

УДК 575.22:595.773.4

БЕЛОК BEAF-32 НАПРЯМУЮ ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С БЕЛКАМИ Z4/putzig и Chriz/Chromator у *Drosophila melanogaster*

© 2021 г. Л. С. Мельникова^{1,*}, В. В. Молодина¹, М. В. Костюченко¹, академик РАН П. Г. Георгиев¹, А. К. Головнин¹

Поступило 29.01.2021 г.

После доработки 06.02.2021 г.

Принято к публикации 08.02.2021 г.

У *Drosophila* белки BEAF-32, Z4/putzig и Chriz/Chromator колокализуются в междисках полиденных хромосом. Предполагалось, что эти белки могут формировать комплекс, влияющий на структуру хроматина. Однако механизм формирования такого комплекса не был изучен. Мы впервые доказали, что белки BEAF-32, Z4/putzig и Chriz/Chromator взаимодействуют между собой напрямую и локализовали домены белков, обеспечивающие множественные белок-белковые взаимодействия. На основании полученных данных мы разработали модель механизма формирования комплекса BEAF/Z4/Chriz и его рекрутирования на хроматин.

Ключевые слова: BEAF-32, Chriz/Chromator, Z4/putzig, белок-белковое взаимодействие, дрожжевая двугибридная система

DOI: 10.31857/S2686738921030100

Хромосомы высших эукариот организованы в топологически ассоциированные домены (ТАДы). Размеры и способы формирования этих доменов значительно отличаются у разных животных. У дрозофилы районы хроматина, разделяющие ТАДы, насыщены генами с высоким уровнем транскрипции. Они активно взаимодействуют между собой, формируя петли хроматина. У дрозофилы границы ТАДов, скорее, определяются активным состоянием и свойствами хроматина, чем сайтами связывания конкретного белка. Тем не менее на границах ТАДов часто присутствуют белки dCTCF, CP190, Chriz/Chromator, Z4/putzig и BEAF-32, связывающиеся с промоторами генов домашнего хозяйства. Роль этих белков в формировании границ ТАДов пока не ясна [1]. Возможно, эти белки являются компонентами комплексов, которые одновременно поддерживают структуру интерфазного хроматина и обеспечивают высокую транскрипционную активность. Однако механизм формирования и функционирования хроматинорганизирующих комплексов еще недостаточно изучен.

Считается, что “диск-междисковая” структура полиденных хромосом у *Drosophila* отражает до-

менную структуру организации хромосом. В дисках полиденных хромосом локализован плотно упакованный хроматин, где активность генов подавлена, а в междисках – открытый хроматин, где связывание транскрипционных факторов облегчено, и гены активно транскрибируются. В представленной работе мы детально изучили механизм формирования комплекса между тремя белками BEAF, Z4 и Chriz, локализованными в междисках полиденных хромосом, и разработали модель, объясняющую участие такого комплекса в формировании открытого хроматина и, следовательно, границ ТАДов.

Белки Z4/putzig и Chriz/Chromator необходимы для поддержания структуры интерфазных хромосом. Они экспрессируются во многих тканях на всех стадиях онтогенеза, колокализуются во всех междисках полиденных хромосом, иммунопреципитируются в общем комплексе и напрямую взаимодействуют друг с другом [2–5]. Белок Z4 участвует в регуляции транскрипции ряда генов. Например, показано, что Z4 входит в состав TRF2-зависимого комплекса, определяющего активность промоторов части генов домашнего хозяйства. Кроме того, Z4 присутствует в ремоделирующем нуклеосомы комплексе NURF [6]. Белок Chriz также связывается с большей частью промоторов генов домашнего хозяйства (данные проекта modENCODE), однако его роль в регуляции транскрипции остается неизвестной. Несмотря на значительное количество публикаций,

