

УДК 577.218

БЕЛОК Z4 ДРОЗОФИЛЫ ИМЕЕТ В СВОЕМ СОСТАВЕ ДИМЕРИЗУЮЩИЙСЯ ZAD-ДОМЕН

© 2024 г. А. Н. Бончук¹*, академик РАН П. Г. Георгиев¹

Поступило 25.04.2024 г.

После доработки 22.05.2024 г.

Принято к публикации 22.05.2024 г.

Транскрипционный фактор Z4 (putzig) дрозофилы является одним из ключевых белков, определяющих структуру хроматина у дрозофилы. Он локализуется на границах «дисков» политемных хромосом, которые, согласно современным представлениям, соотносятся с хроматиновыми доменами. Белок Z4 является компонентом белкового комплекса, в который также входят белки Chromator и BEAF-32, для взаимодействия с которыми необходим консервативный домен на N-конце Z4. В данном исследовании мы показали, что этот домен является ZAD (Zinc-finger associated). При помощи биохимических методов подтверждена способность данного домена к димеризации. При помощи AlphaFold2 получена модель димера данного домена, структура которой подтверждена при помощи малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР/SAXS). Структура димера демонстрирует укладку, типичную для ZAD-доменов.

Ключевые слова: архитектурные белки C2H2, цинковые пальцы, фактор транскрипции, ZAD, МУРР

DOI: 10.31857/S2686738924050049

Хромосомы высших эукариот организованы в топологически связанные домены (ТАД). У дрозофилы участки хроматина, разделяющие ТАД, активно взаимодействуют друг с другом, образуя петли хроматина [1]. Было показано, что границы ТАД часто совпадают с междисками политемных хромосом, в которых находятся промоторы генов домашнего хозяйства [2]. Согласно последним данным, в «дисках» политемных хромосом локализован транскрипционно активный хроматин; а в «междисках» расположен хроматин, в котором активность генов подавлена [3]. Формирование границ ТАД у дрозофилы, вероятно, обусловлено связыванием определенных белков, которые в свою очередь привлекают белковые комплексы, изменяющие свойства окружающего хроматина (в частности, сниженный уровень H3K27me3 [4]). Белки Z4/putzig, а также его партнеры Chriz/Chromator и BEAF-32 локализованы в междисках политемных хромосом по данным иммунофлуоресцентного окрашивания [5–7], а также на границах ТАД по данным Hi-C и ChIP-seq анализов [4]. Искусственное привлечение белка Chromator приводит к декомпактизации участков хроматина, но не влияет на их транскрипционный статус [8]. Данные белки экспрессируются

на всех стадиях онтогенеза, иммунопреципитируют в общем комплексе, непосредственно взаимодействуют друг с другом, необходимы для поддержания структуры интерфазных хромосом [4–6, 9, 10]. Было показано, что белок Z4 участвует в регуляции транскрипции ряда генов [11]. Например, Z4 является компонентом TRF2-зависимого комплекса [12] и ассоциирован с хроматин-ремоделирующим комплексом NURF [13]. Белок Z4 также участвует в привлечении на хроматин конденсиновых комплексов [14].

Белок Z4 можно отнести к классу C2H2 белков, которые имеют кластеры ДНК-связывающих цинковых пальцев C2H2 типа (рис. 1а). На N-конце белка Z4 был выявлен консервативный среди насекомых домен, необходимый для взаимодействия с белками Chromator и BEAF-32 [6, 9]. В аминокислотной последовательности этого домена (рис. 1б) присутствуют два мотива, состоящие из пары консервативных цистеинов разделенных двумя аминокислотными остатками (CxxC), что, в частности, характерно для ZAD (Zinc-finger associated)-доменов. Выравнивание аминокислотной последовательности N-концевого домена Z4 и известных ZAD-доменов показало присутствие и других консервативных аминокислотных остатков (рис. 1в). ZAD-домены имеют схожую пространственную укладку при крайне низкой гомологии первичной аминокислотной последовательности [15, 16], чем и объясняется то, что данный

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена

Российской академии наук (ИБГ РАН), Москва, Россия

*E-mail: bonchuk_a@genebiology.ru

домен не был аннотирован ни в одной существующей базе данных белковых доменов. Для ZAD-доменов характерна укладка из двух альфа-спиралей типа «скрипичный ключ», стабилизированная атомом цинка, скоординированным четырьмя консервативными цистеинами [15].

