

На правах рукописи

УДК 575.22:595.773.4.

**Лебедева Любовь Александровна**

**Изучение взаимодействия белков, участвующих в  
инициации транскрипции РНК-полимеразой II у  
*Drosophila melanogaster*.**

Специальность 03.00.26 - молекулярная генетика

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва - 2005

Работа выполнена в Лаборатории регуляции экспрессии генов  
Института биологии гена РАН

Научные руководители:

доктор биологических наук

Георгиева С. Г.

кандидат биологических наук

Набировкина Е.Н.

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук

Карпов В.Л.

кандидат биологических наук

Тиллиб С.В.

Ведущая организация: Институт цитологии и генетики СО РАН

Защита диссертации состоится *23.05* 2005 года в *11* часов  
на заседании Диссертационного совета Д 002.37.01 при Институте  
биологии гена РАН по адресу: 119334, Москва, ул. Вавилова, д.34/5.

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

Автореферат разослан *22* апреля 2005 года.

Ученый секретарь

Диссертационного совета

канд. фарм. наук

*Грбовская Л.С.* Грбовская Л.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Активация транскрипции у эукариот - многоступенчатый процесс со сложной координированной регуляцией. Для обеспечения доступности специфических геномных локусов для РНК полимеразы II (RNAPII) в контексте хроматина необходимо взаимодействие основных факторов транскрипции, геноспецифических активаторов и различных кофакторов транскрипции.

Изучение механизма взаимодействия основных компонентов транскрипционного аппарата в процессе экспрессии того или иного геномного локуса является одной из наиболее интересных областей современных исследований в области регуляции транскрипции. В настоящее время установлено, что для инициации транскрипции необходимы так называемые общие факторы транскрипции - комплексы, обладающие постоянным белковым составом и участвующие в транскрипции основной части генов. В частности, в области промотора собирается большой преинициаторный комплекс, в свою очередь состоящий из нескольких мультибелковых комплексов, основным из которых является комплекс TFIID, содержащий в своем составе белок TBP и ассоциированные с ним белки TAF (TBP associated factors). Кроме TFIID в состав преинициаторного комплекса входят: белок TFIIB, необходимый для фиксации TFIID на старте транскрипции; комплекс TFIIIF, обеспечивающий вхождение RNAPII в преинициаторный комплекс; комплекс TFIIH, обладающий АТФ-азной активностью и гиперфосфорилирующий CTD RNAPII при переходе ее от инициации к элонгации; комплексы TFIIIE и TFIIA, стимулирующие сборку преинициаторного комплекса, а также комплекс Медиатор, необходимый для активированной транскрипции.

В активации транскрипции на хроматиновой матрице не менее важную роль играют комплексы, участвующие в посттрансляционной модификации

гистонов. Одна из наиболее хорошо изученных модификаций - ацетилирование высококонсервативных N-концов гистонов гистоацетилтрансферазами (НАТ). Ацетилирование изменяет высокоорганизованные фибриллы хроматина и таким образом увеличивает аффинность транскрипционных факторов к ДНК. Многочисленные исследования выявили прямую связь между ацетилированием гистонов и активацией транскрипции. Таким образом, исследование белков и комплексов, обладающих НАТ активностью, имеет большое значения для понимания процессов, проходящих при активации транскрипции у эукариот. Одним из наиболее хорошо изученных комплексов, является SAGA комплекс дрожжей, содержащий в своем составе GCN5 гистонацетилтрансферазу (GCN5 НАТ), Ada белки, Spt белки, а также некоторые из белков TAF, которые, как было указано выше, одновременно являются компонентами основного преинициаторного комплекса TFIID. Гомологи GCN5 НАТ были найдены у дрозофилы и человека. Комплекс, содержащий GCN5 НАТ (TFTC), был охарактеризован у человека, однако у дрозофилы, аналогичный комплекс обнаружен не был.

Настоящая работа посвящена исследованию НАТ комплекса *Drosophila melanogaster* и изучению взаимодействия общих факторов транскрипции РНК- полимеразы II, в активации экспрессии локуса *Hsp70*.

**Цели и задачи исследования.** Основными целями данного исследования являлись изучение белков dADA2a и dADA2b и выявление комплексов, в которые они входят, а также исследование регуляции экспрессии локуса *Hsp70* общими факторами транскрипции.

**В работе были поставлены следующие задачи:**

(1) Охарактеризовать новые белки *Drosophila melanogaster*, dADA2a и dADA2b, гомологи адапторного белка ADA2, входящего в состав SAGA, транскрипционного комплекса дрожжей, содержащего гистонацетилтрансферазу GCN5 (GCN5НАТ).

(2) Выяснить, являются ли dADA2a и dADA2b компонентами GCN5 HAT - содержащего комплекса *Drosophila* и охарактеризовать, данный комплекс.

(3) Изучить взаимодействие GCN5-HAT содержащего комплекса с другими общими комплексами, участвующими в активации транскрипции, на модели одного гена (гена теплового шока *hsp70*).

