

САЙТЫ СВЯЗЫВАНИЯ АРХИТЕКТУРНОГО БЕЛКА Su(Hw) СТИМУЛИРУЮТ РЕКРУТИРОВАНИЕ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКИХ РЕГУЛЯТОРОВ PcG/TrxG НА ХРОМАТИН: CRISPR/Cas9-ТЕСТ

© 2023 г. М. М. Ерохин¹, *, Ф. В. Горбенко¹, Д. В. Ломаев¹, Д. А. Четверина¹, **

¹Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

*e-mail: yermaxbio@yandex.ru

**e-mail: daria.chetverina@gmail.com

Поступила в редакцию 17.04.2022 г.

После доработки 29.05.2022 г.

Принята к публикации 09.06.2022 г.

Белки групп Polycomb и Trithorax (PcG и TrxG) являются эпигенетическими факторами, отвечающими за репрессию и активацию транскрипции соответственно. У *Drosophila* белки PcG/TrxG рекрутируются на специализированные ДНК-элементы, называемые PRE (Polycomb response elements). В зависимости от контекста, данные элементы могут репрессировать, активировать или быть нейтральными по отношению к промотору гена-мишени. Ранее в трансгенных исследованиях с использованием PhiC31 сайт-специфической системы интеграции мы продемонстрировали, что расположенные рядом с PRE сайты для архитектурных белков могут индуцировать репрессорную активность *bxd*PRE, стимулируя связывание факторов PcG/TrxG с данным элементом. Однако этот эффект может зависеть от дополнительных ДНК-элементов, присутствующих в месте интеграции после PhiC31-зависимой инсерции трансгенов. В настоящем исследовании, используя альтернативную систему интеграции на основе CRISPR/Cas9-катализируемой гомологичной репарации, мы доказали, что сайты связывания архитектурного белка Su(Hw) действительно способны индуцировать репрессорную активность *bxd*PRE и привлечение белков PcG/TrxG вне зависимости от дополнительных ДНК-элементов, присутствующих в месте интеграции после PhiC31-зависимой инсерции трансгенов.

Ключевые слова: *Drosophila*, Polycomb, PRE-элемент, репрессия транскрипции, CRISPR/Cas9.

DOI: 10.31857/S0016675823030049, **EDN:** INYMCX

Эпигенетический контроль активности генов является необходимым для дифференцировки клеток и поддержания правильных паттернов экспрессии на взрослой стадии у многоклеточных организмов. Ключевые регуляторы данного процесса — белки групп Polycomb и Trithorax — являются репрессорами и активаторами транскрипции соответственно [1–3]. Нарушение работы данных факторов приводит к различным патологиям, включая онкологические заболевания, что определяет необходимость исследований, направленных на изучение механизма их действия [4–8].

Одним из нерешенных на сегодняшний день вопросов, является понимание механизма рекрутирования белков PcG/TrxG на хроматин. Репрессоры PcG представлены тремя основными белковыми комплексами — PRC1, PRC2 и PhoRC, тогда как активаторы TrxG более разнообразны и включают метилтрансферазные комплексы COMPASS и COMPASS-like, ремоделеры хроматина SWI/SNF и другие (подробнее см. [4]). У *Drosophila* белки PcG/TrxG привлекаются на специализированные

ДНК-регуляторные элементы, названные Polycomb response elements (PRE) [9, 10]. Многочисленные эксперименты с трансгенными конструкциями, интегрированными в геном, показали, что PRE могут подавлять экспрессию репортерных генов и поддерживать репрессию во время развития.

Характерной чертой PRE-зависимой репрессии является эффект, названный pairing-sensitive silencing (PSS), который заключается в том, что репрессия становится намного сильнее у мух, гомозиготных по трансгену [11, 12]. Считается, что усиление репрессии у гомозигот связано с транс-взаимодействиями между двумя копиями PRE, находящихся на гомологичных хромосомах. PSS-эффект также наблюдался для PREs в их эндогенном контексте [13].

Кроме того показано, что активность PRE-элементов в составе трансгенов сильно зависит от окружающего хроматина. В зависимости от сайта интеграции PREs могут репрессировать или активировать транскрипцию репортерных генов, либо же быть нейтральным элементом, не оказывая вли-

яния на экспрессию гена [11, 14–17]. Это указывает на то, что активность PRE модулируется хромосомным контекстом. Однако детали данного процесса и факторы влияния на активность PRE практически не изучены.

Ранее мы показали, что сайты связывания для архитектурных белков, расположенные рядом с PRE-элементом, могут усиливать PRE-опосредованную репрессию и, более того, индуцировать репрессионную активность неактивного PRE [16]. В частности, данный эффект был показан на модельной системе, содержащей четыре сайта связывания для архитектурного белка Su(Hw), PRE-элемента *bxd*PRE из регуляторной области гена *Ubx*, репортерный ген *white* и attB-сайт. Сайт attB необходим для интеграции конструкции в геном с помощью направленной сайт-специфической рекомбинации PhiC31 [18]. При PhiC31-опосредуемой интеграции происходит рекомбинация между сайтом attB трансгена и встроенным в определенное место генома сайтом attP. При этом при встраивании происходит интеграция как тестируемых последовательностей ДНК, так и дополнительных последовательностей, необходимых для наработки плазмиды в бактериях. Кроме того, в геноме рядом с трансгеном присутствуют фрагменты трансгенного элемента Mariner, за счет которого был интегрирован сайт attP [18]. Таким образом, способность сайтов связывания архитектурных белков активировать репрессионную активность PRE потенциально может зависеть от участков ДНК, необходимых для PhiC31-зависимой интеграции конструкции в геном.

