

ВЛИЯНИЕ ТРАНСКРИПЦИИ НА АКТИВНОСТЬ ЭНХАНСЕРА ГЕНА *white*, ИНТЕГРИРОВАННОГО В ИНТРОН

М. М. Ерохин, А. В. Михайлова,
академик РАН П. Г. Георгиев, Д. А. Четверина*

Поступило 14.09.2018 г.

Установили, что у *Drosophila melanogaster* проходящая транскрипция подавляет активность энхансера гена *white*, интегрированного в интрон. Фланкирование трансгена терминаторами транскрипции SV40 полностью снимает ингибирующее действие проходящей транскрипции.

Ключевые слова: регуляция транскрипции, ДНК-регуляторные элементы, энхансеры, проходящая транскрипция, трансгенные конструкции, коровый промотор, сайленсеры, инсуляторы.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524844495-497>

Геном многоклеточных эукариот содержит несколько типов ДНК-регуляторных элементов. Среди них выделяют коровый промотор, энхансеры, сайленсеры и инсуляторы [1]. Энхансеры являются элементами, усиливающими транскрипцию, иницируемую коровым промотором [1–5]. Обычно они представляют собой участки ДНК длиной несколько сотен п.н., содержащие сайты связывания транскрипционных активаторов. Энхансеры могут располагаться на разном удалении от промотора и располагаться как в межгенных областях, так и непосредственно перед промоторами или в интронах генов. Предполагается, что большая роль в регуляции активности энхансеров принадлежит некодирующим РНК. Имеются примеры как активирующего, так и ингибирующего действия некодирующих РНК на транскрипцию белок-кодирующих генов [4]. Ранее [6, 7] в нашей лаборатории было установлено, что транскрипция, запускаемая с минимального промотора гена *hsp70* и проходящая через последовательность энхансеров генов *white* и *yellow*, подавляет их активность. В проанализированных конструкциях энхансеры располагались в межгенной транскрибируемой области. При этом была отмечена прямая зависимость силы ингибирования энхансеров от уровня проходящей транскрипции [6, 7]. Нами была выдвинута гипотеза, согласно которой активность интрон-расположенных энхансеров может регулироваться по типу отрицательной обратной связи: с увеличением уровня транскрипции

с промотора увеличивается количество проходящих через энхансер транскриптов, что ингибирует его активность. Также ранее нами было продемонстрировано [8], что фланкирование трансгена терминаторами транскрипции SV40 стабилизирует работу энхансеров. Однако конкретный механизм такой стабилизации не известен.

В представленной работе мы изучили влияние транскрипции на активность глазного энхансера гена *white Drosophila melanogaster*, интегрированного в интрон, а также исследовали способность терминатора SV40 подавлять негативный эффект проходящей транскрипции.

Для изучения эффектов проходящей транскрипции использовали разработанную ранее систему [6, 7], основанную на создании и анализе трансгенных конструкций. В качестве репортёра использовали ген *white*, отвечающий за окраску глаз. Экспрессия гена *white* в глазах регулируется тканеспецифическим глазным энхансером. При нормальном функционировании этого энхансера наблюдается окраска глаз от красной до коричневой. При отсутствии энхансера или полном подавлении его активности цвет глаз колеблется от светло-жёлтого до оранжевого в зависимости от места встраивания конструкции.

На первом этапе работы мы протестировали способность проходящей транскрипции блокировать действие энхансера гена *white*, расположенного в интроне. Для этого получили конструкцию En-intron, в которой глазной энхансер гена *white* был вставлен в интрон гена *yellow* на расстоянии 3,6 т.п.н. от промотора гена *white* (рис. 1). Перед промотором гена *yellow* вставили пять сайтов связывания дрожжевого белка-активатора GAL4 для

Институт биологии гена
Российской Академии наук, Москва
* E-mail: daria.chetverina@gmail.com

индукции повышенного уровня проходящей через энхансер транскрипции. Промотор гена *yellow* фланкировали сайтами *frt*, а энхансер гена *white* — сайтами *lox* для возможности удаления данных элементов из системы. На 5'-конце конструкции располагали терминатор SV40 для предотвращения возможной транскрипции, проходящей через трансген в случае встраивания конструкции в транскрибируемый участок генома.

