

УДК 575.22:595.773.4

ФРАГМЕНТЫ ГРАНИЦ *Fab-3* и *Fab-4 Bithorax*-комплекса *Drosophila melanogaster*, ВКЛЮЧАЮЩИЕ САЙТЫ СТСФ, НЕ ЯВЛЯЮТСЯ ЭФФЕКТИВНЫМИ ИНСУЛЯТОРАМИ

© 2022 г. О. В. Кырчанова^{1,*}, Н. Е. Постика¹, В. В. Соколов¹, академик РАН П. Г. Георгиев¹

Поступило 17.09.2021 г.

После доработки 01.10.2021 г.

Принято к публикации 03.10.2021 г.

Сегмент-специфичные регуляторные домены комплекса *Bithorax* (BX-C), который состоит из трех гомеотических генов *Ubx*, *abd-A* и *Abd-B*, разделены границами, выполняющими функции инсуляторов. Большинство границ содержат сайты связывания консервативного для высших эукариот архитектурного белка СТСФ. Как было показано ранее, сайты СТСФ определяют инсуляторную активность границ регуляторной области гена *Abd-B*. В настоящей работе было показано, что фрагменты границ регуляторной области *abd-A*, *Fab-3* и *Fab-4*, содержащие сайты связывания белка СТСФ, не являются эффективными инсуляторами.

Ключевые слова: инсуляторы, dCTCF, регуляторные домены, архитектурные белки, *Abd-B*, *Fab-7*, *abd-A*

DOI: 10.31857/S2686738922010139

Архитектура хромосом и дистанционные взаимодействия между регуляторными элементами являются одной из ключевых областей исследований в современной биологии. В настоящее время стало очевидно, что для установления правильной экспрессии генов их регуляторные элементы специфично взаимодействуют друг с другом [1]. Недавно полногеномные 3D-исследования показали, что хромосомы высших эукариот организованы в топологически ассоциированные домены (ТАД) [2]. В организации границ ТАДов у позвоночных определяющую роль играет архитектурный белок СТСФ, который до настоящего времени является единственным хорошо исследованным инсуляторным белком млекопитающих [3].

Одной из наиболее удобных моделей для изучения организации пространственных специфичных взаимодействий между регуляторными элементами *in vivo* является *Bithorax*-комплекс (BX-C) *Drosophila melanogaster*, состоящий из трех гомеозисных генов *Ultrabithorax* (*Ubx*), *abdominal-A* (*abd-A*) и *Abdominal-B* (*Abd-B*), отвечающих за формирование третьего грудного (Т3) и всех брюшных сегментов (A2–A7) [4–6]. Эти гены регулируются тканеспецифичными регуляторными доменами (*abx/bx*, *bxd/pbx*, *iab-2–iab-8*), чередующимися в порядке расположения сегментов, ко-

торые они контролируют (рис. 1а). Каждый домен отвечает за экспрессию одного из трех генов и функционирует автономно благодаря окружающим его границам-инсуляторам [7, 8]. В настоящее время наиболее подробно исследована регуляторная область гена *Abd-B*, представленная доменами *iab-5–8*, которые фланкированы границами *Mcp*, *Fab-6*, *Fab-7* и *Fab-8* [4–6] (рис. 1а). Рядом с границами находятся регуляторные элементы, рекрутирующие Поликомб-комплексы, PRE (Polycomb response element) [9, 10]. На примере *Fab-7* и *Fab-8* было показано, что границы имеют две функции: поддерживают автономию соседних *iab*-доменов и одновременно обеспечивают специфичные взаимодействия между *iab*-доменами и промотором *Abd-B* [11]. На границах *Mcp*, *Fab-6* и *Fab-8* были найдены сайты связывания для гомолога белка СТСФ млекопитающих (dCTCF), а на границах *Fab-7* и *Mcp* – архитектурного белка Pita [12, 13].

Целью настоящего исследования является попытка идентификации границ в регуляторной области гена *abd-A*. Ранее в регуляторной области гена *abd-A* были найдены участки, соответствующие потенциальным границам *Fab-3* и *Fab-4*, окружающим домен *iab-3*, содержащие два (*Fab-3*) и один (*Fab-4*) сайта связывания белка dCTCF [12]. Ранее было показано, что фрагменты ДНК *Fab-3* (626 пн), *F3* (3R:16835097..16834472) и *Fab-4* (784 пн), *F4* (3R:16857582..16856799, координаты указаны в соответствии с Genome Release r6.41, FlyBase), несмотря на наличие сайтов dCTCF, не

