



УДК 577.214.6

АНАЛИЗ ЭНХАНСЕРНОЙ АКТИВНОСТИ ФРАГМЕНТОВ ДНК ИЗ ОБЛАСТИ *FXUD5-COX7A* ХРОМОСОМЫ 19 ЧЕЛОВЕКА

© 2011 г. А. Н. Соротокина[#], И. П. Чернов, Е. А. Стукачева, Л. Г. Николаев, Е. Д. Свердлов

Учреждение РАН Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина
и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10
Поступила в редакцию 18.05.2010 г. Принята к печати 07.07.2010 г.

Исследована энхансерная активность четырех идентифицированных ранее фрагментов ДНК из участка хромосомы 19 человека длиной 1 млн п.о. Все четыре фрагмента обладают сходной тканеспецифичностью — максимальная энхансерная активность наблюдается в клетках HEK293, а минимальная — в клетках HeLa. Полученные фрагменты также обладают выраженной специфичностью энхансерной активности по отношению к промотору цитомегаловируса по сравнению с промотором SV40. Делеционный анализ одного из фрагментов выявил, что энхансерной активностью обладает только его центральная часть длиной 127 п.о. Во фланкирующих областях располагаются, по-видимому, либо негативные регуляторные элементы (сайленсеры), либо инсульторные элементы, ограничивающие действие энхансера на промотор. Энхансерная активность центральной части исследованного фрагмента обладает ярко выраженной зависимостью от ее ориентации относительно промотора, что не характерно для большинства таких элементов. Фрагмент длиной 127 п.о. содержит 11 участков связывания известных факторов транскрипции, причем 8 из них относятся к факторам, участвующим в регуляции активности генов иммунной системы. Исследованный фрагмент находится в 500 п.о. от точки начала транскрипции гена *TYROBP* (*DAP12*), кодирующего адапторный белок активации киллерных Т-клеток, и, возможно, играет роль тканеспецифичного энхансера для этого гена.

Ключевые слова: энхансер; промотор; тканеспецифичность; делеционный анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Подавляющая часть генома человека представлена нетранслируемыми областями, некоторые из которых являются энхансерами. Последним во многом принадлежит роль в обеспечении бесперебойного функционирования генома и поддержании молекулярного гомеостаза организма [1–3]. Энхансеры — это дисрегуляторные элементы, служащие платформой для связывания кластеров регуляторных белков, так как связывания одного фактора обычно недостаточно для того, чтобы вызвать экспрессию. Типичный энхансер занимает 200–1000 п.о. и связывает несколько, часто заметно больше десятка белков, специфичных к его последовательности [4, 5]. Энхансеры интегрируют сигналы от различных источников и способны влиять на транскрипцию гена, располагаясь на расстоянии нескольких сотен тысяч п.о. от промотора с любой стороны от гена или же в интроне гена [6, 7].

Развитие эукариотического организма подразумевает четко скоординированную регуляцию экспрессии генов во времени и в пространстве. Предполагается, что энхансеры являются одними из основных дисрегуляторных элементов, определяющих тканеспецифичность экспрессии генов. Это предположение основано как на многочисленных данных по транскрипции отдельных генов различного типа, в частности генов иммуноглобулинов [8, 9], *CFTR* [10], *GATA-3* [11], *Nfatc1* [12] и др., так и на данных по геномному анализу [13, 14].

Тканеспецифичное функционирование энхансеров является одним из важнейших аспектов нормального развития организма. Энхансерные последовательности позвоночных содержат комбинации участков связывания различных транскрипционных факторов [15]. Детальный анализ структуры индивидуальных генов, таких, как *APOE* и *NKX-2*, показал, что многие гены регулируются целым набором энхансерных комплексов, каждый из которых отвечает за отдельные аспекты профиля экспрессии соответствующих мРНК [16].

Нарушения в последовательности энхансеров могут служить причиной нарушений развития и наследственных заболеваний, в частности синдрома Вернера [17] и болезни Хиршспрунга [18]. Очевидно, что тканеспецифичность энхансеров играет важ-

Сокращения: CMV — цитомегаловирус; CTCF — CCCTC-связывающий фактор (CCCTC-binding factor); SV40 — вакуолизирующий вирус обезьян 40 (Simian vacuolating virus 40); LTR HERV-K — длинный концевой повтор эндогенного ретровируса человека семейства K (Long terminal repeat of Human endogenous retrovirus K).

[#] Автор для связи (тел.: (495) 330-70-29; факс: (495) 330-65-38; эл. почта: ansorotokina@gmail.com).

ную роль в обеспечении правильного функционирования генома.

Ранее в нашей лаборатории было показано [19], что ряд фрагментов ДНК хромосомы 19 человека, расположенных в области, заключенной между генами *FXYD5* и *COX7A1*, способны усиливать транскрипцию репортерного гена, т.е. проявляют энхансерподобную активность. Для некоторых из выявленных фрагментов ДНК мы исследовали тканеспецифичность этой активности и ее специфичность в отношении промотора, а также провели делеционный анализ одного из потенциальных энхансеров.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Специфичность энхансерной активности

Ранее в нашей лаборатории из области *FXYD5-COX7A1* хромосомы 19 человека было отобрано 15 фрагментов ДНК, проявляющих энхансерную активность [19]. В данной работе мы исследовали тканеспецифичность и специфичность по отношению к двум разным промоторам четырех из них E6, E12, E13 и E14 (см. рис. 1). Эти последовательности были встроены в векторы pGL3rv и pGL3/CMVrv (см. “Эксперимент. часть”) с 3'-стороны от гена люциферазы для выявления их энхансерной активности в отношении промоторов вируса SV40 и цитомегаловируса соответственно (рис. 1a). Для исследования тканеспецифичности энхансерной активности описанные выше конструкции были трансфицированы в клеточные линии, происходящие из различных тканей: HEK293, A549, PANC-1, Calu-1 и HeLa. Полученные результаты приведены на рис. 1б.

