

УДК 575.22:595.773.4

Картирование в энхансере En1A *Drosophila melanogaster* модулей, обеспечивающих активацию транскрипции и дистанционное взаимодействие с промотором

Л. С. Мельникова*, Е. А. Померанцева, В. В. Молодина, П. Г. Георгиев

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

*E-mail: lsm73@mail.ru

Поступило в редакцию 23.06.2016

Принято к печати 08.11.2016

РЕФЕРАТ Изучена структура нового энхансера En1A из района 1A X-хромосомы *Drosophila melanogaster*. В составе En1A картированы элементы, один из которых отвечает за активацию транскрипции, а второй – за специфичное взаимодействие с промотором гена *yellow*. Полученные данные свидетельствуют в пользу предположения о модульном строении энхансеров, включающих отдельные последовательности, с которыми связываются активаторы транскрипции и особые коммуникаторные элементы, обеспечивающие дистанционные энхансер-промоторные взаимодействия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Drosophila melanogaster*, дистанционные взаимодействия, активация транскрипции, структура энхансеров, ген *yellow*.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ТФ – транскрипционные факторы; En1A (Enhancer 1A) – энхансер из района 1A хромосомы X; Cm1A (Communicator 1A) – коммуникаторный элемент энхансера En1A; TE (tethering element) – регуляторный элемент в составе промотора, обеспечивающий дистанционное энхансер-промоторное взаимодействие.

ВВЕДЕНИЕ

Одна из ключевых особенностей энхансеров – способность специфично активировать транскрипцию гена-мишени, иногда удаленного на расстояния, достигающие десятков и даже сотен тысяч пар нуклеотидов [1]. Однако механизмы поддержания специфичных дистанционных взаимодействий между энхансерами и промоторами остаются почти неизученными. Известно, что в ряде случаев в обеспечении коммуникации между энхансером и промотором участвуют *cis*-регуляторные последовательности, найденные в промоторных областях эукариотических генов [2–4]. Полученные нами ранее данные [5] позволяют предположить, что специфичность некоторых энхансеров обеспечивается присутствием в них сайтов связывания факторов транскрипции (ТФ), отвечающих за активацию транскрипции, и сайтов связывания белков, обеспечивающих стабильное дистанционное взаимодействие между энхансером и промотором.

Цель представленной работы состояла в изучении нового энхансера En1A, обнаруженного в ин-

троне неизученного гена CG3777, расположенного на X-хромосоме.

Показано, что энхансер En1A имеет модульное строение. В составе En1A мы обнаружили активаторный и коммуникаторный элементы. Активаторный элемент способен функционально заменять энхансеры тела и крыльев гена *yellow*, т.е. стимулировать транскрипцию в соответствующих кутикулярных структурах. Коммуникаторный элемент необходим для взаимодействия En1A с промотором гена *yellow* и способен обеспечивать дистанционную GAL4-зависимую активацию транскрипции.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все конструкции созданы на основе вектора pCaSpeR3, содержащего ген *mini-white*. Производный от pCaSpeR3 плазмидный вектор pCA, содержащий делецию гена *mini-white*, описан ранее [6].

В конструкциях EcoRI–PstI–Y, PstI–PvuII–Y, HindIII–y⁺–Y использованы соответствующие рестрикционные фрагменты химерного элемента из аллеля y⁺. Эти фрагменты были встроены перед

промотором гена *yellow* в положение -343 п.н. (здесь и далее, в том числе на рисунках, нумерация в локусе *yellow* исчисляется по отношению к сайту инициации транскрипции гена) по сайту рестрикции KpnI.

При создании конструкции (a1-a2)Y использована кДНК гена *yellow*, не содержащая интрон и энхансер щетинок (pCaSpeR3-Yil). Фрагмент размером 362 п.н. был амплифицирован с геномной ДНК мух линии y^{+s} с помощью праймеров a1 (5'-CTTTTGCATACACATCCAC-3') и a2 (5'-GCTGATGGAAGTTGCAGA-3') и клонирован в вектор на основе плазмиды pBlueScript между двумя *loxP*-сайтами по EcoRV-сайту (a1-a2/lox). Затем фрагмент a1-a2/lox клонировали в вектор pCaSpeR3-Yil по KpnI-сайту в положение -343 п.н. Во всех перечисленных конструкциях была делетирована регуляторная последовательность гена *yellow* до -343 п.н. (фрагмент XbaI-Eco47III).