Настоящее исследование направлено на проверку способности сайтов связывания архитектурных белков стимулировать активность PRE независимо других ДНК-регуляторных элементов. Для этого была проведена CRISPR/Cas9-зависимая инсерция только внутренних элементов конструкции в геномную область без последовательностей элемента Mariner и attP. В результате анализа было показано, что стимулирование репрессионной активности *bxd*PRE сайтами Su(Hw) сохраняется при CRISPR/Cas9-зависимой интеграции конструкции. Более того, репрессия сопровождается рекрутированием ДНК-связывающего фактора PRE — Combgap, и белками PcG/TrxG на PRE. Таким образом, стимуляция PRE-опосредованной репрессионной активности *bxd*PRE сайтами Su(Hw) не зависит от присутствующих в геноме после PhiC31-зависимой интеграции элементов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для интеграции трансгенной конструкции в геном (область 96E на третьей хромосоме) мы использовали систему гомологичной рекомбинации, индуцируемой созданием двуцепочечных разрывов с помощью CRISPR/Cas9 системы [19].

Для этого были сделаны следующие плазмиды: 1) CRISPR-96E — плазида, экспрессирующая гидовую РНК (gRNA) к геномной области 96E; 2) HR-Su(Hw)-bxd — конструкция, содержащая исследуемые ДНК-регуляторные элементы и участки для гомологичной рекомбинации.

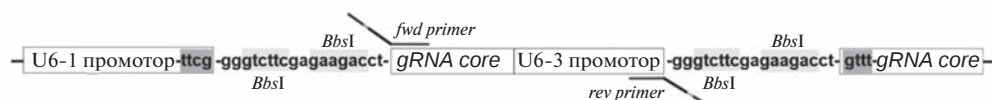
Создание плазмиды 96E-CRISPR

Для выбора оптимальных сайтов-мишеней gRNA к геномной области 96E использовалась онлайн-программа поиска мишеней flyCRISPR (<https://flycrispr.org/>) [20]. Для более эффективной интеграции были выбраны две пары gRNA: первая пара — 5'-96E-CRISPR1 — 5'-aaagcagcatgga-taccacc-3' и 3'-96E-CRISPR1 — 5'-aagatgtcgcaaaacg-gct-3'; вторая пара — 5'-96E-CRISPR2 — 5'-accacctgg-cccattggatt-3' и 3'-96E-CRISPR2 — 5'-atggataccacctgg-cccat-3'. 5'- и 3'-96E-CRISPR были одновременно с помощью ПЦП вставлены в вектор для двойной экспрессии CRISPRs — prAc_yiless_U6:1:3_attB [21], под контроль промоторов U6:1 и U6:3 соответственно (см. далее рис. 1). Вектор prAc_yiless_U6:1:3_attB [21] основан на плазмиде pCFD4-U6:1_U6:3tandemgRNAs (Addgene # 49411 [19]) с дополнительной вставкой гена yellow-intron-less-attB под контролем промотора Actin5C. Ген *yellow* и attB в данной работе не использовались, в плазмиде они присутствуют для возможности стабильной интеграции плазмид с gRNA в геном.

Для одновременного клонирования 5'- и 3'-96E-CRISPR были подобраны прямой и обратный праймеры, которые также содержат гомологию с вектором prAc_yiless_U6:1:3_attB для ПЦП-амплификации с данного участка. Праймеры для первой пары для создания плазмиды 96E-CRISPR1: 5'-gagaagacctTTCGgAAAGCAGCATGGATACCAC-CGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3' и 5'-gagaagacctAAACAGCCGTTTTGCGACATACTTc-GACGTTAAATTGAAAATAGGTC-3'. Праймеры для второй пары для создания плазмиды 96E-CRISPR2: 5'-gagaagacctTTCGgACCACCTGGCCCCATTG-GATTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG-3' и 5'-gagaagacctAAACATGGGCCAGGTGGTATCCATc-GACGTTAAATTGAAAATAGGTC-3'.

Кроме gRNA, праймеры содержат сайты для эндонуклеазы рестрикции *BbsI* и спейсеры, необходимые для клонирования. *BbsI* распознает 5'-GAAGACN2↓-3'/3'-СТТСТGN6↑-5', присутствующий в 5'-части праймера. Сайты для *BbsI* также присутствуют в векторе prAc_yiless_U6:1:3_attB. Продукты ПЦП, обработанные эндонуклеазой рестрикции *BbsI*, были вставлены в вектор prAc_yiless_U6:1:3_attB, расщепленный по *BbsI*. Правильное лигирование последовательностей в результирующих векторах 96E-CRISPR1 и 96E-CRISPR2 было подтверждено секвенированием.

