

УДК 577.218

КОНСЕРВАТИВНАЯ В ЭВОЛЮЦИИ ХЕЛИКАЗА DNX9/MLE УЧАСТВУЕТ В РЕГУЛЯЦИИ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ мРНК СОБСТВЕННОГО ГЕНА У *Drosophila Melanogaster*

© 2025 г. И. А. Золин, академик РАН С. Г. Георгиева, Ю. В. Николенко*

Поступило 20.09.2024 г.

После доработки 25.10.2024 г.

Принято к публикации 27.10.2024 г.

Хеликаза MLE у *D. melanogaster*, как и ее ортолог DNX9 у млекопитающих, участвует в широком спектре процессов, связанных с регуляцией экспрессии генов. В настоящей работе было исследовано влияние мутации *mle[9]* на уровень экспрессии мРНК собственного гена. Было установлено, что помимо ранее описанной делеции в каталитическом домене белка, нарушающей его хеликазную активность, в мутации *mle[9]* присутствует дополнительная небольшая делеция в С-концевом домене. На фоне мутации *mle[9]* происходило трехкратное усиление экспрессии основного транскрипта гена *mle*, кодирующего полноразмерный белок. Было проанализировано связывание MLE с хроматином в кодирующей части гена *mle*, промоторами и близлежащими энхансерами. Чтобы исключить влияние дозовой компенсации, эксперименты были проведены на самках. Полученные данные указывают на роль MLE в специфической регуляции уровня экспрессии мРНК собственного гена *in vivo* на стадии имаго.

Ключевые слова: MLE, DNX9, регуляция транскрипции, экспрессия генов

DOI: 10.31857/S2686738925010116, **EDN:** tcnece

DNX9 – консервативный у высших эукариот белок из семейства DExH-хеликаз, один из важнейших факторов в клетках человека, участвующий во многих стадиях экспрессии генов от поддержания стабильности генома до регуляции трансляции [1, 2]. Многообразие функций, выполняемых хеликазой DNX9 в клетках высших эукариот, обеспечивается ее способностью расплетать разнообразные формы ДНК и РНК (двухцепочечные, гетеродуплексы, триплексы, G-квадруплексы и пр.). На N- и C-концах молекулы расположены домены, которые обеспечивают связывание разных форм нуклеиновых кислот и многочисленные белок-белковые взаимодействия. Благодаря этому DNX9 в разных типах клеток на разных стадиях онтогенеза может выполнять специфические функции. Аминокислотная последовательность и доменная структура DNX9 очень консервативны у представителей таких эволюционно отдаленных групп живых организмов, как *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio*, млекопитающие

и человек [1]. Механизмы работы DNX9 во многих процессах не изучены, поэтому исследования функций этой хеликазы у модельных организмов имеют большое значение.

DNX9 у *D. melanogaster* имеет историческое название MLE (Maleless), отражающее роль этой хеликазы в дозовой компенсации у самцов [3]. Однако у самок *D. melanogaster*, у которых нет комплекса дозовой компенсации, MLE также экспрессируется на всех стадиях развития во всех системах органов. Особенно высок уровень экспрессии на эмбриональной стадии развития, а на стадии имаго – в мозге и в яичниках. В ряде работ было показано, что MLE у *D. melanogaster* вне дозовой компенсации участвует в регуляции уровня транскрипции ряда генов, взаимодействует с факторами сплайсинга, факторами ремоделирования хроматина и выполняет ряд других функций, как и в клетках человека [4–9].

Для гена *mle* в базах данных аннотировано два транскрипта (рис. 1а): *mle-RA*, кодирующий полноразмерный белок MLE с длиной 1293 а. о. и массой 144 кДа, и синтезирующийся с альтернативного промотора гипотетический транскрипт *mle-RC*, содержащий открытую рамку считывания для укороченной формы белка MLE с длиной 936 а. о. и массой 104 кДа, лишенной N-концевых

Федеральное государственное учреждение науки
Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
Москва, Российская Федерация

