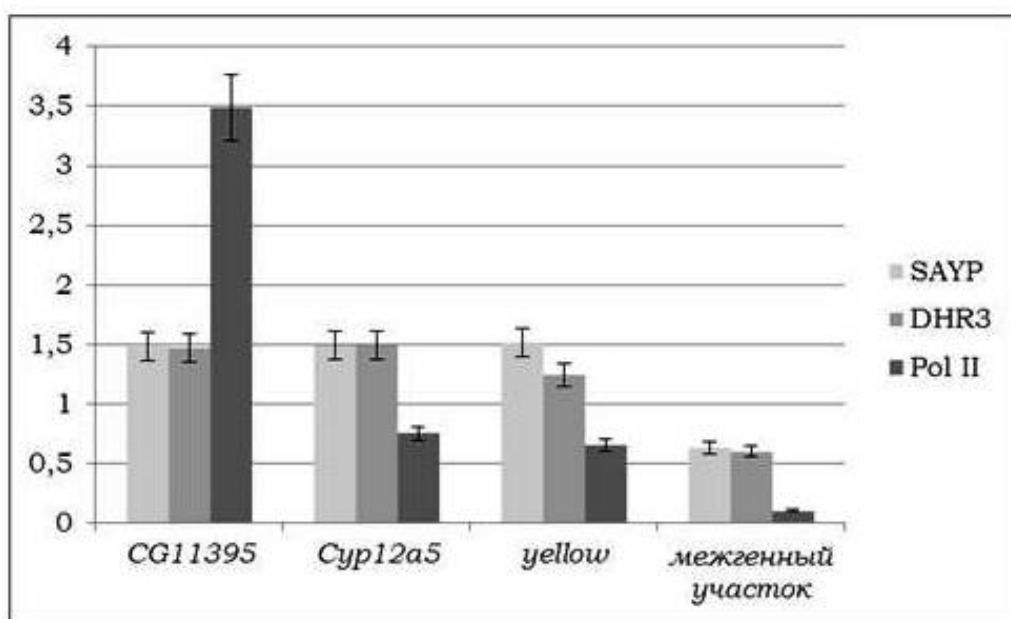
Для мух, несущих мутацию *Hr46<sup>BG00585</sup>*, не отмечено влияние на пигментацию щетинок. Самцы, полученные в результате скрещиваний, гемизиготные по мутации *e(y)3<sup>u1</sup>* и гетерозиготные по мутации *Hr46<sup>BG00585</sup>* (линия **12495** (Bloomington) *w<sup>1118</sup>; P{GT1}Hr46<sup>BG00585</sup>*), имеют фенотип *y<sup>1</sup>* со значением пигментации 0, что соответствует полной потери экспрессии гена *yellow* в щетинках (**Рис. 9(Б)**).

Таким образом, и ядерный рецептор *DHR3*, и транскрипционный коактиватор *SAYP*, участвуют в регуляции транскрипции гена *yellow* в ходе развития организма *D. melanogaster*. Данные исследования подтверждают предположение о наличии для *DHR3* ранее неизвестных генов-мишеней, которые также регулируются *SAYP*.



***DHR3 связывается с промоторами SAYP-зависимых генов на стадии средней куколки***

Чтобы подтвердить совместное участие DHR3 и SAYP в регуляции транскрипции, нами были выбраны несколько SAYP-зависимых генов (*yellow*, *CG11395*, *Cyp12a5*).



**Рис. 10.** Иммунопреципитация хроматина, проведенная на экстракте из куколок. Уровень DHR3, SAYP и РНК-полимеразы II (Pol II) на промоторах SAYP-зависимых генов. Показано процентное отношение от исходного экстракта. В качестве контроля взяты данные для межгенной области.

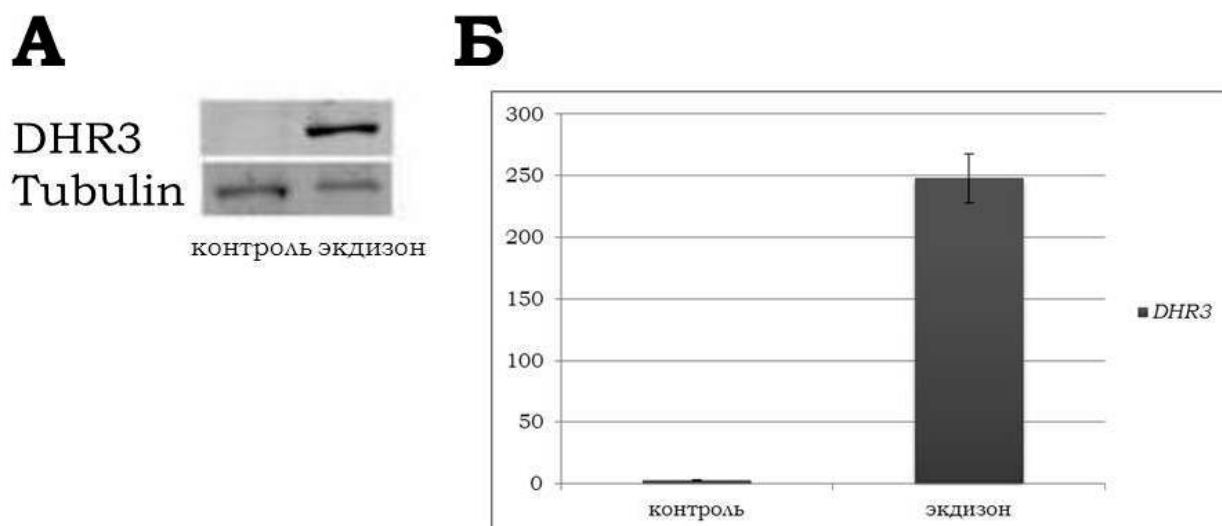
Как было показано ранее, на данной стадии развития и SAYP и DHR3 активно экспрессируются. Поэтому, для характеристики состояния промоторов выбранных генов были проведены эксперименты по хроматин-иммунопреципитации на ядерном экстракте из куколок (**Рис. 10**).

