

УДК 577.214, 577.22, 575.224

ВЛИЯНИЕ МОДИФИКАТОРОВ СТРУКТУРЫ ХРОМАТИНА НА ТРАНС-ДЕЙСТВУЮЩИЙ ГЕТЕРОХРОМАТИНОВЫЙ ЭФФЕКТ ПОЛОЖЕНИЯ У *DROSOPHILA MELANOGASTER*

© 2024 г. А. А. Солодовников, С. А. Лавров*, А. С. Шацких, академик РАН В. А. Гвоздев

Поступило 15.12.2023 г.

После доработки 30.12.2023 г.

Принято к публикации 02.01.2024 г.

Гетерохроматиновый эффект положения проявляется в инактивации эухроматиновых генов при перемещении к гетерохроматину. При хромосомных перестройках инактивации подвергаются гены, расположенные рядом с новой эу-гетерохроматиновой границей в перестройке (цис-инактивация), и, в редких случаях, гены участка нормальной хромосомы, гомологичного району эу-гетерохроматиновой границы хромосомы с перестройкой (транс-инактивация). Инверсия *In(2)A4* способна транс-инактивировать расположенный на нормальной хромосоме ген-репортер *UAS-eGFP*. Мы провели нокдаун ряда белков хроматина при помощи регулируемой температурой РНК-интерференции и исследовали влияние нокдауна на транс-инактивацию репортера. Выявлено подавление транс-инактивации при нокдауне *Su(var)2-HP2* — белка, связывающегося с ключевым белком гетерохроматина *HP1a*, *SAYP* — субъединицы комплекса ремоделирования хроматина и метилтрансферазы гистонов *Eggless (SETDB1)*, вносящей узнаваемую белком *HP1a* модификацию *H3K9me3*. Представленный в работе способ исследования эффектов нокдауна генов на гетерохроматиновый эффект положения представляет самостоятельный методологический интерес.

Ключевые слова: эффект положения, структура хроматина, транс-инактивация, репортерные гены, РНК-интерференция, фазовая сепарация.

DOI: 10.31857/S2686738924020065, **EDN:** WFPXGE

ВВЕДЕНИЕ

Гетерохроматиновый эффект положения (ЭП) приводит к изменениям структуры хроматина (гетерохроматинизации) и нарушениям экспрессии эухроматиновых генов при переносе к гетерохроматину. Хромосомная инверсия *In(2)A4* (далее — *A4*) вызывает ЭП генов, расположенных рядом с новыми эу-гетерохроматиновыми границам (цис-инактивация), а также репортерных трансгенов, расположенных на гомологичной неперестроенной хромосоме (транс-инактивация) [1].

При цис-инактивации репрессия вызывается изменениями структуры хроматина, распространяющимися от гетерохроматина путем линейной самосборки комплекса белков и модификаций гистонов, включающего белок *HP1a*, узнающий вносимую метилтрансферазой *Su(var)3-9* модифика-

цию гистона *H3K9me2/3* [2]. Транс-действующий эффект положения приводит к изменениям структуры хроматина и инактивации генов нормальной хромосомы в гетерозиготе с перестройкой. Предполагается, что транс-инактивация возникает в результате затягивания района нормальной хромосомы в гетерохроматиновый компартмент (область конденсированного хроматина внутри ядра с высокой концентрацией белков гетерохроматина) за счет соматической конъюгации гомологов [1, 3–5]). Транс-инактивация предполагает образование гетерохроматина *de novo*, ее молекулярные механизмы должны отличаться от цис-инактивации [1, 6], обзоры см. [2, 7, 8]. Различие механизмов цис- и транс-инактивации предполагает наличие факторов, влияющих только на транс-инактивацию. Такие факторы были обнаружены в ходе анализа эффектов мутаций генов-модификаторов ЭП на вызываемую *A4* транс-инактивацию репортерного гена *mini-white* [1]. Мутации модификаторов ЭП *Su(var)2-5 (HP1a)*, *Eggless (SETDB1)*, *Su(var)3-1 (JIL-1)*,

Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия

*E-mail: slavrov.defy@gmail.com

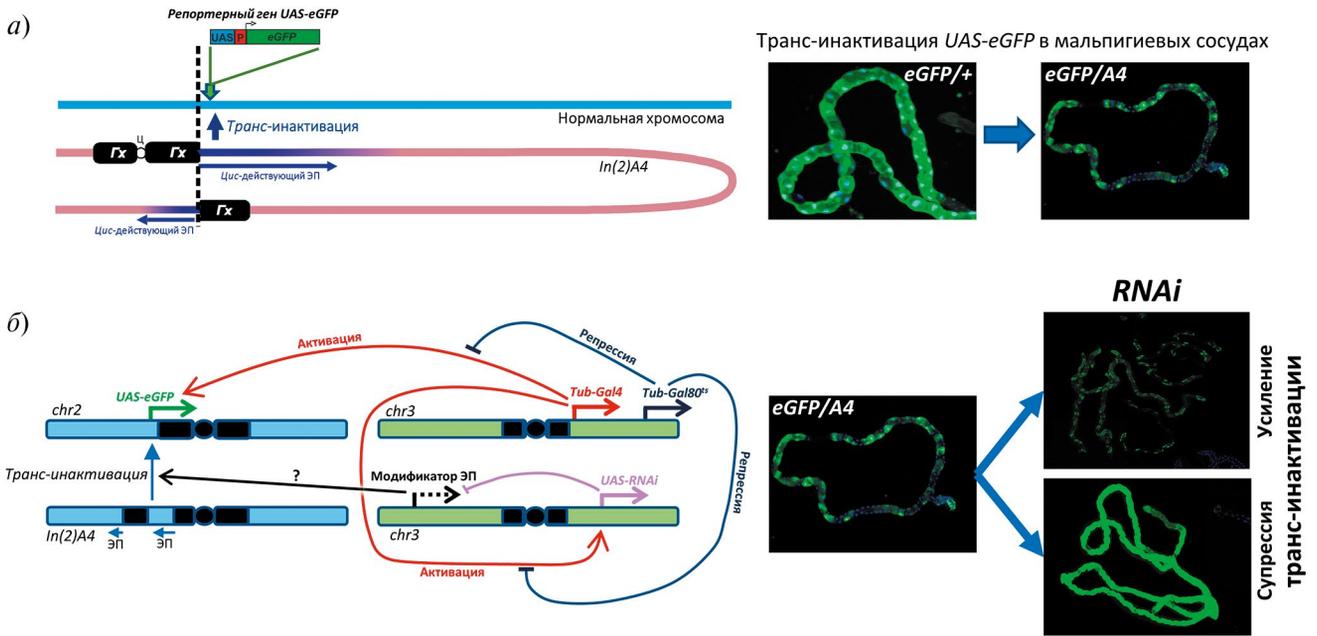


Рис. 1. Система для исследования влияния нокдауна генов – модификаторов эффекта положения на транс-инактивацию репортера *UAS-eGFP*, вызываемую инверсией *In(2)A4*: инверсия *In(2)A4* вызывает мозаичную инактивацию репортера *UAS-eGFP* на нормальной хромосоме в мальпигиевых сосудах. Показано положение репортера *UAS-eGFP* на нормальной хромосоме относительно места разрыва *A4* (пунктирная вертикальная линия). Ниже представлена структура инверсии *A4*, *Gx* – блоки гетерохроматина, в *A4* блок разделен на большой и отделенный малый фрагменты *ц* – центромера. Цис-действующий эффект положения распространяется на эухроматин от основного и отделенного блоков гетерохроматина (синие стрелки), транс-инактивация влияет на репортер в гомологичной нормальной хромосоме. На фотографиях показана мозаичная экспрессия *eGFP* (отсутствие флуоресценции в отдельных клетках) при вызываемой *In(2)A4* транс-инактивации (*eGFP/A4*), по сравнению с экспрессией *eGFP* при той же температуре, но на фоне хромосомы дикого типа (*eGFP/+*) (а); система для исследования нокдауна генов – модификаторов ЭП на транс-инактивацию (б). Генотип содержит: хромосомы 2 – инверсия *A4* в гетерозиготе с нормальной хромосомой с транс-инактивируемым репортером *UAS-eGFP*; хромосомы 3 – хромосома с генами *GAL4* и *GAL80^{ts}* под тубулиновыми промоторами в гетерозиготе с хромосомой, содержащей трансген *UAS-RNAi* – источник дцРНК к одному из исследуемых генов-модификаторов (*egg*, *SAYP*, *Su(var)2-HP2*, *XNP*, *CG2116*, *E(var)3-9* и *Polybromo*). *GAL4* активирует транскрипцию *UAS-eGFP*, а также *UAS-RNAi*, вызывая нокдаун модификатора ЭП. *GAL80^{ts}* инактивирует *GAL4*, подавляя транскрипцию с *UAS*-зависимых промоторов, при этом степень подавления снижается при повышении температуры. Нокдаун модификатора ЭП может выражаться в усилении или подавлении транс-инактивации (иллюстрации эффектов приведены на фото справа).

Su(var)3-6 (*Pp1-87B*), *Su(var)3-7* подавляли цис- и транс-инактивацию, тогда как мутации в гене *SAYP*, кодирующем субъединицу комплекса ремоделирования хроматина SWI/SNF, и в гене *Ago2*, компоненте системы РНК-интерференции и белке хроматина, специфически влияли на транс- но не на цис-инактивацию [1]. Метилтрансфераза гистонов *Su(var)3-9*, один из основных компонентов гетерохроматина, не влияла заметно на вызываемые *A4* цис- и транс-инактивацию [1].

