

## РОЛЬ САЙТОВ СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКА CLAMP В ПОДДЕРЖАНИИ ДИСТАНЦИОННЫХ ВЗАИМОДЕЙСТВИЙ В ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЯХ ДРОЗОФИЛЫ

© 2021 г. Е. А. Тихонова<sup>1</sup>, В. А. Могила<sup>1</sup>, П. Г. Георгиев<sup>1</sup>, О. Г. Максименко<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

\*e-mail: maksog@mail.ru

Поступила в редакцию 05.12.2020 г.

После доработки 21.01.2021 г.

Принята к публикации 15.02.2021 г.

Механизм специфического привлечения комплекса дозовой компенсации (КДК) на X-хромосому самцов дрозофилы остается нерешенной проблемой. Недавно в качестве фактора, участвующего в привлечении КДК, был описан ДНК-связывающий белок CLAMP, который связывается с сайтами первичной посадки (СПП) КДК. Показано, что СПП могут рекрутировать КДК на аутосомы. В представленной работе проведено исследование способности хорошо описанного СПП поддерживать дистанционные взаимодействия в модельных трансгенных линиях дрозофилы. В результате получены отрицательные результаты, показывающие, что СПП, с которым связывается белок CLAMP, не поддерживает дистанционные взаимодействия.

**Ключевые слова:** дозовая компенсация, CLAMP, дрозофила, ген *white*, дистанционные взаимодействия.

**DOI:** 10.31857/S001667582110012X

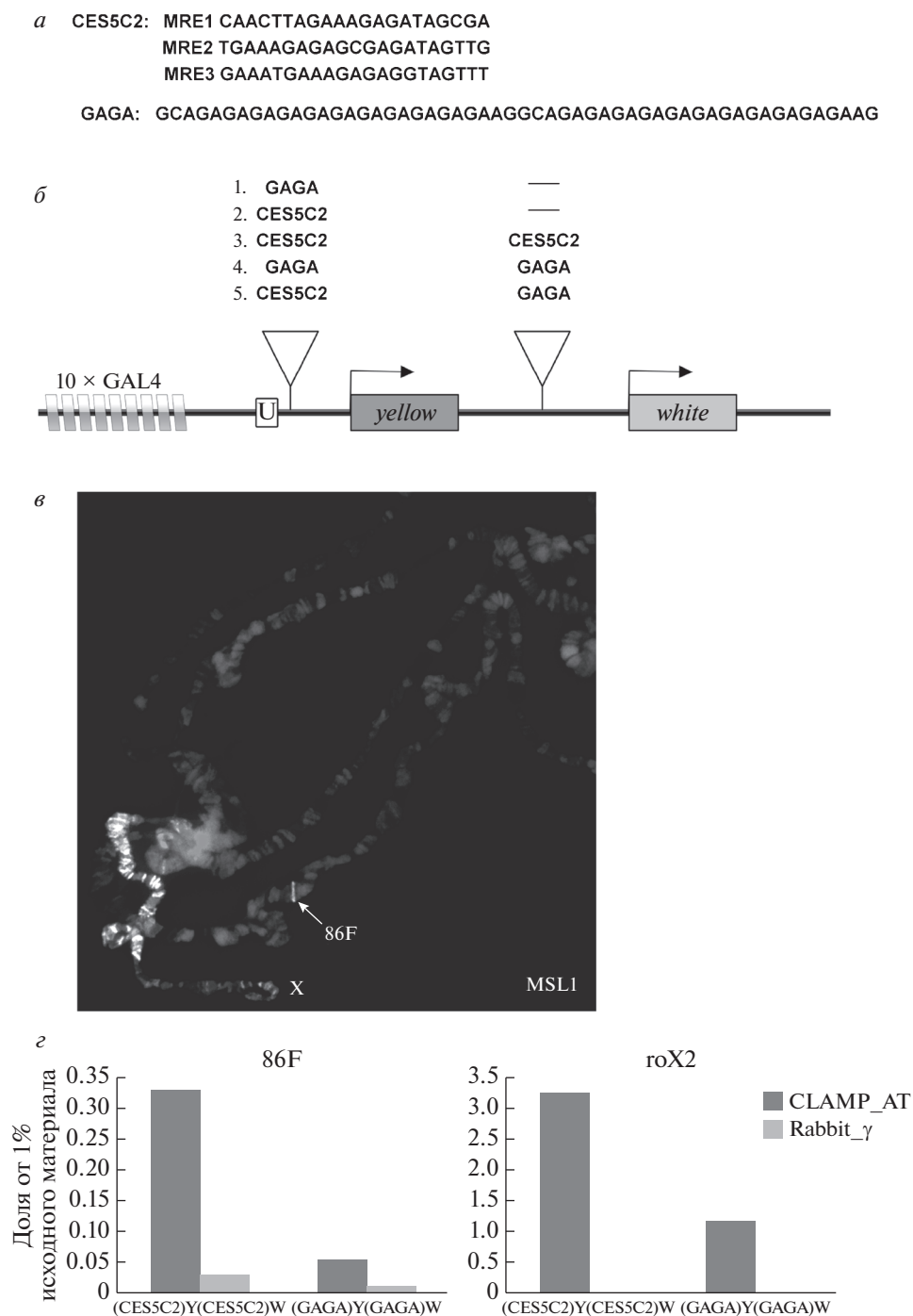
Механизм дозовой компенсации у дрозофилы осуществляется посредством увеличения уровня экспрессии генов X-хромосомы самца (X/Y) в два раза по сравнению с самками (X/X). За увеличение уровня экспрессии генов X-хромосомы самцов отвечает мультисубъединичный комплекс дозовой компенсации (КДК), который специфично связывается с X-хромосомой самцов. В состав комплекса дозовой компенсации (КДК) входят пять белков (MSL1, MSL2, MSL3, MLE, MOF) и некодирующая РНК (гоX1, гоX2) [1]. Исходно КДК привлекается на специфичные последовательности, распределенные по X-хромосоме – сайты первичной посадки (СПП), с которых происходит распространение КДК преимущественно на кодирующие части генов [2].

