



УДК 575.313

РЕГУЛЯТОРНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ S/MAR-ЭЛЕМЕНТОВ ПРИ ВРЕМЕННОЙ ЭКСПРЕССИИ

© 2005 г. А. В. Сасс, В. М. Руда, С. Б. Акопов, Е. В. Снежков,
Л. Г. Николаев#, Е. Д. Свердлов

Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 ГСП, Москва, В-437, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

Поступила в редакцию 11.06.2004 г. Принята к печати 07.07.2004 г.

S/MAR-элементы (scaffold/matrix attachment regions) – это идентифицируемые методами *in vitro* участки ДНК, вовлеченные во взаимодействие с ядерным матриксом. По ряду данных, S/MARs обладают инсуляторной активностью, т.е. способностью блокировать взаимодействие между энхансером и промотором *in vivo* и, возможно, представляют собой целые инсуляторы или их фрагменты. Тем не менее, окончательного доказательства такого соответствия не существует. С целью получить дополнительную информацию об инсуляторной активности S/MARs из полученной ранее библиотеки этих элементов были выбраны пять фрагментов ДНК, различающиеся по длине и сродству к ядерному матриксу, и проведена проверка этих последовательностей на наличие у них свойств инсуляторов. У двух из пяти исследованных элементов была обнаружена инсуляторная активность при временной экспрессии в клетках линии СНО. Ни один из S/MARs не обладал промоторной или энхансерной/сайленсерной активностями в этих клетках.

Ключевые слова: S/MAR, инсулятор, энхансер, временная экспрессия.

ВВЕДЕНИЕ

Для понимания механизмов функционирования генома недостаточно знания его нуклеотидной последовательности. Необходимо также выявить все регуляторные последовательности, участвующие в транскрипции, репликации и других процессах, и исследовать их функциональные свойства. S/MAR-элементы представляют собой участки ДНК (200–1000 п. о.), потенциально ответственные за прикрепление интерфазного хроматина к внутреннему каркасу ядра (ядерному матриксу, ЯМ). Они обладают повышенным сродством к ЯМ *in vitro* и, как полагают, за счет связывания с ним образуют основания петельных доменов хроматина в ядре. Основной функцией, приписываемой S/MARs, является образование, поддержание и регуляция функционирования петельных доменов интерфазного хроматина [1].

Инсуляторы – это последовательности ДНК, способные, находясь между промотором и энхансером, блокировать активирующее действие последнего *in vivo*, а также, будучи помещенными

по краям генетической конструкции (трансгена), вводимой генно-инженерными способами в клетки, защищать экспрессию трансгена от эффекта положения [2]. Различными авторами были получены данные, указывающие на наличие у некоторых S/MAR-элементов свойств, характерных для инсуляторных последовательностей. Так, 5'- и 3'-S/MAR-элементы, окружающие ген аполипопротеина В (apoB), и S/MAR из локуса $\alpha 1$ -антитрипсина человека способны ограждать различные трансгены от эффекта положения [3, 4], а инсулятор ретротранспозона *gypsy* дрозофилы обладает свойствами S/MAR-элемента [5]. В то же время для ряда пограничных элементов, обладающих свойствами как S/MAR, так и инсуляторов, было показано, что за выполнение этих функций отвечают разные, неперекрывающиеся последовательности в составе этих элементов [6, 7]. Возможно, при более детальном изучении взаимосвязей между инсуляторами и S/MAR-элементами, удастся в каждом из них выделить отдельные последовательности, ответственные за свойства инсуляторов и связывание ЯМ.

Наиболее удобным способом такого изучения могла бы быть система временной экспрессии, основанная на введении в клетку плазмид, содержащих энхансер и промотор, обуславливающие экспрессию репортерного гена, и различные S/MAR-элементы, помещенные между энхансером и промотором. Однако не все инсуляторы проявляют актив-

Сокращения: ЯМ – ядерный матрикс; S/MAR – scaffold/matrix attachment region (участок связывания с ЯМ); apoB – аполипопротеин В; cHS4 – chicken β -globin DNase I hypersensitive site 4 (участок гена β -глобина кур, сверхчувствительный к расщеплению ДНКазой I); scs – specialized chromatin structure (специализированные структуры хроматина).

Автор для переписки (тел.: (095) 330-70-29; факс: (095) 330-65-38; эл. почта: lev@humgen.siocb.ras.ru).

