

Выявление мишеней транскрипционной регуляции инсуляторного белка BEAF32 и изучение его роли в поддержании рiРНК-кластеров в герминальных тканях *Drosophila melanogaster*

Соколова О.*, Кобеляцкая А., Калинин А.

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

* sokolova_ol@idbras.ru

Ключевые слова: BEAF32; инсулятор; хроматин; герминальная ткань; *Drosophila*; рiРНК кластер

Мотивация и цель: Важную роль в организации структуры хроматина и регуляции экспрессии генов играют инсуляторные комплексы, или пограничные элементы генома. Инсуляторы имеют множество сайтов связывания в геноме и участвуют в сближении энхансеров и промоторов, а также в разделении доменов с разными типами хроматина. Кроме того, инсуляторные белки могут непосредственно участвовать в регуляции транскрипции, входя в состав репрессивного или активаторного транскрипционного комплекса. Инсуляторные белки млекопитающих играют важную роль в процессах гаметогенеза, а их нарушения приводят к стерильности и остановке развития. Однако, учитывая многофункциональность инсуляторных белков, зачастую сложно выявить механизмы их действия и тканеспецифичные мишени. Инсуляторный белок BEAF32 (Boundary Element-Associated Factor 32 kDa) – один из ключевых инсуляторных белков дрозофилы. Он был впервые выявлен как фактор, защищающий трансгены от влияния эффекта положения. Было отмечено, что трансгены, окруженные инсуляторными белками BEAF32, оставались транскрипционно активными при попадании в гетерохроматин.

Мутация в гене *beaf32* вызывает нарушение гаметогенеза и приводит к стерильности. В данной работе мы занимались выявлением генов-мишеней транскрипционной регуляции инсуляторного белка BEAF32 в герминальных тканях. Выявление герминальных мишеней представляет собой важную биологическую задачу. С одной стороны, это попытка определить причины самочной стерильности у мутантов; с другой – расширить понимание тканеспецифичной работы инсуляторных белков. Второе направление работы состояло в исследовании роли BEAF32 в поддержании некоторых гетерохроматиновых локусов, которые являются рiРНК-кластерами, продуцирующими короткие рiРНК.

Результаты: В данной работе был проведен полногеномный анализ экспрессии генов в мутантной линии BEAF32_KO в сравнении с контролем. Были использованы данные, полученные при полногеномном секвенировании библиотек кДНК из хроматиновых фракций РНК, выделенных из яичников контрольной (BEAF32/CyO) и мутантной (BEAF32_KO) линии. Графическое изображение дифференциальной экспрессии генов представлено в виде Volcano диаграммы (рис. 1).

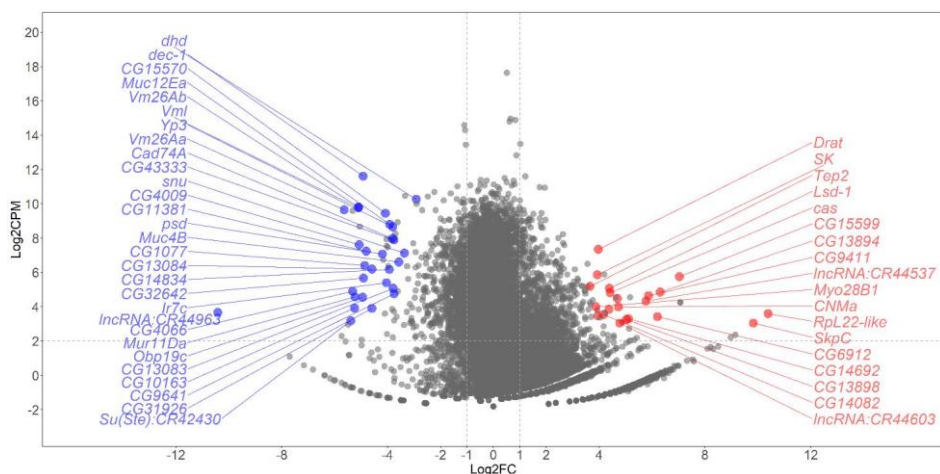


Рис. 1. Анализ дифференциальной экспрессии генов в мутантной линии BEAF32_KO в сравнении с контролем. Log₂CPM – логарифм количества прочтений, нормированный на размер библиотеки, Log₂FC – логарифм отношения значений CPM опыта к CPM контроля

