

УДК 577.214.6

Роль проходящей транскрипции в активности PRE у *Drosophila melanogaster*

П. В. Елизарьев, Д. В. Ломаев, Д. А. Четверина, П. Г. Георгиев, М. М. Ерохин*

Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

*E-mail: yermahbio@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.02.2016

Принята к печати 08.04.2016

РЕФЕРАТ Поддержание индивидуальных профилей экспрессии генов в клетках разного типа необходимо для дифференцировки и развития многоклеточных организмов. Экспрессия многих генов контролируется белками групп Polycomb (PcG) и Trithorax (TrxG), которые действуют посредством ассоциации с хроматином. Мишенями PcG/TrxG-факторов являются ДНК-элементы, названные PRE (Polycomb Response Elements), активность которых можно модулировать, переключая их с репрессии на активацию. В данной работе проанализировано влияние проходящей транскрипции на переключение активности PRE, опосредованное дрожжевым активатором транскрипции GAL4. Показано, что терминатор транскрипции, встроенный между промотором и PRE-элементом, не препятствует переключению PRE с репрессии на активацию. Вне зависимости от ориентации PRE сильная транскрипция в отсутствие терминатора не приводит к удалению белков PcG/TrxG с PRE. Таким образом, транскрипция не имеет определяющего значения в переключении активности PRE.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА Polycomb, Trithorax, PRE, *Drosophila*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ PcG – белки группы Polycomb; TrxG – белки группы Trithorax; *bxd* – *bithoraxoid*.

ВВЕДЕНИЕ

В процессе развития многоклеточных организмов паттерн экспрессии генов в клетках разного типа устанавливается на ранних стадиях развития и затем поддерживается на протяжении многих клеточных делений. За стабильное наследование правильного паттерна отвечают белки групп Polycomb (PcG) и Trithorax (TrxG). Белки PcG обуславливают репрессию, а TrxG – активацию транскрипции [1–4]. У дрозофилы эти факторы связываются с ДНК-элементами, называемыми PRE (Polycomb Response Elements). Элементы PRE содержат сайты различных ДНК-связывающих факторов, привлечение которых приводит к ассоциации комплексов PcG/TrxG с PRE [5, 6]. Белки группы Polycomb представлены тремя основными комплексами: PRC1, PRC2 и PhoRC [2, 3]. Коровыми субъединицами комплекса PRC1 являются факторы PC, PH, dRing и Psc [7–9]. Комплекс PRC2 содержит коровые компоненты E(z), Esc, Su(z)12 и Caf1 [10–13]. В состав комплекса PhoRC входят dSfmbt и ДНК-связывающий фактор Pho [14]. Комплекс PRC2 триметилирует лизин 27 в составе гистона H3 (H3K27me3) за счет SET-домена каталитической субъединицы E(z) [10–13]. Модификация

H3K27me3 маркирует участки хроматина, репрессированного PcG [15, 16]. Факторы группы TrxG представляют собой гетерогенную группу, в которую входят белки Trx, Trr, dCBP, Ash1, UTX и ДНК-связывающий фактор GAF, известный также как Trl (Trithorax-like) [17].

PRE – это модулируемые элементы, репрессорную активность которых в трансгенных системах можно выключить либо энхансерами, либо экзогенным активатором GAL4 дрожжей [18–24]. Ранее было выдвинуто предположение, что инактивация репрессии обеспечивается за счет индукции активатором GAL4 транскрипции через PRE, что, в свою очередь, приводит к «сбрасыванию» PRE-ассоциированных репрессорных факторов с ДНК за счет прохождения РНК-полимеразы II и факторов транскрипции [24].

Однако недавно нами было показано, что даже сильная проходящая транскрипция не приводит к полной элиминации белков с PRE-элемента *bxd* размером 660 п.н. в трансгенных конструкциях *Drosophila* [21]. Установлено, что проходящая транскрипция начиналась с минимального промотора гена *hsp70*, находящегося под контролем пяти сайтов связывания белка GAL4. При этом инактивация

опосредованной PRE репрессии не зависела от того, направлена ли индуцируемая GAL4 транскрипция в сторону *bxdPRE* или нет.

В представленной работе показано, что блокирование проходящей через *bxdPRE* транскрипции терминатором SV40 не препятствует инактивации PRE. Также протестировано значение ориентации *bxdPRE* при проходящей транскрипции. Установлено, что и в обратной ориентации *bxdPRE* проходящая через него транскрипция не приводит к элиминации факторов PcG/TrxG.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Создание плазмидных конструкций

Все конструкции созданы на основе вектора CaSpeR, содержащего ген *white* с неполной делецией первого интрона (кодирует полноценный продукт гена *white*) [25]. Эхансер гена *white* (Ee), находящийся в геноме в положении -1180...-1849 п.н. относительно старта транскрипции гена *white* [26], был вырезан из плазмиды Ee-pBluescript SK+ [27] и встроен в прямой ориентации в вектор CaSpeR4 по NotI-сайту [En-*white*].

Фрагмент SmaI-SalI длиной 4324 п.н. плазмидного вектора CaSpeR-hs43-lacZ, содержащий ген *lacZ* с лидерной областью *adh* и терминатор транскрипции SV40 на 3'-конце (GenBank: X81643.1), был встроен в вектор pBluescript SK+ по SmaI- и SalI-сайтам [LacZ-SV40-pSK].

