

УДК 577.218

ХЕЛИКАЗА MLE – НОВЫЙ УЧАСТНИК РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНА *ftz-f1*, КОДИРУЮЩЕГО ЯДЕРНЫЙ РЕЦЕПТОР У ВЫСШИХ ЭУКАРИОТ

© 2021 г. Ю. В. Николенко^{1,*}, М. М. Куршакова¹,
А. Н. Краснов¹, член-корреспондент РАН С. Г. Георгиева¹

Поступило 03.09.2020 г.
После доработки 08.09.2020 г.
Принято к публикации 08.09.2020 г.

Хеликаза MLE является эволюционно-консервативным белком эукариот, участвующим в широком спектре процессов регуляции экспрессии генов. Ранее мы изучали свойства MLE на модели *Drosophila melanogaster*. В настоящей работе продолжено изучение функций MLE и показано, что MLE взаимодействует с компонентами комплекса SWI/SNF, ремоделирующего хроматин. Для понимания работы MLE был проанализирован профиль связывания MLE с регуляторными элементами SWI/SNF-зависимого гена *ftz-f1* и исследовано влияние MLE на экспрессию этого гена, транскрипция которого происходит по механизму “задержки” РНК-полимеразы II. Полученные данные указывают на важную роль MLE в обеспечении своевременной активации и высокого уровня экспрессии гена *ftz-f1 in vivo*.

Ключевые слова: MLE, DHX9, SWI/SNF, *ftz-f1*, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S2686738921010182

Хеликаза MLE (Maleless) *D. melanogaster* и ее ортологи у других организмов, объединяемые под общим названием DHX9, относятся к семейству хеликаз, содержащих консервативный мотив DEH-бок. Как было показано *in vitro*, DHX9 способна связывать и расплетать двуцепочечные ДНК, РНК, а также РНК-ДНК-гибриды и другие сложные структуры, образующиеся в ядре эукариотической клетки в процессах репликации, рекомбинации и транскрипции [1].

Для DHX9 человека показано участие в широком спектре процессов регуляции экспрессии генов. У *D. melanogaster* подробно изучена роль MLE как компонента комплекса дозовой компенсации у самцов [2], однако у других организмов, в частности нематоды и человека, дозовая компенсация достигается по совершенно другим механизмам, в которых DHX9 не участвует.

Хотя у *D. melanogaster* на протяжении длительного времени MLE изучалась почти исключительно как компонент комплекса дозовой компенсации, в ряде исследований были описаны и дополнительные функции MLE, схожие с функ-

циями DHX9 у других организмов. Было показано, что MLE участвует в сплайсинге, в процессинге мРНК, в РНК-интерференции, взаимодействует с комплексом ремоделирования хроматина NURD и регулирует транскрипцию генов гетерохроматина [3–5]. В нашей предыдущей работе было обнаружено взаимодействие MLE с белком ENY2, консервативное у *D. melanogaster* и человека [6, 7]. ENY2 – консервативный ядерный белок, который физически взаимодействует с рядом мультибелковых комплексов, вовлеченных в регуляцию экспрессии генов, в том числе, с ремоделирующим хроматин комплексом SWI/SNF [8].

В настоящей работе было продолжено изучение функций MLE. Были исследованы взаимодействие MLE с комплексом SWI/SNF и участие MLE в SWI/SNF-зависимой транскрипции. Мы провели реакцию иммунопреципитации белков из ядерного эмбрионального экстракта и ядерного экстракта из клеток линии Schneider2 (S2) и обнаружили, что антитела к MLE эффективно копреципитируют субъединицы комплекса SWI/SNF, включая каталитическую субъединицу Brahma (рис. 1a). Таким образом, было показано, что MLE физически взаимодействует с компонентами комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF.

