

БЕЛКИ AEF1 И CG10543 ДРОЗОФИЛЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ДОМЕНЫ ЦИНКОВЫХ ПАЛЬЦЕВ, КОЛОКАЛИЗУЮТСЯ С КОМПЛЕКСАМИ SAGA, SWI/SNF И ORC НА ПРОМОТОРАХ ГЕНОВ И УЧАСТВУЮТ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

© 2024 г. Ю. В. Николенко^а, М. М. Куршакова^а, Д. В. Копытова^а, Ю. А. Вдовина^а,
Н. Е. Воробьева^б, А. Н. Краснов^{б,*}

^аИнститут молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

^бИнститут биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

*e-mail: krasnov@genebiology.ru

Поступила в редакцию 03.12.2023 г.

После доработки 11.12.2023 г.

Принята к публикации 12.12.2023 г.

Ряд белков с доменами типа цинковых пальцев, включая Aef1 и CG10543, взаимодействуют, как показано нами ранее, с DUB-модулем комплекса SAGA дрозофилы. В представленной работе проведено полногеномное исследование локализации белков Aef1 и CG10543 и показано, что они находятся преимущественно на промоторах активных генов. Сайты связывания этих белков колокализуются с комплексами модификации и ремоделирования хроматина SAGA и dSWI/SNF, а также с репликационным комплексом ORC. Показано, что белки Aef1 и CG10543 участвуют в регуляции экспрессии части генов, на промоторах которых они находятся. Таким образом, белки Aef1 и CG10543 являются новыми участниками транскрипционной сети клетки, которые колокализуются с основными транскрипционными и репликационными комплексами дрозофилы.

Ключевые слова: Aef1, CG10543, домены цинковых пальцев, регуляция транскрипции, DUB-модуль, комплекс SAGA, SWI/SNF, ORC

DOI: 10.31857/S0026898424040087, EDN: IMOGAY

ВВЕДЕНИЕ

Высококонсервативный коактиваторный комплекс SAGA, основной функцией которого является модификация (ацетилирование и деубиквитинирование) гистонов хроматина, содержит более 20 белковых субъединиц [1]. Субъединицы комплекса SAGA взаимодействуют с различными активаторами транскрипции, привлекая таким образом комплекс на промоторы определенных генов [2, 3]. В действии комплексов, ремоделирующих и модифицирующих хроматин, существует определенный синергизм. Показано, что комплекс SAGA ацетирует нукleosомы на промоторах генов в процессе активации транскрипции. Это приводит к привлечению комплекса ремоделирования хроматина dSWI/SNF и стимулированию его ремоделирующей активности [4, 5].

Комплексы SAGA и SWI/SNF дрозофилы локализованы на различных регуляторных элементах генома, включая промоторы, где зачастую колокализуются с репликационным комплексом ORC [6]. Инициация репликации происходит на множестве сайтов в геноме, которые называются участками начала (ориджинами) репликации. На ориджины

репликации привлекается комплекс ORC, который состоит из шести субъединиц (ORC1–6). Этот комплекс участвует в создании платформы для связывания белков пререпликативного комплекса и в инициации репликации. Чтобы обеспечить правильный временной паттерн репликации генома в S-фазе, в клетках эукариот создается множество ориджинов репликации, определенная часть которых запускается в зависимости от стадии развития организма и условий роста. Комплекс ORC связывает определенные участки генома [7], однако субъединицы данного комплекса не проявляют явной специфичности к последовательностям ДНК. Поэтому встает вопрос, какие факторы определяют позиционирование ORC-комплексов в геноме.

В ходе предыдущих исследований нами обнаружено, что инсуляторный белок Su(Hw), содержащий домен цинковых пальцев, взаимодействует с белком ENY2 (субъединица DUB-модуля комплекса SAGA) и привлекает комплексы SAGA, SWI/SNF и ORC на Su(Hw)-зависимые инсуляторы дрозофилы, участвуя одновременно в регуляции транскрипции и в позиционировании ориджинов репликации [8–11]. Белок ENY2 является субъединицей деубиквитирующего (DUB)

