

УДК 575.22:595.773.4

## ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ ДЛИННОЙ НЕКОДИРУЮЩЕЙ РНК roX В ПОДДЕРЖАНИИ КОМПЛЕКСА ДОЗОВОЙ КОМПЕНСАЦИИ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2024 г. В. А. Бабоша\*, академик РАН П. Г. Георгиев, О. Г. Максименко\*\*

Поступило 06.10.2023 г.

После доработки 20.10.2023 г.

Принято к публикации 27.10.2023 г.

Белки MSL1, MSL2, MSL3, MLE, MOF и некодирующие РНК roX1 и roX2 формируют комплекс дозовой компенсации (КДК) дрозофилы, который специфично связывается с X-хромосомой самцов. Известно, что некодирующие РНК roX являются обязательными компонентами КДК в процессах сборки и привлечения комплекса на X-хромосому самцов. Однако до сих пор остается неясным, насколько необходима данная РНК для поддержания структуры уже собранного комплекса. В данной работе нами показано, что полный комплекс дозовой компенсации при воздействии РНКаз диссоциирует достаточно слабо: из комплекса эффективно освобождается хеликаза MLE, а остальные белковые компоненты, MSL1, MSL2 и MSL3, претерпевают частичную разборку и продолжают находиться в составе субкомплексов. Полученные результаты подтверждают важность некодирующей РНК roX2 не только в процессах инициации сборки КДК, но и на этапе поддержания структуры уже собранного комплекса.

*Ключевые слова:* дозовая компенсация, дрозофила, MSL1, РНК-белковые взаимодействия, roX

DOI: 10.31857/S2686738924010109, EDN: KRFHXD

Дозовая компенсация у дрозофилы направлена на увеличение экспрессии генов единственной X-хромосомы самцов с целью выравнивания с двумя X-хромосомами самок. В этом процессе ключевую роль играет РНК-белковый комплекс дозовой компенсации (КДК), состоящий из белков MSL1, MSL2, MSL3, MLE, MOF и длинных некодирующих РНК, roX1 и roX2 [1; 2]. Исходно КДК привлекается на специфичные последовательности, распределенные по X-хромосоме (сайты первичного посадки, СПП), с которых происходит распространение КДК преимущественно на кодирующие части генов [3]. roX1 и roX2 представляют собой некодирующие РНК, различающиеся по размерам, последовательности, уровню экспрессии в клетках самцов, но являются взаимозаменяемыми в составе комплекса дозовой компенсации [4]. В их составе присутствуют небольшие консервативные участки, необходимые для функционирования КДК. Белок MLE необходим для включения РНК внутрь ком-

плекса, при этом roX могут сохраняться в составе комплекса и в отсутствие MLE [5; 6]. roX контактируют с MLE и MSL2 посредством консервативных участков с определенной вторичной структурой, состоящей из нескольких шпилек [5; 6]. В отсутствие roX происходит нарушение паттернов распределения белков КДК вдоль X-хромосомы [7]. Известно, что распространение КДК зависит от активности транскрипции генов roX, что является косвенным подтверждением инициации процесса сборки полного комплекса или его отдельных модулей непосредственно на новосинтезируемой РНК [8]. Последовательность этапов сборки комплекса остается малоизученной, однако известно, что в отсутствие хеликазной активности MLE КДК теряет способность к распространению за пределы мест связывания КДК с хроматином, что может говорить о необходимости roX для формирования полного КДК, способного к связыванию с X-хромосомой за пределами СПП [9].

Целью данной работы стало изучение влияния деградации РНК на общую организацию комплекса дозовой компенсации *Drosophila melanogaster* с целью демонстрации значения нкРНК roX в поддержании структуры и состава комплекса. В рамках данного исследования были проведены аналитическое ультрацентрифугирование в сахарозном

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ИБГ РАН)

\*E-mail: v.babosha@gmail.com

\*\*E-mail: maksog@mail.ru

градиенте и коиммунопреципитация компонентов комплекса до и после обработки РНКазой А и III.

