

**ДОМЕННАЯ РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ
В РАЙОНАХ ИНТЕРКАЛЯРНОГО ГЕТЕРОХРОМАТИНА
*DROSOPHILA MELANOGASTER***

© Д. А. Максимов, П. П. Лактионов, С. Н. Белякин¹

Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск;

¹ *электронный адрес: belyakin@mcb.nsc.ru*

Значительная часть генома дрозофилы находится в репрессированном состоянии в большинстве клеток. Такие районы, названные районами интеркалярного гетерохроматина, содержат существенное количество генов. В основном эти гены работают в строго определенных типах клеток, т. е., являются тканеспецифичными. Наиболее многочисленным классом генов в интеркалярном гетерохроматине являются семенник-специфичные гены. Эти гены активируются только в созревающих сперматоцитах, и их координированная активация важна для нормального прохождения сперматогенеза. Настоящая работа направлена на изучение механизма активации семенник-специфичных генов. Обнаружено, что *Comg*, один из факторов, необходимых для их транскрипции, связан с протяженными районами хромосом, которые хорошо совпадают с репрессированными районами в слюнных железах. При этом связывание *Comg* вызывает активацию только семенник-специфичных генов. Наши результаты позволяют предположить, что на начальных этапах активация семенник-специфичных генов происходит на уровне целых хроматиновых доменов.

Ключевые слова: дрозофила, хроматин, регуляция генов.

Развитие организма определяется генетическими механизмами, контролирующими рост и специализацию клеток. Разные типы клеток характеризуются разными наборами активных генов, от которых в конечном итоге зависят их физиологические свойства. Регуляция геной экспрессии может осуществляться как на уровне индивидуальных промоторов, так и более крупными хромосомными блоками, содержащими по несколько генов (Forrester et al., 1990; Wilczynski, Furlong, 2010).

У дрозофилы значительная часть генов расположена в районах так называемого интеркалярного гетерохроматина. Этим термином были названы районы в политенных хромосомах слюнных желез личинки, которые поздно реплицируются в S-фазе клеточного цикла и не проявляют генетической активности (Жимулев и др., 2010). Механизмы, регулирующие гены в таких районах, остаются малоизученными.

Важным следствием поздней репликации многих районов интеркалярного гетерохроматина является их недорепликация в политенных хромосомах (Zhimulev et al., 1982). В слюнных железах личинки дрозофилы происходит амплификация большей части генома, в результате чего образуются гигантские политенные хромосомы. Однако прицентромерные районы, а также часть районов интеркалярного гетерохроматина не завершают политенизацию и могут содержать меньшее количество нитей ДНК по сравнению с окружающими районами хромосом. Как было показано, это свойство определяется наличием специфического гетерохроматинового белка SUUR (Belyaeva et al., 1998). Впоследствии оказалось, что этот белок характерен для районов

поздней репликации вообще, а не только для районов недорепликации (Makunin et al., 2002). Несмотря на то что механизм действия SUUR остается неизвестным, в предыдущих исследованиях было показано, что он является надежным маркером гетерохроматиновых районов генома (Belyaeva et al., 2003, 2006; Pindyurin et al., 2007).

Недорепликация гетерохроматиновых районов была ранее использована для того, чтобы определить границы некоторых районов интеркалярного гетерохроматина методом сравнительной геномной гибридизации на микрочипах (Belyakin et al., 2005; Sher et al., 2012). В результате этого анализа удалось выявить 52 района недорепликации в политенных хромосомах, в сумме содержащих более 1000 генов. Эти районы представляли часть районов интеркалярного гетерохроматина, которые были значительно недореплицированы. Оказалось, что многие гены в этих районах являются тканеспецифическими, т. е. работают только в некоторых специализированных клетках организма. Наиболее представительной группой оказались семенник-специфичные гены.

В независимых исследованиях было показано, что семенник-специфичные гены зачастую располагаются по соседству друг от друга в геноме дрозофилы, что указывало на возможность их совместной регуляции (Boutananev et al., 2002; Mezey et al., 2008). Однако в недавней работе было показано, что нарушение целостности группы не влияет на тканеспецифичность содержащихся в ней генов (Meadows et al., 2010). Это противоречие указывало на то, что регуляция семенник-специфичных генов происходит более сложным путем.

Представленное исследование направлено на изучение механизма регуляции районов интеркалярного гетерохроматина. При этом наше внимание было сконцентрировано на группе семенник-специфичных генов по двум основным причинам: во-первых, эта группа является наиболее представительной; во-вторых, этим генам были посвящены многие исследования, в которых были обнаружены некоторые факторы, влияющие на их активацию в семенниках (White-Cooper, 2010).