Ранее было показано [9, 10], что ген *eGFP* под контролем элемента *UAS* (*UAS-eGFP*), расположенный на нормальной хромосоме в области, гомологичной району эу-гетерохроматиновой границы *A4*, транс-инактивируется в гетерозиготе с *A4*. Транс-инактивация *UAS-eGFP* в мальпигиевых сосудах имеет характерный для ЭП мозаичный характер (происходит только в части клеток, в дру-

гих сохраняется активность гена). Влияние уровня экспрессии *UAS-eGFP* на разных стадиях развития на степень его транс-инактивации было исследовано при помощи комбинации активатора *GAL4* и его термочувствительного репрессора *GAL80^{ts}* [11]. Обнаружено, что высокий уровень транскрипции репортера на стадии эмбриона препятствует транс-инактивации на более поздних стадиях развития [9].

Для проверки роли ряда компонентов хроматина в транс-активации мы измерили степень репрессии гена-репортера *UAS-eGFP* под влиянием *A4* на фоне нокдауна генов потенциальных модификаторов ЭП: *SAYP*, *eggless*, *Polybromo*, *XNP*, *CG2116*, *E(var)3-9* и *Su(var)2-HP2*. Гены *SAYP* и *eggless* были выбраны для исследования, так как уже имелись данные об участии продуктов этих генов в транс-инактивации гена-репортера *mini-white* [1]. *Polybromo* и *SAYP* входят в ремоделирующий хро-

матин комплекс семейства *SWI/SNF*, белок Xnp/ (dATRX) является АТФ-хеликазой, компонентом другого комплекса ремоделирования хроматина и взаимодействует с *HP1a* [12], *CG2116* является транскрипционным фактором, компонентом меж-дисков, а гены *E(var)3-9* и *Su(var)2-HP2* известны как модификаторы ЭП. *E(var)3-9* – энхансер (необходим для противодействия гетерохроматиновой репрессии), *Su(var)2-HP2* – супрессор, структурный компонент гетерохроматина.

Нокдаун исследуемых генов осуществляли при помощи *GAL4*-зависимых трансгенных конструкций *UAS-RNAi*, производящих двуцепочечную РНК к гену-мишени, и комбинации *GAL4* и *GAL80^s*. Результаты нокдаунов показали участие в установлении транс-инактивации продуктов генов *SAYP*, *Su(var)2-HP2* и метилтрансферазы гистонов *eggless*. *Polybromo* и *E(var)3-9* участвуют в нормальной транскрипции *UAS-eGFP*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Методы классической генетики. Культивирование, отбор и скрещивания мух проводили по стандартным протоколам.

Линии мух. Следующие линии мух были использованы для скрещиваний:

w^{67c23}; *In(2)A4/CyO* содержит вызывающую транс-инактивацию хромосомную инверсию *In(2)A4* (далее – *A4*), получена в ОМГК ИМГ РАН [1].

*w**; *UAS-eGFP/CyO*; *P{tub-GAL4}LL7*; *P{tubP-GAL80ts}7/TM3 Sb¹ Ser¹*; содержит ген-репортер *eGFP* под контролем регуляторного элемента *UAS (UAS-eGFP)* в положении *chr2L:21195077* (релиз генома дрозофилы *R6*) на хромосоме 2, а также гены *GAL4* и *GAL80^s* под контролем промоторов тубулина на хромосоме 3. Создание линии, равно как и исследование транс-инактивации *UAS-eGFP* в мальпигиевых сосудах под влиянием *In(2)A4*, описано ранее [9, 10].

Линии, несущие *UAS-RNAi* для нокдаунов потенциальных генов – модификаторов транс-инактивации (*egg*, *SAYP*, *Su(var)2-HP2*, *XNP*, *CG2116*, *E(var)3-9* и *Polybromo*) были получены из коллекции Transgenic RNAi Project (TRiP, <https://fgr.hms.harvard.edu/fly-in-vivo-rnai>). *UAS-RNAi* в составе трансгенов *VALIUM10* или *VALIUM2* расположен на хромосоме 3 (сайт встраивания *attP2*). Информация о линиях представлена на рис. 1 и 2.

Регулируемый нокдаун генов-модификаторов эффекта положения. Были получены мухи, содержащие: репортер *UAS-eGFP* на хромосоме 2 в гетерозиготе с *In(2)A4* (опыт) или с нормальной хромосомой (контроль); хромосому 3 с генами *GAL4* и *GAL80^s* в гетерозиготе с хромосо-

мой, несущей трансген *UAS-RNAi* (Рис. 1б, 2а). Комбинация в одном геноме *GAL4* и его термочувствительного репрессора *GAL80^s* позволяет менять экспрессию генов под контролем *UAS* путем изменения температуры. *GAL80^s* полностью активен при 18 °С, денатурирует при 30 °С, в интервале 18–30 °С проявляет промежуточную активность [9, 10]. Сила нокдауна исследуемого гена пропорциональна уровню экспрессии *UAS-RNAi*, максимальна при 30 °С и минимальна при 18 °С. Так как сильный нокдаун имел летальный эффект, была подобрана температура, при которой нокдаун максимален, но мухи сохраняли жизнеспособность до взрослой стадии. При температуре 24 °С количество мРНК генов-модификаторов снижалось примерно в 2 раза, и наблюдалась выраженная транс-инактивация [9]. Схемы скрещиваний для получения нужных генотипов приведены на рис. 2а, информация о генах-модификаторах и эффектах нокдауна при разных температурах на жизнеспособность мух – на рис. 2б.