Промотор гена *hsp26* длиной 472 п.н. амплифицировали с помощью ПЦП (праймеры 5'-ctagaacttcg-gctctctca-3' и 5'-gttgaatgaactgtttgactgt-3') и встроили в вектор pBluescript SK+ по сайту эндонуклеазы рестрикции EcoRV [hsp26-pSK]. Фрагмент HindIII-PstI вектора hsp26-pSK встраивали в вектор LacZ-SV40-pSK по SmaI-сайту [hsp26-LacZ-SV40-pSK]. Фрагмент NotI-SalI вектора hsp26-LacZ-SV40-pSK встраивали в вектор En-*white* по BamHI-сайту [hsp26-LacZ-SV40-En-*white*].

Фрагмент HindIII-EcoRI, содержащий минимальный промотор гена *hsp70* и пять сайтов GAL4 с 5'-стороны, вырезали из вектора pUAST [28] и встраивали в вектор pBluescript SK+-sce2 по EcoRV-сайту [sce(UAS)]. Кодировую область гена *eGFP* длиной 717 п.н. амплифицировали с помощью ПЦП (праймеры 5'-atggtgagcaagggcgaggagct-3' и 5'-ctgtacagctc-gtccatgccga-3') и клонировали в вектор pBluescript SK+ по EcoRV-сайту [eGFP-pSK].

Фрагмент HindIII-EcoRI вектора eGFP-pSK встраивали в прямой ориентации в вектор sce(UAS) по HincII-сайту [(UAS)sce-eGFP].

Фрагмент XbaI-BamHI длиной 702 п.н. вектора pUAST, содержащего терминатор транскрипции,

был встроен в вектор pBluescript SK+-lox2 по сайту эндонуклеазы рестрикции EcoRV [lox(SV40)]. Фрагмент XbaI-XbaI вектора lox(SV40) встроен в вектор (UAS)sce-eGFP по XhoI-сайту [(UAS)sce-eGFP-lox(SV40)].

Фрагмент HincII-HincII длиной 1828 п.н. вектора LacZ-SV40-pSK был встроен в вектор pBluescript SK+ по сайту эндонуклеазы рестрикции EcoRV [linker1828bp-pSK]. Фрагмент XbaI-BamHI длиной 222 п.н. вектора pGL3basic, содержащего терминатор транскрипции SV40, встраивали в вектор linker1828bp-pSK по SmaI-сайту [linker1828-SV40s-pSK].

Фрагмент NotI-BamHI вектора (UAS)sce-eGFP-lox(SV40) был встроен в вектор linker1828-SV40s-pSK по EcoRV-сайту [(UAS)sce-eGFP-lox(SV40)-linker1828-SV40s-pSK].

Фрагмент HincII-XbaI, содержащий *bxdPRE* длиной 656 п.н. (3R:16764122..16764777), был вырезан из вектора frt(PRE) [29] и встроен в вектор (UAS)sce-eGFP-lox(SV40)-linker1828-SV40s-pSK по AorI-сайту в прямой [(UAS)sce-eGFP-lox(SV40)-linker785frt(PREdir)linker1043-SV40s-pSK] или обратной [(UAS)sce-eGFP-lox(SV40)-linker785frt(PRErev)linker1043-SV40s-pSK] ориентации.

Конструкция UDTPD. Фрагмент XbaI-XbaI вектора (UAS)sce-eGFP-lox(SV40)-linker785frt(PREdir)-linker1043-SV40s-pSK был встроен в вектор hsp26-LacZ-SV40-En-*white* по BamHI-сайту.

Конструкция UDTPR. Фрагмент XbaI-XbaI вектора (UAS)sce-eGFP-lox(SV40)-linker785frt(PRErev)-linker1043-SV40s-pSK встраивали в вектор hsp26-LacZ-SV40-En-*white* по BamHI-сайту.

Все детали создания конструкций могут быть предоставлены по запросу.

Трансформация эмбрионов *Drosophila melanogaster* и фенотипический анализ экспрессии генов *yellow* и *white* в трансгенных линиях

ДНК-конструкции и P-элемент с дефектными инвертированными повторами *P25.7ws*, использованный как источник транспозазы [30], инъецировали в линию *y^{1w118}* на стадии пребластодермального эмбриона согласно [31, 32]. Выживших мух скрещивали с линией *y^{1w118}*. Трансгенных мух отбирали по фенотипическому проявлению экспрессии гена *white*. Количество копий определяли методом Саузерн-блот-гибридизации с фрагментом гена *white*. Отбирали линии, содержащие одну копию конструкции на геном.

Для *in vivo* делеции фрагмента ДНК мух, содержащих конструкцию, скрещивали с трансгенными

мухами, экспрессирующими Flp (*w¹¹¹⁸*; *S2CyO*, *hs-FLP*, *ISA/Sco*; +) или рекомбиназу Cre (*y^{1w¹}*; *Cyo*, *P[w⁺, cre]/Sco*; +) [33, 34]. Правильность удаления фрагмента подтверждали с помощью ПЦР.

Для экспрессии *GAL4* под контролем тубулинового промотора использовали линию *yw¹¹¹⁸*; *P[w⁻, tub-GAL4]117/TM3,Sb*, производную Bloomington Stock Center #5138, из которой удален маркерный ген *mini-white* [35].

Экспрессию гена *white* определяли путем визуальной оценки пигментации глаз по стандартной шкале: красная окраска – пигментация глаз мух дикого типа (экспрессия гена *white* при полной стимуляции тканеспецифичным энхансером), белая окраска глаз наблюдается в отсутствие пигментации (полная инактивация гена *white*). Разная степень мозаичности проявляется при репрессии.