Из приведенных данных можно заключить, что все четыре фрагмента E6, E12, E13 и E14 обладают сходной тканеспецифичностью – максимальная энхансерная активность наблюдается в клетках HEK293, а минимальная – в клетках HeLa. Тем не менее имеются количественные различия между фрагментами – так, фрагмент E14 обладает существенной энхансерной активностью в отношении промотора CMV в клетках Calu-1, тогда как активность других фрагментов в этих клетках отсутствует (фрагменты E12 и E13) или почти незаметна (фрагмент E6). Высокая активность энхансеров в клетках HEK293 в сравнении с другими клеточными линиями связана с тем, что эти клетки, в отличие от всех остальных, получены из нераковой эмбриональной ткани почек при помощи трансформации ДНК аденовируса типа 5 [20] и, возможно, содержат дополнительный набор транскрипционных факторов. Если сравнить тканеспецифичность энхансерной активности исследованных нами фрагментов ДНК E6, E12, E13 и E14 с тканеспецифичностью типичного вирусного энхансера SV40 и длинного концевой повтора эндогенного ретровируса человека К (LTR HERV-K) [21], можно сделать вывод о том, что ис-

следованные фрагменты из генома человека обладают, подобно LTR HERV-K, высокой тканеспецифичностью, в отличие от энхансера SV40, способного усиливать действие промотора в самых разных типах клеток.

Было показано, что все четыре проверенных фрагмента ДНК обладают энхансерной активностью в отношении промотора CMV. В отношении промотора SV40 энхансерная активность этих четырех фрагментов в 2–5 раз ниже и наблюдается только в клетках HEK293. В случае фрагмента E6 наблюдается даже небольшое понижение активности промотора (рис. 1б). Таким образом, исследованные нами фрагменты обладают выраженной специфичностью энхансерной активности по отношению к промотору цитомегаловируса в сравнении с промотором SV40.

Детальный анализ энхансерной активности фрагмента E14

Мы провели подробный анализ энхансерной активности фрагмента E14. Для этого из области *FXYD5-COX7A* хромосомы 19 человека нами был выделен фрагмент длиной 651 п.о., включающий как фрагмент E14, так и прилегающие к нему с обеих сторон последовательности длиной около 200 п.о. (E14-1). Далее было осуществлено выравнивание (рис. 2) имеющихся в базах данных (GenBank) соответствующих геномных последовательностей ряда приматов – шимпанзе (*Pan troglodytes*, NW_001228224), представителя обезьян Старого Света макаки резус (*Macaca mulatta*, NW_001106510) и представителя обезьян Нового Света игрунки обыкновенной (*Callithrix jacchus*, ACFV01135589), ветви которых отделились от дерева приматов соответственно 5–6, 20–22 и 30–35 млн лет назад [22]. Анализ выравнивания показывает, что внутри области имеются консервативные участки с относительно малым числом замен и делеций, что указывает на их функциональную значимость. Мы выделили 10 участков длиной 25 п.о. и более, содержащих две или менее замены, делеции или вставки (рис. 3, участки a–j).

Этот же фрагмент E14-1 был проанализирован на присутствие участков связывания факторов транскрипции при помощи двух инструментов – программы для предсказания участков связывания p-match (<http://www.gene-regulation.com/cgi-bin/pub/programs/pmatch/bin/p-match.cgi>) и программы поиска участков связывания, находящихся в базе данных TRANSFAC (TESS, <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess>). Оказалось, что абсолютное большинство консервативных участков (кроме участка c) находятся в областях, относительно обогащенных сайтами связывания факторов транскрипции (рис. 3), что подтверждает предположение об их функциональном значении.

