

БИОХИМИЯ, БИОФИЗИКА,  
МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ

УДК 575.22:595.773.4

ИССЛЕДОВАНИЕ ИНСУЛЯТОРНОЙ АКТИВНОСТИ dCTCF  
В МОДЕЛЬНЫХ ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЯХ ДРОЗОФИЛЫ

Н. Е. Постика\*, Т. А. Ивлиева, академик РАН П. Г. Георгиев, О. В. Кырчанова

Поступило 25.01.2019 г.

С помощью трансгенных модельных систем дрозофилы показали, что четыре сайта связывания для архитектурного белка dCTCF самостоятельно не могут формировать эффективный инсулятор, который блокирует энхансеры и защищает от Polycomb-зависимой репрессии. Полученные результаты предполагают, что в известных инсуляторах дрозофилы белок dCTCF функционирует в кооперации с другими архитектурными белками.

*Ключевые слова:* CTCF, инсулятор, хроматиновая петля, PRE, дистанционные взаимодействия.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524862262-266>

Белок CTCF является единственным известным архитектурным белком млекопитающих, который консервативен у большей части высших эукариот. У млекопитающих CTCF поддерживает дистанционные взаимодействия и совместно с когезиновым комплексом организует хромосомы в топологически ассоциированные домены (ТАД) [1]. У дрозофилы был найден гомолог CTCF — dCTCF [2], который способен обеспечивать дистанционные взаимодействия [3] и имеет N-концевой димеризующийся домен [4]. Сайты связывания dCTCF были обнаружены на большинстве границ регуляторных доменов, которые обеспечивают правильную экспрессию гомеозисных генов комплекса *bithorax* [5]. В трансгенных линиях дрозофилы фрагменты некоторых границ *bithorax*-комплекса функционируют как инсуляторы, и их активность зависит от dCTCF [2, 6], что позволило отнести dCTCF к классу инсуляторных белков.

В настоящей работе изучали способность белка dCTCF самостоятельно формировать функциональный инсулятор. С этой целью фрагмент ДНК, состоящий из четырёх сайтов связывания для белка dCTCF (CTCF<sup>x4</sup>), исследовали в трансгенных модельных системах на способность функционировать как инсулятор.

Существует два основных критерия, по которым регуляторный элемент может быть отнесён к инсуляторам [7]. Во-первых, инсуляторы блокируют ак-

тивность энхансеров только в том случае, если инсулятор находится между энхансером и промотором гена. Во-вторых, инсуляторы способны выступать в роли барьера между активным и репрессированным хроматином, образованным белками группы Polycomb (Pc).

Для тестирования способности CTCF<sup>x4</sup> блокировать энхансеры мы использовали наиболее часто применяемую модельную систему, состоящую из репортерного гена *mini-white* (*w*), который активируется в глазах тканеспецифичным энхансером (*Ee*). Уровень экспрессии гена *w* оценивали фенотипически по пигментации глаз. Конструкции были созданы на основе P-транспозона, что позволило получить инсерции в случайные разные участки генома дрозофилы [8].

В первой конструкции CTCF<sup>x4</sup> был встроен между энхансером и промотором гена *w* (*Ee*(CTCF<sup>x4</sup>)*w*). Белок CTCF<sup>x4</sup> был окружён *lox*-сайтами, что давало возможность при помощи скрещивания с линией, несущей фаговую Cre-рекомбиназу, индуцировать вырезание данного элемента. Это позволило сравнить экспрессию гена *w* в производных линиях в присутствии или в отсутствие CTCF<sup>x4</sup> в одном и том же месте генома. В результате инъекции ДНК, содержащей конструкцию *Ee*(CTCF<sup>x4</sup>)*w*, в эмбрионы дрозофилы мы получили 6 трансгенных линий, имеющих в геноме одну копию конструкции, что было подтверждено методом ПЦР в реальном времени. В полученных трансгенных линиях мухи имели окраску глаз в пределах от коричневой до тёмно-оранжевой, что предполагает значительную активность

