

На правах рукописи

УДК 576.315.42

ГАВРИЛОВ Алексей Александрович

**ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОСТРАНСТВЕННОЙ ОРГАНИЗАЦИИ  
ДОМЕНА  $\alpha$ -ГЛОБИНОВЫХ ГЕНОВ КУР**

Специальность 03.00.03 – молекулярная биология

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва-2008

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

**Научный руководитель:** чл.-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор Разин С.В.

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

кандидат биологических наук  
Максименко О.Г.

**Ведущая организация:** Учреждение Российской академии наук Институт белка РАН, Пущино

Защита диссертации состоится 19 ноября 2008 года в 12 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 17 октября 2008 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,  
канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Настоящая работа посвящена изучению молекулярных механизмов, контролирующих активацию транскрипции глобиновых генов в эритроидных клетках кур. Домен  $\alpha$ -глобиновых генов кур, наряду с доменами глобиновых генов других позвоночных животных, в течение многих лет является моделью для изучения механизмов регуляции транскрипции. В предшествующих работах идентифицирован сложный комплекс регуляторных элементов, контролирующих работу этого геномного домена. Однако до сих пор остается неясным, как эти регуляторные элементы взаимодействуют друг с другом, обеспечивая активацию транскрипции глобиновых генов и переключение их экспрессии по ходу развития организма. Довольно давно была предложена гипотеза, постулирующая, что удаленные регуляторные элементы напрямую взаимодействуют с промоторами контролируемых ими генов. К сожалению, до последнего времени отсутствовал экспериментальный подход, позволяющий проверить эту гипотезу. В настоящее время такой подход (метод фиксации конформации хромосомы, 3С) существует. Мы использовали этот подход для того, чтобы выяснить, каким образом изменяется пространственная конфигурация домена  $\alpha$ -глобиновых генов при переходе его в потенциально-активное состояние и, далее, при начале экспрессии глобиновых генов. Полученные результаты расширяют наши знания о механизмах регуляции транскрипции у высших эукариот, что и определяет актуальность настоящей работы. В более узком плане, работа актуальна еще и потому, что раскрывает ряд важных особенностей регуляции экспрессии именно глобиновых генов, нарушения в работе которых вызывают тяжелые заболевания человека и хозяйственно-важных домашних животных.

**Цели и задачи исследования.** Целью настоящей работы явилось изучение механизмов активации транскрипции  $\alpha$ -глобиновых генов у курицы. Для раскрытия этих механизмов мы решили выяснить, происходит ли пространственное взаимодействие каких-либо регуляторных элементов домена между собой и с промоторами  $\alpha$ -глобиновых генов в условиях, когда домен неактивен, и изменяется ли пространственная конфигурация домена при активации транскрипции глобиновых генов. Для ответа на эти вопросы были поставлены следующие экспериментальные задачи:

1. Отработать систему искусственной дифференцировки культивируемых куриных пре-эритробластов в эритроциты.
2. Используя полученную систему, с помощью метода фиксации конформации хромосомы (3С) изучить пространственную организацию домена  $\alpha$ -глобиновых генов в клетках до и после активации транскрипции глобиновых генов.
3. Сравнить пространственную организацию домена  $\alpha$ -глобиновых генов в культивируемых эритроидных клетках с таковой в нормальных куриных эритроцитах и клетках неэритроидного происхождения.

**Научная новизна и практическая ценность работы.** Уже более пяти лет метод 3C (Chromosome Conformation Capture, в переводе с англ. «фиксация конформации хромосомы») активно применяют во всем мире для изучения пространственных взаимодействий между различными участками генома. В России, однако, использование данного метода до последнего времени не увенчивалось успехом. В ходе диссертационной работы были преодолены все технические трудности, связанные с проведением экспериментов, поставлены необходимые контроли и получены достоверные, воспроизводимые результаты. В работе рассмотрены теоретические основы метода 3C с уделением особого внимания проблемам, с которыми сталкивается исследователь при проведении 3C-анализа, и путям их решения.

Сама работа посвящена изучению пространственной организации домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур. Хотя подобные исследования уже проводились для некоторых геномных локусов, среди которых и домен  $\alpha$ -глобиновых генов мыши, настоящее исследование имеет ряд преимуществ. Так, впервые было осуществлено сравнение пространственной конфигурации домена  $\alpha$ -глобиновых генов в нескольких типах клеток, включая культивируемые пре-эритробласты, не экспрессирующие глобиновые гены, и те же клетки после индукции терминальной эритроидной дифференцировки, в ходе которой глобиновые гены начинают активно экспрессироваться. Такое сравнение позволило нам проследить за изменениями в пространственной организации домена, напрямую связанными с активацией транскрипции глобиновых генов, и, таким образом, выявить регуляторные элементы ДНК, контролирующие смену транскрипционного статуса домена. Результаты работы подтверждают важную роль коммуникации между удаленными участками генома в регуляции экспрессии генов.

В нескольких последних публикациях была отмечена эволюционная консервативность организации доменов  $\alpha$ -глобиновых генов различных позвоночных животных. В данной работе впервые показано, что ключевые регуляторные события, происходящие на уровне пространственной организации домена  $\alpha$ -глобиновых генов при активации транскрипции, различаются для птиц и млекопитающих. Более того, в настоящей работе впервые продемонстрировано избирательное взаимодействие удаленного энхансера только с одним из двух функционально связанных активных промоторов, расположенных поблизости друг от друга.

Диссертационная работа вносит существенный вклад в развитие представлений о структурно-функциональной организации эукариотического генома. С другой стороны, несмотря на четко выраженный фундаментальный характер, работа представляет интерес и с практической точки зрения. Новые знания о механизмах, контролирующих экспрессию генов, могут быть использованы в биотехнологии, в частности, при создании трансгенных животных.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы были представлены на 10-ой международной школе-конференции «Биология – наука

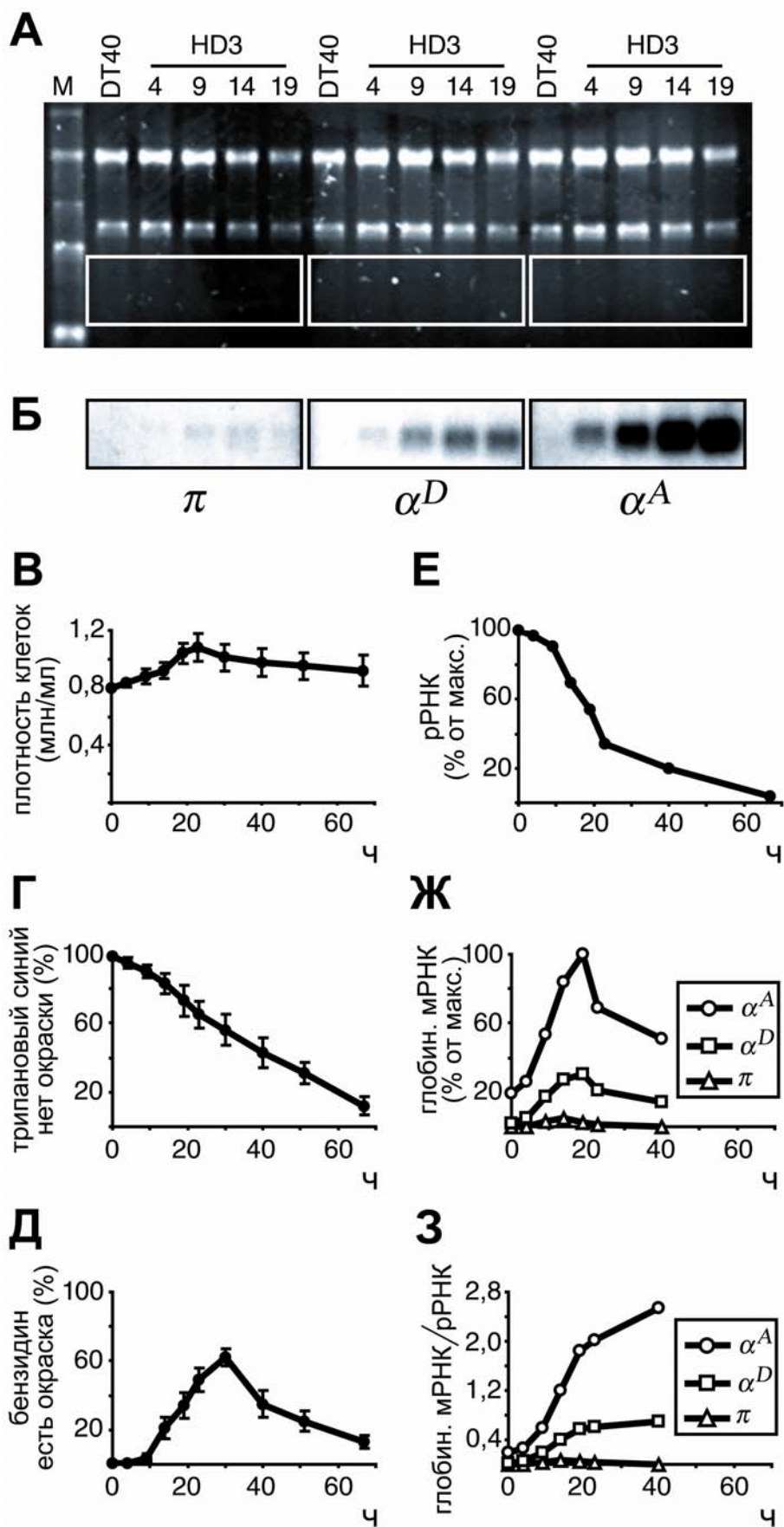
XXI века» (Пушино, 2006), на IV съезде Российского общества биохимиков и молекулярных биологов (Новосибирск, 2008), на конференциях «Workshop on Protein-nucleic acid interactions of the International Research Training Group Gießen/Marburg-Moscow» (Суздаль, 2007; Москва, 2008; Гиссен, Германия, 2008).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 9 печатных работ. Из них статей – 3, тезисов докладов и материалов конференций – 6.