**Научная новизна и практическое значение работы.** Охарактеризованы два новых белка dADA2a и dADA2b, компоненты GCN5 HAT - содержащего комплекса *Drosophila melanogaster*. Показано, что два гомолога dADA2 присутствуют в различных GCN5 HAT - содержащих мультибелковых комплексах, которые могут участвовать в транскрипции различных геномных локусов. Впервые охарактеризованы GCN5 HAT - содержащие комплексы дрозофилы и показано, что они гетерогенны по своему составу. Показано, что GCN5 HAT - содержащие комплексы участвуют в транскрипции гена *hsp70* до и после теплового шока, однако вероятно белковый состав этих комплексов различен. Изучено участие общих транскрипционных факторов в транскрипции гена *hsp70* и показано, что после активации тепловым шоком количество некоторых общих транскрипционных факторов, ответственных за активацию транскрипции (TFIID, TFIIБ и TFIIF) на промоторе гена *hsp70* значительно снижается, в то время как количество таких факторов как GCN5, TRRAP, TFIIN и Медиатора - увеличивается.

Решение многих фундаментальных и прикладных проблем современной биологии требует глубокого понимания общих принципов организации и функционирования генетического аппарата. Это имеет большое значение не только для решения теоретических проблем наук о живом, но и является основой практических разработок, например, в онкологии (создание трансгенных конструкций с гиперэкспрессией необходимого гена). Кроме того, ген *Hsp70* играет большую роль у человека, осуществляя функцию

защиты организма при стрессе. Поэтому очень важны исследованию по изучению механизмов его регуляции.

**Апробация работы.** Основные научные результаты диссертационной работы были доложены на Международной конференции Европейской молекулярно-биологической лаборатории (Гейдельберг, Германия, 2004), на 7-ой Международной конференции по молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта (Суздаль, 2004) и на межлабораторном семинаре ИБГ РАН (2005).

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 90 страницах машинописного текста, содержит 13 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 150 источников.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ходе нашей совместной работы с лабораторией Л.Тора (IGBMC, Strasbourg), с помощью компьютерного поиска были найдены последовательности двух генов *Drosophila. melanogaster* (d), названных *dada2a* и *dada2b*, содержащих открытые рамки считывания для предполагаемых белков, гомологичных белку ADA2 дрожжей. Первой задачей данного исследования являлось выяснить экспрессируются ли эти гены у дрозофилы и кодируют ли они функциональные белки.

Транскрипция генов *adala* и *adalb* у *Drosophila melanogaster*. Для изучения экспрессии генов *adala* и *adalb* была охарактеризована их транскрипция на различных стадиях развития дрозофилы методом Нозерн-блот-гибридизации. (Рис. 1). Было показано, что оба гомолога транскрибируются на всех стадиях развития, однако уровни транскрипции этих генов различаются, *adalb* равномерно транскрибируется на всех

стадиях развития, в то время как *adala* наиболее активно транскрибируется на куколочной стадии.

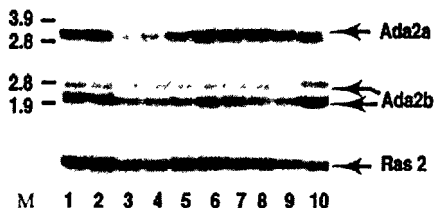


Рис.1. Нозерн-блот-анализ мРНК *adala* и *adalb* на разных стадиях развития *Drosoph. Ua*. Этот же блот был гибридизован с *Ras2* в качестве контроля.

Обозначения: 1- эмбрионы; 2- личинки I возраста; 3- личинки II возраста; 4- личинки раннего III возраста; 5 - личинки позднего III возраста; 6 - куколки I возраста; 7- куколки II возраста; 8 - куколки III возраста; 9- самцы; 10 - самки. М - маркер РНК.

Таким образом, у дрозофилы транскрибируются оба гена, но ген *dadalb*, в отличие от гена *dada2a*, транскрибируется стадие-специфически.

**Гены *dADA2a* и *dADA2b*, кодируют белки, которые входят в состав, GCN5-НАТ содержащих комплексов дрозофилы.** Для изучения ADA2 белков дрозофилы были получены поликлональные антитела, которые узнавали при фракционировании ядерного экстракта в SDS-полиакриламидном геле белки с молекулярной массой соответствующей предсказанной (60кД - dADA2a и 44кД - dADA2b) (Рис.2). Таким образом, *dAda2* гены действительно кодируют соответствующие белки. Кроме того, для dADA2b было показано существование еще одного варианта белка, размером 70 кДа. Возможно, он является посттрансляционно модифицированной формой или сплайс-вариантом ADA2b. Необходимо отметить, что Нозерн-блот-анализом для ADA2b было также найдено две мРНК.

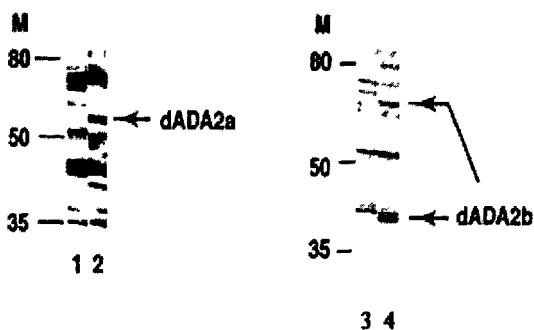


Рис. 2. dADA2a и dADA2b экспрессируются у *Drosophila*. Эмбриональный экстракт *Drosophila* был разделен в 10% SDS-PAGE геле и анализирован Вестерн-блотт-анализом с преиmunной сывороткой (дорожки 1 и 3); сывороткой против dADA2a (дорожка 2) или dADA2b (дорожка 4). Маркер молекулярных масс (M) указан в кДа.