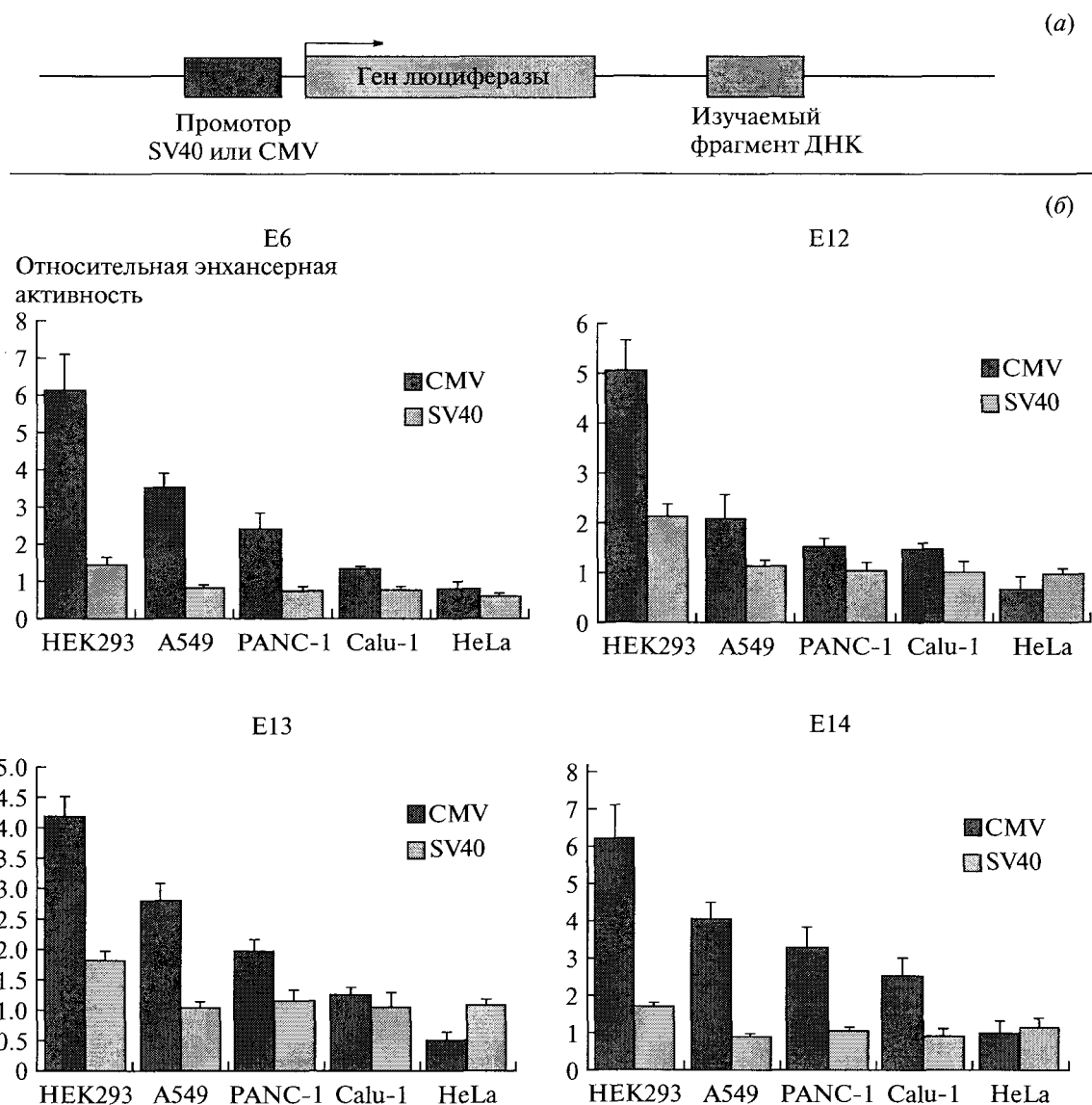


Рис. 1. Определение энхансерной активности фрагментов ДНК, содержащих потенциальные энхансеры E6, E12, E13, E14, из хромосомы 19 человека в клеточных линиях различного типа. (а) Принципиальная схема конструкций, использованных для трансфекции клеток. (б) Энхансерная активность фрагментов ДНК E6, E12, E13, E14 в клетках человека: A549 (эпителиальная аденокарцинома легкого), PANC-1 (карцинома поджелудочной железы), Calu-1 (эпидермоидная карцинома легкого), HeLa-B (эпителиальная карцинома шейки матки), HEK293 (клетки почки зародыша). Активность определяли по люминесценции люциферазы относительно люминесценции, полученной при трансфекции тех же клеток безэнхансерной контрольной плазмидой pGL3rv или pGL3/CMVrv соответственно для промоторов SV40 или CMV. Активность контроля принята за единицу.

Далее фрагмент E14-1 был разбит на три участка: 5'-концевой (5'-E14), 3'-концевой (3'-E14) и центральный участки (E14-с). Все эти фрагменты ДНК были встроены в плазмиду pGL3/CMVrv на место энхансера с 3'-стороны от гена люциферазы в обеих ориентациях относительно промотора CMV (рис. 4а). Полученными генетическими конструкциями были трансфицированы клетки HEK293 и определена энхансерная активность содержащихся в них участков ДНК (рис. 4б). На клеточных линиях

A549 и PANC-1 были получены аналогичные результаты (результаты не приведены).

В результате анализа энхансерной активности исследованных фрагментов E14-1, 5'-E14, 3'-E14 и E14-с (рис. 4а) можно сделать следующие выводы. Фрагмент E14-1 (рис. 4а, конструкция 1), включающий идентифицированный ранее энхансерный фрагмент E14, не обладает энхансерной активностью ни в одной из ориентаций относительно промотора. Более того, активность минимального промотора CMV в его присутствии достоверно ниже,

