

На правах рукописи

УДК 576.315.42

Филоненко Елена Сергеевна

**РАСШИРЕНИЕ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ДОМЕНА  
АЛЬФА-ГЛОБИНОВЫХ ГЕНОВ КУР КАК СЛЕДСТВИЕ  
ХРОМОСОМНОЙ ПЕРЕСТРОЙКИ**

Специальность 03.00.03 – молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2009

Работа выполнена в лаборатории Структурно-функциональной организации хромосом  
Учреждения Российской академии наук Института биологии гена РАН.

**Научный руководитель:** доктор биологических наук Яровая О.В.

**Официальные оппоненты:** доктор биологических наук, профессор  
Карпов В.Л.

кандидат биологических наук  
Коробко И.В.

**Ведущая организация:** Учреждение Российской академии наук  
Институт биорганической химии им. академиков  
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится           ноября 2009 года в           час. на заседании  
Диссертационного совета Д 002.037.01 при Учреждении Российской академии наук  
Институте биологии гена РАН по адресу:  
119334, Москва, ул. Вавилова, д. 34/5

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Учреждения Российской академии  
наук Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН по адресу:  
119991, Москва, ул. Вавилова, д. 32

Автореферат разослан           октября 2009 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Изучение механизмов, контролирующих экспрессию генов высших эукариот, является одной из центральных задач молекулярной биологии. Согласно современным представлениям, активация транскрипции тканеспецифичных генов является многоэтапным процессом, начинающимся с изменения конформации соответствующего геномного домена и заканчивающимся сборкой преинициаторного комплекса (комплексов) на промоторе (промоторах). Геномными доменами в течение многих лет называли протяженные участки хромосом, характеризующиеся различной (зависящей от типа клеточной дифференцировки) чувствительностью к ДНКазе I. В качестве типичных моделей изучались домены бета-глобиновых генов позвоночных животных, домен гена лизоцима кур, домен гена аполипопротеина человека. Во всех этих доменах активации расположенных в них тканеспецифичных генов предшествует изменение хроматинового статуса домена (переход из ДНКазо-устойчивой в ДНКазо-чувствительную конформацию, коррелирующий с повышением уровня ацетилирования гистонов). В течение ряда лет господствовало мнение, что весь геном построен из сходно организованных структурно-функциональных блоков, подобных домену бета-глобиновых генов. Расширение спектра изучаемых геномных моделей продемонстрировало, что эта точка зрения является упрощенной. Были открыты так называемые домены «открытого типа», которые содержат перемежающиеся, а иногда и перекрывающиеся, тканеспецифичные гены и гены «домашнего хозяйства». Эта группа доменов достаточно широко представлена в геноме, и изучение принципов регуляции работы генов, расположенных в доменах «открытого типа», представляется крайне важным. Типичным примером доменов открытого типа является домен альфа-глобиновых генов. Сравнительный анализ геномов 22 видов позвоночных показал, что этот домен высоко консервативен в эволюции и включает кластер собственно альфа-глобиновых генов, расположенных в определённом порядке, и ген домашнего хозяйства *c16orf35*, в котором находится главный регуляторный элемент, контролирующий работу альфа-глобиновых генов. Характерной чертой доменов «открытого типа», в том числе и доменов альфа-глобиновых генов, является независимая от транскрипционного статуса тканеспецифичных генов, входящих в состав домена, высокая чувствительность хроматина к нуклеазному гидролизу. Тем не менее, активации экспрессии альфа-глобиновых генов в эритроидных клетках также предшествуют определенные регуляторные события, осуществляющиеся на уровне всего домена и заключающиеся в изменении пространственной конформации домена и спектра сайт-специфических модификаций гистонов. Значение этих изменений в настоящее время мало изучено. То же можно сказать о принципах функциональной изоляции

различных генов в доменах «открытого» типа. Не изученными являются и механизмы разграничения доменов «открытого типа», которые, как правило, не содержат инсуляторных элементов.

Сравнительный геномный анализ окружения домена альфа-глобиновых генов у различных видов позвоночных показал, что участок, непосредственно соседствующий с альфа-глобиновыми генами, у кур претерпел хромосомную перестройку. Несколько генов-ортологов, граничащих с кластером альфа-глобиновых генов, расположены в инвертированном порядке у курицы по сравнению с человеком и рядом других позвоночных. В результате этого на одной из границ альфа-глобинового домена произошло нарушение консервативного расположения генов и перераспределение установившихся взаимодействий удалённых регуляторных элементов, при этом у кур ген *TMEM8* оказался в непосредственной близости к кластеру альфа-глобиновых генов, тогда как у человека он расположен на расстоянии 170 т.п.н. от него. В настоящей работе показано, что у кур регуляторные элементы гена *TMEM8* вовлечены в регуляторную сеть альфа-глобиновых генов, результатом чего является приобретение геном *TMEM8* эритроидспецифического характера экспрессии. Таким образом, следствием эволюционной перестройки явилось расширение функциональных границ альфа-глобинового домена. Данное наблюдение углубляет наши представления как о принципах работы регуляторных систем доменов «открытого» типа, так и о путях эволюции этих доменов. Именно этим и определяется актуальность темы настоящей работы.

**Цели и задачи исследования.** Целью настоящей работы явилось изучение структурно-функциональной организации ближайшего геномного окружения кластера альфа-глобиновых генов кур. В работе были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Охарактеризовать пространственную организацию 220 т.п.н. локуса 14 хромосомы кур, содержащего кластер альфа-глобиновых генов и фланкирующие его гены домашнего хозяйства.
2. Изучить экспрессию, структуру и хроматиновую конформацию гена *TMEM8*, расположенного в непосредственной близости к кластеру альфа-глобиновых генов у кур.

**Научная новизна и практическая ценность работы.** Настоящая работа вносит существенный вклад в современные представления об организации геномных доменов «открытого» типа и регуляции экспрессии генов в этих доменах. Изучена пространственная организация протяженного фрагмента хромосомы 14 кур, включающего кластер альфа-глобиновых генов и фланкирующие его гены «домашнего» хозяйства. Впервые показано, что

у кур домен альфа-глобиновых генов содержит также не кодирующий глобиновые цепи ген *TMEM8*, оказавшийся в непосредственной близости к кластеру альфа-глобиновых генов в результате геномной инверсии. Продемонстрировано, что *TMEM8* обладает эритроидспецифичным характером экспрессии. Показано, что продукт гена *TMEM8* корректно сплайсируется согласно предсказанной интрон-экзонной структуре, и его транскрипт накапливается при терминальной эритроидной дифференцировке. В одном из интронов гена *TMEM8* кур обнаружен и охарактеризован эритроидспецифический энхансер, который взаимодействует с регуляторными элементами альфа-глобиновых генов. В то же время продемонстрировано, что *TMEM8* не привлекается в активный хроматиновый блок альфа-глобиновых генов. Для активации экспрессии *TMEM8* собирается альтернативный хроматиновый комплекс, использующий ряд регуляторных элементов альфа-глобинового кластера. Это позволяет предположить, что данные регуляторные элементы перемещаются между двумя альтернативными хроматиновыми блоками.

Хотя работа характеризуется четко выраженной фундаментальной направленностью, полученные результаты имеют и определенное практическое значение. В последние годы все чаще стала возникать необходимость создавать клеточные линии и организмы, в геноме которых экспрессируются чужеродные гены (в частности, в биотехнологических целях и целях генной терапии). Осуществление этих задач невозможно без достаточно ясного представления о том, как организованы геномные домены, каким образом осуществляется контроль над транскрипцией генов посредством координированной работы регуляторных систем разных уровней. Результаты настоящей диссертационной работы углубляют существующие представления о геномных доменах открытого типа и, соответственно, расширяют возможности конструирования векторов, адаптированных для обеспечения работы трансгенов в таких доменах.

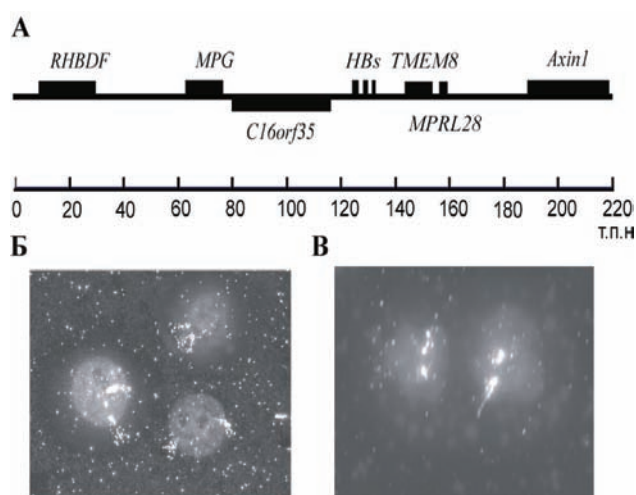
**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы были представлены на XV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "ЛОМОНОСОВ-2008" (Москва, 2008), XVI Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "ЛОМОНОСОВ-2009" (Москва, 2009), Международной научной конференции «Хромосома 2009» (Новосибирск 2009).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ. Из них статей – 3, тезисов докладов и материалов конференций – 2.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 112 страницах, содержит 12 рисунков и 4 таблицы, состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результаты исследования, Обсуждения результатов, Выводов и Списка литературы, включающего 209 источников.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Анализ пространственной организации 220 т.п.н. геномного региона 14 хромосомы кур методом флуоресцентной гибридизации *in situ*.** Нами было проведено исследование пространственной организации 220 т.п.н. геномного фрагмента 14 хромосомы кур, содержащего кластер альфа-глобиновых генов и ряд фланкирующих его генов (Рисунок 1А). Для решения этой задачи нами был использован метод флуоресцентной гибридизации *in situ* на препаратах развёрнутого хроматина (ядерных гало). Этот метод даёт возможность визуализировать петли ДНК, фиксированные своими основаниями на скелетных структурах ядра. В качестве объекта были выбраны культивируемые куриные эритробласты линии HD3 и куриные лимфоидные клетки линии DT40. Ядерные гало были приготовлены посредством солевой экстракции пермеабелизованных ядер, фиксированных на стекле. На препаратах можно видеть корону (гало) петель ДНК, прикрепленных к более ярко окрашенному ядерному матриксу (Рисунок 1). В качестве зондов для гибридизации *in situ* была



**Рисунок 1. Анализ пространственной организации 220 т.п.н. геномного локуса методом флуоресцентной гибридизации *in situ*.**

