

УДК 577.218

ХЕЛИКАЗА MLE (DHX9) РЕГУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ КОНСТИТУТИВНОЙ И ИНДУЦИБЕЛЬНОЙ ИЗОФОРМ КОНСЕРВАТИВНОГО ЯДЕРНОГО РЕЦЕПТОРА FTZ-F1 (NR5A3)

© 2025 г. Ю. В. Николенко*, С. Г. Георгиева

Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
Москва, 119991 Россия

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

Поступила в редакцию 01.09.2024 г.

После доработки 03.10.2024 г.

Принята к публикации 16.10.2024 г.

Хеликаза MLE *Drosophila melanogaster* участвует не только в дозовой компенсации, но и выполняет множество функций в регуляции экспрессии генов, как и ее ортолог DHX9 человека. Многие функции MLE консервативны в эволюции и при этом не изучены. MLE, как показано ранее, участвует в регуляции индуцибельной транскрипции гена *ftz-f1*, кодирующего эволюционно-консервативный ядерный рецептор NR5A3. Ген *ftz-f1* кодирует также и конститутивный транскрипт, синтез которого начинается с альтернативного промотора. В настоящей работе изучали роль MLE в регуляции конститутивной транскрипции гена *ftz-f1*. Показано, что в культуре клеток S2 MLE связывается с конститутивным промотором и контролирует как индуцибельную, так и конститутивную транскрипцию этого гена. Обнаружен новый цис-регуляторный элемент гена *ftz-f1* – энхансер 663, с которым связывается MLE. Методом фиксации конформации хромосом показано, что в культуре клеток S2 энхансер 663 взаимодействует с конститутивным и индуцибельным промоторами гена *ftz-f1*. Изучение активности энхансера 663 по уровню ацетилирования гистона H3 показало, что он вовлечен в работу обоих промоторов. Нокдаун MLE в культуре клеток S2 вызывает усиление конститутивной транскрипции. Впервые показано влияние *in vivo* MLE *D. melanogaster* на транскрипцию вне дозовой компенсации на стадии имаго. Показано, что на стадии имаго MLE связывается с обоими промоторами и с энхансером 663. Мутация в гене *mle* приводит к усилению экспрессии обоих транскриптов гена *ftz-f1* у самок. Полученные данные важны для понимания и дальнейшего изучения эволюционно-консервативных механизмов работы хеликазы MLE *D. melanogaster* и ее ортолога DHX9 у человека.

Ключевые слова: MLE, DHX9, FTZ-F1, NR5A, *D. melanogaster*, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S0026898425020089, **EDN:** GFZUGJ

ВВЕДЕНИЕ

MLE/DHX9 – это консервативный в эволюции мультидоменный белок, принадлежащий к семейству DEhH-хеликаз [1]. MLE *Drosophila melanogaster* и DHX9 млекопитающих и человека способны не только связывать и расплетать дцДНК, дцРНК и ДНК-РНК-гибриды, но и вступать в разнообразные белок-белковые взаимодействия. Благодаря этому, в клетках человека хеликаза DHX9 участвует в широком спектре процессов, связанных с регуляцией экспрессии генов [2]. Нарушения экспрессии DHX9 лежат в основе или участвуют в прогрессии ряда социально-значимых заболеваний – аутоиммунных и онкологических, вирусных инфекций, нейропатий и др. [2–4]. Механизмы работы DHX9 во многих процессах консервативны в эволюции

и при этом не полностью изучены. Изучение функций ортолога этой хеликазы у модельных организмов имеет не только фундаментальное, но и прикладное значение. MLE *D. melanogaster* продолжительное время изучали как компонент комплекса дозовой компенсации, которая у дрозофилы и млекопитающих обеспечивается разными механизмами. Однако за последние годы опубликован ряд исследований, посвященных участию MLE в регуляции генов вне дозовой компенсации [5–9].

Ранее нами было обнаружено влияние MLE на индуцибельную транскрипцию гена *ftz-f1* [9]. Ген *ftz-f1* кодирует орфанный ядерный рецептор, входящий в консервативное в эволюции семейство NR5A. Ортологи этого белка у человека, NR5A1 (SF-1) и NR5A2 (LRH-1), – ор-

фаные ядерные рецепторы, которые регулируют эндокринную функцию взрослого организма [10, 11]. У *D. melanogaster* Ftz-f1 (NR5A3) впервые идентифицировали как фактор транскрипции, связывающийся с промотором гена парной сегментации *fushi tarazu* (*ftz*) в раннем эмбриогенезе [12]. Впоследствии обнаружили, что ген *ftz-f1* кодирует две альтернативные мРНК, *ftz-f1-B* и *ftz-f1-C* [13], и, соответственно, две изоформы белка: Ftz-f1-B (она же α Ftz-f1, 108 кДа,) и Ftz-f1-C (она же β Ftz-f1, 86 кДа). Обе изоформы содержат ДНК-связывающий (DBD) и лиганд-связывающий (LBD) домены, характерные для ядерных рецепторов, и отличаются уникальными N-концевыми последовательностями [14, 15]. Ftz-f1-B экспрессируется на высоком уровне во время раннего эмбриогенеза и на стадии имаго в центральной нервной системе (ЦНС) и яичниках [10, 16]. В то же время, Ftz-f1-C действует как фактор компетентности для перехода на следующие стадии развития. Он транзиторно экспрессируется после каждого повышения титра экдизона в позднем эмбрионе, личинке и куколке и необходим для позднего эмбриогенеза, линьки личинок, метаморфоза и развития куколки [14, 17, 18]. Кроме того, Ftz-f1-C точно контролирует время импульсов экдизона через регуляцию ферментов синтеза экдистероидов [19, 20]. С целью подробного изучения процесса активации транскрипции *ftz-f1-C* ранее была разработана модельная экспериментальная система, позволяющая активировать его транскрипцию в культуре клеток Schneider-2 *D. melanogaster* (S2). Для активации транскрипции в культуральную среду добавляли 20-гидроксиэкдизон (далее экдизон), а после инкубации удаляли экдизон из среды. Транскрипция *ftz-f1-C* происходит по механизму паузы РНК-полимеразы II [13].

MLE, как показано нами ранее, связывается с промотором индуцибельного транскрипта и с интронным экдизонзависимым энхансером и участвует в регуляции уровня экспрессии индуцибельного транскрипта *ftz-f1-C* [9]. Влияние MLE на индуцибельную транскрипцию установлено и другими авторами [5, 7]. Поскольку MLE экспрессируется на протяжении всего онтогенеза у *D. melanogaster*, возникло предположение об участии MLE в регуляции конститутивной транскрипции. В настоящей работе показано, что MLE участвует в регуляции экспрессии конститутивного транскрипта *ftz-f1-B* в клетках S2 и у самок на стадии имаго *in vivo*. Охарактеризован новый энхансер гена *ftz-f1*, взаимодействующий и с конститутивным, и с индуцибельным промоторами. Методом иммунопреципитации хроматина показано, что MLE образует пики связывания на этом энхансере и на конститутивном промоторе. Та-

ким образом, на примере гена *ftz-f1* в настоящей работе показано, что MLE может участвовать и в конститутивной, и в индуцибельной транскрипции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Линии *Drosophila melanogaster*. В работе использовали линию *D. melanogaster* из коллекции центра Bloomington Drosophila Stock Center (<http://flystocks.bio.indiana.edu/>) #5873 с генотипом *mle[9]cn[1]bw[1]/CyO*. В качестве контроля с геном *mle* дикого типа использовали линию *cn[1]bw[1]*. В эксперименте использовали виргинных самок в возрасте 5 суток.