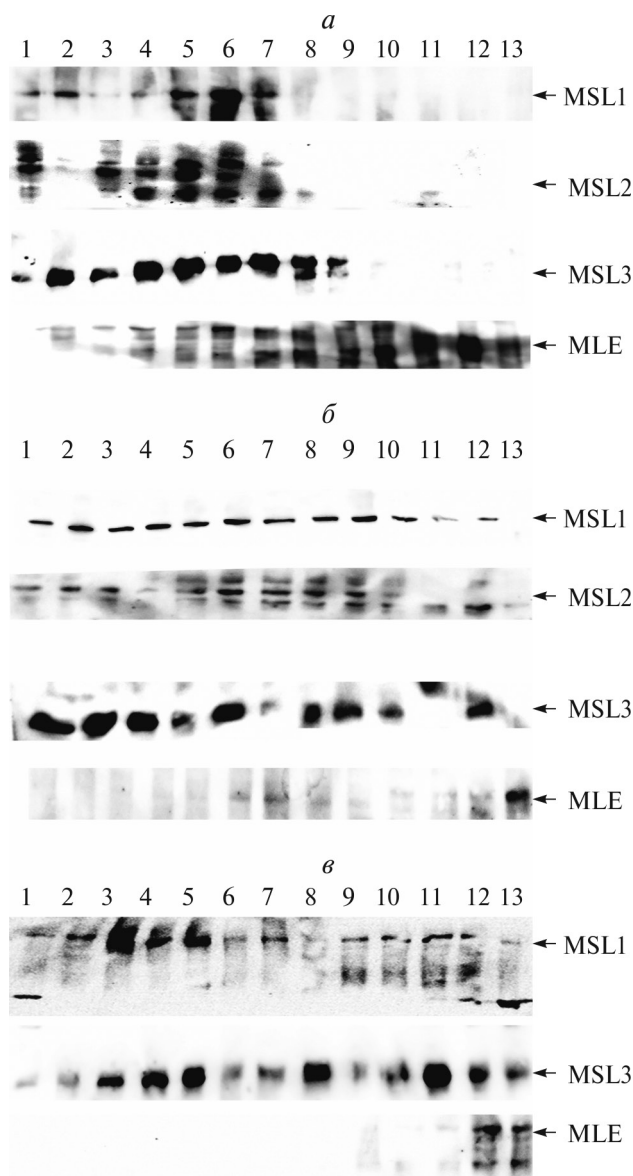
В качестве исходного материала использовался ядерный лизат культуры клеток S2 *Drosophila melanogaster*, имеющих эмбриональное происхождение и считающихся преимущественно мужскими. Полученный лизат делили на три части: без обработки нуклеазами с добавлением ванадил-рибонуклеозидного комплекса (VNC, неспецифичный ингибитор РНКаз), с обработкой РНКазой А (с преимущественной специфичностью к одноцепочечным участкам РНК) и с обработкой РНКазой III (с преимущественной специфичностью к двуцепочечным участкам РНК). После соответствующей обработки экстрактов проводили аналитическое ультрацентрифугирование и коиммунопреципитацию полученных образцов. Аналитическое ультрацентрифугирование проводили на ультрацентрифуге Beckman L7 с ротором типа 70.1 TI в трехдюймовых пробирках Quick-Seal в сахарозном градиенте 10–40% в течение 2 ч 15 мин при 55000 г<sub>рм</sub>. По окончании ультрацентрифугирования последовательно отбирались фракции объемом 500±50 мкл с одновременной спектрофотометрической и кондуктометрической регистрацией. Из фракций осаждались белки в присутствии ТХУ, после чего растворялись в 70 мкл фосфатно-солевого буфера. Затем проводили белковый электрофорез с последующим иммуноблот-анализом на компоненты КДК: MSL1, MSL2, MSL3, MLE. Коиммунопреципитацию проводили также со всеми 3 типами образцов – без обработки и с обработкой РНКазой А и III с антителами, специфично узнающими белки MSL2 и MSL3. Результаты иммунопреципитации анализировали про помощи иммуноблот-анализа с антителами, специфично узнающими белок MSL1.

