

УДК 577

Модельная система в клетках S2 для тестирования функциональной активности инсуляторов дрозофилы

М. В. Тихонов, Н. Б. Гасанов, П. Г. Георгиев, О. Г. Максименко*

Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

*E-mail: mog@genebiology.ru

Поступила в редакцию 19.03.2015

РЕФЕРАТ Инсуляторы – особый класс регуляторных элементов, способных участвовать в установлении взаимодействий между энхансерами и промоторами в геноме высших эукариот. Механизмы действия инсуляторов не выяснены, что во многом связано с отсутствием удобных модельных систем. Нами продолжено изучение модельной системы, основанной на транзientной экспрессии плазмиды, содержащей энхансер мобильного элемента *scoria*, в культурах эмбриональных клеток дрозофилы. Показано, что при транзientной трансфекции кольцевых плазмид входящий в их состав наиболее хорошо изученный инсулятор дрозофилы, найденный в мобильном элементе МДГ4, проявляет при блокировании энхансеров такие же свойства, как и в стабильных трансгенных линиях дрозофилы. Таким образом, в культуре клеток дрозофилы можно изучать основные свойства инсуляторов, что дает дополнительные возможности для исследования функциональной роли отдельных инсуляторных белков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА инсуляторы, энхансер *scoria*, Su(Hw), транскрипция с энхансера, *hsp70*-промотор.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ S2 – культура клеток, полученная из эмбриональных клеток дрозофилы; Sg4 – культура клеток дрозофилы, производная линии S2; *hsp70*-промотор – промотор гена теплового шока 70.

ВВЕДЕНИЕ

В клетках высших эукариот энхансер может активировать промотор на расстоянии, достигающем нескольких сотен тысяч пар нуклеотидов [1–3]. Изучение инсуляторов может внести значительный вклад в понимание механизмов дальних взаимодействий между регуляторными элементами. Инсуляторами названы регуляторные элементы, способные блокировать взаимодействия между энхансером и промотором, если находятся между ними [4–7]. При этом инсуляторы не влияют непосредственно на активность энхансера и промотора, т.е. промотор может быть активирован любым другим энхансером, а энхансер способен активировать любой другой промотор. В последнее время стало очевидным, что многие инсуляторные белки обеспечивают специфичные взаимодействия между удаленными регуляторными элементами и структурными доменами хромосом [1].

В изучении транскрипционных факторов, функционирующих в составе инсуляторов, важную роль играют модельные системы, созданные на основе клеточных линий млекопитающих [8] и дрозофилы [9–11]. Одной из проблем при создании удобной модельной системы для изучения инсуляторов явля-

ется сравнительно небольшое число описанных энхансеров, способных эффективно функционировать в культурах клеток дрозофилы.

Ранее было показано, что энхансер из ретротранспозона *scoria* активирует промотор гена белка теплового шока 70 в клетках S2 *Drosophila melanogaster*, имеющих эмбриональное происхождение [10]. Энхансер, размером 150 п.н., находится непосредственно после 5'-длинного концевого повтора ретротранспозона *scoria* (рис. 1А) и содержит на 3'-конце дупликацию из 28 п.н. [12, 13]. В состав дублированной последовательности входят две копии октануклеотида TTGTGAAA, расположенные в инвертированной ориентации. Три аналогичных октануклеотида находятся в 5'-области энхансера. Известны *scoria*-элементы, содержащие энхансер только с одной последовательностью 28 п.н., которые обладают значительно сниженной транскрипционной активностью. Предполагается, что с последовательностью TTGTGAAA связывается фактор транскрипции, который и определяет активность энхансера. Выделено также несколько транскрипционных факторов, которые преимущественно связываются с 5'-областью энхансера и могут как активировать, так и ингибировать транскрипцию [13–15].

В нашей работе проведено детальное исследование энхансера *coria* в модельной системе, которая используется для тестирования инсуляторов в культуре клеток дрозофилы. Адекватность модельной системы, основанной на транзистентной экспрессии кольцевой плазмиды в культурах клеток дрозофилы, изучали с использованием инсулятора, локализованного в регуляторной области ретротранспозона МДГ4 дрозофилы [4–7]. Ранее с помощью модельных систем, созданных на основе стабильных трансгенных линий дрозофилы, на примере этого инсулятора были описаны основные свойства регуляторных элементов данного класса. В представленной работе показано, что все основные свойства инсулятора МДГ4 воспроизводятся при транзистентной экспрессии кольцевой плазмиды в культуре клеток дрозофилы.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Создание конструкций

В качестве исходных векторов использовали плазмиды pGL3basic и pGL3enhancer (Promega). Промотор (-203...+253 п.н. относительно старта транскрипции) гена *hsp70* амплифицировали с геномной ДНК *D. melanogaster* и встраивали по сайтам рестрикции HindIII, EcoRI в векторы pGL3basic и pGL3enhancer. Энхансер *coria* размером 168 п.н. амплифицировали с геномной ДНК *D. melanogaster* и встраивали ниже сигнала полиаденилирования, в вектор pGL3basic и pGL3enhancer (конструкции *he*) по сайту рестрикции BamHI. Конструкции e_a , e_r получены путем встраивания амплифицированного энхансера *coria* выше кодирующей части гена люциферазы. В конструкциях $e_a h$ и $e_r h$ энхансер *coria* клонировали в вектор *h* выше промотора по сайту рестрикции SmaI. В случае конструкций $g_a e_a h$, $g_r e_a h$, $g_a e_r h$, $g_r e_r h$, $e_a g_a h$, $e_a g_r h$, $g_a e_a g_a h$, $g_r e_a g_a h$, $e_a s_a h$, $e_a s_a g_a h$, $e_a s_a g_r h$, $e_a s_a g_r h$ сначала отдельно собирали последовательность из регуляторных элементов на основе вектора pBluescript, а затем переносили ее в вектор *h* по сайту рестрикции SmaI выше промотора. Инсулятор *gypsy* (из ретротранспозона МДГ4) – ранее амплифицированный в лаборатории фрагмент из 450 п.н. Сигнал полиаденилирования вируса SV40 был вырезан из вектора pAc5.1hisB (Invitrogen) по сайтам рестрикции BamHI, SalI. В случае конструкций $he_a g_a$, $he_a g_r$, $hgde_a$, $hgde_a g_a$, $hgde_a g_r$, так же собирали совокупность регуляторных элементов в векторе pBluescript и переносили в вектор *h* по сайту рестрикции BamHI после сигнала полиаденилирования. В конструкции $g_a hgde_a$ регуляторные элементы встраивали по сайтам рестрикции SmaI и BamHI – выше и ниже транскрипционной единицы соответственно.

