

САЛОЖИН СЕРГЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**РОЛЬ МЕТИЛ-ДНК-СВЯЗЫВАЮЩЕГО БЕЛКА КАИЗО
В КОНТРОЛЕ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ ПОЗВОНОЧНЫХ,
РЕГУЛИРУЕМЫХ МЕТИЛИРОВАНИЕМ ДНК**

03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Работа выполнена в лаборатории молекулярных основ медицины Института Биологии Гена РАН и в лаборатории генетической инженерии клеток млекопитающих Центра «Биоинженерия» РАН.

НАУЧНЫЙ РУКОВОДИТЕЛЬ:

кандидат биологических наук

Прохорчук Егор Борисович

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор

Карпов Вадим Львович

доктор химических наук, профессор

Громова Елизавета Сергеевна

ВЕДУЩАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ:

Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Защита состоится «01» июня 2006 года в 10⁰⁰ на заседании диссертационного совета Д 501.001.76 при Московском Государственном Университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские Горы, МГУ им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, ауд. 536.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «28» апреля 2006 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

Калинина

Н.О. Калинина

2006 А
9294

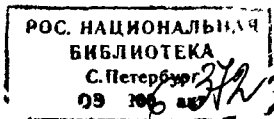
ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Регуляция экспрессии генов у высших эукариот – сложный процесс, включающий контроль синтеза РНК и белков на всех возможных уровнях: от связывания транскрипционных факторов и внутриядерной локализации кодирующей последовательности до посттрансляционных модификаций белков. Важную роль в этом процессе играют и механизмы, связанные с изменением/поддержанием структуры хроматина, в которых участвуют хроматин-ремоделирующие факторы: гистондеацетилазы, гистон-ацетилтрансферазы, метил-ДНК-трансферазы и др. Важную роль в большинстве процессов эпигенетической регуляции экспрессии генов, таких как Х-инаktivация, геномный импринтинг, репрессия транскрипции мобильных элементов, репрессия транскрипции генов-супрессоров опухолевого роста, играет метилирование ДНК. Оно связано с негативной регуляцией экспрессии генов и может оказывать непосредственное влияние на транскрипцию, блокируя взаимодействие активирующих белковых факторов с регуляторными последовательностями [Clark et al., 1997]. Однако существует и другой механизм – привлечение к метилированной ДНК так называемых метил-ДНК-связывающих белков.

Описанный недавно новый метил-ДНК-связывающий белок Каизо имеет два функциональных домена: ВТВ/POZ и «цинковые пальцы» [Prokhortchouk et al., 2001]. Последний обеспечивает специфическое взаимодействие с метилированной ДНК, тогда как ВТВ/POZ-домен может принимать участие в образовании комплексов с другими белками того же семейства. Исходно Каизо был охарактеризован как белок, взаимодействующий с катенином p120 [Daniel, Reynolds, 1999]. Таким образом, Каизо является фактором, способным как взаимодействовать с метилированной ДНК, так и участвовать в других внутриклеточных процессах, обеспечивая связь между событиями в цитоплазме и регуляцией экспрессии генов в ядре.

Кроме того, известно, что ВТВ/POZ-белки играют важную роль в процессах органогенеза, являются супрессорами опухолевого роста [Dewindt et al., 1995]. Следовательно, поиск генов, экспрессия которых зависит от Каизо, представляет интерес для общего понимания эпигенетической регуляции экспрессии генов, а также может оказаться полезным при изучении явлений Х-инаktivации, геномного импринтинга, канцерогенеза и т.д.



Цель работы: изучение возможной роли нового метил-ДНК-связывающего белка Каизо в процессах эпигенетической регуляции экспрессии генов.

Задачи исследования:

1. Охарактеризовать способность Каизо взаимодействовать *in vitro* и *in vivo* с регуляторными последовательностями ДНК, подвергающимися метилированию в живом организме:
 - 5'-LTR мобильных элементов (на примере мобильного элемента IAP – intracisternal A-particle);
 - промоторными областями генов-супрессоров опухолевого роста (на примере гена p16);
 - областями контроля локуса импринтных генов (на примере H19/Igf2-локуса).
2. Исследовать влияние нокаута метил-ДНК-связывающего белка Каизо на транскрипцию этих генов.
3. Исследовать влияние нокаута Каизо на изменение эпигенетических маркеров в исследуемых районах.

Научная новизна

В работе впервые был проведен поиск генов-мишеней нового метил-ДНК-связывающего белка Каизо, а также исследовано влияние делеции гена, кодирующего Каизо у мыши, на экспрессию генов-мишеней в живом организме. Кроме того, впервые было изучено влияние нокаута Каизо на структуру хроматина в районе H19 DMR и уровень метилирования ДНК в районе промотора гена Tctex1.

Теоретическое и практическое значение работы

В работе показано, что метил-ДНК-связывающий белок Каизо способен взаимодействовать с широким спектром последовательностей-мишеней как *in vitro*, так и *in vivo*. При этом было продемонстрировано, что отсутствие Каизо приводит к изменению гистоновому кода в районе H19 DMR, а также установлено, что Каизо подавляет транскрипцию гена Tctex1.

