

УДК 577.214.6; 575.113.2

## ВЫСОКИЙ УРОВЕНЬ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНА НА СТАДИИ ЭМБРИОНА ПРИВОДИТ К ПОДАВЛЕНИЮ ЕГО ГЕТЕРОХРОМАТИНОВОЙ *транс*-ИНАКТИВАЦИИ У ВЗРОСЛЫХ ОСОБЕЙ *Drosophila melanogaster*\*.\*\*

© 2020 А.А. Солодовников, В.А. Гвоздев, С.А. Лавров\*\*\*

Институт молекулярной генетики РАН, 123182 Москва, Россия; электронная почта: slavrov@img.ras.ru

Поступила в редакцию 30.12.2019

После доработки 24.02.2020

Принята к публикации 24.02.2020

Перемещение гена в результате хромосомной перестройки из эухроматина к конститутивному гетерохроматину может сопровождаться эпигенетической инактивацией этого гена – *цис*-инактивацией. При гетерохроматиновой *транс*-инактивации происходит репрессия репортерных трансгенов в нормальной хромосоме под воздействием вызывающей *цис*-инактивацию гомологичной хромосомы с перестройкой. *Транс*-инактивация является результатом соматического спаривания гомологов и перемещения участка нормальной хромосомы в гетерохроматиновый компартмент ядра. Показано, что степень *транс*-инактивация репортерного гена *UAS-eGFP* под влиянием перестройки *In(2)A4* у взрослых мух зависит от уровня его транскрипции. В настоящей работе детально исследовали эпигенетическое наследование активного/репрессированного состояния *транс*-инактивируемого репортерного гена при разных уровнях экспрессии путем измерения уровня флуоресценции *eGFP* в отдельных клетках мальпигиевых сосудов взрослых мух. Было обнаружено, что высокий уровень экспрессии на эмбриональной стадии препятствует *транс*-инактивации *eGFP* у взрослых особей даже при низком уровне экспрессии на постэмбриональных стадиях развития.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** гетерохроматин, *Drosophila*, эффект положения, *транс*-инактивация, экспрессия, GAL4, GAL80<sup>ts</sup>.

DOI: 10.31857/S0320972520040077

Эффектами положения (ЭП) называются нарушения экспрессии генов, происходящие при изменении локализации генов в геноме без нарушения их нуклеотидной последовательности. Частным случаем ЭП является гетерохроматиновый эффект положения, при котором экспрессия эухроматиновых генов подавляется при их перемещении к конститутивному гетерохроматину. В результате хромосомной перестройки эухроматин вблизи новых эу-гетерохроматиновых границ приобретает свойства гетерохроматина (гетерохроматинизация), этот процесс может распространяться на большие рас-

стояния (сотни т.п.н.—миллион п.н.). При гетерохроматинизации в эухроматиновых районах появляются специфические для гетерохроматина белки (HP1a и другие) и модификации гистонов (H3K9me2/3) [1–3], что и приводит к нарушениям работы генов. При гетерохроматиновом ЭП гены могут инактивироваться лишь в части клеток на стадии эмбриона, при этом активное/репрессированное состояние способно эпигенетически наследоваться в клеточной линии, давая в результате мозаичную экспрессию в пределах одной ткани.

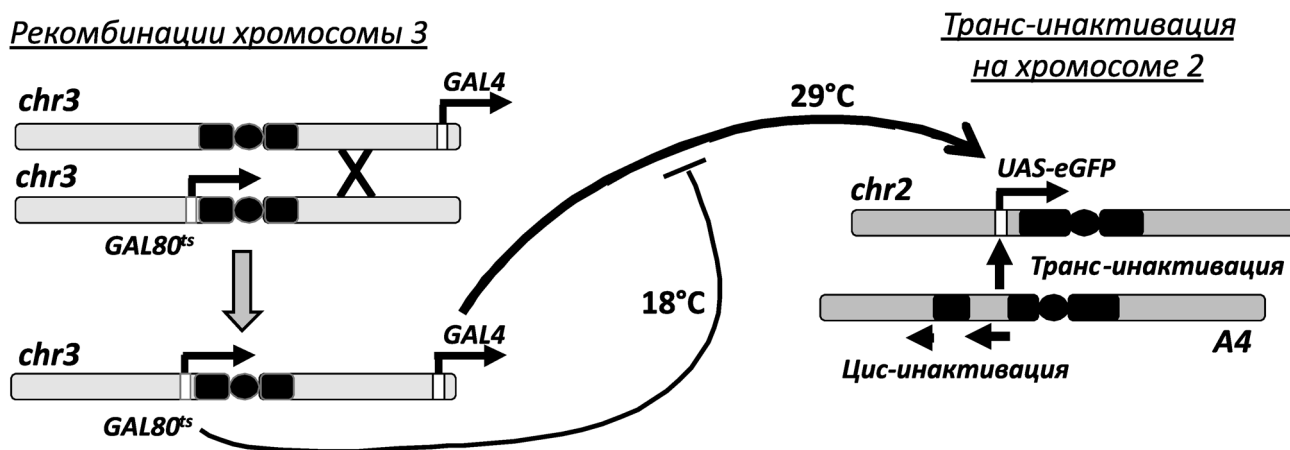
В некоторых случаях перестроенная хромосома с новыми эу-гетерохроматиновыми границами способна инактивировать гены нормальной неперестроенной хромосомы [4–6]. Это явление, *транс*-инактивация, не может быть объяснено распространением гетерохроматина вглубь эухроматина от новой границы и связано, по современным представлениям, с перемещением эухроматинового района в гетерохроматиновый компартмент ядра при соматическом спаривании нормальной хромосомы и гомологичной хромосомы с перестройкой. При *транс*-инактивации происходит формирование гете-

Принятые сокращения: *UAS-eGFP* – ген *eGFP* под контролем регуляторного элемента *UAS*, *A4* – хромосомная инверсия *In(2)A4*, ЭП – эффекты положения.

\* Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 4, 2020.

\*\* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM19-351, 13.04.2020.