Культивирование клеток линии Schneider-2 (S2). Клетки S2 культивировали при 25°C в среде Schneider's insect medium ("Sigma", США), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота ("HyClone", США).

Антитела. В работе использовали поликлональные антитела к белку MLE *D. melanogaster*, полученные ранее в нашей лаборатории [8], к тотальному гистону H3 (Ab1791, "Abcam", Великобритания), модифицированному гистону H3: H3AcK27 (Active Motif, Catalog No: 39133) и H3me1K4 (Ab8895, "Abcam").

Модельная система для индукции экспрессии *ftz-f1-C* в клетках линии S2. Экспрессию индуцировали согласно [13]. Транскрипцию *ftz-f1-C* активировали, добавляя в культуральную среду 20-гидроксиэкдизон (далее экдизон) до конечной концентрации 0.3 мкМ и инкубировали в течение 16 ч, затем клетки отмывали 3 раза средой, не содержащей экдизон, и инкубировали в среде без экдизона в течение 3 ч. Аликвоты клеток, отобранные на разных стадиях индукции, использовали далее для проведения процедур иммунопреципитации хроматина, выделения РНК и фиксации конформации хромосом.

Нокдаун MLE в клетках линии S2. Нокдаун MLE проводили с помощью РНК-интерференции согласно протоколу [21]. В эксперименте использовали 15 мкг дцРНК на 1×10^6 клеток. дцРНК синтезировали с помощью TranscriptAid T7 HighYield TranscriptionKit ("ThermoScientific", США). Для повышения эффективности РНК-интерференции, как и в [9], использовали одновременно две дцРНК, соответствующие районам, кодирующим разные части белка. Таким образом было достигнуто снижение экспрессии MLE в ~5 раз. дцРНК, соответствующую фрагменту гена *GFP*, использовали в качестве отрицательного контроля. дцРНК синтезировали с использованием следующих праймеров:

mle – 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГА-
GACCACTTTATTGAAAATCTAAGAATGGAT-3'
и 5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГAGACCACC
TCGCTTCTGCTGTCCACTGCC-3' (5'-область
гена);

5'-ТААТАСГАСТСАСТАТАГГГAGACCACA
TTCCTGATTCACGCTGCAGTC-3' и 5'-ТААТАС
GACTCACTАТАГГГAGACCACGTAGACGAAA
GGATTGATGGG-3' (3'-область гена).

GFP – 5'-CGACTCACTАТАГГГAGACGTA
AACGGCCACAAGTTCAGC-3' и 5'-CGACTCA
CTATAGGGAGAGATGCCGTTCTTCTGCTTG
TCG-3'.

Уровень экспрессии генов *ftz-fl*, *mle* и *ras64B*
(в качестве контроля) измеряли методом обрат-
ной транскрипции с последующей ПЦР в реаль-
ном времени.

**Праймеры, использованные для изме-
рения уровня экспрессии генов.** *ftz-fl-B* –
5'-CCGCCAGCATTTGATCCTTG TG-3'
и 5'-ACCACCTGCAACATCAGCATCA-3'; *ftz-
fl-C* – 5'-ACAACAACAATAACAACGACAATGA
TGC-3' и 5'-CTGATTGCCGCTGCCACTCC-3';
mle – 5'-CGACAACCSTTCCGACATACTTC-3'
и 5'-TCCTCCGCCGTCACTGAAC-3'; *ras64B* –
5'-GAGGGATTCTCTCGTCTTCG-3'
и 5'-GTCGCACTTGTTACCCACCATC-3'.

Иммунопреципитация хроматина (ChIP). В од-
ной реакции иммунопреципитации использо-
вали хроматин, выделенный из 3×10^6 клеток S2
или из 30 виргинных самок дрозофилы. “Сшив-
ку” проводили, добавляя в реакционную среду
формальдегид до концентрации 0.5% и инку-
бируя в течение 10 мин при комнатной темпе-
ратуре. Реакцию останавливали добавлением
2.5 М глицина до концентрации 0.125 М (1/20
от общего объема). После отмывки тремя объ-
емами холодного раствора $1 \times$ PBS, хроматин
ресуспендировали в SDS-содержащем буфе-
ре (50 мМ HEPES КОН pH 7.9, 140 мМ NaCl,
1 мМ EDTA, 1% Тритона X-100, 0.1% дезокси-
холата Na, 0.1% SDS, $1 \times$ PIC (protease inhibi-
tors cocktail (“Roche”, Швейцария)) и дробили
до фрагментов размером ~500 п.н. с помощью
ультразвука. Обработанный ультразвуком хро-
матин центрифугировали дважды при 16000 g
в течение 20 мин, а затем использовали супер-
натант в экспериментах по иммунопреципита-
ции. В один эксперимент брали около 10 мкг
антител (в качестве отрицательного контроля
использовали предиммунную сыворотку) и 15 мкл
протеин-A-сефарозы MabSelect SuRe (“Sigma”).
В реакцию добавляли также ДНК
спермы лосося и бычий сывороточный альбу-
мин до конечной концентрации 1 мг/мл. Осаж-
денный хроматин последовательно отмывали

1) SDS-содержащим буфером, 2) этим же бу-
фером с 0.5 М NaCl, 3) LiCl-содержащим бу-
фером (20 мМ Трис-НСl pH 8.0, 1 мМ EDTA,
250 мМ LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% дезоксихолата
Na) и 4) буфером TE (20 мМ Трис-НСl pH 8.0,
1 мМ EDTA). Комплексы хроматина инкубиро-
вали в буфере для элюции (50 мМ Трис-НСl pH
8.0, 1 мМ EDTA, 1% SDS) в течение 30 мин при
комнатной температуре. В раствор добавляли
5 М NaCl (16 мкл на 500 мкл раствора) и инку-
бировали при 65°C в течение 16 ч в термошейке-
ре для “расшивки” хроматина. Затем хроматин
обрабатывали протеазой (3 мкл протеиназы К,
5 мкл 0.5 М EDTA на 500 мкл раствора) в те-
чение 4 ч при 55°C в термошейкере. ДНК экс-
трагировали смесью фенол-хлороформ и осаж-
дали изопропанолом. Преципитат растворяли
в буфере TE. Выделенную ДНК анализировали
с помощью количественной ПЦР. Результаты
иммунопреципитации оценивали по соотноше-
нию (%) осажденной/исходной фракции. Каж-
дое измерение выполняли как минимум в трех
повторах и вычисляли среднее значение.

**Праймеры, использованные в анализе свя-
зывания MLE с хроматином.** Промотор В –
5'-CCGTCCTTGTTCTTCAAACGA-3' и 5'-AG-
CGAAATTAGGTTCGAACTCGAAC-3'; промотор
С – 5'-GCTTTGTCATCTATGTGTGTGTTGTTG-3'
и 5'-GAGGCAGAGGCAGCGACG-3'; энхансер
663 – 5'-TTTCGTCTCGTTCGTCCTTCC-3'
и 5'-AAGCCAAAGCCTGACTGGGAG-3', точка
“+1600” – 5'-CTGATTGCCGCTGCCACTCC-3'
и 5'-ACAACAACAATAACAACGACAATGAT-
GC-3'.

