

На правах рукописи  
УДК 575.22:595.773.4

Орлова Анастасия Владимировна

**Связь транскрипции со сборкой и транспортом мРНК**

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

Москва  
2010

Работа выполнена в Учреждении Российской академии наук Институте биологии гена РАН,  
В лаборатории регуляции экспрессии генов

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор

Георгиева С.Г.

кандидат биологических наук

Копытова Д.В.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук,

Зацепина О.Г.

кандидат биологических наук,

Мельникова Л.С.

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук институт молекулярной  
генетики РАН

Защита диссертации состоится 23 декабря 2010 года в 11 часов

на заседании Диссертационного совета Д.002.037.01 при учреждении Российской академии  
наук Институте биологии гена РАН по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, д.34/5.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения российской академии наук  
Института молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН по адресу:  
119991, Москва, ул. Вавилова, д.32.

Автореферат разослан                      ноября 2010 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета

кандидат фармацевтических наук

Грабовская Л.С.

## I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### *Актуальность темы*

Основополагающим свойством эукариотической клетки является наличие ядерной оболочки, разделяющей клетку на два основных компартмента, ядро и цитоплазму. В результате две основных стадии экспрессии генов, транскрипция и трансляция, пространственно разнесены. Благодаря этому разделению у эукариот возникают многочисленные этапы процессинга мРНК, которых нет у прокариот.

Транскрипция является первым этапом реализации наследственной информации. У эукариот гены, кодирующие мРНК, транскрибируются РНК-полимеразой II. Образующаяся в результате транскрипции мРНК проходит три основных этапа созревания – формирование кэпа на 5' конце, сплайсинг интронов (в случае, когда они есть) и созревание 3' конца – укорачивание транскрипта по определенному сайту, сопровождающееся присоединением полиА последовательности. Синтезируемую мРНК можно рассматривать как «фабрику созревания», внутри которой протекают множественные взаимодействия между белковыми факторами, принимающими участие в различных этапах процессинга, что позволяет значительно повысить эффективность и специфичность протекающих процессов. Важную роль в интеграции факторов процессинга на ранних стадиях синтеза мРНК играет С-концевой домен большой субъединицы РНК-полимеразы II, слабоструктурированный домен, подверженный многочисленным модификациям, которые облегчают его взаимодействие с различными факторами процессинга и сборки мРНК.

Экспорт готовых к трансляции мРНК через ядерные поры – кульминационный момент ядерной стадии экспрессии генов, мРНК транспортируется из ядра только после прохождения через все этапы созревания. Неправильно процессированные и неправильно собранные мРНК задерживаются в ядре и подвергаются деградации – их появление в цитоплазме может помешать метаболизму или послужить матрицей для синтеза токсичных для клетки белков.

Современные представления об экспорте мРНК из ядра в цитоплазму заключается в следующем: белки, напрямую взаимодействующие с мРНК, выступают в роли адаптеров, которые взаимодействуют с ядерными рецепторами, доставляющими мРНК в составе мРНК к ядерным порам (NPC – nuclear pore complex).

Несмотря на важность процессов формирования зрелых мРНК, механизмы ремоделинга, протекающие в сайте транскрипции и обеспечивающие транслокацию мРНК

через ядерную пору и отсоединение от NPC со стороны цитоплазмы, изучены ещё очень слабо.

Изначально различные стадии экспрессии генов рассматривались и изучались, как полностью независимые друг от друга (все эти процессы *in vitro* протекают независимо), в последнее время становится понятным, что *in vivo* они тесным образом взаимосвязаны. Сопряжение этапов экспрессии генов является необходимым для формирования готовых к экспорту мРНК, нарушение одних этапов может влиять на эффективность протекания других стадий формирования мРНК. Так, нарушение транскрипции оказывает негативное влияние на процессинг и экспорт мРНК, и наоборот – нарушения процессинга способны негативно влиять на транскрипцию. Изучению молекулярных механизмов, принимающих участие в сопряжении последовательных этапов экспрессии генов в ядре, посвящена настоящая работа.

В данной работе впервые функционально охарактеризован комплекс ENY2-ТНО у *Drosophila melanogaster*. Для белка ENY2 ранее в нашей лаборатории было показано, что он принимает участие в двух этапах экспрессии генов – активации транскрипции и экспорте мРНК. В данной работе показано, что ENY2 в составе комплекса ENY2-ТНО также принимает участие в элонгации транскрипции гена теплового шока *hsp70* и в созревании 3' конца образующихся в результате транскрипции молекул пре-мРНК. ENY2 привлекает ТНО на ген теплового шока, участвуя в сопряжении двух последовательных этапов транскрипции, инициации и элонгации.

Таким образом, ENY2 – пример белкового фактора, который интегрирует последовательные стадии экспрессии генов.

### ***Цели и задачи исследования***

Ранее неизвестный ENY2-содержащий комплекс с молекулярной массой 2.0 МДа был выделен в нашей лаборатории методами классической хроматографии из ядерного белкового экстракта, полученного из эмбрионов *D.melanogaster*. MALDI анализ белкового состава этого комплекса показал наличие в нем субъединиц комплекса ТНО: HPR1, ТНО2, ТНОС5, ТНОС6 и ТНОС7, идентичных выделенным ранее [Rehwinkel, 2004]. На основании этих данных была сформулирована цель этой работы – подтвердить существование и охарактеризовать функциональное значение комплекса ENY2-ТНО у *D.melanogaster*.

В качестве модельной системы был выбран кластер генов теплового шока *hsp70*, так как ранее было показано, что ENY2 и ТНО принимают участие в транскрипции этого

кластера. В ходе исследования предполагалось решить следующие экспериментальные задачи:

1. Показать, что ENY2 и ТНО формируют дискретный комплекс, отличный от других ENY2-содержащих комплексов;
2. Исследовать распределение ENY2-ТНО на кластере генов *hsp70* и выявить, участвует ли ENY2 в привлечении ТНО на кластер генов *hsp70*;
3. Охарактеризовать взаимодействие ENY2 и ТНО с мРНК *hsp70* и исследовать, участвуют ли ENY2 и ТНО в созревании 3' конца пре-мРНК *hsp70*.

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

В данной работе впервые было показано, что ENY2 является компонентом комплекса ТНО у *D.melanogaster*, участвующего в нескольких этапах экспрессии генов. ENY2 и ТНО привлекаются в транскрибируемую область гена *hsp70* при активации транскрипции, ассоциированы с образующейся мРНК. При этом присутствие ENY2 существенно для привлечения ТНО. Истощение ENY2 и компонентов ТНО эмбриональных клеток дрозофилы культуры S2 снижает уровень процессинга 3' концов новосинтезированной мРНК.