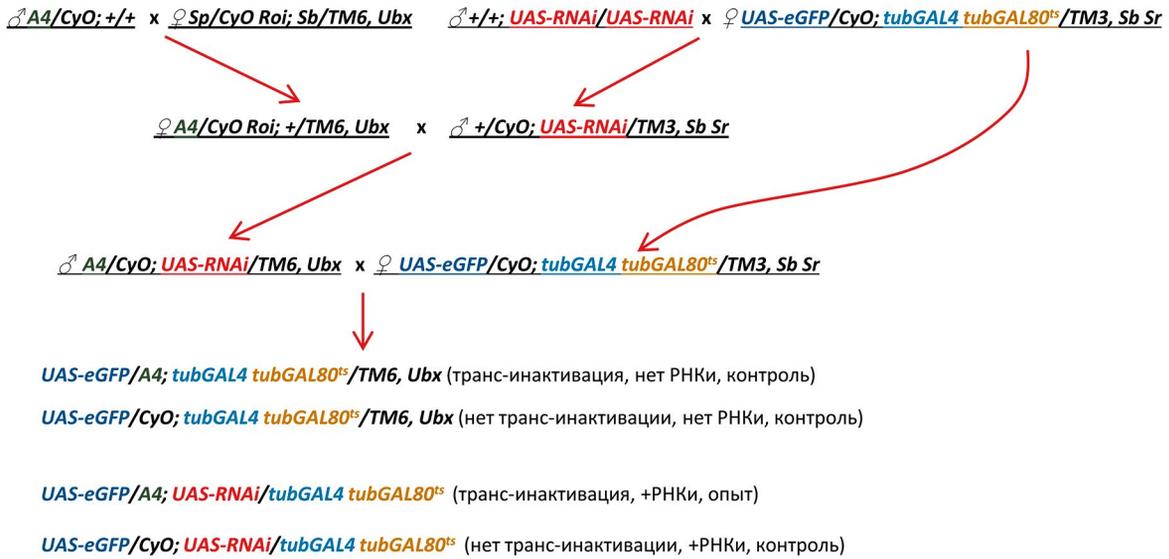
Измерение уровня экспрессии *eGFP* в мальпигиевых сосудах. В мальпигиевых сосудах мозаичный ЭП хорошо выражен, а морфология ткани (крупные изолированные клетки, формирующие однослойные трубки) облегчает количественные измерения. Флуоресценцию *eGFP* измеряли в отдельных клетках мальпигиевых сосудов двухдневных мух, развивавшихся при 24 °С. Измерения проводили, как описано в [9]. Для каждого изображения мальпигиевого сосуда было получено 50–200 записей измерений флуоресценции *eGFP*, соответствующих отдельным клеткам. Данные были использованы для построения графиков распределений интенсивности флуоресценции *eGFP* и подсчета статистики в программах MS Excel и Knime (<https://www.knime.com>). В приложении Knime была создана последовательность обработки данных, состоящая из загрузки исходных измерений, удаления выбросов, построения скрипичных диаграмм и получения базовой статистики. Результаты получены для 2–4 экспериментов.

Оценку количества мРНК репортера *UAS-eGFP* проводили также при помощи количественной ПЦР. Данные количественной ПЦР коррелировали с данными по флуоресценции, хотя разницы по мРНК между генотипами оказалась ниже (не представлено). Прямое сравнение уровня флуоресценции *eGFP* и количества его мРНК затруднено, так как: 1) флуоресценцию измеряли в мальпигиевых сосудах, а мРНК выделяли из целых мух; 2) использованный способ определения относительных количеств мРНК *eGFP* (относительно мРНК *Rpl32*) не позволяет учесть возможные изменения экспрессии *Rpl32* на фоне нокдауна.

Измерение содержания мРНК методом количественной ПЦР. РНК выделяли из взрослых мух возрастом 2 дня с использованием реактива Trizol, проводили обратную транскрипцию и количественную ПЦР. Относительные количества мРНК

репортерного гена *eGFP* и генов-модификаторов определяли на ПЦР-амплификаторе с детекцией в реальном времени ДТ-96 (ДНК-технология) методом ΔCq относительно количества мРНК гена рибосомального белка *Rpl32*. Расчет относительных

a)



б)

Ген-мишень	ID линии TRIP	Комментарий	Выживаемость при повышении температуры (степени нокдауна)			
			18°C	20°C	24°C	29°C
<i>CG2116</i>	26712	Транскрипционный фактор. Связывается с междисками политенных хромосом	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ
<i>E(var)3-9</i>	31948	Связывается с промоторами. Взаимодействует с HP1a	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ
<i>eggless</i>	34803	SETDB1. Метилтрансфераза гистона H3 в положении K9	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ	ЛК
<i>Polybromo</i>	32346	Компонент комплекса Brahma	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ
<i>SAYP</i>	32840	Компонент комплекса Brahma, влияет на транс-инактивацию	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ	ЛК
<i>Su(var)2-HP2</i>	25972	Хроматиновый белок, взаимодействует с HP1a	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ	Л
<i>XNP/ATRX</i>	32894	Хеликаза, взаимодействующая с HP1a. Формирование гетерохроматина	ЛКВ	ЛКВ	ЛКВ(♂)	ЛК

