МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ, 2024, том 58, № 4, с. 612–618

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ КЛЕТКИ

УДК 577.21

БЕЛОК CG9609 ДРОЗОФИЛЫ, СОДЕРЖАЩИЙ ДОМЕНЫ ЦИНКОВЫХ ПАЛЬЦЕВ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЕТ С ДЕУБИКВИТИНИРУЮЩИМ (DUB) МОДУЛЕМ КОМПЛЕКСА SAGA И УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ ТРАНСКРИПЦИИ

© 2024 г. Ю. В. Николенко[a], М. М. Куршакова[a], Д. В. Копытова[a], Ю. А. Вдовина[a], Н. Е. Воробьева[b], А. Н. Краснов[b, *]

[a]*Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия*

[b]*Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия*

**e-mail: krasnov@genebiology.ru*

Поступила в редакцию 17.11.2023 г.
После доработки 12.12.2023 г.
Принята к публикации 12.12.2023 г.

Ранее мы показали, что белки Su(Hw) и CG9890, содержащие домены цинковых пальцев, взаимодействуют с комплексом SAGA дрозофилы, участвуют в формировании активной структуры хроматина и регуляции транскрипции. В представленном исследовании обнаружено взаимодействие DUB-модуля комплекса SAGA с белком CG9609 – еще одним белком с доменами цинковых пальцев. Проведен ChIP-Seq-анализ и идентифицированы сайты связывания белка CG9609 в геноме дрозофилы, локализованные, согласно анализу сайтов связывания, преимущественно на промоторах генов. Показано, что белок CG9609 участвует в регуляции экспрессии тех генов, на промоторах которых он локализован.

Ключевые слова: белок CG9609, цинковые пальцы, активация транскрипции, DUB-модуль, комплекс SAGA

DOI: 10.31857/S0026898424040072, **EDN:** INAPWW

ВВЕДЕНИЕ

Регуляция экспрессии генов эукариот – сложный процесс, который происходит на нескольких последовательных этапах транскрипции, процессинга мРНК, экспорта мРНП из ядра, трансляции и фолдинга белков [1]. Локальная структура хроматина, положение гена относительно функциональных ядерных компартментов и дальние взаимодействия регуляторных элементов являются дополнительным уровнем регуляции генетических процессов у эукариот в контексте сложной организации их генома в трехмерном пространстве ядра [2–5]. Белок ENY2 – мультифункциональный фактор, участвующий в различных стадиях экспрессии генов [6–11]. Разнообразие клеточных функций ENY2 определяется активностями тех белковых комплексов, в состав которых он входит. Так показано, что ENY2 является субъединицей деубиквитинирующего (DUB) модуля комплекса SAGA – важного коактиватора транскрипции у дрозофилы [12, 13]. В состав DUB-модуля входят также белки Sgf11 и Nonstop [14, 15]. Этот комплекс вместе с комплексом SWI/SNF ремоделирования хроматина присутствует на промоторах генов и участвует в создании активной структуры хроматина, что необходимо для регуляции транскрипции [16, 17].

Ранее нами было показано, что белок Su(Hw), содержащий домены цинковых пальцев, взаимодействует с ENY2-содержащими комплексами дрозофилы и необходим для их привлечения на сайты связывания Su(Hw), что необходимо для создания активной структуры хроматина и позиционирования участков начала репликации (ориджинов) [6, 7, 10]. Высказано предположение о существовании целого ряда “цинковых” белков, которые взаимодействуют с ENY2-содержащими комплексами дрозофилы, что необходимо для привлечения этих комплексов на различные регуляторные элементы генома. Так, обнаружено взаимодействие ENY2 с еще одним цинковым белком CG9890 [18]. Этот белок локализован преимущественно на промоторах активных генов и колокализуется с комплексами SAGA, ORC и dSWI/SNF на своих сайтах связывания. Показано, что белок CG9890 участвует в регуляции транскрипции, включая регуляцию экспрессии генов экдизонового каскада [19, 20].

Данная работа посвящена идентификации и изучению новых белков, содержащих домены цинковых пальцев, которые взаимодействуют

с DUB-модулем комплекса SAGA дрозофилы. Такие белки, подобно белку Su(Hw), могут быть важны для привлечения SAGA и других комплексов на различные регуляторные элементы генома, включая промоторы, для формирования активной структуры хроматина и регуляции транскрипции.

