

УДК 575.22:595.773.4

В ПРОЦЕССАХ РЕГУЛИРОВАНИЯ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ РАЗВИТИЯ И ДОМАШНЕГО ХОЗЯЙСТВА У ДРОЗОФИЛЫ УЧАСТВУЮТ РАЗЛИЧНЫЕ ГРУППЫ БЕЛКОВ

© 2023 г. Академик РАН И. Ф. Жимулев^{1,*}, Т. Ю. Ватолина¹,
Г. В. Похолкова¹, О. В. Антоненко¹, М. В. Мальцева¹

Поступило 20.05.2023 г.
После доработки 20.06.2023 г.
Принято к публикации 20.06.2023 г.

Белки и модифицированные гистоны принимают участие в процессах инициации и элонгации транскрипции в геноме дрозофилы. По данным работы белок CHRIZ (инсулятор хроматина) и гистона H3K36me3 (элонгация РНК) выявляются в участках локализации генов домашнего хозяйства (междиски и серые диски политенных хромосом) и никогда — в районах генов развития (черные диски и в возникающие из них крупные пuffs). Модификация гистона H3S10P, который связывают с начальной элонгацией нити РНК в ходе транскрипции, выявляются исключительно в малых пuffs, но не в участках локализации генов домашнего хозяйства или крупных экдизон-индуцируемых пuffs, в которых локализованы гены развития. Модифицированный гистон H4R3me2 (ко-репрессор экдизонного рецептора) выявляются только в крупных экдизон-индуцируемых пuffs.

Ключевые слова: модификации гистонов H3K36me3, H3S10P, H4R3me2, белок CHRIZ, гены домашнего хозяйства, гены развития, промоторы генов, политенные хромосомы, дрозофила

DOI: 10.31857/S2686738923700348, **EDN:** SRXVUU

Транскрипция у эукариот инициируется в результате осуществления нескольких процессов на промоторных участках генов [1, 2]: деконденсируется хроматин под влиянием инсуляторных белков, собирается транскрипционный комплекс из молекул белков, изменяется структура молекул гистонов за счет посттрансляционных модификаций — отдельные аминокислоты в их составе ацетируются, метилируются или фосфорилируются [3, 4], начинается синтез РНК (элонгация).

В политенных хромосомах присутствуют три типа морфологических структур: черные и серые диски и междиски между ними [6]. Черные диски состоят из плотно упакованного материала, в то время как серые — из материала разрыхленного, по степени упаковки материала эти два типа дисков различаются примерно в 10 раз [7]. Гены развития расположены в черных дисках, гены домашнего хозяйства занимают две структуры — в междисках промоторы, в соседних серых дисках — тела генов [5, 7].

В результате разработки биоинформатической модели состояний хроматина (4НММ) весь геном дрозофилы был разбит на две группы — около 6.5 тыс. генов с относительно постоянной активностью в ходе развития (гены домашнего хозяйства) и около 3.1 тыс. генов активных только на определенных стадиях онтогенеза или только в определенных тканях (гены развития). С помощью этой же модели структуры интерфазных политенных хромосом (два типа дисков и междисков) были связаны с этими группами генов [5].

Из хроматина черных дисков в конце личиночного развития формируются крупные вздутия — пuffs, т.е. в результате действия стероидного гормона экдизона активируются гены развития, причем активные только в ходе метаморфоза и активацию которых легко наблюдать под микроскопом [9]. Многие из генов, локализованных в пределах хроматина пuffs, кодируют рецепторы гормона, функции других пока неизвестны [10–13].

В данной работе с помощью картирования антител в политенных хромосомах дрозофилы показано, что в процессах инициации и элонгации транскрипции генов домашнего хозяйства и генов развития принимают участие различные группы белков и модифицированных гистонов.

