

УДК 577.218

ЭФФЕКТЫ ПОВЫШЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ СУБЪЕДИНИЦ SAYP, VAP170 КОМПЛЕКСА РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ ХРОМАТИНА У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2024 г. В. К. Чмыхало^{1*}, Ю. В. Шидловский¹, Л. А. Лебедева¹,
иностраннный член РАН P. Schedl², E. Giordano³

Поступило 20.08.2024 г.

После доработки 31.08.2024 г.

Принято к публикации 01.09.2024 г.

Проанализированы фенотипические проявления повышенной экспрессии генов *Vap170* и *e(y)3* (*SAYP*) у *D. melanogaster*. На модели крыловых дисков показано, что совместное умеренное повышение экспрессии генов *Vap170* и *e(y)3* приводит к нарушению жилкования крыльев, предположительно связанное с подавлением сигнальных путей EGFR/Ras/MAPK. Сильная индукция совместной экспрессии указанных генов в крыловых дисках приводит к полному подавлению развития крыльев у взрослых особей. Убиквитарная совместная экспрессия *Vap170* и *e(y)3* летальна на стадии личинок 1 возраста и сопровождается формированием меланотических опухолей. Указанные фенотипы наблюдаются только при совместной экспрессии *Vap170* и *e(y)3*. Это указывает на сильный синергизм действия этих генов, гиперактивность которых проявляется в нарушении пролиферации и дифференцировки клеток.

Ключевые слова: SWI/SNF комплексы, PBAP, Vap170, ARID2, SAYP, сигнальный путь EGFR/Ras/MAPK

DOI: 10.31857/S2686738924060135

Ремоделирование хроматина является одним из фундаментальных процессов регуляции состояния эпигенетического ландшафта и активности генов. Данный процесс у всех эукариот осуществляется эволюционно-консервативными АТФ-зависимыми комплексами ремоделирования хроматина – ISWI, CHD/Mi-2, INO80 и SWI/SNF [1]. Последний является специфичным фактором для активации транскрипции широкого спектра генов. Особенностью SWI/SNF комплекса является модульное строение с вариабельностью субъединиц, что связано с формированием нескольких функционально отличающихся подсемейств. Главные подсемейства SWI/SNF отличаются набором белков, которые составляют регуляторный модуль и вовлечены в процессы распознавания ДНК и РНК, эпигенетических модификаций гистонов, а также

взаимодействие с разнообразными транскрипционными факторами. У дрозофилы выделяют канонический комплекс ВАР (содержащий в регуляторном модуле субъединицы *osa* и *d4*), неканонический *ncBAP*/*GBAP* (содержащий субъединицы *bica* и *Brd7-9*) и *PBAP* (*Polybromo*-содержащий ВАР, содержащий субъединицы *Polybromo*, *Brd7-9*, *SAYP* и *Vap170*) [1–3]. Белки *SAYP* (кодируется геном *e(y)3*) и *Vap170* являются незаменимыми в развитии, их отсутствие летально [2, 4, 5].

Несмотря на понимание различий в структуре комплексов, функциональные отличия ВАР, *ncBAP* и *PBAP* подсемейств описаны еще недостаточно. Одна из важнейших функций комплекса *PBAP* – участие в энхансер-зависимой регуляции активности генов [6] и регуляция экспрессии генов-мишеней различных сигнальных путей [7], что определяется взаимодействием ремоделера с различными транскрипционными факторами. Подсемейство *PBAP* участвует в транскрипции генов-мишеней фактора *Stat* и рецептора *Hr3* за счет взаимодействия этих факторов с *SAYP* [8, 9]. Для другого компонента *PBAP* – *Vap170* – перечень взаимодействий описан слабо. *Vap170* (гомолог *ARID2* млекопитающих) относится к семейству

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

²Принстонский университет, Принстон, США

³Università di Napoli Federico II, Naples, Italy.

*e-mail: vkchmykhalo@icloud.com

ARID (AT-interacting domain) доменных белков, что позволяет им связываться АТ-богатыми мотивами ДНК. Также в структуре Var170 выделяют другой ДНК-связывающийся домен — RFX, а также повторы аминокислотного мотива LxxLL и два цинковых пальца типа C₂H₂-типа на С-конце [4]. Предположительно, Var170 задействован в привлечении РВАР на целевые локусы [7].