\*\*\* Адресат для корреспонденции.



**Рис. 1.** Система контроля экспрессии репортерного гена. Хромосома 2 с перестройкой *A4* вызывает *транс*-инактивацию репортера *UAS-eGFP* в гомологичной нормальной хромосоме. Хромосома 3 получена путем рекомбинации и несет источники *GAL4* (*tubGal4*) и *GAL80<sup>ts</sup>* (*tubGal80<sup>ts</sup>*). Повышение температуры приводит к разрушению репрессора *GAL80<sup>ts</sup>*, повышению содержания активного *GAL4* и усилению транскрипции *UAS-eGFP*

рохроматина *de novo* в нормальной хромосоме [7–10].

Хромосомная инверсия *In(2)A4* (далее *A4*, рис. 1) вызывает *цис*-инактивацию генов рядом с новыми эу-гетерохроматиновыми границами и *транс*-инактивацию репортерных конструкций в гомологичной хромосоме [6, 9–12]. С целью изучения наследуемости эпигенетических состояний *транс*-инактивируемого гена в процессе развития, были получены мухи, содержащие репортерный ген *UAS-eGFP* в нормальной хромосоме 2, инверсию *A4* в гомологичной хромосоме и комбинацию трансактиватора *GAL4* и термочувствительной формы репрессора *GAL80* (*GAL80<sup>ts</sup>*) в хромосоме 3. Комбинация *GAL4* и *GAL80<sup>ts</sup>* позволяет регулировать экспрессию репортерного гена путем изменения температуры развития мух. Генетическая система была использована для исследования зависимости степени *транс*-инактивации репортерного гена у взрослых мух от уровня его экспрессии на разных стадиях развития. Показано, что высокий уровень экспрессии на эмбриональной стадии приводит к эпигенетически наследуемой в ходе дальнейшего развития устойчивости репортерного гена к *транс*-инактивации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Использованные в работе линии мух.** Линия  $w^{67c23}; In(2)A4/CyO$ , содержащая вызывающую *транс*-инактивацию хромосомную перестройку *In(2)A4* (*A4*), получена и исследуется в ОМГК ИМГ РАН [6].

Следующие линии получены из коллекции Bloomington («Bloomington *Drosophila* Stock

Center», США), номера линий соответствуют идентификаторам в коллекции: линия 7018 ( $w^*; sna^{ScO}/CyO; P\{tubP-GAL80^{ts}\}7$ ) содержит на хромосоме 3 источник белка *GAL80<sup>ts</sup>* под промотором *alphaTub84B* [13]; линия 5138 ( $y^1 w^*; P\{tubP-GAL4\}LL7/TM3 Sb^1 Ser^1$ ) содержит источник *GAL4* под промотором *alphaTub84B* [14].

Линия  $w^*; UAS-eGFP/CyO; P\{tubP-GAL4\}LL7; P\{tubP-GAL80^{ts}\}7/TM3 Sb^1 Ser^1$  содержит репортерный ген *UAS-eGFP* на хромосоме 2 [11] и регуляторные гены *GAL4* и *GAL80<sup>ts</sup>* на хромосоме 3. Хромосома 3 с *GAL4* и *GAL80<sup>ts</sup>* получена путем рекомбинации между линиями 7018 ( $w^*; sna^{ScO}/CyO; P\{tubP-GAL80^{ts}\}7$ ) и 5138 ( $y^1 w^*; P\{tubP-GAL4\}LL7/TM3 Sb^1 Ser^1$ ). Описание скрещиваний приведено в Приложении к статье.

**Влияние активации *eGFP* на разных стадиях развития на *транс*-инактивацию, регистрируемую у взрослых мух.** Для исследования зависимости степени *транс*-инактивации *eGFP* от уровня его экспрессии на разных стадиях развития было проведено скрещивание  $w^*; UAS-eGFP; GAL80^{ts} GAL4/TM3 Sb^1 Ser^1 \times w^*; In(2)A4/CyO; +/+$ . В потомстве от скрещивания появляются мухи четырех генотипов. Мухи  $w^*; UAS-eGFP/In(2)A4; GAL80^{ts} GAL4/+$  (опыт) и  $w^*; UAS-eGFP/CyO; GAL80^{ts} GAL4/+$  (контроль) содержат *GAL4* и *GAL80<sup>ts</sup>*, и при повышении температуры у них повышается экспрессия *eGFP*. В опыте *UAS-eGFP* подвергается *транс*-инактивации под влиянием *In(2)A4*, в контроле *транс*-инактивация отсутствует. Температуру развития особей варьировали, согласно представленным схемам (таблица и рис. 2, а).