Институт биологии гена Российской Академии наук,  
Москва

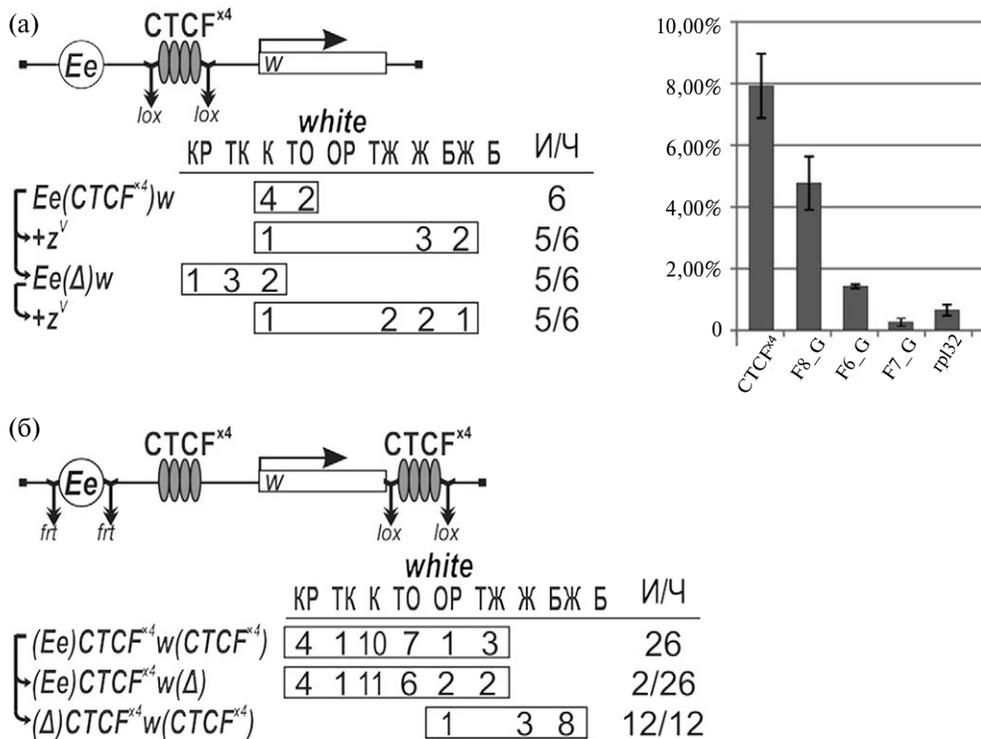
\*E-mail: [nk.postika@gmail.com](mailto:nk.postika@gmail.com)

энхансера глаз (рис. 1а). Для подтверждения роли энхансера в активации репортера *w* мы основывались на ранее полученных данных, что белок *Zeste* является ключевым для поддержания дистанционных взаимодействий между энхансером и промотором *w* [9]. Для проверки активности энхансера использовали мутацию  $z^{y77h}$ , которая полностью инактивирует белок *Zeste*. В результате введения мутации в пять из шести линий окраска глаз резко снизилась, что подтвердило активное участие энхансера в активации *w*-репортера. Для проверки инсуляторной активности фрагмент  $CTCF^{x4}$  был вырезан по *lox*-сайтам, что привело к незначительному усилению пигментации в 5 из 6 трансгенных линий, что можно объ-

яснить слабой инсуляторной активностью сайтов  $CTCF^{x4}$  (рис. 1а).

Отсутствие инсуляции в полученных линиях можно объяснить тем, что *dCTCF* не связывается с сайтами в трансгенной конструкции. Однако иммунопреципитация хроматина (метод описан в [6]), выделенного из куколок трансгенной линии  $(Ee)CTCF^{x4}w$ , подтвердила связывание *dCTCF* с участком  $CTCF^{x4}$ , расположенным между энхансером и промотором *w* (рис. 1а).

