

УДК 577.218

ИНСУЛЯТОРНЫЙ БЕЛОК CP190 РЕГУЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ СПЕРМАТОЦИТОВ В КЛЕТКАХ МУЖСКОГО ЗАРОДЫШЕВОГО ПУТИ *Drosophila melanogaster*

© 2023 г. С. Е. Романов^{a, b}, В. В. Шлома^a, Д. Е. Коряков^a, С. Н. Белякин^a, П. П. Лактионов^{a, b, *}^aИнститут молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия^bНовосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: laktionov@mcb.nsc.ru

Поступила в редакцию 23.06.2022 г.

После доработки 04.08.2022 г.

Принята к публикации 15.08.2022 г.

Белок CP190 — один из ключевых компонентов инсуляторных комплексов дрозофилы, изучение которого важно для понимания механизмов регуляции генов в процессе дифференцировки клеток. Однако мутанты по гену *Cp190* погибают, не доживая до взрослого состояния, что существенно усложняет изучение функций этого гена в клетках взрослого организма. Чтобы преодолеть эту проблему и исследовать регуляторные эффекты CP190 в развитии тканей имаго, мы разработали систему условного спасения мутантов *Cp190*. Спасаящая конструкция, содержащая кодирующую последовательность гена *Cp190*, направленно удаляется при помощи Cre/LoxP-опосредованной рекомбинации только в половых клетках семенников, что позволяет изучать эффекты мутации в клетках мужского зародышевого пути. С использованием высокопроизводительного транскриптомного анализа установлено, что инактивации CP190 влияет на экспрессию генов в клетках зародышевого пути. Обнаружено, что мутация *Cp190* противоположным образом влияет на тканеспецифичные гены, экспрессия которых подавляется CP190, и гены домашнего хозяйства, активатором которых выступает CP190. Мутация *Cp190* также приводила к активации экспрессии субпопуляции генов дифференцировки сперматоцитов, которые регулируются транскрипционным комплексом tMASC. Полученные результаты указывают на то, что основной функцией CP190 в процессе сперматогенеза является координация взаимодействий между генами дифференцировки и специфичными для них транскрипционными активаторами.

Ключевые слова: CP190, инсуляторные белки, *Drosophila melanogaster*, РНК-seq**DOI:** 10.31857/S0026898423010147, **EDN:** AWRYNA

ВВЕДЕНИЕ

Специализация клеток многоклеточного организма сопровождается активацией “генов развития” под воздействием энхансеров [1], а ключевую роль в регуляции промотор–энхансерных взаимодействий играют инсуляторные белки [2]. Они образуют физические контакты между специальными участками ДНК–инсуляторами, и тем самым обеспечивают пространственные взаимодействия промоторов и *цис*-регуляторных элементов. Сходным образом инсуляторные белки блокируют неспецифичные промотор–энхансерные взаимодействия и устанавливают барьеры между соседними доменами на хромосомах.

У *Drosophila melanogaster* обнаружена почти дюжина специализированных белков, которые в различных комбинациях связываются с инсуля-

торами [3–6]. Один из ключевых — белок CP190, взаимодействует с большинством известных инсуляторов. Белок CP190 участвует в формировании физических ДНК-контактов, регуляции трехмерной архитектуры ядра, а также в блокировке промотор–энхансерных взаимодействий [7–9]. В ряде случаев CP190 выступает в роли транскрипционного фактора и привлекает к генам-мишеням регуляторные белки и эпигенетические модификаторы [6, 10–12].

Потеря функции CP190 сопровождается нарушениями транскрипции, которые, в частности, затрагивают гомеозисные гены, кодирующие ключевые регуляторы развития [8, 13, 14]. Нуль-мутации гена *Cp190* являются рецессивными летальными, приводящими к гибели *D. melanogaster* на стадии куколки [15, 16], что затрудняет исследование регуляторных эффектов CP190 в клетках

имаго. По этой причине влияние этого белка на экспрессию генов и морфологию ядра изучали либо на культурах клеток, либо на ранних стадиях развития [8, 13], что накладывает ряд ограничений при интерпретации результатов.

В нашей работе в качестве модельной системы клеточной дифференцировки мы использовали сперматогенез *D. melanogaster*. В ходе дифференцировки клеток мужского зародышевого пути под воздействием специализированных транскрипционных факторов tMAC и tTAF активируются более 1000 специфических генов [17, 18]. При этом лишь небольшая доля геномных сайтов связывания tMAC и tTAF находится в непосредственной близости от генов-мишеней [18]. Это может предполагать регуляцию генов посредством сети пространственных взаимодействий между регуляторными элементами генома при участии инсуляторных белков. Чтобы изучить влияние CP190 на регуляцию генов в процессе клеточной дифференцировки, разработана генетическая система, которая позволяет избирательно исследовать проявления летальных мутаций *Cp190* в клетках зародышевого пути взрослых самцов. С использованием этого подхода мы оценили влияние белка CP190 на экспрессию генов в семенниках и проанализировали его влияние на регуляцию генов дифференцировки сперматоцитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Молекулярное клонирование и трансформация дрозофилы. Спасаящая конструкция (GenBank ON783212), содержащая кодирующую последовательность гена *Cp190* под контролем промотора гена *Ubi63E*, создана на основе вектора pUAST-attB, как описано в разделе “Результаты исследования”. С использованием этой конструкции проведен phiC31-опосредованный трансгенез линии $y^1w^{67};P\{y\{+17.7\} = CaryP\}attP40;M\{vas-int.B\}ZH-102D$, несущей сайт интеграции *attP40* во второй хромосоме, в результате чего получили линию $y^1w^{67};CP190-mCD8-GFP$ [19].

Линии мух. Все линии *D. melanogaster* содержали при температуре 25°C на стандартном корме. В работе использовали следующие линии: $y^1w^{67};CP190-mCD8-GFP$, несущую спасающую конструкцию; $y^1w^{67};nanos-Cre$, содержащую трансген *nanos-Cre*, интегрированный в сайт *attP40* [18, 20]; $y^1w^{67};+/+;Cp190^2,e^1/TM6$ [15] и $y^1w^{67};+/+;Cp190^3,e^1/TM6$ [16], содержащие мутантные аллели *Cp190*. Стандартными генетическими скрещиваниями получены линии $y^1w^{67};CDSCP190;Cp190^2,e^1/TM6$ и $y^1w^{67};nanos-Cre;Cp190^3,e^1/TM6$. Для проведения Cre/loxP-опосредованной рекомбинации скрещивали самок, несущих спасающую конструкцию, с самцами, несущими конструкцию *nanos-Cre*. При проведении

контрольных экспериментов в рамках транскрипционного анализа использовали линию $y^1w^{67};\{Ubi>stop>mCD8-GFP\}$, несущую трансген $\{Ubi>stop>mCD8-GFP\}$ в сайте *attP40* [20].

Выделение РНК и обратная транскрипция. Для анализа экспрессии в целых семенниках диссектировали 25 пар семенников и выделяли РНК с использованием реагента TRIZOL (“Invitrogen”, США, 15596018). кДНК нарабатывали, используя 1 мкг суммарной РНК, обратную транскрипцию проводили с помощью Superscript II Reverse Transcriptase (“Invitrogen”, 18080093) с использованием dT-олигонуклеотидов в качестве затравки.

Количественная ПЦР. Количественную ПЦР проводили с использованием реакционной смеси БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue (“Биолабмикс”, Россия, МНС030). Последовательности использованных праймеров приведены в табл. S1 (см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/1/supp_Romanov_rus.pdf). Эффективность удаления спасающей кассеты оценивали при помощи метода $\Delta\Delta C_t$, экспрессию *CP190* измеряли методом стандартной кривой. Для нормирования использовали ген *Actin42A*. Стандартную кривую строили, используя серийные разведения образцов геномной ДНК личиночных имагинальных дисков самок $y^1w^{67};CP190-mCD8-GFP$.

Микроскопия. Для анализа флуоресценции GFP *in vivo* семенники переносили на предметное стекло в каплю PBS, накрывали покровным стеклом и сразу анализировали на флуоресцентном микроскопе. Семенники для иммуноокрашивания фиксировали стандартным методом (2%-ный раствор формальдегида в PBST) [21]. В работе использовали первичные антитела крысы к CP190 (любезно предоставлены А.К. Головинным) [22] и вторичные антитела (anti-Rat Cross-Adsorbed A568, “Thermo Fisher Scientific”, США, A-11077). Препараты анализировали на конфокальном микроскопе Carl Zeiss LSM 710 (Германия).

Анализ транскриптома методом РНК-seq. В эксперименте использовали семенники самцов генотипов $y^1w^{67};CP190-mCD8-GFP/nanos-Cre$ и $y^1w^{67};CP190-mCD8-GFP/nanos-Cre;Cp190^2/Cp190^3$. Контролем служили семенники самцов $y^1w^{67};Ubi>stop>mCD8-GFP/nanos-Cre$ с репортерной конструкцией *Ubi>stop>mCD8-GFP*, интегрированной в сайт *attP40* во второй хромосоме [20]. Суммарную РНК выделяли из 25 пар семенников с использованием реагента TRIZOL. Пробоподготовка библиотек проводили с использованием набора TruSeq RNA Sample Preparation v2 Kit (“Illumina”, США, RS-121-2002). Секвенирование библиотек проводили на платформе Illumina MiSeq в режиме парных прочтений 2 × 75 п.н. Получено от 3.7 до 6.5 млн парных прочтений на образцах.

Геномное выравнивание осуществляли с помощью инструмента HiSat2 [23] (сборка генома dm6, Release 6 plus ISO1 MT, Aug. 2014) со стандартными параметрами. Количество прочтений для каждого гена суммировано при помощи FeatureCounts [24] с использованием геномной аннотации UCSC refGene (<https://hgdownload.soe.ucsc.edu/goldenPath/dm6/bigZips/genes/dm6.refGene.gtf.gz>). Использовали от двух до трех биологических повторов эксперимента с каждым генотипом; профили экспрессии генов в образцах разных генотипов показали высокую корреляцию (рис. S1, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/1/supp_Romanov_rus.pdf). Дифференциальную экспрессию генов анализировали при помощи алгоритма DESeq2 [25] с параметрами “ashr” [26] и “ihv” [27]. Данные по экспрессии генов в целых семенниках мутантов *cap*, *comr*, *mir40*, *bam* получены ранее и доступны в базе данных Gene Expression Omnibus (GSE97182) [18]. Данные по экспрессии генов в тканях дрозофилы получены из базы modENCODE [28] и кластеризованы при помощи программы Cluster 3.0 [29]. Обогащение тканеспецифичными генами анализировали при помощи пакета TissueEnrich [30]. Данные секвенирования транскриптома единичных клеток семенников получены из базы Fly Cell Atlas и проанализированы с использованием программного пакета Seurat [31, 32]. Результаты секвенирования доступны в базе данных Gene Expression Omnibus (PRJNA847720).