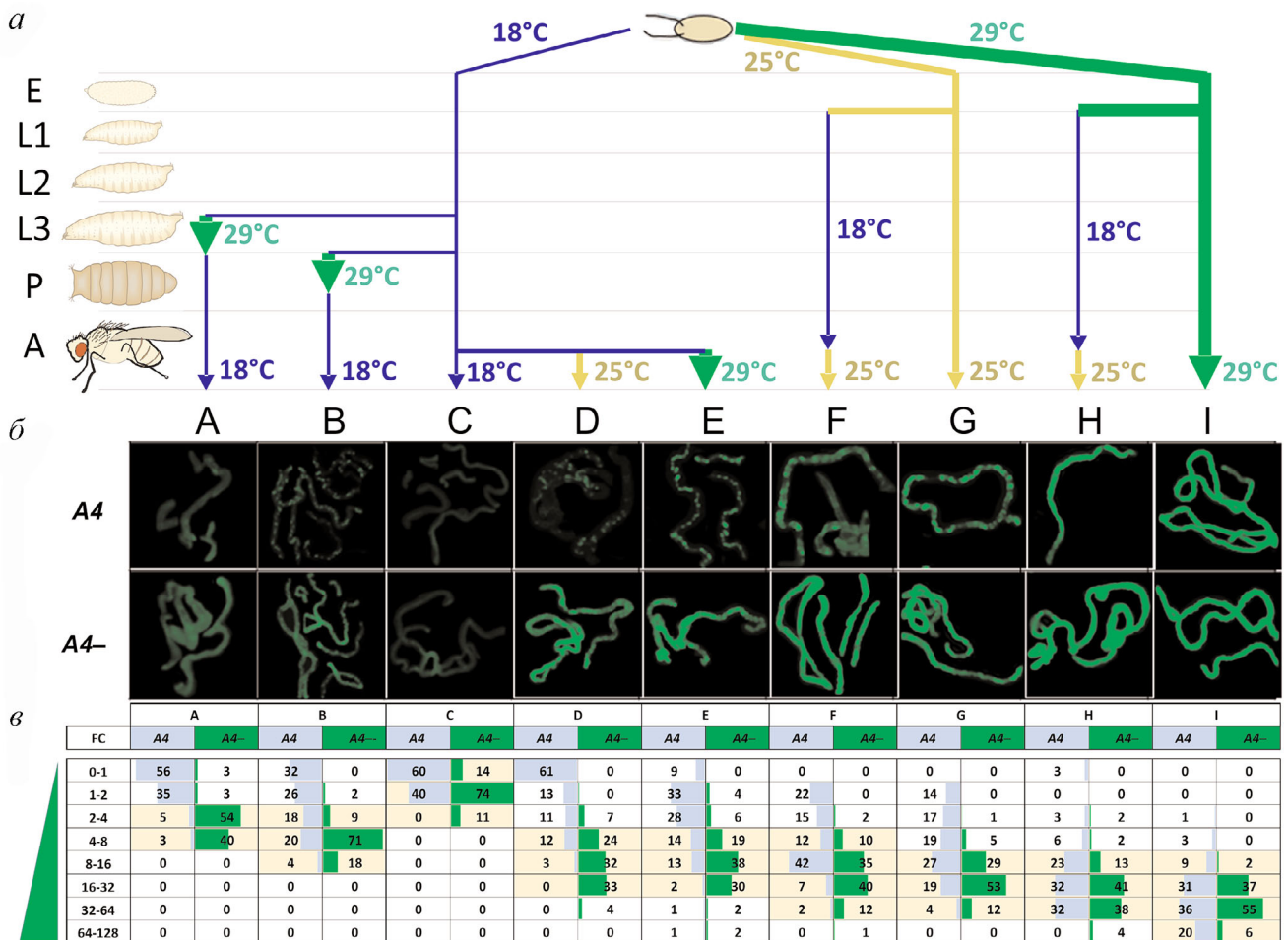
Флуоресценцию *eGFP* в отдельных клетках мальпигиевых сосудов анализировали у двухдневных взрослых самок. Причиной выбора

мальпигиевых сосудов, как объекта исследования, было то, что в мальпигиевых сосудах мозаичный ЭП был хорошо выражен, а морфология ткани (крупные изолированные клетки, формирующие однослойные трубки) существенно облегчала количественные измерения.

У мух *w\**; *UAS-eGFP/In(2)A4*; *TM3 Sb<sup>1</sup> Ser<sup>1</sup>/+* и *w\**; *UAS-eGFP/CyO*; *TM3 Sb<sup>1</sup> Ser<sup>1</sup>/+* отсутствует

активатор GAL4, и *eGFP* экспрессируется на уровне фона. Сравнение экспрессии *eGFP* при *транс*-инактивации (*UAS-eGFP/In(2)A4*) и без нее (*UAS-eGFP/CyO*) при разных температурах позволяет оценить влияние температуры непосредственно на *транс*-инактивацию.

**Измерения уровня флуоресценции *eGFP* в клетках мальпигиевых сосудов.** Изображения



**Рис. 2.** *Транс*-инактивация репортерного гена *UAS-eGFP* у взрослых мух после модуляции его экспрессии на разных стадиях развития. *а* – Схема вариантов температурных воздействий (от А до I) (см. также таблицу) в ходе развития мух *eGFP/A4*; *GAL80<sup>ts</sup> GAL4/+* (*A4*, *транс*-инактивация) и *eGFP/CyO*; *GAL80<sup>ts</sup> GAL4/+* (*A4-*, контроль). Е – эмбрионы, L1–L3 – личинки возрастов 1–3, Р – куколки, А – взрослые мухи). *б* – Флуоресценция *eGFP* в мальпигиевых сосудах мух с хромосомой *A4* и без нее (*A4-*, контроль). В вариантах В и D–G (*A4*) заметна существенная неравномерность флуоресценции от клетки к клетке, отражающая гетерохроматиновую *транс*-инактивацию. *в* – Распределение интенсивностей флуоресценции *eGFP* в клетках мальпигиевых сосудов у мух с *транс*-инактивацией (*A4*) и в контроле (*A4-*). Измеряли интенсивность флуоресценции в каждой клетке мальпигиевого сосуда и нормировали на модальный (встречающийся чаще всего) уровень флуоресценции в мальпигиевых сосудах мух *A4-* при 18 °С, принятый за единицу (столбец С, *A4-*). Полученные значения (FC, fold change) показывают во сколько раз уровень флуоресценции выше принятого за единицу. Весь диапазон уровней флуоресценции был разбит на поддиапазоны (указаны в крайнем левом столбце), и для каждого варианта обработки подсчитан процент клеток, попадающий в поддиапазон (цифры в ячейках). Желтым цветом выделен диапазон флуоресценции, в который попадает большинство клеток мальпигиевых сосудов у мух без *транс*-инактивации (*A4-*), т.е. нормальное значение флуоресценции при данном варианте температурной обработки. Величины достоверности различий между уровнями флуоресценции в каждом из вариантов (Р-величины) представлены в табл. S1 в Приложении, значения погрешностей – в табл. S2 и на рис. S1 в Приложении. С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>

## Измерение температуры развития, T °C

Вариант	Стадия						
	Эмбрион 0–24 ч	Личинка L1–L3	Личинка перед окукливанием 24 ч	Куколка 0–24 ч	Куколка 2 дня → вылупление	Взрослые 2 дня	Взрослые 48–72 ч
A	18	18	29	18	18	18	18
B	18	18	18	29	18	18	18
C	18	18	18	18	18	18	18
D	18	18	18	18	18	18	25
E	18	18	18	18	18	18	29
F	25	18	18	18	18	18	25
G	25	25	25	25	25	25	25
H	29	18	18	18	18	18	25
I	29	29	29	29	29	29	29

Использованные варианты изменений температуры на разных стадиях развития особей (к рис. 1). Пример (вариант B): развитие при 18 °C до окукливания, куколки развивались сутки при 29 °C, далее развитие продолжалось при 18 °C до взрослых двухдневных мух, у которых в клетках мальпигиевых сосудов оценивали уровни флуоресценции. L1–L3 – период личиночного развития (личинки первого, второго и третьего возраста).