**Структура и объем работы.** Диссертация изложена на 140 страницах, содержит 21 рисунок и 3 таблицы, состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результатов исследования, Обсуждения результатов, Выводов и Списка литературы, включающего 260 источников.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

**Клеточная модель для сравнительного ЗС-анализа домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур.** В настоящей работе были использованы культивируемые эритробласты кур (линия HD3). Изначально клетки этой линии были получены путем трансформации куриных пре-эритробластов вирусом птичьего эритробластоза, содержащего онкоген *v-erbA* и мутантный температуро-чувствительный онкоген *v-erbB* (Beug *et al.*, 1982). Клетки HD3 бесконечно делятся и не экспрессируют глобиновые гены, однако домен  $\alpha$ -глобиновых генов имеет «открытую» хроматиновую конфигурацию и подготовлен к запуску транскрипции (Razin *et al.*, 2004). Онкоген *v-erbA* может быть инактивирован при повышенных pH, тогда как онкоген *v-erbB* – при повышенных температурах. При инактивации обоих онкогенов клетки вступают в дифференцировку – прекращают пролиферировать и начинают продуцировать глобины. Для индукции дифференцировки клетки HD3 были инкубированы при pH 8.0 и 42°C в присутствии индуктора iso-H-7 (ингибитор протеинкиназы C, дополнительно способствующий индукции (Nicolas *et al.*, 1991)). После индукции клетки HD3 прекращали пролиферировать (рис. 1 В). Для установления доли клеток, продуцирующих гемоглобин, клетки были окрашены бензидином. Гемоглобин-содержащие (бензидин-позитивные) клетки были обнаружены в небольшом количестве уже в неиндуцированной культуре ( $\leq 1\%$ ). Увеличение доли бензидин-позитивных клеток наблюдалось между 4-ым и 9-ым часами индукции; на 9-ом часе доля таких клеток составляла 4%, на 14-ом часе – 21% и на 30-ом часе – 62% (рис. 1 Д). Доля живых клеток была определена по результатам окрашивания клеток трипановым синим и составляла 90, 65, 43 и 12% соответственно на 10-ом, 23-ем, 40-ом и 67-ом часах индукции (рис. 1 Г). Через разное время после начала индукции из клеток была выделена тотальная клеточная РНК и проведена Нозерн-блот гибридизация с использованием проб, узнающих мРНК, кодируемые глобиновыми генами  $\pi$ ,  $\alpha^D$  и  $\alpha^A$ . Результаты гибридизации ясно показывают, что уровень мРНК «взрослых» глобиновых генов  $\alpha^D$  и  $\alpha^A$  начинает расти уже в первые 4 часа после начала индукции, достигает максимума в



**Рисунок 1. Индукция эритроидной дифференцировки клеток HD3.** (А) и (Б) Нозерн-блот анализ РНК, изолированной из клеток DT40 и HD3 через разные интервалы времени после начала индукции. (А) Гель после электрофореза РНК, окрашенный бромистым этидием. М –

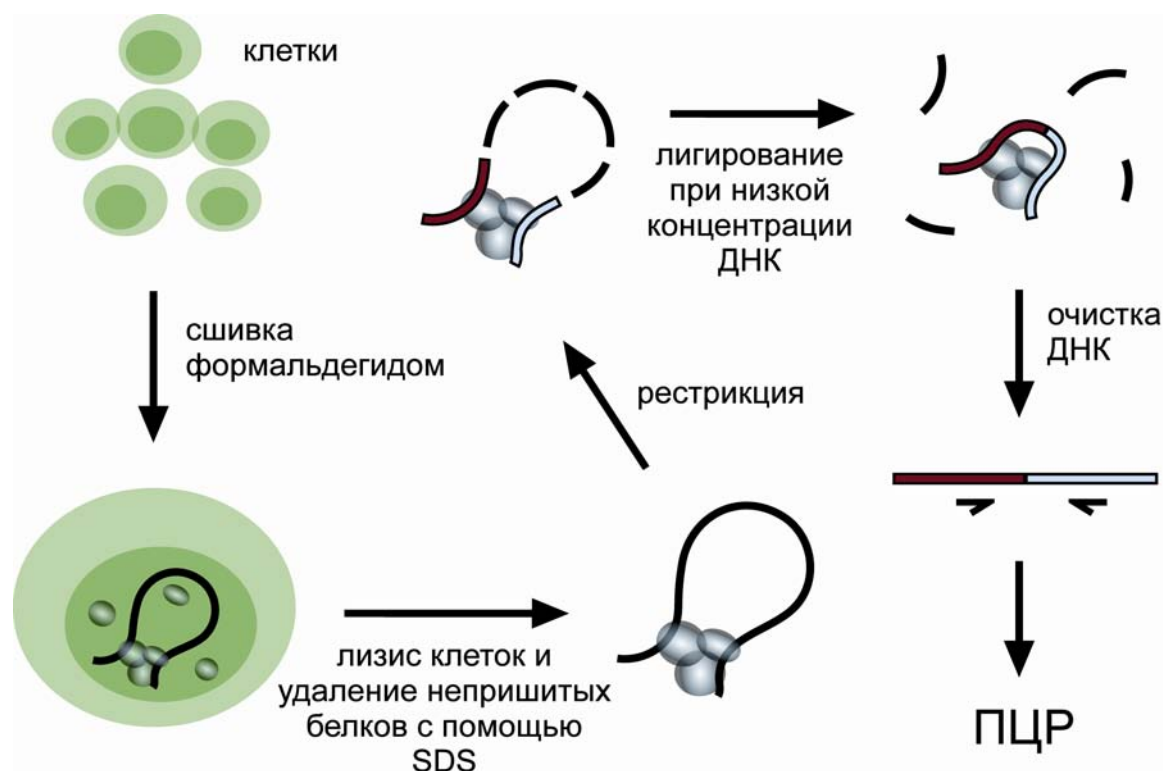
маркерная РНК (0.24, 1.35, 2.37, 4.40, 7.46 т.н.). Для клеток HD3 над дорожками указано время (часы) после начала индукции. (Б) Авторадиограмма, показывающая результаты гибридизации проб, узнающих мРНК генов  $\pi$ ,  $\alpha^D$  и  $\alpha^A$ , с блотами, соответствующими обведенным в рамку участкам в секции «А». (В–Д) Изменения в плотности клеточной суспензии (В), доле живых клеток (Г) и доле содержащих гемоглобин клеток (Д) в ходе индукции. Линии погрешностей соответствуют стандартному отклонению от величины среднего по трем независимым экспериментам. (Е) Относительное количество рРНК (18S + 28S) в образцах. (Ж) Относительное количество глобиновой мРНК в образцах. (З) Количество глобиновой мРНК, нормализованное по отношению к количеству рРНК.

районе 19 часов и далее постепенно падает, таким образом, наглядно демонстрируя, как волна синтеза РНК предшествует волне синтеза белка (рис. 1 Б и Ж). Динамика накопления мРНК генов  $\alpha^D$  и  $\alpha^A$  прослеживается яснее после нормализации результатов на количество рРНК в образцах (рис. 1 З), которое постепенно снижается как результат гибели клеток в культуре (рис. 1 А и Е). Эмбриональный  $\alpha$ -глобиновый ген  $\pi$  практически не транскрибируется при индукции (рис. 1 Б и Ж). Это кажется закономерным, так как линия клеток HD3 получена из эритробластов взрослых кур. В культивируемых лимфоидных клетках кур (линия DT40) не транскрибируется ни один из  $\alpha$ -глобиновых генов (рис. 1 Б).

Какие бы регуляторные механизмы не задействовались в активации генов  $\alpha^D$  и  $\alpha^A$  в индуцированных клетках HD3, эти механизмы должны запускаться до начала транскрипции. Белковые комплексы, собирающиеся при активации транскрипции, по всей вероятности, сохраняют свою структуру, пока продолжается транскрипция. Учитывая это, было решено провести сравнительный 3С-анализ домена  $\alpha$ -глобиновых генов в неиндуцированных клетках HD3 и индуцированных клетках HD3 на 12-ом часе индукции. В этот момент общий уровень транскрипции  $\alpha$ -глобиновых генов в культуре (судя по скорости аккумуляции мРНК) близок к максимальному, но все еще продолжает расти. Нарастание уровня транскрипции может отражать тот факт, что в популяции присутствуют клетки, которые только начинают транскрипцию глобиновых генов, поскольку индукция дифференцировки не происходит абсолютно синхронно. Кроме того, это может свидетельствовать об интенсификации транскрипции в тех клетках, где она уже идет. Таким образом, на 12-ом часе индукции домен  $\alpha$ -глобиновых генов должен иметь пространственную конфигурацию, типичную для клеток, активно транскрибирующих глобиновые гены или начинающих транскрипцию. Принимая во внимание, что биологические процессы, идущие в трансформированных клетках, не всегда отражают таковые в нормальных клетках, пространственная структура домена была проанализирована и в нормальных эритроцитах 10-дневных куриных эмбрионов. Ранее было показано, что в этих клетках экспрессируются «взрослые» глобиновые гены  $\alpha^D$  и  $\alpha^A$  и не экспрессируется эмбриональный ген  $\pi$  (Weintraub et al., 1981). Для более точной интерпретации результатов, полученных для эритроидных клеток, в исследование были включены лимфоидные клетки линии DT40, в которых домен  $\alpha$ -глобиновых генов не подготовлен для транскрипции.

## Количественный 3С-анализ домена $\alpha$ -глобиновых генов кур: принцип метода и контрольные эксперименты.

*Основы метода 3С.* Метод «Chromosome Conformation Capture», или сокращенно 3С, был разработан для анализа пространственной организации протяженных участков генома в живых клетках. В основе данного метода лежит фиксация ДНК-белковых комплексов формальдегидом *in vivo* с последующим расщеплением ДНК эндонуклеазами рестрикции и религированием полученных фрагментов при низкой концентрации ДНК. В таких условиях предпочтительно лигируются фрагменты, находящиеся в составе одного ДНК-белкового комплекса, но не случайные фрагменты. Продукты лигирования анализируются и «подсчитываются» с помощью полимеразной цепной реакции (рис. 2). Частота сшивки двух специфических рестриктных фрагментов, оцениваемая количеством соответствующего продукта лигирования, пропорциональна частоте, с которой эти два фрагмента взаимодействуют друг с другом в ядерном пространстве. Таким образом, 3С анализ предоставляет информацию о пространственной организации изучаемых участков генома *in vivo* (Dekker *et al.*, 2002; Tolhuis *et al.*, 2002).



**Рисунок 2. Основные этапы 3С-анализа.** Живые клетки обрабатывают формальдегидом и лизируют с помощью SDS, после чего добавляют тритон X-100 (не показано) и переваривают ДНК эндонуклеазой рестрикции (тритон повышает эффективность работы фермента в присутствии SDS). Фрагменты ДНК религируют при низкой концентрации ДНК. Продукты лигирования очищают и анализируют с помощью ПЦР.

