

УДК 575.22:595.773.4

## ПРИВЛЕЧЕНИЕ НА ХРОМАТИН (GA)<sub>n</sub>-АССОЦИИРОВАННЫХ ФАКТОРОВ GAF И Psq В ТРАНСГЕННОЙ МОДЕЛЬНОЙ СИСТЕМЕ ЗАВИСИТ ОТ ПРИСУТСТВИЯ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ АРХИТЕКТУРНЫХ БЕЛКОВ

© 2022 г. Д. А. Четверина<sup>1</sup>, Ф. В. Горбенко<sup>1</sup>, Д. В. Ломаев<sup>1</sup>,  
академик РАН П. Г. Георгиев<sup>1</sup>, М. М. Ерохин<sup>1,\*</sup>

Поступило 20.04.2022 г.  
После доработки 20.05.2022 г.  
Принято к публикации 20.05.2022 г.

Репрессоры транскрипции группы Polycomb (PcG) и активаторы группы Trithorax (TrxG) необходимы для правильного развития и поддержания профилей экспрессии генов у многоклеточных организмов. У *Drosophila* белки PcG/TrxG взаимодействуют с ДНК-элементами, названными PRE (Polycomb response elements). Ранее мы показали, что репрессорную активность PRE-элементов в трансгенах можно вызывать встраиванием рядом с PRE сайтов связывания для архитектурных белков. Было продемонстрировано, что индукция репрессии сопряжена с привлечением белков PcG/TrxG, в том числе ДНК-связывающих факторов Pho и Combgar. В настоящем исследовании мы проверили взаимодействие двух других PRE-ассоциированных ДНК-связывающих факторов, GAF и Psq, с *bxd*PRE в присутствии и в отсутствие сайтов для архитектурных белков. В результате было показано, что оба фактора могут эффективно привлекаться на *bxd*PRE только в присутствии расположенных рядом сайтов связывания для архитектурных белков Su(Hw), CTCF либо Pita.

**Ключевые слова:** *Drosophila*, Polycomb, PRE, репрессия транскрипции, Su(Hw), CTCF, Pita, GAF, Psq

**DOI:** 10.31857/S2686738922050067

Эпигенетический контроль экспрессии генов необходим для правильного развития и жизнедеятельности многоклеточных организмов. Важными эпигенетическими регуляторами транскрипции являются белки групп Polycomb (PcG) и Trithorax (TrxG), которые отвечают за репрессию и активацию транскрипции соответственно. Нарушения функционирования систем регуляции транскрипции белками PcG/TrxG связаны со многими патологическими состояниями, такими как онкологические заболевания, что делает необходимым понимание механизма их действия, в том числе принципов привлечения на хроматин [1–5].

У *Drosophila* белки PcG/TrxG взаимодействуют со специализированными ДНК-элементами PRE (Polycomb Response Elements), называемыми также сайленсерами [6–8]. В экспериментах с трансгенными конструкциями было показано, что отдельно взятый PRE-элемент может привлекать белки PcG/TrxG и вызывать репрессию репортерного гена. Однако функциональная активность PRE очень сильно зависит от геномного окружения, и репрессия наблюдается примерно в половине трансгенов, тогда как в остальных случаях PRE может либо быть в нейтральном статусе (не влиять на активность репортерного гена), либо активировать транскрипцию. При этом важно отметить, что белки PcG/TrxG могут привлекаться на ДНК-последовательность PRE вне зависимости от его статуса, однако может меняться уровень их ассоциации с хроматином [9]. Вопрос о том, каким образом контролируется активность

<sup>1</sup> Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

\*e-mail: yermahbio@yandex.ru

PRE, в настоящее время является предметом активных научных исследований.

Ранее нами было показано, что вставка сайтов связывания для архитектурных белков (Su(Hw), CTCF либо Pita) рядом с PRE может усиливать или даже индуцировать PRE-зависимую репрессию гена-мишени [10]. При этом индукция репрессии сопряжена с привлечением белков PcG (Ph, Sfmtb), TrxG (Trx, CBP), а также двух PRE-ассоциированных ДНК-связывающих факторов — Pho и Combgap. В то же время остается не известным, связываются ли с ДНК-последовательностью PRE в неактивном состоянии другие ДНК-ассоциированные факторы. Потенциально возможны два варианта. В первом случае можно ожидать, что в отсутствие сайтов для архитектурных белков область PRE остается прочно ассоциирована с нуклеосомами и является недоступной для любых контактов с ДНК-связывающими белками. Во втором варианте с областью PRE может взаимодействовать ограниченное число транскрипционных факторов, но их недостаточно для привлечения полноценного комплекса PcG/TrxG белков.