модуля комплекса SAGA, связанной с различными стадиями экспрессии генов [8–15]. Высказано предположение, что существуют и другие “цинковые белки”, которые взаимодействуют с комплексом SAGA дрозофилы и функционируют сходным образом на других регуляторных элементах генома, включая промоторы. В ходе дальнейших экспериментов был идентифицирован еще один подобный цинковый белок — CG9890 [16–18]. С целью поиска новых цинковых белков, взаимодействующих с комплексом SAGA дрозофилы, был очищен DUB-модуль комплекса SAGA [19]. С использованием масс-спектрометрического анализа показано, что в состав фракций, содержащих DUB-модуль комплекса SAGA, входят несколько десятков белков с доменами цинковых пальцев, из которых отобрали белки с кластером близкорасположенных цинковых пальцев и каноническим линкером (TGE[K/R]P) между ними, так как именно такая структура с максимальной вероятностью предсказывает ДНК-связывающие свойства белка со специфичным сайтом связывания [20, 21]. В результате дальнейшего отбора осталось 12 белков, взаимодействие которых было проверено с помощью реакции коиммунопреципитации. Подтверждено взаимодействие белка CG9609, а также обнаружено его слабое взаимодействие с белками Aef1 (Adult enhancer factor 1) и CG10543. Чтобы дополнительно подтвердить взаимодействие белков Aef1 и CG10543 с комплексом SAGA дрозофилы было решено провести ChIP-Seq-анализ этих белков и определить колокализацию данных факторов на полногеномном уровне.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток линии Schneider 2 (S2). РНК-интерференция. Клетки культивировали при 25°C в среде Schneider's insect medium (“Sigma”, США), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (“HyClone”, США). Клетки трансфицировали с использованием Effectene Transfection Reagent (“Qiagen”, Германия) по протоколу производителя. Нокдаун генов проводили с помощью РНК-интерференции согласно опубликованному протоколу [22]. дцРНК для нокдауна генов *Aef1* и *CG10543* синтезировали с использованием следующих праймеров:

Aef1 — GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAA TGATGCATATCAAAAGCCT и GAATTAATACGACTCACTATAGGGAGATCCGGGATGCTCGCTA TGT;
CG10543 — GAATTAATACGACTCACTATAGGGA GATTGATGAGCTTCCAGCATAT и GAATTAATA CGACTCACTATAGGGAGAATCGTTCTTCACTG GGTAGTA.

В качестве контроля использовали дцРНК, соответствующую фрагменту плазмиды pBluescript II

SK(–) (“Stratagene”, США) длиной 500 п.н. *pBluescriptIIISK(–)*, GAATTAATACGACTCACTATA GGGAGAGTTACATGATCCCCCATG и GAATTA ATACGACTCACTATAGGGAGATTTTCGCCCCGA AGAACG.

В каждый эксперимент по РНК-интерференции дцРНК брали из расчета 30 мкг на 1 млн клеток. По прошествии 5 дней инкубации выделяли РНК и измеряли уровни мРНК исследуемых генов методом обратной транскрипции с последующей ПЦР в реальном времени. Использовали следующие праймеры:

sgl — CGTGATAACTCTGGTGGACAAG и GTCTCGATGTCCGTTGAGAAG;
D19B — TTGCCGAAAAGGCTTTACCAC и CACTCCGTGCAGGGGAAGTC;
Kek1 — ACCCTGCTGCCTGGAATGAT и GCATGTAGCCATCCTCAGTCATC;
wg — ACTGCTCGACGAGAAACTTCTC и TGTAGTCGCAGGTGCAGGAC;
Psc — CGCTGACTCAAACTCAAGTGTG и TCGATTCTGGCGTCATCATAGTA;
CG1907 — CCGCTAGACTTGGTCAAGACC и TGTCTCAGCAGAGCAGCTCC;
CG34136 — TGCCTTGCAATTCTTCGCTTG и GTCGTGGCGCTGTAGGGACT;
Ras64B — GAGGGATTCTCTGCTCGTCTTCG и GTCGCACTTGTTACCCACCATC.

Получение поликлональных антител к белкам Aef1 и CG10543. Поликлональные антитела α-Aef1 и α-CG10543 получали из сыворотки крови крыс, иммунизированных фрагментами соответствующих белков. Фрагменты белков нарабатывали в клетках *Escherichia coli*: белок Aef1 с использованием N-концевого фрагмента длиной 162 аминокислотных остатка, а белок CG10543 — C-концевого фрагмента из 136 аминокислотных остатков. Эти участки были выбраны, чтобы исключить домены цинковых пальцев из фрагментов, которые будут использоваться для иммунизации животных. Домены цинковых пальцев при получении антител к цинковым белкам не использовали, так как это может дать перекрестную реакцию с другими цинковыми белками. Антитела очищали на колонках, которые содержали соответствующие рекомбинантные белки.

Идентификация сайтов связывания белков Aef1 и CG10543 в геноме дрозофилы. Сайты связывания белков Aef1 и CG10543 идентифицировали, как описано ранее. Идентифицировано примерно по 3500 сайтов связывания каждого из белков.

Анализ распределения сайтов связывания белков Aef1 и CG10543 в геноме. Геном разбивали на точки начала транскрипции (TSS), точки терминации транскрипции (TES), транскрибируемые области (участки генов за исключением TSS и TES) и межгенные области (все остальное). Областью TSS считали интервал ±500 п.н. от старта транскрипции.

Областью TES считали интервал ± 500 п.н. от точки терминирования транскрипции. Данные области определяли из аннотации транскриптов генома дрозофилы dmel_r6.40. Считали, что сайт связывания находится в данной области, если пик сайта связывания попадает в заданный интервал.