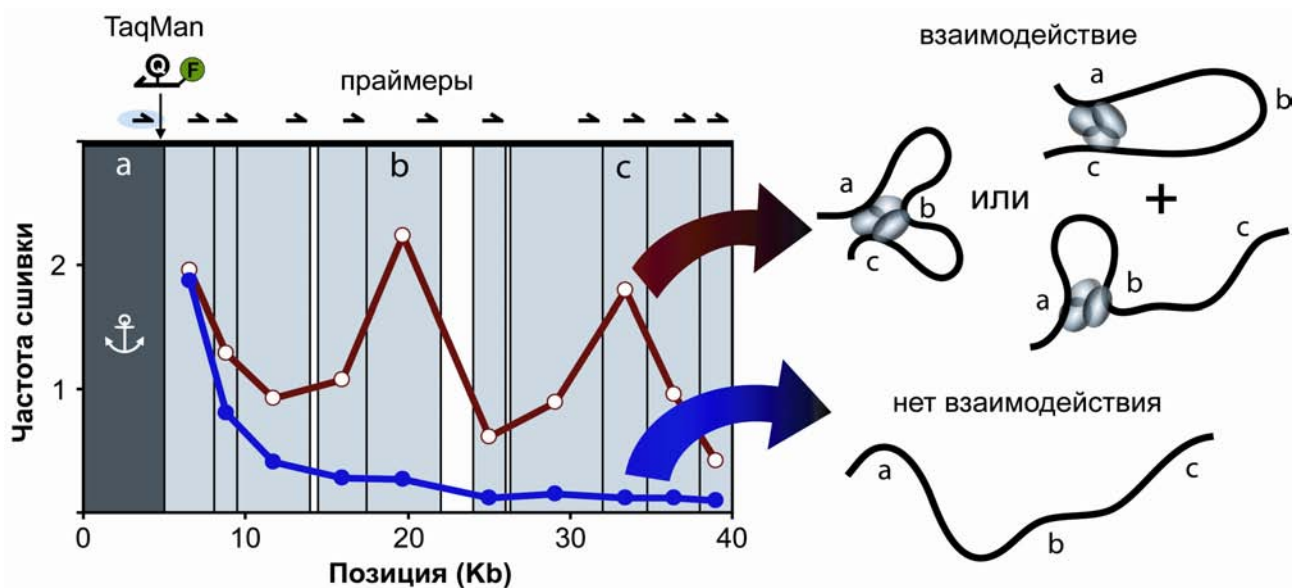
До последнего времени для анализа продуктов лигирования широко применяли методы полуколичественного ПЦР. Однако, достаточно часто необходим более точный подсчет частот лигирования, что возможно лишь с применением техники ПЦР в реальном времени. С другой стороны, одинакового



важным является контроль специфичности ПЦР амплификации. По этим причинам в 3С-анализе все чаще используют технику ПЦР в реальном времени со специфическими пробами, такими как TaqMan (Vernimmen *et al.*, 2005).

Праймеры для амплификации подбирают на концах рестриктных фрагментов так, чтобы 3'-конец праймера был обращен к концу фрагмента (рис. 3). Как правило, все праймеры подбирают на одной и той же стороне (левой или правой) фрагментов с тем, чтобы они были направлены в одну сторону. С помощью таких праймеров анализируются продукты лигирования по типу «голова-к-голове» и «хвост-к-хвосту». Однонаправленность праймеров исключает возможность образования ПЦР-продуктов на матрице недорасщепленной ДНК. Один праймер выбирается в качестве «якоря» и поочередно используется для ПЦР со всеми другими праймерами. TaqMan-пробы для ПЦР в реальном времени подбирают ниже якорного праймера на самом конце рестриктного фрагмента. Таким образом, одна и та же TaqMan-проба может быть использована для всех ПЦР с данным якорным праймером.

Данные 3С-анализа обычно представляют в виде графика зависимости частоты сшивки якорного рестриктного фрагмента с другими фрагментами (эта частота выражается количеством соответствующих продуктов лигирования) от позиции этих других фрагментов в локусе. Повышенная частота сшивки говорит о взаимодействии фрагментов друг с другом (рис. 3).



**Рисунок 3. Представление и интерпретация данных 3С-анализа.** Разобран гипотетический случай. График отражает зависимость частоты сшивки (ось ОУ) якорного рестриктного фрагмента (показан темно-серым) с другими фрагментами (показаны светло-серыми) изучаемой области генома (черная линия в верхней части графика). Вертикальные линии соответствуют позициям рестриктных сайтов. Праймеры и TaqMan-проба, которые могут быть использованы для оценки частот сшивки, показаны над графиком (овалом обозначен якорный праймер). При получении кривой с заполненными точками делается вывод об отсутствии взаимодействия якорного фрагмента с какими-либо фрагментами локуса. При получении кривой с незаполненными точками делается вывод о взаимодействии фрагмента «а» с фрагментами «b» и «с». Однако мы все же не можем сказать, одновременное ли это взаимодействие (a+b+c) или суперпозиция попарных взаимодействий (a+b и a+c).

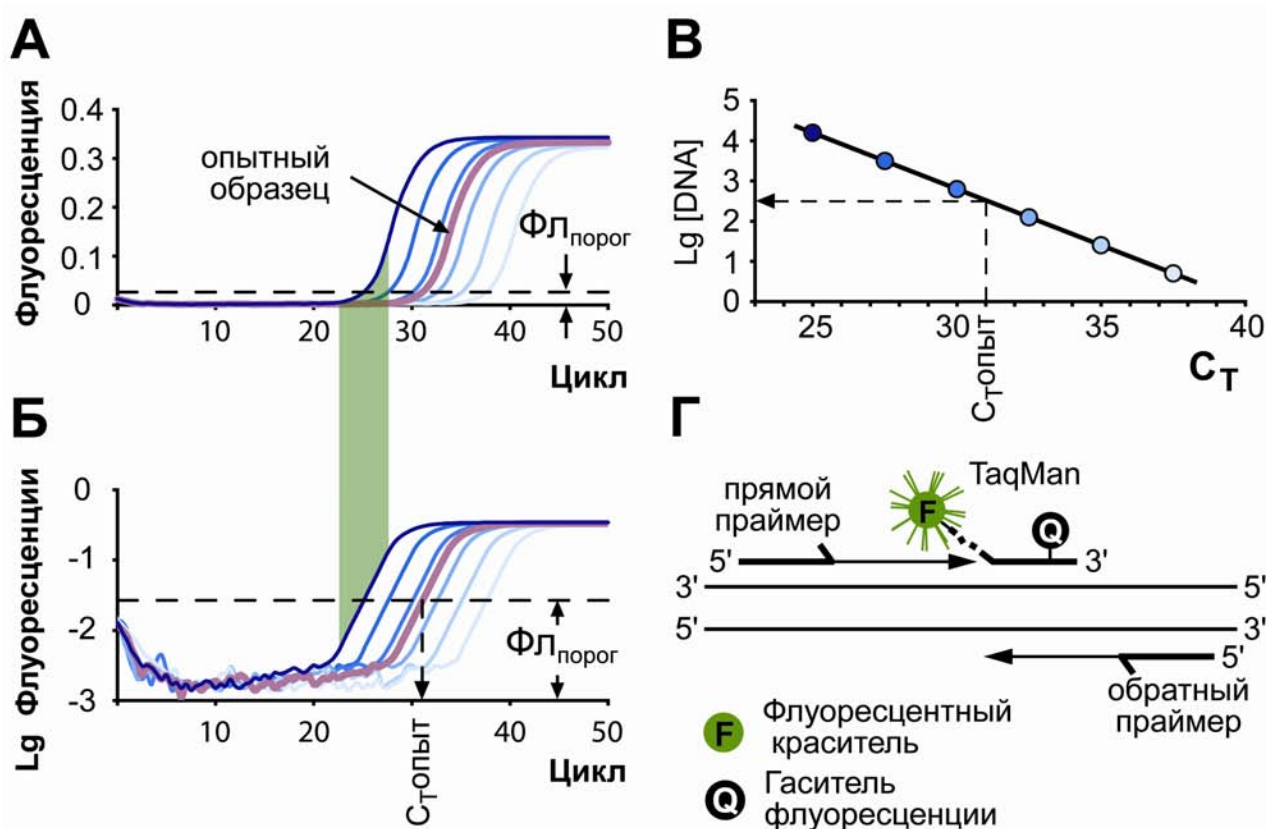
*Подбор рестриктаз, праймеров и TaqMan-проб.* В первой серии экспериментов по ЗС-анализу домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур мы использовали комбинацию эндонуклеаз рестрикции BglII и BamHI. Эти ферменты узнают различные последовательности (AGATCT и GGATCC), но продуцируют совместимые концы ДНК, которые могут лигироваться друг с другом. Схема домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур, демонстрирующая позиции глобиновых генов и важных регуляторных элементов, а также BamHI/BglII-рестрикционная карта домена приведены на рис. 5 А. Видно, что такие элементы, как MRE (главный регуляторный элемент), промотор гена домашнего хозяйства CGTNBA, участок начала репликации (ori), промоторы  $\alpha$ -глобиновых генов, эритроид-специфичный «downstream»-энхансер, локализуются в различных рестриктных фрагментах. Во второй серии экспериментов мы использовали рестриктазу MboI. Этот фермент узнает последовательность GATC, то есть как BamHI- и BglII-сайты, так и 14 других гексонуклеотидных последовательностей. В результате домен расщепляется на более мелкие фрагменты. MboI-рестрикционная карта домена приведена на рис. 6 А.

Позиции праймеров и TaqMan-проб, использованных для анализа продуктов лигирования, показаны над рестрикционными картами. Они были подобраны таким образом, чтобы составить два однонаправленных эррея – для анализа локуса  $\alpha$ -глобиновых генов и контрольного локуса, соответственно (см. «Контроль качества и количества ДНК в ЗС-образцах»).

*Количественный ПЦР-анализ продуктов лигирования.* Чтобы определять количество ДНК-матрицы по интенсивности ПЦР-сигнала, необходимо учитывать, что с разными праймерами амплификация может проходить с разной эффективностью. Для оценки эффективности праймеров необходима матрица, в которой для каждой пары праймеров было бы одинаковое количество матрицы для амплификации. Для получения такой матрицы мы использовали ДНК искусственной бактериальной хромосомы (BAC), несущей целый домен  $\alpha$ -глобиновых генов с фланкирующими областями. Бакмида была переварена рестриктазами BamHI и BglII или рестриктазой Sau3A (изошизомер MboI, нечувствительный к dam-метилованию) и религирована при высокой концентрации ДНК, обеспечивающей эффективное межмолекулярное лигирование. Полученный препарат представлял собой эквимольную смесь всех возможных продуктов лигирования рестриктных фрагментов исследуемого участка куриного генома и был использован для определения относительного количества продуктов лигирования в ЗС-образцах.

Количественный анализ продуктов лигирования был осуществлен с использованием техники ПЦР в реальном времени с TaqMan-пробами. TaqMan-проба – это олигонуклеотид, отжигающийся между прямым и обратным праймерами и несущий на 5'-конце флуоресцентный краситель (в нашем случае FAM), а на 3'-конце или внутри пробы – гаситель флуоресценции (в нашем случае BHQ-1). В ходе реакции амплификации полимеразы расщепляет пробу, что приводит к разобщению флуорофора и гасителя и росту флуоресценции

(рис. 4 Г). Данные амплификации выводятся в виде графика зависимости интенсивности флуоресценции от цикла амплификации (рис. 4 А).



**Рисунок 4. ПЦР в реальном времени с TaqMan-пробами.** (А–В) Количественный анализ продуктов лигирования. Разобран гипотетический случай. (А) и (Б) Нормальная и логарифмическая зависимости интенсивности флуоресценции (ось ОУ) от цикла амплификации (ось ОХ) при использовании в качестве матрицы разведений бакмидного стандарта (тонкие кривые от темного оттенка для неразведенного образца до светлого оттенка для самого разведенного образца) или опытного ЗС-образца (толстая линия). Фл<sub>порог</sub> – пороговая флуоресценция. С<sub>топыт</sub> – пороговый цикл для опытного ЗС-образца. Участок экспоненциального роста флуоресценции затенен. (В) Калибровочная кривая для определения относительного количества продукта лигирования в ЗС-образце. (Г) Принцип метода ПЦР в реальном времени с TaqMan-пробами.

