

DOI: 10.25205/978-5-4437-1691-6-275

**ВЛИЯНИЕ МУТАЦИИ ГЕНА *PROD* НА СТРУКТУРУ ГЕТЕРОХРОМАТИНА ПРИ ЭФФЕКТЕ ПОЛОЖЕНИЯ ГЕНА У *DROSOPHILA MELANOGASTER* \******PROD* GENE MUTATION INFLUENCES HETEROCHROMATIN STRUCTURE AT POSITION EFFECT VARIATION (PEV) IN *DROSOPHILA MELANOGASTER***

А. А. Солодовников, Е. А. Шестакова, С. А. Лавров, В. А. Гвоздев

Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», Москва

A. A. Solodovnikov, E. A. Shestakova, S. A. Lavrov, V. A. Gvozdev

National Research Center “Kurchatov Institute”, Moscow

✉ gorbins@gmail.com

**Аннотация**

В работе проведены исследования влияния мутации по гену *Prod*, кодирующему связывающийся с сателлитной ДНК (Prodsat) белок, на архитектуру ядра при гетерохроматиновом эффекте положения. Локализация сателлитной ДНК в ядре на фоне мутации по *Prod* исследована при помощи иммуноокрашивания на гетерохроматиновый белок HP1a в комбинации с гибридизацией *in situ* на сателлит Prodsat. Количественный анализ конфокальных 3D-изображений показал, что мутация по *Prod* приводит к нарушениям конъюгации гетерохроматиновых последовательностей и изменениям организации ядра.

**Abstract**

In this study, we investigated the effect of mutation in the *Prod* gene, which encodes a satellite DNA (Prodsat) binding protein, on the architecture of the nucleus in the flies bearing PEV-inducing rearrangement. Localization of satellite DNA in the nucleus in the *Prod* mutation background was investigated by immunostaining for the heterochromatin protein HP1a in combination with hybridization *in situ* to the Prodsat satellite. Quantitative analysis of confocal 3D-images showed that *Prod* mutation leads to impaired conjugation of heterochromatin sequences and changes in nuclear architecture.

Эффект положения гена (ЭПГ) состоит в его инактивации при перемещении в зону гетерохроматина. Цис-действующий ЭПГ наблюдается при хромосомных перестройках, переносах ген к гетерохроматину, и обусловлен распространением специфической гетерохроматиновой организации на соседние эухроматиновые районы. В редких случаях наблюдается транс-действующий ЭПГ, при котором инактивируются гены нормальной хромосомы в гетерозиготе с перестройкой. Механизмы транс-действующего ЭПГ неясны, но, видимо, связаны с конъюгацией гомологов и перемещением эухроматиновых районов в гетерохроматиновый компартмент ядра. Таким образом, молекулярные механизмы транс-инактивации отличаются от цис-инактивации и должны иметь специфические регуляторы.

В связи с этим, особый интерес представляет негистоновый белок *Prod* с молекулярной массой около 30 кДа, который объединяет сателлит-содержащие гетерохроматиновые районы 2-й и 3-й хромосом *Drosophila melanogaster* в компактные структуры, называемые хромоцентрами, и играет важную роль в формировании компактной структуры хромосом в процессе митоза. Большие количества белка *Prod* идентифицированы в районе прицентромерного хроматина 2-й и 3-й хромосом *Drosophila melanogaster* и в более чем 400 эухроматиновых зонах политенных хромосом [1–3]. Мутации в гене *prod*, кодирующем этот белок, вызывают диссоциацию хромоцентров и могут оказывать влияние на эффект положения гена.

Белок *Prod* связывается с одним из типов сателлитной ДНК (Prodsat). Хромосомная перестройка *In(2)A4* приводит к формированию границ эухроматина с сателлитом Prodsat и способна вызывать транс-действующий эффект положения. Можно предположить, что мутации по *prod*, в норме не являющемуся модификатором эффекта положения, будут специфически влиять на вызываемый *In(2)A4* транс-действующий ЭПГ, нарушая ассоциацию эухроматиновых районов с гетерохроматиновым компартментом.

Для исследований влияния *Prod* на транс-инактивацию, вызываемую *In(2)A4*, были сконструированы линии мух, содержащих инверсию *In(2)A4* и мутацию *prod*<sup>k088 10</sup> на хромосоме 2, а также все варианты контролей (только *prod*<sup>k088 10</sup>, только *In(2)A4* и мухи дикого типа). Мутация *prod*<sup>k088 10</sup> летальна на стадии личинок первого

\* Исследование выполнено при поддержке РФФ (проект № 19-74-20178-П) и в рамках государственного задания НИЦ «Курчатовский институт».

возраста, поэтому исследования проводили на таких личинках. Отбор гомозиготных личинок первого возраста проводили с использованием балансерной хромосомы *CyO-GFP*, далее осуществлялась комбинация иммуноокрашивания на гетерохроматиновый белок HP1a и гибридизации *in situ* с зондом к сателлитной ДНК Prodsat. 3D-изображения органов личинок получали при помощи конфокального микроскопа Zeiss LSM900 и обрабатывали в программе Imaris. Анализировали число и интенсивность зон гибридизации с Prodsat и конфигурацию зоны обогащения по HP1a (гетерохроматиновый компартмент ядра). Схема хромосом и результаты гибридизации показаны на рисунке.