Затем был исследован вопрос об участии MLE в SWI/SNF-зависимой регуляции экспрессии генов. Ранее были подробно исследованы регуля-

¹ Федеральное государственное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук,
Москва, Россия

*e-mail: julia.v.nikolenko@gmail.com

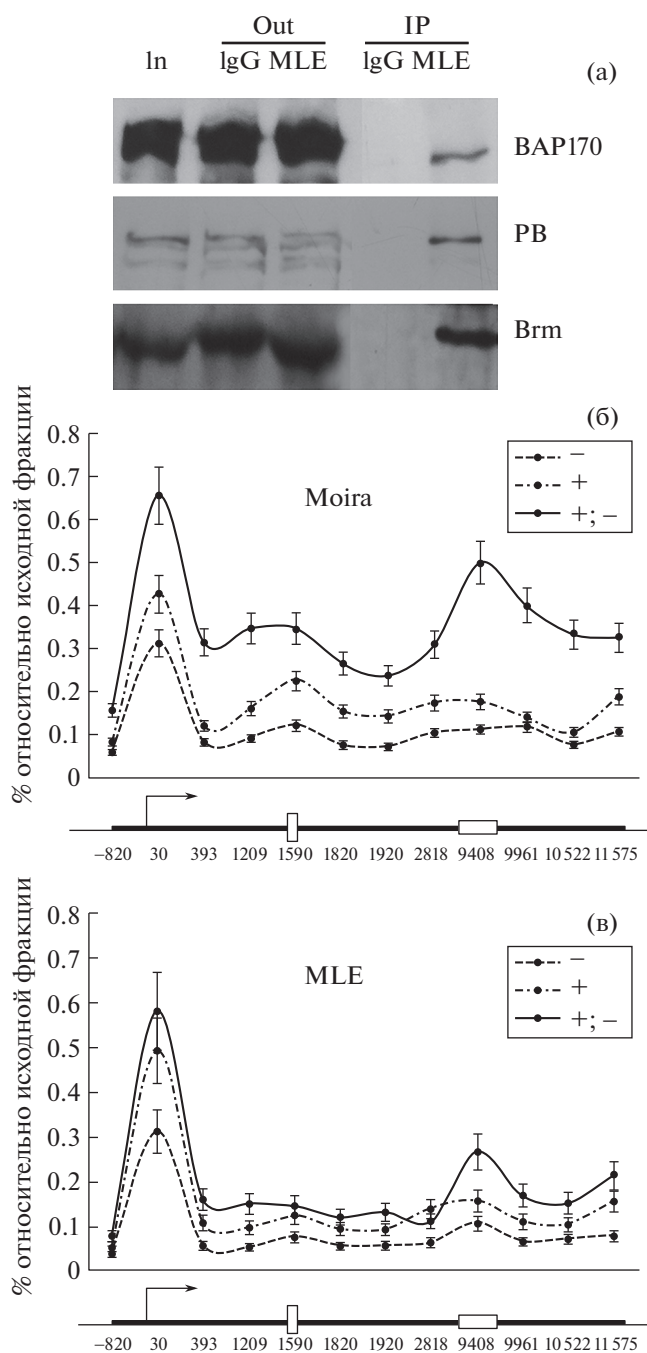


Рис. 1. Коиммунопреципитация MLE и компонентов комплекса SWI/SNF (а) и профили связывания SWI/SNF и MLE с промотор-проксимальной областью гена *ftz-f1* (б и в соответственно). IP – иммунопреципитация, In – исходная фракция эмбрионального ядерного экстракта, Out – фракция эмбрионального ядерного экстракта после инкубации с антителами, IgG – преиммунная сыворотка, которая служит контролем иммунопреципитации. PB (Polybromo), Brm (Brahma), VAP170, Moira – субъединицы комплекса SWI/SNF. По горизонтальной оси отмечено расстояние относительно старта транскрипции гена *ftz-f1*, п.н. Стрелкой обозначен старт транскрипции гена, вертикальным прямоугольником – район “задержки” РНК-полимеразы II, горизонтальным прямоугольником – энхансер.

