

УДК 575.22:595.773.4

ГЕН *PIRAGUA* НЕ ЯВЛЯЕТСЯ ВАЖНЫМ ДЛЯ РАЗВИТИЯ ДРОЗОФИЛЫ

© 2021 г. В. В. Соколов^{1,*}, академик РАН П. Г. Георгиев¹, О. В. Кырчанова¹

Поступило 30.07.2021 г.
После доработки 03.09.2021 г.
Принято к публикации 03.09.2021 г.

Белки с кластерами доменов цинковых пальцев C_2H_2 -типа (C_2H_2 -белки) являются наиболее обширным классом транскрипционных факторов высших эукариот. На N-конце большой группы C_2H_2 -белков членистоногих были найдены домены ZAD (zinc finger-associated domain), основной функцией которых является формирование гомодимеров. Одним из таких белков является белок Fu2, кодируемый геном *piragua*. С помощью метода CRISPR/Cas9 была получена делеция гена, не имеющая фенотипического проявления. С помощью фC31-зависимой *attP/attB* сайт-специфической интеграции была получена трансгенная линия, экспрессирующая белок Fu2 с HA эпитопом, что позволит в дальнейшем провести детальное исследование распределения сайтов связывания и функций белка.

Ключевые слова: ZAD-домен, цинковые пальцы C_2H_2 , архитектурные белки, регуляция транскрипции
DOI: 10.31857/S2686738921060147

ДНК-связывающие белки с кластерами доменов цинковые пальцы типа Cys2His2 (ZF- C_2H_2) являются самой распространенной группой транскрипционных факторов у высших эукариот [1]. К этой группе относится хорошо описанный C_2H_2 -белок млекопитающих, CTCF, который выполняет ключевую роль в формировании архитектуры хромосом [2]. У дрозофилы был описан его гомолог, dCTCF, а также ряд других C_2H_2 -белков, названных архитектурными, которые участвуют в формировании регуляторных элементов, и могут поддерживать специфичные дистанционные взаимодействия между ними [2, 3]. Обычно для специфичного связывания с мотивами из 12–15 пн архитектурные белки используют 4–5 ZF- C_2H_2 [2]. У членистоногих значительная часть C_2H_2 -белков содержит на N-конце ZAD-домен, который обеспечивает гомодимеризацию [4, 5]. Белки с ZAD-доменами составляют примерно одну треть от общего числа C_2H_2 -белков и одну десятую часть от всех ТФ в геноме *D. melanogaster* [6]. К настоящему моменту изучены функции только небольшой части белков ZAD- C_2H_2 , большинство из которых экспрессируются в процессе оогенеза и в раннем эмбриогенезе [4].

Ген *piragua* (другое название *fu2*, CG9233) кодирует ДНК-связывающий транскрипционный фактор Fu2, который содержит N-концевой ZAD-домен и два кластера доменов из 6 и 3 ZF- C_2H_2 , разделенных 40 аминокислотами [7] (рис. 1a).

По структуре Fu2 можно отнести к классу архитектурных белков. Ранее с помощью мутагеназа, опосредованного мобилизацией Р-элемента, были получены мутации *piragua*, которые значительно снижали количество белка Fu2 и приводили к летальности на разных стадиях развития от эмбриогенеза до 1–2 стадии личинки [7]. Был сделан вывод, что Fu2 нужен в процессе формирования имагинальных дисков и кутикулы. Данные, полученные методом РНК-интерференции [8], указывают на роль данного белка в клеточной конкуренции, опосредованной *flower*. РНК-интерференция под контролем драйвера *pnr* приводила к нехватке щетинок, дефектам пигментации и куколочной смерти [9].

Основной целью настоящего исследования является делеция гена *piragua*, что позволит исследовать роль белка Fu2 *in vivo* и тагировать (т.е., получить линию мух, экспрессирующую белок, слитый с удобным для исследователя эпитопом) Fu2 для картирования его сайтов связывания. С этой целью был использован подход, который включает удаление гена *piragua* с заменой его на сайт *attP* с помощью системы CRISPR/Cas9 [11] и последующей фC31-зависимой *attP/attB* сайт-