мальпигиевых сосудов (рис. 2, б) были получены с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM6000 («Leica Microsystems», ФРГ), оснащенного камерой ORCA ER («Hamamatsu Photonics», Япония) и набором фильтров для детекции флуоресценции. Мальпигиевые сосуды извлекали в РВТ (1× PBS с 0,1% (v/v) Tween 20), инкубировали в РВТ с DAPI 15 мин при комнатной температуре и фотографировали. Все изображения получены при увеличении 5× и при одинаковых параметрах съемки (экспозиция, степень усиления, разрешение), экспозицию подбирали, избегая насыщения изображения на наиболее ярких образцах. Съемку проводили в каналах для GFP (488 нм) и DAPI (405 нм), изображения сохраняли в виде 16bit TIFF и обрабатывали в программе ImageJ, загружая изображения сосуда в каналах DAPI и GFP. Изображение ядер (DAPI) использовали для сегментации изображения (Инструмент Threshold). Полученный набор областей интереса (ROI) переносили на изображение с eGFP, для вычитания фона выделяли область, не содержащую объектов. Для набора областей измеряли площадь, модальную величину плотности изображения (значение, наблюдаемое в большинстве клеток), а также стандартное отклонение интенсивности пикселей в области и ее сферичность (Инструмент MultiMeasure в ImageJ). Полученные данные переносили в Excel, где проводили фильтрацию записей по площади (30–300 пикселей), величине стандартного отклонения (не более интенсивности области) и сферичности (>0,2). В итоге для каждого изображения было получе-

но ~100 записей измерений флуоресценции eGFP, соответствующих отдельным клеткам. Полученные результаты использовали для построения гистограмм распределений интенсивности флуоресценции eGFP и подсчета статистики в программах MS Excel и R (<https://cran.r-project.org/>). Результаты получены для двух независимых скрещиваний, для каждого генотипа и варианта температурной обработки анализировали 5–10 мух.

**Количественная ПЦР.** Выделение РНК из взрослых мух *w\**; *UAS-eGFP/In(2)A4*; *GAL80<sup>ts</sup> GAL4/+* (опыт), *w\**; *UAS-eGFP/CyO*; *GAL80<sup>ts</sup> GAL4/+* (контроль), *w\**; *UAS-eGFP/In(2)A4* (исследование влияния температуры выращивания непосредственно на *транс*-инактивацию), обратную транскрипцию и количественную ПЦР с праймерами к гену *eGFP* проводили, как описано ранее [11]. Количество мРНК *eGFP* нормировали на количество мРНК гена домашнего хозяйства *Rpl32*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Использованная в работе репортерная конструкция не содержит каких-либо функциональных элементов кроме *UAS-eGFP*, который без трансактиватора *GAL4* экспрессируется на низком уровне на всех стадиях развития мухи. Экспрессию *UAS-eGFP* можно менять при помощи активатора транскрипции *GAL4* и его термочувствительного репрессора *GAL80<sup>ts</sup>* [11]. Трансактиватор *GAL4* и репрессор *GAL80<sup>ts</sup>* на-



ходятся под контролем промоторов повсеместно активного альфа-тубулина, поэтому экспрессируются на сходном высоком уровне на всех стадиях развития. Репрессор GAL80<sup>ts</sup> блокирует активаторный домен GAL4 при 18 °С, но разрушается при повышении температуры, освобождая активатор GAL4 и приводя к увеличению экспрессии *eGFP* [13]. Понижение температуры приводит к накоплению активной формы GAL80<sup>ts</sup>, выключению GAL4 и понижению уровня экспрессии репортера. Процесс активации репортерного гена не требует запуска экспрессии GAL4, а определяется межбелковыми взаимодействиями GAL4 и GAL80<sup>ts</sup>, уже присутствующих в клетках. Таким образом, комбинация воздействия GAL4 и GAL80<sup>ts</sup> позволяет предсказуемо регулировать уровень экспрессии гена путем изменения температуры [11]. Использование *eGFP* в качестве репортерного гена позволяет наблюдать эффект положения *in vivo*, а измерение относительного уровня флуоресценции *eGFP* является прямым методом оценки уровня экспрессии и в целом коррелирует с количеством его мРНК (рис. S1 в Приложении). Проведенные ранее измерения количества мРНК *eGFP* при помощи ПЦР показали, что в образцах РНК из целых взрослых мух экспрессия репортерного гена при 18 °С возрастает в ~3 раза, при 25 °С – в ~50 раз и при 29 °С – в ~100 раз относительно мух без источника GAL4 (уровень фона) [11]. Уровни активации транскрипции *eGFP* при разных температурах у взрослых мух и на стадии эмбрионов сходны (неопубликованные данные). Экспрессия *eGFP* при 18 °С обозначается далее как слабая (~3 раза), при 25 °С – как умеренная (~50 раз) и при 29 °С – как сильная (~100 раз).

Использованная в работе генетическая система с рекомбинантной хромосомой 3, несущей оба регуляторных трансгена, представлена на рис. 1. У мух генотипа *UAS-eGFP/A4; GAL4 GAL80<sup>ts</sup>/+ (eGFP/A4)* репортерный ген *транс*-инактивируется под влиянием инверсии *A4*, а мухи *UAS-eGFP/CyO; GAL4 GAL80<sup>ts</sup>/+ (eGFP/+)*, лишённые хромосомы *A4*, служат контролем. В мальпигиевых сосудах взрослых мух *транс*-инактивация проявляется в появлении клеток со сниженным уровнем или отсутствием флуоресценции *eGFP* (рис. 2, б, варианты В, D–G).

