

ИММУНОПРЕЦИПИТАЦИОННОЕ КАРТИРОВАНИЕ TRX-АССОЦИИРОВАННЫХ УЧАСТКОВ ХРОМОСОМ В ПРОМОТОРЕ ГЕНА *fork head* В КЛЕТКАХ СЛЮННЫХ ЖЕЛЕЗ *Drosophila melanogaster*

© 2007 г. А. А. Ряховский, С. В. Тиллиб

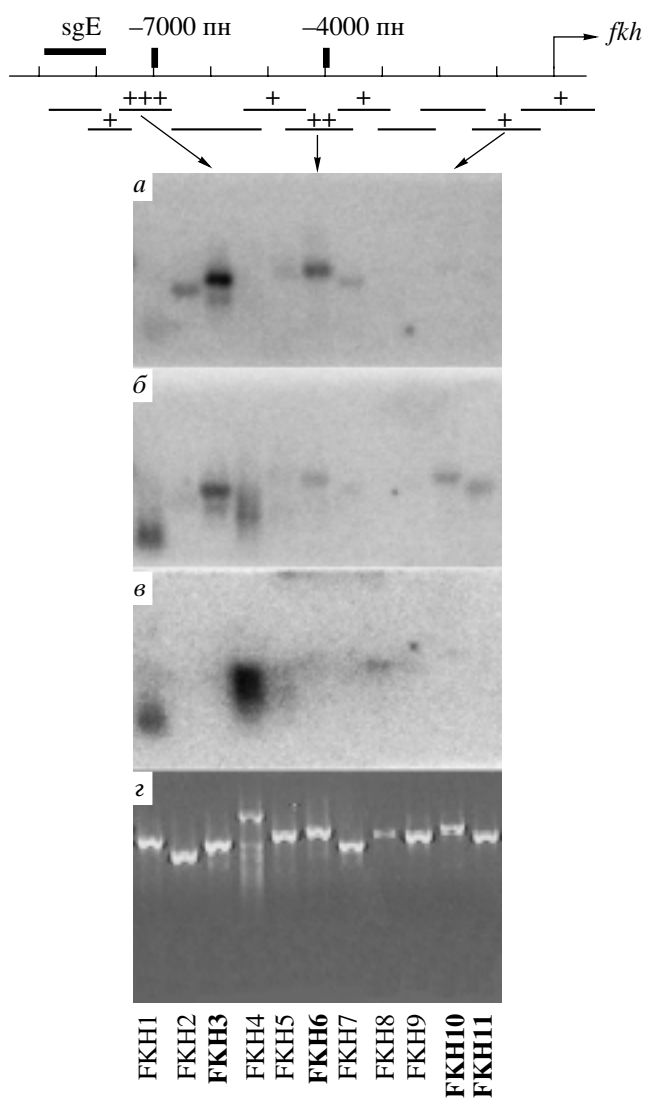
Институт биологии гена Российской академии наук, Москва 119334; e-mail: tillib@genebiology.ru

Поступила в редакцию 02.03.2007 г.

Метод иммунопреципитации сшитого *in vivo* формальдегидом и дробленого ультразвуком хроматина был использован для картирования потенциальных триторакс-ассоциированных регуляторных элементов в расширенной (9 тпн) промоторной области гена *fork head* (*fkf*) в клетках слюнных желез дрозофилы. Относительная гомогенность клеток слюнных желез, параллельное использование антител к различным доменам одного и того же белка триторакса (TRX), введение стадий перекрестной гибридизации для дополнительного специфического обогащения получаемых первоначально библиотек последовательностей ДНК позволили повысить эффективность метода и детектировать один мажорный и еще два менее выраженных района потенциального связывания с TRX.

Недавние исследования на мухах и млекопитающих убедительно продемонстрировали, что продукты двух групп генов – позитивные регуляторы группы триторакса (*trithorax*, *trx-G*) и негативные регуляторы группы поликомба (*Polycomb*, *Pc-G*), – являются ключевыми компонентами запрограммированного в геноме механизма поддержания дифференцировки клеток [1–2]. Функциональный анализ регуляторных районов нескольких генов-мишеней упомянутых групп генов позволил идентифицировать соответствующие специфические цис-элементы, называемые PRE/TRE (“*Polycomb/trithorax-response elements*”). Принципиальные особенности самих PRE/TRE, детали механизма их узнавания белковыми комплексами и последующее распространение специфического воздействия на экспрессию гена остаются слабо изученными. Предполагается, что TRE и PRE в данном гене в значительной степени колокализуются и функционируют взаимноисключаясь, 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 рядом субэлементов PRE [3]. Подобные работы с акцентом на исследование именно TRE довольно редки, несмотря на их актуальность. С целью локализовать другой подобный TRE, на этот раз в региональном гомеотическом гене *fork head* клеток слюнных желез личинки дрозофилы, нами и была предпринята данная работа. Мы исходили из нескольких имеющихся принципиальных заделов и особенно-