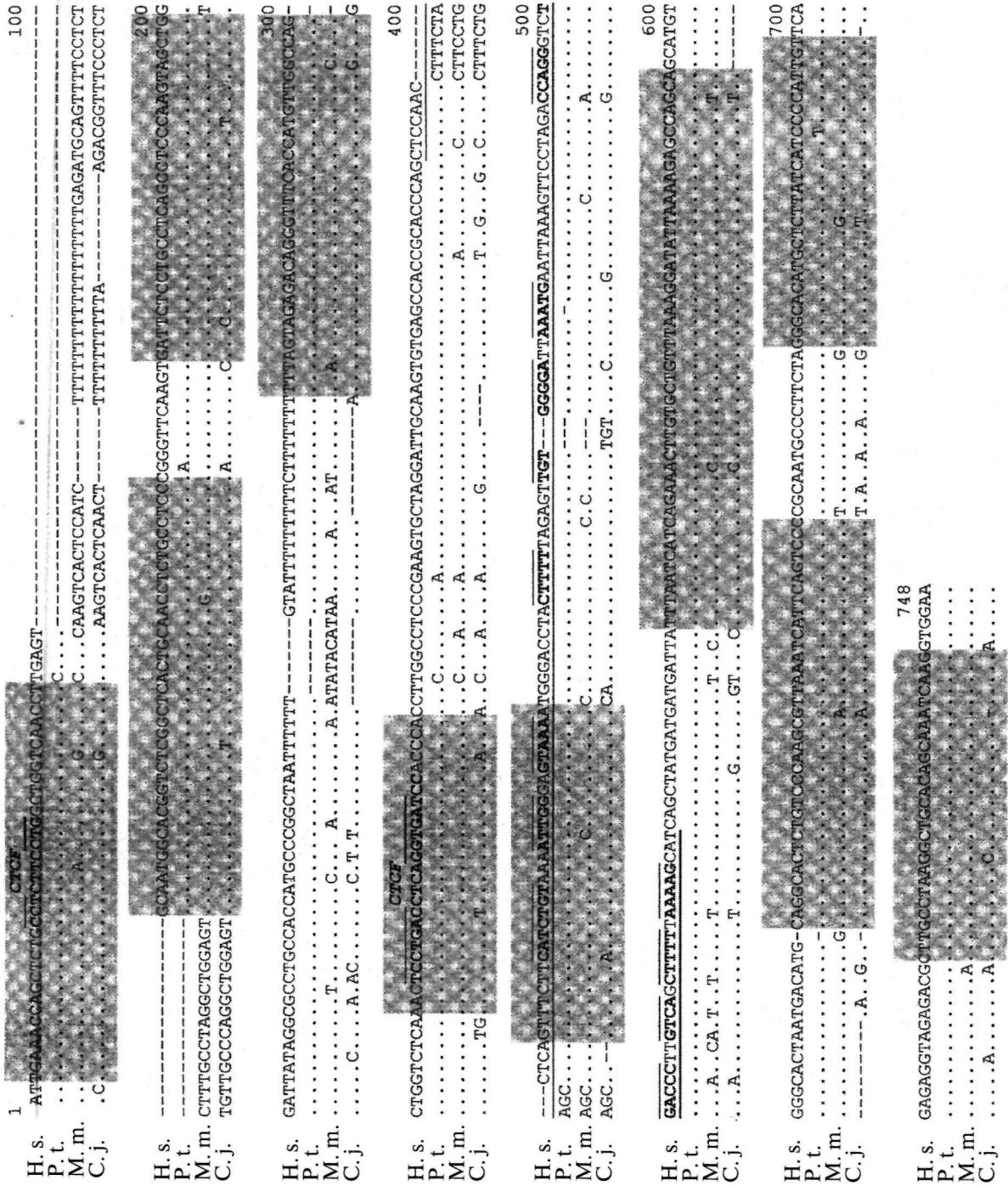


Рис. 2. Выравнивание последовательностей фрагмента ДНК E14-1 из хромосомы 19 человека, включающего потенциальный энхансер E14, и соответствующих последовательностей из геномов шимпанзе *P. troglodytes* (NW_001228224), макаки резус *M. mulatta* (NW_001106510) и игрунки обыкновенной *C. jacchus* (ACFV01135589). Серым цветом выделены области наибольшей эволюционной консервативности. Подчеркнута последовательность наименьшего фрагмента E14-с длиной 127 п.о., обладающего энхансерной активностью (конструкция 4 на рис. 4а). Жирным шрифтом и верхней чертой выделены потенциальные участки связывания факторов транскрипции, отдельно подписаны участки связывания CTCF. H.s. – *Homo sapiens*, P.t. – *P. troglodytes*, M.m. – *M. mulatta*, C.j. – *C. jacchus*.

чем без этого фрагмента. Снижение активности промотора CMV наблюдалось и в присутствии 3'-концевого фрагмента этой последовательности 3'-E14 (рис. 4а, конструкция 3), амплифицированно-

го с помощью праймеров Р2 и Р4 (см. "Эксперимент. часть"), и в меньшей степени, в присутствии 5'-концевого фрагмента 5'-E14 (праймеры Р1 и Р3, рис. 4а, конструкция 2). Можно заключить, что в областях,

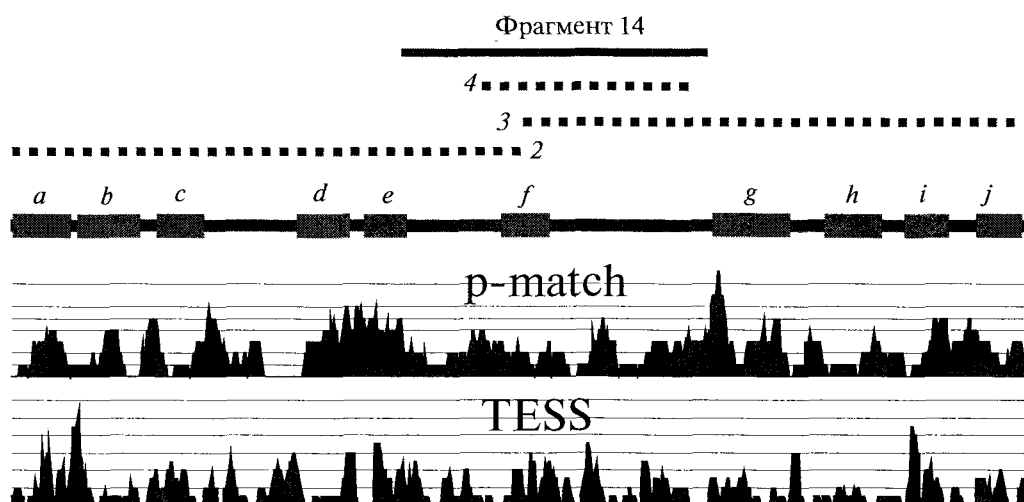


Рис. 3. Консервативные области (обозначены серыми прямоугольниками и подписаны латинскими буквами) в составе фрагмента ДНК E14-l, содержащего потенциальный энхансер E14. Приведены распределения плотности предсказанных (p-match) и имеющихся в базе данных TRANSFAC (TESS) участков связывания факторов транскрипции. По оси ординат отложено количество факторов транскрипции, в состав участков связывания которых входит данная пара оснований. Жирными линиями обозначено положение и длина фрагментов, частично или полностью перекрывающихся с потенциальным энхансером E14: E14-l, 5'-E14, 3'-E14 и E14-c, их номера соответствуют номерам конструкций на рис. 4a.