Полученные результаты представляют интерес как при изучении механизмов интерпретации сигналов метилирования ДНК, так и при общем рассмотрении процессов регуляции экспрессии генов. Кроме того, учитывая, что белок, кодируемый геном Tctex1, важен в процессах роста аксона и формирования дендритов у созревающих нейронов [Chuang et al., 2005], можно предположить,

что нарушение функций Каизо связано с какими-либо психическими расстройствами и нейродегенеративными заболеваниями. Продолжение работы в этом направлении может указать пути лечения подобных заболеваний.

Апробация материалов диссертации

Материалы диссертации были представлены на: III съезде биохимического общества (Санкт-Петербург, 2002), 7-й Пущинской школе-конференции молодых ученых (Пущино, 2003), International congress of medical sciences for students and young doctors (8-11 May 2003; Sofia, Bulgaria), Eighteenth IGB Meeting: Epigenetic Bases of Genome Reprogramming (Capri, Italy, 2005).

Структура диссертации

Диссертационная работа представлена на 118 страницах машинописного текста и состоит из следующих частей: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список литературы, включающий 203 источника. Материал проиллюстрирован 20 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Каизо *in vitro* взаимодействует с фрагментами, соответствующими 5'-LTR IAP-элемента и промоторной области гена p16.

Для определения потенциальной способности Каизо участвовать в основных процессах, связанных с метилированием ДНК, был применен метод EMSA (ElectroMobility Shift Assay, задержки ДНК-белкового комплекса в геле) с ПЦР-амплифицированным фрагментом ДНК, соответствующим участку 5'-LTR ретротранспозонного элемента IAP и ПЦР-амплифицированным фрагментом ДНК, соответствующим ЦфГ-богатому участку промоторной области гена p16.

При использовании ядерных экстрактов из линии клеток КСМЛ-0 было детектировано метилзависимое связывание с обоими фрагментами ДНК (рис. 1). Наличие Каизо в ДНК-белковом комплексе подтверждали, внося в реакционную смесь специфические (ZFН6) или нерелевантные (анти-IкВ) антитела. Добавление поликлональных антител к Каизо приводило к уменьшению подвижности комплекса в геле, тогда как наличие антител к IкВ никак не отражалось на массе комплекса.

Для подтверждения метилспецифичности образующегося комплекса в реакционную смесь был добавлен неметилированный или метилированный специфический конкурент в 10 и 50-кратном избытке. Присутствие

неметилированного конкурента не влияло на образование комплекса, тогда как при избытке метилированного конкурента сигнал исчезал.

Также была исследована возможность взаимодействия рекомбинантно-экспрессированного Каизо с двуцепочечным олигонуклеотидом «матрилизин», содержащим консенсусную последовательность CTGCNA. Показано, что данное взаимодействие наблюдается только при высоких концентрациях белка (7-10 мкг/реакцию).

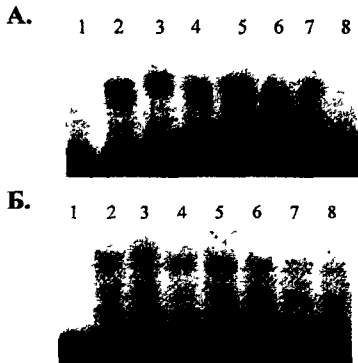


Рис. 1. Взаимодействие Каизо с различными ДНК-мишенями *in vitro* (EMSA-эксперименты):

А. с промоторным участком ретротранспозонного элемента IAP;

Б. с ЦфГ-богатым участком гена p16.

1 – неметилированная проба;

2 – метилированная проба;

3 – метилированная проба + поликлональные антитела к Каизо;

4 – метилированная проба + антитела к IκB;

5,6 – метилированная проба + неметилированный конкурент в 10 и 50-кратном избытке, соответственно;

7,8 – метилированная проба + метилированный конкурент в 10 и 50-кратном избытке, соответственно.

Таким образом, была продемонстрирована возможность метил-специфического *in vitro* взаимодействия Каизо-содержащего комплекса как с регуляторными областями мобильных элементов, так и с последовательностями, подвергающимися абнормальному метилированию при канцерогенезе.

Каизо *in vivo* взаимодействует с регуляторными областями «молчащих» генов IAP и p16.

Взаимодействие Каизо с исследуемыми последовательностями ДНК в живой клетке было подтверждено методом иммунопреципитации хроматина. Для изучения взаимодействия Каизо с 5'-LTR мобильного элемента IAP использовали хроматин, полученный из свежевыделенных тканей печени мышей дикого типа. Хроматин, выделенный из тканей мышей, нокаутных по Каизо, был использован в качестве отрицательного контроля. Продemonстрировано *in vivo* связывание Каизо с 5'-LTR мобильного элемента IAP (рис. 2А.). Взаимодействие с промотором гена «матрилизин» не было детектировано.