стей выбранной модели. Во-первых, ген *fork head* был ранее детально охарактеризован в отношении локализации цис-регуляторных элементов, контролирующей его экспрессию в различных тканях [4, 5], в частности, был выявлен и охарактеризован энхансерный элемент, специфичный только для клеток слюнных желез (*sgE* на рис. 1 и 3). Во-вторых, ранее удалось убедительно продемонстрировать существование сильного TRE в протяженной промоторной области гена *fork head* [6]. 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. Подобный тест на связывание с трансгенной конструкцией на препарате политемных хромосом может быть использован в качестве функционального теста уменьшенного или мутированного TRE. Любопытно, что если экспрессия *fkf* сильно подавляется в *trx*-мутантах [6], то в *Pc*-мутантах не обнаруживаются заметных изменений в экспрессии этого гена [7], что отличает данный элемент от других PRE/TRE и может указывать на возможность существования TRE без выраженного PRE. В-третьих, слюнные железы являются довольно гомогенной тканью (что важно при исследовании PRE/TRE), и эти органы реально отделить от других тканей личинки и нарабатывать в количествах, достаточных для иммунопреципитационных экспериментов. Наконец, вчетвертых, в данной работе мы использовали поликлональные антитела против трех различных доменов белка, генерированные ранее [6,8] путем иммунизации кроликов. Параллельное использование антител к различным доменам одного и то-



го же исследуемого белка представляется принципиальным для повышения достоверности результатов иммунологических исследований, особенно таких, как иммунопреципитация сшитого формальдегидом и дробленого ультразвуком хроматина ("X-ChIP" метод), где очень высок неспецифический фон. Мы смогли существенно повысить разрешение данного метода, используя комбинированные подходы на основе параллельного использования нескольких антител.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Антитела. Использовали ранее полученные [6, 8] путем иммунизации кроликов поликлональные аффинноочищенные антитела к различным доменам белка TRX (N1, N4 и N6), а также антитела, узнающие белок ASH1, полученные к его аминокислотным остаткам с 443 по 769 аналогично тому, как это было сделано ранее [9].

Иммунопреципитация хроматина (X-ChIP). Использовали модификацию описанной ранее процедуры [10]. В качестве исходного биологического материала использовались слюнные железы, извлекаемые под микроскопом из личинок третьей стадии мух *Drosophila melanogaster* дикого типа Орегон. Отобранные и хранящиеся не более часа в PBS на льду слюнные железы подвергали формальдегидной сшивке. Нарработку больших количеств фиксированных желез проводили в несколько этапов (фиксированные железы после отбора водного раствора хранили при -70°). Дальнейшие процедуры проводили в холодной комнате или на льду. При накоплении достаточного количества слюнных желез (1000–1500) их объединяли и ресуспендировали в 1.5 мл лизирующего буфера 1 (50 mM Hepes-KOH, pH 7.4, 140 mM NaCl, 1 mM ЭДТА, 10%-ный глицерин, 0.5% NP-40, 0.25% тритон X-100, коктейль протеазных ингибиторов ("Roche")). После инкубации с

Рис. 1. Гибридизация перекрывающихся последовательностей (ПЦР-продуктов) промоторной области гена *fork head* (*fkh*) с пробами, полученными в результате иммунопреципитации сшитого формальдегидом и дробленого ультразвуком хроматина. *a* – схема промоторной области гена *fkh*. Короткими линиями указаны перекрывающиеся ПЦР-фрагменты FKH1–FKH11, которые были получены с помощью следующих пар праймеров: FKH1 (*fkh2-f* и *fkh1-r*), FKH2 (*fkh3-f* и *fkh2-r*), FKH3 (*fkh5-f* и *fkh3-r*), FKH4 (*fkh7-f* и *fkh6-r*), FKH5 (*fkh8-f* и *fkh7-r*), FKH6 (*fkh10-f* и *fkh8-r*), FKH7 (*fkh12-f* и *fkh10-r*), FKH8 (*fkh14-f* и *fkh12-r*), FKH9 (*fkh16-f* и *fkh14-r*), FKH10 (*fkh17-f* и *fkh16-r*), FKH11 (*fkh18-f* и *fkh17-r*). В верхней части схемы показано положение регуляторного элемента *sgE*, определяющего специфическую экспрессию гена *fkh* именно в клетках слюнных желез, а также (стрелка вправо) локализация начала транскрипции гена *fkh*. Плюсами обозначены гибридизующиеся фрагменты, соответственно относительная сила гибридизации увеличивается в последовательности \pm , +, ++, +++. Стрелками внизу схемы указаны локализации соответствующих фрагментов ДНК на фильтрах, полученных для блот-гибридизации по Саузерну; *б* – проба для гибридизации была получена в результате независимого проведения трех иммунопреципитаций и последующего перекрестного гибридационного обогащения последовательностями, присутствующими в каждой из трех специфически обогащенных библиотек ДНК (одной – полученной с использованием антител, узнающих тритораксный домен N1, и двух независимых библиотек, полученных при использовании антител, узнающих тритораксный домен N6); *в* – подобный предыдущему (*б*) эксперимент, в котором для гибридационного обогащения пробы использовались четыре библиотеки ДНК, независимо полученные с применением одинаковых антител (к тритораксному домену N4); *г* – в качестве контроля неспецифического обогащения ДНК использовали пробу, полученную в результате иммунопреципитации с использованием преиммунной кроличьей сыворотки; *д* – ПЦР-фрагменты FKH1–FKH11, разделенные электрофорезом в 1.5%-ной агарозе, перед капиллярным переносом на фильтр для гибридизации