В настоящей работе мы проверили ассоциацию с PRE двух ДНК-связывающих белков, GAF и Psq, в нейтральном статусе и при активации репрессии. Оба фактора связываются с (GA)<sub>n</sub>-повторами (GAGA-сайтами), узнавая одни и те же мотивы в составе PRE и являются прямыми физическими партнерами, взаимодействуя друг с другом через ВТВ-домены [11]. Более того, для GAF было продемонстрировано, что он является пионерным транскрипционным фактором и, по крайней мере, на ряде геномных позиций может вызывать привлечение ремоделеров хроматина и способствовать связыванию различных функциональных комплексов с ДНК [11]. Таким образом, задачей данного исследования была проверка способности пионерного фактора GAF, а также его партнера Psq, взаимодействовать с неактивным *bxd*PRE в отсутствие расположенных рядом сайтов связывания для архитектурных белков.

Тестирование зависимости привлечения белков GAF и Psq от сайтов связывания архитектурных белков проводилось на разработанной ранее модельной системе [10]. Все используемые в данном исследовании трансгены были встроены в область генома 96E на третьей хромосоме с помощью системы сайт-специфической интеграции PhiC31 путем рекомбинации между сайтом attB, содержащимся в плазмиде, и сайтом attP, ранее встроенным в геном с помощью транспозона Mariner [12]. В качестве модельного PRE в данной работе во всех трансгенных конструкциях использовался хорошо охарактеризованный элемент *bxd*PRE длиной 656 п.н. из регуляторной об-

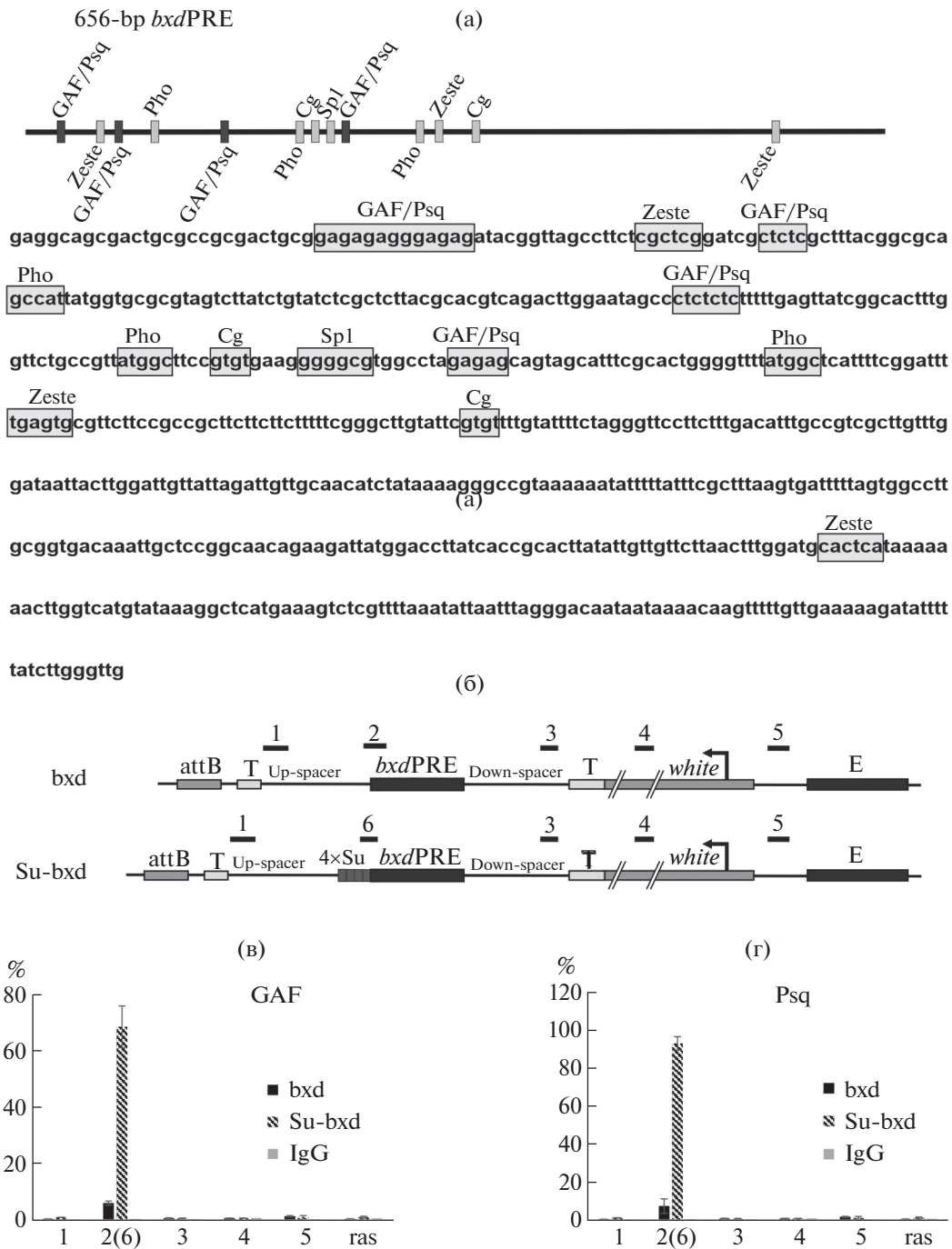
ласти гена *Ubx* [9]. На рис. 1 а представлена последовательность *bxd*PRE и указаны сайты для PRE ДНК-связывающих белков: GAF/Psq — GAGAG [13, 14]; Pho — GCCAT [15, 16]; Zeste — YGAGYG (Y = C or T) [17, 18]; Sp1/Klf — RRGYG (R = A or G) [19]; Combgap (Cg) — GTGT [20].

