

УДК 575.22:595.773.4

## БЕЛОК CHRIZ СПОСОБСТВУЕТ РЕКРУТИРОВАНИЮ БЕЛКА Z4 НА ПРОМОТОРЫ STAT-ЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ

© 2020 г. Л. С. Мельникова<sup>1,\*</sup>, М. В. Костюченко<sup>1</sup>, академик РАН П. Г. Георгиев<sup>1</sup>, А. К. Головнин<sup>1</sup>

Поступило 16.10.2019 г.

После доработки 16.10.2019 г.

Принято к публикации 16.10.2019 г.

Белки Z4/putzig и Chriz/Chromator участвуют в организации хроматина на промоторах большей части генов *Drosophila*. Установлено, что для взаимодействия с белком Z4 необходима последовательность белка Chriz от 273 до 503 а.к. Делеция этой последовательности приводит к дерепрессии ряда STAT-зависимых генов и развитию у мух меланотических опухолей. Результаты работы свидетельствуют, что белок Chriz способствует рекрутированию белка Z4 на хроматин.

**Ключевые слова:** Chriz/Chromator, Z4/putzig, белок-белковое взаимодействие, JAK/STAT сигнальный путь, регуляция транскрипции

**DOI:** 10.31857/S2686738920010163

Детальный анализ пространственной организации эукариотических геномов, в частности генома *Drosophila*, позволил предложить модель, согласно которой хромосомы разделены на дискретные топологически ассоциированные домены (ТАД), чередующиеся с деконденсированными интер-ТАД [1]. Политенные хромосомы дрозофилы являются удобной моделью для изучения структуры и свойств интерфазного хроматина, поскольку воспроизводимая ими структура диск-междиск, как полагают, отражает доменную структуру организации хромосом [2]. Было продемонстрировано, что диски политенных хромосом представляют собой плотно упакованный хроматин, где активность генов сильно подавлена, а междиски – открытый хроматин, где связывание факторов транскрипции облегчено, что позволяет генам активно транскрибироваться.

Белки Z4/putzig и Chriz/Chromator экспрессируются во многих тканях на всех стадиях онтогенеза и колокализуются во всех междисках политенных хромосом дрозофилы [3, 4]. Гипоморфные мутации в генах, кодирующих Z4 и Chriz, приводят к потере структуры диск-междиск, что подтверждает значительную роль этих белков в организации структуры хроматина интерфазных хромосом [5]. Белок Z4 содержит семь доменов типа “цинковый палец”, однако самостоятельного связывания Z4 с ДНК в междиске обнаружено

не было [6]. Интересно, что белок Z4 может участвовать как в активации, так и в репрессии транскрипции ряда генов. Например, показано, что Z4 является компонентом большого TRF2-зависимого комплекса, определяющего активность промоторов части генов домашнего хозяйства [7]. Кроме того, Z4 присутствует в составе ремоделирующего нуклеосомы комплекса NURF, который участвует в активации TRF2-зависимых промоторов и некоторых Notch-зависимых генов [8]. В то же время установлено, что Z4 взаимодействует с транскрипционным фактором Ken, который наряду с NURF-комплексом участвует в репрессии JAK/STAT зависимых промоторов [9]. Также Z4 принимает участие в регуляции экспрессии части MSL- и NSL-зависимых генов [10].

Прямое взаимодействие между белками Z4 и Chriz было выявлено с помощью дрожжевой двугибридной системы (ДДС), а затем эти белки были иммунопреципитированы в общем комплексе из лизата клеток дрозофилы Kc [3, 4]. Интересно, что при анализе взаимодействия белков Z4 и Chriz *in vivo* на политенных хромосомах были получены противоречивые данные. Одна группа исследователей пришла к выводу о независимом привлечении белков на хроматин [4], в то время как другая выяснила, что привлечение белка Z4 на хроматин осуществляется через белок Chriz [3]. Белок Chriz связывается с большей частью промоторов генов домашнего хозяйства и нужен для их экспрессии. Однако роль этого белка в регуляции транскрипции остается неизвестной. Ранее было показано [5], что N-конец белка Chriz, включающий хромодомен, необходим для лока-

<sup>1</sup> Институт биологии гена Российской Академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: lsm73@mail.ru