Анализ привлечения комплексов SAGA, SWI/SNF, ORC на сайты связывания белков Aef1 и CG10543. В анализе использовали ChIP-Seq профили белков GCN5 (комплекс SAGA), OSA (комплекс SWI/SNF), ORC2 (комплекс ORC), полученные нами в предыдущих работах. Был посчитан усредненный профиль каждого из этих белков на четырех группах сайтов: на сайтах связывания белков Aef1 и CG10543, на случайных промоторах и на случайных местах генома. Так как для каждого из белков Aef1 и CG10543 было идентифицировано около 3500 сайтов, мы отобрали такое же число случайных промоторов и случайных мест генома с помощью генератора псевдослучайных чисел. Для получения усредненного ChIP-Seq профиля белков GCN5, OSA и ORC2 на какой-либо группе сайтов сначала были получены локальные профили каждого из 3500 сайтов в группе в пределах ± 5000 п.н. от сайта. Затем эти 3500 локальных профилей усредняли по каждой нуклеотидной позиции для получения среднего профиля. Таким образом получено 12 усредненных профилей для трех белков — GCN5, OSA и ORC2 — на четырех группах сайтов.

Результаты ChIP-Seq-анализа размещены в базе данных Gene Expression Omnibus (идентификатор эксперимента GSE250183). Кроме самих данных, в этой базе приведены также протоколы иммунопреципитации хроматина, создания библиотек и обработки данных.

ChIP-Seq профили получали с помощью программы bamCoverage 3.5.4. Значения в профиле представляют собой нормированное

(CPM — Counts Per Million mapped reads) значение ДНК-фрагментов в каждой геномной позиции.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Белки Aef1 и CG10543 локализованы преимущественно на промоторах генов

С целью идентификации сайтов локализации белков Aef1 и CG10543 в геноме проведен ChIP-Seq-анализ. Поликлональные антитела к белкам Aef1 и CG10543 получены и аффинно очищены на колонках, содержащих соответствующие рекомбинантные белки. Специфичность антител проверена с помощью Вестерн-блоттинга. На полиакриламидный гель наносили белковые экстракты, выделенные как из нормальных клеток, так и подвергнутых РНК-интерференции (рис. 1). Вестерн-блот инкубировали с проверяемыми антителами и антителами к α -тубулину для контроля белковой нагрузки. На рис. 1 видно, что антитела узнают полосы, интенсивность которых значительно уменьшилась после РНК-интерференции соответствующих белков. При этом полосы α -тубулина не изменились.

Затем была проведена иммунопреципитация хроматина из культуры клеток дрозофилы S2 с использованием антител к CG10543 и Aef1 в двух повторях и получены библиотеки для высокопроизводительного секвенирования, которое проводили на геномном секвенаторе Illumina Novaseq 6000. Полученные последовательности выравнивали на геном с помощью программы Hisat2. В дальнейший анализ брали только уникально картированные риды. Потенциальные места связывания идентифицировали с помощью программы Macs2. Характерный ChIP-seq профиль белков Aef1 и CG10543 представлен на рис. 2. В качестве примера приведен ген *wg*, на промоторе которого находятся оба

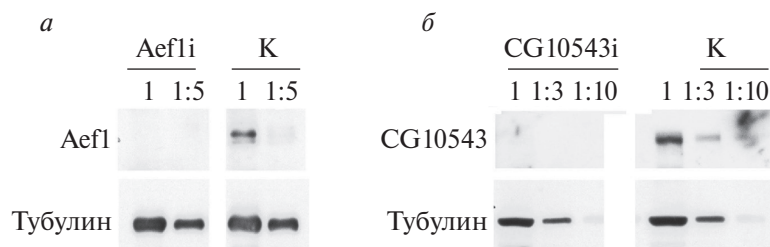


Рис. 1. Проверка специфичности антител к белку Aef1 (а) и CG10543 (б) с помощью Вестерн-блот-анализа. На панели а нанесен белковый экстракт из контрольных клеток (К) в двух разведениях (1 и 1:5), а также белковый экстракт из клеток после РНК-интерференции *Aef1* (Aef1i), также взятый в двух разведениях. Вестерн-блот (панель а) инкубировали с проверяемыми антителами к белку Aef1, а также с антителами к α -тубулину для контроля нанесения. На панели б каждый из образцов нанесен в трех разведениях (1, 1:3, 1:10). К — экстракт из контрольных клеток, CG10543i — экстракт из клеток после РНК-интерференции *CG10543*. Вестерн-блот (панель б) инкубировали с антителами к белку CG10543, а также с антителами к α -тубулину для контроля нанесения.