*e-mail: julia.v.nikolenko@gmail.com

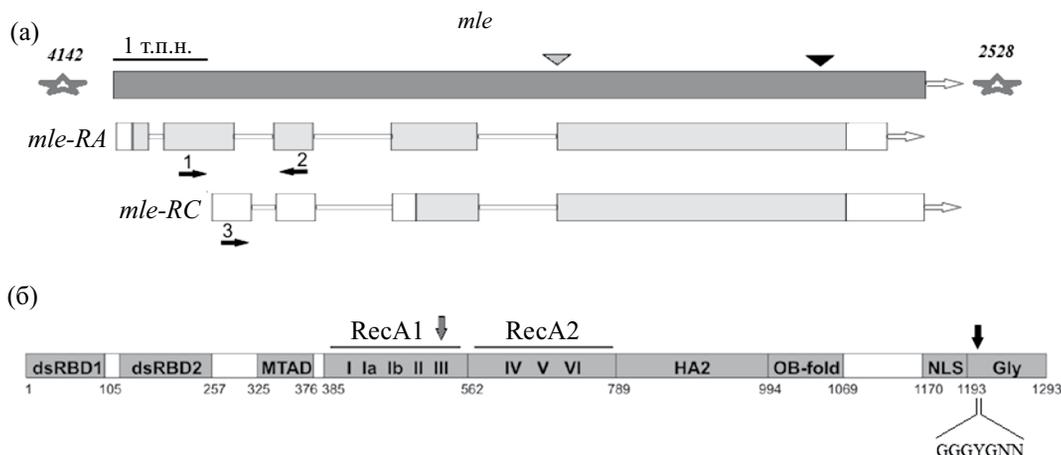


Рис. 1. Ген *mle* и доменное строение белка MLE в норме и на фоне мутации *mle[9]* (цитируется по [11] с изменениями). а – схематическое изображение гена *mle* и его транскриптов: *mle-RA* – транскрипт, кодирующий полноразмерный белок, *mle-RC* – альтернативный транскрипт. Экзоны обозначены прямоугольниками, кодирующая область выделена серым цветом. Стрелками 1,2,3 обозначено положение праймеров, использованных для измерения уровня транскрипции *mle-RA* и *mle-RC*. Стрелки над геном указывают положение делеций в мутации *mle[9]*: серая – ранее описанная делеция в каталитическом “ядре”, черная – обнаруженная в настоящем исследовании делеция в С-концевом домене. Звездочками обозначено положение близлежащих энхансеров STARR_OSC-4142 и STARR_OSC-2528. б – доменное строение белка MLE. Стрелки указывают положение делеций в мутации *mle[9]*: серая – ранее описанная делеция в каталитическом “ядре”, черная – обнаруженная в настоящем исследовании делеция 7 а. о. в С-концевом домене. Районы, соответствующие определенным доменам, обозначены серым цветом, линкерные участки – белым цветом. Представлены два домена связывания дцРНК – dsRBD1 и dsRBD2, минимальный домен трансактиваляции MTAD, каталитическое “ядро”, состоящее из доменов RecA1 и RecA2 и хеликаза-ассоциированного домена HA2, область связывания олигосахарида/олигонуклеотида OB-fold, С-концевой домен RGG-box, включающий сигнал ядерной локализации NLS и глицин-богатую последовательность Gly. Консервативные мотивы в каталитическом “ядре” обозначены римскими цифрами.

доменов dsRBD1, dsRBD2 и MTAD. В нашей предыдущей работе было показано, что мутация *mle[9]* (*mle[γ38]*), в гомозиготном состоянии нарушающая дозовую компенсацию и вызывающая летальный фенотип у самцов [10], также имеет плейотропный эффект у самок [11]. Белок в мутантах лишен хеликазной активности из-за небольшой делеции в каталитическом “ядре” молекулы. В настоящей работе было продолжено изучение изменений экспрессии MLE в этой мутации. Для субклонирования и секвенирования полной последовательности *mle-RA* была получена кДНК тотальной полиаденилированной РНК виргильных самок, гомозиготных по мутации *mle[9]* и самок дикого типа. При сравнении последовательности кДНК мутантов с кДНК самок дикого типа и с референсным транскриптом было обнаружено, что в мутации *mle[9]*, помимо уже известной делеции в каталитическом “ядре”, присутствует еще одна делеция длиной 21 п. н. Анализ последовательности на уровне белка показал, что эта делеция приводит к потере 7 а. о. в С-концевом глицин-богатом домене RGG-box. Этот домен имеет длину ~120 а. о. и содержит сигнал ядерной локализации (NLS) и 9 несовершенных повторов

