

На правах рукописи

Ряховский Алексей Алексеевич

Новый TRITHORAX-ассоциированный регуляторный элемент в промоторной области гена
fork head в *Drosophila melanogaster*

03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва 2007

Работа выполнена в группе «Эпигенетические механизмы регуляции активности генов»
Института биологии гена РАН

Научные руководители: кандидат биологических наук
С.В. Тиллиб

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
С.Г. Георгиева
кандидат биологических наук
Ф.К. Хасанов

Ведущая организация: Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Защита состоится 19 декабря 2007 г. в 11 часов на заседании диссертационного
совета Д 002.037.01 при Институте биологии гена РАН по адресу:
119334, Москва, ул.Вавилова, д.34/5

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

Автореферат разослан __ ноября 2007 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета канд. фарм. наук

Л.С.Грабовская

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Недавние исследования на дрозофиле и млекопитающих убедительно продемонстрировали, что продукты двух групп генов, позитивные регуляторы группы триторакса (*trxG*) и негативные регуляторы группы поликомба (*PcG*), являются ключевыми компонентами запрограммированного в геноме механизма поддержания дифференцированного состояния клеток (*Ringrose, Paro, 2007; Schwartz, Pirrotta, 2007*). Эти белки предотвращают изменения транскрипционной программы, характерной для данного типа клеток, через взаимодействие со специфическими регуляторными цис-элементами, называемыми PRE/TRE (“Polycomb-/trithorax- response elements”). Предполагается, что наличие PRE/TRE характерно для очень многих, если не всех, регуляторных генов, связанных с процессом дифференцировки. Эти элементы отвечают за поддержание экспрессионного статуса конкретного гена-мишени, хотя при этом они могут находиться достаточно далеко от его промоторной области. Изучение принципиальных особенностей самих PRE/TRE, деталей механизма узнавания их белковыми комплексами и последующего распространения специфического воздействия на экспрессию гена является крайне актуальной задачей для ученых, работающих в самых различных областях биологии и медицины: от изучения структуры и функционирования генома, исследования механизмов поддержания плюрипотентности стволовых клеток и клеточной дифференцировки до выявления причин различных нарушений, ведущих к серьезным заболеваниям, таким как, например, раковые заболевания. Об актуальности данной тематики говорит также заметное увеличение в последние годы количества публикаций, посвящённых этой проблеме.

PcG/TrxG-зависимая система регуляции активности гомеотических генов является очень консервативной в процессе эволюции. Для всех генов *PcG* и *TrxG* дрозофилы существуют гомологичные гены у млекопитающих, мутации в которых либо критичны для развития организма, либо напрямую ассоциированы с возникновением рака. В функционировании этой системы у млекопитающих важную роль играют LCR (локус

контролирующие районы), которые во многом могут быть схожи с регуляторными элементами дрозофилы PRE/TRE. Поэтому изучение функционирования белков PcG и TrxG, как гомологов системы поддержания транскрипционной памяти млекопитающих, помимо фундаментального, может иметь ещё и прикладное значение.

Предполагается, что TRE и PRE в данном гене в значительной степени колокализуются и функционируют взаимоисключаяще, в зависимости от типа клетки. Однако, при более тонком картировании было показано, что эти элементы не идентичны. Так, в дистальной промоторной области гена *Ubx* дрозофилы удалось разделить последовательности суб-элементов, необходимых для формирования TRE, от расположенных по-соседству суб-элементов PRE (Tillib *et al.*, 1999). Подобные работы с акцентом на исследование именно TRE довольно редки, несмотря на их актуальность. Таким образом, ввиду недостатка информации, трудно выявить общие черты TRE и, соответственно, лучше понять принципы их функционирования, которые до сих пор остаются не выясненными. С целью более точно локализовать и охарактеризовать ещё один новый TRE и была предпринята данная работа.

Цели и задачи исследования. Целью данной работы являлось выявление и изучение в регуляторной области гена *fork head (fkh)* элементов, связанных с функционированием TRX-ассоциированной системы поддержания активного состояния генов. Соответственно, были поставлены следующие задачи:

- 1) Выявить в протяжённой промоторной области гена *fkh* элементы, непосредственно взаимодействующие с TRX в случае активного состояния гена;
- 2) Проверить *in vivo* функциональную значимость выявленных TRX-ассоциированных элементов как для связывания TRX, так и для экспрессии гена *fkh*;
- 3) Проанализировать распределение модификаций гистонов, являющихся маркерами активного состояния хроматина, в промоторной области гена *fkh*.

- 4) Проверить наличие ассоциации TRE со структурами «ядерного матрикса» на примере изученного ранее TRE гена *Ubx* и исследуемого в этой работе TRE гена *fkh*.

Научная новизна и практическая ценность работы. В результате проделанной работы в регуляторной области гена *fkh* был обнаружен новый хромосомный регуляторный элемент, обладающий свойствами TRE. С помощью трансгенной конструкции, содержащей энхансер слюнных желез, промоторную часть гена *fkh* и анализируемые элементы, обрамлённые сайтами рекомбинации, позволяющими удалять эти элементы из встроенной в геном конструкции, была показана принципиальная функциональная значимость *in vivo* одного из них. В частности, было показано, что чётко детектируемый на политенных хромосомах в месте встраивания описанной трансгенной конструкции сигнал связывания белка ТРИТОРАКС (TRX) исчезал при вырезании изучаемого элемента из конструкции. Кроме того, удаление этого элемента приводило к значительному снижению уровня транскрипции трансгенной “mini-*fkh*” РНК. Важно отметить, что используемую трансгенную конструкцию потенциально можно использовать как основу для создания универсальной тест-системы для функциональной проверки различных гипотетических TRE. Иммунопреципитационный анализ с антителами, узнающими определённые модификации гистонов, являющиеся маркерами «открытого» хроматина (H3K4me3, триметилированный лизин-4 в гистоне H3, и ацетилированные гистоны), показал значительное обогащение этими модифицированными гистонами промоторной области гена *fkh* в слюнных железах, в которых этот ген активен. В то же время, в культуре клеток S2, для которых в данной работе было показано отсутствие заметной транскрипции гена *fkh*, подобного обогащения не наблюдалось. Обогащение особо ярко выражено в районе выявленного TRE, и его уровень заметно снижается при приближении к промотору. Интересно, что для H3K4me3 показано также относительное обогащение и непосредственно в районе начала транскрипции *fkh*. Это может указывать на механизм прямого взаимодействия TRE с промотором гена-мишени. Помимо этого, в работе

получены данные, указывающие на колокализацию TRE в активном гене с местами ассоциации хромосом со структурами ядерного скелета.

Представленное исследование имеет фундаментальный характер и вносит вклад в изучение механизмов функционирования системы поддержания транскрипционной памяти тканеспецифических генов. Практическая значимость работы связана с тем, что млекопитающие (и человек, в частности) также обладают системой поддержания транскрипционной памяти, подобной таковой у дрозофилы. Нарушения в работе этой системы являются причиной серьезных патологий, таких как лейкемии, ассоциированные с мутациями в гене регуляторного белка MLL1, являющегося структурным и функциональным гомологом дрозофилиного белка TRX у млекопитающих. Таким образом, прогресс в понимании особенностей функционирования системы поддержания транскрипционной памяти может способствовать обнаружению возможных путей лечения подобных заболеваний.

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на XII и XIII международных конференциях студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005» и «Ломоносов-2006», а также на международной конференции EMBO “Nuclear Structure and Dynamics” (Монпелье, Франция, 2007).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 5 печатных работ. Из них статей - 2, тезисов устных и стендовых сообщений на конференциях - 3.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на ___ страницах, содержит ___ рисунков и 2 таблицы, состоит из Введения, Обзора литературы, Материалов и методов, Результаты исследования, Обсуждения, Выводов и Списка литературы, включающего ___ источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Иммунопреципитационное картирование TRX-ассоциированных элементов хроматина в промоторной области гена *fkh* в клетках слюнных желез *D. melanogaster*.