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН), Москва, Россия

*e-mail: lsm73@mail.ru

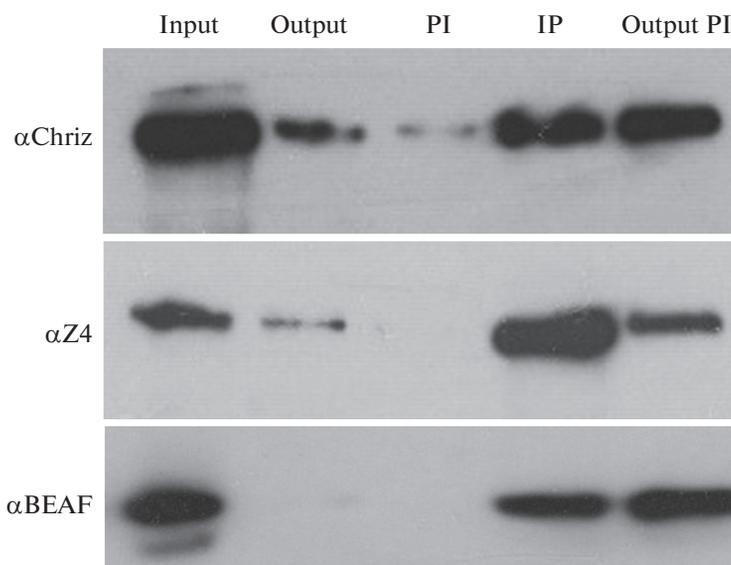


Рис. 1. Результаты тестирования взаимодействия между белком BEAF и белками Z4 и Chriz методом IP из лизата клеток S2. Иммунопреципитацию проводили с помощью антител к белку BEAF (α BEAF) и с помощью преиммунной сыворотки крови (отрицательный контроль). Перед загрузкой в SDS-PAGE для Вестерн-блоттинга IP-комплексы промывали 300 мМ KCl-содержащими буферами. Мембрану PVDF последовательно гибридизовали со специфичными антителами против белков Chriz и Z4 (α Chriz и α Z4, обозначены слева от соответствующих панелей). Input – 10% от лизата клеток, использованного в коиммунопреципитации; IP – иммунопреципитация антителами к BEAF; Output – супернатант после IP; PI – иммунопреципитация преиммунной сывороткой; Output PI – супернатант после PI. Наличие полосы в колонке IP означает, что тестируемые белки входят в состав общего комплекса.

все еще не обнаружены конкретные ДНК-связывающие белки, рекрутирующие Z4 и Chriz на хроматин.

Белок BEAF-32 необходим для оогенеза, эмбриогенеза и поддержания структуры хромосом [7, 8]. Он был впервые обнаружен на инсультаторной последовательности *scs'* и впоследствии локализован на политенных хромосомах во множестве диск-междисковых границ [9]. Анализ геномного распределения BEAF выявил, что этот белок преимущественно локализован в 5' не-транслируемой области различных генов, ориентированных “голова-к-голове”. Примечательно, что большинство из этих генов относятся к генам домашнего хозяйства [10]. Это позволяет предположить, что, взаимодействуя с другими транскрипционными факторами, ассоциированными с генами домашнего хозяйства, BEAF участвует в поддержании открытой структуры хроматина, обеспечивающей значительный уровень транскрипции генов.

Было показано, что каждый из белков, Z4 и Chriz, иммунопреципитируется и частично колокализуется с белком BEAF [4]. На основании этого было выдвинуто предположение, что все три белка входят в состав общего комплекса и взаимодействуют между собой, однако прямое взаимодействие между ними не изучалось [4]. В представленной работе мы впервые доказали, что белки Z4 и Chriz напрямую взаимодействуют с

белком BEAF и точно локализовали районы белков, обеспечивающие такое взаимодействие.

В первую очередь, с помощью коиммунопреципитации белков (IP) из лизата клеток S2 мы продемонстрировали, что все три белка, BEAF, Z4 и Chriz формируют общий комплекс. С помощью антител к белку BEAF комплекс связывали с сефарозой A, а затем с помощью специфичных антител детектировали присутствие в нем белков Z4 и Chriz (рис. 1).