Рис. 2. Схема скрещиваний для получения генотипов, использованных для исследования эффектов нокдаунов компонентов хроматина на транс-инактивацию, таблица исследуемых генов и влияние нокдауна разной степени на жизнеспособность мух: ход скрещиваний и использованные в работе генотипы. Получены четыре генотипа, представляющие все возможные комбинации “наличие – отсутствие транс-инактивации” и “наличие – отсутствие нокдауна”. Во всех генотипах присутствуют гены *GAL4* и *GAL80^{ts}*. Отношение флуоресценции репортера в *eGFP/A4* к *eGFP/+* без *UAS-RNAi* (*UAS-eGFP/A4; tubGAL4 tubGAL80^{ts}/TM6* к *UAS-eGFP/CyO; tubGAL4 tubGAL80^{ts}/TM6*) показывает уровень транс-инактивации без нокдауна гена-модификатора. Отношение флуоресценции репортера в *eGFP/A4; UAS-RNAi* к *eGFP/+; UAS-RNAi* (*UAS-eGFP/A4; tubGAL4 tubGAL80^{ts}/UAS-RNAi* к *UAS-eGFP/CyO; tubGAL4 tubGAL80^{ts}/UAS-RNAi*) показывает уровень транс-инактивации при нокдауне исследуемого гена. Отношение уровней транс-инактивации “нокдаун/без нокдауна” определяет степень влияния гена-модификатора на транс-инактивацию (a); влияние нокдауна исследуемых генов на жизнеспособность особей. Степень нокдауна увеличивается при повышении температуры, когда инактивация репрессора *GAL80^{ts}* повышает концентрацию активного *GAL4*). Стадии развития обозначены как Л (личинка), К (куколка), В (взрослые). Соответственно, ЛКВ обозначает выживаемость на всех стадиях при данной температуре, ЛК – выживают личинки и куколки, Л – только личинки. В случае нокдауна *XNP* выжидали самцы (б).

