

РОЛЬ БЕЛКА Mod(mdg4)-67.2 ВО ВЗАИМОДЕЙСТВИЯХ МЕЖДУ Su(Hw)-ЗАВИСИМЫМИ КОМПЛЕКСАМИ И ИХ РЕКРУТИРОВАНИИ НА ХРОМАТИН

© 2024 Л.С. Мельникова*, В.В. Молодина, П.Г. Георгиев, А.К. Головин

Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН),
119334 Москва, Россия; электронная почта: lsm73@mail.ru

Поступила в редакцию 25.09.2023

После доработки 24.10.2023

Принята к публикации 24.10.2023

Белок Su(Hw) (Suppressor of Hairy-wing) принадлежит к классу белков, которые организуют архитектуру хромосом, определяют активность промоторов и участвуют в формировании границ/инсуляторов между регуляторными доменами. Этот белок содержит кластер из 12 цинковых пальцев типа C2H2, часть из которых отвечает за связывание с консенсусным сайтом. Su(Hw) образует комплекс с белком Mod(mdg4)-67.2 и белком CP190 (Centrosomal protein 190kD), связывающимся со всеми известными инсуляторами дрозофилы. Для дальнейшего изучения функционирования Su(Hw)-зависимых комплексов мы использовали ранее описанную мутацию *su(Hw)^{E8}*, которая инактивирует седьмой цинковый палец, в результате чего мутантный белок теряет способность связываться с консенсусным сайтом. В представленной работе показано, что белок Su(Hw)^{E8} продолжает напрямую взаимодействовать с белками CP190 и Mod(mdg4)-67.2. Через взаимодействие с Mod(mdg4)-67.2 белок Su(Hw)^{E8} может привлекаться в состав формирующихся на хроматине Su(Hw)-зависимых комплексов и усиливать их инсуляторную активность. Результаты работы демонстрируют, что не связанные с ДНК Su(Hw)-зависимые комплексы могут рекрутироваться на Su(Hw)-связывающие сайты через специфичные белок-белковые взаимодействия, которые стабилизируются Mod(mdg4)-67.2.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: регуляция транскрипции, Su(Hw), Mod(mdg4), белок-белковые взаимодействия, хроматиновые инсуляторы.

DOI: 10.31857/S0320972524040033 EDN: ZGKHCS

ВВЕДЕНИЕ

У высших эукариот регуляция экспрессии генов усложняется вследствие дифференцировки клеток в процессе эмбрионального развития. Специализация клеток определяется экспрессией различных комбинаций транскрипционных факторов, которые кодируются обширной группой генов развития, контролирующей дифференцировку [1]. Другая большая группа генов кодирует белки «домашнего хозяйства», которые необходимы для функционирования всех клеток. У *Drosophila* гены домашнего хозяйства группируются в кластерах, и

все их регуляторные элементы обычно находятся в непосредственной близости от регулируемых ими промоторов. В отличие от генов домашнего хозяйства гены развития обычно имеют сложные протяжённые регуляторные системы, состоящие из большого количества энхансеров, каждый из которых определяет экспрессию гена в конкретной группе клеток и на протяжении определённого временного промежутка [2–4]. Энхансеры могут стимулировать работу промотора, находясь от него на дистанциях, достигающих в некоторых случаях сотен тысяч пар нуклеотидов (т.п.н.). Регуляция взаимодействий между энхансерами и промоторами осуществляется особой группой регуляторных элементов, названных инсуляторами [5–7]. Определённые комбинации инсуляторов могут взаимодействовать между собой, формируя хроматиновые домены, которые усиливают/блокируют дистанционные взаимодействия между энхансерами и промоторами [5, 8, 9].

Принятые сокращения: ДДС – дрожжевая двубридная система; CP190 – Centrosomal protein 190kD; Mod(mdg4) – Modifier of mdg4; SBS – Su(Hw) binding sites, сайты связывания белка Su(Hw); Su(Hw) – Suppressor of Hairy-wing; ZF – zinc fingers, цинковые пальцы.

* Адресат для корреспонденции.

У *Drosophila* с промоторами генов и инсуляторами связываются архитектурные белки, характерной особенностью которых являются кластеры, состоящие из пяти и более цинковых пальцев (zinc fingers, ZF) типа C2H2 [10, 11]. Показано, что с помощью 4–5 C2H2-доменов архитектурные белки специфично связываются с протяжёнными мотивами 12–15 п.н. У дрозофилы наиболее хорошо описан архитектурный белок Su(Hw) (Suppressor of Hairy-wing), который имеет около 2000 геномных сайтов связывания [12–15]. Исходно Su(Hw) был открыт как инсуляторный белок, который блокирует взаимодействия между энхансерами и промоторами генов, связываясь с 12 сайтами в составе ретротранспозона *gypsy* [12–14]. В дальнейшем было показано, что Su(Hw) участвует в формировании промоторов и способен репрессировать транскрипцию с некоторых из них [15, 16]. В центре белка Su(Hw) локализован кластер, состоящий из 12 ZF C2H2, которые связываются с консенсусной последовательностью [17]. На N-конце белка Su(Hw) находятся два консервативных участка, взаимодействующих с ВТВ-доменом (ВТВ – bric-a-brac, tramtrack, and broad complex) белка CP190, который участвует в формировании активных инсуляторов и промоторов генов домашнего хозяйства [18, 19]. На С-конце белка картирован домен, взаимодействующий с одной из 30 изоформ белка Mod(mdg4) (Modifier of mdg4) [20–22]. Все изоформы Mod(mdg4) имеют на N-конце ВТВ-домен типа ТТК (Tramtrack group), способный формировать гексамеры [23, 24]. Изоформа Mod(mdg4)-67.2 имеет уникальный С-конец, взаимодействующий исключительно с С-концевым доменом белка Su(Hw). Кроме того, обнаружено, что в состав Su(Hw)-зависимых комплексов могут входить и другие белки: HIP1 (HP1 and insulator partner protein 1), который взаимодействует с тем же С-концевым районом Su(Hw), что и Mod(mdg4)-67.2 [25–27], ENY2 (Enhancer of yellow 2), взаимодействующий с 11-м и 12-м ZF белка Su(Hw) [28], и РНК-связывающие белки [29, 30]. Все изоформы белка Mod(mdg4), как и белок CP190, сумолируются и в результате множественных белок-белковых взаимодействий формируют в ядре спеклы [31–33]. Предполагается, что мультимеризация ВТВ-доменов и взаимодействие между белками SUMO (Small Ubiquitin-like Modifier) формируют ядро спеклов, к которым присоединяются белки «пассажиры», такие как Su(Hw) и другие архитектурные белки. Согласно предложенной модели, спеклы функционируют как резервуары архитектурных белков, которые связываются с новой ДНК в процессе её репликации [32, 33].

В представленной работе мы исследовали способность мутантного белка Su(Hw)^{E8}, который самостоятельно не связывается с ДНК, рекрутироваться на Su(Hw)-зависимые сайты хроматина. Точечная

замена гистидина в положении 459 на тирозин в мутанте Su(Hw)^{E8} [34] приводит к разрушению седьмого домена C2H2, необходимого для связывания белка с хроматином [17]. В результате Su(Hw)^{E8} не может связаться с Su(Hw)-связывающими сайтами *in vitro* и не обнаруживается на полигенных хромосомах [17]. Однако мы продемонстрировали, что в присутствии связывающегося с хроматином мутантного варианта Su(Hw) с делетированным N-концом (Su(Hw) Δ N) белок Su(Hw)^{E8} рекрутируется на Su(Hw)-зависимые инсуляторные сайты. Эффективное связывание Su(Hw)^{E8} опосредовано белком Mod(mdg4)-67.2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание рекомбинантных генетических конструкций. Все конструкции для работы в дрожжевой двугибридной системе (ДДС) были созданы на основе вектора pGBT9, содержащего ДНК-связывающий домен дрожжевого белка GAL4 («Clontech», Пало-Альто, Калифорния, США).

