

УДК 575.22:595.773.4

АКТИВАЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ Su(Hw)-ЗАВИСИМЫХ ГЕНОВ  
АССОЦИИРОВАНА С УВЕЛИЧЕНИЕМ СВЯЗЫВАНИЯ БЕЛКА GAFП. В. Елизарьев<sup>1,2</sup>, Д. А. Четверина<sup>1</sup>, Л. С. Мельникова<sup>1</sup>, А. Шривастава<sup>3</sup>, Р. К. Мишра<sup>3</sup>,  
А. К. Головнин<sup>1</sup>, академик РАН П. Г. Георгиев<sup>1</sup>, М. М. Ерохин<sup>1,\*</sup>

Поступило 21.05.2019 г.

Исследовано взаимодействие белка GAF с промоторами нейрон-специфичных генов при активации и репрессии транскрипции. Показано, что, в то время как белок Su(Hw) остается стабильно ассоциирован с промоторами данных генов при смене их транскрипционного статуса, уровень связывания белка GAF значительно выше при активации транскрипции.

**Ключевые слова:** *Drosophila*, Su(Hw), GAGA фактор, репрессия транскрипции, активация транскрипции.

**DOI:** <https://doi.org/10.31857/S0869-5652488199-102>

ДНК-связывающий белок Suppressor of Hairwing [Su(Hw)] является хорошо изученным архитектурным фактором, который формирует инсуляторы в геноме *Drosophila* [1–4]. Недавно было показано, что Su(Hw) также участвует в прямой репрессии ряда нейрон-специфичных генов в яичниках самок дрозофилы [5–7].

В настоящее время механизм Su(Hw)-зависимой репрессии транскрипции неизвестен. Показано, что в нем не участвуют основные охарактеризованные партнеры Su(Hw): белки CP190 и Mod(mdg4)-67.2. Более того, CP190 и Mod(mdg4)-67.2 взаимодействуют только с некоторыми из Su(Hw)-ассоциированных промоторов нейрон-специфичных генов [7].

В то же время показано, что белок Su(Hw) остается стабильно ассоциирован с промоторами нейрон-специфичных генов как при репрессии, так и при активации транскрипции [7]. Таким образом, кроме Su(Hw) существуют дополнительные факторы, участвующие в активности данных генов. Su(Hw)-опосредованная регуляция транскрипции может контролироваться двумя путями, которые могут взаимно дополнять друг друга. В одном варианте при активации транскрипции с промоторами нейрон-специфичных генов может тканеспецифично взаимодействовать активатор, во втором случае с данных промоторов может диссоциировать дополнительный репрессор.

Для изучения механизма активации генов, регулируемых Su(Hw), мы разделили имаго дрозофилы на

голову и тело, где нейрон-специфичные гены находятся соответственно в активном или неактивном состояниях. Мы использовали три модельных гена — *mAcR-60C*, *Rph* и *Syn2*. Промоторы этих генов содержат сайты связывания для Su(Hw) и дерепрессируются в яичниках *Drosophila* в отсутствие данного белка. Ранее в качестве системы с репрессией изучаемых генов материал получали из яичников самок. Однако известно (база данных <http://www.flybase.org/>), что выбранные модельные гены являются неактивными во всех тканях тела мух. Поэтому в качестве источника тканей с неактивным статусом изучаемых генов в данной работе использовали тела самок дрозофил.

На первом этапе для подтверждения адекватности выбранной системы и согласованности с ранее полученными данными мы проанализировали уровень транскрипции модельных генов в выбранных тканях (рис. 1а). Транскрипты были проанализированы с помощью метода обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ПЦР) в реальном времени. Для ПЦР использовали пары праймеров 5'-ctgcttggtatgacctggcgttg-3' и 5'-ttcagcctgccaactcggacgg-3' для гена *mAcR-60C*, 5'-aacaactcsggcaactcacaacg-3' и 5'-aggcctcacgatagctaattgcaa-3' для гена *Rph*, 5'-aatgccaagtctgcaaagtctgctg-3' и 5'-tatatcattttgagtgtgagtcctatgcg-3' для гена *Syn2*. Нормировка производилась с помощью праймеров, специфичных к транскрипту гена *Ras64B* (5'-gagggattcctgctcgtctctcg-3' и 5'-gtcgcactgttaccaccatc-3'). В голове уровень транскрипции был в 30–50 раз выше, чем в теле. Это полностью согласуется с предыдущими результатами, когда вместо тела мух использовали яичники [7].