Ранее на модели морфогенеза крыльев было показано, что Var170 является антагонистом сигнального каскада рецептора эпидермального фактора роста (EGFR), протоонкогена Ras и митоген-активируемых киназ (МАРК) [4]. Для ряда мутаций в генах, кодирующих компоненты указанных путей, характерен фенотип нарушенного жилкования, при котором наблюдается недоразвитие жилок на крыльях. Гипоморфная мутация *Var170* частично спасает данный фенотип и способствует восстановлению жилкования. Интересно, что гипоморф SAYP сам по себе также стимулирует формирование дополнительного материала жилок на крыльях [8].

Мы проверили поведение SAYP и Var170 на данной модели также с помощью альтернативного метода — повышения уровня данных белков. Для этого мы использовали линии мух, несущих конструкции с кДНК белков Var170 или SAYP под контролем UAS [4], сделанный с помощью вектора pUAST, в сочетании с различными GAL4-драйверами (рис. 1).

В первых экспериментах мы использовали драйвер *Omb*, имеющий специфичную экспрессию

в крыловых имагинальных дисках личинки дрозофилы.

Ранее было показано, что повышенная экспрессия доминант-негативной формы *Ras1 RasN17* в крыловом диске приводит к недоразвитию жилки L4, однако при одновременном повышении уровня *Var170* в диске фенотип усугубляется: в большей степени нарушается формирование жилки L4, также нарушается жилка L3 [4]. Мы проверили нарушение жилкования при повышении экспрессии SAYP в этой системе. Оказалось, что формируется очень схожий фенотип: часть жилок L3 и L4 практически не развивается дистальнее задней поперечной жилки. Эффект повышенной экспрессии SAYP — более выраженный, чем у *Var170*: также видны нарушения в границе дистального края от латеральных жилок L2 до L4 (фенотип *Ser*), в дистальной части L2 подвергается искривлению в постериальном направлении (рис. 2).

Таким образом, SAYP и Var170 ведут себя очень сходно в процессах, контролирующих экспрессию генов, вовлеченных в жилкование крыла. На фоне низкой активности каскадов EGFR/Ras/MAPK повышенный уровень SAYP или Var170 усиливает фенотип крыла, характерного для делеций компонентов указанных каскадов. Необходимо отметить, что в формировании края крыла также вносят вклад сигнальные пути Notch и Wnt, поэтому молекулярная интерпретация данного фенотипа требует дополнительной проверки.