Фиксация конформации хромосом (3С). Фик-
сацию конформации хромосом клеток линии
S2 проводили по протоколу, описанному ранее
[22]. Метод основан на фиксации ДНК-белко-
вых комплексов формальдегидом *in vivo* с по-
следующим расщеплением ДНК эндонуклеа-
зой рестрикции и религирированием полученных
фрагментов при низкой концентрации ДНК.
В качестве “якорных” районов использовали
области конститутивного и индуцибельного
промоторов гена *ftz-fl*. В работе использовали
эндонуклеазу рестрикции DpnII (“NEB”, США).
Контрольная библиотека, содержащая эквимо-
лярное количество всех продуктов лигирования,
получена на основе геномной ДНК клеток S2.
Относительную частоту лигирования фрагмен-
тов ДНК определяли методом ПЦР в реальном
времени с использованием TaqMan-зонда. Для
учета эффективности ПЦР с разными парами
праймеров ПЦР-сигналы нормировали на сиг-
налы, полученные для контрольной библиотеки.
Эксперимент проводили в трех независимых
биологических повторах.

Праймеры, использованные в 3С-анализе гена *ftz-f1*. Промотор В – 5'-CGTGTTCCTGAAATAT-GCTGAAAGAG-3' (“якорный праймер”),

5'-[FAM]CATCTCTCGGCG[BHQ1-dT]CTC-GTTCTCT-PO₄-3' (TaqMan-зонд).

Промотор С – 5'-CATAGATGACAAAGCGT-TACACC-3' (“якорный праймер”),

5'- [FAM]CGATATT[BHQ1-dT]GGGTCACT-CACACGC-PO₄-3' (TaqMan-зонд).

“1” – 5'-GTTCCGTGGGCAATGGCAG-3',

“2” – 5'-TTCATTATATGTAGTGATTTTCAT-ACSTTC-3',

“3” – 5'-GAAGTACCTACTCATTTGATTGT-TAGTC-3',

“4” – 5'-TTCTTTGCTGCTGTCGTGTG-3',

“5” – 5'-CTGAAAGTGAAGAAATGTC-GCTAGG-3',

“6” – 5'-CAATGCTTGTGTTTCGTATTTCG-3',

“7” – 5'-AACATCTTACCGGAAATCCAT-GC-3'.

Статистический анализ. Все данные представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (планки погрешностей) по крайней мере по трем независимым экспериментам. Сравнение экспериментальных групп проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента. Звездочки указывают на статистическую значимость данных: **p* < 0.05 или ***p* < 0.01.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

MLE участвует в регуляции экспрессии конститутивного транскрипта гена *ftz-f1-B* в клетках линии S2

Ген *ftz-f1*, расположенный на хромосоме 3L, содержит протяженные интроны и состоит более чем из 52 т.п.н. Промоторы конститутивного и индуцибельного транскриптов находятся на расстоянии 35 т.п.н. друг от друга (рис. 1а). В середине третьего интрона гена, согласно данным, полученным в результате полногеномного скри-

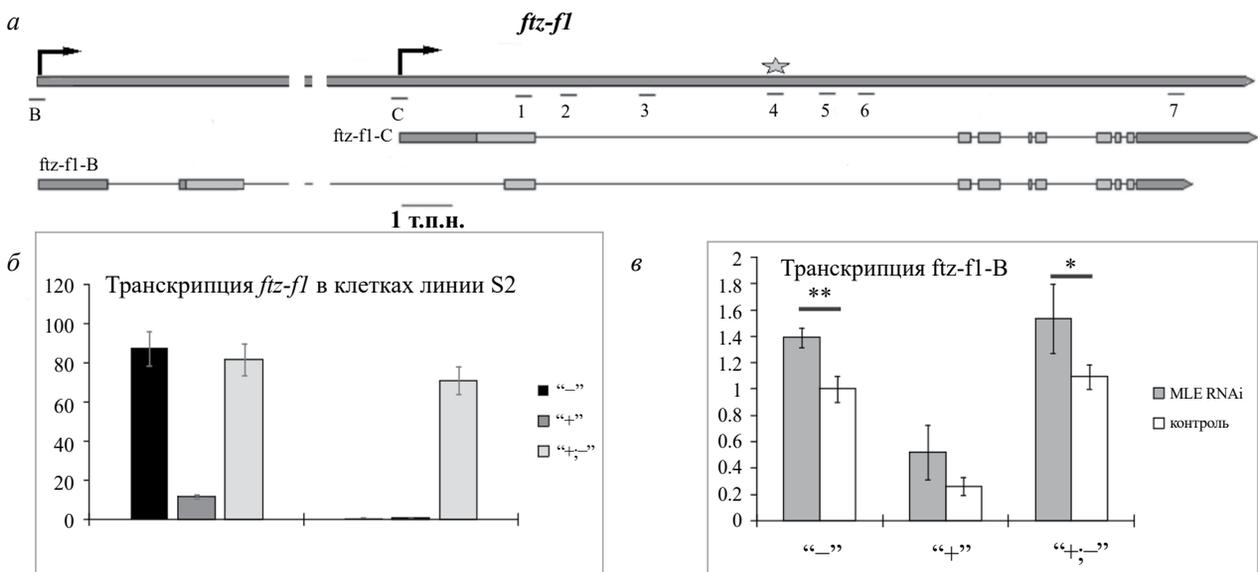


Рис. 1. Строение гена *ftz-f1* и его экспрессия в клетках линии S2 *D. melanogaster*. *а* – Схематическое изображение гена *ftz-f1* и его транскриптов: конститутивного *ftz-f1-B* и индуцибельного *ftz-f1-C*. Экзоны обозначены серыми прямоугольниками, кодирующая область выделена более светлым цветом, стрелками обозначены сайты старта транскрипции, звездочкой показано положение энхансера в третьем интроне. Черные отрезки (1–7) указывают положение праймеров, В и С – “якорных” праймеров, использованных для 3С-анализа пространственной структуры гена. *б* – Изменения уровня экспрессии конститутивного и индуцибельного транскриптов гена *ftz-f1* в модельной системе в клетках S2 *D. melanogaster*. Здесь и далее: “-” – в среде без добавления экдизона, “+” – после инкубации в среде с 0.3 мкМ экдизона в течение 16 ч, “+,-” – после отмывки и последующей инкубации в среде без экдизона в течение 3 ч. Здесь и далее: уровень экспрессии гена *ftz-f1* нормировали на уровень экспрессии контрольного гена *ras64B*. Уровень экспрессии представлен в относительных единицах, за 1 принят уровень *ftz-f1-C* на стадии “-”. *в* – Изменения уровня экспрессии конститутивного транскрипта *ftz-f1-B* в модельной системе в клетках S2 на фоне нокдауна MLE методом РНК-интерференции. Уровень экспрессии представлен в относительных единицах, за 1 принят уровень *ftz-f1-B* в контроле на стадии “-”.

нинга методом STARR-seq, расположен энхансер, конститутивно активный в клетках линии Schneider-2 (S2) [23].

