

**ЭКТОПИЧЕСКОЕ ПРИВЛЕЧЕНИЕ БЕЛКА CHROMATOR В СИСТЕМЕ UAS>DBD(GAL4)
КАК МЕТОД ИЗУЧЕНИЯ ИНСУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ
В ПОЛИТЕННЫХ ХРОМОСОМАХ *DROSOPHILA MELANOGASTER***

© O. B. Андреенков,¹ Н. Г. Андреенкова,¹ Е. И. Волкова,¹ П. Г. Георгиев,²
А. А. Гончарова,¹ Г. В. Похолкова,¹ С. А. Демаков^{1, *}

¹ Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, 630090,

² Институт биологии гена РАН, Москва, 119334;

* электронный адрес: demakov@mcb.nsc.ru

Хроматиновые белки-инсулаторы являются одним из важнейших компонентов, определяющих доменную организацию генома. Согласно последним данным, они могут маркировать границы топологических доменов и препятствовать распространению молчащего хроматина на соседние участки. Одним из подходов к анализу действия этих белков является использование метода эктопического привлечения в системе UAS>DBD(GAL4). Метод позволяет оценить действие выбранного белка на хроматиновую организацию, установить его связь с другими инсулаторными белками и влияние на процессы транскрипции и репликации. В данной работе нами были созданы и проверены на функциональность компоненты системы эктопического привлечения инсулаторного белка Chromator (Chr1z) в район интеркалярного гетерохроматина 10A1-2. Были получены предварительные данные, показывающие, что эктопически привлеченный в диск 10A1-2 белок Chromator может вызывать частичную декомпактацию хроматина. Дальнейшее использование такой экспериментальной модели дает возможность детально исследовать влияние инсулаторных белков на структуру хроматина.

Ключевые слова: инсулаторные белки, эктопическое связывание, политенная хромосома, интеркалярный гетерохроматин, дрозофилы.

Принятые сокращения: ИГ — интеркалярный гетерохроматин, attP — сайт связывания в геноме фага Φ C31 (*attachment site in the phage Φ C31 genome*), attB — сайт связывания в бактериальном геноме (*attachment site in the bacterial genome*), DBD — ДНК-связывающийся домен (*DNA binding domain*), Gal4 -транскрипционный активатор галактозы 4 дрожжей (*Galactose 4*), UAS — активирующая нуклеотидная последовательность, расположенная перед промотором (*upstream activating sequence*).

Хроматиновая организация хромосом эукариот является ключевым фактором для обеспечения множества важных для клетки биологических процессов. Политенные хромосомы слюнных желез *Drosophila melanogaster* признаны лучшей моделью интерфазных хромосом (Zhimulev, 1999). Их гигантские размеры и характерный рисунок чередования плотных и декомпактизованных участков (дисков и междисков) позволяют визуально анализировать многие клеточные процессы. Ранее нами были сопоставлены данные полигеномного анализа структуры хроматина в клеточных культурах (Filion et al., 2010; Kharchenko et al., 2011; Milon et al., 2014) с данными о структурной организации политенных хромосом слюнных желез (Zhimulev et al., 2014). В результате было обнаружено принципиальное сходство организации хроматина политенных хромосом и интерфазных хромосом делящихся клеток разного типа. Так, районы междисков политенных хромосом хорошо соответствовали участкам открытого хроматина культуры клеток (Demakov et al., 2011; Vatolina et al., 2011). В обоих типах хромосом в междисковых районах были обнаружены белки инсулаторных комплексов (BEAF32, CTCF, CP190, CHROMATOR и др.).

Инсулаторные белки являются одним из ключевых компонентов, определяющих доменную организацию генома. Они участвуют в обеспечении контактов между удаленными последовательностями ДНК (энхансерами и промоторами), создавая правильную трехмерную организацию интерфазного ядра (Vogelmann et al., 2014). Кроме того, они участвуют в формировании барьера между хроматиновыми доменами, препятствуя распространению репрессированного хроматина на близлежащие районы хромосомы (Sexton et al., 2012).