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). Трансфекцию клеток проводили при помощи Effectene Transfection Reagent (“Qiagen”, Германия) по протоколу производителя. дцРНК синтезировали с использованием TranscriptAid T7 High Yield Transcription Kit (“ThermoScientific”, США). Нокдаун генов проводили с помощью РНК-интерференции согласно протоколу [21]. Для нокдауна гена *CG9609* синтезировали дцРНК длиной 600 п.н., соответствующую 3'-концевому участку кодирующей последовательности. В качестве контроля использовали дцРНК, соответствующую фрагменту плазмиды pBluescipt II SK(−) (“Stratagene”, США) длиной 500 п.н. дцРНК синтезировали с использованием следующих праймеров:

CG9609 – CGACTCACTATAGGGAGAACTCGT TGCACGGCAAGAAT и CGACTCACTATAGGGAG ATGCTCCTTTTCCTCTTCAT;

pBluesciptIISK(−) – GAATTAATACGACTCACTA TAGGGAGAGTTACATGATCCCCCATG и GAATT AATACGACTCACTATAGGGAGATTTCGCCCCG AAGAACG.

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

bnl – TCGTTTAGATGCGAGCAATTCG и AGCAATTTCAGCTTGTTTATGCG;
cv-2 – AGCAGCAGCAGTAGAAGCACCT и CACTTCTCGTTAAATGCTCGGC;
pnt – GGGCTACTTCAATGATATGGCG и GTTGTTGATGCGGTCGTGTG;
exn – AGAGTGAAACAAGCAAGTGGATTG и CGATCACGTTCTCGGCTATCC;
Kek1 – ACCCTGCTGCCTGGAATGAT и GCATGTAGCCATCCTCAGTCATC;
sgl – CGTGATAACTCTGGTGGACAAG и GTCTCGATGTCCGTTGAGAAG;
wg – ACTGCTCGACGAGAAACTTCTC и TGTAGTCGCAGGTGCAGGAC;
Psc – CGCTGACTCAAAACTCAAGTGTG и TCGATTCTGGCGTCATCATAGTA;
CG1907 – CCGCTAGACTTGGTCAAGACC и TGTCTCAGCAGAGCAGCTCC;
Ras64B – GAGGGATTCCTGCTCGTCTTCG и GTCGCACTTGTTACCCACCATC.

Клонирование конструкций для экспрессии белков, слитых с 3xFLAG-эпитопом. Конструкции создавали в векторе pAc 5.1/V5-His, разработанном для экспрессии белков под контролем актинового промотора в клетках дрозофилы. В данный вектор мы клонировали последовательность 3xFLAG-эпитопа с сайтом рестрикции HindIII непосредственно после нее. Далее с использованием новосозданного вектора клонировали различные последовательности для получения полноразмерных белков (без первого остатка метионина). Гены клонировали после 3xFLAG-эпитопа по сайту HindIII. Второй сайт рестрикции выбирали из полилинкера исходного вектора. Таким образом 3xFLAG-эпитоп оказывался на N-конце слитых белков. кДНК требуемых участков генов синтезировали с помощью ОТ-ПЦР, сайты клонирования интегрировали в праймеры. Правильность полученных конструкций проверяли секвенированием.

Иммунопреципитация. Получение антител. Для выделения ядер клетки центрифугировали в течение 5 мин (500 *g*, +4°C). Осадок клеток промывали 1 мл буфера LB cyto 3 (3 мМ $MgCl_2$, 20 мМ Hepes-NaOH, pH 8.0) с добавлением бутирата натрия (ингибитор деацетилаз) до конечной концентрации 20 мМ. Затем проводили повторное центрифугирование в тех же условиях. Осадок клеток тщательно ресуспендировали в 200 мкл буфера LB cyto 3 с добавлением бутирата натрия до конечной концентрации 10 мМ и ингибитора протеаз (Protease Inhibitor Cocktail (PIC), “Roche”, Швейцария), после чего инкубировали на льду в течение 15 мин. После центрифугирования избавлялись от супернатанта и использовали далее только ядерную фракцию.

Осадок ядер ресуспендировали в 500 мкл буфера MN III (20 мМ Hepes-KOH, 3 мМ $MgCl_2$, 0.1% NP40, 0.1 М KCl, pH 8.0) с добавлением бутирата натрия до конечной концентрации 20 мМ и ингибитора протеаз (PIC, “Roche”). ДНК фрагментировали обработкой ядер ультразвуком (2 раза по 10 с, перерыв – 1 мин, средняя мощность прибора) на льду, инкубировали с 2 ед. ДНКазы I на льду в течение 30 мин и центрифугировали (16000 *g*, 20 мин, +4°C).

