doi 10.18699/bgrs2026-146

Роль комплекса MMB/dREAM в регуляции генов в ходе дифференцировки клеток зародышевого пути самцов *Drosophila melanogaster*

Антошина П.А.[1]*, Белякин С.Н.[2], Лактионов П.П.[1], Максимов Д.А.[1], Шлома В.В.[1]
[1] *Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, Россия*
[2] *Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия*
* *polonium@mcb.nsc.ru*

Ключевые слова: клеточная дифференцировка; регуляция экспрессии генов; MMB/dREAM; tMAC; сперматогенез; *Drosophila melanogaster*

Мотивация и цель: В основе развития специализированных клеток организма лежит генетическая программа, активирующая гены дифференцировки и подавляющая гены, специфичные для других клеточных линий. Сперматогенез *Drosophila melanogaster* является удобной модельной системой для исследования генетических механизмов, управляющих процессом клеточной дифференцировки. Известно, что запуск программы терминальной дифференцировки сопровождается массовой активацией экспрессии семенник-специфичных генов, что во многом опосредовано тканеспецифичным комплексом tMAC (testis-specific meiotic arrest complex). Но в клетках зародышевого пути самцов дрозофилы также активен аналог tMAC – комплекс MMB/dREAM (Myb-MuvB/Drosophila RBF, E2F, and Myb). О существовании гомологии между двумя регуляторными комплексами известно давно, однако вопрос о том, пересекаются ли их функции при регуляции экспрессии генов и, если пересекаются, то в какой степени, до сих пор не имеет ответа, поскольку исследования, посвящённые установлению влияния MMB/dREAM на транскрипцию, были проведены в соматических клетках дрозофилы.
Методы и алгоритмы: полногеномные профили локализации субъединицы комплекса MMB/dREAM, белка Mip130, в клетках зародышевого пути самцов дрозофилы были получены в результате процедуры тканеспецифичной DamID-seq [1]. Чтобы установить сайты связывания комплекса на определённых этапах дифференцировки клеток, процедуру картирования дополнительно проводили на фоне мутаций в генах *bam*, *can*, *aly* и *mip40*. Нокаутный аллель гена *mip130*, кодирующий субъединицу MMB/dREAM, был получен с использованием системы редактирования генома CRISPR-Cas9. Для установления непосредственного вклада MMB/dREAM на активность генов в клетках зародышевого пути был проведён RNA-seq семенников мутантов по гену *mip130*.
Результаты: Мы получили полногеномные профили локализации субъединицы комплекса MMB/dREAM – Mip130 – в клетках зародышевого пути самцов дрозофилы. Мы обнаружили, что комплекс перераспределяется к новым мишеням в процессе сперматогенеза. Этот результат частично объясняет наблюдаемую нами ранее динамику локализации белка Mip40, который является общей субъединицей для MMB/dREAM и tMAC [2]. Мы также обнаружили, что мутация в гене *mip40* существенно нарушает связывание белка Mip130 с хромосомами, а значит, она может влиять на работу обоих комплексов, и установленные ранее изменения экспрессии генов у мутантов *mip40* могут в действительности представлять собой суммарную картину нарушений MMB/dREAM и tMAC. Проанализировав участки связывания MMB/dREAM, мы установили, что комплекс преимущественно локализован вблизи стартов транскрипции генов и среди его мишеней на всех этапах дифференцировки наблюдается обогащение генами, которые специфично активны в яичниках дрозофилы, тогда как семенник-специфичные гены оказались недопредставлены. Этот результат опроверг нашу гипотезу о том, что MMB/dREAM может подавлять активность мишеней tMAC на ранних этапах сперматогенеза. Чтобы установить непосредственный вклад MMB/dREAM в регуляцию экспрессии, мы получили мутантный аллель гена *mip130*, который оказался летален в геми- и гомозиготном состоянии. Поскольку жизнеспособность мух восстанавливается при экспрессии CDS гена *mip130*, это указывает на то, что летальный фенотип связан именно с полученной нами делецией. Мы создали систему условного спасения мутантов *mip130*, которая позволила получить самцов, у которых клетки зародышевого пути мутантны по этому гену, тогда как жизнеспособность организма в целом была обеспечена экспрессией CDS гена *mip130*. Проанализировав изменения транскриптома в семенниках мутантов *mip130*, мы обнаружили 554 дифференциально экспрессирующихся гена (log2FC≥1, FDR <0.05) Нарушение функционирования MMB/dREAM в семенниках дрозофилы преимущественно приводит к оверэкспрессии генов, которые ассоциированы с делением клеток и репликацией ДНК, а также активации транскрипции генов, необходимых для оогенеза, однако это не приводит к значительным нарушениям дифференцировки клеток зародышевого пути самцов.
Выводы: В клетках зародышевого пути самцов дрозофилы два гомологичных регуляторных комплекса MMB/dREAM и tMAC действуют независимо друг от друга, контролируя контрастно отличающиеся наборы генов. Тогда как tMAC осуществляет активацию транскрипции семенник-специфичных генов, MMB/dREAM подавляет экспрессию яичник-специфичных генов, однако дерегуляция мишеней комплекса не приводит к нарушению морфологии семенников и остановке сперматогенеза.
Финансирование: Исследование поддержано Министерством науки и высшего образования РФ (государственное задание No. FWGZ-2021-0017 (122011900429-5)).