Ранее нами было показано [10], что инсуляция может быть значительно усилена за счёт взаимодействия парных инсуляторов с образованием хроматиновой петли, которая стерически ограничивает



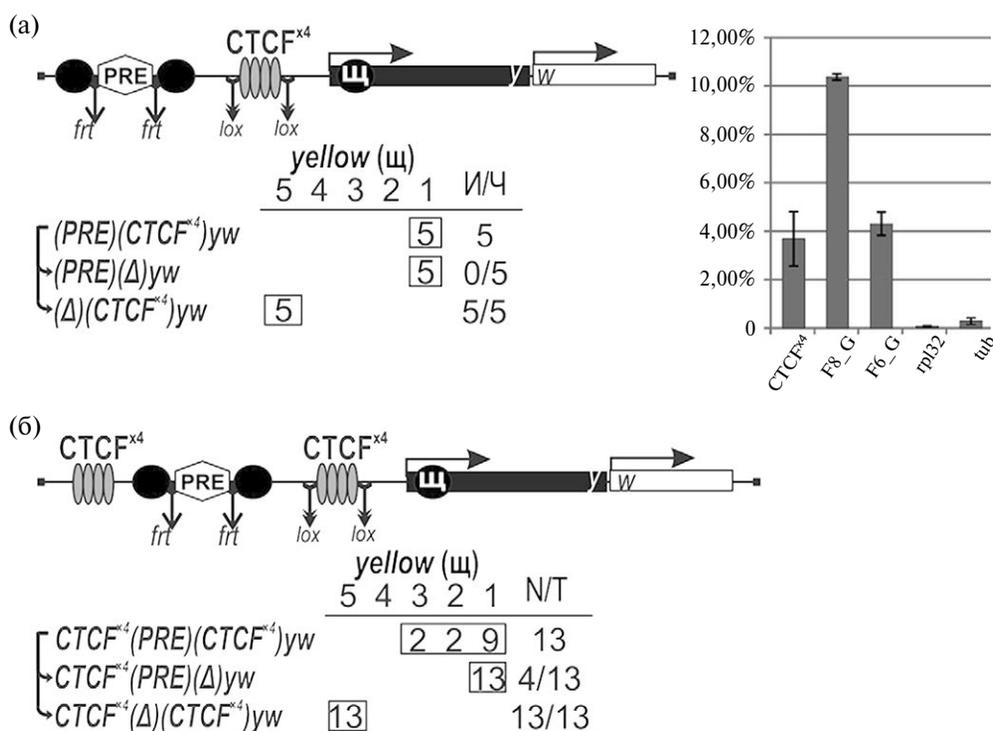
**Рис. 1.**  $CTCF^{x4}$  обладает слабой энхансер-блокирующей способностью. На схемах конструкций ген *mini-white* (*w*) показан в виде белого прямоугольника со стрелкой, указывающей направление транскрипции. Четыре сайта связывания для белка *CTCF* ( $CTCF^{x4}$ ) показаны в виде серых овалов. Стрелки, направленные вниз, указывают на сайты рекомбиназ *Flp* (*frr*) или *Cte* (*lox*); те же сайты в названиях конструкций обозначаются круглыми скобками. Ниже схем представлены результаты экспериментов. Столбец “*white*” показывает количество трансгенных линий с определённой пигментацией глаз. Уровень пигментации, соответствующий экспрессии *w* дикого типа, ярко-красный (КР). Отсутствие экспрессии *w* проявляется белой окраской глаз (Б). Промежуточные уровни пигментации по возрастанию экспрессии *w*: бледно-жёлтый (БЖ), жёлтый (Ж), тёмно-жёлтый (ТЖ), оранжевый (О), тёмно-оранжевый (ТО), коричневый (К) и коричневато-красный (ТК). И/Ч — отношение количества линий, в которых фенотип мух после делеции ( $\Delta$ ) указанного фрагмента ДНК изменился (И) к общему числу линий, просмотренных для каждой конкретной конструкции (Ч). (а) —  $CTCF^{x4}$  слабо инсулирует глазной энхансер (*Ee*) в линиях  $(Ee)CTCF^{x4}w$ . Иммунопреципитация хроматина с антителами к *dCTCF* из куколок [6], показывающая связывание *dCTCF* в области  $CTCF^{x4}$  в линиях  $(Ee)CTCF^{x4}w$ . В качестве положительного контроля взят геномный участок *dCTCF*-связывающих инсуляторов *Fab-8* ( $F8\_G$ ) и *Fab-6* ( $F6\_G$ ), в качестве отрицательного — участки кодирующей области гена *Rpl32* (*rpl32*) и несвязывающей *dCTCF* границы *Fab-7*. Результаты ChIP представлены в процентах от исходной ДНК, нормированной на преиммунное обогащение сыворотки. Здесь и на рис. 2  $M \pm SD$  трёхкратных измерений ПЦР в трёх независимых биологических образцах хроматина. (б) — образующаяся при взаимодействии двух фрагментов  $CTCF^{x4}$  петля не изолирует находящийся внутри ген *white*.