Каждая пара праймеров была использована для амплификации ДНК шести последовательных 5-ти кратных разведений эквимоллярной смеси продуктов лигирования, приготовленной на основе бакмиды (бакмидный стандарт). Для каждого разведения был определен так называемый «пороговый цикл» (threshold cycle, С<sub>Т</sub>) – цикл, при котором флуоресценция достигала некоего фиксированного значения в пределах экспоненциальной фазы роста флуоресценции («пороговая флуоресценция») (рис. 4 А). Для удобства мы использовали графики с логарифмической шкалой ординат, на которых экспоненциальная фаза видна как участок линейности (рис. 4 Б). По полученным данным была построена калибровочная кривая, отражающая зависимость С<sub>Т</sub> от количества ДНК-матрицы. Для получения линейной зависимости использовалась логарифмическая шкала количеств ДНК (в отн. ед.), зависимость представляли в обратных координатах (рис. 4 В). В параллели

с бакмидным стандартом реакцию амплификации проводили на ЗС-образцах. Полученные значения  $C_T$  ( $C_T$ -опыт) были наложены на калибровочную кривую, что позволяло определять относительные количества того или иного (в зависимости от использованной пары праймеров) продукта лигирования в ЗС-образцах. Для получения более точной калибровочной кривой, учитывающей вклад всех последовательностей генома в реакцию амплификации, концентрация ДНК в бакмидных разведениях была доведена до концентрации ДНК ЗС-образцов посредством добавления переваренной и религированной куриной геномной ДНК. Все ЗС-образцы тестировались в двух разведениях (как правило, двукратных), с тем чтобы проверить, действительно ли получаемые по калибровке значения различаются во столько же раз, во сколько раз различается количество ДНК в разведениях. Каждая реакция амплификации была выполнена в четырех повторах, и соответствующие результаты усреднялись. Для унификации условий реакций, проводимых в разное время, все компоненты реакции, за исключением *Taq*-полимеразы, были разделены на порции и хранились замороженными непосредственно до постановки реакции. Для проверки воспроизводимости результатов все эксперименты, начиная с манипуляций с живыми клетками, были повторены как минимум дважды.

*Контроль специфичности ПЦР-амплификации.* Для того чтобы убедиться, что праймеры эффективно работают для амплификации только одного, целевого, участка генома, многие из пар праймеров были протестированы в обычной полимеразной цепной реакции с последующей детекцией продуктов амплификации в агарозном геле. В качестве матрицы для амплификации была использована ДНК ЗС-образцов и, как контроль, ДНК бакмидного стандарта без добавления геномной ДНК (см. «Количественный ПЦР-анализ продуктов лигирования»). Было показано, что праймеры работают достаточно специфично (результаты представлены в диссертации).

*Оценка эффективности рестрикции.* Поскольку рестрикция осуществляется в присутствии SDS, и переваривается не чистая ДНК, а ДНК, сшитая с белками, эффективность рестрикции может быть невысокой и, кроме того, неодинаковой для разных сайтов изучаемого участка генома, что будет влиять на количество специфических продуктов лигирования. Поэтому необходимо было оценить эффективность рестрикции на различных участках ДНК в пределах изучаемой области генома. С этой целью был использован ПЦР-стоп-анализ. Было показано, что эффективность расщепления ДНК разными рестриктазами, по разным сайтам и в разных типах клеток достаточно схожа и составляет около 80% (то есть из всех сайтов рестрикции около 20% остались нерасщепленными) (результаты представлены в диссертации).

*Контроль качества и количества ДНК в ЗС-образцах.* Еще один важный контроль касается тех случаев, когда необходимо сравнивать результаты ЗС-анализа, полученные для клеток различного типа. Дело в том, что качество и количество ДНК, приготовляемой при ЗС-анализе из исходно равного количества клеток различного типа, может различаться: с самого начала может по-разному пройти фиксация и лизис клеток, могут наблюдаться различия не

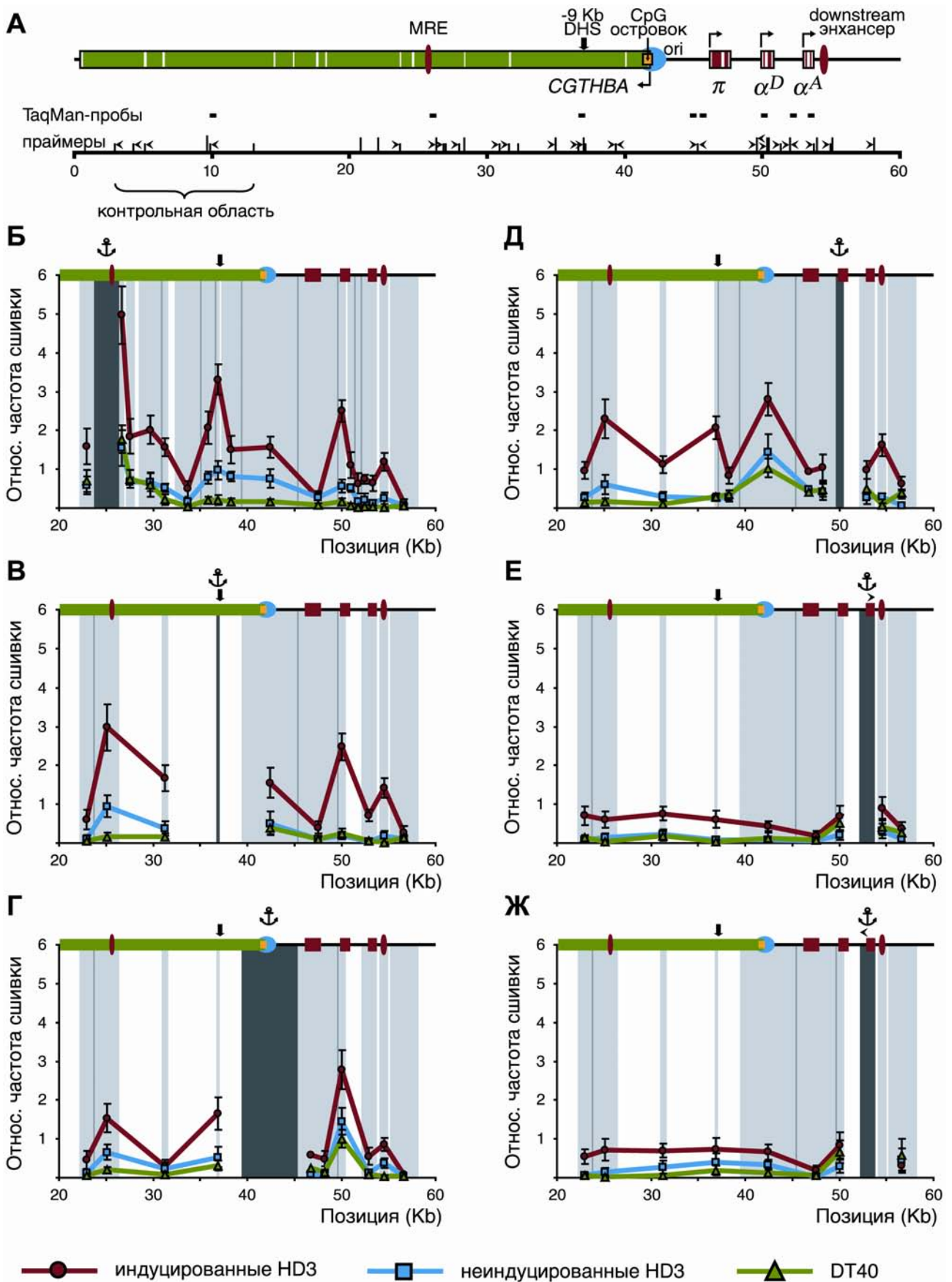
только в эффективности рестрикции, но и лигирования. Для нормировки данных необходимо провести 3С-анализ участка генома, который предположительно имеет одинаковую пространственную организацию во всех типах клеток, используемых в работе. Обычно в качестве таких участков выбирают гены домашнего хозяйства, транскрипционный статус которых не меняется в зависимости от типа клеток. Полученные данные свидетельствуют об успешности экспериментальных процедур и используются для нормировки данных 3С-анализа изучаемого участка генома для каждого типа клеток (Splinter *et al.*, 2004).

В качестве подобного контроля нами был проведен 3С-анализ участка куриного генома, расположенного достаточно близко к домену  $\alpha$ -глобиновых генов (13–23 Kb выше MRE), но в пределах гена домашнего хозяйства CGTNBA (рис. 5 А и 6 А, «контрольная область»). Мы проанализировали три пары рестриктных фрагментов в случае BamHI/BglII-рестрикции и две пары в случае MboI-рестрикции (результаты представлены в диссертации). Полученные в каждом случае величины частот лигирования были усреднены и условно приняты за 1.

Хотя нет веских оснований полагать, что ген домашнего хозяйства может иметь различную пространственную организацию в лимфоидных и эритроидных клетках, такая возможность не может быть полностью исключена в связи с близостью гена к ткане-специфичному генному домену. Поэтому мы выполнили 3С-анализ для другого гена домашнего хозяйства, расположенного на другой хромосоме в окружении повсеместно экспрессирующихся генов (ген ERCC3) (результаты представлены в диссертации). Полученные соотношения частот лигирования были очень схожи с соотношениями, вычисленными на основании 3С-анализа гена CGTNBA.