Для анализа фенотипов трансгенных мух использовали самцов в возрасте 3–5 дней после вылупления, развившихся при температуре 25°C. Все детали скрещиваний, использованных для генетического анализа и вырезаний функциональных элементов, могут быть предоставлены по запросу.

Иммунопреципитация хроматина (X-ChIP)

Для каждого эксперимента было отобрано 150–200 мг взрослых мух. Иммунопреципитацию хроматина проводили в соответствии с методикой, описанной ранее [21].

Антитела

Антитела к белкам PH [к фрагменту 86–520 а.о., ph-p-PA]; dSfmbt [1–348 а.о., Sfmbt-PB] [27]; PC [к фрагменту 191–354 а.о., Pc-PA]; TRX-N [к фрагменту 8–351 а.о., trx-PA]; GAF [к фрагменту 1–519 а.о., Trl-PB] [21] получены в кроликах. Антитела к H3K27me3: Abcam (ab6002, ChIP Grade).

ПЦР в реальном времени с использованием Hot-Start Taq-ДНК-полимеразы

ПЦР в реальном времени проводили на приборе C1000tm ThermalCycler (Bio-Rad) в объеме 25 мкл по следующему протоколу (на одну реакцию): 2.5 мкл 10 × буфера (0.5 М Tris-HCl pH 8.8, 0.5 М KCl, 15 mM MgCl₂, 1% Tween 20), 2 мкл 25 mM MgCl₂, 0.5 мкл 10 mM dNTP, 1.5 мкл каждого праймера (в концентрации 5 пмоль/мкл), 0.25 мкл SYBR Green100× (Sigma), 0.3 мкл Hot-Start Taq-ДНК-полимеразы («СибЭнзим»), 11.45 мкл mQ, 5 мкл пробы. Данные обсчитывали с использованием программы в приложении к прибору Bio-Rad CFX Manager и Microsoft Excel. В качестве известных стандартов использовали десятикратные разведения геномной ДНК дрозофилы в концентрации от 0.1 до 100 нг. Праймеры, ис-

пользованные для анализа материала, полученного при иммунопреципитации хроматина, методом ПЦР в реальном времени

1-ChIP forward	5'-gagaactctgaataggggaattgg-3'
1-ChIP reverse	5'-agctcctgcacctgctcaccat-3'
2-ChIP forward	5'-ccgaccactaccagcagaac-3'
2-ChIP reverse	5'-gtccatgccgagagtgatcc-3'
3-ChIP forward	5'-tctcgcacggtatcgataagcttg-3'
3-ChIP reverse	5'-ccataatggctgcccgtaaaag-3'
4-ChIP forward	5'-ggtgaaattatcgatgagcgtgg-3'
4-ChIP reverse	5'-cagttcaaccaccgcacgataga-3'
5-ChIP forward	5'-aaaactttctacgcctcagttc-3'
5-ChIP reverse	5'-gcttattagccctgcaattga-3'
6-ChIP forward	5'-gcaactggatcattgaaacttatctg-3'
6-ChIP reverse	5'-tggacagagaaggaggcaaac-3'
<i>Ras64B</i> forward	5'-gagggattcctgctcgtcttcg-3'
<i>Ras64B</i> reverse	5'-gtcgcactgttaccaccatc-3'
<i>bxdPRE</i> adjacent forward (точка рядом с <i>bxdPRE</i> в геноме)	5'-aagagcaaggcgaagagagc-3'
<i>bxdPRE</i> adjacent reverse (точка рядом с <i>bxdPRE</i> в геноме)	5'-cgttttaagtgcgactgagatgg-3'

пользованные для анализа материала, полученного при иммунопреципитации хроматина, методом ПЦР в реальном времени, указаны в таблице.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Модельная система для изучения влияния транскрипции на рекрутирование белков групп Polycomb и Trithorax на PRE

Влияние проходящей транскрипции на активность PRE изучали в составе трансгенных конструкций, интегрированных в геном *D. melanogaster* путем микроинъекции плазмидной ДНК в эмбрионы, за счет фланкирующих трансген 5'- и 3'-концов Р-элемента. Использовали элемент *bxdPRE* размером 660 п.н. из регуляторной области гена *Ubx* [36, 37]. Этот PRE-элемент хорошо изучен и имеет четкие сайты связывания различных белков группы Polycomb/Trithorax (PcG/TrxG) [15, 21, 36, 37].

Созданы две конструкции, в которых *bxdPRE* встроен между UAS-промотором и репортерными генами: *lacZ* под контролем промотора гена *hsp26* и ген *white*. Маркерный ген *white* отвечает за пигментацию глаз. Транскрипцию данного гена усиливали, встраивая непосредственно перед ним тканеспецифичный энхансер, обеспечивающий повышенный уровень

экспрессии гена *white* в глазах мух. Для блокирования внутренних транскриптов трансгена использовали два терминатора: перед геном *hsp26-lacZ* и перед энхансером гена *white*. Для того чтобы заблокировать возможную транскрипцию в месте интеграции конструкции в геноме до индукции UAS, с 5'-стороны от *bxDPRE* встраивали дополнительный терминатор транскрипции SV40. В обеих конструкциях UAS-промотор направлен в сторону *bxDPRE*, однако в первой конструкции (UDTPD) *bxDPRE* находится в прямой ориентации, а во второй (UDTPR) – в обратной ориентации по отношению к UAS-промотору (рис. 1). UAS-промотор, применяемый для направленной транскрипции через *bxDPRE*, представляет собой минимальный промотор гена *hsp70*, перед которым расположены пять сайтов связывания дрожжевого активатора GAL4. Этот промотор является индуцибельным. При индукции UAS-промотора (путем скрещивания трансгенных линий с линией, несущей ген *GAL4* под контролем тубулинового промотора) достигается высокий уровень транскрипции.