Данная работа базировалась на более ранних исследованиях, указывающих на существование сильного TRE в протяженной промоторной области гена *fkh* в *D. melanogaster*. Мы исходили из нескольких имеющихся принципиальных заделов и особенностей выбранной модели. Во-первых, ген *fkh* был ранее достаточно детально охарактеризован в отношении локализации цис-регуляторных элементов, контролирующих его экспрессию в различных тканях (*Weigel et al., 1990; Shou et al., 2001*), в частности, был выявлен и детально охарактеризован энхансерный элемент, специфичный для клеток слюнных желез (sgE на рис. 1 и 2). Во-вторых, было показано, что содержащий TRE промоторный участок (размером 8700 п.н.) этого гена достаточен для возникновения нового сайта связывания TRX в месте встраивания соответствующего трансгена (*Kuzin et al., 1994*). Подобный тест на связывание с трансгенной конструкцией на препарате политенных хромосом может быть использован в качестве функционального теста уменьшенного TRE. Любопытно, что, если экспрессия *fkh* сильно подавляется в мухах, имеющих мутации по гену *trx* (*Kuzin et al., 1994*), то в случае мутации по гену *Pc* не обнаруживаются заметных изменений в экспрессии этого гена (*Jurgens, 1997*), что отличает данный элемент от других PRE/TRE и может указывать на возможность существования TRE без выраженного PRE. Наконец, в данной работе мы использовали поликлональные антитела против трех различных доменов белка TRX, полученные ранее (*Kuzin et al., 1994; Лебедева, Тиллиб, 2004*) путем иммунизации кроликов. Параллельное использование антител к различным доменам одного и того же исследуемого белка представляется принципиальным для повышения достоверности результатов иммунологических исследований, особенно таких, как иммунопреципитация сшитого формальдегидом и дробленного ультразвуком хроматина (метод X-ChIP), где очень высок неспецифический фон. Нам

удалось существенно повысить разрешение данного метода с помощью комбинированных подходов на основе параллельного использования нескольких антител. В частности, путем перекрестной гибридизации друг на друга библиотек последовательностей, первоначально получаемых с использованием различных антител мы смогли заметно повысить эффективность X-ChIP экспериментов. Мы провели несколько экспериментов, которые давали воспроизводимые результаты (один из типичных результатов представлен на рис. 1,В). Из совокупности проведенных экспериментов нам удалось выявить в исследуемом районе два потенциальных TRE (размером около 700 п.н.), находящихся на расстоянии примерно 7 т.п.н. и 4 т.п.н. от начала транскрипции гена *fkh* (рис. 1,Б). Небольшое обогащение наблюдалось также для участка хроматина, непосредственно прилегающего к началу транскрипции.

Помимо гибридизационного анализа мы провели прямой ПЦР анализ обогащения X-ChIP проб путём включения радиоактивной метки в ходе многочисленных параллельных ПЦР с использованием 18 пар праймеров, подобранных с учетом покрытия всего исследуемого района. Нормализованные по интенсивности сигнала в положительном контроле данные представлены на графике рис.1,А. Выявляемые обогащающиеся фрагменты хорошо коррелировали с теми, которые были идентифицированы с использованием гибридизационного метода детекции, и соответствовали продуктам ПЦР, обозначенным на рис. 1,А номерами 4 (основной обогащающийся район, находящийся в 7 т.п.н. от начала транскрипции *fkh*), а также 10-11 (менее выраженный район в 3,5-4 тыс.п.н. от начала транскрипции *fkh*).

На рисунке 1 представлены суммарные результаты этих экспериментов, по итогам которых нами было отмечено 2 обогащающихся фрагмента: FKH3-4 и FKH10-11 (названия даны в соответствии с номерами используемых ПЦР-праймеров) (Ряховский, Тиллиб 2007). Особое внимание следует обратить наиболее удаленному от промотора выявленному TRE. Этот элемент, соответствующий основному обогащающемуся материалу в большинстве наших экспериментов, хотя и не перекрывается, но находится в непосредственной близости от ранее выявленного регуляторного элемента sgE, определяющего специфическую

