

УДК 577.218

СОЗДАНИЕ РЕПОРТЁРНОЙ СИСТЕМЫ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ ЭКДИЗОНОВОГО ОТВЕТА

М. Ю. Мазина, А. Н. Краснов, академик РАН П. Г. Георгиев, Н. Е. Воробьева*

Поступило 26.11.2018 г.

Для изучения механизмов регуляции транскрипции генов распространённым экспериментальным подходом является использование искусственных химерных конструкций, несущих в своём составе интересующие регуляторные элементы генома. В настоящей работе мы описываем создание и характеристику подобной генетической конструкции, дающей возможность исследовать регуляцию транскрипции ранне-позднего гена экдизонового каскада *hr4*. При помощи полногеномных экспериментов мы вычленили основной регуляторный район данного гена, который был успешно использован для создания химерной репортёрной конструкции, экспрессирующей флуоресцентный белок под воздействием экдизонового гормона. Данная конструкция может быть использована для исследования механизмов активации экдизонового ответа в культуре клеток и в тканях на разных стадиях развития дрозофилы.

Ключевые слова: экдизон, дрозофила, гормон, транскрипция.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524854515-518>

20-гидроксидекдизон является основным гормоном-регулятором таких стадий развития дрозофилы, как формирование личинки, процессы её линьки и переход в стадию метаморфоза. Механизм влияния 20-гидроксидекдизона на гены до сих пор остаётся недостаточно исследованным. Паттерны экспрессии генов в процессе клеточного ответа на действие этого гормона различаются для разных тканей организма и для разных стадий онтогенеза. Соответственно, и вовлечённые в процесс экдизонового ответа регуляторы транскрипции являются специфичными для клеток разного типа [1].

Основное направление исследований нашей научной группы — выявление новых участников экдизонового ответа *Drosophila melanogaster*, а также установление их точной молекулярной роли в данном процессе [2]. Самым распространённым в настоящее время методом исследования регуляторов транскрипции является иммунопреципитация хроматина (ChIP) антителами, специфичными к различным транскрипционным белкам. Недавно [3] данный метод был применён нами для исследования участия 20 регуляторов транскрипции дрозофилы в процессе активации экдизонзависимых генов в клетках дрозофилы S2 эмбрионального происхождения. К сожалению, прямых методов, которые могли бы подтвердить или дополнить данные, по-

лученные нами в ходе ChIP-экспериментов, в настоящее время не существует. Для подтверждения участия транскрипционных регуляторов в активации транскрипции методами *in situ* (например, выявления факта рекрутирования исследуемого белка в локус трансгена) необходимо использование искусственных генетических конструкций. Для создания генетической конструкции, которая бы отвечала требованиям наших исследований (изучение роли регуляторов в экдизонзависимой транскрипции), нам потребовалось выявить и охарактеризовать набор геномных регуляторных элементов, управляющих экдизонзависимым ответом. Основным экспериментальным подходом, используемым исследователями для изучения экдизонзависимой регуляции транскрипции в искусственных конструкциях, является введение в них искусственно синтезированных сайтов связывания экдизонового рецептора. Такой подход позволяет достичь экдизонзависимой активации транскрипции трансгена не только в клетках дрозофилы, но и в клетках млекопитающих [4]. Однако этот экспериментальный подход неприменим для наших целей — исследования механизма активации генов экдизонового каскада. Действительно, активация транскрипции 20-Н-экдизоном в эндогенной системе нуждается в участии дополнительных, зачастую тканеспецифических регуляторных белков [5]. Поэтому для создания экдизонзависимой репортёрной системы мы решили использовать эндогенный участок ранне-позднего гена экдизонового каскада *hr4*, включающий в себя про-

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

мотор данного гена, а также экдизонзависимые энхансеры, что и составило предмет настоящего сообщения.