Поскольку все известные ZAD-домены формируют димеры (в некоторых случаях тетрамеры из двух димеров [15]), мы исследовали способность ZAD-домена белка Z4 ($Z4^{71-184}$) к димеризации. Химическая сшивка при помощи глутаральдегида выявила присутствие димеров, а также более высокомолекулярные продукты сшивки (рис. 1г),

которые могут быть как следствием образования мультимеров более высокого порядка, так и следствием агрегации. Гель-фильтрация на носителе Superdex 75 показала, что кажущаяся молекулярная масса $Z4^{71-184}$ в растворе составляет порядка 55 кДа (рис. 1д), что также в большей степени согласуется с формированием тетрамера подобно известной тетрамеризации ZAD-домена белка Pita [15]. Однако профиль гель-фильтрации сильно зависит от формы молекулы и присутствия развернутых участков. Чтобы точнее определить олигомерный статус ZAD-домена белка Z4, мы применили метод малоуглового рассеяния рентгеновских лучей

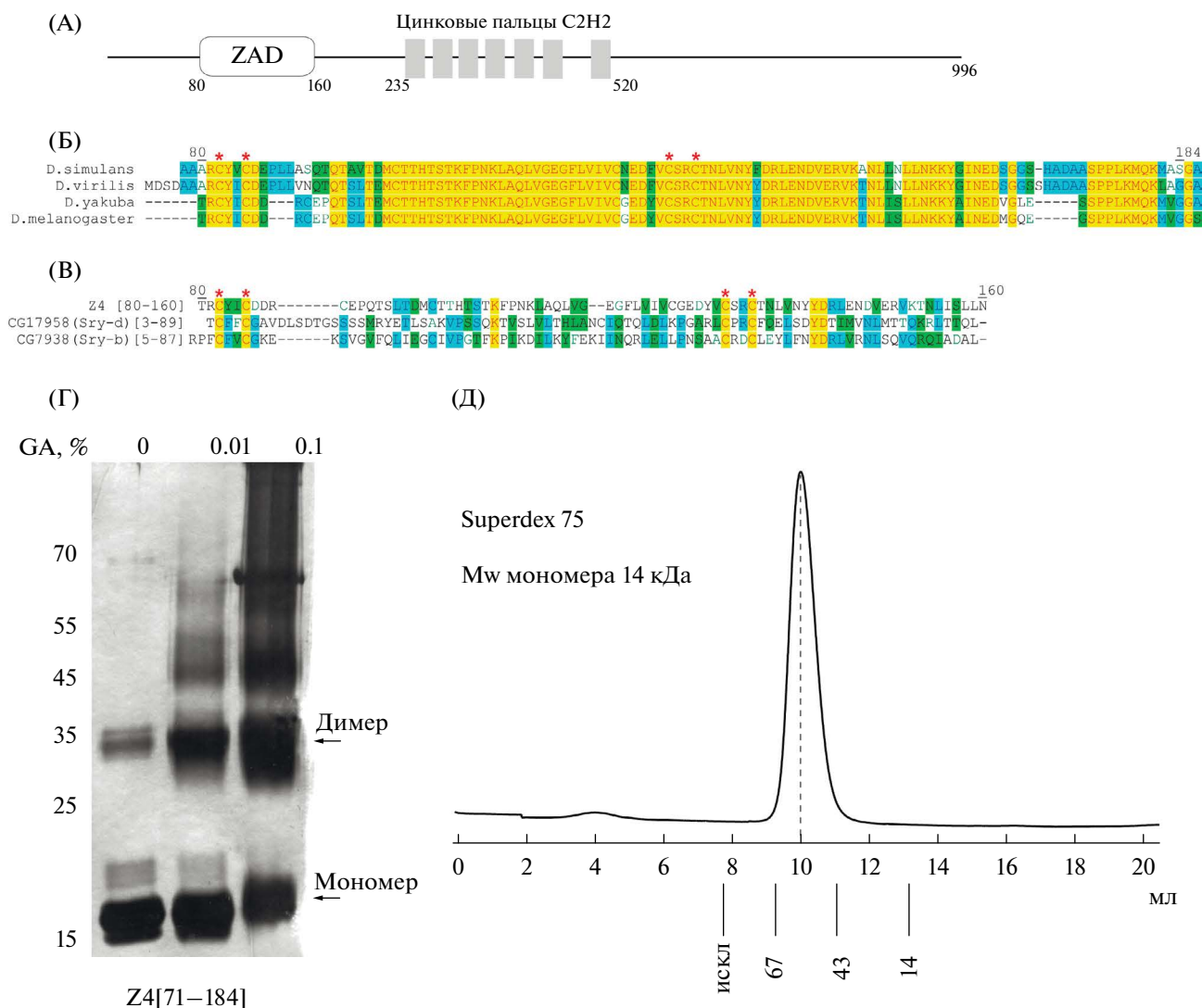


Рис. 1. Белок Z4 имеет в своем составе димеризующийся ZAD-домен. (а) Доменная структура белка Z4. (б) Множественное выравнивание аминокислотных последовательностей N-концевого консервативного домена из ортологов Z4 из различных видов *Drosophila*. Красными звездочками отмечены консервативные цинк-координирующие цистеины. (в) Выравнивание последовательностей N-концевого консервативного домена Z4 и ZAD-доменов белков *Serendipity* дрозофилы. (г) Сшивка $Z4^{71-184}$ с использованием возрастающих концентраций глутарового альдегида (GA). (д) Гель-фильтрация $Z4^{71-184}$ на носителе Superdex S75. Под хроматограммой показаны объемы элюции маркерных белков с указанной молекулярной массой.