Ключевые элементы – терминатор SV40 и *bxDPRE* – в обеих конструкциях фланкированы сайтом LOX или FRT для сайт-специфических рекомбиназ Cre или Flp соответственно. Такой подход позволяет *in vivo* удалять выбранные фрагменты ДНК и сравнивать экспрессию маркерного гена и функциональные изменения системы в присутствии и в отсутствие ключевых элементов в одном и том же месте инсерции трансгена в геном.

В результате трансформации конструкций получены четыре независимые трансгенные линии с *bxDPRE* в статусе репрессии для UDTPD (рис. 1А) и три – для UDTPR (рис. 1Б). Репрессия гена *white* усиливалась в гомозиготе. Этот эффект характерен для PRE-элементов и называется PSS (Pairing Sensitive Silencing) [38]. Фенотипы трансгенов UDTPD и UDTPR не отличались, т.е. эффекты не зависели от ориентации *bxDPRE*. Делеция терминатора транскрипции, находящегося между UAS-промотором и PRE, не привела к изменению фенотипов. Вместе с тем, индукция UAS-промотора с помощью GAL4 привела к дерепрессии гена *white* как и при делеции терминатора, так и в исходных линиях. Таким образом, в исследуемой системе GAL4 инактивирует *bxDPRE* вне зависимости от ориентации и присутствия терминатора между UAS-промотором и *bxDPRE*.

Транскрипция, проходящая через *bxDPRE*, не приводит к элиминированию факторов групп *Polycomb* и *Trithorax* с *bxDPRE*

Ранее мы показали, что даже сильная транскрипция не приводит к полной элиминации комплексов

PcG/TrxG с *bxDPRE*, если в трансгене он находится в прямой ориентации. Нами протестировано влияние проходящей транскрипции при противоположной ориентации *bxDPRE*. С этой целью применили метод иммунопреципитации хроматина, выделенного из взрослых мух, гомозиготных по конструкции, в присутствии и в отсутствие GAL4 (рис. 2). В ПЦР-анализе использовали шесть участков конструкции: 1 – UAS-промотор, 2 – кодирующая область гена *eGFP*, 3 – *bxDPRE*, 4 – кодирующая область гена *LacZ*, 5 – энхансер гена *white*, 6 – промотор гена *white*. В качестве положительного контроля взяли геномную область *bxDPRE*, расположенную рядом с элементом, использованным в трансгенных конструкциях, а в качестве отрицательного – кодирующую область гена *Ras64B*. Иммунопреципитацию проводили с материала, полученного из трансгенной линии UDTPR (№ 2), в которой делегирован терминатор транскрипции SV40 (рис. 2).

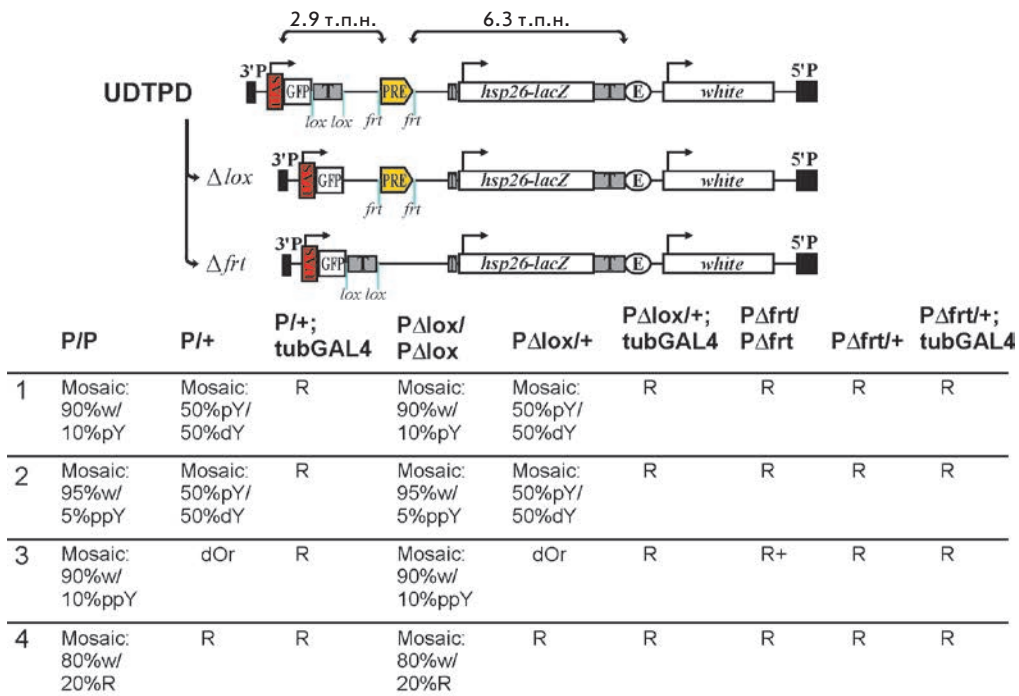
Показано, что пик связывания факторов PH (PRC1-комплекс, рис. 2А) и dSfmbt (PhoRC-комплекс, рис. 2Б) приходится на *bxDPRE* в составе трансгена. Локализация данных факторов согласуется с данными, согласно которым PH и dSfmbt обнаруживаются преимущественно на PRE-элементах, но не в других районах домена, подверженного репрессии [14, 15, 21, 39, 40].