Коиммунопреципитацию проводили с использованием поликлональных антител к белкам Sgf11 и ENY2 и иммуноглобулинов сыворотки крови неиммунизированного кролика в качестве отрицательного контроля. Антитела иммобилизировали на Mab-сефарозе.

Белковый экстракт (200 мкл) из клеток линии S2 инкубировали с 15 мкл 50%-ной Mab-сефарозы с иммобилизованными антителами в течение 3 ч на

ротаторе при +4°C. Сефарозу отмывали буфером MN III (3 раза по 10 мин, +4°C), иммунные комплексы элюировали с сефарозы в 28 мкл 2 × буфера для нанесения по Лэммли с добавлением 3 мкл 1 М дитиотреитола (DTT). Результаты эксперимента анализировали с помощью Вестерн-блот-анализа.

Поликлональные антитела α-CG9609 получены из сыворотки крови крысы, иммунизированной С-концевым фрагментом (102 аминокислотных остатка) белка CG9609, экспрессированным в *E. coli*. Этот фрагмент соответствует области, расположенной после доменов цинковых пальцев, и до конца белка. При получении антител к цинковым белкам мы не используем домены цинковых пальцев, так как это может дать перекрестную реакцию с другими цинковыми белками.

Идентификация сайтов связывания белка CG9609 в геноме дрозофилы. Исходные данные геномного секвенирования (секвенатор Illumina NovaSeq 6000) выравнивали на геном дрозофилы dmel_r6.40 с помощью программы Hisat2 в режиме end-to-end с ключом no-spliced-alignment. Также устанавливали ключ "-a", который позволяет искать множественные выравнивания, с целью их исключения из анализа. В дальнейшую работу брали только уникально картированные риды, обрабатывая флаг "NH: i" в результатах вывода программы Hisat2. Также брали только те риды, уровень мисматчей в которых не превышал 5%, обрабатывая флаг "XM: i" в результатах вывода программы Hisat2. Фильтрацию осуществляли с помощью собственной программы. Сайты связывания белка CG9609 определяли с помощью программы MACS2 с использованием параметров по умолчанию (q-value < 0.05).

Анализ сайтов связывания белка CG9609 в промоторных областях генов. Промоторные области определяли из аннотации транскриптов генома дрозофилы dmel_r6.40. Промоторной областью считали интервал ±500 п.н. от старта транскрипции. Считали, что сайт связывания находится в промоторной области гена, если пик сайта связывания попадает в заданный интервал. Анализ проводили с помощью программы bedtools. Кроме того, сайты связывания белка CG9609 в промоторных областях генов дополнительно контролировали путем совмещения структуры транскриптов из геномного браузера и профиля ChIP-Seq.

Результаты ChIP-Seq размещены в базе данных Gene Expression Omnibus (идентификатор эксперимента GSE250183). Кроме этих результатов, в базе содержится также протокол иммунопреципитации хроматина, создания библиотек и обработки данных.

Профили ChIP-Seq 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

Идентификация цинкового белка CG9609 – нового взаимодействующего партнера DUB-модуля

Ранее нами был очищен DUB-модуль комплекса SAGA дрозофилы. С помощью MALDITOF MS идентифицировано несколько сотен белков, которые соосаждались с DUB-модулем за антитела к белку Sgf11 [22].

Проведение масс-спектрометрического анализа показало, что в состав фракции, содержащей DUB-модуль комплекса SAGA, входят также 55 белков с доменами цинковых пальцев. Из числа белков этой фракции были исключены белки, представленные также в отрицательном контроле (белковый комплекс, очищенный с использованием неспецифических антител), а затем отобраны белки, содержащие кластер близкорасположенных цинковых пальцев с 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 [23, 24]. На этом этапе были отобраны 26 белков с доменами цинковых пальцев.