Ранее было показано, что белок Su(Hw) связывается с выбранными генами вне зависимости от

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

<sup>2</sup> Лаборатория биологии хроматина института биохимии  
Макса Планка, Мартинсрид, Германия

<sup>3</sup> CSIR-Центр клеточной и молекулярной биологии (CCMB),  
Хайдарабад, Индия

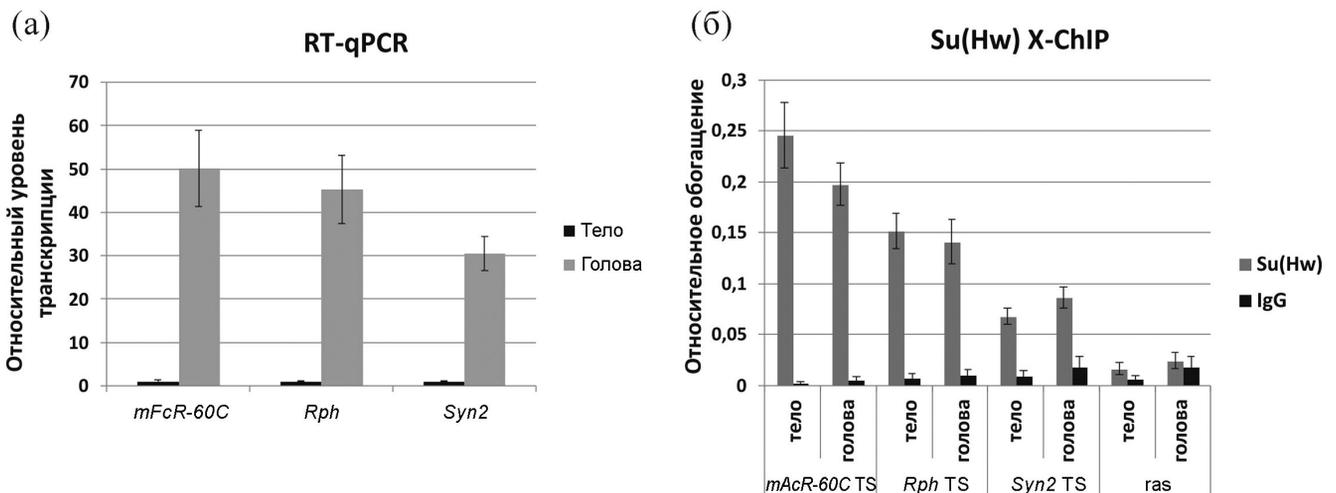
\* E-mail: [yermatxio@yandex.ru](mailto:yermatxio@yandex.ru)

статуса их активности [7]. Для подтверждения этого на новой системе мы оценили связывание белка Su(Hw) с модельными генами в образцах, выделенных из тела и головы мух (рис. 1б). Для анализа результатов иммунопреципитации методом ПЦР в реальном времени были использованы пары праймеров 5'-cagcagaggcagcatctctta-3' и 5'-ctgtcgtcgtctcttggtg-3' для промотора гена *mAcR-60C*, 5'-tcctaccgctgcgataac-3' и 5'-gctgcggagcgtttgcgaat-3' для промотора гена *Rph*, 5'-actgcgtgcccgttttct-3' и 5'-aactggctggctgtactcc-3' для промотора гена *Syn2*. В качестве положительного контроля был использован участок из геномного локуса 62D, стабильно связывающий Su(Hw) в разных тканях (праймеры 5'-tgataccagcggaacagaatc-3' и 5'-tttggccttggtgagacag-3'), в качестве отрицательного – кодирующая область гена *Ras64B* (праймеры как указано выше). Иммунопреципитация хроматина показала, что Su(Hw) связывается примерно с одинаковой эффективностью как в голове, так и в теле (рис. 1б), что полностью согласуется с ранее полученными данными. Таким образом, выбранная модельная система подходит для дальнейшего анализа механизма Su(Hw)-зависимой регуляции транскрипции.

