

УДК 575.22:595.773.4

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИИ БЕЛКОВ *OUIB* И *NOM* С ГЕТЕРОХРОМАТИНОМ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2024 г. Ю. В. Пекина, В. А. Бабоша*, академик РАН П. Г. Георгиев, А. А. Федотова**

Поступило 10.11.2023 г.

После доработки 30.12.2023 г.

Принято к публикации 11.11.2023 г.

У дрозофилы большая группа активно транскрибируемых генов находится в прицентромерном гетерохроматине. Предполагается, что гетерохроматиновые белки привлекают транскрипционные факторы к промоторам генов. Ранее было показано, что два белка, *ouib* и *nom*, связываются с промоторами гетерохроматиновых генов *nvd* и *spok*. Интересно, что *ouib* и *nom* являются паралогами белка M1BP, который связывается с промоторами эухроматиновых генов. Нами было показано, что, как и M1BP, белки *ouib* и *nom* взаимодействует с белком CP190, который участвует в привлечение транскрипционных комплексов на промоторы. В отличие от гетерохроматиновых белков *ouib* и *nom* не взаимодействуют с основным гетерохроматиновым белком HP1a и связываются с эухроматиновыми промоторами на политенных хромосомах из слюнных желез личинок. Полученные результаты предполагают новый механизм привлечения транскрипционных факторов в гетерохроматиновый компартмент ядра.

Ключевые слова: гетерохроматин, CP190, белки с цинковыми пальцами, архитектурные C2H2 белки, ZAD-домен.

DOI: 10.31857/S2686738924020161, EDN: WEMDXK

У дрозофилы эухроматин и гетерохроматин представляют собой два независимых компартмента, отличающихся набором хроматиновых белков и нуклеосомных модификаций [1, 2]. В последних исследованиях было показано, что гетерохроматин активно транскрибируется, и в нем локализованы многие гены домашнего хозяйства, которые имеют высокий уровень экспрессии [2]. При этом промоторы генов, расположенных в эухроматине и гетерохроматине, могут эффективно инициировать транскрипцию только в своем компартменте [1, 2]. В отличие от прокариот большая часть промоторов высших эукариот, включая дрозофилу и человека, не имеет выраженных мотивов, с которыми могут связываться общие факторы транскрипции [3]. Согласно одной из моделей ключевую роль в организации промоторов играют белки, содержащие кластеры цинковых пальцев C2H2-типа (C2H2-белки), которые связываются со специфичными относительно длинными (12–15 п.н.) мотивами в промоторах генов, что приводит к формированию открытого хроматина и рекрутированию TFIIID-комплекса

[3, 4]. У дрозофилы существует обширный класс белков, которые содержат на С-конце кластер, состоящий из 5 C2H2-доменов, а на N-конце находится ZAD (Zinc-finger Associated Domain) домен, который обеспечивает гомодимеризацию белка [5, 6]. ZAD-домен и C2H2-кластеры соединены неструктурированным линкером. Наиболее хорошо описанным у дрозофилы является белок M1BP, который связывается с мотивом, расположенным в примерно в 2000 промоторах, определяющих активность эухроматиновых генов [7, 8]. С неструктурированным линкером белка M1BP связывается белок CP190, который участвует в рекрутировании комплексов стимулирующих транскрипцию [9, 10].

Ген *m1bp* находится в кластере (85A9 на хромосомном плече 3R), который включает еще четыре гена, кодирующих ZAD-C2H2-белки — CG8159, *ranshi*, *ouib* и *nom* (рис. 1б). Все эти гены паралогичны и, предположительно, являются результатом тандемной дупликации в процессе эволюции. Неожиданно оказалось, что гены *ouib* и *nom* кодируют белки, которые связываются с промоторами генов, расположенными в гетерохроматине [11–13]. Ранее были найдены два других ZAD-C2H2-белка, *odj* и *nnk*, которые эффективно связываются с регуляторными последовательностями в гетерохроматине [14]. Было показано, что эти белки взаимодействуют с основным белком гетерохроматина HP1a, что,

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)