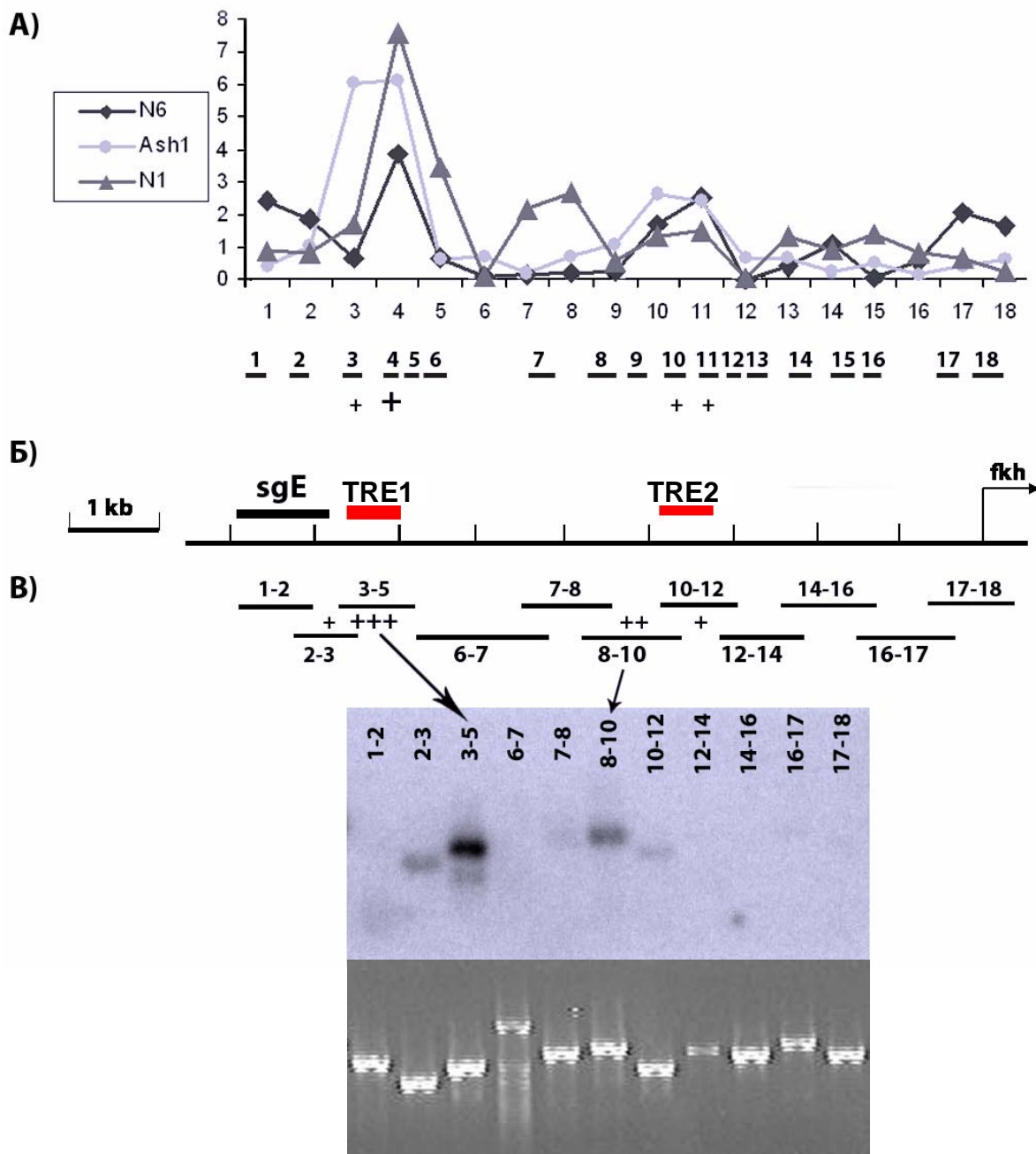


Рис. 1. X-ChIP анализ связывания TRX в предпромоторной области гена *fkh*

- А) ПЦР анализ X-ChIP проб с 18 различными парами праймеров. Вверху: график показывает обогащение соответствующих фрагментов (N1, N6 – различные антитела к белку TRX; ASH1 – антитела к белку ASH1). Внизу: показано положение анализируемых фрагментов ПЦР относительно промотора и *sgE* (обогащаемые фрагменты отмечены знаком «+»)
- Б) Представлена схема регуляторной области гена *fkh*. *sgE* – энхансер слюнных желез; *TRE1*, *TRE2* – два обогащающихся района (гипотетические TRE), первый из которых обогащается предпочтительнее.
- В) Анализ обогащённых X-ChIP проб саузерн-блот гибридизацией с использованием перекрывающихся ПЦР фрагментов синтезированных с гДНК (положение обогащаемых фрагментов отмечено знаком «+»). Представлен один из типичных результатов эксперимента (под радиоавтографом показана фотография разделённых электрофоретически фрагментов ДНК, переносимых на мембрану для гибридизации).

экспрессию гена *fkh* именно в клетках слюнных желез. Стоит отметить, что помимо указанных выше последовательностей, мы наблюдали также некоторое специфическое обогащение

участка, находящегося вблизи начала транскрипции, в случае использования анти-TRX-N6 антител.

В дополнение к TRE в данной работе были также картированы участки связывания другого белка тритораксной группы ASH1 (рис.1,А). Белок ASH1 является одним из самых функционально близких к TRX, и имеется много указаний на то, что эти два белка кооперативно участвуют в поддержании активности генов-мишеней и в значительной степени колокализируются (*Rosovskaya et al., 1999*), однако, эти два белка пока так и не удалось биохимически выделить в одном комплексе, и открытым остается вопрос, совпадают ли полностью или как близки участки их связывания в регуляторной области гена-мишени. Недавно было продемонстрировано, что ASH1 взаимодействует с TRE при условии, что в этом районе происходит транскрипция малой некодирующей РНК (*Sanchez-Elsner, 2006*). При этом для связывания ASH1 требуется образование РНК-ДНК гибрида. Наши данные указывают на непосредственную близость участков связывания ASH1 и TRX. Если исходить из гипотезы, что и в данном случае образуются некодирующие регуляторные РНК, соответствующие последовательностям TRE, то также следует искать РНК в районах ПЦР-продуктов FKH3-4 и FKH10-11.

Итоговые обобщенные результаты этого этапа работы представлены на схеме рис.2. В верхней части схемы обозначены определенные ранее энхансерные тканеспецифические элементы (*Shou et al., 2001*). Мы работали с клетками слюнных желез, и в них наиболее важным регуляторным элементом является sgE. Далее на схеме указаны локализации обогащающихся в X-ChIP экспериментах элементов, являющиеся гипотетическими TRE (обозначены как TRE1 и TRE2). Для первого из них, как уже говорилось выше, наблюдалось значительно большее обогащение. Интересный результат был получен при биоинформатическом анализе обогащения в исследуемой промоторной области участками связывания белков PHO(“Pleiohomeotic”), Z(“Zeste”) и GAGA-фактора(GAF). Обогащение этими участками, по-видимому, является характерной особенностью PRE/TRE, и была разработана

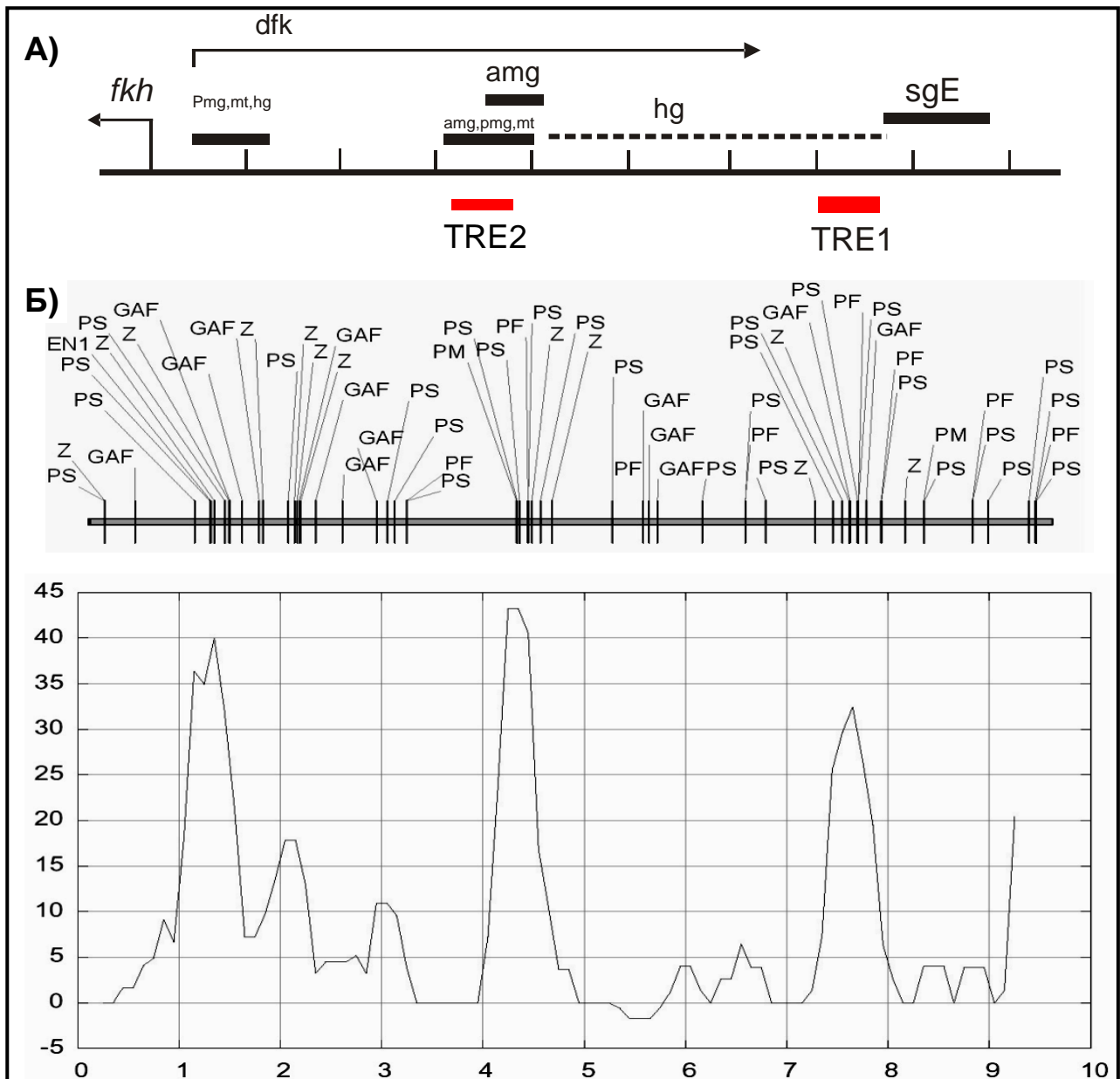


Рис. 2 Обобщенные результаты X-ChIP экспериментов и их анализ.