Однако иммунопреципитация допускает возможность опосредованных взаимодействий между белками. Чтобы выяснить, могут ли белки Z4, Chriz и BEAF взаимодействовать напрямую мы использовали дрожжевую двугибридную систему (ДДС). Сначала были протестированы взаимодействия между полноразмерными белками BEAF, Z4 и Chriz. На основе вектора pGBT9, содержащего промотор гена *Adh* и ДНК-связывающий домен дрожжевого белка GAL4, мы создали конструкции, экспрессирующие в дрожжах белок BEAF. кДНК белков Z4 и Chriz клонировали в вектор pGDA, включающий активационный домен GAL4. В экспериментах использовался дрожжевой штамм pJ69-4A.

Эффективность экспрессии Chriz и Z4 в составе конструкций подтверждалась с помощью Вестерн-блоттинга. Эксперименты проводили в соответствии с методикой, описанной нами ранее [11]. Оказалось, что белок BEAF способен напря-

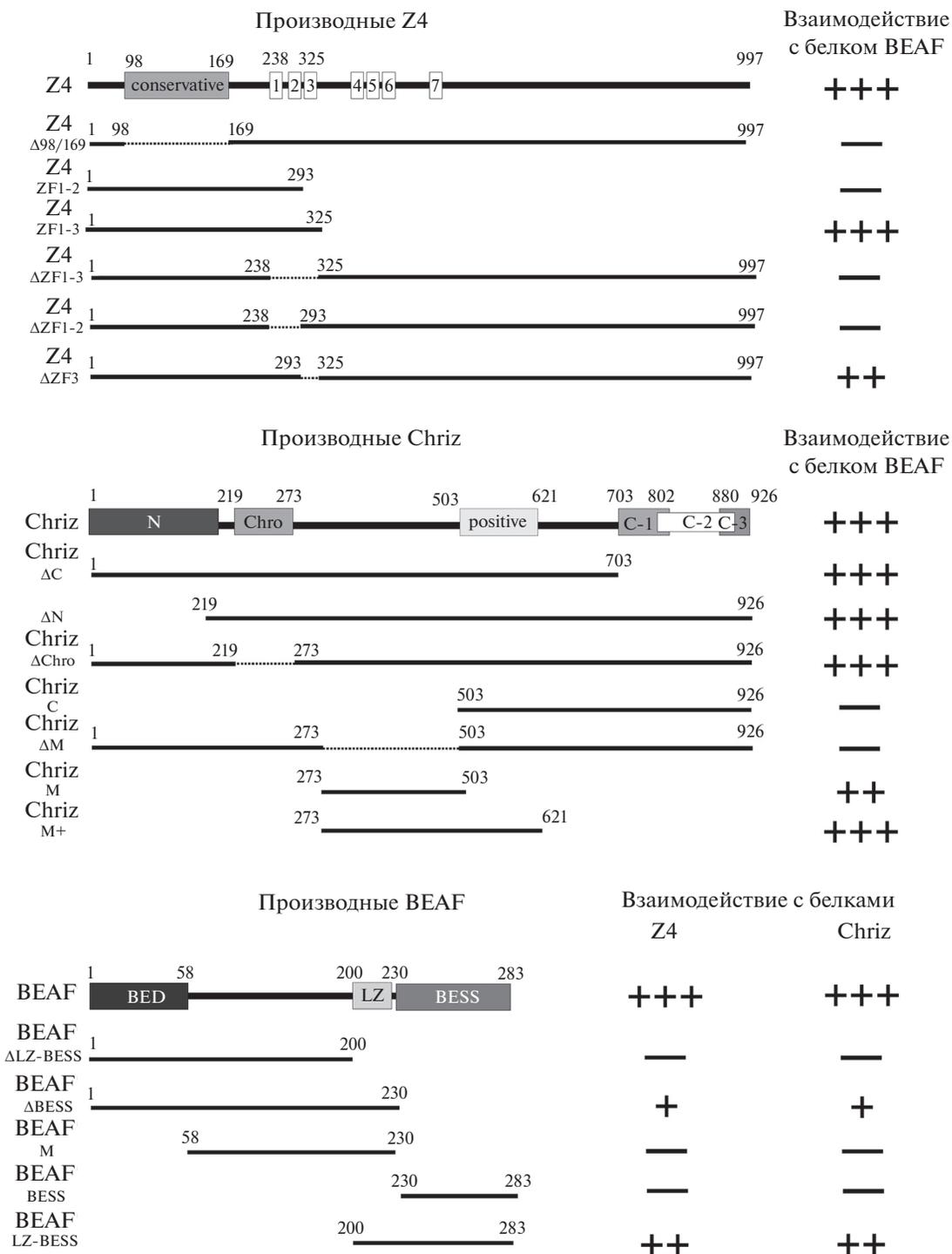


Рис. 2. Взаимодействия между белком BEAF и белками Z4 и Chriz в ДДС.

Тестируемые белки изображены схематично. Для белка Z4: conservative – высококонсервативный район; прямоугольники 1–7 обозначают цинковые пальцы. Для белка Chriz: N – N-концевой консервативный домен; Chro – хромодомен; positive – район, обогащенный положительно заряженными аминокислотами; C-1, C-2, C-3 – консервативные C-концевые