Для получения вектора, не содержащего энхансеры тела и крыльев гена *yellow*, фрагмент XbaI-Eco47III, включающий энхансеры тела и крыльев, был удален из вектора pCA, содержащего полную последовательность гена *yellow* (CA-y (-890)). В конструкциях YG4(Cm1A), eveYG4(Cm1A) и DeveYG4(Cm1A) фрагмент ДНК, содержащий 10 сайтов связывания дрожжевого белка-активатора GAL4 (две копии по пять сайтов связывания из плазмидного вектора pUAST), был встроены в вектор CA-y (-890) на 3'-конец гена *yellow* по сайту рестрикции SmaI, а фрагмент a1-a2/lox – по сайту рестрикции SacI. Замена последовательности -68... +130 п.н в промоторе гена *yellow* на последовательность промотора гена *eve* и получение предпромоторной делеции -69... -100 п.н. описаны ранее [2].

ДНК конструкций и *P*-элемента с дефектными инвертированными повторами *P25.7wc*, использованного как источник транспозазы, инъецировали в линию *yacw*¹¹¹⁸ на стадии пребластодермального эмбриона. Выживших мух скрещивали с линией *yacw*¹¹¹⁸. Трансгенных мух отбирали на основе фенотипического проявления экспрессии генов *white* и *yellow*. Для дальнейшей работы выбрали линии с единственной копией конструкции в геноме, что было подтверждено с помощью Саузерн-блот-анализа. Детали клонирования последовательностей гена *yellow* в состав векторов, молекулярные методы исследования, трансформация эмбрионов и получение трансгенных линий дрозофил, фенотипический анализ экспрессии гена *yellow* в трансгенных линиях, индукция сайт-специфической рекомбинации между сайтами *loxP* и индукция GAL4-зависимой активации в трансгенных линиях подробно описаны в предыдущих работах [2, 5, 6].

Для индукции экспрессии дрожжевого белка GAL4 использовали линию *yw*¹¹¹⁸; *P[w+, tubGAL4]117/TM3, Sb* (Bloomington Center #5138). Для индукции рекомбинации между сайтами *loxP* использовали линию *y ac w*¹¹¹⁸; *Cyo, P[w+, cre]/Sco*. Нуклеотидная последовательность гена CG3777, структура и профиль его экспрессии приведены в базе данных FlyBase (<http://flybase.org/reports/FBgn0024989.html>).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

У *Drosophila melanogaster* ген *yellow* отвечает за пигментацию кутикулярных структур – тела, крыльев и щетинок. Энхансеры, контролирующие экспрессию *yellow* в кутикуле тела и крыльях, расположены на 5'-конец гена, тогда как энхансер, контролирующей экспрессию в щетинках, находится в интроне [7]. У мух дикого типа тело, крылья и щетинки имеют темную окраску.

В работах по изучению регуляции транскрипции у *D. melanogaster* в качестве модельной системы часто используется аллель y^2 . В аллеле y^2 между промотором и энхансерами тела и крыльев гена *yellow* встроился ретротранспозон МДГ4 (*gypsy*) [8]. В результате находящийся в составе МДГ4 инсультатор Su(Hw) блокирует активацию гена *yellow* энхансерами тела и крыльев. Таким образом, фенотип y^2 характеризуется желтой окраской тела и крыльев и одновременно темной окраской щетинок.

Супернестабильный аллель y^{+s} (рис. 1А) получен вследствие индукции P-M гибридного дисгенеза в линии, содержащей мутацию y^2 [9]. Также получены производные аллеля $y^{+s} - y^{2s1}$ и y^{2s2} , содержащие в предпромоторной области гена *yellow* дубликации района 1А хромосомы X [9, 10]. Изучение структуры аллелей y^{2s1} и y^{2s2} позволило идентифицировать в составе дублицированного фрагмента из района 1А регуляторный элемент 1А-RE, который активирует экспрессию *yellow* на большом расстоянии и является инсультатором, специфичным для гена *yellow* [10]. В представленной работе мы продолжили детальное изучение структуры аллеля y^{+s} .