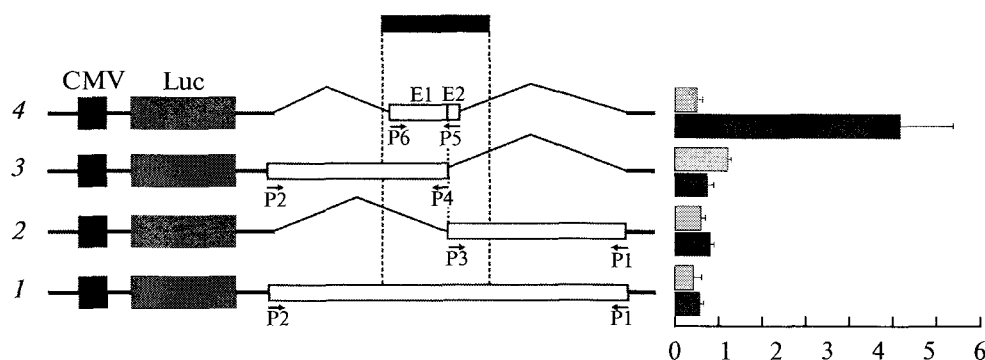


Рис. 4. Энхансерная активность фрагментов ДНК E14-l, 5'-E14, 3'-E14 и E14-c в клетках HEK293. (a) Схемы конструкций, использованных для трансфекции клеток; в конструкцию 1 встроено фрагмент длиной E14-l, в конструкцию 2 – фрагмент 5'-E14, в конструкцию 3 – 3'-E14-фрагмент, в конструкцию 4 – центральный участок E14-c; CMV – минимальный промотор цитомегаловируса; Luc – модифицированный ген люциферазы *Photinus pyralis*. Области E1 и E2 перекрываются соответственно с фрагментами 3 и 2. Стрелками обозначены положения праймеров, использованных в ПЦР, амплифицируемые с их помощью фрагменты обозначены белыми прямоугольниками. (б) уровень активности люциферазы относительно активности, полученной при трансфекции тех же клеток безэнхансерной контрольной плазмидой pGL3/CMV_{pr}. Черными столбиками на диаграмме отображается энхансерная активность соответствующих фрагментов, клонированных в плазмиду в прямой ориентации, серыми столбиками – в обратной.

фланкирующих энхансерный фрагмент E14, располагаются либо негативные регуляторные элементы (сайленсеры), способные не только нейтрализовать действие энхансера, но и понизить активность промотора, либо инсуляторные элементы, ограничивающие действие энхансера на промотор [23]. Последняя возможность подтверждается присутствием в одном из фланкирующих фрагментов двух участков связывания инсуляторного белка CTCF [24]: экспериментально подтвержденного CСТСТТССТG и

предсказанного TCCTGACCTCAGGTGATCC (выделены жирным шрифтом на рис. 2). Оба участка находятся в областях с высокой эволюционной консервативностью и высоким относительным содержанием сайтов связывания факторов транскрипции. Хотя во втором фланкирующем фрагменте участков связывания CTCF не обнаружено, его инсуляторную активность также нельзя исключить, так как не все участки связывания CTCF идентифицированы в на-

стоящее время, и, кроме того, показано существование CTCF-независимых инсуляторов [24].

Из всех четырех исследованных фрагментов ДНК E14-1, 5'-E14, 3'-E14 и E14-с, частично или полностью перекрывающихся с исходным фрагментом E14, энхансерной активностью обладает, кроме исходного фрагмента E14, только центральный участок E14-с длиной 127 п.о., ограниченный последовательностями праймеров P5 и P6. Тому факту, что оба перекрывающихся с этим участком длинных фрагмента (рис. 4а, конструкции 2 и 3) активностью не обладают, возможны два объяснения: энхансерная активность фрагментов 5'-E14 и 3'-E14 может подавляться за счет располагающихся в этих фрагментах сайленсеров и/или инсуляторов или за энхансерную активность центрального участка ответственны одновременно оба перекрывающихся с фланкирующими фрагментами участка E1 и E2 (рис. 4а, конструкция 4).

Энхансерная активность центрального фрагмента E14-с (рис. 4а, конструкция 4) характеризуется ярко выраженной зависимостью от его ориентации относительно промотора (рис. 4б), что не характерно для большинства таких элементов. Подобная зависимость была обнаружена ранее [25, 26] и объяснена присутствием CTCF-зависимого инсулятора в последовательности, содержащей энхансер. В одной из ориентаций инсулятор оказывался между промотором и энхансером и блокировал их взаимодействие. Мы не обнаружили участков связывания CTCF в составе исследуемого центрального фрагмента, что оставляет выяснение причин зависимости энхансерной активности от его ориентации предметом для дальнейших исследований.

Участки связывания факторов транскрипции, обнаруженные в последовательности потенциального энхансера

Для детального анализа того, какие белковые факторы транскрипции могут связываться с центральной активной областью фрагмента E14 (E14-с) длиной 127 п.о. (подчеркнута на рис. 2), мы провели поиск в этой последовательности участков связывания этих факторов из базы данных TRANSFAC [27]. При анализе учитывали только факторы транскрипции человека. Полученные результаты суммированы в таблице. Всего было обнаружено 11 участков узнавания, с которыми способны связываться 27 различных белков (с учетом всех сплайс-вариантов). Большинство этих участков (кроме AP1/16) консервативны: имеется не более одной замены в соответствующих последовательностях высших и низших обезьян. Как видно из таблицы, центральный фрагмент E14-с содержит по три участка связывания факторов транскрипции семейства TCF-1 (Т-клеточный фактор 7) и энхансерного фактора лимфоцитов LEF-1, по два участка связывания факторов AP-1 и YY1, а также участки связывания бел-

ковых факторов LBP1, AML1, NFY, C/EBPalpha и E12/E47, то есть 8 из 11 обнаруженных участков способны связывать факторы, гены которых активно экспрессируются в клетках и тканях иммунной системы, и участвующие в регуляции активности генов, специфичных для этих клеток. Отметим, что последовательность E14 находится всего в 500 п.о. от точки начала транскрипции гена *TYROBP (DAP12)*, кодирующего адапторный белок, принимающий участие в активации киллерных Т-клеток [28]. Можно предположить, что участок E14 играет роль тканеспецифичного энхансера для гена *TYROBP*. Сайты связывания факторов транскрипции в данном участке расположены достаточно плотно, что наводит на мысль о кооперативности взаимодействия связывающихся с ними белков. Их взаимное расположение и структура достаточно консервативны в эволюции (рис. 2). Обе этих черты характерны для энхансерных комплексов, известных как энхансомы [29].