*Ориентация промоторной области гена *fkh* на данной схеме противоположна той, что использовалась на рис.1 для удобства сопоставления с данными биоинформатического поиска PRE элементов (б).

А) На схеме обозначены определенные ранее энхансерные тканеспецифические элементы (*amg* – передней части средней кишки, *pmg* – задней части средней кишки, *hg* – задней кишки, *mt* – мальпигиевых сосудов, *sgE* – слюнных желез) и положение транскрипта *distal fork hesd* (*dfk*). В нижней части схемы указаны локализации выявленных предполагаемых TRE.

Б) Биоинформатический анализ последовательности регуляторной области гена *fkh* проведенный программой (<http://biserv.techfak.uni-bielefeld.de/predictor/submission.html>), оценивающей вероятность существования PRE в данном месте геномной ДНК, основываясь на локальном неслучайном обогащении сайтами связывания белков PHO, Zeste и GAF [16]. На рисунке отражены локализация этих сайтов связывания (сверху), а также положение гипотетических PRE (пики в нижней части рисунка), предполагаемых в результате применения программы.

программа поиска PRE/TRE, основанная на выявлении районов геномной ДНК, обогащенной участками связывания этих трех белков (Ringrose et al., 2003). На рис.2,Б отражен результат применения этой поисковой программы для исследуемой нами промоторной области гена

fkh. Любопытно, что обнаруживается явная корреляция в локализации районов обогащения участками связывания трех упомянутых ДНК-связывающих белков и идентифицированных нами TRX-ассоциированных последовательностей (учитывая область промотора гена *fkh*, которая, возможно, является участком вторичного взаимодействия TRX, ранее связавшегося с основным TRE). Интересно, что для каждого из потенциальных PRE/TRE, предсказываемых для исследуемой промоторной области, можно указать идентифицированные ранее тканеспецифические энхансерные элементы (схема на рис.2,А). Возможно, в каждой конкретной ткани, где активен ген *fkh*, принципиально важны для активности гена энхансеры, специфичные именно для данной ткани, и соответственно принципиально важны расположенные по-соседству с этими энхансерами элементы, поддерживающие их активность (TRE). Соответственно, в тканях, где ген *fkh* неактивен, рядом с энхансерными элементами, по-видимому, формируются PRE. Ранее было показано, что энхансерный элемент “sgE” является определяющим для специфической экспрессии гена *fkh* в клетках слюнных желез (*Shou et al., 2001*). В используемой для трансформации мух минимальной конструкции авторы помещали только этот элемент непосредственно перед промотором и видели слабую экспрессию репортерного гена именно в клетках слюнных желез. В реальной же ситуации этот энхансерный элемент отстоит от промоторной области на 8 т.п.н., да и уровень экспрессии гена существенно выше. Мы предполагаем, что выявленный нами в непосредственной близости от этого энхансерного элемента TRE1 отвечает за поддержание энхансера в «открытом» активном состоянии и, возможно, за пространственное сближение sgE с промотором.

Исследование функциональной значимости гипотетических TRE *in vivo* при помощи трансгенных конструкций.

Для проверки функциональной значимости обогащающихся в X-ChIP экспериментах последовательностей нами была создана базовая трансгенная конструкция *mini-fkh* (см.

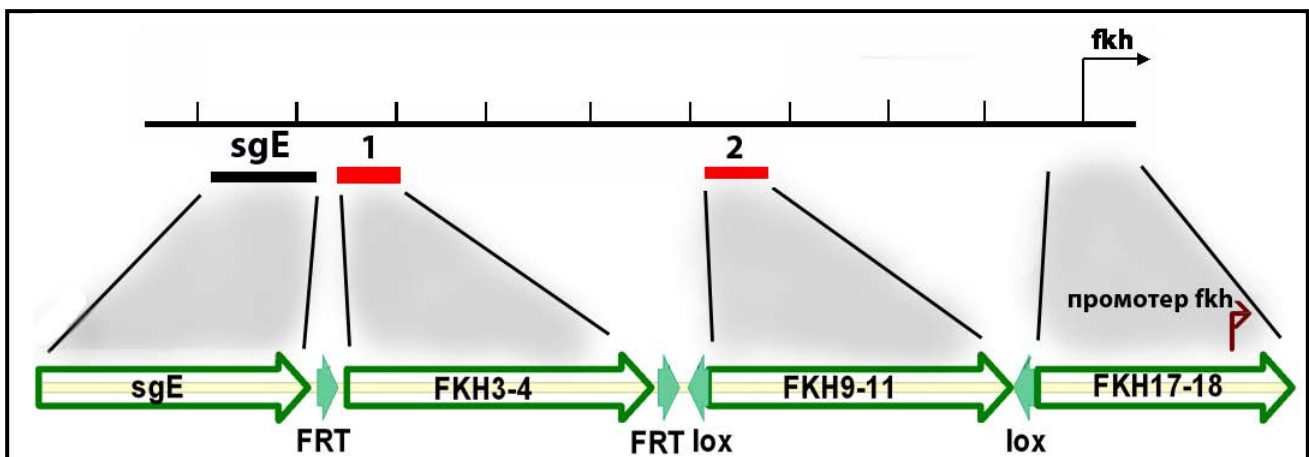


Рис. 3. Схема трансгенной конструкции

Вверху показана масштабированная схема исследуемой области. На схеме отмечены регуляторные элементы и выявленные гипотетические TRE (красные полоски с цифрами 1 и 2). Внизу показана схема созданной трансгенной конструкции, с указанием использованных для клонирования последовательностей.

sgE – энхансер слюнных желез; *FKH17-18* – область промотора; *FKH3-4* и *FKH9-11* – гипотетические TRE, которые могут быть удалены из конструкции использованием методом *FRT/FLP*- и/или *Lox/Cre* зависимой рекомбинации (соответствующие сайты рекомбинации подписаны).

схему на рис. 3). В эту конструкцию мы включили энхансер слюнных желез - уже изученный ранее элемент, необходимый для тканеспецифичной экспрессии гена *fkh* (Shou et al., 2001). Также в неё мы клонировали область промотора (длиной примерно 860 п.н), содержащую точку начала транскрипции гена *fkh* и 5'-фрагмент первого экзона гена *fkh*. Включение части экзона позволило нам в последующем оценить влияние элементов конструкции на экспрессию гена-мишени путём измерения уровня транскрипции трансгенной РНК. Также стоит отметить, что мы наблюдали небольшое обогащение этого района в предшествующих X-ChIP экспериментах, поэтому нельзя было исключить, что этот фрагмент важен для функционирования TRE. Помимо указанных элементов, конструкция также содержала проверяемые гипотетические TRE, выявленные нами на первом этапе работы и обозначенные *FKH3-4* и *FKH10-11*. Чтобы иметь возможность более достоверно оценить значимость проверяемых элементов, мы поместили их между сайтами рекомбинации LOX и FRT (рис. 3). Таким образом, при анализе трансгенных мух мы могли вырезать любой из этих элементов соответствующими рекомбиназами (CRE и FLP), и получить производную трансгенную линию с конструкцией, находящейся в том же месте в геноме и отличающейся от исходной конструкции лишь отсутствием в ней одного из гипотетических TRE. Сравнение