Мутация y^{+s} возникла в результате внедрения химерного элемента размером 5.4 т.п.н. в положение -69 п.н. и одновременной делеции последовательности *yellow* между -146 и -70 п.н. Химерный элемент состоял из *P*-элементов размером 1.2 т.п.н., расположенных «хвост к хвосту», и заключенной между ними последовательности длиной 3030 п.н., представляющей собой дубликацию района 1А хромосомы X, находящегося в геноме дистальнее локуса *yellow* (рис. 1А) [9]. Эта дубликация включала фрагмент неизученного гена CG3777, который экспрессируется на тех же стадиях развития, что и ген *yellow*.

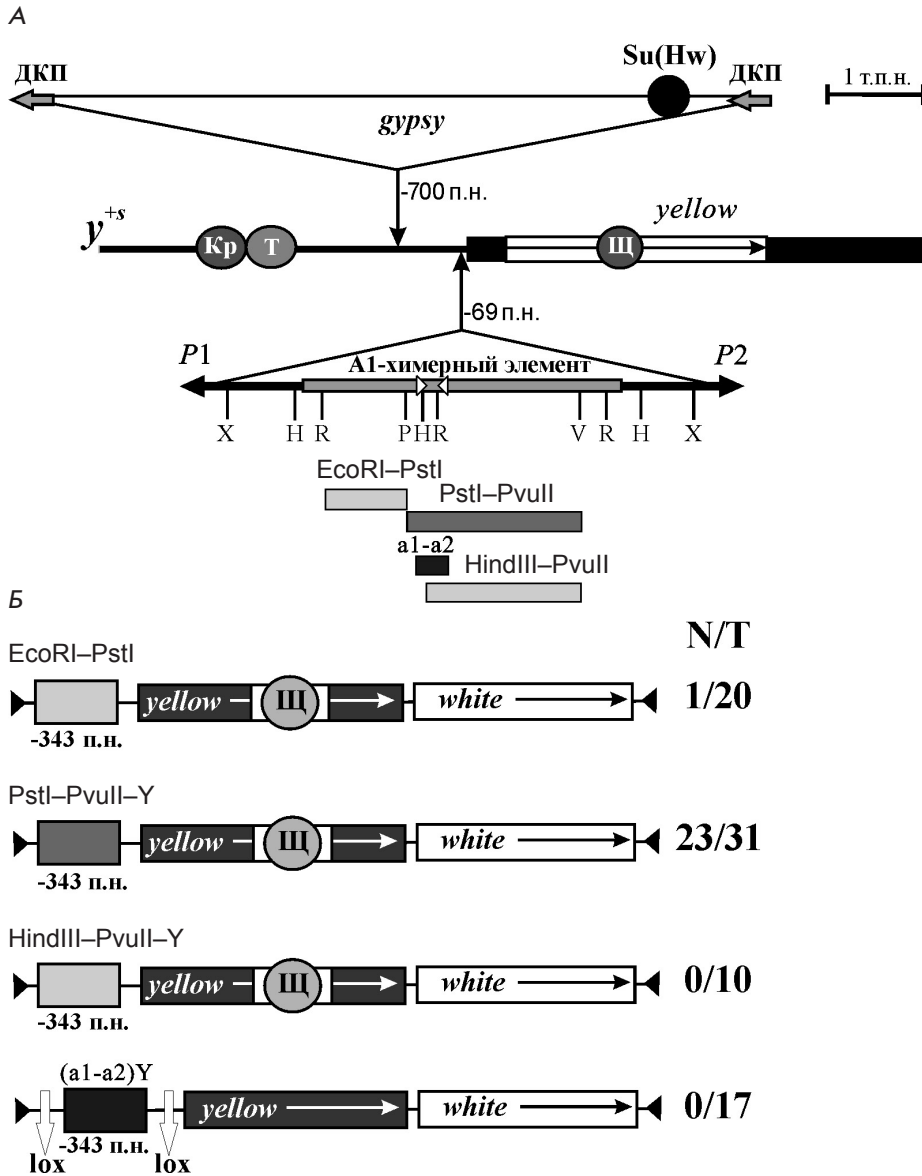


Рис. 1. Картирование нового энхансера En1A из района 1A хромосомы X. А – схематичное изображение локуса *yellow* и структуры аллеля y^{+s} . В гене *yellow* черными прямоугольниками обозначены экзоны, белым – интрон, кружками – энхансеры крыльев (Кр), тела (Т) и щетинок (Щ). Треугольниками показаны инсерции ретро-транспозона *gypsy* и химерного элемента. Длинные концевые повторы на концах ретротранспозона (ДКП) показаны серыми стрелками. Черными стрелками обозначены P-элементы и направление транскрипции гена *yellow*. Внутренняя часть химерного элемента, соответствующая последовательности гена *CG3777*, показана серым прямоугольником. Б – схематическое изображение трансгенных конструкций, включающих фрагменты химерного элемента. Направление транскрипции генов *yellow* и *white* указано стрелками. Концы P-элемента в составе вектора обозначены черными треугольниками. Белые вертикальные стрелки обозначают сайты связывания Cre-рекомбиназы *loxP*. N/T – отношение числа линий мух с темной окраской тела и крыльев к общему числу полученных трансгенных линий соответствующего генотипа