а Фрагмент вектора pAc_yiless_U6:1:3_attB



Праймеры для клонирования плазмиды 96E-CRISPR1:

Прямой праймер fwd:

5'-gagaagacctt(1)-G(2)-AAAGCAGCATGGATACCACC (5'-96E-CRISPR1)-GTTTATAGCTAGAAATAGCAAG (3)-3'

Обратный праймер rev:

5'-gagaagaccta(1)-AGCCGTTTTCGACATACCTT (комплементарно 3'-96E-CRISPR1)-C(2)-GACGTTAAATTGAAAATAGGTC (4)-3'

Праймеры для клонирования плазмиды 96E-CRISPR2:

Прямой праймер fwd:

5'-gagaagacctt(1)-G(2)-ACCACCTGGCCATTGGATT (5'-96E-CRISPR2)-GTTTATAGCTAGAAATAGCAAG (3)-3'

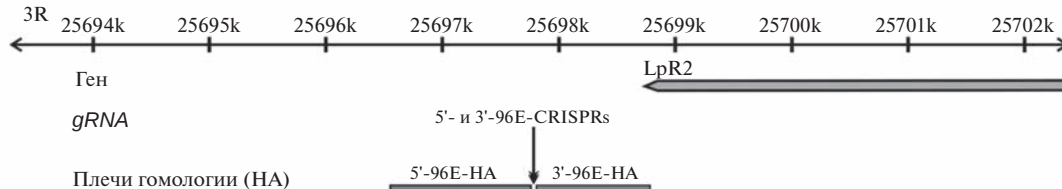
Обратный праймер rev:

5'-gagaagaccta(1)-ATGGGCCAGGTGGTATCCAT (комплементарно 3'-96E-CRISPR2)-C(2)-GACGTTAAATTGAAAATAGGTC (4)-3'

Описание структуры праймеров:

- (1) — BbsI сайт — выделен светло-серым; спейсер для рестрикции-лигирования — выделен темно-серым
- (2) — G (или C в обратном праймере) — необходим для транскрипции с U6 промоторов
- (3) — соответствует фрагменту gRNA core
- (4) — соответствует фрагменту U6:3 промотора

б



в

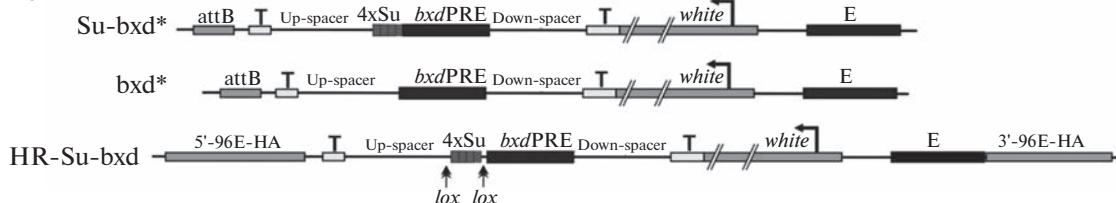


Рис. 1. Дизайн эксперимента. а — схема создания векторов для экспрессии гидовых РНК (gRNA), подробное описание см. в тексте. б — область 96Е, использованная для встройки полученной конструкции. Вертикальной стрелкой указано место после окончания транскрипции гена *LpR2*, в которое производилась интеграция трансгена. Справа и слева — области, использованные в качестве плеч гомологий. в — схемы конструкций *bxd*, и *Su-bxd* и *HR-Su-bxd*. * — из [16]. Обозначения: “attB” — сайт attB, необходимый для PhiC31-зависимой интеграции конструкции в геном; “bxdPRE” — сайленсер *bxdPRE*; “4xSu” — четыре сайта связывания белка *Su*(Hw); *white* — репортерный ген; “Е” — энхансер гена *white*; “Т” — терминаторы транскрипции; 5'-96Е-НА и 3'-96Е-НА — плечи гомологии, необходимые для CRISPR/Cas9-зависимой интеграции конструкции в геном. Внутренние функциональные элементы конструкции *HR-Su-bxd* полностью повторяют элементы конструкции *Su-bxd*, но четыре сайта связывания белка *Su*(Hw) (4xSu) фланкированы сайтами lox (указаны стрелками снизу), для их делеции *in vivo* и получения аналога конструкции *bxd*.

Создание плазмиды *HR-Su-bxd*

Для создания плазмиды *HR-Su-bxd* *Bam*HI-*Apa*I фрагмент 4xSu из плазмиды lox(Sx4) [22] был встроен в вектор *bxd* [16], обработанный сайтами эндонуклеаз рестрикции *Spe*I и *Xho*I (конструкция *Su-lox-bxd*). Плечи гомологии области 96Е, окружающие сайты-мишени 96Е-CRISPR, были амплифицированы методом ПЦР, используя в качестве матрицы геномную ДНК *D. melanogaster* дикого типа и следующие праймеры:

1) 5'-GGTACCCTAACCTTGTGTGCATGT-3' и 5'-GGTACCACCAAATGGCAAAACACT-3' для плеча гомологии 5'-96Е-НА с сайтами для эндонуклеазы рестрикции *Kpn*I (итоговая длина области гомологии 1170 пн),

2) 5'-CCGCGGGGATCATATCTAAATTGA-3' и 5'-CCGCGGTGAAACAAAATATTAGCT-3' для плеча гомологии 3'-96Е-НА с сайтами для эндонуклеазы рестрикции *Sac*II (итоговая длина области гомологии 980 пн).

Для получения итоговой конструкции HR-Su-bxd полученные фрагменты плечей гомологии 5'- и 3'-96E-НА последовательно вставляли в плазмиду Su-lox-bxd. ПЦР-фрагмент, содержащий плечо 5'-96E-НА, был встроен по сайту *KpnI*. ПЦР-фрагмент, содержащий плечо 3'-96E-НА, был встроен по сайту *SacII*, в результате чего удалялась функциональная область участка attB.

Инъекция эмбрионов и получение трансгенных линий

Смесь плазмид (10 : 1 — HR-Su-bxd : 96E-CRISPR, общая концентрация 500 нг/мкл) вводили в эмбрионы линии #58492 Bloomington *Drosophila* Stock Center, экспрессирующие ген *Cas9* под контролем промотора Actin5C. Инъекцированные эмбрионы выращивали до зрелого возраста и скрещивали с мухами линии y-w¹¹¹⁸. Мух с встройками конструкции HR-Su-bxd идентифицировали по цвету глаз за счет экспрессии гена *white*. Найденных трансформантов скрещивали с линией, несущей балансир TM3, Sb на третьей хромосоме и в дальнейшем переводили в гомозиготное состояние по трансгену.