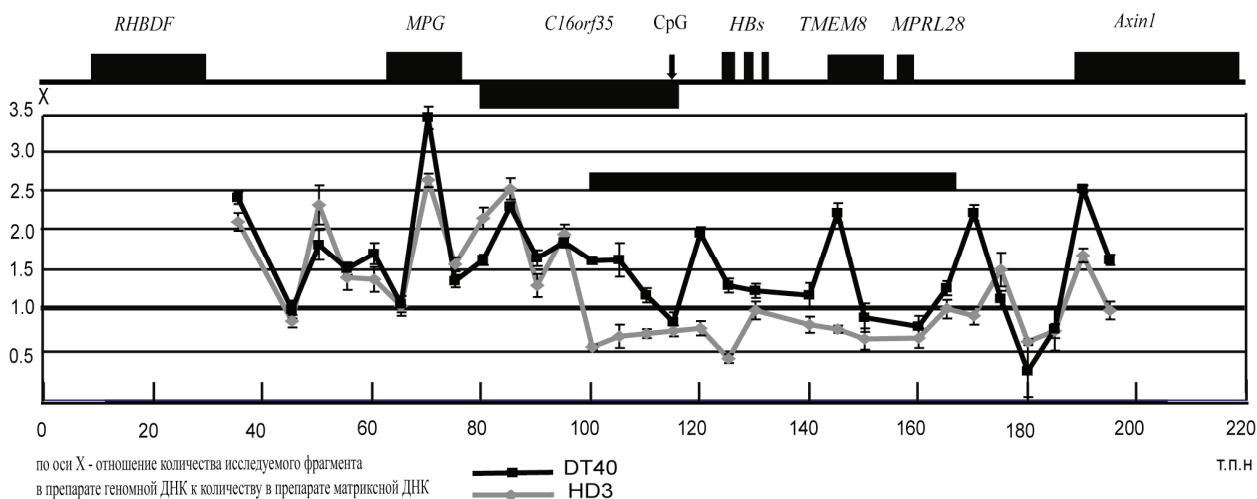
А. Схема изучаемой геномной области. RHBDF- ген, кодирующий эпидермальный фактор роста; MPG- ген, кодирующий метиладенин-ДНК-гликозилазу; C16orf35 - ген домашнего хозяйства с неизвестной функцией; HBs –кластер альфа-глобиновых генов; TMEM8 – ген, кодирующий трансмембранный белок 8; MPRL28– ген, кодирующий белок L 28 митохондриальных хромосом; Axin1 – ген, кодирующий аксин. Б-В. Результаты гибридизации *in situ* на препаратах ядерного гало для лимфоидной DT40 (Б) и эритроидной HD3 (В) линий клеток. В качестве зонда для гибридизации использована ВАС CH261-75C12.

использована ВАС-проба к исследуемой области генома, меченная биотинилированным дезоксицитидином. Для выявления гибридизационного сигнала использовали каскад флуоресцентно меченного авидина и биотинилированные антитела к авидину. Результаты гибридизации, представленные на Рисунке 1, позволяют заключить, что в лимфоидных клетках эта область генома организована в несколько петель, закрепленных на ядерном матриксе. В эритроидных клетках большая часть локуса коллапсирована на структурах ядерного матрикса и выявляется в виде точечного сигнала. Ранее было продемонстрировано, что активация транскрипции тканеспецифичных генов при клеточной дифференцировке коррелирует с пространственной реорганизацией геномных доменов, в границах которых расположены эти гены. Эта реорганизация заключается в перемещении всего домена,

содержащего один или несколько активно транскрибирующихся генов, к ядерному матриксу (Ciejek *et. al.*, 1983; Iarovaia *et. al.*, 2005). В связи с этим было предположено, что наблюдаемый коллапс петли хроматина в куриных эритроблестах является следствием активации тканеспецифичных генов в ходе эритроидной дифференцировки. По всей вероятности, коллапсируются не только альфа-глобиновые гены, но и их окружение.

Однако метод флуоресцентной гибридизации *in situ* хотя и позволяет визуализировать петельную организацию исследуемой области, но не обладает достаточной разрешающей способностью для того, чтобы можно было непосредственно картировать участки прикрепления ДНК к ядерному матриксу.

**Картирование участков прикрепления к ядерному матриксу локуса 14 хромосомы кур, содержащей кластер альфа-глобиновых генов и его ближайшее окружение.** Для установления топографии взаимодействий ДНК с ядерным матриксом в сегменте 14 хромосомы кур, содержащем кластер альфа-глобиновых генов и ряд фланкирующих его генов, нами был использован следующий подход: в исследуемой области были выбраны короткие тест-фрагменты, располагающиеся на расстоянии 5 т.п.н. друг от друга, и методом полуколичественного ПЦР-анализа оценивалась представленность этих фрагментов в препаратах прикреплённой к матриксу ДНК (Рисунок 2). Так как участки



**Рисунок 2. Картирование участков прикрепления ДНК к ядерному матриксу в границах 220 т.п.н. сегмента 14 хромосомы кур, включающего кластер альфа-глобиновых генов и ряд фланкирующих его генов.**

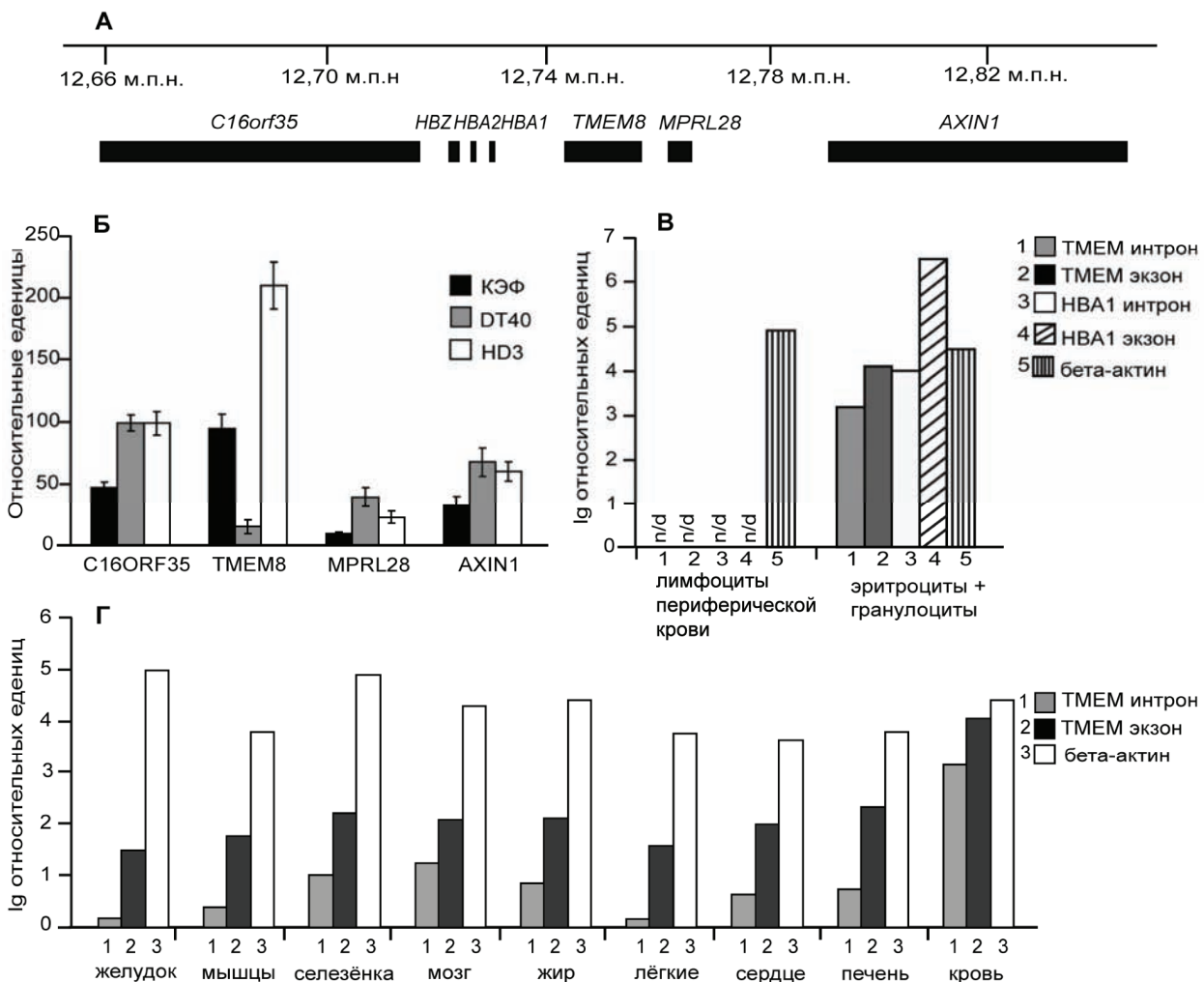
В верхней части рисунка показана схема изучаемой геномной области. В нижней части рисунка показаны результаты ПЦР анализа. Обозначения такие же, как на Рисунке 1. Черный прямоугольник показывает протяженную область, которая целиком прикреплена к ядерному матриксу в клетках HD3. Погрешности – стандартное отклонение от величины среднего по трём независимым экспериментам.

прикрепления к ядерному матриксу разделяются на конститутивные (характерные для всех типов клеток) и тканеспецифичные, то с целью дискриминации различных типов

взаимодействий ДНК с ядерным матриксом проводилось параллельное изучение пространственной организации домена в эритроидных и неэритроидных клетках. Полученные результаты представлены на Рисунке 2 как отношение содержания исследуемых фрагментов в препаратах геномной ДНК к содержанию этих фрагментов в препаратах прилежащей к ядерному матриксу ДНК. Чем ближе к оси абсцисс полученное значение, тем выше представленность в матриксе данной последовательности. Последовательности ДНК, не связанные с матриксом и расположенные в петлях, выявляются в виде пиков. Результаты показали, что в лимфоидных клетках участки прикрепления к ядерному матриксу распределены относительно регулярно в пределах всей исследуемой области и разделяются несвязанными с ядерным матриксом фрагментами ДНК (Рисунок 2). Среднее расстояние между участками прикрепления или, иными словами, размер петель ДНК, составляет 20-30 т.п.н. Участок с координатами 35 – 100 т.п.н (Рисунок 2) организован сходным образом в клетках HD3 и DT40. Эта область содержит гены домашнего хозяйства, которые экспрессируются на относительно низком уровне как в эритроидных, так и в лимфоидных клетках (Iarovaia *et. al.*, 2009). В эритроидных клетках область от 100 до 170 т.п.н., составляющая большую часть исследуемого геномного фрагмента, предпочтительно представлена в препаратах прилежащей к ядерному матриксу ДНК. Анализ полученных результатов позволил заключить, что протяженный фрагмент генома с координатами от 100 до 170 т.п.н. на карте, показанной на Рисунке 2, целиком прикреплен к ядерному матриксу в эритроидных клетках. В пределах прикрепленного к ядерному матриксу протяженного геномного фрагмента локализуются домен альфа-глобиновых генов, а также гены *MPRL28*, *TMEM8* и часть гена *C15orf35*.