Таким образом, продемонстрировано, что существует не менее двух различных видов сопряжения различных этапов экспрессии генов с участием белка ENY2. Во-первых, комплекс ENY2-ТНО принимает участие не менее, чем в двух последовательных стадиях формирования готовых к экспорту из ядра мРНК, элонгации транскрипции и процессинге 3'конца пре-мРНК *hsp70*. Во-вторых, как было показано ранее, ENY2 входит в состав ещё двух комплексов, один из которых – SAGA – участвует в инициации транскрипции, другой – AMEX – вовлечен в процесс экспорта мРНК в цитоплазму. Полученные в ходе выполнения данной работы данные позволяют более детально определить функции белка ENY2 в клетке: ENY2, как компонент нескольких белковых комплексов, вовлечен в несколько последовательных этапов экспрессии генов в ядре и принимает участие в их сопряжении.

В настоящее время неясно, является ли столь тесное сопряжение обязательным для всех этапов биогенеза мРНК и одинаково важным для экспрессии всех генов, но это свойство факторов транскрипции и процессинга предоставляет множество возможностей для координированной регуляции всего процесса формирования готовых к экспорту мРНК и коррекции возникающих нарушений.

Полученные данные также позволяют выделить следующие особенности механизма функционирования ТНО у дрозофилы: привлечение ENY2-ТНО на ген *hsp70* протекает

независимо от РНК-полимеразы II, взаимодействие с транскрибируемым участком гена идет через образующуюся в процессе транскрипции молекулу мРНК. Полученные результаты коррелируют с уже известными данными о функционировании ТНО у человека, но отличаются от известных для дрожжей. Данная работа имеет большое значение для развития молекулярной биологии, так как вносит значительный вклад в понимание различий механизмов процессинга мРНК у одноклеточных и многоклеточных эукариот.

Полученные данные в дальнейшем можно будет использовать для создания новых систем контроля количества функциональной мРНК в клетке, которые можно будет использовать в биотехнологии и медицине.

### ***Апробация работы***

Результаты работы были представлены автором на следующих конференциях: Всероссийская научная школа для молодежи «Горизонты нанобиотехнологии» (Москва; 2009), XXII зимняя молодежная научная школа «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва; 2010), International symposium «Control of gene expression and cancer» (Москва; 2010)

### ***Публикации***

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ. Из них статей – 3; тезисов, докладов и материалов конференций – 3.

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

Диссертация изложена на \_\_\_\_\_ 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 \_\_\_\_\_ рисунков. Библиография включает \_\_\_\_\_ источников.

## II. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### **Введение**

Белок E(y)2/ENY2, продукт гена *e(y)2* у *Drosophila melanogaster* [Georgiev, 1989], был впервые охарактеризован в нашей лаборатории как коактиватор транскрипции, который принимает участие в регуляции экспрессии генов на разных этапах развития дрозофилы [Georgieva, 2001]. Было показано, что ENY2 входит в состав гистонацетилтрансферазного комплекса SAGA/TFTC, который участвует в активации транскрипции. Кроме того, на модели кластера SAGA-зависимых генов теплового шока *hsp70* было показано, что ENY2 активирует транскрипцию, участвует в прикреплении кластера генов белка теплового шока *hsp70* к NPC. Также было показано, что ENY2 в составе комплекса AMEX принимает участие в экспорте мРНК [Kurshakova, 2007]. Кроме того, ENY2 является компонентом белкового комплекса Su(Hw)-зависимых инсуляторов. ENY2 связывается с доменом цинковых пальцев белка Su(Hw) и необходим для барьерной активности Su(Hw)-зависимых инсуляторов [Kurshakova, 2007].

ТНО – ядерный белковый комплекс, был впервые открыт у дрожжей. У дрожжей ТНО состоит из четырех субъединиц, Hrg1p, Tho2, Mft1p и Thp1p. Дальнейшие биохимические исследования показали, что факторы экспорта мРНК Sub2p и Yra1p взаимодействуют с ТНО комплексом. Вместе Sub2p, Yra1p и ТНО формируют комплекс TREX (transcription and mRNA export). У *Drosophila melanogaster* и у человека ТНО содержит два белка-гомолога дрожжевых, Tho2p и Hrg1p, и три белка: ТНОС5, ТНОС6 и ТНОС7, не имеющие ортологов у дрожжей. UAP56 и REF1/Aly, гомологи субъединиц Sub2p и Yra1p комплекса TREX, у *Drosophila melanogaster* не были найдены в очищенных комплексах, что указывает на их слабое сродство к ТНО.

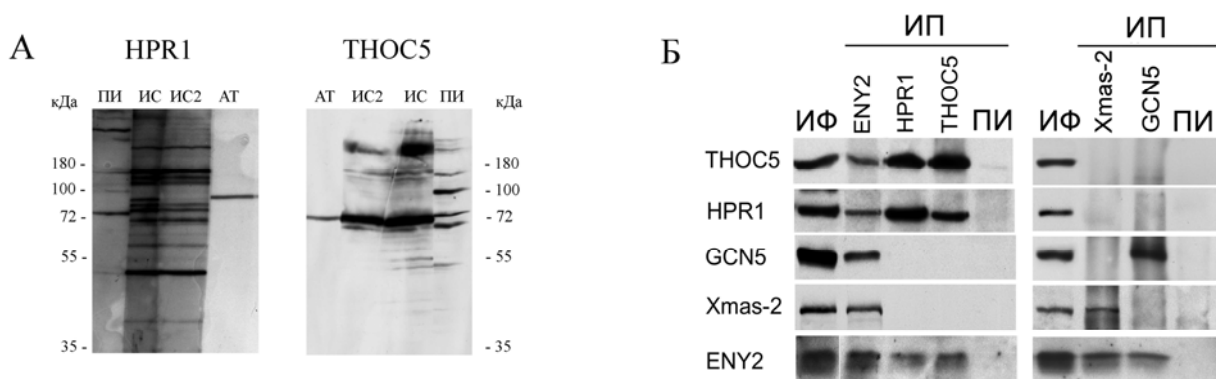
ТНО у дрожжей принимает участие в элонгации транскрипции, процессинге 3' концов пре-мРНК, формировании и экспорте мРНК частиц [Chavez, 2000, Saguez, 2008]. Для гомологов ТНО у дрозофилы и человека показано, что они также принимают участие в экспорте мРНК ряда генов, в том числе и мРНК генов теплового шока [Masuda, 2005; Rehwinkel, 2004].

### **ENY2 и ТНО формируют дискретный комплекс**

Для изучения взаимодействия ENY2 и ТНО были получены и аффинно очищены поликлональные кроличьи антитела против белка HPR1, консервативного компонента ТНО у эукариот, и против белка ТНОС5, специфического компонента ТНО у высших эукариот.

Вестерн-блот анализ показал, что очищенные антитела специфично узнают в экстракте белки размером 95 кДа (антитела против HPR1) и 72 кДа (антитела против THOC5) (рис.1А), что соответствует молекулярным массам белков HPR1 и THOC5 у дрозофилы определенными ранее [Rehwinkel, 2004].