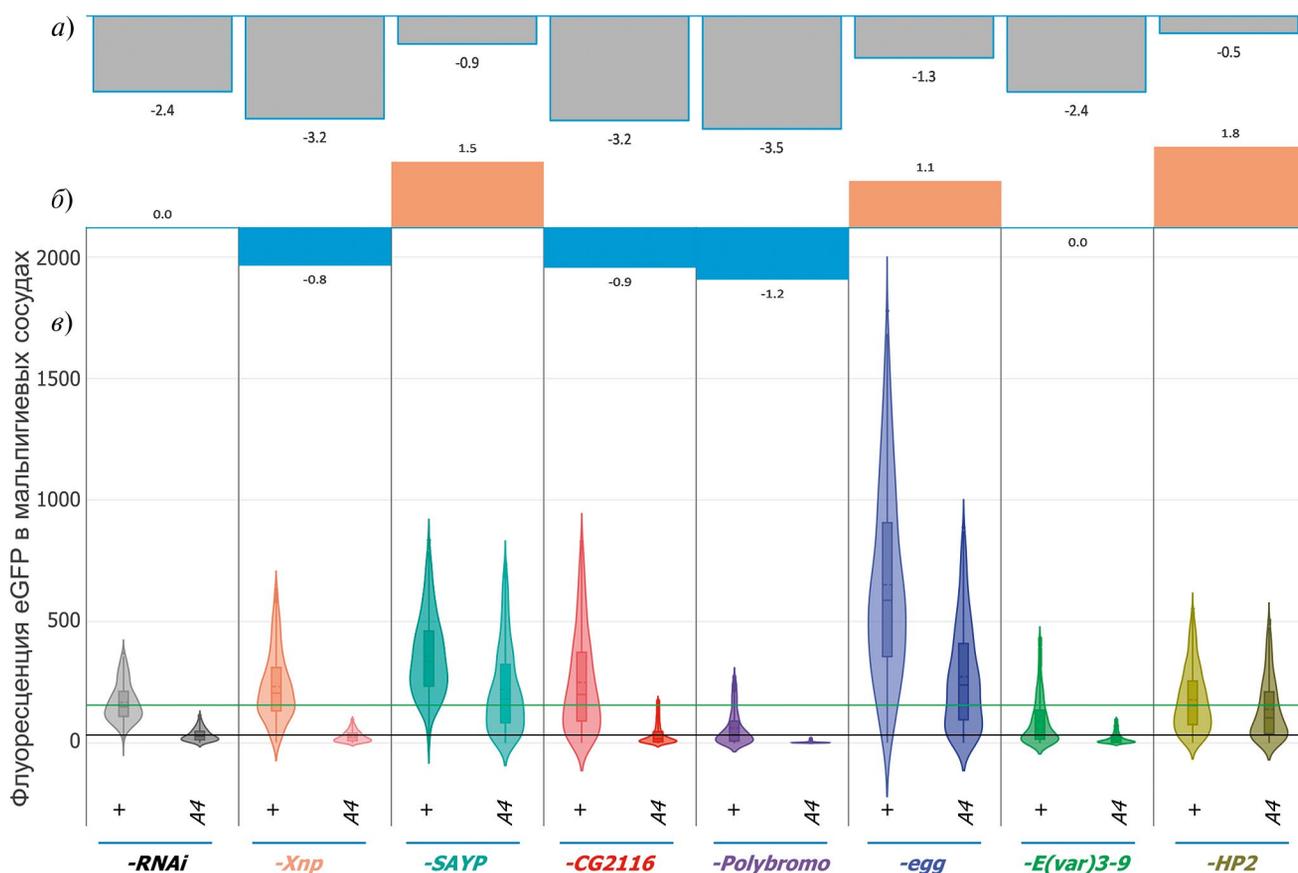


Рис 3. Парное сравнение интенсивности флуоресценции клеток мальпигиевых сосудов у мух с *UAS-eGFP* в норме и при транс-инактивации без нокдауна (*-RNAi*) и при нокдауне одного из белков (*-Xnp*, *-SAYP*, *-CG2116*, *-olybromo*, *-eggless*, *-E(var)3-9*, *-HP2*).

количество мРНК проводили в программе RealTime PCR от производителя прибора и Excel. Протокол выделения подробно описан в [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные измерений транс-инактивации на фоне нокдаунов белков хроматина представлены на рис. 3.

Пары слева направо (подписи внизу рисунка): отсутствие нокдауна (*-RNAi*), нокдаун одного из хроматиновых белков (остальные столбцы, указан выключаемый ген). В каждой паре (+) – норма (нет транс-инактивации), (*A4*) – транс-инактивация. Гистограмма, показывающая степень транс-инактивации репортера (*a*). Степень транс-инактивации рассчитана как Log_2 отношения медианной интенсивности флуоресценции в *UAS-eGFP/A4* (*A4*) к *UAS-eGFP/+* (+), для контроля без нокдауна (*-RNAi*) флуоресценция снижена в ~ 6 раз. Гистограмма, показывающая влияние нокдауна на транс-инактивацию (*b*). Влияние нокдауна рассчитывается как Log_2 отношения степени транс-инактивации при нокдауне к степени транс-инактивации в кон-

троле (*-RNAi*). Положительные значения (оранжевые столбики) означают подавление транс-инактивации (уменьшение репрессии репортера), отрицательные (синие столбики) – усиление. В случае нокдауна *Su(var)2-HP2* транс-инактивация ослабевает в ~ 3.5 раза. Скрипичные диаграммы, показывающие распределение интенсивностей флуоресценции в мальпигиевых сосудах (*в*). Графики показывают симметрично отраженную кривую распределения результатов измерений, внутри кривой – “ящик с усами”, диаграмма с квартилями и выбросами, для тех же измерений. Ось *y* – интенсивность флуоресценции в условных единицах. Зеленая линия – медианное значение интенсивности флуоресценции для контроля (*UAS-eGFP/+*; без нокдауна и транс-инактивации), черная линия – медианное значение интенсивности флуоресценции при транс-инактивации без нокдауна. На графиках видно: транс-инактивацию (столбик *-RNAi*, разница между + и *A4*), влияние нокдауна на нормальную транскрипцию репортера (увеличение экспрессии в образцах без транс-инактивации (+) в *-SAYP*, *-egg* и снижение в *-Polybromo* и *-E(var)3-9*) и влияние нокдауна на степень транс-

инактивации (изменения отношения *A4* к + внутри столбца). Нокдауны *SAYP*, *Eggless* и *HP2* заметно снижают транс-инактивацию, тогда как нокдауны *Xnp*, *CG2116* и *Polybromo* ее слабо усиливают. Нокдаун *E(var)3-9* на транс-инактивацию не влиял

Обнаружено, что нокдауны генов *CG2116* (кодирует белок междисков политенных хромосом) и *XNP* (последний отвечает за поддержание стабильности центромера и теломера, правильную локализацию *HP1a* и встраивание в хроматин вариантного гистона H3.3) не оказывают заметного влияния на степень транс-инактивации репортера или на уровень его экспрессии в целом.

Нокдаун метилтрансферазы *Eggless/SETDB1* приводит к подавлению транс-инактивации *UAS-eGFP*, аналогично ранее описанному подавлению транс-инактивации *mini-white* под влиянием *A4* при мутации в *eggless* [1]. Интересно, что метилтрансфераза *Su(var)3-9* не влияла на репрессию репортера *mini-white* в той же системе [1]. *Eggless*, как и *Su(var)3-9*, вносит репрессорную модификацию H3K9me3 и, возможно, в случае *A4 Eggless* функционально заменяет *Su(var)3-9*. Нокдаун *Eggless* также приводит к повышению уровня экспрессии *UAS-eGFP* в норме (без влияния *A4*), это указывает на роль *Eggless* в контроле нормальной транскрипции *UAS-eGFP*.

