

На правах рукописи

УДК 576.315.42

МАРКОВА ЕЛЕНА НИКОЛАЕВНА

**РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСКРИПЦИИ И ПРОСТРАНСТВЕННАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ГЕНА *AML1/RUNX1* ЧЕЛОВЕКА**

Специальности: 03.01.07 – молекулярная генетика

03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва

2011

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

Научные руководители: чл.-корр. РАН, доктор биологических наук, профессор
С.В. Разин

кандидат биологических наук
О.Л. Кантидзе

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

кандидат биологических наук
М.А. Рубцов

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

Защита диссертации состоится ____ декабря 2011 года в ____ час. на заседании
Диссертационного совета Д 002.037.01 при Учреждении Российской академии наук
Института 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 2011 года.

Ученый секретарь диссертационного совета
канд. фарм. наук

Грабовская Л.С.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Пролиферация и дифференцировка клеток – это ключевые, жизненно важные процессы в организмах высших эукариот, как во время эмбрионального развития, так и во взрослом состоянии. Они находятся под контролем целого ансамбля транскрипционных факторов, запускающих экспрессию генов-мишеней в нужное время и в строго определенном месте. Разбалансировка этих процессов, связанная с нарушением структуры белков и соответствующих генов тканеспецифичных транскрипционных факторов, приводит к тяжелым последствиям, таким как не совместимые с жизнью нарушения в развитии плода во внутриутробный период или острые формы онкологических заболеваний во взрослом возрасте.

К числу важных транскрипционных факторов, контролирующих ключевые этапы гематопоеза и ангиогенеза у человека и млекопитающих животных, относится и *RUNX1*. Изучение этого фактора, как и кодирующего его гена *RUNX1* в значительной мере было обусловлено тем, что нарушение нормальной функции *RUNX1* приводит к острым формам лейкемии. Несмотря на то, что многое известно о структуре *RUNX1*, установлены контролируемые им гены-мишени, охарактеризована структура гена *RUNX1*, механизмы регуляции экспрессии гена *RUNX1* человека остаются мало изученным. Работа в этом направлении ведется, однако на сегодняшний день фактической информации для понимания всей сложности процесса не достаточно. Было установлено, что транскрипция гена *RUNX1* человека осуществляется с двух промоторов, дистального (P1) и проксимального (P2), но они не имеют тканевой специфичности, в то время, как *RUNX1* экспрессируется только в определенных типах клеток. Стало быть, должны существовать дополнительные регуляторные элементы, определяющие тканевую специфичность экспрессии *RUNX1*. Такие регуляторные элементы обычно представляют собой площадки для связывания транскрипционных факторов. Они могут находиться как во фланкирующих областях, так и в интронах соответствующих генов и часто являются консервативными по нуклеотидной последовательности среди представителей разных видов. Неспецифичная активность промоторов гена *RUNX1* и четкий пространственно-временной профиль экспрессии этого гена в разных тканях прямо указывают на то, что такого типа регуляторные элементы в его составе должны существовать. Тем не менее, до сих пор они не были локализованы. Идентификация и характеристика таких регуляторных

элементов и изучение их работы в составе гена *RUNX1* человека позволит лучше понять фундаментальные механизмы, лежащие в основе регуляции процесса развития системы гематопоеза у млекопитающих.

Все вышесказанное определяет актуальность темы настоящей диссертационной работы, которая посвящена поиску тканеспецифичных регуляторных элементов в составе гена *RUNX1* человека и изучению характера взаимодействий этих элементов с промоторами гена *RUNX1* в разных типах клеток.

Цель и задачи исследования.

Основная цель работы заключалась в локализации тканеспецифичных регуляторных элементов гена *RUNX1* человека и изучении характера взаимодействий этих элементов с промоторами гена *RUNX1* в разных типах клеток.

Для реализации поставленной цели были определены следующие экспериментальные задачи:

- идентифицировать участки гена *RUNX1* человека, которые потенциально могут обладать регуляторной активностью;
- проанализировать с помощью конструкций с репортерным геном влияние идентифицированных потенциальных регуляторных элементов на активность дистального (П1) и проксимального (П2) промоторов гена *RUNX1* человека;
- установить взаимное пространственное расположение промоторов и потенциальных регуляторных участков в составе гена *RUNX1* человека в разных типах клеток, используя метод 3С-анализа.

Научная новизна и практическое значение работы.

В работе впервые были локализованы два регуляторных элемента РЭ1 и РЭ2 внутри интронов гена *RUNX1* человека. Было установлено, что эволюционно консервативный среди позвоночных регуляторный элемент 1 (РЭ1) внутри первого интрона представляет собой тканеспецифичный энхансер, активирующий работу дистального (П1) и проксимального (П2) промоторов этого гена в лимфоидных клетках и только проксимального промотора – в эритроидных клетках, и не обладающий подобной активностью в эпителиальных клетках. Анализ работы регуляторного элемента 2 (РЭ2) из интрона 5.2 гена *RUNX1* человека, представляющего собой лимфоид-специфичный сайт гиперчувствительности к ДНКазе I, показал, что он является важным структурным

элементом, участвующим в формировании активаторного блока транскрипции *RUNX1* в лимфоидных и эритроидных клетках, а также образует дальние взаимодействия с промотором П2 в эпителиальных клетках. Кроме того, нами впервые была установлена пространственная организация гена *RUNX1* человека в разных типах клеток. На основании данных, полученных с помощью метода фиксации конформации хромосом (3С-анализа), были предложены две альтернативные модели дальних взаимодействий внутри гена *RUNX1* человека, характерные для клеток крови и для эпителиальных клеток.

Результаты данной работы вносят существенный вклад в развитие представлений о работе структурно-функциональных элементов, обеспечивающих тканевую специфичность экспрессии генов.

Апробация работы.

Результаты диссертационной работы были представлены на 13-ой международной конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2009), на международных школах, конференциях и симпозиумах: Workshop «Protein-nucleic acid interactions» of the IRTG (International Research Training Group Giessen/Marburg-Moscow) (Вильнюс, Литва и Гиссен, Германия, 2010), International Conference «Early events in human pathologies» (Барбизон, Франция, 2010), International Symposium «Control of Gene Expression and Cancer» (Москва, Россия, 2010).

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ. Из них статей – 1, материалов конференций – 5.

Структура и объем работы.

Диссертация изложена на 111 страницах, содержит 10 рисунков, 6 таблиц и включает следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Постановка задачи и методические подходы», «Материалы и методы», «Результаты исследований», «Обсуждение результатов», «Выводы» и «Список литературы» (139 цитированных работ).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

1. Промоторы П1 и П2 гена *RUNX1* человека дифференциально активны в разных типах клеток.

Известно, что экспрессия гена *RUNX1* человека носит тканеспецифичный характер. У позвоночных этот ген экспрессируется только при гематопоезе в Т-лимфоцитах (Taniuchi et al., 2002) и в эритроидных клетках на раннем этапе их дифференцировки (North et al., 2004). Ген не экспрессируется в клетках других органов: в нейронах головного мозга, миоцитах и эпителиальных клетках дыхательной и мочеполовой систем (Levanon et al., 1996; Levanon et al., 1994; Nucifora and Rowley, 1995). Известно также, что в составе гена находятся два промотора, дистальный (П1) и проксимальный (П2), активность которых не имеет тканевой специфичности (Ghozi et al., 1996). Исходя из этого, на первом этапе нашего исследования нам представлялось интересным выяснить, каковы различия в уровне транскрипции, осуществляемой с каждого из промоторов этого гена в разных линиях культивируемых клеток человека, как активно экспрессирующих *RUNX1*, так и с низким уровнем его экспрессии. Для этих исследований были выбраны три типа клеток: лимфоидные Jurkat, эритроидные K562, а также эпителиальные НЕК 293. Для того чтобы проанализировать активность промоторов, мы сравнивали относительную представленность в тотальной клеточной РНК экзонов *RUNX1*, расположенных между промоторами П1 и П2, которые транскрибируются с промотора П1, и экзонов, расположенных в 3'-области от промотора П2, которые могут быть транскрибированы как с промотора П1, так и с промотора П2. Расположение праймеров, использованных для анализа, показано на рисунке 1А. В качестве отрицательного контроля была использована пара праймеров, комплементарная участку, расположенному в 5'-области по отношению к промотору П1. Тотальная РНК была выделена из всех трех типов клеток, далее была синтезирована кДНК, которую анализировали с помощью ПЦР в реальном времени. Полученные результаты нормировали на количество одного из экзонов гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Результаты анализа представлены на диаграмме на рисунке 1Б. Следует подчеркнуть, что истинную активность промотора П2, представленную на диаграмме, вычисляли путем вычитания величины ПЦР сигнала в относительных единицах, полученного для промотора П1, из соответствующего сигнала, полученного для пары праймеров, комплементарной экзону 2. Из представленных данных видно, что промотор П1 в эпителиальных клетках не работал, а активность промотора П2 была

крайне низка. В лимфоидных клетках оба промотора были активны практически на одинаковом уровне. В эритроидных клетках активность промотора П2 в 10 раз превышала такую промотора П1.