Взаимодействие ENY2 и ТНО было подтверждено экспериментами по иммунопреципитации антителами против ENY2, HPR1 и THOC5 из эмбрионального ядерного экстракта, обработанного ДНКазой I и РНКазой А (Рис.1Б). Антитела против ENY2 не полностью соосадили компоненты ТНО из экстракта. Это говорит о том, что ENY2 взаимодействует лишь с частью компонентов ТНО. Чтобы проверить, взаимодействует ли комплекс ENY2-ТНО с другими ENY2-содержащими комплексами SAGA и AMEX, были проведены эксперименты по иммунопреципитации антителами против белков-компонентов комплексов SAGA и AMEX компонентов ТНО из эмбрионального ядерного экстракта. Взаимодействия компонентов комплексов SAGA и AMEX с ТНО не наблюдалось (Рис.1Б).



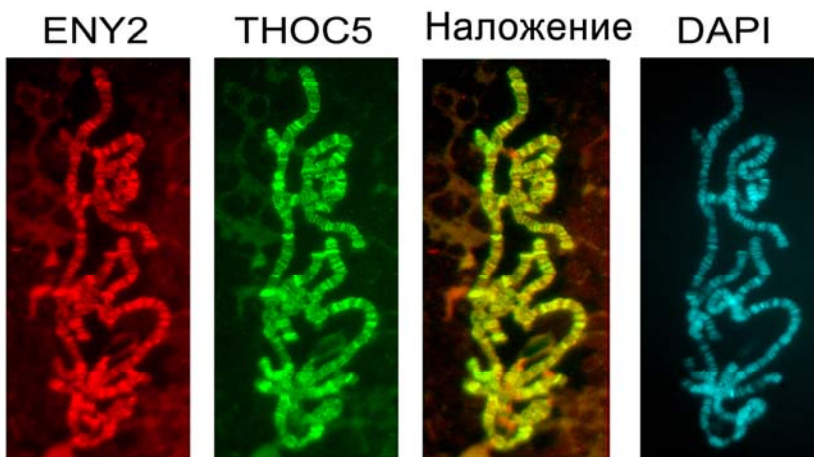
**Рис.1 ENY2 взаимодействует с ТНО-комплексом**

**А** – Вестерн-блот анализ полученных антител к белкам HPR1 и THOC5. Экстракт, полученный из эмбрионов *D.melanogaster*, был нанесен в широкую ячейку, после переноса белков мембрана была разрезана на полосы, каждая из которых была окрашена с использованием ПИ – преимунной сыворотки, ИС – иммунной сыворотки, ИС2 – иммунной сыворотки, преадсорбированной с пептидом, использованным для очистки антител, АТ – аффинно очищенные антитела к HPR1 и THOC5.

**Б** – Коиммунопреципитация компонентов ТНО-комплекса с ENY2 и компонентами ENY2-содержащих комплексов SAGA и AMEX. Эксперименты по иммунопреципитации (ИП) из ядерного экстракта проводились с использованием антител против ENY2, субъединиц ТНО (THOC5, HPR1), SAGA (GCN5) и AMEX (Xmas-2) или преимунной сыворотки (ПИ). Хотя ENY2 ассоциирован со всеми проанализированными белками, не было замечено взаимодействия компонентов ТНО с SAGA и AMEX. Были проанализированы иммунопреципитированные белки и эквивалентное количество экстракта (ИФ – исходная фракция).



Для того, чтобы проверить колокализуются ли ENY2 и ТНО *in vivo*, было проведено коиммуноокрашивание политенных хромосом из слюнных желёз личинок дрозофилы антителами против ТНОС5 и ENY2 (Рис.2). Антитела против ТНОС5 окрасили большое количество транскрипционно активных локусов, почти все эти локусы также окрасились антителами против ENY2. Следовательно, ТНО и ENY2 колокализуются на политенных хромосомах *in vivo*. Присутствие ТНОС5 и ENY2 в большом количестве сайтов на политенных хромосомах говорит о том, что ENY2-ТНО вовлечен в экспрессию большого количества генов дрозофилы.



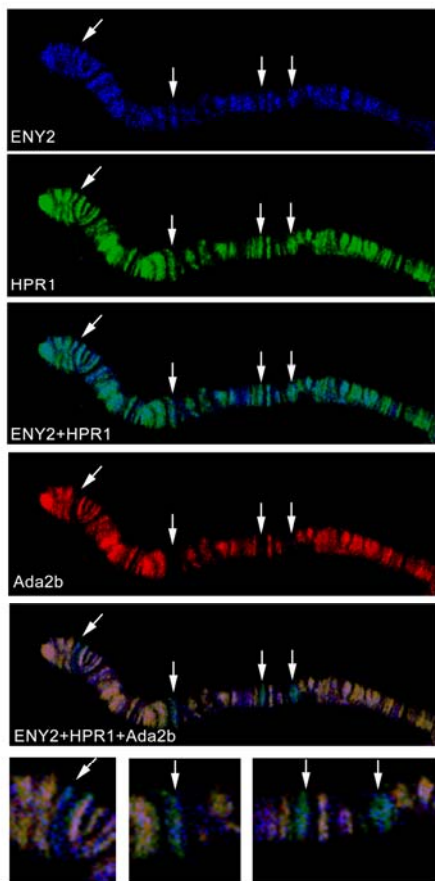
**Рис.2 ENY2 колокализуется с ТНОС5 на политенных хромосомах, выделенных из слюнных желёз личинок *D.melanogaster***  
Проводили иммуноокрашивание политенных хромосом антителами против ENY2 и ТНОС5, на рисунке приведено наложение и окрашивание DAPI.

Чтобы оценить распространенность ENY2, ТНО и SAGA в различных локусах генома, была проведена их тройная колокализация на политенных хромосомах (Рис.3). ENY2 и HPR1 распределены по всему геному, часть локусов на хромосомах, в которых есть ENY2 и HPR1, не содержат *Ada2b*, компонента SAGA. Это говорит о том, что ТНО и ENY2 могут присутствовать на генах, не содержащих SAGA.

Полученные результаты говорят о том, что ENY2 и ТНО формируют дискретный комплекс.

***ENY2 и ТНО привлекаются на транскрибируемую область гена *hsp70* при активации транскрипции***

Роль комплекса ENY2-ТНО в контроле экспрессии индивидуальных генов изучалась на примере кластера генов *hsp70* у дрозофилы.