ция транскрипции гена экдизонового каскада *ftz-f1* и регуляторные области в промотор-проксимальной части этого гена. Ген *ftz-f1* кодирует ядерный рецептор, консервативный у высших эукариот. Активация транскрипции гена *ftz-f1* у *D. melanogaster* происходит по механизму “задержки” РНК-полимеразы II и включает так называемую “подготовительную” стадию, адекватное протекание которой обеспечивает высокий уровень транскрипции на последующей стадии активной транскрипции [9,10]. Кроме того, на уровень транскрипции гена *ftz-f1* оказывает влияние энхансер, расположенный в дистальной части первого интрона [11]. В этих процессах играет важную роль комплекс SWI/SNF, пики связывания которого находятся на ключевых регуляторных сайтах – промоторе, сайте “задержки” РНК-полимеразы II и интронном энхансере [9,12].

В настоящей работе для изучения роли MLE в регуляции экспрессии гена *ftz-f1* была использована ранее разработанная модельная система [9], позволяющая активировать экдизоновый каскад в клетках S2 и детально исследовать ген *ftz-f1* на разных стадиях его активации. В отсутствие экдизона в культуральной среде ген *ftz-f1* был практически не активен (стадия “-”). После добавления экдизона и последующей инкубации в течение ночи ген находился на подготовительной стадии (стадия “+”). На этой стадии РНК-полимераза II начинает осуществлять транскрипцию, но останавливается на расстоянии ~1.5 т.п.н. от промотора. После отмывки клеток и инкубации в течение 3 часов в среде без экдизона ген *ftz-f1* вступал в стадию активной транскрипции (стадия “+; -”).

Методом иммунопреципитации хроматина (ChIP) было исследовано связывание MLE с промотор-проксимальной областью гена *ftz-f1* на всех стадиях его транскрипции (рис. 1в). Оказалось, что профиль связывания MLE очень похож на профиль связывания комплекса SWI/SNF [9,12]; для наглядности на рис. 1б представлен профиль связывания Moira – одной из коровых субъединиц комплекса SWI/SNF. MLE, также как SWI/SNF, сильнее всего связан с промотором и энхансером гена, и его связывание усиливается в процессе активации транскрипции.

Следующий вопрос, который мы исследовали – оказывает ли MLE влияние на уровень транскрипции гена *ftz-f1* в данной модельной системе. Для решения этого вопроса был сделан нокдаун MLE методом РНК-интерференции. Результаты эксперимента представлены на рис. 2а. Для измерения уровня транскрипции мы использовали метод ОТ-ПЦР в реальном времени и праймеры, расположенные на расстоянии 1900 п.н. от промотора, т.е. “ниже” сайта “задержки” РНК-полимеразы II, чтобы детектировать только полно-размерные транскрипты. На первых двух стадиях

в модельной системе на фоне снижения содержания MLE уровень транскрипции гена *ftz-f1* повышался. Наиболее заметно (в 3 раза) — на подготовительной стадии транскрипции, для которой ранее было показано особо значимое влияние комплекса SWI/SNF [9, 12].