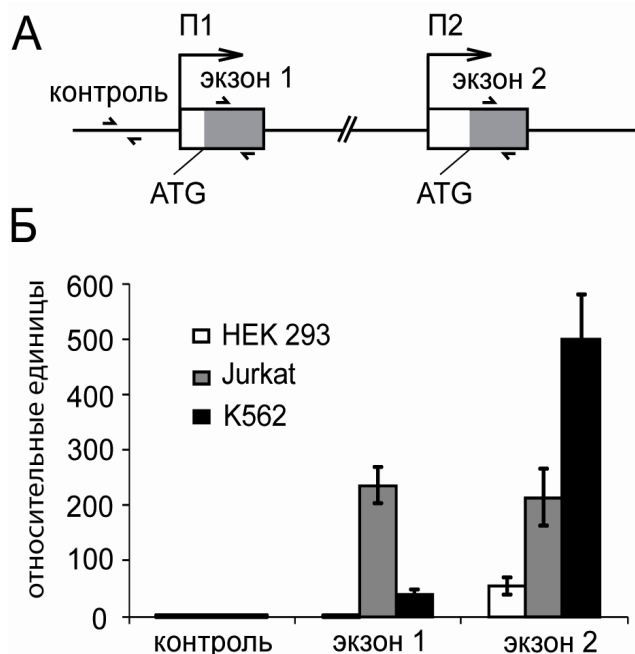


Рисунок 1. Профиль экспрессии гена *RUNX1* человека в разных клеточных линиях. (А) Схема расположения праймеров, использованных для анализа. Белым цветом обозначены нетранслируемые области соответствующих экзонов. Стрелками показано направление транскрипции. (Б) Относительная представленность контрольной области, экзона 1 и экзона 2 в препаратах тотальной РНК, выделенной из клеток HEK 293 (белые столбцы), Jurkat (серые столбцы) и K562 (черные столбцы). Относительная единица соответствует 0.1% от экспериментально определенного количества 8-го экзона гена *GAPDH* в анализируемых препаратах РНК. Погрешности – стандартное отклонение от величины среднего по четырём независимым экспериментам.

Таким образом, на первом этапе исследований нами было установлено, что не смотря на то, что активность обоих промоторов не имеет тканевой специфичности в модельных тест-системах, имеются существенные различия в уровне активности П1 и П2 в геномном контексте. Значительно более высокий уровень их активности наблюдаемый в лимфоидных и эритроидных клетках по сравнению с эпителиальными клетками косвенно свидетельствует о наличии активирующих, тканеспецифичных цис-регуляторных элементов.

2. Выбор потенциальных регуляторных элементов в составе гена *RUNX1* человека.

На следующем этапе исследования мы попытались локализовать те области гена *RUNX1* человека, которые теоретически могут обладать тканеспецифичной энхансерной активностью по отношению к промоторам П1 и П2. Наше внимание привлекли две работы. В одной из них (Nottingham et al., 2007) был проведен поиск консервативных

некодирующих элементов внутри интронов гена *RUNX1* у позвоночных. Среди прочих был идентифицирован элемент «+23» размером 500 п.о. внутри первого интрона этого гена, обладающий высокой степенью идентичности нуклеотидной последовательности (более 70%) у позвоночных от земноводных (*Xenopus tropicalis*) до человека (*Homo sapiens*). В этой же работе было показано, что данный элемент внутри гена *Runx1* мыши обладает гиперчувствительностью к ДНКазе I в эмбриональных стволовых клетках крови. Это означает, что данный элемент находится в открытой конформации хроматина при эмбриональном гематопозе. Мы назвали данный потенциальный регуляторный элемент РЭ1 (регуляторный элемент 1).

В другой работе (Zhang et al., 2002) был проведен анализ распределения сайтов гиперчувствительности к ДНКазе I и топоизомеразе II внутри гена *RUNX1* в культивируемых лимфоидных клетках человека. В ходе этого исследования было установлено, что на расстоянии 12,5 т.п.о. в 3'-области от экзона 5.2 этого гена колокализованы три сайта расщепления ДНКазой I и три сайта разрезания топоизомеразой II. Следовательно, фрагмент интрона 5.2 гена *RUNX1* в данном типе клеток также находится в открытой конформации хроматина, что косвенно свидетельствует о его возможной функциональной активности. Соответствующий участок размером 400 п.о., мы назвали РЭ2 (регуляторный элемент 2). В последующих экспериментах была проанализирована энхансерная/сайленсерная активность РЭ1 и РЭ2 в разных типах клеток (с использованием метода трансфекции конструкций с репортерным геном), а также их способность специфически связывать различные белковые факторы. Расположение выбранных нами для анализа потенциальных регуляторных участков в составе гена *RUNX1* человека показано на рисунке 2.

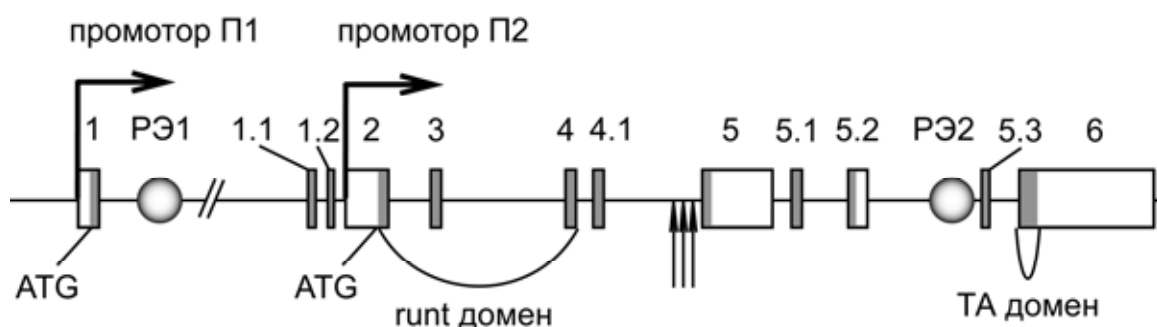


Рисунок 2. Общая схема структуры гена *RUNX1* человека. Прямоугольниками показаны экзоны, внутри которых белым цветом обозначены нетранслируемые области. Овалами показаны потенциальные регуляторные элементы, исследованные в данной

работе. Три вертикальные стрелки внутри интрона 4.1 обозначают кластеры двухцепочечных разрывов молекулы ДНК, характерные для хромосомных перестроек t(8;21) и t(3;21).

3. Выбранные элементы РЭ1 и РЭ2 образуют комплексы предпочтительно с белками ядерного экстракта лимфоидных клеток.

Регуляторные элементы генов обычно содержат множественные сайты связывания тканеспецифичных транскрипционных факторов. Поэтому после того как нами было выбрано два потенциальных регуляторных элемента, мы решили проверить, образуют ли исследуемые фрагменты ДНК-белковые комплексы с белками ядерного экстракта лимфоидных клеток.