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН), Москва, Россия

*e-mail: olna73@gmail.com

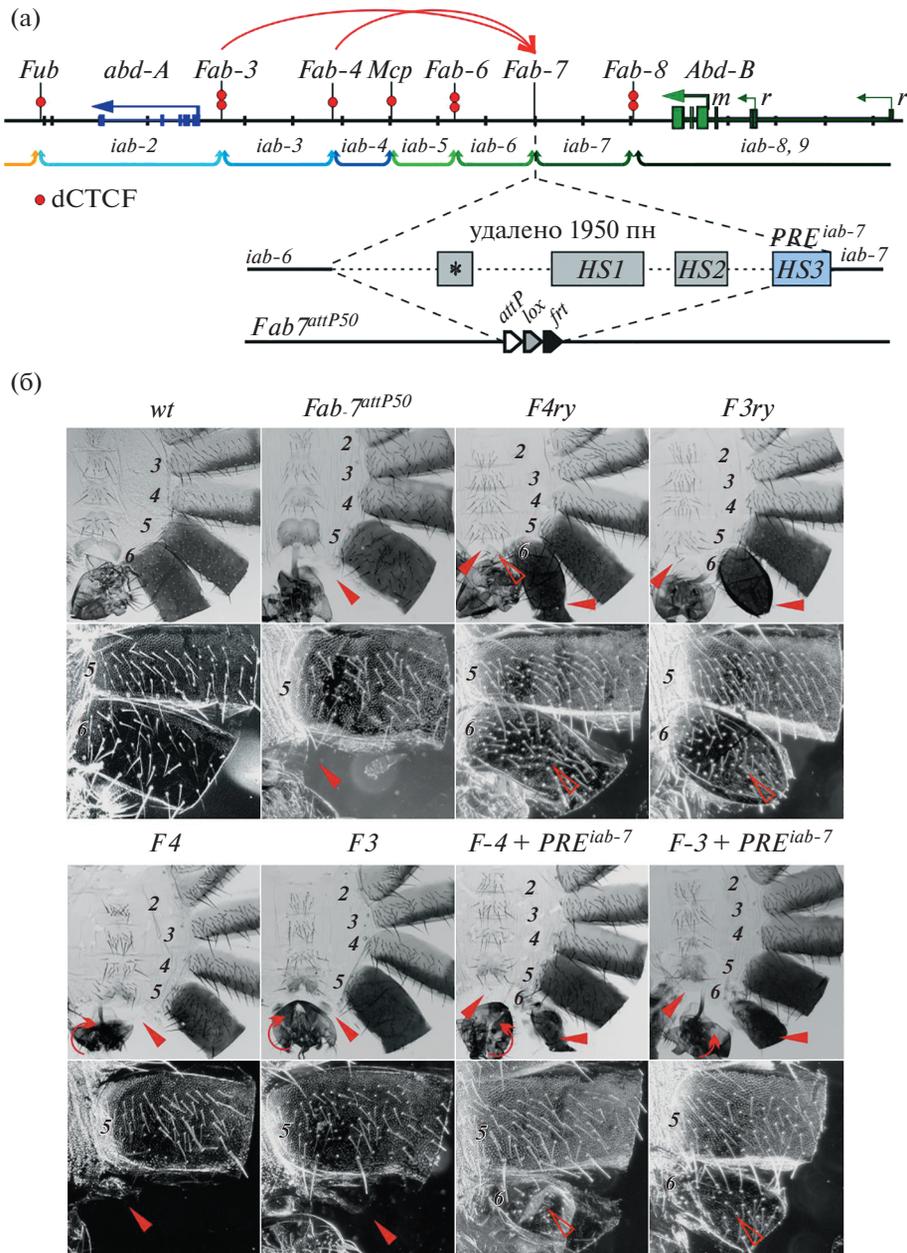


Рис. 1. (а) Схема регуляторной области генов *abd-A* и *Abd-B*. Синяя и зеленая стрелки представляют транскрипты генов *abd-A* и синие оттенки – регуляторная область гена *Abd-B* соответственно. Фигурными скобками обозначены *iab*-домены, содержащие сегмент-специфичные энхансеры (синие оттенки – регуляторная область гена *abd-A*, зеленые оттенки – регуляторная область гена *Abd-B*). Вертикальными черными линиями отмечены границы (*Fub*, *Fab-3*, *Fab-4*, *Msp*, *Fab-6*, *Fab-7* и *Fab-8*) регуляторных доменов *iab-2* – *iab-8,9*, которые ответственны за регуляцию генов и за дифференцировку сегментов Т3–А8. Сайты связывания dCTCF на границах показаны кружками красного цвета. Ниже показана карта области границы *Fab-7*, которая удалена в платформе *Fab-7^{attP50}* и заменена на сайты *attP*, *lox* и *frt*. Сайты гиперчувствительности, HS*, HS1 и HS2, показаны серыми прямоугольниками, а HS3, который является сайленсером *PRE^{iab-7}* – голубым. (б) Фотографии кутикулы брюшек самцов в светлом и темном поле: *wt* (*dukuï mun*), *Fab.7^{attP50}*, *F4ry*, *F3ry*, *F4*, *F3*, *F4+PRE^{iab-7}* и *F3+PRE^{iab-7}*. У взрослых самцов *wt* сегмент А7 отсутствует, стернит сегмента А6 имеет форму банана и лишен щетинок, а стернит А5 имеет четырехугольную форму и покрыт щетинками. Тергит А6 имеет трихомы (темное поле) только вдоль переднего и вентрального краев, в то время как весь тергит А5 почти полностью покрыт трихомами. У самцов *Fab.7^{attP50}* А6 отсутствует. Сегмент А6 линий *F3ry* и *F4ry* лишен стернита – частичное превращение в А7, но имеет деформированный тергит, однако распределение трихом указывает на частичную трансформацию в А5. В линиях *F3* и *F4* вновь наблюдается полное исчезновение А6. В случае *F4+PRE^{iab-7}* и *F3+PRE^{iab-7}* стернит отсутствует, а тергит заметно уменьшен в размерах, но имеет посторонние трихомы, что указывает на трансформацию в А5.