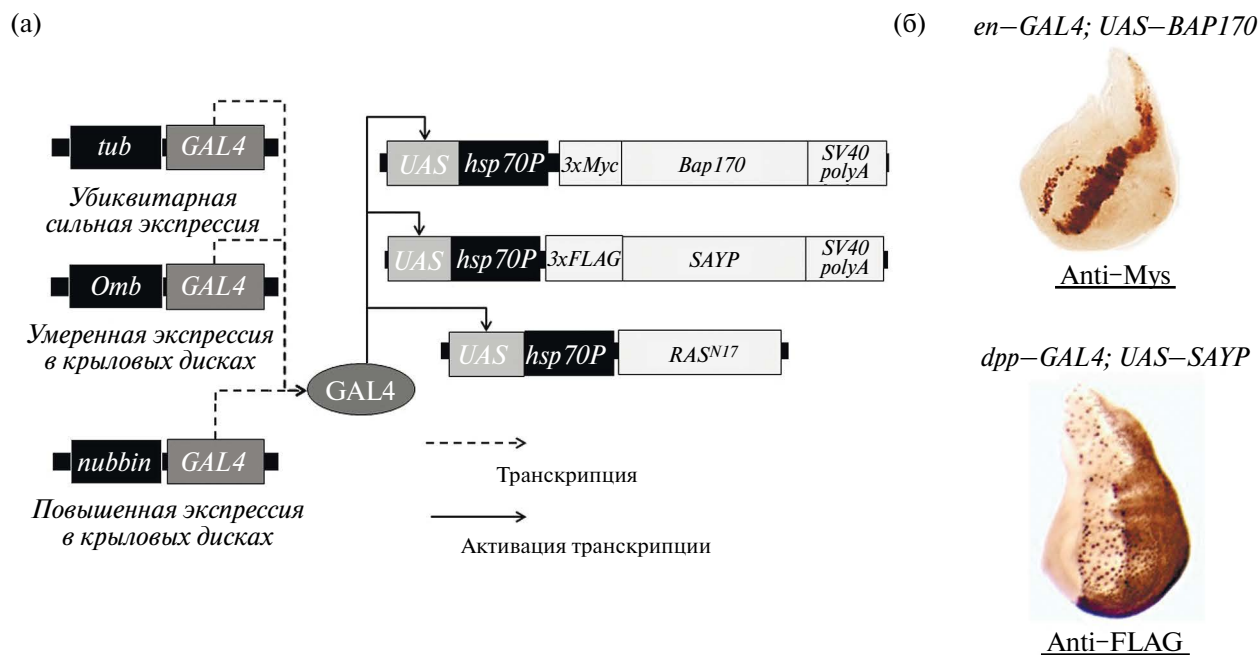


Рис. 1. А — Используемые генетические конструкции Var170 и SAYP для экспрессии с помощью системы GAL4-UAS, Б — Детекция трансгенных белков VAR170 и SAYP антителами к эпитопам 3xMyc и 3xFLAG соответственно в имагинальных дисках крыльев.

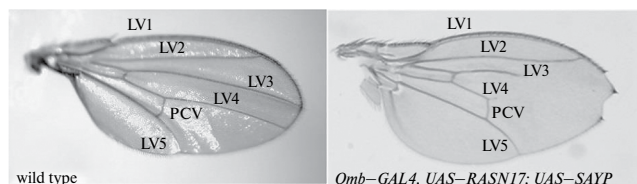


Рис. 2. Повышенная экспрессия *SAYP* на фоне экспрессии *RasN17* усугубляет фенотип нарушенного жилкования.

Повышенная экспрессия факторов *SAYP* или *Var170* с использованием промотора *Omb* у мух дикого типа не имеет фенотипического проявления. Однако повышение экспрессии одновременно и *SAYP*, и *Var170* приводит к потере ряда жилок на крыльях, при этом формируется фенотип, схожий с описанным выше. Недоразвитие жилкования наблюдается также при совместной экспрессии *SAYP* и мутантных форм *Var170* с делецией ARID домена или LXXL мотива [4]. Интересно, что ко-экспрессия *SAYP* и *Var170* без цинковых пальцев не приводит к формированию такого мутантного фенотипа, что указывает, скорее всего, на роль этого домена в формировании контакта с *SAYP*.

Повышенная экспрессия *SAYP* совместно с *Var170* в крыловых дисках под контролем промотора *nubbin* с более сильной и широкой экспрессией, чем *Omb*, полностью подавляет развитие крыльев (рис. 3). При этом мухи с экспрессией *SAYP* или *Var170* при использовании данного драйвера имеют фенотип дикого типа. Это косвенно указывает на критически важную роль РВАР в контроле пролиферации и дифференцировки клеток крыловых дисков.

Повышенная экспрессия *Var170* с использованием убиквитарного промотора тубулина не имеет фенотипического проявления [4]. Мы также проверили фенотип мух с повышенной убиквитарной экспрессией *SAYP* и не обнаружили явных фенотипических проявлений. Однако убиквитарная совместная повышенная экспрессия *SAYP* и *Var170* летальна для личинок первого возраста. При этом



Рис. 3. Повышенная экспрессия субъединиц *SAYP* и *Var170* в крыловых дисках приводит к полному отсутствию крыльев у взрослых мух *D. melanogaster*.

у погибших личинок наблюдается формирование меланотических опухолей. Данный тип опухолей связан с гематopoэтическими клетками и возникает в результате гиперактивации сигнальных путей иммунного ответа и гематopoэза Toll/NF- κ B и Jak/Stat92E [10]. Сигнальные пути Ras и AP-1 также контролируют пролиферацию и дифференцировку клеток гемолимфы, их нарушения дают схожий фенотип [11].

Наши данные позволяют заключить, что факторы *SAYP* и *Var170*, являющиеся партнерами в РВАР [3], также тесно связаны с собой функционально. Эффект повышенной экспрессии этих субъединиц по-отдельности не проявляется у мух дикого типа, но их совместная экспрессия вызывает существенные нарушения в развитии. Ранее было показано, что специфические субъединицы подсемейства РВАР стабилизируют друг друга в клетке [12]. Вероятно, только совместная экспрессия этих белков позволяет повысить их уровень в клетке, экспрессия по-отдельности является неэффективной. Как показали данные совместной экспрессии *SAYP* и мутантных форм *Var170*, скорее всего, цинковые пальцы белка *Var170* являются доменом, осуществляющим его взаимодействие с *SAYP*. Со стороны *SAYP*, как показано ранее, взаимодействующим доменом является *SAY* [3]. В структуре РВАФ комплекса млекопитающих наблюдаются схожие закономерности [13], поэтому можно ожидать схожих эффектов взаимной стабилизации субъединиц.

