

На правах рукописи
УДК 575.22:595.773.4

Воробьева Надежда Евгеньевна

**Изучение механизма действия
нового коактиватора транскрипции**

03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва
2009

Работа выполнена в лаборатории регуляции экспрессии генов Учреждения Российской академии наук Института биологии гена РАН,

Научные руководители:

доктор биологических наук, профессор
кандидат физико-математических наук

Георгиева София Георгиевна
Шидловский Юлий Валерьевич

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор
доктор биологических наук, профессор

Чуриков Николай Андреевич
Сашенко Лидия Павловна

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт молекулярной генетики РАН.

Защита диссертации состоится 4 июня 2009 года в 11⁰⁰ часов
на заседании Диссертационного совета Д 002.37.01 при Учреждении Российской академии наук Института 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 29 апреля 2009 года.

Ученый секретарь Диссертационного совета
кандидат фармацевтических наук

Грабовская Л.С.

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Физиологическое состояние клетки определяется внешними сигналами и в большинстве случаев конечной точкой действия этих сигналов является изменение уровня транскрипции гена. Изучение сложных механизмов, позволяющих клетке распознавать и реагировать на внешние факторы, является одной из основных задач современной молекулярной биологии.

Знание законов, по которым функционирует молекулярный аппарат клетки, координировано запускающий в нужный момент экспрессию одного спектра генов и подавляющий другой, и своевременно реагирующий на приходящие извне импульсы, имеет не только большое фундаментальное значение. Оно является незаменимым для разработки новейших методик лечения заболеваний, моделирования действия новых лекарственных препаратов, выведения новых видов сельскохозяйственных растений и животных.

Первым этапом экспрессии большинства генов высших эукариот является транскрипция, осуществляемая РНК-полимеразой II. Этот процесс контролируется многоуровневым аппаратом, состоящим из нескольких тысяч белковых факторов. Для инициации транскрипции какого-либо гена требуется воздействие различных коактиваторных комплексов, которые привлекаются ген-специфическими активаторами (Rosenfeld M., Lunyak V., 2006) Основной задачей коактиваторных комплексов является осуществление взаимной связи между активаторами и общими факторами транскрипции, а также изменение состояния хроматина в районе гена. За последнее десятилетие было описано множество мультибелковых комплексов, которые биохимически и функционально были отнесены к коактиваторам транскрипции. Однако, все их можно разделить на два больших класса: адапторы и комплексы, модифицирующие хроматин. В свою очередь коактиваторы, изменяющие состояние хроматина, делятся на коактиваторы, ковалентно посттрансляционно модифицирующие гистоны, и коактиваторы, обладающие АТФ-зависимой активностью расплетать хроматинизированную ДНК, участвуя в скольжении нуклеосом.

Ранее в нашей лаборатории был впервые охарактеризован новый коактиватор транскрипции SAYP, кодируемый геном *e(y)3* (Shidlovskii et al, 2005). Первоначально этот белок был описан как фактор, необходимый для активированной экспрессии гена *yellow* у дрозофилы (Georgiev P., Gerasimova T., 1989). В дальнейшем были обнаружены его гомологи у других многоклеточных животных. Гомолог SAYP, PHF10 играет важную роль в регуляции экспрессии генов млекопитающих (Lessard et al, 2007). Обнаруженные гомологи

SAYP имеют в своем составе область высокой гомологии характерную для всех. Она была названа SAY доменом, и для нее было обнаружено свойство активировать транскрипцию в дрожжевой системе. Этот консервативный домен белка SAYP представляет интерес, так как, возможно, его свойствами, изученными на примере белка дрозофилы, будут обладать и белки-гомологи.

В данной работе были изучены свойства основного консервативного домена белка SAYP: показано, что именно он отвечает за способность этого белка активировать транскрипцию, а также обнаружены взаимодействующие с ним белковые комплексы, которые и осуществляют механизм активации, регулируемый SAYP. Таким образом, показан новый механизм функционирования коактиватора транскрипции посредством объединения двух больших транскрипционных комплексов в единый.

Цель и задачи исследования

Целью настоящей работы являлось изучение механизма действия нового коактиватора транскрипции *D. melanogaster* белка SAYP. Для этого в ходе исследований предполагалось решить следующие экспериментальные задачи:

- выявить домен SAYP, отвечающий за активацию транскрипции в системе клеток S2 *D. melanogaster*;
- изучить влияние различных коактиваторов на SAYP-зависимую активацию транскрипции;
- выявить коактиваторы, взаимодействующие с SAYP, изучить, какие домены SAYP необходимы для взаимодействия с коактиваторами;
- в составе коактиваторов, взаимодействующих с SAYP, обнаружить белки, непосредственно связанные с активационным доменом белка.

Научная новизна и практическая ценность работы

В данной работе в системе S2 клеток *D. melanogaster* показано, что основным доменом белка SAYP, отвечающим за активацию транскрипции является новый эволюционно высоко консервативный домен SAY. Обнаружено, что способность этого домена активировать транскрипцию определяется его взаимодействием с транскрипционными коактиваторами TFIIID и Brahma.

Впервые описан новый механизм действия коактиватора транскрипции путем непосредственного объединения комплексов, осуществляющих ремоделинг хроматина и инициацию транскрипции, а значит ключевые этапы процесса активации экспрессии гена.

Более того, показано, что основным ядром, связывающим транскрипционные комплексы, является эволюционно высоко консервативный домен SAY. Принимая во внимание, что именно этот домен является высоко консервативной областью всех гомологов SAYP различных организмов, в том числе и человека, можно предположить, что механизм функционирования этих гомологов будет во многом сходным с описанным нами механизмом.

Способность SAYP соединять на промоторе комплексы, осуществляющие ключевые этапы активации транскрипции, может быть использована в практической области, например, для активации транскрипции локусов, репрессированных в результате генетических заболеваний или для поддержки функционирования высоко активных промоторов при получении трансгенных животных.