Было показано присутствие значительного количества DHR3 на промоторах SAYP-зависимых генов, что говорит о возможном его участии в регуляции их транскрипции.

## Модельная система активации *DHR3* в культуре клеток *S2*

Для детального изучения найденного взаимодействия транскрипционного коактиватора SAYP и ядерного рецептора *DHR3* была предложена модель активации *DHR3* в культуре клеток *S2 D. melanogaster*.

Как известно, *DHR3* является участником экдизонового каскада у *D. melanogaster*. В норме транскрипция *DHR3* в клетках детектируется на очень низком уровне. Нами была предложена модель и подобраны условия по активации *DHR3* в культуре клеток путем добавления в среду стероидного гормона экдизона. Было детально изучено два состояния – в среде без экдизона и после инкубации с экдизоном 16 часов (ночь).



**Рис. 11.** Активация части экдизонового каскада в культуре клеток *S2 D. melanogaster* добавлением в среду экдизона. **(А)** Вестерн-блот анализ клеточного экстракта до (контроль) и после (экдизон) добавления экдизона с использованием антител против *DHR3*. Для контроля общего уровня белков в обоих образцах данный Вестерн-блот был гибридизован с антителами против белка Tubulin. **(Б)** Уровень транскриптов *DHR3* до (контроль) и после (экдизон) добавления экдизона, измеренный методом количественного ПЦР. За единицу взят уровень транскриптов, детектируемый в *S2* клетках отсутствие экдизона.

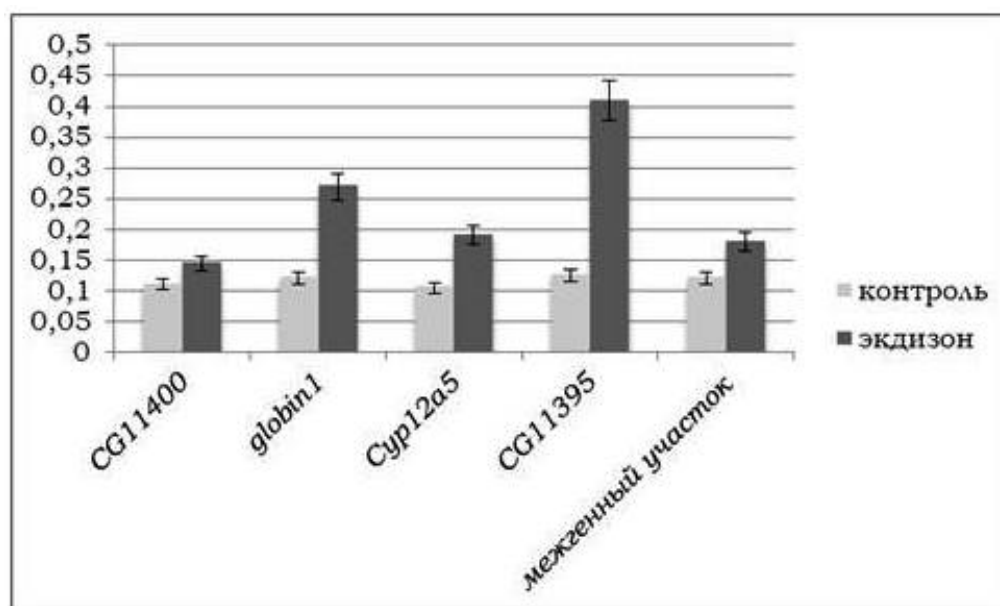
Для контроля активации *DHR3* на белковом уровне был проведен Вестерн-блот анализ клеточного экстракта с антителами против *DHR3* (**Рис.**

**11(A)**). Одновременно, для проверки активации транскрипции данного гена методом количественного ПЦР был измерен уровень транскриптов *DHR3* до и после активации экдизоном (**Рис. 11(Б)**). Было показано значительное увеличение как количества транскриптов данного гена, так и увеличение концентрации белка в клетках.

Таким образом, можно заключить, что при добавлении экдизона к культуре клеток S2 происходит активация транскрипции гена экдизонового каскада *DHR3*.