Мы использовали антитела против белка CHRIZ/CHROMO дрозофилы (в дальнейшем

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук (ИМКБ СО РАН), Новосибирск, Россия

*e-mail: zhimulev@mcb.nsc.ru

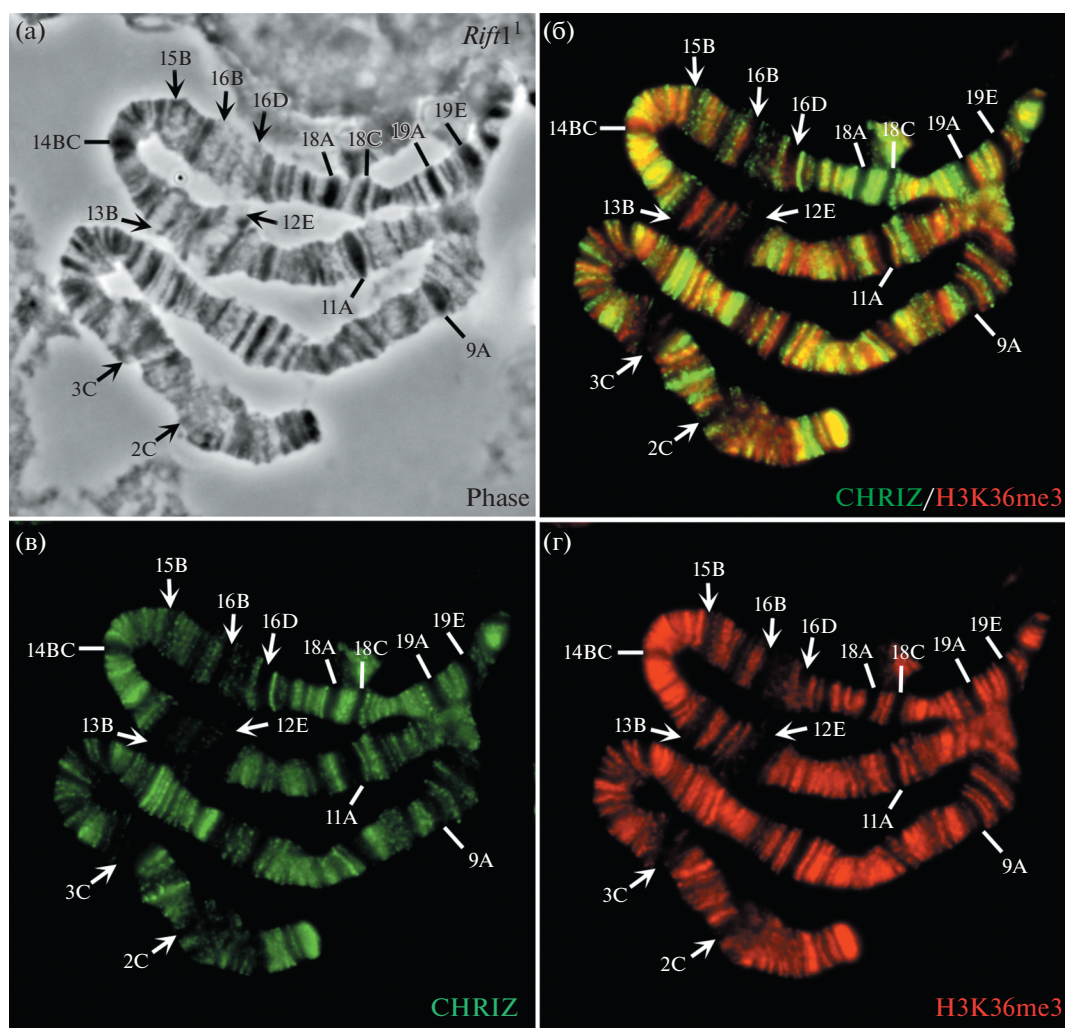


Рис. 1. Локализация иммунофлуоресцирующих антител на белок CHRIZ (в) и модификацию гистона H3K36 me3 (г) в X хромосоме у личинок конца третьего личиночного возраста [10] за два часа до начала формирования пупариума. (а) и (б) — фазовый контраст и наложение двух упомянутых окрасок соответственно. Стрелками обозначены экдизон-индуцируемые пuffs, прямыми черточками — черные диски.