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

*e-mail: vladimir.sokolov.v.93@gmail.com

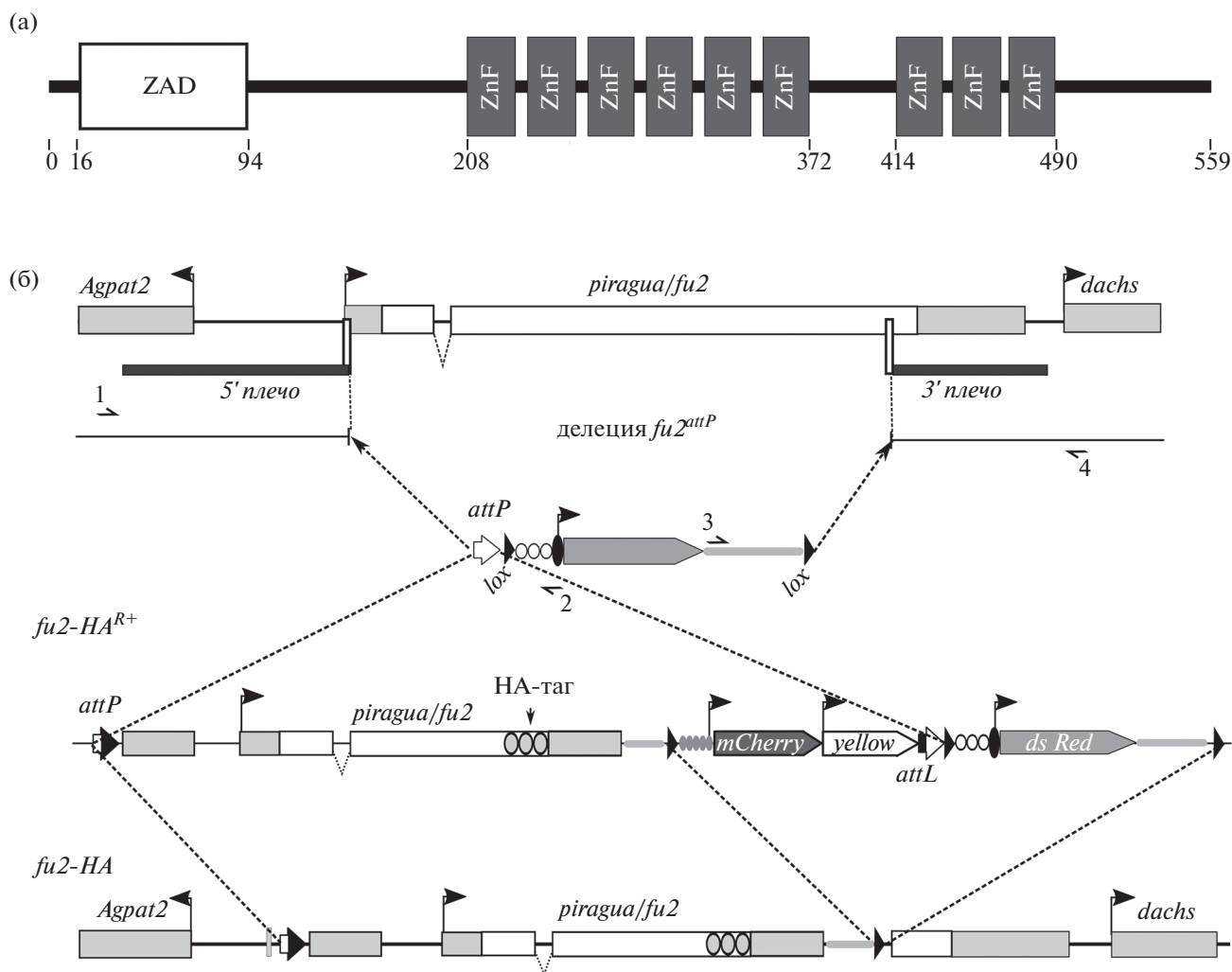


Рис. 1. Стратегия замены гена *piragua* на его тагированную копию. (а) Структура белка Fu2. ZAD-домен обозначен белым прямоугольником, цинковые пальцы типа C₂H₂ (ZF) обозначены черными прямоугольниками. Цифрами обозначены координаты доменов в аминокислотах. (б) Схема геномного локуса *piragua* и получения линий *fu2^{attPR+}* и *fu2-HA*. Кодированные участки гена *piragua* обозначены белыми прямоугольниками, серыми прямоугольниками отмечены некодирующие участки генов. Черными флажками обозначены промоторы генов. Узкими вертикальными белыми прямоугольниками отмечены CRISPR-мишени. Черными горизонтальными прямоугольниками обозначены фрагменты, использованные в качестве плеч для гомологичной рекомбинации. Черным овалом обозначен промотор *hsp70*. Три белых кружка обозначают сайты связывания рахб. Белой, серой и темно-серой пятиугольной стрелкой обозначены соответственно маркерные гены *yellow*, *dsRed* и *mCherry*. Серой горизонтальной полоской обозначен терминатор SV40. Черными треугольниками обозначены *lox*-сайты. Белой горизонтальной стрелкой обозначен *attP*-сайт, комбинации белой и черной стрелок соответствуют рекомбинантным *attP/attB*. Серыми кругами обозначен промотор *glass*. Серыми кругами с черным контуром обозначен HA-таг. Черными полустрелками обозначены праймеры, использованные для проверки делеции: 1 – Fu2GRdir, 2 – H70rev, 3 – Sv40RT, 4 – Fu2GRr.