контакт между энхансером и промотором. Для исследования возможного усиления инсуляторной активности  $CTCF^{x4}$  вследствие взаимодействия двух его копий мы создали конструкцию  $(Ee)CTCF^{x4}-w(CTCF^{x4})$ , в которой ген  $w$  был заключён между  $CTCF^{x4}$  (рис. 16). Фрагмент  $CTCF^{x4}$ , расположенный на конце гена  $w$ , был окружён  $lox$ -сайтами. Энхансер глаз, в свою очередь, был окружён  $frt$ -сайтами, что позволило оценить его вклад в активацию транскрипции  $w$ -репортёра.

В результате интеграции конструкции в геном мы получили 26 независимых трансгенных линий, которые имели единичные инсерции конструкции. Пигментация глаз в трансгенных линиях сильно варьировалась (рис. 16) от красной до тёмно-жёлтой. Для подтверждения активности энхансера он был удалён по  $frt$ -сайтам из 12 трансгенных линий путём скрещивания с линией, экспрессирующей дрожжевую Flp-рекомбиназу. В результате степень пигмен-

тации глаз резко снизилась, что указывает на значительную роль энхансера в активации репортёра  $w$  во всех тестируемых линиях. Удаление дистальной копии  $CTCF^{x4}$  по  $lox$ -сайтам привело только к незначительному увеличению пигментации глаз у мух и только в двух из 26 тестируемых трансгенных линий (рис. 16). Таким образом, можно сделать вывод, что потенциальное взаимодействие между сайтами  $CTCF$  не приводит к усилению инсуляции. Следовательно, образование хроматиновой петли не является достаточной для блокирования взаимодействия между энхансером и промотором.

Для исследования барьерной активности  $CTCF^{x4}$ , т.е. его способности блокировать Рс-зависимую репрессию, была создана конструкция  $(PRE)(CTCF^{x4})yw$ , в которой  $CTCF^{x4}$  был помещён между 660 п.н. сайленсером из регуляторной области  $bxd$  гена  $Ubx$  (PRE) и промотором гена  $yellow$  (рис. 2а). Ген  $yellow$  ( $y$ ) отвечает за пигментацию кутикулы и на-



**Рис. 2.** Тестирование барьерных свойств  $CTCF^{x4}$ . В приведённых схемах конструкций ген  $yellow$  ( $y$ ) показан в виде чёрного прямоугольника со стрелкой, указывающей направление транскрипции. Энхансеры гена  $y$  показаны чёрными кружками. Энхансер щетинок — буквой “щ”. PRE  $Ubx$  — шестиугольником белого цвета “PRE”. Столбец “yellow” показывает количество трансгенных линий с пигментацией щетинок, отражающей активность промотора  $y$ . Выраженность экспрессии  $y$  оценивали по пятибалльной шкале, где “5” соответствует пигментации дикого типа, “1” — отсутствие пигментации, а “4”–“2” промежуточное количество пигмента в кутикуле по убыванию. Остальные условные обозначения как на рис. 1. а —  $CTCF^{x4}$  не блокирует сайленсер PRE  $Ubx$  в линиях  $(PRE)(CTCF^{x4})yw$ . б — иммунопреципитация хроматина с антителами к dCTCF в области  $CTCF^{x4}$  из куколок линий  $(PRE)(CTCF^{x4})yw$ . В качестве положительного контроля взят геномный dCTCF-связывающий участок инсуляторов  $Fab-8$  (F8\_G) и  $Fab-6$  (F6\_G), в качестве отрицательного — область, кодирующая гена  $\gamma Tub37C$  ( $tub$ ) и гена  $Rpl32$  ( $rpl32$ ). Результаты ChIP представлены в процентах от исходной ДНК, нормированной на преиммунное обогащение сыворотки. Петля, образованная взаимодействующими  $CTCF^{x4}$ , только в редких случаях очень слабо изолирует PRE  $Ubx$ .