перемешиванием в течение 10 мин клетки дополнительно разрушали обработкой в Даунсе (10–15 движениями пестика В). Ядра центрифугировали при 800g в течение 3 мин, осторожно ресуспендировали в 1 мл буфера 2 (200 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 0.5 мМ ЭГТА, 10 мМ трис-HCl, pH 8, коктейль протеазных ингибиторов) и перемешивали на Ротомиксе (Ромомикс-1, ELM1) 10 мин. Далее ядра центрифугировали и ресуспендировали в 0.7 мл буфера 3 (1 мМ ЭДТА, 0.5 мМ ЭГТА, 10 мМ трис-HCl, pH 8, коктейль протеазных ингибиторов). Дробление ультразвуком проводили на приборе Vibracell (“Bioblock Scientific”) при мощности 100 Вт и амплитуде 80, импульсами по 30 с, перемежающимися интервалами по 1 мин, с охлаждением во льду. ДНК дробили до фрагментов со средним размером 500 пн. К раствору дробленого хроматина добавляли (для перевода в RIPA буфер) 1% тритон X-100, 0.1% Na-дезоксиколат, 0.1% SDS, 140 мМ NaCl, 1 мМ PMSF и коктейль протеазных ингибиторов. Далее проводили процедуру пре-адсорбции неспецифически связывающегося с протеин-А-сефарозой (ПАС) материала хроматина, для чего к раствору хроматина (0.7 мл) добавляли 0.1 мл 50%-ной суспензии ПАС (предварительно “блокированной” в стандартном солевом растворе PBS с 2 мкг/мл олигонуклеотида Б и 1 мг/мл БСА, а после уравновешенной в RIPA буфере) и инкубировали, перемешивая на Ротомиксе 3–4 ч при 4°C. ПАС осаждали центрифугированием (3000g, 1 мин). Супернатант отбирали, разбавляли в 4 раза буфером RIPA, отбирали аликвоту (1/10 V) для положительного контроля, а остальной раствор разделяли равномерно (примерно по 0.7 мл) для параллельных иммунопреципитаций с различными препаратами антител или с преиммунной кроличьей сывороткой (отрицательный контроль). Конечные концентрации используемых антител были примерно 10 мкг/мл. Инкубацию проводили в течение ночи при 4°C на Ротомиксе. После этого осаждали центрифугированием возможно образовавшиеся неспецифические агрегаты, а к отобранному супернатанту добавляли 80 мкл ПАС (с заблокированными местами неспецифической сорбции) и инкубировали 2–3 ч при 4°C на Ротомиксе. ПАС со связавшимся материалом промывали последовательно 6 раз RIPA-буфером, 1 раз раствором, содержащим ТЕ (1 мМ Na-EDTA, 10 мМ трис-HCl, pH 8.0), 0.25 М LiCl, 0.5% NP-40 и 0.5% Na-дезоксиколат, дважды ТЕ и затем ресуспендировали в 200 мкл ТЕ. К суспензии ПАС добавляли ЭДТА (до 10 мМ) и RNКазу А (до 50 мкг/мл), инкубировали 30 мин при 37°C, после чего к раствору добавляли SDS до 0.5%, протеиназу К (“Fermentas”) до 200 мкг/мл и инкубировали 3 ч при 55°C для удаления белков и высвобождения ДНК. Обращение формальдегидной сшивки проводили при 65°C в течение ночи. Затем проводили фенольную депротенизацию, и очи-