Связывание Cap, Comr и Mir40 с CP190-зависимыми генами. Данные по связыванию белков Cap, Comr и Mir40 с хромосомами клеток мужского зародышевого пути получены ранее при помощи метода DamID-seq (GSE97182) [18]. Сайты связывания белков картировали с использованием набора программ DamID-Seq [33]. Все гены в геноме были разделены на заданное число фрагментов. Обогащение связывания белков в области генов исследуемой выборки оценивали, сопоставляя частоту встречаемости центров GATC-фрагментов, связанных белком (согласно данным DamID-seq), в каждом фрагменте гена, со средним значением по всем генам *D. melanogaster*. Статистическую значимость обогащения оценивали с помощью точного теста Фишера.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Система условного спасения обеспечивает жизнеспособность мутантов Cp190

Мутанты по гену, кодирующему инсуляторный белок CP190, не доживают до взрослой стадии [15, 16], поэтому исследование функции этого гена в тканях имаго *D. melanogaster* сопряжено с экспериментальными трудностями. Чтобы преодолеть эту проблему и установить регуляторную функцию CP190 в клетках зародышевого пути

взрослых самцов, мы разработали генетическую систему для тканеспецифичного условного спасения мутации *Cp190* (рис. 1а).

Система состоит из двух генетических конструкций. Первая — спасающая конструкция *CP190-mCD8-GFP* — содержит кодирующую последовательность гена *Cp190* под контролем конститутивного промотора гена *Ubi63E*, который успешно использовали ранее для спасения летальной мутации *Cp190* [34, 35]. Вслед за кодирующей последовательностью *Cp190* помещен гибридный терминатор транскрипции HIS3-SV40 и кодирующая последовательность гена химерного репортерного белка mCD8-GFP [36, 37]. Кодирующая последовательность *Cp190* и терминатор транскрипции фланкированы loxP-сайтами узнавания рекомбиназы Cre и образуют спасающую генную кассету (рис. 1а). Вторая конструкция содержит ген рекомбиназы Cre под управлением промотора гена *nanos*, что обеспечивает наработку белка исключительно в клетках зародышевого пути (рис. 1а) [18, 20]. При наличии обеих конструкций в организме мутантов *Cp190* спасающая кассета будет специфически удалена из клеток зародышевого пути рекомбиназой Cre. В соматических клетках спасающая кассета не вырезается, обеспечивая жизнеспособность организма. При удалении кассеты в клетках зародышевого пути кодирующая последовательность гена химерного репортерного белка mCD8-GFP сближается с промотором гена *Ubi63E*, что позволяет получить клетки с дефицитом *Cp190*, помеченные GFP (рис. 1б).

С использованием системы phiC31-опосредованного трансгенеза генетическая конструкция *CP190-mCD8-GFP* была встроена в сайт attP40 во второй хромосоме [19]. Трансгенные мухи как с одной, так и с двумя копиями конструкции жизнеспособны и фертильны (данные не показаны). При этом одной копии оказалось достаточно для спасения летального фенотипа компаунд-гетерозигот *Cp190²/Cp190³*, у которых не образуется функциональный белок CP190 [15, 16]. Одновременно с этим экспрессия одной или двух копий спасающей конструкции не вызывала аномалий развития как в комбинации с *Cp190²/Cp190³*, так и на фоне дикого типа. Это свидетельствует об умеренном уровне эктопической экспрессии CP190, поскольку сильное повышение экспрессии этого гена вызывает серьезные дефекты развития [34].

В серии генетических скрещиваний получены самцы, несущие конструкции *CP190-mCD8-GFP* и *nanos-Cre* на фоне мутации *Cp190* (*y^{1w67}; CP190-mCD8-GFP/nanos-Cre; Cp190²/Cp190³*). В клетках зародышевого пути таких самцов выявлена активация репортерного белка mCD8-GFP, начиная со стадии ранних сперматоцитов, что свидетельствовало об удалении спасающей генной кассеты

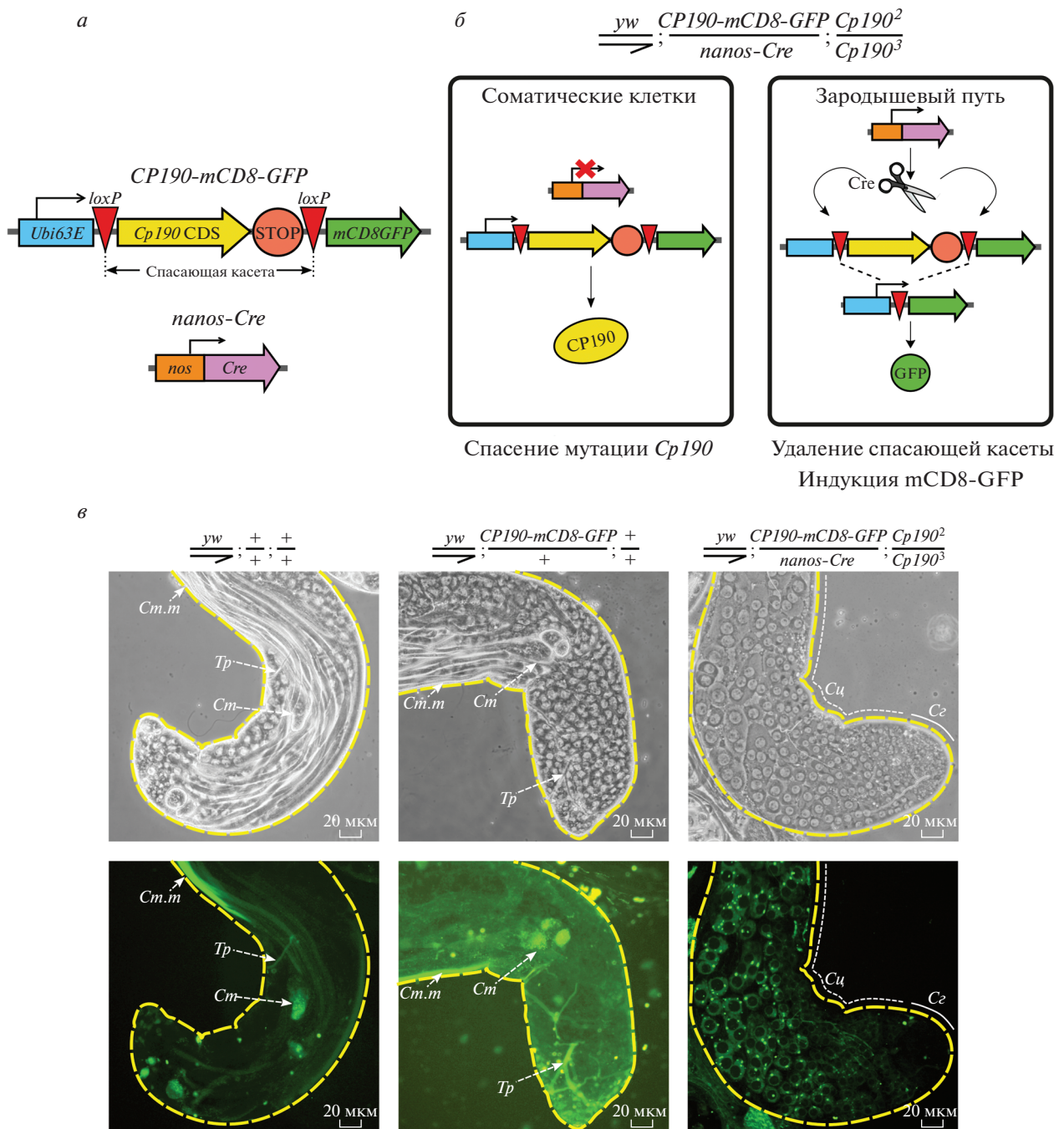


Рис. 1. Генетическая система для условного спасения мутантов с потерей функции *Cp190*. **а** – Схема спасающей конструкции *Cp190-mCD8-GFP* и конструкции *nanos-Cre* для экспрессии рекомбиназы Cre в клетках зародышевого пути дрозофилы. **б** – Принципиальная схема условного спасения мутантов *Cp190²/Cp190³* (см. пояснения в тексте). **в** – Снимки семенников самцов, не несущих спасающую конструкцию, с одной дозой спасающей конструкции и с условным спасением мутации *Cp190*. Режим фазового контраста (верхний ряд) и детекция флуоресценции GFP (нижний ряд). Желтым пунктиром обозначены границы семенников. Условные обозначения: *Cm.m* – хвосты сперматид; *Cm* – головы сперматид; *Tr* – дыхательные трубочки; *C₂* – область семенника, содержащая сперматогонии (непрерывная линия); *C₁* – область семенника, содержащая сперматоциты (пунктирная линия).

(рис. 1в). Такие самцы обладали нормальной жизнеспособностью и не имели видимых нарушений сперматогенеза. GFP-негативные сперматозоиды и GFP-позитивные соматические клетки оболочки визуально не обнаружены, что указывает на высокую эффективность и специфичность удаления спасающей конструкции.

В контрольных образцах семенников y^1w^{67} , а также семенников самцов, несущих спасающую конструкцию в отсутствие Cre-рекомбиназы, наблюдалась только фоновая автофлуоресценция, характерная для дыхательных трубочек и фрагментов сперматид (рис. 1в). Это подтверждает надежное блокирование экспрессии репортерного белка во всех типах клеток семенника.

Дополнительная проверка эффективности удаления спасающей кассеты из генома клеток зародышевого пути при помощи количественной ПЦР показала, что спасающая конструкция сохраняется в 49.6% клеток целого семенника (рис. 2а). Это значение соответствует доле соматических клеток в семеннике (50.4%), оцененной исходя из данных секвенирования транскриптома единичных клеток семенника [31]. Этот результат свидетельствует о том, что спасающая кассета удаляется в подавляющем большинстве половых клеток.