### ***DHR3 и SAYP совместно активируют экспрессию генов CG11395 и Cyp12a5 в культуре клеток***

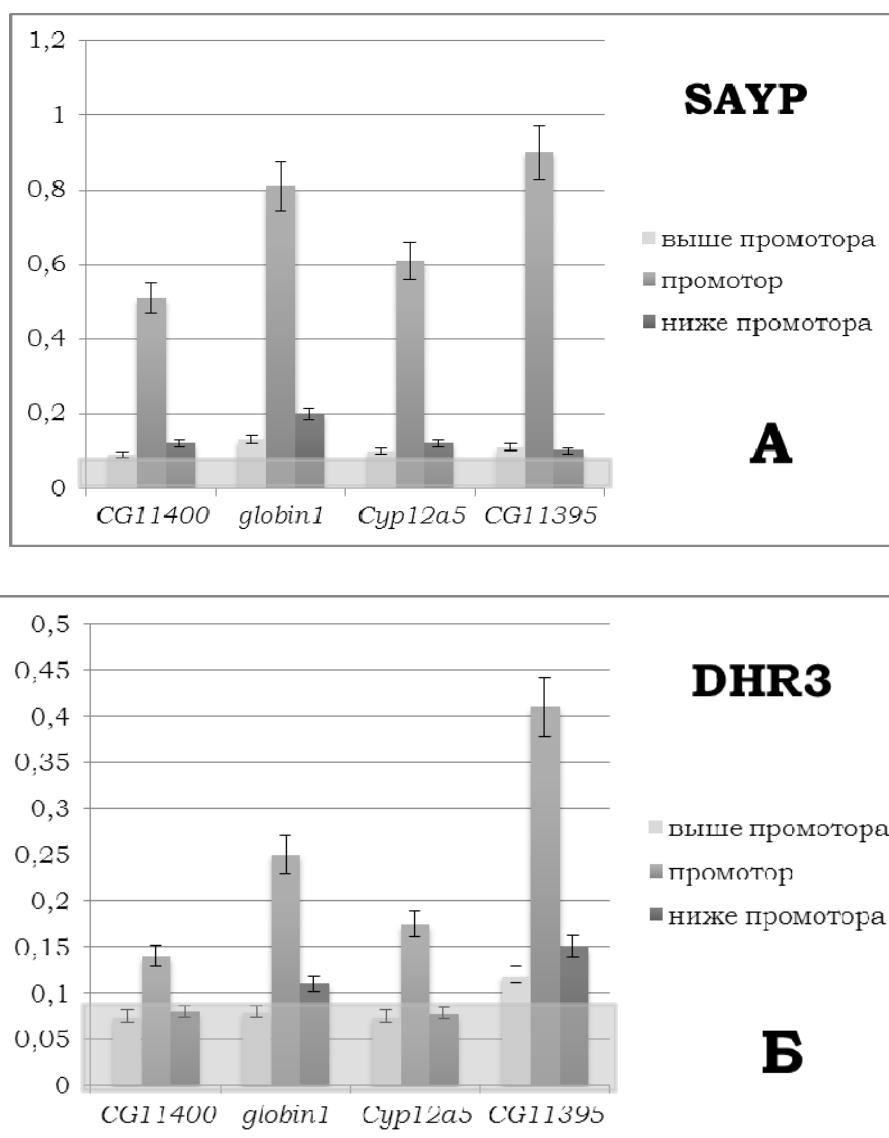
Для изучения участия *DHR3* в активации *SAYP*-зависимой транскрипции в культуре S2 клеток были проанализированы состояния промоторов нескольких *SAYP*-зависимых генов.



**Рис. 12.** Привлечение *DHR3* на промоторы нескольких *SAYP*-зависимых генов при активации части экдизонового каскада в культуре S2 клеток. Показаны состояния промоторов до (контроль) и после (экдизон) добавления экдизона в среду.

Было показано, что при добавлении экдизона в культуру S2 клеток, происходит увеличение уровня DHR3 на промоторах нескольких SAYP-зависимых генов (Рис. 12).

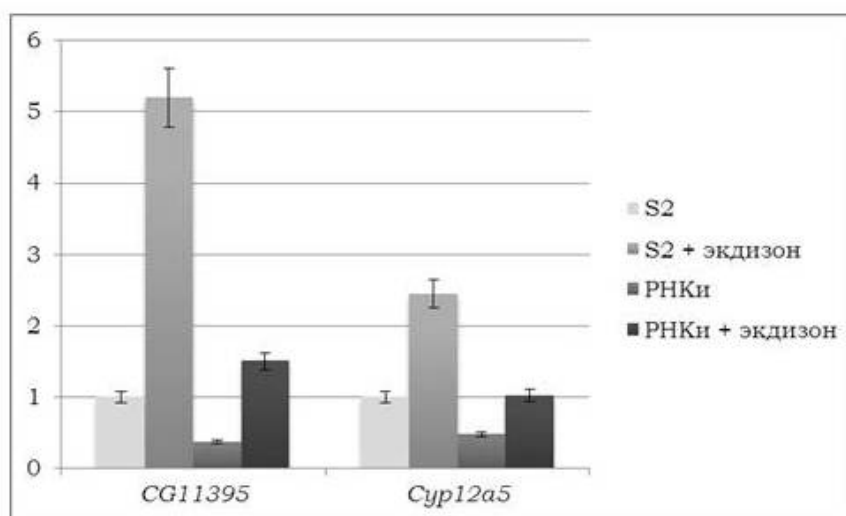
Для подтверждения того, что изменение уровня SAYP и DHR3 на промоторах данных генов является специфическим, с помощью метода хроматин иммунопреципитации были проверены области, окружающие промотор (Рис. 13).



**Рис. 13.** Уровень SAYP (А) и DHR3 (Б) в области промоторов нескольких SAYP-зависимых генов в условиях активации экдизонового каскада. Иммунопреципитация хроматина на экстракте из клеток. Серой линией отмечен уровень количества исследуемых белков в межгенной области.

Было показано, что повышение уровня SAYP и DHR3 на промоторах нескольких SAYP-зависимых генов происходит специфично относительно окружающей области.