Уровень метилирования промотора гена *p16* в клетках линии HCT116 составляет около 45% [Meehan et al., 1991]. При использовании хроматина, выделенного из клеток этой линии, показано, что Каизо метилспецифически взаимодействует с промотором *p16* (рис. 2Б): при обработке полученного в результате ChIP'a (Chromatin ImmunoPrecipitation, иммунопреципитация хроматина) пула ДНК неметилчувствительной рестриктазой *MspI* невозможно было получить специфический для исследуемой области ПЦР-продукт, тогда как обработка метилчувствительной рестриктазой *HpaII* не препятствовала амплификации.

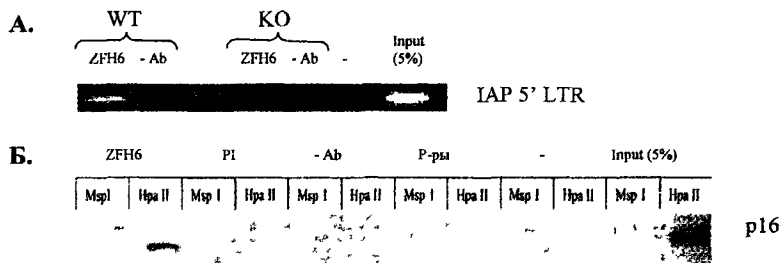


Рис. 2. Каизо *in vivo* взаимодействует с регуляторными областями генов IAP и *p16* (иммунопреципитация хроматина):

А. Каизо взаимодействует с 5'-LTR IAP-элемента.

Б. Каизо метилспецифически взаимодействует с промотором гена *p16*.

ZFH6 – иммунопреципитация с поликлональными антителами к Каизо; PI – сыворотка крови кролика; «-Ab» – контроль без антител; «-Input» – отрицательный и положительный контроли для ПЦР, соответственно.

Каизо дифференциально взаимодействует с разными участками H19 DMR как *in vitro*, так и *in vivo*.

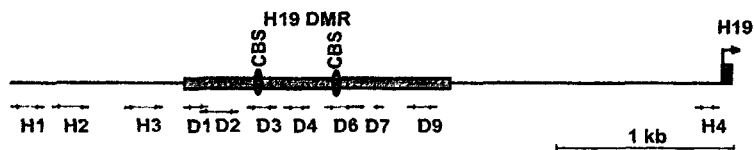
Импринтные гены могут быть использованы как уникальная система для изучения эпигенетических процессов: отцовский и материнский аллели генов отличаются как уровнем метилирования ДНК, так и модификациями гистонов. В случае H19/Igf2-локуса материнский (неметилированный) аллель DMR является внутренним контролем при исследовании метилирования ДНК.

Для изучения возможности Каизо взаимодействовать с H19 DMR была проведена серия EMSA-экспериментов. В качестве ДНК-зонда использовали метилированные и неметилированные ПЦР-продукты длиной от 100 до 200 п.о., перекрывающие весь дифференциально метилированный участок (рис. 3А). эксперименты проводили с рекомбинантно-экспрессированным полноразмерным Каизо (в количестве 1, 3 и 5 нг), а также ядерными экстрактами, полученными из

нормальных фибробластов мыши (в количестве 1, 3 и 5 мкг). Для подтверждения специфичности связывания реакционная смесь, содержащая метилированный зонд, была дополнительно проинкубирована с поликлональными анти-Каизо антителами ZFH6. Наличие т.н. «супершифта» свидетельствовало о присутствии Каизо в метил-ДНК-связывающем комплексе.

Показано, что Каизо метилспецифически взаимодействует с рядом зондов. Так, рекомбинантно-экспрессированный белок образовывал комплекс со следующими ПЦР-продуктами: H1, H3, D2, D3, D4, D6, D9 и H4, тогда как в случае ядерных экстрактов метилспецифическое взаимодействие было получено только для районов H3, D3, D4, D6 и D9 (рис. 3Б.).

А.



Б.

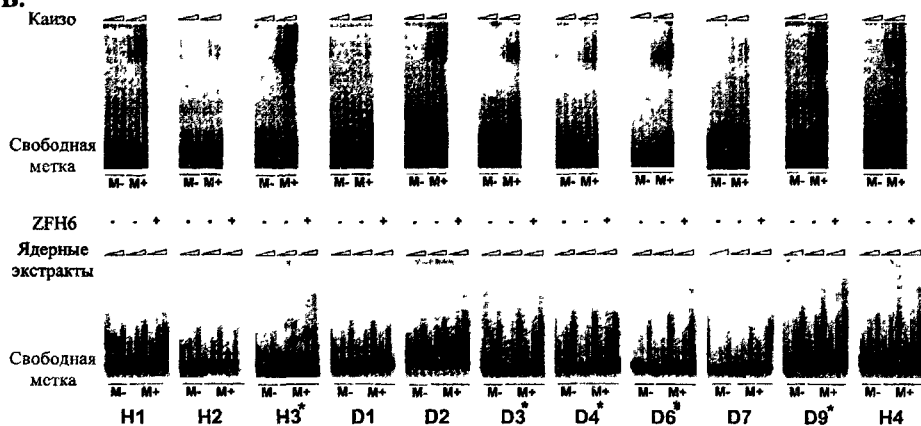


Рис. 3. Взаимодействие Каизо с H19 DMR *in vitro*:

А. Схема H19/Igf2-локуса.

