

УДК 575.22:595.773.4

НОВЫЙ PRE-ЭЛЕМЕНТ ГЕНОМА *Drosophila virilis* КАК УДОБНЫЙ МОДЕЛЬНЫЙ САЙЛЕНСЕР

Д. А. Четверина, А. В. Михайлова,
академик РАН П. Г. Георгиев, М. М. Ерохин*

Поступило 14.09.2018 г.

Протестировали активность элемента PRE из генома *Drosophila virilis*, который является гомологом известного элемента *bxdPRE Drosophila melanogaster* из регуляторной области гена *Ubx*. К данному элементу легко подобрать уникальные праймеры, не встречающиеся в геноме *Drosophila melanogaster*. Мы показали, что исследованный нами PRE-элемент обуславливает сильную репрессию маркёрного гена *white* при inserции в геном *Drosophila melanogaster* и взаимодействует с белками PcG комплексов PRC1 и PhoRC.

Ключевые слова: *Drosophila*, Polycomb, PRE-элемент, репрессия транскрипции.

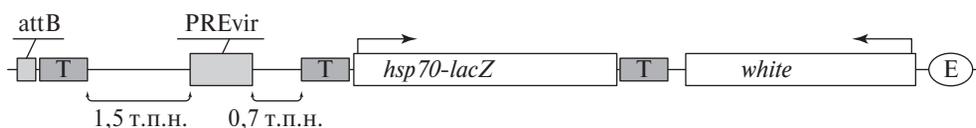
DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524843363-366>

Уровень экспрессии белок-кодирующих генов у многоклеточных организмов контролируется активаторами и репрессорами транскрипции. Среди репрессоров транскрипции наиболее исследованы на сегодняшний день белки группы Polycomb (PcG) [1]. Факторы PcG функционируют в составе белковых комплексов, наиболее изученными из которых являются комплексы PRC1 (Polycomb repressive complex 1) [2–4], PRC2 (Polycomb repressive complex 2) [5, 6] и PhoRC (Pho-repressive Complex) [7]. Данные комплексы рекрутируются на хроматин путём связывания с определёнными участками ДНК — PRE-элементами (Polycomb Response Element) [8, 9]. На сегодня наиболее удобной модельной системой для изучения базовых принципов репрессии транскрипции PcG-факторами и механизмов их рекрутирования на хроматин является плодовая мушка *Drosophila melanogaster* [1]. На данном модельном объекте с использованием трансгенных конструкций, интегрированных в геном, было открыто и исследовано несколько десятков PRE-элементов. Однако при проведении молекулярно-генетических экспериментов на трансгенах, включающих ПЦР, таких как иммунопреципитация хроматина и количественный анализ уровня транскрипции, часто возникают проблемы подбора праймеров, так как одна из копий PRE-элемента находится в трансгене, а вторая — в геноме. Обычно эта задача решается подбором ампликонов ДНК таким образом, чтобы

один из праймеров находился в не имеющем гомологии с геномом участке трансгена, а второй — в области PRE-элемента [10]. Это позволяет получить ампликон ДНК, специфичный только для трансгенного PRE-элемента. Однако такой подход имеет ряд ограничений. Получаемые ампликоны ДНК дают возможность провести анализ только ограниченных концевых участков PRE-элементов, что препятствует полноценному исследованию элементов при их большой длине.

Для решения этой проблемы в настоящей работе был исследован новый PRE-элемент из генома близкородственного вида *Drosophila virilis*. Для данного организма показано сходное с *Drosophila melanogaster* распределение PcG-факторов по геному [11]. Выбранный элемент (далее PREvir) имеет чёткую, но не полную гомологию с хорошо изученным репрессорным элементом генома *Drosophila melanogaster* — элементом *bxdPRE* из регуляторной области гена *Ubx*. Участок ДНК PREvir длиной 920 п.н. был амплифицирован с использованием праймеров 5'-aaataacgagagtaccattcg-3' и 5'-tggcacaggttcacgttga-3' с геномной ДНК *Drosophila virilis* в качестве матрицы. Далее исследуемый элемент был встроен в вектор, содержащий маркёрный ген *white*, под контролем глазного энхансера (рис. 1). Комбинация гена *white* и глазного энхансера обеспечивают красную окраску глаз трансгенных линий мух при отсутствии репрессии. Также в составе вектора находился сайт *attB* для интеграции конструкции в геном с использованием ϕ C31-интегразы. Для исследования активности элемента PREvir выбраны две точки, не-

Институт биологии гена
Российской Академии наук, Москва
*E-mail: yermaxbio@yandex.ru



Точка интеграции	Генотип	Цвет глаз
96E	Гетерозигота	Жёлтый
	Гомозигота	Леталь
68E	Гетерозигота	Жёлтый
	Гомозигота	Жёлтый

Рис. 1. Схема конструкции, использованной для изучения активности элемента PREvir, и фенотипы полученных трансгенных линий *Drosophila melanogaster*. Сверху представлена схема конструкции. Светло-серыми прямоугольниками обозначены элементы attB и PREvir, серые прямоугольники — терминаторы транскрипции SV40, присутствующие в трансгене для блокирования транскрипции посредством PRE. Белые прямоугольники — репортёрные гены *white* и *lacZ*, стрелки вверх — направление транскрипции с репортёрных генов. Белый овал с подписью “E” — глазной энхансер гена *white*.