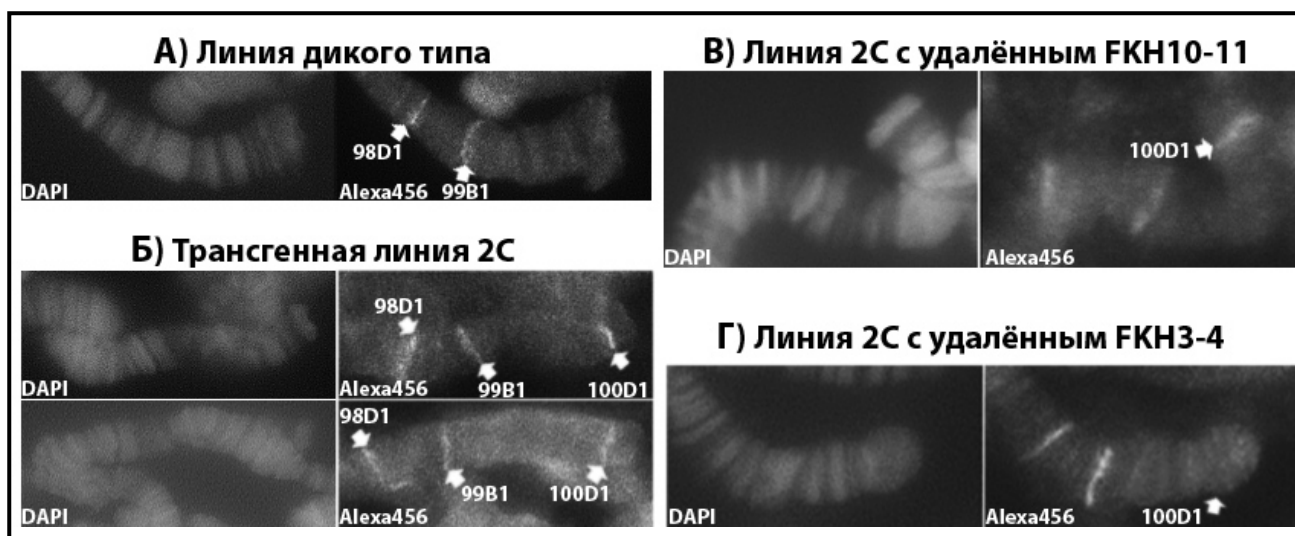


Рис. 4. Иммуное окрашивание политенных хромосом антителами к TRX

Показаны результаты окрашивания для одной из линий трансгенных мух с удобным для детекции положением конструкции в районе 100D1 (на краю хромосомы рядом с двумя эндогенными сигналами связывания). Слева окрашивание по DAPI, справа анти-TRX.

А) Хромосомы дикого типа (отмечены эндогенные сигналы связывания TRX в районах 98D1 и 99B1). Б-Г) Трансгенная линия 2С и производные от неё линии (стрелочкой отмечено положение конструкции). Б – Линия с полной конструкцией; В – линия, с конструкцией с вырезанным фрагментом FKH10-11. Г – линия, с конструкцией с вырезанным фрагментом FKH3-4

конструкций, находящихся в одном и том же месте генома принципиально в подобном анализе, потому что, как известно, геномное окружение может существенно влиять на характер экспрессии гена. Благодаря такому подходу можно было более надёжно оценить как связывание белка TRX с конструкцией, так и уровень транскрипции трансгена при наличии и отсутствии изучаемых последовательностей в конструкции.

В результате проделанной работы мы получили 8 трансгенных линий мух, местоположение конструкции в которых было определено методом инвертированного ПЦР. Пять из них мы отобрали для дальнейшего анализа (в трёх случаях конструкция находилась слишком близко к центromере, что сильно затрудняло анализ с помощью иммуного окрашивания). При иммунофлюоресцентном окрашивании мы детектировали появление сильного сигнала связывания TRX на политенных хромосомах в клетках слюнных желёз во всех анализируемых линиях (рис. 4). Положение и интенсивность нового флюоресцентного сигнала в месте встраивания конструкции мы сопоставляли с известными эндогенными участками связывания TRX. Интересно отметить, что, как правило, новый сигнал окрашивания, как и в случае с эндогенным *fkh*, был одним из самых заметных.

Удаление фрагмента FKH10-11 из конструкции не приводило к какому-либо заметному эффекту, и мы по-прежнему наблюдали наличие нового сайта связывания TRX во многих ядрах различных исследуемых линий трансгенных мух. В то же время удаление из конструкции последовательности, наиболее сильно обогащающейся в иммунопреципитационных экспериментах (FKH3-4), было критичным и приводило к полному исчезновению флюоресцентного сигнала TRX в месте встраивания конструкции для всех анализируемых линий трансформированных мух (рис. 4). Таким образом, элемент FKH3-4 необходим для связывания TRX с конструкцией.

Помимо подтверждения значимости выявленного элемента для связывания белка TRX мы также проанализировали влияние новых гипотетических TRE на экспрессию гена-мишени. С этой целью для пяти исходных трансгенных линий и их производных (линии с вырезанными фрагментами FKH3-4 и FKH10-11) методом ПЦР в реальном времени мы проанализировали отношение уровня транскрипции РНК с трансгенного промотора (“*mini-fkh*” РНК) к уровню транскрипции мРНК эндогенного гена *fkh* (в качестве контроля). Интересно отметить, что уровень транскрипции с трансгенного промотора во всех линиях мух с базовой конструкцией *mini-fkh* был сопоставим с уровнем транскрипции эндогенного гена *fkh*: в четырёх случаях из пяти отношение уровней транскрипции составляло 40-80%, а в одном случае (линия 3-red) уровень транскрипции с трансгенного промотора был даже втрое

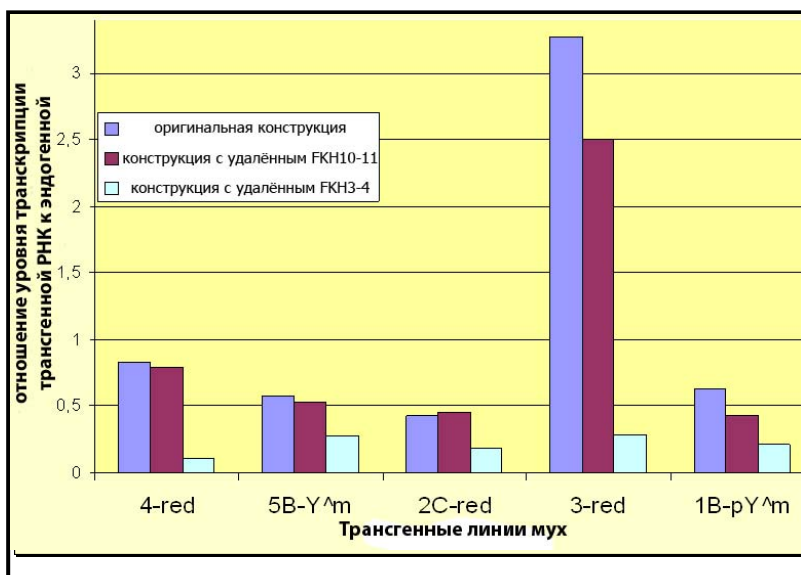


Рис. 5. Анализ уровня транскрипции «трансгенного» *fkh* в оригинальных трансформированных линиях и в производных из них.
 На рисунке показано отношение уровней транскрипции «трансгенного *mini-fkh*» к эндогенному *fkh* для пяти различных оригинальных линий трансформированных мух и производных от них линий (с удалением указанных проверяемых элементов).

выше (рис. 5). Во всех случаях при вырезании фрагмента FKH3-4 мы детектировали существенное снижение уровня транскрипции в несколько раз по сравнению с базовой трансгенной конструкцией (для различных линий уровень транскрипции снижался от 2 до 10 раз со средним значением примерно в 4 раза) (рис. 5). В то же время удаление из конструкции фрагмента FKH10-11 практически не оказывало влияния на уровень транскрипции.