Известно, что SAGA комплекс дрожжей содержит в своем составе гистонацетилтрансферазу GCN5 и некоторые из белков TAF (dTAF4, dTAF9, dTAF10), которые одновременно являются компонентами преинициаторного комплекса TFIID. Мы исследовали, входят ли dADA2a и dADA2b в состав GCN5 HAT - содержащих комплексов дрозофилы, методом коиммунопреципитации из ядерного экстракта в нативных условиях. Белки, связавшиеся с антителами, разделяли в SDS-полиакриламидном геле и переносили на мембраны, которые последовательно гибридизовали с антителами против dTAF4, dGCN5, dTBP, dTAF9, dADA2b, dTAF10, dTAF10b (Рис.3).

В качестве контроля была проведена иммунопреципитация антителами к белкам dTAF10 и dTAF10b. Ранее было показано, что оба данных белка входят в состав преинициаторного комплекса dTFIID [Georgieva et.al., 2000]. Но, в отличие от dTAF10b, dTAF10 в иммунопреципитации также соосаждается с GCN5. Было обнаружено, что антитела к dTAF10 соосаждают все белки TAF, TBP и dGCN5, в то время как антитела к



dTAF1Ob соосажают только компоненты dTFIID комплекса (TAF, TBP), что указывает на специфичность условий иммунопреципитации. dADA2b соосаждается антителами к dTAF1O, но не к dTAF1Ob. (Присутствие dADA2a в данной иммунопреципитации нельзя детектировать, т.к. по молекулярному весу белок совпадает с тяжелой цепью антител).

Антитела к dADA2b соосаждали из ядерного экстракта компоненты GCN5-HAT содержащего комплекса (GCN5, dADA2a и некоторые TAF), но не специфический компонент dTFIID (dTAF1Ob). Антитела против dADA2a соосаждали dADA2b, dGCN5 и dTAF9, но не dTAF10). Интересно, что в отличие от антител к dADA2b они не соосаждали dTAF4 (дорожка 8). В контрольных экспериментах по иммунопреципитации преиммунной антисывороткой (дорожка 10) или на дорожках, где были нанесены аликвоты антител (дорожки 3,5,7,9,11), ни один из этих белков не был детектирован.

Таким образом, полученные результаты демонстрируют, что dADA2 белки дрозофилы входят в состав мультибелкового GCN5 HAT- содержащего комплекса (-ов). (Далее такой комплекс мы будем называть TFTC по аналогии с соответствующим комплексом человека). Кроме того, показано, что у дрозофилы могут существовать различные GCN5 HAT- содержащие комплексы, т.к. состав белков, ассоциированных с dADA2a и dADA2b, отличается.

Проведенные эксперименты также показали, что dADA2a и dADA2b коиммунопреципитируют некоторое количество TBP, что указывает на то, что в эмбриональных экстрактах *Drosophila* некоторое количество TBP может быть ассоциировано с ADA2-содержащими комплексами. Это согласуется с литературными данными (Bhaumik, Green, 2002).

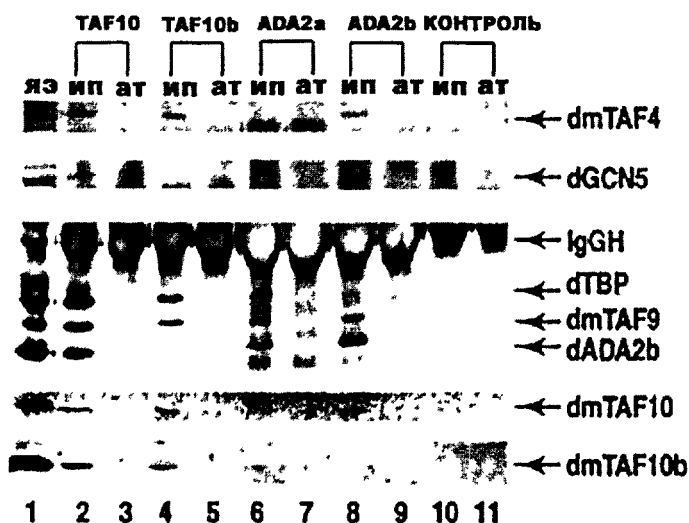


Рис.3. Коиммунопреципитация компонентов GCN5 HAT-содержащего комплекса с dADA2a и dADA2b из ядерного экстракта. На дорожках нанесены: ядерный экстракт из эмбрионов дрозофилы (яэ); антитела с белками, осажденными иммунопреципитацией (ип), и те же антитела до иммунопреципитации (в качестве контроля). Были использованы аффинно-очищенными антитела к dADA2a и dADA2b. На верхней панели указаны антитела, использованные для иммунопреципитации, контроль-иммунопреципитация преиммунной сывороткой. Стрелками указаны белки, идентифицированные Вестерн-блот-анализом. Для разделения белков были использованы 10% и 15% SDS-полиакриламидные гели.

