

УДК 336.72

**Федосеева Дарья Михайловна**

*кандидат биологических наук, младший научный сотрудник  
Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН*

**Чуриков Николай Андреевич**

*доктор биологических наук, профессор,  
Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН*

**ВЛИЯНИЕ ЭНХАНСЕРА *SOR1A* И ИНСУЛЯТОРА *GURPSY* НА  
СИНТЕЗ ЭРНК, МОДИФИКАЦИИ ХРОМАТИНА И СВЯЗЫВАНИЕ  
ИНСУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ ВТРАНСФЕЦИРОВАННЫХ  
ГЕНЕТИЧЕСКИХ КОНСТРУКЦИЯХ**

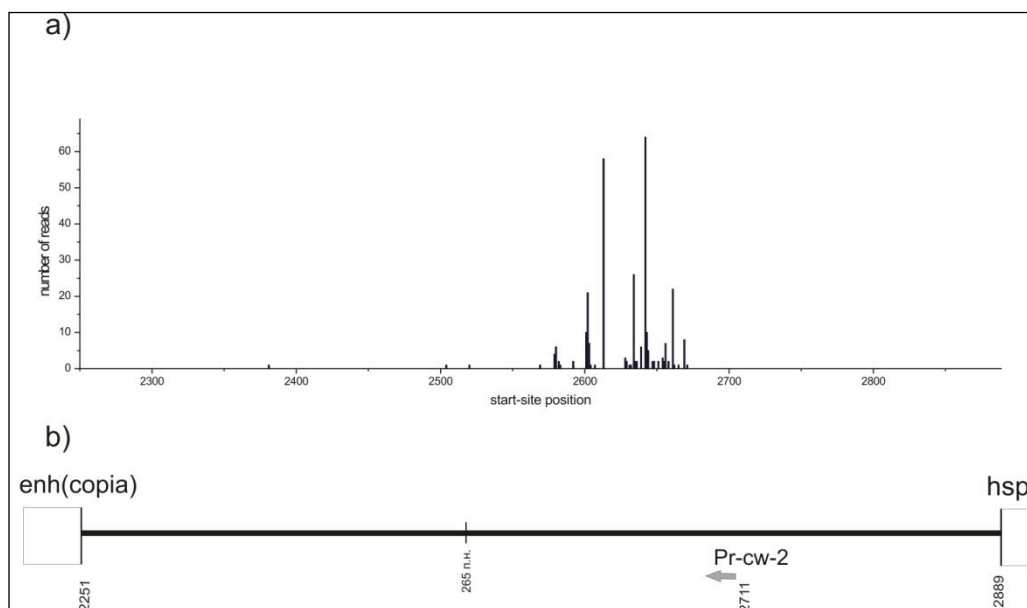
*Аннотация.* Энхансеры и инсуляторы являются одними из ключевых регуляторов экспрессии генов в геноме. Тем не менее, не смотря на многочисленные исследования, механизмы обеспечивающие работу этих регуляторных элементов до конца не изучены. Мы проанализировали отдельные эффекты, которые оказывает энхансер и инсулятор из мобильных элементов *sor1a* и *gypsy* соответственно с использованием трансффицированных генетических конструкций. Созданная нами система конструкций исключает влияние геномного окружения. Мы обнаружили синтез эРНК, длиной от 350-1050 п.н. а также наличие специфических меток хроматина  $3K4me3$   $H3K418ac$  в регионе, удаленном от энхансера на 300 п.н. Введение в конструкцию инсулятора между энхансером и промотором подавляет эти эффекты. Также мы обнаружили связывание *dCTCF* с энхансером и инсулятором *gypsy*. Мы предполагаем, что один инсулятор может взаимодействовать с энхансером, тогда как два инсулятора преимущественно взаимодействуют друг с другом. Наши данные подтверждают гипотезу о существовании петель хроматина, формируемых данными регуляторными элементами.

**Ключевые слова:** *Регуляция экспрессии генов, энхансеры, инсуляторы, энхансерные РНК, модификации хроматина.*

Первостепенная задача современной науки - изучение механизмов регуляции экспрессии генов. На данный момент эта область науки активно изучается, однако многие аспекты данной области до конца не изучены. Одним из важных вопросов в процессах генной регуляции являются механизмы работы регуляторных элементов генома.

Что нам известно? С уверенностью можно сказать лишь то, что в большинстве своем механизмы функционирования энхансеров и инсуляторов построены на эпигенетических процессах. Этот вывод был сделан на основе исследований механизмов работы регуляторных элементов генома. Для решения этой задачи мы создали генетические конструкции, включающие в себя энхансер *coria* мобильного элемента *coria*; и конструкции, содержащие 1-2 инсулятора *gypsy* (в позиции «до» и «после» репортерного гена). Функционал регуляторных элементов был экспериментально проверен с помощью ко-трансфекции.