Эти факторы формируют два различных белковых комплекса, образующихся только в половых клетках самца на стадии сперматоцитов. Один из комплексов представляет собой гомолог транскрипционного фактора TFIID и состоит из гомологов TBP-связанных факторов (TAF) (Chen et al., 2005). Второй комплекс (tMAC) образован белками, обладающими сходством с компонентами хроматинового комплекса Mub—MuvB/dREAM, однако это сходство недостаточно, чтобы уверенно судить об их функции (Beall et al., 2007). Мутации по компонентам этих комплексов приводят к остановке мейоза у самцов. Как оказалось, у таких мутантов не запускается экспрессия значительной части семенник-специфичных генов. По всей видимости, гомологи TAF являются специфичными активаторами, связывающимися с конкретными последовательностями промоторов генов (Chen et al., 2011). Функция второго комплекса еще неизвестна, но было высказано предположение о том, что он может действовать на уровне хроматина.

В рамках нашего исследования было проведено картирование сайтов связывания белков SUUR и Cookie monster (Comg), компонента tMAC. Белок SUUR использовался как маркер репрессированных районов генома в соматических клетках. По существующим данным, этот белок связан с репрессированными районами хромосом и вызывает в них замедление репликационной вилки в конце S-фазы. Единственный подтвержденный фенотип мутации *SuUR* наблюдался в политенных хромосомах, где пропадала недорепликация в районах интеркалярного гетерохроматина и частично в прицентромерных районах (Belyaeva et al., 1998). По этой причине картирование репрессированных доменов с использованием белка SUUR в качестве маркера проводили в слюнных железах личинок.

Белок Comg нарабатывается избирательно в сперматоцитах. Там он входит в состав комплекса tMAC и вызывает активацию семенник-специфичных генов. Поэтому было важно проводить картирование белка Comg именно в клетках зародышевого пути самца.

Картирование белков SUUR и Comg в тканях дрозофилы проводили методом DamID. Этот метод позволяет определять сайты связывания хромосомных белков без применения фиксации материала и является альтернативой хроматин-иммунопреципитации. Метод основан на использовании химерного полипептида, состоящего из исследуемого белка, соединенного с ДНК-аденин-метилтрансферазой (Dam) *Escherichia coli*, способной метилировать аденин в последовательностях GATC. Экспрессия такого полипептида осуществляется при помощи генетической конструкции, введенной в клетку. Химерный полипептид направляется к сайтам связывания исследуемого белка на хромосомах, а присоединенная к нему Dam метилирует ДНК в окрестности этого сайта. Метилированные фрагменты ДНК избирательно выделяют, амплифицируют и используют в экспериментах с микрочипами для определения геномного расположения фрагментов из обогащенных фракций. Этот метод ранее хорошо зарекомендовал себя в экспериментах на клетках в культуре (Filion et al., 2010).

Для картирования белка SUUR использовали генетическую конструкцию, экспрессирующую химерный белок Dam-SUUR под контролем минимального промотора гена *hsp70*, входящего в состав вектора pUAST. Использование этого промотора обеспечивает достаточный уровень экспрессии химерного белка. Слюнные железы личинок третьего возраста являются крупным, компактным органом, поэтому для сбора материала была использована диссекция.