Наиболее вероятным механизмом привлечения КДК на X-хромосому является присутствие в составе СПП сайтов для транскрипционных факторов (ТФ), которые участвуют в специфичном связывании с КДК. Однако сравнение последовательностей СПП друг с другом выявило только обогащение GA-повторами, которые также повсеместно распределены на аутосомах [3]. Недавно в скрининге ТФ, определяющих способность СПП-элемента стимулировать транскрипцию в культуре клеток дрозофилы S2, был найден белок CLAMP, который содержит семь доменов “цин-

ковые пальцы” C2H2-типа [4]. *In vitro* было показано, что часть белка, содержащая C2H2-домены (с четвертого по седьмой), специфично связывается с GA-повторами [5], которые достаточно часто находятся в СПП.

Согласно одной из моделей [6], СПП взаимодействуют между собой и другими регуляторными элементами, что способствует специфическому распространению комплекса вдоль X-хромосомы. Для проверки этого предположения в работе было исследовано взаимодействие между двумя копиями ранее охарактеризованного СПП [3] – с помощью модельной GAL4/*white*-системы [7] в трансгенных линиях дрозофилы. Для исследования был взят участок в 200 пн ранее описанного СПП, CES5C2 [3], который содержит GA-богатые мотивы (MRE – Msl Recognition Element), и искусственный ДНК-фрагмент, содержащий GA-повторы (рис. 1,а).

Для исследования дистанционных взаимодействий между тестируемыми ДНК-фрагментами была использована ранее разработанная модельная система, основанная на неспособности дрожжевого транскрипционного фактора GAL4 активировать промотор гена *white*, когда между GAL4-сайтами и промотором находится ген *yellow* [7]. Ген *white* определяет окраску глаз дрозофилы. Уровень его экспрессии тестировали по степени пигментации



**Рис. 1.** *a* – используемые в работе ДНК-фрагменты: участок CES5C2, содержащий три GA-богатых мотива (MRE1, MRE2 и MRE3), и искусственно синтезированная последовательность, содержащая десять GAGA-повторов. *б* – модельная система для исследования дистанционных взаимодействий содержит два репортерных гена (*yellow*, *white*), десять сайтов посадки дрожжевого активатора GAL4 ( $10 \times$  GAL4) и уникальную последовательность для количественного анализа при иммунопреципитации хроматина (U). Контрольные конструкции (1, 2) содержат один ДНК-фрагмент (GAGA или CES5C2) перед геном *yellow*, а конструкции для изучения дистанционных взаимодействий (3, 4, 5) – два фрагмента (два CES5C2-элемента, две GAGA-последовательности или их комбинацию) перед генами *yellow* и *white*. *в* – сборка КДК на аутосомном трансгене в цитогенетическом локусе 86F. Иммуноокрашивание политенных хромосом самцов трансгенной линии (CES5C2)Y(CES5C2)W проводилось антителами против MSL1. *г* – связывание белка CLAMP с CES5C2-элементом и GAGA-последовательностью в цитогенетическом локусе 86F на стадии куколки в трансгенных линиях (CES5C2)Y(CES5C2)W и (GAGA)Y(GAGA)W. В качестве положительного контроля использовался эндогенный СПП (roX2). Иммунопреципитация хроматина выполнялась с использованием антител к белку CLAMP (Clamp\_AT) и преиммунной сыворотки (rabbit\_γ).