### **dADA2a и dADA2b находятся в различных мультибелковых HAT**

**комплексах.** Дальнейшая характеристика dADA2a- и dADA2b-содержащих комплексов была проведена методом хроматография белков ядерного экстракта из эмбрионов дрозофилы. Белки связывали с Гепарином Ultragel в буфере, содержащем 0.1M KCl. Для последовательной элюции использовали буфер, содержащий 0.24, 0.5 и 1 M KCl. Полученные фракции тестировали на присутствие dADA2a и dADA2b с помощью Вестерн анализа. Интересно, что большая часть dADA2a присутствовала в 0.24 M KCl элюате (Hep0.24), в то

время как dADA2b элюировали с колонки солью большей концентрации - 0.5 KCl (Нер0.5). Для определения размеров разделенных dADA2a- и dADA2b-содержащих комплексов, Нер0.24 и Нер0.5 фракции были подвергнуты гельфильтрации на колонке с Superose 6. Пик dADA2a сходил с колонки во фракциях, соответствующих молекулярной массе 0.2 - 0.8 МДа. В данных фракциях dADA2a коэлюирует с GCN5. dADA2b, вместе с другими компонентами GCN5 HAT - комплекса (белками TAF и GCN5), сходил с колонки во фракции с молекулярной массой более 2 МДа (данные не представлены).

Полученные результаты, совместно с результатами иммунопреципитации указывают на то, что большая часть ADA2 гомологов *Drosophila* присутствуют в различных GCN5 HAT - содержащих мультибелковых комплексах. Комплексы, содержащие dADA2a, имеют молекулярную массу 0.8 МДа, в то время как комплексы содержащие dADA2b - 2 МДа или больше.

**Комплексы, содержащие dADA2a и dADA2b, участвуют в транскрипции различных генов *in vivo*.** Что бы проверить, имеют ли два dADA2 белка одинаковые или разные цели *in vivo* было изучено их распределение на политенных хромосомах личинок дрозофилы. dADA2a и dADA2b связываются со многими сайтами на политенных хромосомах, и имеют как общие, так и специфические сайты связывания (Рис.5). Данные результаты, показывают, что два dADA2 белка имеют пересекающиеся, но не идентичные функции, и что у дрозофилы имеются функционально различные dADA2-содержащие комплексы.

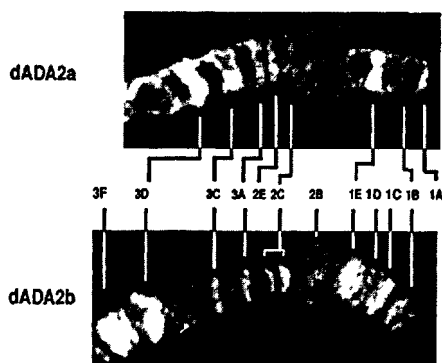


Рис.5. Локализация белков dADA2a и dADA2b в дистальном районе X-хромосомы *D.melanogaster*. Иммуноокрашивание политенных X-хромосом личинок линии *Oregon* антителами к dADA2a (верхняя панель) и антителами к dADA2b (нижняя панель) и вторичными Cy-3-конъюгированными антителами. dADA2a и dADA2b имеют как общие (1B, 1E, 2C, 3A, 3C, 3D), так и специфические (1A, 1E и 1C, 2B, 3F соответственно) сайты связывания.

**Исследование участия общих транскрипционных факторов и GCN5-НАТ содержащих комплексов в активации транскрипции одного геномного локуса на модели гена *hsp70*.** Быстро активирующиеся гены теплового шока - удобная модель для изучения процессов регуляции активации транскрипции у *Drosophila*. Наличие политенных хромосом у *Drosophila* позволяет визуально наблюдать происходящие изменения. Для анализа используют политенные хромосомы из слюнных желез личинок третьего возраста. При тепловом воздействии (37°C, 20 мин.) активируются гены теплового шока, расположенные в пяти сайтах хромосом, которые легко определить по образующимся пучкам. Транскрипция остальных генов при этом прекращается. В данной работе для анализа использовали локусы 87A и 87B, содержащие соответственно две копии и четыре копии гена теплового шока *hsp70*.

Регуляция транскрипции генов теплового шока изучена достаточно хорошо (Karpov et.al., 1984; Farkas et.al., 2000). В частности показано, что важную роль в активации транскрипции играет фактор теплового шока (HSF), который аккумулируется на промоторе после теплового шока. Так же биохимическими методами было показано, что преинициаторный комплекс TFIID связан с промотором гена теплового шока *hsp26* в неактивном

состоянии и инициирует образование коротких транскриптов. Предполагается, что общие транскрипционные факторы остаются связанными с промоторами и после теплового шока. Однако участие общих транскрипционных факторов в инициации транскрипции после теплового шока не было изучено.

Основные компоненты TFIID комплекса покидают сайты генов теплового шока после их активации. Мы исследовали присутствие общих транскрипционных факторов на политенных хромосомах в сайтах 87A и 87B до и после теплового шока. Для идентификации соответствующих сайтов в отсутствие теплового шока хромосомы окрашивали DAPI и проводили картирование при помощи карт Бриджеса. Ранее методом иммуноокрашивания политенных хромосом *D. melanogaster* было показано, что после теплового воздействия РНК-полимераза II аккумулируется в этих активно транскрибирующихся пуфах, практически полностью покидая остальные сайты транскрипции (Shopland., Lis, 1996). Этот факт мы использовали как положительный контроль как для оценки степени ответа на тепловое воздействие, так и для точности картирования.