Показателем, позволяющим оценить дифференциальную экспрессию, является величина Fold Change (FC). FC – это отношение количества прочтений, выровненных на аннотированную область гена, в экспериментальном образце к количеству прочтений в контрольном образце. Далее мы использовали величину log₂FC для удобства отображения данных на Volcano диаграмме. Таким образом, мы выделили две группы генов: первая группа с величиной log₂FC > 0, вторая группа с log₂FC < 0 по отношению к контролю. Для группы генов с величиной log₂FC > 0 было характерно увеличение экспрессии на фоне мутации *beaf32*. На Volcano диаграмме эта группа обозначена красным цветом. Для генов с величиной log₂FC < 0 было характерно снижение экспрессии, и на диаграмме они обозначены синим цветом. По результатам анализа был сформирован список генов с наибольшими по модулю значениями log₂FC.

Для подтверждения дифференциальной экспрессии с помощью метода обратной транскрипции с последующей ПЦР в реальном времени (RT-qPCR) были выбраны гены со значительной активацией экспрессии в яичниках на фоне BEAF32_KO и различными клеточными функциями. Дополнительным критерием для отбора генов-кандидатов являлась ассоциация их экспрессии с герминальной и нервной тканью. Для анализа мы выбрали следующие гены: *RpL22-like*, *SkpC*, *cas*, *Drat*, *Myo28B1*, *nolo*, *sug*, *CG5758*. Для подтверждения дифференциальной экспрессии методом RT-qPCR были приготовлены кДНК библиотеки из женской герминальной ткани (яичники), мужской герминальной ткани (семенники) и нервной ткани (головы). Все библиотеки кДНК были приготовлены из всех тканей мутантной и контрольной линии (рис. 2).

Все исследуемые гены показали многократный рост экспрессии в женской герминальной ткани (яичники) на фоне мутации *beaf32*, в сравнении с контролем. Значительной активации экспрессии в мужской герминальной ткани (семенники) не наблюдалось. В нейрональной ткани на фоне мутации большинство генов,

напротив, показали тенденцию к снижению экспрессии. Исключение составил ген *SkpC*, чьи значения экспрессии возрастали в сравнении с контролем. Таким образом, эффект мутации *beaf32* на экспрессию исследованных генов носит тканеспецифичный характер.

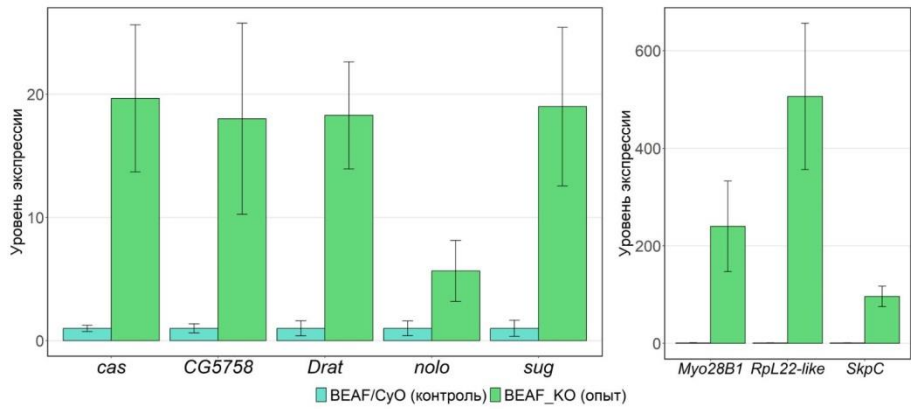


Рис. 2. Активация экспрессии генов в женской герминальной ткани (яичники) на фоне мутации *beaf32* по сравнению с контролем, определенная методом RT-qPCR. В качестве контроля загрузки использовали ген домашнего хозяйства *rp49*. Погрешность – стандартная ошибка среднего