Черный прямоугольник — экзон, стрелки — точка старта транскрипции гена H19. CBS — сайты связывания белка CTCF. Кроме того, обозначены пары праймеров, использованные для синтеза зондов для EMSA-экспериментов.

Б. Взаимодействие рекомбинантно-экспрессированного Каизо (верхняя панель) и Каизо-зависимого метил-ДНК-связывающего комплекса (нижняя панель) с фрагментами H19 DMR.

«M-/M+» — неметилированный/метилированный зонд. ZFH6 — кроличьи поликлональные антитела к Каизо.

Разница во взаимодействии с зондами Каизо-содержащего комплекса и рекомбинантного белка может быть объяснена наличием посттрансляционных модификаций или разницей в ко-трансляционном сворачивании (фолдинге) исследуемого белка, что может отражаться на способности Каизо взаимодействовать с метилированными последовательностями.

С помощью программы OptiQuant была проведена количественная оценка взаимодействия Каизо с проанализированными фрагментами ДНК (рис. 4; сплошная и пунктирная линии). Для более точного картирования участков связывания Каизо был применен метод ПЦР в реальном времени, где в качестве матрицы использовали ДНК, полученную в результате иммунопреципитации хроматина с антителами к Каизо (рис. 4; вертикальные столбцы). Праймеры для ПЦР в реальном времени подбирали к участкам, показавшим наибольшее сродство к Каизо в экспериментах по торможению ДНК-белкового комплекса в геле. Обсчет результатов проводили отдельно для каждого эксперимента; общий «профиль» связывания Каизо был построен на основании четырех независимых экспериментов. Наиболее сильный сигнал (в 5,5 раз выше по отношению к Input) получен для фрагмента D3 участка H19 DMR.

Разница во взаимодействии Каизо с фрагментами H19 DMR *in vitro* и *in vivo* может быть объяснена тем, что в живой клетке часть сайтов связывания исследуемого белка недоступна для узнавания

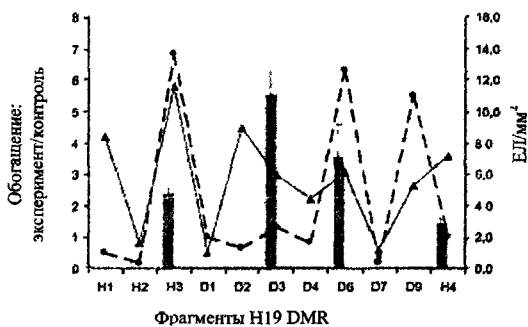


Рис. 4. Количественный анализ взаимодействия Каизо с районом H19 DMR.

Сплошная линия – «профиль» взаимодействия Каизо, полученный при анализе экспериментов с рекомбинантно-экспрессированным белком, прерывистая – при анализе экспериментов с ядерными экстрактами. Вертикальные столбцы – «профиль» взаимодействия Каизо, полученный в экспериментах по иммунопреципитации хроматина с последующей ПЦР в реальном времени. ЕЛ/мм² – удельная интенсивность радиоактивности геля в районе ДНК-белкового комплекса.

Каизо аллель-специфично взаимодействует с районом H19 DMR.

Для изучения метилспецифичности связывания Каизо с районом H19 DMR был картирован рестрикционный полиморфизм в участке D3 между подвидами *Mus musculus domesticus* и видом *Mus spretus* (рис. 5А.). В экспериментах по иммунопреципитации хроматина использовали хроматин, полученный из печени гибридной мыши *Mus musculus domesticus*/SD7, причем из скрещиваемых особей самец принадлежал линии C57Black (*Mus. musculus domesticus*), а самка -- линии SD7 (у таких животных обе 7 хромосомы частично заменены на хромосомы вида *Mus. spretus*).

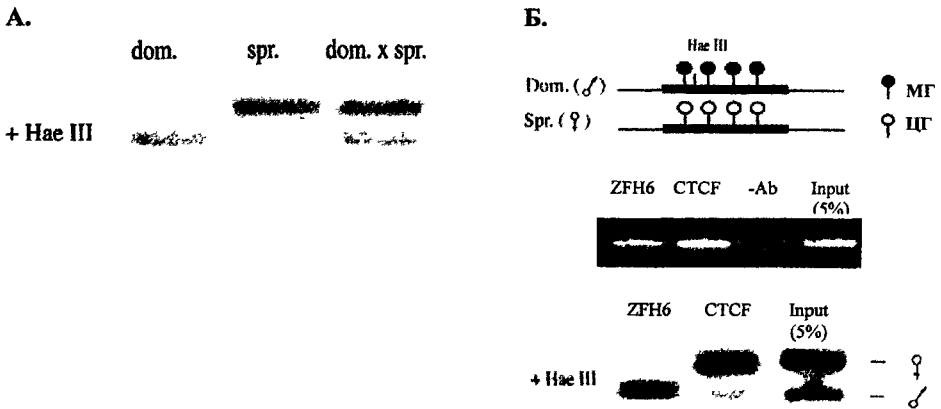


Рис. 5. Взаимодействие Каизо с метилированным аллелем H19 DMR:

А. Картирование рестрикционного полиморфизма в D3-районе H19 DMR (ПЦР с последующей рестрикцией продукта HaeIII-эндонуклеазой).