Для более детального рассмотрения были выбраны два SAYP-зависимых гена – *CG11395* и *Cyp12a5*. Методом количественного ПЦР анализа был измерен уровень их транскрипции до и после активации *DHR3* экдизоном (Рис. 14).



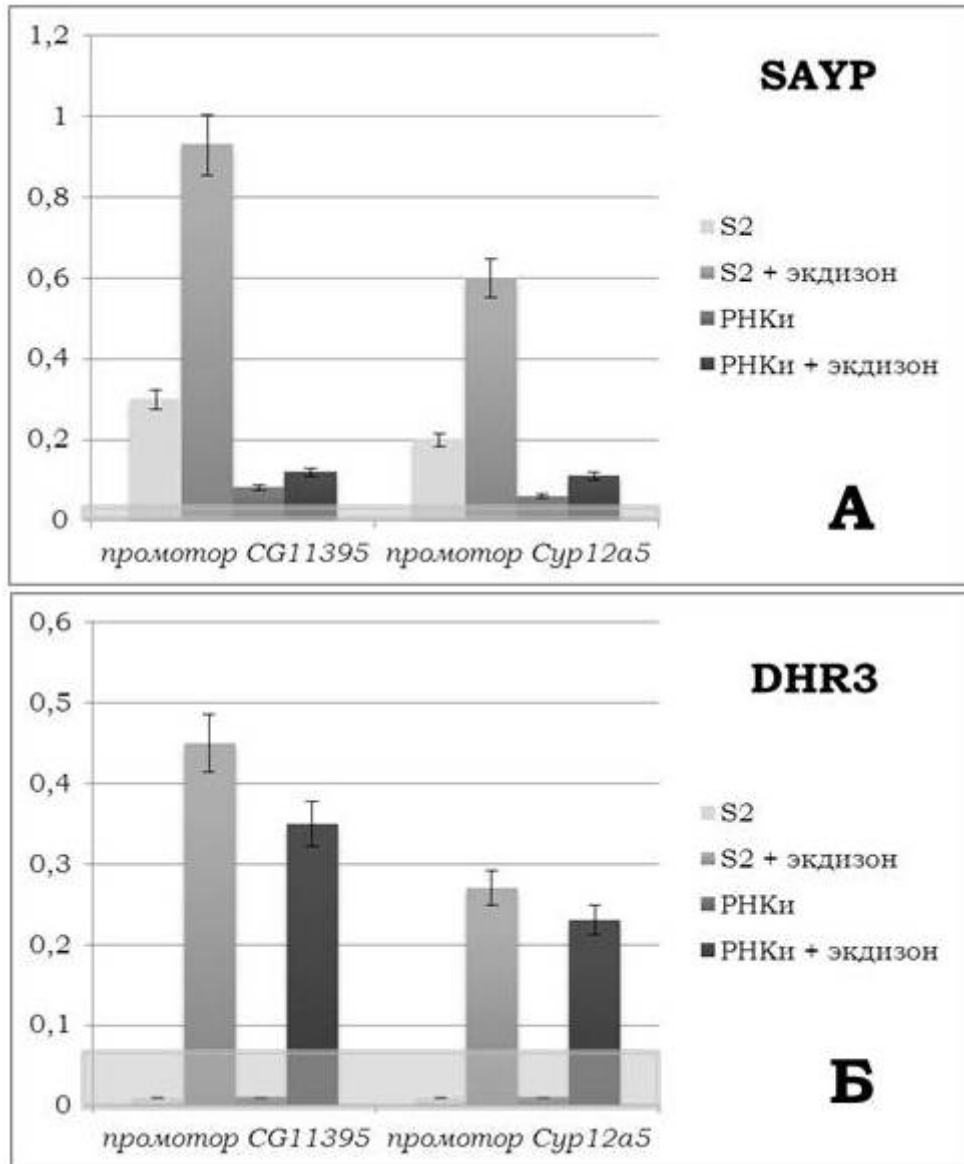
**Рис. 14.** Уровень транскрипции SAYP-зависимых генов *CG11395* и *Cyp12a5*, измеренный методом количественного ПЦР. Показаны следующие состояния: **S2** – норма; **S2 + экдизон** – клетки, активированные экдизоном; **РНКи** – клетки со сниженным уровнем SAYP; **РНКи + экдизон** – активация экдизоном в клетках со сниженным уровнем SAYP. За единицу взят уровень транскриптов, детектируемый в контроле.

Было показано, что в культуре клеток при добавлении экдизона происходит значительное увеличение транскрипции SAYP-зависимых генов *CG11395* и *Cyp12a5* по сравнению с контролем.

При помощи РНК-интерференции был снижен уровень белка SAYP и данные гены были вновь активированы при помощи экдизона. Оказалось, что на фоне пониженного уровня SAYP, активации данных генов происходит не так эффективно. Таким образом, транскрипция нескольких SAYP-зависимых

генов чувствительна к активации экдизоном. Эффективность данной активации зависит от уровня SAYP.

С помощью метода хроматин иммунопреципитации была также произведена оценка состояния промоторов данных SAYP-зависимых генов в условиях активации экдизонового каскада в культуре нормальных клеток и при одновременном нокдауне SAYP (**Рис. 15**).