Правильность гомологичной рекомбинации была подтверждена с помощью ПЦР с использованием ДНК, выделенной из трансгенных мух. Для получения производной линии HR-bxd с делецией сайтов связывания архитектурного белка Su(Hw), мух с конструкцией HR-Su-bxd скрещивали с линией y^{1w1}; Cyo, P(w⁺, cre)/Sco; +, экспрессирующей Cre-рекомбиназу [23]. Фенотипы трансгенных линий мух HR-Su-bxd и HR-bxd анализировали в геми- (P/+) и гомозиготном (P/P) состояниях. Всех мух содержали при 25°C на стандартной среде.

Иммунопреципитация хроматина (X-ChIP)

Метод иммунопреципитации хроматина проводился как описано в [16]. Хроматин был выделен из голов взрослых мух (150–200 мг) и иммунопреципитирован с помощью специфичных либо неспецифичных антител. В качестве специфичных антител были использованы ранее полученные кроличьи поликлональные антитела к белкам Su(Hw) (C-конец) [24], Ph, Sfmtb, Trx-N [25, 26], Combgap [16]. В качестве неспецифичных антител были использованы IgG не иммунизированного животного. Анализ обогащения был проведен с помощью ПЦР в реальном времени (qPCR) в присутствии SYBR Green с использованием следующих пар праймеров: специфичные к трансгену пары праймеров точка 1 (5'-CCGACCACTACCAGCAGAAC-3' и 5'-GTCCATGCCGAGAGTGATCC-3'), точка 2 (5'-AGCTCCTCGCCCTTGCTCACCAT-3' и 5'-CCATAATGGCTGCGCCGTAAAG-3'), точка 3 (5'-GCCACTACGACGCTGAGGTCAA-3' и 5'-CGTTGTGGGAGGTGATGTCC-3'). В каче-

стве отрицательного контроля использовалась пара к кодирующей области гена *Ras64B* (5'-GAGGGATTCCTGCTCGTCTTCG-3' и 5'-GTCGCACTTGTACCCACCATC-3'). В качестве положительного контроля использовались пары к области 62D (область высокого обогащения белка Su(Hw), 5'-GAGGGATTCCTGCTCGTCTTCG-3' и 5'-GTCGCACTTGTACCCACCATC-3') и к области, соседствующей с *bxdPRE* в геноме, но не входящей в состав трансгена (участок высокого обогащения PcG/TrxG-факторов, 5'-AAGAGCAAGGCGAAAGAGAGC-3' и 5'-CGTTTAAAGTGCGACTGAGATGG-3').

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для интеграции трансгенной конструкции, содержащей сайты связывания архитектурного белка Su(Hw), *bxdPRE* и гена *white*, была выбрана область 96E (рис. 1). Согласно ранее полученным нами данным [16], в этой области трансгенный *bxdPRE* в отсутствие сайтов связывания архитектурных белков (Su(Hw), CTCF либо Pita) находится в нейтральном статусе — не репрессирует транскрипцию и не связывает белки групп PcG и TrxG. В то же время в присутствии сайтов связывания для архитектурных белков Su(Hw), CTCF либо Pita происходила индукция репрессии трансгенного гена *white*, которая усиливалась в гомозиготе (эффект PSS). Сайты связывания архитектурных белков обладают инсуляторной активностью — в частности, способностью блокировать PRE-опосредованную репрессию гена мишени. Поэтому в данной системе PRE находится между сайтами связывания архитектурных белков и промотором гена *white*. В таком положении PRE не блокируется сайтами связывания архитектурных белков и способен репрессировать ген *white*.

Фенотипический анализ трансгенной линии HR-Su-bxd и ее производной HR-bxd с делецией сайтов Su(Hw) (см. Материалы и методы) проводился в сравнении с ранее полученными трансгенами Su-bxd и bxd ([16] и рис. 2). В результате было показано, что фенотипы линий HR-Su-bxd и HR-bxd полностью совпадают с фенотипами линий Su-bxd и bxd соответственно. В отсутствие сайтов связывания для архитектурного белка Su(Hw), окраска глаз в геми- и гомозиготе красная, что свидетельствует о неспособности *bxdPRE* репрессировать маркерный ген *white*. В то же время, в присутствии сайтов Su(Hw), окраска глаз гораздо светлее как у гемизигот (коричневый), так и у гомозигот (светло-желтый). Это свидетельствует о репрессии гена *white*. Более сильная репрессия в гомозиготном состоянии согласуется с эффектом PSS, характерным для PRE-элементов. Таким образом, сайты связывания для архитектурного белка Su(Hw) индуцируют репрессию, опосредованную сайленсером *bxdPRE*. Кроме того, для индук-