На первом этапе мы исследовали экспрессию конститутивного транскрипта *ftz-f1-B* в модельной системе, ранее разработанной для изучения активации индуцибельной транскрипции гена *ftz-f1* в клетках линии S2. В этой модельной системе при культивировании в стандартных условиях в среде без экдизона (“–”), индуцибельный транскрипт *ftz-f1-C* практически не экспрессируется. После инкубации в среде с экдизоном (“+”) РНК-полимераза II синтезирует начало транскрипта *ftz-f1-C* и задерживается в состоянии паузы на расстоянии ~1.5 т.п.н. от сайта старта транскрипции, дальнейшей элонгации транскрипции не происходит. После удаления экдизона из среды и культивирования клеток в течение 3 ч (“+; –”) начинается стадия активной элонгации индуцибельного транскрипта [13]. Адекватность работы данной модельной системы в клетках S2, культивируемых в нашей лаборатории, мы подтвердили, измерив уровень экспрессии индуцибельного транскрипта *ftz-f1-C* методом ОТ-кПЦР при помощи праймеров, расположенных в теле гена “ниже” сайта паузы РНК-полимеразы II. В согласии с опубликованными данными [13], транскрипция *ftz-f1-C* детектируется на очень низком уровне на первых двух стадиях и резко возрастает на стадии активной элонгации. В то же время конститутивный транскрипт *ftz-f1-B* экспрессируется на высоком уровне, сопоставимом с уровнем экспрессии гена домашнего хозяйства *ras64B*, в стандартных условиях в среде без экдизона (“–”). На фоне высокого титра экдизона (“+”) его экспрессия снижается, а после удаления экдизона из среды (“+; –”) восстанавливается до исходного уровня (рис. 1б).

Затем мы исследовали влияние нокдауна MLE на транскрипцию *ftz-f1-B* (рис. 1в). С использованием метода РНК-интерференции экспрессию MLE снизили в ~5 раз (данные не представлены). На обеих стадиях с высоким уровнем *ftz-f1-B* в среде без экдизона (“–” и “+; –”) на фоне нокдауна MLE уровень *ftz-f1-B* возрастал по сравнению с контролем. Этот результат подтвердил наше предположение, что хеликаза MLE участвует в регуляции конститутивной транскрипции гена *ftz-f1* в клетках линии S2. Нокдаун MLE, как показано нами ранее, также приводит к повышению уровня экспрессии индуцибельного транскрипта *ftz-f1-C* на стадиях, предшествующих его активной элонгации (“–” и “+”) [9].

MLE связывается с конститутивным промотором и с новым энхансером гена ftz-f1

Ранее методом ChIPseq было показано, что MLE связывается с регуляторными районами – промоторами и энхансерами – многих генов *D. melanogaster* [7]. Изучение влияния MLE на экспрессию *ftz-f1-C* показало, что MLE связывается с хроматином его цис-регуляторных элементов: образует главный пик на промоторе С, а также присутствует в сайте, проявляющем свойства экдизонзависимого энхансера [9]. Поскольку мы показали, что MLE участвует в регуляции экспрессии *ftz-f1-B*, предположили, что MLE также образует пик на конститутивном промоторе В. В полногеномных скринингах последовательностей, обладающих свойствами энхансеров, проведенных методом STARR-seq в 2013–2014 гг. [23, 24], а затем в 2022 г. [25], перекрывающиеся фрагменты ДНК общей длиной ~500 п.н., расположенные в средней части третьего интрона гена *ftz-f1*, выявлены, как элементы, проявляющие свойства энхансеров в линиях клеток *D. melanogaster* разного происхождения. Элемент, обладающий свойствами энхансера, найденный в первоначальном поиске [23] в клетках S2 при стандартном культивировании, получил порядковый номер 663 (Unspecified_STARR-S2-663), поэтому далее мы будем называть его “энхансер 663”. Предположили, что этот энхансер активирует конститутивную транскрипцию гена *ftz-f1*. Методом иммунопреципитации хроматина (ChIP) изучили связывание MLE с энхансером 663 и с промотором конститутивного транскрипта. В качестве контрольных точек связывания MLE были взяты пик MLE на промоторе индуцибельного транскрипта и точка, расположенная на 1600 п.н. “ниже” сайта старта транскрипции с этого промотора, в которой MLE связывается намного слабее [9] (рис. 2а). Обнаружен высокий уровень связывания MLE на промоторе конститутивного транскрипта и на энхансере 663 на всех трех стадиях активации транскрипции в модельной системе.

Затем проанализировали содержание гистона H3 с модификациями H3me1K4 и H3AcK27 на энхансере 663 (рис. 2б). Известно, что для энхансерных элементов, независимо от их активности, характерно высокое содержание H3me1K4 [26]. Высокое содержание H3me1K4 отмечено и на исследуемом геномном элементе на всех стадиях активации транскрипции, это подтверждает, что этот элемент является энхансером. В то же время, H3AcK27 является маркером “активного” хроматина, он присутствует только на активно функционирующих энхансерах и промоторах [27]. Нами обнаружено, что H3AcK27 присутствует на энхансере 663, когда активен только конститутивный промотор. Од-

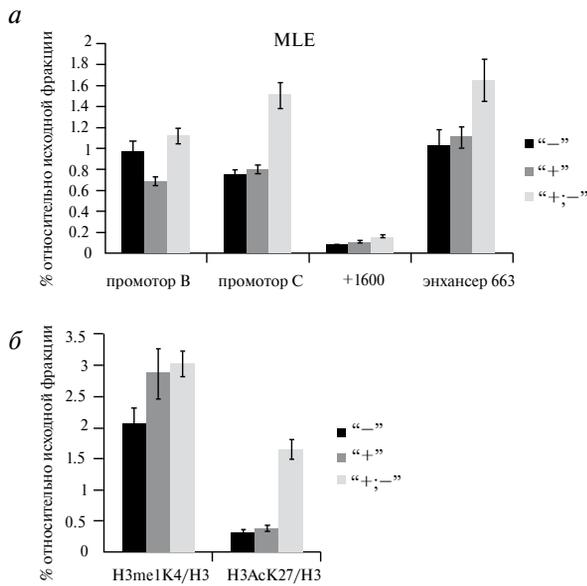


Рис. 2. Изучение энхансера 663 в модельной системе в клетках линии S2 *D. melanogaster* методом иммунопреципитации хроматина. *а* – Анализ связывания MLE с энхансером 663 и промоторами конститутивного и индуцибельного транскриптов гена *ftz-f1*. “+1600” – контрольная точка с низким уровнем связывания MLE. *б* – Содержание (%) модификаций гистона H3 относительно общего количества гистона H3 на энхансере 663. H3me1K4 – гистон H3, монометилированный по остатку лизина 4; H3AcK27 – гистон H3, ацетилированный по остатку лизина 27.

нако наибольший уровень гистона H3 с этой модификацией выявлен на энхансере 663 на стадии “+; -”, на которой активно экспрессируются оба транскрипта. Таким образом, энхансер 663, вероятно, вовлечен в работу обоих промоторов гена *ftz-f1*.

Согласно общепринятой модели, энхансер и активируемый им промотор сближаются путем образования ДНК-петли, что способствует активации транскрипции за счет привлечения на промотор факторов, необходимых для позиционирования преинициаторного транскрипционного комплекса или перехода РНК-полимеразы II из состояния паузы в стадию активной элонгации [28–30]. Чтобы подтвердить участие энхансера 663 в активации конститутивной транскрипции гена *ftz-f1*, проведен анализ пространственной структуры гена методом фиксации конформации хромосом (3C). В качестве “якорного” района использовали область конститутивного промотора гена *ftz-f1*. Показано взаимодействие конститутивного промотора В и энхансера 663 на всех трех стадиях активации транскрипции (“-”, “+” и “+; -”) (рис. 3*а*). Затем проверили взаимодействие энхансера 663 с промотором индуцибельного транскрипта и также обнаружили сближение этих регулятор-

ных элементов на всех трех стадиях активации транскрипции (“-”, “+” и “+; -”) (рис. 3*б*). На основании полученных данных можно сделать вывод, что энхансер 663 на постоянной основе вовлечен в конститутивную транскрипцию гена *ftz-f1* и также принимает участие в активации транзиторной индуцибельной транскрипции на стадиях, когда она включается. С последовательностью энхансера 663, активного в клетках линии S2, имеющих эмбриональное происхождение, перекрываются и почти полностью совпадают энхансеры, найденные в STARR-seq-скринингах, проведенных на линиях соматических клеток яичников имаго (OSC) [23] и клеток мозга личинок (BG3) *D. melanogaster* [24]. На основании этих данных можно предположить, что в середине третьего интрона гена *ftz-f1* расположен энхансер, активный во многих типах клеток *D. melanogaster*, и на этом энхансере формируется пик связывания хеликазы MLE, одного из регуляторов транскрипции этого гена.