Представляло интерес оценить устойчивость эпигенетического наследования состояния экспрессии гена, испытывающего гетерохроматинизацию, индуцированную гомологичной перестроенной хромосомой *A4*. Мы исследовали, как степень *транс*-инактивации у взрослых мух может зависеть от уровня экспрессии репортера (слабая, умеренная и сильная) на более ранних

стадиях развития, начиная с эмбриональной. Степень *транс*-инактивации репортера оценивали по уровню флуоресценции *eGFP* в отдельных клетках мальпигиевых сосудов взрослых мух при изменении уровня экспрессии репортера на разных стадиях развития. Общая схема вариантов температурных воздействий (варианты А–I) в ходе развития представлена на рис. 2, а и в таблице, а визуальная и количественная оценки интенсивности флуоресценции представлены, соответственно, на рис. 2, б и в. Значения Р-величин при попарном сравнении распределений интенсивностей флуоресценции и стандартные отклонения уровней флуоресценции между экспериментами приведены в табл. S1 и S2 и на рис. S2 в Приложении.

Для количественной оценки степени *транс*-инактивации уровни флуоресценции в отдельных клетках мальпигиевых сосудов в опыте (мухи *UAS-eGFP/A4, A4* на рис. 2, б, в) и контроле (мухи *UAS-eGFP/CyO, A4*– на рис. 2, б, в) были измерены и нормированы на принятый за единицу модальный (встречающийся чаще всего) уровень флуоресценции в мальпигиевых сосудах контрольных мух, развивавшихся при 18 °С (вариант С, *A4*–). Полученная величина показывает, во сколько раз уровень флуоресценции в образце больше принятого за единицу. На основании полученных данных для всех вариантов температурных обработок для опыта и контроля были построены гистограммы, отражающие процент клеток образца, попадающих в заданные диапазоны интенсивности флуоресценции. К примеру, в случае D (рис. 2, в) контрольные и опытные мухи развивались до взрослой стадии при 18 °С (слабая активация *eGFP*), затем у взрослых особей репортер был умеренно активирован при 25 °С перед измерением флуоресценции. При этом, при *транс*-инактивации (D, столбец *A4*) 61% клеток имеет уровень флуоресценции меньше или равный принятому за единицу, тогда как в контроле без *транс*-инактивации (D, столбец *A4*–) 89% клеток показывают уровень экспрессии, превышающий принятый за единицу, в 4–32 раза. Распределения интенсивностей флуоресценции в опыте и контроле практически не перекрываются, это пример сильной *транс*-инактивации под влиянием инверсии *A4*.

Анализ полученных данных позволяет сделать следующие заключения. Низкий уровень экспрессии репортера на ранних стадиях развития сопровождается его сильной *транс*-инактивацией у взрослых мух (варианты А–D), во всех случаях обнаруживается популяция клеток с флуоресценцией *eGFP* на уровне фона. При умеренной и сильной активации экспрессии на

стадии эмбриона у взрослых мух отсутствуют клетки с флуоресценцией *eGFP* на уровне фона (варианты **F–I**). При умеренной экспрессии в течение всего развития (25 °С, вариант **G**) ~45% клеток показывают *транс*-инактивацию *eGFP*, их уровень флуоресценции ниже минимального уровня флуоресценции в контроле. Сильная экспрессия *eGFP* в течение всего развития препятствует *транс*-инактивации в основной массе клеток, распределение уровней флуоресценции в опыте и контроле достоверно не отличаются (вариант **I**). Однако ~10% клеток содержат *транс*-инактивированный репортер и, что неожиданно, в ~10% клеток мух *UAS-eGFP/A4* уровень флуоресценции превышает максимальный уровень флуоресценции в контроле. Репрессированное состояние репортерного гена, установившееся на ранних стадиях развития, может быть преодолено путем сильной активации транскрипции. Так, в варианте **D** *eGFP* слабо экспрессируется на протяжении всего развития (18 °С) и затем умеренно активируется у взрослых мух (25 °С), тогда как в варианте **E** у взрослых мух репортер активируется сильно (29 °С). В итоге в случае **E** обнаруживается лишь девять процентов клеток с полной репрессией репортера по сравнению с вариантом **D**, где число таких клеток достигает 60%. Иными словами, при сильной активации транскрипции у взрослых мух до 80% клеток с *транс*-инактивированным *eGFP* начинают его активно экспрессировать (рис. 2, в, вариант **E**). При этом уровень флуоресценции в случае **E** у мух с *транс*-инактивацией был в целом ниже контрольного (*A4*–).

Сравнение вариантов развития **D**, **F** и **H** показало, что активация репортера на стадии эмбрионов приводит к формированию устойчивого в развитии активного эпигенетического импринтинга в присутствии хромосомы *A4*. На стадии эмбриона в варианте **D** *eGFP* активировался слабо (18 °С), в варианте **F** – умеренно (25 °С) и в варианте **H** – сильно (29 °С). Дальнейшее развитие во всех случаях проходило при 18 °С (слабая экспрессия репортера) вплоть до вылупления, после чего экспрессию репортера умеренно активировали (25 °С) для анализа степени *транс*-инактивации. Оказалось, что доли клеток мальпигиевых сосудов, в которых *eGFP* был репрессирован, существенно различались между вариантами. В случае **D** наблюдается сильный эффект положения (85% клеток с нарушенной активацией репортера), в случае **F** репрессию демонстрируют ~ 40% клеток, а в случае **H** – только 12% клеток. Сравнение вариантов **D**, **F** и **H** показывает, что для поддержания активного состояния хроматина (устойчивости к *транс*-инактивации) до стадии взрослых мух необхо-

дим высокий уровень экспрессии именно на эмбриональной стадии развития, тогда как на постэмбриональных стадиях активная транскрипция репортера необязательна.