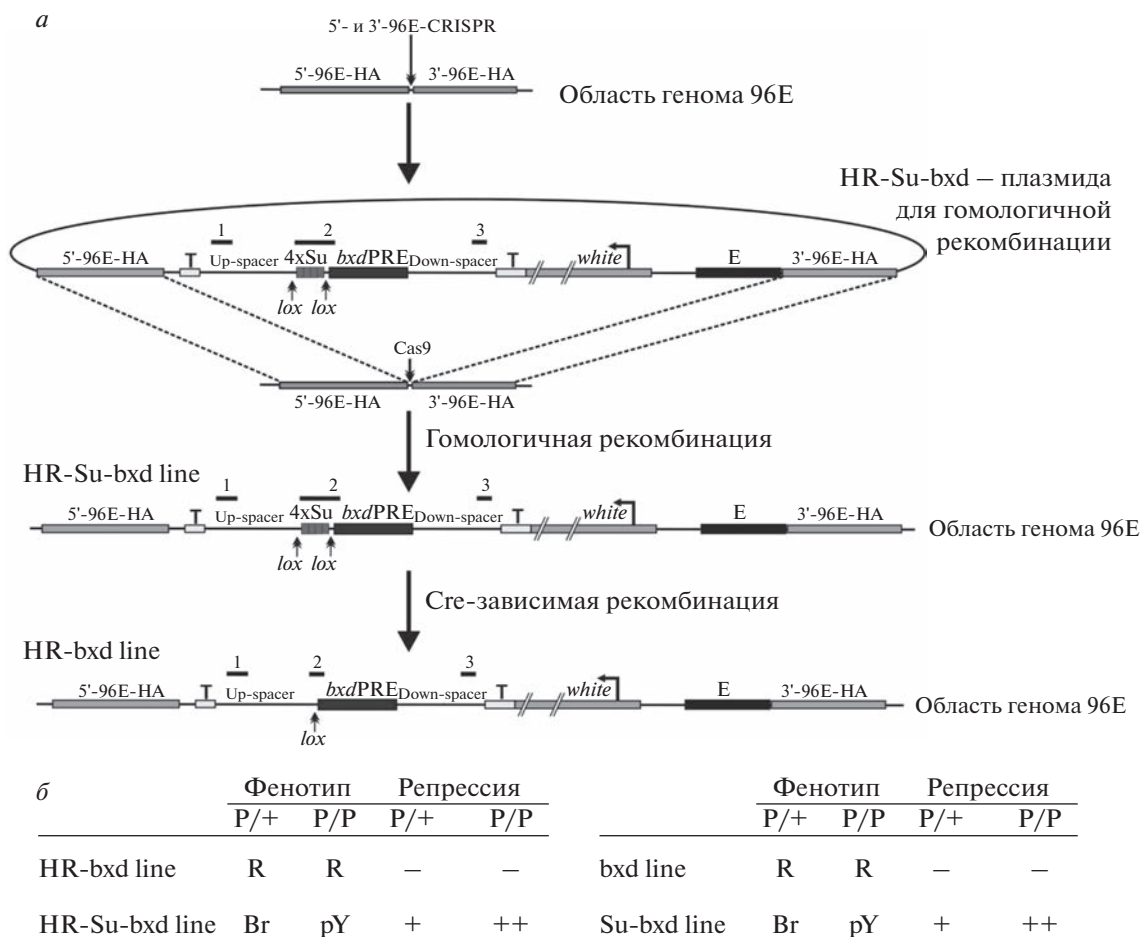


Рис. 2. Сайты связывания для архитектурного белка Su(Hw) индуцируют репрессивную активность *bxdPRE* вне зависимости от использованной системы интеграции трансгена. **a** — общая схема интеграции конструкции HR-Su-bxd в область 96E с использованием системы CRISPR/Cas9. Последующая Cre-зависимая рекомбинация приводит к удалению сайтов связывания белка Su(Hw) (4xSu) и получению производной линии HR-bxd. **b** — фенотипы мух трансгенных линий HR-bxd, HR-Su-bxd, Su-bxd, bxd. В конструкциях HR-bxd и bxd, в отсутствие сайтов связывания для Su(Hw) рядом с *bxdPRE*, окраска глаз в геми- (P/+) и гомозиготе (P/P) R — красная, что свидетельствует об отсутствии (—) репрессии. В конструкциях HR-Su-bxd и Su-bxd, в присутствии 4xSu рядом с *bxdPRE*, окраска глаз в геми- (P/+, Br — коричневая) и гомозиготе (P/P, pY — светло-желтая), что свидетельствует о репрессии в гемизиготе (+), усиливающейся в гомозиготе (++)).

ции активности PRE сайтами Su(Hw) не требуется наличия присутствующих после PhiC31-зависимой интеграции конструкции в геноме элементов, так как при CRISPR/Cas9-зависимой инсерции происходит встраивание только внутренних элементов конструкции.

На следующем этапе методом X-ChIP с последующей количественной ПЦР (qPCR) мы проверили состав белковых комплексов, рекрутирующихся на элемент *bxdPRE* в присутствии и в отсутствие сайтов связывания для белка Su(Hw). Сначала мы протестировали связывание белка Su(Hw) (рис. 3,а). В полном соответствии с ожиданиями Su(Hw) связывается со своими сайтами в созданной трансгенной конструкции. При этом делеция сайтов связывания для Su(Hw) приводит к потере его ассоциации в области трансгена с *bxdPRE*.