лизации белка в междисках и для поддержания нормальной структуры политепных хромосом. Было показано, что в модельных системах Chriz совместно с инсуляторным белком BEAF может участвовать в организации дистанционных взаимодействий [11]. Искусственное привлечение Chriz в интеркалярный гетерохроматин приводит к локальной деконденсации хроматина и рекрутирует на искусственно созданные сайты белок Z4 [12], что предполагает кооперативное рекрутирование белков Chriz и Z4 на хроматин и их совместное участие в формировании открытого хроматина на промоторах. Таким образом, несмотря на значительное количество публикаций, функциональная роль обоих белков, Z4/putzig и Chriz/Chromator, всё ещё окончательно не определена.

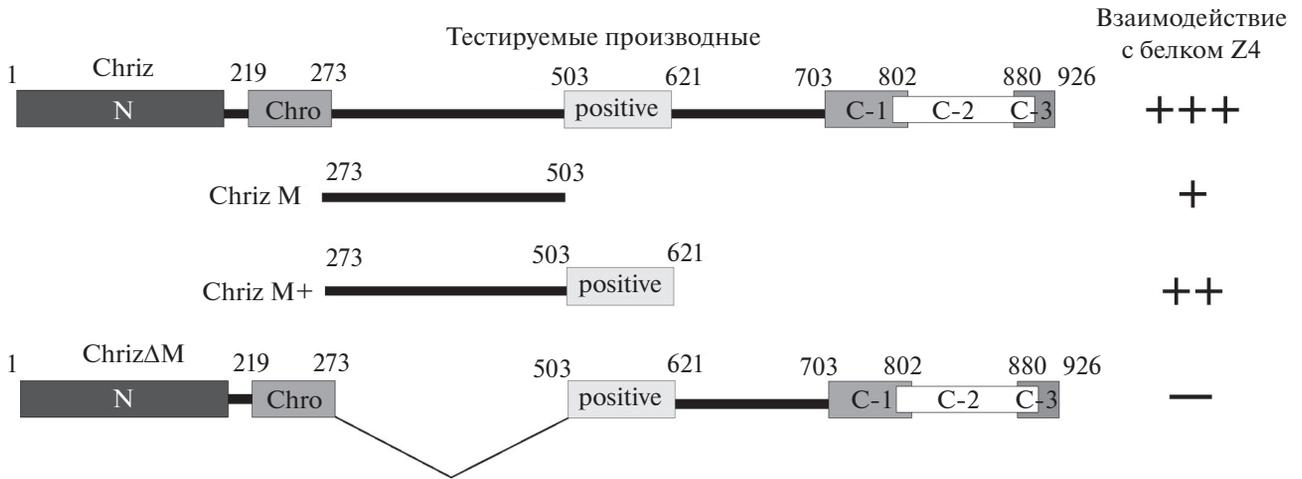
В представленной работе было продолжено исследование механизма взаимодействия между белками Chriz и Z4 и тестирование возможности их кооперативного связывания с целевыми регуляторными элементами. С помощью ДДС мы точно картировали домен белка Chriz, обеспечивающий его взаимодействие с Z4. Мы показали, что делеция этого домена, как и инактивация Z4, приводит к дерепрессии транскрипции генов, регулируемых посредством сигнального пути JAK/STAT. Интересно, что такая делеция ослабляет связывание самого белка Chriz с тестируемыми сайтами.

Ранее было показано, что во взаимодействии с белком Z4 задействована последовательность белка Chriz от 279 до 590 а.к. [3]. С помощью ДДС было проведено более точное картирование района Chriz, который необходим для взаимодействия с Z4 (рис. 1). Мы протестировали взаимодействие белка Z4 с короткой последовательностью Chriz от 273 до 503 а.к. (Chriz M), не содержащей описанных ранее структур, и с последовательностью от 273 до 621 а.к. (Chriz M+), включающей район, обогащенный положительно заряженными аминокислотами. В качестве положительного контроля использовалось взаимодействие между полноразмерными белками Chriz и Z4. Конструкции, экспрессирующие в дрожжах белок Chriz и его делеционные производные, были созданы на основе вектора pGBT9, а кДНК, кодирующая полноразмерный белок Z4, была клонирована в вектор pGDA. В экспериментах использовался дрожжевой штамм rJ69-4A. Эффективность экспрессии Chriz и Z4 в составе конструкций подтверждалась с помощью Вестерн-блоттинга. Для детекции использовались антитела к тестируемым белкам. Эксперименты проводились в соответствии с методикой, описанной нами в предыдущей работе [13]. В результате было установлено, что делеционная производная Chriz M способна взаимодействовать с Z4, однако это взаимодействие слабее, чем взаимодействие между