Для создания конструкции pGBTSu(Hw)^{E8} продукт ПЦР 5'-ggaacagcacaagtcacgtg-3'/5'-caccatgcagaa-aactctgtc-3' обрабатывали эндонуклеазой BglII, а продукт ПЦР 5'-gcccttaaaaagTatcgacgct-3'/5'-aatccgtg-cgttcataat-3' – эндонуклеазой EagI. В качестве матрицы для ПЦР использовали кДНК Su(Hw). Полученные фрагменты ДНК совместно клонировали в плазмиду pGBTSu(Hw), обработанную BglII и EagI.

Для создания конструкции pGBTSu(Hw)^{E8} Δ 114 фрагмент XhoI-Afl II, содержащий делецию 114 а.о., из pGBTSu(Hw) Δ 114 клонировали в плазмиду pGBTSu(Hw)^{E8}, обработанную XhoI и Afl II.

Для создания конструкции pGBTSu(Hw)^{E8} Δ 283 фрагмент EagI-SalI, содержащий делецию 17 а.о., из pGBTSu(Hw) Δ 283 клонировали в плазмиду pGBTSu(Hw)^{E8}, обработанную EagI и SalI.

Плазмиды pGBTSu(Hw), pGBTSu(Hw) Δ 283, pGADMod(mdg4)-67.2 и pGADCP190 были получены и описаны ранее [18, 20].

Дрожжевая двугибридная система. Анализ взаимодействий между белками в ДДС проводили с использованием плазмид и протоколов от «Clontech». Плазмиды трансформировали в штамм дрожжей pJ69-4A литий-ацетатным методом, как описано производителем, и высевали на среду без триптофана и лейцина. Через 3 дня роста при 30 °С клетки пересевали на селективные среды без триптофана, лейцина, гистидина и аденина и сравнивали рост дрожжевых колоний ещё через 2–3 дня. В качестве отрицательного контроля тестировали взаимодействие производных белка Su(Hw), экспрессировавшихся в векторе pGBT9, с вектором pGAD24. Положительным контролем служили взаимодействия полноразмерного белка

Su(Hw) с белками Mod(mdg4)-67.2 или CP190, описанные ранее [18, 20]. Каждый эксперимент повторяли трижды.

Фенотипический анализ в трансгенных линиях дрозофил. Всех мух содержали при температуре 25 °C на стандартной дрожжевой среде (Bloomington Drosophila Stock Center). Эффекты различных комбинаций мутаций оценивались двумя исследователями независимо. Уровень выраженности фенотипов *yellow* и *cut* оценивали в возрасте 3–5 дней у самцов, развивающихся при 25 °C. Изменения в экспрессии гена *yellow* (в теле и в крыльях) оценивали по пятибалльной шкале, где 5 соответствует пигментации дикого типа; 2 – уровню пигментации, ассоциированному с мутацией *y*²; 3 и 4 – частичной активации базовой транскрипции; 1 – отсутствию экспрессии. В качестве эталона использовали мух, у которых экспрессия аллеля *yellow* была охарактеризована ранее. Изменения в экспрессии гена *cut* оценивали, подсчитывая количество вырезов, возникающих по краю крыловой пластины. В качестве эталона использовали мух дикого типа и мух, несущих аллель *ct*⁶. Репрезентативные формы крыльев, представленные на рис. 2, б, были выбраны как «средние» из серии крыльев, расположенных в порядке возрастания выраженности их мутантного фенотипа. В каждой трансгенной линии оценивали фенотип не менее чем 50 мух.

Трансгенные линии Su(Hw)⁺, Su(Hw) Δ 62, Su(Hw) Δ 52, Su(Hw) Δ 114 и Su(Hw)J, тагетированные эпитопом 3xFLAG, были получены и описаны ранее [18, 35]. Введение в трансгенные линии мутации *mod(mdg4)*^{u1} или комбинаций мутаций *su(Hw)*^v/*su(Hw)*² и *su(Hw)*^v/*su(Hw)*^{E8} проводили в соответствии со схемой, описанной ранее [36]. Все детали генетических скрещиваний могут быть предоставлены по запросу.

Иммуноокрашивание политенных хромосом. Личинок дрозофилы 3-го возраста выращивали при 18 °C в стандартных условиях. Окрашивание политенных хромосом проводили в соответствии с ранее описанной методикой [37]. Использовали следующие первичные антитела: анти-Su(Hw) (кролик) 1 : 300 и анти-FLAG (мышь) 1 : 50. Применяемыми вторичными антителами были FITC-AffiniPure Donkey Anti-Rabbit 1 : 200 и Cy5-AffiniPure Donkey Anti-Mouse 1 : 200 («Jackson ImmunoResearch», США). Анализ проводился с помощью флуоресцентного микроскопа Zeiss Axio Observer.Z1 («Zeiss», Германия), в который встроена система микроскопии со структурированным освещением OptiGrid («Qiortiq», Великобритания). Для обработки изображений использовали программу Fiji.

Иммунопреципитация хроматина. Выделение хроматина из дрозофил на кукольной стадии

развития и последующую иммунопреципитацию хроматина проводили в соответствии с методикой, описанной ранее [35]. Для иммунопреципитации использовали следующие антитела: анти-Su(Hw) (кролик) 1 : 200 и анти-FLAG (мышь) 1 : 300. Количество иммунопреципитированной ДНК определяли с помощью количественной ПЦР с использованием красителя SYBR green («Bio-Rad», США, Cat# 170-8882). Последовательности праймеров, использованных в ПЦР:

62D fw – 5'-TTTGGGCTTGGTGAGAACAG-3'
 62D rev – 5'-TGATACCAGGCGAACAGAAATC-3'
 50A fw – 5'-ATACAAAGTGGTTTCAGCCAAGAAG-3'
 50A rev – 5'-TTGATAAATAGTCCAGCACGCATAC-3'
 87E fw – 5'-GGATGTTACA TTGAGAGTGCTTAGG-3'
 87E rev – 5'-TTTGCGTTTCGGCTGCTGTC-3'
 1A2 fw – 5'-ACCACACATCAGTCATCGTGT-3'
 1A2 rev – 5'-CTTCGTCTACCGTTGTGC-3'
 gypsy fw – 5'-TTCTCTAAAAAGTATGCAGCACTT-3'
 gypsy rev – 5'-CACGTAATAAGTGTGCGTTGA-3'
 ras fw – 5'-GAGGGATTCTGCTCGTCTTCG-3'
 ras rev – 5'-GTCGCACTTGTATCCACCATC-3'

Каждый эксперимент выполняли в трёх биологических повторях.

Антитела. В работе использовали поликлональные антитела к N-концевому домену белка Su(Hw), полученные и описанные ранее [32, 33], и моноклональные антитела к эпитопу FLAG («Sigma-Aldrich», Cat# F 1804).

Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Белок Su(Hw)^{E8} способен напрямую взаимодействовать с белками Mod(mdg4)-67.2 и CP190. Ранее мы показали, что мутантный белок Su(Hw)^f, в котором инактивирован десятый ZF, утрачивает способность взаимодействовать с белком CP190 (Centrosomal protein 190kD) *in vitro* [35]. Чтобы проверить, как мутация в седьмом ZF белка Su(Hw)^{E8} влияет на взаимодействие с двумя другими компонентами Su(Hw)-зависимого комплекса, белками CP190 и Mod(mdg4)-67.2, мы использовали ДДС. На основе вектора pGBT9 были созданы 3 конструкции. Первая экспрессировала в дрожжах полноразмерный белок Su(Hw)^{E8}, вторая – его производную Su(Hw)^{E8} Δ 114 с делецией района 88–202 а.о., взаимодействующего с белком CP190, и третья – производную Su(Hw)^{E8} Δ 283, в которой делетирован район взаимодействия с белком Mod(mdg4)-67.2 от 760 до 778 а.о. (рис. 1, а). Затем мы протестировали прямые взаимодействия вариантов Su(Hw)^{E8} с полноразмерными белками CP190 и Mod(mdg4)-67.2, которые экспрессировались в векторе pGAD24. Белок Su(Hw)^{E8} взаимодействовал со всеми инсу-

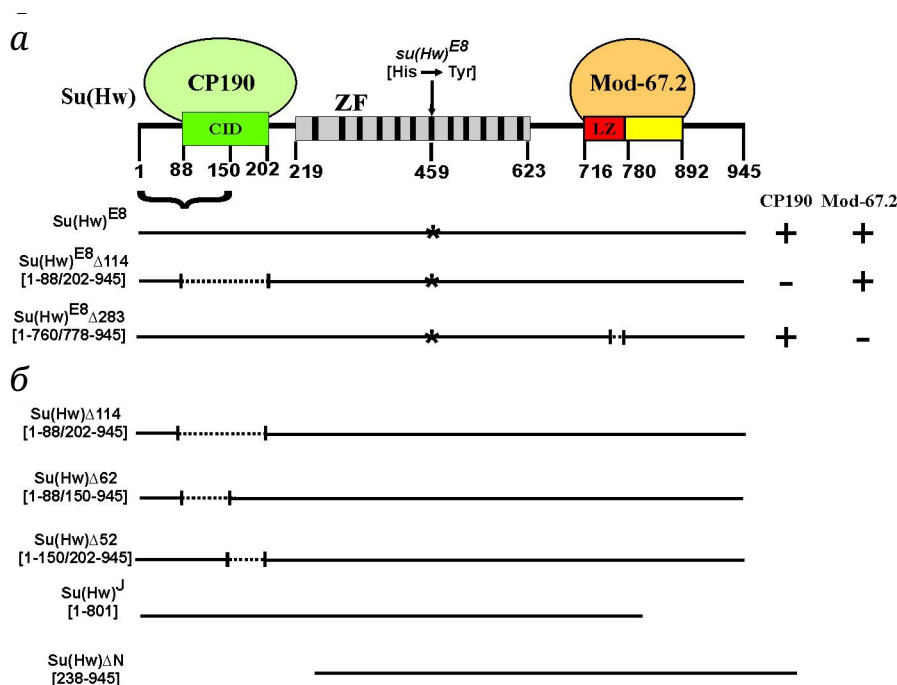


Рис. 1. Производные белка Su(Hw), использованные в работе. **а** – Схематичное изображение полноразмерного белка Su(Hw). Обозначения доменов: CID – домен, взаимодействующий с CP190; ZF – цинковые пальцы; LZ – лейциновая молния. На схеме показаны районы взаимодействия с белками Mod(mdg4)-67.2 (Mod-67.2) и CP190, которые изображены в виде овалов. Вертикальная стрелка указывает на мутацию *su(Hw)*^{E8}. Скобкой под схемой указан район белка, к которому были получены антитела. Цифрами обозначены аминокислотные остатки, ограничивающие домены и производные формы. Слева указаны названия производных, размер производных обозначен отрезками, пунктирные линии обозначают внутренние делеции, звёздочкой обозначена мутация *su(Hw)*^{E8}. Справа от схем приведены результаты, полученные в ДДС. «+» – наличие взаимодействия, «-» – отсутствие взаимодействия. **б** – Делеционные производные, использованные в генетических экспериментах и в иммуноокрашивании полетных хромосом

ляторными белками так же, как белок дикого типа. Белок Su(Hw)^{E8}Δ114 утрачивал способность взаимодействовать с CP190, а белок Su(Hw)^{E8}Δ283 – с Mod(mdg4)-67.2 (рис. 1, **а**). Следовательно, мутация в седьмом ZF не влияет на взаимодействие белка Su(Hw)^{E8} с остальными компонентами инсульторного комплекса. Поэтому через взаимодействие с белками CP190 и Mod(mdg4)-67.2 белок Su(Hw)^{E8} может рекрутироваться на хроматин.

Белок Su(Hw)^{E8} восстанавливает инсульторную функцию мутантных белков Su(Hw), взаимодействие которых с CP190 нарушено. Для исследования Su(Hw)-зависимой инсультации обычно используют две модельные системы, которые получены в результате интеграции мобильного элемента *gypsy* в локусы *yellow* (*y*²) и *cut* (*ct*⁶).

Ген *yellow* отвечает за пигментацию кутикулярных структур дрозофилы [38]. В диком типе тело, крылья и щетинки мух окрашены в тёмный цвет. В аллеле *y*² ретротранспозон *gypsy* встроился между энхансерами тела и крыльев и промотором гена *yellow* (рис. 2, **а**). В этом случае инсультатор Su(Hw) полностью блокирует активацию экспрессии *yellow* в теле и крыльях, в результате чего тело и крылья мутантных мух приобретают жёлтую окраску (рис. 2, **б**). Однако щетинки мух остаются

пигментированными, т.к. энхансер щетинок расположен в интроне гена [39].

В аллеле *ct*⁶ (рис. 2, **а**) *gypsy* находится между энхансером крыловой пластины и промотором гена *cut*, отвечающим за развитие края крыла, которые дистанцированы друг от друга на расстояние более 70 т.п.н. В этом случае инсультатор полностью блокирует крыловой энхансер, вследствие чего край крыла практически целиком обрезан и крыловые щетинки отсутствуют (рис. 2, **б**) [22, 40].

Белок CP190 связывается с двумя районами, 88–150 а.о. и 150–202 а.о., на N-конце белка Su(Hw) (рис. 1, **а**) [18]. С помощью генетических скрещиваний во вторую хромосому линии *y*²*ct*⁶; *su(Hw)*^v/*su(Hw)*² были интегрированы трансгены, экспрессирующие полноразмерный белок Su(Hw)⁺ и его производные: Su(Hw)Δ62 (делеция района 88–150 а.о.), Su(Hw)Δ52 (делеция района 150–202 а.о.) и Su(Hw)Δ114 (делеция обоих районов, взаимодействующих с CP190) (рис. 1, **б**). Сочетание мутаций *su(Hw)*^v/*su(Hw)*² инактивирует нативный белок Su(Hw), поэтому мы смогли проанализировать влияние мутантных белков на фенотип *y*²*ct*⁶ (рис. 2, **б**) [18].

Инактивация белка Su(Hw) в линии *y*²*ct*⁶; *su(Hw)*^v/*su(Hw)*² восстанавливала экспрессию *yellow*