Система условного спасения значительно снижает уровень эктопической экспрессии Cp190 в клетках мужского зародышевого пути имаго

Мы проанализировали уровни экспрессии мРНК эндогенного и трансгенного гена *Cp190* методом количественной ПЦР с праймерами на кодирующую область гена *Cp190* и 3'-нетранслируемую область эндогенного *Cp190* (рис. 2б). Первая пара праймеров позволяет измерить уровень экспрессии и эндогенного, и трансгенного *Cp190*, а вторая пара – только эндогенной мРНК *Cp190*. Установлено, что удаление спасающей кассеты под воздействием *nanos-Cre* приводило к снижению экспрессии кодирующей последовательности *Cp190* в целых семенниках в 3.8 раза (рис. 2в). Вместе с тем, уровень экспрессии кодирующей последовательности *Cp190* оставался в 2.4 раза выше по сравнению с контролем дикого типа, что, по всей видимости, можно объяснить повышенным (в сравнении с эндогенным) уровнем экспрессии трансгенного *Cp190* в соматических клетках, а также сохранением спасающей конструкции в единичных сперматозоидах (рис. 2г).

Получение мутантных по *Cp190* клеток зародышевого пути подтверждено иммуноокрашиванием (рис. 2з). В семенниках $y^1w^{67};CP190-mCD8-GFP/nanos-Cre;Cp190^2/Cp190^3$ белок CP190 обнаружен в ядрах клеток на апикальном конце семенника, где располагаются недифференцированные сперматогонии, а также в ядрах соматических кле-

ток оболочки. Вместе с тем, экспрессия CP190 наблюдалась лишь в единичных ядрах сперматозоитов. В семенниках дикого типа стабильный уровень экспрессии CP190 наблюдался как в соматических, так и в половых клетках. Таким образом, разработанная система обеспечивает спасение мутантного фенотипа *Cp190* в соматических клетках, а также достаточно эффективное удаление спасающей кассеты в клетках мужского зародышевого пути, что на фоне мутации позволяет изолированно воспроизвести мутантный фенотип *Cp190* в половых клетках взрослых самцов.

Мутация Cp190 влияет на экспрессию генов дифференцировки в клетках мужского зародышевого пути

Влияние CP190 на экспрессию генов в семенниках имаго оценивали с помощью высокопроизводительного секвенирования транскриптома (РНК-seq) и последующего анализа дифференциальной экспрессии (табл. S2, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/1/supp_Romanov_rus.zip). В экспериментах использовали трехнедельных самцов, так как в этом возрасте семенники $y^1w^{67};CP190-mCD8-GFP/nanos-Cre$ и $y^1w^{67};CP190-mCD8-GFP/nanos-Cre;Cp190^2/Cp190^3$ имеют эквивалентный уровень экспрессии *Cp190* (рис. S2, см. Дополнительные материалы на сайте http://www.molecbio.ru/downloads/2023/1/supp_Romanov_rus.zip). Важно отметить, что активность спасающей кассеты контролируется промотором гена *Ubi63E*, из-за чего уровень транскрипции *Cp190* превышает эндогенный (рис. 2в), что может влиять на экспрессию генов. Чтобы аккуратно учесть этот эффект в нашем эксперименте, мы оценили влияние повышенной экспрессии *Cp190* в соматических клетках на транскриптом целых семенников.

С этой целью мы измерили экспрессию генов в семенниках самцов $y^1w^{67};CP190-mCD8-GFP/nanos-Cre;+/+$, в которых экспрессируется эндогенный функциональный ген *Cp190*, а спасающая кассета активна только в соматических клетках. Для сравнения использовали экспрессию генов в семенниках самцов контрольной линии. Присутствие спасающей конструкции привело к умеренным изменениям транскрипции: экспрессия 12 генов изменялась более чем в 8 раз (рис. 3а). Анализ семенников с условным спасением мутации *Cp190* в соматических клетках ($y^1w^{67};CP190-mCD8-GFP/nanos-cre;Cp190^2/Cp190^3$) выявил 89 генов, чья экспрессия изменялась более чем в 8 раз в сравнении с контролем (рис. 3а).

Кроме того, из 226 генов, дифференциально экспрессирующихся на фоне условного спасения мутации *Cp190* (экспрессия 154 генов повыси-

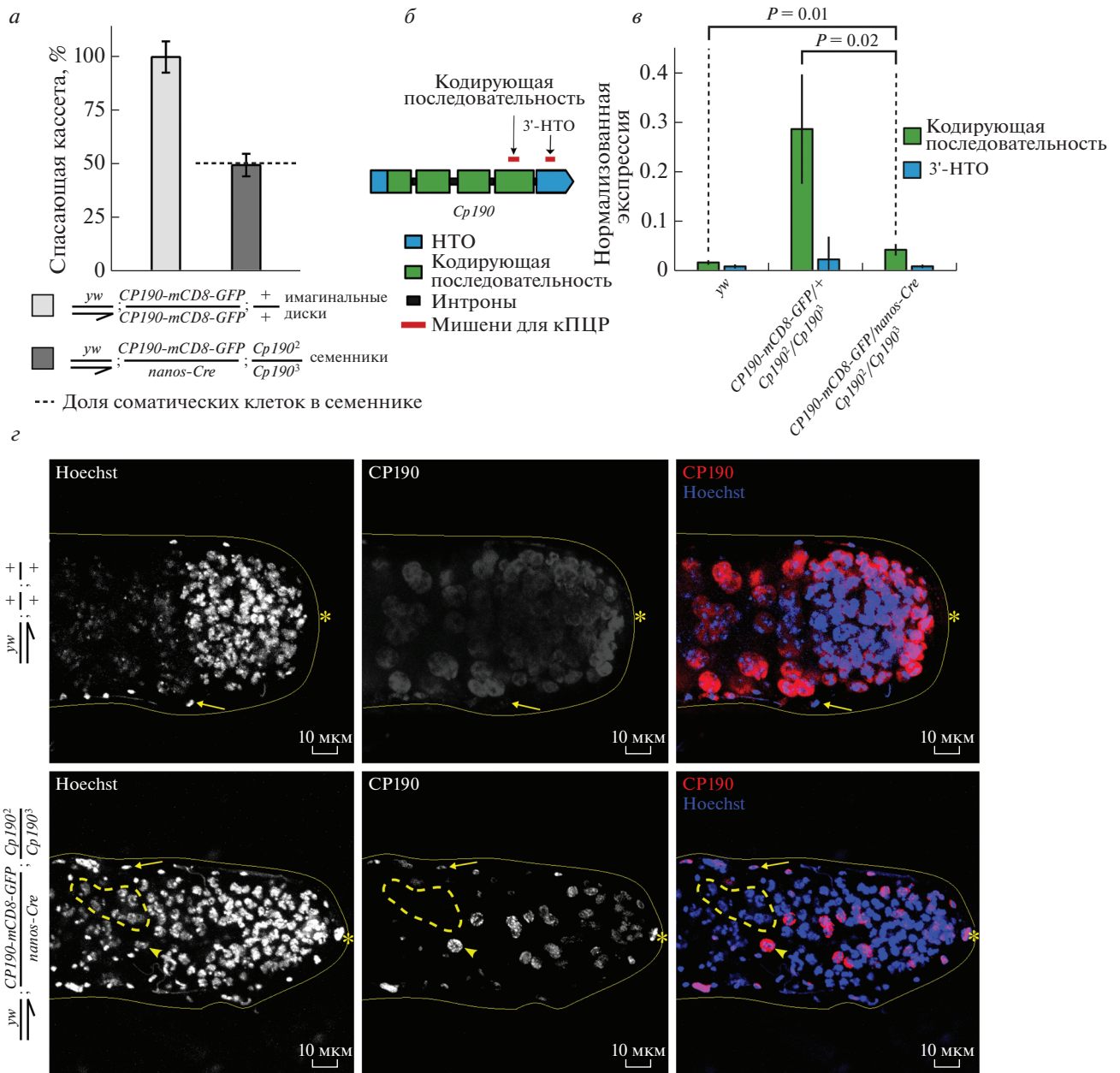


Рис. 2. Cre-опосредованная рекомбинация приводит к удалению спасающей кассеты и утрате CP190 в клетках мужского зародышевого пути. **а** – Количество копий спасающей кассеты в семенниках с условным спасением сравнивали с количеством в имажинальных дисках личинок, несущих двойную дозу конструкции *CP190-mCD8-GFP*. Число копий спасающей кассеты нормировали на дозу конструкции. Пунктирной линией обозначена доля соматических клеток в семенниках дрозофилы по данным секвенирования транскриптома единичных клеток [31]. **б** – Расположение мишеней для ОТ-кПЦР в гене *Cp190*. Соответствующие праймеры использовали для измерения экспрессии эндогенного и трансгенного *Cp190*. **в** – Нормированная экспрессия *Cp190* в семенниках трехдневных имаго с конструкциями *CP190-mCD8-GFP* и *nanos-Cre*. Экспрессию измеряли при помощи праймеров к локусам, обозначенным на диаграмме **б** – Экспрессию нормировали на активность гена домашнего хозяйства *Actin42A*. Величина *P*-value получена с помощью теста Стьюдента с двусторонним распределением. **г** – Конфокальные изображения семенников с иммуноокрашиванием антителами анти-CP190. В верхнем ряду – семенник дикого типа (*yw*). В нижнем ряду – семенник с условным спасением. ДНК окрашивали красителем Hoechst. Непрерывной желтой линией подчеркнуты границы семенников. Звездочкой отмечен апикальный конец семенника. Длинной стрелкой показаны соматические клетки оболочки. Пунктирной линией показано скопление CP190-негативных сперматоцитов. Короткой стрелкой показан CP190-позитивный сперматоцит. Масштаб 10 мкм.