Свойства последовательностей S/MARs и инсуляторов, использованных в работе

Элемент	Инсулятор cHS4	S/MAR M0A7	S/MAR M0B9	S/MAR M1H10	S/MAR M2F2	S/MAR M3G5
Источник	Курица	Человек	Китайский хомячок	Человек	Человек	Человек
Длина, п. о.	1200	350	290	550	200	550
Относительное сродство к ЯМ*	Не опр.	12	55	43	1.3	7

* Сродство фрагментов ДНК к ЯМ по отношению к таковой фрагментов ДНК фага λ определялось так, как описано ранее [12].

ность в условиях временной экспрессии. Так, инсуляторы cHS4, scs и scs' блокируют взаимодействие энхансера с промотором, находясь между ними в составе плазмиды [8, 9], а S/MARs, окружающие ген *ароВ*, и инсулятор из ретротранспозона *gypsy* такой активности не проявляют [4, 5].

Ранее в нашей лаборатории были выделены, картированы и частично охарактеризованы несколько десятков S/MAR-элементов из геномов человека и китайского хомячка. Эти последовательности различались по длине, коэффициентам связывания с ЯМ и некоторым другим характеристикам [10–13]. В данной работе мы исследовали влияние некоторых из них в комбинациях с другими регуляторными элементами на экспрессию репортерного гена люциферазы.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования были выбраны S/MAR-элементы с различными свойствами: средний по длине и сродству к ядерному матриксу элемент M0A7; короткий, с высоким сродством элемент M0B9; длинный, с высоким сродством элемент M1H10; короткий (M2F2) и длинный (M3G5) элементы с низким сродством к ЯМ (таблица). Эти фрагменты ДНК ранее были отобраны по их способности связываться с ЯМ [10, 12, 13], что не исключает, однако, наличия у них других активностей, в том числе промоторной, энхансерной или сайленсерной.

Известно, что многие промоторы способны функционировать в качестве инсуляторов. Так, из десяти известных последовательностей генома *Drosophila melanogaster*, проявляющих активность инсулятора, шесть включают в себя промоторы [2, 14], а некоторые промоторы *Saccharomyces cerevisiae* играют роль элементов, ограничивающих зоны хроматина с различной структурой и активностью [15].

Чтобы исключить ошибки, связанные с возможным влиянием собственной промоторной активности S/MAR-элементов на их инсуляторную активность, фрагменты M0A7, M1H10 и M2F2 (таблица) были тестированы на наличие у них промоторной активности. Для этого они были клонированы в вектор pGL3BV (не содержащий

ни энхансера, ни промотора) перед геном люциферазы (рис. 1а) и трансфицированы в клетки линии CHO. Результаты измерения уровня временной экспрессии люциферазы, приведенные на рис. 2а, свидетельствуют об отсутствии у всех трех S/MAR-элементов промоторной активности в данной системе. Не была обнаружена промоторная активность в условиях транзientной трансфекции и у инсулятора cHS4 и его фрагментов [8, 16]. Видимо, промоторная активность не является универсальным свойством этих элементов.

Наличие инсуляторной активности у исследуемой последовательности проявляется в системе временной экспрессии как снижение уровня экспрессии репортерного гена в том случае, когда эта последовательность находится между промотором и энхансером. Достоверность этого эффекта оценивается по сравнению с уровнем экспрессии, наблюдаемым при трансфекции конструкцией, не содержащей вставки между энхансером и промотором. Такой эффект, однако, может быть обусловлен не только инсуляторной, но и сайленсерной активностью участка ДНК. Сайленсер определяется как элемент генома, способный подавлять активность промотора независимо от его положения и ориентации относительно природного или гетерологичного промотора [17]. Иными словами, сайленсер – это элемент, обладающий активностью, обратной активности энхансера. Сайленсерной активностью обладает, например, фрагмент (П/Ш-Ins)Q инсулятора cHS4 [8]. В то же время фрагменты ДНК, помимо активности S/MAR-элементов, могут обладать и энхансерной активностью. Если в составе фрагмента такой энхансер оказывается ближе к промотору репортерного гена, чем предполагаемый инсулятор, то действие инсулятора не будет на него распространяться.

Чтобы исследовать подобные возможности, мы клонировали S/MAR-элементы M0A7, M0B9, M1H10, M2F2 и M3G5 в вектор pGL3PV перед промотором SV40 (рис. 1б) и провели серию трансфекций в клетки линии CHO. В результате этой проверки ни энхансерной, ни сайленсерной активности в условиях временной экспрессии ни у одного из S/MAR-элементов обнаружено не было (рис. 2б).