Районы интеркалярного хроматина (ИГ) в отличие от междисков характеризуются большими размерами и плотной упаковкой ДНК в разных типах клеток. Эти районы представлены недореплицированным репрессированным хроматином и обденены инсулаторными белками (Filion et al., 2010; Belyaeva et al., 2012). Вопрос о том, могут ли инсулаторные белки в одиночку или в комплексе с другими инсулаторными белками формировать открытый хроматин типа междиска в инактивированном хроматине, остается открытым. В норме в интерфазном ядре белок Chromator (Chr1z) выявляется в междисковых декомпактизованных районах политенных хромосом (Gortchakov et al., 2005; Rath et al., 2006), преимуществен-

но колокализуется с инсуляторным белком BEAF32 и CP190 (Vogelmann et al., 2014), а также с киназой JIL-1, определяющей синтез одного из вариантов гистона H3, характерного для активного хроматина (Rath et al., 2006). Предполагается, что в комплексе с этими и другими белками Chromator участвует в создании границ топологических доменов (Sexton et al., 2012) и, следовательно, может участвовать в формировании открытого хроматина в диске ИГ. Мы выбрали систему UAS>DBD(GAL4) для эктопического привлечения химерного белка, содержащего ДНК-связывающий район дрожжевого транскрипционного фактора GAL4 (DBD(GAL4)) и инсуляторный белок Chriz, в район интеркалярного гетерохроматина 10A1-2, в который была встроена конструкция с UAS-последовательностями, специфически взаимодействующими с доменом DBD.

В данной работе мы приводим результаты получения и проверки функциональности трансгенных конструкций, а также первичные результаты эктопического привлечения белка Chromator в диск 10A1-2.

Материал и методика

Интеграция в геном attP сайта. Для внедрения сайта attP в район 10A1-2 Х-хромосомы *D. melanogaster* методом гомологичной направленной рекомбинации была создана трансгенная конструкция P(Jester) (рис. 1, а). В P-транспозон pW25 (#1166, Drosophila Genomics Resource Center (DGRC)) по сайтам рестрикции *SacII-SphI* и *Ascl* были встроены фрагменты ДНК *HindIII-SphI* (1459 п. н.) и *SphI-HindIII* (3711 п. н.) соответственно из района 10A1-2 (координаты на физической карте Х: 10920735-10922194 и 10922189-10925900; версия r6.06 базы данных FlyBase). Фрагмент attP был получен методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) из транспозона P{CaryP}attP40 с использованием праймеров attP(*KpnI*)dir: 5'-gcggtaacctcgccgtcgccgact-3' и attP(*KpnI*)rev: 5'-ccggtaaccactgacggacacaccgaaag-3' (здесь и далее ориентация праймеров 5'-3') и после гидролиза *KpnI* клонирован в промежуточную конструкцию pW25(1,5_3,7) с получением финального транспозона P(Jester). После трансформации в геном линии мух (#4368, BDSC) была получена линия мух со встройкой P(Jester) в хромосому 2.

Интеграцию сайта attP в район 10A1-2 проводили по протоколу (Rong, Golic, 2000) с некоторыми модификациями. Событие гомологичной рекомбинации attP в район 10A1-2 проверяли по смене группы сплеления и подтверждали ПЦР с праймерами из района 10A1-2,

фланкирующими сайт интеграции attP из конструкции P(Jester). В одной из линий после удаления вспомогательных элементов конструкции P(Jester) по сайтам loxP (рис. 1, а) в районе 10A1-2 остались только сайт attP и повтор loxP.

Сайт-специфичная интеграция UAS-повторов. Фрагмент 14xUAS был получен с помощью ПЦР на матрице геномной ДНК линии мух EP1321, содержащей этот повтор в составе транспозона EP (Rørth, 1996), с праймерами tctcgaggcatcaagcttag и cgctctggatccctcgac и клонирован в плазмидный вектор pGEM-T Easy (#A1360, Promega). Вектор pUni был получен на основе транспозона pP{CaSpeR-5} (#EF09040, DGRC), в который по сайтам рестрикции *PstI* и *XbaI* был встроен фрагмент ДНК с сайтом attB из вектора pFly (Wang et al., 2013), а затем по сайтам *PstI* и *KpnI* последовательно встроены FRT-фрагменты, синтезированные отжигом олигонуклеотидов — FRT(*PstI*)f: tgaagttcctattctcttagaaagtagatggaaacttcggcgccgtgc, FRT(*PstI*)r: ggccgcgccgaaatgttctatactttcttagaaataggaaatcggtac, FRT(*KpnI*)f: gaagttcctattctcttagaaataggaaatctcgat, FRT(*KpnI*)r: cgaagttcctatactttcttagaaataggaaatctcgatc.