При индукции транскрипции через *bxDPRE* уровень связывания данных факторов падает, однако не исчезает полностью. Аналогичный результат получен при анализе влияния транскрипции на рекрутирование факторов PH и dSfmbt на *bxDPRE*, расположенный в трансгене в прямой ориентации относительно UAS-промотора [21].

Фактор PC комплекса PRC1 специфически взаимодействует с гистоном 3, триметилированным по лизину в позиции 27 (H3K27me3) [41, 42]: модификацией, характерной для хроматина, репрессруемого белками PcG [16, 40]. Связывание фактора PC, так же как и H3K27me3, в отличие от остальных коровых компонентов PcG не ограничивается PRE и покрывает более широкую область, подверженную репрессии [16, 21, 40, 43]. В согласии, в производной трансгена UDTPR выявлен более широкий профиль распределения фактора PC (рис. 2В) и модификации H3K27me3 (рис. 2Г). Введение активатора GAL4 не привело к полному элиминированию PC и H3K27me3, однако наблюдалось значимое снижение уровня их рекрутирования на *bxDPRE* и окружающие области трансгена.

Дополнительно проанализировано связывание TrxG-факторов Trx (рис. 2Д) и GAF (рис. 2Е). Установлено, что индукция транскрипции через *bxDPRE* приводит к усилению связывания обоих факторов с *bxDPRE* примерно в 2 раза.

А



Б

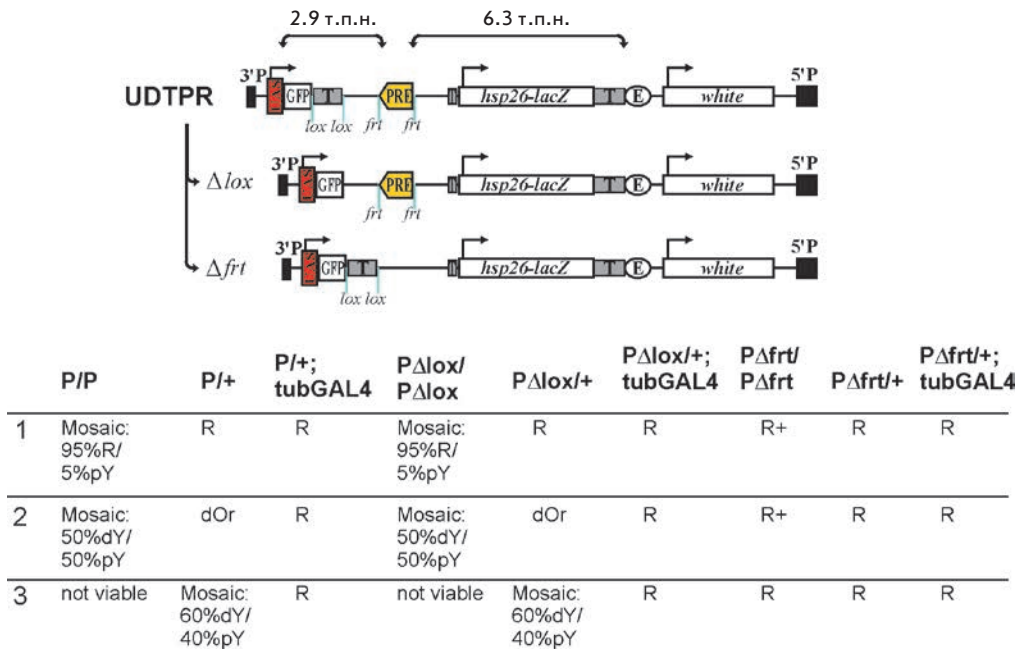


Рис. 1. Схема трансгенных конструкций и фенотипический анализ линий. А – конструкция UDTDP. Минимальный промотор гена *hsp70* под контролем сайтов связывания белка активатора GAL4 (UAS) запускает транскрипцию в направлении *eGFP* и *bxdPRE*. Т – терминатор транскрипции, *hsp26-lacZ* и *white* – репортерные гены, E – энхансер гена *white*. Снизу указаны фенотипы полученных линий. P/P – гомозиготы по конструкции; P/+ – гетерозиготы по конструкции; P/+; tubGAL4 – гетерозиготы, экспрессирующие белок GAL4; PΔlox/PΔlox – гомозиготы с делецией терминатора транскрипции; PΔlox/+ – гетерозиготы с делецией терминатора транскрипции; PΔlox/+; tubGAL4 – гетерозиготы с делецией терминатора транскрипции, экспрессирующие белок GAL4; PΔfrit/PΔfrit – гомозиготы с делецией *bxdPRE*; PΔfrit/+ – гетерозиготы с делецией PRE; PΔfrit/+; tubGAL4 – гетерозиготы с делецией *bxdPRE*, экспрессирующие белок GAL4. Градация пигментации глаз, зависящая от уровня экспрессии гена *white*: R+ – ярко-красный (дикий тип); R – красный; BrR – темно-коричневый; Br – коричневый; dOr – темно-оранжевый; Or – оранжевый; dY – темно-желтый; Y – желтый; pY – светло-желтый; w – белый. Мозаичная окраска фасеток отмечена как mosaic. Б – конструкция UDTPR