*E-mail: v.babosha@gmail.com

**E-mail: annafedotova@list.ru

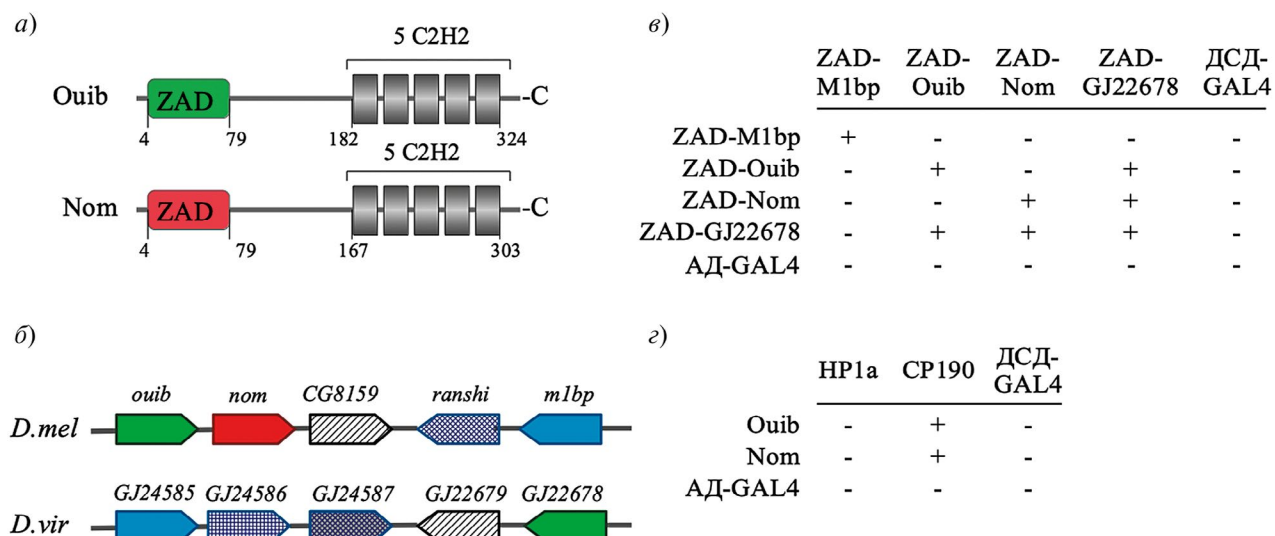


Рис. 1. Доменная структура белков *ouib* и *nom*. Указаны порядковые номера аминокислотных остатков, соответствующих границам доменов (а); геномное расположение генов *m1bp*, *ouib* и *nom* в кластере у *D. melanogaster* и *D. virilis*. Для обозначения ортологов использованы одинаковые цвета (б); исследование взаимодействия между ZAD-доменами в ДДС. Фрагменты ZAD были слиты с ДНК-связывающим доменом GAL4 (ДСД), и исследовано их взаимодействие с фрагментами, слитым с активационным доменом GAL4 (АД). Результаты представлены в колонках, где + и – означают наличие или отсутствие взаимодействия соответственно. В качестве положительного контроля проверялась способность ZAD-доменов к димеризации, а в качестве отрицательного контроля выполнялось тестирование на наличие взаимодействия только с активационным (АД) или ДНК-связывающим (ДСД) доменом белка GAL4 (в); исследование взаимодействия полноразмерных белков *Ouib* и *Nom*, слитых с АД GAL4, с полноразмерными белками CP190 и HP1a, слитыми с ДСД GAL4 (г). Остальные обозначения – такие же, как в (в).

как предполагается, определяет преимущественную локализацию этих белков в гетерохроматиновом компартменте.