Далее было исследовано связывание репрессоров группы Polycomb — факторов Ph (субъединица комплекса PRC1) и Sfnbt (субъединица комплекса PhoRC). В результате X-ChIP-анализа было установлено, что данные факторы активно рекрутируются на область *bxdPRE* в составе трансгена только в случае наличия рядом расположенных сайтов связывания для Su(Hw) (рис. 3,б, в). Этот факт полностью согласуется с полученными фенотипическими данными по уровню экспрессии гена *white*. Важно, что PRE-ассоциированный ДНК-связывающий фактор Combgar [27] также рекрутируется на трансген-расположенный *bxdPRE* только в присутствии сайтов Su(Hw) (рис. 3,г). В полном соответствии с полученными нами ранее данными, стимуляция PRE-зависимой репрессии сайтами связывания Su(Hw) связана не толь-

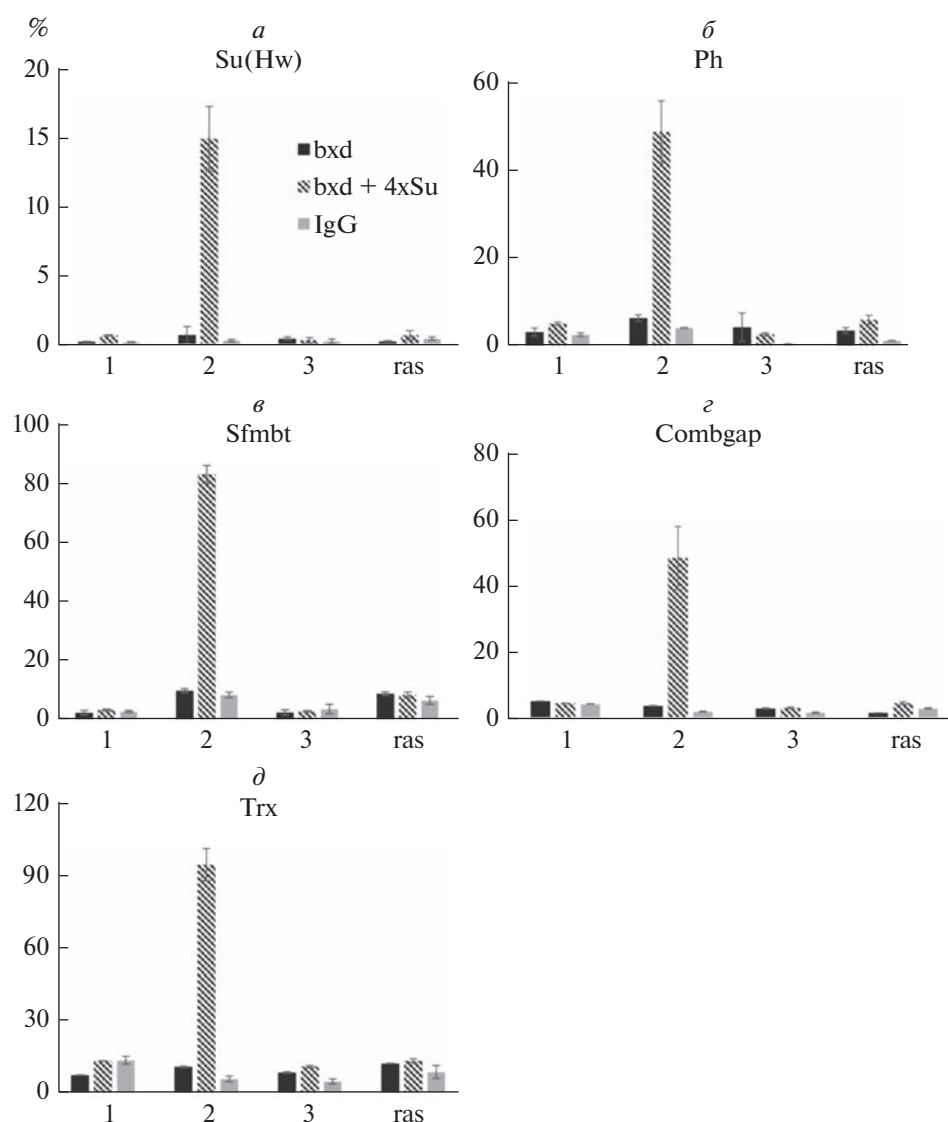


Рис. 3. Рекрутирование белков PcG/TrxG на *bxd*PRE в полученных трансгенах зависит от сайтов связывания для архитектурного белка Su(Hw). Результаты X-ChIP-анализа с использованием антител к белкам Su(Hw) (a), Ph (б), Sfmbl (в), Combgap (г), Trx (д). Цифры на оси абсцисс 1, 2, 3 обозначают ампликоны, использованные в количественной ПЦР (qPCR) и указаны на схеме конструкций на рис. 2 соответствующими цифрами. Ось ординат – обогащения при иммунопреципитации хроматина показаны в виде доли от исходного образца (Input) с нормировкой на эндогенный позитивный контроль – область эффективного связывания Su(Hw) 62D (a) или рядом с *bxd*PRE в геноме (б–д). Кодированная область гена Ras64B использовалась как отрицательный контроль (ras). На диаграммах черные столбцы обозначают обогащение для линии HR-*bxd*, заштрихованные столбцы – для линии HR-Su-*bxd*, серые столбцы – обогащение, полученное при использовании неспецифических антител (IgG). Вертикальными отрезками указаны стандартные отклонения.

ко с привлечением репрессоров группы PcG, но также и белков семейства TrxG, в частности, белка Trithorax (рис. 3,д).

Таким образом, архитектурный белок Su(Hw) вне зависимости от системы интеграции способен стимулировать рекрутирование эпигенетических регуляторов PcG/TrxG на хроматин и переводить PRE-элемент из неактивного в активное состояние.