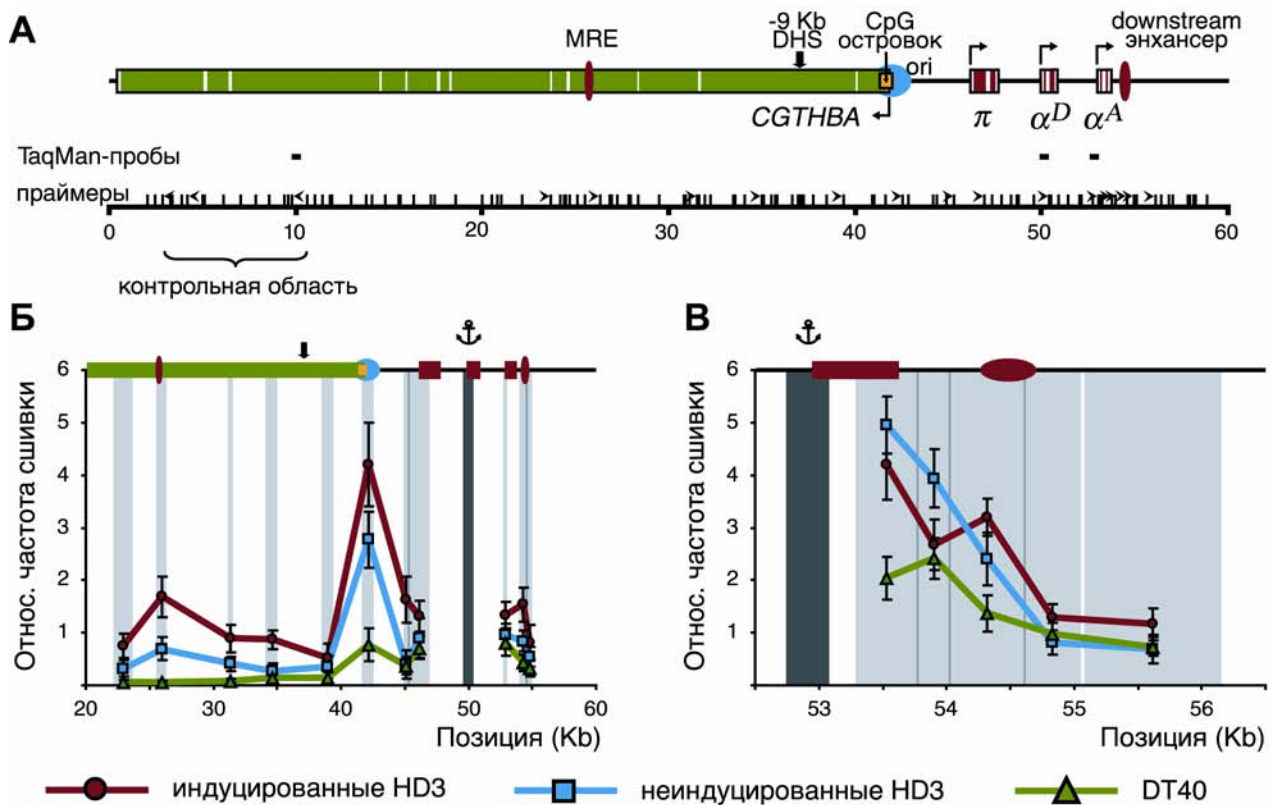
*Отрицательные контроли.* В качестве отрицательного контроля 3С-анализ был выполнен без добавления формальдегида на стадии фиксации клеток или без добавления лигазы на этапе лигирования. Полученная ДНК была амплифицирована, как в обычном эксперименте. Было показано, что в образцах, приготовленных из клеток, не обработанных формальдегидом, некоторое количество продуктов лигирования все же может быть обнаружено. Вероятнее всего, они образуются в результате межмолекулярного лигирования, которое на низком уровне может проходить в разбавленном растворе. В отсутствие лигазы продукты лигирования не детектировались (результаты представлены в диссертации).

**Сравнение пространственной организации домена  $\alpha$ -глобиновых генов в неэритроидных клетках кур и трансформированных эритроидных клетках кур до и после начала транскрипции глобиновых генов.** В течение многих лет домен  $\alpha$ -глобиновых генов кур служит моделью для изучения механизмов регуляции транскрипции у высших эукариот (Weintraub *et al.*, 1981; Recillas-Targa and Razin, 2001; Razin and Ioudinkova, 2007). Помимо трех глобиновых генов  $\alpha$ -типа (эмбриональный ген  $\pi$  и «взрослые» гены  $\alpha^D$  и  $\alpha^A$ ) домен содержит ряд регуляторных элементов, расположенных как выше (Flint



**Рисунок 5.** BamHI/BglII-3C-анализ домена  $\alpha$ -глобиновых генов в незрительных и трансформированных эритроидных клетках кур. (А) Схема домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур (выше) и BamHI/BglII-рестрикционная карта домена (ниже). На схеме: красные

прямоугольники –  $\alpha$ -глобиновые гены, зеленый прямоугольник – ген CGTHBA (белые участки соответствуют экзонам, стрелками показано направление транскрипции); красные овалы – MRE и энхансер; толстая черная стрелка – 9Kb DHS; квадратная рамка – CpG-островок; синяя окружность – участок начала репликации (ori). На карте: короткие насечки – сайты BglII, длинные насечки – сайты BamHI; точка «0» соответствует началу последовательности ДНК AY016020 (GeneBank), размерность шкалы представлена в т.п.н. Положения праймеров и TaqMan-проб, использованных для 3С-анализа, отмечены соответственно галочками и черточками над картой. (Б–Ж) Относительные частоты сшивки между якорными рестриктными фрагментами, несущими (Б) – MRE, (В) – 9Kb DHS, (Г) – CpG-островок, (Д) – промотор гена  $\alpha^D$ , (Е) и (Ж) – ген  $\alpha^A$ , и другими фрагментами домена. Ось X показывает позиции рестриктных фрагментов в соответствии со шкалой рестрикционной карты. В верхней части каждого графика дана схема домена с такой же символикой, как и в секции «А». Темно-серые прямоугольники на заднем фоне со значком якоря сверху демонстрируют позицию якорного фрагмента, светло-серые прямоугольники – тест-фрагментов. Границы между соседними фрагментами обозначены серыми линиями. Ось Y показывает частоты сшивки между анализируемыми фрагментами, нормализованные относительно частот сшивки между фрагментами из контрольной области. Линии погрешностей соответствуют стандартному отклонению от величины среднего по трем независимым экспериментам.



**Рисунок 6.** MbI-3C-анализ домена  $\alpha$ -глобиновых генов в неэритроидных и трансформированных эритроидных клетках кур. (А) Схема домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур (выше) и MbI-рестрикционная карта домена (ниже). Обозначения на схеме такие же, как на рисунке 5. (Б и В) Относительные частоты сшивки между якорными рестриктными фрагментами, несущими (Б) – промотор гена  $\alpha^D$ , (В) – промотор гена  $\alpha^A$ , и другими фрагментами домена. Обозначения на графиках такие же, как на рисунке 5.

*et al.*, 2001; Razin *et al.*, 2000; Razin *et al.*, 1999; Vyas *et al.*, 1995), так и ниже (Knezetic and Felsenfeld, 1989) кластера генов. Подобный области контроля

локуса главный регуляторный элемент (Major Regulatory Element, MRE) домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур расположен в интроне гена домашнего хозяйства CGTNBA на расстоянии около 20 т.п.н. перед геном  $\pi$ , первым в кластере  $\alpha$ -глобиновых генов. Промотор этого гена домашнего хозяйства локализуется внутри CpG-островка на расстоянии около 4 т.п.н. перед геном  $\pi$ . Внутри гена CGTNBA картирован ряд эритроид-специфичных участков гиперчувствительности к ДНКазе (DHS) (Flint *et al.*, 2001; De Moura Gallo *et al.*, 1992; Razin *et al.*, 1994). Некоторые из них колокализуются с такими регуляторными элементами, как MRE (Flint *et al.*, 2001) и инсуляторы (Valadez-Graham *et al.*, 2004). Значение других до настоящего времени не установлено. На расстоянии около 1 т.п.н. за геном  $\alpha^A$  (последним геном кластера  $\alpha$ -глобиновых генов кур) расположен эритроид-специфичный энхансер (Knezetic and Felsenfeld, 1989). Взаимное расположение всех перечисленных регуляторных элементов представлено на схеме (рис. 5А).

В первом цикле экспериментов мы проанализировали взаимодействие главного регуляторного элемента MRE с нижележащими фрагментами (за исключением очень маленьких фрагментов). Для этого в качестве якорного был использован праймер (с соответствующей TaqMan-пробой), отжигающийся на рестриктном фрагменте, содержащем MRE. В лимфоидных клетках DT40 частота сшивки якорного фрагмента, несущего MRE, с остальными фрагментами резко уменьшалась с увеличением дистанции между тестируемыми фрагментами и далее оставалась достаточно низкой (рис. 5 Б, зеленая кривая с точками треугольной формы). Это типично для участков хроматина, не организованных в петли (Tolhuis *et al.*, 2002). Напротив, уже в пролиферирующих (неиндуцированных) клетках HD3 частота сшивки якорного фрагмента, несущего MRE, с большинством нижележащих фрагментов домена  $\alpha$ -глобиновых генов была значительно выше. В особенности это касалось участка, включающего промотор гена  $\alpha^D$ , и достаточно протяженной области, перекрывающей CpG-островок и эритроид-специфичный участок гиперчувствительности к ДНКазе I, расположенный на расстоянии 9 т.п.н. перед геном  $\pi$  (-9Kb DHS) (рис. 5 Б, синяя кривая с квадратными точками). Частота взаимодействия MRE с -9Kb DHS, CpG-островком и промоторной областью гена  $\alpha^D$  (оцениваемая частотой сшивки соответствующих рестриктных фрагментов) увеличивалась при индукции терминальной эритроидной дифференцировки клеток HD3 (примерно в 3.5, 2 и 4.5 раза для каждого из указанных выше элементов, соответственно) (рис. 5 Б, красная кривая с круглыми точками). Помимо этого в дифференцирующихся (индуцированных) клетках HD3 детектировалось взаимодействие между MRE и эритроид-специфичным энхансером, расположенном за кластером глобиновых генов («downstream»-энхансер). Интересно, что MRE не взаимодействовал с генами  $\pi$  и  $\alpha^A$  ни в пролиферирующих, ни в индуцированных клетках HD3. В отношении гена  $\alpha^A$  это был неожиданный результат, поскольку этот ген активно транскрибируется в клетках HD3 (см. рис. 1 Б, Ж и З). Для подтверждения этого результата мы проанализировали частоты лигирования для противоположного конца



рестриктоного фрагмента, содержащего ген  $\alpha^A$ . С этой целью был подобран праймер обратной ориентации, отжигающийся на левом конце этого фрагмента (рис. 5 А). Частоты лигирования фрагмента, содержащего MRE, с обоими концами фрагмента, несущего ген  $\alpha^A$ , практически не отличались.

В следующей серии экспериментов «якорь» был последовательно перенесен на фрагменты, содержащие –9Kb DHS, CpG-островок, промотор гена  $\alpha^D$  и ген  $\alpha^A$ . Результаты этих экспериментов, показанные на рис. 5 В–Ж, в целом подтвердили выводы, сделанные из экспериментов с «якорем» на MRE. Кроме того, стало ясно, что в пролиферирующих клетках HD3 –9Kb DHS может образовывать комплекс с MRE, но не с промотором гена  $\alpha^D$  или энхансером, расположенным за кластером глобиновых генов (рис. 5 В и Д). В дифференцированных клетках HD3 частота ассоциации между –9Kb DHS и MRE возростала примерно в 3 раза. В то же время этот элемент теперь можно было обнаружить в комплексе с промотором гена  $\alpha^D$  и нижележащим энхансером (сравнить красную и синюю кривые на рис. 5 В).

3С-анализ с «якорем», фиксированным на CpG-островке или промоторе гена  $\alpha^D$ , показал, что эти элементы взаимодействуют во всех трех клеточных моделях. При этом частота взаимодействия возрастала в следующем порядке: DT40 < пролиферирующие HD3 < дифференцирующиеся HD3 (рис. 5 Г и Д). Однако утверждение о том, что данное взаимодействие реализуется, напрямую зависило от данных, показывающих достаточно низкую степень ассоциации как CpG-островка, так и промотора гена  $\alpha^D$  с расположенным между ними геном  $\pi$ . Для проверки этих данных на левой стороне рестриктных фрагментов, содержащих вышеуказанные элементы, были подобраны праймеры обратной ориентации, и 3С-анализ был выполнен с «якорем», фиксированным на гене  $\pi$ . Результаты анализа подтвердили вывод о слабой степени ассоциации гена  $\pi$  с CpG-островком и промотором гена  $\alpha^D$  (рис. 5 Г и Д, точки без линий погрешности).