Полученные данные позволяют выдвинуть следующие гипотезы об участии *SAYP* и *Var170* в работе сигнальных путей. Полное отсутствие крыльев в системе *nubbin-Gal4; UAS-SAYP, UAS-BAP170* схоже с фенотипом подавления сигнального пути Hedgehog [14]. Можно отметить, что в морфогенезе крыла, а конкретно — в процессах жилкования, предполагается, что эффекты активации сигнальных каскадов EGFR/Ras/MAPK основаны на ингибировании транскрипционного репрессора Gro [15]. Gro, в свою очередь, подавляет транскрипционную активность фактора Su(H) — компонента пути Hedgehog [15]. Ранее было показано, что разные делеции *Var170* приводят к схожему фенотипу, характерного для гиперактивации каскада Ras или для повышенной экспрессии *dpp*, что косвенно может указывать на взаимодействие РВАР с Gro [4]. С другой стороны, известно что сигнальный путь JAK/Stat92E ограничивает активность сигнальных каскадов EGFR/Ras/MAPK [16]. Вероятно, именно Stat92E привлекает комплекс РВАР к локусам генов-ингибиторов каскада EGFR/Ras/MAPK (например, *argo*). В пользу предположения кооперации РВАР и Stat92E также говорит образование меланотических опухолей у личинок [17]. Суммируя сказанное, негативная регуляция каскадов EGFR/Ras/MAPK комплексом РВАР на эпигенетическом уровне, скорее всего,

может осуществляться посредством кооперации с такими факторами, как Gro, Мус и Stat92Е, однако данные предположения требуют дальнейшего подтверждения.

Интересно отметить, что у человека мутации *ARID2* связаны с развитием различных типов рака (поджелудочной железы, кожи, головы, шеи и других), пролиферативных болезнями крови. Ортолог SAYP – PHF10 – контролирует гематопоз, взаимодействует с онкогеном MYC [18] и опосредует активность NF-κB [19], FOS [20]. Это указывает на функциональную преемственность в процессах формирования опухолей у данных субъединиц у разных видов животных.