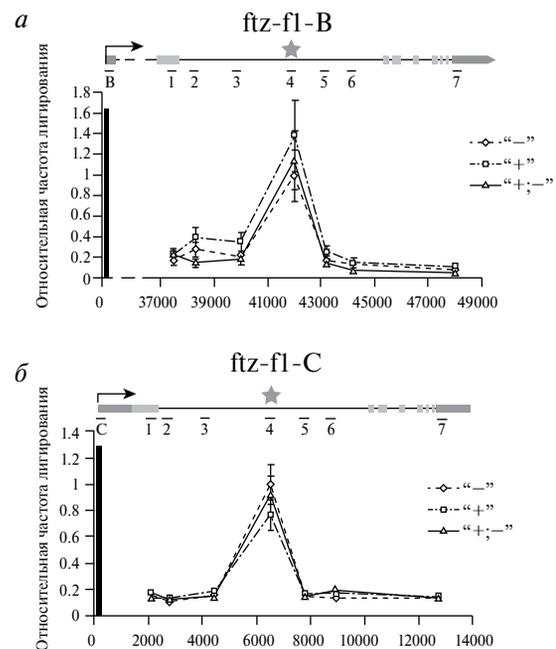


Рис. 3. Анализ взаимодействия энхансера 663 с конститутивным (*а*) и индуцибельным (*б*) промоторами гена *ftz-f1* методом фиксации конформации хромосом (3C). Экзоны обозначены серыми прямоугольниками, кодирующая область выделена более светлым цветом; стрелками обозначены сайты старта транскрипции; звездочкой показано положение энхансера 663; отрезки (1–7) указывают положение праймеров, черные столбики В и С – положение “якорных” праймеров. Расстояние указано в п.н. относительно старта транскрипции. Частота лигирования указана в относительных единицах, за 1 принята частота лигирования энхансера 663 с промотором В (*а*) и промотором С (*б*) соответственно на стадии “-”.

MLE участвует в регуляции транскрипции гена ftz-f1 на стадии имаго

Затем оценили влияние MLE на транскрипцию гена *ftz-f1 in vivo* на стадии имаго. Методом ОТ-кПЦР измерили уровень экспрессии обоих транскриптов у взрослых самок дикого типа и гомозиготных по мутации *mle[9]*, нарушающей хеликазную активность белка MLE [31]. Результаты представлены на рис. 4а. В согласии с данными проекта modENCODE на стадии имаго конститутивный транскрипт *ftz-f1-B* экспрессировался на высоком уровне, сопоставимом с уровнем экспрессии гена домашнего хозяйства *ras64B*, а индуцибельный транскрипт *ftz-f1-C* экспрессировался очень слабо. На фоне гомозиготного состояния мутации *mle[9]* уро-

вень экспрессии обоих транскриптов гена *ftz-f1* повышался.

Затем методом иммунопреципитации хроматина проанализировали связывание MLE с промоторами обоих транскриптов и энхансером 663. Как показано ранее [31], в мутантах *mle[9]* белок MLE не отличается от белка дикого типа по своей доменной структуре, но лишен хеликазной активности из-за небольшой делеции в каталитическом ядре молекулы. Мутантный белок сохраняет способность связываться с хроматином, поскольку связывание MLE с белковыми партнерами и с различными формами нуклеиновых кислот определяется не каталитическим ядром молекулы, а дополнительными доменами на N- и C-концах [2, 32]. Результаты иммунопреципитации хроматина представлены

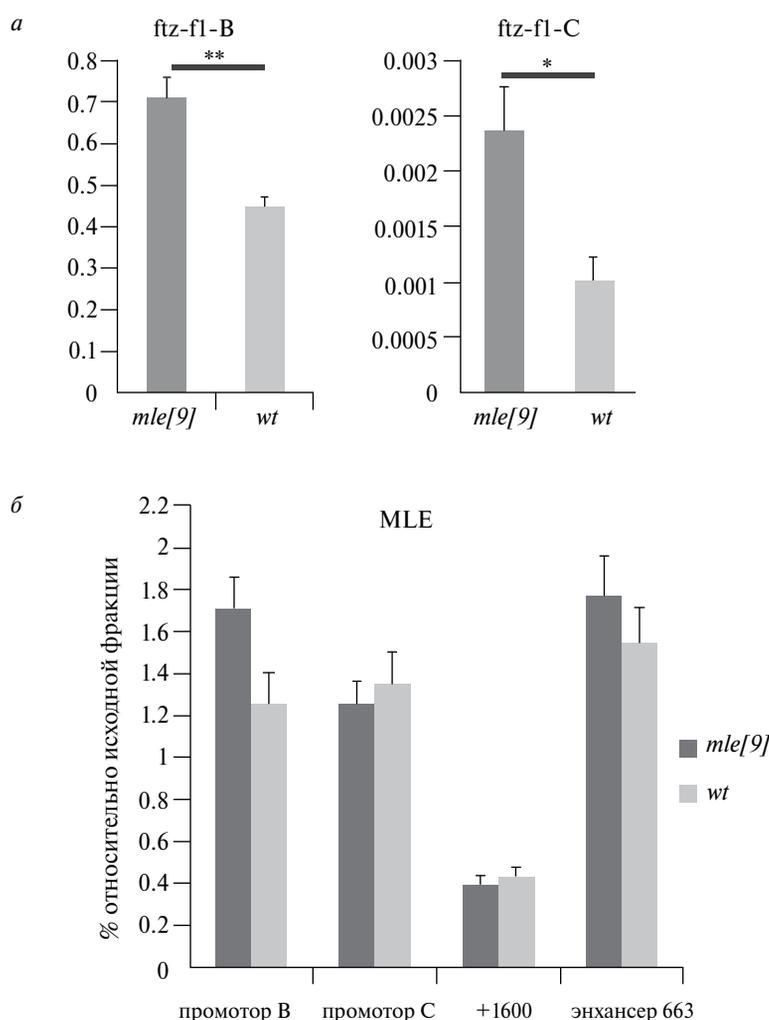


Рис. 4. Изучение влияния MLE на экспрессию гена *ftz-f1 in vivo* в самках *D. melanogaster* на стадии имаго. *а* – Изменения уровня экспрессии конститутивного и индуцибельного транскриптов гена *ftz-f1* на фоне мутации *mle[9]*. *wt* – дикий тип. Уровень экспрессии представлен в относительных единицах, за 1 принят уровень экспрессии контрольного гена *ras64B*. *б* – Анализ связывания мутантного варианта белка MLE (*mle[9]*) и белка дикого типа (*wt*) с энхансером 663, конститутивным и индуцибельным промоторами гена *ftz-f1* методом иммунопреципитации хроматина. “+1600” – контрольная точка с низким уровнем связывания MLE.