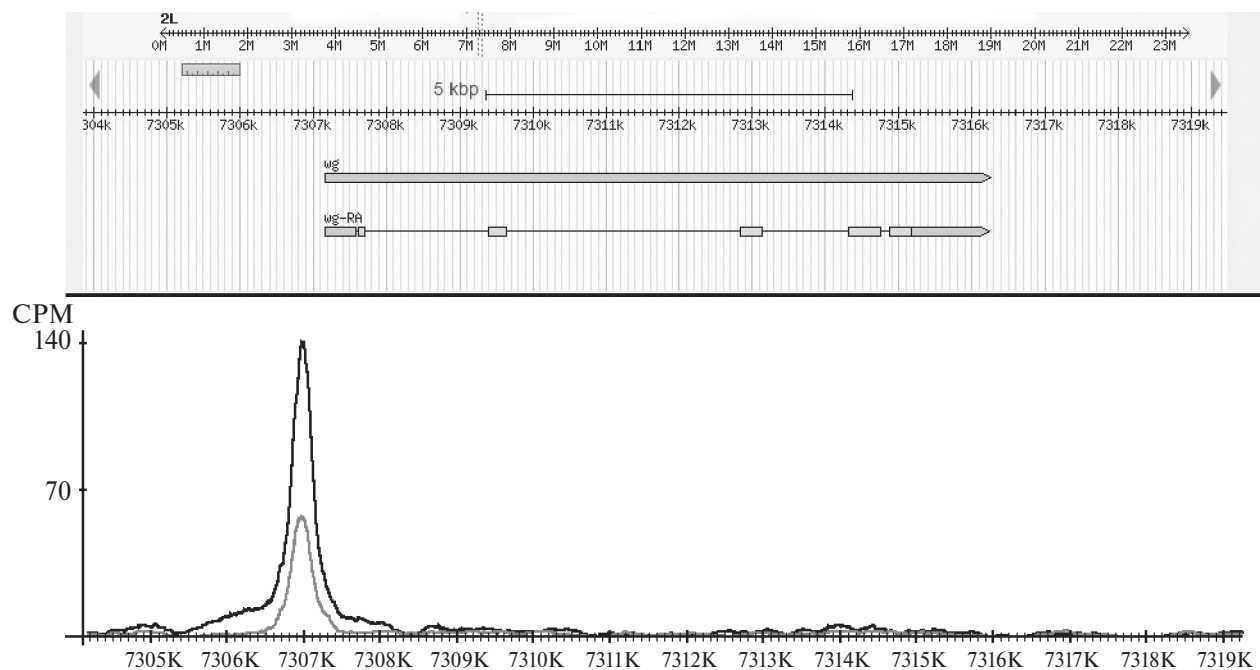


Рис. 2. ChIP-Seq профили белков CG10543 (черный) и Aefl (серый) в области гена *wg*. На верхней панели представлена структура гена из геномного браузера. На нижней панели представлены ChIP-Seq профили в единицах CPM.

белка. Идентифицировано примерно по 3500 сайтов связывания каждого белка (FDR <5%).

Мы аннотировали полученные сайты по признаку их локализации в одном из следующих элементов генома дрозофилы: промоторы генов, 3'-концы генов, тела генов и межгенные области.

Согласно полученным данным (рис. 3), наибольшее количество ChIP-Seq-пиков белков Aefl и CG10543 представлено в промоторных областях генов дрозофилы, 55 и 76% соответственно. Мы предполагаем, что, локализуясь преимущественно на промоторах генов, данные белки могут участвовать

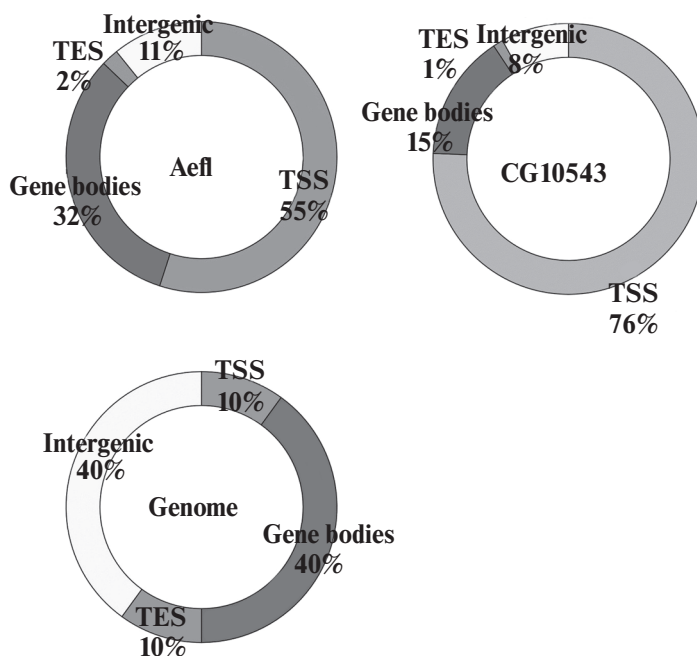


Рис. 3. Распределение сайтов связывания белков Aefl (верхнее левое изображение) и CG10543 (верхнее правое изображение) относительно аннотированных элементов генома дрозофилы. Для сравнения показана относительная представленность всех аннотированных элементов в геноме (Genome) (нижнее изображение). TSS-промоторная область, TES-конец гена, Gene bodies — область гена между TSS и TES, Intergenic — межгенные области.