Базовый трансген, названный *bxd* (рис. 1 б), содержит следующие функциональные элементы: сайт attB, сайленсер *bxd*PRE, репортерный ген *white* и тканеспецифичный энхансер гена *white* (E). Кроме того, *bxd*PRE в трансгене окружен ДНК-спейсерами длиной примерно 1 т.п.н. каждый, полученными из кодирующих областей генов eGFP и RFP, а также терминаторами транскрипции (с 5'-стороны от *bxd*PRE встроены терминатор SV40 и с 3'-стороны от *bxd*PRE — терминатор гена *yellow*).

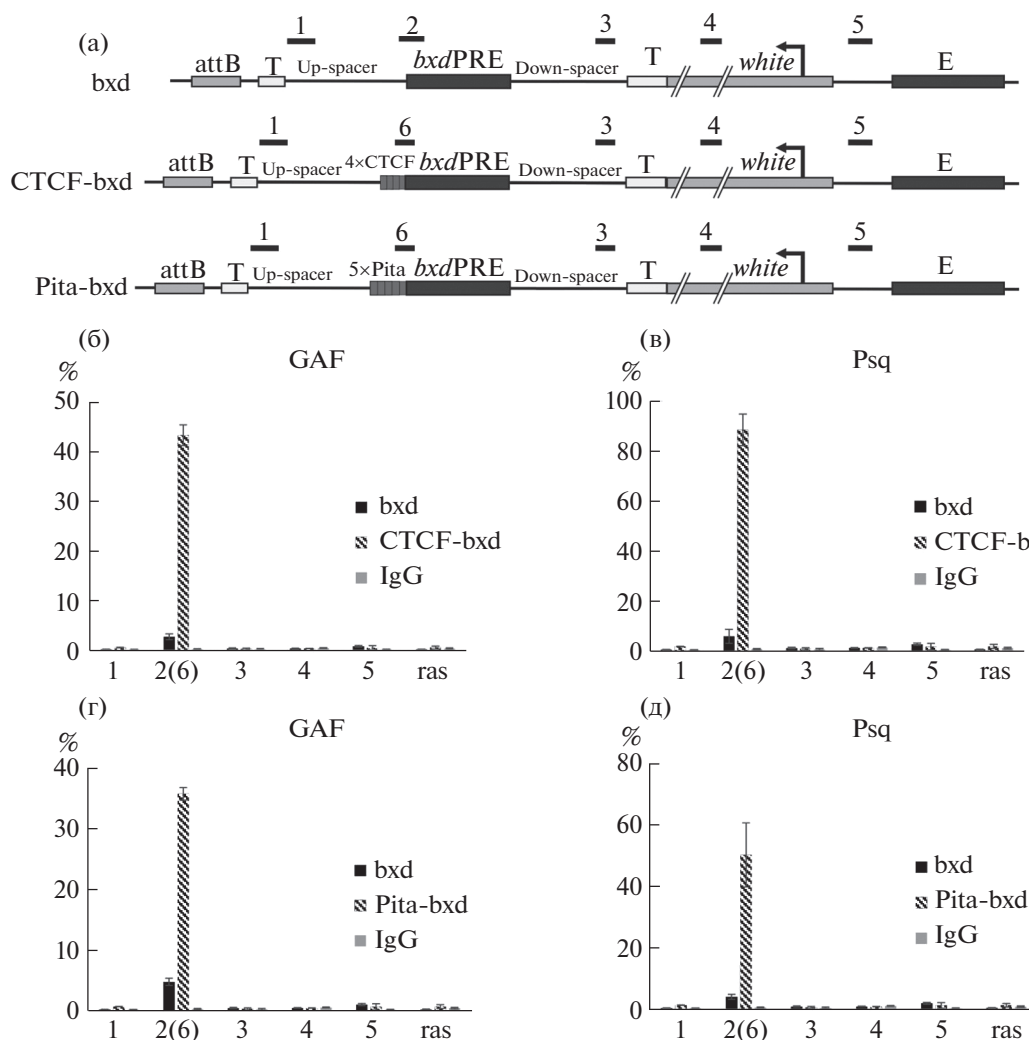
Второй трансген, названный Su-*bxd* (рис. 1 б), содержит все элементы трансгена *bxd*, но вплотную с 5'-стороны от *bxd*PRE, встроены 4 сайта связывания для архитектурного белка Su(Hw) (4xSu).