Любопытным представляется результат нокдауна *Polybromo* и *SAYP*: оба белка являются субъединицами комплекса ремоделирования хроматина *PBAF* (один из *SWI/SNF* комплексов) и физически взаимодействуют между собой [13-15]. Комплексы ремоделирования (ремоделеры), при их склонности к сохранению консервативной архитектуры из нескольких субъединиц, также описываемых как консервативные, в действительности достаточно разнообразны функционально. Некоторые из них формируют хроматин промоторов генов [14], но все они объединяются в одно большое семейство ремоделеров *SWI/SNF*. На примере элегантного и детального исследования ремоделера млекопитающих *cBAF* семейства *SWI/SNF* было обнаружено, что его субъединицы представляют собой белки, несущие районы протяженных *IDR* [16], склонных к формированию белок-белковых взаимодействий. Работа продемонстрировала роль *IDRs* в ремоделировании хроматина. При этом онкогенные факторы часто представляют собой мутантные варианты субъединиц *cBAF*. Нокдаун *Polybromo* не оказывает достоверного влияния на транс-инактивацию (но вызывает снижение экспрессии репортера в опыте и контроле, что указывает на участие белка в активации транскрипции *UAS-eGFP* в норме), а нокдаун *SAYP* вызывает сильное подавление транс-инактивации. Видимо, *SAYP* имеет отдельную функцию в установлении гетерохроматиновой репрессии, реализуемую независимо от *Polybromo*. Нокдаун *SAYP*

также вызывал дерепрессию *UAS-eGFP* в норме, это указывает на роль *SAYP* в формировании репрессированного эухроматина.

Нокдаун *Su(var)2-HP2* подавляет транс-инактивацию репортера примерно в той же степени, что и *SAYP*. Белок *Su(var)2-HP2* взаимодействует с ключевым белком гетерохроматина HP1a, который рассматривается как определяющий компактизацию гетерохроматина по механизму фазовой сепарации с участием белков с районами функционально важных неупорядоченных аминокислотных последовательностей (*IDRs*) [17-19]. В настоящее время механизмы фазовой сепарации рассматриваются как регуляторные при образования разнообразных субклеточных компартментов, необходимых для обеспечения важнейших биологических процессов, перечисление которых можно найти в обзорах [18], осуществляемых с участием функционально важных *IDRs* [20].

Таким образом, среди исследованных генов *Su(var)2-HP2*, *SAYP* и *eggless* необходимы для транс-действующей гетерохроматиновой репрессии. Полученные данные согласуются с ранее имеющейся информацией о роли *SAYP* в транс-инактивации репортеров *mini-white* в паре с *A4* [1], тем самым указывая на *SAYP* как универсальный компонент транс-инактивации. Роль *Su(var)2-HP2* в процессе ранее не была известна. Участие белков *Su(var)2-HP2* и *SAYP* в процессе транс-инактивации обнаруживает роль в этом явлении белков, содержащих *IDRs*, и механизмов фазовой сепарации.

Перспективы. Использованный в работе подход может быть применен для исследования роли любых хроматиновых белков в эктопической гетерохроматинизации эухроматина, для этого требуется наличие источника дцРНК к интересующему гену под контролем *UAS* на хромосоме 3. Комбинация *GAL4-GAL80^{ts}* позволяет путем изменения температуры, осуществлять нокдаун интересующего гена на любой стадии развития и тем самым исследовать, на каком этапе онтогенеза необходима функция продукта изучаемого гена.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность А. Ю. Коневу за ценные замечания.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Часть работы, связанная с морфологическим анализом флуоресцентных изображений, была выполнена при финансовой поддержке Российского

научного Фонда (грант № 19-74-20178-П). Часть работы, связанная с генетическими исследованиями выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00382-П).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ И СТАНДАРТОВ