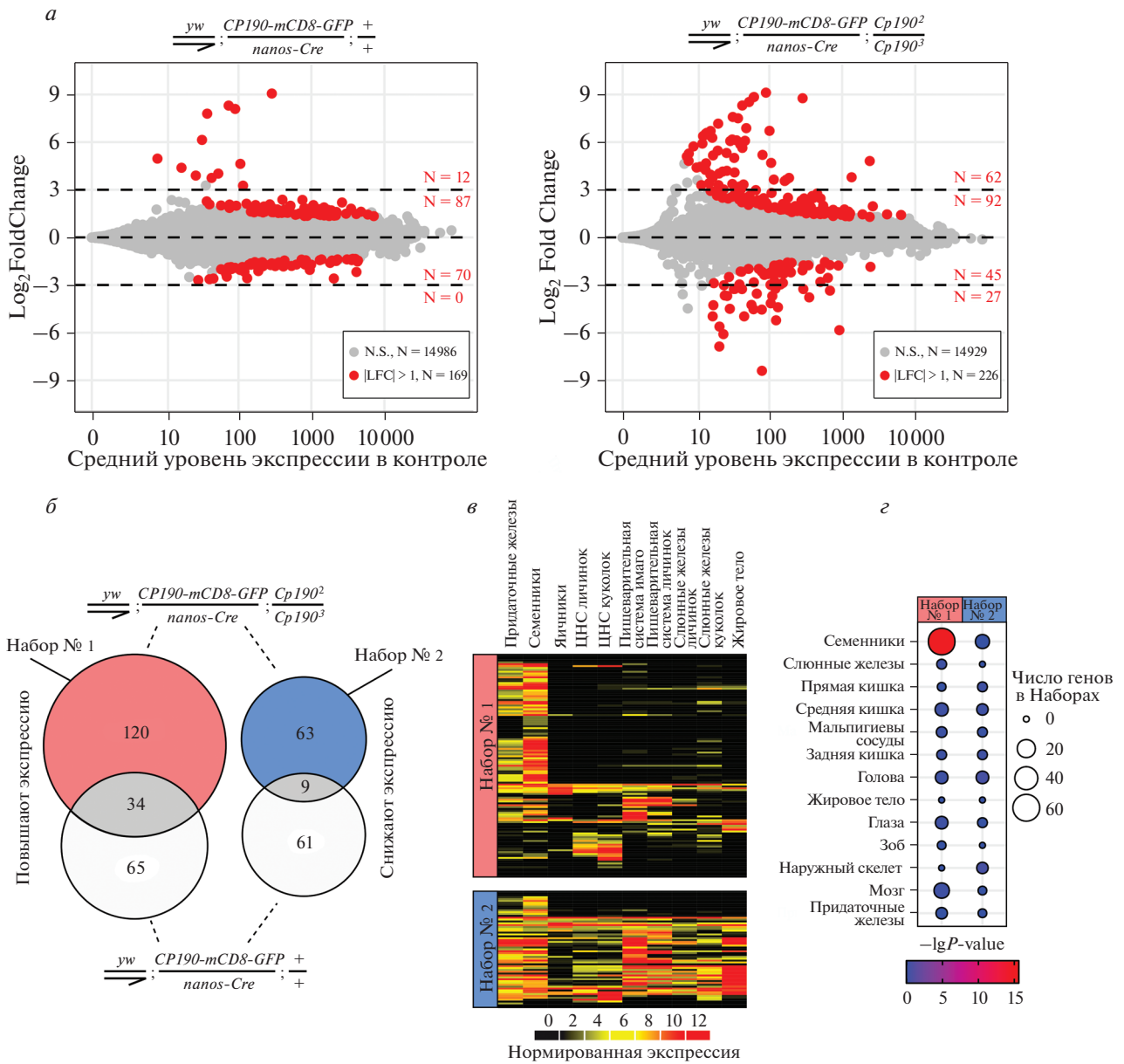


Рис. 3. Истощение CP190 в клетках мужского зародышевого пути сопровождается активацией семенник-специфичных генов и инактивацией генов домашнего хозяйства. *а* – Дифференциальная экспрессия генов в семенниках с повышенной экспрессией CP190 в соматических клетках (диаграмма слева) или в семенниках с условным спасением (диаграмма справа) по результатам РНК-seq. По вертикальной оси отложен логарифмированный диапазон изменения экспрессии ($\text{Log}_2\text{FoldChange}$, LFC) трансгенных семенников по сравнению с контролем. По горизонтальной оси отложена нормированная средняя экспрессия в семенниках контрольной линии. Гены со статистически значимым изменением экспрессии ($|\text{LFC}| > 1$, $P < 0.05$) помечены красным цветом. Значения LFC генов с незначимым изменением экспрессии (серые точки, N.S.) были для наглядности усечены при помощи эмпирического байесовского подхода. Пунктирными линиями указаны значения $\text{LFC} \pm 3$ и 0. Красным показано число красных точек со значением LFC в интервале между ближайшими пунктирными линиями. *б* – Пересечение между множествами генов, экспрессия которых значимо повысилась и понизилась в семенниках с условным спасением или в семенниках с повышенной экспрессией CP190 в соматических клетках (красные точки на диаграмме *а*). Гены, экспрессия которых изменилась только на фоне условного спасения, обозначены как Набор № 1 и Набор № 2. *в* – Нормированная экспрессия генов из Наборов № 1 и № 2 в разных тканях дрозофилы по данным modENCODE [28]. *г* – Анализ тканеспецифичной экспрессии CP190-зависимых генов в клетках мужского зародышевого пути.

лась, 72 — понизилась), транскрипция 43 изменялась и на фоне повышенной экспрессии *Cr190* (у 34 генов повысилась, у 9 снизилась) (рис. 3б). Эти 43 гена были исключены из дальнейшего анализа, направленного на выделение специфического эффекта мутации в гене *Cr190* на экспрессию генов в клетках зародышевого пути.

После этой поправки обнаружили 120 генов, чья экспрессия усиливалась на фоне мутации *Cr190* (Набор № 1), и 63 гена, уровень экспрессии которых снижался (Набор № 2) (рис. 3б). Чтобы охарактеризовать эти выборки, мы проанализировали профили экспрессии входящих в них генов в разных тканях с использованием транскриптомных данных базы modENCODE [28]. Оказалось, что в Наборе №1 можно выделить три основных кластера, представленных генами, активными в мужской репродуктивной, нервной и пищеварительной системах (рис. 3в). Гены же Набора № 2 экспрессируются повсеместно и лишь 14 из них можно причислить к семенник-специфичным. Анализ паттернов экспрессии генов в различных тканях дрозофилы с использованием программы TissueEnrich [30] подтвердил преобладание семенник-специфичных генов в Наборе № 1, но не в Наборе № 2 (рис. 3г). Таким образом, белок *Cr190* может участвовать как в поддержании экспрессии повсеместно активных генов в семенниках, так и в репрессии (или модуляции) активности тканеспецифичных генов, в том числе и генов, участвующих в сперматогенезе.

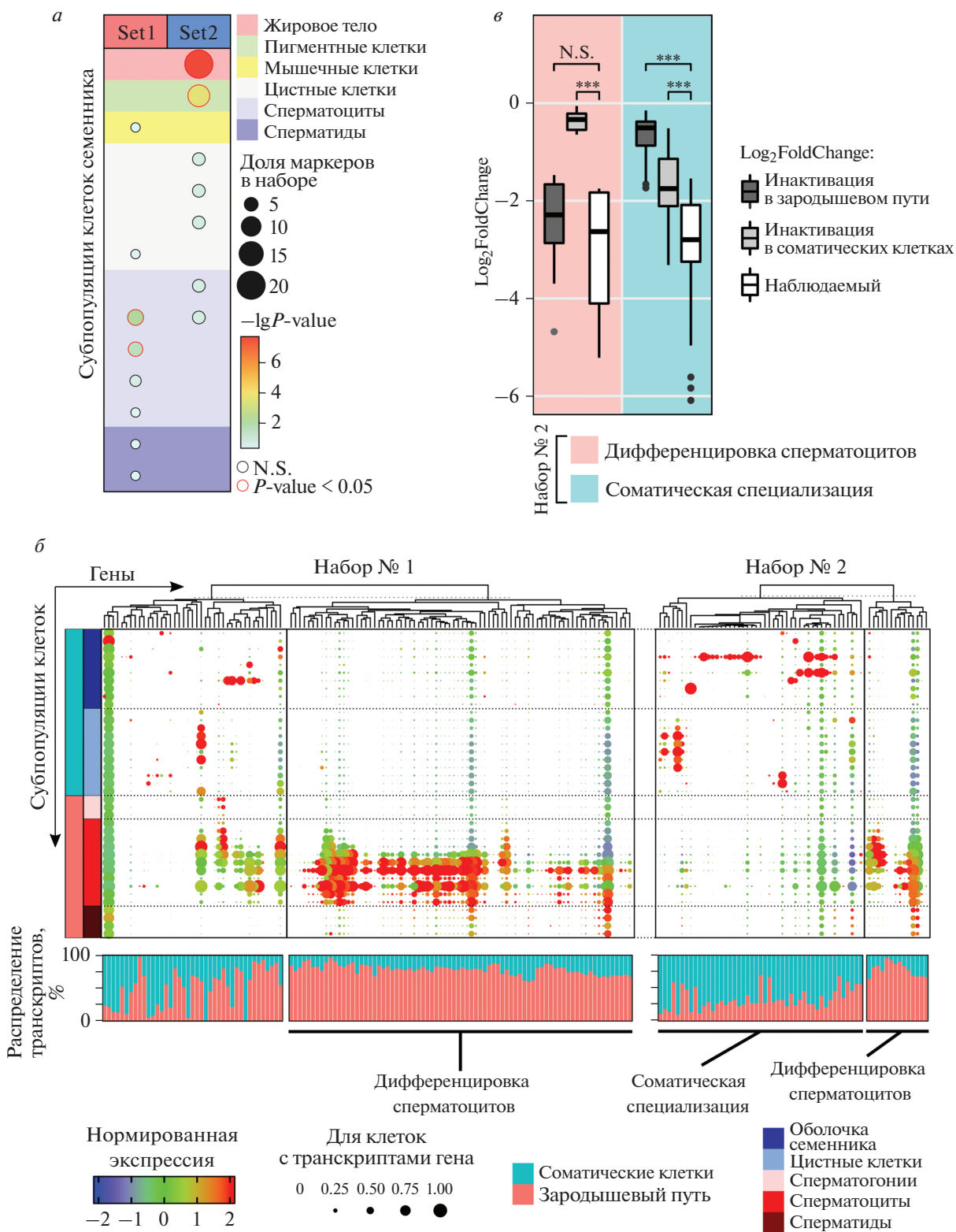
Вместе с тем, необходимо учитывать, что клеточный состав семенника достаточно разнообразен, он представлен несколькими типами соматических клеток, а также клетками зародышевого пути, находящимися на разных стадиях дифференцировки. Различные клеточные типы имеют характерные отличия в профиле экспрессии, что подтверждается данными секвенирования тран-

скриптома единичных клеток семенников. Охарактеризованные профили экспрессии отдельных клеточных популяций позволяют выделить специфичные гены-маркеры, а также установить, в каких клетках активен тот или иной ген в норме.