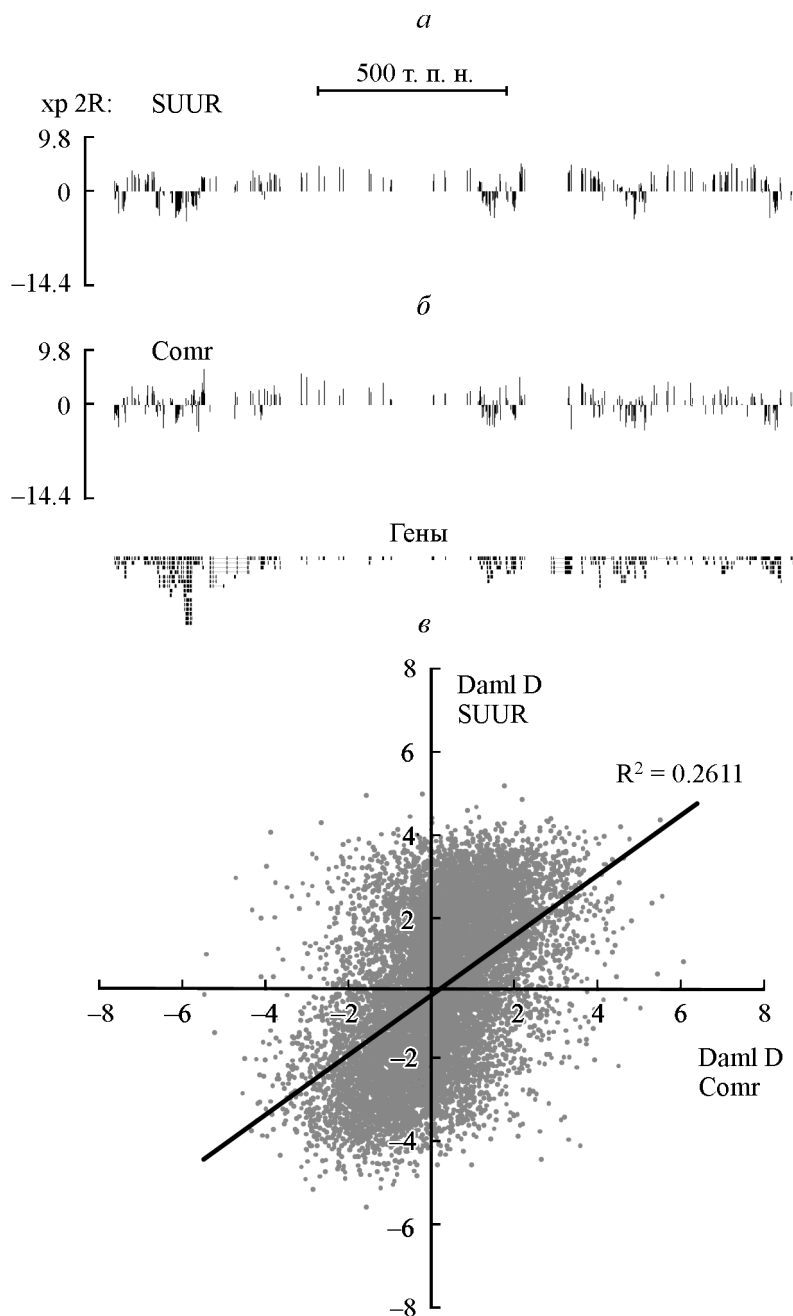
Картирование белка Comg потребовало дополнительных усилий. Дело в том, что семенники дрозофилы наряду с развивающимися клетками зародышевого пути содержат некоторое количество клеток соматического происхождения. Запуск экспрессии белка Dam-Comg в ненадлежащих клетках мог бы привести к неконтролируемым искажениям картины его связывания. Использование минимального промотора гена *hsp70* является необходимым условием при проведении экспериментов DamID, но в то же время не позволяет контролировать экспрессию конструкции в разных тканях. Чтобы обойти это препятствие, мы модифицировали схему эксперимента DamID.

В предложенной нами схеме была использована дополнительная конструкция, несущая ген рекомбиназы *cre* под контролем регуляторных элементов гена *nanos*, специфично экспрессирующегося в клетках зародышевого пути (Duchow et al., 2005). В конструкции, кодирующей химерный белок Dam-Comg, между промотором и кодирующей частью был вставлен терминатор транскрипции, фланкированный loxP-сайтами. У мух, несущих *cre*-экспрессирующую конструкцию и конструкцию для DamID, происходило вырезание терминатора избирательно в клетках зародышевого пути. Это приводило к тканеспецифичной наработке химерного белка. Таким образом, метилирование в окрестности сайтов связывания белка Comg происходило избирательно в клетках зародышевого пути. Семенники таких мух выделяли с помощью диссекции и подвергали процедуре DamID (Greil et al., 2006).

После диссекции слюнных желез и семенников из них выделяли геномную ДНК, которую обрабатывали согласно ранее предложенному протоколу и гибридизовали с микрочипами, содержащими последовательности всех генов дрозофилы. После обработки данных были получены профили связывания белка SUUR в слюнных железах личинки и белка Comg в клетках зародышевого пути самца. Как и предполагалось, белок SUUR связывался с протяженными участками генома, включающими в себя ранее обнаруженные районы недорепликации (см. рисунок, а). Неожиданно для нас на профиле связывания белка Comg в созревающих сперматоцитах также было выявлено протяженные участки связывания, границы которых во многих случаях совпадали с районами связывания SUUR в политенных хромосомах (см. рисунок, б). Более того, общая корреляция связывания двух белков в двух тканях была довольно значительной ($R^2 = 0.26$; см. рисунок, в).