В результате трансформации конструкции En-intron в геном *Drosophila melanogaster* получили 11 независимых трансгенных линий (рис. 1).

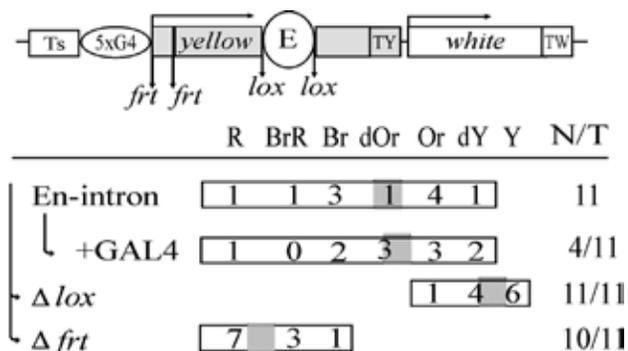


Рис. 1. Фенотипический анализ трансгенных линий мух, несущих конструкцию En-intron. Сверху представлена схема трансгенной конструкции. Глазной энхансер гена *white* (En) вставлен в интрон гена *yellow*. Стрелками над генами *yellow* и *white* обозначено направление транскрипции. 5xG4 — 5 сайтов связывания белка-активатора GAL4, Ts — терминатор транскрипции SV40, TY — терминатор транскрипции гена *yellow*, TW — терминатор транскрипции гена *white*. Под схемой суммированы результаты фенотипического анализа трансгенных линий мух. Градация пигментации глаз, зависящая от уровня экспрессии гена *white*: R — красный (максимальная транскрипция); BrR — темно-коричневый; Br — коричневый; dOr — темно-оранжевый; Or — оранжевый; dY — темно-жёлтый; Y — жёлтый; pY — светло-жёлтый; W — белый (отсутствие транскрипции). Для конструкции представлен только диапазон градаций, в котором находились фенотипы мух в процессе анализа. Под схемой суммированы результаты по анализу фенотипов трансгенных линий мух, несущих данную конструкцию и её производные. "+GAL4" — результат скрещивания трансгенных линий мух с линией, экспрессирующей белок-активатор дрожжей GAL4. Δlox — делеция глазного энхансера гена *white*. Δfrt — делеция промотора гена *yellow*. Цифры в строках — число линий с соответствующей пигментацией. N/T — отношение числа линий, в которых наблюдалось изменение (N) пигментации при скрещивании с линией мух, экспрессирующей GAL4-активатор, или при удалении исследуемого элемента, к общему числу проанализированных (T) линий. Серым курсором на цифровой панели указано среднее значение фенотипов в проанализированных линиях мух. Все фенотипы анализировали в гетерозиготных по конструкции мухах.

В большинстве линий цвет глаз колебался от темно-оранжевого до темно-жёлтого, что свидетельствовало об ингибировании действия энхансера гена *white* проходящей транскрипцией, инициируемой с промотора гена *yellow* даже в отсутствие его стимуляции GAL4. Действительно, удаление промотора гена *yellow* (Δfrt) из системы привело к резкому усилению окраски глаз в 10 из 11 протестированных линиях. Введение активатора GAL4 в систему усилило ингибирование глазного энхансера в четырёх линиях. Таким образом, проходящая транскрипция ингибировала действие глазного энхансера, расположенного в интроне гена *yellow*. Делеция энхансера гена *white* (Δlox) привела к дополнительному снижению пигментации глаз, что свидетельствовало о том, что транскрипция через энхансер в данной системе не приводит к его полной инактивации, а лишь снижает его активность.