В соответствии с результатами 3С-анализа с «якорем», фиксированным на MRE, эксперименты с «якорем» на CpG-островке показали, что частота взаимодействия этих двух элементов примерно вдвое выше в дифференцирующихся клетках HD3 по сравнению с пролиферирующими клетками HD3 (рис. 5 Г, сравнить красную и синюю кривые).

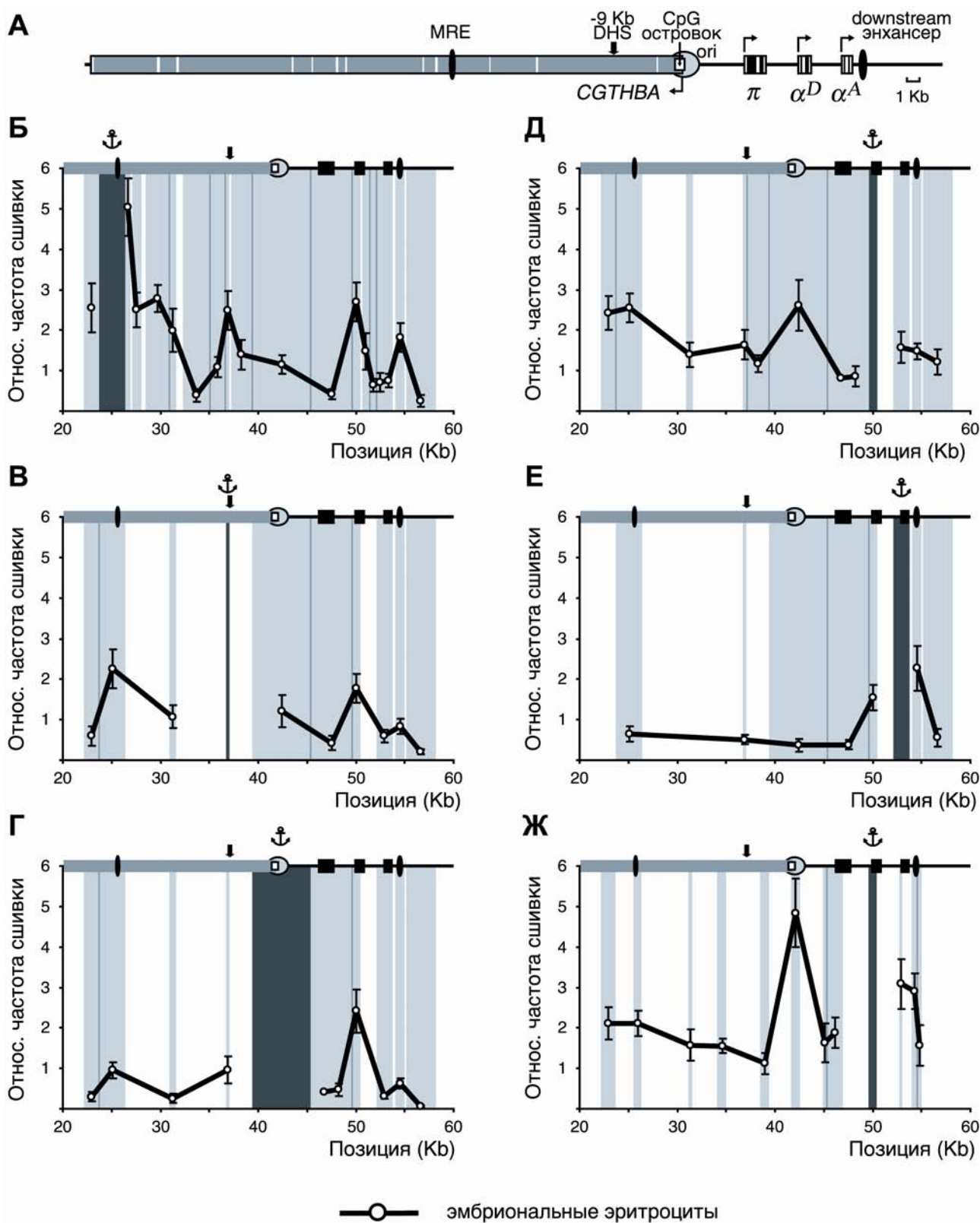
Эксперименты с «якорем», фиксированным на правой или левой сторонах рестриктоного фрагмента, включающего ген  $\alpha^A$  (рис. 5 Е и Ж, соответственно), показали, что этот ген не локализуется в непосредственной близости ни с одним из вышележащих регуляторных элементов.

Для повышения разрешения 3С-анализа эксперименты с «якорем» на промоторе гена  $\alpha^D$  были повторены на образцах, приготовленных с использованием рестриктазы MboI. С помощью этой рестриктазы 6 т.п.н. BglII-VglII фрагмент, включающий CpG-островок, был расщеплен на более мелкие фрагменты. В результате выяснилось, что промотор гена  $\alpha^D$  взаимодействует с CpG-островком *per se* (а точнее с 1 т.п.н. фрагментом, содержащим правую половину CpG-островка, в которой расположен промотор гена домашнего

хозяйства CGTNBA) (рис. 6 Б). Частота ассоциации 0.8 т.п.н. фрагмента, несущего промотор гена  $\alpha^D$ , с 1 т.п.н. фрагментом, содержащим правую часть CpG-островка, была даже более высокой, чем таковая, рассчитанная на основании данных по анализу бóльших по длине BamHI/VglII-фрагментов (рис. 5 Г и Д). Возможно, в данном конкретном случае короткие рестриктные фрагменты позиционируются в ДНК-белковом комплексе более подходящим для лигирования образом. Точно так же, с помощью рестриктазы MboI 1 т.п.н. BamHI-VglII-фрагмент, включающий энхансер, расположенный за кластером глобиновых генов, был разделен на два субфрагмента, один из которых содержал основную часть энхансера. Именно это субфрагмент демонстрировал высокую степень ассоциации с промотором гена  $\alpha^D$ , тогда как второй, «пустой», субфрагмент с промотором не взаимодействовал (рис. 6 Б). Более важным, однако, представляется то, что различия между клетками DT40, пролиферирующими клетками HD3 и дифференцирующимися клетками HD3, обнаруженные при проведении 3С-анализа с использованием рестриктаз BamHI и VglII, хорошо воспроизвелись в экспериментах с MboI-рестрикцией. Однако рестриктаза MboI расщепляет участок домена, включающий -9Kb DHS, на слишком маленькие фрагменты. Поэтому данный участок проанализировать не удалось. С другой стороны, при рестрикции MboI промотор гена  $\alpha^A$  выщепляется в составе небольшого (0.35 т.п.н.) рестриктного фрагмента и, таким образом, может быть проанализирован отдельно от всего гена в отличие от BamHI/VglII-рестрикции, при которой ген  $\alpha^A$  целиком попадает в рестриктный фрагмент длиной 1.7 т.п.н. Частоты лигирования коротких рестриктных фрагментов, содержащих промоторы генов  $\alpha^A$  и  $\alpha^D$ , снова были достаточно низкими (принимая во внимание близость рестриктных фрагментов в последовательности ДНК, что само по себе может обеспечивать повышенную частоту лигирования). Более того, при сравнении различных клеточных линий, включая лимфоидные клетки DT40, значительных различий в частоте ассоциации промоторов генов  $\alpha^A$  и  $\alpha^D$  не обнаруживается (рис. 6 Б).

Принимая во внимание кажущееся отсутствие взаимодействия промотора гена  $\alpha^A$  со всеми протестированными вышележащими регуляторными элементами, мы решили проверить, не взаимодействует ли этот промотор с расположенным ниже энхансером. Был выполнен детальный 3С-анализ 3'-концевой части домена, включающей участок от промотора гена  $\alpha^A$  до энхансера. При MboI-рестрикции данный участок расщепляется на серию фрагментов, шесть из которых имеют достаточный размер для того, чтобы их можно было анализировать с помощью метода 3С. Результаты анализа взаимодействий между якорным рестриктным фрагментом, содержащим промотор гена  $\alpha^A$ , с остальными пятью фрагментами показаны на рис. 6 В. Небольшой подъем в частоте сшивки между фрагментом, несущим промотор гена  $\alpha^A$ , и фрагментом, содержащим основную часть энхансера, был отмечен только в дифференцирующихся клетках HD3.

**Анализ пространственной организации домена  $\alpha$ -глобиновых генов в нормальных эмбриональных эритроцитах кур.** Для того чтобы выяснить,



**Рисунок 7. 3C-анализ домена  $\alpha$ -глобиновых генов в нормальных эритроцитах 10-дневных куриных эмбрионов.** (А) Схема домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур. Черные прямоугольники –  $\alpha$ -глобиновые гены, серый прямоугольник – ген  $CGTHBA$  (белые участки соответствуют экзонам, стрелками показано направление транскрипции); черные овалы – MRE и энхансер; толстая черная стрелка – -9Kb DHS; квадратная рамка – CpG-островок; серая окружность – участок начала репликации (ori). (Б–Ж) Относительные частоты сшивки между якорными рестриктными фрагментами, несущими (Б) – MRE, (В) – -9Kb DHS, (Г) –

СрG-островок, (Д) и (Ж) – промотор гена  $\alpha^D$ , (Е) – ген  $\alpha^A$ , и другими фрагментами домена (3С-анализ выполнен с использованием (Б–Е) – рестриктаз BamHI и BglII, (Ж) – рестриктазы MboI). Обозначения на графиках такие же, как на рис.5.

является ли пространственная конфигурация домена  $\alpha$ -глобиновых генов похожей в дифференцирующихся клетках HD3 и нормальных эритроидных клетках, мы провели 3С-анализ домена в эритроцитах 10-дневных куриных эмбрионов. У курицы переключение экспрессии глобиновых генов с эмбрионального на взрослый тип происходит примерно на 5-ый день эмбрионального развития. Таким образом, в эритроидных клетках 10-дневных эмбрионов экспрессируются «взрослые» глобиновые гены  $\alpha^D$  и  $\alpha^A$ , тогда как эмбриональный ген  $\pi$  уже неактивен (Weintraub *et al.*, 1981; Bruns and Ingram, 1973; Knezetic and Felsenfeld, 1993; Singal *et al.*, 2002). Результаты 3С-анализа, выполненного с использованием рестриктаз BamHI и BglII, представлены на рис. 7 Б–Е. Можно видеть, что относительные частоты взаимодействия между MRE и нижележащими фрагментами очень похожи в дифференцирующихся клетках HD3 (рис. 5 Б, красная кривая) и нормальных эмбриональных эритроцитах (рис. 7 Б). Особое внимание следует обратить на низкую частоту взаимодействия MRE с генами  $\pi$  и  $\alpha^A$  в сравнении с частотой взаимодействия этого элемента с –9Kb DHS, промотором гена  $\alpha^D$  и нежележащим энхансером. 3С-анализ с «якорем», фиксированным на –9Kb DHS (рис. 7 В) и СрG-островке (рис. 7 Г), также дал результаты, очень схожие с таковыми, полученными для дифференцирующихся клеток HD3 (рис. 5 В и Г, красная кривая). Когда в качестве якорного был использован рестриктный фрагмент, содержащий промотор гена  $\alpha^D$ , мы выявили достаточно высокую степень ассоциации этого фрагмента с геном  $\alpha^A$  (рис. 7 Д). Этот результат был подтвержден в экспериментах с «якорем» на гене  $\alpha^A$  (рис. 7 Е). Более того, по результатам, представленным на рис. 7 Е, можно сделать вывод о некоторой степени ассоциации между геном  $\alpha^A$  и нижележащим энхансером.