Целью настоящей работы стало исследование, каким образом белки *ouib* и *nom* приобретают способность связываться с промоторами генами, находящимися в областях гетерохроматина. Ранее было показано, что ZAD-домены даже близких C2H2 паралогов преимущественно формируют только гомодимеры [5, 6]. Так как ZAD-домены белков M1BP, *ouib* и *nom* имеют высокую степень сходства последовательностей, то была протестирована способность ZAD-доменов к формированию гетеродимеров. Для этого мы использовали метод дрожжевой двугибридной системы (ДДС). Были созданы конструкции, в которых последовательности ZAD-доменов белков *ouib*, *nom* и M1BP были клонировали в одну рамку считывания с активационным доменом (АД) или ДНК-связывающим доменом (ДСД) белка GAL4. Поиск ортологов у видов *Drosophila* показал, что ортолог *ouib* присутствует у всех видов, тогда как его дупликация – ген *nom* произошла позже. Так, ортологи *nom* отсутствуют у *D. virilis* (рис. 1б). Мы протестировали в ДДС взаимодействие ZAD-доменов белков *ouib* и *nom* с ортологом *ouib* *D. virilis* (GJ22678). Анализ взаимодействия показал, что ZAD-до-

мены M1BP, *ouib* и *nom* гомодимеризуются, но не образуют гетеродимеров. При этом оба белка паралога *ouib* и *nom* взаимодействуют с ортологом GJ22678 *D. virilis* (см. рис. 1в), что является дополнительным доказательством того, что они произошли от одного гена.

Известно, что многие белки, ассоциированные с гетерохроматином, взаимодействуют с белком HP1a через аминокислотный мотив PxxL (где x – любая аминокислота). Однако, анализ последовательностей *ouib* и *nom* не выявил данного мотива. Для проверки прямого взаимодействия белков с HP1a в ДДС были получены конструкции, в которых последовательности кДНК белков *ouib* и *nom* были клонированы в одну рамку считывания с АД GAL4 и конструкция, в которой кДНК белка HP1a находилась в одной рамке считывания с ДСД GAL4. В результате, в ДДС прямое взаимодействие *ouib* и *nom* с HP1a не обнаружено (см. рис. 1г).

Многие ZAD-C2H2-белки, имеющие сайты связывания в промоторах генов, взаимодействуют с белком CP190, в том числе рекрутирование CP190 является важным для функциональной активности M1BP [9]. Мы проверили прямое взаимодействие паралогов *ouib* и *nom* с CP190 в ДДС (рис. 1в). Оказалось, что *ouib* и *nom* тоже взаимодействуют с CP190, который связывается исключительно с эухромати-