последовательности GGGYGNN, где тирозин занимает каждое седьмое положение в пределах повтора [3, 12]. В мутации *mle[9]* утрачивается один из первых двух идентичных повторов, расположенных в начале домена сразу после сигнала ядерной локализации (рис. 1б). Ранее было показано, что этот домен отвечает за связывание MLE с несколькими белками-партнерами [1], в том числе с мультифункциональным консервативным белком ENY2, который входит в состав целого ряда белковых комплексов [5, 13]. Далее был исследован вопрос влияния мутации *mle[9]* на изменение уровня транскриптов гена *mle*. Ранее было отмечено, что мутация *mle[9]* не снижает уровень экспрессии гена. Наоборот, была отмечена тенденция к возрастанию уровня экспрессии *mle* у гомозиготных по мутации *mle[9]* самок по сравнению с их гетерозиготными сестрами [11]. Для достоверного и точного определения влияния мутации *mle[9]* на экспрессию мРНК собственного гена в настоящей работе были учтены следующие моменты. Линия BDSC #5873, несущая мутацию, имеет генотип *cn[1]bw[1]mle[9]/CyO*, поэтому самки, гомозиготные по мутации *mle[9]*, в отличие от своих гетерозиготных сестер,

также в гомозиготном состоянии несут мутации *cn[1]* и *bw[1]*.

Несмотря на то, что в литературе нет данных о влиянии мутаций *cn[1]* и *bw[1]* на уровень транскрипции, это влияние нельзя исключить. Кроме того, на уровень экспрессии *mle* может влиять общее генетическое окружение, если оно отличается в опытной и контрольной линиях. С учетом вышесказанного, в качестве контрольной линии мы использовали в настоящей работе линию *cn[1]bw[1]*, предварительно проведенную через 9 последовательных скрещиваний с опытной линией #5873 для приведения обеих линий к общему генетическому фону. В эксперименте были использованы виргильные самки в возрасте 5 дней после вылупления. Была получена кДНК тотальной полиаденилированной РНК самок с генотипом *cn[1]bw[1]mle[9]* и самок контрольной линии с генотипом *cn[1]bw[1]*. Уровень экспрессии основного транскрипта *mle-RA* и гипотетического транскрипта *mle-RC* был измерен при помощи количественной ПЦР. Расположение праймеров для специфической амплификации кДНК двух транскриптов указано на рис. 1а. Уровни экспрессии транскриптов *mle* были отнормированы на уровень экспрессии транскрипта гена рибосомального белка RPL32. Все эксперименты были проведены в трех повторностях. Результаты представлены на рис. 2а. Транскрипт *mle-RA*, кодирующий полноразмерный белок, экспрессируется в самках имаго на высоком уровне. В самках, гомозиготных по мутации *mle[9]*, его уровень повышен в 3 раза по сравнению с контрольными самками.

Транскрипт *mle-RC* также детектируется в самках на стадии имаго, хотя и на значительно меньшем уровне, гомозиготное состояние мутации *mle[9]* не оказывает влияния на его экспрессию.

Ранее было показано, что MLE влияет на регуляцию уровня транскрипции гена *ftz-f1* в культуре клеток и в самках *D. melanogaster in vivo*. При этом был исследован профиль связывания MLE с хроматином гена *ftz-f1*, и показано, что MLE образует пики на промоторе и энхансере гена [6, 14]. В настоящей работе мы исследовали методом иммунопреципитации хроматина связывание MLE с промоторами собственного гена. Также было проанализировано связывание с близлежащими энхансерами, определенными в полногеномном скрининге методом STARR-seq [15], и с районами в кодирующей части гена *mle* (рис. 1а). Для проведения реакции иммунопреципитации хроматина были использованы виргильные самки с генотипом *cn[1]bw[1]*, несущие ген *mle* дикого типа, и самки, гомозиготные по мутации *mle[9]*, с генотипом *cn[1]bw[1]mle[9]* одного возраста (5 дней). Результат представлен на рис. 2б. Мутантный белок MLE связывался с хроматином на таком же уровне, как и белок дикого типа. Это означает, что делеции в хеликазном и в С-концевом домене не нарушают способность MLE связываться с хроматином. Мы обнаружили, что ни на промоторах собственного гена, ни на близлежащих энхансерах MLE не образует пиков. Уровень связывания MLE с промотором основного транскрипта *mle-RA* и близлежащими энхансерами был сопоставим с уровнем связывания