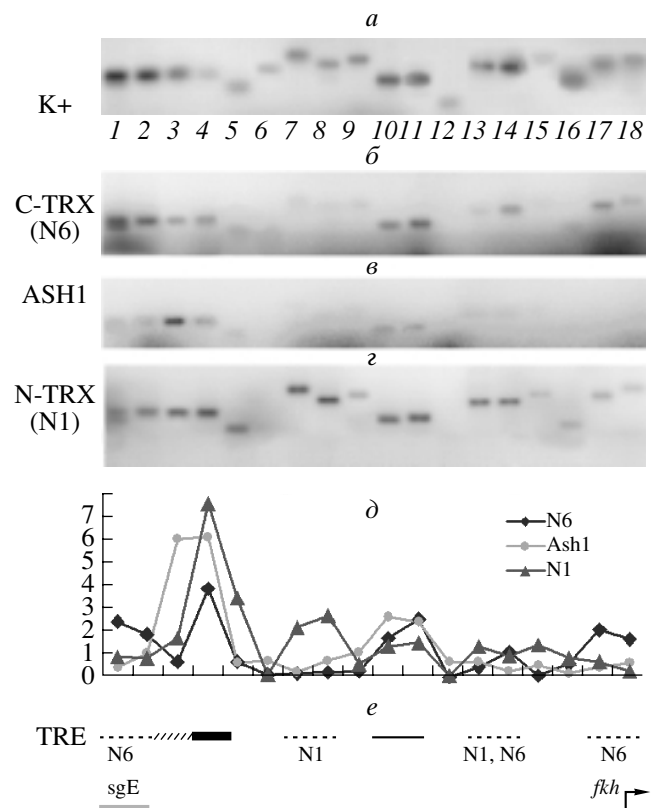


Рис. 2. Анализ специфического иммунопреципитационного обогащения, основанный на прямом включении радиоактивной метки в ходе многочисленных параллельных ПЦР с использованием 18 пар праймеров (праймеры для синтеза фрагментов fkh1-fkh18 указаны в разделе “Материалы и методы”), подобранных с учетом покрытия всего исследуемого района. *a*) – представлены контрольные данные (K+) по включению метки при амплификации ДНК, полученной из хроматина, приготовленного для иммунопреципитации. Следующие три автографа (*b*, *c*, *d*) отражают результаты ПЦР с ДНК, полученной в результате иммунопреципитационного обогащения с использованием соответственно трех различных антител: *b* – узнающих C-концевую половину TRX (анти-C-TRX, анти-N6), *c* – узнающих еще один белок группы триггера – ASH1 (анти-ASH1), *d* – узнающих N-концевую половину TRX (анти-N-TRX, анти-N1). Результаты авторадиографии обсчитывали с помощью программы TotalLab. Интенсивность сигнала, полученного в случае X-ChIP-проб, нормализовали относительно интенсивности сигнала в соответствующем положительном контроле. Полученные данные представлены на графике (*d*). *e* – схема, отражающая выявляемые обогащенные последовательности (толщина линии соответствует степени обогащения, пунктирной линией отмечены участки, заметно обогащающиеся только в случае одного из используемых антител) в промоторной области гена *fkh*

щенную ДНК осаждали этанолом, добавив предварительно 20 мкг/мл гликогена. После промывки и высушивания ДНК растворяли в 5 мкл воды.

Количество ДНК, получаемое в результате описанной процедуры, обычно очень мало и тре-

буется проводить амплификацию обогащенной ДНК или с помощью специфических праймеров для исследуемого района, или с помощью “универсального” праймера, как было описано ранее [10]. В последнем случае присоединяли к соответствующим обработанным концам молекул ДНК адаптеры. Адаптеры для лигирования по липким концам получали путем отжига следующих пар олигонуклеотидов (Ф – фосфатная группа):

MspI-адаптер (Ф-5'-gatcagaagcttgaattcgagcag-3' и 3'-tcttcgaactaagctcgtc-5'), Sau3A/MboI-адаптер (Ф-5'-ccggagaagctgaattcgagcag-3' и 3'-tcttcgaactaagctcgtc-5'). Для лигирования по тупым концам использовали адаптер, полученный путем отжига двух олигонуклеотидов: 5'agaagcttgaattcgagcagttt-3' и 3'tcttcgaactaagctcgtc-5'.

Перекрестная гибридизация. Для перекрестной гибридизации одну из X-ChIP-проб в количестве 5–10 мкг обрабатывали рестриктазой *Hind*III для удаления адаптеров с целью предотвращения гибридизации проб по ним и затем наносили на мембрану Hybond N+ (“Amersham”) размером около 10 мм². После пришивки ДНК к фильтру UV-облучением и тщательной отмывки мембраны в 0.1 × SSC (20 × SSC, 3 М хлорид натрия; 0.3 М цитрат натрия, pH 7.0) при 65°C проводили гибридизацию с другой X-ChIP-пробой в объеме 30 мкл (концентрация приблизительно 0.2 мкг/мкл) в течение ночи в гибридизационном буфере (5 × SSC; 1% SDS; 0.1% БСА; 0.1% фикоил; 0.1% поливинилпирролидон, дробленая ДНК спермы лосося – 100 мкг/мл) при 65°C. После отмывки сгибридизованный материал элюировали в 0.4 М NaOH при 45°C, элюат нейтрализовали разбавленной уксусной кислотой и осаждали ДНК (с 20 мкг гликогена в качестве соосаждителя) этанолом, после чего снова проводили амплификацию с “универсальным” праймером.