**Изучение транскрипционного статуса генов, окружающих кластер альфа-глобиновых генов кур.** Нами было проведено сравнение транскрипционного профиля генов *C16orf35*, *TMEM8*, *MPRL28* и *AXIN1* в эритроидных и неэритроидных клетках кур. С этой целью была выделена тотальная РНК из эмбриональных куриных фибробластов (КЭФ), лимфоидной (DT40) и эритроидной линии клеток (HD3). Используя метод обратной транскрипции с последующей ПЦР в реальном времени с TaqMan пробами, мы установили относительную представленность интронных регионов вышеперечисленных генов в данных образцах РНК. Результаты, представленные на Рисунке 3Б, показали, что уровень транскрипции генов *C16orf35* и *MPRL28* не отличается от уровня транскрипции *AXIN1*, не представленного во фракции прилежащей к ядерному матриксу ДНК, во всех типах клеток. Ген *TMEM8*, в отличие от генов, являющихся, по-видимому, генами домашнего хозяйства (*C16orf35*, *MPRL28* и *AXIN1*), транскрибировался в пролиферирующих клетках HD3 более





**Рисунок 3. Экспрессионный профиль *κTMEM8* и других генов, фланкирующих кластер альфа-глобиновых генов, в различных клетках и тканях кур.**

А. Схема, показывающая расположение исследуемых генов. Шкала показывает реальные расстояния на 14 хромосоме кур.

Б. Экспрессия исследуемых генов в клетках различных линий. Исследуемые гены обозначены на оси X. Столбцы на диаграмме показывают нормализованный уровень мРНК каждого исследуемого гена. Относительная единица - 0.1% от установленного числа копий 18S рРНК. Погрешности – стандартное отклонение от величины среднего по четырём независимым экспериментам.

В. Относительный уровень интронных и экзонных последовательностей РНК *κTMEM8* и *HBA1* генов, выделенной из лимфоцитов периферической крови и из образцов, содержащих смесь эритроцитов и гранулоцитов (главным образом эритроцитов), полученных из образцов крови взрослых кур. Уровень экзонных последовательностей бета-актина показан для сравнения. Результаты были нормированы как описано выше (секция «Б»). «n/d» означает, что тест-фрагменты не детектировались при анализе образцов РНК.

Г. Экспрессия *κTMEM8* в различных тканях взрослой курицы. Все обозначения как в секции «Б».

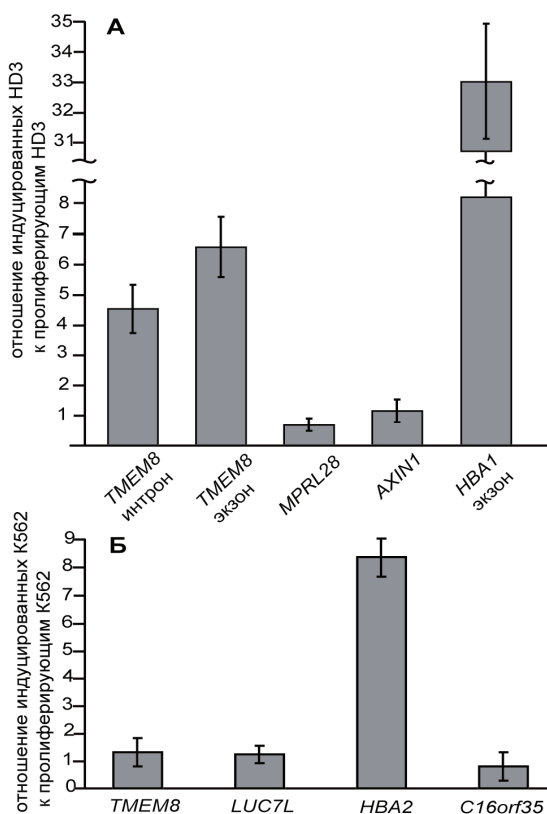
интенсивно, чем в КЭФ и клетках линии DT40. Высокий уровень транскрипции *TMEM8* в эритроидных клетках и его репрессия в лимфоидных клетках позволили предположить, что по характеру экспрессии этот ген является эритроидспецифичным. Особый интерес к этому гену связан с тем, что в результате геномной инверсии этот ген в геноме кур оказался сближен с доменом альфа-глобиновых генов.

**Изучение экспрессии гена *TMEM8* в различных типах тканей.** *TMEM8* (а также: *M83*, *TMEM6*) – высококонсервативный ген, кодирующий белок с 5 трансмембранными доменами (Motohashi *et al.*, 2000). Белковый продукт этого гена был охарактеризован только для человека (UniProtKB: Q9HCN3). У человека *TMEM8* (далее обозначенный как *чTMEM8* для *TMEM8* человека), экспрессируется на высоком уровне в покоящихся Т-лимфоцитах (Motohashi *et. al.*, 2000). Чтобы проверить, сохранил ли *TMEM8* свои функции в куриных клетках, мы проанализировали образцы РНК, приготовленные из эритроцитов и лимфоцитов периферической крови (ЛПК) кур на предмет присутствия интронных и экзонных последовательностей *TMEM8* (далее обозначенный как *кTMEM8* для *TMEM8* кур). Результаты анализа (Рисунок 3В) показали, что в куриных лимфоцитах *кTMEM8* либо не транскрибируется, либо транскрибируется на незначительном уровне, в то время как в эритроцитах наблюдался высокий уровень транскрипции *кTMEM8*.

В следующей серии экспериментов была изучена экспрессия *кTMEM8* в тканях взрослой курицы. Образцы РНК были выделены из тканей желудка, мышц, селезёнки, мозга, жировой ткани, лёгких, сердца, печени и периферической крови. Количественный анализ содержания интронных и экзонных последовательностей *кTMEM8* и экзонной последовательности β-актина в образцах РНК, был проведен с использованием метода обратной транскрипции с последующей ПЦР в реальном времени. Результаты, представленные на Рисунке 3Г, позволили заключить, что уровень транскрипции *кTMEM8* (как следует из сравнения обогащенности образцов РНК интронными последовательностями) как минимум в 1000 раз выше в образцах РНК из периферической крови, по сравнению с другими исследованными тканями (Рисунок 3Г). В предыдущем эксперименте было показано, что *кTMEM8* не экспрессируется в лимфоидных клетках. Следовательно, высокий уровень экспрессии *кTMEM8* в периферической крови обусловлен его экспрессией в эритроцитах. Различие становится более значительным (в 10 раз) после индукции эритробластов к терминальной дифференцировке (см. следующий раздел).

**Индукция экспрессии *TMEM8* при терминальной эритроидной дифференцировке.** Трансформированные AEV куриные проэритробласты (линия HD3) являются моделью ранней стадии дифференцировки кровяных клеток кур по эритроидному пути (Beug *et. al.*, 1979). Они не экспрессируют глобины, хотя кластер альфа-глобиновых генов находится в активной хроматиновой конформации (Klochkov *et. al.*, 2009). После индукции дифференцировки клетки HD3 останавливают пролиферацию и начинают экспрессировать «взрослые» глобиновые гены (Gavrilov & Razin, 2008). С целью выяснить, стимулируется ли транскрипция *кTMEM8* при дифференцировке клеток линии HD3, была

проанализирована относительная представленность интронных и экзонных последовательностей *κTMEM8* в образцах тотальной РНК, изолированной из пролиферирующих и дифференцированных клеток линии HD3. Полученные результаты (Рисунок 4А) ясно показывают, что транскрипция *κTMEM8*, также как и гена *HBA1*, в значительной степени индуцируется при терминальной дифференцировке. Уровень экспрессии генов *MPRL28* и *AXIN1* изменяется в процессе дифференцировки клеток линии HD3 незначительно.



**Рисунок 4. Индукция экспрессии *κTMEM8* при терминальной дифференцировке в культуре куриных эритроцитов.**

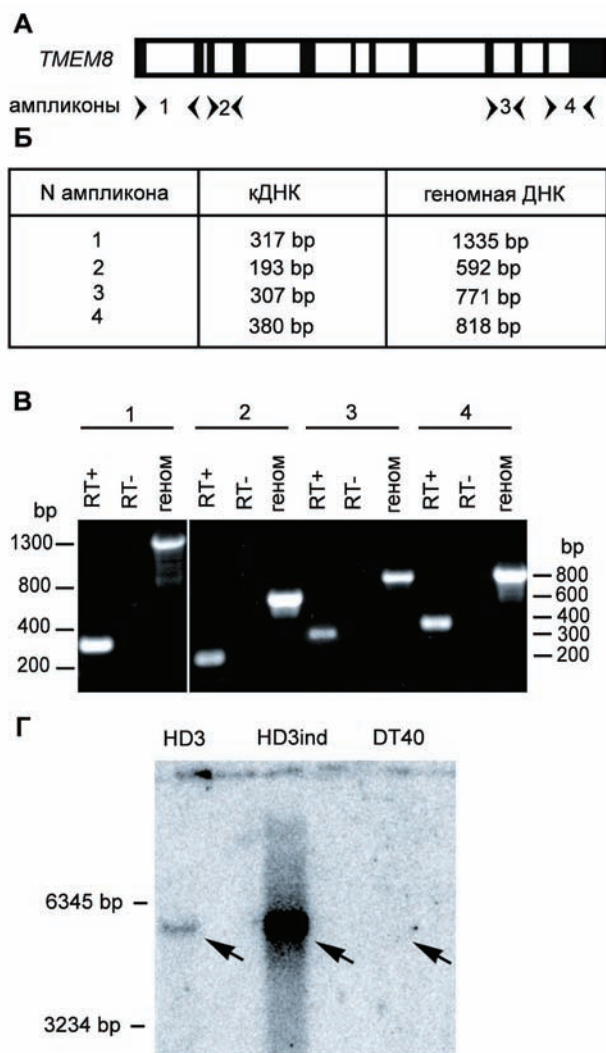
А. Изменение в уровне экспрессии *HBA1*-глобинового гена и генов, расположенных за кластером альфа-глобиновых генов при индукции терминальной дифференцировки в линии клеток куриных эритроцитов (HD3). Столбцы на диаграмме представляют отношение уровня экспрессии каждого гена в индуцированных клетках линии HD3 к уровню экспрессии этих же генов в пролиферирующих клетках HD3. Погрешности представляют собой стандартное отклонение от величины среднего по 4 независимым экспериментам.