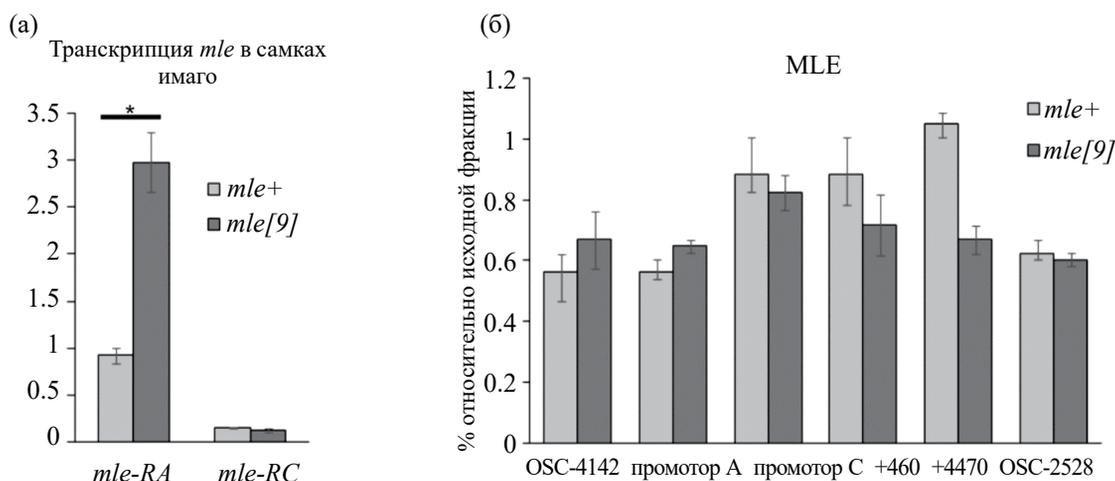


Рис. 2. Изучение влияния MLE на экспрессию собственного гена *in vivo* в самках *D. melanogaster* на стадии имаго. а – изменения уровня экспрессии транскриптов гена *mle* на фоне мутации *mle[9]*. Уровень транскриптов *mle* был измерен относительно уровня транскрипта контрольного гена *Rpl32*. За 1 по оси ординат принято значение *mle-RA* в самках дикого типа в одной из трех повторностей эксперимента. * – $p < 0.01$. б – анализ связывания белка MLE дикого типа (*mle+*) и мутантного белка (*mle[9]*) с промоторами собственного гена, с кодирующими районами в 5'-области гена (+460 – расстояние в п. о. от сайта старта транскрипции *mle-RC*) и в 3'- области гена (+4470 – расстояние в п. о. от сайта старта транскрипции *mle-RC*) и с близлежащими энхансерами (STARR_OSC-4142 и STARR_OSC-2528).

в межгенном участке (данные не представлены). Уровень связывания на промоторе транскрипта *mle-RC* и в теле гена в 3'- и 5'-проксимальных районах был несколько выше. При этом надо отметить, что промотор транскрипта *mle-RC* расположен в белок-кодирующем экзоне транскрипта *mle-RA*. Поэтому можно заключить, что MLE формирует протяженную область связывания в теле собственного гена, но не образует пиков на его регуляторных элементах.

Итак, в настоящей работе было показано, что мутация *mle[9]*, помимо описанной ранее делеции в хеликазном домене, несет также делецию 7 а. о. в С-концевом глицин-богатом домене. Гомозиготное состояние мутации приводит к троекратному усилению экспрессии основного транскрипта гена *mle*, что означает участие MLE в регуляции экспрессии собственного гена. При этом белок MLE, как мутантный, так и дикого типа, связывается на невысоком уровне с хроматином в теле гена *mle*, но не образует пиков на его регуляторных элементах.