В качестве матрицы использована ДНК следующих видов мышей: *Mus musculus domesticus* (dom.), *Mus spretus* (spr.), *M.m domesticus* x *M.spretus* (dom. x spr.).

Б. Иммунопреципитация хроматина с последующей ПЦР и рестрикцией продукта HaeIII.

Иммунопреципитация с антителами: ZFH6 – поликлональными к Каизо, CTCF – к CTCF.

«-Ab» – контроль без антител; «Input» – положительный контроль для ПЦР. ЦфГ-динуклеотид, содержащий цитозин: МГ – в метилированной форме; ЦГ – в неметилированной форме.

После иммунопреципитации с антителами к Каизо или CTCF (положительный контроль) полученная фракция ДНК была проанализирована методом ПЦР с парой праймеров DMD56/1 – DMD78/1 к участку D3. Полученный ПЦР-продукт расщепляли эндонуклеазой HaeIII и далее гибридизовали с пробой, соответствующей полноразмерному ПЦР-продукту. При использовании антител к Каизо был получен ПЦР-продукт только с ДНК *Mus. musculus domesticus*, тогда

как при использовании антител к CTCF (положительный контроль) можно было детектировать только сигнал, соответствующий ДНК *Mus. spretus* (рис. 5Б.). Таким образом, Каизо взаимодействует только с отцовским метилированным аллелем H19 DMR.

Делеция Каизо приводит к изменению структуры хроматина в районе H19 DMR.

Для изучения функциональной роли Каизо в районе H19 DMR был применен метод иммунопреципитации хроматина с антителами к различным модифицированным гистонам. Были использованы следующие антитела: к ацетилованному гистону H3, к ацетилованному в положении K9 гистону H3, к триметилованному в положении K9 гистону H3, к диметилованному в положении K27 гистону H3. В качестве контроля использовались антитела к инсультаторному белку CTCF.

Хроматин получали из тканей животных дикого типа, а также нокаутных по Каизо, рожденных после скрещивания самца линии SD7 и самки линии C57Black. Полученные в результате иммунопреципитации с различными антителами фрагменты ДНК были проанализированы также, как в случае использования антител к Каизо и CTCF. При использовании антител к метилированному по остатку K9 либо K27 гистону H3 разницы в распределении модификаций хроматина между отцовским и материнским аллелями для нокаутных животных и животных дикого типа выявлено не было. Однако, показано, что убиквитинирование гистона H2A характерно только для отцовского метилированного аллеля H19 DMR, и делеция Каизо приводит к полному исчезновению данной модификации гистона в исследуемом районе (рис. 6А.,Б.). Кроме того, при использовании антител к ацетилованному гистону H3 или к гистону H3, ацетилованному только в положении K9, детектировано появление слабого сигнала на отцовском аллеле H19 DMR (рис. 6Б.). В то же время, как в животных дикого типа, так и в животных с делетированным геном, кодирующим Каизо, было показано взаимодействие белка CTCF только с материнским аллелем H19 DMR.

Таким образом, Каизо способен привлекать убиквитинирование гистона H2A к метилированным последовательностям ДНК. Роль данной модификации хроматина во внутриклеточных процессах еще не установлена. Возможно, именно отсутствие убиквитинирования H2A на отцовском аллеле H19 DMR связано с накоплением ацетилирования гистона H3.

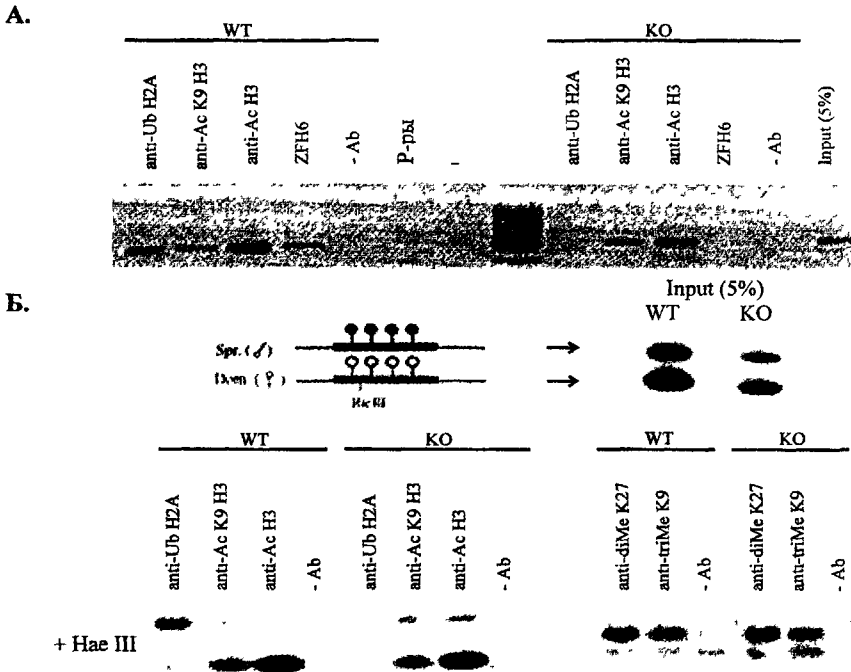


Рис. 6. Делеция Каизо приводит к исчезновению убиквитинирования на отцовском аллеле H19 DMR.