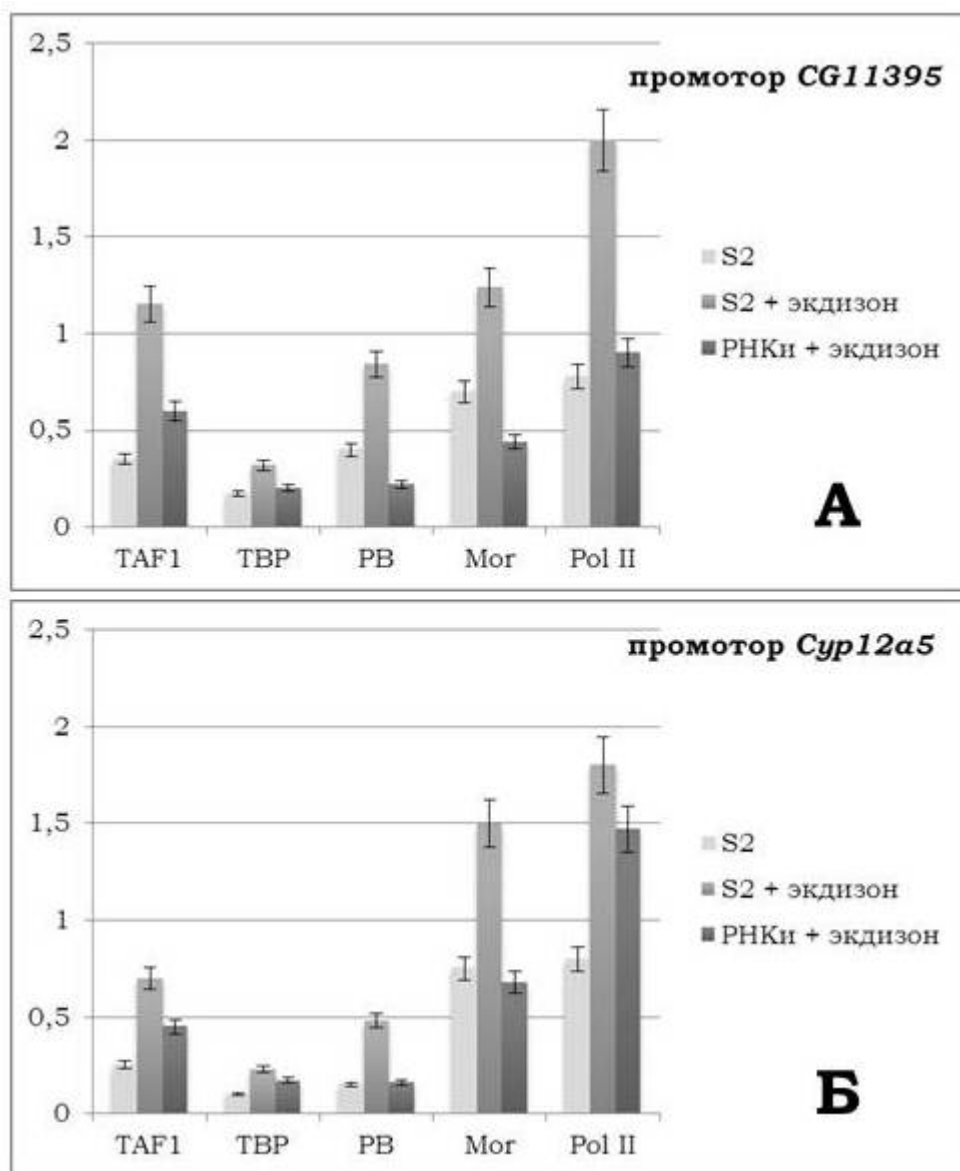
**Рис. 15.** Уровень SAYP и DHR3 на промоторах SAYP-зависимых генов: *CG11395* и *Cyp12a5* при активации экдизонового каскада в нормальных клетках (столбцы – (S2) и (S2 + экдизон)) и в клетках с нокдауном SAYP (столбцы – (РНКи) и (РНКи + экдизон)). Серой линией отмечен уровень факторов в межгенной области. Показано процентное отношение от исходного экстракта.

Оказалось, что при снижении внутриклеточного уровня SAYP при помощи РНК-интерференции уровень данного белка на промоторе генов снижается. Однако, уровень активатора DHR3 на промоторе генов не изменился на фоне снижения уровня SAYP, что говорит о независимости привлечения DHR3 от SAYP.

В условиях активации экдизонового каскада при одновременном нокдауне SAYP на промоторы исследуемых генов, видимо, привлекается остаточное количество SAYP, которое обеспечивает остаточный уровень транскрипции этих генов.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что SAYP привлекается на промоторы генов в составе мультисубъединичного комплекса BTFly, состоящего также из хроматин ремоделирующего фактора Brahma и фактора инициации транскрипции TFIIID.

Методом хроматин-иммунопреципитации было также проанализировано присутствие на промоторах двух SAYP-зависимых генов компонентов данного мультисубъединичного комплекса и РНК-полимеразы II в условиях активации экдизонового каскада в культуре S2 клеток. При помощи метода хроматин иммунопреципитации был измерен уровень компонентов суперкомплекса BTFly на промоторе генов до и после активации экдизоном (**Рис. 16**). Оказалось, что в условиях активации транскрипции данных генов происходит увеличение уровня компонентов комплекса на промоторе данных генов. При снижении внутриклеточного уровня SAYP при помощи РНК-интерференции, уровень компонентов на промоторе генов также снижается.