MLE может влиять на уровень транскрипции генов несколькими путями. Первый состоит в том, что связывание и хеликазная активность MLE обеспечивает расплетение РНК-петель (R-loops) и прочих сложных структур, образующихся в процессе транскрипции, сплайсинга и процессинга РНК [1, 2, 16]. Кроме того, MLE вступает в белок-белковые взаимодействия с факторами транскрипции и непосредственно с РНК-полимеразой II, привлекая ее на промоторы генов-мишеней [1, 17, 18]. Поскольку MLE не образует пиков на регуляторных элементах собственного гена, этот механизм регуляции его транскрипции кажется маловероятным. Также MLE участвует в регуляции экспрессии генов посредством РНК-интерференции [8]. Для этого необходима хеликазная активность MLE. Анализ данных полногеномного секвенирования “small RNA-seq”, приведенных на сайте Flybase.org, показывает, что в теле гена *mle* детектируется много коротких (менее 30 нуклеотидов) РНК, комплементарных транскриптам гена. Это позволяет предположить, что уровень экспрессии мРНК гена *mle* в норме регулируется при помощи РНК-интерференции. Именно поэтому на фоне потери хеликазной активности MLE в мутантах *mle[9]*, нарушающей РНК-интерференцию [8], уровень экспрессии гена возрастает.

У человека изменение уровня экспрессии DHX9 (ортолога MLE) наблюдается во многих злокачественных опухолях и в процессе развития аутоиммунных заболеваний [1,2]. Даже гетерозиготное состояние мутаций в гене *DHX9* вызывает у человека спектр серьезных нарушений в работе нервной системы, от нарушений в развитии головного мозга до прогрессирующей периферической нейропатии [19]. Механизм развития

этих патологий может быть связан как с гапло-недостаточностью, так и с доминант-негативным действием мутаций в гене *DHX9*, и на данный момент не изучен. У *D. melanogaster* также показано влияние мутаций в гене *mle* на строение и работу как центральной, так и периферической нервной системы [16,20]. Это означает, что функции MLE в нервной системе могут быть консервативны в эволюции. Известно также, что мутации, не затрагивающие сигнал ядерной локализации (к таким мутациям относится и *mle[9]*), тем не менее могут вызывать перераспределение MLE и DHX9 из ядра в цитоплазму [17]. Все вышесказанное делает важным исследование регуляции экспрессии MLE на модельных организмах. Проведенное нами исследование вносит вклад в понимание деталей этого процесса.

ИСТОЧНИКМ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа была выполнена при поддержке гранта РФФИ № 23-24-00357.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lee T., Pelletier J. The biology of DHX9 and its potential as a therapeutic target. *Oncotarget*. 2016. Vol. 7. P. 42716–42739.
2. Gulliver C., Hoffmann R., Baillie G.S. The enigmatic helicase DHX9 and its association with the hallmarks of cancer. *Future Sci OA*. 2020. Vol. 7. FSO650.
3. Kuroda M.I., Kernan M.J., Kreber R., et al. The maleless protein associates with the X chromosome to regulate dosage compensation in drosophila. *Cell*. 1991. Vol. 66. P. 935–947.
4. Николенко Ю.В., Георгиева С.Г., Копытова Д.В. Разнообразие функций хеликазы MLE в регуляции экспрессии генов у высших эукариот. *Молекулярная биология*. 2023. Т. 57. С. 1–14.
5. Николенко Ю.В., Куришкова М.М., Краснов А.Н. Мультифункциональный белок ENY2 взаимодействует с РНК-хеликазой MLE. *Докл. Акад. Наук*. 2019. Т. 489. С. 637–640.