Б. Изменение в уровнях экспрессии *κTMEM8*, *HBA2* и генов, фланкирующих кластер альфа-глобиновых генов, при индукции терминальной эритроидной дифференцировки в линии клеток эритроцитов человека K562. Обозначения такие же, как для секции «А».

В следующем эксперименте был проанализирован уровень экспрессии *κTMEM8* в линии клеток эритролейкемии человека K562 (Lozzio *et al.*, 1979) до и после индукции терминальной эритроидной дифференцировки. Анализ образцов РНК из пролиферирующих и дифференцированных клеток K562 (Рисунок 4Б) продемонстрировал, что уровень транскрипции *κTMEM8* не изменяется при индукции дифференцировки K562. Таким образом, экспрессионный профиль *κTMEM8* и *κTMEM8* принципиально отличен.

**Характеристика транскрипта *κTMEM8*.** В отличие от человека, где и мРНК и белковый продукт гена *κTMEM8* были охарактеризованы (Motohashi *et al.*, 2000), *κTMEM8* был найден как открытая рамка считывания только биоинформатическими методами. Был поставлен вопрос о том, корректно ли сплайсируется транскрипт открытой рамки

считывания, и можно ли идентифицировать мРНК, кодируемую этим геном, методом Нозерн-блот анализа. На основании предсказанной интрон-экзонной структуры, *κTMEM8* (Ensembl protein coding Gene: ENSGALG00000007471 (UniProtKB/TrEMBL: Q8UWG9\_CHICK)) были подобраны 4 пары праймеров для ПЦР, расположенные в различных экзонах *κTMEM8* (Рисунок 5А-В). С использованием этих праймеров



**Рисунок 5. Анализ транскрипта *κTMEM8*.**

А. Схема, иллюстрирующая интрон-экзонную структуру *κTMEM8* (согласно Ensembl Genome Browser) и позиции тест-ампликонов.

Б. Ожидаемый размер ПЦР-продуктов при амплификации с κДНК и геномной ДНК.

В. Результаты ПЦР-амплификации. Номера (1-4) над фотографией отражают номер ампликона в соответствии с секцией «А».

«RT+» – ПЦР выполненная на матрице, полученной в результате реакции обратной транскрипции; «RT-» – контрольный эксперимент, в котором ПЦР была выполнена на матрице, полученной в результате реакции обратной транскрипции без добавления ревертазы. Необходимо отметить, что ПЦР-продукты, полученные на матрице κДНК (дорожки «RT+») имеют размеры, ожидаемые для матриц с вырезанными интронами.

Г. Нозерн-блот гибридизация экзонных проб к *TMEM8* с поли-А+ РНК, выделенной из пролиферирующих HD3, дифференцированных HD3 (HD3ind) и клеток линии DT40. РНК *κTMEM8* показана стрелками.

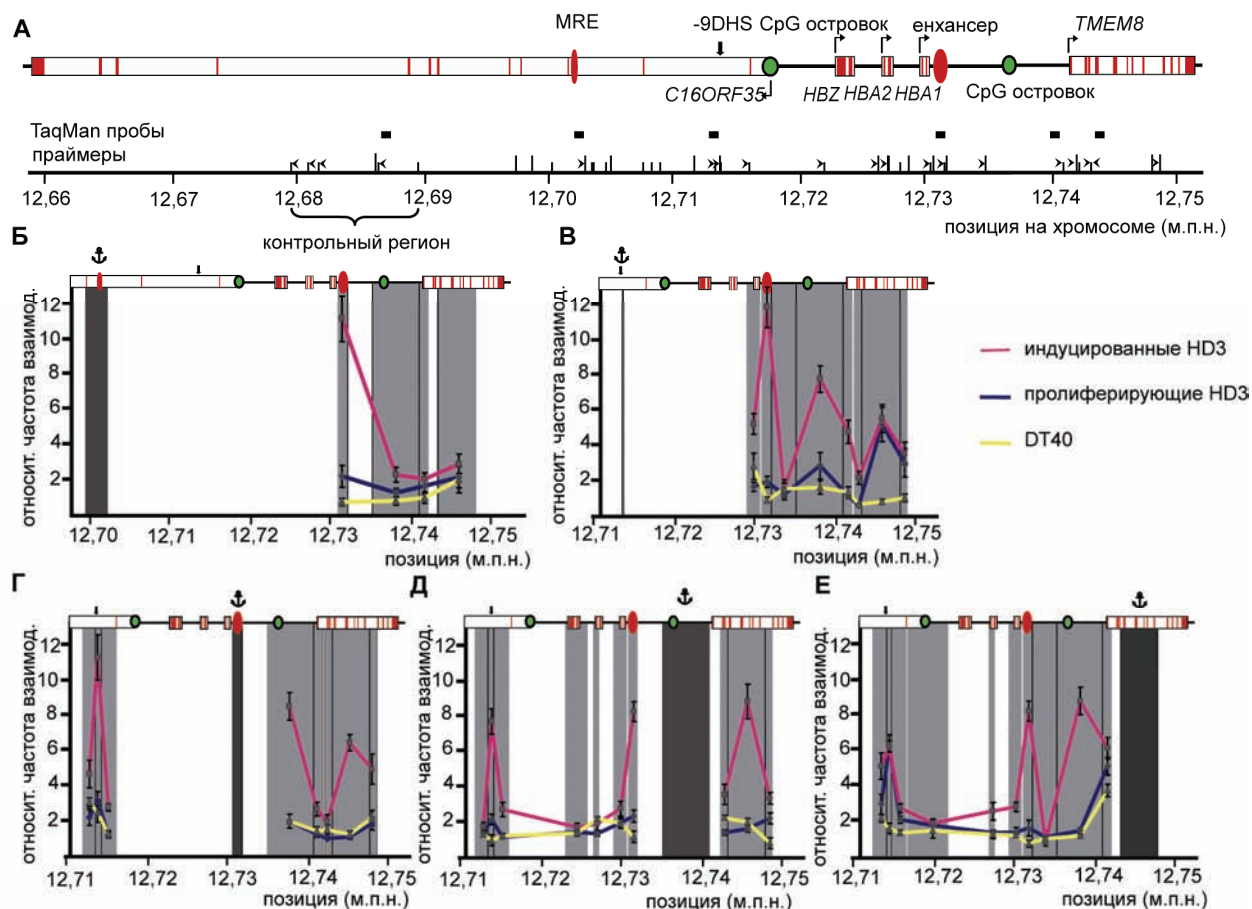
было продемонстрировано, что интроны 1, 3, 9 и 11 *κTMEM8* сплайсируются корректно. Затем был проведён Нозерн-блот анализ образцов поли-А+ РНК, выделенных из пролиферирующих и дифференцированных клеток HD3. *κTMEM8*-специфичная проба позволила идентифицировать один транскрипт размером ~5 т.п.н., присутствующий в обеих пробах РНК (Рисунок 5Г). Интенсивность полосы в дорожке, содержащем поли-А+ РНК из дифференцированных клеток HD3, была намного выше. В дорожке, содержащей поли-А+ РНК из клеток линии DT40, специфический транскрипт отсутствует.

Таким образом, были исследованы пространственная организация, характер прикрепления к ядерному матриксу и профиль экспрессии ближайшего геномного окружения кластера альфа-глобиновых генов. В результате этого исследования было

обнаружено, что для гена *κТМЕМ8*, расположенного в непосредственной близости к кластеру альфа-глобиновых генов, характерны предпочтительная экспрессия в эритроидных клетках, повышение уровня экспрессии при индукции терминальной эритроидной дифференцировки и типичные для эритроидных клеток особенности пространственной организации в клеточном ядре. Кроме того, мы показали, что транскрипт *κТМЕМ8* сплайсируется согласно предсказанной интрон-экзонной структуре и накапливается в эритроидных клетках.

**Изучение хроматиновой конформации *κТМЕМ8* методом 3С.** В следующей группе экспериментов мы проверили, контролируется ли экспрессия *κТМЕМ8* известными регуляторными элементами домена альфа-глобиновых генов. Ранее было показано, что в дифференцированных клетках HD3 собирается активаторный комплекс (активный хроматиновый блок (de Laat *et. al.*, 2003)), включающий расположенный перед кластером альфа-глобиновых генов главный регуляторный элемент (MRE), эритроидспецифический сайт гиперчувствительности к ДНКазе I, расположенный на расстоянии 9 т.п.н. перед кластером альфа-глобиновых генов (-9 DHS), CpG-островок, находящийся перед кластером альфа-глобиновых генов, промотор гена *HBA2* и эритроидспецифический энхансер альфа-глобинового домена (Gavrilov & Razin, 2008). Простейшее предположение заключалось в том, что *κТМЕМ8* также привлекается в этот хроматиновый блок. Для проверки этого предположение был проведён количественный 3С анализ (Hagege *et. al.*, 2007; Gavrilov & Razin, 2008). Метод 3С позволяет определить относительное расстояние между фрагментами хроматина и показать, сближены ли в пространстве те или иные удалённые регуляторные элементы. Метод основан на том, что удалённые геномные последовательности, пространственно сближенные и объединённые белковыми комплексами, могут быть химически сшиты. После обработки «сшитых» комплексов рестриктазами продукты рестрикции лигируют. «Сшитые» фрагменты ДНК лигируются друг с другом с большей эффективностью, чем другие. ПЦР в реальном времени с использованием праймера к интересующему фрагменту, обозначенного как якорный, в сочетании с праймерами, специфичными к другим продуктам лигирования, позволяет количественно измерить частоту лигирования различных рестриктных фрагментов с якорным и таким образом оценить относительное расстояние между исследуемыми последовательностями. Было проведено параллельное исследование пространственной организации геномной области, содержащей регуляторные элементы альфа-глобинового кластера и гена *κТМЕМ8*, в лимфоидных клетках линии DT40 и пролиферирующих и терминально дифференцированных культивируемых эритроидных клетках линии HD3. Для разрезания исследуемой области на фрагменты были использованы рестриктазы Bam HI и

BglIII, имеющие «совместимые» липкие концы. Расположение праймеров и TaqMan проб показано на Рисунке 6А. Сначала якорь был расположен на фрагменте, содержащем MRE, и анализировались частоты лигирования этого фрагмента с фрагментами, расположенными



**Рисунок 6. Анализ взаимодействия *κ*TMEM8 с регуляторными элементами альфа-глобинового домена в незритроидных и эритроидных линиях клеток**

А. Рестриктивная карта исследуемого региона. Шкала отражает реальные расстояния на 14 хромосоме кур. Прямоугольники - гены (красными линиями обозначены экзоны, стрелки указывают направление транскрипции); красные овалы – MRE и энхансер; чёрная вертикальная стрелка – -9 DHS; зелёные овалы – CpG островки. Длинные и короткие вертикальные линии над шкалой расстояний показывают расположение сайтов рестрикции BamHI и BglIII соответственно. Расположение праймеров и TaqMan проб, использованных для 3С анализа, показано соответственно чёрными горизонтальными стрелками и прямоугольниками.