Тело и крылья мух, несущих аллель y^{+s} , имеют темную окраску, близкую по интенсивности к окраске мух дикого типа. Следовательно, при перемещении к гену *yellow* участка из района 1A хромосомы X экспрессия гена в теле и крыльях активирована, несмотря на то, что соответствующие энхансеры заблокированы инсулятором Su(Hw). При помощи трансгенных конструкций (рис. 1Б) в перемещенной последовательности ДНК нам удалось локализовать энхансер размером 1748 п.н., названный энхансер 1A (En1A).

Сначала мы протестировали два рестрикционных фрагмента, которые совместно перекрывают

большую часть дупликации из района 1A: EcoRI-PstI длиной 771 п.н. и PstI-PvuII длиной 1748 п.н. (рис. 1А). В трансгенных конструкциях EcoRI-PstI-Y и PstI-PvuII-Y эти фрагменты находились перед промотором гена *yellow* в позиции -343 п.н. (рис. 1Б). Обе конструкции не содержали энхансеров тела и крыльев. В линиях, несущих конструкцию EcoRI-PstI-Y, в 19 случаях из 20 мухи имели неокрашенные тело и крылья. В трансгенных линиях PstI-PvuII-Y фенотип мух был близок к фенотипу дикого типа в 23 из 31 полученной линии, что доказывает способность фрагмента размером 1748 п.н. функционально заменять энхансеры тела и крыльев гена *yellow*.

Трансгенная линия	Пигментация тела/крыльев				N/T
	5	4	3	2	
-890 п.н.					
YG4(Cm1A)	-	-	-	7	7
↳ +GAL4	1	5	1	-	7/7
YG4	-	-	-	7	7
↳ +GAL4	-	-	-	7	0/7
-890 п.н.					
eveYG4(Cm1A)	-	-	-	5	5
↳ +GAL4	-	4	1	-	5/5
eveYG4	-	-	-	5	5
↳ +GAL4	-	-	-	5	0/5
-890 п.н.					
ΔeveYG4(Cm1A)	-	-	-	6	6
↳ +GAL4	-	-	-	6	0/6
ΔeveYG4	-	-	-	6	6
↳ +GAL4	-	-	-	6	0/6