Хорошо известно, что степень выраженности гетерохроматинового эффекта положения, как правило, снижается при повышении температуры в процессе развития [1, 3]. Поскольку в исследуемой нами системе уровень экспрессии репортерного гена регулировали путем изменения температуры, то такое воздействие могло влиять на степень *транс*-инактивации непосредственно, а не только через активацию экспрессии репортера с участием GAL4. Однако оценка с помощью количественной ПЦР не выявила заметных различий в содержании мРНК *eGFP* у мух *UAS-eGFP/A4*, лишенных источника GAL4 (*UAS-eGFP/A4; +/-*), развивавшихся при 18 °С и 29 °С (рис. S3 в Приложении). Также известно, что при ЭП зависимость репрессии от температуры развития особи варьирует в разных перестройках, иногда влияние температуры отсутствует [3, 15]. Представляется более вероятным, что наблюдаемое нами влияние уровня экспрессии репортерного гена на степень его *транс*-инактивации обусловлено именно активацией транскрипции с участием GAL4.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследования репрессии генов при гетерохроматиновом эффекте положения в ходе индивидуального развития были ранее проведены в ряде работ [16–19]. В двух из них [18, 19] изучали поведение репортерной конструкции, содержащей *UAS-eGFP* (а также другие функциональные элементы), под влиянием гетерохроматина, причем в работе Sage et al. [19] исследовали именно *транс*-действующий эффект положения.

В работе Ahmad et al. [18] была использована репортерная конструкция, содержащая гены *GFP* (под контролем UAS) и *mini-white*. Конструкция подвергалась ЭП, а экспрессия *GFP* могла быть запущена на разных стадиях развития при помощи источников GAL4 под ткане- или стадия-специфичным промотором. Анализировались глазные имагинальные диски у личинок и глаза взрослых мух. Было показано, что сильная активация экспрессии репортерного гена *GFP* на стадии эмбриона (драйвер GAL4 под актиновым промотором) приводит к супрессии ЭП, однако при активации экспрессии в меньшей степени (GAL4 под контролем слабого, но активного в большинстве тканей и на всех стадиях развития промотора гена *armadillo*, *arm*) эффект положения сохраняется. ЭП наблюдали

также при активации транскрипции на постэмбриональных стадиях развития. Дерепрессию репортерного гена (появление экспрессирующих *GFP* клеток) наблюдали в процессе дифференцировки имагинальных дисков у личинок, причем дерепрессия происходила как в делящихся, так и в уже дифференцированных клетках. Это наблюдение означает, что для реактивации репрессированного при ЭП гена не требуется прохождения клеточного цикла.

В работе Sage et al. [19] была исследована *транс*-инактивация репортерной конструкции, содержащей *UAS-eGFP* и *mini-white*, под влиянием аллеля *Bw<sup>D</sup>* на соседней хромосоме. *Bw<sup>D</sup>* представляет собой вставку сателлитной ДНК в ген *Brown*. Экспрессию *UAS-eGFP* активировали при помощи источников GAL4 под контролем промоторов разной силы и специфичности (в том числе актина и *arm*, как и в работе Ahmad et al. [18]), а затем анализировали степень *транс*-инактивации репортера в тканях личинок 3 возраста и у взрослых мух. *Транс*-инактивация *UAS-eGFP* в данной работе демонстрировала заметную тканеспецифичность и наблюдалась в тех случаях, когда экспрессия репортерного гена была на низком уровне на стадиях развития, предшествующих исследованным (личинки 3 возраста и взрослые мухи).

Анализ полученных в ранних работах данных позволяет отметить следующие общие особенности проявления инактивации генов, общие для *цис*- и *транс*-действующего гетерохроматинового ЭП в процессе развития. Репрессия при ЭП начинается со стадии гастрюляции у эмбриона. Если ген экспрессируется на высоком уровне, начиная со стадии эмбриона (высокий уровень обеспечивает, к примеру, промотор актина), то такой ген устойчив к ЭП. Если ген экспрессируется, начиная со стадии эмбриона на низком/среднем уровне (уровень промотора *arm*), то он может быть репрессирован. Также репрессируются гены, экспрессия которых включается на постэмбриональных стадиях развития. Ген, репрессированный на ранних этапах развития, может реактивироваться на более поздних стадиях (обычно в ходе метаморфоза). Реактивация не требует прохождения цикла клеточного деления [18, 19].

Используемая нами система позволяла предсказуемо и количественно регулировать уровень экспрессии репортера [11], тогда как источники GAL4, применяемые для активации транскрипции в ранних работах, имели лишь качественно охарактеризованные профили экспрессии в ходе развития в разных типах тканей. Кроме того, *транс*-инактивацию детектировали в одном типе ткани (мальпигиевых сосудах

взрослых мух). Мальпигиевые сосуды формируются из эктодермы и мезодермы на стадиях 5–13 развития эмбриона, клеточные деления заканчиваются на стадии 13, далее число клеток не меняется. Мальпигиевые сосуды не подвергаются гистолузу в ходе метаморфоза [20]. Политенные хромосомы в ядрах клеток мальпигиевых сосудов в ходе развития проходят до 8 циклов эндорепликации ДНК без цитокинеза и могут содержать до 256-ти сестринских хроматид [21]. Мальпигиевые сосуды состоят из терминально-дифференцированных клеток и схожи с клетками слюнных желез, но в отличие от последних сохранены у взрослых мух.