В ходе экспериментов по очистке комплексов с последующей масс-спектрометрией мы анализировали несколько фракций, полученных после гель-фильтрации. Показано разделение фракций,

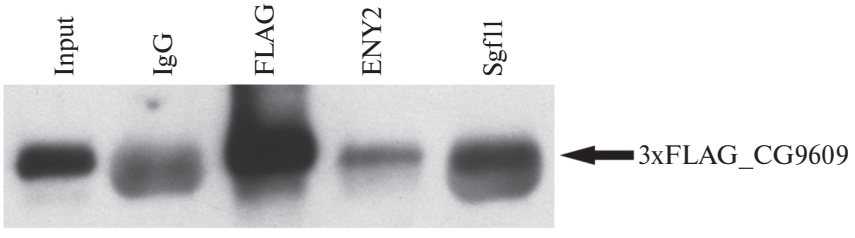

Рис. 1. Коиммунопреципитация белка 3xFLAG_CG9609 с белками ENY2, Sgf11. Указаны антитела, которые использовали в иммунопреципитации. Input – исходный экстракт, IgG – иммунопреципитация неспецифическими антителами. Вестерн-блот окрашивали антителами к 3xFLAG-эпитопу. Стрелкой отмечен белок 3xFLAG_CG9609. Видно, что антитела к ENY2 и Sgf11 преципитируют 3xFLAG_CG9609. В образце IgG широкая полоса соответствует тяжелой цепи антител, белок 3xFLAG_CG9609 в нем отсутствует.

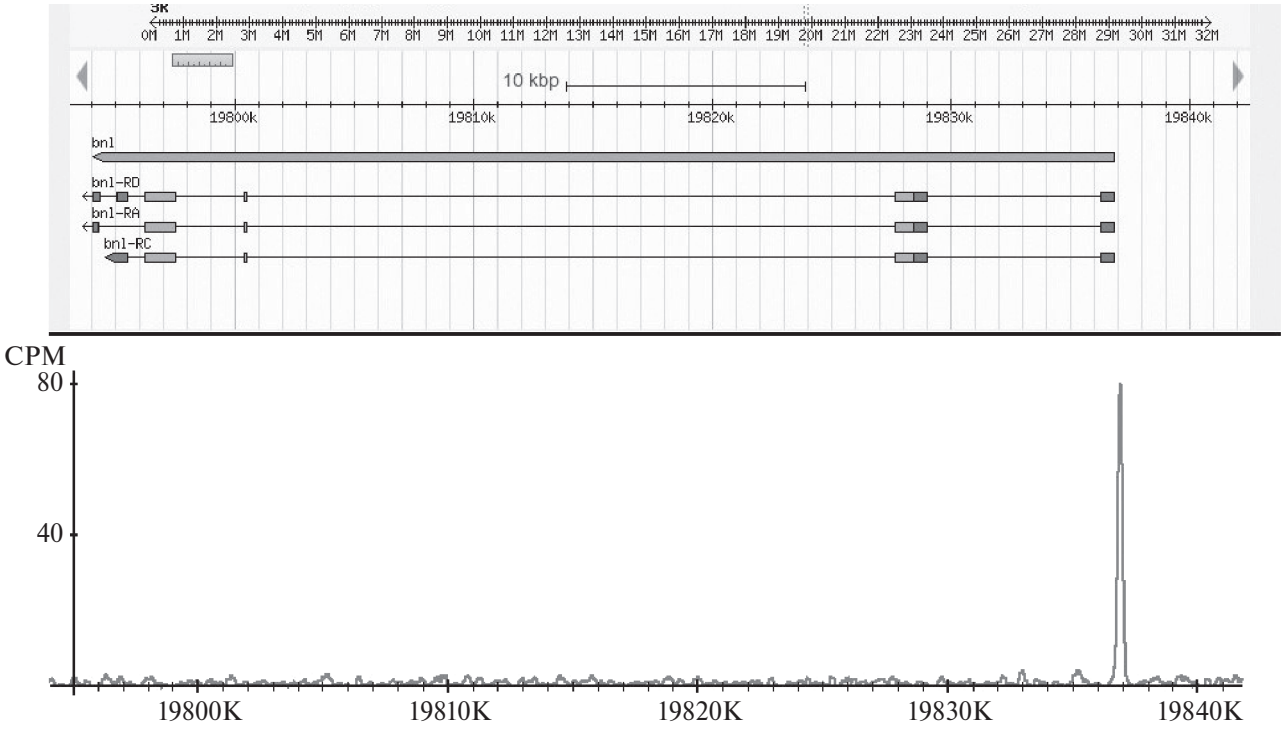

Рис. 2. ChIP-Seq профиль белка CG9609 в области гена *bnl*. На верхней панели представлена структура гена из геномного браузера. На нижней панели представлен сам ChIP-Seq профиль в единицах CPM. Видно, что белок CG9609 локализован на промоторе гена *bnl*.