На первом этапе работы проведено исследование стартов транскрипции эРНК (TSS эРНК) с использованием метода 5'RACE. После него мы проанализировали PCR-продукты путем мультиплексного однонаправленного глубокого секвенирования на платформе 454. В итоге получено 2895 чтений. Максимум TSS находился в области, удаленной от энхансера на 265 п.н. (рис.1).



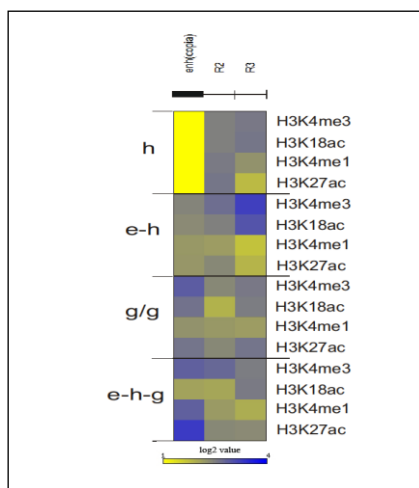
**Рис. 1. Распределение стартов транскрипции на основе мультиплексного однонаправленного глубокого секвенирования на платформе 454. а) Распределение старт-сайтов. По оси X указаны координаты по исходному вектору pGL3-enhancer (Promega, США). По оси Y- количество чтений. б) Схема конструкции e-h. Стрелкой указан праймер pr-cw-2, использованный для наработки PCR-продукта при 5'-RACE**

Обнаружение активной транскрипции энхансерных РНК в области R3 указывает на открытую и активную конфигурацию хроматина в этой области.

Для подтверждения данной гипотезы рассмотрим модификации хроматина H3K4me1 и H3K27ac, которые принято ассоциировать с активными энхансерами [1], и модификации H3K4me3 и H3K18ac, ассоциированные с активной транскрипцией [2] в различных районах генетических конструкций. Достоинством разработанной системы является ее независимость от окружающего геномного контекста. С этой целью мы провели опыты ChIP с антителами к выбранным модифицированным гистонам.

Фрагменты ДНК после иммунопреципитации анализировались посредством количественной PCR [3] с праймерами к трем районам генетических конструкций – области энхансера (R1), области с минимальным количеством TSS эРНК (R2) и области с максимумом TSS

эРНК (R3). Анализируя соответствующий самому энхансеру район R1, мы задействовали минус-праймер, комплементарный последовательности вектора, что позволило следить за областью энхансера не в его геномных копиях, а лишь в самих конструкциях.



**Рис. 2. Опыты по иммунопреципитации хроматина с помощью антител к модификациям гистона H3 (H3K4me3, H3K4me1, H3K18ac и H3K27ac) в исследуемых областях конструкций. Цветная шкала показывает log<sub>2</sub> значения интенсивности специфических модификаций гистонов в указанных районах конструкций**

В ходе экспериментов был обнаружен ощутимый рост уровня H3K4me3 и H3K18ac в конструкции e-h в направлении от энхансера к области R3, в области, где было обнаружено основное количество TSS (рис.2). Число этих меток значительно падает после введения инсулятора. Это может означать, что инсулятор gypsy действует как антагонист энхансера в данной области. К тому же, инсулятор вызывает повышение уровня H3K27ac, H3K4me1, and H3K4me3 на энхансере и рост уровня H3K27ac в области R3. Как правило, при проведении полногеномных исследований метка H3K27ac связана с активными энхансерами.