Таблица 1. Параметры малоуглового рентгеновского рассеяния для ZAD-доменов белков Z4 *Drosophila melanogaster* (dm) и *D. virilis* (dv). Rg – радиус гирации, Dmax – максимальный размер частиц, Vp – Porod volume – объем частиц.

Образец	Концентрация, мг/мл	Rg, нм	Dmax, нм	Vp, нм ³	Рассчитанная молекулярная масса, кДа	Молекулярная масса мономера, кДа
dmZ4 ^{71–184}	5.0	3.2	9.2	52.4	31–46.5	14.2
dmZ4 ^{71–184}	1.0	3.2	7.83	35.5	20.2–29.8	14.2
dvZ4 ^{66–155}	2.5	2.54	7.3	36.5	20.8–31.2	10.5
dvZ4 ^{66–155}	1.0	2.31	7.1	32.8	19.2–28.8	10.5

(МУРР/SAXS). Были изучены ZAD-домены белков Z4 *Drosophila melanogaster* и *D. virilis*. Параметры рассеяния приведены в таблице 1.

Молекулярный вес, определенный на основе экстраполяции интенсивности рассеяния при нулевом значении угла рассеяния [17], однозначно подтверждает димеризацию ZAD-доменов белков Z4 обоих видов дрозофил.

Взаимодействия ZAD-доменов с другими белковыми доменами до сих пор не изучены, поэтому, вероятно, ZAD-домен белка Z4 может иметь необычные структурные особенности. С целью

установления структуры нами были предприняты попытки кристаллизации, однако оказалось, что ZAD-домен белка Z4 в значительной степени подвержен агрегации при высокой концентрации во всех протестированных нами буферах. Поэтому мы получили структуру димера этого домена при помощи моделирования в AlphaFold2 [18] с последующим подтверждением структуры при помощи SAXS.