Апробация работы

Результаты работы были представлены автором на следующих конференциях: международная конференция «Генетика в России и в мире» (Москва; 2006), XIX зимняя школа молодых ученых «Перспективные направления в физико-химической биологии и биотехнологии» (Москва; 2007), Workshop “Protein-nucleic acid interactions” of the International Research Training Group Giessen/Marburg-Moscow (Russia, Suzdal; 2007),

FEBS workshop “The biology of modular protein domains” (Austria, Tirol; 2007).

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

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 печатных работ. Из них статей – 2, тезисов докладов и материалов конференций – 4.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 98 страницах и состоит из следующих разделов: введение, объект и задачи исследования, материалы и методы, результаты, обсуждение результатов, выводы, благодарности и список литературы. Диссертация содержит 8 рисунков. Библиография включает 144 источника.

II. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Определение домена белка SAYP, отвечающего за его способность активировать транскрипцию в системе S2 клеток D. melanogaster

Для определения способности доменов белка SAYP активировать транскрипцию была создана плазмидная конструкция pTrAssay, которая содержала репортерный ген *lacZ* под контролем минимального промотора гена *hsp70* и 10 сайтов связывания для GAL4 ДНК-связывающего домена (UAS сайты). Кроме того, в состав конструкции входила последовательность, кодирующая ДНК-связывающий домен GAL4, маркированный тройным FLAG – эпитопом под контролем конститутивного актинового промотора (Рис. 1А). Для проведения теста на способность активировать транскрипцию фрагменты ДНК, кодирующие различные домены SAYP, были встроены в эту конструкцию, чтобы после экспрессии в S2 клетках образовывать слитный белок с GAL4 ДНК-связывающим доменом. Экспрессированный таким образом слитный белок при помощи ДНК-связывающего домена привлекался на UAS-сайты и изучаемый домен оказывался в непосредственной близости от укороченного *hsp70* промотора и, если обладал необходимыми свойствами, активировал транскрипцию репортерного гена. Полученные конструкции использовали для проведения временной трансфекции S2 клеток *D. melanogaster*. По истечении двух суток после трансфекции из клеток получали лизат, который анализировали на активность β-галактозидазы, а также измеряли количество экспрессированного исследуемого домена SAYP при помощи иммуоферментного анализа. Делением значения активности β-галактозидазы на относительное количество экспрессированного домена получали удельную активность, отражающую способность этого домена активировать транскрипцию.

Учитывая распределение внутри SAYP консервативных белковых доменов, белок был разделен на несколько фрагментов для дальнейшего изучения. Среди них был выделен АТ-домен, содержащий так называемый АТ-hook, который, возможно, отвечает за связывание этого белка с А/Т богатыми районами ДНК, N-концевой домен, специфический для *D. melanogaster*, а также два расположенных рядом РНД домена. В последнее время было опубликовано много работ, описывающих специфическое взаимодействие доменов этого типа с модифицированными N-концевыми остатками гистонов. Предполагается, что они способны участвовать в распознавании гистонового кода.

Ранее в составе SAYP был обнаружен новый эволюционно консервативный домен SAY и показана его способность самостоятельно активировать транскрипцию в дрожжевой двугибридной системе (Shidlovskii et al., 2005). Гомологи SAYP, содержащие этот специфический домен, присутствуют у многих высших эукариот. Примером такого гомолога

является, например, человеческий белок PHF10, который также содержит домен, высоко гомологичный домену SAY и два расположенных рядом PHD домена.

Из всех исследованных доменов SAYP только домен SAY обладал способностью активировать транскрипцию репортерного гена в S2 клетках (Рис.1Б). Однако изучение в нашей системе слитного домена, содержащего оба консервативных домена SAY и PHD, показало в 3 раза большую активацию транскрипции репортерного гена, чем при использовании только SAY домена. Таким образом, PHD домен, по-видимому, важен для эффективной активации транскрипции посредством SAY в S2 клетках дрозофилы. Так как для этого типа доменов характерно свойство специфически распознавать модификации гистонов, возможно, они путем взаимодействия с нуклеосомами стабилизируют активационный домен SAY на репортерном гене или ориентируют образуемый им комплекс более благоприятно для активации транскрипции.

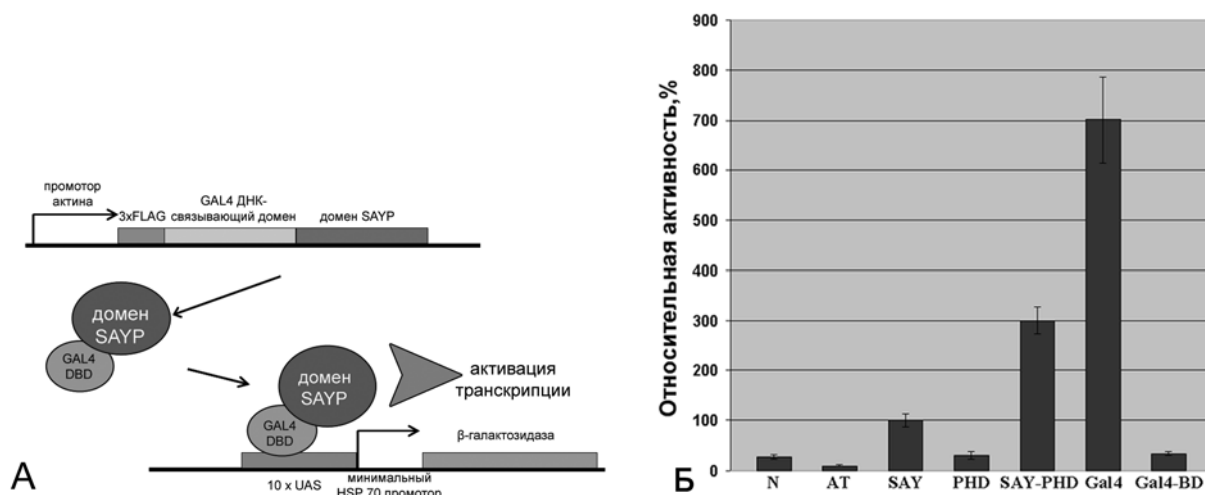


Рис 1. Определение домена белка SAYP, отвечающего за свойство белка активировать транскрипцию в системе S2 клеток *D. melanogaster*:

А – Схема работы конструкции рTrAssay, применявшейся для поиска активационного домена. Под контролем конститутивного промотора актина изучаемый домен экспрессировался слитно с ДНК-связывающим доменом Gal4. Экспрессированный подобным образом слитный белок привлекался за счет ДНК-связывающего домена к UAS сайтам, оказываясь в непосредственной близости от укороченного *hsp70* промотора и исследуемый домен активировал транскрипцию репортерного гена, если был на это способен;

Б – Относительная активность отдельных доменов белка SAYP в системе для изучения способности белков активировать транскрипцию в S2 клетках. Относительная активность представляет собой значение равное отношению относительной активности репортерного белка (β-галактозидазы) к относительному количеству исследуемого домена, измеренному при помощи иммуноферментного анализа.

N-специфический для *D.melanogaster* домен белка; AT-домен, содержащий AT-hook; SAY-консервативный домен, характерный для всех гомологов; PHD-два рядом расположенных PHD домена; SAY-PHD – домен, объединяющий домены SAY и PHD; Gal4 – активатор транскрипции Gal4, содержащий ДНК-связывающий и активационный домены, был взят нами в качестве положительного контроля; Gal4-BD – ДНК-связывающий домен GAL4, был взят в качестве отрицательного контроля.

Определение коактиваторов, обеспечивающих способность SAY домена активировать транскрипцию репортерного гена

Для обнаружения коактиваторов, при помощи которых домен SAY осуществляет свою активаторную функцию в S2 клетках *D. melanogaster* было изучено, как снижение уровня различных компонентов комплексов-коактиваторов транскрипции при помощи РНК-интерференции оказывает влияние на активацию при помощи SAY репортерного гена в описанной системе (Рис. 2А). Для большей стабильности результатов, а также для сохранения влияния организации хроматина в области промотора на его работу (так в некоторых работах было показано, что ДНК плазмид при временной трансфекции в клетку не несет нуклеосом) были получены две линии S2 клеток, стабильно экспрессирующие SAY и SAY-PHD домены в составе конструкции рTrAssay. В дальнейших экспериментах была использована линия, несущая SAY домен, однако стоит отметить, что и линия SAY-PHD обладала схожими свойствами.

Для определения роли различных коактиваторов транскрипции на активацию при помощи SAY домена была изучена экспрессия репортерного гена в клетках стабильной линии, несущей SAY домен, в условиях снижения уровня различных компонентов комплексов-коактиваторов транскрипции при помощи РНК-интерференции. Значительное снижение активации экспрессии репортерного гена SAY доменом было обнаружено при РНК-интерференции компонентов общего фактора транскрипции TFIID и хроматин ремоделирующего комплекса Brahma. В тоже время, снижение уровня GCN5-гистонацетилтрансферазы и ISWI-ремоделирующей АТФазы, которые также являются компонентами комплексов-коактиваторов транскрипции (семейств комплексов SAGA и ISWI соответственно), не оказало влияния на способность SAY-домена активировать транскрипцию.

Для подтверждения взаимодействия консервативного домена SAY и коактиваторов TFIID и Brahma были проведены эксперименты по осаждению домена SAY из лизата клеток стабильно трансфицированной линии при помощи анти-FLAG-агарозы (Sigma) (Рис.2б).

Полученные результаты показали, что домен SAY способен соосаждать компоненты коактиваторов TFIID и Brahma и не способен соосаждать GCN5-ацетилтрансферазу (компонент семейства комплексов SAGA) и ISWI-ремоделирующую АТФ-азу (компонент семейства комплексов ISWI) из лизата S2 клеток. Как и стоило ожидать такими же свойствами обладал и участок белка, содержащий SAY и PHD домены, в то время, как сами по себе PHD домены оказались не способными соосаждать ни один из изучаемых белков.

Таким образом, в результате проведенного эксперимента было показано, что способность изучаемого нами домена SAY активировать транскрипцию репортерного гена

зависит от уровня компонентов общего фактора транскрипции TFIID и хроматин ремоделирующего коактиватора Brahma. По-видимому, коактиваторы TFIID и Brahma и определяют способность SAY домена активир[...]