Ген *white* отвечает за пигментацию глаз мух и необходим для оценки репрессорной активности сайленсера *bxd*PRE. Тканеспецифичный энхансер используется для повышения уровня экспрессии гена *white*, что необходимо для работы с трансгенами, содержащими репрессорные элементы, эффективно подавляющие транскрипцию репортерных генов. Фенотип глаз трансгенных мух напрямую коррелирует с уровнем транскрипции гена *white* [9]. В случае отсутствия репрессии фенотип глаз трансгенных мух будет красным, в случае наличия репрессии — пигментация глаз будет снижена вплоть до белой окраски в зависимости от степени репрессии.

Ранее нами было показано, что в составе трансгена *bxd* элемент *bxd*PRE находится в нейтральном статусе — не репрессирует транскрипцию (фенотип глаз трансгенных мух в геми- и гомозиготе красный) и не привлекает белки групп PcG/TrxG и PRE-ассоциированные ДНК-связывающие факторы Pho и Combgap. В то же время в составе трансгена Su-*bxd*, при добавлении четырех сайтов связывания для архитектурного белка Su(Hw), *bxd*PRE эффективно репрессирует ген *white* (фенотип глаз трансгенных мух коричневый в гемизиготе и светло-желтый в гомозиготе). Репрессия сопровождается привлечением белков PcG/TrxG, в том числе двух PRE-ассоциированных ДНК-связывающих белков Pho и Combgap. Кроме того, экспериментально было подтверждено, что в конструкции Su-*bxd* происходит привлечение Su(Hw) на 4xSu сайты [10].



**Рис. 1.** (а) Предсказанные сайты связывания известных PRE-ассоциированных ДНК-связывающих белков сайленсера *bxdPRE* длиной 656 п.н. (б) Схематическое изображение трансгенов. Обозначения: “attB” – сайт attB, необходимый для интеграции трансгена; “*bxdPRE*” – сайленсер *bxdPRE*; “Т” – терминаторы транскрипции; *white* – репортерный ген; “Е” – энхансер гена *white*, “4xSu” – четыре сайта связывания белка Su(Hw). Числа над схемами трансгенов (1, 2 или 6, 3, 4, 5) обозначают области, амплифицированные с помощью количественной ПЦР (qPCR) в экспериментах X-ChIP. (в, г) Результаты экспериментов по иммунопреципитации хроматина, выделенного из голов взрослых мух, гомозиготных по трансгенам “*bxd*” и “*Su-bxd*”. Эксперименты проводились с использованием антител против белков GAF (в) и Psq (г), либо с неспецифическими IgG неиммунизированного животного (IgG). По оси ординат указан процент обогащения каждой области в иммунопреципитированном материале по отношению к исходной ДНК (Input), нормированный на эндогенный позитивный контроль – область рядом с 656 п.н. *bxdPRE* в геноме (*bxdPRE*-Genome). По оси абсцисс – области исследования с помощью qPCR в трансгене и отрицательный контроль (*ras* – кодирующая область гена Ras64B). Вертикальные линии указывают стандартные отклонения.