В результате описанных выше экспериментов мы идентифицировали новый TRE, расположенный в 7 т.п.н выше промотора гена *fkh*. Нами было показано, что этот новый элемент важен как для связывания белка TRX, так и для экспрессии гена *fkh* в секреторных клетках слюнных желез личинки дрозофилы. Этот элемент расположен поблизости от энхансера слюнных желёз, что может быть важным обстоятельством функционирования данного TRE.

Также стоит отметить дополнительную ценность проделанной работы. Мы впервые создали достаточно компактную конструкцию (3 т.п.н, включая сайты рекомбинации для удаления проверяемых последовательностей), включающую все необходимые элементы для формирования нового сайта связывания TRX, легко детектируемого на политенных хромосомах при иммунном окрашивании. Мы показали, что удаление из конструкции небольшого фрагмента, при сохранении всех других регуляторных элементов, критично для связывания в этом районе белка TRX. Таким образом, на основе созданной нами конструкции теоретически возможна функциональная проверка других гипотетических TRE путём замены выявленного нами TRE гена *fkh* внутри конструкции на проверяемые последовательности. Поскольку в конструкцию входят регуляторные элементы, определяющие экспрессию гена *fkh* в клетках слюнных желёз, можно ожидать формирование TRX-комплекса на TRE внутри конструкции, которое легко детектируется иммунным окрашиванием политенных хромосом, даже в том случае, когда ген, находящийся в геноме под регуляцией проверяемого TRE, неактивен в секреторных клетках слюнных желёз.

Анализ распределения модифицированных гистонов в промоторной области гена *fkh*

Помимо выявления TRE в протяжённой промоторной области гена *fkh* нами была поставлена задача изучить некоторые особенности его функционирования. Как известно, транскрипционная память складывается из комбинации различных механизмов, включающих модификацию гистонов, ремоделирование хроматина, взаимодействие с основными транскрипционными факторами (*Francis & Kingston 2001, Simon & Tankun 2002*), и синтез некодирующей РНК (*Orlando, 2003*). Причём, модифицирование гистонов является важным признаком транскрипционного статуса хроматина. Так, метилирование лизинов в H3 по положениям 9 и 27 является маркёром репрессированного состояния хроматина, в то время как ацетилирование H4 и метилирование лизина-4 в H3 ассоциировано с активными районами. Также известно, что некоторые белки группы триторакса (trx-G) обладают гистон-модифицирующими активностями. Например, ASH1 и TRX содержат консервативный домен (SET-домен), способный метилировать определённые остатки лизина в гистонах, в частности, триметилировать лизин-4 в гистоне H3. В связи с этими данными нам показалось интересным проанализировать методом иммунопреципитации хроматина характер обогащения предпромоторной области гена *fkh* данными модификациями гистонов в случаях активного и репрессированного состояния гена *fkh*. Для этого в предварительном опыте методом RT-PCR мы показали отсутствие транскрипции *fkh* в культуре клеток S2, что позволило нам использовать эти клетки для анализа распределения модифицированных гистонов при неактивном состоянии гена *fkh* в сравнении с активным состоянием гена *fkh* в клетках слюнных желёз. Результаты данного исследования могут помочь в выяснении механизма функционирования TRE. Так, например, если предполагать механизм распространения сигнала об активном состоянии гена вдоль хроматина от TRE до промотора, то следует ожидать равномерное обогащение специфически модифицированных

гистонов по всему району. А в случае механизма, предполагающего прямое взаимодействие TRE и энхансера слюнных желез с собственно промотором, можно ожидать преимущественное обогащение модифицированными гистонами в районах TRE и в начала транскрипции.

Проведённые нами X-ChIP эксперименты показали, что хроматин в протяжённой промоторной области гена *fkh* действительно обогащен в значительной степени ацетилированными гистонами и триметилированными по 4 остатку лизина гистонами H3 (H3K4me3) в клетках слюнных желез, где ген активен (рис. 6), в отличие от клеток линии S2, в которых ген неактивен и сколько либо заметного обогащения при X-ChIP не наблюдается. Также мы показали, что обогащение промоторной области носит неравномерный характер, и имеется существенный пик обогащения в районе энхансера слюнных желёз и TRE с последующим затуханием сигнала при удалении от TRE. При этом, в случае анализа модификации H3K4me3 мы наблюдали заметное усиление обогащения в районе начала транскрипции гена *fkh*, но в случае с антителами к ацетилированным гистонам такого эффекта не отмечено. Также видны некоторые другие различия в профилях обогащения протяжённой промоторной области гена *fkh*, но они не столь значительны и могут быть

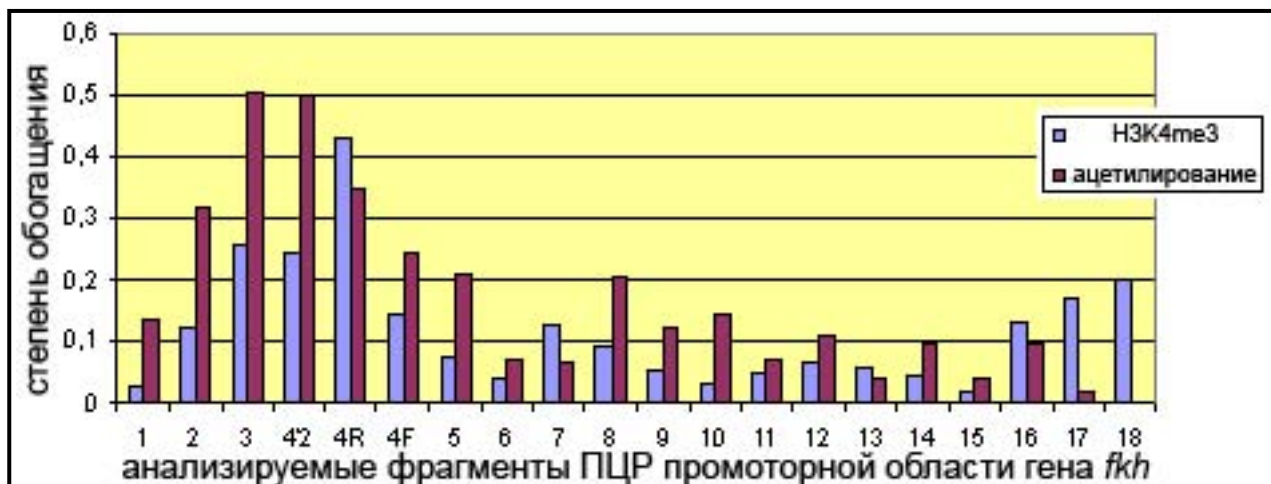


Рис. 6 Анализ распределения модифицированных гистонов в промоторной области гена *fkh*

Показаны результаты ПЦР анализа X-ChIP с антителами к модификации гистона H3K4me3 и к ацетилированным гистонам. Для проверки использовали те же 18 пар праймеров, что и в иммунопреципитационных экспериментах с антителами к TRX. Также были использованы дополнительные праймеры к району TRE (фрагменты 4², 4R, 4F) для более детального изучения этого участка. График показывает отношение количества ДНК в X-ChIP пробах к положительному контролю (аликвота хроматина, взятая непосредственно перед иммунопреципитацией) для соответствующих ПЦР фрагментов.

обусловлены погрешностью метода X-ChIP, хотя, возможно, стоит обратить внимание на неполное совпадение пиков обогащения для обеих проб и смещение этого пика ближе к энхансеру слюнных желёз в случае проб с антителами к ацетилированным гистонам.