специфической интеграцией тагированной копии гена [12]. Гидовые РНК были выбраны с использованием “CRISPR optimal target finder” [12] таким образом, чтобы удалить последовательности всего гена, не затрагивая регуляторные области окружающих генов: 5' tcgactatcgtgtagat – 2 пн от точки старта транскрипции гена *piragua*, и 3' ctgccgagggacgcactagc – в 94 пн (32 кодонах) ниже стоп-кодона (рис. 1б). Гидовые последовательности клонировали в плазмиду *pCFD4-*

U6:1_U6:3tandemgRNAs plasmid (Addgene # 49411). В качестве основы для клонирования плазмиды-донора использовали вектор *pHD-DsRed*, полученный от К. О’Connor-Giles (Addgene no. 51434). Данный вектор содержит сайт *attP* и репортерный ген *dsRed*, фланкированный *lox*-сайтами. *dsRed*, кодирующий красный флуоресцентный белок, находится под минимальным промотором *hsp70*, усиленным тремя сайтами связывания белка рахб, который активирует промотор в глазах. По-

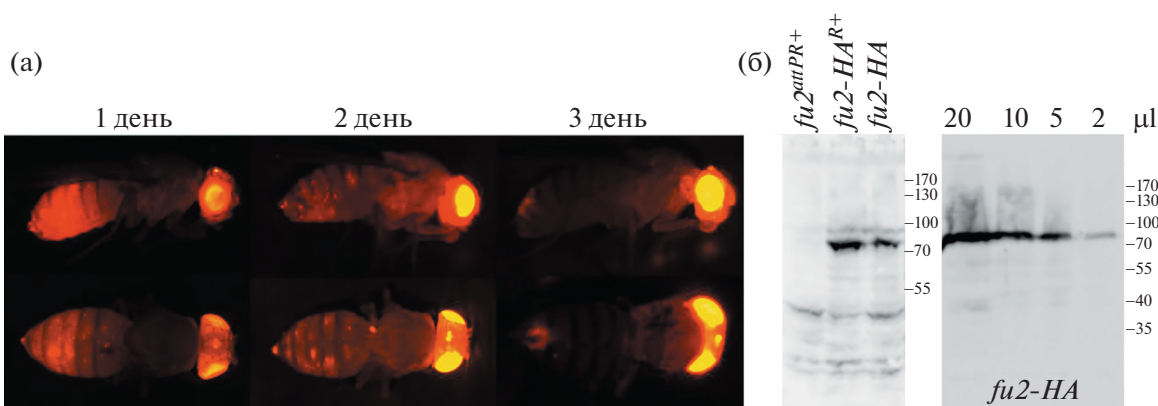


Рис. 2. (а) Флуоресценция мух линии *fu2^{antPR+}*. У молодых мух наблюдается интенсивная флуоресценция в 4 и следующих брюшных сегментах. Со временем она угасает, и остается слабая флуоресценция участка в 6–7 сегменте брюшка. Снимки получены на микроскопе Leica. (б) Экспрессия тагированного белка Fu2-НА. Слева показан вестерн-блот белковых экстрактов, выделенных из мух линий *fu2^{antPR+}*, *fu2-HA^{R+}*, *fu2-HA*, справа – вестерн-блот белкового экстракта, выделенного из эмбрионов линии *fu2-HA*.