Белок SUUR является маркером репрессированных районов в соматических клетках. Он связан с районами прицентромерного и интеркалярного гетерохроматина в политенных хромосомах слюнных желез, а в культуре клеток связанные с SUUR гены были в основном неактивны. Напротив, белок Comg является активатором значительного числа генов в созревающих сперматоцитах и необходим для правильного прохождения сперматогенеза.

Обнаруженная нами корреляция выявляет интересный аспект в регуляции активности генов в развитии организма. В тех типах тканей, в которых их экспрессия не



Связывание белков SUUR и Comr с хромосомами *Drosophila melanogaster*.

а — профиль связывания белков SUUR с хромосомами слюнных желез; б — профиль связывания белка Comr с хромосомами сперматоцитов. Профили получены методом DamID. Положительные значения соответствуют последовательностям, обогащенным исследуемым белком, отрицательные значения означают отсутствие связывания. в — диаграмма, демонстрирующая корреляцию связывания двух белков в двух типах клеток.

нужна, тканеспецифичные гены находятся в репрессированном состоянии. В частности, значительная часть семенник-специфичных генов располагается в районах интеркалярного гетерохроматина, которые недореплицируются в политенных хромосомах, транскрипционно инертны и связываются с белком SUUR (Belyakin et al., 2005).

Для прохождения сперматогенеза эти гены должны быть активированы, и процесс активации контролируется комплексами tMAC и tTAF. Полученные нами данные указывают на то, что комплекс tMAC связывается не с отдельными семенник-специфичными генами, а с целыми репрессированными районами. Мы полагаем, что это способствует связыванию промотор-специфических

транскрипционных факторов, например tTAF. Эти факторы избирательно активируют семенник-специфичные гены. Гены, имеющие иную специализацию, остаются молчаливыми, поскольку отсутствуют необходимые для них активаторы.

Полученные нами результаты свидетельствуют в пользу предположения о том, что районы интеркалярного гетерохроматина являются функциональными регуляторными единицами в геноме дрозофилы. В рамках такой модели регуляция заключенных в них генов зависит от хроматинового состояния всего домена. В семенниках переключение активности генов в гетерохроматиновых районах, по-видимому, осуществляет комплекс tMAC. Интересно было бы выяснить, существуют ли похожие меха-

низмы в отношении других тканеспецифичных генов, располагающихся в интеркалярном гетерохроматине.

Работа выполнена при финансовой поддержке проекта VI.42.1.2 ФНИ РАН (Госрегистрация № 01201055588), программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 08-04-01105, 12-04-01007, 12-04-31128 и 12-04-00160).