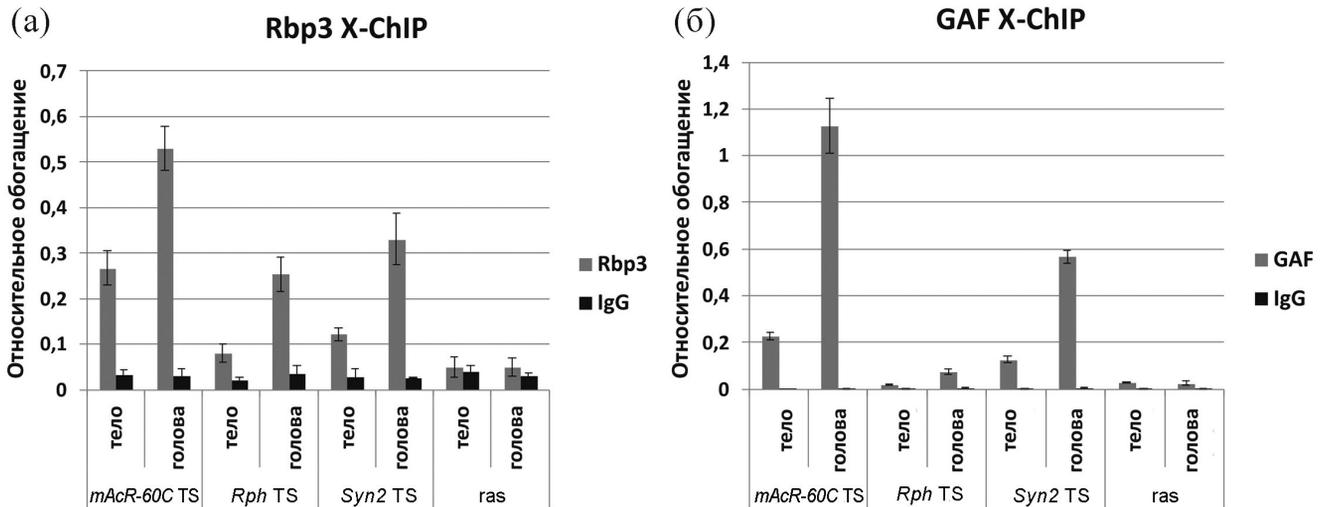
На следующем этапе мы оценили связывание РНК-полимеразы II с модельными генами при их различном транскрипционном статусе (рис. 2а). При иммунопреципитации использовались антитела против одной из субъединиц РНК-полимеразы II – к белку Rbp3. В качестве положительного контроля

был использован промотор гена теплового шока 70 (праймеры 5'-acggcgcactgttctcgttg-3' и 5'-gctgttcagctgcgctgtttg-3'), в качестве отрицательного – кодирующая область гена *Ras64B* (праймеры как указано выше). В результате было установлено, что и в голове и в теле мух наблюдается связывание РНК-полимеразы II с промоторами исследуемых генов. Уровень связывания РНК-полимеразы II в голове повышается в 2–3 раза, что свидетельствует о дополнительном привлечении РНК-полимеразы при активации транскрипции. Однако, по всей видимости, большое количество РНК-полимеразы связывается с промоторами до активации транскрипции. Вероятно, в случае репрессии РНК-полимеразы II на данных промоторах находится в состоянии паузинга, ожидая сигнала активации транскрипции.

Известно, что промоторы многих генов *Drosophila*, находящиеся в состоянии паузинга, регулируется белком GAF (GAGA factor, GAGA-связывающий фактор) [8]. Ранее было показано, что GAF привлекает на хроматин активирующие транскрипцию факторы и ремоделеры хроматина [9, 10]. Мы проанализировали последовательности промоторов генов *mAcR-60C*, *Rph* и *Syn2* на присутствие сайтов связывания GAGA-фактора в их составе. Анализ показал наличие сильных сайтов связывания в промоторах генов *mAcR-60C* и *Syn2*, а также слабого сайта в промоторе гена *Rph*. Далее мы протестировали связывание GAF с модельными промоторами



**Рис. 1.** (а) Анализ уровня транскрипции нейрон-специфичных генов в теле (чёрные столбцы) и голове (серые столбцы) взрослых самок дрозофил. Все значения указаны с учетом нормировки на ген *Ras64B*. Уровень транскрипции исследуемых генов в теле мух принят за 1. (б) Результат иммунопреципитации хроматина с использованием антител против белка Su(Hw), выделенного из головы и тела самок дрозофил. Значения указаны в виде доли от образца Input с нормировкой на эндогенный положительный контроль – область 62D, *ras* – кодирующая область гена *Ras64B*. Здесь и рис. 2 на диаграммах серые столбцы обозначают обогащение при использовании специфичных антител; чёрные столбцы – обогащение, полученное при использовании неспецифичной фракции иммуноглобулинов (IgG неиммунизированного кролика). Здесь и на рис. 2  $M \pm SD$ ,  $n = 3$ .