Далее провели анализ данных ChIP-seq библиотек и показали, что в контрольной линии в промоторной области генов *cas*, *drat*, *nolo* и *sug* собирается белковый комплекс, состоящий из BEAF32, Chriz и DREF. На фоне мутации *beaf32* белок BEAF32 не детектируется, а Chriz и DREF остаются на промоторе. Таким образом, мы делаем вывод, что для активации транскрипции вышеуказанных генов необходим инсуляторный белок BEAF32, который, с большой вероятностью, выступает как транскрипционный активатор. В промоторной области генов *RpL22-like*, *SkpC*, *Myo28B1*, экспрессия которых активируется больше чем на порядок на фоне мутации, белковый комплекс BEAF32/Chriz/DREF не детектируется. Мы предполагаем, что для данной группы генов участие BEAF32 в регуляции транскрипции происходит опосредованно, например, за счет активации экспрессии общего транскрипционного фактора.

Далее мы сосредоточились на изучении роли BEAF32 в поддержании гетерохроматиновых локусов, которые являются рiPHK-кластерами. Локус *flamenco* – это одноцепочечный рiPHK-кластер, который продуцирует короткие рiPHK в герминальной ткани самок. Большинство протяженных рiPHK-кластеров имеет гетерохроматиновую природу. Анализ данных ChIP-seq с антителами к BEAF32, Chriz и DREF показал, что в регуляторной области локуса *flamenco* на границе с активно экспрессирующимся геном *DIP1* выявляется инсуляторный белок BEAF32 и его партнеры Chriz и DREF.

С помощью ChIP-qPCR мы показали, что на фоне мутации *beaf32* инсуляторный белок BEAF32 не детектируется, а его партнеры Chriz и DREF остаются в

регуляторной области *flam*. Более того, на фоне мутации транскрипция локуса *flamenco* увеличивается. Сделать однозначный вывод, за счет какой функции инсуляторного белка BEAF32 происходит активация транскрипции *flamenco*, не представляется возможным. С одной стороны, нарушение границы между доменами с разными типами хроматина может приводить к активации транскрипции, при таком сценарии реализуется барьерная функция BEAF32. С другой стороны, BEAF32 может выполнять функцию транскрипционного активатора, как и в случае некоторых генов, о которых говорилось выше.

Кроме того, анализ данных ChIP-seq показал, что инсуляторный белок BEAF32 и его партнеры Chriz и DREF локализованы между субтеломерными участками хромосом (telomere associated sequences, TAS) и эухроматиновым доменом, предположительно, формируя границу между разными типами хроматина. TAS примыкают непосредственно к теломерным повторам и, предположительно, необходимы для поддержания теломерного гетерохроматинового компартмента. Более того, субтеломерные повторы представляют собой рiРНК-кластеры, которые продуцируют короткие РНК из транскриптов-предшественников. Мы показали, что на фоне мутации BEAF32 происходит уменьшение количества транскриптов-предшественников TAS. Далее мы провели эксперимент по анализу изменений количества коротких рiРНК в яичниках ноль-мутантов BEAF32 в сравнении с диким типом. При мутации BEAF32 отмечалось резкое снижение количества коротких рiРНК, комплементарных субтеломерным повторам (TAS). Мы не наблюдали эктопическое распространение продукции рiРНК за пределы TAS, что может говорить об участии BEAF32 в транскрипционной регуляции транскриптов-предшественников, а не о формировании границ между разными типами хроматина. Изучение роли BEAF32 в герминальных тканях впервые демонстрирует важность инсуляторных белков в регуляции транскрипции тканеспецифичных генов и функционировании рiРНК-кластеров, а также продукции коротких рiРНК.

Финансирование: Исследование поддержано РНФ (№ 23-24-00025).