Культивирование клеток, трансфекция

Культуру клеток S2 *Drosophila* выращивали в среде SFX (HyClone) при 25°C. Клетки трансфицировали с помощью реагента Cellfectin II (Invitrogen) согласно рекомендациям производителя (около 8×10^5 клеток на трансфекцию). За 2 ч до трансфекции клетки разносили по лункам 12-луночного планшета. На одну трансфекцию брали 0.5 мкг ДНК. Во всех случаях проводили котрансфекцию опытных конструкций, в которых в качестве репортерного гена использовали ген люциферазы светлячка, и контрольной конструкции, в которой под контролем промотора гена актина размещали ген люциферазы медузы (в соотношении 19 : 1). Клетки собирали через 48 ч после трансфекции.

Выделение РНК, обратная транскрипция

РНК выделяли из клеток S2 при помощи TRI-реагента (Ambion) согласно рекомендациям производителя. Выделенную суммарную РНК очищали от примеси геномной ДНК с помощью набора реактивов Turbo DNA-free (Ambion). К 1–5 мкг препарата РНК добавляли рассеянную затравку до концентрации 1–5 мкМ, нагревали до 70°C, инкубировали в течение 5 мин и быстро охлаждали во льду. Добавляли dNTP до концентрации 0.5 мМ, буфер для обратной транскриптазы, 5 ед. ингибитора РНКаз SUPERase-In (Ambion), 60 ед. обратной транскриптазы ArrayScript Reverse Transcriptase (Ambion). Реакционную смесь инкубировали в течение 2 ч при 42°C, затем ферменты инактивировали, нагревая до 95°C в течение 5 мин.

Количественная ПЦР с получением результатов в режиме реального времени

Количественную ПЦР с получением результатов в режиме реального времени проводили на образцах кДНК. Одновременно проводили как минимум три независимых реакции с каждой парой праймеров для каждого из трех независимо собранных образцов. Относительные количества ДНК определяли методом $\Delta\Delta Ct$. В качестве эндогенного контроля использовали участки генов *γTub37C* и *rpl32*. В работе использовали следующие пары праймеров: *tub* (gctttcccaagaagctcataca и gggtcagtcggtattatccag), *rpl32* (gttcgatccgtaaccgatgt и ccagtcggatcgatgatgctaa), *Fluc* (ttgtcccaacaccccaacat и ttccgtctccaaaacaaca), *Rluc* (cagtggtggccagatgtaaacaa и taatacaccgcgctactgctca).

Двойной люциферазный анализ

Двойной люциферазный анализ проводили, используя фирменный набор реактивов Firefly & Renilla Luciferase Assay Kit (Biotium), согласно протоколу

производителя. Измерение проводили на планшетном анализаторе с чувствительностью 100 и временем экспозиции 1 с.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активность энхансера мобильного элемента *coria* зависит от клеточной линии дрозофилы

Ранее было показано [10], что энхансер *coria* (рис. 1А) может более чем в 100 раз усиливать транскрипцию с промотора гена белка теплового шока 70 (*hsp70*) в составе плазмиды, трансфицированной в клетки S2. Однако согласно [16], энхансер *coria* не стимулирует транскрипцию в клетках S2, и его активность выявлена только в клеточной линии DH-33, полученной из *Drosophila hydei*.

Первым вероятным объяснением таких противоречивых результатов было предположение о том, что конструкция, используемая в работе [10], содержала дополнительные регуляторные элементы, которые могли усиливать работу энхансера *coria* в клетках S2. Действительно, экспрессионный вектор содержал три копии энхансера *coria* с 3'-стороны репортерного гена люциферазы светлячка, контролируемого минимальным *hsp70*-промотором (рис. 1Б). Рядом с копиями энхансера *coria* (e_3) находился энхансер SV40 (s), который также мог принимать участие в стимуляции транскрипции [10].

С целью изучения роли сложной организации области энхансеров в стимуляции транскрипции сравнили активность этой конструкции (he_3s) и конструкции, содержащей только промотор (h), в S2-клетках, полученных из двух разных источников (рис. 1Б). Одна линия клеток велась в нашей лаборатории (S2_G), вторая получена непосредственно из фирмы Invitrogen (S2_I). Неожиданно оказалось, что сложный элемент, состоящий из трех энхансеров *coria* и энхансера SV40, не стимулирует *hsp70*-промотор ни в одной из тестируемых линий клеток (рис. 1Б). Таким образом, сложный энхансер не стимулирует транскрипцию в клетках S2.

Полученные результаты можно объяснить различиями в наборе транскрипционных факторов, которые экспрессируются в клеточных линиях S2, культивируемых независимо на протяжении длительного времени. С целью проверки данного предположения создан новый вектор, в котором за репортерным геном была встроена только одна копия энхансера *coria* (рис. 1Б). Мы использовали две дополнительные линии клеток: S2_P (линия, использованная в проекте MODEncode) и Sg4 (получена из лаборатории В. Пирротты, Университет Ратгерса, США). Линия Sg4 – производная линии S2, отличается от S2 профилем экспрессии части генов.

В результате трансфекции контрольной и опытной плазмид в четыре клеточные линии установили, что энхансер *coria* способен примерно в 80–100 раз стимулировать транскрипцию *hsp70*-промотора в линиях S2_P и Sg4, но не обладает стимулирующим потенциалом в двух ранее используемых линиях S2. Таким образом, одна копия энхансера *coria* способна эффективно стимулировать транскрипцию только в определенных вариантах клеток S2.