Рис. 2. Тестирование коммуникаторных свойств фрагмента Cm1A. Под схемами конструкций представлены результаты фенотипического анализа мух в трансгенных линиях. Обозначения; *y* – промотор гена *yellow*; *eve* – промотор гена *even skipped*; черный овал – коммуникатор Cm1A. Стрелка внутри овала указывает направление транскрипции. Символ Δ обозначает делецию последовательности гена *yellow* от -69 до -100 п.н. (TE). Пигментация тела и крыльев обозначена цифрами от 5 – темная окраска, как в диком типе, до 2 – желтая окраска, соответствующая фенотипу аллеля *y²*. Количество трансгенных линий каждого фенотипа обозначено цифрами. С помощью стрелок и надписи «+GAL4» обозначены производные, полученные в результате активации GAL4 в трансгенных линиях соответствующего генотипа. N/T – отношение линий, в которых фенотип мух изменился после вырезания фрагмента Cm1A или в результате GAL4-активации, к общему числу полученных трансгенных линий. Прочие обозначения, как на рис. 1

Следовательно, энхансер En1A локализован в пределах участка PstI–PvuII.

Для точного картирования En1A созданы две генетические конструкции, содержащие отдельные фрагменты PstI–PvuII, встроенные в положение -343 п.н. – HindIII–PvuII–Y и (a1–a2)Y (рис. 1B). Фрагмент HindIII–PvuII длиной 1511 п.н. (рис. 1A) не обладал свойствами энхансера: во всех 10 трансгенных линиях HindIII–PvuII–Y тело и крылья мух имели желтую окраску (рис. 1B). При биоинформатическом анализе структуры последовательности PstI–PvuII был выделен фрагмент размером 362 п.н., включающий повторяющиеся мотивы, которые, возможно, являются сайтами связывания регуляторных белков. Этот фрагмент ДНК был амплифицирован при помощи ПЦП с использованием праймеров a1 и a2, а затем в составе конструкции (a1–a2)Y помещен перед промотором гена *yellow* (рис. 1B) Фрагмент a1–a2 окружен сайтами узнавания рекомбиназой Cre (*loxP*-сайты), позволяющими вырезать исследуемый элемент *in vivo* [11]. Нужно отметить, что в конструкции (a1–a2)Y кДНК гена *yellow* не содержала энхансер щетинок (рис. 1B). Мы получили 17 трансгенных линий, несущих данную конструкцию. Несмотря на отсутствие энхансера щетинок, мухи всех линий имели фенотип *y²*. Вырезание последовательности a1–a2 приводило к исчезновению пигментации щетинок в 12 линиях из 15. Таким образом, в конструкции (a1–a2)Y изучаемый фрагмент 362 п.н. взаимодействовал с промотором и стимулировал экспрессию *yellow* в щетинках, но не был способен функционально заменить энхансеры тела и крыльев.

Полученные результаты позволили предположить, что энхансер En1A имеет неоднородную структуру. Одна его часть размером 362 п.н. (a1–a2), получившая название «коммуникаторной» (далее Cm1A), самостоятельно стимулирует экспрессию гена *yellow* только в щетинках, однако она необходима для стимуляции полноразмерным En1A экспрессии *yellow* в теле и крыльях. Другая часть последовательности PstI–PvuII размером 1386 п.н. способна индуцировать высокий уровень экспрессии *yellow* в теле и крыльях лишь в комбинации с коммуникаторной частью (рис. 1A,Б). Полноразмерный En1A размером 1748 п.н. активирует транскрипцию гена *yellow* во всех кутикулярных структурах. Возможно, фрагмент 1386 п.н. содержит сайты связывания активаторов транскрипции *yellow* в теле и крыльях, но их взаимодействие с промотором обеспечивают белки, связывающие последовательность Cm1A.

Для дальнейшего изучения коммуникаторных свойств элемента Cm1A мы использовали модельную систему, основанную на свойствах дрожжевого активатора GAL4. Известно, что в геноме дрозофилы