Таким образом, приведенные в статье данные позволяют предположить, что выделенный нами фрагмент действительно представляет собой энхансер. Однако лишь данные *in vivo* позволят сделать окончательные выводы о его активности и тканеспецифичности, а также о гене (генах)-мишенях данного энхансера.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культуры клеток. В работе использовали клетки человека следующих линий: A549 (эпителиальная аденокарцинома легкого), PANC-1 (карцинома поджелудочной железы), Calu-1 (эпидермоидная карцинома легкого), HeLa-B (эпителиальная карцинома шейки матки), HEK293 (клетки почки зародыша). Все клеточные линии культивировали в среде DMEM/F12 (1 : 1), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки.

Конструкции. В работе использовали векторы pGL3cv и pGL3pv (Promega, США), направляющие экспрессию гена люциферазы под контролем промотора SV40 с энхансером SV40 и без него соответственно. Аналогичные векторы pGL3/CMVcv и pGL3/CMVpv с геном люциферазы под контролем промотора CMV получили при помощи расщепления исходных векторов pGL3cv и pGL3pv рестриктазой SmaI (Fermentas) с последующим встраиванием промотора и энхансера CMV или только промотора CMV.

Потенциальные энхансеры E6, E12, E13 и E14 [19], клонированные в pGEM-T, вырезали из соответствующего вектора при помощи рестриктазы SalI (Fermentas), участок узнавания которой находится в составе праймера, использованного ранее для их амплификации (подробно см. [19]). Вырезанные фрагменты клонировали в pGL3pv и pGL3/CMVpv, предварительно расщепленные той же рестрикта-

Свойства транскрипционных факторов, участки узнавания которых обнаружены в энхансерподобном фрагменте E14-с длиной 127 п.о.

TRANS-FAC №	Название	Начало участка узнавания ¹	Участок узнавания	Ген	Описание	Тканеспецифичность экспрессии	Ссылка
T01002, T00999, T01000, T01001, T01979, T01981, T01982, T02905	TCF-1, 1A, 1B, 1C, 1E, 1F, 1G LEF-1	4, 10, 73 4, 10, 73	СТКТК СТКТК	<i>TCF7</i> <i>LEF1</i>	Т-клеточный фактор транскрипции 7, содержит HMG-бокс Связывающийся с энхансером фактор лимфоцитов	Т-клетки, тимус	[31]
T00029	AP-1	16, 24	TGAC	<i>FOS</i> + + <i>JUN</i>	Активирующий белок 1	Иммунная система	[32]
T00721	RAR-beta	22	GGGTCA	<i>RARB</i>	Бета-рецептор ретиноевой кислоты	Нет	[33]
T00261	ER-alpha	23	GGTCA	<i>ESR1</i>	Альфа-рецептор эстрогена	Нет	[34]
T00461	LBP-1a, b	30	CCTGG	<i>UBP1</i>	Фактор, связывающийся с регуляторными областями ВИЧ-1	Т-клетки, иммунная система	[35]
T00915	YY1	52, 86	CATTT	<i>YY1</i>	Фактор Yin и Yang 1	Т-клетки, иммунная система	[36]
T00035, T02466	AP-2alphaA, B	59	TCCCCA	<i>TFAP2A</i>	Активирующий белок 2	Плацента, слонные железы, трахея, почки	[37]
T01067, T02256, T02246	AML1, 1a, 1c	61	CCCACA	<i>RUNX1</i>	Связанный с острым миелоидным лейкозом фактор транскрипции 1, содержащий домен Runt	Т-клетки, иммунная система, яичник	[38]
T00100	CUTL1	95	CCAAT	<i>CUX1</i>	Белок, содержащий Cut-подобный гомеодомен	Нет	[39]
T00150	NFY	95	CCAAT	<i>NFYA, B, C</i>	Ядерный фактор Y	Лимфоциты	[40]
T00151	CP2a	95	CCAAT	<i>TFCP2</i>	Фактор транскрипции CP2 (LBP-1c)	Нет	[35]
T00764	SRF	95	CCAAT	<i>SRF</i>	Фактор транскрипции, связывающийся с <i>serum response element</i> гена <i>c-fos</i>	Нет	[41]
T00105	C/EBPalpha	95	CCAAT	<i>CEBPA</i>	ССААТ/энхансерсвязывающий альфа-белок (ССААТ/enhancer binding protein alpha)	Лимфоциты (кроме Т-клеток), печень	[42]
T00204, T00207	E12, E47	103	RCAGNTG	<i>TCF3</i>	Факторы, связывающиеся с энхансером иммуноглобулинов	Лимфоциты (кроме Т-клеток), печень	[43]
T01667	RFX2	104	CAGATG	<i>RFX2</i>	Регуляторный фактор X	Нет	[44]

¹ Отсчитывается от 3'-конца последовательности, соответствующей праймеру P6 (см. "Эксперимент. часть").

зой. Схема полученных конструкций приведена на рис. 1а.

Для анализа энхансерной активности фрагмента E14 были получены следующие фрагменты ДНК, полностью или частично перекрывающиеся с фрагментом E14:

1. Фрагмент E14 (198 п.о.), фланкированный с обеих сторон последовательностями по ~200 п.о. (E14-1, общая длина 651 п.о.). Для его получения ис-

пользованы праймеры AGTCGACATTGAAAC-CAGCTCT (P1) и GTCGACTTCCACCTTGATTT (P2). В этих и приведенных ниже праймерах подчеркнуты последовательности, соответствующие участкам расщепления *SalI*, использованным в дальнейшем для клонирования.