на рис. 4б. На обоих промоторах и на энхансере 663 был детектирован высокий уровень связывания белка MLE как дикого типа, так и мутантного. В качестве “отрицательной” контрольной точки использовали, как и в экспериментах в культуре клеток, точку, расположенную примерно на 1600 п.н. “ниже” сайта старта транскрипции с индуцибельного промотора. Не удивительно, что при высоком уровне экспрессии конститутивного транскрипта и низком уровне экспрессии индуцибельного транскрипта, MLE на одинаково высоком уровне связывается как с конститутивным, так и с индуцибельным промоторами. Этот результат согласуется с данными, ранее полученными в модельной системе в клетках S2: MLE образует пик на индуцибельном промоторе не только на стадии активной элонгации транскрипции “+; —”, но и на подготовительных стадиях “—” и “+”, с очень низким уровнем экспрессии [9].

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Итак, в настоящей работе показано, что MLE участвует в регуляции как индуцибельной, так и конститутивной транскрипции гена *ftz-f1* в модельной системе (в клетках S2) и *in vivo* на стадии имаго в самках. Мы использовали культуру клеток S2, поскольку именно в этой системе подробно изучали активацию транскрипции ряда генов экдизонового каскада [9, 13, 33–37], в том числе индуцибельную транскрипцию гена *ftz-f1*. Активация *in vivo* экдизонового каскада обеспечивает завершение личиночной стадии, окукливание и начало метаморфоза. Повышение титра экдизона на стадии поздней личинки (в модельной системе это стадия “+”) индуцирует экспрессию “ранних” генов, в том числе гена, кодирующего ядерный рецептор DHR3, который, в свою очередь, связывается с регуляторной последовательностью индуцибельного промотора гена *ftz-f1*. Это стимулирует накопление комплексов TFIID и SWI/SNF и РНК-полимеразы II на промоторе. РНК-полимераза II начинает синтезировать индуцибельный транскрипт, однако задерживается на расстоянии примерно 1.5 т.п.н. от промотора и остается в состоянии паузы. После снижения титра экдизона (в модельной системе это стадия “+; —”) РНК-полимераза II выходит из состояния паузы и начинается активная элонгация индуцибельного транскрипта [13]. Регуляция транскрипции с конститутивного промотора до настоящего момента не была предметом подробного изучения. Известно, что этот транскрипт не активируется в экдизоновом каскаде в начале метаморфоза и экспрессируется на одинаковом уровне на стадиях “—” и “+; —” в клетках S2 [13, 14]. В настоящей работе мы наблюдали снижение уровня *ftz-f1-B* на фоне высокого титра экди-

зона на стадии “+” по сравнению с другими стадиями. Механизм регуляции *ftz-f1-B* на этой стадии на данный момент не известен, при этом уровень *ftz-f1-B* даже после снижения на фоне высокого титра экдизона остается достаточно высоким по сравнению с уровнем индуцибельного транскрипта *ftz-f1-C*.

Надо отметить, что в клетках линии S2, в согласии с данными проекта modENCODE, на высоком уровне экспрессируются MSL2 и длинная некодирующая РНК гоX2 и не экспрессируется SXL (данные не представлены), что обеспечивает формирование комплекса дозовой компенсации [38, 39]. Это означает, что нельзя полностью исключить возможность того, что MLE оказывает влияние на транскрипцию *ftz-f1*, находясь в составе комплекса дозовой компенсации. Однако это представляется маловероятным по ряду причин. Во-первых, ген *ftz-f1* располагается на аутоosome, поэтому не должен подвергаться дозовой компенсации. Во-вторых, дозовая компенсация у *D. melanogaster* состоит в двукратном повышении транскрипции X-сцепленных генов у самцов, и мутации, нарушающие дозовую компенсацию, в том числе мутации в гене *mle*, приводят к снижению уровня транскрипции генов-мишеней. Противоположная ситуация наблюдается в случае гена *ftz-f1*: нокдаун MLE приводит к повышению уровня транскрипции *ftz-f1*. И, наконец, данные о влиянии MLE на экспрессию *ftz-f1*, полученные в культуре клеток S2, согласуются с данными, полученными на самках, у которых комплекс дозовой компенсации не формируется. Поэтому мы считаем, что в клетках линии S2 MLE участвует в регуляции транскрипции *ftz-f1* независимо от комплекса дозовой компенсации, как и у самок *D. melanogaster in vivo*.

Ранее в ряде работ были получены данные об участии MLE в регуляции индуцибельной транскрипции генов вне дозовой компенсации [5, 7, 9]. Так показано, что на политенных хромосомах личинок женского пола MLE связывается практически со всеми экдизоновыми пуффами. После кратковременного теплового шока белок MLE локализуется во многих пуффах, появляющихся при тепловом шоке [5]. Показано также влияние MLE на экспрессию трех ранних генов экдизонового каскада: *Eip74EF*, *BR-C* и *Eip75B*. У мутантных по гену *mle* личинок женского пола содержание транскриптов генов *Eip74EF* и *BR-C* снижалось хотя и незначительно, но статистически значимо, тогда как уровень *Eip75B* был несколько повышен. Этот результат предполагает вклад MLE в регуляцию индуцируемой экдизоном транскрипции [7]. Наконец, ранее мы показали, что MLE влияет на экспрессию индуцибельного транскрипта *ftz-f1-C* гена *ftz-f1* [9].

Влияние MLE на транскрипцию может быть обусловлено главным образом двумя эволюционно консервативными механизмами. Первый из них состоит в расплетании или, наоборот, стабилизации РНК-петель, вилок, G-квадруплексов и других сложных структур, образующихся в процессе элонгации транскрипции, особенно при активации по механизму паузы РНК-полимеразы II [2]. Второй способ обеспечивается взаимодействием N- и C-концевых доменов MLE с транскрипционными факторами, или прямым взаимодействием с РНК-полимеразой II посредством минимального домена трансактивации (MTAD), расположенного непосредственно перед каталитическим ядром молекулы MLE [40]. Мутация *mle[9]* нарушает хеликазную активность MLE, но, в отличие от нокдауна, не приводит к снижению его экспрессии, напротив, наблюдается некоторое усиление экспрессии [31]. При этом и нокдаун, и мутация приводят к повышению уровня экспрессии *ftz-f1*. Поэтому мы предполагаем, что в регуляции экспрессии *ftz-f1* реализуется первый механизм — хеликазная активность MLE обеспечивает регуляцию уровня транскрипции *ftz-f1*. Для точного выяснения этого вопроса необходимы дальнейшие эксперименты.

В настоящей работе на примере обоих транскриптов гена *ftz-f1* впервые наблюдали влияние MLE на экспрессию генов у взрослых самок. Ранее нами было показано, что *mle* экспрессируется на высоком уровне в яичниках имаго, и мутация *mle[9]* в гомозиготном состоянии значительно (более чем в 2 раза) снижает фертильность самок [31]. Ген *ftz-f1* экспрессируется во всех клетках яичника, в том числе, в стволовых клетках зародышевой линии, в цистах зародышевой линии и нескольких популяциях соматических клеток. FTZ-F1 (NR5A3) относится к подсемейству ядерных рецепторов NR5A. Представители этого подсемейства необходимы для развития гонад и выработки половых стероидов у млекопитающих, и их роль в регуляции созревания фолликулов консервативна в эволюции. Экспрессия *ftz-f1* в клетках фолликулов *D. melanogaster* необходима для выживания яйцевых камер. Гибель яйцевых камер в отсутствие *ftz-f1* предположительно обусловлена неспособностью клеток фолликулов выйти из митотического клеточного цикла или неспособностью накапливать ооцит-специфические факторы в зародышевой линии [10, 41]. NR5A1 (SF-1) и NR5A2 (LRH-1) — ортологи FTZ-F1 (NR5A3) человека, представляют собой не дублирующие друг друга факторы, которые являются важнейшими регуляторами целого ряда процессов в репродуктивных тканях [42]. В исследованиях на человеке и мышах показано, что нарушение экспрессии SF-1 приводит к развитию синдрома

истощения яичников (преждевременная овариальная недостаточность) [11]. Это заболевание приводит к бесплодию у женщин фертильного возраста, потому изучение механизмов его развития и поиск подходов к терапии имеют большое значение. Данные, полученные в настоящей работе, позволяют предположить, что в основе сниженной фертильности самок *mle* [9] лежит обнаруженное нами нарушение регуляции экспрессии гена *ftz-f1*. Для дальнейшей экспериментальной разработки этой темы необходимы исследования на тканеспецифичном уровне.