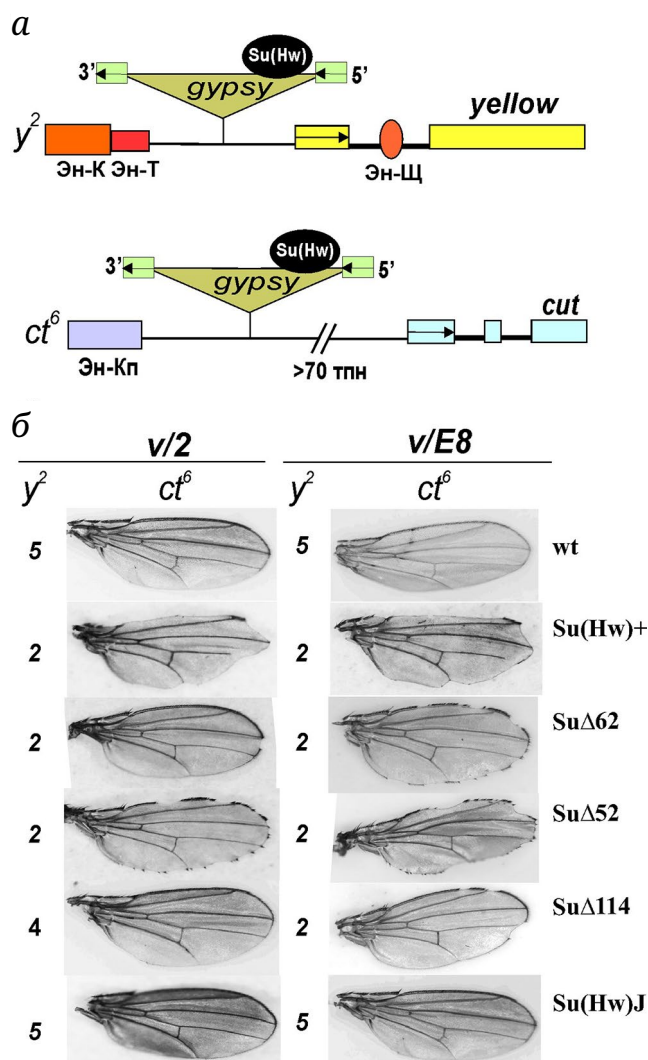


Рис. 2. Влияние белка Su(Hw)^{E8} на *gypsy*-зависимую инсуляцию. *a* – Схематичное изображение аллелей *y*² и *ct*⁶. Экзоны генов *yellow* и *cut* изображены в виде прямоугольников. Сайты инициации транскрипции генов указаны стрелками. Ретротранспозон *gypsy* изображён в виде треугольника. Прямоугольники на его концах обозначают длинные концевые повторы (ДКП), ориентация которых указана стрелками. Обозначения: Su(Hw) – инсулятор Su(Hw); Эн-К – энхансер крыльев; Эн-Т – энхансер тела; Эн-Щ – энхансер щетинок; Эн-Кп – энхансер крыловой пластины. *б* – Влияние производных белка Su(Hw) на активность инсулятора *gypsy* в аллелях *y*² и *ct*⁶ на фоне мутаций *su(Hw)*^v/*su(Hw)*² (*v/2*) и *su(Hw)*^v/*su(Hw)*^{E8} (*v/E8*). Названия линий, использованных для фенотипического анализа, указаны в правой колонке: wt – *y*²*ct*⁶, Su(Hw)⁺ – трансген экспрессировал полноразмерный белок. Схемы и названия остальных производных приведены на рис. 1. Цифры в колонке *y*² показывают уровень экспрессии гена *yellow* в кутикуле тела и крыльях. На фотографиях показаны изменения крылового фенотипа гена *cut* на различных мутантных фонах

в аллеле *y*² и экспрессию *cut* в аллеле *ct*⁶, демонстрируя, что связывание белка Su(Hw) имеет решающее значение для инсуляции. Введение транс-

гена Su(Hw)⁺ приводит к полному восстановлению инсуляции (рис. 2, б). Ранее мы показали, что белок CP190 также необходим для Su(Hw)-зависимой инсуляции [18]. В линиях с экспрессией белков Su(Hw)Δ62 и Su(Hw)Δ52, где связывание белка CP190 с Su(Hw)-зависимым комплексом было ослаблено, инсулятор полностью блокировал энхансеры тела и крыльев гена *yellow* (фенотип *y*²). Однако фенотип *cut* гораздо сильнее реагировал на недостаток CP190. В случае экспрессии белка Su(Hw)Δ52 инсуляция в аллеле *ct*⁶ ослабевала: по краю крыла присутствовали многочисленные, но отдельные вырезки, и часть щетинок развивалась. Белок Su(Hw)Δ62 демонстрировал лишь слабую инсуляторную активность: по краю крыла возникали 1–2 вырезки. В линии Su(Hw)Δ114 белок CP190 не связывался с инсуляторным комплексом. В результате инсуляторная активность не проявлялась: мухи имели крылья дикого типа, окраска кутикулярных структур также была близка к норме (рис. 2, б).

Затем мы изучили инсуляцию в линии *y*²*ct*⁶;*su(Hw)*^v/*su(Hw)*^{E8} (рис. 2, б). В этом случае экспрессия белка Su(Hw)^{E8} не восстанавливала инсуляцию. Неожиданно оказалось, что инсуляция частично восстанавливается при введении в линию *y*²*ct*⁶;*su(Hw)*^v/*su(Hw)*^{E8} трансгенов, экспрессирующих производные Su(Hw). В линии Su(Hw)Δ62 количество крыловых вырезок существенно возросло, а в линии Su(Hw)Δ52 мухи имели крыловой фенотип, близкий к *ct*⁶. Даже в линии Su(Hw)Δ114 в аллеле *ct*⁶ проявлялась слабая инсуляция: появлялись отдельные крыловые вырезки. При этом инсуляция в аллеле *y*² восстанавливалась практически полностью (рис. 2, б). Анализ полученных результатов позволяет предположить, что делеционные производные Su(Hw) рекрутируют на сайты инсулятора *gypsy* белок Su(Hw)^{E8}, способный связывать белок CP190, что приводит к восстановлению инсуляции.

Поскольку белок Su(Hw)Δ114 не взаимодействует с белком CP190, то привлечение Su(Hw)^{E8} на Su(Hw)-зависимые сайты хроматина может осуществляться через белок Mod(mdg4)-67.2, который связывается с С-концевым районом Su(Hw) (716–892 а.о.), необходимым для инсуляции и репрессии транскрипции [20, 21]. Чтобы протестировать роль Mod(mdg4)-67.2 в рекрутировании белка Su(Hw)^{E8}, мы использовали трансген Su(Hw)J, экспрессирующий мутантный белок с делецией 144 С-концевых а.о. [16]. В мутантном белке Su(Hw)J (1–801 а.о.) делетирован район взаимодействия с Mod(mdg4)-67.2, поэтому Su(Hw)J связывается только с CP190 (рис. 1, б). На мутантном фоне *y*²*ct*⁶;*su(Hw)*^v/*su(Hw)*² фенотипы мух из линий, экспрессирующих белки Su(Hw)J и Su(Hw)Δ114, схожи: экспрессия *yellow* и *cut* восстанавливается (рис. 2, б). Однако в линии Su(Hw)J на фоне *su(Hw)*^v/*su(Hw)*^{E8} восстановления