При анализе поведения белков, входящих в состав комплекса TFIID (TBP, TAF1, TAF2, TAF4, TAF5, TAF8, TAF9 и TAF10), было обнаружено, что до теплового воздействия эти белки присутствуют в сайтах локализации гена *hsp70*, что согласуется с опубликованной моделью активации генов теплового шока (Farkas et.al., 2000). Однако наши эксперименты показали, что после теплового воздействия данные белки в пуфах 87A и 87B не детектируются. Такие же данные были получены для комплекса TFIIB и TFIIF. (Рис.7 и данные не представлены). Необходимо отметить, что компоненты TFIID присутствуют при тепловом шоке в экдизиновых пуфах, которые образуются в процессе развития личинки под воздействием экдизона и не содержат генов теплового шока. На определенной стадии

развития личинки эти пuffs можно наблюдать одновременно с puffами, индуцированными тепловым шоком.

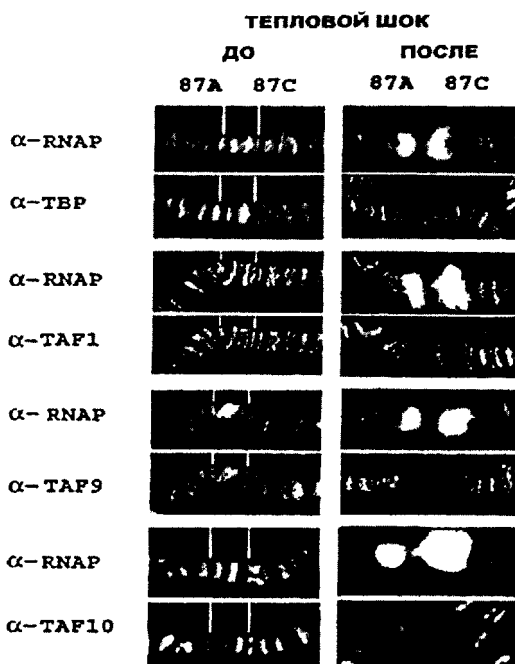


Рис.7. Колокализация TBP, TAF1, TAF9 и TAF10 и РНК-полимеразы II до и после теплового воздействия. Политенные хромосомы *Drosophila melanogaster* линии *Oregon* гибридизовали одновременно с антителами против РНК-полимеразы II и с антителами против одного из компонентов TFIID комплекса. Сигнал детектировали с помощью вторичных флюоресцентных антител. Линиями показаны сайты 87A и 87B до теплового воздействия.

Таким образом, можно предположить, что, несмотря на то, что комплексы TFIID и TFIIB участвуют в инициации транскрипции генов

теплого шока при активации, они не принимают участия в процессе реинициации транскрипции этих генов в ответ на тепловой шок.

**Компоненты GCN5 HAT-содержащего комплекса и комплекса Mediator, а также HSF присутствуют в сайтах теплового шока после их активации.** Наши эксперименты показали, что компоненты TFIIID и TFIIIB в сайтах теплового шока при тепловой индукции не детектируются. Таким образом, встает вопрос, какие транскрипционные факторы могут участвовать в реинициации транскрипции гена *hsp70*. С этой целью мы протестировали присутствие в локусах 87A и 87B двух основных компонентов GCN5 HAT-содержащего комплекса, GCN5 и TRRAP. Оказалось, что оба фактора (GCN5 и TRRAP) присутствуют в сайтах 87A и 87B до и после теплового шока. Такие же данные были получены для субъединицы Mediator - комплекса MED13 (Рис.8).

Высокий уровень основного фактора транскрипции генов теплового шока HSF был обнаружен в данных локусах после теплового шока, что подтверждает данные других авторов. Интересно, что в некоторое количество HSF было обнаружено в данных локусах и до теплового воздействия (данные не представлены).

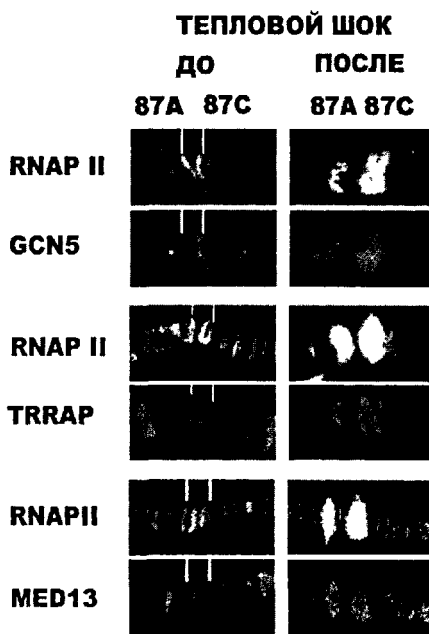


Рис. 8. Колокализация РНК-полимеразы II и GCN5, TRRAP, MED13 до и после теплового воздействия. Проводили двойное иммуноокрашивание политенных хромосом *Drosophila melanogaster* линии *Oregon*.

Таким образом, возможно, в процессе реинициации транскрипции генов теплового шока после теплового воздействия принимает участие TFTC-комплекс совместно с медиаторным комплексом и фактором теплового шока.