районы белка. Для белка BEAF: BED – домен цинкового пальца; LZ – лейциновая молния; BESS – домен BESS. Цифрами обозначены аминокислотные остатки, ограничивающие домены и производные формы. Слева указаны названия белков и их производных, размер производных обозначен отрезками, пунктирные линии обозначают внутренние делеции. Справа от схем обозначена сила взаимодействия между белками: “+++” – сильное; “++” – умеренное; “+” – слабое; “–” – отсутствие взаимодействия.

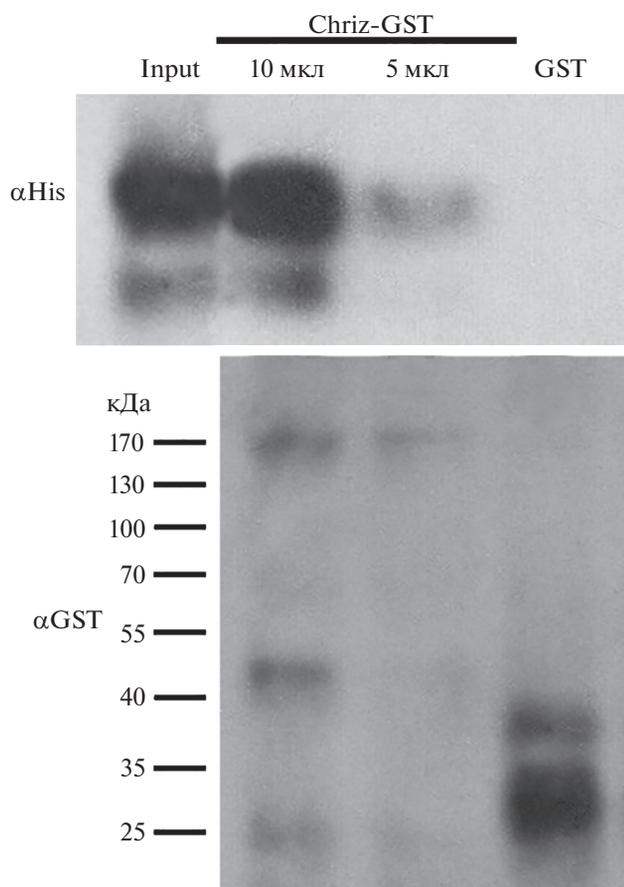


Рис. 3. Результаты тестирования взаимодействия между белками BEAF и Chriz в GST pull down экспериментах. Input – нанесено 10% белка BEAF-His, использованного в каждом эксперименте (положительный контроль). Детекция проводилась с помощью антител к гистидину (α His), с которым был слит белок BEAF – верхняя панель. GST – связывание белка BEAF-His с белком GST (отрицательный контроль). Белок BEAF-His связывали с 10 мкл (вторая дорожка) и 5 мкл (третья дорожка) белка Chriz, слитого с GST. Наличие полосы в вертикальной колонке означает, что белки BEAF и Chriz связываются напрямую. Нижняя панель (α GST) – контрольная гибридизация мембраны с антителами к GST. Полосы в вертикальных колонках отражают количество белков Chriz-GST и GST, использованных в каждом эксперименте.