Энхансер *coria* индуцирует транскрипцию в двух направлениях с эффективностью, сравнимой с базовой активностью промотора *hsp70*

В работе [10] показано, что сложный регуляторный элемент, состоящий из энхансеров SV40 и *coria*, индуцирует двустороннюю транскрипцию. В настоящее время существует достаточно много данных о том, что инициация транскрипции происходит на большей части энхансеров [2, 3]. Наиболее часто с энхансеров транскрибируются короткие нестабильные неполладенилированные транскрипты, которые обычно не транспортируются в цитоплазму и не транслируются. Поэтому решили проверить способность энхансера *coria* индуцировать транскрипцию. Ранее было показано, что некоторые энхансеры могут продуцировать полноценные мРНК [2, 3], поэтому была изучена способность энхансера *coria* продуцировать полиаденилированную РНК, способную транслироваться.

С этой целью получили конструкции, в которых энхансер *coria* был встроен в прямой либо обратной ориентации вместо *hsp70*-промотора выше репортерного гена люциферазы светлячка (рис. 2). В качестве контроля использовали плазмиды с/без *hsp70*-промотора выше репортерного гена. Этими плазмидами трансфицировали клетки Sg4. В результате показали, что с энхансера *coria* в обеих ориентациях запускается транскрипция и экспрессируется люцифераза, но в 5–20 раз слабее, чем в случае конструкции с *hsp70*-промотором. При этом в прямой ориентации энхансер *coria* функционирует в качестве промотора, приблизительно в 3 раза более сильного, чем в обратной ориентации. Таким образом, энхансер *coria* может функционировать как слабый двунаправленный промотор, индуцирующий формирование функциональной мРНК, на матрице которой синтезируется люцифераза. Уровень транскриптов, синтезируемых с энхансера *coria* и *hsp70*-промотора, сравнили с помощью обратной транскрипции РНК с последующей количественной ПЦР. Оказалось, что транскрипция с промотора всего лишь в 2–3 раза эффективней транскрипции с энхансера. Таким образом, одна копия энхансера *coria* может запускать двунаправленный синтез молекул РНК, пригодных

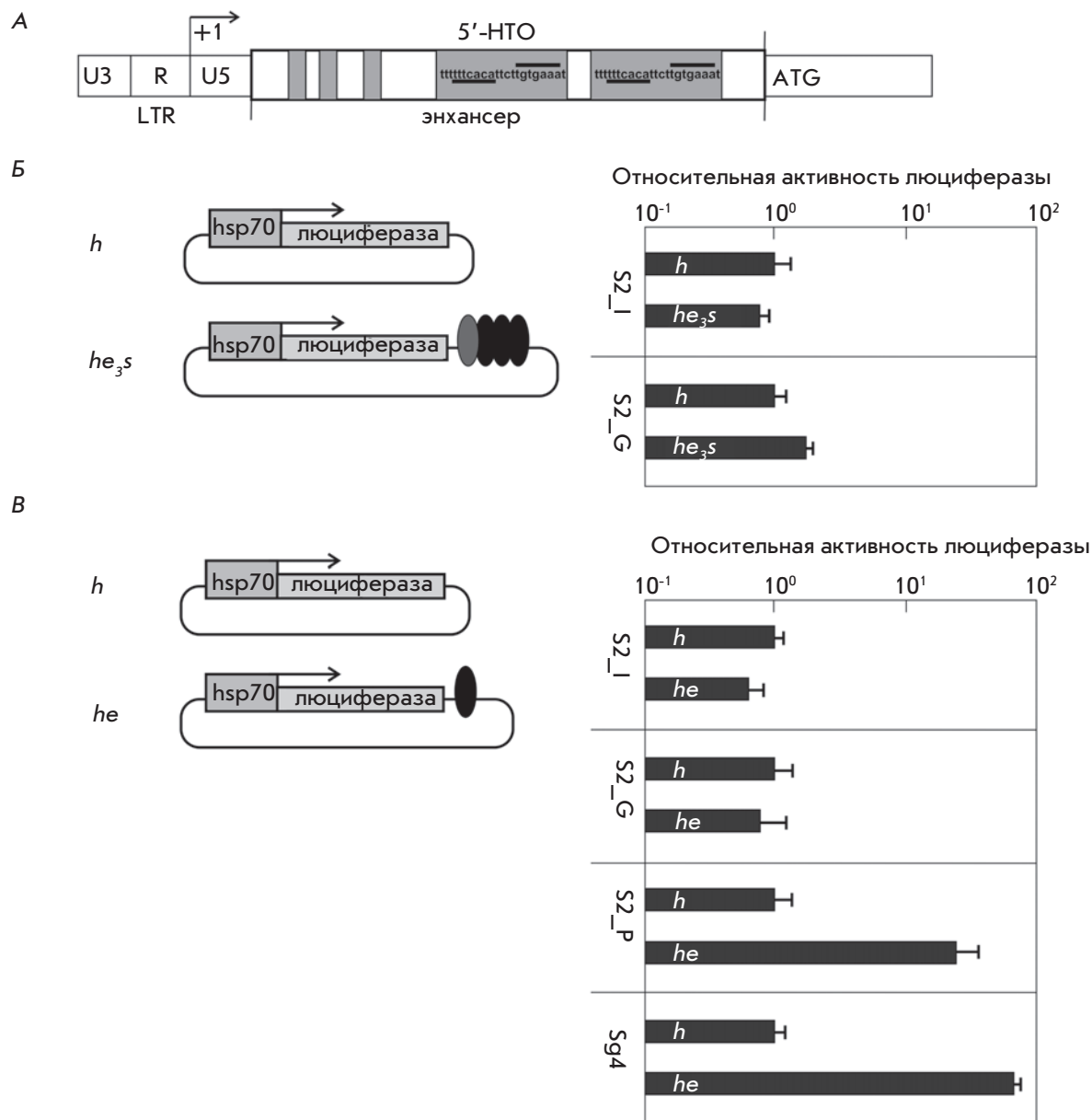


Рис. 1. А – схема энхансера из ретротранспозона *coria*. Энхансер расположен в 5'-нетранспируемой области (5'-НТО). LTR – длинный концевой повтор. +1 – точка начала транскрипции. ATG – стартовый кодон. Серыми прямоугольниками показаны октануклеотидные повторы. Б – результаты анализа активности элемента из трех копий энхансера *coria* (черные овалы) и одной копии энхансера SV40 (серый овал), расположенных с 3'-конца репортерного гена люциферазы светлячка (серый прямоугольник), находящегося под контролем *hsp70*-промотора (серый прямоугольник со стрелкой). Контрольная конструкция *h* и опытная *he₃s* трансфицированы в два варианта клеток S2 (S2_I и S2_G). На гистограмме в логарифмической шкале представлено отношение активностей люциферазы светлячка к люциферазе медузы. Все данные нормировали относительно контрольной конструкции *h*. Стандартные отклонения подсчитаны по результатам измерения четырех биологических повторов. В – анализ активности одной копии энхансера *coria* (черный овал), расположенного с 3'-конца репортерного гена люциферазы светлячка. Контрольной конструкцией *h* и опытной *he* трансфицированы четыре варианта клеток S2 (S2_I, S2_G, S2_P, Sg4). На гистограмме в логарифмической шкале представлено отношение активностей люциферазы светлячка к люциферазе медузы. Все данные нормировали относительно контрольной конструкции *h*. Стандартные отклонения подсчитаны по результатам измерения четырех биологических повторов