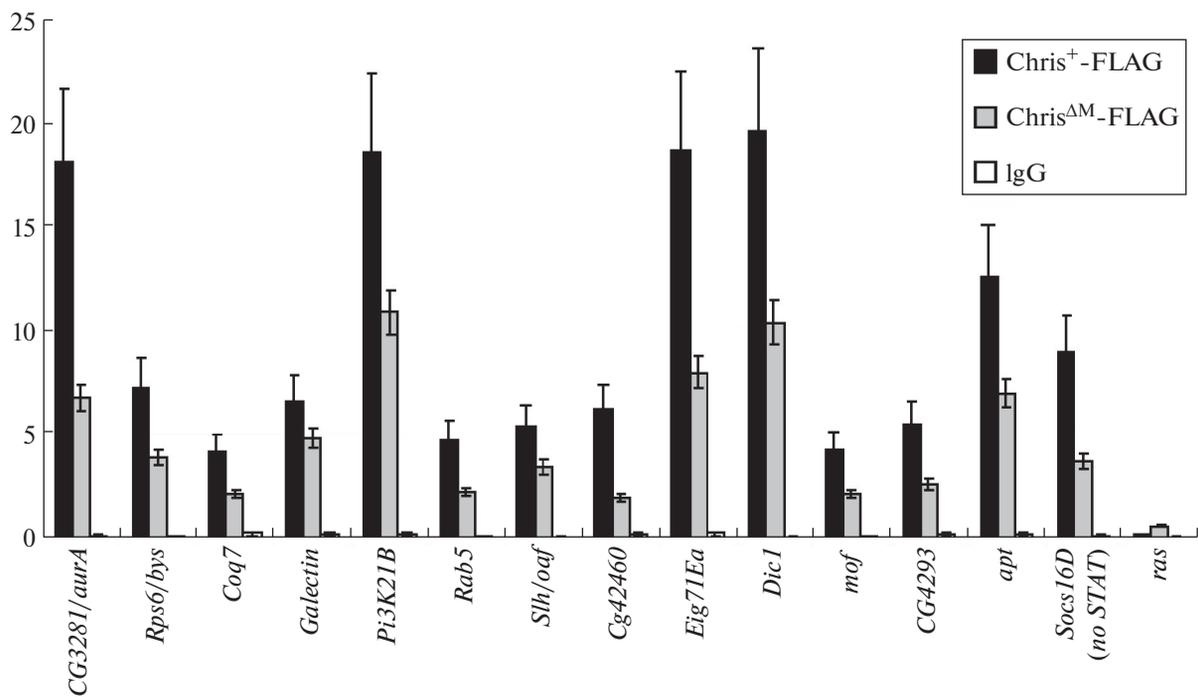
полноразмерными белками. Добавление района положительно заряженных аминокислот в производной Chriz M+ усиливает взаимодействие с Z4 и делает его сравнимым с взаимодействием полноразмерных белков. Для подтверждения решающей роли Chriz M во взаимодействии с Z4 мы делетировали эту последовательность и протестировали взаимодействие производной pGBT9-Chriz $\Delta$ M с pGDA-Z4 (рис. 1). Как и ожидалось, белок Chriz с делетированной последовательностью от 273 до 503 а.к. не взаимодействовал с полноразмерным белком Z4. Полученные результаты были подтверждены в реципрокных экспериментах. Таким образом, мы более точно картировали район белка Chriz, критичный для взаимодействия с Z4, и показали, что обогащенный положительно заряженными аминокислотами участок Chriz (от 503 до 621 а.к.) играет вспомогательную роль и лишь стабилизирует взаимодействие Chriz-Z4.