мую взаимодействовать как с белком Z4, так и с белком Chriz (рис. 2).

Для подтверждения выявленных взаимодействий мы провели реципрокные эксперименты: кДНК белка BEAF переклонировали в вектор pGDA, а кДНК белков Z4 и Chriz – в вектор pGBT9. Затем взаимодействия между белками снова протестировали в ДДС. Полученные результаты полностью подтвердили наличие прямых межбелковых взаимодействий.

С помощью соосаждения белков на глутатион S-сефарозе (GST pull down) мы также продемон-

стрировали, что белки Chriz и BEAF напрямую взаимодействуют *in vitro* (рис. 3).

Чтобы с помощью ДДС выявить минимальный район взаимодействия для каждого из партнеров, на основе векторов pGDA и pGBT9 были созданы серии делеционных производных тестируемых белков.

Ранее было показано, что N-концевой район белка Z4 (1–237 а.о.) обеспечивает его взаимодействие с белком Chriz [4]. Мы локализовали на N-конце белка Z4 консервативный участок (98–169 а.о.) и показали, что именно он отвечает за взаимодействие белка Z4 с белком BEAF (рис. 2). Также белок Z4 содержит 7 цинковых пальцев C_2H_2 типа (239–515 а.о.), однако самостоятельного связывания Z4 с ДНК в междиске обнаружено не было [2]. Поочередно делетируя каждый из них, мы продемонстрировали, что во взаимодействии с белком BEAF участвуют цинковые пальцы 1–3 (рис. 2). С-концевой район белка Z4 не нужен для взаимодействия с белком BEAF.

В предыдущей работе мы показали, что последовательность белка Chriz от 273 до 503 а.о. обеспечивает его взаимодействие с белком Z4 [5]. Обогащенный положительно заряженными аминокислотами участок Chriz от 503 до 621 а.о. дополнительно стабилизирует взаимодействие Chriz–Z4. Неожиданно оказалось, что эти же последовательности отвечают за взаимодействие белка Chriz с белком BEAF (рис. 2). N- и С-концевые районы белка Chriz, а также его хромодомен не участвуют во взаимодействии Chriz–BEAF (рис. 2).

На N-конце белка BEAF расположен нетипичный домен типа цинковый палец, называемый BED доменом. Он отвечает за связывание белка BEAF с консенсусной последовательностью ДНК CGATA [12]. На С-конце находится BESS домен, отвечающий за гомодимеризацию белка и участвующий в белок-белковых взаимодействиях. Недавно было предсказано наличие у белка BEAF домена лейциновой молнии [10], способствующего гомодимеризации [13].

Со стороны белка BEAF во взаимодействиях с обоими белками, Z4 и Chriz, одновременно участвуют только BESS домен и район лейциновой молнии (рис. 2). Таким образом, Z4 и Chriz взаимодействуют с белком BEAF, способным образовывать ди/тримеры.

Наиболее эффективно белок BEAF связывается с так называемыми “Dual-core” последовательностями, где 2–5 коровых сайта связывания разделены АТ богатой последовательностью размером около 200 п.н. [12]. Исходя из этого, можно предположить, что через свои BESS домены и район LZ белок BEAF образует ди/тримеры и таким образом эффективно связывается с “Dual-core” последовательностями. Однако полноге-