Моделирование в AlphaFold2 с высокой достоверностью предсказывает каноническую структуру димера ZAD (рис. 2а, б), наиболее

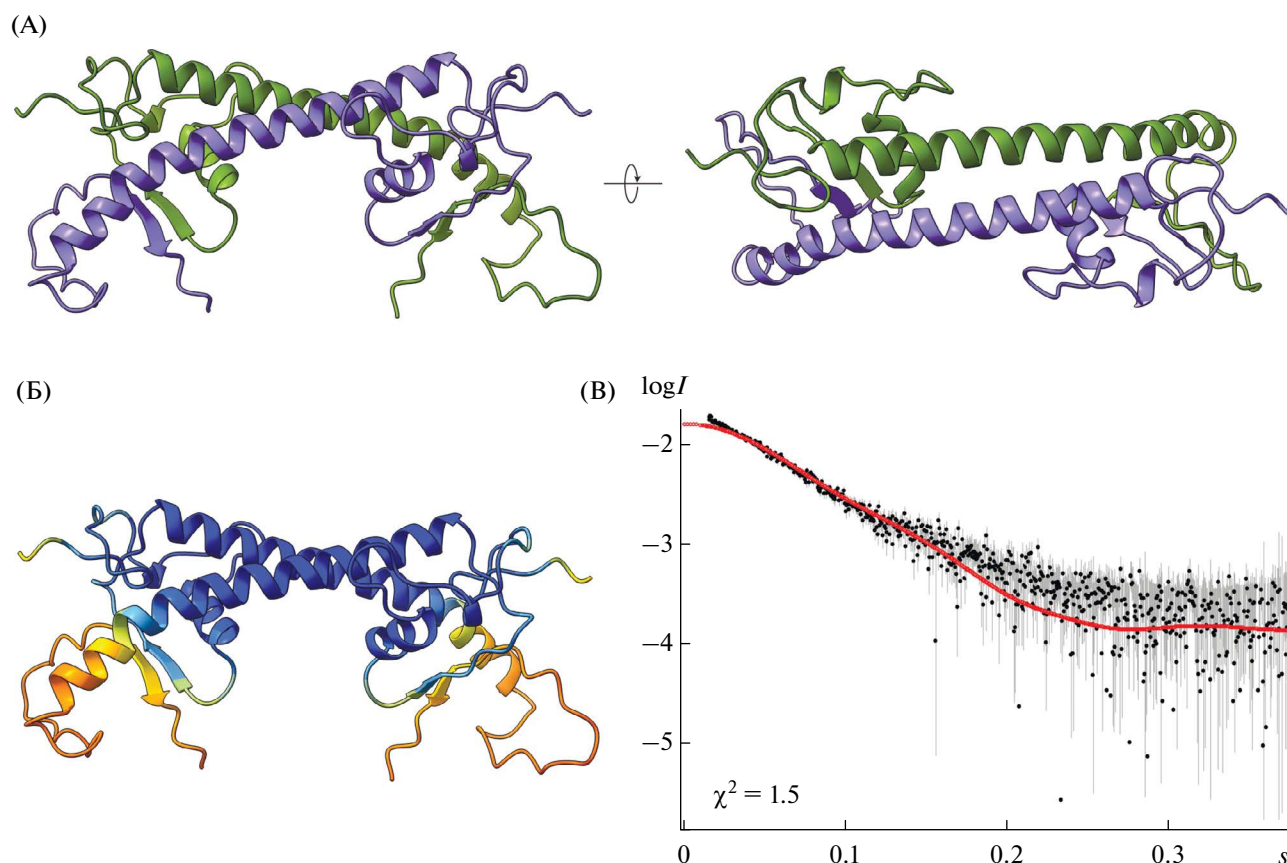


Рис. 2. Изучение структуры ZAD-домена белка Z4 при помощи AlphaFold и SAXS. (а) Структура димера ZAD-домена белка Z4, полученная при помощи AlphaFold. (б) Достоверность полученной модели, окрашенная в соответствии со значением метрики pLDDT. (в) Сопоставление экспериментальных интенсивностей малоуглового рассеяния рентгеновских лучей в растворе с теоретическими кривыми (красная линия), рассчитанными на основе модели AlphaFold с помощью программы CRY SOL. LogI – логарифм интенсивности сигнала, s – вектор угла рассеяния.