Ранне-поздний ген *hr4* экдизонового каскада занимает сравнительно протяжённый для генов дрозофилы участок генома — около 60 т.п.н. Однако подавляющая часть экдизонзависимых регуляторных элементов данного гена сосредоточена в районе первого длинного интрона. Такой вывод мы сделали на основании экспериментальных данных (рис. 1), картирующих распределение экдизонзависимых энхансеров в геноме дрозофилы методом STARR-Seq в клетках S2 эмбрионального происхождения, а также в клетках яичников OSC (ovarian somatic cells) [5]. На рисунке видно, что в первом интроне сосредоточены 4 сильных экдизонзависимых энхансера, функционирующих независимо от типа клеток (отмечены знаком “#”), а также экдизонзависимый энхансер, специфичный для клеток эмбрионального

происхождения (отмечен звёздочкой “*”). Ранее нашей группой был выполнен полногеномный анализ связывания основного функционального маркера энхансеров, белка CBP/p300, до и через 1 ч после обработки клеток S2 20-гидрокси-экдизоном. Результаты данного анализа ChIP-Seq для локуса гена *hr4* представлены на рис. 1. Они наглядно демонстрируют, что взаимодействие белка CBP/p300 со всеми энхансерами, расположенными в первом длинном интроне гена *hr4*, значительно усиливается. Этот экспериментальный факт подтверждает экдизонзависимое функционирование данных регуляторных элементов. Проведённый нами полногеномный анализ связывания субъединицы Rpb3 РНК-полимеразы II до и после обработки клеток 20-гидрокси-экдизоном выявил наличие у гена *hr4* одного, преимущественного, старта транскрипции, соответствующего старту, имеющемуся в базах данных. Таким образом, на основании имеющихся ли-