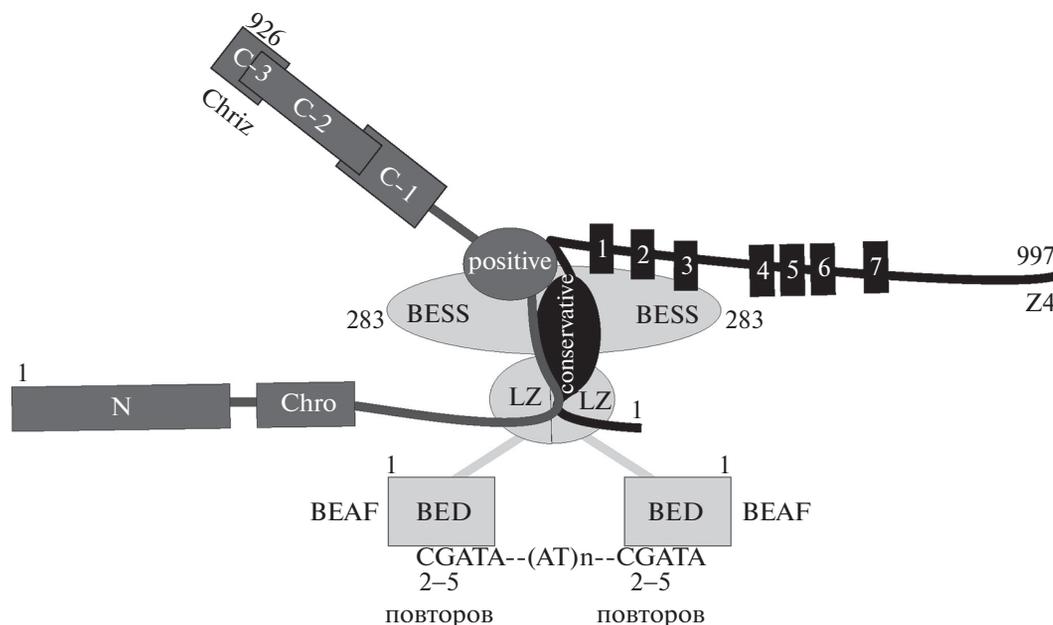


Рис. 4. Модель взаимодействия между димеризующимся белком BEAF и белками Z4 и Chriz. Заглавными буквами обозначены мотивы связывания белка BEAF; (AT)*n* – AT богатая последовательность. Районы белка BEAF обозначены светло-серым; районы белка Chriz – темно-серым; районы белка Z4 – черным. Остальные обозначения, как на рис. 2.

номное картирование не выявило каких-либо жестких правил размещения или относительной ориентации мотивов CGATA в областях обогащения белком BEAF [14]. Некоторые последовательности, демонстрирующие сильное связывание в экспериментах EMSA (electrophoretic mobility shift assay), имеют только 2 мотива CGATA, в то время как другие, имеющие 3 и более мотивов, связывали BEAF гораздо хуже. Это предполагает, что BEAF, так же, как ДНК-связывающий белок Su(Hw) [11], нуждается в партнерах, опосредующих его связывание с различающимися по структуре мотивами генома. Сложная перекрывающаяся структура выявленных нами межбелковых взаимодействий позволяет предположить, что партнерами, способствующими связыванию белка BEAF с районами междисков политеменных хромосом, служат белки Z4 и Chriz.

Основываясь на полученных данных, мы предлагаем модель сборки и функционирования комплекса BEAF/Z4/Chriz (рис. 4). В таком комплексе белки Z4 и Chriz не только стабилизируют связывание BEAF с ДНК, но одновременно могут привлекать на хроматин другие белковые компоненты, такие как комплекс NURF [8] и белок CP190.

Например, были получены данные, что искусственное привлечение белка Chriz в район диска политеменных хромосом, соответствующий интеркалярному гетерохроматину, приводит к локальной деконденсации хроматина и рекрутированию

белков Z4 и CP190 [15]. Кроме того, показано, что хроматиновый комплекс, содержащий белки Chriz, Z4 и BEAF, участвует в H3S10 фосфорилировании интерфазных хромосом, предположительно за счет местного рекрутирования тандемной киназы JIL-1.