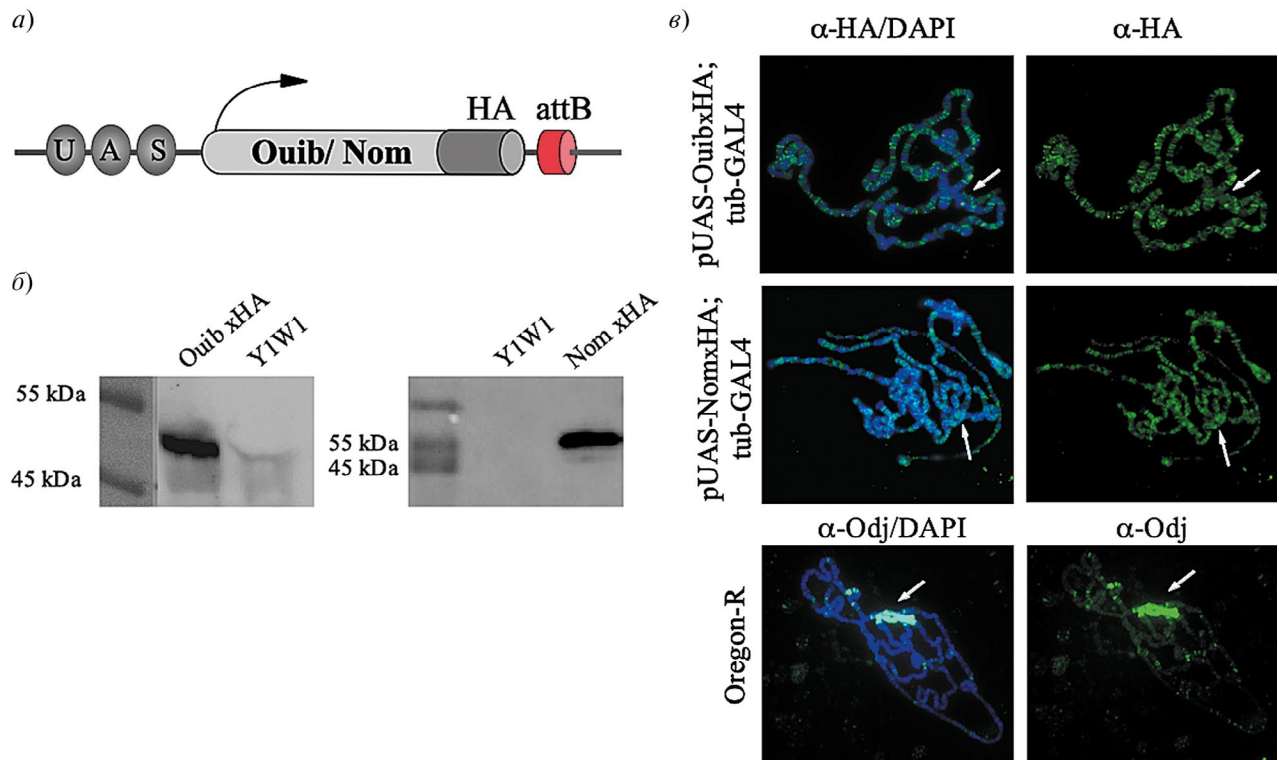


Рис. 2. Схема генетической конструкции, используемой для создания трансгенных мух, экспрессирующих белок, слитый с HA-эпитопом (а); вестерн-блот анализ белковых экстрактов из 2–3-дневных самцов, экспрессирующих OuibxHA и NomxHA, окрашенные антителами к HA-эпитопу (б); политенные хромосомы слюнных желез личинок мух, экспрессирующих OuibxHA и NomxHA. Политенные хромосомы были окрашены антителами к эпитопу HA, ДНК окрашена DAPI. Для сравнения приведено иммуноокрашивание политенных хромосом из линии Oregon-R кроличьими антителами к гетерохроматиновому белку *odj* (в). Стрелками показано положение хромоцентра на разных препаратах политенных хромосом. Масштаб — 10 мкм.

новыми промоторами. Это предполагает роль *ouib* и *nom* в организации эухроматиновых промоторов.

Для исследования полногеномного распределения сайтов связывания белков *ouib* и *nom* была использована модель политенных хромосом из ядер слюнных желез личинок третьего возраста. Политенные хромосомы состоят из междисков, которые представляют собой промоторы, контролирующие экспрессию генов домашнего хозяйства, и дисков, которые соответствуют преимущественно неактивным генам [15]. Области конститутивного гетерохроматина хорошо визуализируются в области прицентромерного гетерохроматина и в теломерах на концах хромосом. Так как *ouib* и *nom* не экспрессируются в слюнных железах, мы использовали индуцируемую систему UAS/GAL4 для экспрессии этих белков. С этой целью были созданы генетические конструкции, в которых кДНК белков *nom* и *ouib* в одной рамке считывания с эпитопом HA были клонированы в вектор pUAS, который содержит последовательность UAS (Upstream activating sequence) и *attB*-сайт для интеграции в геном дрозофилы (рис. 2а). Полученные конструкции были встроены в одно и то же место генома в сайт *attP* 38D

с использованием системы интеграции *phiC31*. Для эктопической экспрессии генов мы скрещивали мух линии, содержащей конструкт pUAS-OuibxHA или pUAS-NomxHA, с мухами линии, экспрессирующей GAL4 под контролем сильного тубулинового промотора (*tub:GAL4*), который обеспечивает высокий уровень транскрипции во всех тканях. Экспрессию белка подтверждали анализом белкового лизата из взрослых мух методом вестерн-блот с использованием антител к HA (см. рис. 2б).

Иммуноокрашивание политенных хромосом показало неожиданные результаты. Оказалось, что белки *ouib* и *nom* имеют множество сайтов связывания в междисках политенных хромосом, но при этом не наблюдается связывания в прицентромерных гетерохроматиновых районах. Таким образом, эктопически экспрессируемые белки не рекрутируются сами по себе в гетерохроматиновый компартмент (см. рис. 2в). Это отличает белки *nom* и *ouib* от белка *odj*, который активно связывается с гетерохроматином политенных хромосом (см. рис. 2в).