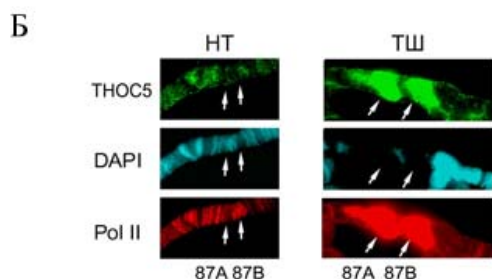
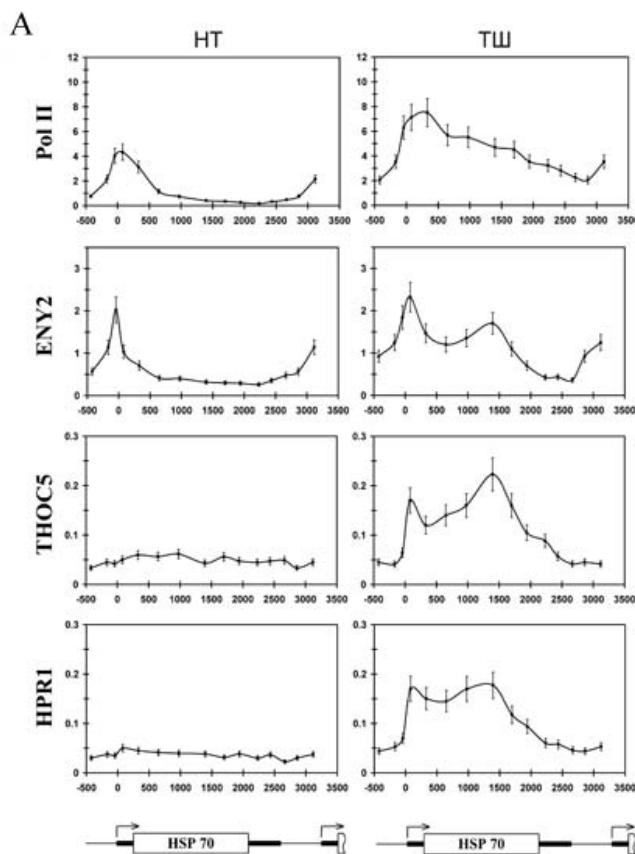


**Рис.3** Тройная колокализация ENY2, ТНО и SAGA на политенных хромосомах, выделенных из слюнных желез личинок *D.melanogaster*

Иммуноокрашивание политенных хромосом антителами против ENY2, HPR1, Ada2b. На рисунке также приведено двойное наложение окрашиваний ENY2+HPR1, тройное наложение окрашиваний ENY2+HPR1+Ada2b. Стрелками указаны сайты, в которых есть ENY2 и HPR1, но нет Ada2b.

Кластер генов *hsp70* состоит из шести почти идентичных копий безинтронного гена *hsp70*, которые синхронно активируются при тепловом шоке. Распределение ENY2 и компонентов ТНО (HPR1 и ТНОС5), а также РНК-полимеразы II по кластеру генов *hsp70* в клетках культуры Шнайдер 2 (S2) было проанализировано при нормальной температуре (НТ) и при тепловом шоке (ТШ) с использованием метода хроматин иммунопреципитации (ChIP) с последующим анализом полученных результатов методом ПЦР в реальном времени с использованием 13 пар праймеров, перекрывающих весь ген *hsp70* (Рис. 4А). В нормальных условиях ENY2 локализован на промоторе гена *hsp70*, также как и компоненты SAGA, GCN5 и Ada2b [Lebedeva et al. 2005]. РНК-полимераза II также представлена на промоторе, как было показано ранее [Rasmussen, 1993]. HPR1 и ТНОС5 отсутствуют на неактивированном гене *hsp70*. Этот результат был подтвержден иммуноокрашиванием политенных хромосом, выделенных из слюнных желёз личинок *D.melanogaster* антителами против ТНОС5 (Рис.4Б). Без теплового шока ТНОС5 отсутствует на гене *hsp70* ( локус 87А–87В).

При тепловом шоке происходила активация транскрипции *hsp70*, количество РНК-полимеразы II в транскрибируемой области гена сильно возрастало. ENY2 также обнаруживался на промоторе *hsp70* с небольшим сдвигом пика в транскрибируемую область, подобно пику полимеразы. Второй широкий пик ENY2 наблюдался в транскрибируемой области. Данные экспериментов по иммуноокрашиванию политенных хромосом и ChIP указывают, что компоненты ТНО появляются на гене *hsp70* при тепловом шоке (Рис.4А, 4Б). Интересно, что у компонентов ТНО, также как и у ENY2, наблюдалось два пика. Острый пик наблюдался сразу же за промотором, тогда как второй широкий пик покрывал всю транскрибируемую область гена. Таким образом, и ENY2, и ТНО при активации транскрипции привлекались на транскрибируемую область *hsp70*, и распределение HPR1 и ТНОС5 в общем совпадало с распределением ENY2.



**Рис.4 ENY2 и ТНО привлекаются на транскрибируемую область гена *hsp70* с последующей активацией транскрипции**

**А** – Распределение РНК-полимеразы II (Pol II), ENY2, ТНОС5 и HPR1 на *hsp70* гене при нормальной температуре (НТ) и после теплового шока (ТШ), полученное методом иммунопреципитации хроматина, измерения проводили с использованием 13 пар праймеров, перекрывающих весь ген *hsp70*. Данные представлены в процентах от исходной фракции, значения фона (иммунопреципитация за иммуноглобулины из преиммунной сыворотки) варьировали от 0,02 до 0,05% для разных точек. На схеме гена *hsp70* стрелка указывает точку начала транскрипции, черными полосами обозначены нетранслируемые области, белой рамкой обозначена кодирующая область гена.

**Б** – ТНО приходит в индуцированные тепловым шоком пучки (87А, 87В) на политенных хромосомах, выделенных из слюнных желёз личинок *D.melanogaster*. Иммуноокрашивание проводили с использованием антител против ТНОС5, РНК-полимеразы II (Pol II) и DAPI.

Кроме того было проанализировано присутствие Xmas-2, компонента комплекса AMEX, (Kurshakova et al. 2007) на гене *hsp70*. ChIP метод показал его отсутствие на гене *hsp70*. Этот факт можно объяснить слабой ассоциацией Xmas-2 с хроматином, а не качеством антител, с ним взаимодействующих, поскольку качество антител было проверено в экспериментах по иммунопреципитации белков из эмбриональных экстрактов и в опытах по коиммунопреципитации РНК (см. ниже).

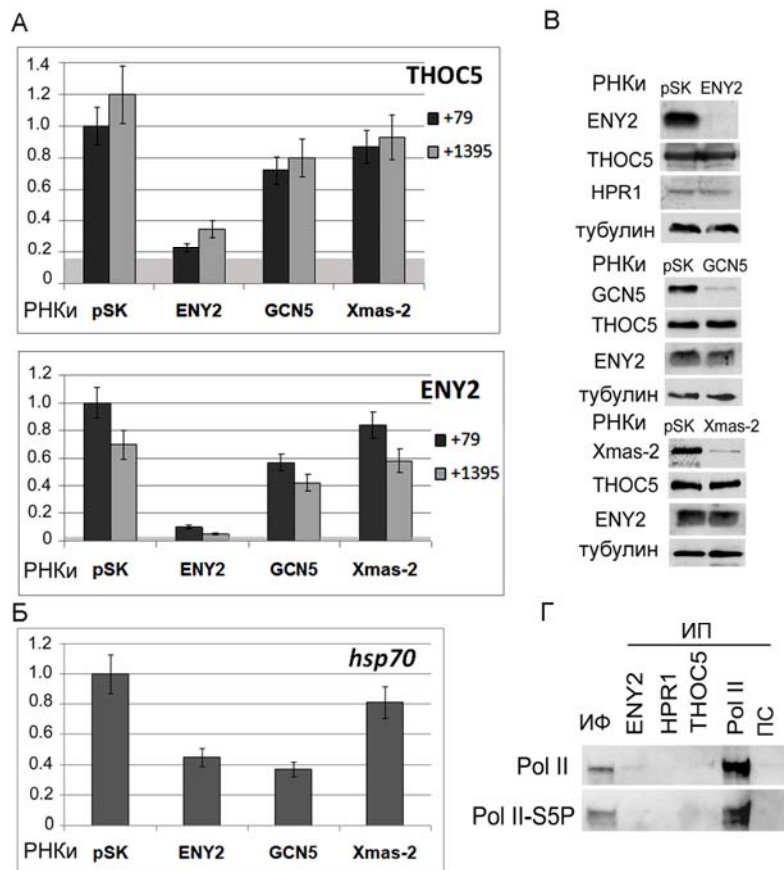
### ***ENY2 необходим для привлечения ТНО на ген hsp70***