Ранее было показано, что инактивация белка Z4 приводит к развитию у мух меланотических опухолей и вызывает активацию транскрипции STAT-зависимых генов [9]. Если белок Z4 рекрутируется на хроматин через взаимодействие с белком Chriz, то при делеции последовательности Chriz M должны наблюдаться те же эффекты. Для проверки этого предположения была создана конструкция Chriz $\Delta$ M, экспрессирующая в мухах мутантный белок, не способный взаимодействовать с Z4. Мы клонировали мутированную кДНК гена *Chriz* вместе с 5' и 3' нетранслируемыми последовательностями, включающими промотор гена и сигнал полиаденилирования в вектор pCaSpeR3. Затем эмбрионы дрозофил были инъецированы плазмидной ДНК, содержащей конструкцию Chriz $\Delta$ M. Несущие трансген мухи отбирались по проявлению маркерного гена *mini white*, отвечающего за окраску глаз. С помощью серии генетических скрещиваний была получена линия, несущая на хромосоме II гомозиготу по конструкции Chriz $\Delta$ M, а на хромосоме III – гомозиготу по мутации *Chro*<sup>KG03258</sup>, полностью инактивирующей нативный ген *Chriz*. В качестве положительного контроля в экспериментах *in vivo* использовалась линия, экспрессирующая полноразмерный белок Chriz<sup>+</sup>, полученная по вышеописанной схеме. Экспрессируемые белки Chriz<sup>+</sup> и Chriz $\Delta$ M были маркированы эпитопом FLAG. В дальнейших экспериментах для детекции вариантов Chriz использовались антитела к этому эпитопу. Эффективность экспрессии белков была подтверждена с помощью Вестерн-блоттинга.

Мы обнаружили, что, подобно инактивации Z4, экспрессия мутантного белка Chriz $\Delta$ M негативно влияет на выживаемость и иммунитет мух. Жизнеспособность гомозиготных по конструкции Chriz $\Delta$ M мух была значительно снижена в



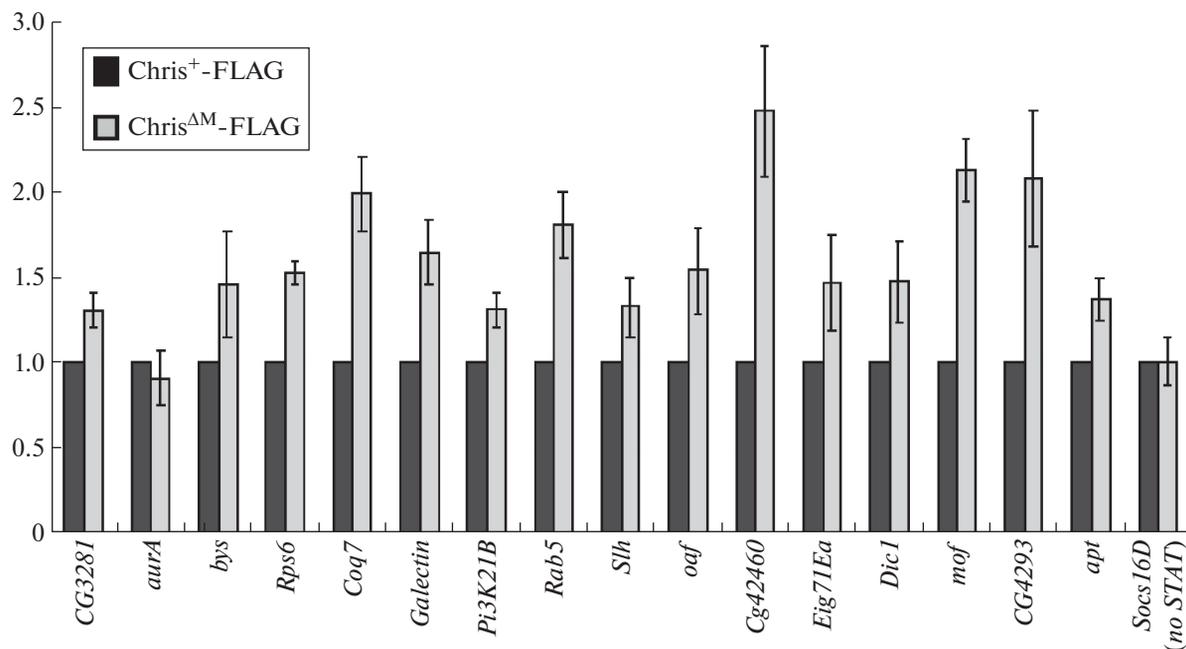
**Рис. 1.** Взаимодействие белка Chriz и его делеционных производных с белком Z4 в ДДС. Домены белка Chriz изображены схематично. Обозначения: N – N-концевой консервативный домен; Chro – хромодомен; positive – район, обогащённый положительно заряженными аминокислотами; C-1, C-2, C-3 – консервативные C-концевые районы белка. Цифрами обозначены аминокислотные остатки, ограничивающие домены и производные формы. Справа от схем обозначена сила взаимодействия между белками: “+++” – сильное; “++” – умеренное; “+” – слабое; “–” – отсутствие взаимодействия. В реципрокных экспериментах были получены аналогичные результаты.