После фракционирования образца экстракта, не обработанного нуклеазами, все исследуемые белки КДК обнаруживаются в тяжелых фракциях (рис. 1, а). При этом для белка MSL1 характерна преимущественная локализация во фракциях 2, 5–7, MSL2–1, 3–6, MSL3–2–9. Для MLE четкий сигнал детектировать не удалось. Таким образом, можно предположить, что КДК соответствует примерно 5–7 фракциям. Коиммунопреципитация также показала, что белки MSL1, MSL2 и MSL3 достаточно эффективно копреципитируются из экстракта, не обработанного нуклеазами (рис. 2, а).

Из аликвот фракций, полученных после ультрацентрифугирования ядерного лизата, не обработанного нуклеазами, выделялась РНК с последующей обратной транскрипцией для мониторинга количества некодирующей РНК roX в полученных фракциях методом количественной ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени с ис-

пользованием праймеров и TaqMan-пробы к roX2. Праймеры к другой некодирующей РНК roX1 не использовались, так как в популяции S2-клеток данная нкРНК практически не экспрессируется [10]. В результате проведенного анализа (рис. 2, б) roX2 была выявлена во всех фракциях, но выраженный пик детектировался с 5 по 13.

После обработки экстракта РНКазой А в условиях, обеспечивающих специфичное расщепление



**Рис. 1.** Выявление компонентов КДК в сахарозном градиенте 10–40%. (а) Лизат без обработки нуклеазой, с VNC. (б) Лизат, обработанный РНКазой А. (в) Лизат, обработанный РНКазой III. Иммуноблот-анализ проведен с антителами, специфично узнающими белки MSL1, MSL2, MSL3, MLE. Цифрами отмечены номера собранных фракций от 1 до 13 (от «тяжелой» к «легкой»).

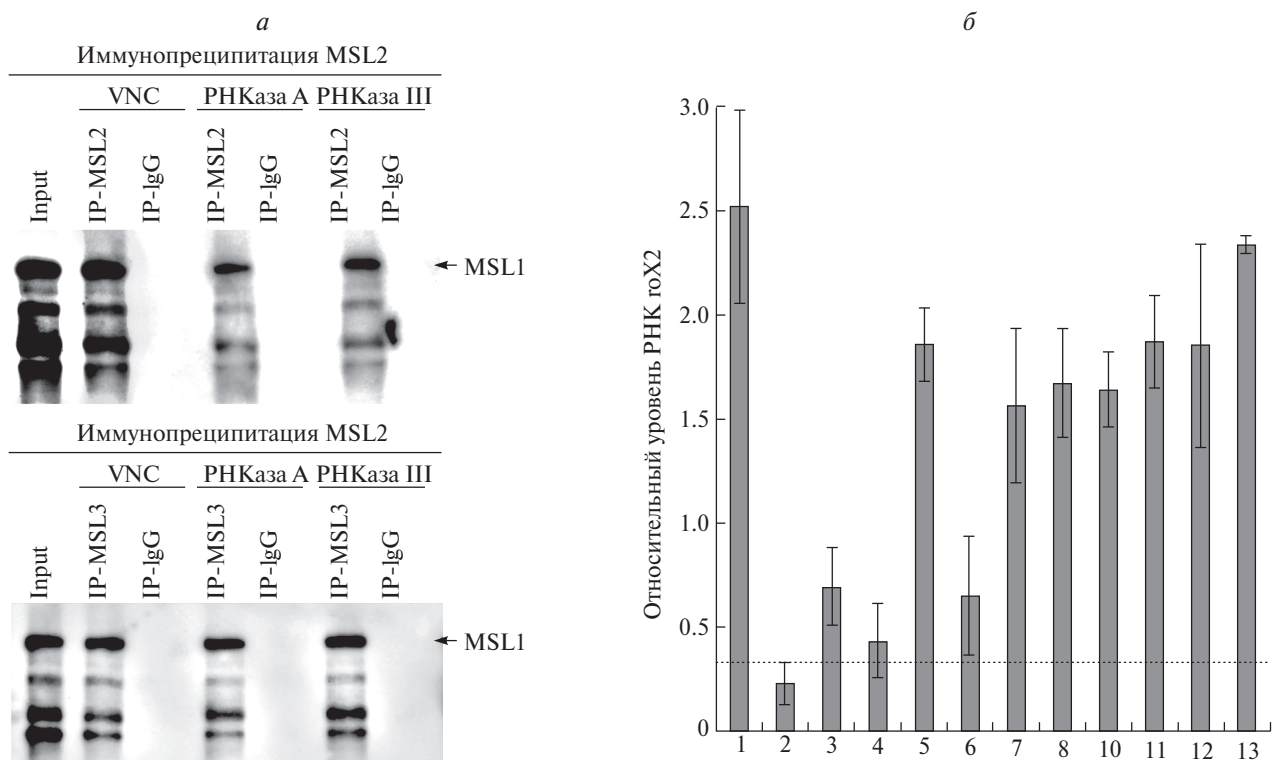
одноцепочечной РНК, белки MSL1, MSL2 стали детектироваться почти во всех фракциях от тяжелых до легких, за исключением только самых легких 12 и 13 (Рис. 1б). Аналогичная картина была получена с MSL1 и MSL3 для образца, обработанного РНКазой III в условиях, обеспечивающих специфичное расщепление двуцепочечной РНК (рис. 1, в).