CHRIZ, антитела получены в нашей лаборатории), антитела против модифицированных гистонов человека H3K36me3 (Abclonal, Diagenode), человека и мыши H3S10P (Merck) и антитела против модифицированной формы гистона H4R3me2 человека (Active Motif) (антитела на две последние модификации гистонов любезно предоставлены Н.Е. Воробьевой). Использованные в работе методы ведения дрозофил, приготовления препаратов, разведения антител, окраски, фотографирования, микроскопии и манипуляции с иммунофлуоресценцией проводили как описано ранее в [14].

Белок CHRIZ в политенных хромосомах локализуется в промоторах генов домашнего хозяйства (в политенных хромосомах — в междисках) [5, 8]. Будучи привлеченным в окружение материала черных дисков в составе искусственно со-

зданных генетических конструкций, декомпактизует этот дисковый материал, формируя новый междиск [14], т.е. ведет себя как инсуляторный белок. В качестве первого шага инициации транскрипции в генах домашнего хозяйства является привлечение в район промотора белка CHRIZ — инсулятора, деконденсирующего структуру хроматина. Поэтому мы рассматриваем CHRIZ как абсолютно необходимый компонент для посадки факторов транскрипции и РНК полимеразы.

Модифицированный гистон H3K36me3 выполняет в геноме дрозофилы многие функции, в том числе участвует в элонгации синтезируемой РНК [15, 16]. На рис. 1 показаны результаты иммунофлуоресцентной колокализации антител на белок CHRIZ и модифицированный гистон H3K36me3.