Наиболее вероятно, что ген, кодирующий M1BP, является основателем кластера генов (85A9), так как его экспрессия намного выше и белок имеет кон-

сервативные среди дрозофил мотивы связывания в промоторах большой группы генов. Остальные гены кластера, за исключением *ranshi*, имеют слабый уровень экспрессии и, вероятно, связываются с промоторами небольшого количества генов. Так, было показано, что белки *nom* и *ouib* определяют активность промоторов генов *nvd* и *spok*, расположенных в гетерохроматине [11,12]. При этом активация этих промоторов является основной функцией белков *nom* и *ouib*. Как и M1BP, белки *nom* и *ouib* связываются с CP190, рекрутирование которого на промоторы определяет формирование зоны открытого хроматина и активацию транскрипции. Таким образом, белки *nom* и *ouib* по строению и функциям похожи на M1BP. Более того, при избыточной экспрессии белки *nom* и *ouib* связываются с промоторами (междисками) генов домашнего хозяйства, которые находятся в эухроматине и не наблюдается их ассоциации с прицентромерным гетерохроматином. ZAD-домены трех близких паралога M1BP, *nom* и *ouib* формируют только гомодимеры. Таким образом, ZAD-домены определяют функциональную независимость недавно возникших C2H2-белков и блокируют их взаимодействие с M1BP. Полученные результаты свидетельствуют о том, что механизм рекрутирования *nom* и *ouib* в гетерохроматиновые районы принципиально отличается от описанного ранее для *odj* и *nnk*, для которых показано взаимодействие через консенсусный мотив с HP1a. Белки *nom* и *ouib* не взаимодействуют напрямую с основным гетерохроматиновым белком HP1a.

Наиболее вероятно, что *nom* и *ouib* рекрутируются в гетерохроматиновый компартмент с помощью белка-партнера, который также участвует в формировании активных промоторов *nvd* и *spok* генов. Одним из потенциальных белков-партнеров может быть большой (около 2000 а.о.) ZAD-C2H2 белок Molting Defective (Mld), который также связывается с промоторами *nvd* и *spok* [12]. Белок Mld эффективно экспрессируется на всех стадиях развития и, вероятно, имеет много различных функций в регуляции экспрессии генов. Необходимы дальнейшие исследования для ответа на вопрос, могут ли белки *ouib* и *nom* рекрутироваться в гетерохроматиновый компартмент в результате взаимодействия с другими ZAD-C2H2-белками, которые ассоциированы с основными гетерохроматиновыми белками.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет Российского научного фонда, грант № 22-24-00894.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В соответствии с пунктом 3 главы 1 Директивы 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. о защите животных, ис-