Согласно нашим данным, *транс*-инактивация репортерного гена под влиянием инверсии *A4* демонстрирует свойства, обнаруженные в упомянутых выше более ранних работах и отражающие, видимо, характерные черты гетерохроматиновой репрессии в целом. Так, на стадии эмбриона экспрессия *UAS-eGFP* на высоком уровне супрессирует наблюдаемую у взрослых мух *транс*-инактивацию. При 100× повышении экспрессии репортера на стадии эмбриона *транс*-инактивация у взрослых мух достоверно не наблюдалась, но при активации в 30–50 раз репрессия была хорошо выражена. При активации в 100 раз уровень экспрессии *eGFP* составлял ~17% от уровня экспрессии гена домашнего хозяйства *Rpl32* [11]. Это наблюдение позволяет предполагать, что гены, экспрессирующиеся на сходных или более высоких уровнях на стадии эмбриона, не будут подвергаться гетерохроматиновой репрессии. В двух работах, в которых исследовали уровень транскрипции генов при *цис*-действующем ЭП [9, 22], было обнаружено, что гетерохроматиновой репрессии подвергается лишь несколько генов из десятков, находящихся в области распространения эффекта положения. Достаточно высокий уровень транскрипции этих генов на эмбриональной стадии может служить объяснением этого наблюдения.

В случаях *транс*-инактивации эпигенетический эффект ассоциируется с изменениями внутриядерной локализации репортерного гена. Ранее было показано [7–9, 23], что репрессия сопровождается переносом гена в гетерохроматиновый компартмент ядра, и наоборот, сохранение активного состояния приводит к локализации гена в эухроматине. Локальная активация *UAS-eGFP* может приводить к нарушению спаривания *транс*-инактивируемого района нормальной хромосомы с инверсией и к переносу области расположения репортерного гена в эухроматиновый компартмент ядра. Представляет интерес при помощи FISH-гибридизации сравнить локализацию малоактивного и активированного



в 100 раз репортера в отдельных клетках мальпигиевых сосудов политенных хромосом, демонстрирующих разную степень *транс*-инактивации.

Мы обнаружили, что установившуюся на стадии эмбриона *транс*-инактивацию репортера можно преодолеть сильной активацией транскрипции у молодых взрослых мух (рис. 2, б, вариант Е, А4). Температурный уровень для активации экспрессии совпадает с тем, который необходим для предотвращения *транс*-инактивации на стадии эмбриона. По-видимому, достигается пороговый уровень экспрессии репортера, при котором гетерохроматинизированное состояние в районе гена становится нестабильным, не формируется у эмбрионов и разрушается у взрослых мух. Так как мальпигиевые сосуды представляют собой неделиющуюся терминально дифференцированную ткань, то изменение организации хроматина/положения в ядре репортера при реактивации достигается без прохождения клеточного деления и в политенизированных ядрах.

При сильной активации репортера на протяжении всего развития (29 °С) на фоне инверсии А4 до ~10% клеток мальпигиевых сосудов демонстрируют уровень флуоресценции более высокий, чем в контроле (рис. 2, вариант I). Это означает, что гетерохроматиновое окружение может поддерживать высокий уровень экспрессии и, более того, усиливать транскрипцию. Представляется, что гетерохроматин не является неспецифическим репрессором эухроматиновых генов — часть из них может вести себя аналогично генам гетерохроматина, демонстрирующим высокий уровень транскрипции именно в гетерохроматиновом окружении. Можно предположить, что гиперактивированные репортерные гены локализуются в гетерохроматиновом компартменте ядра, а по организации хроматина похожи на сильно экспрессирующиеся гетеро-

хроматиновые гены, то есть включают как маркеры гетерохроматина (HP1a и H3K9me2/3), так и маркеры активной транскрипции, например, H3K4me3 [24].

В настоящей работе мы продемонстрировали возможность исследования эпигенетически наследуемых изменений экспрессии генов при гетерохроматиновой *транс*-инактивации в генетической системе, в которой осуществляли контролируемое изменение экспрессии гена-репортера в процессе развития и следили за наследованием этого состояния у взрослых особей, выключая индуктор транскрипции. Обнаружено, что сильная активация экспрессии гена на стадии эмбриона приводит к переключению репрессированного состояния на активное у взрослых мух. Предложенная в работе генетическая система может быть использована для дальнейших исследований гетерохроматинового эффекта положения, включая выявление новых генов, вовлеченных в процессы эпигенетического наследования, а также механизмов установления гетерохроматиновой репрессии.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-20178) в части синтеза генотипов мух с регулируемой *транс*-инактивацией с дальнейшим использованием в исследованиях и Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 17-04-01984 А и № 17-00-00282 КОМФИ) в части молекулярно-биологических экспериментов и биоинформационного анализа полученных данных.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Elgin, S. C., and Reuter, G. (2013) Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila*, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a017780, doi: 10.1101/cshperspect.a017780.
2. Weiler, K. S., and Wakimoto, B. T. (1995) Heterochromatin and gene expression in *Drosophila*, *Annu. Rev. Genet.*, **29**, 577-605, doi: 10.1146/annurev.ge.29.120195.003045.
3. Spofford, J. B., (1976) Position-effect variegation in *Drosophila*, in *The Genetics and Biology of Drosophila*, Academic press. p. 955.
4. Csink, A. K., Bounoutas, A., Griffith, M. L., Sabl, J. F., and Sage, B. T. (2002) Differential gene silencing by trans-heterochromatin in *Drosophila melanogaster*, *Genetics*, **160**, 257-269.
5. Martin-Morris, L. E., Csink, A. K., Dorer, D. R., Talbert, P. B., and Henikoff, S. (1997) Heterochromatic trans-
6. Abramov Ю. А., Кибанов М. В., Гвоздев В. А., Лавров С. А. (2011) Генетический и молекулярный анализы явления *транс*-инактивации генов у *Drosophila melanogaster*, обусловленного эу-гетерохроматиновой перестройкой гомологичной хромосомы, *Доклады Академии Наук*, **437**, 261-265.
7. Thakar, R., and Csink, A. K. (2005) Changing chromatin dynamics and nuclear organization during differentiation in *Drosophila* larval tissue, *J. Cell Sci.*, **118**, 951-960, doi: 10.1242/jcs.01684.
8. Thakar, R., Gordon, G. and Csink, A. K. (2006) Dynamics and anchoring of heterochromatic loci during development, *J. Cell Sci.*, **119**, 4165-4175, doi: 10.1242/jcs.03183.