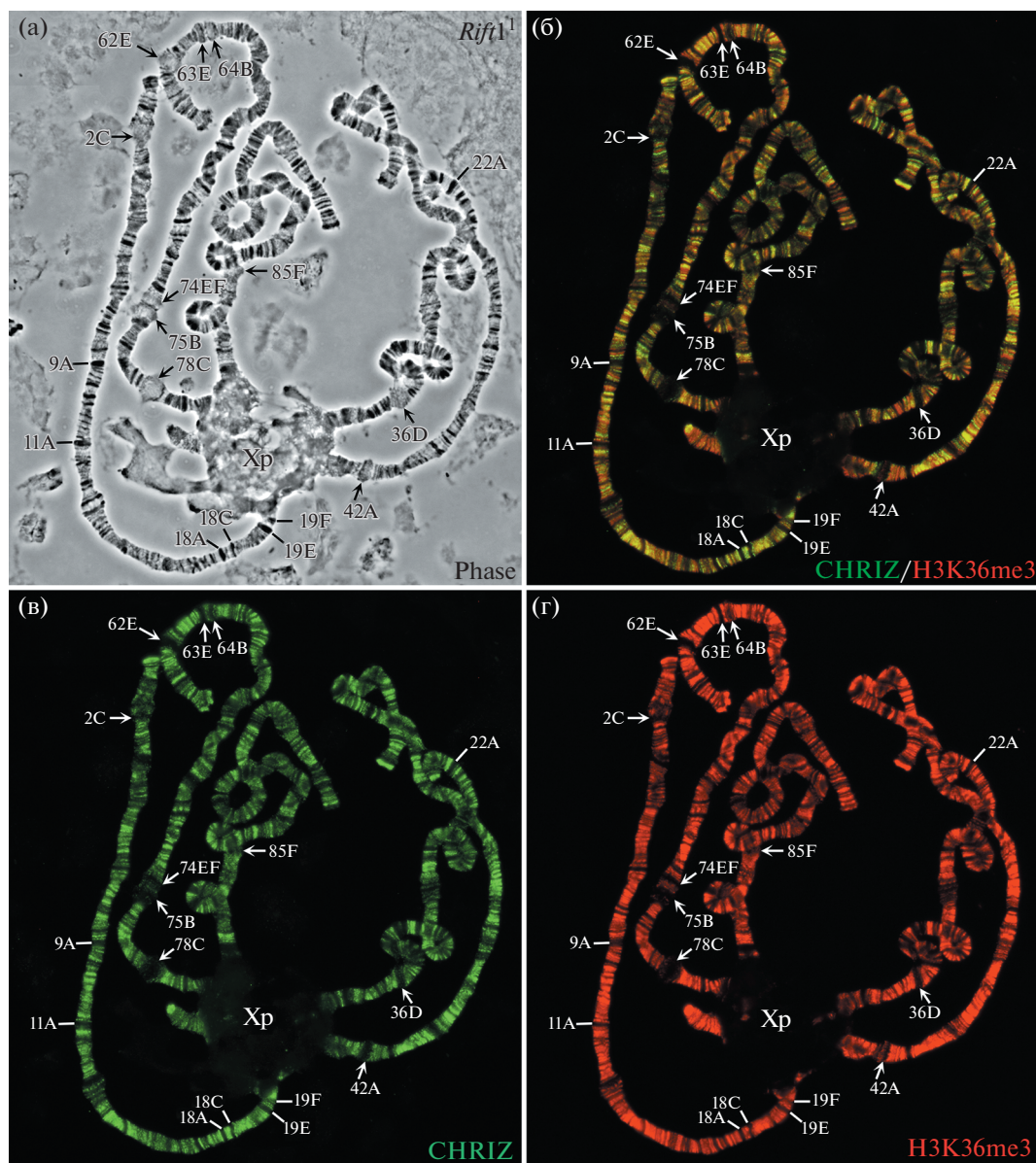


Рис. 2. Локализация иммунофлуоресцирующих антител на белок CHRIZ (v) и модификацию гистона H3K36me3 (r) у личинок на стадии начала формирования пупариума [10]. (a) и (б) — соответственно фазовый контраст и наложение двух упомянутых окрасок. Цифрами и стрелками обозначены экдизон-индуцируемые пuffs, цифрами и прямыми черточками — черные диски.

Гены домашнего хозяйства в политенных хромосомах расположены одиночно или группами в участках локализации серых дисков/междисков, при этом в междисках лежат промоторы, а в дисках тела этих генов (соответственно зеленая и красная флуоресценция на рис. 1в, г). Окрашивание желтого цвета (из-за наложения красной и зеленой флуоресценции) видно на большей части длины всех хромосом (рис. 1б). Гены развития в политенных хромосомах располагаются в черных дисках (обозначения с черточками на рис. 1а), при активировании этих генов образуются пuffs

(обозначены стрелками на рис. 1). В черных дисках и во всех пuffs отмечено полное отсутствие сигналов флуоресценции (рис. 1б) несмотря на то, что, как известно [сводка 10], пuffs — наиболее интенсивно транскрибируемые районы.

На рис. 2 показаны результаты иммунофлуоресцентной локализации антител на белок CHRIZ и модифицированный гистон H3K36me3, в хромосомах личинок с более ранней стадии развития, чем на рис. 1. Окрашка антител на белок CHRIZ полностью отсутствует в участках локализации генов развития в черных дисках, в пuffs, а