Нарушение связывания комплекса SWI/SNF с регуляторными последовательностями гена *ftz-f1* *in vivo* приводит к тому, что в процессе метаморфоза *ftz-f1* начинает экспрессироваться преждевременно, но его транскрипция остается на низком уровне [9]. Мы исследовали влияние мутации в гене *mle* на транскрипцию гена *ftz-f1* в начале метаморфоза. Чтобы исключить влияние комплекса дозовой компенсации, в эксперименте были использованы только личинки и предкуколки женского пола. Были отобраны самки с генотипом *mle* [9]/*mle* [9] (мутация, приводящая к потере функции белка) и самки дикого типа трех возрастных категорий в начале метаморфоза. Чтобы точно определить возраст личинок поздней третьей стадии, использовали метод, основанный на том, что перед началом метаморфоза личинки перестают питаться, и их пищеварительная система освобождается от съеденного ранее корма [13]. Личинок культивировали в стандартных условиях при температуре 25°C с добавлением в корм 0.05% бромфенолового синего. На пятый день развития визуально оценивали наличие синего красителя в пищеварительной системе личинок. Питающиеся личинки были отобраны, как имеющие возраст >8 ч до формирования предкуколки (ДФП), возраст личинок без бромфенолового синего в пищеварительной системе был определен как 2–6 ч ДФП. Третья группа особей — белые предкуколки в течение первого часа после формирования — 0 ч. Результаты представлены на рис. 2б. Как и в предыдущем эксперименте, мы детектировали только полноразмерные транскрипты гена *ftz-f1*. За 8 ч ДФП ген *ftz-f1* транскрибируется на одинаково низком уровне как в мутантах *mle* [9], так и в контрольных личинках. За 6–2 ч ДФП уровень транскрипции возрастает в 3 раза в личинках дикого типа, и в 2 раза в личинках *mle* [9]. Наконец, сразу после формирования предкуколки уровень транскрипции быстро возрастает в норме и наоборот несколько снижается в мутантах.

Итак, в настоящей работе было показано, что MLE совместно с комплексом SWI/SNF связывается с регуляторными элементами гена *ftz-f1* и влияет на его транскрипцию в модельной системе и *in vivo*. Мы полагаем, что MLE в процессе экспрессии данного гена выполняет функцию расплетания сложных структур, которые образуются в процессе транскрипции по механизму “задержки” РНК-полимеразы II, а также при формировании петли между промотором и энхансером и одновременном прохождении транскрипции.

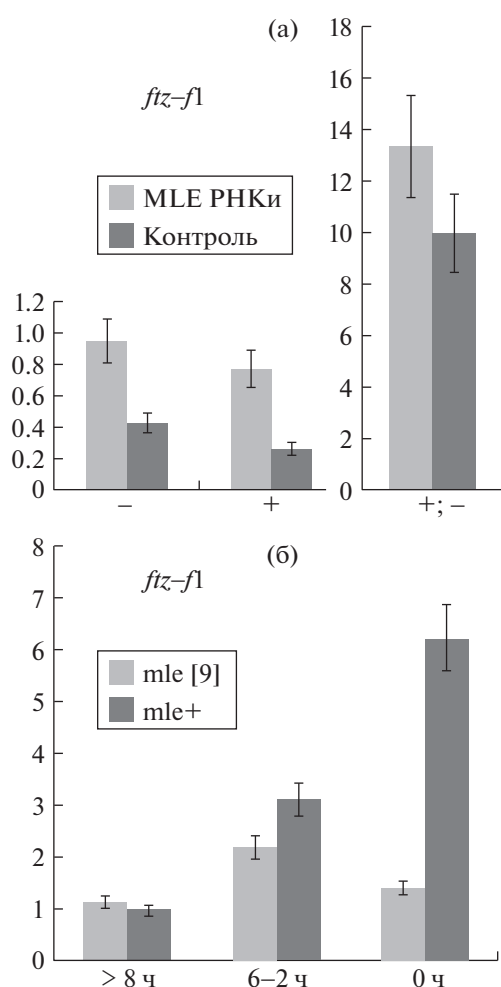


Рис. 2. Изменение уровня транскрипции гена *ftz-f1* на фоне РНК-интерференции MLE в модельной системе в клетках S2 (а) и на фоне мутации *mle* [9] *in vivo* в личинках и предкуколках женского пола (б). Все эксперименты были проведены в трех биологических повторностях. Уровень транскрипции гена *ftz-f1* был измерен относительно уровня транскрипции контрольного гена *ras*.

ДНХ9 человека является потенциальной мишенью для терапии, поскольку она вовлечена в репликацию и транскрипцию ряда РНК-содержащих вирусов, и в то же время в иммунный ответ организма на вирусную инфекцию и в злокачественную трансформацию [1, 14, 15]. Конкретная роль и механизмы работы ДНХ9 в перечисленных процессах требуют дальнейшего изучения. Поэтому мы считаем важным изучение “универсальных”, потенциально консервативных в эволюции функций MLE вне комплекса дозовой компенсации. Данная работа вносит вклад в эту область знаний.