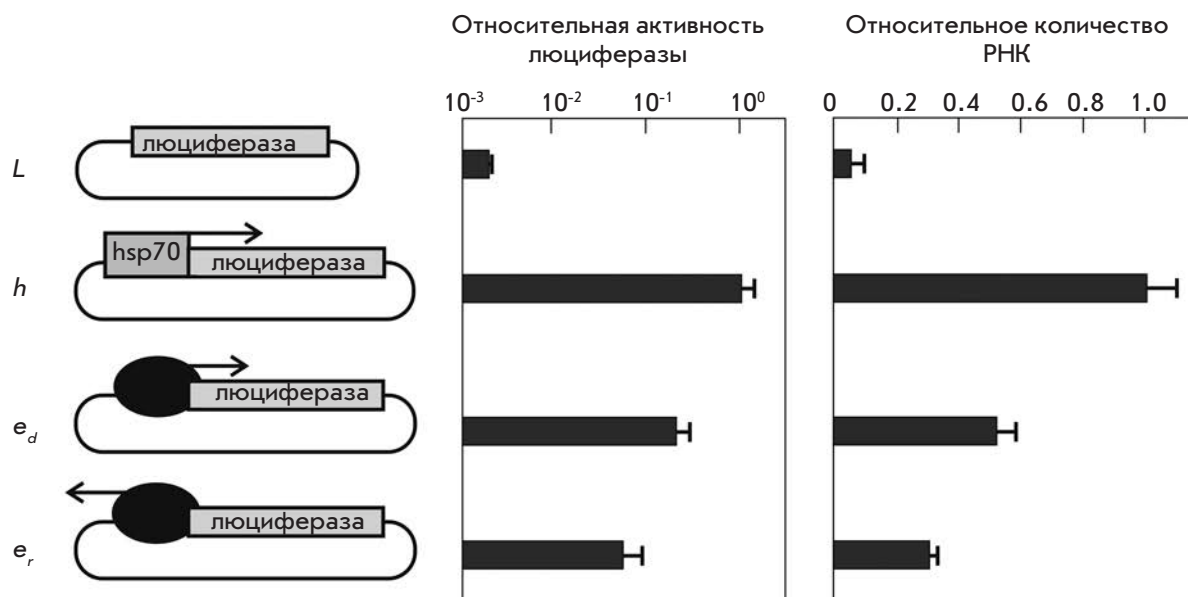


Рис. 2. Результаты анализа промоторной активности энхансера *soria* (черный овал). Стрелка показывает ориентацию энхансера. В качестве контролей использовали плазмиды *L* (отрицательный контроль, без промотора) и *h* (положительный контроль, с промотором *hsp70*). На левой гистограмме в логарифмической шкале представлено отношение активностей люциферазы светлячка к люциферазе медузы. Все данные нормировали относительно контрольной конструкции *h*. Стандартные отклонения подсчитаны по результатам измерения четырех биологических повторов. На правой гистограмме в линейной шкале представлено относительное количество РНК, транскрибируемой с гена люциферазы светлячка. Все данные нормировали относительно уровней экспрессии генов *rpl32*, *tub* и люциферазы медузы. Стандартные отклонения подсчитаны по результатам измерения четырех биологических повторов

для прохождения этапов трансляции, и на уровне, сопоставимом с базовой активностью *hsp70*-промотора.

Инсулятор из ретротранспозона МДГ4 незначительно влияет на активность энхансера *soria* в положении перед промотором

Наиболее сильный инсулятор дрозофилы, состоящий из 12 сайтов связывания белка Su(Hw), локализован в регуляторной области ретротранспозона МДГ4 [17–19]. В трансгенных линиях дрозофилы активность этого инсулятора зависит от взятых в исследование энхансеров и промоторов. Так, одна копия такого инсулятора полностью блокирует активность энхансеров гена *yellow*, но почти не влияет на активность энхансера гена *white* [20, 21]. С помощью трансфекции кольцевой плазмиды в клетки S2 дрозофилы показано [9], что одна копия инсулятора из МДГ4, размещенная перед промотором репортерного гена, снижает в 2 раза активность энхансера *soria*, встроенного с 3'-стороны гена. Двукратное снижение транскрипции можно объяснить влиянием инсулятора как на активность энхансера, так и на промотор, расположенный рядом. Так, белок Su(Hw) детекти-

руется не только на инсуляторе, но также на последовательностях энхансера *soria* и промотора *hsp70* в составе трансфицированных конструкций [22].