А. ПЦР-анализ преципитированной ДНК с парой праймеров к D3-участку.

Имунопреципитация хроматина с антителами: anti-Ub H2A – к убиквитинированному гистону H2A, anti-Ac K9 H3 – к гистону H3, ацетилованному в 9 положении, anti-Ac H3 – к ацетилованному гистону H3, ZFH6 – поликлональными к Каизо. «- Ab» – контроль без антител; «Р-ры» – контроль без антител и хроматина; «-Input» – отрицательный и положительный контроли для ПЦР, соответственно.

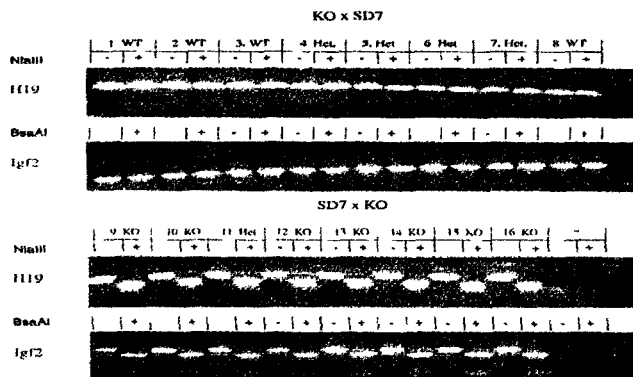
Б. Рестрикционный анализ полученного ПЦР-продукта.

Имунопреципитация хроматина с антителами: anti-diMe K27 – к гистону H3, диметилированному в положении K27; anti-triMe K9 – к гистону H3, триметилированному в 9 положении. Dom. – *Mus. musculus domesticus*; Spr. – *Mus. spretus*.

Делеция Каизо не влияет на экспрессию генов H19 и Igf2.

Полученные при анализе распределения модификаций хроматина данные позволяют предположить, что Каизо может играть важную роль в регуляции экспрессии генов H19 и Igf2. Поскольку эпигенетические маркеры импринтных генов образуются во время гаметогенеза, можно было ожидать, что отсутствие Каизо во время спермато- или оогенеза приведет к нарушению импринтинга в исследуемом локусе.

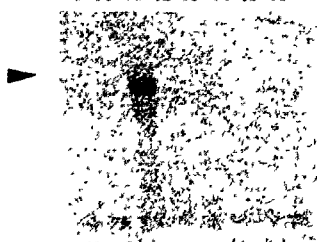
А.



Б.

Номер животного

9 10 11 12 13 14 15 16



В.

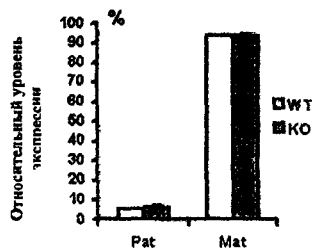


Рис. 7. Делеция Каизо не влияет на уровень экспрессии H19 и Igf2.

А. Обратная транскрипция с последующим расщеплением рестриктазами NlaIII и BsaAI.

В качестве матрицы для ОТ-ПЦР взята тотальная РНК из тканей мышей, полученных от скрещиваний Каизо-нокаутного самца и самки линии SD7, а также реципроктного скрещивания.

Б. Нозерн-блот анализ тотальной РНК из тканей животных, полученных от скрещивания самца линии SD7 и Каизо-нокаутной самки.

Стрелка указывает положение Каизо-специфического транскрипта.

В. Аллель-специфичная ПЦР в реальном времени.

В качестве матрицы для ОТ-ПЦР взята тотальная РНК из печени мышей, полученных от скрещиваний Каизо-нокаутной самки и самца линии SD7. Аллели H19: Pat. – отцовский, Mat. – материнский

Для проверки данного предположения было проанализировано потомство от скрещивания Каизо-нокаутного самца с самкой дикого типа, а также реципроктного скрещивания: самца дикого типа с Каизо-нокаутной самкой. В обоих экспериментах животные дикого типа принадлежали к линии SD7. Потомство от данных скрещиваний имело рестрикционный полиморфизм между

отцовским и материнским аллелями как в кодирующей последовательности гена H19 (полиморфизм по рестрикционному сайту для NlaIII), так и в кодирующей последовательности гена Igf2 (полиморфизм по рестрикционному сайту для BsaAI). При анализе РНК, выделенной из печени таких животных, было установлено, что отсутствие Каизо во время гаметогенеза не влияет на формирование эпигенетических маркеров импринтинга (рис. 7А.,Б.).

Для более точного изучения экспрессии гена H19 применили методику аллель-специфичной ПЦР в реальном времени. Результаты анализа свидетельствуют о том, что делеция Каизо не приводит к реактивации экспрессии гена H19 с отцовского аллеля (рис. 7В.).

Экспрессия IAP-элемента не зависит от взаимодействия Каизо с его 5'-LTR последовательностью.