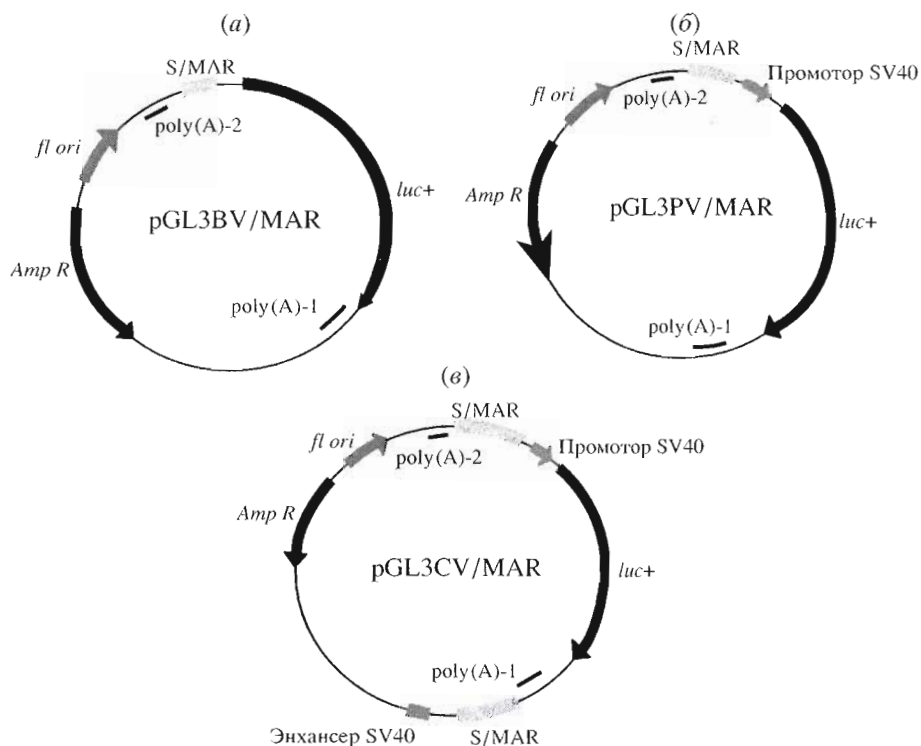


Рис. 1. Схематическое изображение использованных в работе плазмидных конструкций. Конструкции получены на основе векторов серии pGL3 (Promega). (а) Плазмиды серии pGL3BV/MAR получены встраиванием S/MAR-элементов на место промотора репортерного гена люциферазы и предназначены для измерения промоторной активности S/MARs; (б) плазмиды серии pGL3PV/MAR получены встраиванием S/MAR-элементов перед промотором репортерного гена люциферазы и предназначены для измерения энхансерной активности S/MARs по отношению к раннему промотору вируса SV40; (в) плазмиды серии pGL3CV/MAR получены встраиванием S/MAR-элементов с двух сторон от репортерного гена люциферазы с промотором так, чтобы отделить их от энхансера с обеих сторон. Предназначены для измерения способности S/MARs блокировать действие энхансера, то есть его активности как инсулятора. *luc+* – репортерный ген люциферазы; poly(A) – участки полиадезиллирования; *AmpR* – ген устойчивости к ампициллину; *fl ori* – участок начала репликации фага f1.

По крайней мере некоторые инсуляторы способны блокировать действие энхансера также и в условиях временной экспрессии, причем проявляют максимальную активность в том случае, когда ограничивают энхансер в составе плазмиды с обеих сторон [8, 9]. Для проверки наличия у них инсуляторной активности, S/MAR-элементы M0A7, M0B9, M1H10, M2F2 и M3G5 были клонированы в вектор pGL3CV таким образом, чтобы ограничивать энхансер с обеих сторон (рис. 1в). Представленные на рис. 2в результаты указывают на способность S/MAR-элементов M1H10 и M2F2 заметно блокировать активацию энхансером SV40 его промотора. Предварительная проверка, не обнаружившая других активностей (см. выше), подтверждает, что здесь мы наблюдаем именно инсуляторподобную активность. Сравнение свойств этих S/MAR-элементов – M1H10 с высоким и M2F2 с низким сродством к ЯМ – позволяет предположить, что сила взаимодействия с ЯМ *in vitro* не коррелирует с инсуляторной активностью в условиях временной экспрессии. Способность S/MARs блокировать энхансер в составе плазмиды указы-

вает на то, что эти элементы не нуждаются в хромосомном окружении для проявления инсуляторной активности.