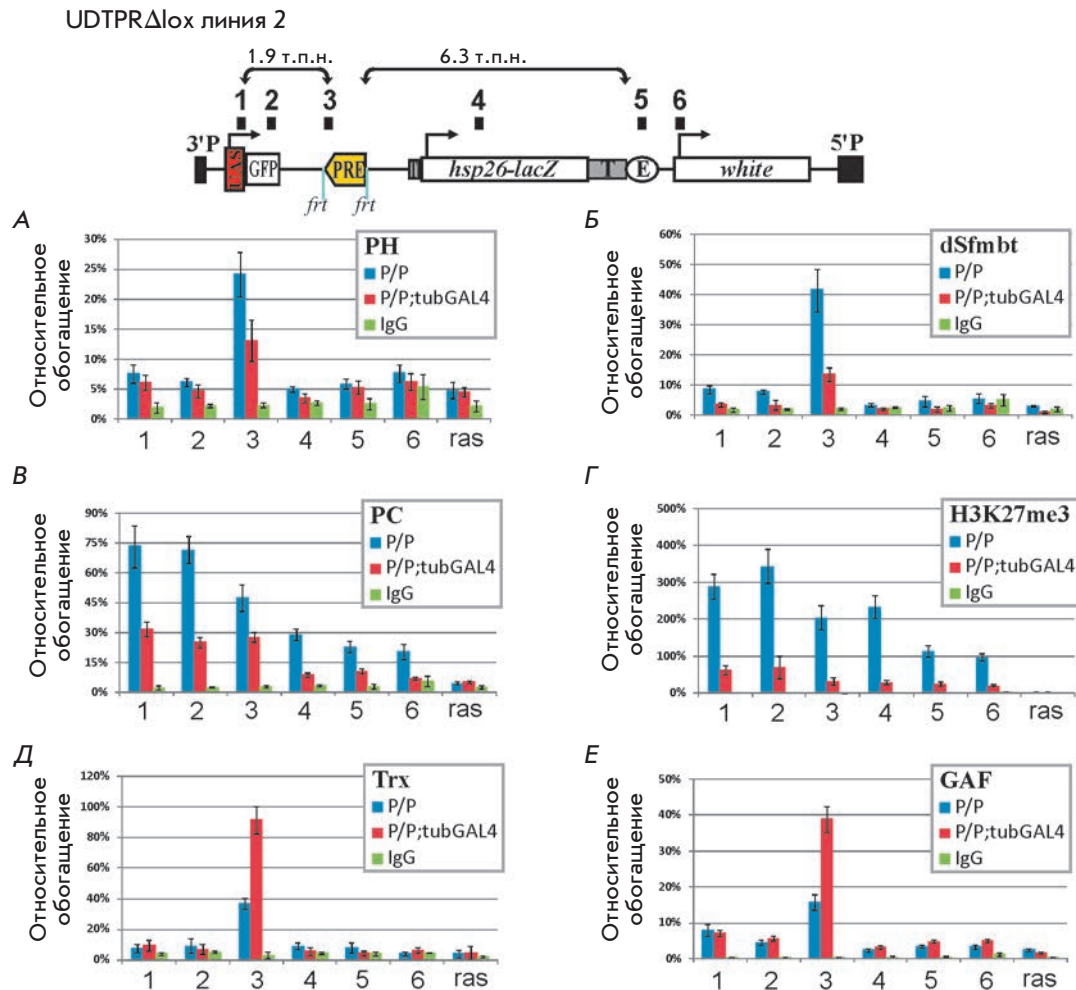


Рис. 2. Анализ связывания PcG/TrxG-факторов при проходящей транскрипции. Представлен результат иммунопреципитации хроматина, выделенного из взрослых мух. Цифры над схемами конструкций (1, 2, 3, 4, 5 и 6) обозначают пары праймеров, использованных в количественной ПЦР. Обогащения при иммунопреципитации хроматина показаны в виде доли от образца Input, с нормированием на эндогенный позитивный контроль – область рядом с *bxd*PRE 660 п.н. в геноме. Кодированная область гена *Ras64B* – отрицательный контроль (*ras*). На диаграммах синие столбцы обозначают обогащение для линий, гомозиготных по конструкции (P/P); красные столбцы – гомозиготные линии, экспрессирующие GAL4 (P/P; tubGAL4); зеленые столбцы – обогащение, полученное при использовании неспецифических антител. На диаграммах показаны стандартные отклонения. Используются антитела против PH (А), dSfmbt (Б), PC (В), H3K27me3 (Г), Trx (Д), GAF (Е)

Таким образом, прохождение транскрипции через PRE приводит к изменению соотношения в связывании PcG/TrxG-факторов, но не к полному «сбрасыванию» этих белков с ДНК.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За репрессию/активацию множества генов *Drosophila* отвечают белки группы PcG/TrxG [1–4], которые связываются с так называемыми PRE-элементами ДНК [5, 6]. В ряде работ показано, что отсутствие PRE-опосредованной репрессии

коррелирует с присутствием некодирующих транскриптов, проходящих через PRE [24, 44]. На основании этого предложена модель, согласно которой проходящая транскрипция физически «сбрасывает» PRE-ассоциированные факторы и замещает репрессивные модификации гистонов на активные [24]. Несмотря на кажущуюся ясность, данная гипотеза не подвергалась прямой проверке.

Однако согласно другим данным, некодирующие РНК локуса *Ubx* (lncRNA-*bxd* и lncRNA *iab-8*) связаны с доменом, подверженным репрессии [45, 46].