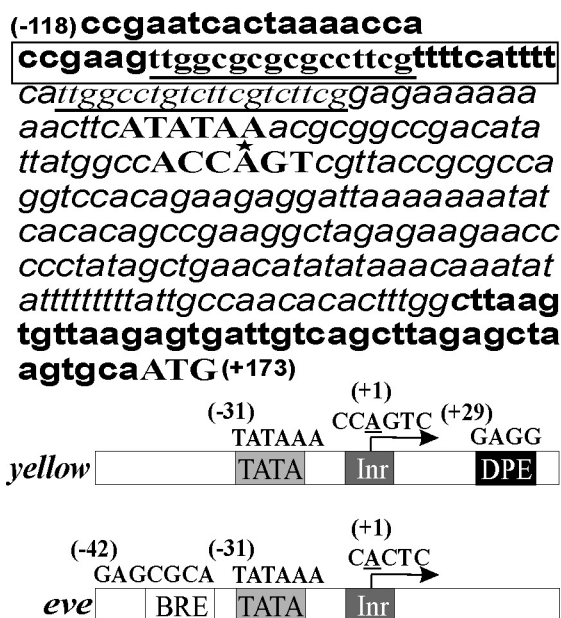


Рис. 3. Промоторные области генов *yellow* и *eve*. В верхней части рисунка показана последовательность промоторной области гена *yellow*. Промотор TATA, инициатор транскрипции и сайт начала трансляции обозначены заглавными буквами. 198 п.н., замененные в конструкциях *eveYG4(Cm1A)* и *DeveYG4(Cm1A)*, обозначены курсивом. Сайт инициации транскрипции указан звездочкой. Возможные последовательности связывания коммуникаторных белков подчеркнуты. Последовательность от -69 до -100 п.н., включающая ТЕ гена *yellow*, заключена в рамку. Цифры в скобках указывают расстояния относительно сайта инициации транскрипции. Коровые элементы промоторов *yellow* и *eve* изображены схематично. Обозначения: стрелки указывают направление транскрипции. TATA – TATA-мотив; Inr – инициатор транскрипции; DPE (downstream promoter element) – нижележащий элемент промотора; BRE (TFIIB binding factor) – элемент, связывающий транскрипционный фактор TFIIB. Последовательности коровых элементов промоторов обозначены заглавными буквами

этот активатор способен стимулировать промоторы различных генов [2]. Однако GAL4, расположенный на 3'-конце изучаемого гена, не способен активировать транскрипцию [12]. В конструкции YG4(Cm1A) сайты связывания белка GAL4 и окруженный *loxP*-сайтами потенциальный коммуникатор Cm1A были встроены на 3'-конец гена *yellow*. При этом 5'-последовательность *yellow*, содержащая энхансеры тела и крыльев (до -890 п.н.), была делетирована (рис. 2). В семи трансгенных линиях, несущих конструкцию YG4(Cm1A), мухи имели фенотип u^2 . Таким образом, в отсутствие GAL4-активации фрагмент Cm1A не способен самостоятельно активировать

транскрипцию гена *yellow* в теле и крыльях. Затем мы скрестили трансгенные линии YG4(Cm1A) с линией, экспрессирующей белок GAL4. В результате GAL4-активации тело и крылья мух во всех линиях приобрели более темную окраску (рис. 2). Делеция Cm1A приводила к снижению экспрессии *yellow* до исходного уровня. Следовательно, элемент Cm1A действительно обладает свойствами коммуникатора. В составе конструкции YG4(Cm1A) он обеспечивает стабильное дистанционное взаимодействие между GAL4-активатором и промотором гена *yellow*.

Ранее в промоторной области гена *yellow* в положении -69... -100 п.н. нами был локализован ТЕ, обеспечивающий дистанционные взаимодействия энхансеров тела и крыльев с промотором гена *yellow*, а также с гетерологичным промотором гена *eve* [2]. Мы предположили, что коммуникатор Cm1A функционально взаимодействует именно с ТЕ гена *yellow*. Для проверки этого предположения были созданы конструкции *eveYG4(Cm1A)* и *DeveYG4(Cm1A)* (рис. 2). В обеих конструкциях промотор гена *yellow* был заменен на гетерологичный промотор гена *eve* (-68... +130 п.н.) (рис. 3). Кроме того, в конструкции *DeveYG4(Cm1A)* последовательность ТЕ гена *yellow* была делетирована (рис. 2, 3). Результаты, полученные при фенотипическом анализе пяти трансгенных линий *eveYG4(Cm1A)*, были аналогичны результатам анализа линий YG4(Cm1A). Как и в предыдущем случае, коммуникатор обеспечивал GAL4-зависимую активацию транскрипции гена *yellow*. Поскольку структура промоторов *yellow* и *eve* различна (рис. 3), можно утверждать, что коровые элементы промотора не участвуют в функциональном взаимодействии с Cm1A. В шести трансгенных линиях, несущих конструкцию *DeveYG4(Cm1A)*, активация GAL4 не приводила к изменению исходного фенотипа u^2 (рис. 2). Следовательно, в отсутствие ТЕ гена *yellow* коммуникатор Cm1A не способен поддерживать дистанционное взаимодействие между активатором транскрипции и промотором гена. Вероятно, белки, связывающие коммуникаторный элемент Cm1A, способны взаимодействовать с белками, которые привлекаются на ТЕ гена *yellow*. В описанной модельной системе такое взаимодействие пространственно сближает GAL4-активатор и промотор, что делает возможным контакт между активационным комплексом, собирающимся на последовательностях GAL4, и транскрипционным комплексом промотора.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Представленные данные позволяют заключить, что новый энхансер En1A имеет модульное строение. В предыдущей работе мы доказали, что регулятор-