сущие сайт *attP*, в которые осуществлялась интеграция: 68E и 96E. После трансформации конструкции в геном *Drosophila melanogaster* мы получили линии трансгенных мух, которые имели жёлтую окраску глаз, что свидетельствовало о репрессии гена *white* элементом PREvir (рис. 1). Более того, в точке 96E гомозиготные по конструкции мухи были летальны. Известно, что в ряде точек интеграции в гомозиготном состоянии усиливается PRE-зависимая репрессия транскрипции. Возможно, у гомозигот в точке 96E также происходит усиление репрессии, что приводит к подавлению активности генов, прилежащих к месту интеграции конструкции, и, как следствие, к летальности мух.

Для подтверждения связывания факторов PcG с элементом PREvir мы использовали метод иммунопреципитации хроматина. Хроматин выделяли из гомозиготных по трансгенной конструкции мух линии 68E на взрослой стадии развития. Выделенный хроматин иммунопреципитировали с помощью описанных ранее антител [10, 12, 13] против компонентов комплексов PRC1 (факторы PC и PH) и PhoRC (факторы Pho и dSfmbt). Для анализа результатов иммунопреципитации методом ПЦР в реальном времени мы подобрали три ампликона (первый — праймеры 5'-tacaattcatcagcgatgctctg-3' и 5'-taccacgacttggccatcaa-3', второй — праймеры 5'-gcg-cacatacgtcactctctc-3' и 5'-aaacgctactgccacgctagg-3', третий — праймеры 5'-gagcgaaactgcgacacctaatgg-3' и 5'-acaggttcatcgttgagcgcgctc-3'), которые отсутствовали в составе элемента *bxDPRE* генома *Drosophila melanogaster* (рис. 2a). В качестве положительного контроля для нормирования полученных данных использовали ампликон из последовательности *bxDPRE* генома *Drosophila melanogaster* (праймеры 5'-aagagcaagcgcaagagagagc-3' и 5'-cgtttaagtgcgactgaga-

tgg-3'). В результате мы обнаружили, что все протестированные факторы связывались с элементом PREvir в созданной системе (рис. 2б–д). При этом наибольшую эффективность связывания для белков PH, Pho и dSfmbt наблюдали в области второго ампликона. Вероятно, здесь находится коровый участок элемента PREvir. Связывание же белка PC было эффективным во всех протестированных областях PREvir, что, вероятно, объясняется разными механизмами взаимодействия факторов PcG с хроматином. В то время как основные PcG-белки рекрутируются на небольшой участок ДНК посредством разных ДНК-связывающих факторов, белок PC взаимодействует с гистоновой модификацией H3K27me3, и его связывание, как и обогащение по H3K27me3, распространяется на сотни и тысячи п.н. от коровой области PRE-элементов [10, 14, 15].

На следующем этапе было проанализировано связывание PcG-факторов с элементом PREvir в точке 68E в гетерозиготных по этой конструкции мухах, а также обогащение в гетерозиготных по конструкции мухах в точке 96E. В результате анализа экспериментов по иммунопреципитации хроматина мы установили, что связывание факторов PH и dSfmbt в точке 68E практически не различается у гомо- и гетерозигот (рис. 3). Это согласовывалось с фенотипическими данными, согласно которым цвет глаз был одинаков у гетерозиготных и гомозиготных по конструкции мух. В точке 96E также наблюдали сильное связывание белков PH и dSfmbt.