Для проверки этих результатов мы провели 3С-анализ с использованием рестриктазы MboI и в качестве якорного выбрали праймер, лежащий в рестриктном фрагменте, содержащем промотор гена  $\alpha^D$ . Полученные результаты свидетельствуют о том, что в нормальных эмбриональных эритроцитах промотор гена  $\alpha^D$  действительно может взаимодействовать не только с энхансером, но и с промотором гена  $\alpha^A$  (рис. 7 Ж).

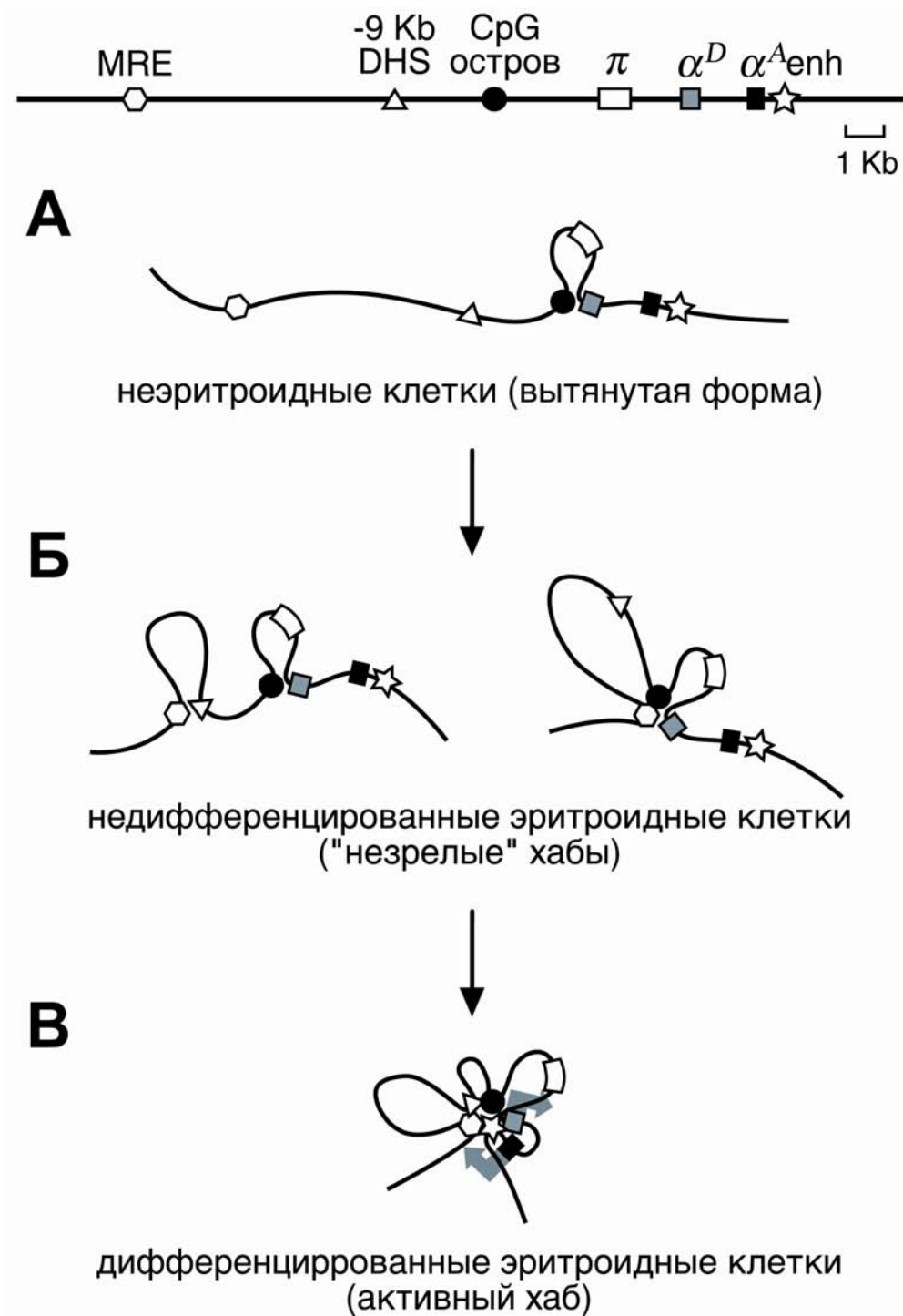
### **ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ**

Для правильной интерпретации результатов настоящей работы необходимо иметь в виду, что проведенный нами 3С-анализ позволяет количественно оценить только вероятность взаимодействия между теми или иными фрагментами изучаемого локуса. Следует принимать в расчет возможность чередования короткоживущих конфигураций домена в одних и тех же клетках. Кроме того, пространственная структура домена может отличаться для двух копий гомологичных хромосом в одной клетке, и для различных клеток, представленных в популяции. Для облегчения дискуссии мы

будем рассматривать только наиболее интересные пространственные конфигурации домена, типичные для изученных типов клеток. В то же время мы понимаем, что наиболее сложные конфигурации могут сосуществовать с другими, включая простейшую линейную конфигурацию.

Наиболее очевидный вывод из настоящей работы состоит в том, что пространственная организация домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур кардинально отличается в эритроидных и неэритроидных клетках. Даже в пролиферирующих клетках HD3, в которых глобиновые гены не экспрессируются, частота взаимодействия MRE с большинством нижележащих фрагментов домена  $\alpha$ -глобиновых генов заметно выше по сравнению с таковой в неэритроидных клетках. Исключения представляют области генов  $\pi$  и  $\alpha^A$ , а также участок, содержащий несколько CTCF-зависимых инсультаторов, который расположен 11–16 т.п.н. выше гена  $\pi$  (Valadez-Graham *et al.*, 2004). В дифференцирующихся клетках HD3 и нормальных эмбриональных эритроцитах частота ассоциации MRE со всеми рестриктными фрагментами, за исключением фрагмента, несущего ген  $\pi$ , увеличена по сравнению с пролиферирующими клетками HD3.

Тщательный анализ частот лигирования различных фрагментов домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур в эритроидных и неэритроидных клетках позволил нам выделить несколько характерных пространственных конфигураций данного локуса. Первая конфигурация типична для лимфоидных клеток DT40 (рис. 8 А). В этих клетках было выявлено единственное взаимодействие – между промотором гена  $\alpha^D$  и CpG-островком, расположенном на расстоянии около 4 т.п.н. перед кластером  $\alpha$ -глобиновых генов и содержащем промотор гена домашнего хозяйства CGTNBA (Flint *et al.*, 2001; Klochkov *et al.*, 2006) и участок начала репликации (Razin *et al.*, 1986; Verbovaia and Razin, 1995). Это взаимодействие кажется нестабильным (короткоживущим), поскольку частота взаимодействия между промотором гена  $\alpha^D$  и CpG-островком значительно увеличивается в эритроидных клетках (в особенности, продуцирующих глобины). Таким образом, в неэритроидных клетках линейная форма домена  $\alpha$ -глобиновых генов существует в равновесии с петлей, образующейся при взаимодействии промотора гена  $\alpha^D$  и CpG-островка. Этот результат противоречит наблюдениям, сделанным для домена  $\alpha$ -глобиновых генов мыши, где промоторы  $\alpha$ -глобиновых генов взаимодействуют с CpG-островками, окружающими домен, только в клетках, транскрибирующих глобиновые гены (Zhou *et al.*, 2006). Вероятно, пространственная организация домена  $\alpha$ -глобиновых генов в клетках, не экспрессирующих глобины, различна для курицы и мыши. Это может быть связано с различиями в крупномасштабной организации доменов. В самом деле, области консервативной синтении между доменами  $\alpha$ -глобиновых генов курицы и мыши захватывают сравнительно небольшие участки генома в сравнении со значительно более протяженными областями консервативной синтении между доменами  $\alpha$ -глобиновых генов различных млекопитающих (Tufarelli *et al.*, 2004).



**Рисунок 8.** Схематическое представление пространственной организации домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур в различных типах клеток. (А) Клетки DT40. (Б) Пролиферирующие клетки HD3. (В) Индуцированные в эритроидную дифференцировку клетки HD3 и 10-дневные эмбриональные эритроциты. Схема сверху показывает позиции глобиновых генов и регуляторных элементов домена: MRE – белый шестиугольник, -9Кб DHS – треугольник, CpG-остров – черный кружок, ген  $\pi$  – белый прямоугольник, ген  $\alpha^D$  – серый прямоугольник, ген  $\alpha^A$  – черный прямоугольник, энхансер – звездочка. Крупные стрелки символизируют активный транскрипционный статус генов  $\alpha^D$  и  $\alpha^A$ .

В пре-эритроблестах (пролиферирующие клетки HD3) взаимодействие между промотором гена  $\alpha^D$  и CpG-островком становится более частым (или происходит в большей доле клеток). Кроме того, различные регуляторные

элементы начинают взаимодействовать друг с другом с образованием «незрелых» комплексов регуляторных элементов («хроматиновых хабов»). Анализ частоты взаимодействий различных рестриктных фрагментов, расположенных ниже MRE, показывает, что наиболее «сложный» хроматиновый хаб на данной стадии клеточной дифференцировки включает MRE, CpG-островки и промотор гена  $\alpha^D$  (рис. 8, Б). Важно подчеркнуть, что эксперименты с «якорем», фиксированным на различных рестриктных фрагментах, ясно продемонстрировали, что все эти элементы взаимодействуют друг с другом. Таким образом, можно предположить, что они действительно формируют хроматиновый хаб. Однако это не исключает возможности, что этот хроматиновый хаб находится в динамическом равновесии с менее сложными ассоциатами указанных регуляторных элементов. Примечательно, что в пролиферирующих клетках HD3 участок гиперчувствительности к ДНКазе I –9Кб DHS не входит в состав хроматинового хаба, образованного с участием промотора гена  $\alpha^D$  и CpG-островка, однако может формировать независимый комплекс с MRE (рис. 5 В, синяя кривая). Таким образом, в пролиферирующих клетках HD3 домен  $\alpha$ -глобиновых генов имеет одну из двух взаимоисключающих пространственных конфигураций, обусловленных альтернативным взаимодействием MRE с –9Кб DHS либо с промотором гена  $\alpha^D$  и CpG-островком (рис. 8 Б).