ОБСУЖДЕНИЕ

Белки PcG/TrxG являются ключевыми транскрипционными регуляторами, однако вопрос об их специфичном привлечении в строго определенных места генома остается открытым. В данных процессах большую роль, по крайней мере у *Drosophila*, отводят PRE-ДНК-связывающим факторам, которые взаимодействуют с белками PcG/TrxG и направленно рекрутируют данные

комплексы на соответствующие хроматиновые мишени. Однако детали данных процессов не известны. Недавно нами было показано, что расположенные рядом с PRE-сайты связывания архитектурных белков Su(Hw), CTCF или Pita способны стимулировать, а в отдельных случаях и инициировать, привлечение PcG/TrxG факторов и, как следствие, усиливать или индуцировать Polycomb-зависимую репрессию гена-мишени. В качестве объяснения наблюдаемого феномена можно выдвинуть две гипотезы. Согласно первой, связывание архитектурных белков локально дестабилизирует взаимодействие нуклеосом с хроматином, что делает сайты связывания для PcG/TrxG-ассоциированных ДНК-связывающих белков более доступными. Согласно второй гипотезе, архитектурные белки способны создавать и поддерживать стабильные пространственные взаимодействия в ядре [28, 29], что способствует взаимодействию между PRE-элементами и, как следствие, приводит к усилению репрессии. Ранее нами была использована система интеграции PhiC31, в которой для встройки конструкции в геном использовались дополнительные ДНК-регуляторные элементы, потенциально способные так же, как и сайты связывания для архитектурных белков, оказывать влияние на рекрутирование PcG/TrxG факторов на PRE. В представленном исследовании мы протестировали возможную роль таких дополнительных последовательностей в стимуляции активности PRE-элемента. Для этого мы осуществили встройку трансгенной конструкции, содержащей все функциональные элементы ранее использованного вектора, в то же самое место генома (область 96E), но с применением технологии CRISPR/Cas9. В результате было установлено, что сайты связывания для архитектурного белка Su(Hw) вне зависимости от используемой системы интеграции способствуют привлечению как канонических комплексов PcG (PRC1, PhoRC), так и белка Trx из группы TrxG. Важно отметить, что привлечение ДНК-связывающего фактора Combgar также наблюдалось только в присутствии сайтов Su(Hw). Полученные результаты подтверждают, что в рекрутировании белков групп PcG/TrxG на хроматин важную регуляторную роль могут играть архитектурные факторы, такие как белок Su(Hw) у *Drosophila*.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 20-74-10099. В работе была использована инфраструктура Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ИБГ РАН.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием в качестве объекта животных.

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием в качестве объекта людей.

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chetverina D.A., Elizav'ev P.V., Lomaev D.V. et al. Control of the gene activity by Polycomb and Trithorax group proteins in *Drosophila* // Russian J. Genetics. 2017. V. 53. № 2. P. 133–154.
2. Kassis J.A., Kennison J.A., Tamkun J.W. Polycomb and Trithorax group genes in *Drosophila* // Genetics. 2017. V. 206. № 4. P. 1699–1725. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.185116>
3. Schuettengruber B., Bourbon H.M., Di Croce L., Cavalli G. Genome regulation by Polycomb and Trithorax: 70 years and counting // Cell. 2017. V. 171. № 1. P. 34–57. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.002>
4. Chetverina D.A., Lomaev D.V., Erokhin M.M. Polycomb and Trithorax group proteins: The long road from mutations in *Drosophila* to use in medicine // Acta Naturae. 2020. V. 12. № 4. P. 66–85. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11090>
5. Четверина Д.А., Ломаев Д.В., Георгиев П.Г., Ерохин М.М. Генетические нарушения активности PRC2 при онкологии: проблемы и перспективы // Генетика. 2021. Т. 57. № 3. С. 235–289. <https://doi.org/10.31857/S0016675821030048>
6. Erokhin M., Chetverina O., Györfy B. et al. Clinical correlations of Polycomb repressive complex 2 in different tumor types // Cancers (Basel). 2021. V. 13. № 13. <https://doi.org/10.3390/cancers1313155>
7. Piunti A., Shilatifard A. The roles of Polycomb repressive complexes in mammalian development and cancer // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2021. V. 22. № 5. P. 326–345. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00341-1>
8. Parreno V., Martinez A.M., Cavalli G. Mechanisms of Polycomb group protein function in cancer // Cell Res. 2022. V. 32. № 3. P. 231–253. <https://doi.org/10.1038/s41422-021-00606-6>
9. Erokhin M., Georgiev P., Chetverina D. *Drosophila* DNA-binding proteins in Polycomb repression // Epigenomes. 2018. V. 2. № 1. P. 1. <https://doi.org/10.3390/epigenomes2010001>
10. Kuroda M.I., Kang H., De S., Kassis J.A. Dynamic competition of Polycomb and Trithorax in transcriptional programming // Annu. Rev. Biochem. 2020. V. 89. P. 235–253. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-120219-103641>
11. Kassis J.A. Unusual properties of regulatory DNA from the *Drosophila* engrailed gene: Three “pairing-sensitive” sites within a 1.6-kb region // Genetics. 1994. V. 136. № 3. P. 1025–1038. <https://doi.org/10.1093/genetics/136.3.1025>
12. Kassis J.A. Pairing-sensitive silencing, polycomb group response elements, and transposon homing in *Drosophila* // Adv. Genet. 2002. V. 46. P. 421–438. [https://doi.org/10.1016/s0065-2660\(02\)46015-4](https://doi.org/10.1016/s0065-2660(02)46015-4)
13. Mihaly J., Hogga I., Gausz J. et al. In situ dissection of the Fab-7 region of the bithorax complex into a chromatin domain boundary and a Polycomb-response element // Development. 1997. V. 124. № 9. P. 1809–1820. <https://doi.org/10.1242/dev.124.9.1809>
14. De S., Cheng Y., Sun M.A. et al. Structure and function of an ectopic Polycomb chromatin domain // Sci. Adv. 2019. V. 5. № 1. P. eaau9739. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aau9739>
15. De S., Mitra A., Cheng Y. et al. Formation of a Polycomb-domain in the absence of strong Polycomb response ele-