Таким образом, в настоящей работе нами был описан новый PRE-элемент из генома *Drosophila virilis*. Данный элемент вызывает сильную репрессию репортёрного гена *white* в двух разных районах инсерции трансгенной конструкции. С данным эле-

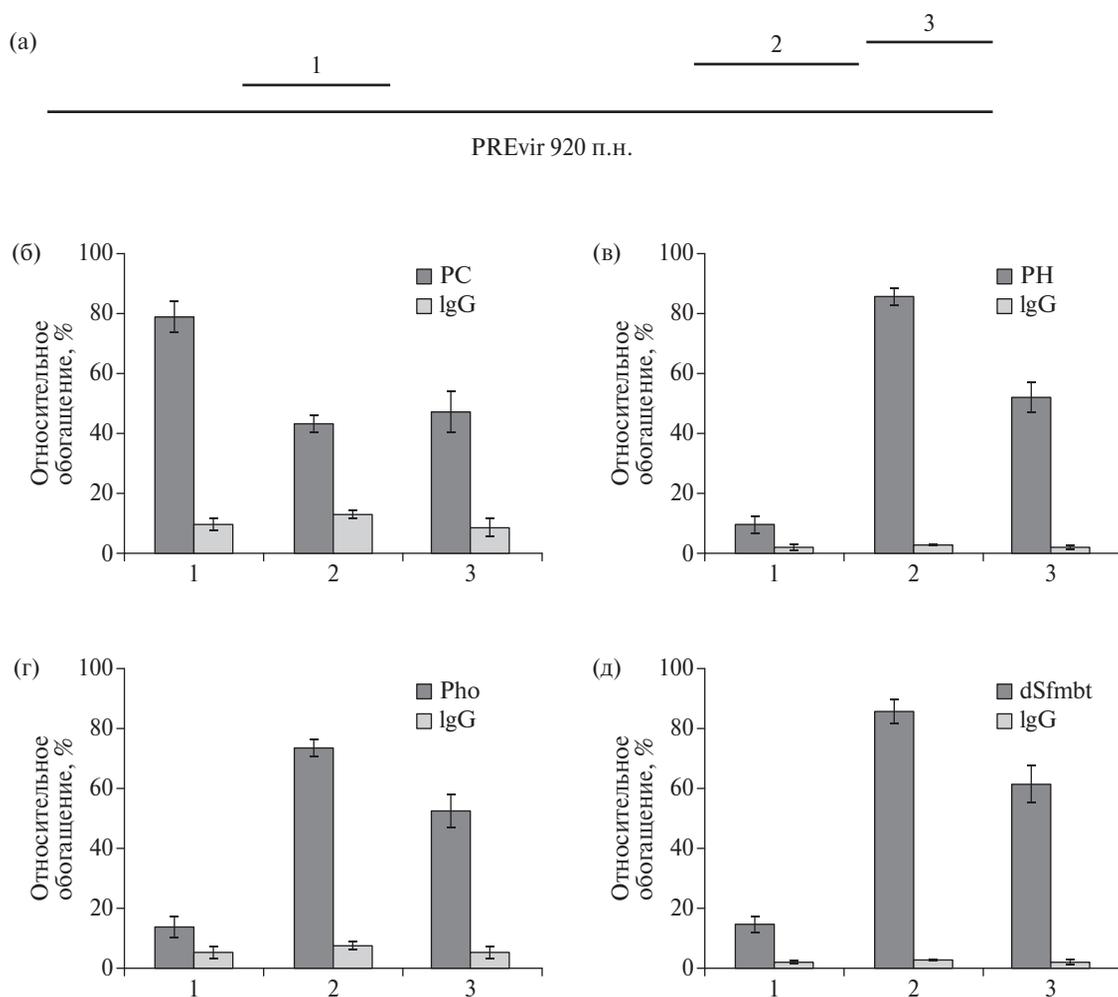


Рис. 2. (а) — схема ампликонов праймеров в последовательности PREvir, подобранных для ПЦР в реальном времени. (б–д) — результат иммунопреципитации хроматина, выделенного из мух трансгенной гомозиготной линии в точке 68E. Обогащения иммунопреципитации хроматина показаны в виде доли от образца Input с нормированием на эндогенный положительный контроль — область *bxdPRE* в геноме *Drosophila melanogaster*. На диаграммах тёмно-серые столбцы — обогащение при использовании кроличьих антител против белков PC, PH, Pho, dSfmbt; серые столбцы — обогащение, полученное при использовании неспецифических антител (IgG неиммунизированного кролика). Здесь и на рис. 3 $M \pm SD$, $n = 3$.