**Рис. 2.** (а) Схематическое изображение трансгенов. Обозначения: “4хCTCF” – четыре сайта связывания белка CTCF, “5хPita” – пять сайтов связывания белка Pita. (б, в) Результаты экспериментов по иммунопреципитации хроматина, выделенного из голов взрослых мух, гомозиготных по трансгенам “*bxd*” и “*CTCF-bxd*”. Были использованы специфические антитела к белкам GAF (Б), Psq (В). (г, д) Результаты экспериментов по иммунопреципитации хроматина, выделенного из голов взрослых мух, гомозиготных по трансгенам “*bxd*” или “*Pita-bxd*”. Были использованы специфические антитела к белкам GAF (Г), Psq (Д). Остальные обозначения как на рис. 1.

В данной работе с помощью иммунопреципитации хроматина (X-ChIP), выделенного из голов гомозиготных трансгенных мух, мы проверили ассоциацию белков GAF и Psq с *bxdPRE* в трансгенах *bxd* и *Su-bxd* на взрослой стадии развития. Мы оценивали обогащение исследуемых белков на пяти областях трансгенов: (1) дистальный конец спейсерной последовательности перед *bxdPRE*, (2) *bxdPRE*, (3) дистальный конец последовательности спейсера после *bxdPRE*, (4) кодирующая область гена *white* и (5) промотор гена *white* (рис. 1 б). В качестве отрицательного внутреннего контроля был использован участок кодирующей области гена *Ras64B* (*ras*), в качестве положитель-

ного внутреннего контроля была выбрана область *bxdPRE*-Genome – область, связывающая белки GAF/Psq рядом с *bxdPRE* в геноме, но не входящая в состав *bxdPRE* в трансгенах. Проведенный анализ показал, что белок GAF, также как и белок Psq, не взаимодействует с неактивным *bxdPRE* в составе трансгена *bxd* (рис. 1 в). В то же время данные белки эффективно привлекаются на сайленсер *bxdPRE* в статусе репрессии в составе трансгена *Su-bxd* в присутствии сайтов связывания для архитектурного белка Su(Hw).

На следующем этапе мы изучили взаимодействие белков GAF и Psq с сайленсером *bxdPRE*

при его индукции альтернативными архитектурными белками – CTCF или Pita. Для этого рядом с *bxdPRE* были встроены либо 4 сайта связывания архитектурного белка CTCF (трансен *CTCF-bxd*, рис. 2 а), либо 5 сайтов связывания архитектурного белка Pita (трансен *Pita-bxd*, рис. 2 а). В предыдущем исследовании мы показали, что сайты связывания данных архитектурных белков функционально ведут себя также, как и сайты связывания для белка Su(Hw) – в их присутствии активируется репрессорная активность *bxdPRE*. Как и в случае трансгена *Su-bxd*, обогащение белков GAF и Psq проверялось с помощью X-ChIP на пяти аналогичных областях трансгенов *CTCF-bxd* и *Pita-bxd*. Как и ранее, хроматин для иммунопреципитации был выделен из голов гомозиготных по конструкции мух на взрослой стадии развития. В качестве контроля все эксперименты проводились параллельно с выделением и иммунопреципитацией хроматина, выделенного из мух, несущих трансген *bxd*. В результате анализа нами было показано, что белки GAF и Psq привлекаются на элемент *bxdPRE* только в статусе репрессии в присутствии сайтов связывания для архитектурных белков CTCF или Pita (рис. 2 б, д).

Таким образом, мы показали, что в используемой модельной системе пионерный фактор GAF, также как и белок Psq, не взаимодействует с неактивным *bxdPRE*. При этом активация опосредованной *bxdPRE* репрессии маркерного гена при добавлении сайтов связывания для архитектурных белков сопровождается привлечением GAF и Psq. Полученные данные показывают, что, по крайней мере в некоторых ситуациях, GAGA-сайтов недостаточно для привлечения GAGA-ассоциированных белков и, как следствие, взаимодействующих с ними транскрипционных комплексов на хроматин. Интересно, что использование сайтов связывания для всех трех протестированных архитектурных факторов приводит к примерно одинаковому усилению связывания GAF и Psq с *bxdPRE*. Несмотря на то что на сегодня известно около десяти PRE-ассоциированных ДНК-связывающих факторов [7, 8], вопрос о детальном механизме привлечения белков PcG/TrxG на хроматин остается открытым. Результаты данного исследования показывают, что в этих процессах важную роль могут играть не только ранее известные PcG/TrxG-ассоциированные ДНК-связывающие белки, но и различные архитектурные факторы, определяющие трехмерную структуру хроматина в ядре.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 20-74-10099. В работе была использована инфра-