Инсулятор cHS4 в данной системе инсуляторной активности не проявляет (рис. 2в), что, по-видимому, связано с его тканеспецифичностью. По результатам работы [8], cHS4 активен в эритроидных клетках и практически неактивен в фибробlastах. Возможно, в других неэритроидных клетках, в том числе и в клетках линии CHO, он также неактивен. Аналогично, S/MAR-элементы M0A7, M0B9 и M3G5, не обладающие инсуляторной активностью в клетках CHO, могут проявлять эту активность в клетках других типов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование и трансформация штаммов *E. coli*, выделение плазмидной ДНК, электрофорез в агарозном геле и другие стандартные процедуры осуществляли по описанным методикам [18].

Клонирование S/MAR-элементов проводили в репортерные плазмиды серии pGL3 (Promega).

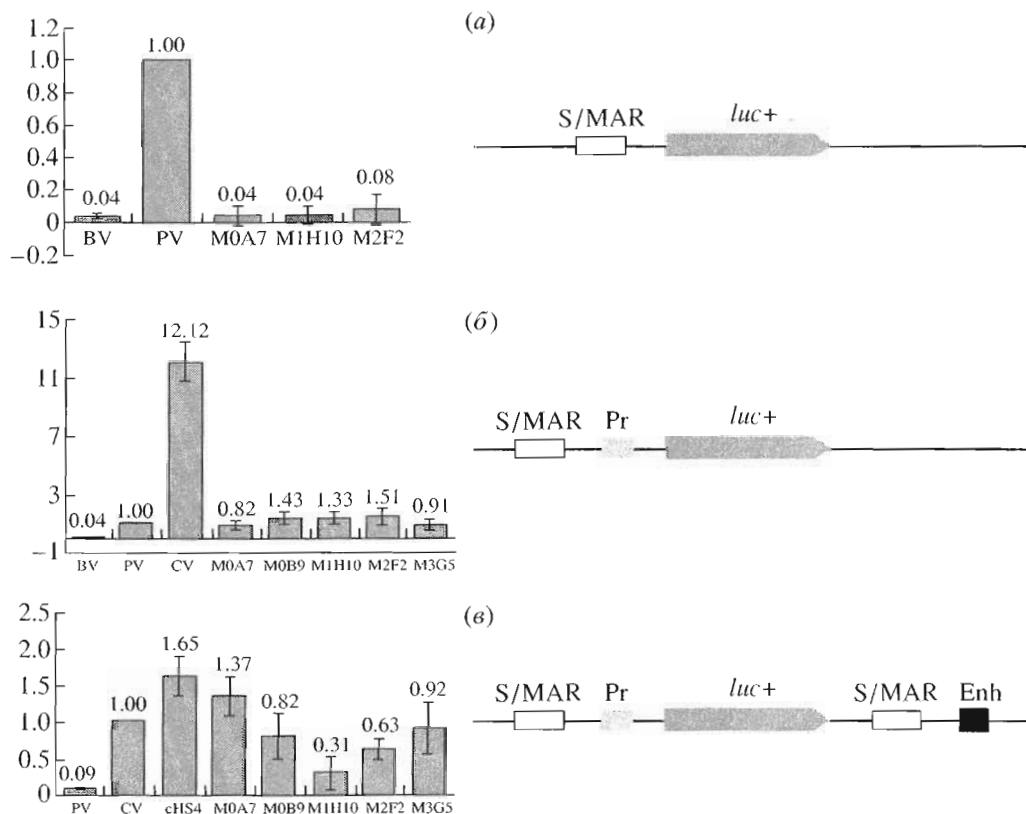


Рис. 2. Промоторная (а), энхансерная/сайленсерная (б) и инсуляторная (в) активности S/MAR-элементов. По оси ординат отложена относительная интенсивность люминесценции. За единицу приняты: (а, б) активность раннего промотора SV40; (в) активность системы промотор + энхансер вируса SV40. BV – плаزمида pGL3BV, не содержащая ни промотора, ни энхансера; PV – плазмида pGL3PV, содержащая ранний промотор вируса SV40, но не содержащая энхансера; CV – плазмида pGL3CV с промотором и энхансером вируса SV40. Pr – ранний промотор SV40; Enh – энхансер SV40, luc+ – репортерный ген люциферазы.