Для ответа на этот вопрос мы воспользовались методом задержки ДНК-белковых комплексов в полиакриламидном геле. Принцип этого метода заключается в том, что радиоактивно меченые фрагменты ДНК инкубируют с ядерными экстрактами клеток в специальном буфере для связывания в присутствии неспецифичного конкурента в разных концентрациях. После этого продукты реакции разделяют в низкопроцентном полиакриламидном геле с пониженным содержанием бис-акриламида для облегчения движения массивных ДНК-белковых комплексов. Фрагмент ДНК в комплексе с белками обладает меньшей подвижностью в геле и оказывается ближе к старту, чем фрагмент ДНК в отсутствие ядерного экстракта. Образование комплексов фрагментов ДНК с белками экстракта в присутствии высоких молярных избытков неспецифичного конкурента указывает на специфичный характер связывания. В нашей работе в эксперимент были взяты радиоактивно меченые фрагменты РЭ1, РЭ2 и, в качестве контроля, TCR β , являющийся лимфоид-специфичным энхансером. Ядерные экстракты были приготовлены из лимфоидных клеток Jurkat и эпителиальных клеток НЕК 293. Результаты представлены на рисунке 3.

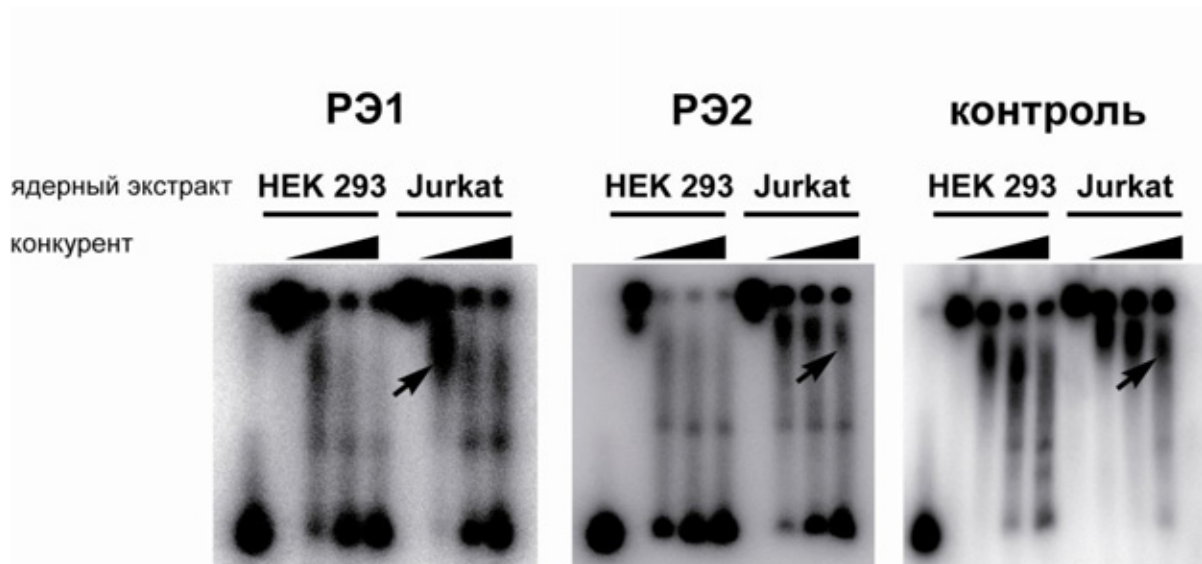


Рисунок 3. Взаимодействие фрагментов PЭ1 и PЭ2 с белками ядерного экстракта лимфоидных клеток. Над каждой радиограммой указан фрагмент, взятый для анализа, «контроль» соответствует энхансеру из гена Т-клеточного рецептора β (TCR β) мыши. Над всеми дорожками отмечен тип клеток, из которого был приготовлен ядерный экстракт. Черным треугольником показана нарастающая концентрации неспецифичного конкурента поли dI/dC. Стрелкой указаны специфичные ДНК-белковые комплексы. Первая дорожка во всех трех экспериментах отображает электрофоретическую подвижность соответствующего фрагмента в отсутствие белкового экстракта.

Экстракт лимфоидных клеток был взят по той причине, что ген *RUNX1* человека активно экспрессируется именно в Т-лимфоцитах (Taniuchi et al., 2002) и, кроме того, элемент PЭ2 по литературным данным обладает гиперчувствительностью к ДНКазе I именно в этом типе клеток. В качестве контроля специфичности связывания был взят ядерный экстракт эпителиальных клеток человека HEK 293. Как положительный контроль в реакциях связывания мы использовали ранее описанный лимфоид-специфичный энхансер из гена Т-клеточного рецептора β мыши (TCR β) (Krimpenfort et al., 1988). Как видно из представленных результатов, оба элемента PЭ1 и PЭ2, образовывали более стабильные комплексы с белками, присутствующими в ядерных экстрактах лимфоидных клеток. В контрольном эксперименте фрагмент мышинной ДНК, содержащий энхансер TCR β , также предпочтительно связывал белки из экстракта лимфоидных клеток. Взаимодействия фрагментов ДНК с белками ядерного экстракта эпителиальных клеток были слабее и разрушались уже при незначительном молярном избытке неспецифичного конкурента (поли dI/dC).

На основе полученных результатов можно сделать заключение о том, что фрагменты РЭ1 и РЭ2 предпочтительно связываются с белками ядерного экстракта лимфоидных клеток, что подтверждает наше предположение о потенциальном наличии специфичной функциональной активности у выбранных элементов.

4. Элемент РЭ1 является тканеспецифичным энхансером по отношению к промоторам П1 и П2 гена *RUNX1* человека, РЭ2 не обладает активностью энхансера по отношению к тем же промоторам.

Следующей задачей нашего исследования было проверить, обладают ли выбранные нами элементы РЭ1 и РЭ2 энхансерной/сайленсерной активностью по отношению к промоторам П1 и П2 гена *RUNX1* человека.

Для ответа на этот вопрос мы выбрали тест-систему на основе вектора pGL3-Basic, содержащего в своем составе ген люциферазы светлячка (*Photinus pyralis*). Нами было получено две серии генно-инженерных конструкций. В каждой из них в 5'-области от гена люциферазы был клонирован один из промоторов гена *RUNX1* человека. В первой серии конструкций в качестве промотора П1 был взят фрагмент гена, соответствующий ранее описанному дистальному регуляторному участку -12 – -370, расположенному перед первым экзоном, во второй серии в качестве промотора П2 был взят проксимальный промоторный участок -190 – +111, расположенный перед вторым экзоном. Оба промотора были описаны ранее в работе Ghazi et al., 1996 (цифры указаны относительно точек начала транскрипции с соответствующих промоторов, принятых за +1). В 3'-области от гена люциферазы были клонированы исследуемые фрагменты РЭ1 и РЭ2 в двух возможных ориентациях по отношению к промоторам, то есть геномной и обратной. В качестве положительного контроля в каждой серии конструкций был использован ранее известный и хорошо описанный лимфоид-специфичный энхансер из гена Т-клеточного рецептора β мыши (TCR β) (Krimpenfort et al., 1988). Как универсальный контроль для анализа и нормирования результатов по двум сериям конструкций мы выбрали вектор pGL3-Control, в котором ген люциферазы светлячка находится под контролем промотора и энхансера вируса SV40, что обеспечивает высокий уровень экспрессии во всех типах клеток, использованных в нашей работе.

Полученные генно-инженерные конструкции были трансфицированы в культивируемые клетки человека трех разных линий: эпителиальные НЕК 293, лимфоидные Jurkat и эритроидные K562. После 48-часовой инкубации были приготовлены клеточные лизаты и измерена активность люциферазы. Результаты

измерения относительной активности люциферазы, представлены в виде диаграмм на рисунке 4. Активность люциферазы в экстрактах клеток, трансфицированных вектором pGL3-Control, была принята нами за 100%.