Б-Е. Относительная частота взаимодействия между якорным фрагментом (Б) – MRE, (В) – -9 Кб DHS, (Г) – энхансером, расположенным за кластером альфа-глобиновых генов, (Д) – CpG островком, расположенным между кластером альфа-глобиновых генов и *κ*TMEM8, (Е) – средней частью *κ*TMEM8 и другими фрагментами исследуемого локуса. По оси «х» обозначено расположение фрагментов в соответствии со шкалой на рестриктивной карте. м.п.н. – миллионы пар нуклеотидов. В верхней части каждого графика дана схема домена с такими же обозначениями как в секции «А». Результаты 3С анализа для индуцированных HD3, пролиферирующих HD3 и DT40 показаны красными, синими и жёлтыми линиями соответственно. Чёрные прямоугольники на заднем фоне со значком якоря сверху демонстрируют позицию якорного фрагмента, светло-серые прямоугольники – тест-фрагментов. Границы между соседними фрагментами обозначены чёрными линиями. Области с белым фоном не анализировались. По оси «Y» показаны частоты сшивки между анализируемыми фрагментами, нормированные относительно частот сшивки между фрагментами из контрольной области. Линии погрешностей соответствуют стандартному отклонению от величины среднего по 4 независимым экспериментам.

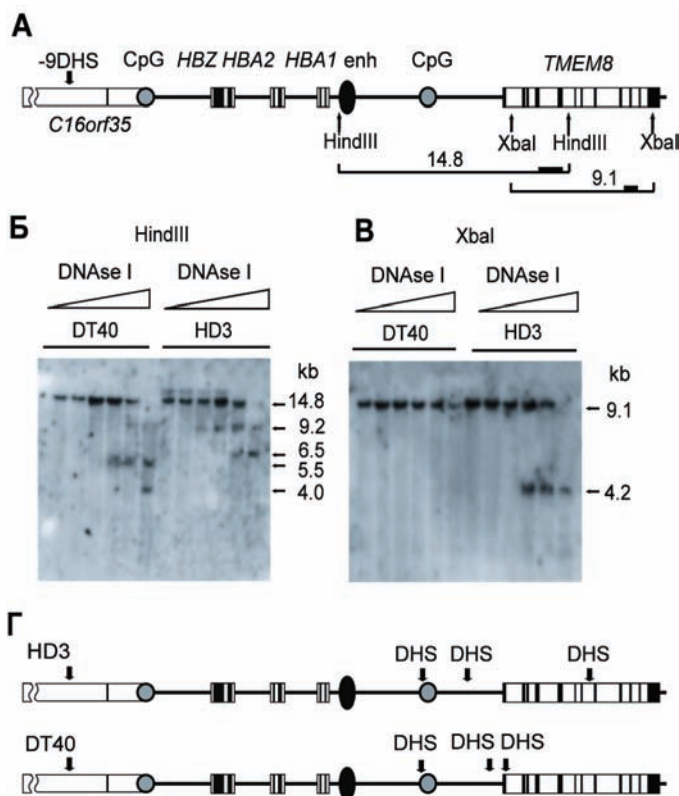
за кластером альфа-глобиновых генов начиная с энхансера. Было продемонстрировано, что в дифференцированных клетках HD3 MRE взаимодействует с энхансером, что подтверждает полученные ранее результаты (Gavrilov & Razin, 2008). Ни *κTMEM8*, ни фрагменты ДНК, фланкирующие *κTMEM8*, не показали увеличения частоты лигирования с якорным фрагментом, содержащим MRE (Рисунок 6Б). Принципиально иная картина наблюдалась при постановке якоря на фрагмент ДНК, содержащий сайт гиперчувствительности к ДНКазе I (-9 DHS). В клетках линии HD3, помимо взаимодействия с энхансером, этот фрагмент предпочтительно взаимодействовал с двумя фрагментами, расположенными правее энхансера, а именно, с фрагментом, содержащим CpG островок, расположенным перед *κTMEM8*, и фрагментом ДНК, расположенным в середине гена *κTMEM8*. Частота лигирования -9 DHS с серединой *κTMEM8* была одинаковой для пролиферирующих и дифференцированных HD3 клеток, в то время как частота лигирования -9 DHS с CpG островком была выше (в 3.5 раза) в дифференцированных клетках, по сравнению с пролиферирующими HD3. Ни одно из этих взаимодействий не наблюдалось для линии клеток DT40 (Рисунок 6В). При постановке якоря на эритроидспецифичный энхансер наблюдалась высокая частота лигирования якорного фрагмента с CpG-островком, расположенным перед *κTMEM8*, и со средней частью гена *κTMEM8* в дифференцированных клетках HD3 (Рисунок 6Г). Также для этого типа клеток наблюдался повышенный уровень лигирования энхансера с -9 DHS (что согласуется с ранее опубликованными данными (Gavrilov & Razin, 2008)). Вышеописанные ассоциации не наблюдались ни для пролиферирующих клеток HD3, ни для клеток линии DT40. При одновременном анализе результатов, представленных на Рисунке 6В и Г можно заключить, что -9 DHS и эритроидспецифичный энхансер альфа-глобинового домена вовлечены в регуляцию экспрессии *κTMEM8* в пролиферирующих (только -9 DHS) и дифференцированных (и -9 DHS, и эритроидспецифичный энхансер) клетках линии HD3. Мишени вышеописанных регуляторных элементов, по всей вероятности, локализуются внутри 6 т.п.н. Bam HI-Bgl II фрагмента, содержащего CpG островок, и 6 т.п.н. Bam HI фрагмента, располагающегося во внутренней части *κTMEM8*. Для проверки этого заключения якорь был помещён на каждый из двух фрагментов. Данные, представленные на Рисунках 6Д и Е, показывают, что в дифференцированных клетках линии HD3 интересующие нас фрагменты взаимодействуют друг с другом, с -9 DHS и с эритроидспецифичным энхансером. В соответствии с наблюдениями, сделанными для якоря, расположенного на -9 DHS (Рисунок 6В), в реципрокных экспериментах было показано, что частота ассоциации CpG островка с -9 DHS ниже в пролиферирующих клетках HD3, по сравнению с клетками HD3, индуцированных к терминальной эритроидной

дифференцировке (Рисунок 6Д). Частота лигирования средней части гена *κТМЕМ8* с -9 DHS приблизительно одинакова для пролиферирующих и дифференцированных клеток HD3 (сравнение Рисунков 6В и Е). Таким образом, в пролиферирующих и в терминально дифференцированных клетках HD3 средняя часть гена *κТМЕМ8* взаимодействует с -9 DHS. В то же время не наблюдалось взаимодействие ни одного из исследованных фрагментов с промоторами взрослых альфа-глобиновых генов. Этот факт свидетельствует о том, что, по всей вероятности, существует две альтернативные пространственные конфигурации альфа-глобинового домена. -9 DHS и эритроидспецифичный энхансер могут активировать либо глобиновые гены, либо ген *κТМЕМ8*.

Для увеличения разрешения 3С анализа эксперимент с якорем, расположенным на эритроидспецифичном энхансере, был повторён с использованием рестриктазы MboI. Результаты 3С анализа (см. диссертацию) позволили заключить, что энхансер домена альфа-глобиновых генов взаимодействует с CpG островком *per se*. Что касается самого гена *κТМЕМ8*, то сайты взаимодействия с эритроидспецифическим энхансером были картированы внутри 3 и 8 интронов этого гена.

**Картирование участков гиперчувствительности к ДНКазе I в области гена *κТМЕМ8*.** Регуляторные элементы генома часто колокализуются с сайтами гиперчувствительности к ДНКазе I. Для картирования сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I, в области, фланкирующей домен альфа-глобиновых генов справа, был использован метод непрямого мечения концов ДНК (Wu *et. al.*, 1979). Схема эксперимента и полученные результаты представлены на Рисунке 7. Пермеабелизированные клетки (DT40 и пролиферирующие HD3) были обработаны увеличивающимися количествами ДНКазы I. После очистки ДНК обрабатывалась рестриктазами Hind III, либо Xba I и анализировалась посредством гибридизации по Саузерну с пробами, узнающими правые концы 14.8 т.п.н. Hind III фрагмента, содержащего в себе CpG островок, расположенный перед *κТМЕМ8*, и 9.1 т.п.н. Xba I фрагмента, включающего всю внутреннюю часть *κТМЕМ8* (Рисунок 7А). Анализ результатов гибридизации позволил локализовать 3 сайта гиперчувствительности к ДНКазе I для линии клеток DT40 и 3 сайта гиперчувствительности к ДНКазе I для линии клеток HD3 (Рисунок 7Г). Только один из обнаруженных сайтов гиперчувствительности был общим для обеих линий клеток. Сильный эритроидспецифичный сайт гиперчувствительности к ДНКазе I был обнаружен в середине открытой рамки считывания *κТМЕМ8* между 7 и 8 экзонами.