Определить, на активность какого элемента влияет инсулятор, мы попытались с помощью серии конструкций, в которых энхансер находился в положении –233 п.н. относительно старта транскрипции с *hsp70*-промотора (рис. 3). Энхансер был размещен в двух ориентациях – прямой (*e_d*) и обратной (*e_r*). В трансфицированных клетках Sg4 уровень экспрессии репортерного гена не зависел от ориентации энхансера. Инсулятор МДГ4 (*g*) располагался непосредственно перед энхансером либо в прямой, либо в обратной ориентации. Таким образом, получены четыре конструкции, в которых инсулятор и энхансер размещались в разных ориентациях друг относительно друга и промотора. Всеми конструкциями трансфицировали клетки Sg4 (рис. 3). Определение уровня экспрессии люциферазы показало, что в конструкциях, в которых энхансер и промотор имели друг относительно друга противоположную ориентацию, присутствие инсулятора в любой ориентации не влияло или незначительно увеличивало уровень

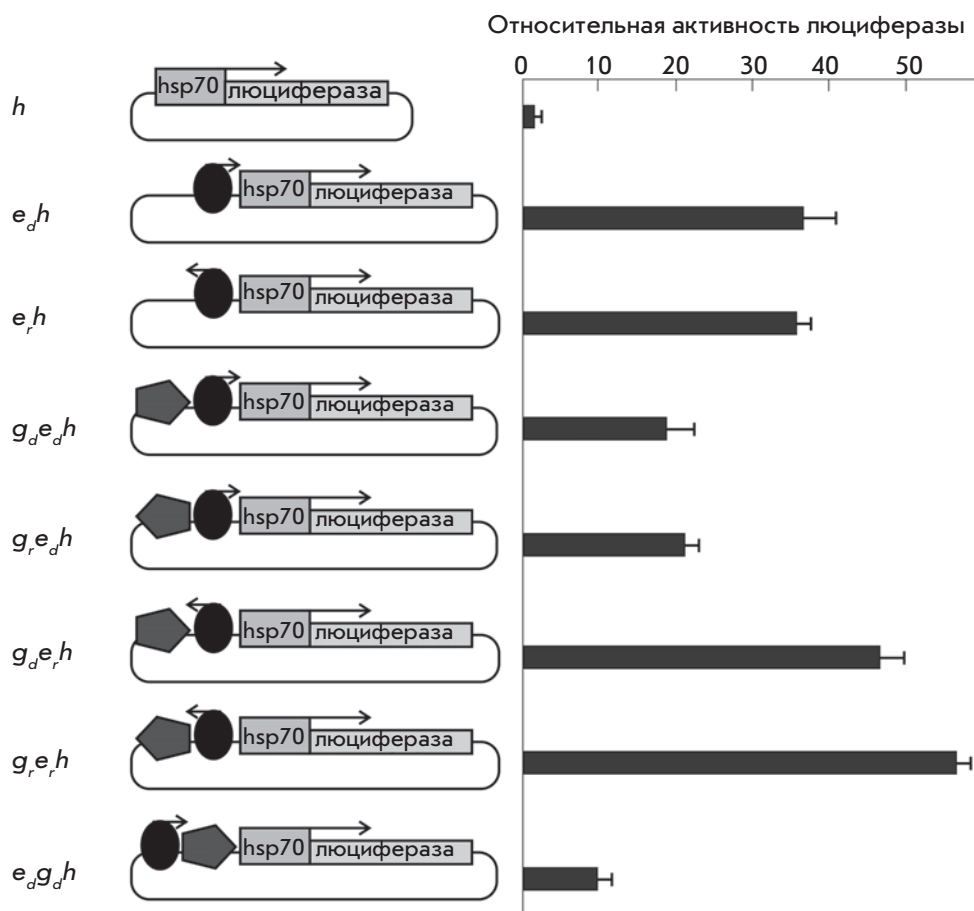


Рис. 3. Влияние инсулятора МДГ4 на активность энхансера *coria*. Результаты анализа активности комбинаций энхансера (овал) и инсулятора (пятиугольник), расположенных выше промотора *hsp70*. Ориентация энхансера *coria* показана стрелкой, ориентация инсулятора – направлением пятиугольника. На гистограмме представлено отношение активностей люциферазы светлячка к люциферазе медузы. Все данные нормировали относительно контрольной конструкции *h*. Стандартные отклонения подсчитаны по результатам измерения четырех биологических повторов

экспрессии репортерного гена. В тех случаях, когда энхансер был встроен в прямой ориентации, уровень экспрессии репортерного гена снижался примерно в 2 раза в присутствии инсулятора в любой ориентации. Таким образом, инсулятор может влиять на активность расположенного рядом энхансера, находящегося в непосредственной близости от промотора. В этом случае механизм влияния не связан с блокированием взаимодействия между энхансером и промотором. Наиболее вероятно, что подобное ингибирование транскрипции, зависящее от ориентации, связано с прямым взаимодействием белков, связанных с инсулятором и энхансером, что согласуется с данными о распределении инсуляторных белков [10].

Следующей задачей стало изучение влияния инсулятора на уровень экспрессии репортерного гена в положении между энхансером и промотором. С этой целью получили конструкцию, в которой инсулятор встроен в положение -233 п.н. относительно старта транскрипции *hsp70*-промотора (рис. 3). Энхансер находился непосредственно перед инсулятором в прямой ориентации, т.е. инсулятор располагался между

энхансером и промотором. В этом случае инсулятор снижал активность энхансера примерно в 4 раза. Таким образом, инсулятор, помещенный между энхансером и промотором, сильнее ингибирует транскрипцию репортерного гена, чем в положении выше энхансера. Этот результат согласуется с основным свойством инсуляторов – способностью блокировать энхансер, которое проявляется, когда инсулятор располагается между энхансером и промотором.

Две копии инсулятора, окружающие энхансер, полностью инактивируют его активность

Полученные результаты показывают, что одна копия инсулятора способна только частично блокировать активность энхансера в транзientной модели на основе кольцевых плазмид. Ранее мы показали, что только две копии инсулятора МДГ4, окружающие либо энхансер, либо репортерный ген *white*, способны полностью блокировать активность энхансера в трансгенных линиях дрозофилы [21]. Согласно модели за счет взаимодействия между инсуляторами формируется хроматиновая петля, которая значительно усложняет процесс установления взаимодей-