Чтобы выяснить, участвует ли ENY2 в привлечении ТНО комплекса на ген, проводили нокдаун белка ENY2 в S2-клетках методом РНК-интерференции и анализировали, присутствует ли при этом ТНО на гене *hsp70* после теплового шока. Количество ENY2 в клетке было снижено в 20 раз по сравнению с контрольными клетками, в то время как количество HPR1 и ТНОС5 в клетке не изменилось, это говорит о специфичности РНК-интерференции ENY2. При этом связь ТНОС5 с геном *hsp70* значительно ослабла и упала до уровня фона (Рис.5А). Таким образом, ENY2 необходим для привлечения ТНО на ген *hsp70*.

Нарушение привлечения ТНО могло быть также вызвано снижением уровня транскрипции *hsp70*, наблюдаемом при нокдауне ENY2 [Kurshakova, 2007]. Влияние уровня транскрипции на привлечение ТНО было описано у дрожжей [Jimeno, 2008]. Чтобы выяснить, будет ли наблюдаться такой эффект у дрозофилы, был проведен нокдаун белка GCN5 методом РНК-интерференции. Это привело к снижению уровня транскрипции *hsp70*, такому же, как и при уменьшении количества ENY2 в клетке. В этом случае уменьшение привлечения ТНО на ген *hsp70* было незначительным по сравнению с тем, что наблюдалось после нокдауна ENY2. Привлечение ТНО на ген *hsp70* оставалось неизменным в том случае, когда мы проводили нокдаун белка Xmas-2, который оказывает незначительное влияние на транскрипцию *hsp70* (Рис.5Б). В целом, влияние нокдаунов GCN5 и Xmas-2 на привлечение ТНО сравнимо с влиянием на уровень транскрипции *hsp70*. По результатам проведенных экспериментов был сделан вывод, что основное снижение количества ТНО на *hsp70* после нокдауна ENY2 происходит из-за отсутствия последнего, а не из-за снижения уровня транскрипции гена *hsp70*. При нокдаунах GCN5 и Xmas-2 привлечение ENY2 на *hsp70* менялось таким же образом, как привлечение ТНОС5, что подтверждает его ассоциацию с ТНО на транскрибируемом участке (рис.5А).

Каждый из нокдаунов ENY2, GCN5, Xmas-2 также не оказывал влияния на количество двух других факторов и компонентов ТНО в S2 клетках (Рис.5В). Исходя из этого, снижение количества ТНО на гене *hsp70* при нокдауне ENY2 не было вызвано уменьшением

количества ТНО в клетке. Таким образом, ENY2, как компонент ТНО, необходим для его привлечения на ген.



**Рис.5** Нокаунт ENY2 ослабляет рекрутирование ТНО на ген *hsp70*

**А** – THOC5 и ENY2 на транскрибируемой области гена *hsp70* в точке +79 (черные столбцы) и +1395 (серые столбцы) при тепловом шоке оценили методом иммунопреципитации хроматина после нокадаунов ENY2, GCN5 или Xmas-2. В контрольных экспериментах клетки обрабатывали неспецифической dsRNA (pSK). Значения фона (иммунопреципитация за иммуноглобулины из преиммунной сыворотки) варьировали от 0,05 до 0,15%.

**Б** – Количество транскриптов гена *hsp70* после нокадауна соответствующих факторов относительно контрольных клеток.

**В** – Специфичность нокадаунов ENY2, GCN5 и Xmas-2. Присутствие указанных белков проанализировали в клетках, обработанных неспецифической dsRNA (pSK) и соответствующей dsRNA. В качестве контроля использовали тубулин.

**Г** – ENY2 и компоненты ТНО не ассоциированы с Pol II в клеточном экстракте. Проводили иммунопреципитацию из экстракта клеток культуры Шнайдер 2(S2) после теплового шока с использованием антител против ENY2, THOC5, HPR1, Pol II и преиммунной сыворотки. В полученной смеси оценили тотальное количество Pol II и Pol II, несущей фосфорилированный Ser 5 в CTD, который является маркером элонгирующей полимеразы.

Для дрожжей было показано, что РНК-полимераза II принимает участие в привлечении ТНО на ген. Чтобы оценить её участие в привлечении ENY2 и ТНО на ген у *D.melanogaster*, были проведены эксперименты по коиммунопреципитации из ядерного экстракта S2 клеток. Было изучено, взаимодействует ли РНК-полимераза II с ENY2-ТНО комплексом (Рис.5Г). В экспериментах по коиммунопреципитации ENY2, ТНОС5, НРР1 не взаимодействуют с РНК-полимеразой II. Таким образом, РНК-полимераза II не участвует в привлечении ENY2-ТНО на ген *hsp70*.