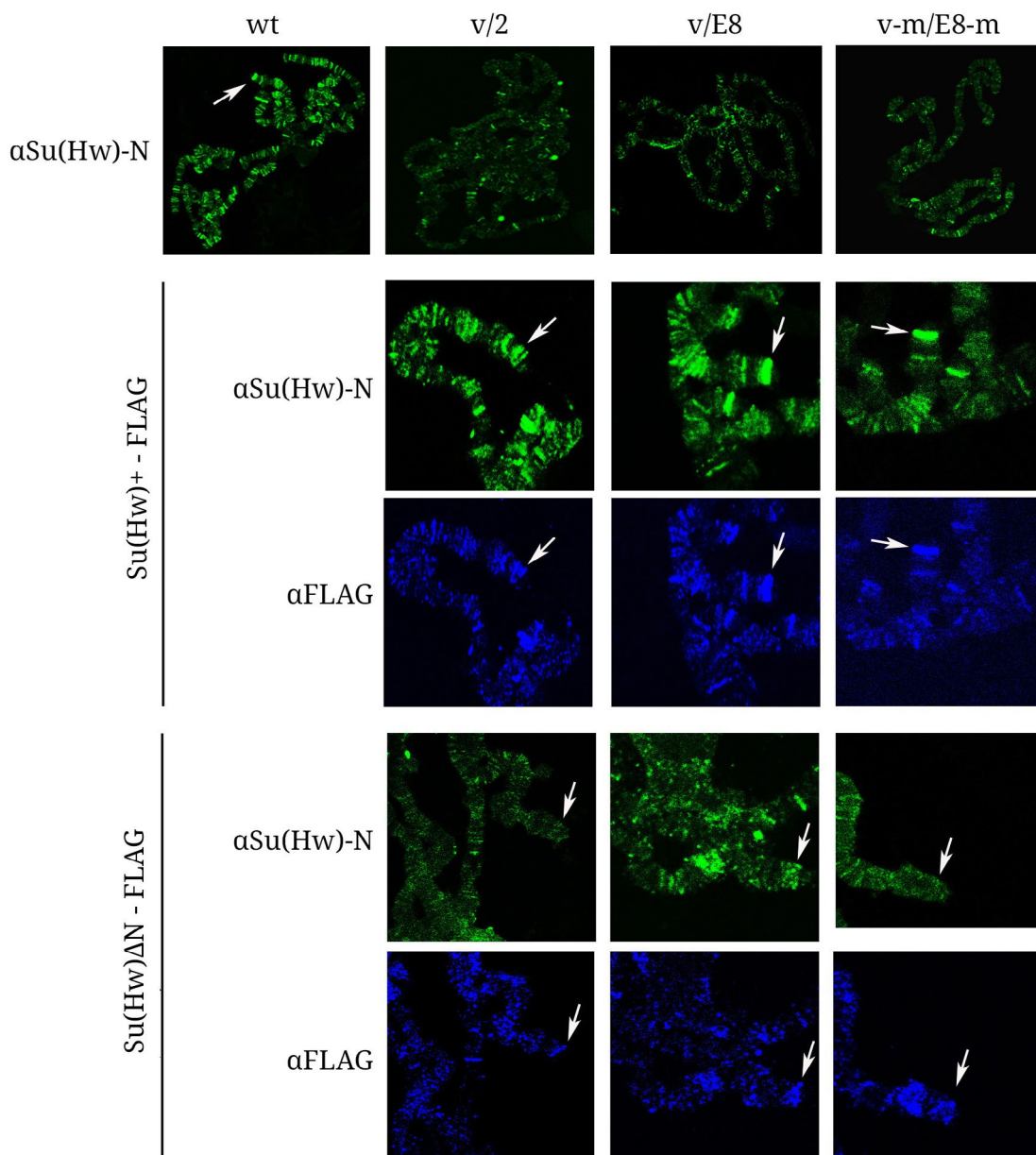


Рис. 3. Связывание белка $Su(Hw)^{E8}$ с политенными хромосомами. Иммуноокрашивание политенных хромосом слюнных желёз личинок третьего возраста из линий y^2ct^6 (wt), y^2ct^6 $su(Hw)^v/su(Hw)^2$ (v/2), $y^2ct^6;su(Hw)^v/su(Hw)^{E8}$ (v/E8), $y^2ct^6;su(Hw)^vmod(mdg4)^{u1}/su(Hw)^{E8}mod(mdg4)^{u1}$ (v-m/E8-m) и из тех же линий, экспрессирующих белок $Su(Hw)\Delta N$ -FLAG или $Su(Hw)^+$ -FLAG. В экспериментах использовали антитела к эпитутопу FLAG (α FLAG) и к N -концевому домену белка $Su(Hw)$ (α Su(Hw)-N). Стрелки указывают на инсерцию *gypsy* на конце хромосомы X

инсуляции не происходило. Полученные данные согласуются с предполагаемой ролью белка $Mod(mdg4)$ -67.2 в привлечении белка $Su(Hw)^{E8}$ на $Su(Hw)$ -зависимые сайты хроматина.

Белок $Mod(mdg4)$ -67.2 опосредует рекрутирование белка $Su(Hw)^{E8}$ на сайты связывания белка $Su(Hw)\Delta N$ с политенными хромосомами.

Чтобы подтвердить рекрутирование белка $Su(Hw)^{E8}$ на сайты хроматина через белок $Mod(mdg4)$ -67.2, мы использовали трансгенные линии, экспрессирующие производную $Su(Hw)\Delta N$ с делецией N -концевого домена $Su(Hw)$ от 1 до 238 а.о., тагетированную эпитутопом 3xFLAG (рис. 1, б) [20].

Производная $Su(Hw)\Delta N$, как и $Su(Hw)\Delta 114$, взаимодействует только с белком $Mod(mdg4)$ -67.2. На политенных хромосомах личинок дрозофилы из линии $y^2ct^6;Su(Hw)\Delta N$ -FLAG/ $Su(Hw)\Delta N$ -FLAG; $su(Hw)^v/su(Hw)^2$ белок $Su(Hw)\Delta N$ можно идентифицировать с помощью антител к FLAG, но не с помощью антител к N -концевому домену (1–150 а.о.) белка $Su(Hw)$ (рис. 1, рис. 3). В линии y^2ct^6 сайты инсерции ретротранспозона *gypsy* находятся на дистальном по отношению к хромоцентру конце хромосомы X. Иммуноокрашивание антителами к FLAG показало, что, в сравнении с полноразмерным белком $Su(Hw)^+$, белок $Su(Hw)\Delta N$ связывается с хро-

тином менее эффективно, так как стабильность связывания Su(Hw) опосредуется белком CP190 (рис. 3) [18].

В линии $y^2ct^6;su(Hw)^v/su(Hw)^{E8}$, как и в линии $y^2ct^6;su(Hw)^v/su(Hw)^2$, антитела к N-концевому домену Su(Hw) не окрашивали Su(Hw)-связывающие сайты. Однако на мутантном фоне $su(Hw)^v/su(Hw)^{E8}$ при экспрессии производной Su(Hw) Δ N эти антитела эффективно окрашивали многочисленные сайты связывания Su(Hw), в том числе сайты *gypsy* на конце хромосомы X (рис. 3). Следовательно, антитела к N-концевому домену идентифицировали полноразмерный белок Su(Hw) E8 , который рекрутировался на хроматин через взаимодействие с белком Su(Hw) Δ N.

Введение мутации $mod(mdg4)^{u1}$, полностью инактивирующей белок Mod(mdg4)-67.2, не изменило окрашивание антителами к FLAG в линиях, экспрессирующих Su(Hw) Δ N. Тем не менее в линии $y^2ct^6;Su(Hw)\Delta N-FLAG/Su(Hw)\Delta N-FLAG;su(Hw)^vmod(mdg4)^{u1}/su(Hw)^{E8}mod(mdg4)^{u1}$ окрашивание антителами к N-концевому домену Su(Hw) полностью исчезло (рис. 3). Таким образом, в отсутствии белка Mod(mdg4)-67.2 белок Su(Hw) Δ N утрачивал способность взаимодействовать с Su(Hw) E8 и рекрутировать его на свои сайты связывания.

Белок Mod(mdg4)-67.2 опосредует ассоциацию белка Su(Hw) E8 с сайтами связывания белка Su(Hw) Δ N. Для дальнейшего подтверждения полученных результатов с помощью иммунопреципитации хроматина мы протестировали уровень связывания белка Su(Hw) E8 в линии $y^2ct^6;su(Hw)^v/su(Hw)^{E8}$ с пятью наиболее исследованными Su(Hw)-зависимыми инсуляторами [41, 42]. Для детекции белка Su(Hw) E8 использовали антитела к N-концевому домену Su(Hw). Как ожидалось, белок Su(Hw) не детектировался на тестируемых сайтах ни на мутантном фоне $su(Hw)^v/su(Hw)^2$, ни на фоне $su(Hw)^v/su(Hw)^{E8}$ (рис. 4, а).

Затем, используя антитела к FLAG, мы продемонстрировали, что в линиях, экспрессирующих производную Su(Hw) Δ N-FLAG, белок Su(Hw) Δ N связывается со всеми SBS (Su(Hw) binding sites, сайты связывания белка Su(Hw)) как в присутствии, так и в отсутствии белка Mod(mdg4)-67.2 (рис. 4, б). Введение мутации $mod(mdg4)^{u1}$ несколько снижало уровень связывания Su(Hw), поскольку Mod(mdg4)-67.2, так же как и CP190, стабилизирует ассоциацию инсуляторного комплекса с SBS [20].