Чтобы определить, в каких конкретно клетках семенника в норме активны *Cr190*-зависимые гены, мы использовали гены-маркеры различных клеточных популяций семенников дрозофилы из базы данных DRscDB [31, 38]. В Наборе № 1 обнаружены лишь единичные гены-маркеры соматических клеток, тогда как маркеры сперматоцитов в сумме составляли 10% (рис. 4а). В Наборе № 2 маркерами жировых и пигментных клеток были 22% генов, маркеры же клеток зародышевого пути были единичными (рис. 4а). Кластеризация выборки генов Набора № 1 по уровню экспрессии в разных клеточных популяциях семенника с использованием базы данных транскриптома единичных клеток Fly Cell Atlas [31] позволила установить, что транскрипция 66% генов характерна для сперматоцитов (рис. 4б). Не менее 60% экспрессии таких генов обеспечивается клетками зародышевого пути, что позволяет отнести большинство генов Набора № 1 к генам дифференцировки сперматоцитов (рис. 4б). Напротив, лишь пятую часть генов Набора № 2 можно идентифицировать как гены дифференцировки сперматоцитов, а их общее количество в 5.7 раза меньше, чем в Наборе № 1. Все вместе это позволяет предположить, что *Cr190* оказывает преимущественно репрессорное воздействие по отношению к генам дифференцировки сперматоцитов.

Основная часть генов из Набора № 2 в норме активна преимущественно в соматических клетках семенников (рис. 4б). Вместе с тем, оставался открытым вопрос, изменяется ли уровень экспрессии этих генов в клетках зародышевого пути на фоне истощения *Cr190*. С использованием

Рис. 4. Утрата *Cr190* в клетках мужского зародышевого пути приводит к нарушению активности генов дифференцировки сперматоцитов. *a* — Обогащение генов-маркеров клеточных типов в Наборе № 1 и № 2 по данным DRscDB [38]. Клеточные типы аннотированы в эксперименте по секвенированию транскриптома единичных клеток [31], в некоторых случаях они включают несколько субпопуляций с собственным набором генов-маркеров. Принадлежность субпопуляций клеточным типам обозначена цветными прямоугольниками. Размер кругов характеризует представленность маркеров во всем наборе. Статистическая значимость обогащения вычислена в точном тесте Фишера. Маркеры со значимым обогащением обведены красным. *b* — Экспрессия генов из Наборов № 1 и № 2 в клеточных популяциях семенника по данным Fly Cell Atlas [31]. Принадлежность популяций клеточным типам и анатомическим структурам в семеннике закодирована цветными прямоугольниками. Цвет точек характеризует уровень экспрессии гена в сравнении со средней экспрессией в клетках семенника. Размер точек описывает долю клеток в популяции, в которых обнаружены транскрипты данного гена. На столбчатой диаграмме показан вклад клеток зародышевого пути и соматических клеток в общую транскрипцию каждого гена в целом семеннике. При помощи иерархической кластеризации по уровням экспрессии в популяциях клеток гены в каждом наборе разделены на два кластера. В Наборе № 1 отчетливо выделяются гены с высокой активностью в сперматоцитах (гены дифференцировки сперматоцитов). В Наборе № 2 кластеры можно охарактеризовать как гены соматической специализации и гены дифференцировки сперматоцитов. *в* — Сравнение оценок изменения экспрессии в двух кластерах из Набора 2. Оценки диапазона изменений экспрессии ($\text{Log}_2\text{FoldChange}$) получены отдельно для генов дифференцировки сперматоцитов (красный цвет) и генов соматической специализации (синий цвет) из предположения, что в семенниках с условным спасением инактивация произошла только в клетках зародышевого пути (темно-серые прямоугольники) или только в соматических клетках (светло-серые прямоугольники). Наблюдаемые значения $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ показаны белыми прямоугольниками. Условные обозначения: *** $P < 5 \times 10^{-8}$ в тесте Вилкоксона, N.S. — $P > 0.05$.



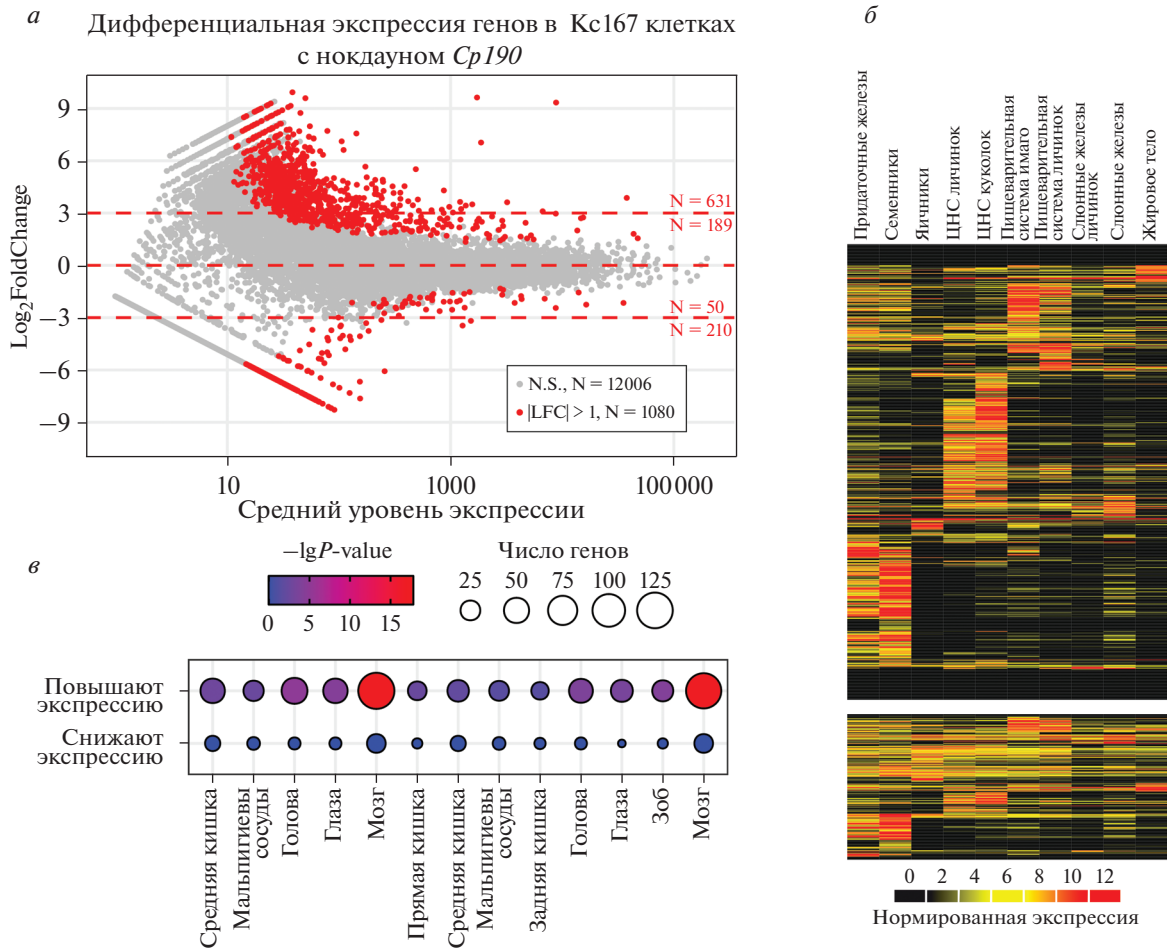


Рис. 5. CP190 подавляет активность тканеспецифичных генов и способствует активации генов домашнего хозяйства в клетках Кс167. *а* – Эффект инактивации *Cp190* в клетках Кс167 согласно данным эксперимента [13]. Дифференциальную экспрессию анализировали таким же способом, как на рис. 3*а*. *б* – Экспрессия CP190-зависимых генов (красные точки на диаграмме *а*) в тканях дрозофилы согласно данным modENCODE [28]. *в* – Анализ тканеспецифичной экспрессии CP190-зависимых генов клеток Кс167.

данных о транскриптомах единичных клеток [31], позволяющих оценить вклад отдельной клеточной популяции семенников в уровень экспрессии генов, мы смоделировали два профиля экспрессии, соответствующих образцам целых семенников, в одном профиле исследуемые гены были инактивированы в клетках зародышевого пути, а в другом – в соматических клетках. На следующем этапе мы сопоставили реальные изменения экспрессии генов Набора № 2 с моделями инактивации генов в отдельных клеточных популяциях. Инактивация генов, активных преимущественно в соматических клетках, только в соматических или только в половых клетках не позволяет смоделировать такое же сильное падение транскрипции, какое мы наблюдали в семенниках с условным спасением ($P < 5 \times 10^{-8}$ в тесте Вилкоксона) (рис. 4*в*). Напротив, оценка генов дифференцировки сперматоцитов, полученная на основе гипотезы об инактивации в зародышевом пути, не

отличается от реальных значений ($P = 0.23$ в тесте Вилкоксона) (рис. 4*в*). Такое наблюдение может указывать на то, что падение транскрипции генов Набора № 2, характерных для соматических клеток, происходит как в половых, так и в соматических клетках.

Интересно отметить, что схожие регуляторные эффекты CP190 обнаружены и в культуре соматических клеток дрозофилы. С использованием полученных ранее данных транскриптомного анализа клеток Кс167 на фоне инактивации *Cp190* посредством РНК-интерференции мы обнаружили повышение экспрессии 820 генов и снижение только 260 (рис. 5*а*) [13]. Активирующиеся гены также представлены преимущественно генами, специфичными для семенников, нервной ткани и пищеварительной системы (рис. 5*б*, *в*). Гены же, экспрессия которых снижалась на фоне истощения *Cp190*, имели неспецифичные профили экспрессии (рис. 5*б*, *в*).