**Рис. 2.** Тестирование связывания белков Chriz<sup>+</sup> и Chriz<sup>ΔM</sup> с промоторами STAT-зависимых генов методом ChIP-qPCR. В эксперименте использовали антитела против эпитопа FLAG. Кодировочная область гена *ras64B* (Ras) использовалась как контроль, не содержащий сайты связывания белка Chriz. Процент обогащения иммунопреципитированной ДНК (ось Y) рассчитывали относительно количества загруженной ДНК. Внизу (ось X) указаны названия выбранных STAT-зависимых генов. Показано стандартное отклонение для трёх независимых биологических повторностей. IgG – иммуноглобулины. Ген *Socs16D* не относится к STAT-зависимым (no STAT).

сравнении с диким типом. Кроме того, примерно у 30% куколок и взрослых мух наблюдалось развитие меланотических опухолей. Поскольку нарушение иммунного ответа связано с JAK/STAT

сигнальным путём регуляции транскрипции, мы протестировали влияние мутантного белка Chriz<sup>ΔM</sup> на экспрессию 16 STAT-зависимых генов. Модельные гены были выбраны на основе опубликованных данных о влиянии



**Рис. 3.** RT-qPCR анализ экспрессии STAT-зависимых генов в линиях мух, экспрессирующих Chriz<sup>+</sup> и Chriz<sup>ΔM</sup>. Уровень экспрессии (ось Y) измерялся относительно экспрессии в линии Chriz<sup>+</sup>. Названия тестируемых STAT-зависимых генов указаны внизу (ось X). Показано стандартное отклонение для трёх независимых биологических повторностей. Ген *Socs16D*, не относящийся к STAT-зависимым (no STAT), использовался в качестве контроля. Его экспрессия в линии Chriz<sup>ΔM</sup> оставалась такой же, как и в линии Chriz<sup>+</sup>.

ликованных данных [14]. Связывание белков Chriz<sup>+</sup> и Chriz<sup>ΔM</sup> с тестируемыми промоторными последовательностями было подтверждено методом ChIP-qPCR (рис. 2). Уровень транскрипции выбранных генов анализировали с помощью RT-qPCR (рис. 3). Неожиданно оказалось, что белок Chriz<sup>ΔM</sup> связывается со всеми последовательностями примерно в два раза слабее, чем полно-размерный белок Chriz<sup>+</sup> (рис. 2). Однако уровень транскрипции модельных генов, за исключением гена *aur* и контрольного STAT-независимого гена *Socs16D*, на фоне экспрессии Chriz<sup>ΔM</sup> повысился в 1.5–2 раза (рис. 3). Таким образом, делеция последовательности белка Chriz, отвечающей за взаимодействие с белком Z4, так же как и ноль-мутация по белку Z4, приводит к активации экспрессии STAT-зависимых генов.

Полученные результаты позволяют предположить, что наблюдаемые при экспрессии белка Chriz<sup>ΔM</sup> эффекты обусловлены отсутствием белка Z4. Следовательно, делеция района Chriz от 273 до 503 а.к. препятствует рекрутированию белка Z4 на хроматин. Однако эта делеция ослабляет и связывание самого мутантного белка Chriz с хроматином. Наши данные демонстрируют, что белок Z4 рекрутируется на промоторы STAT-зависимых генов через взаимодействие с белком Chriz, но при этом стабилизируется и связывание самого белка Chriz с этими сайтами. Возможно,