В соответствии с пунктом 3 главы 1 Директивы 2010/63/ЕС от 22.09.2010 г. о защите животных, используемых в научных целях, требования биоэтики не распространяются на объект данного исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Abramov Y.A., Shatskikh A.S., Maksimenko O.G., et al.* The Differences Between Cis- and Trans-Genes Inactivation Caused by Heterochromatin in *Drosophila* // *Genetics*, 2016, Т. 202 №. 1, С. 93–106.
2. *Elgin S.C., Reuter G.* Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila* // *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2013, Т. 5 №. 8, С. a017780.
3. *Sass G.L., Henikoff S.* Pairing-dependent mislocalization of a *Drosophila* brown gene reporter to a heterochromatic environment // *Genetics*, 1999, Т. 152 №. 2, С. 595–604.
4. *Sage B.T., Csink A.K.* Heterochromatic self-association, a determinant of nuclear organization, does not require sequence homology in *Drosophila* // *Genetics*, 2003, Т. 165 №. 3, С. 1183–1193.
5. *Shatskikh A.S., Abramov Y.A., Lavrov S.A.* Trans-inactivation: Repression in a wrong place // *Fly (Austin)*, 2017, Т. 11 №. 2, С. 96–103.
6. *Nisha P., Plank J.L., Csink A.K.* Analysis of chromatin structure of genes silenced by heterochromatin in trans // *Genetics*, 2008, Т. 179 №. 1, С. 359–373.
7. *Politz J.C., Scalzo D., Groudine M.* Something silent this way forms: the functional organization of the repressive nuclear compartment // *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2013, Т. 29, С. 241–270.
8. *Grewal S.I.S.* The molecular basis of heterochromatin assembly and epigenetic inheritance // *Mol Cell*, 2023, Т. 83 №. 11, С. 1767–1785.
9. *Солодовников А.А., Гвоздев В.А., Лавров С.А.* Высокий уровень транскрипции гена на стадии эмбриона приводит к подавлению его гетерохроматиновой транс-инактивации у взрослых особей *Drosophila melanogaster* // *Биохимия*, 2020, Т. 85 №. 4, С. 547–555.
10. *Шацких А.С., Оленкина О.М., Солодовников А.А. и др.* Системы регулируемой экспрессии генов как инструмент исследования гетерохроматинового эффекта положения у *Drosophila melanogaster* // *Биохимия*, 2018, Т. 83 №. 5, С. 712–723.
11. *Fujimoto E., Gaynes B., Brimley C.J., et al.* Gal80 inter-sectional regulation of cell-type specific expression in vertebrates // *Dev Dyn*, 2011, Т. 240 №. 10, С. 2324–2334.
12. *Meyer-Nava S., Torres A., Zurita M., et al.* Molecular effects of dADD1 misexpression in chromatin organization and transcription // *BMC Mol Cell Biol*, 2020, Т. 21 №. 1, С. 17.
13. *Nakayama T., Shimojima T., Hirose S.* The PBAP remodeling complex is required for histone H3.3 replacement at chromatin boundaries and for boundary functions // *Development*, 2012, Т. 139 №. 24, С. 4582–4590.
14. *Shidlovskii Y.V., Bylino O.V., Shaposhnikov A.V., et al.* Subunits of the PBAP Chromatin Remodeler Are Capable of Mediating Enhancer-Driven Transcription in *Drosophila* // *Int J Mol Sci*, 2021, Т. 22 №. 6.
15. *Chalkley G.E., Moshkin Y.M., Langenberg K., et al.* The transcriptional coactivator SAYP is a trithorax group signature subunit of the PBAP chromatin remodeling complex // *Mol Cell Biol*, 2008, Т. 28 №. 9, С. 2920–2929.
16. *Patil A., Strom A.R., Paulo J.A., et al.* A disordered region controls cBAF activity via condensation and partner recruitment // *Cell*, 2023, Т. 186 №. 22, С. 4936–4955 e4926.
17. *Keenen M.M., Brown D., Brennan L.D., et al.* HP1 proteins compact DNA into mechanically and positionally stable phase separated domains // *Elife*, 2021, Т. 10.
18. *Babu M.M.* The contribution of intrinsically disordered regions to protein function, cellular complexity, and human disease // *Biochem Soc Trans*, 2016, Т. 44 №. 5, С. 1185–1200.
19. *Cermakova K., Hodges H.C.* Interaction modules that impart specificity to disordered protein // *Trends Biochem Sci*, 2023, Т. 48 №. 5, С. 477–490.
20. *Banerjee P.R., Holehouse A.S., Kriwacki R., et al.* Dissecting the biophysics and biology of intrinsically disordered proteins // *Trends Biochem Sci*, 2023.

**EFFECT OF CHROMATIN STRUCTURE MODIFIERS
ON THE TRANS-ACTING HETEROCHROMATIN POSITION
EFFECT IN *DROSOPHILA MELANOGASTER***

A. A. Solodovnikov, S. A. Lavrov[#], A. S. Shatskikh, Academician of the RAS V. A. Gvozdev

National Research Centre “Kurchatov Institute”, Moscow, Russian Federation

[#]E-mail: slavrov.defy@gmail.com

The heterochromatin position effect is manifested in the inactivation of euchromatin genes transferred to heterochromatin. In chromosomal rearrangements, genes located near the new eu-heterochromatin boundary in the rearrangement (cis-inactivation) and, in rare cases, genes of a region of the normal chromosome homologous to the region of the eu-heterochromatin boundary of the chromosome with the rearrangement (trans-inactivation) are subject to inactivation. The *In(2)A4* inversion is able to trans-inactivate the *UAS-eGFP* reporter gene located on the normal chromosome. We knockdown a number of chromatin proteins using temperature-controlled RNA interference and investigated the effect of knockdown on trans-inactivation of the reporter. We found suppression of trans-inactivation by knockdowns of *Su(var)2-HP2*, a protein that binds to the key heterochromatin protein *HP1a*, *SAYP*, a subunit of the chromatin remodelling complex, and *Eggless* histone methyltransferase (*SETDB1*), which introduces a *H3K9me3* histone mark, recognized by the *HP1a* protein. The method of studying the effects of gene knockdown on heterochromatin position effects presented in this work is of independent methodological interest.

Keywords: position effect variegation, chromatin structure, trans-inactivation, reporter genes, RNA interference, phase separation.