Саузерн-блот-гибридизацию проводили согласно традиционному протоколу.

ПЦР с радиоактивной меткой. X-ChIP-процедуру проводили с материалом, полученным из примерно 150 слюнных желез. Полученную в результате иммунопреципитации ДНК анализировали методом ПЦР с радиоактивной меткой. В реакционную смесь добавляли 0.1 мкМ α-³²P-АТФ (с удельной активностью 4 МКи/моль), уменьшив концентрацию немеченого дАТФ в реакции с 200 до 50 мкМ. В каждой реакции использовали примерно 3% от общего количества обогащенной X-ChIP-пробы (что эквивалентно примерно ДНК одной слюнной железы). В положительном контроле количество ДНК было примерно в 50 раз меньше. Реакцию проводили в стандартных условиях согласно протоколу фирмы “Силекс” (Россия) с некоторыми модификациями. В реакционный буфер добавляли 0.5 М бетаин, а в качестве фермента использовали смесь полимераз

Taq и *Pfu* (фирмы “Силекс”) в соотношении 50 : 1. Продукты реакции очищали от невключившейся метки на колонках Nucleospin (“Macherey-Nagel”) и разделяли в агарозном геле, который впоследствии высушивали и закладывали на экспозицию с экраном (cyclone storage phosphor screen) для фосфоимаджера (cyclone phosphor imager, Packard Bioscience), с помощью которого и фиксировали затем результат автордиографии.

Используемые праймеры. Праймеры для амплификации участков ДНК в промоторной области гена *fork head* (координата 5'-конца указана согласно последовательности AC009213):

fkh1-f: 5'-cgctcgatgtttacctgctc-3' 133269, fkh1-r: 5'-cctcgtcggccaacagca-3' 133477;

fkh2-f: 5'-gtgtccaccagcagagttc-3' 132572, fkh2-r: 5'-gctttgtgccaattgacag-3' 132782;

fkh3-f: 5'-ccggcaaaactgaaagtc-3' 132083, fkh3-r: 5'-ggctttgtgtttatgtgcca-3' 132317;

fkh4-f: 5'-ggctacccatgacgtga-3' 131619, fkh4-r: 5'-ctgtgctgccgttatgctg-3' 131829;

fkh5-f: 5'-gtaggtgtaccatggagt-3' (131448), fkh5-r: 5'-ggagagccctcgtcgcga-3' 131587;

fkh6-f: 5'-gctcgcactggagtcaca-3' 131184, fkh6-r: 5'-caaccagatggcgacaagca-3' 131421,

fkh7-f: 5'-gacaacgagactgctgcca-3' 129763, fkh7-r: 5'-cccagtcгааagctagcca-3' 130109;

fkh8-f: 5'-gccaccaagaaacagcga-3' 129088, fkh8-r: 5'-caatcggccaagtgtgtac-3' 129389,

fkh9-f: 5'-cagccgagtagcgcacct-3' 128633, fkh9-r: 5'-gcaaaagcgcgactaggct-3' 128970;

fkh10-f: 5'-catgcacatatccgcagt-3' 128455, fkh10-r: 5'-catgcacatatccgcagt-3' 128455;

fkh11-f: 5'-gcatttaactctgtttcggct-3' 127816, fkh11-r: 5'-ctaatttagctggccaac-3' 128014;

fkh12-f: 5'-cttaacgattctgctggga-3' 127642, fkh12-r: 5'-gcatacactcccaagattc-3' 127705;

fkh13-f: 5'-gatgacgtccgcagctgt-3' 127291, fkh13-r: 5'-gcatcatctgtgtgct-3' 127584;

fkh14-f: 5'-ctcaaatccttatgtgact-3' 126681, fkh14-r: 5'-cgccatgtaatccgacct-3' 126975;

fkh15-f: 5'-ccttcatctaggcgtga-3' 126269, fkh15-r: 5'-gatatccgagtggaagcca-3' 126620;

fkh16-f: 5'-ccataaacatagacgcct-3' 125981, fkh16-r: 5'-gagaaacgagacaatcgtct-3' 126154;

fkh17-f: 5'-gcaccagctccgactcgt-3' 125018, fkh17-r: 5'-acatggcgtcgtcagca-3' 125353;

fkh18-f: 5'-ctatcactgcttcaatcggt-3' 124412, fkh18-r: 5'-gcaacagcagcatcagcca-3' 124818.