Финальная конструкция pUni-UAS (рис. 1, б) была получена встраиванием 14xUAS-фрагмента по уникальным сайтам рестрикции *KpnI* и *NoI* в вектор pUni. ДНК этого вектора была инъецирована в эмбрионы линии, содержащей сайт attP в районе 10A1-2 и источник интеграции *FC31*. В результате была получена линия мух, в которой 14xUAS-фрагмент был встроен по сайту attP в район 10A1-2. После удаления рекомбиназой FLP вспомогательных элементов конструкции pUni-UAS в районе 10A1-2 остался только 14xUAS-фрагмент. Положение сайта на молекулярной карте района Х: 10922194 (<http://flybase.org/cgi-bin/gbrowse2/dmel/>; Release 6.06), он располагается в 23 т. п. н. от дистального края диска 10A1-2 (по данным: Vatolina et al., 2011).

Создание конструкции для эктопического связывания белка Chromator. На основе вектора p-attB-FRT-STOP#1-FRT-DamMyc[open] (любезно предоставлен А. Пиндюриным (ИМКБ СО РАН) и Bas van Steensel (Голландский институт рака, Амстердам)) нами получена конструкция, в которой ДНК-связывающий домен (DBD) Gal4 с сигналом ядерной локализации (NLS) и мус-эпиптомом был соединен в одну рамку считывания с полноразмерной кДНК, кодирующей Chromator (рис. 1, в). Вначале с матрицы геномной ДНК линии y¹w^{*}; P{w⁺mW.hs}=GawB}AB1 (#1824, BDSC), содержащей ДНК Gal4, с помощью праймеров DBD-nls1f: gtggaggacggaatgaaatgtcttatcg и DBD-myc1r: gagttct-

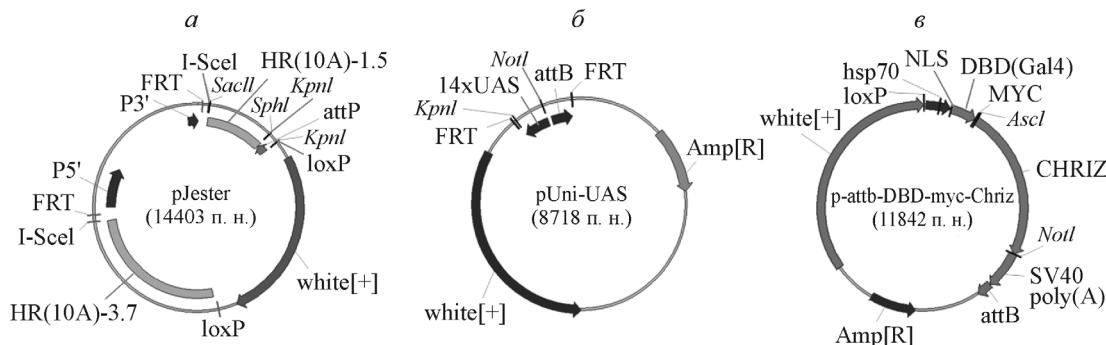


Рис. 1. Молекулярно-генетическая организация трансгенных конструкций.