ходится под контролем нескольких тканеспецифичных энхансеров. PRE, окружённый *ftr*-сайтами, был встроен между энхансерами тела и крыльев, которые находятся перед промотором *u*. Энхансер *u*, отвечающий за пигментацию щетинок, находится в интроне гена и является маркёром активности промотора. Таким образом, по уровню экспрессии гена *u* в щетинках можно судить об эффективности защиты у-промотора от Рс-зависимой репрессии, распространяющейся с PRE, т.е. о барьерных свойствах CTCF<sup>x4</sup>. Изменения в экспрессии гена *u* оценивали фенотипически по уровню пигментации щетинок (рис. 2).

В результате инъекции конструкции в эмбрионы дрозофилы было получено 5 независимых трансгенных линий (PRE)(CTCF<sup>x4</sup>)*uw*, содержащих единичную копию конструкции. Во всех трансгенных линиях мухи имели жёлтые щетинки, что предполагает репрессию промотора *yellow*. Удаление PRE в результате рекомбинации между *ftr*-сайтами привело к восстановлению пигментации, что подтверждает роль PRE в репрессии промотора *u*. Делеция CTCF<sup>x4</sup> в результате рекомбинации между *lox*-сайтами не влияла на уровень пигментации щетинок. Связывание dCTCF с последовательностью CTCF<sup>x4</sup> было подтверждено с помощью иммунопреципитации хроматина, выделенного из куколок трансгенной линии (PRE)(CTCF<sup>x4</sup>)*uw* (рис. 2а). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют об отсутствии барьерной активности CTCF<sup>x4</sup>.

Для *Mcr* и ряда других инсуляторов ранее было показано, что две копии эффективно блокируют Рс-зависимую репрессию [11]. Поэтому была создана конструкция CTCF<sup>x4</sup>(PRE)(CTCF<sup>x4</sup>)*uw*, в которой PRE был фланкирован двумя фрагментами CTCF<sup>x4</sup> (рис. 2б). В результате инъекции конструкции в эмбрионы линии *uw* было получено 13 трансгенных линий PRE. В 9 линиях мухи имели жёлтые щетинки, что предполагает полную репрессию гена *u*. Делеция PRE восстанавливала пигментацию щетинок. Таким образом, в этих линиях CTCF<sup>x4</sup> не блокировал PRE-зависимую репрессию гена *u*. В 4 трансгенных линиях мухи имели мозаичную пигментацию щетинок, что предполагает неполную репрессию гена *u*. Делеция фрагмента CTCF<sup>x4</sup> привела к полной инактивации гена *u* в этих линиях (жёлтые щетинки), что предполагает слабую барьерную активность CTCF<sup>x4</sup> (рис. 2б). Таким образом, хроматиновая петля, образованная взаимодействующими CTCF<sup>x4</sup> сайтами, практически не блокировала распространение Рс-зависимой репрессии с PRE.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что сами по себе мультиплицированные сайты свя-

зывания dCTCF не могут эффективно блокировать энхансеры и защищать от Polycomb-зависимой репрессии, т.е. не обладают инсуляторной активностью. С этой точки зрения интересно, что инсуляторы *Fab-8* и *Mcp*, активность которых зависит от dCTCF, инсулируют энхансеры и блокируют PRE-зависимую репрессию [6, 11, 12]. Наиболее вероятно, что белок CTCF функционирует в составе инсуляторов совместно с другими архитектурными белками [13, 14]. Ранее было показано, что сайты CTCF<sup>x4</sup> взаимодействуют с промотором гена *yellow*, что отличает их от инсуляторов и сайтов связывания белка Su(Hw) [15]. Вероятно, что взаимодействие с промотором является необходимым для способности инсулятора защитить экспрессию трансгена от PRE-зависимой репрессии. Также эта способность, по видимому, нужна для блокирования активности энхансера.