**Рисунок 7. Картирование сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I (DHS) внутри гена *κTMEM8* и в регионе, фланкирующем *κTMEM8*, в линиях клеток DT40 и HD3.**

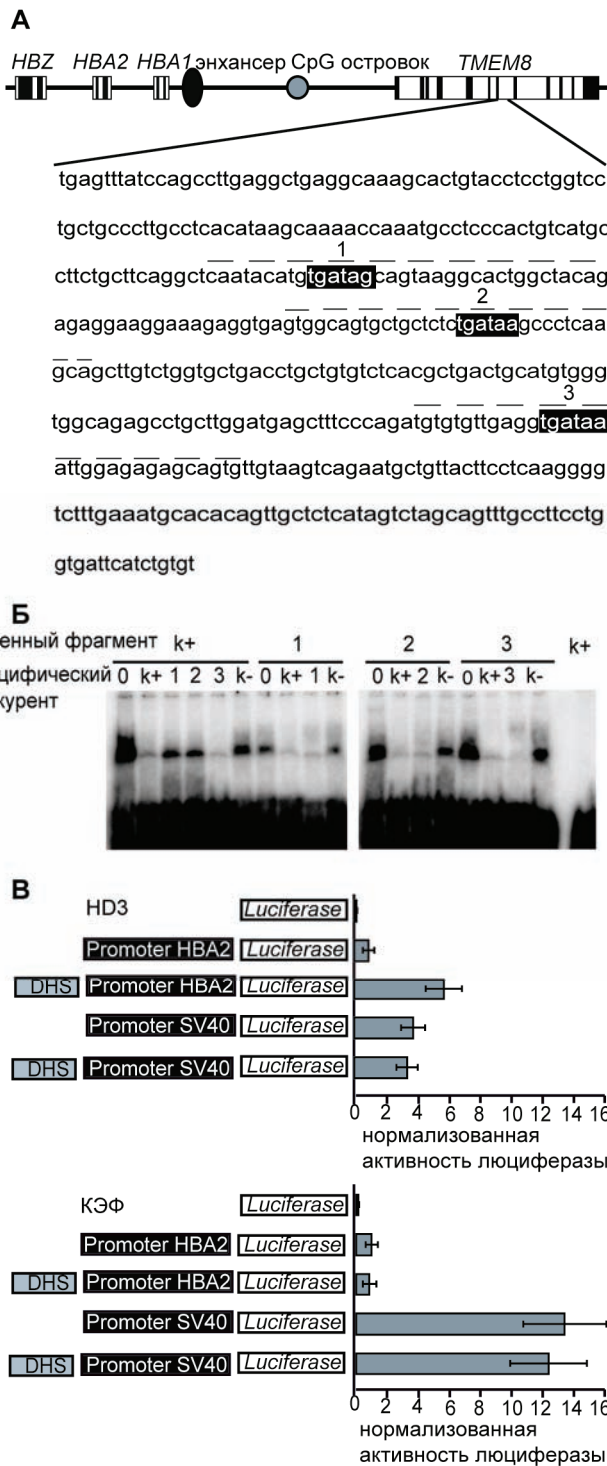
А. Схема расположения генов (прямоугольники), CpG островков (круги) и энхансера домена альфа-глобиновых генов (овал) в исследуемом регионе. DHS картировали в рестриктных фрагментах HindIII и XbaI, показанных под картой. На рисунке отражен размер этих рестриктных фрагментов в т.п.н. Расположение гибридизационных проб, использованных для непрямого мечения концов, показано чёрными прямоугольниками.

Б, В. Результаты гибридизации с пробами, распознающими концы выбранных рестриктных фрагментов. ДНК из ядер, обработанных увеличивающимися количествами ДНКазы I, обрабатывали рестриктазой (Б) Hind III или (В) XbaI и гибридизовали с пробами, показанными на панели «А».

Расположение полноразмерных рестриктных фрагментов и дополнительных полос, образованных в результате расщепления ДНКазой I сайтов гиперчувствительности, показаны стрелками с правой стороны фотографии. На рисунке указан размер фрагментов в т.п.н.

Г. Схема расположения идентифицированных сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I. Позиции DHS показаны чёрными стрелками для клеточных линий HD3 и DT40. Обозначения такие же, как для секции «А».

**Картирование энхансерного элемента в интроне гена *κTMEM8*.** Непосредственное взаимодействие эритроидспецифичного энхансера, расположенного за кластером альфа-глобиновых генов, с CpG островком и внутренним участком гена *κTMEM8*, свидетельствует о том, что партнёр регуляторного элемента может быть расположен внутри этих регионов. Для проверки этого предположения было проанализировано распределение потенциальных сайтов связывания транскрипционного фактора GATA1 в рамках 20 т.п.н. фрагмента ДНК, включающего CpG островок и ген *κTMEM8*. GATA1- активатор транскрипции, играющий важную роль в гемопоэзе (Crispino, 2005). Ранее было показано, что кластер из трёх сайтов связывания GATA1, расположенный в эритроидспецифичном энхансере домена альфа-глобиновых генов кур, имеет важное значение для активации транскрипции с промоторов альфа-глобиновых генов (Knezetic & Felsenfeld, 1989). Анализ *in silico* геномного фрагмента с координатами 12,735-12,755 (см. карту на Рисунке 6) выявил кластер из трёх сайтов связывания GATA1 (WGATAR) внутри 7 интрона гена *κTMEM8* (Рисунок 8А). С тем чтобы определить, действительно ли GATA1 связывается с найденными консенсусами, был поставлен эксперимент по задержке электрофоретической подвижности в геле (Fried & Crothers, 1981; Klochkov & Razin, 2006). В качестве зонда были использованы радиоактивно



**Рисунок 8. Идентификация энхансерного элемента внутри тела гена *κTMEM8***

А. Схема, показывающая расположение и последовательность исследуемого фрагмента ДНК. Олигонуклеотиды, используемые для эксперимента по задержке электрофоретической подвижности в геле, показаны пунктирной линией. Предсказанные сайты связывания GATA1 1-3 выделены чёрными прямоугольниками.

Б. Результаты эксперимента по задержке электрофоретической подвижности в геле. Дорожки обозначены в следующем порядке: над линией – номер тестируемого фрагмента (к+ - контрольный фрагмент, содержащий *bona fide* сайт связывания GATA 1, 1-3 – тест-фрагменты, обозначенные в секции «А»); под линией – тип специфического конкурента (к- - фрагмент, не связывающий GATA1; остальные обозначения расшифрованы выше). Каждый образец содержит также *poly dI/dC*. В последней дорожке содержится к+ фрагмент без инкубации с белковым экстрактом.

В. Результаты экспериментов по трансфекции. Конструкты схематически показаны в левой части рисунка. Диаграмма показывает нормализованную люциферазную активность, где за единицу принимается активность люциферазы под промотором *HBA2* гена. Линии погрешностей соответствуют стандартному отклонению от величины среднего по 4 независимым экспериментам.

меченые 30 п.н. олигонуклеотиды, содержащий потенциальный участок связывания GATA1 (Рисунок 8А), в качестве источника белковых факторов – экстракт ядерных белков, выделенный из ядер клеток HD3. Было продемонстрировано, что все три потенциальных сайтов связывания GATA1 связываются с неким белковым фактором (Рисунок 8Б). В экспериментах по конкурентному связыванию немеченого («холодного») двуцепочечного олигонуклеотида, содержащего известный участок связывания GATA1 (Knezetic & Felsenfeld, 1989), было показано, что данный олигонуклеотид эффективно конкурировал с изучаемыми фрагментами ДНК за связываемый белковый фактор: уже при 10-кратном

молярном избытке конкурента сигнал, соответствовавший ДНК-белковому комплексу, практически полностью исчезал, так же, как при вытеснении меченого фрагмента гомологичным ему специфическим немеченым фрагментом (рисунок 8Б). На основании этих результатов было сделано заключение, что каждая из последовательностей WGATAR, присутствующих в вышеописанном кластере, действительно связывает GATA1, хотя сила связывания для трёх исследуемых фрагментов различается (Рисунок 8Б). Таким образом, появились основания полагать, что участок, содержащий 3 сайта связывания GATA1, может обладать энхансерной активностью. Для проверки этого предположения ~400 п.н. фрагмент ДНК, включающий кластер сайтов связывания GATA1, был проверен на энхансерную активность в экспериментах по транзиторной трансфекции. С этой целью перед геном люциферазы светлячка под промотором гена *HBA2* кур был клонирован исследуемый фрагмент. Этот конструкт, конструкт без исследуемого фрагмента, а также конструкт без тест-фрагмента и без промотора гена *HBA2* были трансфицированы в клетки линии HD3. Проведенный анализ позволил заключить, что исследуемый фрагмент в 6 раз стимулирует активность промотора гена *HBA2* (Рисунок 8В). Для проверки универсальности нового энхансерного элемента исследуемая последовательность была клонирована перед промотором ранних генов вируса SV40. Результаты этого эксперимента говорят о том, что энхансерный элемент не активирует промотор SV40 (Рисунок 8В). При трансфекции всех 5 конструкций в клетки эмбриональных фибробластов кур не наблюдалось активации энхансером промотора альфа-глобинового гена (Рисунок 8В). Следовательно, энхансерный элемент является эритроидспецифичным и избирательным в отношении промотора. В CpG островке не было обнаружено сайтов связывания GATA1; функциональная значимость этого фрагмента остаётся неясной.

Подводя итог, можно сказать, что в этой части работы было показано, что в гене *κTMEM8* между 7 и 8 экзонами содержится сильный эритроидспецифичный сайт гиперчувствительности к ДНКазе I. С сайтом гиперчувствительности к ДНКазе I колокализуется эритроидспецифичный регуляторный элемент, обладающий энхансерной активностью и содержащий в своём составе 3 сайта связывания транскрипционного фактора GATA1. Исследование хромосомной конформации гена *κTMEM8* показало, что в эритроидных клетках ген *κTMEM8* непосредственно взаимодействует с эритроидспецифичным энхансером и с регуляторным элементом -9 DHS, но не с главным регуляторным элементом домена альфа-глобиновых генов. Однако *κTMEM8* не привлекается в активный хроматиновый блок альфа-глобиновых генов. Для активации экспрессии *TMEM8* собирается альтернативный хроматиновый комплекс, использующий ряд регуляторных

элементов домена альфа-глобиновых генов. Видимо, эти регуляторные элементы перемещаются между двумя различными хроматиновыми блоками.