Ортолог MLE (DHX9) и ортологи FTZ-F1 (NR5A1 и NR5A2) также вовлечены в патогенез многих социально-значимых заболеваний [2, 4, 42], поэтому изучение механизмов их работы на модельном организме *D. melanogaster* представляет большой фундаментальный и практический интерес.

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 23-24-00357.

В соответствии с пунктом 3 главы 1 Директивы 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. о защите животных, используемых в научных целях, требования биоэтики не распространяются на объект данного исследования.

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee C.G., Hurwitz J. (1993) Human RNA helicase A is homologous to the maleless protein of *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* **268**, 16822–16830.
2. Lee T., Pelletier J. (2016) The biology of *DHX9* and its potential as a therapeutic target. *Oncotarget.* **7**, 42716–42739.
3. Calame D.G., Guo T., Wang C., Garrett L., Jolly A., Dawood M., Kurolap A., Henig N.Z., Fattih J.M., Herman I., Du H., Mitani T., Becker L., Rathkolb B., Gerlini R., Seisenberger C., Marschall S., Hunter J.V., Gerard A., Heidlebaugh A., Challman T., Spillmann R.C., Jhangiani S.N., Coban-Akdemir Z., Lalani S., Liu L., Revah-Politi A., Iglesias A., Guzman E., Baugh E., Boddaert N., Rondeau S., Ormieres C., Barcia G., Tan Q.K.G., Thiffault I., Pastinen T., Sheikh K., Biliciler S., Mei D., Melani F., Shashi V., Yaron Y., Steele M., Wakeling E., Østergaard E., Nazaryan-Petersen L.; Undiagnosed Diseases Network; Millan F., Santiago-Sim T., Thevenon J., Bruel A.L., Thauvin-Robinet C., Popp D., Platzer K., Gawlinski P., Wiszniewski W., Marafi D., Pehlivan D., Posey J.E., Gibbs R.A., Gailus-Durner V., Guerrini R., Fuchs H., Hrabě de Angelis M., Hölter S.M., Cheung H.H., Gu S., Lupski J.R. (2023) Monoallelic variation in *DHX9*, the gene encoding the DExH-box helicase DHX9,

- underlies neurodevelopment disorders and Charcot-Marie-Tooth disease. *Am. J. Hum. Genet.* **110**, 1394–1413.
4. Gulliver C., Hoffmann R., Baillie G.S. (2020) The enigmatic helicase DHX9 and its association with the hallmarks of cancer. *Future Sci. OA.* **7**, FSO650.
 5. Kotlikova I.V., Demakova O.V., Semeshin V.F., Shlooma V.V., Boldyreva L.V., Kuroda M.I., Zhimulev I.F. (2006) The *Drosophila* dosage compensation complex binds to polytene chromosomes independently of developmental changes in transcription. *Genetics.* **172**, 963–974.
 6. Cugusi S., Li Y., Jin P., Lucchesi J.C. (2016) The *Drosophila* helicase MLE targets hairpin structures in genomic transcripts. *PLoS Genet.* **12**, e1005761.
 7. Cugusi S., Kallappagoudar S., Ling H., Lucchesi J.C. (2015) The *Drosophila* helicase maleless (MLE) is implicated in functions distinct from its role in dosage compensation. *Mol. Cell. Proteomics.* **14**, 1478–1488.
 8. Николенко Ю.В., Куршакова М.М., Краснов А.Н. (2019) Мультифункциональный белок ENY2 взаимодействует с РНК-хеликазой MLE. *Докл. Акад. Наук.* **489**, 637–640.
 9. Николенко Ю.В., Куршакова М.М., Краснов А.Н., Георгиева С.Г. (2021) Хеликаза MLE – новый участник регуляции транскрипции гена *ftz-fl*, кодирующего ядерный рецептор у высших эукариот. *Докл. Акад. Наук. Науки о жизни.* **496**, 48–51.
 10. Beacham A.N., Whitehead K.M., McDonald S.I., Phipps D.N., Berghout H.E., Ables E.T. (2021) Orphan nuclear receptor *ftz-fl* (NR5A3) promotes egg chamber survival in the *Drosophila* ovary. *G3* (Bethesda). **11**, jkab003.
 11. Hughes C.H.K., Smith O.E., Meinsohn M.C., Brunelle M., Gévy N., Murphy B.D. (2023) Steroidogenic factor 1 (SF-1; Nr5a1) regulates the formation of the ovarian reserve. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **120**, e2220849120.
 12. Ueda H., Sonoda S., Lesley Brown J., Scott M.P., Wu C. (1990) A sequence-specific DNA-binding protein that activates *fushi tarazu* segmentation gene expression. *Genes Dev.* **4**, 624–635.
 13. Vorobyeva N.E., Nikolenko J.V., Nabirochkina E.N., Krasnov A.N., Shidlovskii Y.V., Georgieva S.G. (2012) SAYP and Brahma are important for ‘repressive’ and ‘transient’ Pol II pausing. *Nucl. Acids Res.* **40**, 7319–7331.
 14. Lavorgna G., Karim F.D., Thummel C.S., Wu C. (1993) Potential role for a FTZ-F1 steroid receptor superfamily member in the control of *Drosophila* metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90**, 3004–3008.
 15. Ohno C.K., Ueda H., Petkovich M. (1994) The *Drosophila* nuclear receptors FTZ-F1 α and FTZ-F1 β compete as monomers for binding to a site in the *fushi tarazu* gene. *Mol. Cell Biol.* **14**, 3166–3175.
 16. Yu Y., Li W., Su K., Yussa M., Han W., Perrimon N., Pick L. (1997) The nuclear hormone receptor Ftz-F1 is a cofactor for the *Drosophila* homeodomain protein Ftz. *Nature.* **385**, 552–555.
 17. Broadus J., McCabe J.R., Endrizzi B., Thummel C.S., Woodard C.T. (1999) The *Drosophila* beta FTZ-F1 orphan nuclear receptor provides competence for stage-specific responses to the steroid hormone ecdysone. *Mol. Cell.* **3**, 143–149.
 18. Woodard C.T., Baehrecke E.H., Thummel C.S. (1994) A molecular mechanism for the stage specificity of the *Drosophila* prepupal genetic response to ecdysone. *Cell.* **79**, 607–615.
 19. Boulanger A., Clouet-Redt C., Farge M., Flandre A., Guignard T., Fernando C., Juge F., Dura J.M. (2011) *ftz-fl* and *Hr39* opposing roles on EcR expression during *Drosophila* mushroom body neuron remodeling. *Nat. Neurosci.* **14**, 37–46.
 20. Yamada M.A., Murata T., Hirose S., Lavorgna G., Suzuki E., Ueda H. (2000) Temporally restricted expression of transcription factor betaFTZ-F1: significance for embryogenesis, molting and metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Development.* **127**, 5083–5092.
 21. Clemens J.C., Worby C.A., Simonson-Leff N., Muda M., Maehama T., Hemmings B.A., Dixon J.E. (2000) Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **97**, 6499–6503.
 22. Гаврилов А.А., Разин С.В. (2008) Изучение пространственной организации домена альфа-глобиновых генов кур методом 3С. *Биохимия.* **73**, 1486–1494.
 23. Arnold C.D., Gerlach D., Stelzer C., Boryn Ł.M., Rath M., Stark A. (2013) Genome-wide quantitative enhancer activity maps identified by STARR-seq. *Science.* **339**, 1074–1077.
 24. Yáñez-Cuna J.O., Arnold C.D., Stampfel G., Boryn Ł.M., Gerlach D., Rath M., Stark A. (2014) Dissection of thousands of cell type-specific enhancers identifies dinucleotide repeat motifs as general enhancer features. *Genome Res.* **24**, 1147–1156.
 25. de Almeida B.P., Reiter F., Pagani M., Stark A. (2022) DeepSTARR predicts enhancer activity from DNA sequence and enables the *de novo* design of synthetic enhancers. *Nat. Genet.* **54**, 613–624.
 26. Heintzman N.D., Stuart R.K., Hon G., Fu Y., Ching C.W., Hawkins R.D., Barrera L.O., Van Calcar S., Qu C., Ching K.A., Wang W., Weng Z., Green R.D., Crawford G.E., Ren B. (2007) Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat. Genet.* **39**, 311–318.
 27. Koenecke N., Johnston J., Gaertner B., Natarajan M., Zeitlinger J. (2016) Genome-wide identification of *Drosophila* dorso-ventral enhancers by differential histone acetylation analysis. *Genome Biol.* **17**, 196.
 28. Ong C.T., Corces V.G. (2011) Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nat. Rev. Genet.* **12**, 283–293.
 29. Cubenäs-Potts C., Rowley M.J., Lyu X., Li G., Lei E.P., Corces V.G. (2017) Different enhancer classes in *Drosophila* bind distinct architectural proteins and mediate unique chromatin interactions and 3D architecture. *Nucl. Acids Res.* **45**, 1714–1730.