**Таблица 1.** Экспрессия гена *white* в исследуемых трансгенных линиях. Степень экспрессии гена *white* определялась по интенсивности окраски глаз: Ж – желтый, ТЖ – темно-желтый, О – оранжевый

Трансгенные линии	Пигментация глаз	
	исходный фенотип	GAL4-активация
(GAGA)YW	Ж–ТЖ	Ж–ТЖ
(CES5C2)YW	Ж–ТЖ	ТЖ–О
(CES5C2)Y(CES5C2)W	Ж–ТЖ	Ж–О
(GAGA)Y(GAGA)W	Ж–ТЖ	ТЖ–О
(CES5C2)Y(GAGA)W	Ж–ТЖ	ТЖ–О

глаз с помощью визуального анализа. Тестируемые ДНК-фрагменты (CES5C2 и GAGA-повторы) встраивали перед генами *yellow* и *white* в конструкцию (рис. 1,б), в которой десять сайтов связывания дрожжевого активатора GAL4 были встроены в положении –893 пн относительно промотора гена *yellow*, и ген *white* находился с 3'-стороны от гена *yellow*. Для исследования взаимодействия между СПП-элементами и GA-повторами были созданы конструкции, содержащие два CES5C2-фрагмента ((CES5C2)Y(CES5C2)W), два ДНК-фрагмента с GAGA-повторами ((GAGA)Y(GAGA)W), а также комбинацию CES5C2 и GA-повтора ((CES5C2)Y(GAGA)W). В двух контрольных конструкциях CES5C2 ((CES5C2)YW) или GAGA-последовательность ((GAGA)YW) были встроены только рядом с GAL4-сайтами, перед промотором гена *yellow* (рис. 1,б).

Для интеграции конструкций в геном был использован метод, основанный на сайт-специфичной рекомбинации для интегразы фага  $\phi$ C31 [8]. Все конструкции были встроены в одно место генома на 3-й хромосоме в положение 86F. Трансгенная линия  $y[1] M\{vas-int.Dm\}ZH-2A w[*]; M\{3xP3-RFP.attP\}ZH-86Fb$  (#24749), содержащая *attP*-сайт в цитогенетическом локусе 86F и трансген, экспрессирующий интегразу  $\phi$ C31, была получена из коллекции Блумингтона (США). Ранее было показано, что сайты связывания архитектурных белков в трансгене, встроенном в цитогенетический локус 86F, способны за счет дистанционных взаимодействий поддерживать стимуляцию промотора гена *white* за счет GAL4-активации [9].

Трансгенные линии были получены в результате микроинъекции ДНК, содержащей одну из конструкций, в эмбрионы дрозофилы. В полученных трансгенных линиях самки имели желтые глаза, а самцы – немного более интенсивную пигментацию – темно-желтую окраску. Для активации GAL4 проводили скрещивание трансгенной линии с линией, в которой белок GAL4 экспрессировался под контролем тубулинового промотора. При скрещивании с любой из двух трансгенных линий, содержащих контрольную

конструкцию, активация GAL4 незначительно меняла пигментацию глаз до оранжевой окраски, но приводила к резкому усилению пигментации тела и крыльев, что связано со стимуляцией промотора гена *yellow*, расположенного рядом с GAL4-сайтами в трансгенных линиях. Таким образом, было подтверждено, что GAL4 может стимулировать только рядом расположенный промотор гена *yellow*. При индукции экспрессии GAL4 в трансгенных линиях, содержащих тестируемые на поддержание дистанционных взаимодействий сайты, происходила также только активация гена *yellow* (табл. 1).

Полученный отрицательный результат может объясняться неспособностью белка CLAMP связываться с ДНК-элементами, встроенными на аутосоме, и привлекать к ним белки КДК. Поэтому для проверки такой возможности на аутосоме в трансгенных линиях было исследовано связывание белка MSL1 с политенными хромосомами, выделенными из слюнных желез (рис. 1,в). У самцов антитела к MSL1 окрашивают только X-хромосому в политенных хромосомах. Однако в трансгенной линии (CES5C2)Y(CES5C2) наблюдается связывание MSL1 также с сайтом 86F. Таким образом, полученные данные подтверждают специфичное привлечение КДК на элемент CES5C2.

С помощью иммунопреципитации хроматина с последующей количественной ПЦР было также проанализировано связывание белка CLAMP с CES5C2 и GAGA-последовательностями в куколках трансгенных линий. В результате было обнаружено, что белок CLAMP связывается с последовательностью CES5C2 в составе трансгенной конструкции намного более эффективно, чем с GA-повторами (рис. 1,з). Вероятно, слабое связывание с GA-повторами объясняется конкуренцией между CLAMP и транскрипционным фактором GAF, для которого известно эффективное кооперативное связывание с GA-повторами.