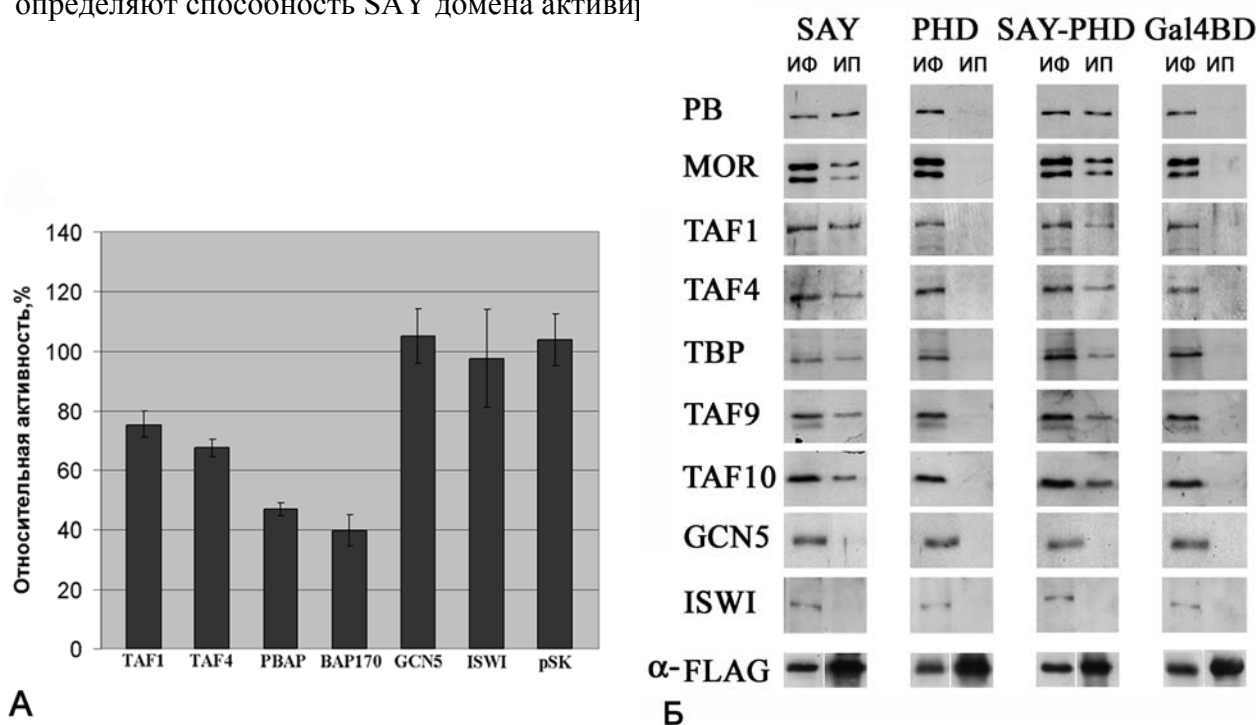


Рис. 2 Изучение влияния компонентов различных коактиваторов транскрипции на способность SAY активировать транскрипцию репортерного гена в S2 клетках:

А – Уровень активации репортерного гена в системе рTrAssay при помощи домена SAY на фоне снижения уровня различных компонентов комплексов-коактиваторов транскрипции. TAF1, TAF4 – компоненты общего фактора транскрипции TFIID; PBAP, BAP170 – компоненты хроматин-ремоделирующего комплекса Brahma; GCN5 – гистоацетилтрансфераза; ISWI – ремоделирующая АТФаза; pSK – последовательность плазмиды рBluescriptSK2(-) – взята нами в качестве отрицательного контроля. За 100% принято значение активации репортерного гена доменом SAY без снижения уровня каких-либо коактиваторов в клетке.

Б – Соосаждение белков – компонентов транскрипционных комплексов из клеточного лизата доменами SAYP. Все изученные домены были маркированы тройным FLAG-эпитопом, поэтому коиммунопреципитацию проводили с использованием агарозы с иммобилизованными анти-FLAG антителами. TAF1, TAF4, TAF9, TAF10, TBP – компоненты общего фактора транскрипции TFIID; PBAP, MOR – компоненты хроматин-ремоделирующего комплекса Brahma; GCN5 – гистоацетилтрансфераза; ISWI – ремоделирующая АТФаза, α -FLAG – антитела к FLAG эпитопу.

Колокализация компонентов комплексов-коактиваторов транскрипции на репортерном гене, активируемом SAY доменом в ядре клетки

Взаимодействие SAY домена с комплексами TFIID и Brahma было также подтверждено экспериментами по иммуноокрашиванию клеток стабильно трансфицированных плазмидой рTrAssay, несущей в своем составе последовательность, кодирующую SAY домен (Рис. 3). Известно, что трансгены в стабильных линиях S2 клеток встраиваются в геном, образуя локусы с большим количеством повторов (обычно порядка нескольких тысяч). Описанная выше и используемая в этом эксперименте конструкция рTrAssay содержит не только последовательность для экспрессии исследуемого SAY домена,

но также и сайты для связывания слитного белка, состоящего из ДНК-связывающего домена GAL4 и SAY домена. Поэтому, при встраивании в геном, локус трансгена будет нести сайты для посадки экспрессируемого домена. В результате иммуноокрашивания клеток такой стабильной линии ожидалось скопление гиперэкспрессированного домена внутри ядра в одной точке, а именно в локусе встраивания трансгена. Как и предполагалось при иммуноокрашивании клеток стабильной линии, экспрессирующей SAY домен, с использованием анти-FLAG антител было обнаружено скопление изучаемого домена в одной точке внутри ядра.

Вначале были проведены эксперименты по совместному иммуноокрашиванию клеток анти-FLAG антителами с гибридизацией *in situ* последовательности GAL4 DBD для подтверждения локализации скопления SAY домена именно в локусе встраивания трансгена. В результате было показано, что SAY домен локализуется именно в локусе трансгенов, вероятнее всего, находясь на промоторе репортерного гена, чью транскрипцию он активирует. Далее, проводя иммуноокрашивание клеток стабильной линии специфическими антителами к компонентам коактиваторов TFIID и Brahma, было показано, что эти комплексы настолько активно привлекаются к активированному репортерному гену при помощи SAY домена, что также образуют скопление в виде точки, которое хорошо колокализуется с изучаемым доменом.