обладают свойствами инсуляторов на стадии имаго при исследовании в трансгенных линиях дрозофилы на модельных регуляторных системах генов *yellow* и *white* [14]. Однако четыре сайта dCTCF также не блокируют энхансеры генов *yellow* и *white*, но, находясь в регуляторной области гена *Abd-B* вместо границы *Fab-7*, эффективно изолируют домен *iab-6*, который обеспечивает формирование сегмента А6, от *iab-7*, отвечающий за лизис сегмента А7 у взрослых самцов мух [15, 16]. Поэтому можно ожидать, что фрагменты *F3* и *F4* также могут формировать границу в контексте ВХ-С. Для исследования этого вопроса была использована созданная ранее платформа *Fab-7^{attP50}*, в которой граница *Fab-7* заменена на сайты *attP* и *ftr* (рис. 1а) [17, 18]. Граница *Fab-7* состоит из четырех сайтов гиперчувствительности к ДНКзе I: HS* + HS1 + HS2, формирующие инсулятор, и HS3, считающийся сайленсером *PRE^{iab-7}* [10].

В линии *Fab-7^{attP50}* удалены все четыре сайта, что приводит к преждевременной эктопической активации домена *iab-7* инициатором *iab-6* во всех клетках PS11, в результате чего сегмент А6 у самцов лизируется (рис. 1б), а у самок трансформируется в А7. На основе плазмиды rBluKS были созданы конструкции, содержащие сайт *attB* для интеграции в нужное место генома по сайту *attP*, фрагменты *F3*, или *F4*, *ftr*-сайт для последующего вырезания репортера и последовательностей плазмиды, и репортерный ген *rosy* (*ry*), для отбора позитивных событий. Полученные конструкции были инъецированы в эмбрионы линии *ry^{Fab-7^{attP50}}*, которая на X-хромосоме содержит конструкцию, экспрессирующую интегразу *φC31* на стадии преblastодермы [18]. Выжившие мухи были скрещены с линией *uw; TM2/MKRS*, несущей мутации гена *ry*. Положительные события интеграции в платформу были отобраны по восстановлению окраски глаз трансгенным геном *ry* до дикого типа.

В результате были созданы линии: *F3 ry* и *F4 ry*. В обоих случаях наблюдалось слабое восстановление функций границы, что проявлялось неполным формированием сегмента А6: тергит был деформирован, а стернит либо не развивался, либо представлял собой небольшие островки клеток (рис. 1б). Характер распределения трихом на тергите и щетинки на остатках стернита свидетельствуют, что клетки А6 в этих линиях имеют спецификацию сегмента А5. Это свидетельствует о том, что в данных тканях происходит изоляция *iab-6* не только от *iab-7*, но и от промотора гена *Abd-B*. Однако после делеции *ry* в результате Flp-индуцированной рекомбинации между сайтами *ftr*, в линиях *F3* и *F4* происходили полный лизис сегмента А6 у самцов (рис. 1б) и превращение А6 в А7 у самок, что предполагает полную потерю инсуляции. Так как сам ген *ry* не формирует гра-