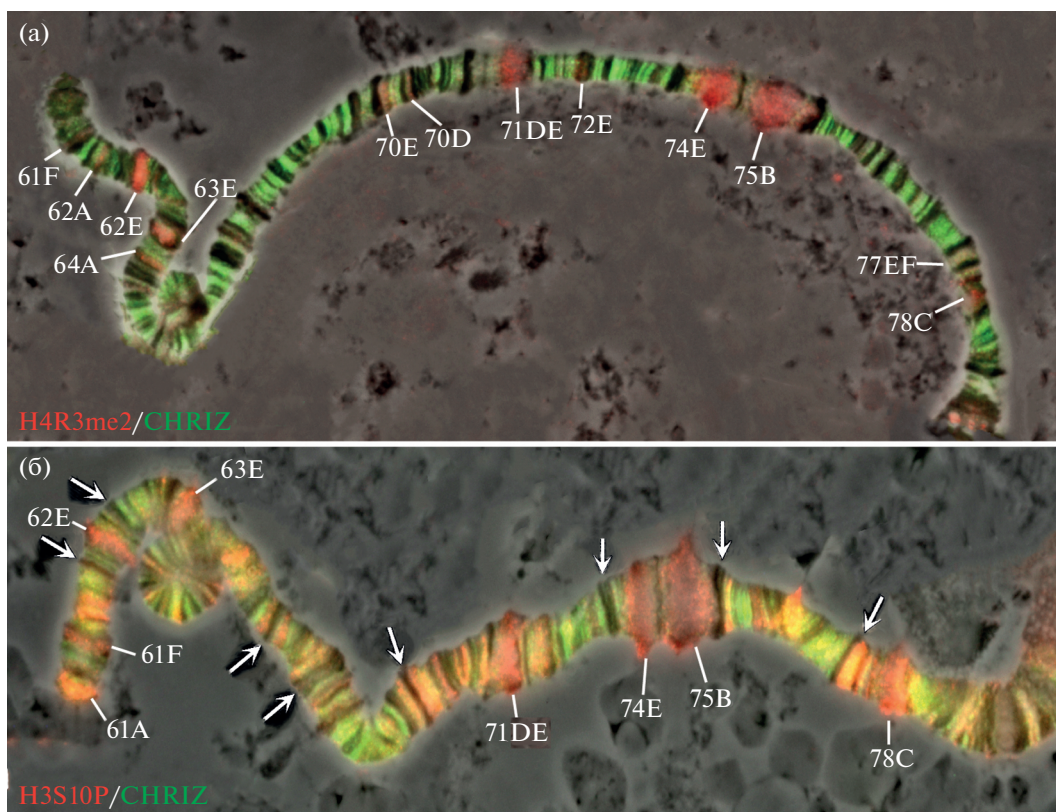


Рис. 3. Иммунофлуоресцентная окраска политенных хромосом антителами (а) на модификацию гистона H3R3me2 (красный цвет) и белок CHRIZ (зеленый цвет), цифрами и прямыми черточками обозначены большие экдизон-индуцируемые пuffs; (б) на модификацию H3S10P (красный цвет) и белок CHRIZ (зеленый цвет), цифрами и прямыми черточками обозначены малые и большие экдизон-индуцируемые пuffs, стрелками — черные диски.