Отсутствие активации репортерного гена *white* GAL4-активатором предполагает отсутствие взаимодействия между тестируемыми ДНК-фрагментами, расположенными на большом расстоянии

друг относительно друга. Таким образом, комплексы белков, которые связываются с элементами CES5C2, не взаимодействуют между собой. Также не найдено взаимодействий между комплексами белков, включающих GAF и CLAMP, которые взаимодействуют с GA-повторами. Таким образом, полученные нами результаты не подтверждают модель, согласно которой взаимодействие между СПП-элементами определяет архитектуру X-хромосомы дрозофилы и распространение КДК. В поддержку данного результата недавно было показано, что белки КДК не участвуют в формировании архитектуры X-хромосомы [10]. С другой стороны, СПП-элементы часто располагаются рядом с границами топологических ассоциированных доменов. Согласно доминирующей в настоящее время модели, внутри топологических доменов могут происходить множественные локальные взаимодействия между промоторами, энхансерами и сайленсерами, что определяет регуляцию экспрессии генов. Вероятно, границы топологических доменов могут участвовать в распространении КДК по X-хромосоме. Поэтому необходимы дальнейшие исследования для выяснения механизмов, которые определяют распространение КДК с СПП-элементов по X-хромосоме.

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (№ 17-74-20155).

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuroda M.I., Hilfiker A., Lucchesi J.C. Dosage compensation in *Drosophila*—a model for the coordinate regulation of transcription // *Genetics*. 2016. V. 204. № 2. P. 435–450. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.185108>
2. Straub T., Grimaud C., Gilfillan G.D. et al. The chromosomal high-affinity binding sites for the *Drosophila* dosage compensation complex // *PLoS Genetics*. 2008. V. 4. № 12. P. e1000302. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000302>
3. Alekseyenko A.A., Peng S., Larschan E. et al. A sequence motif within chromatin entry sites directs MSL establishment on the *Drosophila* X chromosome // *Cell*. 2008. V. 134. № 4. P. 599–609. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.06.033>
4. Larschan E., Soruco M.M., Lee O.K. et al. Identification of chromatin-associated regulators of MSL complex targeting in *Drosophila* dosage compensation // *PLoS Genetics*. 2012. V. 8. № 7. P. e1002830. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002830>
5. Marcela M., Soruco M.M., Chery J. et al. The CLAMP protein links the MSL complex to the X chromosome during *Drosophila* dosage compensation // *Genes & Development*. 2013. V. 27. № 14. P. 1551–1556. <https://doi.org/10.1101/gad.214585.113>
6. Alekseyenko A.A., Ho J.W., Peng S. et al. Sequence-specific targeting of dosage compensation in *Drosophila* favors an active chromatin context // *PLoS Genetics*. 2012. V. 8. № 4. P. e1002646. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002646>
7. Kyrchanova O., Cheverina D., Maksimenko O. et al. Orientation-dependent interaction between *Drosophila* insulators is a property of this class of regulatory elements // *Nucl. Ac. Res.* 2008. V. 36. № 22. P. 7019–7028. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn781>
8. Bischof J., Maeda R.K., Hediger M. et al. An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific C31 integrases // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 9. P. 3312–3317. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611511104>
9. Zolotarev N., Fedotova A., Kyrchanova O. et al. Architectural proteins Pita, Zw5, and ZIPIC contain homodimerization domain and support specific long-range interactions in *Drosophila* // *Nucl. Ac. Res.* 2016. V. 44. № 15. P. 7228–7241. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw371>
10. Ramirez F., Lingg T., Toscano S. et al. High-affinity sites form an interaction network to facilitate spreading of the MSL complex across the X chromosome in *Drosophila* // *Mol. Cell*. 2015. V. 60. № 1. P. 146–162. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.08.024>

## The Role of CLAMP Binding Sites in Maintaining of Distant Interactions in *Drosophila* Transgenic Lines

E. A. Tikhonova<sup>a</sup>, V. A. Mogila<sup>a</sup>, P. G. Georgiev<sup>a</sup>, and O. G. Maksimenko<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

\*e-mail: maksog@mail.ru

The mechanism of specific recruitment of the dosage compensation complex (DCC) to the X chromosome of male *Drosophila* remains an unresolved problem. Recently a DNA-binding protein CLAMP, which binds to the primary chromosome entry sites (CESs) of the DCC, has been described as a factor involved in X chromosome recruiting of DCC. It was shown that CES can recruit of DCC to autosomes. In the present work, we studied the ability of a well-described CES to support distant interactions in model transgenic *Drosophila* lines. As a result, negative results were obtained showing that the CES that bound by CLAMP protein does not support distance interactions.

**Keywords:** dosage compensation, CLAMP, *Drosophila*, gene *white*, distant interactions.