ная система гена *white* также включает элементы, не влияющие на транскрипцию, но обеспечивающие дистанционное энхансер-промоторное взаимодействие. В предпромоторной области и в составе энхансера глаз гена *white* присутствуют сайты связывания белка Zeste. Белок Zeste не участвует в активации транскрипции, но, связываясь со своими сайтами, позволяет энхансеру глаз активировать находящийся на значительном расстоянии промотор [5]. Результаты данной работы свидетельствуют в пользу предположения, что регуляторные области различных генов имеют модульное строение и включают в свой состав активаторные элементы, с которыми связываются транскрипционные факторы, иницирующие и поддерживающие эффективную транс-

крипцию, и элементы-коммуникаторы, с которыми связываются белки, обеспечивающие пространственное сближение энхансера и промотора. Описанные модельные системы могут использоваться для изучения структуры энхансеров и выявления последовательностей, участвующих в дистанционных взаимодействиях между регуляторными элементами генома.

Коллектив авторов благодарит Е.К. Корягину за техническое участие в работе.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (проект № 14-14-01067).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Erokhin M., Vassetzky Y., Georgiev P., Chetverina D. // *Cell Mol. Life Sci.* 2015. V. 72. № 12. P. 2361–2375.
2. Melnikova L., Kostuchenko M., Silicheva M., Georgiev P. // *Chromosoma.* 2008. V. 117. № 2. P. 137–145.
3. Calhoun V.C., Levine M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 17. P. 9878–9883.
4. Calhoun V.C., Stathopoulos A., Levine M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 26. P. 9243–9247.
5. Kostyuchenko M., Savitskaya E., Koryagina E., Melnikova L., Karakozova M., Georgiev P. // *Chromosoma.* 2009. V. 118. № 5. P. 665–674.
6. Savitskaya E., Melnikova L., Kostuchenko M., Kravchenko E., Pomerantseva E., Boikova T., Chetverina D., Parshikov A., Zobacheva P., Gracheva E., et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2006. V. 26. № 3. P. 754–761.
7. Geyer P.K., Corces V.G. // *Genes Dev.* 1987. V. 1. № 9. P. 996–1004.
8. Geyer P.K., Spana C., Corces V.G. // *EMBO J.* 1986. V. 5. № 10. P. 2657–2662.
9. Georgiev P., Tikhomirova T., Yelagin V., Belenkaya T., Gracheva E., Parshikov A., Evgen'ev M.B., Samarina O.P., Corces V.G. // *Genetics.* 1997. V. 146. № 2. P. 583–594.
10. Pomerantseva E., Biryukova I., Silicheva R., Savitskaya E., Golovnin A., Georgiev P. // *Genetics.* 2006. V. 172. № 4. P. 2283–2291.
11. Siegal M.L., Hartl D.L. // *Methods Mol. Biol.* 2000. V. 136. P. 487–495.
12. Erokhin M., Davydova A., Kyrchanova O., Parshikov A., Georgiev P., Chetverina D. // *Development.* 2011. V. 138. № 18. P. 4097–4106.