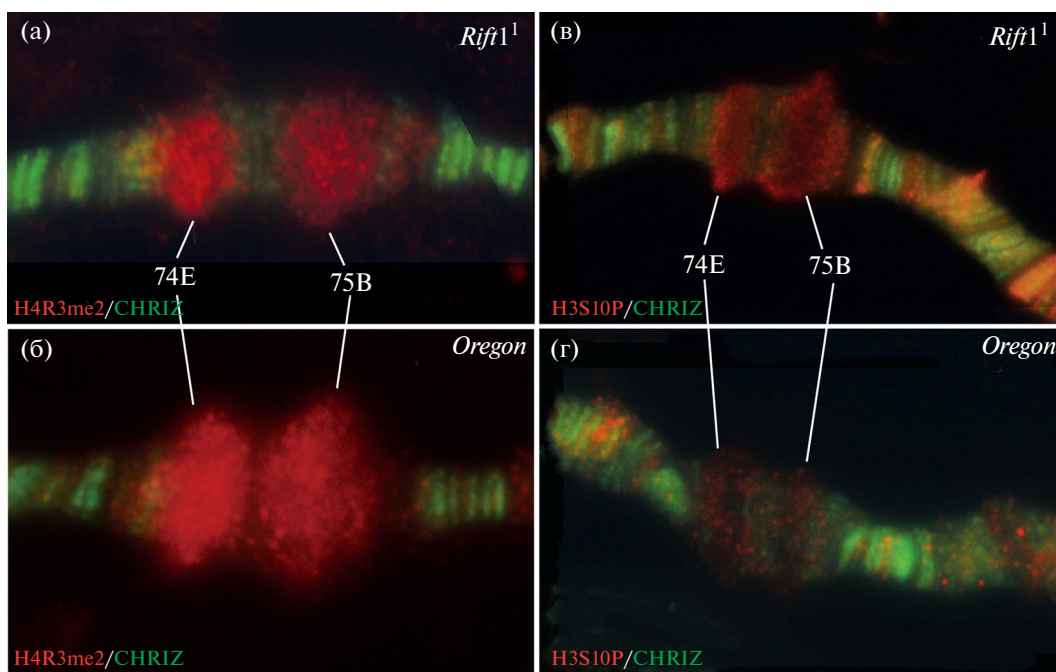


Рис. 4. Иммунофлуоресцентное окрашивание пuffs 74E и 75B в линиях *Oregon* и *Rif1*¹ антителами на модификацию гистонов H4R3me2 (красный цвет) и белок CHRIZ (зеленый цвет) (а, б) и модификацию H3S10P (красный цвет) и белок CHRIZ (зеленый цвет) (в, г).

также в прицентромерном гетерохроматине (Нет на рис. 2), который, как правило, значительно обеднен генами как развития, так и домашнего хозяйства. По этой причине в нем нет как точек инициации, так и элонгации транскрипции.

Антитела на ко-репрессор экдизонового рецептора — модификацию гистона H4R3me2 [17] метят строго участки локализации крупных экдизон-индуцируемых пучков, независимо от их размеров (красные сигналы на рис. 3а, 4а, б).

Фосфорилирование гистона H3 в позиции S10 с помощью трансферазы *JIL-1* (модификация H3S10P) специфически необходимо для осуществления ранней элонгации транскрипции (см. обсуждение в [18, 19]). Данные рис. 3б показывают довольно сложное распределение окрасок при совместном использовании антител на CHRIZ: зеленая окраска антител на инсуляторный белок осталась в участках локализации генов домашнего хозяйства, в то время как гены развития поделились на две группы: в наиболее крупных пучках окраска на H3S10P не выявлена или слабо выявлена (пучки в районах 63E, 72D, 74E, 75B, 78C), в то время как малые экдизон-индуцируемые пучки, которых в геноме более всего [10], активно метились (красная окраска на рис. 3б, 4в, г).

Таким образом, результаты, полученные в данной статье, позволяют высказать предположение о том, что в гомологичных процессах активирования транскрипции в генах домашнего хозяйства и генах развития участвуют разные наборы белков.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Н.Е. Воробьевой (ИБГ РАН) за предоставленные антитела на модификации гистонов H4R3me2 и H3S10P.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при финансовой поддержке Государственного задания ИМКБ СО РАН № FWGZ-2021-0014 (окраски на модификации гистонов H4R3me2 и H3S10P) и гранта РФФИ № 19-14-00051-П (окраски на белок CHRIZ и модификацию гистона H3K36me3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lenhard B., Sandelin A., Carninci P. Metazoan promoters: emerging characteristics and insights into transcriptional regulation // *Nat. Rev. Genet.* 2012. V. 13. № 4. P. 233–245.
2. Andersson R., Sandelin A. Determinants of enhancer and promoter activities of regulatory elements // *Nat. Rev. Genet.* 2020. V. 21. P. 71–87.