Для блокировки протеин-А сепарозы использовали олигонуклеотид-Б:

5'-cacaacgaatggatcctc-3'. “Универсальный праймер”: 5'-ctgctcgaattcaagcttct-3'.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С целью получения библиотеки геномных последовательностей, с которыми взаимодействуют TRX-содержащие белковые комплексы в клетках слюнных желез личинок дрозофилы, в данной работе вначале был использован подход, базирующийся на проведении процедуры “X-ChIP” параллельно с тремя различными антителами, соответственно узнающими три разных домена одного и того же белка TRX (N1, N4 и N6), и на последующей амплификации специфически обогащенной и лигированной с адаптерами ДНК с использованием “универсального” праймера. Полученные в результате данной процедуры специфически обогащенные и амплифицированные последовательности радиоактивно метили и использовали в качестве зонда для гибридационной детекции обогащающихся (комплементарных) участков в промоторной области гена *fkh*. Результаты данных опытов не представлены, так как мы наблюдали их весьма сильную вариабельность и излишне высокий неспецифический фон (в случае контроля с использованием преиммунной сыворотки). Нам удалось существенно повысить эффективность и воспроизводимость данного подхода введением дополнительной стадии гибридационного обогащения (путем перекрестной гибридационной) получаемых первоначально библиотек последовательностей. Так, не способную к амплификации с использованием универсального праймера (после рестрикции и удаления адаптеров) обогащенную пробу ДНК в избытке иммобилизовали на нейлоновом фильтре (проба 1). Другую, специфически обогащаемую ДНК (пробу 2), способную к амплификации, добавляли в гибридационный раствор и проводили процедуру гибридационной с иммобилизованной на фильтре ДНК. В качестве проб 1 и 2 использовали ДНК, полученные в результате различных иммунопреципитационных экспериментов как с одним и тем же антителом, так и с антителами к разным доменам TRX. Было проведено несколько экспериментов, которые давали воспроизводимые результаты. На рис. 1 представлены данные трех таких экспериментов. Из совокупности проведенных экспериментов нам удалось выявить в исследуемом районе два потенциальных TRE (размером около 1000 п.н.), находящихся на расстоянии примерно 7000 и 4000 пн от начала транскрипции гена *fkh* (рис. 1, а). Небольшое, но воспроизводимое обогащение наблюдалось также последовательностями ДНК, непосредственно прилегающими к началу транскрипции. Особое внимание следует обратить на наиболее удаленный от промотора TRE. Этот элемент, соответствующий основному гибридируемому материалу в большинстве наших экспериментов, хотя и не перекрывается, но находится в непосредственной близости от ранее выявленного регуляторного элемента (sgE), определяющего специфиче-

скую экспрессию гена *fkh* именно в клетках слюнных желез.

Наряду с вышеизложенным “гибридационным” подходом в данной работе использовали также метод прямого включения радиоактивной метки в ходе многочисленных параллельных ПЦР с использованием 18 пар праймеров (праймеры для синтеза фрагментов *fkh1–fkh18* указаны в разделе “Материалы и методы”), подобранных с учетом покрытия всего исследуемого района. Характерные результаты таких экспериментов представлены на рис. 2. В верхней части рисунка представлены контрольные данные (К+) по включению метки при амплификации ДНК, полученной из хроматина, приготовленного для иммунопреципитации. Видно, что нам удается детектировать (с несколько различающейся эффективностью) продукты, получающиеся при использовании всех 18 пар праймеров (рис. 2, а). Следующие три автографа (рис. 2, б–г) были получены в результате ПЦР с ДНК, полученной в результате иммунопреципитационного обогащения с использованием соответственно трех различных антител, узнающих N- или C-концевые половины TRX, а также белок группы триторакса ASH1. Предполагается, что специфическое расщепление TRX является эволюционно консервативным этапом процессинга этого белка [6, 11]. Предполагается также, что обе части TRX взаимодействуют между собой и функционируют в составе одного комплекса, хотя нельзя исключить и дополнительного раздельного функционирования комплексов, включающих только часть TRX. Ранее мы показали, что антитела к N1- и N6-доменам TRX связываются с одними и теми же участками политенных хромосом [8]. Однако при этом нельзя исключить, что каждая из двух частей TRX может иметь хотя и близко расположенный, но свой специфический участок связывания как в одном и том же, так и в соседних TRE. На возможность этого указывают предыдущие исследования, в которых были выявлены участки TRX, необходимые для характерной его точечной (“spiced”) локализации в ядре, в N-концевой половине белка [12], а также участок C-концевой половины этого белка, находящийся рядом с SET-доменом (“pre-SET” [13]) и обладающий свойством связывать одноцепочечные нуклеиновые последовательности как ДНК, так и РНК. В наших экспериментах в первую очередь внимание обращалось на те участки регуляторной области TRX, которые обогащались при использовании всех имеющихся анти-TRX антител. Выявляемые участки хорошо коррелировали с теми, которые были идентифицированы с использованием гибридационного метода детекции, и соответствовали продуктам ПЦР, обозначенным на рис. 2 номером 4 (мажорный обогащающийся район, находящийся в 7 тпн от начала транскрипции *fkh*)