содержащих DUB-модуль комплекса SAGA (включает белки ENY2, Sgf11), и остальной части SAGA (содержит белки GCN5, Ada2b) без DUB-модуля. Были отобраны цинковые белки, которые присутствуют во фракции DUB-модуля. Таким образом, в дальнейший анализ взяли 12 белков: CG9609, CG10543, CG4903, CG34100, CG9932, CG12701, CG3998, CG4936, CG11696, CG5683, CG8474, CG11352. В этой фракции обнаружен также белок Su(Hw), взаимодействие которого с DUB-модулем показано нами ранее.

Взаимодействие этих белков с DUB-модулем комплекса SAGA проверяли с помощью генетических конструкций, созданных для экспрессии каждого из 12 белков, маркированных 3xFLAG-эпитопом. Каждую из этих генетических конструкций трансфицировали по отдельности в клетки S2 дрозофилы для экспрессии слитых белков, а затем проводили иммунопреципитацию из лизата этих клеток с использованием антител к белкам ENY2 и Sgf11 и неспецифических антител в качестве отрицательного контроля. Результаты иммунопреципитации анализировали с помощью Вестерн-блотинга с помощью антител к 3xFLAG эпитопу (“Sigma”). Как видно из рис. 1, антитела к белку ENY2 и Sgf11 преципитируют белок 3xFLAG_CG9609 в отличие от неспецифических антител (IgG). В образце IgG широкая полоса соответствует тяжелой цепи антител, белок 3xFLAG_CG9609 в нем отсутствует. Таким образом, подтверждено взаимодействие белка CG9609 с DUB-модулем комплекса SAGA. Обнаружено также слабое взаимодействие с белками CG10543 и CG5683 (Aef1) (данные не представлены). Взаимодействие остальных 9 белков с DUB-модулем подтвердить не удалось.

С целью дальнейшего изучения CG9609 получены поликлональные антитела к этому белку, которые аффинно очистили на колонке, содержащей рекомбинантный белок CG9609.

Определение сайтов связывания белка CG9609 в геноме дрозофилы

Сайты локализации CG9609 в геноме идентифицировали с помощью CHIP-Seq-анализа. Для этого провели иммунопреципитацию хроматина с антителами к CG9609 (в двух повторах) и получили библиотеки для высокопроизводительного секвенирования на геномном секвенаторе Illumina NovaSeq 6000. Вероятные места локализации белка идентифицировали с помощью программы Macs2 (всего выявлено около 1500 сайтов). Анализ сайтов локализации CG9609 в геноме показал, что 75% из них совпадают с промоторами генов. У сотни наиболее сильных сайтов связывания (в списке, отсортированном по значению ChIP/Input) этот показатель достигает 95%. Таким образом, белок CG9609 локализуется преимущественно на промоторах генов. Характерный ChIP-Seq-профиль белка CG9609 на одном из его сайтов связывания представлен на рис. 2.

Рис. 3. Консенсусная последовательность потенциального сайта связывания белка CG9609.

Далее была определена потенциальная консенсусная последовательность сайта связывания белка CG9609. С этой целью с помощью программы bedtools получены последовательности длиной 500 п.н. вокруг каждого пика ChIP-Seq, которые проанализировали в программе MEME-ChIP. На рис. 3 представлена консенсусная последовательность, имеющая наибольшее обогащение во фрагментах ChIP-Seq. Эта консенсусная последовательность имеет высокую статистическую значимость, центральное обогащение в ChIP-Seq-фрагментах и не является сайтом связывания какого-либо известного белка. Эту последовательность можно рассматривать как потенциальный сайт связывания белка CG9609.

Белок CG9609 принимает участие в регуляции экспрессии генов

Учитывая, что CG9609 найден преимущественно на промоторах генов, мы решили исследовать, к каким изменениям в экспрессии CG9609-ассоциированных генов приведет снижение внутриклеточного уровня белка CG9609 с помощью РНК-интерференции. В результате оптимизации условий РНК-интерференции удалось добиться эффективного снижения экспрессии изучаемого белка в клетках: более чем в 9 раз по количеству мРНК и фактически полную деплецию по количеству белка (ниже предела детекции с помощью Вестерн-блотинга).