схожую с известной структурой ZAD-домена белка Serendipity-d, имеющего характерную бета-шпильку [15]. Сопоставление спектров малоуглового рассеяния рентгеновских лучей ZAD-домена белка Z4 в растворе с теоретическими кривыми, рассчитанными на основе модели AlphaFold, с помощью программы CRY SOL [19] показывает достоверно высокое соответствие ($\chi^2 = 1.5$ (значение меньше 3.84 для 5% доверительного интервала)) модели и экспериментальных данных, причем наибольшее расхождение наблюдается в области профиля рассеяния с наибольшими значениями угла рассеяния, соответствующего мелким элементам структуры, что говорит о том, что основные элементы предсказанной структуры соответствуют нативной структуре данного домена в растворе.

Таким образом, нами показано присутствие консервативного ZAD-домена, обладающего димеризующей активностью, в ключевом архитектурном белке дрозофилы Z4. Димеризация, очевидно, важна для функционирования данного белка, для других ZAD-C2H2 белков, например, было показано, что димеризация необходима для поддержания взаимодействий между удаленными сайтами связывания этих белков [20]. Также димеризация домена может создавать платформу для эффективного взаимодействия с другими факторами, например, партнерами Z4 — белками Chromator и BEAF-32.

кДНК, кодирующая фрагмент белка Z4 71–184 а.о., была клонирована в модифицированный вектор pGEX, содержащий сайт разрезания TEV-протеазы между GST и кДНК. Экспрессия, очистка белка, а также химическая сшивка и эксперименты по малоугловому рассеянию проводилась как описано ранее [15]. Модель димера была построена при помощи программы AlphaFold 2.3.0-Multimer на локальной рабочей станции. Соответствие модели и экспериментальных данных было оценено с помощью программы CRY SOL [19] как описано ранее [15] на основе метрики χ^2 .

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта РФФ проект № 19-74-10099-П.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В работе не проводились исследования человека или животных.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Отсутствует.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang Q., Sun Q., Czajkowsky D.M., Shao Z. Sub-kb Hi-C in *D. melanogaster* reveals conserved characteristics of TADs between insect and mammalian cells, // *Nat Commun.* 2018. 9: 188.
2. Zhimulev I., Vatolina T., Levitsky V., Tsukanov A. Developmental and Housekeeping Genes: Two Types of Genetic Organization in the *Drosophila* Genome, // *Int J Mol Sci.* 2024. 25.
3. Ulianov S.V., Khrameeva E.E., Gavrilov A.A., et al. Active chromatin and transcription play a key role in chromosome partitioning into topologically associating domains, // *Genome Res.* 2016. 26: 70–84.
4. El-Sharnouby S., Fischer B., Magbanua J.P., et al. Regions of very low H3K27me3 partition the *Drosophila* genome into topological domains, // *PLoS One.* 2017. 12: e0172725.
5. Eggert H., Gortchakov A., Saumweber H. Identification of the *Drosophila* interband-specific protein Z4 as a DNA-binding zinc-finger protein determining chromosomal structure, // *J Cell Sci.* 2004. 117: 4253–64.
6. Gan M., Moebus S., Eggert H., Saumweber H. The Chriz-Z4 complex recruits JIL-1 to polytene chromosomes, a requirement for interband-specific phosphorylation of H3S10, // *J Biosci.* 2011. 36: 425–38.
7. Gortchakov A.A., Eggert H., Gan M., et al. Chriz, a chromodomain protein specific for the interbands of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes, // *Chromosoma.* 2005. 114: 54–66.
8. Pokholkova G.V., Demakov S.A., Andreenkov O.V., et al. Tethering of CHROMATOR and dCTCF proteins results in decompaction of condensed bands in the *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes but does not affect their transcription and replication timing, // *PLoS One.* 2018. 13: e0192634.
9. Melnikova L.S., Molodina V.V., Kostyuchenko M.V., et al. The BEAF-32 Protein Directly Interacts with Z4/putzig and Chriz/Chromator Proteins in *Drosophila melanogaster*, // *Dokl Biochem Biophys.* 2021. 498: 184–9.
10. Melnikova L.S., Kostyuchenko M.V., Georgiev P.G., Golovnin A.K. The Chriz Protein Promotes the Recruitment of the Z4 Protein to the STAT-Dependent Promoters, // *Dokl Biochem Biophys.* 2020. 490: 29–33.
11. Kober L., Zimmermann M., Kurz M., et al. Loss of putzig in the germline impedes germ cell development by inducing cell death and new niche like microenvironments, // *Sci Rep.* 2019. 9: 9108.
12. Hochheimer A., Zhou S., Zheng S., et al. TRF2 associates with DREF and directs promoter-selective gene expression in *Drosophila*, // *Nature.* 2002. 420: 439–45.
13. Kugler S.J., Nagel A.C. A novel PzG-NURF complex regulates Notch target gene activity, // *Mol Biol Cell.* 2010. 21: 3443–8.
14. Puerto M., Shukla M., Bujosa P., et al. The zinc-finger protein Z4 cooperates with condensin II to regulate