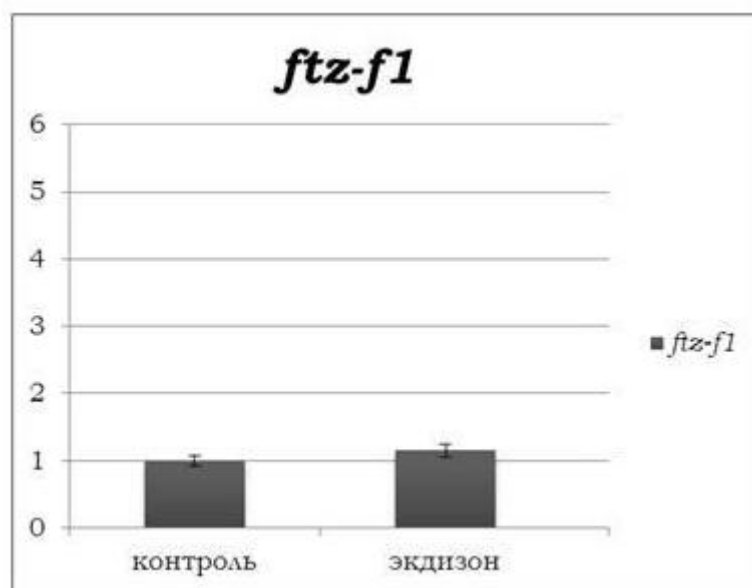


**Рис. 16.** Уровень компонентов комплекса *BTFLy* и РНК-полимеразы II (*Pol II*) на промоторах *SAUP*-зависимых генов при активации экдизонового каскада в нормальных клетках (столбцы (*S2*) и (*S2* + экдизон)) и со сниженным содержанием *SAUP* (*РНКи* + экдизон). Показано процентное отношение от исходного экстракта.

При активации экдизонового каскада на промоторах *SAUP*-зависимых генов происходит увеличение уровня компонентов мультисубъединичного комплекса *BTFLy*, в частности, показано увеличение для субъединиц фактора инициации транскрипции *TFIID* (*TAF1* и *TBP*) и компонентов хроматинремоделирующего комплекса *Brahma* (*PB* и *Mor*). В связи с этим, происходит и значительное повышение уровня РНК-полимеразы II на промоторе.



Схожие измерения уровня компонентов комплекса с помощью метода хроматин иммунопреципитации были проведены на клетках со сниженным содержанием SAYP. Было показано, что в условиях РНК-интерференции SAYP происходит снижение уровня всех компонентов комплекса VTFly на промоторах рассмотренных генов, что влечет за собой и снижение уровня РНК-полимеразы II.

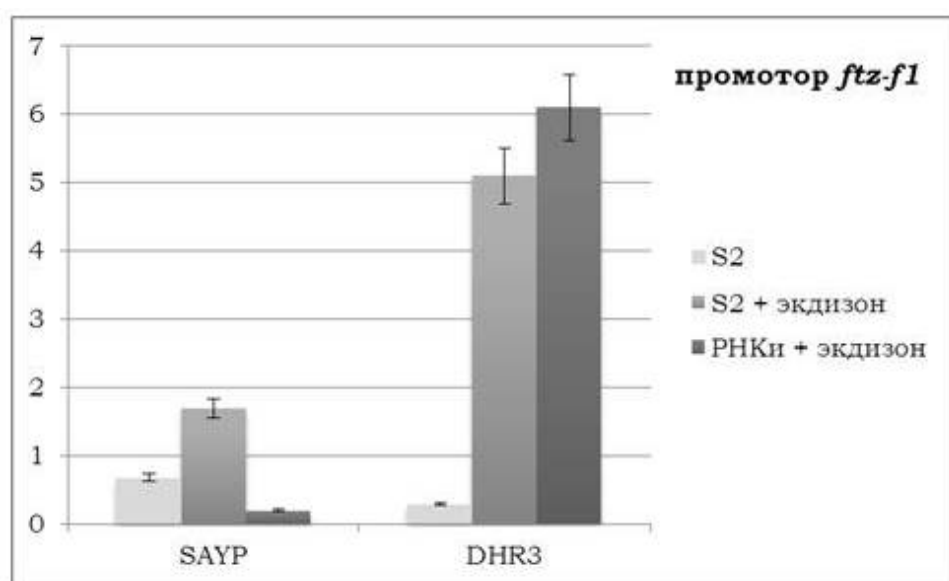


**Рис. 17.** Уровень транскрипции гена *ftz-f1* при активации экдизонового каскада, измеренный методом количественного ПЦР анализа. За единицу взят уровень транскрипции в неактивированных клетках.

Обнаружив изменение уровня транскрипции SAYP-зависимых генов в условиях активации DHR3 при добавлении экдизона к S2 клеткам, было решено уточнить роль SAYP в регуляции транскрипции единственного известного на данный момент DHR3-зависимого гена *ftz-f1*, который также является компонентом экдизонового каскада. Показано, что пик экспрессии гена *ftz-f1* смещен относительно пика экспрессии гена DHR3 и приходится на стадию поздней куколки (**Рис. 7**). В культуре S2 клеток *D. melanogaster* при активации экдизонового каскада активации гена *ftz-f1* не происходит (**Рис. 17**).