## **ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

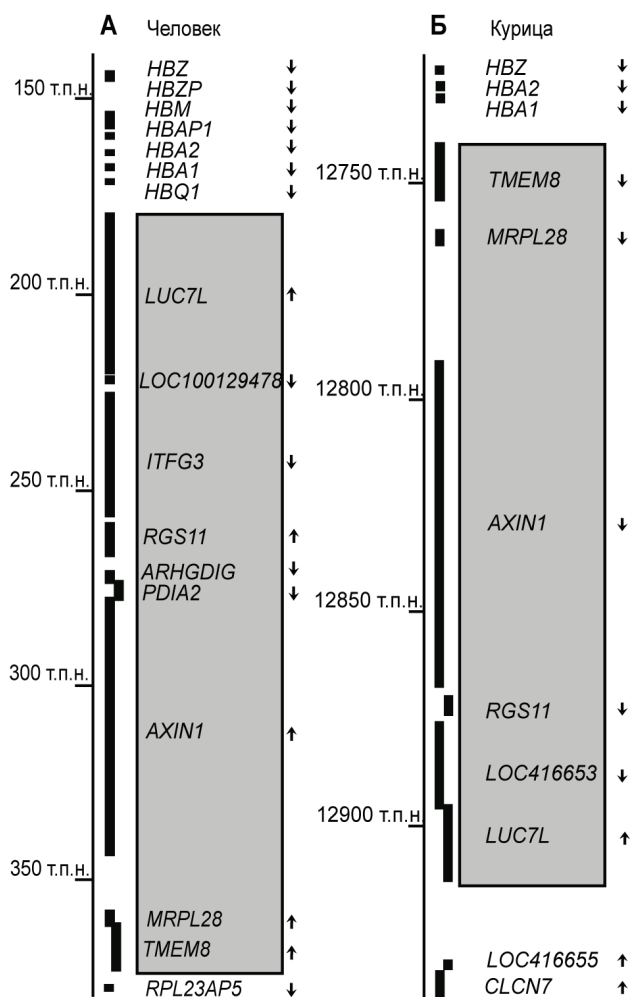
В течение последних 25 лет модели, описывающие регуляцию экспрессии альфа-глобиновых генов, становилась всё более и более сложными. Однако области, фланкирующие альфа-глобиновые гены, оставались мало исследованными. С целью изучения пространственной организации 220 т.п.н. сегмент хромосомы 14 кур, содержащий кластер альфа-глобиновых генов и окружающие его гены, были проведены эксперименты по FISH на препаратах ядерного гало. Результаты показали, что в эритроидных клетках исследуемая область коллапсирована на скелетных структурах ядра и визуализируется в виде точечного сигнала. В лимфоидных клетках исследуемая область выявляется в виде нескольких петель. В серии предшествующих работ было продемонстрировано, что активация транскрипции тканеспецифичных генов при клеточной дифференцировке коррелирует с пространственной реорганизацией геномных доменов, в границах которых расположены эти гены. Эта реорганизация заключается в перемещении всего домена, содержащего один или несколько активно транскрибирующихся генов, к ядерному матриксу (Ciejek *et al.*, 1983; Iarovaia *et al.*, 2005). С учётом этих результатов, было проведено более детальное исследование характера прикрепления к ядерному матриксу изучаемого фрагмента хромосомы 14 кур в эритроидных и лимфоидных клетках. Было показано, что в лимфоидных клетках участки прикрепления ДНК к ядерному матриксу распределены относительно регулярно в пределах всей исследуемой области и разделяются не связанными с ядерным матриксом фрагментами. В эритроидных клетках часть исследуемой геномной области, содержащая кластер альфа-глобиновых генов, а также ген *κTMEM8*, оказалась предпочтительно представлена в препаратах прилежащей к ядерному матриксу ДНК. Это позволило предположить, что *κTMEM8* является частью функционального домена альфа-глобиновых генов. Данный ген вызывает особый интерес, так как в результате хромосомной перестройки произошла инверсия участка ДНК длиной около 200 т.п.н., в результате которой *κTMEM8* оказался в непосредственной близости к кластеру альфа-глобиновых генов, чего не наблюдается у других позвоночных. Нами было показано, что у кур этот ген предпочтительно экспрессируется в эритроидных клетках, хотя у человека *TMEM8* вообще не экспрессируется в эритроцитах. Уровни транскрипции других генов, фланкирующих кластер альфа-глобиновых генов (*C16orf35*, *MPRL28* и *AXIN1*), и являющихся, по-видимому, генами домашнего хозяйства, были одинаковы в изученных эритроидных и неэритроидных

клетках кур. Анализ уровней экспрессии *κTMEM8* в различных тканях взрослой курицы подтвердил предпочтительный характер экспрессии этого гена в эритроидных клетках.

Одной из характерных черт доменов альфа-глобиновых генов всех позвоночных является то, что эти домены проявляют предпочтительную чувствительность к ДНКазе I вне зависимости от типа клеточной дифференцировки (Craddock *et. al.*, 1995; Klochkov *et. al.*, 2009). В связи с этим, отдельной задачей становится установление границ таких хроматиновых доменов. Одним из методов определения границ доменов открытого типа является детекция тканеспецифичных сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I (DHS) (Razin *et. al.*, 1994). Проведенные ранее эксперименты показывали, что область, содержащая эритроидспецифические DHS, начинается рядом с MRE элементом и заканчивается на расстоянии нескольких т.п.н. после *HBA1* гена (de Moura-Gallo *et. al.*, 1992; Razin *et. al.*, 1994). В данной работе были обнаружены несколько эритроидспецифичных DHS, расположенных правее уже установленных (рисунок 7): один в области между CpG островком и геном *κTMEM* и второй сильный DHS в самом гене *κTMEM8*. Таким образом было показано, что границы хроматинового альфа-глобинового домена кур шире, чем ранее предполагали, и что *κTMEM* входит в состав функционального домена альфа-глобиновых генов кур.

Ранее общепринятым считался тот факт, что эритроидспецифичный домен альфа-глобиновых генов содержит только гены, которые кодируют альфа-глобины. Результаты данной работы свидетельствуют о том, что у кур в состав этого домена входит также ген *TMEM8*, кодирующий трансмембранный белок, функции которого не известны. Альфа-глобиновые гены высоко консервативны в эволюции. Долгое время считалось, что область синтении ограничивается расположенными в определённом порядке альфа-глобиновыми генами (Flint *et. al.*, 2001). Позднее было обнаружено, что ген *LUC7L*, расположенный за кластером альфа-глобиновых генов (в направлении центромеры у человека), у многих позвоночных принадлежит к области синтении (Tufarelli *et. al.*, 2001; 2004). Кроме того, перед кластером альфа-глобиновых генов была обнаружена мультивидовая консервативная последовательность (MCS), которая, как считается, содержит эритроидспецифичные регуляторные элементы (Hughes *et. al.*, 2005). В геноме курицы ген *LUC7L* расположен на расстоянии 170 т.п.н. за кластером альфа-глобиновых генов. Вместо гена *LUC7L* после кластера альфа-глобиновых генов располагается ген *TMEM8*. Несколько генов-ортологов, находящихся между *LUC7L* и *TMEM8*: *RGS11*, *AXIN1*, *MRPL28* располагаются в инвертированном порядке у курицы, по сравнению с другими позвоночными. По всей видимости ~ 170 т.п.н. геномный фрагмент, расположенный после кластера альфа-глобиновых генов, претерпел инверсию в геноме курицы относительно генома других

позвоночных. На Рисунке 9 показана схема, иллюстрирующая положение инвертированного геномного фрагмента в области, фланкирующей домен альфа-глобиновых генов у человека



**Рисунок 9. Схема, иллюстрирующая положение инвертированного геномного фрагмента в области, фланкирующей альфа-глобиновый домен**

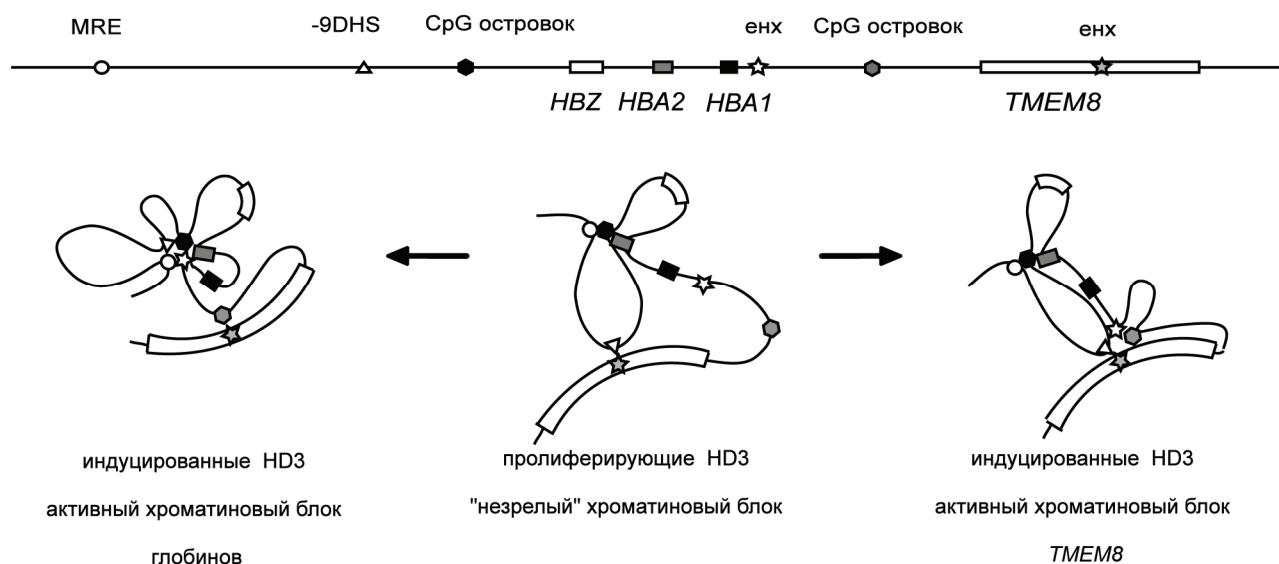
А. Расположение альфа-глобиновых генов и генов, фланкирующих альфа-глобиновый домен на 16 хромосоме человека. Шкала отражает реальные расстояния на хромосоме в т.п.н. Гены показаны чёрными прямоугольниками. Стрелки справа от названия гена показывают направление транскрипции. Гены, располагающиеся в инвертированном порядке по отношению к альфа-глобиновому кластеру на 16 хромосоме человека и 14 хромосоме кур, показаны серым прямоугольником. Названия генов обозначены в соответствии с Ensembl Genome Browser.

Б. Расположение глобиновых генов и генов, фланкирующих альфа-глобиновый кластер на 14 хромосоме кур. Шкала отражает реальные расстояния на хромосоме. Все обозначения соответствуют описанным для секции «А».

и курицы. *TMEM8* (*M83*, *TMEM6*) – высоко консервативный ген, кодирующий белок с 5 трансмембранными доменами (Motohashi *et. al.*, 2000). Белковый продукт этого гена был охарактеризован только для человека (UniProtKB: Q9HCN3). Было высказано предположение о том, что его биологическая функция состоит в маркировании состояния покоя Т-лимфоцитов, так как при активации лимфоцитов уровень его экспрессии уменьшается (Motohashi *et. al.*, 2000). Хотя уровень транскрипции *чTMEM8*, обнаруженный в образцах цельной крови, относительно высок (GNF Symatlas data; <http://symatlas.gnf.org>), скорее всего это связано с интенсивной транскрипцией *чTMEM8* в поющих Т-лимфоцитах, присутствующих в цельной крови. РНК *чTMEM8* не детектируется в циркулирующих ретикулоцитах человека (Goh *et. al.*, 2007) (см. также NIDDK Hembase at <http://hembase.nidk.nih.gov>). В соответствии с этим в данной работе было показано, что экспрессия *чTMEM8* не увеличивается при терминальной эритроидной дифференцировке культивируемых эритроидных клеток человека (линия K562). Однако экспрессия *кTMEM8* возрастает в процессе терминальной эритроидной дифференцировки клеток линии HD3 кур.