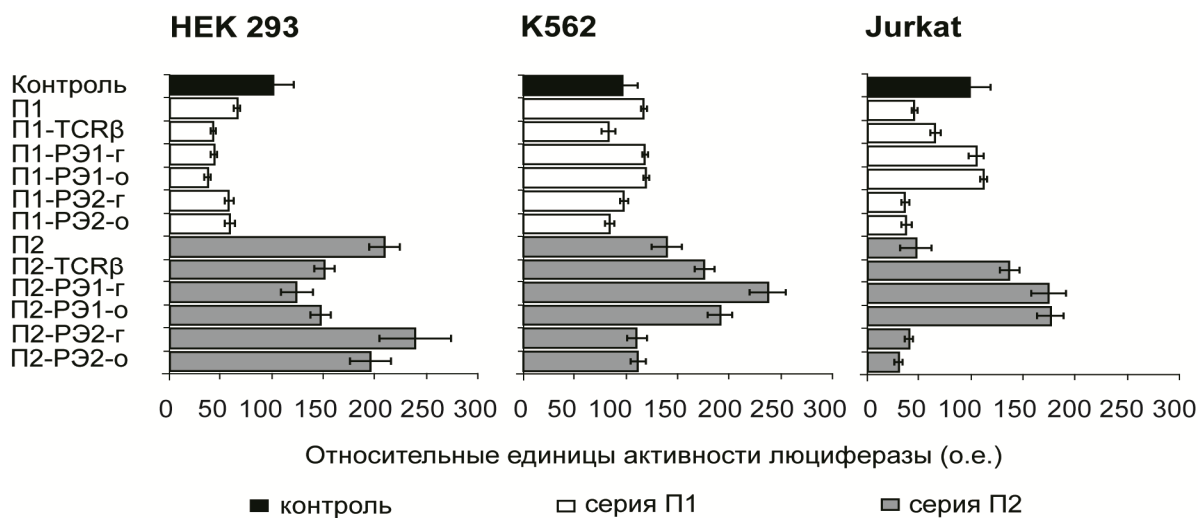


Рисунок 4. Анализ энхансерной/сайленсерной активности элементов РЭ1 и РЭ2 в составе генно-инженерных конструкций. Названия соответствующих конструкций указаны в левой части рисунка («г» – означает геномная ориентация по отношению к промотору, «о» – означает обратная ориентация, «TCRβ» – энхансер из гена T-клеточного рецептора β мыши). На диаграммах представлена нормализованная активность люциферазы. За 100% была принята активность, наблюдаемая при трансфекции клеток вектором pGL3-Control (обозначена черным столбцом). Белые и серые столбцы отражают результаты, полученные при трансфекции клеток сериями конструкций на основе промотора П1 и П2 соответственно. Планки погрешностей отражают стандартное отклонение от величины среднего по трем независимым экспериментам.

Анализируя представленные диаграммы, можно сделать следующие заключения. Оба промотора работали в эпителиальных клетках, при этом активность П1 была в 3 раза меньше, чем активность П2. Ни один из двух анализируемых нами элементов, как и контрольный энхансер мыши TCRβ, не оказывал стимулирующего воздействия на соответствующие промоторы. В эритроидных клетках наблюдалась практически одинаковая активность промоторов П1 и П2. В этом типе клеток РЭ1, РЭ2 и TCRβ не оказывали существенного воздействия на промотор П1. С другой стороны, элемент РЭ1 в геномной ориентации по отношению к промотору П2 стимулировал его активность в 2 раза, в то время как РЭ2 по-прежнему не обладал выраженной активностью энхансера по отношению к П2. В лимфоидных клетках на фоне одинаковой базальной активности промоторов П1 и П2, элемент РЭ1 существенно стимулировал активность обоих

промоторов, как и контрольный энхансер TCR β , вне зависимости от ориентации по отношению к промоторам. Элемент РЭ2 не проявлял энхансерной активности по отношению к П1 и П2 в лимфоидных клетках, как и в двух других клеточных линиях.

Так как фрагмент РЭ2 в функциональном тесте не оказывал воздействия на промоторы гена *RUNX1* человека, но при этом образовывал комплексы с белками ядерного экстракта лимфоидных клеток, как было описано выше, мы предположили, что такое отсутствие активности может быть связано с избыточными размерами самого фрагмента. Известно, что чрезмерная длина нуклеотидной последовательности может негативно сказываться на работе регуляторного элемента в тест-системах. В данном эксперименте фрагмент РЭ2 составлял 400 п.о. Мы решили уменьшить размер изучаемой области. Для этого был проведен анализ уровня консервативности последовательности всего фрагмента РЭ2 среди млекопитающих с помощью интернет ресурса ENCODE (<http://genome.ucsc.edu/ENCODE/>). По результатам проведенного анализа, мы разделили его на две части – консервативную (конс) и неконсервативную (неконс). Оба фрагмента были введены в состав векторов, содержащих промотор П1 или П2, после гена люциферазы в геномной ориентации по отношению к промоторам. Полученные конструкции были проанализированы в экспериментах по транзientной трансфекции, как описано выше. Результаты представлены на рисунке 5. На диаграммах видно, что ни один из анализируемых фрагментов не обладал энхансерной активностью по отношению к промоторам П1 и П2, как и полноразмерный элемент РЭ2.

Суммируя вышесказанное, можно утверждать, что по результатам функционального теста исследуемый нами элемент РЭ1 ведет себя как энхансер по отношению к промоторам П1 и П2 гена *RUNX1* человека в лимфоидных клетках и только по отношению к промотору П2 в эритроидных. Элемент РЭ2 не обладает энхансерной активностью по отношению к обоим промоторам этого гена ни в одном типе клеток.

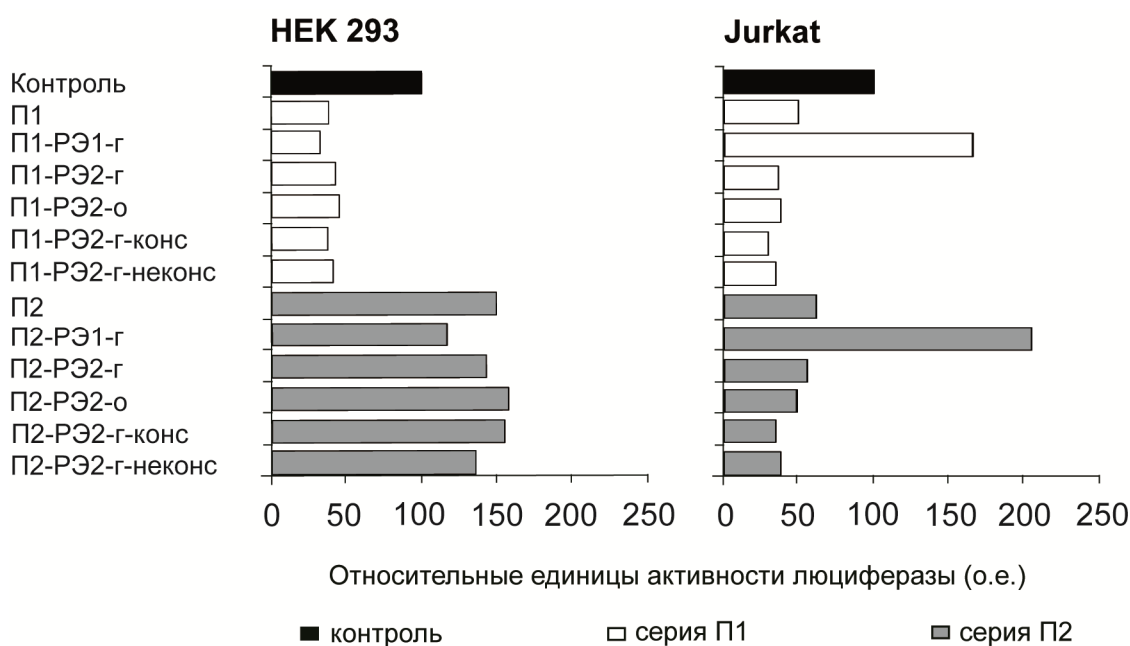


Рисунок 5. Анализ энхансерной/сайленсерной активности участков элемента РЭ2 в составе генно-инженерных конструкций. Все обозначения как на рисунке 4, «конс» – означает консервативный участок, «неконс» – означает неконсервативный участок элемента РЭ2. Представлены результаты одного из двух воспроизводимых экспериментов.