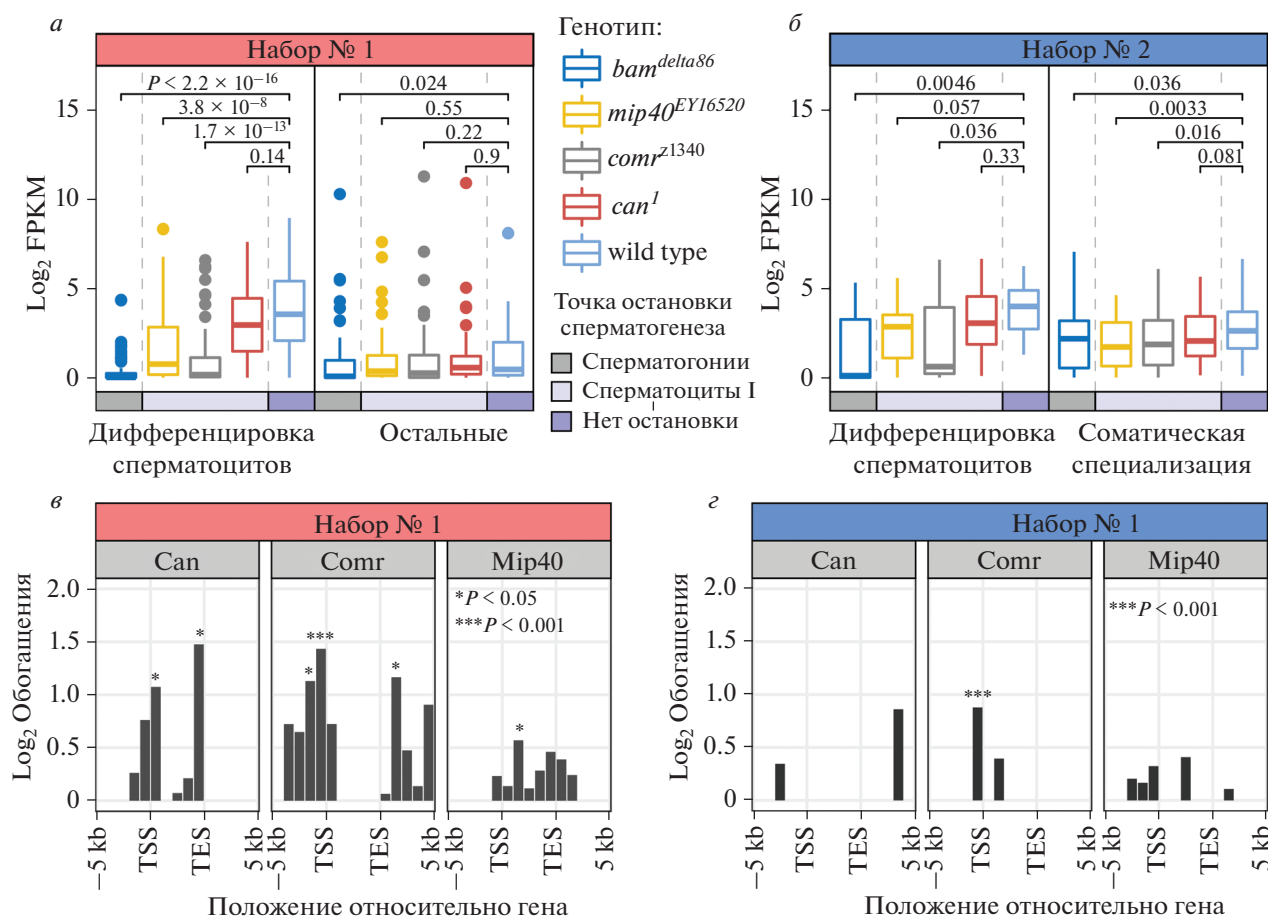


Рис. 6. Делеция CP190 в клетках мужского зародышевого пути приводит к нарушению активности tMAC-зависимых генов дифференцировки сперматоцитов. *a* – Экспрессия генов из двух кластеров Набора № 1 в семенниках дикого типа и мутантов с нарушением дифференцировки клеток мужского зародышевого пути. Цветными прямоугольниками показано на каких стадиях сперматогенеза останавливается дифференцировка клеток в семенниках каждого генотипа. Гены *mip40* и *comr* кодируют компоненты семенник-специфичного транскрипционного активатора tMAC. Ген *can* кодирует один из белков tTAF. Статистическая значимость отличий экспрессии генов в семенниках мутантов и дикого типа установлена в тесте Вилкоксона. *б* – Обогащение Набора № 1 генами, вокруг которых в хромосомах клеток зародышевого пути самцов в разных участках связываются транскрипционные факторы Can, Comr и Mip40 [18]. Статистическая значимость обогащения измерена с помощью точного теста Фишера. Обозначения: TSS – сайт начала транскрипции; TES – сайт завершения транскрипции. *в* – То же, что в *a*, для генов из двух кластеров Набора № 2. *г* – То же, что в *б*, для генов из Набора № 2.

Мутация *Sr190* нарушает экспрессию генов-мишеней tMAC

Активация генов дифференцировки происходит скоординировано в фазе роста сперматоцитов первого порядка. Описано несколько мутаций, которые нарушают этот процесс [17]. Так, мутация гена *bat* вызывает остановку сперматогенеза на стадии сперматогониев, в результате чего семенники обогащаются слабо дифференцированными клетками зародышевого пути [39]. Гены *mip40*, *comr* и *can* являются генами задержки мейоза, они кодируют транскрипционные факторы, а их мутации приводят к остановке сперматогенеза на стадии первичных сперматоцитов [17].

Нарушения в работе Mip40 и Comr, которые входят в состав семенник-специфичного ком-

плекса задержки мейоза tMAC, вызывают драматичные изменения экспрессии генов в семенниках [17, 18]. Нарушения же в работе белков из группы семенник-специфичных факторов транскрипции tTAF, включая Can, вызывают менее выраженные изменения в транскриптите семенников. Вместе tTAF и tMAC обеспечивают активацию программы дифференцировки сперматоцитов, причем только часть генов регулируется этими факторами напрямую [18].

Учитывая связь CP190 с генами дифференцировки, мы предположили функциональное взаимодействие между CP190, tTAF и tMAC. Ранее мы получили профили экспрессии генов в семенниках мутантов *bat*, *mip40*, *comr* и *can*, а также картировали сайты связывания Mip40, Comr и Can с хромосомами в клетках зародышевого пути [18].

Мы проанализировали экспрессию генов, которые активируются в семенниках с условным спасением (Набор № 1), в семенниках дикого типа и мутантов *bat*, *mip40*, *comr* и *can* (рис. 6а).

Активность генов дифференцировки сперматоцитов из Набора № 1 (рис. 4б) значительно снижена у мутантов *bat*, *mip40* и *comr*, но не у мутантов *can* (рис. 6а). Остальные гены из Набора № 1 почти не реагируют на мутации *mip40*, *comr* и *can*, только мутация *bat* приводит к незначительному снижению их экспрессии, что можно объяснить присутствием среди них генов с высокой активностью в сперматоцитах (рис. 4б). Таким образом, CP190 ограничивает активность tMAC-зависимых генов дифференцировки сперматоцитов.

Профили распределения *Comr*, *Mip40* и *Can* на хромосомах показывают, что эти белки чаще ожидаемого связываются с генами из Набора № 1, причем наиболее интенсивно связывается транскрипционный фактор *Comr* (рис. 6б). Таким образом, мутация *Sp190* затрагивает активность генов, непосредственно регулируемых комплексом tMAC.

Для экспрессии генов Набора № 2 характерны менее выраженные различия между мутантами *bat*, *mip40*, *comr* и *can*, и диким типом (рис. 6в), хотя и у мутантов с нарушениями в tMAC, и у мутантов *bat* снижается экспрессия генов дифференцировки сперматоцитов и генов, характерных для соматических клеток. Гены из Набора № 2 имеют некоторую связь с транскрипционным фактором *Comr* (рис. 6г), что указывает на возможность прямой активации их экспрессии комплексом tMAC, и белок CP190 участвует в этом процессе.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В этой работе мы подробно изучили влияние белка CP190 на активность генов в клетках зародышевого пути *D. melanogaster*. Как оказалось, основное влияние мутация *Sp190* оказывает на субпопуляцию генов дифференцировки сперматоцитов, которые регулируются транскрипционным комплексом tMAC. Интересно, что в отсутствие белка CP190 активность этих генов усиливается в 2 раза и более, что позволяет сделать вывод о модуляции их активности этим белком в норме, ограничивающим уровень их экспрессии.

В целом, на культурах клеток дрозофилы показаны умеренные изменения транскриптома на фоне истощения инсуляторного белка CP190 [8, 13, 40]. Нами также выявлены лишь 183 гена, экспрессия которых зависит от CP190 в сперматоцитах. Экспрессия 120 из этих генов повышалась на фоне мутации *Sp190*, а 63 – снижалась, что говорит в пользу преобладающей репрессорной функции CP190. На культурах клеток показано

также, что CP190, как и другие инсуляторные белки, в большей степени склонен к подавлению транскрипции, несмотря на одновременную активаторную функцию [13, 41].

Мы обнаружили, что CP190 противоположным образом влияет на активность тканеспецифичных генов и генов домашнего хозяйства, что указывает на возможность существования нескольких механизмов, с помощью которых CP190 контролирует активность этих генов. Можно предположить, что CP190 способен выступать в качестве транскрипционного фактора для генов, активация которых зависит от CP190. Это косвенно подтверждается тем, что для активации CP190-связанных генов требуется кооперативное действие CP190 и фактора M1BP – регулятора генов домашнего хозяйства [13]. Причем промоторы генов, экспрессия которых снижается в клетках с нокдауном, обогащены CP190, в то время как репрессорный эффект CP190, по всей вероятности, реализуется не напрямую [13].