9. Abramov, Y. A., Shatskikh, A. S., Maksimenko, O. G., Bonaccorsi, S., Gvozdev, V. A., and Lavrov, S. A. (2016) The differences between *cis*- and *trans*-gene inactivation caused by heterochromatin in *Drosophila*, *Genetics*, **202**, 93-106, doi: 10.1534/genetics.115.181693.
10. Shatskikh, A. S., Abramov, Y. A. and Lavrov, S. A. (2017) Trans-inactivation: repression in a wrong place, *Fly (Austin)*, **11**, 96-103, doi: 10.1080/19336934.2016.1225634.
11. Shatskikh, A. S., Olenkina, O. M., Solodovnikov, A. A., and Lavrov, S. A. (2018) Regulated gene expression as a tool for analysis of heterochromatin position effect in *Drosophila*, *Biochemistry (Moscow)*, **83**, 542-551, doi: 10.1134/S0006297918050073.
12. Лавров С. А., Шацких А. С., Кибанов М. В., Гвоздев В. А. (2013) Транскрипционная инактивация генов при эффекте положения у *D. melanogaster* коррелирует на уровне отдельных клеток с их перемещением в гетерохроматиновый компартмент ядра, *Молекулярная биология*, **47**, 1-6.
13. Mcguire, S. E., Le, P. T., Osborn, A. J., Matsumoto, K., and Davis, R. L. (2003) Spatiotemporal rescue of memory dysfunction in *Drosophila*, *Science*, **302**, 1765-1768, doi: 10.1126/science.1089035.
14. Lee, T., and Luo, L. (1999) Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis, *Neuron*, **22**, 451-461, doi: 10.1016/s0896-6273(00)80701-1.
15. Lloyd, V. K., Dymont, D., Sinclair, D. A., and Grigliatti, T. A. (2003) Different patterns of gene silencing in position-effect variegation, *Genome*, **46**, 1104-1117, doi: 10.1139/g03-070.
16. Lu, B. Y., Bishop, C. P., and Eissenberg, J. C. (1996) Developmental timing and tissue specificity of heterochromatin-mediated silencing, *EMBO J.*, **15**, 1323-1332.
17. Weiler, K. S., and Wakimoto, B. T. (1998) Chromosome rearrangements induce both variegated and reduced, uniform expression of heterochromatic genes in a development-specific manner, *Genetics*, **149**, 1451-1464.
18. Ahmad, K., and Henikoff, S. (2001) Modulation of a transcription factor counteracts heterochromatic gene silencing in *Drosophila*, *Cell*, **104**, 839-847.
19. Sage, B. T., Wu, M. D. and Csink, A. K. (2008) Interplay of developmentally regulated gene expression and heterochromatic silencing in trans in *Drosophila*, *Genetics*, **178**, 749-759, doi: 10.1534/genetics.107.083105.
20. Gautam, N. K., Verma, P., and Tapadia, M. G., (2017) *Drosophila* malpighian tubules: a model for understanding kidney development, function, and disease, in *Kidney Development and Disease*, (R.K. Miller, Editor.), Springer International Publishing: Cham, pp. 3-25.
21. Lamb, M. J. (1982) The DNA content of polytene nuclei in midgut and Malpighian tubule cells of adult *Drosophila melanogaster*, *Wilhelm Roux's archives of developmental biology*, **191**, 381-384, doi: 10.1007/bf00879628.
22. Vogel, M. J., Pagie, L., Talhout, W., Nieuwland, M., Kerkhoven, R. M., and Van Steensel, B. (2009) High-resolution mapping of heterochromatin redistribution in a *Drosophila* position-effect variegation model, *Epigenetics Chromatin*, **2**, 1, doi: 10.1186/1756-8935-2-1.
23. Harmon, B., and Sedat, J. (2005) Cell-by-cell dissection of gene expression and chromosomal interactions reveals consequences of nuclear reorganization, *PLoS Biol.*, **3**, e67, doi: 10.1371/journal.pbio.0030067.
24. Saha, P., Sowpati, D. T. and Mishra, R. K. (2019) Epigenomic and genomic landscape of *Drosophila melanogaster* heterochromatic genes, *Genomics*, **111**, 177-185, doi: 10.1016/j.ygeno.2018.02.001.

**THE HIGH LEVEL OF GENE TRANSCRIPTION AT THE EMBRYO STAGE  
LEADS TO THE SUPPRESSION OF ITS HETEROCHROMATIC  
*trans*-INACTIVATION IN *Drosophila melanogaster* ADULTS\*,\*\***

**A. A. Solodovnikov, V. A. Gvozdev, and S. A. Lavrov\*\*\***

*Institute of Molecular Genetics of the Russian Academy of Sciences,  
123182 Moscow, Russia; E-mail: slavrov@img.ras.ru*

Received December 30, 2019

Revised February 24, 2020

Accepted February 24, 2020

The movement of the gene as a result of chromosomal rearrangement from euchromatin to constitutive heterochromatin in some cases is accompanied by epigenetic inactivation of this gene - *cis*-inactivation. In the case of *trans*-inactivation, the transgenes in the normal chromosome are repressed by the *cis*-inactivation-causing homologous rearranged chromosome. *Trans*-inactivation is the result of somatic pairing of homologs and movement of the normal chromosome region into the heterochromatic compartment of the nucleus. Previously, we showed that the degree of *trans*-inactivation of the *UAS-eGFP* reporter gene in adult flies depends on the level of its transcription, which was regulated by temperature changes on the background of GAL4 transcription activator and GAL80<sup>ts</sup> temperature-sensitive inhibitor presenting in the same genome. In this paper we investigated in detail the epigenetic inheritance of the active/repressed state of the *trans*-inactivated reporter gene at different expression levels by measuring the fluorescence level of eGFP in individual cells of Malpighian tubes in adult flies. It was found that the high level of expression at the embryonic stage protects the eGFP gene from *trans*-inactivation in adults, and the activated state is inherited in the continuation of the entire development and differentiation while the activating effect of GAL4 is turned off.

**Keywords:** heterochromatin, *Drosophila*, PEV, *trans*-inactivation, expression, GAL4, GAL80<sup>ts</sup>