5. Промоторы П1 и П2, а также элементы РЭ1 и РЭ2 гена *RUNX1* человека собраны в активаторный блок транскрипции в лимфоидных и эритроидных клетках.

На сегодняшний день известно, что функционально важные тканеспецифичные энхансеры генов могут быть расположены на большом расстоянии от регулируемых ими промоторов. Однако внутри клеточного ядра они оказываются пространственно сближены в силу выпетливания фрагментов ДНК, разделяющих энхансеры и промоторы (Palstra et al., 2008; Splinter et al., 2006; Tolhuis et al., 2002). Исследуемые нами элементы РЭ1 и РЭ2 находятся на большом расстоянии от промоторов П1 и П2 гена *RUNX1* человека. Нам представлялось интересным установить, какова пространственная организация этих элементов в разных типах клеток.

Для того чтобы выяснить взаимную пространственную организацию регуляторных элементов в составе гена *RUNX1* человека, мы воспользовались методом фиксации конформации хромосом, который носит название 3С-анализ (Dekker et al., 2002). Суть этого метода заключается в том, что клетки обрабатывают формальдегидом, чтобы «защитить» существующие *in vivo* ДНК-белковые взаимодействия. После этого фиксированные клетки лизируют и выделяют из них ДНК-белковые комплексы, отмывая их от несвязавшихся белков с помощью детергента додецилсульфата натрия. Полученные

комплексы обрабатывают высококонцентрированной эндонуклеазой рестрикции до так называемого «исчерпывающего» переваривания, то есть когда разрезаны все доступные сайты. Затем фермент ингибируют температурной обработкой, а полученные продукты рестрикции «сшивают» с помощью лигазы бактериофага T4 при десятикратном разведении, которое снижает вероятность лигирования случайных фрагментов и способствует лигированию фрагментов ДНК в составе одного и того же комплекса. Очищенные продукты лигирования анализируют с помощью ПЦР в реальном времени (Gavrilov and Razin, 2008; Hagege et al., 2007).

Мы провели 3С-анализ на трех типах клеток, использованных в нашей работе: эпителиальных НЕК 293, лимфоидных Jurkat и эритроидных K562. Для исследования локуса гена *RUNX1* нами была выбрана эндонуклеаза рестрикции *HindIII*, так как этот фермент разрезает данный ген на фрагменты размером от 3 до 10 т.п.о. и при этом все четыре интересных нам элемента, то есть П1, П2, РЭ1 и РЭ2, оказываются в составе разных рестрикционных фрагментов. Так как ген *RUNX1* занимает достаточно протяженный участок 21-ой хромосомы человека (примерно 260 т.п.о.), то для анализа мы выбирали только определенные рестрикционные фрагменты. Соответственно, нами были взяты те фрагменты, которые непосредственно содержали в своем составе элементы П1, П2, РЭ1 и РЭ2, а также ближайшие к ним фрагменты, расположенные в 5'- и 3'-областях. Праймеры для ПЦР в реальном времени были подобраны таким образом, что по нуклеотидной последовательности они были идентичны верхней, кодирующей цепи гена *RUNX1* человека и своими 3'-концами они были ориентированы в сторону краев рестрикционных фрагментов, то есть «смотрели наружу». Это давало возможность анализировать только продукты лигирования по типу «голова-к-хвосту» и исключало возможность регистрации сигнала от неразрезанных сайтов. Один из праймеров (в трех экспериментах каждый раз разный) был выбран в качестве «якорного». Это означает, что его последовательно использовали в комбинациях со всеми остальными праймерами для проведения ПЦР. Для каждого якорного праймера была синтезирована TaqMan-проба, которая по нуклеотидной последовательности была идентична нижней, некодирующей цепи гена *RUNX1* человека и отжигалась в 3'-области от соответствующего праймера, ближе к краю рестрикционного фрагмента. В нашей работе мы использовали четыре якорных праймера. Один – для фрагмента, содержащего промотор П1, второй – для фрагмента с промотором П2, третий – для фрагмента с элементом РЭ1 и четвертый – для фрагмента с элементом РЭ2. Расположение исследованных нами фрагментов и праймеров, использованных для анализа, показано на рисунке 6А. Для того чтобы сравнить

результаты, полученные на разных типах клеток, нам было необходимо выбрать внутренний контроль для нормировки. В качестве такового мы взяли ген человека *ERCC3*. Этот ген часто используется в качестве контроля в экспериментах ЗС, так как известно, что он принимает одинаковую конформацию в различных типах клеток (de Laat and Grosveld, 2003; Palstra et al., 2003; Vernimmen et al., 2007). Результаты представлены на рисунке 6 (Б-Д). Относительная частота взаимодействий двух рестрикционных фрагментов, отраженная отдельным столбиком на диаграмме, была измерена по количеству соответствующего продукта лигирования, детектированного с помощью количественного ПЦР в реальном времени. Это значение пропорционально частоте взаимодействия двух данных геномных фрагментов. Исходя из результатов анализа, представленных на диаграммах, можно заключить, что в эритроидных клетках K562 и лимфоидных Jurkat промотор П1 взаимодействует с П2, РЭ1 и РЭ2 (диаграмма 6Б). В эпителиальных клетках НЕК 293 П1 взаимодействует только с РЭ2. В следующем эксперименте мы поставили якорь на рестрикционный фрагмент, содержащий в своем составе П2. В Jurkat и K562 П2 взаимодействует с П1, РЭ2 и РЭ1 (диаграмма 6В). В эпителиальных клетках НЕК 293 наблюдалось лишь взаимодействие П2 с РЭ2. При переносе якоря на фрагмент, содержащий элемент РЭ1, в эритроидных и лимфоидных клетках наблюдалось взаимодействие с П1, П2 и РЭ2. В эпителиальных клетках таких взаимодействий не наблюдалось (диаграмма 6Г). Для того чтобы проверить полученные результаты, мы поставили якорь на рестрикционный фрагмент, содержащий элемент РЭ2. В клетках Jurkat и K562 общая картина взаимодействий не изменилась – мы также наблюдали взаимодействие РЭ2 с П1, П2 и РЭ1. В эпителиальных клетках РЭ2 давал сигналы с П1, П2 и РЭ1, но при этом частота взаимодействий РЭ2-П2 была воспроизводимо почти в 3 раза выше, чем частота взаимодействий РЭ2-П1 и РЭ2-РЭ1 (диаграмма 6Д).