Анализ уровня связывания Su(Hw) в линии $y^2ct^6;Su(Hw)\Delta N-FLAG/Su(Hw)\Delta N-FLAG;su(Hw)^v/su(Hw)^2$ показал, что белок отсутствует на четырёх из пяти сайтов (рис. 4, в). Введение в эту линию мутации $mod(mdg4)^{u1}$ не влияло на связывание Su(Hw). Присутствие некоторого количества Su(Hw) на наиболее эффективно связывающем сайте 62D объясняется остаточной экспрессией в аллеле $su(Hw)^2$ [34].

Это ещё раз подтверждает, что антитела к N-концевому домену Su(Hw) способны узнавать нативный белок, но не мутантную производную Su(Hw) Δ N.

В линии $y^2ct^6;Su(Hw)\Delta N-FLAG/Su(Hw)\Delta N-FLAG;su(Hw)^v/su(Hw)^{E8}$ уровень связывания белка Su(Hw) на всех тестируемых сайтах возрастал в сравнении с мутантным фоном $su(Hw)^v/su(Hw)^2$ в 1,5–3 раза (рис. 4, в). При введении мутации $mod(mdg4)^{u1}$ Su(Hw) E8 переставал связываться с четырьмя сайтами, а на сайте 62D его связывание снижалось до уровня мутантного фона $su(Hw)^v/su(Hw)^2$. Полученные данные полностью подтверждают, что белок Mod(mdg4)-67.2 играет решающую роль во взаимодействиях между комплексом, формирующимся на Su(Hw)-зависимых сайтах, и белком Su(Hw) E8 .

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Полученные результаты демонстрируют, что через взаимодействие с белком Mod(mdg4)-67.2 мутантный белок Su(Hw) E8 , не способный связываться с консенсусной последовательностью ДНК, может не только рекрутироваться на SBS, но и усиливать инсуляторную активность Su(Hw)-зависимых комплексов. Согласно предложенной ранее модели [33], спеклы являются местом формирования белковых комплексов, которые в дальнейшем связываются с ДНК. Изоформы Mod(mdg4) и белок CP190 принимают участие в формировании спеклов и привлекают в их состав архитектурные белки, в том числе белок Su(Hw). Можно предположить, что в спеклах происходит образование комплекса Su(Hw) Δ N-Su(Hw) E8 /CP190, который стабилизируется мултимеризацией белка Mod(mdg4)-67.2, взаимодействующего со всеми компонентами этого комплекса. В результате последующего связывания комплекса с SBS белки Su(Hw) E8 /CP190 также рекрутируются на них, что приводит к частичному восстановлению активности инсулятора *gypsy*, зависящей от белка CP190.

Полученные результаты позволяют предположить, что белок Su(Hw) способен рекрутироваться на хроматиновые Su(Hw)-связывающие сайты без непосредственного взаимодействия с консенсусной последовательностью ДНК. Необходимо отметить, что почти во всех регуляторных элементах SBS представлены в единичном количестве [41]. Рекрутирование на единичные SBS не связанного с хроматином белка Su(Hw) может увеличивать эффективность привлечения белков-партнёров, тем самым повышая функциональную активность Su(Hw)-зависимого инсулятора. Также белки Su(Hw), не ассоциированные с ДНК, в процессе репликации могут связываться со вновь синтезируемой ДНК, конкурируя с нуклеосомами, и таким образом эффективно воспроизводить инсуляторы

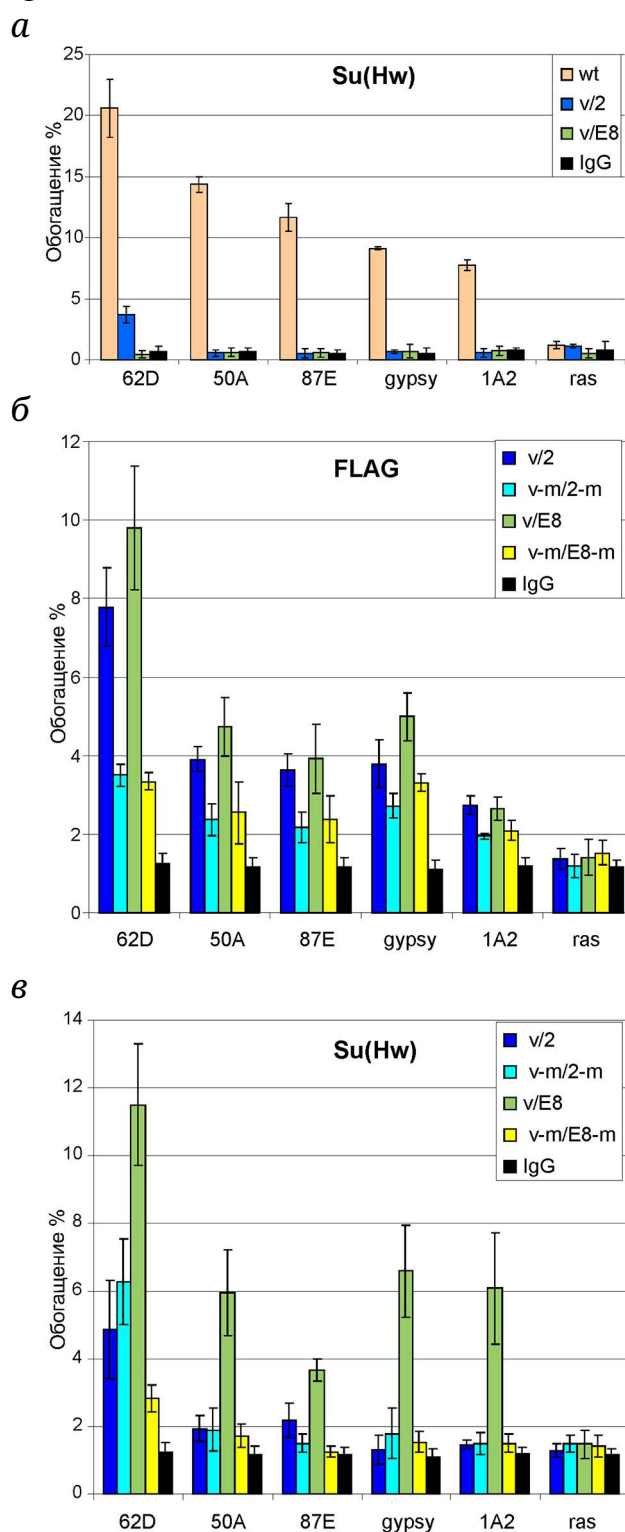


Рис. 4. Связывание белка Su(Hw)^{E8} с SBS. *а* – Тестирование связывания белка Su(Hw) в линиях y^{2ct6} с помощью антител к N-концевому домену Su(Hw). *б* – Тестирование связывания белка Su(Hw) ΔN -FLAG/Su(Hw) ΔN -FLAG с помощью антител к N-концевому домену Su(Hw). *в* – Тестирование связывания белка Su(Hw)^{E8} в линиях y^{2ct6} ; Su(Hw) ΔN -FLAG/Su(Hw) ΔN -FLAG с помощью антител к N-концевому домену Su(Hw). Кодировочную область гена *ras64B* (*ras*) использовали как контроль, не содержащий сайты связывания белка Su(Hw). Процент обогащения иммунопреципитированной ДНК (ось Y) рассчитывали относительно количества загруженной ДНК. Внизу (ось X) указаны названия выбранных Su(Hw)-зависимых сайтов. Показано стандартное отклонение для трёх независимых биологических повторностей. Уровни значимости (критерий Стьюдента) $p < 0,05$. Обозначения: wt – дикий тип; v-m/2-m – сочетание мутаций *su(Hw)^vmod(mdg4)^{u1}/su(Hw)²mod(mdg4)^{u1}*; IgG – иммуноглобулины. Остальные обозначения – как на рис. 2 и 3

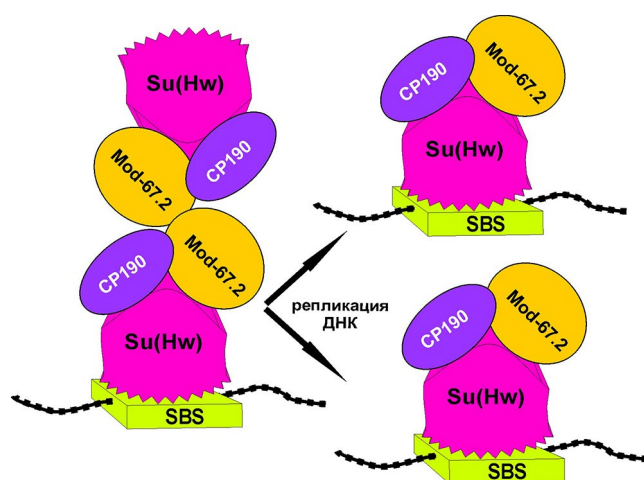


Рис. 5. Модель рекрутирования Su(Hw)-зависимых комплексов на SBS в процессе репликации ДНК

в процессе деления клетки (рис. 5). Для экспериментального подтверждения предложенной модели необходимы дальнейшие исследования механизмов формирования инсуляторных комплексов в спеклах и на хроматине.