структура Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Piunti A., Shilatifard A.* // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2021. V. 22. № 5. P. 326–345.
2. *Chetverina D.A., Lomaev D.V., Erokhin M.M.* // Acta Naturae. 2020. V. 12. № 4. P. 66–85.
3. *Parreno V., Martinez A.M., Cavalli G.* // Cell Res. 2022. V. 32. № 3. P. 231–253.
4. *Cavalli G., Heard E.* // Nature. 2019. V. 571. № 7766. P. 489–499.
5. *Erokhin M., Chetverina O., Gyorffy B., et al.* // Cancers (Basel). 2021. V. 13. № 13. P. 3155.
6. *Kassis J.A., Kennison J.A., Tamkun J.W.* // Genetics. 2017. V. 206. № 4. P. 1699–1725.
7. *Erokhin M., Georgiev P., Chetverina D.* // Epigenomes. 2018. V. 2. № 1. P. 1–24.
8. *Kassis J.A., Brown J.L.* // Adv. Genet. 2013. V. 81. P. 83–118.
9. *Erokhin M., Elizar'ev P., Parshikov A., et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. № 48. P. 14930–14935.
10. *Erokhin M., Gorbenko F., Lomaev D., et al.* // BMC Biol. 2021. V. 19. № 1. P. 113.
11. *Chetverina D., Erokhin M., Schedl P.* Cell Mol. Life Sci. 2021. V. 78. № 9. P. 4125–4141.
12. *Bischof J., Maeda R.K., Hediger M., et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. № 9. P. 3312–3317.
13. *van Steensel B., Delrow J., Bussemaker H.J.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2003. V. 100. № 5. P. 2580–2585.
14. *Lehmann M., Siegmund T., Lintermann K.G., et al.* // J. Biol. Chem. 1998. V. 273. № 43. P. 28504–28509.
15. *Fritsch C., Brown J.L., Kassis J.A., et al.* // Development. 1999. V. 126. № 17. P. 3905–3913.
16. *Brown J.L., Kassis J.A.* // Genetics. 2013. V. 195. № 2. P. 407–419.
17. *Biggin M.D., Bickel S., Benson M., et al.* // Cell. 1988. V. 53. № 5. P. 713–722.
18. *Moses A.M., Pollard D.A., Nix D.A., et al.* // PLoS Comput. Biol. 2006. V. 2. № 10. P. e130.
19. *Brown J.L., Grau D.J., DeVido S.K., et al.* // Nucleic Acids Res. 2005. V. 33. № 16. P. 5181–5189.
20. *Ray P., De S., Mitra A., et al.* // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. № 14. P. 3826–3831.

## RECRUITMENT TO CHROMATIN OF (GA)<sub>n</sub>-ASSOCIATED FACTORS GAF AND Psq IN THE TRANSGENIC MODEL SYSTEM DEPENDS ON THE PRESENCE OF ARCHITECTURAL PROTEIN BINDING SITES

D. A. Chetverina<sup>a</sup>, F. V. Gorbenko<sup>a</sup>, D. V. Lomaev<sup>a</sup>,  
Academician of the RAS P. G. Georgiev<sup>a</sup>, and M. M. Erokhin<sup>a,#</sup>

<sup>a</sup> Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

<sup>#</sup> e-mail: yermxbio@yandex.ru

Polycomb group (PcG) repressors and Trithorax group (TrxG) activators of transcription are essential for the proper development and maintenance of gene expression profiles in multicellular organisms. In *Drosophila*, PcG/TrxG proteins interact with DNA elements called PRE (Polycomb response elements). We have previously shown that the repressive activity of inactive PRE in transgenes can be induced by architectural protein binding sites. It was shown that the induction of repression is associated with the recruitment of PcG/TrxG proteins, including the DNA-binding factors Pho and Combgap. In the present study, we tested the association of the two other PRE DNA-binding factors, GAF and Psq, with *bxd*PRE in the presence and absence of sites for architectural proteins. As a result, it was shown that both factors can be efficiently recruited to the *bxd*PRE only in the presence of adjacent binding sites for architectural proteins Su(Hw), CTCF, or Pita.

**Keywords:** *Drosophila*, Polycomb, PRE, repression of transcription, Su(Hw), CTCF, Pita, GAF, Psq