**dADA2a и dADA2b отсутствуют в сайте 87A и присутствуют в районе 87B после теплового воздействия.** Интересно, что хотя было показано присутствие белков GCN5 и TRRAP в сайтах 87A и 87B после теплового шока, белки TAF, также являющиеся компонентами TFTC-комплекса, в этих районах не были обнаружены. Поэтому мы исследовали участие dADA2a и ADA2b в ответе на тепловой шок. Было обнаружено, что оба белка



отсутствуют в сайтах 87А и 87В до и присутствуют после теплового воздействия только в пуге 87В (рис.9).

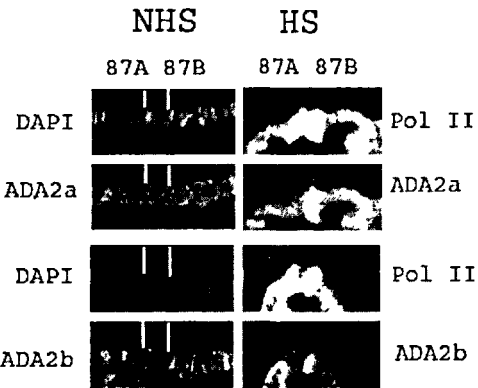


Рис. 9. Локализация белков dADA2a и dADA2b до и после теплового шока. NHS - нет теплового шока; HS - 20 мин. теплового шока.

Но, вероятно, этот факт не связан с активацией транскрипции генов теплового шока, т.к. в дальнейшем при изучении активации трансгенного промотора *hsp70* (см. ниже) данных белков после теплового шока обнаружено не было. Таким образом, можно предположить, что в активации генов теплового шока участвует специфический TFTC-комплекс, не содержащий белков TAF и Ada2.

**Изучение активации трансгена находящегося под контролем промотора *hsp70*, подтверждают результаты, полученные для нативных локусов теплового шока.** Как было указано выше, ген *hsp70* является многокопийным. Кинетический анализ изменений в иммунофлуоресценции на политенных хромосомах в трансгенном локусе, содержащем одну копию гена под *hsp70* промотором, дает независимую и более точную оценку поведения изучаемых белков до и после тепловой индукции. В работе была

использована линия *D. melanogaster* (любезно предоставленная М.Б. Евгеньевым), в которой конструкция с инактивированным мобильным элементом *Penelope* под контролем промотора гена *hsp70* была встроена в локус 19E. Таким образом, при тепловом воздействии образовывался нетипичный для этого района X-хромосомы пуф. Для исследования кинетики взаимодействия транскрипционных факторов с промотором гена личинок подвергали тепловому шоку в течение 2,5 и 20 минут и изучали присутствие данных факторов в пучке 19E методом иммуноокрашивания. Уже через 2,5 минуты теплового воздействия в локусе 19E образовывался пучок и практически для всех анализируемых факторов полученные результаты соответствовали результатам, полученным в эндогенных пучках гена *hsp70* дикой линии. Аналогичные результаты были получены и после 20 мин. теплового шока. Исключением оказались TAF9 и TFIIIF, которые еще присутствовали в локусе 19E спустя 2,5 минуты и отсутствовали после 20 минут теплового воздействия (Рис.10).

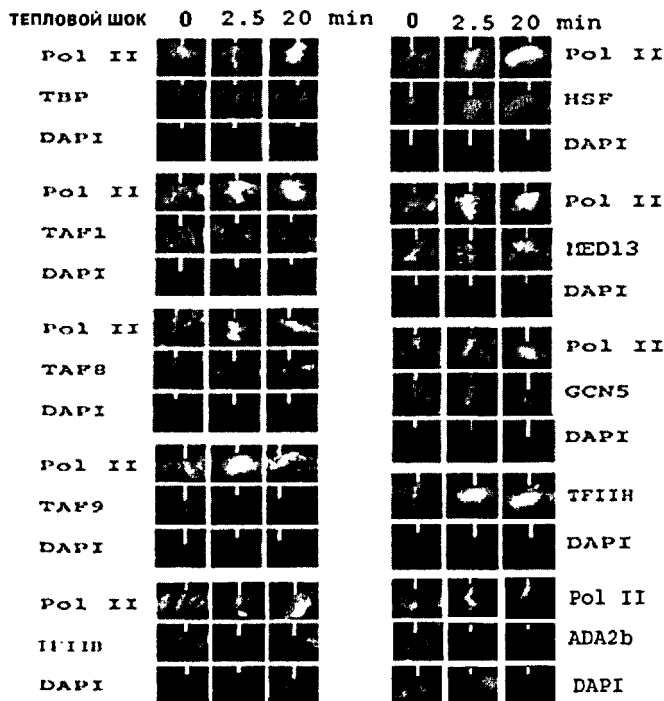


Рис. 10. Колокализация РНК-полимеразы II и TBP, TAF1, TAF8, TAF9, TFIIB, GCN5, TFIIH, HSF, ADA2b до и после теплового воздействия. Двойное иммуноокрашивание политенных хромосом *Drosophila melanogaster* трансгенной линии. Приведено DAPI окрашивание. Цифры над панелями указывают время после теплового шока. Линией указан сайт 19E.