сле репортерного гена расположен терминатор SV40. В вектор были клонированы плечи для гомологической рекомбинации, которые амплифицировались путем ПЦР с геномной ДНК линии 58492 (Bloomington Drosophila Stock Center) с использованием следующих праймеров: Fu2 5'dir aagagctcgcagcatctgcagtgcataaa – Fu2 5'rev cacgatatgatcgcgatgtcg (734 п.н. фрагмент), и Fu2 3'dir aactcggaggaactgtcgttctacagcaac – Fu2 3'rev aaggccctctctcgtatcggacaacgt (500 п.н. фрагмент) (рис. 16).

Плазмиду для рекомбинации вместе с плазмидой, экспрессирующей гидовые РНК, инъецировали в эмбрионы линии 58492 из Bloomington Drosophila Stock Center. Развившихся мух скрещивали с линией *y¹w¹*; *CyO/If*. В потомстве были отобраны мухи по флуоресценции *dsRed* в глазах, их скрещивали с линией *y¹w¹*; *CyO/If*. В результате была получена линия с делецией размером 1770 пн, имеющей координаты: 2L:8464499..8466269 (6.40). Всего была получена 1 линия с сигналом *dsRed*. Полученную делецию, *fu2^{antPR+}*, проверяли методом ПЦР с праймеров Fu2GRdir (ctgcgtaggcgtaacagttg) – H70rev (cgctgtttatttgccttagc), и Fu2GRr (cgtacggggcgaactcaa) – sv40RT_2 (agccataccacattgtagag) (рис. 16). Делеция гена не влияет на пигментацию кутикулы, расположение и размер щетинок и волосков, форму тергитов и стернитов, размер и строение глаз и крыльев, фертильность и жизнеспособность самцов и самок. Это противоречит фенотипу мутации, полученной путем мобилизации транспозонов [7], а также результатам, наблюдавшимся при РНК-интерференции под драйвером *pnr* [9]. Мы полагаем, что наблюдавшиеся авторами этих статей фенотипы являются артефактами использованных ими методов.

Так как экспрессия *dsRed* в полученной линии находится под контролем регуляторных элементов *piragua*, то сигнал *dsRed* должен отражать локализацию экспрессии *piragua* в организме. Ока-

залось, что репортер помимо глаз преимущественно активируется в задних брюшных сегментах (A2–A6), причем экспрессия затухает у взрослых мух в течение 3 дней (рис. 2а).

Для тагирования Fu2 геномная область кодирующей части гена *piragua* была амплифицирована с праймеров Fu2 5'f Nhe tgtgctagctaggataacagggtaataggcctgcagtgcataaattccactaaac – Fu2 5'g Xho aaactcggagctcgggacgagtctcgcgtgtag – для поднятия фрагмента, включающего промоторную и всю кодирующую область, и Fu2 3'Ud ggtctagaacaacattatcatcgttataaag – Fu2 3'Ur gtgcggccgctgttgctcagacgactgc – для поднятия 3'UTR. В рамку считывания гена *piragua* на 3'-конец перед 3'UTR был клонирован НА-таг. Для интеграции в геном полученной тагированной копии гена использовали описанный ранее вектор *attB-glass-mCherry-mini-yellow* [13]. Полученная плаزمида была инъецирована в эмбрионы линии *fu2^{antPR+}* вместе со вспомогательной плазмидой, экспрессирующей интегразу φC31 [12]. Неожиданно оказалось, что репортер *mini-yellow* в геномном районе *piragua* не экспрессируется. Вследствие этого успешные интеграции отбирали на основе экспрессии репортера *mCherry* в глазах.

Успешность интеграции подтверждали ПЦР. Было отобрано 4 линии, *fu2-HA^{R+}*. С помощью Cre-опосредованной рекомбинации по *lox*-сайтам все репортерные гены были удалены и получена линия *fu2-HA* (рис. 1б). Для подтверждения экспрессии тагированного белка были произведены вестерн-блоты с антителами к НА-тагу с лизатом из взрослых самок и из эмбрионов линии *fu2-HA* (рис. 2б). Белок преимущественно присутствует в эмбрионах, что соответствует доступным данным относительно экспрессии гена *piragua* [FlyBase, modENCODE Development RNA-Seq].