Любопытно, что в пре-эритроблестах мыши активаторные белковые комплексы собраны на регуляторных элементах домена  $\alpha$ -глобиновых генов, однако промоторы «взрослых» глобиновых генов не взаимодействуют с этими элементами до индукции дифференцировки (Vernimmen *et al.*, 2007). Напротив, в куриных пре-эритроблестах ассоциация между MRE, CpG-островком и промотором гена  $\alpha^D$  ясно детектируется.

После индукции терминальной эритроидной дифференцировки клеток HD3 частота взаимодействия MRE, CpG-островка и промотора гена  $\alpha^D$  возрастает. Кроме того, к предсуществующему хроматиновому хабу привлекаются –9Кб DHS и энхансер, расположенный за геном  $\alpha^A$ . Похожая конфигурация домена  $\alpha$ -глобиновых генов характерна и для нормальных эмбриональных эритроцитов, продуцирующих  $\alpha^D$ - и  $\alpha^A$ -глобиновые цепи. Таким образом, подключение –9Кб DHS и специфического энхансера – характерная особенность «активного» хроматинового хаба домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур (рис. 8 В). К сожалению, относительно –9Кб DHS не известно ничего особенно примечательного. Этот участок гиперчувствительности к ДНКазе I был картирован достаточно давно. При этом было показано, что он специфичен для эритроидных клеток и колокализуется с MAR-элементом (De Moura Gallo *et al.*, 1992). Хотя общая организация доменов  $\alpha$ -глобиновых генов различных позвоночных животных отличается эволюционной консервативностью (Tufarelli *et al.*, 2004; Hughes *et al.*, 2005), –9Кб DHS не локализуется в пределах консервативных между разными видами последовательностей ДНК, и в геноме мыши и человека не существует аналога этому DHS (Hughes *et al.*, 2005). По-видимому, этот элемент содержит сайты

связывания некоторых эритроид-специфичных транскрипционных факторов, участвующих в сборке «активного» хроматинового хаба, характерного для зрелых эритробластов, продуцирующих глобины. Мы провели компьютерный анализ последовательности ДНК в области –9Кб DHS и обнаружили 4 потенциальных сайта связывания эритроид-специфичных транскрипционных факторов GATA1 и GATA2.

Во всех исследованных клеточных линиях мы не выявили взаимодействия эмбрионального  $\alpha$ -глобинового гена  $\pi$  с какими-либо регуляторными элементами. Это кажется логичным, поскольку ген  $\pi$  не экспрессируется в дифференцирующихся клетках HD3 и эритроидных клетках 10-дневных эмбрионов (рис. 1 Б и Ж; Weintraub *et al.*, 1981). Более неожиданным стало наблюдаемое отсутствие ассоциации промотора гена  $\alpha^A$  с вышележащими регуляторными элементами, и, прежде всего, с MRE. В этой связи необходимо напомнить, что в дифференцирующихся клетках HD3 уровень транскрипции гена  $\alpha^A$  превышает таковой гена  $\alpha^D$  (рис. 1 Б, Ж и З). То же верно и для 10-дневных эмбриональных эритроцитов (Brown and Ingram, 1974). Хотя частота взаимодействия MRE с геном  $\alpha^A$  в дифференцирующихся клетках HD3 и 10-дневных эмбриональных эритроцитах не достигала нулевого уровня, она была значительно меньше частоты взаимодействия MRE с промотором гена  $\alpha^D$  (рис. 5 Б и 7 Б). То же наблюдалось и для –9Кб DHS (рис. 5 В и 7 В) и CpG-островка (рис. 5 Г и 7 Г). Принимая во внимание тот факт, что промотор гена  $\alpha^A$  расположен на расстоянии 3 т.п.н. от промотора гена  $\alpha^D$  и на расстоянии 1.5 т.п.н. от энхансерного элемента, которые сами по себе взаимодействуют с вышележащими регуляторными элементами, кажется маловероятным, чтобы частота взаимодействия гена  $\alpha^A$  с вышележащими регуляторными элементами достигала столь же малых величин, как в лимфоидных клетках, даже если в действительности ген  $\alpha^A$  с этими элементами не взаимодействует. Вместе с тем, мы понимаем, что даже сравнительно маленькая частота сшивки еще не доказывает несущественности взаимодействия, поскольку оно может быть кратковременным и/или редким, но отнюдь не случайным. Тем не менее, вполне определенным кажется, что активности генов  $\alpha^D$  и  $\alpha^A$  регулируются с помощью различных механизмов. Иная картина наблюдается в домене  $\beta$ -глобиновых генов человека, где область контроля локуса (LCR) альтернативно взаимодействует со всеми активными промоторами (Tolhuis *et al.*, 2002; Gribnau *et al.*, 1998; Palstra *et al.*, 2003). Можно было бы предположить, что с промотора гена  $\alpha^D$  осуществляется синтез бицистронной пре-мРНК, которая впоследствии процессируется с образованием индивидуальных мРНК генов  $\alpha^D$  и  $\alpha^A$ . Однако паттерн транскрипции в домене  $\alpha$ -глобиновых генов кур на протяжении многих лет служил предметом интенсивных исследований, и следов такой бицистронной пре-мРНК обнаружено не было (Recillas-Targa and Razin, 2001). Более того, промотор гена  $\alpha^A$  хорошо охарактеризован, и нет оснований полагать, что он не функционирует в живых клетках (Knezetic and Felsenfeld, 1989; Dodgson and Engel, 1983; Lewis *et al.*, 1993).



Нам представляется весьма вероятным, что в домене  $\alpha$ -глобиновых генов кур активация гена  $\alpha^A$  осуществляется эритроид-специфичным энхансером, расположенном в непосредственной близости с этим геном – на расстоянии около 1 т.п.н. за ним (Knezetic and Felsenfeld, 1989). В доменах  $\alpha$ -глобиновых генов мыши и человека подобных энхансеров не обнаружено. Однако, происходит ли взаимодействие этого энхансера с промотором гена  $\alpha^A$ , сложно достоверно установить посредством 3С-анализа, поскольку эти элементы расположены очень близко. Во всяком случае, некоторые наши результаты допускают возможность такого взаимодействия в эритроцитах 10-дневных эмбрионов (рис. 7 Е) и дифференцирующихся клетках HD3 (рис. 6 В). С другой стороны, вполне возможно, что энхансер, расположенный так близко к подконтрольному промотору, может активировать этот промотор по другому механизму, не связанному с образованием петли ДНК. Наконец, в виде еще одной модели активации транскрипции гена  $\alpha^A$ , мы можем предположить, что взаимодействие нескольких регуляторных элементов в области перед геном  $\alpha^D$  может обеспечивать активацию целого «взрослого» субдомена  $\alpha$ -глобиновых генов, включающего гены  $\alpha^D$  и  $\alpha^A$ . В качестве молекулярного механизма такой активации может быть рассмотрена инактивация сайленсерного элемента, расположенного перед геном  $\alpha^D$  и активного в отношении обоих взрослых  $\alpha$ -глобиновых генов (Lewis *et al.*, 1993).

### ВЫВОДЫ

1. Пространственная организация домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур различается в клетках с различным транскрипционным статусом глобиновых генов.
2. В лимфоидных клетках кур, в которых  $\alpha$ -глобиновые гены неактивны, промотор гена  $\alpha^D$  взаимодействует с CpG-островком домена.
3. В куриных пре-эритроблестах, где  $\alpha$ -глобиновые гены находятся в подготовленном для транскрипции состоянии, главный регуляторный элемент домена формирует комплекс с промотором гена  $\alpha^D$  и CpG-островком домена либо, альтернативно, с участком гиперчувствительности к ДНКазе I, расположенном девятью т.п.н. выше кластера  $\alpha$ -глобиновых генов.
4. В дифференцированных эритроидных клетках кур, транскрибирующих «взрослые» глобиновые гены  $\alpha^D$  и  $\alpha^A$ , формируется блок регуляторных элементов, включающий в себя главный регуляторный элемент домена, промотор гена  $\alpha^D$ , CpG-островок домена, участок гиперчувствительности к ДНКазе I, расположенный девятью т.п.н. выше кластера  $\alpha$ -глобиновых генов, и энхансер, локализованный за кластером  $\alpha$ -глобиновых генов.
5. Транскрипционно неактивный куриный эмбриональный  $\alpha$ -глобиновый ген  $\alpha$  не располагается в непосредственной близости с какими-либо регуляторными элементами домена  $\alpha$ -глобиновых генов.
6. Куриный глобиновый ген  $\alpha^A$  не взаимодействует с расположенными перед кластером  $\alpha$ -глобиновых генов регуляторными элементами, однако в

эритроидных клетках, транскрибирующих гены  $\alpha^D$  и  $\alpha^A$ , может взаимодействовать с расположенным за геном энхансером.

### СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

#### Статьи:

1. Gavrilov A.A., Razin S.V. (2008). Spatial organization of the chicken  $\alpha$ -globin gene domain: immature and active chromatin hubs. *Nucleic Acids Res.* **36**: 4629–4640.
2. Klochkov D., Rincon-Arano H., Ioudinkova E.S., Valadez-Graham V., Gavrilov A., Recillas-Targa F., Razin S.V. (2006). A CTCF-dependent silencer located in the differentially methylated area may regulate expression of a housekeeping gene overlapping a tissue-specific gene domain. *Mol. Cell. Biol.* **26**: 1589–1597.
3. Гаврилов А.А., Разин С.В. (2008). Изучение пространственной организации домена  $\alpha$ -глобиновых генов кур методом 3С. *Биохимия* **73**: 1486–1494.

#### Тезисы конференций:

1. Gavrilov A.A., Klochkov D.B., Razin S.V. Mapping chicken ggPRX gene promoter. Workshop «Protein-nucleic acid interactions» of the International Research Training Group Gießen/Marburg-Moscow. Giessen, Germany, March 9–12, **2008**, abstract book, p. 26.
2. Gavrilov A.A., Razin S.V. 3C technology: analyzing the spatial organization of genomic loci in vivo. Workshop «Protein-nucleic acid interactions» of the International Research Training Group Gießen/Marburg-Moscow. Moscow, Russia, February 12–15, **2008**, abstract book, p. 20.
3. Gavrilov A.A., Razin S.V. Study of spatial organisation of the chicken alpha-globin gene domain by Chromosome Conformation Capture assay. Workshop «Protein-nucleic acid interactions» of the International Research Training Group Gießen/Marburg-Moscow. Suzdal, Russia, June 20–24, **2007**, abstract book, p. 24.
4. Гаврилов А.А., Клочков Д.Б., Разин С.В. Картирование промотора гена ggPRX курицы. 10-ая международная школа-конференция «Биология – наука XXI века». Пущино, Россия, 17–21 апреля **2006**, сборник тезисов, с. 8.
5. Гаврилов А.А., Разин С.В. Анализ пространственной организации домена альфа-глобиновых генов кур в эритроидных и неэритроидных клетках с использованием метода фиксации конформации хромосом (3С). IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Новосибирск, Россия, 11–15 мая **2008**, сборник тезисов, с.100.
6. Гаврилов А.А., Разин С.В. Изучение пространственной организации геномных локусов методом 3С. IV съезд Российского общества биохимиков и молекулярных биологов. Новосибирск, Россия, 11–15 мая **2008**, сборник тезисов, с. 123.