БЛАГОДАРНОСТИ

Количественный анализ транскриптов проводился с использованием оборудования ЦКП ИБГ РАН.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа поддержана грантом Российского Научного Фонда 20-14-00201-П.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Поскольку дрозофила является насекомым, специальное разрешение комиссии по биоэтике не требуется.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. SWI/SNF Complex Connects Signaling and Epigenetic State in Cells of Nervous System [Text] / Chmykhalo, V.K. et al. // Mol Neurobiol. – 2024. – Vol. N – P.
2. A novel multidomain transcription coactivator SAYP can also repress transcription in heterochromatin [Text] / Shidlovskii, Y.V. et al. // EMBO J. – 2005. – Vol. 24, N 1. – P. 97–107.
3. Transcription coactivator SAYP combines chromatin remodeler Brahma and transcription initiation factor TFIID into a single supercomplex [Text] / Vorobyeva, N.E. et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2009. – Vol. 106, N 27. – P. 11049–11054.
4. Bap170, a subunit of the Drosophila PBAP chromatin remodeling complex, negatively regulates the EGFR signaling [Text] / Rendina R. et al. // Genetics. – 2010. – Vol. 186, N 1. – P. 167–181.
5. The novel regulator of metazoan development SAYP organizes a nuclear coactivator supercomplex [Text] / Vorobyeva N.E. et al. // Cell Cycle. – 2009. – Vol. 8, N 14. – P. 2152–2156.
6. Subunits of the PBAP Chromatin Remodeler Are Capable of Mediating Enhancer-Driven Transcription in Drosophila [Text] / Shidlovskii Y.V. et al. // Int J Mol Sci. – 2021. – Vol. 22, N 6. – P. 2856.
7. Functional differentiation of SWI/SNF remodelers in transcription and cell cycle control [Text] / Moshkin Y.M. et al. // Mol Cell Biol. – 2007. – Vol. 27, N 2. – P. 651–661.
8. Transcription co-activator SAYP mediates the action of STAT activator [Text] / Panov V.V. et al. // Nucleic Acids Res. – 2012. – Vol. 40, N 6. – P. 2445–2453.
9. SAYP interacts with DHR3 nuclear receptor and participates in ecdysone-dependent transcription regulation [Text] / Vorobyeva N.E. et al. // Cell Cycle. – 2011. – Vol. 10, N 11. – P. 1821–1827.
10. Melanotic mutants in Drosophila: pathways and phenotypes [Text] / Minakhina S., and Steward R. // Genetics. – 2006. – Vol. 174, N 1. – P. 253–263.
11. A directed screen for genes involved in Drosophila blood cell activation [Text] / Zettervall C.J. et al. // Proc Natl Acad Sci U S A. – 2004. – Vol. 101, N 39. – P. 14192–14197.
12. The transcriptional coactivator SAYP is a trithorax group signature subunit of the PBAP chromatin remodeling complex [Text] / Chalkley G.E. et al. // Mol Cell Biol. – 2008. – Vol. 28, N 9. – P. 2920–2929.
13. Systematic characterization of BAF mutations provides insights into intracomplex synthetic lethalties in human cancers [Text] / Schick, S. et al. // Nat Genet. – 2019. – Vol. 51, N 9. – P. 1399–1410.
14. A genome-wide transgenic resource for conditional expression of Drosophila microRNAs [Text] / Bejarano F. et al. // Development. – 2012. – Vol. 139, N 15. – P. 2821–2823.
15. Crosstalk between the EGFR and other signalling pathways at the level of the global transcriptional corepressor Groucho/TLE [Text] / Hasson P., and Paroush Z. // Br J Cancer. – 2006. – Vol. 94, N 6. – P. 771–775.
16. JAK/STAT controls organ size and fate specification by regulating morphogen production and signalling [Text] / Recasens-Alvarez C. et al. // Nat Commun. – 2017. – Vol. 8, N 13815. – P. 13815.
17. Tumor models in various Drosophila tissues [Text] / Gong S. et al. // WIREs Mech Dis. – 2021. – Vol. 13, N 6. – P. e1525.
18. PHF10 subunit of PBAF complex mediates transcriptional activation by MYC [Text] / Soshnikova N.V. et al. // Oncogene. – 2021. – Vol. 40, N 42. – P. 6071–6080.

19. Double plant homeodomain (PHD) finger proteins DPF3a and -3b are required as transcriptional co-activators in SWI/SNF complex-dependent activation of NF-kappaB RelA/p50 heterodimer [Text] / Ishizaka A. et al. // J Biol Chem. — 2012. — Vol. 287, N 15. — P. 11924–11933.
20. [PHF10, a Subunit of the PBAF Chromatin Remodeling Complex, Changes Its Localization and Interacts with c-FOS during the Initiation of Long-Term Potentiation in Neuronal Culture] [Text] / Azieva A.M. et al. // Mol Biol (Mosk). — 2021. — Vol. 55, N 6. — P. 1021–1029.

EFFECTS OF OVEREXPRESSION OF SPECIFIC SUBUNITS SAYP, BAP170 OF THE CHROMATIN REMODELING COMPLEX IN DROSOPHILA MELANOGASTER

V. K. Chmykhala^{a, *}, Y. V. Shidlovskii^a, L. A. Lebedeva^a,
foreign member of RAS P. Schedl^b, E. Giordano^c

^a*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Laboratory of Gene Expression Regulation in Development,
Moscow, Russian Federation*

^b*Princeton University, Princeton, USA*

^c*Università di Napoli Federico II, Naples, Italy.*

*e-mail: vkchmykhala@icloud.com

The phenotypic manifestations of increased expression of the *Bap170* and *e(y)3* (*SAYP*) genes in *D. melanogaster* were analyzed. Using the wing disc model, we show that moderate co-expression of *Bap170* and *e(y)3* genes in wing discs leads to abnormalities in wing veining, which was probably caused by suppression of EGFR/Ras/MAPK signaling pathways. Strong induction of co-expression of the above genes in wing discs leads to complete suppression of wing development in adults. Ubiquitous co-expression of *Bap170* and *e(y)3* is lethal at the 1st instar larval stage and leads to the formation of melanotic tumors. The above phenotypes are observed exclusively when *Bap170* and *e(y)3* are co-expressed. This evidence suggests a robust synergistic effect of the combined action of these genes, which is manifested in the hyperactivity of cell proliferation and differentiation.

Keywords: SWI/SNF complexes, PBAP, Bap170, ARID2, SAYP, EGFR/Ras/MAPK signaling pathway