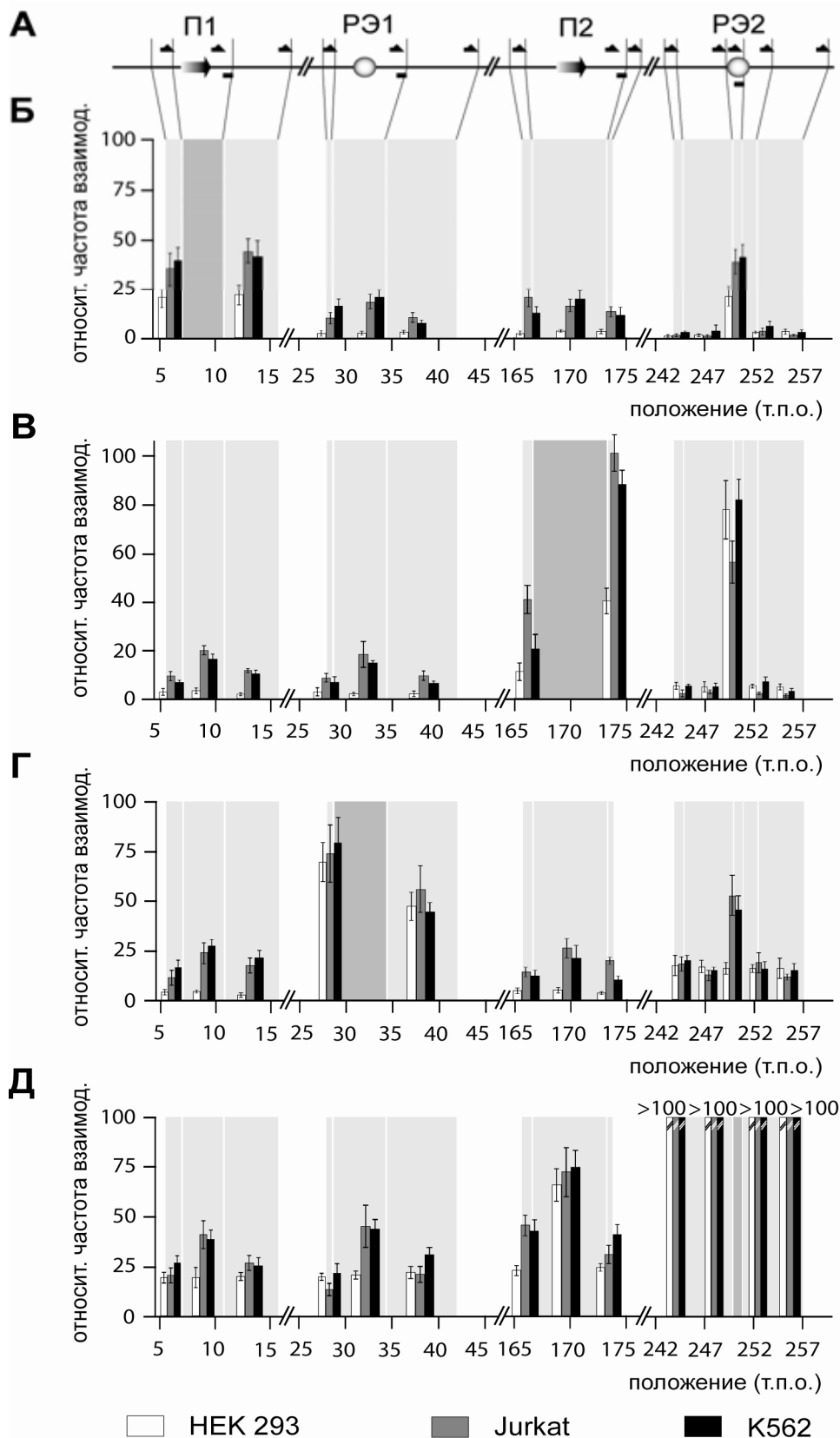


Рисунок 6. Пространственная организация функциональных элементов гена *RUNX1* человека в лимфоидных, эритроидных и эпителиальных клетках. (А) Схема расположения П1, П2, РЭ1 и РЭ2 (показаны стрелками и овалами соответственно, не в

масштабе) внутри рестрикционных фрагментов *Hind*III, обозначенных вертикальными линиями. Праймеры и TaqMan-пробы, использованные для анализа, обозначены, соответственно, черными стрелками и прямоугольниками по краям рестрикционных фрагментов. (Б-Д) Относительная частота взаимодействий, наблюдаемая в экспериментах при установке якоря на фрагмент, содержащий П1 (Б), П2 (В), РЭ1 (Г) и РЭ2 (Д). По оси «Х» указано положение продуктов рестрикции в геномном масштабе. По оси «У» показаны частоты сшивки между анализируемыми фрагментами, нормализованные к частоте сшивки между фрагментами из контрольного гена. Серыми прямоугольниками на заднем плане каждой из диаграмм обозначены тест-фрагменты, темно-серыми – фрагмент с якорным праймером. Области с белым фоном не были включены в анализ. Белыми, черными и серыми столбцами обозначены результаты, полученные соответственно для клеток НЕК 293, K562 и Jurkat. Планки погрешностей соответствуют стандартному отклонению от величины среднего по трем независимым экспериментам.

Таким образом, 3С-анализ пространственной структуры гена *RUNX1* человека позволил установить, что в лимфоидных и эритроидных клетках дистальный промотор П1 и проксимальный промотор П2 физически взаимодействуют с энхансером РЭ1 и элементом РЭ2 внутри ядра, образуя активаторный блок транскрипции, в то время как в эпителиальных клетках такой блок не образуется, а напрямую взаимодействуют только промотор П2 и элемент РЭ2.

6. Элемент РЭ2 не связывается с ядерным белковым матриксом *in vitro*.

На первом этапе нашей работы, мы выбрали элемент РЭ2 для анализа тканеспецифичной энхансерной активности, так как этот элемент содержит специфичные для лимфоидных клеток человека сайты расщепления ДНКазой I и топоизомеразой II. Проведенный нами функциональный тест этого элемента в составе генно-инженерных конструкций не подтвердил наше предположение. Однако 3С-анализ локуса гена *RUNX1* человека показал, что РЭ2 входит в состав активаторного блока транскрипции (хроматинового «хаба») в лимфоидных и эритроидных клетках. На сегодняшний день известно, что многие ферменты, участвующие в метаболизме ДНК и РНК в клеточном ядре располагаются на ядерном белковом матриксе, который представляет собой белковый каркас ядра и на котором молекула ДНК закреплена в виде петель (Wang et al, 2009; Blasquez et al, 1989; Razin et al, 2007). Так как на матриксе располагаются такие ферменты, как топоизомераза II и РНК-полимераза II, то предполагается, что многие процессы, в частности транскрипция, происходят в точках прикрепления петель ДНК к белковому матриксу (Wen et al, 2005; Cai et al, 2006). Из литературы нам было известно, что РЭ2 содержит сайты расщепления топоизомеразой II, а по результатам 3С-анализа он

необходим для транскрипции – два факта, указывающие на то, что этот элемент может являться участком прикрепления к ядерному белковому матриксу, то есть быть MAR-элементом (Matrix Associated Region), привлекая тем самым промоторы к сайтам активной транскрипции.

Для того чтобы проверить это предположение мы проанализировали способность РЭ2-элемента связываться с ядерным матриксом *in vitro*. Этот анализ был проведен согласно стандартной методике (Cockerill & Garrard, 1986; Cockerill et al., 1987). Принцип метода заключается в том, что смесь радиоактивно меченых фрагментов ДНК, содержащую тест-фрагмент, известный MAR-элемент в качестве положительного контроля и один или несколько фрагментов плазмидной ДНК в качестве отрицательного контроля, инкубируют с выделенными из клеток ядерными матриксами в присутствии неспецифического конкурента в специальном буфере для связывания. После этого отмывают несвязавшиеся фрагменты тем же буфером, а матриксы обрабатывают протеолитическими ферментами, очищают связанные с ними фрагменты ДНК и анализируют их в агарозном геле. Те фрагменты, которые остаются связанными с матриксами после нескольких промываний буфером, и представляют собой MAR-элементы.

В эксперимент нами была взята смесь радиоактивно меченых фрагментов ДНК, состоящую из:

- фрагмента интрона 5.2 гена *RUNX1* человека размером 1000 п.о., содержащего в своем составе элемент РЭ2 (для анализа был взят участок интрона, соответствующий рестрикционному фрагменту *HindIII*, который образовывал дальние взаимодействия с промоторами П1 и П2 в экспериментах 3С);
- фрагмента гена гистона H4 дрозофилы, содержащего известный сильный MAR-элемент (Mirkovitch et al., 1984; Cockerill & Garrard, 1986); этот фрагмент размером 1300 п.о. использовали в качестве положительного контроля;
- четырех фрагментов плазмидной ДНК (пл) разных размеров 700, 2500, 3000 и 4000 п.о. в качестве отрицательного контроля.