Для MSL3 после обработки РНКазой А наблюдался существенный сдвиг в сторону легких фракций. И только один белок, MLE, после обработки РНКазами практически полностью диссоциировал из комплекса и оказывался в самой легкой фракции.

Эксперименты по коиммунопреципитации белков из экстрактов, обработанных РНКазами А и III, показали сходные результаты (рис. 2, а). При иммунопреципитации антителами, специфично узнающими белок MSL3, белок MSL1 продолжает копреципитироваться с эффективностью, сходной с экстрактом, не обработанным нуклеазами. В то же время при иммунопреципитации антителами,

специфично узнающими белок MSL2, детектируется примерно двукратное снижение уровня белка MSL1 в образцах иммунопреципитатов по сравнению с преципитатом из экстракта, не обработанного нуклеазами.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что нкРНК гоX не играет ключевую роль в поддержании целостности КДК. В то же время, так как наблюдаются изменения профилей распределения белков КДК по фракциям после обработки РНКазами и несколько меняется эффективность преципитации белков MSL1 и MSL2, можно предположить, что гоX является одним из регуляторов стабилизации КДК. Ее удаление из предварительно собранного комплекса способно привести к полной диссоциации только белка MLE, что должно иметь фатальное значение *in vivo*, остальные компоненты остаются в виде полных или частично разобранных комплексов. В частности, по результатам иммунопреципитации можно предположить существование РНК-независимого субкомплек-



**Рис. 2.** (а) Результаты иммунопреципитации ядерных экстрактов, выделенных из культуры клеток S2, с антителами, специфично узнающими белки MSL2 и MSL3, или с иммуноглобулинами G кролика (отрицательный контроль). Экстракты проходили 3 вида обработки: 1) без нуклеаз, обработаны неспецифичным ингибитором РНКаз VNC, 2) с добавлением РНКазы А, 3) с добавлением РНКазы III. Иммунопреципитаты анализировались при помощи иммуноблот-анализа на присутствие белка MSL1 в образцах. 'input' – исходный экстракт; IP-MSL2 – образец после иммунопреципитации антителами, специфично узнающими белок MSL2; IP-MSL3 – образец после иммунопреципитации антителами, специфично узнающими белок MSL3; IP-IgG – образец после иммунопреципитации иммуноглобулинами G кролика. (б) Выявление РНК гоX2 во фракциях, полученных после аналитического ультрацентрифугирования в сахарозном градиенте 10-40% ядерного экстракта из культуры клеток S2. Пунктирной линией отмечен уровень фона. Стандартные отклонения построены по результатам четырех измерений.

са MSL1-MSL3. Хотя можно предположить, что roX1 выполняет аналогичную функции в структуре КДК, исследование её роли требует отдельных экспериментов. Дальнейшие исследования в данной области необходимы для детального описания всех этапов сборки и разборки КДК.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны Пирогову С.А. за помощь в проведении части экспериментов.

#### ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет Российского научного фонда, грант № 21-04-00211. В работе использовалось оборудование, приобретенное при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках соглашения № 075-15-2021-668.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Конфликт интересов отсутствует.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Samata M., Akhtar A.* Dosage Compensation of the X Chromosome: A Complex Epigenetic Assignment Involving Chromatin Regulators and Long Noncoding RNAs // *Annual Review of Biochemistry*. 2018. Vol. 87. Dosage Compensation of the X Chromosome. № 1. P. 323–350.
2. *Kuroda M. I., Hilfiker A., Lucchesi J. C.* Dosage Compensation in *Drosophila*-a Model for the Coordinate Regulation of Transcription // *Genetics*. 2016. V. 204. № 2. P. 435–450.
3. *Straub T., Grimaud C., Gilfillan G. D., et al.* The chromosomal high-affinity binding sites for the *Drosophila* dosage compensation complex // *PLoS genetics*. 2008. V. 4. № 12. P. e1000302.
4. *Meller V. H., Rattner B. P.* The roX genes encode redundant male-specific lethal transcripts required for targeting of the MSL complex // *The EMBO Journal*. 2002. V. 21. № 5. P. 1084–1091.
5. *Maenner S., Müller M., Fröhlich J., et al.* ATP-dependent roX RNA remodeling by the helicase maleless enables specific association of MSL proteins // *Molecular Cell*. 2013. V. 51. № 2. P. 174–184.
6. *Ilik I. A., Quinn J. J., Georgiev P., et al.* Tandem Stem Loops in roX RNAs Act Together to Mediate X Chromosome Dosage Compensation in *Drosophila* // *Molecular cell*. 2013. V. 51. № 2. P. 156–173.
7. *Li F., Schiemann A. H., Scott M. J.* Incorporation of the noncoding roX RNAs alters the chromatin-binding specificity of the *Drosophila* MSL1/MSL2 complex // *Molecular and Cellular Biology*. 2008. V. 28. № 4. P. 1252–1264.
8. *Kelley R. L., Lee O.-K., Shim Y.-K.* Transcription rate of noncoding roX1 RNA controls local spreading of the *Drosophila* MSL chromatin remodeling complex // *Mechanisms of development*. 2008. V. 125. № 11–12. P. 1009–1019.
9. *Morra R., Smith E. R., Yokoyama R., Lucchesi J. C.* The MLE subunit of the *Drosophila* MSL complex uses its ATPase activity for dosage compensation and its helicase activity for targeting // *Molecular and Cellular Biology*. 2008. V. 28. № 3. P. 958–966.
10. *Johansson A.-M., Stenberg P., Larsson J.* msl2 mRNA is bound by free nuclear MSL complex in *Drosophila melanogaster* // *Nucleic Acids Research*. 2011. V. 39. № 15. P. 6428–6439.

## STUDY OF THE ROLE OF LONG NON-CODING RNA ROX IN MAINTAINING OF THE DOSAGE COMPENSATION COMPLEX IN *DROSOPHILA MELANOGASTER*

V. A. Babosha<sup>#</sup>, Academician of the RAS P. G. Georgiev, O. G. Maksimenko<sup>##</sup>

*Institute of Gene Biology RAS, Moscow, Russian Federation*

<sup>#</sup>E-mail: v.babosha@gmail.com

<sup>##</sup>E-mail: maksog@mail.ru

The proteins MSL1, MSL2, MSL3, MLE, MOF and non-coding RNAs roX1 and roX2 form the *Drosophila* dosage compensation complex (DCC), which specifically binds to the X chromosome of males. It is known that non-coding RNA roX are primary component of the DCC in the process of assembly and spreading of the complex among the X chromosome of males. However, it still remains unclear the role of this RNA in maintaining the structure of the already assembled complex. In this work, we have shown that the full-assembled complex of dosage compensation dissociates rather weakly when treated with RNases: the MLE helicase is effectively released from the complex, and the remaining protein components, MSL1, MSL2 and MSL3, undergo partial disassembly and continue to be part of subcomplexes. The results confirm the importance of the non-coding RNA roX2 not only in the processes of initiation of CDK assembly, but also at the stage of maintaining the structure of the already assembled complex.

**Keywords:** Dosage compensation, *Drosophila*, MSL1, RNA-protein interactions, roX