связывание Chriz со специфичными сайтами стабилизируется какими-то белками, с которыми одновременно взаимодействуют и Chriz и Z4. Для детального изучения механизма рекрутирования белков Chriz и Z4 на хроматин, а также для выявления их роли в функционировании генома необходимы дальнейшие исследования.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда (проект № 18–14–00295).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Szabo Q., Bantignies F., Cavalli G. Principles of Genome Folding into Topologically Associating Domains // Science advances. 2019. V. 5. № 4. P. eaaw1668.
2. Zhimulev I.F., Zykova T.Y., Goncharov F.P., et al. Genetic Organization of Interphase Chromosome Bands and Interbands in *Drosophila Melanogaster* // PloS one. 2014. V. 9. № 7. P. e101631.
3. Gan M., Moebus S., Eggert H., Saumweber H., et al. The Chriz-Z4 Complex Recruits JIL-1 to Polytene Chromosomes, a Requirement for Interband-Specific Phosphorylation of H3S10 // J. Biosci. 2011. V. 36. № 3. P. 425–438.
4. Gortchakov A.A., Eggert H., Gan M., et al. Chriz, a Chromodomain Protein Specific for the Interbands of *Drosophila Melanogaster* Polytene Chromosomes // Chromosoma. 2005. V. 114. № 1. P. 54–66.

5. Rath U., Ding Y., Deng H., et al. The Chromodomain Protein, Chromator, Interacts with JIL-1 Kinase and Regulates the Structure of Drosophila Polytene chromosomes // *J. Cell Sci.* 2006. V. 119. № 11. P. 2332–2341.
6. 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. V. 117. № 18. P. 4253–4264.
7. Kugler S.J., Nagel A.C. Putzig is Required for Cell Proliferation and Regulates Notch Activity in Drosophila // *Mol Biol Cell.* 2007. V. 18. № 10. P. 3733–3740.
8. Kugler S.J., Nagel A.C. A Novel PzG-NURF Complex Regulates Notch Target Gene Activity // *Mol. Biol. Cell.* 2010. V. 21. № 19. P. 3443–3448.
9. Kugler S.J., Gehring E.M., Wallkamm V., et al. The Putzig-NURF Nucleosome Remodeling Complex is Required for Ecdysone Receptor Signaling and Innate Immunity in Drosophila Melanogaster // *Genetics.* 2011. V. 188. № 1. P. 127–139.
10. Larschan E., Soruco M.M., Lee O.K., et al. Identification of Chromatin-Associated Regulators of MSL Complex Targeting in Drosophila Dosage Compensation // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 7. P. e1002830.
11. Vogelmann J., Le Gall A., Dejardin S., et al. Chromatin Insulator Factors Involved in Long-Range DNA Interactions and Their Role in the Folding of the Drosophila Genome // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 8. P. e1004544.
12. 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. V. 13. № 4. P. e0192634.
13. Головнин А.К., Шаповалов И.С., Костюченко М.В. и др. Белок Chromator взаимодействует с белками семейства Mod(mdg4) у *Drosophila melanogaster* // *ДАН.* 2014. Т. 454. № 4. С.477–480.
14. Panov V.V., Kuzmina J.L., Doronin S.A., et al. Transcription Co-activator SAYP Mediates the Action of STAT Activator // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. № 6. P. 2445–2453.

## THE CHRIZ PROTEIN PROMOTES THE RECRUITMENT OF Z4 PROTEIN TO THE STAT-DEPENDENT PROMOTERS

L. S. Melnikova<sup>a, #</sup>, M. V. Kostyuchenko<sup>a</sup>, Academician of the RAS P. G. Georgiev<sup>a</sup>, and A. K. Golovnin<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup>e-mail: lsm73@mail.ru

Proteins Z4/putzig and Chriz/Chromator are involved in the chromatin organization on the promoters of most *Drosophila* genes. It was shown that Chriz protein region from aa 273 to 503 is required for the interaction with the Z4 protein. Deletion of this sequence leads to derepression of a number of STAT-dependent genes and the development of melanotic tumors in flies. The results of this study suggest that Chriz protein promotes the recruitment of Z4 protein to chromatin.

**Keywords:** Chriz/Chromator, Z4/putzig, protein-protein interaction, JAK/STAT signaling pathway, transcriptional regulation