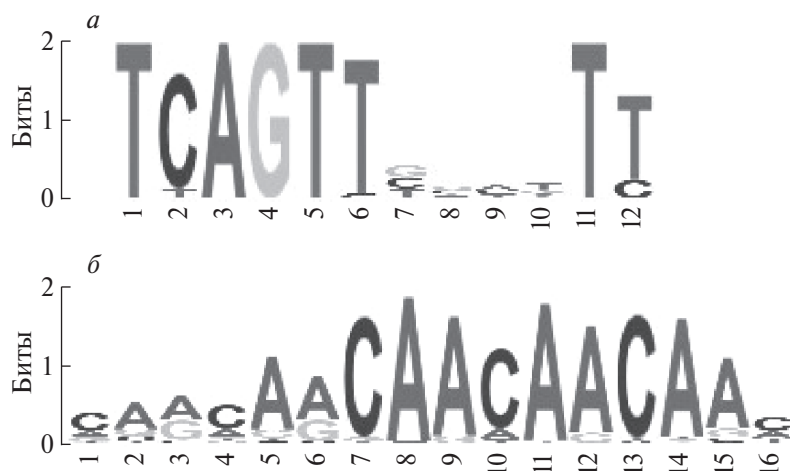


Рис. 4. Консенсусная последовательность потенциального сайта связывания белков CG10543 (а) и Aef1 (б).

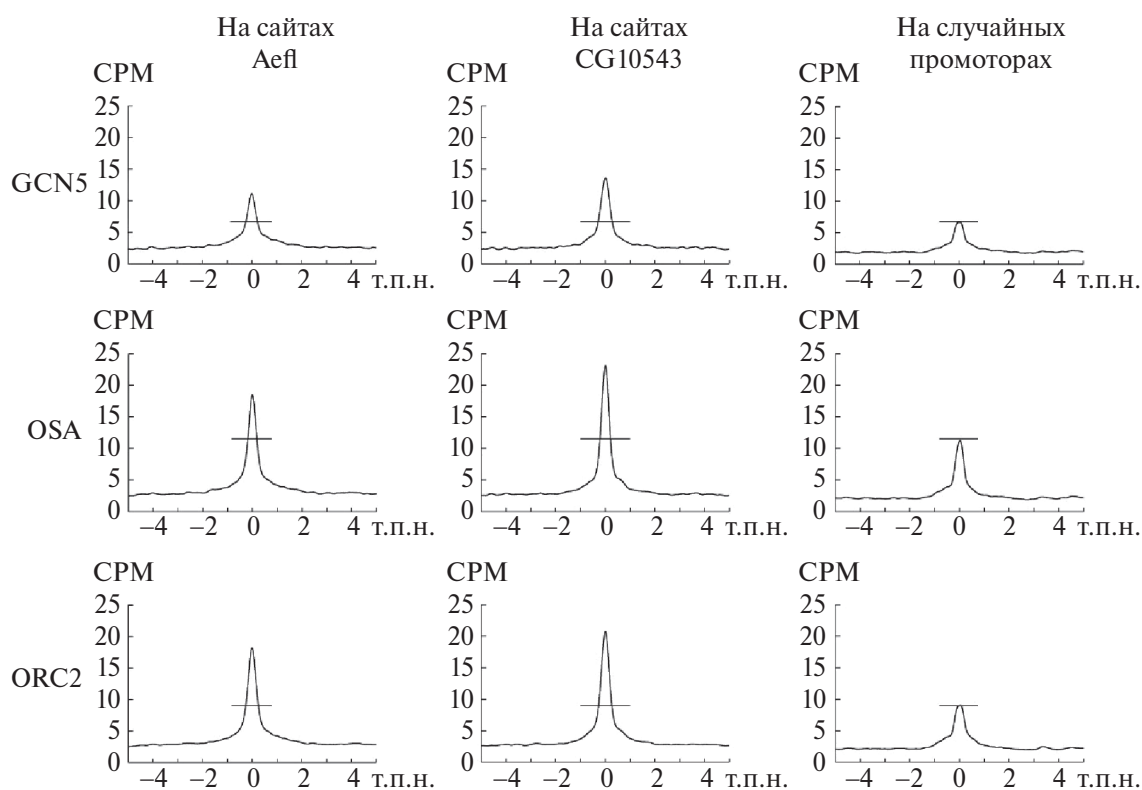


Рис. 5. Усредненные ChIP-Seq-профили белков ORC2 (комплекс ORC), OSA (комплекс SWI/SNF) и GCN5 (комплекс SAGA) на сайтах связывания белков Aef1, CG10543 и на случайных промоторах. Слева указаны субъединицы данных комплексов: ORC2 (ORC), OSA (SWI/SNF), GCN5 (SAGA). Представлен средний ChIP-Seq-профиль белков (указаны слева) на трех группах сайтов (указаны сверху). По оси ординат профили представлены в единицах CPM, по оси абсцисс указано расстояние в т.п.н. относительно центра пика. В каждой из групп анализировали примерно по 3500 сайтов. Горизонтальными отрезками отмечен уровень сигнала на случайных промоторах. Видно, что субъединицы комплексов SAGA, SWI/SNF и ORC привлекаются на сайты Aef1 и CG10543 в большем количестве, чем на случайные промоторы.