ницу между *iab-6* и *iab-7*, можно заключить, что в линиях *F3 ry* и *F4 ry* фрагменты *F3* и *F4* кооперируют с геном *ry* в формировании границы в отдельных клетках сегмента А6. Наиболее вероятно, что в этом процессе участвует промотор гена *ry*. Таким образом, исследуемые фрагменты *F3* и *F4* обладают очень слабой инсуляторной активностью. Важно отметить, что фрагменты *F3* и *F4*, встроенные вместо *Fab-7*, приводили к стерильности самцов и самок. В этой связи можно отметить, что половой аппарат гомозиготных самцов в обеих линиях повернут на 30–180°. Кроме того, как в линии *F3*, так и в линии *F4*, наблюдалось значительное снижение выживаемости гомозигот. При скрещивании гетерозиготных самок и самцов, находящихся на балансере *MKRS*, либо *TM2*, вместо ожидаемых в потомстве ~33% выжило не более 5% гомозигот с задержкой развития (вылуплялись гораздо позже по сравнению с диким типом), а при снижении температуры до +18°C гомозиготы как *F3*, так и *F4*, вообще не обнуживались.

Ранее для границ *Fab-6* и *Fab-7* было показано, что PRE, расположенные в доменах *iab-6* и *iab-7*, участвуют в формировании эффективных границ [19, 20]. Для исследования возможного участия PRE в активности границ регуляторной области *abd-A* были созданы конструкции, в которых к фрагментам *F3* и *F4* был добавлен *PRE^{iab-7}* (227 bp) (рис. 1а), и были получены трансгенные линии, в которых *Fab-7* был заменен на *F3+PRE^{iab-7}ry* и *F4+PRE^{iab-7}ry*. Однако в полученных линиях после вырезания *ry* по сайтам *ftr* полного восстановления границы между *iab-6* и *iab-7* не наблюдалось. Фенотип мух линий *F3+PRE^{iab-7}* и *F4+PRE^{iab-7}*, после вырезания *ry*, напоминал фенотип линий *F3 ry⁺* и *F4 ry⁺* (рис. 1б). Таким образом, *PRE^{iab-7}* лишь частично усиливает слабую инсуляторную активность фрагментов *F3* и *F4* в отдельных клетках сегмента А6.

Полученные результаты показывают, что сайты CTCF в составе 626 пн фрагмента *F3* и 784 пн фрагмента *F4* не формируют сильных инсуляторов, в отличие от содержащего два сайта связывания белка dCTCF 337 пн фрагмента границы *Fab-8*, который полностью блокировал взаимодействие между доменами *iab-6* и *iab-7* [15]. Эти результаты согласуются с выводами о том, что неизвестные архитектурные белки совместно с dCTCF участвуют в формировании сильных границ ВХ-С [13]. Можно предположить, что в районе *iab-3 – iab-4* сильные инсуляторы в составе границ не нужны, что связано с особенностями регуляции в этой области. В то же время замещение границы *Fab-7* фрагментами границ *Fab-3* или *Fab-4* негативно влияет на жизнеспособность и фертильность мух. Это может быть связано со способностью этих границ формировать неправильные контакты со