а — pJester; б — pUni-UAS; в — p-attB-DBD-myc-Chriz. Объяснения см. в тексте.

gttccgatacagtcaactgtctttga был амплифицирован фрагмент ДНК, содержащий последовательность DBD и части NLS (с одной стороны) и тус-эпипотопа (с другой стороны). Этот фрагмент был использован в ПЦР со второй парой праймеров — DBD-nls2f: catgaccccccccaagaagaaggcgaaggtggaggacgaaatgaaatgc и DBD-myc2r: ggcgcgcggcaggatcccttcagatgaggatgttctgtccgatacagtc. Подбор праймеров к DBD и NLS был основан на данных Ву и соавторов (Wu et al., 2008). Финальный фрагмент ДНК клонировали в вектор pGEM-T Easy, а затем по сайтам рестрикции Eco-RI и *AscI* встроили в p-attB-FRT-STOP#1-FRT-Dam-Myc[open] вместо блока функциональных элементов FRT-STOP#1-FRT-DamMyc с получением вектора p-attB-DBD-myc (контрольная конструкция). Из вектора с полноразмерной копией кДНК гена *Chriz* (*Chromator*), Chro-RB, с помощью ПЦР с праймерами к флангам этой кДНК и сайтами рестрикции *AscI* и *NoI*: Chrom-*AscI*: ggcgcgcacatgtggcacaggagattc, Chrom-*NoI*: gggccgcgtttacgtggatgttag был получен фрагмент ДНК и встроен в вектор pGEM-T Easy. После гидролиза по этим сайтам рестрикции фрагмент был клонирован в p-attB-DBD-myc. В результате инъекции ДНК этих векторов в эмбрионы линии мух с сайтом attP в районе 51C (линия #24482, BDSC) были получены линии с гибридными генами DBD(Gal4)-myc-CHRIZ и DBD(Gal4)-myc.

Вестерн-блот-анализ проводили, как описано ранее (Maksimov et al., 2014), с антителами к DBD-домену Gal4 (sc-577, Santa Cruz) и бета-тубулину (получены от H. Saumweber (Германия)), разведение 1 : 1000.

Иммунофлуоресцентное окрашивание политеиновых хромосом выполняли согласно описанному ранее протоколу (Kolesnikova et al., 2011) антителами к тус-эпипотопу (sc-40, Santa Cruz) и белку Chriz (получены от H. Saumweber (Германия)), разведения 1 : 100 и 1 : 600 соответственно.

Результаты и обсуждение

Одним из компонентов системы UAS>DBD(GAL4) является сайт для привлечения химерного белка, содержащий повторенные UAS-последовательности и специфически взаимодействующий с DBD-доменом белка GAL4. Для того чтобы внедрить этот сайт в район интеркалярного гетерохроматина 10A1-2, мы вначале методом гомологичной рекомбинации встроили в этот район сайт attP. Затем в результате сайт-специфичной Φ C31-опосредованной рекомбинации attP/attB в район была встроена трансгенная конструкция с повторенным 14 раз фрагментом UAS.

Для эктопического привлечения белка Chriz в изучаемый район были получены линии с внедренными в район 51C хромосомы 2 гибридными генами *DBD(Gal4)-myc-Chriz* и *DBD(Gal4)-myc*, которые находились под контролем промотора гена теплового шока *hsp70*. Химерный белок DBD-myс-Chriz был выявлен Вестерн-блот-анализом (рис. 2, а), а иммуноокрашивание политеиновых хромосом слюнных желез личинок антителами к тус-эпипотопу показало, что в трансгенных линиях химерный белок DBD-myс-Chriz экспрессируется на высоком уровне и связывается с междисковыми районами, как эндогенный белок (рис. 2, б).

Далее мы исследовали эффект эктопического привлечения белка Chriz в район диска ИГ 10A1-2 X-хромосомы. Трансгетерозиготные мухи линий UAS (10A1-2); DBD-myс-Chriz и UAS(10A1-2); DBD(Gal4)-myc (конт-