Более того, транскрипт *κTMEM8* обнаруживался в циркулирующих эритроцитах, выделенных из крови взрослых птиц. Уровень мРНК *κTMEM8* в циркулирующих эритроцитах был сравним с уровнем мРНК β-актина и составлял 0,4% от уровня мРНК *HBA1*. С другой стороны, *κTMEM8* не экспрессировался в куриных лимфоцитах. В культуре куриных В-лимфоцитов (линия клеток DT40) уровень мРНК *κTMEM8* также был очень низок. На основании этих наблюдений, было предположено, что после того, как *κTMEM8* оказался в непосредственной близости к кластеру альфа-глобиновых генов, сложившийся ансамбль регуляторных элементов был разрушен, *κTMEM8* попал под контроль регуляторных элементов альфа-глобинового домена и приобрел эритроидспецифичный профиль экспрессии. Гены *MPRL28* и *AXIN1*, расположенные далее за геном *κTMEM8*, не показывают какого-либо значительного увеличения уровня экспрессии в HD3 (по сравнению с DT40 и КЭФ). Перенесение *κTMEM8* к проксимальному концу домена альфа-глобиновых генов едва ли могло автоматически сделать этот ген эритроидспецифичным. Действительно, у человека в непосредственной близости к 3' концу домена альфа-глобиновых генов располагается ген *LUC7*, который экспрессируется в различных тканях и предположительно является геном домашнего хозяйства (Vyas *et. al.*, 1995; Tufarelli *et. al.*, 2001). Этот ген располагается на хромосоме 16 человека ближе к кластеру альфа-глобиновых генов (8.7 т.п.н между *LUC7L* и *HBQ1*), чем *κTMEM8* в хромосоме 14 кур (12 т.п.н. между *κTMEM8* и *HBA1*) и не является эритроидспецифичным. Таким образом, расположение гена в непосредственной близости к кластеру альфа-глобиновых генов не является crucialным для попадания гена под контроль регуляторных элементов глобиновых генов. Присутствие эритроидспецифичных сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I внутри гена *κTMEM8* и в районе между *κTMEM8* и кластером альфа-глобиновых генов свидетельствует о том, что в процессе эволюции *κTMEM8* приобрёл эритроидспецифичные регуляторные элементы, которые оказались критичными для включения *κTMEM8* в регуляторную сеть домена альфа-глобиновых генов. Одним из таких регуляторных элементов является энхансер, обнаруженный в одном из интронов гена *κTMEM8*. Этот энхансер обладает рядом общих свойств с ранее охарактеризованным эритроидспецифичным энхансером домена альфа-глобиновых генов (Knezetic *et. al.*, 1989) и, по всей видимости, функционально зависит от наличия сайтов связывания транскрипционного фактора GATA1. Внедрение гена *κTMEM8* в регуляторную сеть альфа-глобинового домена является интересным примером экспансии функциональных геномных доменов. Дальнейшее изучение механизмов регуляции экспрессии *κTMEM8* позволит глубже понять базовые принципы организации функциональных геномных доменов.

С использованием 3C анализа было показано, что два ранее идентифицированных регуляторных элемента домена альфа-глобиновых генов кур взаимодействуют с  $\kappa TME8$  и вышележащим фланкирующим его регионом в терминально дифференцированных эритроидных клетках линии HD3 – это энхансер домена альфа-глобиновых генов (см. схему на Рисунке 6) и ещё не охарактеризованный регуляторный элемент, колокализующийся с эритроидспецифичным сайтом гиперчувствительности к ДНКазе I (-9DHS). Принимая во внимание стимуляцию экспрессии  $\kappa TME8$  при терминальной эритроидной дифференцировке клеток линии HD3, ожидалось увидеть, что экспрессия этого гена контролируется регуляторными элементами домена альфа-глобиновых генов. Неожиданным было то, что регуляция экспрессии взрослых альфа-глобиновых генов и  $\kappa TME8$  осуществляется посредством формирования двух различных хроматиновых блоков (Рисунок 10). Для обоих хроматиновых блоков характерно присутствие двух регуляторных элементов:



**Рисунок 10. Схематическое представление пространственной организации альтернативных хроматиновых блоков.** Схема в верхней части рисунка показывает позиции генов и регуляторных элементов: MRE – круг; -9 DHS – треугольник; CpG-островок, расположенный перед кластером альфа-глобиновых генов, – черный многоугольник; ген *HBZ* – белый прямоугольник; ген *HBA2* – серый прямоугольник; ген *HBA1* – черный прямоугольник; энхансер, расположенный за кластером альфа-глобиновых генов, – белая звезда; CpG-островок, расположенный перед геном  $\kappa TME8$ , – серый многоугольник; ген  $\kappa TME8$  – длинный белый прямоугольник со звездой внутри; энхансер, расположенный в теле гена  $\kappa TME8$ , – серая звезда. В середине нижней части рисунка показан незрелый блок, собирающийся в пролиферирующих клетках линии HD3. Справа и слева от него – два альтернативных состояния активного хроматинового блока, собирающихся для активации транскрипции альфа-глобиновых генов или гена  $\kappa TME8$ .

-9 DHS и энхансера, остальные участники различаются. Наконец, интересно, что ни -9 DHS, ни энхансер альфа-глобинового домена кур не входят в состав ранее установленных мультивидовых консервативных последовательностей (Hughes *et. al.*, 2005). Другими словами, эти регуляторные элементы характерны только для кур. Вероятно, особые свойства



регуляторной системы домена альфа-глобиновых генов кур, в частности, существование энхансера, расположенного за кластером альфа-глобиновых генов, обусловили возможность экспансии функционального домена. -9 DHS и энхансер не взаимодействуют с промотором гена *HBA1* в пролиферирующих клетках линии HD3. Они привлекаются в активный хроматиновый блок домена альфа-глобиновых генов только при индукции HD3 к терминальной эритроидной дифференцировке. В данной работе было показано, что те же самые элементы принимают участие в организации активаторного комплекса *κTMEM8*. Таким образом -9 DHS и энхансер курсируют между двумя альтернативными хроматиновыми блоками, как предполагает предложенная ранее «flip-flop» модель (Wijgerde *et. al.*, 1995; Gribnau *et. al.*, 1998). Эта модель была предложена для объяснения способности LCR бета-глобинового домена одновременно активировать транскрипцию нескольких генов. Хотя «flip-flop» модель никогда не опровергалась, она была практически забыта после открытия активных хроматиновых блоков (Zhou *et. al.*, 2006; Kooren *et. al.*, 2007; de Laat *et. al.*, 2003; Tolhuis *et. al.*, 2002; de Laat *et. al.*, 2008), представляющих собой комплекс из энхансера и нескольких промоторов. Модель активных хроматиновых блоков предлагает более простое объяснение способности энхансера одновременно активировать несколько промоторов. Полученные данные говорят о том, что две модели не являются взаимоисключающими, а модель активных хроматиновых блоков более динамична.

Тот факт, что высокий уровень мРНК *κTMEM8* наблюдается в циркулирующих эритроцитах и дифференцированных клетках линии HD3 может свидетельствовать о том, что белковый продукт *κTMEM8* функционально активен. Одно из предположений состоит в том, что он может служить маркером стадии покоя терминально дифференцированных красных клеток крови. Характеристика функциональной роли продукта гена *κTMEM8* представляется интересной перспективой для исследовательской работы.

## **ВЫВОДЫ**

1. Охарактеризована пространственная организация 220 т.п.н. сегмента хромосомы 14 кур, содержащего кластер альфа-глобиновых генов и фланкирующие его гены домашнего хозяйства.
2. Показано, что не кодирующий глобины ген *TMEM8*, расположенный в 3' фланкирующей области кластера альфа-глобиновых генов кур, предпочтительно экспрессируется в эритроидных клетках, и экспрессия этого гена стимулируется при терминальной эритроидной дифференцировке культивируемых эритробластов кур.

3. Продemonстрировано, что в интроне 7 гена *κТМЕМ8* содержится эритроидспецифичный участок гиперчувствительности к ДНКазе I, колокализующийся с эритроидспецифичным энхансером, в границах которого присутствуют три сайта связывания транскрипционного фактора GATA1.
4. Изучена хромосомная конформация гена *κТМЕМ8*. Показано, что в эритроидных клетках ген *κТМЕМ8* непосредственно взаимодействует с эритроидспецифичным энхансером и регуляторным элементом -9 DHS, но не с главным регуляторным элементом домена альфа-глобиновых генов. Продemonстрировано, что *κТМЕМ8* не привлекается в активный хроматиновый блок альфа-глобиновых генов. Для активации экспрессии *κТМЕМ8* собирается альтернативный хроматиновый комплекс.

#### **СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

##### **Статьи:**

1. Филоненко Е. С., Гаврилов А. А., Разин С. В., Яровая О. В. (2009) В эритроидных клетках кур протяженный фрагмент хромосомы 14, включающий кластер альфа-глобиновых генов, организован в микропетли. *Живые системы* 1:105-108.
2. Iarovaia OV, Borounova VV, Philonenko ES, Kantidze OL, Vassetzky YS, Razin SV. (2009) In embryonic chicken erythrocytes actively transcribed alpha globin genes are not associated with the nuclear matrix. *J Cell Biochem.* 106(1):170-8.
3. Philonenko ES, Klochkov DB, Borounova VV, Gavrilov AA, Razin SV, Iarovaia OV. (2009) TMEM8 – a non-globin gene entrapped in the globin web. *Nucleic Acids Research* PMID: 19820109.

##### **Тезисы конференций:**

1. Филоненко Е.С., Борунова В.В., Яровая О.В. Пространственная организации домена α-глобиновых генов кур . XVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "ЛОМОНОСОВ-2008". Москва, Россия, 14-19 апреля 2008, сборник тезисов, секция «Биология», подсекция «молекулярная биология» с. 19.
2. Филоненко Е.С., Яровая О.В. Пространственная организация локуса 14 хромосомы кур. XVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых "ЛОМОНОСОВ-2009". Москва, Россия, 13-17 апреля 2009, сборник тезисов, с. 195.