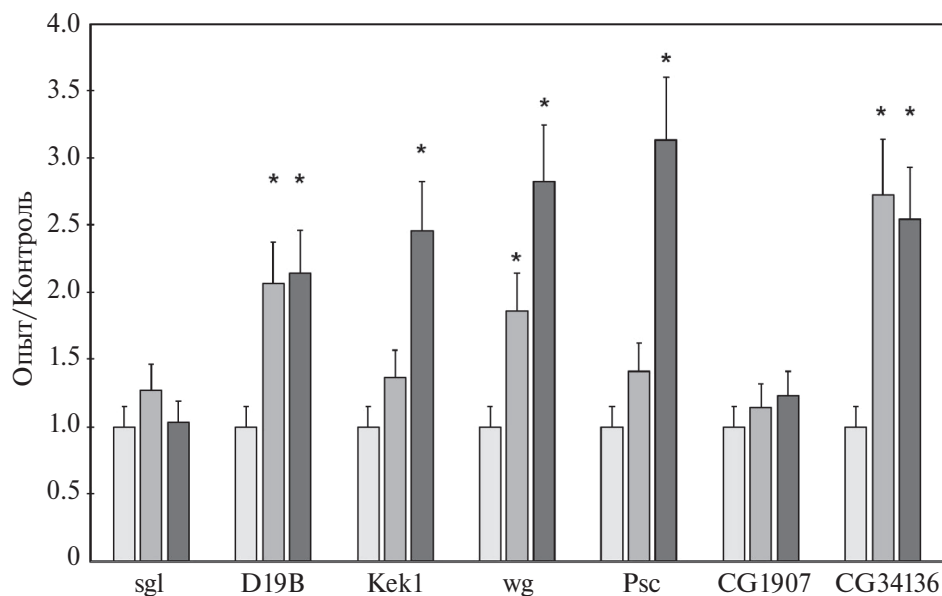


Рис. 6. Транскрипция некоторых генов, содержащих оба белка, CG10543 и Aef1, на своих промоторах, при нокадауне CG10543 и Aef1 в индивидуальных экспериментах. Названия генов указаны внизу. Светло-серые столбцы соответствуют транскрипции генов при РНК-интерференции Aef1, темно-серые столбцы — при РНК-интерференции CG10543. Белые столбцы соответствуют транскрипции гена в норме (контроль), принято за единицу. По оси ординат указано соотношение транскрипции в опыте и в контроле. В качестве нормировочного гена использовали ген *ras64B*. Эксперименты проводили в трех повторах. Планки погрешностей отмечают стандартную ошибку среднего. Звездочкой указаны статистически значимые изменения с $p < 0.05$ (использован *t*-критерий Стьюдента).

в функционировании регуляторных генетических элементов этого типа.

Далее были определены потенциальные консенсусные последовательности связывания белков Aef1 и CG10543. Для этого получили нуклеотидные последовательности длиной 500 п.н. вокруг каждого ChIP-Seq-пика с помощью программы bedtools, а затем проанализировали их в программе MEME-ChIP. Были определены консенсусные последовательности, которыми обогащены фрагменты ChIP-Seq, представленные на рис. 4. Эти консенсусы имеют высокую статистическую значимость, центральное обогащение во фрагментах ChIP-Seq и не являются сайтами связывания какого-либо известного белка. Таким образом, их можно рассматривать как потенциальные сайты связывания белков Aef1 и CG10543.

Белки CG10543 и Aef1 колокализуются с комплексами SAGA, SWI/SNF и ORC на своих сайтах связывания

Геномная колокализация белков Aef1 и CG10543 с комплексами SAGA, SWI/SNF и ORC изучена нами с использованием программного обеспечения собственной разработки для построения усредненного профиля исследуемого фактора на заданных сайтах генома (см. раздел Экспериментальная часть) [8]. ChIP-Seq-профили белков ORC2, GCN5, OSA получены в нашей лаборатории ранее. Рассчитаны усредненные профили данных

белков на четырех группах сайтов: на сайтах связывания белка Aef1, на сайтах связывания белка CG10543, на случайных промоторах и на случайных участках генома (рис. 5). Изображение усредненных профилей на случайных сайтах генома не приведено. Эти профили представляют собой прямые линии на уровне фона (примерно 2).

Поскольку белки Aef1 и CG10543 локализованы преимущественно на промоторах генов, на их сайтах связывания можно будет найти обогащение любых промоторных факторов, включая комплексы SAGA, dSWI/SNF и ORC, относительно среднегеномного уровня. Однако, как можно видеть из рис. 5, белки GCN5 (комплекс SAGA), OSA (комплекс dSWI/SNF) и ORC2 (комплекс ORC) обогащены на сайтах связывания белков Aef1 и CG10543 не только по сравнению со среднегеномным уровнем (примерно 2), но и по сравнению со случайными промоторами. Полученный результат свидетельствует, что причиной данной колокализации является не просто случайное совпадение на промоторах генов, а то, что именно сайт связывания цинковых белков Aef1 и CG10543 способствует локализации комплексов SAGA, dSWI/SNF и ORC.