### ***ENY2 и ТНО котранскрипционно взаимодействуют с образующейся мРНК***

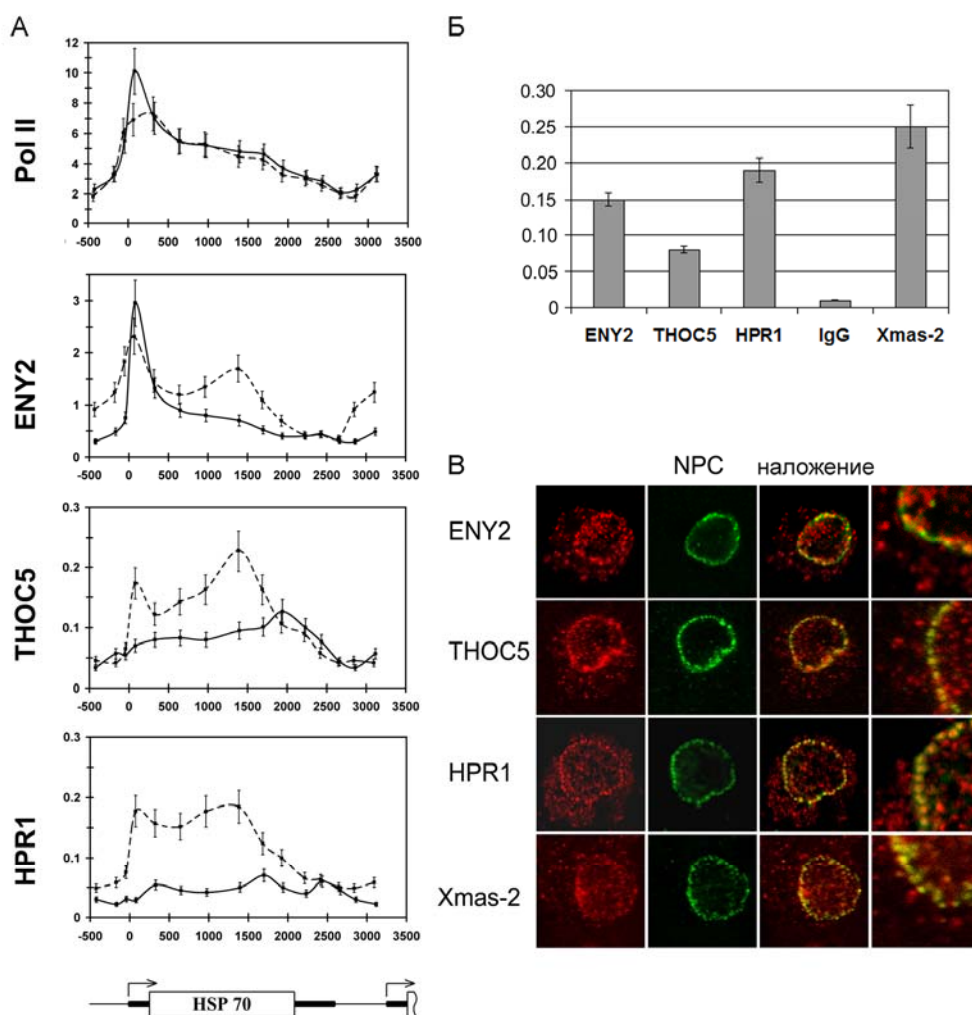
На следующем этапе работы было проверено, обусловлено ли присутствие ENY2 и ТНО в транскрибируемой части гена взаимодействием с ДНК или с образующейся пре-мРНК. Для этого был использован метод, предложенный Abruzzi et al. 2004. В экспериментах по иммунопреципитации хроматина перед иммунопреципитацией хроматин был обработан РНКазой А. Обработка не повлияла на белки, которые взаимодействуют с хроматином напрямую. Количество белков, взаимодействующих с хроматином через РНК, после обработки РНКазой А уменьшилось.

Обработка РНКазой А привела к небольшому повышению пика РНК-полимеразы II на промоторе и оказала незначительное влияние на её распределение на транскрибируемой области. Количество ТНОС5 и НРР1 сильно снизилось по всей длине гена, небольшое количество ТНО сохранилось на 3' концевой части гена (Рис.6А). Проведенный эксперимент показывает, что ТНО ассоциирован с геном посредством взаимодействия с РНК.

Количество ENY2 в транскрибируемой части гена также значительно уменьшилось. Однако пик ENY2 на промоторе стал даже выше после обработки РНКазой А, что говорит о том, что на промоторе ENY2 взаимодействует с хроматином напрямую (Рис.6А). Небольшое увеличение пиков ENY2 и РНК-полимеразы II после обработки РНКазой А можно объяснить повышением доступности этих белков для антител после удаления формирующейся мРНК и ассоциированных с ней факторов. Такой эффект был описан ранее [Abruzzi, 2004].

Чтобы подтвердить, что ENY2 и ТНО взаимодействуют с мРНК, были проведены эксперименты по коиммунопреципитации мРНК *hsp70* за антитела к ENY2, ТНОС5 и НРР1 из лизата S2 клеток, которые были подвергнуты тепловому шоку (Рис.6Б). Антитела к перечисленным белкам, а также антитела к Xmas-2, специфично копреципитируют мРНК *hsp70*. Это подтверждает, что ENY2 и ТНО ассоциированы с мРНК *hsp70*, как и Xmas-2.

Полученные данные указывают на то, что ENY2, ТНОС5 и НРР1 ассоциированы с формирующимися в процессе транскрипции мРНК.



**Рис.6 ENY2, ТНО и Xmas-2 ассоциированы с мРНК**

**А** – Влияние обработки РНКазой на распределение PolII, ENY2, THOC5 и HPR1 на гене *hsp70* после теплового шока. Сплошной линией показаны результаты экспериментов, в которых хроматин в реакции иммунопреципитации хроматина был обработан РНКазой А, прерывистой линией – когда обработка РНКазой А не проводилась. Результаты иммунопреципитации хроматина показаны в процентах от исходной фракции, уровень фона варьировал в пределах 0,02-0,05% от точки к точке.

**Б** – мРНК *hsp70*, сосажденная антителами к ENY2, ТНО и Xmas-2. РНК-иммунопреципитацию проводили с использованием антител к перечисленным белкам (IgG из преиммунной сыворотки использовали в качестве отрицательного контроля), из лизата S2 клеток, подвергнутых тепловому шоку. Результаты приведены в процентах от исходной фракции.

**В** – компоненты ТНО колокализуются с комплексом ядерной поры (NPC). На рисунке приведены иммуноокрашивания S2 клеток антителами к ENY2, THOC5, HPR1, Xmas-2 (красным) и антителами к NPC (зеленым), наложение окрашиваний и увеличенный фрагмент наложенного изображения. Увеличение 1000х, для наложений из правого столбца 3000х.

Кроме того было проанализировано распределение ТНО комплекса в S2 клетках *D.melanogaster*. Большая часть ENY2 и Xmas-2 локализуется в виде точек на периферии и внутри ядра, как было показано ранее [Kurshakova, 2007]. Компоненты ТНО распределяются в ядре S2 клеток сходным с компонентами AMEX образом (Рис.6В). ТНОС5 и HPR1 колокализуются с комплексом ядерной поры, NPC (Nuclear Pore Complex). Колокализация с NPC характерна для белков, принимающих участие в транспорте мРНК. Небольшое количество перечисленных белков присутствует и в цитоплазме S2 клеток.

Суммируя полученные данные, можно сделать вывод, что ENY2-ТНО взаимодействует с образующейся в процессе транскрипции мРНК. Распределение компонентов ENY2-ТНО в S2 клетках дает возможность предположить, что этот комплекс ассоциирован с мРНК не только в ядре, но и в цитоплазме, где ENY2-ТНО может принимать участие в цитоплазматических этапах экспрессии генов.