2. 3'-Концевой фрагмент длиной 331 п.о. (3'-E14), полученный при помощи праймеров P1 и AGTC-GACAGAACTGAGGTTG (P3).

3. 5'-Концевой фрагмент длиной 320 п.о. (5'-E14), полученный при помощи праймеров TGTCGACT-CATCTGTA AAAATTGG (P4) и P2.

4. Центральная часть фрагмента 14 длиной 127 п.о. (E14-с), полученная при помощи праймеров AAGTCGACCTCCAACCTCAG (P5) и AAC TGCA-GATGCTTTAAAAA (P6).

Фрагменты для делеционного анализа амплифицировали, используя в качестве матрицы космиду F19399 (GenBank AD000833), любезно предоставленную А. Ольсен (Ливерморская национальная лаборатория, США; Livermore National Laboratory, USA) и встраивали в вектор pAL-TA (Евроген, Россия). Далее фрагменты вырезали рестриктазой SalI и переносили в линейаризованную тем же ферментом плазмиду pGL3/CMV_{pr}. Структуру полученных конструкций подтверждали секвенированием.

Трансфекция клеток. Транзientную трансфекцию клеток проводили в 48-луночных планшетах с использованием реагента Lipofectamine 2000 согласно рекомендациям производителя (Invitrogen, США). При проведении трансфекции использовали 3 мкг ДНК соответствующей плазмидной конструкции (см. выше) и 1 мкл липофектамина в расчете на одну лунку. После трансфекции клетки культивировали в среде DMEM/F12 (1 : 1) без антибиотиков, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, в течение 48 ч. Клетки собирали и лизировали с использованием буфера PLB (passive lysis buffer, Promega, США).

Определение энхансерной активности фрагментов. Активность люциферазы под контролем промоторов CMV и SV40 и предполагаемых энхансеров (исследуемые фрагменты E6, E12, E13, E14 из хромосомы 19 человека) измеряли при помощи люцинометра GENios Pro (TECAN, Австрия), в качестве внутреннего контроля использовали люминесценцию люциферазы *Renilla reniformis*, экспрессирующейся с котрансфицированной плазмиды pRL-TK (Promega, США). В качестве контролей применялись плазмиды pGL3_{pr}, pGL3/CMV_{pr}, pGL3_{sv} и pGL3/CMV_{sv} (см. выше). На каждой клеточной линии проводили по три опыта по два повтора в каждом, полученные данные по уровню активности люциферазы нормировали по контрольной люминесценции люциферазы *R. reniformis*, вычисляли среднее значение активности и стандартную ошибку среднего.

Анализ нуклеотидных последовательностей. Выравнивание последовательностей осуществляли при помощи пакета Vector NTI v.9 (Invitrogen, США). Поиск участков связывания фактора транскрипции CTCF проводили с использованием баз данных <http://www.essex.ac.uk/bs/molonc/spa.html> (экспериментально подтвержденные участки) и <http://insulatordb.uthsc.edu/> (предсказанные участки).

Для выявления участков связывания факторов транскрипции использовали программу предска-

зания участков связывания факторов транскрипции p-match [30] и базу данных участков связывания факторов транскрипции TRANSFAC [27].

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны В.К. Потапову и Н.А. Скапцовой (Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова), а также Анне Ольсен (Ливерморская национальная лаборатория, США) за предоставление космидных клонов. Работа финансировалась программой Президиума РАН “Молекулярная и клеточная биология” и программой “Ведущие научные школы РФ” (НШ-2395.2008.4).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Atchison M.L.* // Annu. Rev. Cell Biol. 1988. V. 4. P. 127–153.
2. *Maston G.A., Evans S.K., Green M.R.* // Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 2006. V. 7. P. 29–59.
3. *Visel A., Rubin E.M., Pennacchio L.A.* // Nature. 2009. V. 461. P. 199–205.
4. *Arnosti D.N., Kulkarni M.M.* // J. Cell. Biochem. 2005. V. 94. P. 890–898.
5. *Levine M., Tjian R.* // Nature. 2003. V. 424. P. 147–151.
6. *Bartkuhn M., Renkawitz R.* // Biochim. Biophys. Acta. 2008. V. 1783. P. 2161–2166.
7. *Sipos L., Gyurkovics H.* // FEBS J. 2005. V. 272. P. 3253–3259.
8. *Banerji J., Olson L., Schaffner W.* // Cell. 1983. V. 33. P. 729–740.
9. *Gillies S.D., Morrison S.L., Oi V.T., Tonegawa S.* // Cell. 1983. V. 33. P. 717–728.
10. *Ott C.J., Suszko M., Blackledge N.P., Wright J.E., Crawford G.E., Harris A.* // J. Cell. Mol. Med. 2009. V. 13. P. 680–692.
11. *Hasegawa S.L., Moriguchi T., Rao A., Kuroha T., Engel J.D., Lim K.C.* // Dev. Biol. 2007. V. 301. P. 568–577.
12. *Zhou B., Wu B., Tompkins K.L., Boyer K.L., Grindley J.C., Baldwin H.S.* // Development. 2005. V. 132. P. 1137–1146.
13. *Hallikas O., Palin K., Sinjushina N., Rautiainen R., Partanen J., Ukkonen E., Taipale J.* // Cell. 2006. V. 124. P. 47–59.
14. *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., Ching K.A., Antosiewicz-Bourget J.E., Liu H., Zhang X., Green R.D., Lobanov V.V., Stewart R., Thomson J.A., Crawford G.E., Kellis M., Ren B.* // Nature. 2009. V. 459. P. 108–112.
15. *Panne D.* // Curr. Opin. Struct. Biol. 2008. V. 18. P. 236–242.
16. *Visel A., Bristow J., Pennacchio L.A.* // Semin. Cell. Dev. Biol. 2007. V. 18. P. 140–152.
17. *Wieczorek D., Pawlik B., Li Y., Akarsu N.A., Caliebe A., May K.J., Schweiger B., Vargas F.R., Balci S., Gillissen-Kaesbach G., Wollnik B.* // Hum. Mutat. 2010. V. 31. P. 81–89.