TRX может триметилировать H3K4, поэтому увеличение степени обогащения в районе начала транскрипции гена *fkh* именно этой модификацией, в отличие от модификации ацетилирования гистонов, выглядит не случайной (напомним, что при иммуннопреципитации с одним из антител к TRX мы также наблюдали обогащение в этом участке). Пока преждевременно делать общие выводы о механизме функционирования TRE. На основе полученных данных можно предположить наличие прямого взаимодействия TRE с областью промотора.

Представленные результаты и выводы хорошо согласуются с недавними исследованиями других авторов. Так, например, в лаборатории Паро на примере гена *Abd-B* было показано, что белок TRX находится как в регуляторных элементах (описанных, как PRE), так и в районе промотора гена-мишени в случае активного состояния гена, в то время как в случае репрессированного состояния гена обогащения в районе промотора не наблюдалось (Beisel, 2007). В той же работе было проанализировано распределение ацетилированных гистонов в этих районах, показавшее, на примере генов *Abd-B* и *dfd*, что появляющееся обогащение в случае активного состояния генов также, как и в наших экспериментах, не затрагивает промоторную область.

Демонстрация колокализации TRE с элементами хроматина, ассоциированными со структурами «ядерного скелета».

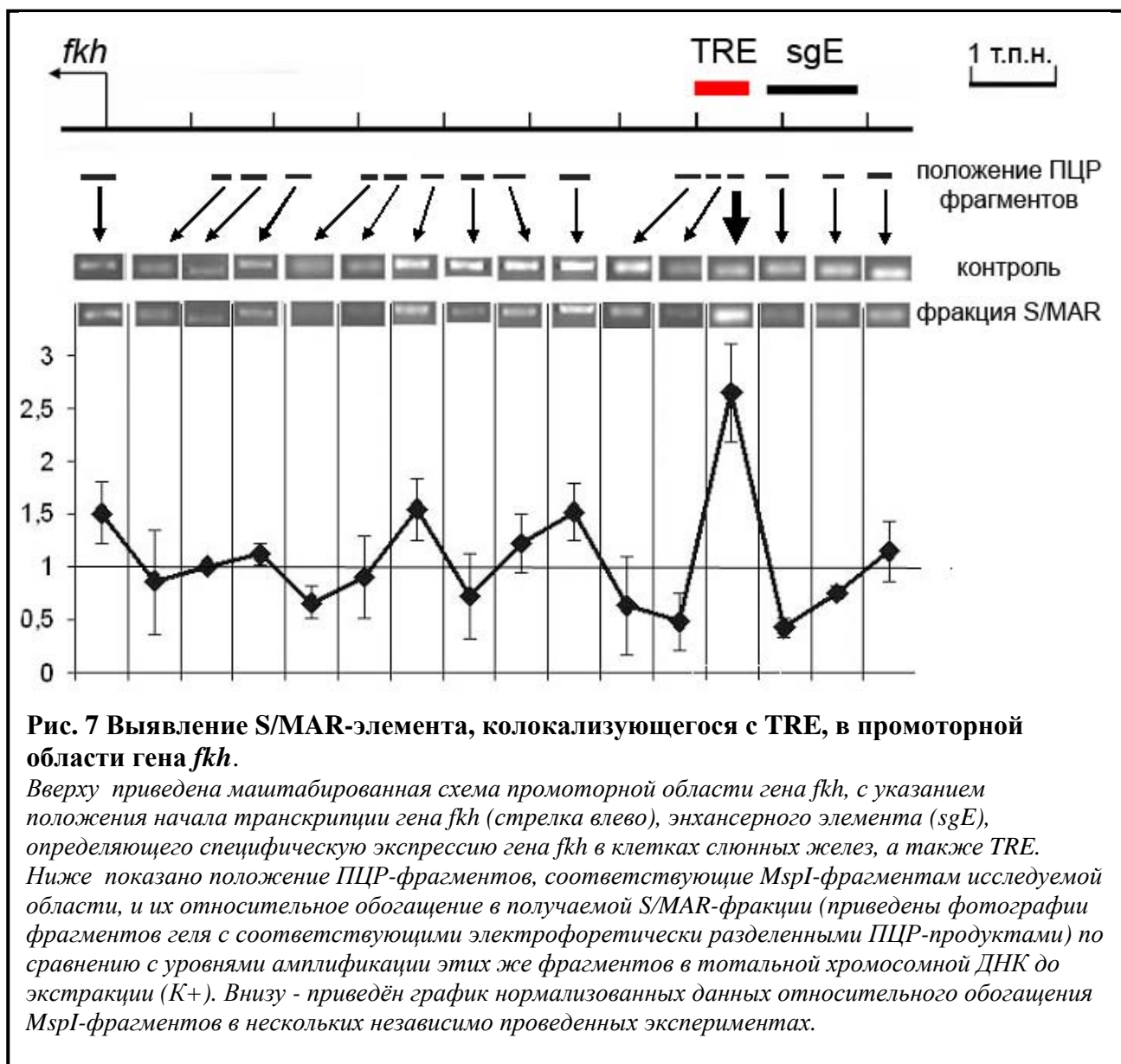
Недавно в нашей лаборатории было показано, что белок TRX является компонентом «ядерного матрикса» (Лебедева, Тиллиб, 2003). Поэтому мы решили проверить предположение о том, что TRE, подобно самому TRX, также могут быть ассоциированы с «ядерным матриксом», то есть могут являться потенциальными S/MAR. Нами была