пользуемых в научных целях, требования биоэтики не распространяются на объект данного исследования.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтверждают отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Marsano R.M., Giordano E., Messina G., et al. A New Portrait of Constitutive Heterochromatin: Lessons from *Drosophila melanogaster* // Trends in Genetics. 2019. Vol. 35. A New Portrait of Constitutive Heterochromatin. № 9. P. 615–631.
2. Saha P., Sowpati D. T., Soujanya M., et al. Interplay of pericentromeric genome organization and chromatin landscape regulates the expression of *Drosophila melanogaster* heterochromatic genes // Epigenetics & Chromatin. 2020. Vol. 13. № 1. P. 41.
3. Vo Ngoc L., Kassavetis G.A., Kadonaga J.T. The RNA Polymerase II Core Promoter in *Drosophila* // Genetics. — 2019. — Vol. 212. — № 1. — P. 13–24.
4. Kyrchanova O. V., Bylino O. V., Georgiev P. G. Mechanisms of enhancer-promoter communication and chromosomal architecture in mammals and *Drosophila* / O.V. Kyrchanova, O.V. Bylino, P. G. Georgiev // Frontiers in Genetics. 2022. Vol. 13. P. 1081088.
5. Bonchuk A.N., Boyko K., Nikilaeva A.Y., et al. Structural insights into highly similar spatial organization of zinc-finger associated domains with a very low sequence similarity // Structure (London, England: 1993). 2022. Vol. 30. № 7. P. 1004–1015.e4.
6. Bonchuk A.N., Boyko K., Fedotova A. A., et al. Structural basis of diversity and homodimerization specificity of zinc-finger-associated domains in *Drosophila* // Nucleic Acids Research. 2021. Vol. 49. № 4. P. 2375–2389.
7. Baumann D.G., Gilmour D.S. A sequence-specific core promoter-binding transcription factor recruits TRF2 to coordinately transcribe ribosomal protein genes // Nucleic Acids Research. 2017. Vol. 45. № 18. P. 10481–10491.
8. Li J., Gilmour D.S. Distinct mechanisms of transcriptional pausing orchestrated by GAGA factor and M1BP, a novel transcription factor / J. Li, D.S. Gilmour // The EMBO Journal. 2013. Vol. 32. № 13. P. 1829–1841.
9. Bag I., Shue C., Rosin L. M1BP cooperates with CP190 to activate transcription at TAD borders and promote chromatin insulator activity // Nature Communications. 2021. Vol. 12. № 1. P. 4170.
10. Sabirov M., Popovich A., Boyko K., et al. Mechanisms of CP190 Interaction with Architectural Proteins in *Drosophila Melanogaster* // International Journal of Molecular Sciences. 2021. Vol. 22. № 22. P. 12400.
11. Komura-Kawa T., Hirota K., Shimada-Niwa Y., et al. The *Drosophila* Zinc Finger Transcription Factor Ouija Board Controls Ecdysteroid Biosynthesis through Specific Regulation of spookier // PLoS genetics. 2015. Vol. 11. № 12. P. e1005712.
12. Uryu O., Komura-Kawa T., Kamiyama T., et al. Cooperative Control of Ecdysone Biosynthesis in *Drosophila* by Tran-

- scription Factors Séance, Ouija Board, and Molting Defective // *Genetics*. 2018. Vol. 208. № 2. P. 605–622.
13. Niwa Y.S., Niwa R. Ouija board: A transcription factor evolved for only one target in steroid hormone biosynthesis in the fruit fly *Drosophila melanogaster* // *Transcription*. 2016. Vol. 7. Ouija board. № 5. P. 196–202.
 14. Kasinathan B., Colmenares S. U., McConnell H., et al. Innovation of heterochromatin functions drives rapid evolution of essential ZAD-ZNF genes in *Drosophila* // *eLife*. 2020. Vol. 9. P.e63368.
 15. Demakova O.V., Demakov S.A., Boldyreva L.V., et al. Faint gray bands in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes are formed by coding sequences of housekeeping genes // *Chromosoma*. 2020. Vol. 129. № 1. P. 25–44.

STUDY OF THE ASSOCIATION OF *OUIB* AND *NOM* WITH HETEROCHROMATIN IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

Y. V. Pekina, V. A. Babosha[#], academician of the RAS P. G. Georgiev, A. A. Fedotova^{##}

Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russian Federation

[#]E-mail: v.babosha@gmail.com

^{##}E-mail: annafedotova@list.ru

In *Drosophila*, a large group of actively transcribed genes is located in pericentromeric heterochromatin. It is assumed that heterochromatic proteins attract transcription factors to gene promoters. Two proteins, *ouib* and *nom*, were previously shown to bind to the promoters of the heterochromatic genes *nvd* and *spok*. Interestingly, *ouib* and *nom* are paralogs of the M1BP protein, which binds to the promoters of euchromatic genes. We have shown that, like M1BP, the *ouib* and *nom* proteins bind to CP190, which is involved in the recruitment of transcription complexes to promoters. Unlike heterochromatic proteins, *ouib* and *nom* do not interact with the major heterochromatic protein HP1a and bind to euchromatic promoters on polytene chromosomes from the larval salivary glands. The results suggest a new mechanism for the recruitment of transcription factors into the heterochromatic compartment of the nucleus.

Keywords: heterochromatin, CP190, zinc finger protein, C2H2-type architectural proteins, zinc-finger associated domain.