Используя метод ОТ-кПЦР, мы проанализировали количество РНК девяти CG9609-ассоциированных генов в образцах, выделенных из контрольных клеток и клеток после РНК-интерференции. Результаты этого эксперимента представлены на рис. 4. После нокдауна гена *CG9609* количество мРНК пяти из девяти генов достоверно возросло. Таким образом, белок CG9890 действительно участвует в регуляции экспрессии тех генов, на промоторах которых он локализуется, выступая в роли репрессора.

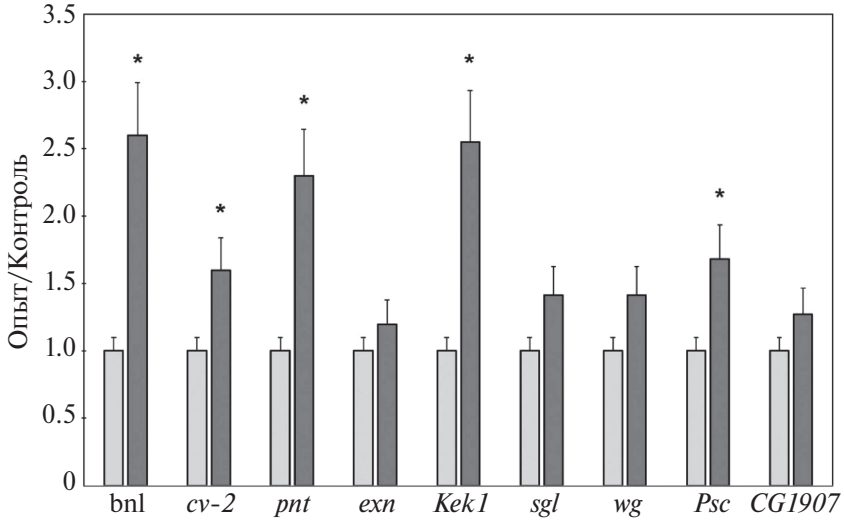

Рис. 4. Транскрипция некоторых генов, содержащих CG9609 на промоторах, при РНК-интерференции *CG9609*. Названия генов указаны внизу. Светлые столбцы соответствуют транскрипции гена в норме (принято за единицу). Темные столбцы соответствуют транскрипции генов при РНК-интерференции *CG9609*. По оси ординат указано соотношение транскрипции в опыте и в контроле. Уровень транскрипции гена *CG9609* при РНК-интерференции был в 9 раз меньше, чем в норме. В качестве нормировочного гена использовали ген *ras64B*. Эксперименты проводили в трех повторах. Планки погрешностей отмечают стандартную ошибку среднего. Звездочкой указаны статистически значимые изменения ($p < 0.05$, *t*-критерий Стьюдента).

Ранее мы обнаружили, что инсуляторный белок Su(Hw), содержащий домен цинковых пальцев, взаимодействует с белком ENY2 (субъединица DUB-модуля) и привлекает ENY2-содержащие комплексы на Su(Hw)-зависимые инсуляторы дрозофилы, участвуя одновременно в регуляции транскрипции и в позиционировании ориджинов репликации [6, 7, 10]. Обнаружено также взаимодействие ENY2 с еще одним цинковым белком CG9890 [18]. Этот белок локализован преимущественно на промоторах активных генов и колокализуется с комплексами SAGA, ORC и dSWI/SNF на своих сайтах связывания. Показано, что белок CG9890 участвует в регуляции транскрипции генов, включая гены экдизонового каскада [19, 20]. В данной работе нами обнаружено взаимодействие DUB-модуля с еще одним белком CG9609, который содержит домен цинковых пальцев, как и Su(Hw). Мы предполагаем, что по аналогии с Su(Hw) белок CG9609 является ДНК-связывающим белком, который привлекает ENY2-содержащие комплексы на свои сайты связывания, организуя таким образом регуляторные элементы генома, необходимые для функционирования клетки.

Нами показано, что белок CG9609 принимает участие в регуляции транскрипции, зависимой от РНК-полимеразы II. После нокдауна гена *CG9609* количество мРНК пяти из девяти генов возросло статистически значимо (рис. 4). 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. Белок GTF3A человека – гомолог CG9609, является транскрипционным фактором РНК-полимеразы III, который принимает участие в транскрипции 5S рРНК человека. По-видимому, CG9609 может также принимать участие и в регуляции транскрипции, зависимой от РНК-полимеразы III.