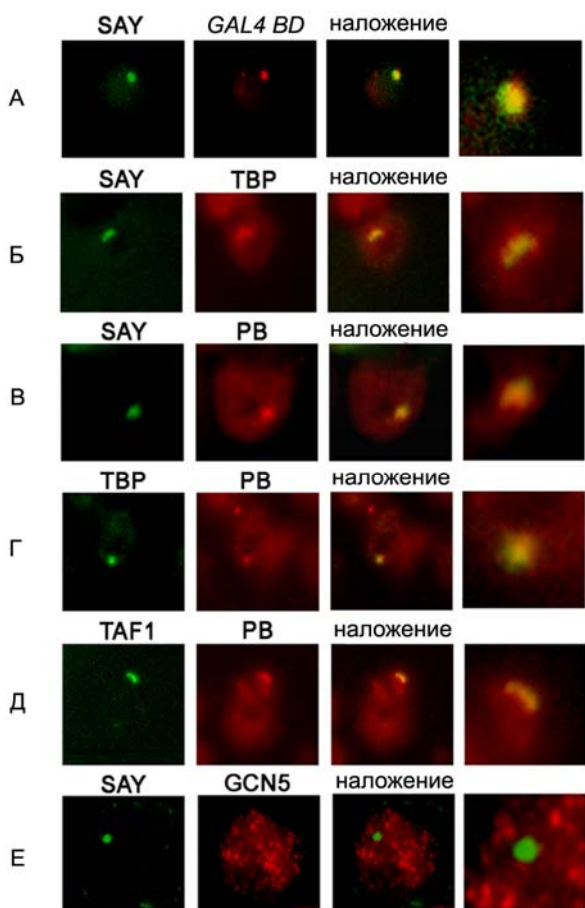


Рис. 3. Колокализация компонентов комплексов-коактиваторов транскрипции на репортерном гене в клетках линии, стабильно экспрессирующей SAY домен в составе конструкции pTrAssay:

А – совместное иммуноокрашивание антителами к FLAG SAY домену и гибридизация *in situ* последовательности *GAL4 BD*;

Б-Е – иммуноокрашивание с использованием антител к FLAG (показывает локализацию в клетке SAY домена, маркированного FLAG эпитопом), компонентам общего фактора транскрипции TFIID (TBP и TAF1) и хроматин ремоделирующего комплекса Brahma (PB), а также антителами к ацетилтрансферазе GCN5 (компоненту SAGA-комплекса), взятыми в качестве контроля.

Таким образом, было подтверждено взаимодействие SAY домена с различными компонентами общего фактора транскрипции TFIID и хроматин ремоделирующего комплекса Brahma в результате колокализации белков на репортерном гене, активированном SAY доменом, внутри ядра клетки.

Экспрессированный в S2 клетках SAY домен способен образовывать белковый комплекс, характерный для полноразмерного SAYP

Параллельно с настоящей работой в нашей лаборатории проводилась биохимическая очистка комплекса, образуемого белком SAYP из ядерного экстракта эмбрионов *D. melanogaster*. Было обнаружено, что полноразмерный белок SAYP способен формировать белковый комплекс размером порядка 2 МДа и состоящий из коактиваторов TFIID и Brahma (Сошникова et al, 2008).

Приведенные выше эксперименты показали, что основным доменом белка SAYP, отвечающим за взаимодействие с коактиваторами TFIID и Brahma является SAY домен. Было решено проверить, способен ли SAY домен сам по себе формировать полноразмерный комплекс характерный для SAYP.

Для определения размера белкового комплекса, образуемого доменом SAY, его гиперэкспрессировали в S2 клетках *D. melanogaster* в составе конструкции pTrAssay. По истечении двух суток после трансфекции клетки лизировали и клеточный лизат был фракционирован при помощи гель-фильтрации (Superose 6). Распределение экспрессированного домена по фракциям детектировали при помощи вестерн-блот анализа с использованием анти-FLAG антител (Рис. 4). Так как изучаемый домен экспрессировался в клетках на очень высоком уровне, то вполне объяснимо его распределение по фракциям широким пиком. Для образования полноразмерного комплекса размером 2 МДа, SAY домену, вероятно, не хватило эндогенных партнеров. Однако, как видно на разделении, SAY домен присутствует в высоких фракциях, соответствующих 2-2,5 МДа. Чтобы выяснить, с какими транскрипционными коактиваторами объединяется SAY домен для образования комплекса размером 2 МДа было выполнено соосаждение анти-FLAG антителами из различных фракций компонентов транскрипционных комплексов. Основываясь на приведенных выше экспериментах, основными претендентами были компоненты основного фактора транскрипции TFIID и ремоделирующего комплекса Brahma, тем более, что если суммировать массу их компонентов, они способны образовывать единый комплекс искомого размера.

Только из высоких фракций, соответствующих размеру комплекса 2МДа, SAY домен оказался способным соосаждать компоненты комплексов TFIID и Brahma, а из более низких фракций, взятых в качестве контроля, SAY их не преципитировал.

Таким образом, изучаемый SAY домен, при экспрессии его в S2 клетках способен образовывать комплекс, характерный для полноразмерного белка размером порядка 2МДа и состоящий из основного фактора транскрипции TFIID и хроматин ремоделирующего комплекса BRM.