Важно отметить, что активация генетической программы дифференцировки клеток мужского зародышевого пути сопровождается значительной перестройкой архитектуры хроматина [42]. Так, на стадии сперматоцитов уменьшается количество дистальных контактов, а промоторы активных генов дифференцировки оказываются в изолированном окружении [42]. Показано участие CP190, наряду с белком Chro, в формировании и поддержании топологически ассоциированных доменов (ТАД) [41]. Причем обнаружено, что нарушение экспрессии генов в результате удаления CP190 коррелирует с изменением границ окружающего их ТАД [41]. Более того, ТАДы, содержащие гены домашнего хозяйства, имеют тенденцию к более высокой стабильности [41]. Это позволяет предположить, что наблюдаемое дифференциальное влияние CP190 на экспрессию тканеспецифичных генов и генов домашнего хозяйства может быть обусловлено различиями в механизмах регуляции на уровне структуры хроматина, в результате чего гены домашнего хозяйства активируются под действием CP190, тогда как тканеспецифичные гены подавляются.

Учитывая отсутствие влияния на дифференцировку клеток мужского зародышевого пути, нормальную фертильность мутантных самцов, а также умеренный эффект на изменение паттерна экспрессии генов, инсуляторный белок CP190 вряд ли можно рассматривать в качестве ключевого регуляторного фактора сперматогенеза. Для сравнения, мутация *comr* (tMAC) затрагивает экспрессию более 2500 генов и вызывает задержку мейоза [43]. Однако с учетом ключевой роли CP190 в регуляции архитектуры ядра можно предположить, что недостаточность CP190 приводит к сбоям в коммуникации специфичных

факторов транскрипции и их регуляторных элементов, а также к более общим нарушениям структуры хроматина, что вызывает нарушения в механизмах тонкой регуляции экспрессии.

В ходе исследования мы обнаружили, что нарушение экспрессии CP190 приводит к инактивации tMAC-зависимых генов дифференцировки сперматоцитов. Примечательно, что в соматических клетках дрозофилы функционирует гомологичный tMAC репрессорный комплекс dREAM — партнер CP190, основная функция которого состоит в регуляции генов дифференцировки и клеточного цикла [44–47]. Взаимодействие CP190 и dREAM в культурах клеток играет важную роль в управлении парами дивергентных генов — близлежащих генов с противоположно направленными промоторами [46]. Привлечение dREAM к дивергентным генам дрозофилы происходит за счет CP190 и позволяет добиваться снижения экспрессии только одного гена в паре. Наличие у dREAM и tMAC общих субъединиц (например, Mir40 и Caf1), а также связь между CP190 и tMAC-зависимыми генами позволяет предположить, что CP190 участвует в привлечении tMAC к хромосомам. Дальнейшие исследования позволят объяснить, почему основной эффект истощения CP190 в клетках мужского зародышевого пути заключается в дерегуляции генов дифференцировки сперматоцитов.

Авторы работы выражают благодарность А.К. Головнину (ИБГ РАН) за предоставленные антитела, А.В. Пиндюрину (ИМКБ СР РАН) за помощь в клонировании, а также ЦКП “Молекулярная и клеточная биология” за предоставленное оборудование.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научных проектов № 19-34-90108, 17-00-00181, 20-34-70141 и 19-04-00872, а также при поддержке Программы фундаментальных научных исследований FWGZ-2021-0017 (122011900429-5).

Условия содержания *Drosophila melanogaster* соответствовали нормативам, указанным в Приказе Минздрава России № 267 от 19.06.2003 “Об утверждении правил лабораторной практики в Российской Федерации”.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Long H.K., Prescott S.L., Wysocka J. (2016) Ever-changing landscapes: transcriptional enhancers in development and evolution. *Cell*. **167**, 1170–1187.
- Kyrchanova O., Georgiev P. (2014) Chromatin insulators and long-distance interactions in *Drosophila*. *FEBS Lett*. **588**, 8–14.
- Yang J., Corces V.G. (2011) Chromatin insulators: a role in nuclear organization and gene expression. In: *Advances in Cancer Res.* Ed. Woude G.W. **110**. London: Acad. Press, 43–76.
- Nègre N., Brown C.D., Shah P.K., Kheradpour P., Morrison C.A., Henikoff J.G., Feng X., Ahmad K., Russell S., White R.A.H., Stein L., Henikoff S., Kellis M., White K.P. (2010) A comprehensive map of insulator elements for the *Drosophila* genome. *PLoS Genet*. **6**, e1000814.
- Maksimenko O., Bartkuhn M., Stakhov V., Herold M., Zolotarev N., Jox T., Buxa M.K., Kirsch R., Bonchuk A., Fedotova A., Kyrchanova O., Renkawitz R., Georgiev P. (2015) Two new insulator proteins, Pita and ZIPIC, target CP190 to chromatin. *Genome Res*. **25**, 89–99.
- Zolotarev N., Maksimenko O., Kyrchanova O., Sokolinskaya E., Osadchiy I., Girardot C., Bonchuk A., Ciglar L., Furlong E.E.M., Georgiev P. (2017) Opbp is a new architectural/insulator protein required for ribosomal gene expression. *Nucl. Acids Res*. **45**, 12285–12300.
- Cuartero S., Fresán U., Reina O., Planet E., Espinàs M.L. (2014) Ibf1 and Ibf2 are novel CP190-interacting proteins required for insulator function. *EMBO J*. **33**, 637–647.
- Schwartz Y.B., Linder-Basso D., Kharchenko P.V., Tolstorukov M.Y., Kim M., Li H.-B., Gorchakov A.A., Minoda A., Shanower G., Alekseyenko A.A., Riddle N.C., Jung Y.L., Gu T., Plachetka A., Elgin S.C.R., Kuroda M.I., Park P.J., Savitsky M., Karpen G.H., Pirrotta V. (2012) Nature and function of insulator protein binding sites in the *Drosophila* genome. *Genome Res*. **22**, 2188–2198.
- Kaushal A., Dorier J., Wang B., Mohana G., Taschner M., Cousin P., Waridel P., Iseli C., Semenova A., Restrepo S., Guex N., Aiden E. L., Gambetta M.C. 2022. Essential role of Cp190 in physical and regulatory boundary formation. *Sci. Adv*. **8**, eabl8834.
- Sabirov M., Kyrchanova O., Pokholkova G.V., Bonchuk A., Klimenko N., Belova E., Zhimulev I.F., Maksimenko O., Georgiev P. (2021) Mechanism and functional role of the interaction between CP190 and the architectural protein Pita in *Drosophila melanogaster*. *Epigenet. Chromatin*. **14**, 16.
- Bohla D., Herold M., Panzer I., Buxa M.K., Ali T., Demmers J., Krüger M., Scharfe M., Jarek M., Bartkuhn M., Renkawitz R. (2014) A functional insulator screen identifies NURF and dREAM components to be required for enhancer-blocking. *PLoS One*. **9**, e107765.
- Ali T., Krüger M., Bhuju S., Jarek M., Bartkuhn M., Renkawitz R. (2017) Chromatin binding of Gcn5 in *Drosophila* is largely mediated by CP190. *Nucl. Acids Res*. **45**, 2384–2395.
- Bag I., Chen S., Rosin L.F., Chen Y., Liu C.-Y., Yu G.-Y., Lei E.P. (2021) M1BP cooperates with CP190 to activate transcription at TAD borders and promote chromatin insulator activity. *Nat. Commun*. **12**, 4170.
- Savitsky M., Kim M., Kravchuk O., Schwartz Y.B. (2016) Distinct roles of chromatin insulator proteins in control of the *Drosophila* bithorax complex. *Genetics*. **202**, 601–617.