18. Emison E.S., McCallion A.S., Kashuk C.S., Bush R.T., Grice E., Lin S., Portnoy M.E., Cutler D.J., Green E.D., Chakravarti A. // *Nature*. 2005. V. 434. P. 857–863.
19. Chernov I., Stukacheva E., Akopov S., Didych D., Nikolaev L., Sverdlov E. // *Biotechniques*. 2008. V. 44. P. 775–784.
20. Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R. // *J. Gen. Virol.* 1977. V. 36. P. 59–74.
21. Ruda V.M., Akopov S.B., Trubetskoy D.O., Manuylov N.L., Vetchinova A.S., Zavalova L.L., Nikolaev L.G., Sverdlov E.D. // *Virus Res.* 2004. V. 104. P. 11–16.
22. Glazko G.V., Nei M. // *Mol. Biol. Evol.* 2003. V. 20. P. 424–434.
23. Bushey A.M., Dorman E.R., Corces V.G. // *Mol. Cell*. 2008. V. 32. P. 1–9.
24. Nikolaev L.G., Akopov S.B., Didych D.A., Sverdlov E.D. // *Curr. Genomics*. 2009. V. 10. P. 294–302.
25. Swamynathan S.K., Piatigorsky J. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. P. 49700–49706.
26. Swamynathan S.K., Piatigorsky J. // *Int. J. Dev. Biol.* 2007. V. 51. P. 689–700.
27. Wingender E. // *Brief Bioinform.* 2008. V. 9. P. 326–332.
28. Tomasello E., Vivier E. // *Eur. J. Immunol.* 2005. V. 35. P. 1670–1677.
29. Panne D., Maniatis T., Harrison S.C. // *Cell*. 2007. V. 129. P. 1111–1123.
30. Chekmenev D.S., Haid C., Kel A.E. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. P. W432–437.
31. Hoppler S., Kavanagh C.L. // *J. Cell. Sci.* 2007. V. 120. P. 385–393.
32. Hess J., Angel P., Schorpp-Kistner M. // *J. Cell. Sci.* 2004. V. 117. P. 5965–5973.
33. Alvarez S., Germain P., Alvarez R., Rodriguez-Barrios F., Gronemeyer H., de Lera A. R. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2007. V. 39. P. 1406–1415.
34. Welboren W.J., Sweep F.C., Span P.N., Stunnenberg H.G. // *Endocr. Relat. Cancer*. 2009. V. 16. P. 1073–1089.
35. Katsura A., Kimura K., Hosoi K., Tomokuni Y., Nesori M., Goryo K., Numayama-Tsuruta K., Torii S., Yasumoto K., Gotoh O., Takada M., Fukumura H., Sogawa K. // *Genes Cells*. 2009. V. 14. P. 1183–1196.
36. Gordon S., Akopyan G., Garban H., Bonavida B. // *Oncogene*. 2006. V. 25. P. 1125–1142.
37. Eckert D., Buhl S., Weber S., Jager R., Schorle H. // *Genome Biol.* 2005. V. 6. P. 246.
38. Yoshida H., Kitabayashi I. // *Int. J. Hematol.* 2008. V. 87. P. 19–24.
39. Sansregret L., Nepveu A. // *Gene*. 2008. V. 412. P. 84–94.
40. Mantovani R. // *Gene*. 1999. V. 239. P. 15–27.
41. Niu Z., Li A., Zhang S.X., Schwartz R.J. // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2007. V. 19. P. 618–627.
42. Fuchs O. // *Folia Biol. (Praha)*. 2007. V. 53. P. 97–108.
43. Slattery C., Ryan M.P., McMorrow T. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2008. V. 40. P. 1431–1436.
44. VanWert J.M., Wolfe S.A., Grimes S.R. // *J. Cell. Biochem.* 2008. V. 104. P. 1087–1101.

Enhancer Activity of DNA Fragments from *FXYD5-COX7A* Region of Human Chromosome 19

A. N. Sorotokina[#], I. P. Chernov, E. A. Stukacheva, L. G. Nikolaev, and E. D. Sverdlov

[#]Phone: (495) 330-70-29; fax: (495) 330-65-38; e-mail: ansorotokina@gmail.com

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia*

The enhancer activity of four previously identified within the one megabase region of human chromosome 19 DNA fragments was investigated. All four fragments had similar tissue-specific profile – maximum of enhancer activity was observed in HEK293 and minimum in HeLa cells. Enhancers obtained had pronounced specificity toward cytomegalovirus promoter compared with SV40 promoter. Functional dissection of one of the fragments (enhancer 14) demonstrated that only its inner 127 b.p. part possessed enhancer activity. The negative regulators, i.e. silencers or insulators are probably located in flanking regions of enhancer 14 and limit its effect on promoter. At the same time, enhancer activity of enhancer 14 depends on its orientation relative to promoter that isn't typical to majority of enhancer elements. Inner 127 b.p. fragment contains 11 transcription factor binding sites; 8 of them are factors that take part in immune system regulation. Enhancer 14 is located 500 b.p. upstream of transcription start site of *TYROBP (DAP12)* gene that codes for of T-killer cells activator protein and possibly functions as tissue-specific enhancer for this gene.

Keywords: enhancer, promoter, tissue specificity, deletion analysis.