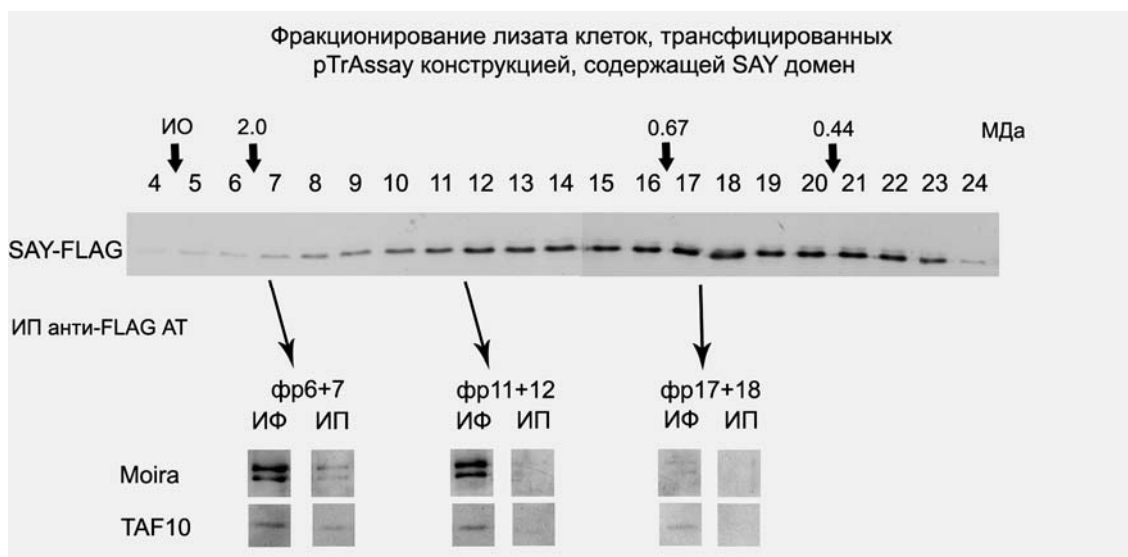


Рис. 4. Фракционирование лизата клеток, экспрессирующих SAY домен в составе конструкции рТгAssay при помощи гель-фильтрации. Соосаждение SAY доменом компонентов (а) основного фактора транскрипции TFIID (TAF10) и хроматин ремоделирующего комплекса Brahma (Moira) из различных фракций.

ИО - исключенный объем колонки, ИФ – исходная фракция, ИП – иммунопреципитация.

Определение белка-партнера в составе коактиватора Brahma, взаимодействующего с SAY

Основываясь на полученных ранее данных (Сошникова et al, 2008) о том, что SAYP взаимодействует именно с подтипом РВАР комплекса Brahma, в качестве предполагаемых партнеров выступало всего два белка, характерных для этого комплекса. В выделенном комплексе, образуемом SAYP, не было обнаружено компонента Osa, зато были обнаружены оба специфических компонента для РВАР комплекса (ВАР170 и РВАР).

Чтобы выяснить, какая же из этих специфических субъединиц непосредственно взаимодействует с SAYP, предположили, что, понизив уровень белка-партнера, можно нарушить ассоциацию SAYP с коровыми компонентами комплекса, если конечно при этом не нарушается стабильность самого комплекса. Для этого в клетках линии, стабильно экспрессирующей SAY домен, методом РНК интерференции понижали уровень РВАР и

ВАР170 компонентов комплекса Brahma (его подтипа РВАР). Затем из грубого клеточного лизата антителами к FLAG эпитопу сосаждали коровые компоненты Brahma (Рис.5А).

На рисунке хорошо видно, что именно снижение уровня компонента ВАР170 комплекса Brahma значительно нарушает взаимодействие SAY домена с основными субъединицами комплекса, в то время как РНК интерференция РВАР такого влияния не оказывала.

Кроме того, непосредственное взаимодействие домена SAY с ВАР170 было подтверждено сосаждением их из клеточного лизата после совместной гиперэкспрессии их в S2 клетках (Рис.5Б). Для этого, ранее полученная клеточная линия, стабильно экспрессирующая SAY была трансфицирована конструкцией, несущей последовательность, кодирующую ВАР170, маркированный гемагглютинином, под контролем конститутивного актинового промотора. Гиперэкспрессированный ВАР170 белок сосаждался вместе с SAY доменом из клеточного лизата при помощи анти-FLAG антител. По-видимому, в этом эксперименте гиперэкспрессированный компонент ВАР170 замещал эндогенный белок в составе транскрипционного комплекса, образуемого SAY, так как в результате осаждения SAY домена при гиперэкспрессии ВАР170 не было обнаружено ни одного другого компонента Brahma комплекса (его подтипа РВАР).

В качестве контроля для этого эксперимента была использована клеточная линия, стабильно экспрессирующая ДНК-связывающий домен GAL4. Она также было трансфицирована конструкцией с последовательностью ВАР170. Однако, в отличие от SAY домена, контрольный белок GAL4 DBD не взаимодействовал с ВАР170.

Результаты двух различных экспериментов показали, что SAY домен белка SAYP взаимодействует с ВАР170 компонентом комплекса Brahma (его варианта РВАР).

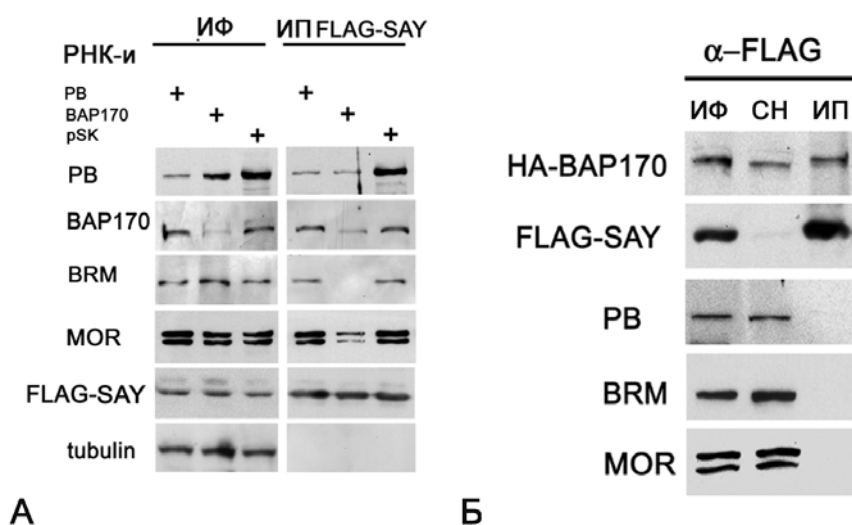


Рис. 5. Определение непосредственного партнера SAY в составе хроматин ремоделирующего комплекса РВАР:

А – Сосаждение SAY доменом коровых компонентов Brahma комплекса (его подтипа РВАР) при РНК интерференции его субъединиц РВАР и ВАР170;

Б – Сосаждение доменом SAY белка ВАР170 при совместной гиперэкспрессии в S2 клетках дрозофилы.

ИФ – исходная фракция; ИП – иммунопреципитация; СН – супернатант.