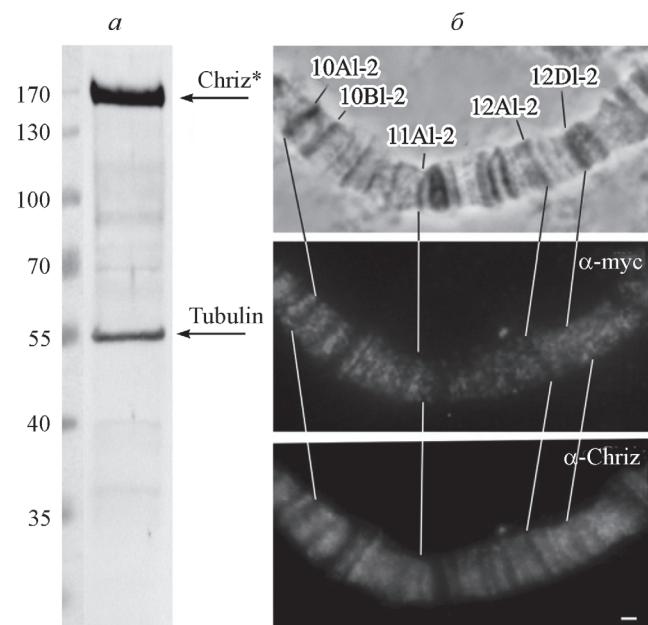


Рис. 2. Проверка функциональности гибридного белка DBD-Myc-Chriz.

а — Вестерн-блот белков слюнных желез после теплового шока, инкубированных с антителами к DBD(Gal4), выявил уникальный гибридный белок DBD-Myc-Chriz (отмечен как Chriz*); контроль нанесения — окраска антителами к тубулину. б — результаты иммуномечения политеиновых хромосом линии с трансгеном DBD-Myc-Chriz после активации тепловым шоком антителами к тус-эпипотопу и к белку Chriz. Масштабный отрезок — 1 мкм.

роль) были подвергнуты тепловому воздействию на разных стадиях развития. После такой активации химерные белки DBD-myс-Chriz и DBD-myс помимо районов нативной локализации на политеиновых хромосомах выявлялись также в диске 10A1-2 (рис. 3, а). В результате привлечения химерного белка DBD-myс-Chriz в районе было обнаружено появление небольшой зоны декомпактизации дискового материала. В контроле такого эффекта не наблюдали (рис. 3, б), т. е. белок Chriz, по-видимому, участвует в формировании открытого хроматина — цитологически это проявляется как разрыхление материала диска. Возможно, это происходит за счет привлечения других инсулиторных белков, например белка CP190, для которого было показано, что он может вызывать протяженную декомпактизацию хроматина в гетерохроматиновом районе вблизи центромеры (Ahanger et al., 2014). Кроме того, возможно привлечение таких белков, как JIL1 и ISWI (Bohla et al., 2014; Vogelmann et al., 2014), которые за счет модификации гистонов изменяют плотность нуклеосомной укладки.

В целом использование предложенной экспериментальной модели дает нам возможность детально исследовать эффекты привлечения инсулиторных белков на структуру хроматина в различных районах хромосом, а также выяснить взаимодействия между разными типами инсулиторов.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российской научного фонда (проект 14-14-00934), часть экспериментов по созданию генно-инженерных конструкций — при поддержке бюджетного финансирования (0310-2014-0002).

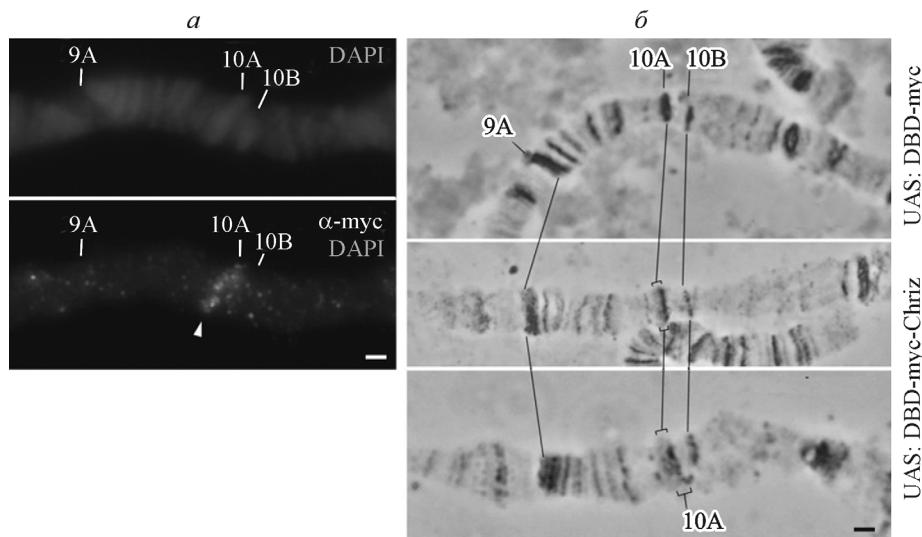


Рис. 3. UAS-зависимое привлечение химерного белка DBD-Myc-Chriz в диск 10A1-2 вызывает изменения в организации хроматина.