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. Orphanides G., Reinberg D. (2002) A unified theory of gene expression. *Cell*. **108**, 439–451.
2. Maksimenko O., Georgiev P. (2014) Mechanisms and proteins involved in long-distance interactions. *Front. Genet*. **5**, 28.
3. van Bemmel J.G., Pagie L., Braunschweig U., Brugman W., Meuleman W., Kerkhoven R.M., van Steensel B. (2010) The insulator protein SU(HW) fine-tunes nuclear lamina interactions of the *Drosophila* genome. *PLoS One*. **5**, e15013.
4. Rando O.J., Chang H.Y. (2009) Genome-wide views of chromatin structure. *Annu. Rev. Biochem*. **78**, 245–271.
5. Tchurikov N.A., Krasnov A.N., Ponomarenko N.A., Golova Y.B., Chernov B.K. (1998) Forum domain in *Drosophila melanogaster* cut locus possesses looped domains inside. *Nucl. Acids Res*. **26**, 3221–3227.
6. 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.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
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. 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.
12. Zhao Y., Lang G., Ito S., Bonnet J., Metzger E., Sawatsubashi S., Suzuki E., Le Guezennec X., Stunnenberg H.G., Krasnov A., Georgieva S.G., Schule R., Takeyama K., Kato S., Tora L., Devys D. (2008) A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, coactivates nuclear receptors, and counteracts heterochromatin silencing. *Mol. Cell*. **29**, 92–101.
13. Helmlinger D., Tora L. (2017) Sharing the SAGA. *Trends Biochem. Sci*. **42**, 850–861.
14. Samara N.L., Datta A.B., Berndsen C.E., Zhang X., Yao T., Cohen R.E., Wolberger C. (2010) Structural insights into the assembly and function of the SAGA deubiquitinating module. *Science*. **328**, 1025–1029.
15. Kohler A., Zimmerman E., Schneider M., Hurt E., Zheng N. (2010) Structural basis for assembly and activation of the heterotetrameric SAGA histone H2B deubiquitinase module. *Cell*. **141**, 606–617.
16. Мазина М.Ю., Николенко Ю.В., Краснов А.Н., Воробьева Н.Е. (2016) Транскрипция гена *HSP70* дрозофилы на этапах инициации и элонгации происходит с участием белковых комплексов SWI/SNF. *Генетика*. **52**, 164–169.
17. Krasnov A.N., Mazina M.Y., Nikolenko J.V., Vorobyeva N.E. (2016) On the way of revealing coactivator complexes crosstalk during transcriptional activation. *Cell. Biosci*. **6**, 15.
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. Фурсова Н.А., Мазина М.Ю., Николенко Ю.В., Воробьева Н.Е., Краснов А.Н. (2020) Белок CG9890 дрозофилы, содержащий домены цинковых пальцев, колокализуется с комплексами модификации и ремоделирования хроматина на промоторах генов и участвует в регуляции транскрипции. *Acta Naturae*. **12**, 114–119.
20. НиколенкоЮ.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.
21. 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.
22. Николенко Ю.В., Вдовина Ю.А., Фефелова Е.И., Глухова А.А., Набирочкина Е.Н., Копытова Д.В. (2021) Деубиквитинирующий (DUB) модуль SAGA участвует в Pol III-зависимой транскрипции. *Молекуляр. биология*. **55**(3), 500–509.
23. 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.
24. 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.

The Drosophila Zinc Finger Protein CG9609 Interacts with the Deubiquitinating (DUB) Module of the SAGA Complex and Participates in the Regulation of Transcription

J. V. Nikolenko[1], M. M. Kurshakova[1], D. V. Kopytova[1], Y. A. Vdovina[1], N. E. Vorobyova[2], A. N. Krasnov[2, *]

[1]Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia
[2]Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia
**e-mail: krasnov@genebiology.ru*

In previous studies, we found that the zinc finger proteins Su(Hw) and CG9890 interact with the Drosophila SAGA complex and participate in the formation of active chromatin structure and transcriptional regulation. In this research, we discovered the interaction of the DUB module of the SAGA complex with another zinc finger protein, CG9609. ChIP-Seq analysis was performed and CG9609 binding sites in the Drosophila genome were identified. Analysis of binding sites showed that they are localized predominantly at gene promoters. The CG9609 protein has been shown to be involved in the regulation of gene expression.

Keywords: CG9609, zinc fingers, transcription activation, DUB-module, SAGA complex