**Рис. 2.** Результат иммунопреципитации хроматина с использованием антител против корового фактора РНК-полимеразы II (а) и белка GAF (б). Хроматин был выделен из головы и тела самок дрозофил. Значения указаны в виде доли от образца Input с нормировкой на эндогенный положительный контроль – промотор гена *Hsp70*. Остальные обозначения как на рис. 1.

в голове и теле мух методом иммунопреципитации хроматина (рис. 2б). Связывание GAF наблюдалось во всех случаях. Наиболее сильные сигналы были получены для генов *mAcR-60C* и *Syn2*, что соответствует силе консенсуса связывания для GAF. Уровень связывания GAF был существенно выше (примерно в 5 раз) в голове мух, где происходит активация транскрипции анализируемых генов, по сравнению с телом, где транскрипция тестируемых генов репрессирована, косвенно свидетельствуя о прямой роли GAF в активации транскрипции данных генов.

Таким образом, в то время как сила связывания белка Su(Hw) с промоторами нейрон-специфичных генов является примерно одинаковой как при репрессии, так и при активации транскрипции, уровень РНК-полимеразы II и белка GAF значительно увеличивается при активации транскрипции. Следовательно, GAF наряду с Su(Hw) принимает участие в контроле активности нейрон-специфичных генов. Однако для установления непосредственной роли белка GAF и детального механизма активации нейрон-специфичных генов требуются дополнительные исследования.

**Благодарности.** В работе была использована инфраструктура Центра коллективного пользования Института биологии гена Российской Академии наук “Биология живой клетки и биомедицинские нанотранспортеры лекарств”.

**Источник финансирования.** Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований грант № 17–54–45098.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chetverina D., Aoki T., Erokhin M., Georgiev P., Schedl P. // *Bioessays*. 2014. V. 36. № 2. P. 163–172.
2. Chetverina D., Fujioka M., Erokhin M., Georgiev P., Jaynes J.B., Schedl P. // *Bioessays*. 2017. V. 39. № 3.
3. Schwartz Y.B., Cavalli G. // *Genetics*. 2017. V. 205. № 1. P. 5–24.
4. Cubeñas-Potts C., Corces V.G. // *FEBS Lett*. 2015. V. 589. № 20. Pt A. P. 2923–2930.
5. Soshnev A.A., Baxley R.M., Manak J.R., Tan K., Geyer, P.K. // *Development*. 2013. V. 140. № 17. P. 3613–3623.
6. Baxley R.M., Soshnev A.A., Koryakov D.E., Zhimulev I.F., Geyer P.K. // *Dev Biol*. 2011. V. 356. № 2. P. 398–410.
7. Melnikova L., Elizar'ev P., Erokhin M., Molodina V., Chetverina D., Kostyuchenko M., Georgiev P., Golovnin A. // *Sci Rep*. 2019. V. 9. № 1. P. 5314.
8. Srivastava A., Kumar A.S., Mishra R.K. // *Cell Mol Life Sci*. 2018. V. 75. № 4. P. 623–633.
9. Lomaev D., Mikhailova A., Erokhin M., Shaposhnikov A.V., Moresco J.J., Blokhina T., Wolle D., Aoki T., Ryabykh V., Yates J.R.3rd., Shidlovskii Y.V., Georgiev P., Schedl P., Chetverina D. // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 3. P. e0173602.
10. Nakayama T., Shimojima T., Hirose S. // *Development*. 2012. V. 139. № 24. P. 4582–4590.

## ACTIVATION OF Su(Hw) CONTROLLED GENES IS ASSOCIATED WITH INCREASE IN GAF BINDING

**P. V. Elizar'ev<sup>1,2</sup>, D. A. Chetverina<sup>1</sup>, L. S. Melnikova<sup>1</sup>, Avinash Srivastava<sup>3</sup>, Rakesh K. Mishra<sup>3</sup>, A. K. Golovnin<sup>1</sup>, Academician of the RAS P. G. Georgiev<sup>1</sup>, M. M. Erokhin<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> *Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

<sup>2</sup> *Laboratory of Chromatin Biology, Max Planck Institute of Biochemistry, Martinsried, Germany*

<sup>3</sup> *CSIR-Centre for Cellular and Molecular Biology (CCMB), Hyderabad, India*

Received May 21, 2019

The interaction of the GAF protein with the promoters of neuron-specific genes during activation and repression of transcription has been studied. We have shown that while the Su(Hw) protein remains stably associated with the promoters of these genes at different transcriptional state, the GAF protein level is significantly higher when transcription is activated.

*Keywords:* *Drosophila*, Su(Hw), GAGA factor, repression of transcription, activation of transcription.