Role of the MMB/dREAM complex in gene regulation during *Drosophila melanogaster* male germline differentiation

Antoshina P.A.[1]*, Belyakin S.N.[2], Laktionov P.P.[1], Maksimov D.A.[1], Shloma V.V.[1]
[1] *Institute of Molecular and Cellular Biology, SB RAS, Novosibirsk, Russia*
[2] *Novosibirsk National Research State University, Novosibirsk, Russia*
* *polonium@mcb.nsc.ru*

Key words: cell differentiation; gene expression regulation; MMB/dREAM; tMAC; spermatogenesis; *Drosophila melanogaster*

Motivation and Aim: The development of specialized cell types is driven by genetic programs that activate differentiation genes while suppressing those specific to other cell lineages. *Drosophila melanogaster* spermatogenesis is widely used as a model system for investigating the genetic mechanisms underlying cellular differentiation. It has been well established that the initiation of the terminal differentiation program during spermatogenesis involves the massive activation of testis-specific genes, a process largely mediated by the testis-specific meiotic arrest complex (tMAC). However, an analog of tMAC, the MMB/dREAM complex (Myb-MuvB/Drosophila RBF, E2F, and Myb), is also active in the male germline. Although the homology between these two regulatory complexes has been known, the extent to which their functions in gene expression regulation overlap remains elusive, as previous studies on MMB/dREAM-mediated transcription have been conducted in somatic cells.
Methods and Algorithms: Genome-wide localization profiles of the MMB/dREAM largest subunit Mip130 in the *Drosophila* male germline were obtained using tissue-specific DamID-seq [1]. Mapping was further performed in *bam*, *can*, *aly*, and *mip40* mutant backgrounds to identify Mip130 binding sites at specific stages of differentiation. A knockout allele of the *mip130* gene was generated using the CRISPR-Cas9 system. To determine the direct contribution of MMB/dREAM to gene expression in the male germline, RNA-seq was performed on testes from *mip130* mutants.
Results: We used tissue-specific DamID-seq to establish the genome-wide profiles of the MMB/dREAM subunit Mip130 in *Drosophila* male germline. We found that the MMB/dREAM complex redistributes to novel targets during spermatogenesis. This finding partially explains the previously observed localization dynamics of Mip40, a shared subunit of both MMB/dREAM and tMAC [2]. We also demonstrated that a mutation in the *mip40* gene significantly impairs Mip130 binding to chromosomes. Thus, the *mip40* mutation may affect both complexes, and previously reported expression changes in these mutants likely represent the combined disruption of MMB/dREAM and tMAC. Analysis of MMB/dREAM binding sites revealed that the complex is predominantly localized near transcription start sites. At all differentiation stages, its targets were enriched for genes specifically active in *Drosophila* ovaries, while testis-specific genes were underrepresented. This result refuted our hypothesis that MMB/dREAM might repress tMAC targets during early spermatogenesis stages. To evaluate the direct role of MMB/dREAM in gene expression regulation, we generated a *mip130* mutant allele, which proved lethal in hemi- and homozygous states. Since viability was restored by transgenic expression of the *mip130* CDS, the lethal phenotype is confirmed to be caused by the generated deletion. We developed a conditional rescue system for *mip130* mutants, allowing us to obtain males with *mip130*-mutant germline. Transcriptomic analysis of *mip130* mutant testes revealed 554 differentially expressed genes (log2FC≥1, FDR < 0.05). Impairment of MMB/dREAM function in *Drosophila* testes predominantly leads to the upregulation of genes associated with cell division and DNA replication, as well as the activation of genes required for oogenesis. However, these changes did not cause significant defects in male germline differentiation.
Conclusion: In the *Drosophila* male germline, the two homologous regulatory complexes, MMB/dREAM and tMAC, act independently to control the expression of distinct gene sets. While tMAC activates the transcription of testis-specific genes, MMB/dREAM predominantly represses ovary-specific genes. Notably, the deregulation of MMB/dREAM targets does not affect testis morphology or spermatogenesis arrest.
Funding: The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (state project No. FWGZ-2021-0017 (122011900429-5)).

Список литературы/References

1. Maksimov DA, Laktionov PP, Belyakin SN. Data analysis algorithm for DamID-seq profiling of chromatin proteins in Drosophila melanogaster. *Chromosom Res*. 2016;24(4):481-494. doi:10.1007/s10577-016-9538-4
2. Laktionov PP et al. Genome-wide analysis of gene regulation mechanisms during Drosophila spermatogenesis. *Epigenetics Chromatin*. 2018;11(1):14. doi:10.1186/s13072-018-0183-3