***SAYP* рекрутируется на промотор *DHR3*-зависимого гена *ftz-f1* после активации экспрессии *DHR3* в составе суперкомплекса *BTFLy***

Для изучения участия *SAYP* в *DHR3*-зависимой транскрипции было решено исследовать привлечение *SAYP* на промотор гена *ftz-f1*. При помощи метода иммунопреципитации хроматина было проанализировано состояние промотора гена *ftz-f1* до, после активации экдизоном в культуре нормальных клеток *S2*, а также в активированных клетках на фоне сниженного внутриклеточного уровня *SAYP*.

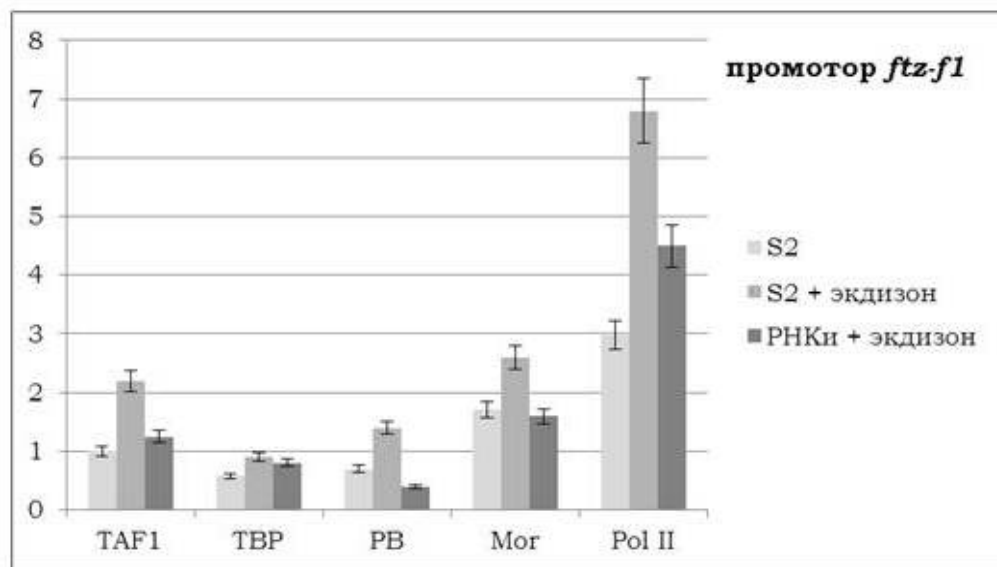


**Рис. 18.** Уровень *SAYP* и *DHR3* на промоторе *DHR3*-зависимого гена *ftz-f1* при активации экдизонового каскада в культуре нормальных клеток *S2* (**S2 + экдизон**) и при одновременном нокдауне *SAYP* (**РНКи + экдизон**). Столбец **S2** – неактивированные клетки *S2*. Показано процентное отношение от исходного экстракта.

Было показано, что при активации экдизонового каскада в культуре клеток на промотор гена *ftz-f1* происходит привлечение ядерного рецептора *DHR3*. Вместе с *DHR3* на промоторе *ftz-f1* происходит увеличение уровня *SAYP*. Снижение уровня *SAYP* на промоторе при нокдауне не влияет на уровень *DHR3*, связанного с промотором (**Рис. 18**).

Было проанализировано привлечение компонентов комплекса *BTFLy*, образуемого *SAYP*, на промотор *ftz-f1* на разных стадиях активации. Также

был исследован уровень РНК-полимеразы II на промоторе данного гена (Рис. 19).



**Рис. 19.** Уровень компонентов комплекса BTFLy и РНК-полимеразы II на промоторе гена *ftz-f1* при активации экдизонового каскада в культуре нормальных S2 клеток и при одновременном нокдауне SAYP. Показано процентное отношение от исходного экстракта.

Показано, что при обработке экдизоном происходит привлечение компонентов комплекса и РНК-полимеразы II, которое нарушается при одновременном нокдауне SAYP.

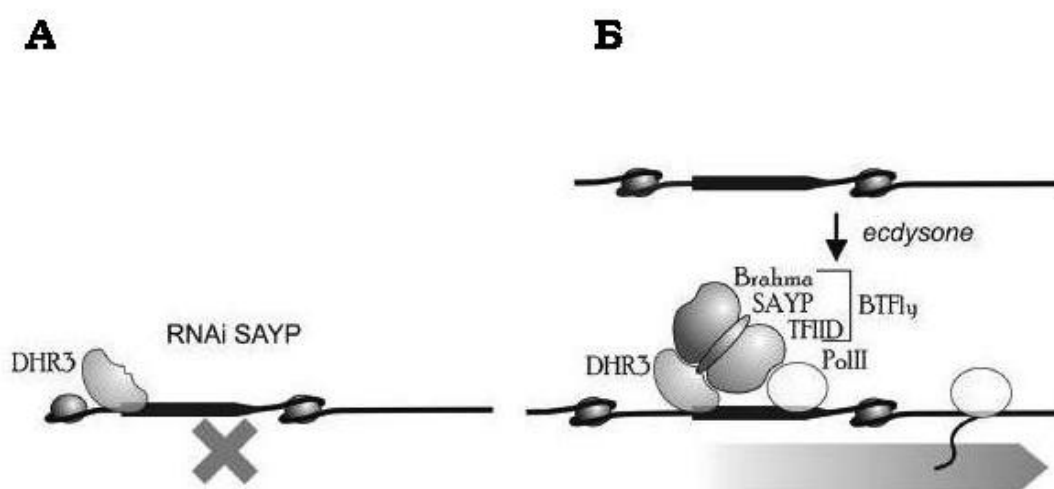
Активации транскрипции гена *ftz-f1* при добавлении экдизона к S2 клеткам не происходит, несмотря на активацию экспрессии активатора DHR3, участвующего в транскрипции этого гена. Это согласуется с имеющимися литературными данными, указывающими на то, что *ftz-f1* может репрессироваться высокой концентрацией экдизона.