Вклад авторов. А.К. Головнин – концепция и руководство работой; Л.С. Мельникова, В.В. Молодина, А.К. Головнин, П.Г. Георгиев – проведение экспериментов; Л.С. Мельникова, А.К. Головнин, П.Г. Георгиев – обсуждение результатов исследования; А.К. Головнин, Л.С. Мельникова, П.Г. Георгиев – написание текста; А.К. Головнин, П.Г. Георгиев – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда. Все эксперименты, за исключением фенотипического анализа трансгенных линий, выполнены за счёт гранта № 21-14-00205. Фенотипический анализ выполнен за счёт гранта № 19-74-30026-Р.

Благодарности. В работе использовали оборудование Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cavalleiro, G. R., Pollex, T., and Furlong, E. E. (2021) To loop or not to loop: what is the role of TADs in enhancer function and gene regulation? *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **67**, 119-129, <https://doi.org/10.1016/j.gde.2020.12.015>.
2. Kim, J., and Dean, A. (2021) Enhancers navigate the three-dimensional genome to direct cell fate decisions, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **71**, 101-109, <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2021.06.005>.
3. Kyrchanova, O., Sokolov, V., and Georgiev, P. (2023) Mechanisms of interaction between enhancers and promoters in three *Drosophila* model systems, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 2855, <https://doi.org/10.3390/ijms24032855>.
4. Furlong, E. E. M., and Levine, M. (2018) Developmental enhancers and chromosome topology, *Science*, **361**, 1341-1345, <https://doi.org/10.1126/science.aau0320>.
5. Melnikova, L. S., Georgiev, P. G., and Golovnin, A. K. (2020) The functions and mechanisms of action of insulators in the genomes of higher eukaryotes, *Acta Naturae*, **12**, 15-33, <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11144>.
6. Schoborg, T., and Labrador, M. (2014) Expanding the roles of chromatin insulators in nuclear architecture, chromatin organization and genome function, *Cell. Mol. Life Sci.*, **71**, 4089-4113, <https://doi.org/10.1007/s00018-014-1672-6>.
7. Chen, D., and Lei, E. P. (2019) Function and regulation of chromatin insulators in dynamic genome organization, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **58**, 61-68, <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.02.001>.
8. Kyrchanova, O., Maksimenko, O., Stakhov, V., Ivlieva, T., Parshikov, A., Studitsky, V. M., and Georgiev, P. (2013) Effective blocking of the white enhancer requires cooperation between two main mechanisms suggested for the insulator function, *PLoS Genet.*, **9**, e1003606, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003606>.
9. Savitskaya, E., Melnikova, L., Kostuchenko, M., Kravchenko, E., Pomerantseva, E., Boikova, T., Chetverina, D., Parshikov, A., Zobacheva, P., Gracheva, E., et al. (2006) Study of long-distance functional interactions between Su(Hw) insulators that can regulate enhancer-promoter communication in *Drosophila melanogaster*, *Mol. Cell Biol.*, **26**, 754-761, <https://doi.org/10.1128/MCB.26.3.754-761.2006>.
10. Maksimenko, O. G., Fursenko, D. V., Belova, E. V., and Georgiev, P. G. (2021) CTCF as an example of DNA-binding transcription factors containing clusters of C2H2-type zinc fingers, *Acta Naturae*, **13**, 31-46, <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11206>.
11. Kyrchanova, O. V., Bylino, O. V., and Georgiev, P. G. (2022) Mechanisms of enhancer-promoter communication and chromosomal architecture in mammals and *Drosophila*, *Front. Genet.*, **13**, 1081088, <https://doi.org/10.3389/fgene.2022.1081088>.
12. Roseman, R. R., Pirrotta, V., and Geyer, P. K. (1993) The su(Hw) protein insulates expression of the *Drosophila melanogaster* white gene from chromosomal position-effects, *EMBO J.*, **12**, 435-442, <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05675.x>.