6. *Николенко Ю.В., Куршакова М.М., Краснов А.Н.,* и др. Хеликазы MLE – новый участник регуляции транскрипции гена *ftz-f1*, кодирующего ядерный рецептор у высших эукариот. Докл. Акад. Наук. Науки о жизни. 2021. Т. 496. С.48–51.
7. *Kotlikova I. V, Demakova O. V, Semeshin V.F.,* et al. The Drosophila Dosage Compensation Complex Binds to Polytene Chromosomes Independently of Developmental Changes in Transcription. *Genetics*. 2006. Vol. 14. P. 1478–1488.
8. *Cugusi S., Li Y., Jin P.,* et al. The Drosophila Helicase MLE Targets Hairpin Structures in Genomic Transcripts. *PLoS Genet*. 2016. Vol. 12. P. e1005761.
9. *Cugusi S., Kallappagoudar S., Ling H.,* et al. The Drosophila Helicase Maleless (MLE) is Implicated in Functions Distinct From its Role in Dosage Compensation. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2015. Vol. 14. P. 1478–1488.
10. *Kernan M.J., Kuroda M.I., Kreber R.,* et al. *naps*, a Mutation affecting sodium channel activity in Drosophila, Is an allele of *mle* a regulator of X chromosome transcription. *Cell*. 1991. Vol. 66. P. 949–959.
11. *Ашниева Г.А., Георгиева С.Г., Николенко Ю.В.* Функции хеликазы MLE Drosophila melanogaster вне дозовой компенсации: молекулярная природа и плейотропный эффект мутации *mle[9]*. Генетика. 2024. Т. 60. С.34–46.
12. *Izzo A., Regnard C., Morales V.,* et al. Structure-function analysis of the RNA helicase maleless. *Nucleic Acids Res*. 2008. Vol. 36. P. 950–962.
13. *Kopytova D.V., Krasnov A.N., Orlova A.V.,* et al. ENY2: Couple, triple...more? *Cell Cycle*. 2010. Vol. 9. P. 479–481.
14. *Николенко Ю.В., Краснов А.Н., Мазина М.Ю.,* и др. Изучение свойств нового экдизонзависимого энхансера. Докл. Акад. Наук. 2017. Т. 474. С. 756–759.
15. *Arnold C.D., Gerlach D., Stelzer C.,* et al. Genome-wide quantitative enhancer activity maps identified by STARR-seq. *Science*. 2013. Vol. 339. P. 1074–1077.
16. *Reenan R.A., Hanrahan C.J., Ganetzky B.* The *mle* RNA Helicase Mutation in Drosophila Results in a Splicing Catastrophe of the *para Na + Channel* Transcript in a Region of RNA Editing. *Neuron*. 2000. Vol. 25. P. 139–149.
17. *Aratani S., Fujii R., Fujita H.,* et al. Aromatic residues are required for RNA helicase A mediated transactivation. *Int J Mol Med*. 2003. Vol. 12. P. 175–180.
18. *Aratani S., Kageyama Y., Nakamura A.,* et al. MLE activates transcription via the minimal transactivation domain in Drosophila. *Int J Mol Med*. 2008. Vol. 21. P. 469–476.
19. *Calame D.G.* et al. Monoallelic variation in DHX9, the gene encoding the DExH-box helicase DHX9, underlies neurodevelopment disorders and Charcot-Marie-Tooth disease. *Am J Hum Genet*. 2023. Vol. 110. P. 1394–1413.
20. *Fergestad T., Ganetzky B., Palladino M.J.* Neuropathology in Drosophila membrane excitability mutants. *Genetics*. 2006. Vol. 172. P. 1031–1042.

EVOLUTIONARILY CONSERVED DHX9/MLE HELICASE IS INVOLVED IN THE REGULATION OF ITS OWN MRNA EXPRESSION LEVEL IN DROSOPHILA MELANOGASTER

I. A. Zolin, Academician of the RAS S. G. Georgieva, J. V. Nikolenko*

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

**e-mail: julia.v.nikolenko@gmail.com*

The MLE helicase of *D. melanogaster*, like its ortholog DHX9 in mammals, is involved in a wide range of processes related to the regulation of gene expression. In the present study, we investigated the impact of the *mle[9]* mutation on its own mRNA expression level. It was shown that in addition to the previously described deletion in the catalytic domain of the protein, which impairs its helicase activity, the *mle[9]* mutation contains an additional small deletion in the C-terminal domain. In the *mle[9]* mutation background, there was a threefold increase in the expression of the main transcript of the *mle* gene encoding the full-length protein. Binding of MLE to chromatin at the coding region and promoters of the *mle* gene and nearby enhancers was analyzed. To exclude the influence of dosage compensation, experiments were performed on females. The data obtained indicate the role of MLE in specific regulation of its own mRNA expression level *in vivo* at the adult stage.

Keywords: MLE, DHX9, transcription regulation, gene expression