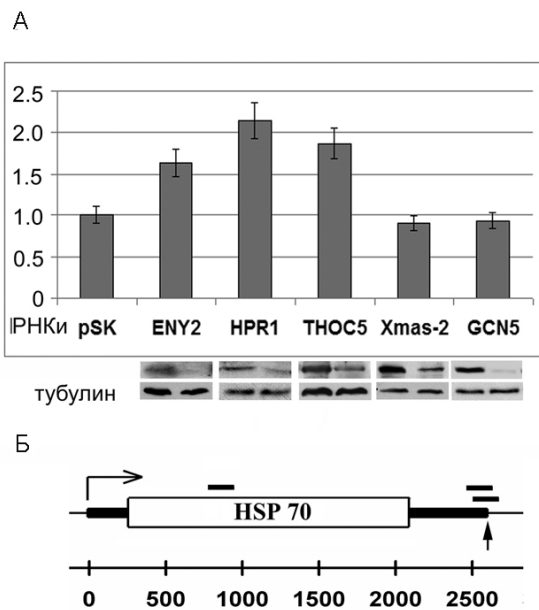
### ***Нокдаун ENY2 и ТНО влияет на процессинг 3' конца пре-мРНК hsp70***

Ранее было показано, что *THO2* и *HPR1* мутации у дрожжей влияют на процессинг 3' конца пре-мРНК [Saguez, 2008]. В связи с этим было решено проверить влияние нокдаунов ENY2 и ТНО на количество непроцессированной мРНК *hsp70* в S2 клетках после теплового шока (Рис.7А). Уровень непроцессированных транскриптов измеряли при помощи ПЦР в реальном времени, в качестве матрицы использовали кДНК, синтезированную с использованием гексануклеотидов случайной последовательности. Для получения более достоверных результатов использовали две разных пары праймеров на участок пре-мРНК, расположенный после сигнала полиаденилирования (Рис.7Б). Полученные результаты были одинаковы для разных пар праймеров.

Нокдауны ТНОС5 и HPR1 приводили к увеличению количества непроцессированных транскриптов в два раза, нокдаун ENY2 – в полтора раза по сравнению с контрольными клетками. Нокдауны белков Xmas-2 и GCN5 не оказывали влияния на процессинг 3' конца пре-мРНК *hsp70*. Таким образом, снижение количества ENY2 или компонентов ТНО нарушает созревание 3' конца транскриптов гена *hsp70*.



**Рис.7 Влияние нокдауна ТНО, ENY2, GCN5, Xmas-2 на процессинг 3' конца пре-мРНК *hsp70***



**А** – Относительное количество непротранскрипированных транскриптов *hsp70* после нокдаунов соответствующих факторов. Клетки, обработанные неспецифической дцРНК (рСК), использовали в качестве отрицательного контроля. Количество соответствующего белка в контрольных клетках (слева) и в клетках после РНК-интерференции, а также количество выравнивающего белка тубулина в образцах показано ниже.

**Б** – Схема гена *hsp70*, горизонтальными полосами отмечены фрагменты гена, которые использовали для измерения общего количества транскриптов и для измерения количества непротранскрипированных транскриптов. Два крайних правых фрагмента присутствуют только в непротранскрипированном транскрипте, сайт расщепления (показан стрелкой в конце транскрибируемой части гена) расположен внутри этого участка.

### III. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты, полученные в этой работе, показывают, что ENY2 и ТНО формируют у *D.melanogaster* дискретный комплекс. Взаимодействие ENY2 и компонентов ТНО не зависит от РНК и ДНК. Результаты ряда независимых экспериментов подтверждают важную функциональную роль взаимодействия ENY2 с ТНО *in vivo*. Оба эти компонента распределены по транскрибируемой части гена *hsp70*, котранскрипционное привлечение ТНО зависит от присутствия ENY2. Также ENY2 и ТНО колокализуются на многих транскрипционно активных сайтах политеменных хромосом.

Комплекс ENY2-ТНО не взаимодействует с двумя другими ENY2-содержащими комплексами, SAGA и AMEX. На политеменных хромосомах часть локусов, в которых есть ENY2 и ТНО, не содержат SAGA. Это говорит о том, что ТНО и ENY2 могут принимать участие в экспрессии SAGA-независимых генов.

На неактивном гене *hsp70* ENY2 присутствует на промоторе. На промоторе также присутствуют другие компоненты SAGA [Lebedeva, 2005; Kurshakova, 2007]. При активации транскрипции ENY2 привлекается в транскрибируемую область гена *hsp70*. Компоненты ТНО отсутствуют на неактивном гене *hsp70* и появляются при тепловом шоке. Распределение компонентов ТНО похоже на распределение ENY2. Результаты экспериментов по иммунопреципитации хроматина из экстракта, обработанного РНКазой, и иммунопреципитации мРНК показывают, что у *D.melanogaster* комплекс ENY2-ТНО ассоциирован с образующейся в процессе транскрипции мРНК. Количество ENY2 на промоторе не уменьшается при обработке экстракта РНКазой – по-видимому, этот пик дает ENY2, входящий в состав SAGA. Ассоциацию ENY2-ТНО с образующейся в процессе транскрипции мРНК можно рассматривать как особенность механизма функционирования ТНО у многоклеточных, так как ранее было показано, что у дрожжей ТНО ассоциирован с хроматином напрямую, а у млекопитающих – через взаимодействие с молекулой мРНК [Abruzzi, 2004; Masuda, 2005].

Привлечение ТНО на ген у дрожжей зависит от РНК-полимеразы II [Abruzzi, 2004], Sus1, гомолог ENY2 дрожжей, взаимодействует с элонгирующей формой РНК-полимеразы II [Pascual-García, 2008]. Полученные в этой работе данные говорят о том, что у дрозофилы ENY2 необходим для привлечения ТНО в сайт активированной транскрипции. При этом ни ENY2, ни ТНО не взаимодействуют с РНК-полимеразой II. Сходный результат был описан для ТНО человека [Masuda, 2005]. По-видимому, привлечение ТНО в сайты активированной транскрипции у многоклеточных идет по иному, нежели у дрожжей, механизму и не зависит от РНК-полимеразы II.

Уменьшение количества отдельных субъединиц ENY2-ТНО в клетке приводит к сдвигу соотношения процессированных и непроцессированных транскриптов в сторону последних. Видимо, нарушения в упаковке формирующейся мРНК приводят к нарушениям механизма процессинга 3' конца молекул пре-мРНК.

Также в этой работе было проанализировано участие Xmas-2, субъединицы комплекса AMEX, в формировании мРНК. Ранее в нашей лаборатории было показано, что Xmas-2 привлекается в сайты активной транскрипции, в этой работе показано, что он также взаимодействует с мРНК. Метод иммунопреципитации хроматина показывает, что Xmas-2, в отличие от ТНО, не ассоциирован с хроматином в сайтах активной транскрипции. Видимо, Xmas-2 связывается с мРНК на более поздних стадиях биогенеза, нежели ENY2-ТНО. Также не было обнаружено влияния Xmas-2 на 3' процессинг пре-мРНК *hsp70*. Видимо, Xmas-2 принимает участие в более поздних стадиях процессинга мРНК и формирования мРНК.

Кроме того, как было показано ранее, Xmas-2 и ENY2 в составе комплекса AMEX принимают участие в экспорте зрелых мРНК из ядра в цитоплазму [Kurshakova, 2007].