На следующем этапе мы протестировали влияние добавления терминатора транскрипции SV40 с 3'-конца конструкции в используемой модельной системе. Для этого получили аналогичную вышеописанной конструкцию En-intron-SV40, в которой терминаторы SV40 были расположены с обеих сторон от трансгена, фланкируя его (рис. 2). В результате трансформации эмбрионов мы получили четыре независимые трансгенные линии. Цвет глаз мух во всех протестированных линиях был красным, что свидетельствовало о способности энхансера гена *white* эффективно стимулировать промотор. Удаление промотора гена *yellow* (Δfrt) не привело к изменению фенотипов трансгенных линий. Более того, стимуляция повышенного уровня проходящей транскрипции при введении активатора GAL4 также не привела к ингибированию действия энхансера ни в одной из протестированных линий. Таким образом, фланкирование трансгена терминаторами транскрипции

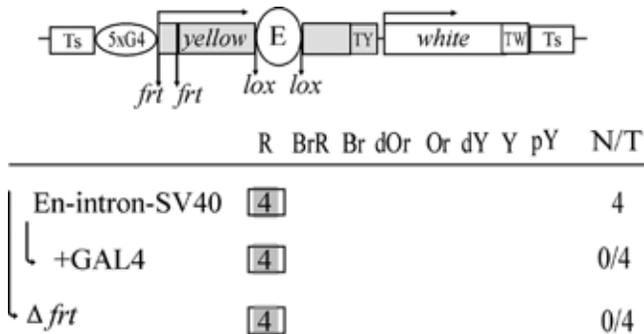


Рис. 2. Фенотипический анализ трансгенных линий мух, несущих конструкцию En-intron-SV40. С 3'-стороны от элементов конструкции встроены дополнительный терминатор SV40 (Ts). Обозначения как на рис. 1.

препятствует ингибирующему действию проходящей транскрипции на работу энхансера гена *white*.

Итак, в настоящей работе мы установили ингибирующее влияние проходящей транскрипции на активность глазного энхансера гена *white*, расположенного в интроне. Фланкирование трансгена терминаторами SV40 отменяло ингибирующий эффект проходящей транскрипции. Механизм такой стабилизации действия энхансера не вполне ясен. Мы предполагаем, что терминатор транскрипции с 3'-конца от функциональных элементов трансгенной системы блокирует транскрипцию, которая обеспечивает восприимчивость энхансера гена *white* к проходящей транскрипции. Альтернативно, с ДНК-последовательностью терминатора SV40 могут связываться неизвестные пока транскрипционные факторы, которые стабилизируют активность энхансера в системе, обеспечивая устойчивость энхансера к проходящей через него транскрипции. Для ответа на данные вопросы требуются дополнительные исследования.

В работе использовали инфраструктуру Центра коллективного пользования Института биологии гена Российской Академии наук "Биология живой клетки и биомедицинские нанотранспортёры лекарств".

Источник финансирования. Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда 18-74-10091.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Levine M., Cattoglio C., Tjian R.* // Cell. 2014. V. 157. № 1. P. 13–25.
2. *Buecker C., Wysocka J.* // Trends Genetics. TIG. 2012. V. 28. № 6. P. 276–284.
3. *Bulger M., Goudine M.* // Cell. 2011. V. 144. № 3. P. 327–339.
4. *Erokhin M., Vassetzky Y., Georgiev P., Chetverina D.* // Cell. and Mol. Life Sci. CMLS. 2015. V. 72. № 12. P. 2361–2375.
5. *Rickels R., Shilatifard A.* // Trends Cell Biol. 2018. V. 28. № 8. P. 608–630.
6. *Erokhin M., Davydova A., Parshikov A., Studitsky V.M., Georgiev P., Chetverina D.* // Epigenetics & Chromatin. 2013. V. 6. № 1. P. 31.
7. *Ерохин М.М., Давыдова А.И., Ломаев Д.В., Георгиев П.Г., Четверина Д.А.* // Генетика. 2016. Т. 52. № 1. С. 37–46.
8. *Четверина Д.А., Елизарьев П.В., Георгиев П.Г., Ерохин М.М.* // ДАН. 2015. Т. 463. № 5. С. 611–614.

EFFECT OF TRANSCRIPTION ON THE WHITE GENE ENHANCER INTEGRATED INTO THE INTRON

M. M. Erokhin, A. V. Mikhailova,
Academician of the RAS P. G. Georgiev, D. A. Chetverina

Received September 14, 2018

We demonstrate that passing-through transcription suppresses the activity of the *white* gene enhancer integrated into the intron. At the same time, the SV40 transcription terminators flanking the transgene can completely remove the inhibitory effect of transcription.

Keywords: regulation of transcription, DNA regulatory elements, enhancers, passing-through, transgene constructs, core promoter, silencers, insulators.