- somatic chromosome pairing and 3D chromatin organization, // *Nucleic Acids Res.* 2024.
15. Bonchuk A.N., Boyko K.M., Nikolaeva A.Y., et al. Structural insights into highly similar spatial organization of zinc-finger associated domains with a very low sequence similarity, // *Structure.* 2022. 30: 1004–15 e4.
16. Bonchuk A., Boyko K., Fedotova A., et al. Structural basis of diversity and homodimerization specificity of zinc-finger-associated domains in *Drosophila*, // *Nucleic Acids Res.* 2021. 49: 2375–89.
17. Mylonas E., Svergun D.I. Accuracy of molecular mass determination of proteins in solution by small-angle X-ray scattering, // *J Appl Crystallogr.* 2007. 40: S245–S9.
18. Jumper J., Evans R., Pritzel A., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold, // *Nature.* 2021. 596: 583–9.
19. Svergun D.I., Barberato C., Koch M.H.J. CRY SOL – a Program to Evaluate X-ray Solution Scattering of Biological Macromolecules from Atomic Coordinates // *J Appl Cryst.* 1995. 28: 768–73.
20. Kyrchanova O.V., Bylino O.V., Georgiev P.G. Mechanisms of enhancer-promoter communication and chromosomal architecture in mammals and *Drosophila*. // *Front Genet.* 2022. 13: 1081088.

DROSOPHILA PROTEIN Z4 HAS N-TERMINAL ZAD DIMERIZATION DOMAIN

A. N. Bonchuk^{1, #}, Academician of the RAS P. G. Georgiev¹

¹*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: bonchuk_a@genebiology.ru*

Drosophila transcription factor Z4 (putzig) is one of the key proteins that determines chromatin structure in *Drosophila*. It is localized at the boundaries of the “bands” of polytene chromosomes, which, according to modern concepts, correlate with chromatin domains. The Z4 protein is a component of a protein complex that also includes the Chromator and BEAF-32 proteins, which require a conserved domain at the N-terminus of Z4 to interact with them. In this study, we showed that this domain is a ZAD (Zinc-finger associated). Using biochemical methods, the ability of this domain to dimerize was confirmed. A dimer model of this domain was obtained using AlphaFold2, the structure of which was confirmed using small-angle X-ray scattering (SAXS). The dimer structure shows a fold typical of ZAD domains.

Keywords: architectural C2H2 proteins, zinc-finger proteins, transcription factor, ZAD, SAXS