Более того, несмотря на тщательные исследования, некодирующие РНК не обнаружены в районах PRE-элементов некоторых локусов (*invected*, *engrailed*), что свидетельствует об отсутствии ключевой роли транскрипции, по крайней мере, в функционирующей некоторых PRE [47].

Ранее мы проверили эффект транскрипции в опосредованном GAL4 переключении PRE-элемента [21]. В результате выяснилось, что даже сильная проходящая через *bxd*PRE транскрипция не приводит к полной элиминации PcG/TrxG-факторов, но изменяет соотношение связывания данных белков – связывание PcG уменьшается, а TrxG – растет. Эффект транскрипции подробно проанализирован для *bxd*PRE, встроенного в трансген в прямой ориентации [21]. В то же время активное и неактивное состояния PRE из локуса *vg* коррелируют с проходящей некодирующей транскрипцией с разных цепей ДНК [48]. Таким образом, направление транскрипции, проходящей через PRE, потенциально может быть решающим для активности этого элемента. Мы проверили эту возможность и выяснили, что изменение ориентации *bxd*PRE не приводит к изменению эффекта проходящей транскрипции. Связывание факторов PcG/TrxG при транскрипции не исчезает, однако привлечение TrxG-белков Trx и GAF растет, а PcG-белков (PH, dSfmbt, Pc) снижается.

Присутствие сильного терминатора SV40 между UAS-промотором и *bxd*PRE также не препятствует блокированию репрессии. Вероятно, сайты связывания GAL4 сами по себе способны нейтрализовать PRE-зависимый сайленсинг, и проходящая через PRE транскрипция не играет определяющей роли в данном процессе.

PRE-элементы регулируют гены, экспрессия которых должна меняться в ходе развития орга-

низма. Так, определенный ген должен экспрессироваться в определенных клетках на определенной стадии развития, а затем его экспрессия должна быть заблокирована. По всей видимости, связывание репрессорных факторов с PRE в его неактивном состоянии необходимо для того, чтобы в определенный момент времени PRE мог быстро перейти в активное состояние и прекратить экспрессию гена-мишени. Похожий по логике механизм описан для многих промоторов эукариот – это задержка РНК-полимеразы II. В этом случае с транскрипционно неактивным промотором связывается РНК-полимераза II и при необходимости быстро запускает транскрипцию.

Механизм связывания белков с PRE-элементом при активной проходящей транскрипции также не ясен. Известно, что с PRE ассоциирован ряд ДНК-связывающих факторов с мотивом «цинковые пальцы». Возможно, транскрипция не препятствует прямым ДНК-белковым контактам. С другой стороны, существует возможность того, что сохранение комплексов на PRE при проходящей транскрипции обусловлено контактами между PcG/TrxG-факторами и гистоновыми белками. Так, в составе белков PcG имеются домены, способные прямо взаимодействовать с нуклеосомами (например, MBT-домены dSfmbt и Scm) [14, 49, 50], а транскрипция не приводит к полной диссоциации нуклеосом [51]. Однако детали этих процессов в настоящее время не ясны и требуют дополнительных исследований. ●

В работе использовано оборудование ЦКП ИБГ РАН. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-24-00166).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beisel C., Paro R. // *Nat. Rev. Genet.* 2011. V. 12. № 2. P. 123–135.
2. Muller J., Verrijzer P. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2009. V. 19. № 2. P. 150–158.
3. Schwartz Y.B., Pirrotta V. // *Nat. Rev. Genet.* 2013. V. 14. № 12. P. 853–864.
4. Steffen P.A., Ringrose L. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. V. 15. № 5. P. 340–356.
5. Kassis J.A., Brown J.L. // *Adv. Genet.* 2013. V. 81. P. 83–118.
6. McElroy K.A., Kang H., Kuroda M.I. // *Open. Biol.* 2014. V. 4. P. 140006.
7. Francis N.J., Saurin A.J., Shao Z., Kingston R.E. // *Mol. Cell.* 2001. V. 8. № 3. P. 545–556.
8. Saurin A.J., Shao Z., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Kingston R.E. // *Nature.* 2001. V. 412. № 6847. P. 655–660.
9. Shao Z., Raible F., Mollaaghababa R., Guyon J.R., Wu C.T., Bender W., Kingston R.E. // *Cell.* 1999. V. 98. № 1. P. 37–46.
10. Cao R., Wang L., Wang H., Xia L., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Jones R.S., Zhang Y. // *Science.* 2002. V. 298. № 5595. P. 1039–1043.
11. Czermin B., Melfi R., McCabe D., Seitz V., Imhof A., Pirrotta V. // *Cell.* 2002. V. 111. № 2. P. 185–196.
12. Kuzmichev A., Nishioka K., Erdjument-Bromage H., Tempst P., Reinberg D. // *Genes Dev.* 2002. V. 16. № 22. P. 2893–2905.
13. Muller J., Hart C.M., Francis N.J., Vargas M.L., Sengupta A., Wild B., Miller E.L., O'Connor M.B., Kingston R.E., Simon J.A. // *Cell.* 2002. V. 111. № 2. P. 197–208.
14. Klymenko T., Papp B., Fischle W., Kocher T., Schelder M., Fritsch C., Wild B., Wilm M., Muller J. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. № 9. P. 1110–1122.
15. Papp B., Muller J. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. № 15. P. 2041–2054.
16. Schwartz Y.B., Kahn T.G., Nix D.A., Li X.Y., Bourgon R., Biggin M., Pirrotta V. // *Nature Genetics.* 2006. V. 38. № 6. P. 700–705.
17. Schuettengruber B., Martinez A.M., Iovino N., Cavalli G. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2011. V. 12. № 12. P. 799–814.
18. Cavalli G., Paro R. // *Cell.* 1998. V. 93. № 4. P. 505–518.
19. Cavalli G., Paro R. // *Science.* 1999. V. 286. № 5441. P. 955–958.