Данными хроматин-иммунопреципитации подтверждают результаты, полученные методом иммуноокрашивания политенных хромосом. Для еще одной независимой оценки наблюдаемых нами событий и определения изменений в количествах исследуемых белков до и после теплового шока, был использован метод хроматин-иммунопреципитации (СЫР). В этих экспериментах использовали S2 (Schneider) клетки *Drosophila*. Фиксированный параформальдегидом хроматин дробили ультразвуком в таких условиях, чтобы размер ДНК, полученной после очистки от белков и

РНК, находился в районе 500 пар нуклеотидов и ниже. Количество ДНК, полученной в хроматин-иммунопреципитации, определяли с помощью ПЦР в режиме реального времени (real-time ПЦР). Для ПЦР были выбраны две пары праймеров: одна пара - к участку ДНК в районе промотора (+58), вторая (как внутренний контроль) - к локусу внутри гена (+946).Количество ДНК, полученной в результате иммунопреципитации с исследуемыми белками, рассчитывали в процентах от количества внесенной в иммунопреципитацию ДНК.

Было показано, что RNAPII, GCN5 и MED13 присутствуют на *hsp70* промоторе до и после теплового воздействия. Однако, TAF9, TBP, TAF10 присутствуют на *hsp70* промоторе до и не детектируются после теплового воздействия. Таким образом, результаты, полученные в хроматин-иммунопреципитации, подтверждают данные иммуноокрашивания политенных хромосом (рис.11).

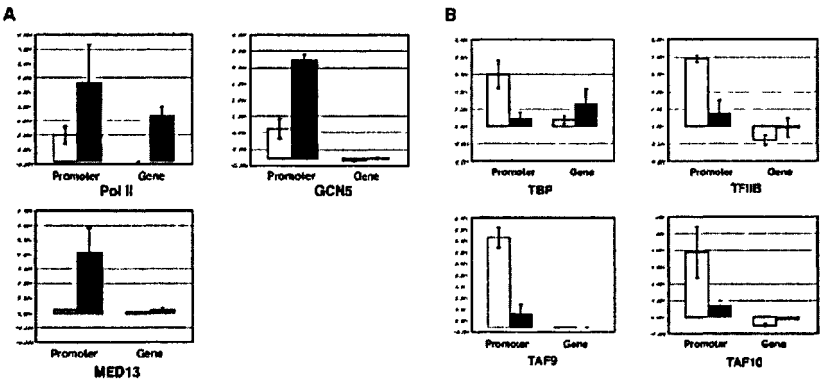


Рис.11 Результаты СЫР для RNAPII, GCN5, MED13, TBP, TAF10, TAF9 и TFIIIB. Белые столбики - клетки S2 до теплового шока, черные - после. По оси Y указано количество ДНК в процентах от Input.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Первая часть данной работы посвящена характеристике двух новых ADA2a и ADA2b белков дрозофилы и характеристике содержащих их комплексов. Показано, что хотя белки гомологичны, их функции, вероятно, различны.

Так, нами впервые было показано существование у *D. melanogaster* HAT-содержащих комплексов, содержащих белки dADA2a и dADA2b. По-видимому, ADA2b присутствует преимущественно в 2-МДа мультитепловом комплексе, который имеет такой же размер и состав как TFTC-комплекс человека и SAGA-комплекс дрожжей. В то время как dADA2a входит в состав мультисубъединичного комплекса размером от 0.4 до 0.8МДа, который может быть гомологом 0.8МДа ADA2 комплекса дрожжей. Т.к. у всех изученных высших эукариот (человека, мыши, кукурузы и др.) тоже существуют 2 гомолога ADA2 белка дрожжей, можно предположить, что у высших эукариот так же, как и у дрожжей, могут существовать GNAT-комплексы, отличные от SAGA.

Различная локализация dADA2a и dADA2b на политепловых хромосомах дрозофилы также указывает на то, что различные dADA2a- и dADA2b-содержащие комплексы обладают различающимися функциями в регуляции экспрессии генов.

ADA2 дрожжей - один из нескольких белков, необходимых для их роста в условиях спиртового стресса. Мы предположили, что dADA2a и dADA2b также вовлечены в стресс-индуцируемую транскрипцию. Однако наши данные не обнаружили их участия в такой транскрипции у дрозофилы, во всяком случае, при стрессе, индуцируемом тепловым воздействием. Мы наблюдали, что оба белка отсутствуют в сайтах 87A и 87B до и присутствуют после теплового воздействия только в пучке 87B. Но, вероятно, этот факт не

связан с активацией транскрипции генов теплового шока, т.к. в дальнейшем при изучении активации трансгенного промотора *hsp70* данных белков после теплового шока обнаружено не было.

В данной работе двумя независимыми методами было показано, что *in vivo* во время активации гена *hsp70* детектируемое количество TBP, шести различных TAF, TFIIB и TFIIF уменьшается, в то время как количество RNAPII, TFIIN, GCN5, TRRAP и MED13 увеличивается. Неожиданному факту отсутствия TBP, TAF, TFIIB и TFIIF на промоторе гена *hsp70* после теплового шока, можно дать несколько объяснений:

- в условиях активации гена недетектируемые факторы присутствуют на промоторе, но принимают такую конформацию, что узнавание их специфическими антителами становится невозможным как на политенных хромосомах, так и в хроматин-иммунопреципитации;
- недетектируемые факторы действительно отсутствуют и не принимают участия в активации генов теплового шока;
- на активно транскрибируемом промоторе факторы присутствуют, но в течение очень короткого времени, что не позволяет детектировать их методами, использованными в работе.