Эту смесь (input) инкубировали в течение двух часов с ядерным матриксом, выделенным отдельно путем исчерпывающей обработки пермеабилizованных клеток ДНКазой I и последующей экстракции 2М раствором NaCl. Для предотвращения неспецифического связывания инкубация проводилась в присутствии неспецифического конкурента – геномной ДНК *E.coli* (средний размер около 1000 п.н.), взятой в различных

концентрациях (0–1 мг/мл). После инкубации несвязавшиеся фрагменты отмывались, а фрагменты, ассоциировавшие с ядерным матриксом, были очищены от белковых компонентов и разделены с помощью электрофореза в агарозном геле, после чего высушенный гель был экспонирован со светочувствительным экраном. Результаты этого эксперимента представлены на рисунке 7.

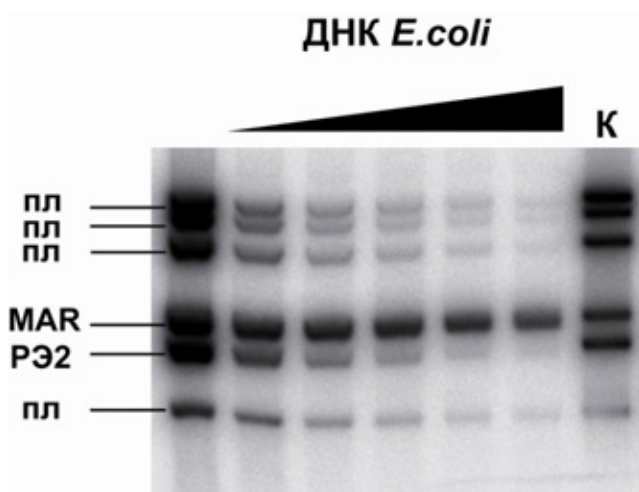


Рисунок 7. Анализ способности элемента РЭ2 связываться с ядерным белковым матриксом *in vitro*. К – загрузочный контроль (input); «пл» - фрагменты плазмидной ДНК, в качестве отрицательного контроля; MAR - фрагмент гена гистона H4 дрозофилы, обладающий сильным сродством к ядерному матриксу; РЭ2 – фрагменты интрона 5.2 гена *RUNXI* человека, содержащий в своем составе элемент РЭ2.

Отчетливо видно, что исследуемый фрагмент вытесняется из матрикса таким же количеством неспецифичного конкурента, как и контрольные фрагменты плазмидной ДНК. В то же время фрагмент, содержащий известный MAR-элемент, остается связанным с ядерным матриксом, даже когда берется 50-кратный избыток конкурента. Из этого эксперимента можно сделать вывод, что исследуемый фрагмент интрона 5.2 гена *RUNXI* человека, содержащий в своем составе элемент РЭ2, не обладает свойствами MAR-элемента, так как он не способен связываться с ядерным матриксом *in vitro*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ген *RUNXI* человека активно исследуют во многих лабораториях по всему миру. Однако большая часть исследований сосредоточена на изучении мутаций этого гена, начиная от точечных нуклеотидных замен и заканчивая такими драматичными изменениями в структуре, как хромосомные перестройки (Hromas et al., 2000; Osato et al., 1999; Paulsson et al., 2006; Roumier et al., 2003; Speck and Gilliland, 2002). Тем не менее, крайне мало известно о работе самого гена, о его транскрипции в разных тканях на разных

этапах развития организма у позвоночных. До сих пор остается открытым вопрос о том, как осуществляется тканеспецифичная экспрессия данного гена. В нашей работе мы попытались прояснить несколько аспектов тканеспецифичной экспрессии гена *RUNX1* человека.

Прежде всего, нас интересовала работа промоторов гена *RUNX1* человека. Ранее было установлено, что в составе гена их насчитывается два, – дистальный П1 и проксимальный П2, – что они находятся на расстоянии 160 т.п.о. друг от друга и что оба промотора лишены какой-либо тканевой специфичности, так как стимулируют транскрипцию репортерных генов в составе генно-инженерных конструкций во всех типах клеток (Ghozi et al., 1996). Результаты исследований последних лет, проведенные на мышинных эмбрионах, свидетельствуют о том, что такое количество промоторов в гене отнюдь не излишество, а функциональная необходимость, поскольку они работают на разных этапах гематопозеза во время пренатального развития. Было установлено, что в кроветворном эндотелии парной дорсальной аорты и желтковой артерии активно работает П2, в эндотелиальных клетках центральных сосудов и в развивающихся клетках definitivo гематопозеза на следующих стадиях развития эмбриона оба промотора одинаково активны, а позднее, при формировании эмбриональной печени происходит переключение на промотор П1 (Vee et al., 2009; Vee et al., 2010; Sroczynska et al., 2009). На первом этапе нашего исследования мы проанализировали активность промоторов гена *RUNX1* человека в разных типах клеток и установили, что она существенно отличается. Так, в лимфоидных клетках Jurkat оба промотора, П1 и П2, были одинаково активны. В эпителиальных НЕК 293 и эритроидных K562 клетках промотор П2 был в несколько раз активнее промотора П1. Такой преобладающей активности промотора П2 по сравнению с П1, которую мы наблюдали в наших экспериментах, есть «эволюционное» объяснение. Во-первых, в отличие от П1, промотор П2 располагается внутри консервативного CpG-островка (Bangsow et al., 2001; Eggers et al., 2002; Levanon et al., 2001). Во-вторых, в эволюции промотор П2 появляется несколько раньше промотора П1. Так, например, у круглых червей и членистоногих есть только П2 промотор, а у рыб и млекопитающих дополнительно появляется промотор П1 (Levanon and Groner, 2004). Таким образом, позвоночные приобрели дистальный промотор П1 как дополнительный рычаг регуляции, который, позволил осуществлять более тонкую настройку транскрипции этого гена по принципу «в нужное время в нужном месте».

Следующей задачей нашего исследования был поиск регуляторных элементов в составе гена *RUNX1* человека. Как было отмечено ранее, оба промотора П1 и П2 не имеют

тканевой специфичности в модельных системах с репортерным геном (Ghozi et al., 1996). Они активны во всех типах клеток. Но при этом экспрессия самого гена наблюдается только в определенных тканях, что свидетельствует о наличии тканеспецифичных энхансеров. В поисках регуляторных элементов мы опирались на два базовых свойства энхансеров. Первое свойство – это сохранение эволюционной консервативности важных регуляторных участков генов. Обычно такие элементы обладают высокой степенью идентичности нуклеотидной последовательности среди разных видов (Flint et al., 2001; Hughes et al., 2005). Второе свойство – это предпочтительное расположение такого рода элементов внутри доменов хроматина открытой конформации в тех клетках, где данный элемент функционально активен. В этом случае участки генов, содержащие подобные регуляторные элементы, приобретают гиперчувствительность к ДНКазе I (Felsenfeld et al., 1996). Исходя из этого, по литературным данным были выбраны два участка гена *RUNX1* человека, которые обладали описанными выше признаками. Эволюционно консервативный элемент в составе первого интрона был назван РЭ1 (регуляторный элемент 1). Второй элемент, содержащий лимфоид-специфичный сайт гиперчувствительности к ДНКазе I из интрона 5.2 был назван РЭ2 (регуляторный элемент 2). В экспериментах по сдвигу электрофоретической подвижности ДНК-белковых комплексов мы убедились в том, что эти фрагменты способны специфично взаимодействовать с белками ядерных экстрактов лимфоидных клеток. Далее, анализируя их расположение внутри гена и относительно его промоторов, мы предположили, что РЭ1 является тканеспецифичным энхансером по отношению к промотору П1, а РЭ2 – по отношению к промотору П2, соответственно. Однако в отношении РЭ2 наше предположение опровергли результаты функционального теста. Было установлено, что РЭ2, не имеет энхансерной активности по отношению к промоторам П1 и П2 гена *RUNX1* человека во всех типах клеток, использованных в нашей работе. Элемент РЭ1 напротив, обладал энхансерной активностью исключительно в лимфоидных и эритроидных клетках. Однако внутри двух указанных типов клеток он работал по-разному. В лимфоидных клетках линии Jurkat РЭ1 стимулировал работу обоих промоторов вне зависимости от ориентации. В эритроидных клетках линии K562 этот элемент стимулировал работу только промотора П2. В эпителиальных клетках НЕК 293 РЭ1 не обладал энхансерной активностью по отношению к П1 и П2 (см. рисунок 4).