и номерами 10 и 11 (менее заметно обогащающийся участок, находящийся в 3.5–4 тпн от начала транскрипции *fkh*). При анализе получаемых данных проводилась нормализация относительных интенсивностей сигналов с помощью сравнения интенсивностей детектируемых полос в обогащенном материале и относительной эффективности наработки данного продукта в положительном контроле (см. 2, д). Помимо мажорных общих обогащающихся последовательностей наблюдалось также некоторое специфическое обогащение для конкретных антител. Так, только в случае анти-TRX-N1-антител воспроизводимо обогащался район ПЦР-продуктов 7 и 8, а в случае анти-TRX-N6 антител обогащались также участки энхансера слюнных желез (1, 2) и участок вблизи начала транскрипции *fkh* (17) (рис. 2). Нельзя, конечно, полностью исключить возможность неспецифических взаимодействий в случае каждого отдельного препарата поликлональных антител. Именно поэтому более надежны результаты, указывающие на один и тот же район в случае каждого из используемых антител. Однако нам представляется возможным и специфичность несовпадающих обогащений. Так, из наших предварительных данных следует преимущественное участие в ассоциации с так называемым “ядерным матриксом” именно N-концевой части TRX, а районы ПЦР-продуктов 7 и 8 (рис. 2) обогащаются при выделении ассоциированной с матриксом ДНК. С другой стороны, именно C-концевая часть TRX содержит SET-домен, обладающий гистон-метилтрансферазной активностью. Эта активность нужна для поддержания “открытой” структуры хроматина активных генов, и предполагается, что TRX-содержащий комплекс может специфически метилировать гистоны протяженных участков хромосом, прилегающих к первоначальному участку связывания (TRE), а также и гистоны в районах собственно транскрибирующихся последовательностей. Для этой энзиматической функции вполне достаточно C-концевого фрагмента TRX, содержащего SET-домен, и мы предполагаем, что такой фрагмент может существовать в составе отдельного комплекса (без N-концевой части TRX).

В дополнение к TRE в данной работе были также картированы участки связывания другого белка тритораксной группы, ASH1 (рис. 2, в). 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 колокализуются [14], однако эти два белка пока так и не удалось биохимически выделить в одном комплексе. Поэтому открытым остается вопрос, совпадают ли полностью или как близки участки их связывания в регуляторной области гена-мишени. Недавно было продемон-

стрировано, что ASH1 взаимодействует с TRE при условии, что в этом районе происходит транскрипция малой некодирующей РНК [15]. При этом для связывания ASH1 требуется образование РНК-ДНК-гибрида. Наши данные указывают на непосредственную близость, но не идентичность участков связывания ASH1 и TRX. Так, если в случае TRX дальний от промотора обогащающийся участок соответствует ПЦР-продукту 4, то в случае анти-ASH1 антител примерно одинаково обогащаются два соседних участка – 3 и 4 (рис. 2). Похожая ситуация и в случае второго, менее выраженного TRE, соответствующего ПЦР-продуктам 10 и 11. Если в случае TRX участок 11 обогащается больше, чем участок 10, то в случае ASH1 обогащение примерно одинаковое. Если исходить из гипотезы, что и в данном случае образуются некодирующие регуляторные РНК, соответствующие последовательностям TRE, то эти РНК следует искать в районах ПЦР-продуктов 3–4 и 10–11 (рис. 2).

Итоговые обобщенные результаты данной работы представлены на схеме рис. 3. В верхней части схемы обозначены определенные ранее энхансерные тканеспецифические элементы. Мы работали с клетками слюнных желез, и в них наиболее важным регуляторным элементом является *sgE*. Далее на схеме (сверху вниз) представлены данные гибридизационной детекции TRX-ассоциированных последовательностей, а затем и данные прямого ПЦР-анализа обогащающихся коротких фрагментов ДНК. В нижней части схемы указаны локализации трех выявленных предполагаемых TRE. TRE1 – мажорный из выявленных участков, более слабый элемент – TRE2, а TRE3 – едва детектируем и, возможно, является участком вторичного взаимодействия TRX, ранее связавшегося с основным TRE. Интересный результат был получен при анализе обогащения в исследуемой промоторной области участками связывания белков РНО (“Pleiohomeotic”), Z (“Zeste”) и GAGA-фактора (GAF). Обогащение этими участками, по-видимому, является характерной особенностью PRE/TRE, и была разработана программа поиска PRE/TRE, основанная на выявлении районов геномной ДНК, обогащенной участками связывания этих трех белков [16]. На рис. 3, б отражен результат применения этой поисковой программы для исследуемой нами промоторной области гена *fkh*. Любопытно, что обнаруживается явная корреляция в локализации идентифицированных нами TRX-ассоциированных последовательностей и районов обогащения участками связывания трех упомянутых ДНК-связывающих белков.