Белки CG10543 и Aef1 принимают участие в регуляции экспрессии генов

Учитывая, что исследуемые белки найдены преимущественно на промоторах генов, мы решили с помощью метода РНК-интерференции определить, к каким изменениям в экспрессии генов

приведет снижение внутриклеточного уровня этих белков. В эксперимент взяли гены, на промоторах которых присутствуют оба белка. Используя метод ОТ-кПЦР, мы проанализировали количество РНК семи генов в образцах, выделенных из контрольных клеток и клеток после РНК-интерференции. Результаты этого эксперимента представлены на рис. 6. После нокдауна *CG10543* и *Aef1* количество мРНК части генов возросло. Таким образом, эти белки действительно могут участвовать в регуляции экспрессии тех генов, на промоторах которых они локализуются, выступая в роли репрессоров.

В ходе предыдущих исследований мы обнаружили, что инсуляторный белок Su(Hw) дрозофилы, содержащий домен цинковых пальцев, взаимодействует с белком ENY2 (субъединица DUB-модуля комплекса SAGA) и привлекает комплексы SAGA, SWI/SNF и ORC на Su(Hw)-зависимые инсуляторы, участвуя одновременно в регуляции транскрипции и в позиционировании ориджинов репликации [8–10]. Предполагалось, что существуют и другие цинковые белки, которые взаимодействуют с комплексом SAGA дрозофилы и функционируют сходным образом на других регуляторных элементах генома, включая промоторы. В дальнейшем были идентифицированы еще два цинковых белка CG9890 [16–18] и CG9609. В данной работе показана полногеномная колокализация еще двух белков – *Aef1* и *CG10543* – с комплексами SAGA, SWI/SNF и ORC. Все четыре белка, CG9890, CG9609, *Aef1* и *CG10543*, содержат домены цинковых пальцев, локализованы на промоторах активных генов, колокализуются с основными транскрипционными и репликационными комплексами и участвуют в регуляции транскрипции. Мы предполагаем, что подобно Su(Hw) эти четыре белка могут участвовать в привлечении комплексов SAGA, SWI/SNF и ORC на свои сайты связывания, организуя, таким образом, регуляторные элементы генома, необходимые для функционирования клетки. Нокдаун генов *Aef1* и *CG10543* приводит к изменению транскрипции некоторых из проверенных генов (рис. 6). По всей видимости, на промоторах генов присутствует множество цинковых белков, которые стабилизируют транскрипционные комплексы, и нокдаун одного из них не всегда приводит к заметному влиянию на транскрипцию.

Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБГ РАН и при поддержке Российского научного фонда (грант № 20-14-00269).

Данная работа выполнена без привлечения людей и животных в качестве объектов исследования.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koutelou E., Hirsch C.L., Dent S.Y. (2010) Multiple faces of the SAGA complex. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **22**, 374–382.

2. Baker S.P., Grant P.A. (2007) The SAGA continues: expanding the cellular role of a transcriptional co-activator complex. *Oncogene*. **26**, 5329–5340.
3. Brown C.E., Howe L., Sousa K., Alley S.C., Carrozza M.J., Tan S., Workman J.L. (2001) Recruitment of HAT complexes by direct activator interactions with the ATM-related Tra1 subunit. *Science*. **292**, 2333–2337.
4. Chatterjee N., Sinha D., Lemma-Dechassa M., Tan S., Shogren-Knaak M.A., Bartholomew B. (2011) Histone H3 tail acetylation modulates ATP-dependent remodeling through multiple mechanisms. *Nucl. Acids Res.* **39**, 8378–8391.
5. Li B., Carey M., Workman J.L. (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell*. **128**, 707–719.
6. MacAlpine D.M., Rodriguez H.K., Bell S.P. (2004) Coordination of replication and transcription along a *Drosophila* chromosome. *Genes Dev.* **18**, 3094–3105.
7. Eaton M.L., Prinz J.A., MacAlpine H.K., Tretyakov G., Kharchenko P.V., MacAlpine D.M. (2011) Chromatin signatures of the *Drosophila* replication program. *Genome Res.* **21**, 164–174.
8. Vorobyeva N.E., Mazina M.U., Golovnin A.K., Kopytova D.V., Gurskiy D.Y., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Georgiev P.G., Krasnov A.N. (2013) Insulator protein Su(Hw) recruits SAGA and Brahma complexes and constitutes part of Origin Recognition Complex-binding sites in the *Drosophila* genome. *Nucl. Acids Res.* **41**, 5717–5730.
9. Мазина М.Ю., Воробьева Н.Е., Краснов А.Н. (2013) Способность Su(Hw) создавать платформу для формирования ориджинов репликации не зависит от типа окружающего хроматина. *Цитология*. **55**(4), 218–224.
10. Kurshakova M., Maksimenko O., Golovnin A., Pulina M., Georgieva S., Georgiev P., Krasnov A. (2007) Evolutionarily conserved E(y)2/Sus1 protein is essential for the barrier activity of Su(Hw)-dependent insulators in *Drosophila*. *Mol. Cell*. **27**, 332–338.
11. Vorobyeva N.E., Erokhin M., Chetverina D., Krasnov A.N., Mazina M.Y. (2021) Su(Hw) primes 66D and 7F *Drosophila* chorion genes loci for amplification through chromatin decondensation. *Sci. Rep.* **11**, 16963.
12. Vorobyeva N.E., Nikolenko J.V., Krasnov A.N., Kuzmina J.L., Panov V.V., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. (2011) SAYP interacts with DHR3 nuclear receptor and participates in ecdysone-dependent transcription regulation. *Cell Cycle*. **10**, 1821–1827.
13. Kopytova D.V., Krasnov A.N., Orlova A.V., Gurskiy D.Y., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G., Shidlovskii Y.V. (2010) ENY2: couple, triple...more? *Cell Cycle*. **9**, 479–481.
14. Krasnov A.N., Kurshakova M.M., Ramensky V.E., Mardanov P.V., Nabirochkina E.N., Georgieva S.G. (2005) A retrocopy of a gene can functionally displace the source gene in evolution. *Nucl. Acids Res.* **33**, 6654–6661.
15. Gurskiy D., Orlova A., Vorobyeva N., Nabirochkina E., Krasnov A., Shidlovskii Y., Georgieva S., Kopytova D. (2012) The DUBm subunit Sgf11 is required for mRNA export and interacts with Cbp80 in *Drosophila*. *Nucl. Acids Res.* **40**, 10689–10700.
16. Николенко Ю.В., Фурсова Н.А., Мазина М.Ю., Воробьева Н.Е., Краснов А.Н. (2022) Белок CG9890 дрозофилы участвует в регуляции экдизонзависимой транскрипции. *Молекуляр. биология*. **56**(4), 557–563.