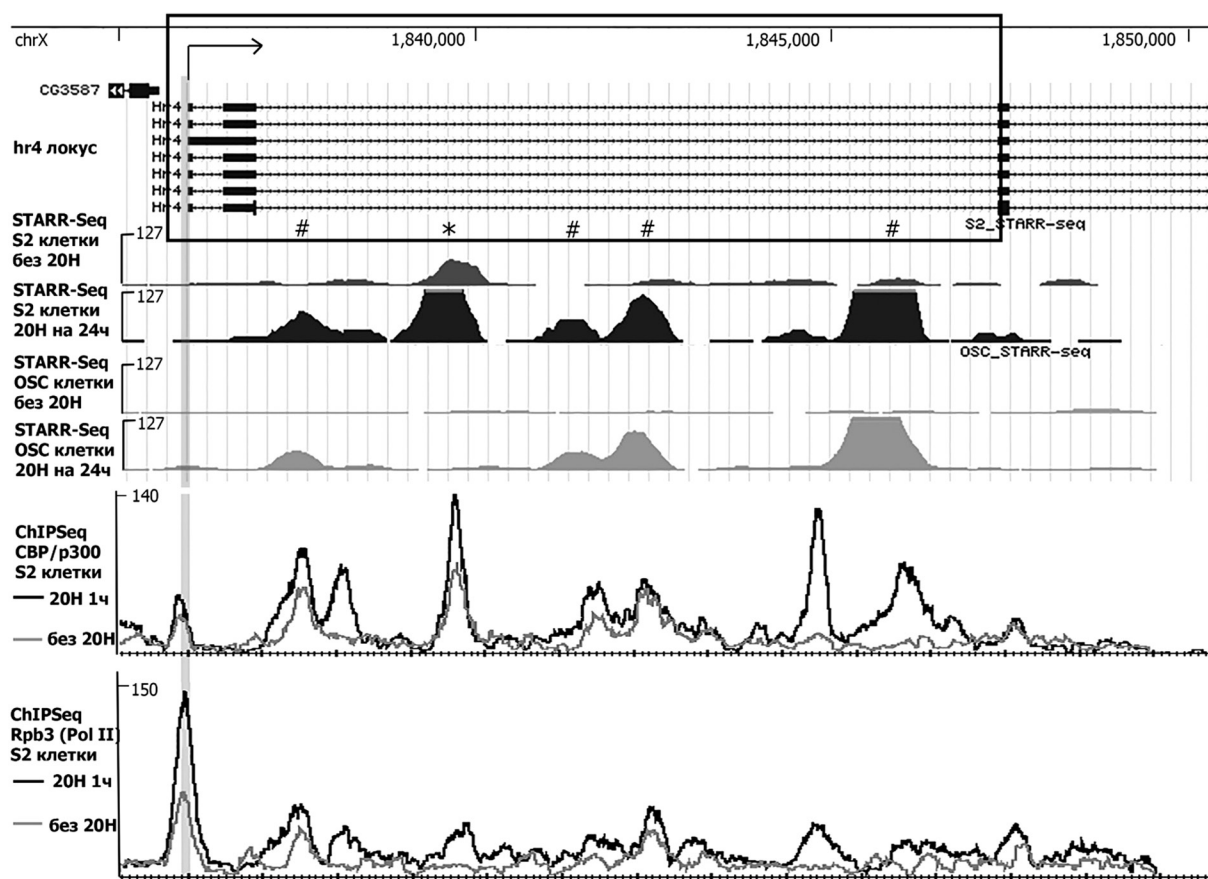


Рис. 1. Схематическое изображение участка генома *Drosophila melanogaster*, включающего в себя область, окружающую промотор гена *hr4* (участок, маркированный прямоугольником, был использован для создания репортёрной конструкции). Над схемой гена приведены координаты X-хромосомы генома дрозофилы по версии dm3. В нижней панели приведены данные экспериментов STARR-Seq для S2 и OSC клеток до и после обработки их 20-Н-экдизоном в течение 24 ч [5], а также данные ChIP-Seq о связывании белков CBP/p300 и Rpb3 (до и после индукции S2 клеток 20-гидрокси-экдизоном в течение 1 ч). Вертикальная ось для данных экспериментов ChIP-Seq и STARR-Seq отражает количество ридов.

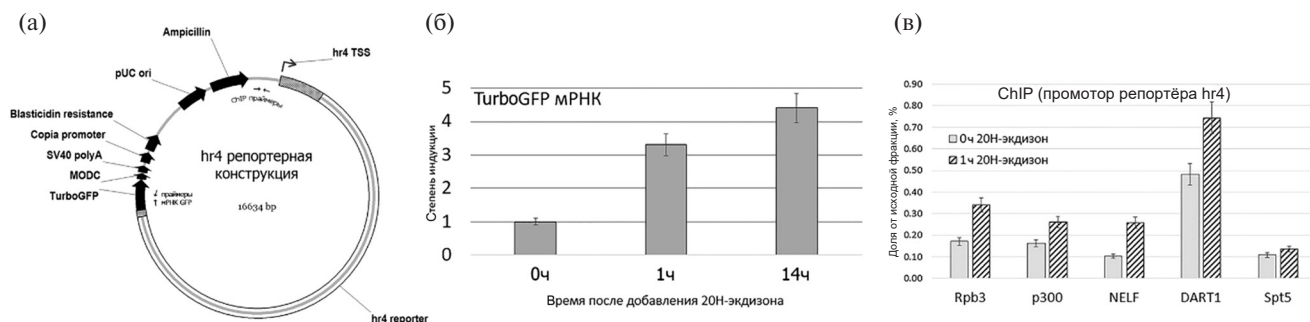


Рис. 2. Создание и проверка эффективности работы репортёрной системы для изучения транскрипции экдизоновых генов. а — схема репортёрной конструкции, несущей регуляторную область гена *hr4* и маркёрный белок TurboGFP. На схеме стрелками маркированы участки, используемые для аналитической амплификации с целью оценки уровня экспрессии и уровня связывания регуляторных белков. б — уровень транскрипции мРНК, кодирующей репортёр TurboGFP, до (0 ч) и после (1 и 14 ч) добавления 20-гидрокси-экдизона в культуральную среду клеточной линии S2, несущей стабильно интегрированный репортёр *hr4*. Здесь и во фрагменте (в) $M \pm m$, $n = 5$. в — уровень связывания белков Rpb3, CBP/p300, NELF, DART1 и Spt5 с промоторной областью репортёрной системы *hr4* до и через 1 ч после обработки клеток 20-гидрокси-экдизоном.

тературных данных и результатов наших экспериментов мы выделили участок локуса *hr4*, потенциально перспективный для использования его в качестве экдизонзависимого регулятора в репортёрных конструкциях. Данный участок указан нами на рис. 1 в виде прямоугольника, который берёт начало на 500 п.н. выше сайта старта транскрипции *hr4* гена, включает в себя весь первый длинный интрон и заканчивается в коротком 2(3) экзоне.

Для получения экдизонзависимой репортёрной системы мы клонировали (рис. 2а) регуляторный участок гена *hr4* в единой рамке считывания с флуоресцентным белком TurboGFP, несущим на своём С-конце сигнал быстрой деградации [6]. Созданная нами репортёрная система обладала геном устойчивости к бластицидину, регулируемым сильным промотором *copia*. Устойчивость к эукариотическому антибиотику бластицидину даёт возможность получения линий клеток дрозофилы, несущих репортёрную систему в состоянии интеграции в геном.