Источником S/MAR-последовательностей служили плазмиды pGEM-7Zf(+)/MAR [12], из которых S/MAR-элементы вырезали рестрикцией по сайтам *Xho*I. Контрольную последовательность инсулятора cHS4 вырезали из плазмиды pJC13-1 [19] рестрикцией по сайтам *Xba*I. Клонирование производили в области полилинкеров, присутствующих в векторах серии pGL3 (см. рис. 1).

Клеточную линию из яичника китайского хомячка CHO-K1 (CCL-61) культивировали при 37°C в атмосфере с 5% CO₂ в смеси сред DMEM/RPMI 1640 (1 : 1) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Трансфекцию клеток и измерение активности люциферазы осуществляли как описано ранее [20].

Работа финансировалась грантом для поддержки ведущих научных школ РФ № НШ-2006.2003.4 и грантом INTAS-2001-0279.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Чернов И.П., Акопов С.Б., Николаев Л.Г. // Биоорган. химия. 2004. Т. 30. С. 3–14.

- Kuhn E.J., Geyer P.K. // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2003. V. 15. P. 259–265.
- Namciu S.J., Blochlinger K.B., Fournier R.E. // *Mol. Cell. Biol.* 1998. V. 18. P. 2382–2391.
- Kalos M., Fournier R.E. // *Mol. Cell. Biol.* 1995. V. 15. P. 198–207.
- Nabirochkin S., Ossokina M., Heidmann T. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 2473–2479.
- Antes T.J., Namciu S.J., Fournier R.E., Levy-Wilson B. // *Biochemistry*. 2001. V. 40. P. 6731–6742.
- Scott K.C., Taubman A.D., Geyer P.K. // *Genetics*. 1999. V. 153. P. 787–798.
- Recillas-Targa F., Bell A.C., Felsenfeld G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999. V. 96. P. 14354–14359.
- Dunaway M., Hwang J.Y., Xiong M., Yuen H.L. // *Mol. Cell. Biol.* 1997. V. 17. P. 182–189.
- Акопов С.Б., Николаев Л.Г., Тырсин О., Рызов А.С., Свердлов Е.Д. // *Биоорган. химия*. 1997. Т. 23. С. 727–731.
- Chernov I.P., Akopov S.B., Nikolaev L.G., Sverdlov E.D. // *J. Cell. Biochem.* 2002. V. 84. P. 590–600.
- Nikolaev L.G., Tsevegijn T., Akopov S.B., Ashworth L.K., Sverdlov E.D. // *Nucleic Acids Res.* 1996. V. 24. P. 1330–1336.

13. Николаев Л.Г., Акопов С.Б., Чернов И.П., Глотов Б.О., Эшворт Л.К., Сverdlov E.D. // Докл. РАН. 1998. Т. 361. С. 409–411.
14. Hogga I., Karch F. // *Development*. 2002. V. 129. P. 4915–4922.
15. Donze D., Kamakaka R.T. // *EMBO J.* 2001. V. 20. P. 520–531.
16. Chung J.H., Bell A.C., Felsenfeld G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 575–580.
17. Ogbourne S., Antalis T.M. // *Biochem. J.* 1998. V. 331 (Pt 1). P. 1–14.
18. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbour; CSHL Press, 1989.
19. Chung J.H., Whiteley M., Felsenfeld G. // *Cell*. 1993. V. 74. P. 505–514.
20. 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.

Regulatory Potential of S/MAR Elements in Transient Expression

A. V. Sass, V. M. Ruda, S. B. Akopov,
E. V. Snezhkov, L. G. Nikolaev[#], and E. D. Sverdlov

[#]Phone: +7 (095) 330-7029; fax: +7 (095) 330-6538; e-mail: lev@humgen.siobc.ras.ru
Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997 Russia

S/MARs (scaffold/matrix attachment regions) are the DNA regions that are involved in the interaction with the nuclear matrix and are identified by *in vitro* methods. According to the available information, S/MARs possess an insulating activity, i.e., the ability to block the interaction between the enhancer and promoter *in vivo*, and are, probably, intact insulators or their fragments. Nevertheless, there is still no direct proof for this correspondence. To obtain additional information on the insulator activity of S/MARs, we selected five DNA fragments of different lengths and affinities for the nuclear matrix from the previously constructed library of S/MARs and tested their ability to serve as insulators. Two of five elements exhibited an insulator (enhancer-blocking) activity upon the transient transfection of CHO cells. None of the S/MARs displayed either promoter or enhancer/silencer activities in these cells. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2005, vol. 31, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

Key words: enhancer, insulator, S/MAR, transient expression