Список литературы

- Жимулев И. Ф., Беляева Е. С., Андреева Е. Н., Андреевко Н. Г., Бабенко В. Н., Белякин С. Н., Болдырева Л. В., Брусенцова И. В., Демаков С. А., Демакова О. В., Зыков И. А., Коза Е. Б., Колесникова Т. Д., Максимов Д. А., Макунин И. В., Пиндюрин А. В., Семешин В. Ф., Хорошко В. А. 2010. Интеркалярный гетерохроматин в геноме дрозофилы. Генетика. 46 (12) : 1405—1408.
- 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 Develop. 21 : 904—919.
- Belyaeva E. S., Boldyreva L. V., Volkova E. I., Nanayev R. A., Alekseyenko A. A., Zhimulev I. F. 2003. Effect of the Suppressor of Underreplication (SuUR) gene on position-effect variegation silencing in *Drosophila melanogaster*. Genetics. 165 : 1209—1220.
- Belyaeva E. S., Demakov S. A., Pokholkova G. V., Alekseyenko A. A., Kolesnikova T. D., Zhimulev I. F. 2006. DNA underreplication in intercalary heterochromatin regions in polytene chromosomes of *Drosophila melanogaster* correlates with the formation of partial chromosomal aberrations and ectopic pairing. Chromosoma. 115 : 355—366.
- Belyaeva E. S., Zhimulev I. F., Volkova E. I., Alekseyenko A. A., Moshkin Y. M., Koryakov D. E. 1998. Su(UR)ES: a gene suppressing DNA underreplication in intercalary and pericentric heterochromatin of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 95 : 7532—7537.
- Belyakin S. N., Christophides G. K., Alekseyenko A. A., Kriventseva E. V., Belyaeva E. S., Nanayev R. A., Makunin I. V., Kafatos F. C., Zhimulev I. F. 2005. Genomic analysis of *Drosophila* chromosome underreplication reveals a link between replication control and transcriptional territories. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 102 : 8269—8274.
- Boutanaev A. M., Kalmykova A. I., Shevelyov Y. Y., Nurminsky D. I. 2002. Large clusters of co-expressed genes in the *Drosophila* genome. Nature. 420 : 666—669.
- Chen X., Hiller M., Sancak Y., Fuller M. T. 2005. Tissue-specific TAFs counteract Polycomb to turn on terminal differentiation. Science. 310 : 869—872.
- Chen X., Lu C., Prado J. R., Eun S. H., Fuller M. T. 2011. Sequential changes at differentiation gene promoters as they become active in a stem cell lineage. Development. 138 : 2441—2450.
- Filion G. J., van Bommel J. G., Braunschweig U., Talhout W., Kind J., Ward L. D., Brugman W., de Castro I. J., Kerkhoven R. M., Bussemaker H. J., van Steensel B. 2010. Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. Cell. 143 : 212—224.
- Forrester W. C., Epner E., Driscoll M. C., Enver T., Brice M., Papayannopoulou T., Groudine M. 1990. A deletion of the human beta-globin locus activation region causes a major alteration in chromatin structure and replication across the entire beta-globin locus. Genes Develop. 4 : 1637—1649.
- Greil F., Moorman C., van Steensel B. 2006. DamID: mapping of *in vivo* protein-genome interactions using tethered DNA adenine methyltransferase. Methods Enzymol. 410 : 342—359.
- Makunin I. V., Volkova E. I., Belyaeva E. S., Nabirochkina E. N., Pirrotta V., Zhimulev I. F. 2002. The *Drosophila* suppressor of underreplication protein binds to late-replicating regions of polytene chromosomes. Genetics. 160 : 1023—1034.
- Meadows L. A., Chan Y. S., Roote J., Russell S. 2010. Neighbourhood continuity is not required for correct testis gene expression in *Drosophila*. PLoS Biol. 8 : e1000552.
- Mezey J. G., Nuzhdin S. V., Ye F., Jones C. D. 2008. Coordinated evolution of co-expressed gene clusters in the *Drosophila* transcriptome. BMC Evol. Biol. 8 : 2.
- Pindyurin A. V., Moorman C., de Wit E., Belyakin S. N., Belyaeva E. S., Christophides G. K., Kafatos F. C., van Steensel B., Zhimulev I. F. 2007. SUUR joins separate subsets of PcG, HP1 and B-type lamin targets in *Drosophila*. J. Cell Sci. 120 : 2344—2351.
- Sher N., Bell G. W., Li S., Nordman J., Eng T., Eaton M. L., Macalpine D. M., Orr-Weaver T. L. 2012. Developmental control of gene copy number by repression of replication initiation and fork progression. Genome Res. 22 : 64—75.
- White-Cooper H. 2010. Molecular mechanisms of gene regulation during *Drosophila* spermatogenesis. Reproduction. 139 : 11—21.
- Wilczynski B., Furlong E. E. 2010. Challenges for modeling global gene regulatory networks during development: insights from *Drosophila*. Develop. Biol. 340 : 161—169.
- Zhimulev I. F., Semeshin V. F., Kulichkov V. A., Belyaeva E. S. 1982. Intercalary heterochromatin in *Drosophila*. I. Localization and general characteristics. Chromosoma. 87 : 197—228.

Поступила 26 XI 2012

DOMAIN REGULATION OF GENE EXPRESSION IN THE INTERCALARY HETEROCHROMATIN OF *DROSOPHILA MELANOGASTER*

D. A. Maksimov, P. P. Laktionov, S. N. Belyakin¹

Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk; ¹ e-mail: belyakin@mcb.nsc.ru

A significant part of *Drosophila* genome is repressed in most cells. These areas, called intercalary heterochromatin regions, contain a significant amount of genes. Most of these genes work in well-defined cell types, that is, are tissue-specific. The most numerous class of genes in the intercalary heterochromatin are testis-specific genes. These genes are activated only in maturing spermatocytes and their coordinated activation is necessary for the normal spermatogenesis. Our work aims to study the mechanism of activation of testis-specific genes. We have found that Comr, one of the factors required for their transcription, is associated with extensive regions of chromosomes, which are often coextensive with the repressed parts of the salivary glands chromosomes. However, Comr binding to the large chromatin domains leads to the selective activation of testis-specific genes only. Our results suggest that, at the initial stages, activation of the testis-specific genes involves the entire domains of intercalary heterochromatin.

Key words: *Drosophila*, chromatin, gene regulation.