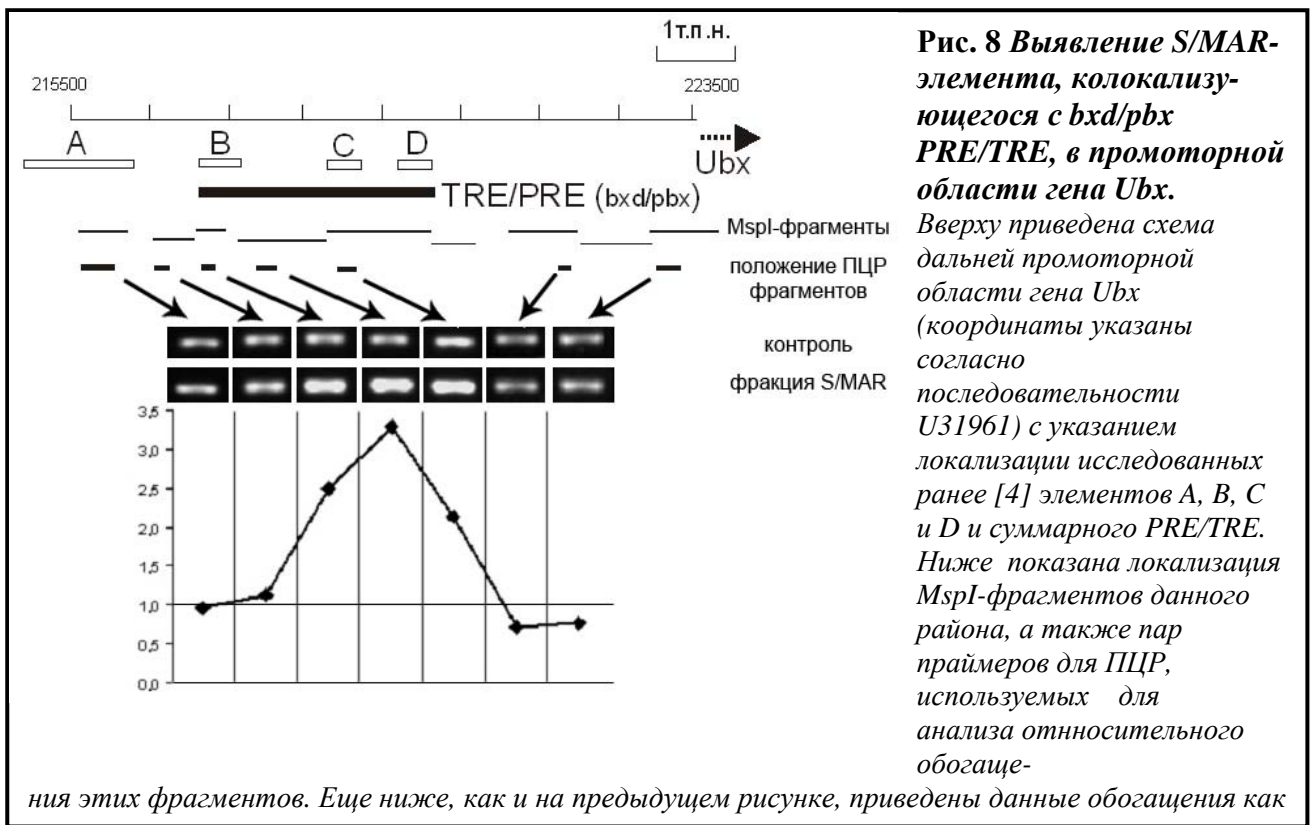
поставлена задача сравнить локализацию S/MAR-подобных участков с участками ранее нами определенных TRX-ассоциированных элементов в расширенной промоторной области (8,7 т.п.н.) гена *fkh* в клетках слюнных желез личинки дрозофилы. В качестве второго исследуемого района был взят район, наиболее детально изученного ранее TRE из дальней промоторной области гена *Ubx* (*pbx/bxd*) (*Tillib et al., 1999*) клеток эмбрионов дрозофилы. Для тонкого картирования S/MAR-элементов мы использовали традиционную процедуру экстракции хроматина в низкосолевым буфере с сильным детергентом (LIS) (*Craig et al., 1997; Mirkovitch et al., 1984*) с некоторыми модификациями. Для исследования промоторной области гена *fkh* в качестве исходного материала брали клетки слюнных желез личинки для анализа в случае активного состояния гена *fkh* и S2 культуральные клетки, где ген *fkh*, по нашим данным, не активен. В случае исследования регуляторного района гена *Ubx* использовали клетки эмбрионов, содержащие клетки как с активным, так и с репрессированным геном *Ubx*. Выделение ядер проводили параллельно как в указанной методике (*Craig et al., 1997*), так и согласно первому этапу экстракции (удалению цитоскелетной фракции), описанному в работе Хе и соавт. (*He et al., 1990*). В конце процедуры хромосомную ДНК расщепляли с помощью часто щепящей эндонуклеазы MspI. Анализ относительного обогащения перекрывающихся исследуемый район фрагментов MspI-MspI проводили путем ПЦР с использованием специально подобранных пар праймеров, как для промоторной области гена *fkh*, так и для района *pbx/bxd* гена *Ubx*.

По результатам нескольких повторных экспериментов нам удалось выявить в промоторной области гена *fkh* только один воспроизводимо и явно обогащающийся во фракции ядерного скелета участок ДНК (рис. 7). Интересно, что этот же участок был ранее выявлен нами как основной TRX-ассоциированный элемент гена *fkh* в клетках слюнных желез (*Ряховский, Тиллиб, 2007*). Таким образом, с высокой степенью разрешения можно предполагать ко-локализацию этих двух типов регуляторных элементов. Похожее исследование мы провели и на другой модельной системе, районе сильного PRE/TRE гена

Ubx в клетках эмбрионов дрозофилы. Полученные результаты (рис. 8) указывают на существование выраженного S/MAR-элемента, перекрывающегося с районом локализации ранее выявленных «B»-, «C»- и «D»- PRE/TRE. В результате проделанной работы на двух модельных системах удалось впервые продемонстрировать, что TRE колокализуется с хромосомными элементами, ассоциированными со структурами ядерного скелета.

Многие исследователи полагают, что помимо постоянно формирующихся (стабильных, структурных) существует и другой тип S/MAR: динамичных, факультативных, тканеспецифических (Чернов и др., 2004). Этот второй тип S/MAR весьма напоминает TRE, а возможно, что следует из результатов данной работы, эти два типа элементов являются лишь





условно разделимыми, а по существу они или очень близко располагаются или являются одним и тем же регуляторным элементом. В связи с этим следует упомянуть наши данные (не приведены) о подобном указанному выше анализе расширенной промоторной области гена *fkh* в культуральных S2 клетках дрозофилы, в которых ген *fkh* неактивен. В этом случае, в отличие от ситуации в клетках слюнных желез, где этот ген активен, мы не наблюдали обогащения участка FKH4, что указывает на зависимость от активности гена тканеспецифическую, динамичную природу подобных элементов.

ВЫВОДЫ

1. Проведено иммунопреципитационное картирование TRX-ассоциированных регуляторных элементов в промоторной области гена *fork head* длиной 8.7 т.п.н. в клетках слюнных желёз третьей личиночной стадии *D. melanogaster*, по результатам которого выявлены один мажорный и один менее выраженный районы потенциального связывания с белком TRX.
2. В экспериментах *in vivo* на трансгенных линиях мух показано, что только один из выявленных элементов, обогащённый в значительно большей степени, принципиально важен как для связывания белка TRX на политенных хромосомах, так и для транскрипции “*mini-fkh*” РНК в составе конструкции в секреторных клетках слюнных желез личинки дрозофилы.
3. Показано значительное обогащение промоторной области гена *fkh* модифицированными гистонами H3K4me3 и ацетилированными гистонами в случае активного состояния гена в клетках слюнных желёз личинки дрозофилы, и отсутствие подобного обогащения в случае репрессированного состояния гена в клетках культуры S2. Показано преимущественное обогащение данными модифицированными гистонами района TRE и некоторое обогащение H3K4me3 в районе промотора в клетках слюнных желёз.
4. Продемонстрировано на примере известного ранее TRE из гена *Ubx* и описанного в данной работе нового TRE из гена *fkh*, что TRE в активном гене может колокализоваться с хромосомными элементами, ассоциированными со структурами ядерного скелета.

СПИСОК ПЕЧАТНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи:

1. Ряховский А.А., Тиллиб С.В. Иммунопреципитационное картирование TRX-ассоциированных участков хромосом в промоторе гена *fkh* в клетках слюнных желез *Drosophila melanogaster*. *Генетика*, 2007, том. 43, №9, стр. 1181-1189.
2. Ряховский А.А., Тиллиб С.В. Колокализация S/MAR и TRE в регуляторных участках хромосом тканеспецифически экспрессирующихся генов *Drosophila melanogaster*. *Доклады Академии Наук*, 2007, том. 416, №3, стр. 416-419.

Материалы конференций:

1. Ряховский А.А., «Идентификация в геноме *Drosophila melanogaster* элементов, ответственных за образование триторакс-комплекса». XII международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2005». Секция биология, с. 189.
2. Ряховский А.А., Арифов А.О. «Выявление последовательностей ДНК, связывающих комплекс триторакса в эмбрионах *Drosophila melanogaster* и в S2 клетках *in vivo*». XIII международная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2006». Секция биология, с. 196.
3. Rjakhovsky AA., Tillib SV, "Identification of Trithorax response elements in upstream promoter region of the gene *fkh*". EMBO Conference Series on Nuclear Structure & Dynamics, 1-5 September 2007, Montpellier, France, p. 111.

БЛАГОДАРНОСТИ

Хотелось бы поблагодарить сотрудников ИБГ РАН Кырчанову Ольгу и Максименко Оксану за предоставление базовых линий мух, используемых для получения исследуемых трансгенных линий, и за консультации по работе с ними, а также Паршикова Александра за трансформирование эмбрионов мух созданной нами трансгенной конструкцией.