Однако, мы обнаружили, что активатор DHR3 рекрутируется на промотор гена *ftz-f1* в репрессированном состоянии. Было продемонстрировано, что вместе с увеличением уровня активатора на промоторе возрастает уровень компонентов комплекса BTFLy, а также РНК-полимеразы II. Таким образом, на промоторе *ftz-f1* при высокой концентрации экдизона происходит сборка неактивного преинициаторного

комплекса РНК-полимеразы II. Возможно, такая подготовка необходима для дальнейшей быстрой активации транскрипции гена в ответ на снижение уровня гормона.

### *Модель участия SAYP DHR3-зависимой транскрипции*

На основании полученных результатов была предложена модель участия SAYP в работе транскрипционного аппарата при активации части экдизонового каскада.



**Рис. 20.** Организация работы транскрипционного аппарата при активации экдизонового каскада (показаны только DHR3-зависимые события).

Было показано, что при активации экдизонового каскада происходит привлечение DHR3 на ряд промоторов. Затем происходит привлечение BTFly и PolII, что приводит к сборке преинициаторного комплекса на промоторе и активации транскрипции. В условиях сниженного содержания SAYP в клетке привлечение DHR3 не нарушается, но активации транскрипции не происходит (**Рис. 20**).

### III. Выводы

1. Установлено, что в организме *D. melanogaster* ядерный рецептор DHR3 ассоциирован с коактиваторным суперкомплексом BTFLy посредством взаимодействия с SAYP.
2. Для генов *DHR3* и *e(y)3*, кодирующих DHR3 и SAYP, показано генетическое взаимодействие и коэкспрессия в развитии *D. melanogaster*.
3. Найдены новые гены-мишени DHR3. Показано влияние DHR3 на транскрипцию ранее неизвестных для него генов-мишеней, которые контролируются также SAYP.
4. Показано, что DHR3 и SAYP привлекаются на промоторы генов-мишеней при активации экдизонового каскада в культуре клеток S2 *D. melanogaster*.
5. Показано участие SAYP в DHR3-зависимой транскрипции в условиях активации экдизонового каскада в культуре клеток S2 *D. melanogaster*.
6. Установлено, что SAYP участвует в привлечении на промотор DHR3-зависимого гена *ftz-f1* компонентов коактиваторного суперкомплекса BTFLy и РНК-полимеразы II, формируя преинициаторный комплекс перед началом транскрипции.
7. Разработана система активации части генов экдизонового каскада в культуре клеток S2 *D. melanogaster*.

#### **IV. Список публикаций по теме диссертации**

##### **Статьи:**

1. Vorobyeva NE, Soshnikova NV, Kuzmina JL, Kopantseva MR, Nikolenko JV, Nabirochkina EN, Georgieva SG, Shidlovskii YV. The novel regulator of metazoan development SAYP organizes a nuclear coactivator supercomplex. *Cell Cycle* (2009); 8(14):2152-6.
2. Кузьмина Ю.Л., Панов В.В., Воробьева Н.Е., Сошникова Н.В., Копанцева М.Р., Николенко Ю.В., Набирочкина Е.Н., Георгиева С.Г., Шидловский Ю.В. SAYP – новый регулятор развития многоклеточных организмов. *Генетика* (2010); 46 (8), С. 1033-1040
3. Vorobyeva NE, Nikolenko JV, Krasnov AN, Kuzmina JL, Panov VV, Nabirochkina EN, Georgieva SG, Shidlovskii YV. SAYP interacts with DHR3 nuclear receptor and participates in ecdysone-dependent transcription regulation. *Cell Cycle* (2011) 10(11):1821-7.

##### **Тезисы конференций:**

1. Mechanism of transcription activation by factor SAYP. Shidlovskii YV, Kuzmina JL, Panov VV, Vorobyeva NE, Soshnikova NV, Georgieva SG, Ilyin YV. International Symposium “Control of gene expression and cancer”, Russia, Moscow, 21-25.06.2010, Abstract book, p.15
2. Механизмы активации генов коактиватором SAYP. Кузьмина Ю.Л., Воробьева Н.Е., Николенко Ю.В., Набирочкина Е.Н., Краснов А.Н., Георгиева С.Г., Шидловский Ю.В. XXIII Международная зимняя молодежная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», Москва, 7-10 февраля 2011, Тезисы докладов, стр. 80

3. Mechanisms of gene activation by transcription coactivator SAYP. Kuzmina JL, Vorobyeva NE, Nikolenko JV, Nabirochkina EN, Krasnov AN, Georgieva SG, Shidlovskii YV VII International Scientific Conference for Students and PhD Students “Youth and Progress of Biology”, Lviv, Ukraine, April 5-8, 2011, Abstract book, p. 304

4. Novel mechanism of genes activation by SAYP/PHF10 coactivator is important in signaling pathways. Panov VV, Kuzmina JL, Doronin SA, Vorobyeva NE, Soshnikova NV, Georgieva SG, Shidlovskii YV. EMBO Conference Series on Nuclear Structure and Dynamics, France, L’Isle sur la Sorgue, September 28 – October 2, 2011, Abstract book, P-098