своими эндогенными копиями, что нарушает правильную работу генов *abd-A* и *Abd-B*. Это предположение требует дальнейшего исследования.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта РФФ проект № 19-14-00103.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kyrchanova O., Georgiev P. Mechanisms of Enhancer-Promoter Interactions in Higher Eukaryotes // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 2. P. 671.
2. Kantidze O.L., Razin S.V. Weak interactions in higher-order chromatin organization // *Nucleic Acids Res.* 2020. V. 48. № 9. P. 4614–4626.
3. Максименко О.Г., Фурсенко Д.В., Белова Е.В., и др. CTCF как пример ДНК-связывающих транскрипционных факторов, содержащих кластеры цинковых пальцев C2H2-типа // *Acta Naturae.* 2021. Т. 13. № 1. С. 31–46.
4. Kyrchanova O., Mogila V., Wolle D., et al. The boundary paradox in the Bithorax complex // *Mech. Dev.* 2015. V. 138. Pt 2. P. 122–132.
5. Maeda R.K., Karch F. The ABC of the BX-C: the bithorax complex explained // *Development.* 2006. V. 133. № 8. P. 1413–1422.
6. Bender W.W. Molecular Lessons from the *Drosophila* Bithorax Complex // *Genetics.* 2020. V. 216. № 3. P. 613–617.
7. Bowman S.K., Deaton A.M., Domingues H., et al. H3K27 modifications define segmental regulatory domains in the *Drosophila* bithorax complex // *Elife.* 2014. V. 31. № 3. P. e02833.
8. Savitsky M., Kim M., Kravchuk O., et al. Distinct Roles of Chromatin Insulator Proteins in Control of the *Drosophila* Bithorax Complex // *Genetics.* 2016. V. 202. № 2. P. 601–617.
9. Simon J., Chiang A., Bender W., et al. Elements of the *Drosophila* bithorax complex that mediate repression by Polycomb group products // *Dev. Biol.* 1993. V. 158. № 1. P. 131–144.
10. Mihaly J., Hogga I., Gausz J., et al. In situ dissection of the *Fab-7* region of the bithorax complex into a chromatin domain boundary and a Polycomb-response element // *Development.* 1997. V. 124. № 9. P. 1809–1820.
11. Kyrchanova O., Sabirov M., Mogila V., et al. Complete reconstitution of bypass and blocking functions in a minimal artificial *Fab-7* insulator from *Drosophila* bithorax complex // *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019. V. 116. № 27. P. 13462–13467.
12. Holohan E.E., Kwong C., Adryan B., et al. CTCF genomic binding sites in *Drosophila* and the organisation of the bithorax complex // *PLoS Genet.* 2007. V. 3. № 7. P. e112.
13. Kyrchanova O., Maksimenko O., Ibragimov A., et al. The insulator functions of the *Drosophila* polydactyl C2H2 zinc finger protein CTCF: Necessity versus sufficiency // *Sci. Adv.* 2020. V.25. № 6 (13) P. eaaz3152.
14. Ивлиева Т.А., Георгиев П.Г., Кырчанова О.В. Исследование новых границ в *bithorax* комплексе у *Drosophila melanogaster* на способность блокировать взаимодействие между энхансерами и промоторами // *Генетика.* 2011. Т. 47. № 9. С. 1184–1189.
15. Kyrchanova O., Mogila V., Wolle D., et al. Functional Dissection of the Blocking and Bypass Activities of the *Fab-8* Boundary in the *Drosophila* Bithorax Complex // *PLoS Genet.* 2016. V. 12. № 7. P. e1006188.
16. Postika N.E., Ivlieva T.A., Georgiev P.G., et al. Study of dCTCF Insulator Activity in *Drosophila melanogaster* Model Systems // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2019. V. 486. № 1. P. 187–191.
17. Wolle D., Cleard F., Aoki T., et al. Functional Requirements for *Fab-7* Boundary Activity in the Bithorax Complex // *Mol. Cell. Biol.* 2015. V. 35. № 21. P. 3739–3752.
18. Bischof J., Maeda R.K., Hediger M., et al. An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific ϕ C31 integrases // *PNAS.* 2007. V. 104. № 9. P. 3312–3317.
19. Kyrchanova O., Kurbidaeva A., Sabirov M., et al. The bithorax complex *iab-7* Polycomb response element has a novel role in the functioning of the *Fab-7* chromatin boundary // *PLoS Genet.* 2018. V. 14. № 8. P. e1007442.
20. Postika N., Schedl P., Georgiev P., et al. Mapping of functional elements of the *Fab-6* boundary involved in the regulation of the *Abd-B* hox gene in *Drosophila melanogaster* // *Sci. Rep.* 2021. V. 11. № 1. P. 4156.

FRAGMENTS OF THE *Fab-3* and *Fab-4* BOUNDARIES OF THE *Drosophila melanogaster* *Bithorax* complex, THAT INCLUDE CTCF SITES, ARE NOT EFFECTIVE INSULATORS

O. V. Kyrchanova^{a,*}, N. E. Postika^a, V. V. Sokolov^a, and Academician of the RAS P. G. Georgiev^a

^a Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

*e-mail: olgina73@gmail.com

The segment-specific regulatory domains of the *Bithorax* complex (BX-C), which consists of three homeotic genes *Ubx*, *abd-A* and *Abd-B*, are separated by boundaries that act as insulators. Most of the boundaries contain binding sites for the architectural protein CTCF, which is conserved for higher eukaryotes. As previously shown, the CTCF sites determine the insulator activity of the boundaries of the *Abd-B* regulatory region. In this work, it was shown that fragments of the *Fab-3* and *Fab-4* boundaries of the regulatory region *abd-A*, containing CTCF binding sites, are not effective insulators.

Keywords: insulators, dCTCF, regulatory domain, architectural proteins, *Abd-B*, *Fab-7*, *abd-A*