По первому сценарию, при тепловом воздействии TBP, TAF, TFIIB и TFIIF одновременно становятся невидимыми во всех пуфах теплового шока при иммуноокрашивании политенных хромосом и в СЫР. Этот эффект не является следствием теплового шока, поскольку перечисленные факторы наблюдаются в пуфах, образованных под воздействием эндогенного экдизона как до, так и во время теплового воздействия. Кроме того, в эксперименте были использованы поликлональные антитела, предполагающие наличие для них множественных сайтов узнавания, что позволяет в некоторой степени нивелировать влияние изменения конформации белков-мишеней. Таким образом, первый сценарий развития событий маловероятен.

По второму сценарию TBP, белки TAF, TFIIB и TFIIF не принимают участия в активации транскрипции генов теплового шока при тепловой индукции. Первый раунд инициации транскрипции отличается от последующих раундов реинициации. Так, набор факторов, необходимых для реинициации транскрипции может являться лишь частью набора факторов, необходимых для инициации первого раунда транскрипции. Биохимические исследования показали, что TBP, TAF5, TFIIA, TFIIN, TFIIE и Медиатор остаются на промоторе генов после активации транскрипции, в то время как TFIIB и TFIIF покидают его (Hahn, 2004; Yudkovsky et. al., 2000). В нашей работе было обнаружено, что TFIIN (XPB субъединица) и Медиатор (MED13 субъединица), но не TFIIB и TFIIF, остаются на промоторе гена *hsp70* после тепловой индукции, что согласуется с литературными данными. Однако в противоречие полученным ранее данным, мы не обнаружили, присутствие компонентов комплекса TFIID (TBP, TAF1 и несколько других TAF) при тепловом воздействии. Следовательно, если второй сценарий имеет место, то комплекс TFIID является не существенным для реинициации транскрипции на промоторе гена *hsp70* при тепловом воздействии. Исследования, проведенные на дрожжах, показали, что один из комплексов, обладающих НАТ активностью (SAGA), а не TFIID, преимущественно активирует транскрипцию генов ответа на стресс (Huisinga, 2004). Наши данные показывают, что данный механизм может являться универсальным.

По третьему сценарию, средняя плотность основных факторов транскрипции на промоторе гена *hsp70* выше в неактивном состоянии, чем в активном. Эта ситуация возможна, если основные факторы транскрипции находятся в статическом комплексе на неактивном промоторе гена *hsp70* и в динамичном состоянии сборки и разборки PIC на транскрипционно активном *hsp70* промоторе. Таким образом, TBP, TAF, TFIIB и TFIIF при активации *hsp70* могут переходить из статического в динамическое состояние.

Полученные на промоторе *hsp70* результаты являются примером механизма транскрипции, когда при активации транскрипции количество TFIID, TFIIB и TFIIF снижается. Таким образом, присутствие или отсутствие этих факторов на промоторе не всегда отражает транскрипционную активность этого промотора. Открытие и анализ различных механизмов транскрипции является ключевым шагом к пониманию различных стратегий, используемых клеткой для контроля транскрипционной активности.

## ВЫВОДЫ

1. Гомологичные гены *ada2a* и *ada2b* *Drosophila melanogaster* экспрессируются на всех стадиях развития и кодируют белки, которые отличаются по своим функциям и входят в состав GCN5 HAT-содержащего комплекса.
2. Впервые у *D.melanogaster* показано существование нескольких GCN5 HAT-содержащих комплексов, которые отличаются по своему белковому составу и могут участвовать в регуляции экспрессии различных геномных локусов.
3. При воздействии теплового шока общие транскрипционные факторы TFIID, TFIIF и TFIIB не обнаружены на промоторе при реинициации транскрипции.
4. В транскрипции генов теплового шока участвуют общие транскрипционные факторы TFIIN и Медиатор, а так же специфический HAT- комплекс, содержащий белки GCN5, TRRAP, но не содержащий белков TAF и Ada2.





**Список печатных работ, опубликованных по теме диссертации.**

1. S.Muratoglu, S.Georgieva, Gabor Papai, E.Scheer, I.Enunlu, O.Komonyi, I.Cserpan, L.Lebedeva, E.Nabirochkina, A.Udvardy, L.Tora, I.Boros. Two different *Drosophila* ADA2 homologues are present in distinct GCN5 histone acetyltransferase-containing complexes. Mol.Cell.Biol. 2003. V.23, N1, pp. 306-321.
2. Л.А. Лебедева, С.Г. Георгиева, Е.Н. Набирошкина. Исследование свойств двух гомологов ADA2 дрожжей у *Drosophila melanogaster*. Доклады Академии наук. 2004. т. 384, № 4, с.297-299.
3. Lebedeva LA, Nabirochkina EN, Georgieva SG and Tora L. Promoter occupancy of the *hsp70* promoter by GTFs is fundamentally different before and after heat-shock. 6th EMBL Transcription Meeting EMBL Heidelberg, Germany, 2004, August 28-September 1, p. 45.

Типография ордена «Знак почета» издательства МГУ  
117234, Москва, Ленинские горы  
Заказ №235 Тираж 70 экз.



19 МАЙ 2005

393