20. Dejardin J., Cavalli G. // *EMBO J.* 2004. V. 23. № 4. P. 857–868.
21. Erokhin M., Elizav'ev P., Parshikov A., Schedl P., Georgiev P., Chetverina D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 48. P. 14930–14935.
22. Maurange C., Paro R. // *Genes Dev.* 2002. V. 16. № 20. P. 2672–2683.
23. Perez L., Barrio L., Cano D., Fiuza U.M., Muzzopappa M., Milan M. // *Development.* 2011. V. 138. № 15. P. 3125–3134.
24. Rank G., Prestel M., Paro R. // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. № 22. P. 8026–8034.
25. Pirrotta V. // *Biotechnology.* 1988. V. 10. P. 437–456.
26. Qian S., Varjavand B., Pirrotta V. // *Genetics.* 1992. V. 131. № 1. P. 79–90.
27. Erokhin M., Davydova A., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P., Chetverina D. // *Epigenet. Chromatin.* 2013. V. 6. № 1. P. 31.
28. Brand A.H., Perrimon N. // *Development.* 1993. V. 118. № 2. P. 401–415.
29. Erokhin M., Parshikov A., Georgiev P., Chetverina D. // *Chromosoma.* 2010. V. 119. № 3. P. 243–253.
30. Karess R.E., Rubin G.M. // *Cell.* 1984. V. 38. № 1. P. 135–146.
31. Rubin G.M., Spradling A.C. // *Science.* 1982. V. 218. № 4570. P. 348–353.
32. Spradling A.C., Rubin G.M. // *Science.* 1982. V. 218. № 4570. P. 341–347.
33. Golic K.G., Lindquist S. // *Cell.* 1989. V. 59. № 3. P. 499–509.
34. Siegal M.L., Hartl D.L. // *Meth. Mol. Biol.* 2000. V. 136. P. 487–495.
35. Kyrchanova O., Toshchakov S., Parshikov A., Georgiev P. // *Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 27. № 8. P. 3035–3043.
36. Comet I., Savitskaya E., Schuettengruber B., Negre N., Lavrov S., Parshikov A., Juge F., Gracheva E., Georgiev P., Cavalli G. // *Dev. Cell.* 2006. V. 11. № 1. P. 117–124.
37. Orlando V., Jane E.P., Chinwalla V., Harte P.J., Paro R. // *EMBO J.* 1998. V. 17. № 17. P. 5141–5150.
38. Kassis J.A. // *Genetics.* 1994. V. 136. № 3. P. 1025–1038.
39. Beisel C., Bunes A., Roustan-Espinosa I.M., Koch B., Schmitt S., Haas S.A., Hild M., Katsuyama T., Paro R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 42. P. 16615–16620.
40. Schuettengruber B., Ganapathi M., Leblanc B., Portoso M., Jaschek R., Tolhuis B., van Lohuizen M., Tanay A., Cavalli G. // *PLoS Biol.* 2009. V. 7. № 1. P. e13.
41. Fischle W., Wang Y., Jacobs S.A., Kim Y., Allis C.D., Khorasanizadeh S. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. № 15. P. 1870–1881.
42. Min J., Zhang Y., Xu R.M. // *Genes Dev.* 2003. V. 17. № 15. P. 1823–1828.
43. Bowman S.K., Deaton A.M., Domingues H., Wang P.I., Sadreyev R.I., Kingston R.E., Bender W. // *Elife.* 2014. V. 3. P. e02833.
44. Bae E., Calhoun V.C., Levine M., Lewis E.B., Drewell R.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 26. P. 16847–16852.
45. Petruk S., Sedkov Y., Riley K.M., Hodgson J., Schweisguth F., Hirose S., Jaynes J.B., Brock H.W., Mazo A. // *Cell.* 2006. V. 127. № 6. P. 1209–1221.
46. Gummalla M., Maeda R.K., Castro Alvarez J.J., Gyurkovics H., Singari S., Edwards K.A., Karch F., Bender W. // *PLoS Genetics.* 2012. V. 8. № 5. P. e1002720.
47. Langlais K.K., Brown J.L., Kassis J.A. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 11. P. e48765.
48. Herzog V.A., Lempradl A., Trupke J., Okulski H., Altmutter C., Ruge F., Boidol B., Kubicek S., Schmauss G., Aumayr K., et al. // *Nat. Genet.* 2014. V. 46. № 9. P. 973–981.
49. Grimm C., de Ayala Alonso A.G., Rybin V., Steuerwald U., Ly-Hartig N., Fischle W., Muller J., Muller C.W. // *EMBO Repts.* 2007. V. 8. № 11. P. 1031–1037.
50. Grimm C., Matos R., Ly-Hartig N., Steuerwald U., Lindner D., Rybin V., Muller J., Muller C.W. // *EMBO J.* 2009. V. 28. № 13. P. 1965–1977.
51. Kulaeva O.I., Hsieh F.K., Chang H.W., Luse D.S., Studitsky V.M. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1829. № 1. P. 76–83.