БЛАГОДАРНОСТИ

Эксперименты ПЦР в реальном времени были выполнены на приборе ЦКП ИБГ РАН. Авторы благо-

дарны Н.Е. Воробьевой за предоставленные антитела к субъединицам комплекса SWI/SNF.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была поддержана грантом Российского фонда фундаментальных исследований 18–04–01019.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee T., Pelletier J. // *Oncotarget*. 2016. V. 7 (27). P. 42716–42739.
2. Morra R., Yokoyama R., Ling H., et al. // *Epigenet. Chromatin*. 2011. V. 4 (6).
3. Reenan R.A., Hanrahan C.J., Ganetzky B. // *Neuron*. 2000. V. 25. P. 139–149.
4. Cugusi S., Kallappagoudar S., Ling H., et al. // *Mol Cell Proteomics*. 2015. V. 14. № 6. P. 1478–1488.
5. Cugusi S., Li Y., Jin P., et al. // *PLoS Genet*. 2016. V. 12 (1).
6. Nikolenko J.V., Kurshakova M.M., Krasnov A.N. // *Dokl. Biochem. Biophys*. 2019. V. 489. P. 407–410.
7. Kopytova D.V., Krasnov A.N., Orlova A.V., et al. // *Cell Cycle*. 2010. V. 9. № 3. P. 479–481.
8. Gurskii D.Ia., Orlova A.V., Kopytova D.V., et al. // *Genetika*. 2010. V. 46 (12) P. 1700–1703.
9. Vorobyeva N., Nikolenko J., Nabirochkina E., et al. // *Nucl. Acids Res*. 2012. V. 40. P. 7319–7331.
10. Vorob'eva N.E. // *Tsitologiya*. 2013. V. 55. № 3. P. 153–158.
11. Nikolenko J.V., Krasnov A.N., Mazina M.Y. et al. // *Dokl. Biochem. Biophys*. 2017. V. 474. № 1. P. 236–238.
12. Nikolenko J.V., Krasnov A.N., Vorobyeva N.E. // *Russian Journal of Genetics*. 2019. V. 55. № 2. P. 163–171.
13. Andres A.J., Thummel C.S. // *Methods Cell Biol*. 1994. V. 44. P. 565–73.
14. Boeras I., Song Z., Moran A., et al. // *J. Mol. Biol*. 2016. V. 428. № 11. P. 2418–2429.
15. Fidaleo M., De Paola E., Paronetto M.P. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 19. P. 28711–28723.

MLE HELICASE IS A NEW PARTICIPANT IN THE TRANSCRIPTION REGULATION OF THE *ftz-f1* GENE ENCODING A NUCLEAR RECEPTOR IN HIGHER EUKARYOTES

J. V. Nikolenko^{a,#}, M. M. Kurshakova^a, A. N. Krasnov^a,
and Corresponding Member of the RAS S. G. Georgieva^a

^a Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: julia.v.nikolenko@gmail.com

MLE helicase is an evolutionarily conserved eukaryotic protein involved in a wide range of processes in the regulation of gene expression. Previously, we studied the properties of MLE on the *Drosophila melanogaster* model. In the present work we continue studying the functions of MLE and show that MLE interacts with the components of the SWI/SNF chromatin remodelling complex. To clarify the work of MLE, the profile of MLE binding to the regulatory elements of the SWI/SNF-dependent *ftz-f1* gene was analyzed. The effect of MLE on the expression of this gene, the transcription of which occurs by the RNA polymerase II pausing mechanism, was investigated. The data obtained indicate the important role of MLE in ensuring timely activation and high level of expression of the *ftz-f1* gene *in vivo*.

Keywords: MLE, DHX9, SWI/SNF, *ftz-f1*, gene expression