После изучения энхансерной активности выбранных элементов в составе генно-инженерных конструкций, нам представлялось интересным установить пространственную структуру гена *RUNX1* человека и выяснить таким образом взаимное расположение

промоторов и элементов РЭ1 и РЭ2. Используя метод 3С-анализа, нам удалось установить, что промоторы П1 и П2, а вместе с ними и элементы РЭ1 и РЭ2 пространственно сближены в лимфоидных (Jurkat) и эритроидных (K562) клетках. В эпителиальных клетках НЕК 293 нам удалось зафиксировать два альтернативных взаимодействия: либо взаимодействие П1 с РЭ2, либо П2 с РЭ2. Из чего можно заключить, что в этом типе клеток существует лишь динамическое равновесие между различными вариантами попарного взаимодействия РЭ2 с двумя промоторами гена *RUNX1*. Обобщенная модель пространственных взаимодействий внутри гена *RUNX1* человека в разных клеточных линиях представлена на рисунке 8.

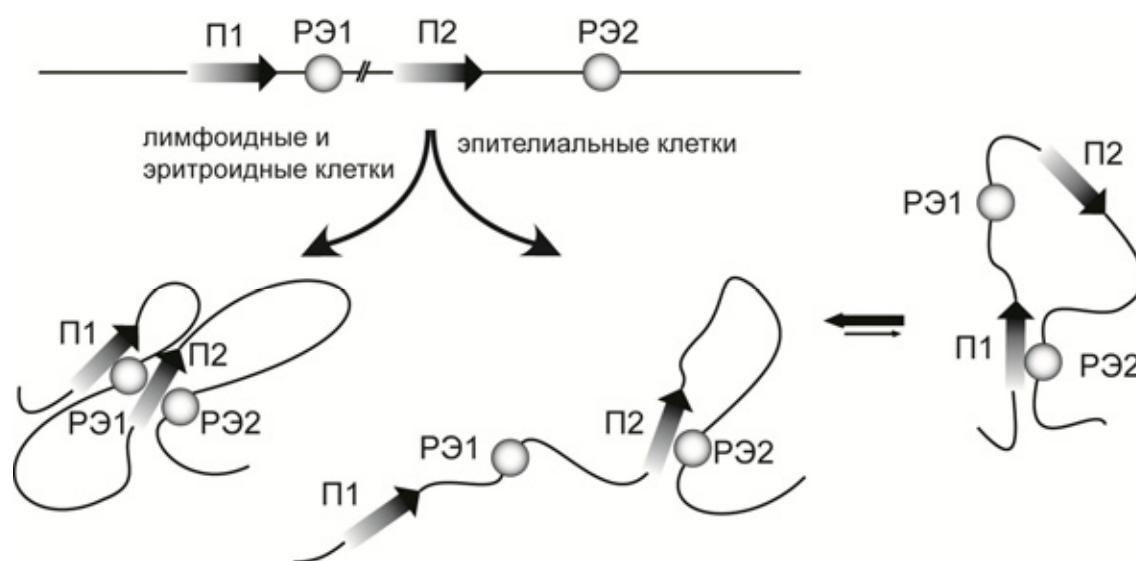


Рисунок 8. Модель пространственной организации гена *RUNX1* человека в разных типах клеток. Наверху показана схема расположения регуляторных элементов внутри гена, стрелками показаны промоторы, овалами обозначены исследованные фрагменты. Слева показана структура организации локуса гена *RUNX1* в лимфоидных и эритроидных клетках, справа показана структура локуса в эпителиальных клетках.

Обращает на себя внимание тот факт, что элемент РЭ2, который не обладает активностью энхансера по отношению к промоторам П1 и П2, при этом образует с ними дальние взаимодействия в разных типах клеток. Это означает, что РЭ2 является важным структурным компонентом хроматиновых блоков, необходимым для работы соответствующих промоторов этого гена. Не так давно подобный элемент был локализован внутри домена альфа-глобиновых генов кур. Этот элемент DHS-9 также

обладает тканеспецифичной гиперчувствительностью к ДНКазе I и играет ключевую роль в сборке активного хроматинового блока, но при этом не обладает энхансерной активностью (Gavrilov and Razin, 2008).

Одной из самых интересных особенностей пространственной организации гена *RUNX1* человека является привлечение обоих промоторов П1 и П2 в один и тот же хроматиновый блок в лимфоидных и эритроидных клетках. Такое сближение накладывает свои ограничения на возможности независимой регуляции работы П1 и П2 промоторов, так как по сути они находятся в составе одной транскрипционной фабрики. В составе же самой фабрики оба промотора возможно должны конкурировать за свободные молекулы РНК-полимеразы II. Именно это «соревнование» может отчасти объяснить различия в активности промоторов П1 и П2 *in vivo* и при транзientной трансфекции в эритроидных клетках. Кроме того, работа промоторов П1 и П2 в составе одной и той же транскрипционной фабрики приводит к тому, что новосинтезированные транскрипты оказываются пространственно сближены, что в свою очередь может приводить к транссплайсингу, усложняя тем самым существующий набор изоформ транскрипционного фактора RUNX1.

ВЫВОДЫ

1. Впервые показано, что активность промоторов П1 и П2 гена *RUNX1* человека в геномном контексте разных типов клеток существенно отличается, тогда как в конструкциях с репортерным геном промоторы не имеют тканевой специфичности.
2. Эволюционно консервативный элемент РЭ1 из первого интрона гена *RUNX1* человека является тканеспецифичным энхансером, работающим в лимфоидных и эритроидных клетках.
3. Промоторы П1 и П2 гена *RUNX1* человека в лимфоидных и эритроидных клетках напрямую взаимодействуют друг с другом, энхансером РЭ1 и структурным элементом РЭ2 из интрона 5.2.
4. Элемент РЭ2 из 5.2 интрона гена *RUNX1* человека способен к дистанционным взаимодействиям с промоторами П1 и П2 этого гена, но не обладает активностью энхансера по отношению к этим промоторам и не является областью прикрепления к ядерному белковому матриксу.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Markova E.N., Kantidze O.L., Razin S.V. **2011**. Transcription regulation and spatial organization of the human *AML1/RUNX1* gene. *Journal of Cellular Biochemistry*. 112(8), 1997-2005.

Тезисы конференций:

1. Маркова Е.Н., Кантидзе О.Л., Разин С.В. Функциональный анализ новых регуляторных элементов гена *RUNX1* человека. 13-ая Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых «Биология – Наука XXI Века». Пушино, Россия, 28 сентября – 2 октября, **2009**, 28.
2. Markova E.N., Kantidze O.L., Razin S.V. A new insight into human *RUNX1* gene transcription regulation. Workshop «Protein-nucleic acid interactions» of the International Research Training Group Giessen/Marburg-Moscow. Vilnius, Lithuania, 16 – 19 May, **2010**, 33.
3. Markova E.N., Kantidze O.L., Razin S.V. Novel regulatory elements of human *RUNX1* gene. International Conference «Early events in human pathologies». Barbison, France, 29 May – 1 June, **2010**, 7.
4. Markova E.N., Kantidze O.L., Razin S.V. Regulation of human *RUNX1* gene expression. International Symposium «Control of Gene Expression and Cancer». Moscow, Russia, 21 – 25 June, **2010**, 61.
5. Markova E.N., Kantidze O.L., Razin S.V. Finding novel regulatory elements of human *RUNX1* gene. Workshop «Protein-nucleic acid interactions» of the International Research Training Group Giessen/Marburg-Moscow. Giessen, Germany, 20 – 21 September, **2010**, 59.