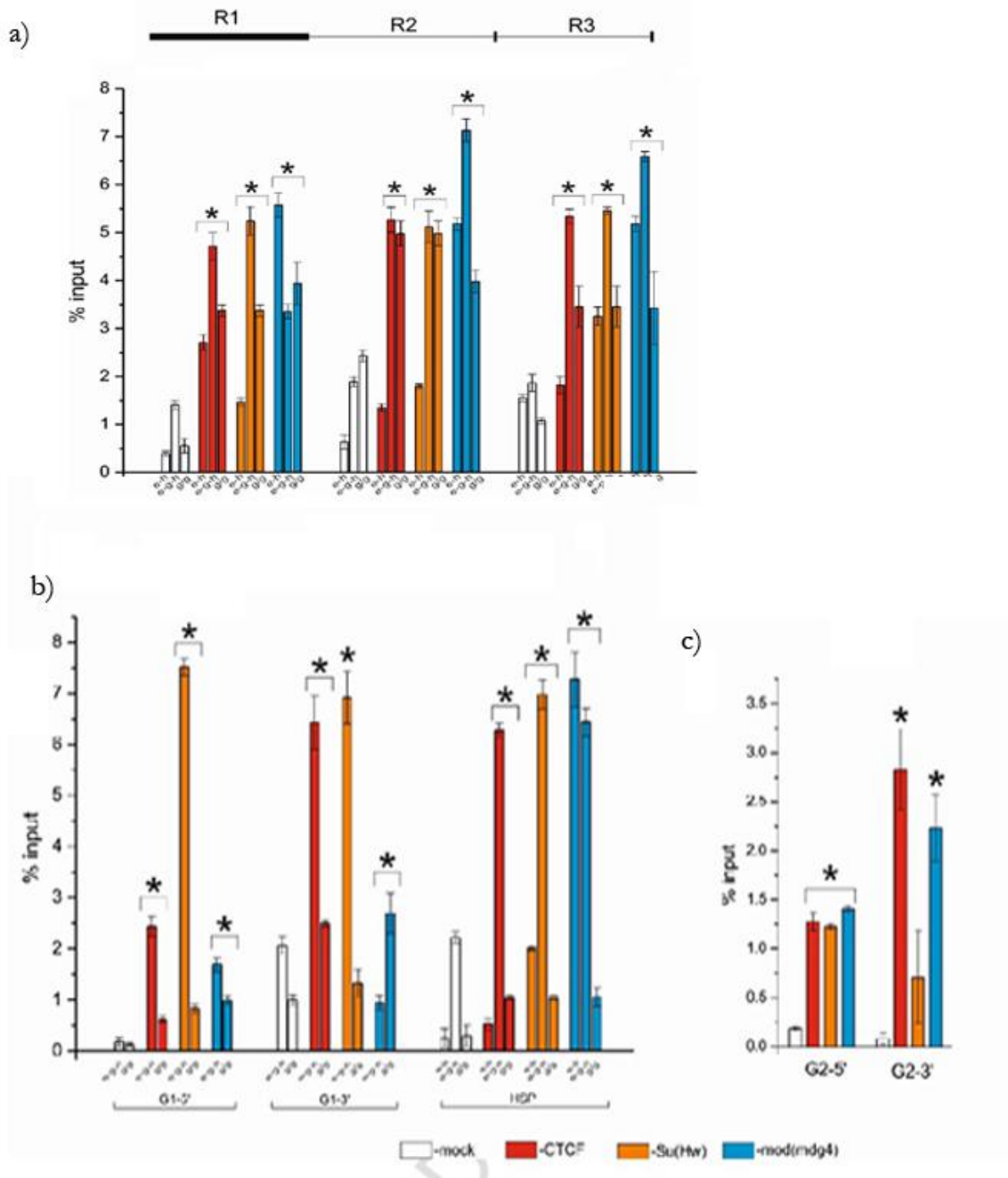
Аналогичная ситуация наблюдается в модели e-h, хотя введение инсулятора в g/g и e-h-g ведет к заметному росту ее уровня на энхансере. Возможно, эта модификация хроматина имеет отношение к энхансерам, чья деятельность подавляется активными инсуляторами.

Не следует забывать о том, что одна из ключевых задач инсуляторов – это блокирование реакции между энхансером и промотором. Впрочем, недавние опыты показали, что инсуляторы всего лишь управляют взаимодействием, а не ингибируют его [4]. Сам механизм обеспечения специфичности и стабильности этого процесса пока еще не изучен [5].

Изучение механизмов работы инсуляторов потребовало исследования связывания в разных частях используемых конструкций трех инсуляторных белков: Su(Hw) и mod2.2, входящих в состав инсулятора *gypsy*, а также белка dCTCF. В ходе опытов было обнаружено, что все белки с разной интенсивностью связываются в районе энхансера в отсутствие инсулятора *gypsy* (конструкция e-h). Связывание mod2.2 (рис. 3а) было особенно заметно (в том числе, в районе R2, прилежащем к энхансеру).

Впрочем, это едва ли говорит о том, что антитела к Su(Hw) или к dCTCF менее активны. Ярко выраженные сигналы при ChIP-PCR обнаруживались и при манипуляциях с этими антителами. Связывание инсуляторных белков Su(Hw), mod2.2 и dCTCF не только с инсулятором, но и с энхансером *coria*, обнаруженное нами в ходе иммунопреципитации хроматина трансфецированных генетических конструкций, тоже говорит об их участии в функционировании данного энхансера.

Связывание белков mod2.2 и dCTCF с энхансером резко подавляется введением одной копии инсулятора в конструкцию, но сохраняется при введении пары инсуляторов (рис.3а). Таким образом, один инсулятор конкурирует с энхансером за связывание инсуляторных белков, в то время как пара инсуляторов сделать этого не может.