Определение белка-партнера в составе общего фактора транскрипции TFIIID, взаимодействующего с SAY

При поиске предположительных кандидатов на непосредственного партнера SAY в составе общего фактора транскрипции TFIIID мы также опирались на полученные ранее данные (Сошникова et al, 2008). Стоит отметить, что выделенный комплекс SAYP не имел четкой стехиометрии и отдельные компоненты коактиватора TFIIID в его составе были представлены в различном количестве (для комплекса TFIIID это свойство уже было описано другими авторами ранее (Sanders et al, 2002)). Поэтому, для исследования в качестве партнера домена SAY были выбраны мажорные компоненты комплекса. По такой же, как и в случае с комплексом Brahma, схеме определения белкового партнера были исследованы несколько TAF белков. Однако основным кандидатом являлся белок TAF5, так как он был представлен в очищенном комплексе белка SAYP наиболее полно и, кроме того, при использовании ядерного экстракта эмбрионов дрозофилы и соосаждении антителами к SAYP истощался с самой высокой эффективностью. Также, как и для BAP170, при помощи РНК-интерференции в линии клеток, стабильно экспрессирующих SAY домен в конструкции pTrAssay, был снижен уровень белков TAF4 и TAF5. Затем была проведена иммунопреципитация клеточного лизата, антителами к FLAG эпитопу. На рисунке 6А видно, что при пониженном уровне белка TAF5 SAY домен теряет способность соосаждать коровый компонент TFIIID комплекса TAF4. Стоит отметить, что РНК-интерференция TAF5 практически не влияет на клеточный уровень TAF4. По данным, полученным другими авторами, TAF4 является основной субъединицей комплекса TFIIID, при снижении его уровня в клетке сильнее всего нарушается стабильность комплекса и уровень других компонентов комплекса в клетке (Wright et al, 2006). В контрольных экспериментах при РНК-интерференции GCN5-гистонацетилтрансферазы и pSK, SAY домен соосаждал все изученные компоненты TFIIID комплекса. Таким образом, TAF5 является важным белком для ассоциации SAY домена с общим фактором транскрипции TFIIID.

Так как, TAF5 является одним из коровых компонентов TFIIID, и снижение его уровня экспрессии оказывает влияние на несколько TAF, полученные данные было решено подтвердить экспериментами по непосредственному соосаждению белков TAF5 и SAY домена после гиперэкспрессии их в S2 клетках. Для этого линию S2 клеток, стабильно экспрессирующую SAY домен в составе конструкции pTrAssay, трансфицировали плазмидой, несущей последовательность TAF5 под контролем актинового промотора. На рисунке 6Б видно, что SAY домен связывает значительную часть TAF5, экспрессированного в клетке. Кроме того, отдельно нами было изучено взаимодействие SAY домена с WD-40 доменом, входящим в состав TAF5. Ранее другие авторы предсказывали для WD-40 TAF5

функцию домена, обеспечивающего взаимодействие TFIIID с транскрипционными факторами (Dubrovskaya et al, 1996). Для изучаемого в данной работе SAY домена это предположение подтвердилось. Действительно, WD-40 домен, экспрессируемый в клеточной линии несущей SAY домен в конструкции рTrAssay полностью сосаждался антителами к FLAG эпитопу. Стоит отметить, что ранее была показана неспособность WD-40 домена TAF5 встраиваться в состав эндогенного комплекса TFIIID, так что наблюдаемое нами взаимодействие не может быть опосредовано какими-либо другими компонентами комплекса.

Таким образом, непосредственным белковым партнером SAY домена в составе комплекса TFIIID является TAF5, а именно его WD-40 домен.

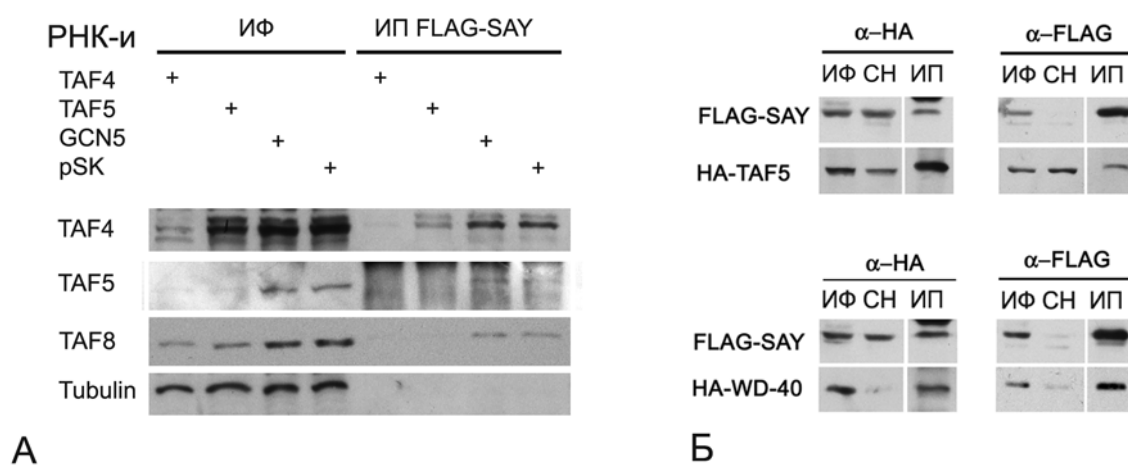


Рис. 6. Определение непосредственного партнера SAYP в составе основного фактора транскрипции TFIIID:

А – Сосаждение SAY доменом коровых компонентов TFIIID комплекса при РНК-интерференции субъединиц TAF4 и TAF5;

Б – Сосаждение доменом SAY белка TAF5 и его WD-40 домена при их совместной гиперэкспрессии в S2 клетках.

ИФ – исходная фракция; ИП – иммунопреципитация; СН – супернатант.

III. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Изначально коактиватор SAYP был описан как транскрипционный фактор, необходимый для активированной экспрессии гена *yellow* у *Dr. melanogaster* (Georgiev P., Gerasimova T., 1989). Позднее, в нашей лаборатории он был более детально охарактеризован, а также были обнаружены его гомологи у других организмов (Shidlovskii et al, 2005). Обнаруженные гомологи SAYP значительно различаются по длине белка даже среди родственных видов, а гомолог SAYP у человека – белок PHF10 (BAF45a) имеет приблизительно в 5 раз меньшую длину. Обнаруженные белки имеют в своем составе область высокой гомологии характерную для всех белков-гомологов, которая была названа SAY доменом, и для которой были обнаружены свойства активировать транскрипцию в дрожжевой системе. Этот консервативный домен белка SAYP представляет интерес, так как, вероятно, его свойства, изученные для белка дрозофилы, будут характерны и для белков-гомологов. В задачи данного исследования входило изучение способности доменов белка SAYP активировать транскрипцию в S2 клетках дрозофилы, а также выявление механизма, по которому осуществляется данная активация.

В результате проведенной работы был изучен консервативный домен SAY транскрипционного коактиватора SAYP, имеющий гомологов во многих организмах. Была показана его способность активировать транскрипцию репортерного гена в природной для него системе S2 клеток *D.melanogaster*, а также обнаружены взаимодействующие с ним коактиваторы транскрипции, которые и определяют его свойства. Также для SAY домена была описана способность формировать белковый комплекс, характерный для полноразмерного белка, взаимодействуя одновременно с транскрипционными комплексами TFIID и Brahma (вариант PBAР). В составе этих комплексов были обнаружены белки с которыми домен взаимодействует: BAP170 – в случае Brahma комплекса (его PBAР варианта) и WD-40 домен белка TAF5 – в случае фактора TFIID.

Таким образом, впервые был описан новый механизм функционирования коактиватора транскрипции, который заключается в непосредственном объединении на промоторе в общий стабильный комплекс общего фактора транскрипции TFIID и хроматин ремоделирующего комплекса Brahma, то есть транскрипционных комплексов, отвечающих за ключевые этапы активации транскрипции. Неоднократно было показано, что ремоделирование хроматина на промоторе и посадка общего фактора транскрипции TFIID это зависимые процессы. Представленный выше общий комплекс коактиваторов способен сам по себе обеспечивать выполнение двух важнейших этапов подготовки промотора для формирования преинициаторного комплекса, а значит и последующей активации

транскрипции. В результате экспериментов был также локализован SAY домен белка, отвечающий за формирование общего комплекса, который является областью высокой гомологии этого белка у других организмов. Исходя из этого, можно предположить наличие сходного механизма функционирования коактиватора и для его белков-гомологов в других организмах, в частности белка PHF10 (BAF45a) человека.

IV. ВЫВОДЫ

1. Способность белка SAYP активировать транскрипцию определяется консервативным SAY доменом, присутствующим у всех гомологов SAYP, в том числе и в белке PHF10 человека.

2. Способность SAY домена активировать репортерный ген в клетке зависит от уровня компонентов общего фактора транскрипции TFIID и хроматин ремоделирующего комплекса Brahma.

3. Показано, что SAY домен взаимодействует с коактиваторами TFIID и Brahma и способен формировать комплекс размером приблизительно 2МДа, включающий данные коактиваторы.

4. В составе коактиваторов TFIID и Brahma идентифицированы белки, с которыми взаимодействует SAY домен. Это белки BAP170 комплекса Brahma и белок TAF5 комплекса TFIID. Показано, что SAY домен взаимодействует с доменом WD-40 белка TAF5.

5. Впервые описан новый механизм функционирования коактиватора транскрипции, который заключается в непосредственном объединении на промоторе в общий стабильный комплекс общего фактора транскрипции TFIID и хроматин ремоделирующего комплекса Brahma, то есть транскрипционных комплексов, отвечающих за ключевые этапы активации транскрипции

V. СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Статьи:

1. Воробьева Н.Е., Сошникова Н.В., Николенко Ю.В., Набирочкина Е.Н., Георгиева С.Г., Шидловский Ю.В. «Новый эволюционно консервативный белковый домен, активирующий транскрипцию» Доклады Академии Наук 2008 том 423, №5, стр. 694-696

2. Сошникова Н.В., Воробьева Н.Е., Краснов А.Н., Георгиева С.Г., Набирочкина Е.Н., Ильин Ю.В., Шидловский Ю.В. «Взаимодействие коактиваторов на промоторе» Доклады Академии Наук 2008, том 423, №4, стр. 561-563

Тезисы конференций:

1. Vorobyeva N.E., Soshnikova N.V., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V., Ilyin Y.V. Structural and functional study of domains of novel transcription coactivator SAYP. FEBS workshop “The biology of modular protein domains”, Austria, Tirol, 8-13 September, 2007, Abstract book, p.122

2. NE Vorobyeva, NV Soshnikova, YV Shidlovskii and SG Georgieva Studying structure and function of SAYP domains. Workshop “Protein-nucleic acid interactions” of the International Research Training Group Giessen/Marburg-Moscow, Suzdal, 20-24 June, 2007, p.31

3. Воробьева Н.Е., Шидловский Ю.В., Николенко Ю.В., Набирочкина Е.Н., Георгиева С.Г. Структурный и функциональный анализ транскрипционного коактиватора SAYP. XIX зимняя школа молодых ученых «Перспективные направления в физикохимической биологии и биотехнологии». Москва, 7-9 Февраля, 2007: 25

4. Воробьева Н.Е., Шидловский Ю.В., Николенко Ю.В., Набирочкина Е.Н., Георгиева С.Г. Роль доменов транскрипционного коактиватора SAYP при активации транскрипции в эукариотической системе. Международная конференция «Генетика в России и в мире» Москва, 28 июня-2 июля, 2006: 37