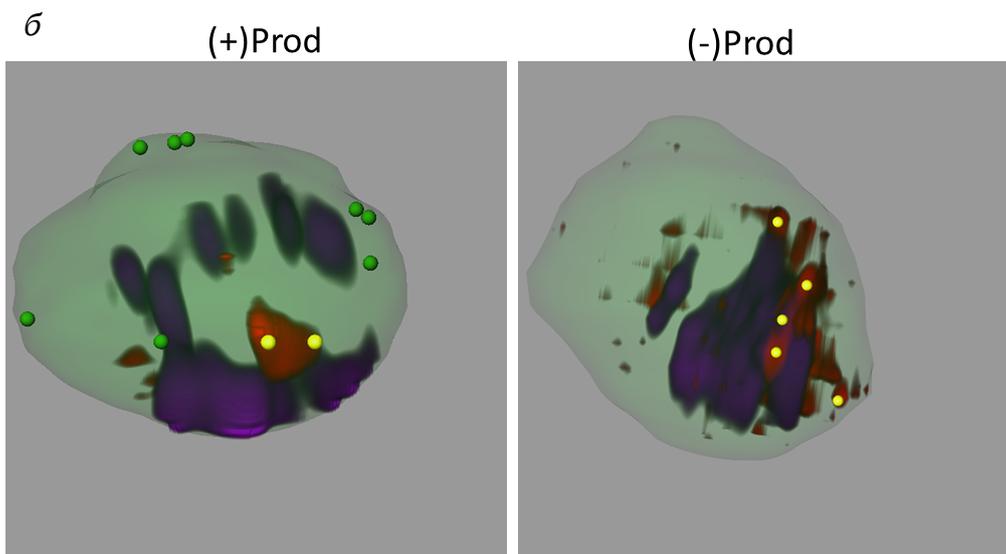
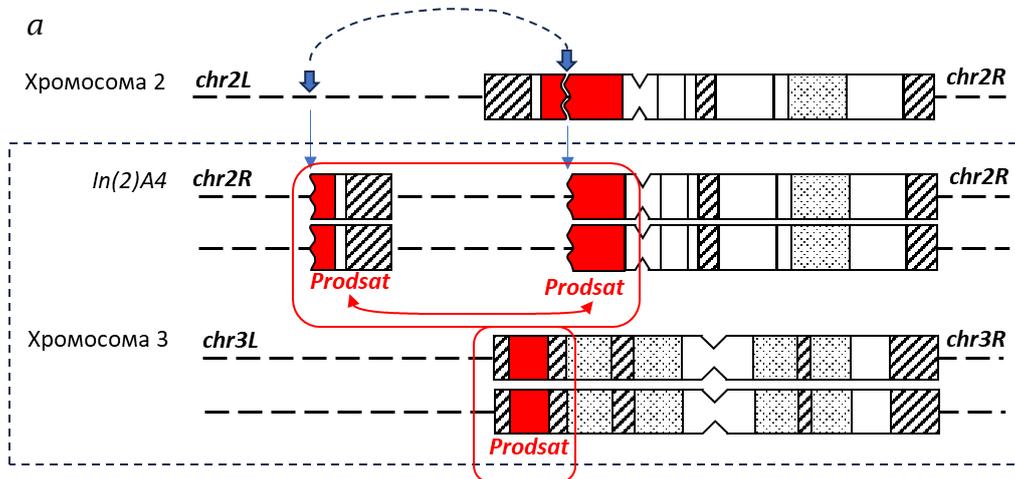


Схема возникновения инверсии *In(2)A4* и структура прицентромерного гетерохроматина хромосом 2 и 3 (а). Красным выделены блоки сателлита Prodsat, разрыв инверсии *In(2)A4* произошел в блоке Prodsat в хромосоме 2 и привел к его разделению в соотношении ~ 1 : 3. Отделенные блоки сателлита в норме сближены в пространстве ядра (красная двусторонняя стрелка); б — примеры ядер из мух дикого типа ((+)Prod) и из мутантов по Prod ((-)Prod). 3D-реконструкция в Imaris, светло-зеленая оболочка — ядро, красное — гибридизация на Prodsat, фиолетовое — окрашивание на HP1a. Шарики показывают результат сегментации изображения в Imaris (точки с максимальной локальной интенсивностью окрашивания на Prodsat). Диаметр шарика 1 мкм. Ряд таких точек (зеленое) являются фоновым шумом, желтые соответствуют сигналу от Prodsat

Обнаружено, что в ядрах (+)Prod обычно наблюдается 2–4 сигнала от Prodsat, соответствующих основным блокам сателлита в гетерохроматине хромосом 2 и 3 (в *In(2)A4* малый и большой фрагменты разорванного блока сателлита конъюгируют, давая один сигнал). В ядрах (-)Prod наблюдается в среднем большее число сигналов Prodsat с большим разбросом по интенсивности, что указывает на нарушения конъюгации блоков гетерохроматина, в том числе нарушение взаимодействия малого и большого фрагментов сателлита в *In(2)A4*, что, в свою очередь, указывает на возможную роль Prod в транс-инактивации. Полученные данные воспроизводят результаты [2]

на другой генетической системе и другой стадии развития, подтверждая пригодность системы для дальнейших исследований влияния Prod на транс-инактивацию.

Результаты, полученные в ходе выполнения проекта, позволят исследовать процессы организации ядерных компартментов и влияние изменений ядерной организации на структуру хроматина и процессы эпигенетической регуляции генов не только у дрозофилы, но и в эукариотических организмах в целом.

### **Литература**

1. Torok T., Harvie P.D., Buratovich M. et al. The product of proliferation disrupter is concentrated at centromeres and required for mitotic chromosome condensation and cell proliferation in *Drosophila* // *Genes and Development*. 1997. Vol. 11. P. 213–225.
2. Jagannathan M., Cummings R., Yamashita Y.M. The modular mechanism of chromocenter formation in *Drosophila* // *Elife*. 2019. Vol. 8. P. e43938.
3. Talbert P.B., Kasinathan S., Henikoff S. Simple and complex centromeric satellites in *Drosophila* sibling species // *Genetics*. 2018. Vol. 208. P. 977–990.