**Источник финансирования.** Исследование выполнено при поддержке гранта РФФИ 19-04-00340.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ali T., Renkawitz R., Bartkuhn M. // Curr. Opin. Genet. Dev. 2016. V. 37. P. 17–26. DOI:10.1016/j.gde.2015.11.009.
2. Moon H., Filippova G., Loukinov D., Pugacheva E., Chen Q., Smith S.T., Munhall A., Grewe B., Bartkuhn M., Arnold R., Burke L.J., Renkawitz-Pohl R., Ohlsson R., Zhou J., Renkawitz R., Lobanenkov V. // EMBO Rept. 2005. V. 6. № 2. P. 165–170.
3. Kyrchanova O., Toshchakov S., Podstreshnaya Y., Parshikov A., Georgiev P. // Mol. Cell. Biol. 2008. V. 28. № 12. P. 4188–4195. DOI:10.1128/MCB.00229–08.
4. Bonchuk A., Maksimenko O., Kyrchanova O., Ivlieva T., Mogila V., Deshpande G., Wolle D., Schedl P., Georgiev P. // BMC Biol. 2015. V. 13. P. 63. DOI: 10.1186/s12915–015–0168–7.
5. Holohan E.E., Kwong C., Adryan B., et al. // PLoS Genet. 2007. V. 3. № 7. e112.
6. Maksimenko O., Kyrchanova O., Bonchuk A., Stakhov V., Parshikov A., Georgiev P. // Epigenetics. 2014. V. 9. № 9. P. 1261–1270. DOI:10.4161/epi.32086.
7. Kyrchanova O., Georgiev P. // FEBS Lett. 2014. V. 588. № 1. P. 8–14. DOI:10.1016/j.febslet.2013.10.039.
8. Karess R.E., Rubin G.M. // Cell. 1984. V. 38. № 1. P. 135–146.
9. Kostyuchenko M., Savitskaya E., Koryagina E., Melnikova L., Karakozova M., Georgiev P. // Chromosoma. 2009. V. 118. № 5. P. 665–674.
10. Kyrchanova O., Maksimenko O., Stakhov V., Ivlieva T., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P. // PLoS Ge-

- net. 2013. V. 9. № 7. e1003606. DOI:10.1007/s00412-009-0226-4.
11. Gruzdeva N., Kyrchanova O., Parshikov A., Kullyev A., Georgiev P. // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. № 9. P. 3682–3689.
12. Kyrchanova O., Mogila V., Wolle D., Deshpande G., Parshikov A., Cléard F., Karch F., Schedl P., Georgiev P. // *PLoS Genet.* 2016. V. 12. № 7. e1006188. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006188.
13. Федотова А.А., Бончук А.Н., Могила В.А., Георгиев П.Г. // *Acta Naturae.* 2017. Т. 9. № 2. С. 50–61.
14. Kyrchanova O., Zolotarev N., Mogila V., Maksimenko O., Schedl P., Georgiev P. // *Development.* 2017. V. 144. № 14. P. 2663–2672. DOI: 10.1242/dev.149815.
15. Erokhin M., Davydova A., Kyrchanova O., Parshikov A., Georgiev P., Chetverina D. // *Development.* 2011. V. 138. № 18. P. 4097–4106. DOI: 10.1242/dev.062836.

## STUDY OF dCTCF INSULATOR ACTIVITY IN *Drosophila melanogaster* MODEL SYSTEMS

**N. E. Postika, T. A. Ivlieva, Academician of the RAS P. G. Georgiev, O. V. Kyrchanova**

*Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

Received January 25, 2019

Using *Drosophila* transgenic model systems, we have shown that the four binding sites for the architectural protein dCTCF themselves have no insulator activity. They cannot block enhancers and protect from Polycomb-dependent repression. The results suggest that in the known *Drosophila* insulators, the dCTCF protein functions in cooperation with other architectural proteins.

**Keywords:** CTCF, insulator, chromatin loop, PRE, distant interactions.