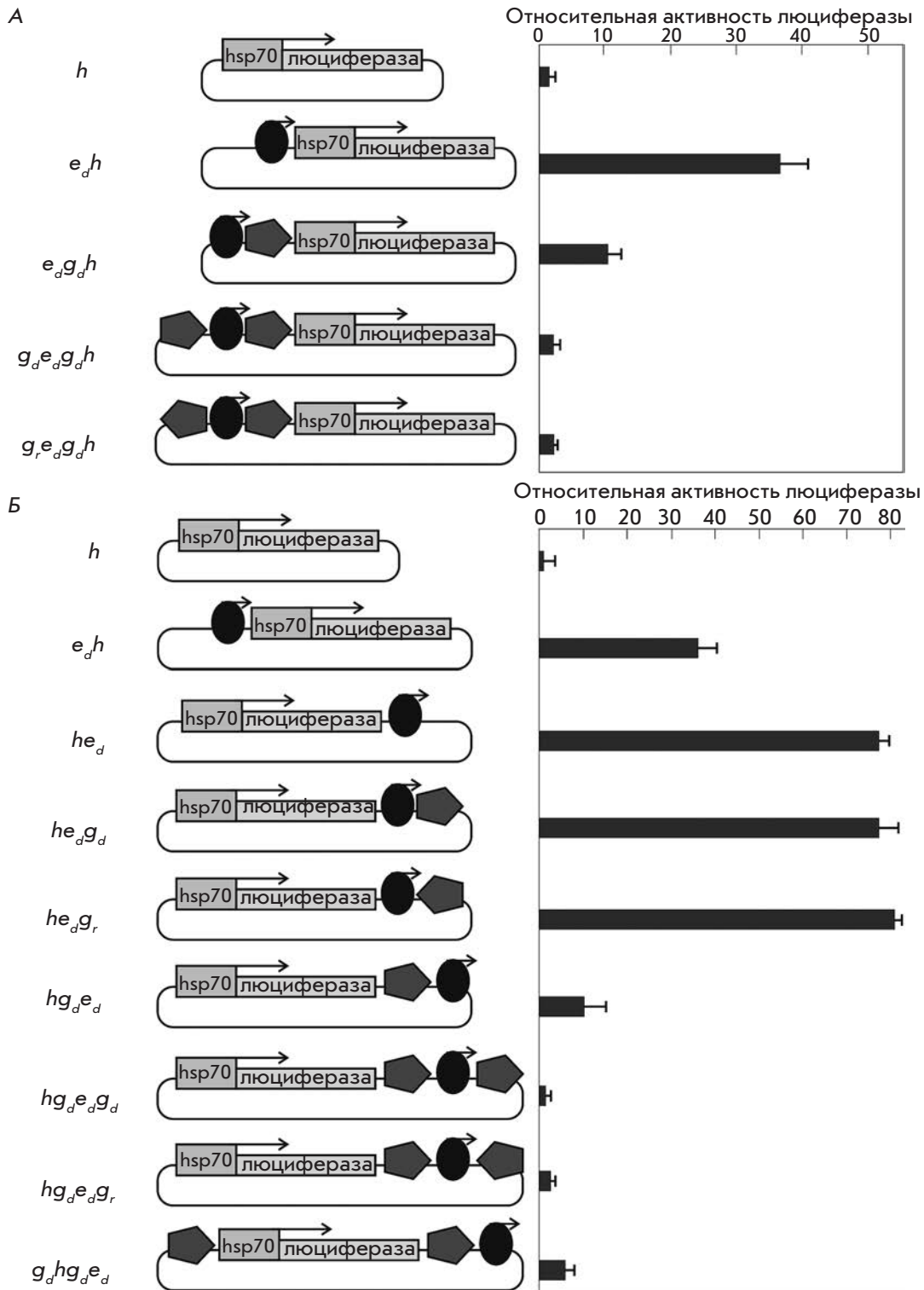


Рис. 4. Влияние двух копий инсультора МДГ4, окружающих энхансер или репортерный ген. Результаты анализа комбинаций двух копий инсультора (пятиугольник) в разной ориентации, окружающих энхансер (овал) и расположенных выше промотора *hsp70* (А) или с 3'-конца репортерного гена (Б). Ориентация энхансера *soria* показана стрелкой, ориентация инсультора – направлением пятиугольника. На гистограммах представлено отношение активностей люциферазы светлячка к люциферазе медузы. Все данные нормировали относительно контрольной конструкции *h*. Стандартные отклонения подсчитаны по результатам измерения четырех биологических повторов

ствий между белковыми комплексами, связанными с энхансерами и промоторами. Чтобы определить, будет ли выполняться это правило функционирования инсуляторов в транзиентной модели на основе кольцевой плазмиды, получили две дополнительные конструкции, в которых энхансер, локализованный перед *hsp70*-промотором, был окружен двумя инсуляторами, расположенными в одном или противоположных направлениях (рис. 4А). Оказалось, что в обоих вариантах уровень экспрессии репортерного гена близок к уровню контрольной плазмиды, которая содержит только *hsp70*-промотор. Таким образом, два инсулятора, окружающие энхансер, приводят к полной инактивации его активности, что согласуется с результатами, полученными ранее в трансгенных линиях дрозофилы.

В описанных выше опытах инсуляторы, окружающие энхансер, находились рядом с промотором. Возникает вопрос, сохранится ли эффект полного блокирования энхансера, если энхансер, окруженный инсуляторами, будет находиться на значительном расстоянии от промотора. Для ответа на этот вопрос создали серию конструкций, в которых энхансер *scoria* был встроен в прямой ориентации в положении +2230 п.н. относительно старта транскрипции репортерного гена люциферазы светлячка (рис. 4Б). В этом положении энхансер стимулировал транскрипцию репортерного гена примерно в 2 раза эффективнее, чем в положении перед промотором. В двух плазидах, в которых инсулятор находился в прямой/обратной ориентации с 3'-стороны от энхансера, уровень экспрессии репортерного гена оказался близким к экспрессии плазмиды, содержащей только энхансер. Таким образом, инсулятор, расположенный за энхансером, не влиял на его активность. Однако при размещении инсулятора между репортерным геном и энхансером происходило шестикратное снижение уровня экспрессии репортерного гена. Таким образом, даже в рамках кольцевой плазмиды взаимное расположение энхансера и инсулятора относительно промотора определяет эффективность ингибирования транскрипции. В следующей серии конструкций энхансер был встроен между двумя одно- или разнонаправленными инсуляторами (рис. 4Б). При транзиентной трансфекции таких плазмид в клетки Sg4 экспрессия репортерного гена детектировалась на уровне контрольной плазмиды, содержащей только *hsp70*-промотор. Таким образом, две копии инсулятора, окружающие энхансер, полностью блокируют его активность. Следовательно, расстояние между энхансером и промотором не влияет на эффективность блокирования энхансера, расположенного между парой инсуляторов.