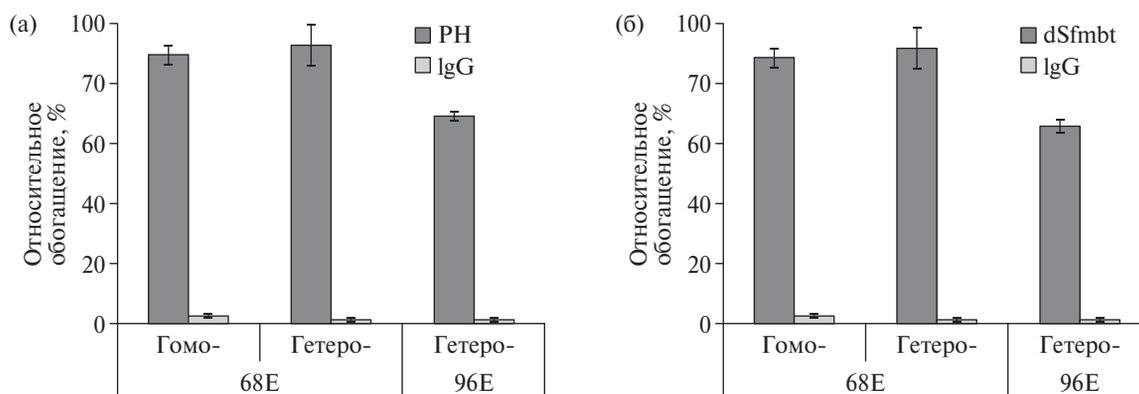


Рис. 3. Результат иммунопреципитации хроматина, выделенного из гетеро- и гомозиготных мух линии 68E и гетерозиготных мух линии 96E. Иммунопреципитацию проводили с использованием антител против PH (а) и dSfmbt (б), а также неспецифических антител. Для ПЦР-анализа использовали пару праймеров из второго ампликона. Остальные обозначения, как на рис. 2.

ментом ассоциированы белки PcG комплексов PRC1 и PhoRC. Удобство использования данного элемента в работе с трансгенными линиями дрозофилы заключается в том, что практически на каждый его участок могут быть подобраны уникальные пары праймеров, не присутствующие в геноме *Drosophila melanogaster*.

В работе использовали инфраструктуру Центра коллективного пользования Института биологии гена Российской академии наук “Биология живой клетки и биомедицинские нанотранспортеры лекарств”.

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда 18–74–10091.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chetverina D.A., Elizar'ev P.V., Lomaev D.V., et al. // Rus. J. Genetics. 2017. V. 53. № 2. P. 157–177.
2. Francis N.J., Saurin A.J., Shao Z., et al. // Mol. Cell. 2001. V. 8. № 3. P. 545–556.
3. Saurin A.J., Shao Z., Erdjument-Bromage H., et al. // Nature. 2001. V. 412. № 6847. P. 655–660.
4. Shao Z., Raible F., Mollaaghababa R., et al. // Cell. 1999. V. 98. № 1. P. 37–46.
5. Czermin B., Melfi R., McCabe D., et al. // Cell. 2002. V. 111. № 2. P. 185–196.
6. Muller J., Hart C.M., Francis N.J., et al. // Cell. 2002. V. 111. № 2. P. 197–208.
7. Klymenko T., Papp B., Fischle W., et al. // Genes and Develop. 2006. V. 20. № 9. P. 1110–1122.
8. Erokhin M., Georgiev P., Chetverina D. // Epigenomes. 2018. V. 2. № 1.
9. Kassis J.A., Brown J.L. // Adv. Genetics. 2013. V. 81. P. 83–118.
10. Erokhin M., Elizar'ev P., Parshikov A., Schedl P., Georgiev P., Chetverina D. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. № 48. P. 14930–14935.
11. Schuettengruber B., Oded Elkayam N., Sexton T., et al. // Cell Repts. 2014. V. 9. № 1. P. 219–233.
12. Elizar'ev P.V., Lomaev D.V., Chetverina D.A., Georgiev P.G., Erokhin M.M. // Acta Naturae. 2016. V. 8. № 2. P. 79–86.
13. Erokhin M., Davydova A., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P., Chetverina D. // Epigenetics & Chromatin. 2013. V. 6. № 1. P. 31.
14. Schuettengruber B., Ganapathi M., Leblanc B., et al. // PLoS Biol. 2009. V. 7. № 1. e13.
15. Schwartz Y.B., Kahn T.G., Nix D.A., et al. // Nature Genetics. 2006. V. 38. № 6. P. 700–705.

A NOVEL PRE-ELEMENT FROM *Drosophila virilis* GENOME AS A USEFUL MODEL SILENCER

D. A. Chetverina, A. V. Mikhailova,
Academician of the RAS P. G. Georgiev, M. M. Erokhin

Received September 14, 2018

We tested the activity of the PRE element from the *Drosophila virilis* genome, which is the homologue of the known *Drosophila melanogaster* bxdPRE element from the regulatory region of the Ubx gene. It is easy to select unique primers to this element that do not occur in the *Drosophila melanogaster* genome. We showed that the studied PRE element causes a strong repression of the white marker gene upon insertion into the *Drosophila melanogaster* genome and interacts with the PcG proteins of the PRC1 and PhoRC complexes.

Keywords: *Drosophila*, Polycomb, PRE, repression of transcription.