3. Boros I.M. Histone modification in *Drosophila* // *Briefings in Functional Genomics*. 2012. V. 11. № 4. P. 319–331.
4. Lindehell H., Glotov A., Dorafshan E., et al. The role of H3K36 methylation and associated methyltransferases in chromosome-specific gene regulation // *Sci. Adv.* 2021. V. 7. № 40. eabh4390.
5. Zhimulev I.F., Zykova T.Yu., Goncharov F.P., et al. Genetic organization of polytene chromosome bands and interbands in *Drosophila melanogaster* // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 7. P. e101631.
6. Bridges C.B. A revised map of the salivary gland X-chromosome of *Drosophila melanogaster* // *J. Hered.* 1938. V. 29. № 1. P. 11–13.
7. Kozlova T.Yu., Semeshin V.F., Tretyakova I.V., et al. Molecular and cytogenetical characterization of the 10A1-2 band and adjoining region in the *Drosophila melanogaster* polytene X chromosome // *Genetics*. 1994. V. 136. № 3. P. 1063–1073.
8. Zykova T.Yu., Levitsky V.G., Belyaeva E.S., et al. Polytene chromosomes — a portrait of functional organization of the *Drosophila* genome // *Curr. Genomics*. 2018. V. 19. № 3. P. 179–191.
9. Ashburner M., Chihara C., Meltzer P., et al. Temporal control of puffing activity in polytene chromosomes // *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 1974. V. 38. P. 655–662.
10. Zhimulev I.F. Genetic organization of polytene chromosomes // *Advances in Genetics*. 1999. V. 39. P. 1–589.
11. Thummel C.S. Ecdysone-regulated puff genes 2000 // *Insect Biochem. Mol. Biol.* 2002. V. 32. № 2. P. 113–20.
12. King-Jones K., Thummel C. Nuclear receptors — a perspective from *Drosophila* // *Nat. Rev. Genet.* 2005. V. 6. № 4. P. 311–323.
13. FlyBase version FB2022_06, released Desember 13, 2022.
14. 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.
15. Boldyreva L.V., Goncharov F.P., Demakova O.V., et al. Protein and genetic composition of four chromatin types in *Drosophila melanogaster* Cell Lines // *Curr. Genomics*. 2017. V. 18. № 2. P. 214–226.
16. Sharda A., Humphrey T.C. The role of histone H3K36me3 writers, readers and erasers in maintaining genome stability // *DNA Repair*. 2022. № 119: 103407.
17. Kimura S., Sawatsubashi S., Ito S., et al. *Drosophila* arginine methyltransferase 1 (DART1) is an ecdysone receptor co-repressor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 371. № 4. P. 889–893.
18. Karam C.S., Kellner W.A., Takenaka N., et al. 14-3-3 mediates histone cross-talk during transcription elongation in *Drosophila* // *PLoS Genetics*. 2010. V. 6. № 6. P. e1000975.
19. Cai W., Bao X., Deng H., et al. RNA polymerase II-mediated transcription at active loci does not require histone H3S10 phosphorylation in *Drosophila*. *Development*. 2008. V. 135. № 17. P. 2917–2925.

DIFFERENT PROTEIN GROUPS INVOLVED IN TRANSCRIPTION REGULATION IN GENES OF DEVELOPMENT AND HOUSEKEEPING IN *DROSOPHILA*

Academician of the RAS I. F. Zhimulev^{a, #}, T. Yu. Vatolina^a, G. V. Pokholkova^a,
O. V. Antonenko^a, and M. V. Maltseva^a

^a*Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences,
Novosibirsk, Russian Federation*

[#]*e-mail: zhimulev@mcb.nsc.ru*

Antibodies to histone modifications and an insulator protein involved in the processes of transcription initiation and elongation are mapped in *Drosophila* polytene chromosomes. The CHRIZ protein (chromatin insulator) and H3K36me3 histone modification (RNA elongation) are detected only in the localization of housekeeping genes (interbands and gray bands of polytene chromosomes) and never in the regions of development genes (black bands and large puffs arising from them). Antibodies to H3S10P histone modification, which is associated with the initial elongation of the RNA strand during transcription, are found exclusively in small puffs, but not in housekeeping gene localization sites or large ecdysone-induced puffs, where housekeeping genes are localized. Antibodies to H4R3me2 histone modification (a co-repressor of the ecdysone receptor) are detected only in large α -induced puffs.

Keywords: histone modifications H3K36, H3S10P, H4R3me2, CHRIZ protein, housekeeping genes, developmental genes, gene promoters, polytene chromosomes, *Drosophila*