Полученные в этой работе данные говорят о том, что ENY2-ТНО рассматривать как пример комплекса, задействованного в сопряжении различных этапов экспрессии генов в ядре. ENY2-ТНО принимает участие в элонгации транскрипции и в созревании образующихся в процессе транскрипции мРНК. Кроме того, ранее было показано, что ТНО необходим для экспорта мРНК генов теплового шока из ядра в цитоплазму [Rehwinkel, 2004]. То, что ENY2-ТНО вовлечен в последовательные этапы формирования мРНК, открывает дополнительные возможности для эффективной регуляции биогенеза мРНК и для устранения возникающих в процессе созревания мРНК нарушений.

Сравнение полученных в этой работе данных о механизме функционирования ТНО у дрозофилы с данными, полученными при изучении ТНО у дрожжей и человека, позволило выделить особенности механизма процессинга мРНК, которые специфичны для многоклеточных.

Интегрируя данные, полученные в этой работе и данные, полученные ранее, можно сделать следующее заключение: ENY2 входит в состав нескольких белковых комплексов, принимающих участие в последовательных этапах экспрессии генов. ENY2 необходим для пространственной координации привлечения этих комплексов на ДНК и РНК, а также для позиционирования генов в ядре (Рис.8).

Участие в клеточных процессах ENY2 и Xmas-2 не ограничивается ядром, в цитоплазме S2 также обнаруживается значительное количество этих факторов. Для ТНО человека показано, что он функционирует как шаттл между ядром и цитоплазмой [Katahira, 2009], эти данные позволяют предположить, что ENY2 и ассоциированные с ним факторы также могут принимать участие в биогенезе мРНК в цитоплазме. Дальнейшие эксперименты направлены на выяснение того, какую роль выполняет ENY2-ТНО в цитоплазме.

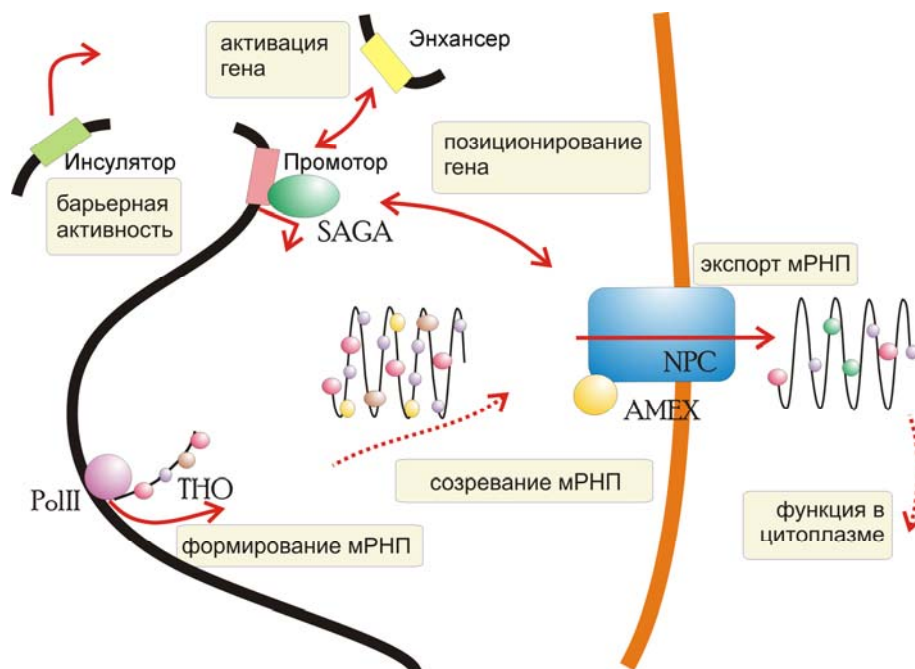


Рис.8 Процессы, в которых участвует ENY2

#### IV. ВЫВОДЫ

1. Показано, что у *D.melanogaster* белок ENY2 ассоциирован с комплексом ТНО;
2. Установлено, что ENY2 и ТНО привлекаются на транскрибируемую область гена теплового шока *hsp70* при активации транскрипции;
3. Выявлено, что ENY2 необходим для привлечения ТНО на кластер генов теплового шока *hsp70*, РНК-полимераза II не принимает участия в привлечении ENY2 и ТНО;
4. Показано, что ENY2 и ТНО котранскрипционно взаимодействуют с образующейся мРНК *hsp70* и входят в состав мРНК *hsp70*;
5. Установлено, что снижение количества ENY2 и компонентов ТНО нарушает процессинг 3' конца пре-мРНК *hsp70*.

## V. СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. **А.В.Орлова**, Д.В.Копытова, А.Н.Краснов, Е.Н.Набирочкина, Ю.В. Ильин, С.Г.Георгиева, Ю.В.Шидловский «Транскрипционный фактор ENY2 необходим для привлечения ТНО комплекса на ген *hsp70 Drosophila melanogaster*» Доклады Академии Наук, 2010, том 434, № 1, с. 130–134.

2. Daria V. Kopytova, **Anastasija V. Orlova**, Alexey N. Krasnov, Dmitriy Ya. Gurskiy, Julia V. Nikolenko, Elena N. Nabirochkina, Yulii V. Shidlovskii, and Sofia G. Georgieva «Multifunctional factor ENY2 is associated with the THO complex and promotes its recruitment onto nascent mRNA», GENES & DEVELOPMENT, 2010, 24:86–96.

3. Daria V. Kopytova, Alexey N. Krasnov, **Anastasija V. Orlova**, Dmitriy Ya. Gurskiy, Elena N. Nabirochkina, Sofia G. Georgieva and Yulii V. Shidlovskii «ENY2: Couple, triple...more?» Cell Cycle, 2010 9:3, 1-3; February 1.

Тезисы конференций:

1. **Орлова А.В.**, Копытова Д.В., Краснов А.Н., Гурский Д.Я., Воробьева Н.Е., Набирочкина Е.Н., Шидловский Ю.В., Георгиева С.Г. Транскрипционный фактор ENY2 взаимодействует с ТНО комплексом и стимулирует его привлечение на мРНК у *Drosophila melanogaster*. Всероссийская научная школа для молодежи «Горизонты нанобиотехнологии». 12-16 октября 2009 г., Звенигород.

2. **Орлова А.В.**, Копытова Д.В., Краснов А.Н., Гурский Д.Я., Набирочкина Е.Н., Шидловский Ю.В., Георгиева С.Г. Транскрипционный фактор ENY2 взаимодействует с ТНО комплексом у *Drosophila melanogaster*. 8-11 февраля 2010г., Москва.

3. **Anastasija Orlova**, Daria V. Kopytova, , Alexey N. Krasnov, Dmitriy Gurskiy, , Julia V. Nikolenko, Elena N. Nabirochkina, Yulii V. Shidlovskii, and Sofia G. Georgieva. Multifunctional Factor ENY2 Is Associated with the THO Complex and Promotes its Recruitment onto Nascent mRNA. June, 21-25, 2010, Moscow.