В трансгенных линиях дрозофилы две копии инсулятора, окружающие репортерный ген, слабее блокировали активность энхансера, чем две копии инсулятора, окружающие энхансер [21]. Для дальнейшей проверки степени корреляции результатов, полученных в кольцевых плазидах и трансгенных линиях дрозофилы, использовали конструкцию, в которой инсуляторы окружали репортерный ген, а энхансер находился сразу за инсулятором с 3'-стороны гена. При трансфекции такой плазмиды в клетки Sg4 выявлена слабая активность энхансера, что согласуется с предположением о том, что инсуляторы в такой конфигурации не способны обеспечить полное блокирование энхансера. Полная инактивация энхансера наблюдалась только в том случае, если два инсулятора находились непосредственно рядом с энхансером. Таким образом выявлена полная корреляция между результатами, полученными на трансгенных линиях дрозофилы и в транзиентной модели в клетках Sg4.

Транскрипция с энхансера регулирует активность инсулятора МДГ4

Ранее предполагалось [10, 23, 24], что транскрипция помогает энхансеру двигаться по хроматину в поисках промотора. Согласно этой модели, инсулятор блокирует продвижение энхансера вместе с РНК-полимеразой II в сторону промотора. Транскрипция, которая инициируется на энхансере, также может непосредственно влиять на активность промотора и инсулятора.

Для исследования функциональной роли транскрипции, инициируемой на энхансере, создана серия плазмид, в которых для прерывания транскрипции используется универсальный терминатор вируса SV40 размером 220 п.н. В первой плазмиде терминатор SV40 встроен между энхансером *scoria*, расположенным в прямой ориентации, и *hsp70*-промотором (рис. 5). При трансфекции этой плазмиды в Sg4-клетки уровень экспрессии репортерного гена снижался в 2 раза по сравнению с плазмидой, содержащей только энхансер. Этот результат частично можно объяснить тем, что транскрипция, инициируемая с энхансера, вносит вклад в экспрессию репортерного гена. Терминатор SV40 прерывает эту транскрипцию и тем самым снижает уровень экспрессии репортерного гена. Однако ранее (рис. 2) мы показали, что с энхансера *scoria* нарабатывается приблизительно в 5 раз меньше люциферазы, чем с *hsp70*-промотора. Поэтому основное возможное объяснение связано с тем, что терминатор SV40 способен частично блокировать взаимодействие энхансера с промотором за счет остановки продвижения РНК-полимеразы II от энхансера в сторону промотора. Такая интерпретация согласуется с моделью,

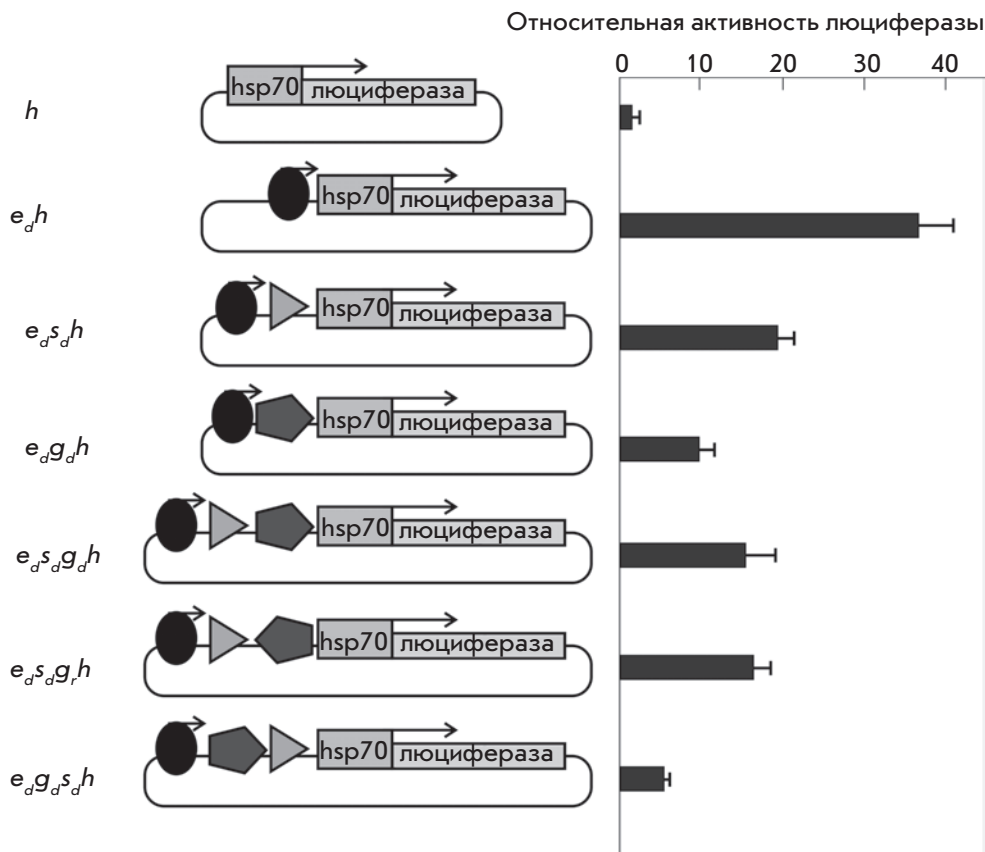


Рис. 5. Влияние транскрипции с энхансера на активность инсулятора МДГ4. Результаты анализа комбинаций инсулятора (пятиугольник) в разной ориентации, энхансера (овал) и терминатора транскрипции вируса SV40 (треугольник), расположенных выше промотора *hsp70*. Ориентация энхансера *scoria* показана стрелкой, ориентация инсулятора – направлением пятиугольника, ориентация терминатора SV40 показана направлением треугольника. На гистограмме представлено отношение активностей люциферазы светлячка к люциферазе медузы. Все данные нормировали относительно контрольной конструкции *h*. Стандартные отклонения подсчитаны по результатам измерения четырех биологических повторов

согласно которой РНК-полимераза II играет определенную роль при передаче сигнала от энхансера к промотору [10, 24, 25].