Поскольку отсутствие поддерживающей ДНК-метилтрансферазы DNMT1 приводит к существенному увеличению уровня экспрессии IAP-элемента [Walsh et al., 1998], делеция метил-ДНК-зависимого репрессора, взаимодействующего с регуляторной последовательностью данного мобильного элемента, также могло оказать влияние на его транскрипцию.

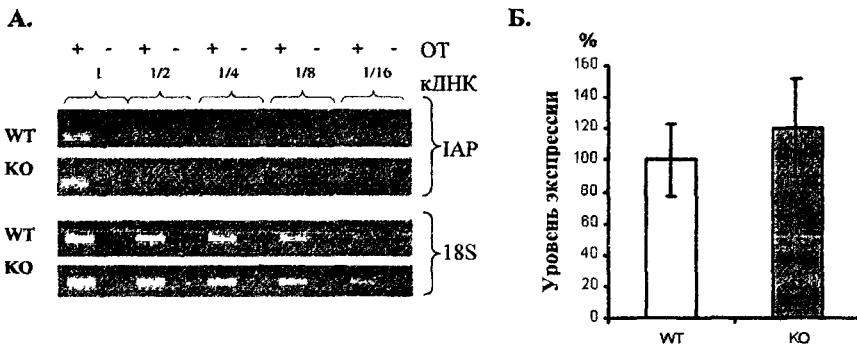


Рис. 8. Уровень экспрессии IAP-элемента в тканях животных дикого типа (WT) и нокаутных по Каизо (KO):

А. Обратная транскрипция.

«ОТ +/-» – наличие/отсутствие обратной транскриптазы в реакции.

Б. Относительная экспрессия IAP-элемента в тканях животных дикого типа и нокаутных по Каизо (ПЦР в реальном времени).

Для изучения уровня экспрессии IAP-элемента были применены методы обратной транскрипции с последующим использованием полученной кДНК в качестве матрицы для ПЦР или, в случае количественной оценки, ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР/ОТ-ПЦР в реальном времени). Уровень экспрессии оценивали относительно экспрессии гена 18S рРНК. Разницы в количестве IAP транскрипта у животных дикого типа и нокаутных животных обнаружено не было (рис. 8). Кроме того, не было детектировано разницы в уровне экспрессии гена *Wnt11*.

Недавно было охарактеризовано семейство Каизо-подобных белков (KL-белки – от Kaiso-like proteins) [Filion et al., 2006]. Отсутствие изменения в экспрессии генов *H19* и IAP при нокауте Каизо, можно объяснить тем, что нокаут Каизо частично компенсируется другими членами KL-семейства.

Делеция Каизо приводит к усилению экспрессии гена *Tctex1*.

Методом гибридизации на микрочипах был проведен глобальный анализ изменения уровня экспрессии 30 тыс. генов в Каизо-нокаутных мышах. Идентифицирован ряд генов, транскрипция которых оказалась изменена при отсутствии Каизо. Одним из генов с наиболее увеличенным уровнем экспрессии оказался ген *Tctex1*, кодирующий легкую цепь динеинового комплекса. Данные гибридизации были подтверждены Нозерн-блот анализом. Уровень экспрессии *Tctex1* оказался в 4,4 раза выше в печени нокаутных животных, чем у животных дикого типа, и в 2,6 раза выше в мозге животных с делецией гена, кодирующего Каизо, чем в мозге животных дикого типа (рис. 9).

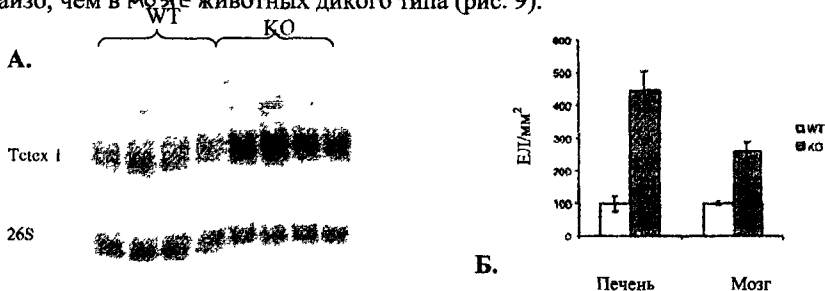


Рис. 9. Увеличение уровня экспрессии гена *Tctex1* в тканях мышей, нокаутных по Каизо.

А. Нозерн-блот анализ. Тотальная РНК из печени животных дикого типа (WT) и Каизо-нокаутных (KO). Верхняя панель – гибридизация с зондом к мРНК гена *Tctex1*; нижняя панель – контрольная гибридизация с пробой к 18S рРНК.

Б. Количественный подсчет результатов Нозерн-блот гибридизации тотальной РНК из тканей животных дикого типа и нокаутных по Каизо. ЕЛ/мм² – удельная интенсивность радиоактивности геля в районе специфического транскрипта.

Каизо взаимодействует с геном Tctex1 только на 17, но не на 6 хромосоме.