30. Marsman J., Horsfield J.A. (2012) Long distance relationships: enhancer-promoter communication and dynamic gene transcription. *Biochim. Biophys. Acta*. **1819**, 1217–1227.
31. Ашниева Г.А., Георгиева С.Г., Николенко Ю.В. (2024) Функции хеликазы MLE *Drosophila melanogaster* вне дозовой компенсации: молекулярная природа и плейотропный эффект мутации *mle[9]*. *Генетика*. **60**, 34–46.
32. Николенко Ю.В., Георгиева С.Г., Копытова Д.В. (2023) Разнообразие функций хеликазы MLE в регуляции экспрессии генов у высших эукариот. *Молекуляр. биология*. **57**, 10–23.
33. Николенко Ю.В., Краснов А.Н., Воробьева Н.Е. (2019) Ремоделирующий хроматин комплекс SWI/SNF влияет на пространственную организацию локуса гена *ftz-f1*. *Генетика*. **55**, 156–164.
34. Николенко Ю.В., Краснов А.Н., Мазина М.Ю., Георгиева С.Г., Воробьева Н.Е. (2017) Изучение свойств нового экдизонзависимого энхансера. *Докл. Акад. Наук*. **474**, 756–759.
35. Mazina M.Yu., Kovalenko E.V., Derevyanko P.K., Nikolenko J.V., Krasnov A.N., Vorobyeva N.E. (2018) One signal stimulates different transcriptional activation mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms*. **1861**, 178–189.
36. Mazina M.Y., Nikolenko J.V., Fursova N.A., Nedil'ko P.N., Krasnov A.N., Vorobyeva N.E. (2015) Early-late genes of the ecdysone cascade as models for transcriptional studies. *Cell Cycle*. **14**, 3593–3601.
37. Vorobyeva N.E., Nikolenko J.V., Krasnov A.N., Kuzmina J.L., Panov V.V., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. (2011) SAYP interacts with DHR3 nuclear receptor and participates in ecdysone-dependent transcription regulation. *Cell Cycle*. **10**, 1821–1827.
38. Samata M., Akhtar A. (2018) Dosage compensation of the X chromosome: a complex epigenetic assignment involving chromatin regulators and long non-coding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **87**, 323–350.
39. McDowell K.A., Hilfiker A, Lucchesi J.C. (1996) Dosage compensation in *Drosophila*: the X chromosome binding of MSL-1 and MSL-2 in female embryos is prevented by the early expression of the *Sxl* gene. *Mech. Dev.* **57**, 113–119.
40. Aratani S., Kageyama Y., Nakamura A., Fujita H., Fujii R., Nishioka K., Nakajima T. (2008) MLE activates transcription via the minimal transactivation domain in *Drosophila*. *Int. J. Mol. Med.* **21**, 469–476.
41. Knapp E.M., Li W., Singh V., Sun J. (2020) Nuclear receptor Ftz-f1 promotes follicle maturation and ovulation partly via bHLH/PAS transcription factor Sim. *Elife*. **9**, e54568.
42. Meinsohn M.C., Smith O.E., Bertolin K., Murphy B.D. (2019) The orphan nuclear receptors steroidogenic factor-1 and liver receptor homolog-1: structure, regulation, and essential roles in mammalian reproduction. *Physiol. Rev.* **99**, 1249–1279.

Mle (DHX9) Helicase Regulates the Expression of Constitutive and Inducible Isoforms of the Conserved Nuclear Receptor FTZ-F1 (NR5A3)

© 2025 J. V. Nikolenko*, S. G. Georgieva

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
Moscow, 119991 Russia

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

In addition to participating in dosage compensation, the MLE helicase in *D. melanogaster* performs many functions in the regulation of gene expression, as does its human ortholog DHX9. Many of these functions are evolutionarily conserved and poorly explored. MLE has previously been shown to be involved in the regulation of inducible transcription of the *ftz-f1* gene encoding the evolutionarily conserved nuclear receptor NR5A3. The *ftz-f1* gene also encodes a constitutive transcript synthesized from an alternative promoter. The present work is devoted to the investigation of the role of MLE in the regulation of constitutive transcription of the *ftz-f1* gene. This work shows that in S2 cell culture, MLE binds to the constitutive promoter and controls both inducible and constitutive transcription of the *ftz-f1* gene. A novel MLE-binding cis-regulatory element of the *ftz-f1* gene, enhancer 663, was identified. Using chromosome conformation capture technique the interaction of enhancer 663 with constitutive and inducible promoters of *ftz-f1* gene in S2 cell culture was demonstrated. Examination of enhancer 663 histone H3 acetylation showed that it is involved in the activity of both promoters. Knockdown of MLE in S2 cell culture causes an increase in constitutive transcription. The effect of MLE on transcription beyond dosage compensation *in vivo* at the adult stage was shown for the first time. It was shown that at the adult stage MLE binds to both inducible and constitutive promoters and to enhancer 663. Mutation in the *mle* gene leads to increased expression of both transcripts of the *ftz-f1* gene in females. The data obtained are important for understanding and further study of the evolutionarily conserved functions of MLE and its human ortholog DHX9.

Keywords: MLE, DHX9, FTZ-F1, NR5A, *D. melanogaster*, gene expression