a — иммуномечение X-хромосомы с UAS-сайтом в районе 10A1-2 в линии мух с экспрессией DBD(Gal4)-Myc-CHRIZ антителами к Мус-эпигеному обнаруживает эктопическую локализацию гибридного белка в диске 10A1-2 (отмечено треугольником). *б* — цитологическое проявление эктопической локализации DBD(Gal4)-Myc-CHRIZ — расщепление диска 10A1-2 на две неравные части, чего не наблюдается для белка DBD(Gal4)-Myc. *Масштабный отрезок* — 1 мкм.

Список литературы

- Ahanger S. H., Günther K., Weth O., Bartkuhn M., Bhonde R. R., Shouche Y.S., Renkawitz R. 2014. Ectopically tethered CP190 induces large-scale chromatin decondensation. *Sci. Rep.* 29 : 3917.
- Belyaeva E. S., Goncharov F. P., Demakova O. V., Kolesnikova T. D., Boldyreva L. V., Semeshin V. F., Zhimulev I. F. 2012. Late replication domains in polytene and non-polytene cells of *Drosophila melanogaster*. *PLoS One*. 7 : e30035.
- Bohla D., Herold M., Panzer I., Buxa M. K., Ali T., Demmers J., Kruger 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.
- Demakov S. A., Vatolina T. Y., Babenko V. N., Semeshin V. F., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. 2011. Protein composition of interband regions in polytene and cell line chromosomes of *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics*. 12 : 566.
- Filion G. J., van Bemmel 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.
- Gortchakov A. A., Eggert H., Gan M., Mattow J., Zhimulev I. F., Saumweber H. 2005. Chriz, a chromodomain protein specific for the interbands of *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes. *Chromosoma*. 114 : 54—66.
- Kharchenko P. V., Alekseyenko A. A., Schwartz Y. B., Minoda A., Riddle N. C., Ernst J., Sabo P. J., Larschan E., Gorchakov A. A., Gu T., Linder-Basso D., Plachetka A., Shanower G., Tolstorukov M. Y., Luquette L. J., Xi R., Jung Y. L., Park R. W., Bishop E. P., Canfield T. K., Sandstrom R., Thurman R. E., MacAlpine D. M., Stamatoyannopoulos J. A., Kellis M., Elgin S. C., Kuroda M. I., Pirrotta V., Karpen G. H., Park P. J. 2011. Comprehensive analysis of the chromatin landscape in *Drosophila melanogaster*. *Nature*. 471 : 480—485.
- Kolesnikova T. D., Semeshin V. F., Andreyeva E. N., Zykova I. A., Kokoza E. B., Kalashnikova D. A., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. 2011. Induced decondensation of heterochromatin in *Drosophila melanogaster* polytene chromosomes under condition of ectopic expression of the Suppressor of underreplication gene. *Fly (Austin)*. 5 : 181—190.
- Maksimov D. A., Koryakov D. E., Belyakin S. N. 2014. Developmental variation of the SUUR protein binding correlates with gene regulation and specific chromatin types in *D. melanogaster*. *Chromosoma*. 123 : 253—264.
- Milon B., Sun Y., Chang W., Creasy T., Mahurkar A., Shetty A., Nurminsky D., Nurminskaya M. 2014. Map of open and closed chromatin domains in *Drosophila* genome. *BMC Genomics*. 15 : 988.
- Rath U., Ding Y., Deng H., Qi H., Bao X., Zhang W., Girton J., Johansen J., Johansen K. M. 2006. The chromodomain protein, Chromator, interacts with JIL-1 kinase and regulates the structure of *Drosophila* polytene chromosomes. *J. Cell Sci.* 119 : 2332—2341.
- Rong Y. S., Golic K. G. 2000. Gene targeting by homologous recombination in *Drosophila*. *Science*. 288 : 2013—2018.
- Rørth P. 1996. A modular misexpression screen in *Drosophila* detecting tissue-specific phenotypes. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 93 : 12 418—12 422.
- Sexton T., Yaffe E., Kenigsberg E., Bantignies F., Leblanc B., Hoichman M., Parrinello H., Tanay A., Cavalli G. 2012. Three-dimensional folding and functional organization principles of the *Drosophila* genome. *Cell*. 148 : 458—472.
- Vatolina T. Y., Boldyreva L. V., Demakova O. V., Demakov S. A., Kokoza E. B., Semeshin V. F., Babenko V. N., Goncharov F. P., Belyaeva E. S., Zhimulev I. F. 2011. Identical functional organization of nonpolytene and polytene chromosomes in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE*. 6 : e25960.
- Vogelmann J., Le Gall A., Dejardin S., Allemand F., Gamot A., Labesse G., Cuvier O., Nègre N., Cohen-Gonsaud M., Margeat E., Nollmann M. 2014. Chromatin insulator factors involved in long-range DNA interactions and their role in the folding of the *Drosophila* genome. *PLoS Genet*. 10 : e1004544.
- Wang C. I., Alekseyenko A. A., LeRoy G., Elia A. E., Gorchakov A. A., Britton L. M., Elledge S. J., Kharchenko P. V., Garcia B. A., Kuroda M. I. 2013. ChIP-mass spectrometry captures protein interactions and modified histones associated with dosage compensation in *Drosophila*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20 : 202—209.
- Wu S. C., Maragathavally K. J., Coates C. J., Kaminski J. M. 2008. Steps toward targeted insertional mutagenesis with class II transposable elements. *Methods in Mol. Biol.* 435 : 139—151.
- Zhimulev I. F. 1999. Genetic organization of polytene chromosomes. *Adv. Genet.* 39 : 1—589.