Интересно, что для каждого из трех потенциальных PRE/TRE, предсказываемых для исследуемой промоторной области, можно указать идентифицированные ранее тканеспецифические эн-

хансерные элементы (схема на рис.3,а). Можно предположить, что 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 [5]. 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 тпн, да и уровень экспрессии гена существенно выше. Мы предполагаем, что выявляемый 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. Элементы TRE2 и TRE3 могут быть в этом случае вторичными местами взаимодействия с TRX-ассоциированным комплексом. Полученные результаты планируется в дальнейшем использовать при создании конструкций с целью проверки *in vivo* функциональной значимости выявленных TRE. Данная работа была поддержана грантом РФФИ (№ 05-04-48970а Тиллиб С.В.) и грантом Тиллибу С.В. по Программе фундаментальных исследований РАН "Молекулярная и клеточная биология" (проект №10002-251 / П-10 / 147-142 / 120503-051).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ringrose L., Paro R. Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity // *Development*. 2007. V. 134. P. 223-232.
2. Schwartz Y.B., Pirrotta V. Polycomb silencing mechanisms and the management of genomic programmes // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. P. 9-22.
3. Tillib S., Petruk S., Sedkov Y., Kuzin A. et al. Trithorax and Polycomb group response elements within a Ultrabithorax transcription maintenance unit consist of closely situated but separable sequences // *Mol. Cell. Biol.* 1999. V. 19. P. 5289-5202.
4. Weigel D., Seifert E., Reuter D., Jackle H. Regulatory elements controlling expression of the *Drosophila* homeotic gene fork head // *EMBO J.* 1990. V. 9. P. 1199-1207.
5. Zhou B., Bagri A., Beckendorf S.K. Salivary gland determination in *Drosophila*: a salivary-specific, fork head enhancer integrates spatial pattern and allows fork head autoregulation // *Develop. Biol.* 2001. V. 237. P. 54-67.
6. Kuzin B., Tillib S., Sedkov I. et al. The *Drosophila trithorax* gene encodes a chromosomal protein and directly regulates the region-specific homeotic gene fork head // *Genes & Develop.* 1994. V. 8. P. 2478-2490.
7. Jurgens G., Weigel D. Terminal versus segmental development in *Drosophila embryo*: The role of the homeotic gene fork head // *Roux Arch. Dev. Biol.* 1988. V. 197. P. 345-354.
8. Лебедева Л.А., Тиллиб С.В. Глобальный фактор поддержания тканеспецифического активного состояния генов *Drosophila melanogaster*, белок TRITHORAX, ассоциирован с ядерным матриксом // *Генетика* 2003. Т. 39. № 2. С. 250-258. (Lebedeva L.A., Tillib S.V. TRITHORAX, a global transcription activator/maintenance protein of *Drosophila melanogaster*, is associated with the nuclear matrix // *Rus. J. Genetics*. 2003. V. 39. № 2. P. 190-197.)
9. Tripoulas N., LeJeunesse D., Gildea J., Shearn A. The *Drosophila ash1* gene product, which is localized at specific sites on polytene chromosomes, contains a SET domain and PHD finger // *Genetics* 1996. V. 143. P. 913-928.
10. Orlando V., Strutt H., Paro R. Analysis of chromatin structure by *in vivo* formaldehyde cross-linking. // *Methods*. 1997. V. 11. P. 205-214.
11. Hsieh J.J.-D., Cheng E. H.-Y., Korsmeyer S.J. Taspase 1: a threonine aspartase required for cleavage of MLL and proper *HOX* gene expression // *Cell* 2003. V. 115. P. 293-303.
12. Yano T., Nakamura T., Blechman J. et al. Nuclear punctate distribution of ALL-1 is conferred by distinct elements at the N terminus of the protein. // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 7286-7291.
13. Krajewski W.A., Nakamura T., Mazo A., Canaani E. A motif within SET-domain proteins binds single-stranded nucleic acids and transcribed and supercoiled DNAs and can interfere with assembly of nucleosomes // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. P. 1891-1899.
14. Rosovskaya T., Tillib S., Smith S. et al. Trithorax and ASH1 interact directly and associate with the Trithorax-Group responsive bxd region of the Ultrabithorax promoter // *Mol. Cell. Biol.* 1999. V. 19. P. 6441-6447.
15. Sanchez-Elsner T., Gou D., Kremmer E., Sauer F. Non-coding RNAs of trithorax response elements recruit *Drosophila Ash1* to Ultrabithorax // *Science* 2006. V. 311. P. 1118-1123.
16. Ringrose L., Rehmsmeier M., Dura J.-M., Paro R. Genome-wide prediction of polycomb/trithorax response elements in *Drosophila melanogaster* // *Dev. Cell* 2003. V. 5. P. 759-771.