- ments // PLoS Genet. 2016. V. 12. № 7. P. e1006200. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006200>
16. Erokhin M., Gorbenko F., Lomaev D. et al. Boundaries potentiate Polycomb response element-mediated silencing // BMC Biol. 2021. V. 19. № 1. P. 113. <https://doi.org/10.1186/s12915-021-01047-8>
 17. Horard B., Tatout C., Poux S., Pirrotta V. Structure of a Polycomb response element and *in vitro* binding of Polycomb group complexes containing GAGA factor // Mol. Cell. Biol. 2000. V. 20. № 9. P. 3187–3197. <https://doi.org/10.1128/MCB.20.9.3187-3197.2000>
 18. Bischof J., Maeda R.K., Hediger M. et al. An optimized transgenesis system for *Drosophila* using germ-line-specific phiC31 integrases // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. № 9. P. 3312–3317. <https://doi.org/10.1073/pnas.0611511104>
 19. Port F., Chen H.M., Lee T., Bullock S.L. Optimized CRISPR/Cas tools for efficient germline and somatic genome engineering in *Drosophila* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2014. V. 111. № 29. P. E2967–2976. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405500111>
 20. Gratz S.J., Ukken F.P., Rubinstein C.D. et al. Highly specific and efficient CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair in *Drosophila* // Genetics. 2014. V. 196. № 4. P. 961–971. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.160713>
 21. Zolotarev N., Maksimenko O., Kyrchanova O. et al. Opbp is a new architectural/insulator protein required for ribosomal gene expression // Nucl. Ac. Res. 2017. V. 45. № 21. P. 12285–12300. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx840>
 22. Erokhin M., Davydova A., Kyrchanova O. et al. Insulators form gene loops by interacting with promoters in *Drosophila* // Development. 2011. V. 138. № 18. P. 4097–4106. <https://doi.org/10.1242/dev.062836>
 23. Siegal M.L., Hartl D.L. Application of Cre/loxP in *Drosophila*. Site-specific recombination and transgene co-placement // Methods Mol. Biol. 2000. V. 136. P. 487–495. <https://doi.org/10.1385/1-59259-065-9:487>
 24. Melnikova L., Elizar'ev P., Erokhin M. et al. The same domain of Su(Hw) is required for enhancer blocking and direct promoter repression // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 5314. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41761-6>
 25. Erokhin M., Davydova A., Parshikov A. et al. Transcription through enhancers suppresses their activity in *Drosophila* // Epigenetics Chromatin. 2013. V. 6. № 1. P. 31. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-6-31>
 26. Erokhin M., Elizar'ev P., Parshikov A. et al. Transcriptional read-through is not sufficient to induce an epigenetic switch in the silencing activity of Polycomb response elements // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. № 48. P. 14930–14935. <https://doi.org/10.1073/pnas.1515276112>
 27. Ray P., De S., Mitra A. et al. Combgap contributes to recruitment of Polycomb group proteins in *Drosophila* // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. № 14. P. 3826–3831. <https://doi.org/10.1073/pnas.1520926113>
 28. Chetverina D., Aoki T., Erokhin M. et al. Making connections: Insulators organize eukaryotic chromosomes into independent cis-regulatory networks // Bioessays. 2014. V. 36. № 2. P. 163–172. <https://doi.org/10.1002/bies.201300125>
 29. Chetverina D., Fujioka M., Erokhin M. et al. Boundaries of loop domains (insulators): Determinants of chromosome form and function in multicellular eukaryotes // Bioessays. 2017. V. 39. № 3. <https://doi.org/10.1002/bies.201600233>

Su(Hw) Architectural Protein Binding Sites Stimulate Recruitment of PcG/TrxG Epigenetic Regulators to Chromatin: CRISPR/Cas9-Test

M. M. Erokhin^{a, *}, F. V. Gorbenko^a, D. V. Lomaev^a, and D. A. Chetverina^{a, **}

^a*Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119334 Russia*

^{*}*e-mail: yermaxbio@yandex.ru*

^{**}*e-mail: daria.chetverina@gmail.com*

Polycomb and Trithorax group proteins (PcG and TrxG) are epigenetic factors responsible for the repression and activation of transcription, respectively. In *Drosophila*, PcG/TrxG proteins are recruited to specialized DNA elements called PRE (Polycomb response elements). Depending on the context, these elements may repress, activate, or be neutral with respect to the promoter of the target gene. Previously, in transgenic studies using PhiC31 site-specific integration system, we have demonstrated that sites for architectural proteins inserted next to PRE can induce the repressive activity of *bxd*PRE by stimulating the binding of PcG/TrxG factors to this element. However, this effect may depend on additional DNA elements present at the integration site after PhiC31-dependent transgene insertion. In the present study, using an alternative system of integration based on CRISPR/Cas9-catalyzed homology-directed repair, we have proved that the binding sites of the architectural protein Su(Hw) are indeed able to induce the repressive activity of *bxd*PRE and recruitment of PcG/TrxG proteins, regardless the heterogenous DNA-sequences present at the site of integration after PhiC31-dependent insertion of the transgenes.

Keywords: *Drosophila*, Polycomb, PRE-element, repression of transcription.