13. Holdridge, C., and Dorsett, D. (1991) Repression of *hsp70* heat shock gene transcription by the suppressor of hairy-wing protein of *Drosophila melanogaster*, *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1894-1900, <https://doi.org/10.1128/mcb.11.4.1894-1900.1991>.
14. Geyer, P. K., and Corces, V. G. (1992) DNA position-specific repression of transcription by a *Drosophila* zinc finger protein, *Genes Dev.*, **6**, 1865-1873, <https://doi.org/10.1101/gad.6.10.1865>.
15. Soshnev, A. A., Baxley, R. M., Manak, J. R., Tan, K., and Geyer, P. K. (2013) The insulator protein Suppressor of Hairy-wing is an essential transcriptional repressor in the *Drosophila* ovary, *Development*, **140**, 3613-3623, <https://doi.org/10.1242/dev.094953>.
16. Melnikova, L., Elizar'ev, P., Erokhin, M., Molodina, V., Chetverina, D., Kostyuchenko, M., Georgiev, P., and Golovnin, A. (2019) The same domain of Su(Hw) is required for enhancer blocking and direct promoter repression, *Sci. Rep.*, **9**, 5314, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41761-6>.
17. Baxley, R. M., Bullard, J. D., Klein, M. W., Fell, A. G., Morales-Rosado, J. A., Duan, T., and Geyer, P. K. (2017) Deciphering the DNA code for the function of the *Drosophila* polydactyl zinc finger protein suppressor of Hairy-wing, *Nucleic Acids Res.*, **45**, 4463-4478, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx040>.
18. Melnikova, L., Kostyuchenko, M., Molodina, V., Parshikov, A., Georgiev, P., and Golovnin, A. (2018) Interactions between BTB domain of CP190 and two adjacent regions in Su(Hw) are required for the insulator complex formation, *Chromosoma*, **127**, 59-71, <https://doi.org/10.1007/s00412-017-0645-6>.
19. Pai, C. Y., Lei, E. P., Ghosh, D., and Corces, V. G. (2004) The centrosomal protein CP190 is a component of the gypsy chromatin insulator, *Mol. Cell*, **16**, 737-748, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2004.11.004>.
20. Melnikova, L., Kostyuchenko, M., Molodina, V., Parshikov, A., Georgiev, P., and Golovnin, A. (2017) Multiple interactions are involved in a highly specific association of the Mod(mdg4)-67.2 isoform with the Su(Hw) sites in *Drosophila*, *Open Biol.*, **7**, 170150, <https://doi.org/10.1098/rsob.170150>.
21. Ghosh, D., Gerasimova, T. I., and Corces, V. G. (2001) Interactions between the Su(Hw) and Mod(mdg4) proteins required for gypsy insulator function, *EMBO J.*, **20**, 2518-2527, <https://doi.org/10.1093/emboj/20.10.2518>.
22. Gause, M., Morcillo, P., and Dorsett, D. (2001) Insulation of enhancer-promoter communication by a gypsy transposon insert in the *Drosophila cut* gene: cooperation between suppressor of hairy-wing and modifier of mdg4 proteins, *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 4807-4817, <https://doi.org/10.1128/MCB.21.14.4807-4817.2001>.
23. Bonchuk, A., Balagurov, K., and Georgiev, P. (2023) BTB domains: A structural view of evolution, multimerization, and protein-protein interactions, *Bioessays*, **45**, e2200179, <https://doi.org/10.1002/bies.202200179>.
24. Bonchuk, A., Denisov, S., Georgiev, P., and Maksimenko, O. (2011) *Drosophila* BTB/POZ domains of "ttk group" can form multimers and selectively interact with each other, *J. Mol. Biol.*, **412**, 423-436, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2011.07.052>.
25. Glenn, S. E., and Geyer, P. K. (2019) Investigation of the developmental requirements of *Drosophila* HP1 and insulator protein partner, HIPPI, *G3 (Bethesda)*, **9**, 345-357, <https://doi.org/10.1534/g3.118.200705>.
26. Melnikova, L., Molodina, V., Erokhin, M., Georgiev, P., and Golovnin, A. (2019) HIPPI stabilizes the interaction between CP190 and Su(Hw) in the *Drosophila* insulator complex, *Sci. Rep.*, **9**, 19102, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55617-6>.
27. Stow, E. C., Simmons, J. R., An, R., Schoborg, T. A., Davenport, N. M., and Labrador, M. (2022) A *Drosophila* insulator interacting protein suppresses enhancer-blocking function and modulates replication timing, *Gene*, **819**, 146208, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2022.146208>.
28. Kurshakova, M., Maksimenko, O., Golovnin, A., Pulina, M., Georgieva, S., Georgiev, P., and Krasnov, A. (2007) Evolutionarily conserved E(y)2/Sus1 protein is essential for the barrier activity of Su(Hw)-dependent insulators in *Drosophila*, *Mol. Cell*, **27**, 332-338, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.05.035>.
29. Matzat, L. H., Dale, R. K., Moshkovich, N., and Lei, E. P. (2012) Tissue-specific regulation of chromatin insulator function, *PLoS Genet.*, **8**, e1003069, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003069>.
30. King, M. R., Matzat, L. H., Dale, R. K., Lim, S. J., and Lei, E. P. (2014) The RNA-binding protein Rumpelstiltskin antagonizes gypsy chromatin insulator function in a tissue-specific manner, *J. Cell. Sci.*, **127**, 2956-2966, <https://doi.org/10.1242/jcs.151126>.
31. Schoborg, T., Rickels, R., Barrios, J., and Labrador, M. (2013) Chromatin insulator bodies are nuclear structures that form in response to osmotic stress and cell death, *J. Cell Biol.*, **202**, 261-276, <https://doi.org/10.1083/jcb.201304181>.
32. Golovnin, A., Melnikova, L., Volkov, I., Kostyuchenko, M., Galkin, A. V., and Georgiev, P. (2008) "Insulator bodies" are aggregates of proteins but not of insulators, *EMBO Rep.*, **9**, 440-445, <https://doi.org/10.1038/embo.2008.32>.
33. Golovnin, A., Volkov, I., and Georgiev, P. (2012) SUMO conjugation is required for the assembly of *Drosophila* Su(Hw) and Mod(mdg4) into insulator bodies that facilitate insulator complex formation, *J. Cell Sci.*, **125**, 2064-2074, <https://doi.org/10.1242/jcs.100172>.
34. Harrison, D. A., Gdula, D. A., Coyne, R. S., and Corces, V. G. (1993) A leucine zipper domain of the suppressor of Hairy-wing protein mediates its repressive effect on enhancer function, *Genes Dev.*, **7**, 1966-1978, <https://doi.org/10.1101/gad.7.10.1966>.

35. Melnikova, L., Kostyuchenko, M., Parshikov, A., Georgiev, P., and Golovnin, A. (2018) Role of Su(Hw) zinc finger 10 and interaction with CP190 and Mod(mdg4) proteins in recruiting the Su(Hw) complex to chromatin sites in *Drosophila*, *PLoS One*, **13**, e0193497, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193497>.
36. Georgiev, P., and Kozycina, M. (1996) Interaction between mutations in the *suppressor of Hairy wing* and *modifier of mdg4* genes of *Drosophila melanogaster* affecting the phenotype of *gypsy*-induced mutations, *Genetics*, **142**, 425-436, <https://doi.org/10.1093/genetics/142.2.425>.
37. Murawska, M., and Brehm, A. (2012) Immunostaining of *Drosophila* polytene chromosomes to investigate recruitment of chromatin-binding proteins, *Methods Mol. Biol.*, **809**, 267-277, https://doi.org/10.1007/978-1-61779-376-9_18.
38. Geyer, P. K., and Corces, V. G. (1987) Separate regulatory elements are responsible for the complex pattern of tissue-specific and developmental transcription of the *yellow* locus in *Drosophila melanogaster*, *Genes Dev.*, **1**, 996-1004, <https://doi.org/10.1101/gad.1.9.996>.
39. Geyer, P. K., Spana, C., and Corces, V. G. (1986) On the molecular mechanism of *gypsy*-induced mutations at the *yellow* locus of *Drosophila melanogaster*, *EMBO J.*, **5**, 2657-2662, <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04548.x>.
40. Jack, J., Dorsett, D., Delotto, Y., and Liu, S. (1991) Expression of the *cut* locus in the *Drosophila* wing margin is required for cell type specification and is regulated by a distant enhancer, *Development*, **113**, 735-747, <https://doi.org/10.1242/dev.113.3.735>.
41. Parnell, T. J., Kuhn, E. J., Gilmore, B. L., Helou, C., Wold, M. S., and Geyer, P. K. (2006) Identification of genomic sites that bind the *Drosophila* suppressor of Hairy-wing insulator protein, *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 5983-5993, <https://doi.org/10.1128/MCB.00698-06>.
42. Kuhn-Parnell, E. J., Helou, C., Marion, D. J., Gilmore, B. L., Parnell, T. J., Wold, M. S., and Geyer, P. K. (2008) Investigation of the properties of non-*gypsy* suppressor of hairy-wing-binding sites, *Genetics*, **179**, 1263-1273, <https://doi.org/10.1534/genetics.108.087254>.

ROLE OF Mod(mdg4)-67.2 PROTEIN IN INTERACTIONS BETWEEN Su(Hw)-DEPENDENT COMPLEXES AND THEIR RECRUITMENT TO CHROMATIN

L. S. Melnikova*, V. V. Molodina, P. G. Georgiev, and A. K. Golovnin

Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, 119334 Moscow, Russia; e-mail: lsm73@mail.ru

Su(Hw) belongs to a class of proteins that organize chromosome architecture, determine promoter activity, and participate in the formation of boundaries/insulators between regulatory domains. This protein contains a cluster of 12 zinc fingers of the C2H2 type, some of which are responsible for binding to the consensus site. The Su(Hw) protein forms a complex with the Mod(mdg4)-67.2 and the CP190 proteins, where the last one binds to all known *Drosophila* insulators. To further study the functioning of Su(Hw)-dependent complexes, we used the previously described *su(Hw)^{E8}* mutation, with inactive seventh zinc finger, which produced the mutant protein losing the ability to bind to the consensus site. The present work shows that the Su(Hw)^{E8} protein continues to directly interact with the CP190 and Mod(mdg4)-67.2 proteins. Through interaction with Mod(mdg4)-67.2, the Su(Hw)^{E8} protein can be recruited into Su(Hw)-dependent complexes formed on chromatin and enhance their insulator activity. Our results demonstrate that DNA-unbound Su(Hw)-dependent complexes can be recruited to Su(Hw)-binding sites through specific protein-protein interactions that are stabilized by Mod(mdg4)-67.2.

Keywords: transcription regulation, Su(Hw), Mod(mdg4), protein-protein interactions, chromatin insulators