**Рис. 3. Анализ связывания инсуляторных белков в различных областях конструкций e-h, e-g-h и g/g. (а) связывание инсуляторных белков с районами R1-3 (б) связывание инсуляторных белков с районами G1- 5', G1-3' и HSP (с) связывание инсуляторных белков с районами G2-5' и G2-3'**

Как видно, связывание mod2.2 обнаруживается и в районе R2, прилежащем к энхансеру. Это не говорит о том, что антитела к Su(Hw) или к dCTCF менее активны (хорошие сигналы при ChIP-PCR прослеживаются

и в экспериментах с этими антителами). Мы видим, что инсуляторные белки Su(Hw), mod2.2 и dCTCF связываются как с инсулятором, так и с энхансером *coria*, что свидетельствует об их участии в функционировании энхансера. Это выявлено в ходе иммунопреципитации хроматина трансфицированных генетических конструкций.

Если ввести в конструкцию одну копию инсулятора, то связывание белков mod2.2 и dCTCF с энхансером резко подавляется. Другими словами, один инсулятор успешно конкурирует за связывание инсуляторных белков с энхансером, в то время как пара инсуляторов это сделать не может.

При исследовании области первого инсулятора (районы 5'G1 и 3'G1), получена информация о связывании инсуляторных белков (рис.3а). Как и ожидалось, наблюдается связывание инсуляторных белков Su(Hw) и mod2.2 с инсулятором *gypsy*.

Анализ связывания в 5' и 3' половинах второго инсулятора *gypsy* в конструкции *g/g* (5'G2 и 3'G2 на рис. 3с) показал, что белки dCTCF и Mod2.2 активно связываются только в 3' половине G2. И наоборот: в первой копии инсулятора 5' половина активно связывает все белки. Эти необычные данные указывают на неравномерное распределение связывания белков dCTCF и Mod2.2, которое позволяет предположить, что копии инсулятора могут взаимодействовать между собой в конструкции *g/g*, располагаясь антипараллельно. Вдобавок существует вероятность, что районы 5'G1 и 3'G2, в которых инсуляторные белки связываются не так активно, могут образовывать контакты с другими участками хроматина, что делает их недоступными для взаимодействия. Все это соответствует литературным данным, согласно которым инсуляторы могут взаимодействовать между собой не только в составе генетических конструкций, но и в геноме [6, 7, 8].

На основе вышесказанного мы делаем вывод о формировании комплекса, включающего энхансер и пару антипараллельно расположенных инсуляторов, которые связывают инсуляторные белки 5' половиной G1 и 3'

половиной G2. Этому не противоречат и данные о взаимодействии инсуляторных белков с энхансером в конструкции e-h. Мы видим, что инсуляторные белки могут участвовать во взаимодействии энхансера с промотором, энхансера и инсулятора, а также между несколькими инсуляторами.

Более точный механизм этого процесса у дрозофилы требует дальнейших исследований.

Работа поддержана Программой фундаментальных исследований государственных академий наук на 2013 - 2020 годы (тема № 01201363821).

### **Литература**

1. Heintzman N.D., Hon G.C., Hawkins R.D., Kheradpour P., Stark A., Harp L.F., Ye Z., Lee L.K., Stuart R.K., Ching C.W. et al. Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature*. – 2009. - №459. - p.108–112.
2. Bernstein B.E., Kamal M., Lindblad-Toh K., et al. Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. *Cell*. - 2005. - №120 – p.169–81.
3. Tchurikov NA, Kretova OV, Fedoseeva DM, Sosin DV, Grachev SA, Serebraykova MV, Romanenko SA, Vorobieva NV, Kravatsky YV. DNA double-strand breaks coupled with PARP1 and HNRNPA2B1 binding sites flank coordinately expressed domains in human chromosomes. *PLoS Genet*. – 2013. - № 9(4). - e1003429.
4. Krivega I., Dean A Enhancer and promoter interactions — long distance calls. *Curr Opin Genet Dev*. – 2012. - №22 – P.79-85.
5. Van Bortle K., Corces V.G. The role of chromatin insulators in nuclear architecture and genome function. *Curr. Opin. Genet. Dev*. - 2013 - №23(2) – P. 212-218.



6. Ong, C.T. and Corces, V.G. CTCF: an architectural protein bridging genome topology and function. *Nat. Rev. Gen.* – 2014. - №15. - P. 234-246.
7. Phillips-Cremins.J.E. and Corces, V.G. Chromatin insulators: linking genome organization to cellular function. *Mol. Cell.* – 2013.- №50. - P. 461-474.
8. Comet I., Savitskaya E., Schuettengruber B., Negre N., Lavrov S., Parshikov A., Juge F., Gracheva E., Georgiev P., Cavalli G. PRE-mediated bypass of two Su(Hw) insulators targets PcG proteins to a downstream promoter. *Dev. Cell.* – 2006. – №11. - P.1–8.