Локальное связывание и активность такого комплекса на политеменных хромосомах может приводить к деконденсации областей междисков [4]. Таким образом, стабильный комплекс BEAF/Z4/Chriz способен формировать активный открытый хроматин, соответствующий междискам политеменных хромосом и границам ТАДов.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ (проект № 19-04-00257). Работа была выполнена с использованием инфраструктуры Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Мельникова Л.С., Георгиев П.Г., Головнин А.К. Функции и механизмы действия инсуляторов в геномах высших эукариот // Acta naturae. 2020. Т. 12. № 4. С. 15–33.
2. Eggert H., Gortchakov A., Saumweber H. Identification of the *Drosophila* interband-specific protein Z4 as a DNA-binding zinc-finger protein determining chro-

- mosomal structure // *J. Cell. Sci.* 2004. V. 117. № 8. P. 4253–4264.
3. 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.
 4. Gan M., Moebus S., Eggert 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.
 5. Мельникова Л.С., Костюченко М.В., Георгиев П.Г., и др. Белок Chriz способствует рекрутированию белка Z4 на промоторы STAT-зависимых генов // *ДАН*. 2020. Т. 490. № 1. С. 39–43.
 6. 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.
 7. Gilbert M.K., Tan Y.Y., Hart C.M. The *Drosophila* boundary element-associated factors BEAF-32A and BEAF-32B affect chromatin structure // *Genetics*. 2006. V. 173. № 3. P. 1365–1375.
 8. Roy S., Gilbert M.K., Hart C.M. Characterization of BEAF mutations isolated by homologous recombination in *Drosophila* // *Genetics*. 2007. V. 176. № 2. P. 801–813.
 9. Zhao K., Hart C.M., Laemmli U.K. Visualization of chromosomal domains with boundary element-associated factor BEAF-32 // *Cell*. 1995. V. 81. № 6. P. 879–889.
 10. Lam K.C., Muhlplfordt F., Vaquerizas J.M., et al. The NSL complex regulates housekeeping genes in *Drosophila* // *PLoS Genet.* 2012. V. 8. № 6. P.e1002736.
 11. Melnikova L., Kostyuchenko M., Molodina V., et al. 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.* 2017. V. 7. № 10. P. 170150.
 12. Emberly E., Blattes R., Schuettengruber B., et al. BEAF regulates cell-cycle genes through the controlled deposition of H3K9 methylation marks into its conserved dual-core binding sites // *PLoS Biol.* 2008. V. 6. № 12. P. 2896–2910.
 13. Avva S.V., Hart C.M. Characterization of the *Drosophila* BEAF-32A and BEAF-32B Insulator Proteins // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 9. P.e0162906.
 14. Jiang N., Emberly E., Cuvier O., et al. Genome-wide mapping of boundary element-associated factor (BEAF) binding sites in *Drosophila melanogaster* links BEAF to transcription // *Mol. Cell. Biol.* 2009. V. 29. № 13. P. 3556–3568.
 15. 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.

THE BEAF-32 PROTEIN DIRECTLY INTERACTS WITH Z4/putzig AND Chriz/Chromator PROTEINS IN *Drosophila melanogaster*

L. S. Melnikova^{a,#}, V. V. Molodina^a, M. V. Kostyuchenko^a,
Academician of the RAS P. G. Georgiev^a, and A. K. Golovnin^a

^a Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

[#]e-mail: lsm73@mail.ru

In *Drosophila*, the BEAF-32, Z4/putzig, and Chriz/Chromator proteins colocalize in the interbands of polytene chromosomes. It was assumed that these proteins can form a complex that affects the structure of chromatin. However, the mechanism of the formation of such a complex has not been studied. We have proved for the first time that the BEAF-32, Z4/putzig, and Chriz/Chromator proteins interact directly with each other and localized protein domains that provide multiple protein-protein interactions. Based on the data obtained, we developed a model of the mechanism of the formation the BEAF/ Z4/Chriz complex and its recruitment to chromatin.

Keywords: BEAF-32, Chriz/Chromator, Z4/putzig, protein-protein interaction, yeast two-hybrid system