17. Фурсова Н.А., Мазина М.Ю., Николенко Ю.В., Воробьева Н.Е., Краснов А.Н. (2020) Белок CG9890 дрозофилы, содержащий домены цинковых пальцев, локализуется с комплексами модификации и ремоделирования хроматина на промоторах генов и участвует в регуляции транскрипции. *Acta Naturae*. **12**, 114–119.
18. Фурсова Н.А., Николенко Ю.В., Сошникова Н.В., Мазина М.Ю., Воробьева Н.Е., Краснов А.Н. (2018) Белок CG9890 с доменами цинковых пальцев — новый компонент ENY2-содержащих комплексов дрозофилы. *Acta Naturae*. **10**, 110–114.
19. Николенко Ю.В., Вдовина Ю.А., Фефелова Е.И., Глухова А.А., Набирочкина Е.Н., Копытова Д.В. (2021) Деубиквитирующий (DUB) модуль SAGA участвует в Pol III-зависимой транскрипции. *Молекуляр. биология*. **55**(3), 500–509.
20. Enuameh M.S., Asriyan Y., Richards A., Christensen R.G., Hall V.L., Kazemian M., Zhu C., Pham H., Cheng Q., Blatti C., Brasefield J.A., Basciotta M.D., Ou J., McNulty J.C., Zhu L.J., Celniker S.E., Sinha S., Stormo G.D., Brodsky M.H., Wolfe S.A. (2013) Global analysis of *Drosophila* Cys(2)-His(2) zinc finger proteins reveals a multitude of novel recognition motifs and binding determinants. *Genome Res*. **23**, 928–940.
21. Laity J.H., Dyson H.J., Wright P.E. (2000) DNA-induced alpha-helix capping in conserved linker sequences is a determinant of binding affinity in Cys(2)-His(2) zinc fingers. *J. Mol. Biol.* **295**, 719–727.
22. Clemens J.C., Worby C.A., Simonson-Leff N., Muda M., Maehama T., Hemmings B.A., Dixon J.E. (2000) Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **97**, 6499–6503.

The *Drosophila* Zinc Finger Proteins Aef1 and Cg10543 Are Co-Localized with SAGA, SWI/SNF and ORC Complexes on Gene Promoters and Involved in Transcription Regulation

J. V. Nikolenko¹, M. M. Kurshakova¹, D. V. Kopytova¹,
Y. A. Vdovina¹, N. E. Vorobyova², A. N. Krasnov^{2, *}

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

²Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia

*e-mail: krasnov@genebiology.ru

In previous studies, we purified the DUB-module of the *Drosophila* SAGA complex and showed that a number of zinc proteins interact with it, including Aef1 and CG10543. In this work, we conducted a genome-wide study of the Aef1 and CG10543 proteins and showed that they are localized predominantly on the promoters of active genes. The binding sites of these proteins colocalize with the SAGA and dSWI/SNF chromatin modification and remodeling complexes, as well as with the ORC replication complex. It has been shown that the Aef1 and CG10543 proteins are involved in the regulation of the expression of some genes on the promoters of which they are located. Thus, the Aef1 and CG10543 proteins are new participants in the cell transcriptional network and colocalize with the main transcription and replication complexes of *Drosophila*.

Keywords: Aef1, CG10543, zinc fingers domains, transcription regulation, DUB-module, complex SAGA, SWI/SNF, ORC