В следующих двух плазидах энхансер, расположенный в прямой ориентации относительно промотора, был отделен от промотора терминатором SV40 и инсулятором, встроенным в прямой или обратной ориентации (рис. 5). При трансфекции любой из этих плазмид в клетки Sg4 экспрессия репортерного гена оставалась на том же уровне, как и у плазмиды, содержащей только терминатор SV40. Интересно, что при этом в присутствии комбинации инсулятора и терминатора транскрипция достигала более высокого уровня по сравнению с плазмидой, содержащей только инсулятор. Таким образом, терминатор SV40 частично супрессирует блокирующую активность инсулятора вместо ожидаемого аддитивного негативного эффекта инсулятора и терминатора SV40 на экспрессию репортерного гена. При трансфекции в клетки Sg4 плазмиды, в которой инсулятор и терминатор поменяли местами, в результате чего инсулятор оказался между энхансером и терминатором, наблюдалось снижение уровня экспрессии репортерного гена (рис. 5). Полученные данные позволяют предположить, что транскрипция с энхансера уси-

ливает активность инсулятора, что приводит к более эффективному блокированию энхансера.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные в нашей работе данные предполагают, что эмбриональные клеточные линии дрозофилы, имеющие общее происхождение, отличаются по уровню экспрессии в них транскрипционных факторов, необходимых для функционирования энхансера *scoria*. По-видимому, в эмбриональных клеточных линиях может варьировать экспрессия и других генов, кодирующих транскрипционные факторы, которые не являются необходимыми для поддержания клеточной линии. Таким образом, клеточные линии, даже имеющие общее происхождение, могут значительно отличаться по набору транскрипционных факторов и, как следствие, по функциональной активности регуляторных элементов.

Нами доработана модельная система, позволяющая изучать активность инсуляторов в эмбриональных клеточных линиях дрозофилы. В транзитной модели на кольцевых плазидах наиболее хорошо известный инсулятор МДГ4 сохраняет свои основные свойства, описанные при использовании модельных систем на основе трансгенных линий дрозофилы [25].

Одна копия инсулятора только частично блокирует активность энхансера, в то же время две копии, окружающие либо энхансер, либо репортерный ген, приводят к полной инактивации энхансера.

Недавно в нашей лаборатории было показано, что транскрипция через энхансер ингибирует его активность [26]. В настоящей работе установлено, что энхансер *coria* обладает свойствами слабого двустороннего промотора, и транскрипция с энхансера

может усиливать способность инсулятора МДГ4 блокировать активность энхансера. Действительно, существует ряд данных, согласно которым связывание транскриптов с комплексом Su(Hw) может регулировать активность инсулятора [27, 28]. ●

*Работа выполнена при поддержке Российского
научного фонда (проект № 14-24-00166).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Maksimenko O., Georgiev P. // *Front. Genet.* 2014. V. 5. P. 28.
- Spitz F., Furlong E.E. // *Nat. Rev. Genet.* 2012. V. 13. P. 613–626.
- Erokhin M., Vassetzky Y., Georgiev P., Chetverina D. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. V. 72. P. 2361–2375. doi: 10.1007/s00018-015-1871-9.
- Chetverina D., Aoki T., Erokhin M., Georgiev P., Schedl P. // *BioEssays.* 2014. V. 36. P. 163–172.
- Kyrchanova O., Georgiev P. // *FEBS Lett.* 2014. V. 588. P. 8–14.
- Herold M., Bartkuhn M., Renkawitz R. // *Development.* 2012. V. 139. P. 1045–1057.
- Matzat L.H., Lei E.P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1839. P. 203–214.
- Федосеева Д.М., Чуриков Н.А. // *ДАН.* 2013. Т. 451. С. 339–343.
- Bohla D., Herold M., Panzer I., Buxa M.K., Ali T., Demmers J., Krüger M., Scharfe M., Jarek M., Bartkuhn M., Renkawitz R. // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e107765.
- Tchurikov N.A., Kretova O.V., Moiseeva E.D., Sosin D.V. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. P. 111–122.
- Dai Q., Ren A., Westholm J.O., Serganov A.A., Patel D.J., Lai E.C. // *Genes Dev.* 2013. V. 27. P. 602–614.
- McDonald J.F., Matyunina L.V., Wilson S., Jordan I.K., Bowen N.J., Miller W.J. // *Genetica.* 1997. V. 100. P. 3–13.
- Wilson S., Matyunina L.V., McDonald J.F. // *Gene.* 1998. V. 209. P. 239–246.
- Cavarec L., Jensen S., Casella J.F., Cristescu S.A., Heidmann T. // *Mol. Cell. Biol.* 1997. V. 17. P. 482–494.
- Cavarec L., Heidmann T. // *Nucl. Acids Res.* 1993. V. 21. P. 5041–5049.
- Cavarec L., Jensen S., Heidmann T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1994. V. 203. P. 392–399.
- Holdridge C., Dorsett D. // *Mol. Cell Biol.* 1991. V. 11. P. 1894–1900.
- Geyer P.K., Corces V.G. // *Genes Dev.* 1992. V. 6. P. 1865–1873.
- Mazo A.M., Mizrokhi L.J., Karavanov A.A., Sedkov Y.A., Krichevskaja A.A., Ilyin Y.V. // *EMBO J.* 1989. V. 8. P. 903–911.
- Maksimenko O., Golovnin A., Georgiev P. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. P. 5469–5477.
- Kyrchanova O., Maksimenko O., Stakhov V., Ivlieva T., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P. // *PLoS Genet.* 2013. V. 9. P. e1003606.
- Смирнов Н.А., Дидыч Д.А., Акопов С.Б., Николаев Л.Г., Свердлов Е.Д. // *Биохимия.* 2013. Т. 78. С. 1141–1150.
- Zhao H., Dean A. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. P. 4903–4919.
- Zhu X., Ling J., Zhang L., Pi W., Wu M., Tuan D. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. P. 5532–5544.
- Ling J., Ainol L., Zhang L., Yu X., Pi W., Tuan D. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 51704–51713.
- Erokhin M., Davydova A., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P., Chetverina D. // *Epigenetics Chromatin.* 2013. V. 6. P. 31.
- King M.R., Matzat L.H., Dale R.K., Lim S.J., Lei E.P. // *J. Cell Sci.* 2014. V. 127. P. 2956–2966.
- Názer E., Lei E.P. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2014. V. 25. P. 68–73.