15. Butcher R.D.J., Chodagam S., Basto R., Wakefield J.G., Henderson D.S., Raff J.W., Whitfield W.G.F. (2004) The *Drosophila* centrosome-associated protein CP190 is essential for viability but not for cell division. *J. Cell Sci.* **117**, 1191–1199.
16. Oliver D., Sheehan B., South H., Akbari O., Pai C.Y. (2010) The chromosomal association/dissociation of the chromatin insulator protein Cp190 of *Drosophila melanogaster* is mediated by the BTB/POZ domain and two acidic regions. *BMC Cell Biol.* **11**, 101.
17. White-Cooper H. (2010) Molecular mechanisms of gene regulation during *Drosophila* spermatogenesis. *Reproduction.* **139**, 11–21.
18. Laktionov P.P., Maksimov D.A., Romanov S.E., Antoshina P.A., Posukh O.V., White-Cooper H., Koryakov D.E., Belyakin S.N. (2018) Genome-wide analysis of gene regulation mechanisms during *Drosophila* spermatogenesis. *Epigenetics Chromatin.* **11**, 14.
19. Markstein M., Pitsouli C., Villalta C., Celniker S.E., Perrimon N. (2008) Exploiting position effects and the gypsy retrovirus insulator to engineer precisely expressed transgenes. *Nat. Genet.* **40**, 476–483.
20. Лактионов П.П., Максимов Д.А., Андреева Е.Н., Шлома В.В., Белякин С.Н. (2013) Генетическая система для мечения соматических и герминальных клеточных линий в гонадах *Drosophila melanogaster*. *Цитология.* **55**, 185–189.
21. Solovei I., Cremer M. (2010) 3D-FISH on cultured cells combined with immunostaining. In: *Methods Mol. Biol.* **659**. Eds Bridger J.M., Volpi E.M. New York: Humana Press, 117–126.
22. Golovnin A., Volkov I., Georgiev P. (2012) SUMO conjugation is required for the assembly of *Drosophila* Su(Hw) and Mod(mdg4) into insulator bodies that facilitate insulator complex formation. *J. Cell Sci.* **125**, 2064–2074.
23. Kim D., Paggi J.M., Park C., Bennett C., Salzberg S.L. (2019) Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat. Biotechnol.* **37**, 907–915.
24. Liao Y., Smyth G.K., Shi W. (2014) FeatureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics.* **30**, 923–930.
25. Love M.I., Huber W., Anders S. (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **15**, 550.
26. Stephens M. (2016) False discovery rates: a new deal. *Biostatistics.* **18**, 275–294.
27. Ignatiadis N., Klaus B., Zaugg J.B., Huber W. (2016) Data-driven hypothesis weighting increases detection power in genome-scale multiple testing. *Nat. Meth.* **13**, 577–580.
28. Brown J.B., Boley N., Eisman R., May G.E., Stoiber M.H., Duff M.O., Booth B.W., Wen J., Park S., Suzuki A.M., Wan K.H., Yu C., Zhang D., Carlson J.W., Cherbas L., Eads B.D., Miller D., Mockaitis K., Roberts J., Davis C.A., Frise E., Hammonds A.S., Olson S., Shenker S., Sturgill D., Samsonova A.A., Weizmann R., Robinson G., Hernandez J., Andrews J., Bickel P.J., Carninci P., Cherbas P., Gingers T.R., Hoskins R.A., Kaufman T.C., Lai E.C., Oliver B., Perrimon N., Graveley B.R., Celniker S.E. (2014) Diversity and dynamics of the *Drosophila* transcriptome. *Nature.* **512**, 393–399.
29. de Hoon M.J.L., Imoto S., Nolan J., Miyano S. (2004) Open source clustering software. *Bioinformatics.* **20**, 1453–1454.
30. Jain A., Tuteja G. (2019) TissueEnrich: tissue-specific gene enrichment analysis. *Bioinformatics.* **35**, 1966–1967.
31. Li H., Janssens J., De Waegeneer M., Kolluru S.S., Davie K., Gardeux V., Saelens W., David F.P.A., Brbić M., Spanier K., Leskovec J., McLaughlin C.N., Xie Q., Jones R.C., Brueckner K., Shim J., Tattikota S.G., Schnorrer F., Rust K., Nystul T.G., Carvalho-Santos Z., Ribeiro C., Pal S., Mahadevaraju S., Przytycka T.M., Allen A.M., Goodwin S.F., Berry C.W., Fuller M.T., White-Cooper H., Matunis E.L., DiNardo S., Galenza A., O'Brien L.E., Dow J.A.T.; FCA Consortium, Jasper H., Oliver B., Perrimon N., Deplancke B., Quake S.R., Luo L., Aerts S., Agarwal D., Ahmed-Braimah Y., Arbeitman M., Ariss M.M., Augsburg J., Ayush K., Baker C.C., Banisch T., Birker K., Bodmer R., Bolival B., Brantley S.E., Brill J.A., Brown N.C., Buehner N.A., Cai X.T., Cardoso-Figueiredo R., Casares F., Chang A., Clandinin T.R., Crasta S., Desplan C., Detweiler A.M., Dhakan D.B., Donà E., Engert S., Floc'hlay S., George N., González-Segarra A.J., Groves A.K., Gumbin S., Guo Y., Harris D.E., Heifetz Y., Holtz S.L., Horns F., Hudry B., Hung R.J., Jan Y.N., Jaszczak J.S., Jeffers G.S.X.E., Karkanas J., Karr T.L., Katheder N.S., Kezou J., Kim A.A., Kim S.K., Kockel L., Konstantinides N., Kornberg T.B., Krause H.M., Labott A.T., Laturney M., Lehmann R., Leinwand S., Li J., Li J.S.S., Li K., Li K., Li L., Li T., Litovchenko M., Liu H.H., Liu Y., Lu T.C., Manning J., Mase A., Matera-Vatnick M., Matias N.R., McDonough-Goldstein C.E., McGeever A., McLachlan A.D., Moreno-Roman P., Neff N., Neville M., Ngo S., Nielsen T., O'Brien C.E., Osumi-Sutherland D., Özel M.N., Papatheodorou I., Petkovic M., Pilgrim C., Pisco A.O., Reisenman C., Sanders E.N., Dos Santos G., Scott K., Sherlekar A., Shiu P., Sims D., Sit R.V., Slaidina M., Smith H.E., Sterne G., Su Y.H., Sutton D., Tamayo M., Tan M., Tastekin I., Treiber C., Vacek D., Vogler G., Waddell S., Wang W., Wilson R.I., Wolfner M.F., Wong Y.E., Xie A., Xu J., Yamamoto S., Yan J., Yao Z., Yoda K., Zhu R., Zinzen R.P. (2022) Fly Cell Atlas: a single-nucleus transcriptomic atlas of the adult fruit fly. *Science.* **375**, eabk2432.
32. Hao Y., Hao S., Andersen-Nissen E., Mauck W.M., Zheng S., Butler A., Lee M.J., Wilk A.J., Darby C., Zager M., Hoffman P., Stoeckius M., Papalexi E., Mimitou E.P., Jain J., Srivastava A., Stuart T., Fleming L.M., Yeung B., Rogers A.J., McElrath J.M., Blish C.A., Gottardo R., Smibert P., Satija R. (2021) Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell.* **184**, 3573–3587. e29.
33. Maksimov D.A., Laktionov P.P., Belyakin S.N. (2016) Data analysis algorithm for DamID-seq profiling of chromatin proteins in *Drosophila melanogaster*. *Chromosome Res.* **24**(4), 481–494.
34. Akbari O.S., Oliver D., Eyer K., Pai C.-Y.Y. (2009) An entry/gateway cloning system for general expression of genes with molecular tags in *Drosophila melanogaster*. *BMC Cell Biol.* **10**, 8.

35. Evans C.J., Olson J.M., Ngo K.T., Kim E., Lee N.E., Kuoy E., Patananan A.N., Sitz D., Tran P., Do M.-T., Yackle K., Cespedes A., Hartenstein V., Call G.B., Banerjee U. (2009) G-TRACE: rapid Gal4-based cell lineage analysis in *Drosophila*. *Nat. Methods*. **6**, 603–605.
36. Pindyurin A.V., Pagie L., Kozhevnikova E.N., van Arensbergen J., van Steensel B. (2016) Inducible DamID systems for genomic mapping of chromatin proteins in *Drosophila*. *Nucl. Acids Res.* **44**, 5646–5657.
37. Lee T., Luo L. (2001) Mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) for *Drosophila* neural development. *Trends Neurosci.* **24**, 251–254.
38. Hu Y., Tattikota S.G., Liu Y., Comjean A., Gao Y., Forman C., Kim G., Rodiger J., Papatheodorou I., Santos G.D., Mohr S.E., Perrimon N. (2021) DRscDB: A single-cell RNA-seq resource for data mining and data comparison across species. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **19**, 2018–2026.
39. Gönczy P., Matunis E., DiNardo S. (1997) bag-of-marbles and benign gonial cell neoplasm act in the germline to restrict proliferation during *Drosophila* spermatogenesis. *Development*. (Cambridge, England). **124**, 4361–4371.
40. Bartkuhn M., Straub T., Herold M., Herrmann M., Rathke C., Saumweber H., Gilfillan G.D., Becker P.B., Renkawitz R. (2009) Active promoters and insulators are marked by the centrosomal protein 190. *EMBO J.* **28**, 877–888.
41. Chathoth K.T., Mikheeva L.A., Crevel G., Wolfe J.C., Hunter I., Beckett-Doyle S., Cotterill S., Dai H., Harrison A., Zabet N.R. (2022) The role of insulators and transcription in 3D chromatin organization of flies. *Genome Res.* **32**, 682–698.
42. Ilyin A.A., Kononkova A.D., Golova A.V., Shloma V.V., Olenkina O.M., Nenashcheva V.V., Abramov Y.A., Kotov A.A., Maksimov D.A., Laktionov P.P., Pindyurin A.V., Galitsyna A.A., Ulianov S.V., Khrameva E.E., Gelfand M.S., Belyakin S.N., Razin S.V., Shevelyov Y.Y. (2022) Comparison of genome architecture at two stages of male germline cell differentiation in *Drosophila*. *Nucl. Acids Res.* **50**, 3203–3225.
43. Лактионов П.П., White-Соорер Н., Максимов Д.А., Белянкин С.Н. (2014) Транскрипционный фактор Comg играет роль прямого активатора в генетической программе сперматогенеза у *D. melanogaster*. *Молекуляр. биология*. **48**, 153–165. <https://doi.org/10.1134/S0026893314010087>
44. Lee H., Ohno K., Voskoboynik Y., Ragusano L., Martinez A., Dimova D.K. (2010) *Drosophila* RB proteins repress differentiation-specific genes via two different mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 2563–2577.
45. DeBruhl H., Wen H., Lipsick J.S. (2013) The complex containing *Drosophila* Myb and RB/E2F2 regulates cytokinesis in a histone H2Av-dependent manner. *Mol. Cell. Biol.* **33**, 1809–1818.
46. Korenjak M., Kwon E., Morris R.T., Anderssen E., Amzallag A., Ramaswamy S., Dyson N.J. (2014) dREAM co-operates with insulator-binding proteins and regulates expression at divergently paired genes. *Nucl. Acids Res.* **42**, 8939–8953.
47. Beall E.L., Lewis P.W., Bell M., Rocha M., Jones D.L., Botchan M.R. (2007) Discovery of tMAC: a *Drosophila* testis-specific meiotic arrest complex paralogous to Myb-Muv B. *Genes Dev.* **21**, 904–919.

Insulator Protein CP190 Regulates Expression of Spermatocyte Differentiation Genes in *Drosophila melanogaster* Male Germline

S. E. Romanov^{1, 2}, V. V. Shloma¹, D. E. Koryakov¹, S. N. Belyakin¹, and P. P. Laktionov^{1, 2, *}

¹*Institute of Molecular and Cellular Biology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

²*Novosibirsk State University, Novosibirsk, 630090 Russia*

*e-mail: laktionov@mcb.nsc.ru

CP190 protein is one of the key components of *Drosophila* insulator complexes, and its study is important for understanding the mechanisms of gene regulation during cell differentiation. However, *Cp190* mutants die before reaching adulthood, which significantly complicates the study of its functions in imago. To overcome this problem and to investigate the regulatory effects of CP190 in adult tissues development, we have designed a conditional rescue system for *Cp190* mutants. Using Cre/loxP-mediated recombination, the rescue construct containing *Cp190* coding sequence is effectively eliminated specifically in spermatocyte, allowing us to study the effect of the mutation in male germ cells. Using high-throughput transcriptome analysis we determined the function of CP190 on gene expression in germline cells. *Cp190* mutation was found to have opposite effects on tissue-specific genes, which expression is repressed by CP190, and housekeeping genes, that require CP190 for activation. Mutation of *Cp190* also promoted expression of a set of spermatocyte differentiation genes that are regulated by tMAC transcriptional complex. Our results indicate that the main function of CP190 in the process of spermatogenesis is the coordination of interactions between differentiation genes and their specific transcriptional activators.

Keywords: CP190, insulator proteins, *Drosophila melanogaster*, RNA-seq