Для проверки эффективности функционирования созданной репортёрной системы мы получили стабильные линии клеток, несущие в своём геноме репортёрную конструкцию *hr4*. Клетки этих линий мы обработали 20-гидрокси-экдизоном в концентрации 0,3 мкМ в течение 1 и 14 ч. До и после индукции транскрипции 20-гидрокси-экдизоном в клетках стабильной линии мы измерили уровень транскрипции репортёра GFP (рис. 2б). Мы обнаружили, что используемый нами регуляторный участок гена *hr4* действительно оказался способным поддерживать экдизонзависимую экспрессию трансгена. Активация транскрипции происходила достаточно быстро — уже через 1 ч после обработки кле-

ток экдизоном мы наблюдали существенную степень активации транскрипции.

Основной целью создания нами экдизонзависимого репортёра было его использование для исследования *in situ* молекулярных механизмов активации гена *hr4* путём наблюдения за рекрутированием регуляторных белков в трансгенный локус, несущий репортёрную систему. Поэтому было важно установить соответствие молекулярного механизма активации транскрипции репортёрной системы её эндогенному аналогу (локусу гена *hr4*). Для проверки этого мы провели эксперименты по иммунопреципитации хроматина антителами против транскрипционных регуляторов, для которых мы ранее установили факт привлечения в локус гена *hr4* в процессе его активации [3]. Мы обнаружили, что в полном соответствии с данными, полученными нами ранее на модели эндогенного локуса *hr4*, РНК-полимераза II, а также регуляторы CBP/p300, NELF и DART1 привлекалась в область промотора *hr4*, в то время как уровень связывания регулятора Spt5 остался неизменным (рис. 2в). Данный эксперимент дал основания полагать, что созданная нами репортёрная система действительно воспроизводит экдизонзависимый механизм активации транскрипции, присущий гену *hr4*.

Таким образом, созданная нами репортёрная система является удобной и перспективной моделью для дальнейшего исследования молекулярного механизма экдизонзависимой активации транскрипции.

Источник финансирования. Работа поддержана грантом Российского научного фонда 18–14–00219.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mitchell N., Cranna N., Richardson H., Quinn L. // *Development*. 2008. V. 135. P. 2707–2716.
2. Krasnov A.N., Mazina M.Y., Nikolenko J.V., Vorobyeva N.E. // *Cell Biosci*. 2016. V. 6. P. 15.
3. Mazina M.Y., Kovalenko E.V., Derevyanko P.K., Nikolenko J.V., Krasnov A.N., Vorobyeva N.E. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2018. V. 1861. P. 178–189.
4. Antoniewski C., Laval M., Lepesant J.-A. // *Insect Biochem. Mol.* 1993. V. 23 P. 105–114.
5. Shlyueva D., Stelzer C., Gerlach D., Yáñez-Cuna J.O., Rath M., Boryń Ł.M., Arnold C.D., Stark A. // *Mol. Cell*. 2014. V. 54. P. 180–192.
6. Li X., Zhao X., Fang Y., Jiang X., Duong T., Fan C., Huang C.C., Kain S.R. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 34970–34975.

THE DEVELOPMENT OF REPORTER SYSTEM FOR THE INVESTIGATION OF MOLECULAR MECHANISMS OF ECDYSONE RESPONSE

M. Yu. Mazina, A. N. Krasnov, Academician of the RAS P. G. Georgiev, N. E. Vorobyeva

Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Received November 26, 2018

To study the mechanisms of transcriptional regulation, a convenient experimental approach is to use the artificial chimeric constructs, carrying the regulatory elements of interest. In the present work, we describe the creation and characterization of a novel genetic construct, which makes possible to study the transcriptional regulation of the early-late gene of the ecdysone cascade. Using the data of genome-wide experiments, we have isolated the main regulatory region of the *hr4* gene, which was successfully used to create a chimeric reporter construct expressing a fluorescent protein upon the treatment with the ecdysone hormone. This reporter system can be used to study the mechanisms of the ecdysone response, both in cell culture and in tissues, at various stages of the *Drosophila* development.

Keywords: ecdysone, *drosophila*, hormone, transcription.