Zhimulev I. F., Zykova T. Y., Goncharov F. P., Khoroshko V. A., Demakova O. V., Semeshin V. F., Pokholkova G. V., Boldyreva L. V., Demidova D. S., Babenko V. N., Demakov S. A., Belevaeva E. S. 2014. Genetic organization of interphase chromosome

bands and interbands in *Drosophila melanogaster*. PLoS ONE. 9 : e101631.

Поступила 1 XII 2015

ECTOPIC TETHERING OF THE CHROMATOR PROTEIN IN UASDBD(GAL4)
SYSTEM AS APPROACH FOR STUDYING OF THE INSULATOR PROTEINS
IN *DROSOPHILA MELANOGASTER* POLYTENE CHROMOSOMES

O. V. Andreenkov,¹ N. G. Andreenkova,¹ E. I. Volkova,¹ P. G. Georgiev,²
A. A. Goncharova,¹ G. V. Pokholkova,¹ S. A. Demakov^{1,*}

¹ Institute of Molecular and Cellular Biology SB RAS, Novosibirsk, 630090,
and ² Institute of Gene Biology RAS, Moscow, 119334;

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

Chromatin insulator proteins are one of the major components that determine the domain organization of the genome. According to the latest data, they can mark the boundaries of topological domains and prevent the spread of silent chromatin to adjacent areas. One approach to the analysis of the actions of these proteins is to use the ectopic involvement in the UAS>DBD(GAL4). The method allows to evaluate the effect of selected protein in chromatin organization, to establish its association with other insulator proteins and influence on the processes of transcription and replication, and influence the processes of transcription and replication. In this study, we have developed and tested the functionality of the system components in ectopic tethering of the Chromator (Chriz) to the region of intercalary heterochromatin 10A1-2. Preliminary data have been obtained showing that ectopically tethered Chromator to the band 10A1-2 can induce a partial decompactization of the band chromatin. Further use of this experimental model provides the opportunity to investigate the effect of insulator proteins on the chromatin structure.

Key words: insulator proteins, ectopic tethering, polytene chromosome, intercalary heterochromatin, *Drosophila*.