Таким образом, получена делеция гена *piragua*, *fu2^{attPR+}*, которая не имеет мутантного фенотипа. Эти результаты предполагают, что функции белка Fu2 компенсируются другими архитектурными белками. Экспрессия *dsRed* в линии *fu2^{attPR+}* в задних брюшных сегментах молодых мух может указывать на сегмент-специфичную экспрессию данного белка и предполагает его функционирование в процессе формирования задних брюшных сегментов дрозофилы. Полученная платформа *fu2^{attPR+}* может быть использована в дальнейшем для изучения свойств белка Fu2 и его отдельных доменов. В настоящей работе была получена трансгенная линия, которая экспрессирует Fu2-НА, что позволит исследовать распределение сайтов связывания белка в эмбрионах дрозофилы и определить мотив, с которым связывается белок.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта РФФИ проект № 19-74-30026.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Федотова А.А., Бончук А.Н., Могилла В.А., и др. Белки с цинковыми пальцами типа C₂H₂ – самый многочисленный и наименее изученный класс транскрипционных факторов высших эукариот // *Acta Naturae*. 2017. Т. 9. № 2 (33). С. 50–61.
2. Maksimenko O.G., Fursenko D.V., Belova E.V. et al. CTCF As an Example of DNA-Binding Transcription Factors Containing Clusters of C₂H₂-Type Zinc Fingers // *Acta Naturae*. 2021. V. 13. № 1. P. 31–46.
3. Kyrchanova O., Georgiev P. Mechanisms of Enhancer-Promoter Interactions in Higher Eukaryotes // *Int. J. Mol Sci*. 2021. V. 22. № 2. С. 671.
4. Chung H.R., Lohr U., Jackle H. Lineage-specific expansion of the zinc finger associated domain ZAD // *Mol. Biol. Evol.* 2007. V. 24. № 9. P. 1934–1943.
5. Bonchuk A., Boyko K., Fedotova A., et al. Structural basis of diversity and homodimerization specificity of zinc-finger-associated domains in *Drosophila*. // *Nucleic Acids Res* 2021. V. 49. № 4. P. 2375–2389.
6. Chung H.R., Schafer U., Jackle H., et al. Genomic expansion and clustering of ZAD-containing C₂H₂ zinc-finger genes in *Drosophila* // *EMBO Repts*. 2002. V. 3. № 12. P. 1158–1162.
7. Nazario-Yepiz N.O., Riesgo-Escovar J.R. *piragua* encodes a zinc finger protein required for development in *Drosophila* // *Mechanisms of Development*. 2017. V. 144. № Pt B. P. 171–181.
8. Rhiner C., López-Gay J.M., Soldini D. et al. Flower forms an extracellular code that reveals the fitness of a cell to its neighbors in *Drosophila* // *Developmental Cell*. 2010. V. 18. P. 985–998.
9. Mummery-Widmer J.L., Yamazaki M., Stoeger T., et al. Genome-wide analysis of Notch signalling in *Drosophila* by transgenic RNAi // *Nature*. 2009. V. 458. № 7241. P. 987–992.
10. Zhang X., Koolhaas W.H., Schnorrer F. A versatile two-step CRISPR- and RMCE-based strategy for efficient genome engineering in *Drosophila* // *G3 (Bethesda)*. 2014. V. 4. № 12. P. 2409–2418.
11. 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.
12. Gratz S.J., Ukken F.P., Rubinstein C.D. et al., Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila* // *Genetics*. 2014. V. 196. № 4. P. 961–971.
13. 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* // *Scientific Reports*. 2021. V. 11. № 1. P. 4156.

***PIRAGUA* GENE IS NOT ESSENTIAL FOR *DROSOPHILA* DEVELOPMENT**

V. V. Sokolov^{a,#}, academician of the RAS P. G. Georgiev^a, and O. V. Kyrchanova^a

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

[#]*e-mail: vladimir.sokolov.v.93@gmail.com*

Proteins with clusters of C₂H₂ zinc finger domains (C₂H₂-proteins) constitute the most abundant class of transcription factors in higher eukaryotes. N-terminal ZAD (zinc finger-associated domain) dimerization domain has been identified in a large group of C₂H₂-proteins mostly in insects. *piragua* gene encodes one of these proteins, Fu2. We have generated CRISPR/Cas9-mediated deletion of the *piragua* gene that has no phenotype. We have used ϕ C31-mediated *attP/attB* recombination to generate a transgenic line expressing Fu2 protein fused with HA epitope. This line will be useful for analysis of DNA binding profile and functions of Fu2 protein.

Keywords: ZAD-domain, CYS2-HIS2 Zinc Fingers, architectural proteins, regulation of transcription