В геноме мыши содержится два гена Tctex1: на 17 и 6 хромосомах [база данных Entrez Map Viewer]. При этом ген, находящийся на 17 хромосоме, имеет сложную интрон/экзонную структуру и включает 5 экзонов, тогда как кодирующая часть гена, расположенного на 6 хромосоме, состоит из одного экзона. С помощью ChIP было показано, что Каизо взаимодействует только с ЦфГ-островком гена Tctex1, расположенного на 17 хромосоме (рис. 10). Интересно отметить, что ацетилирование гисгонов H3 и H4, являющееся маркерами активного хроматина, можно было детектировать в той же области одновременно со связыванием Каизо. При этом ни взаимодействия Каизо, ни ацетилирования гистонов в районе промотора гена, расположенным на 6 хромосоме, детектировано не было.

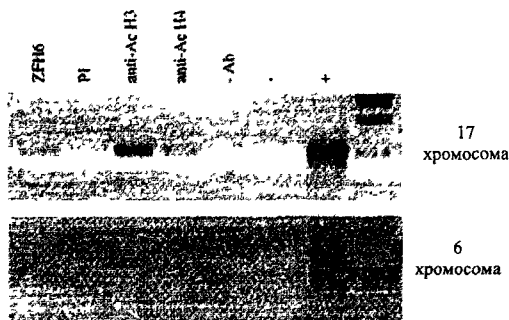


Рис 10. Каизо взаимодействует с геном Tctex1 на 17, но не на 6 хромосоме (Иммунопреципитация хроматина).

Иммунопреципитация с антителами: ZFN6 – поликлональными к Каизо; anti-Ac H3 – к ацетилированному гистону H3; anti-Ac H4 – к ацетилированному гистону H4; PI – сыворотка крови кролика; «-Ab» – контроль без антител; «-/» – отрицательный и положительный контроль для ПЦР, соответственно.

При компьютерном анализе последовательностей данных генов был идентифицирован рестрикционный полиморфизм в последовательностях мРНК. Замена цитозина на тимин привела к исчезновению сайта узнавания рестриктазой MspI в мРНК гена, расположенного на 17 хромосоме.

Методом ОТ-ПЦР с последующим рестрикционным анализом была проанализирована тотальная РНК, полученная из печени мышей дикого типа, а также нокаутных по Каизо. Поскольку ген Tctex1 имеет только один экзон, препарат геномной ДНК мыши был использован в качестве контроля для теста: ПЦР-продукт, полученный с использованием той же пары праймеров, что и для ОТ-ПЦР, был полностью расщеплен рестриктазой MspI. Показано, что в препаратах тотальной РНК, полученной как из органов животных дикого типа, так и из органов мышей с делецией гена, кодирующего Каизо, содержится только

транскрипт, соответствующий гену *Tctex1*, расположенному на 17 хромосоме (рис. 11).

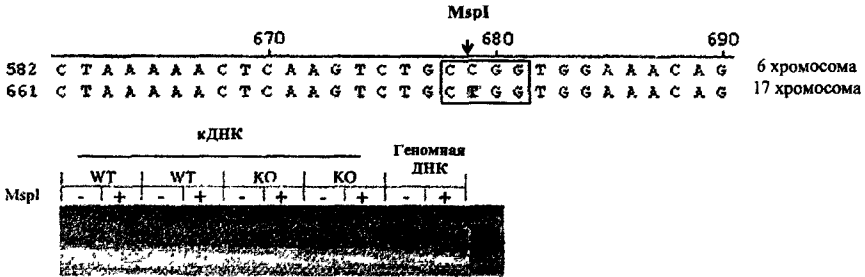


Рис. 11. В тканях животных как дикого типа, так и с делецией Каизо экспрессируется только ген, расположенный на 17 хромосоме.

Верхняя панель – полиморфизм в последовательностях мРНК двух генов. Заштрихованный нуклеотид – полиморфизм, нарушающий сайт узнавания рестриктазой *MspI*. Нижняя панель – обратная транскрипция с последующей ПЦР и расщеплением ПЦР-продукта ферментом *MspI*

Делеция Каизо не приводит к изменению метилирования «ЦфГ-островка» гена *Tctex1*.

Поскольку Каизо взаимодействует с метилированной ДНК, был проанализирован уровень метилирования в районе «ЦфГ-островка» гена *Tctex1* методом бисульфитного секвенирования. Для исследования использована ДНК, полученная из печени мышей дикого типа и с делецией гена, кодирующего Каизо. Было проанализировано две области: «-189; -57» и «+160; +460» по отношению к точке старта транскрипции.

В области «-189; -57» метилирование ДНК детектировано не было (проанализировано по 10 клонов для ДНК животных дикого типа и Каизо-нокаутных). Показано, что область «+160; +460» характеризуется малым процентным содержанием метилированных ЦфГ-динуклеотидов (проанализировано 20 клонов для ДНК животных дикого типа и 21 – для Каизо-нокаутных), причем уровень метилирования ДНК не зависит от присутствия Каизо (рис. 12).

Поскольку ген *Tctex1* экспрессируется и в нормальном организме, можно предположить, что Каизо является модулятором активности *Tctex1*, взаимодействуя с остаточным метилированием ДНК в промоторной области.

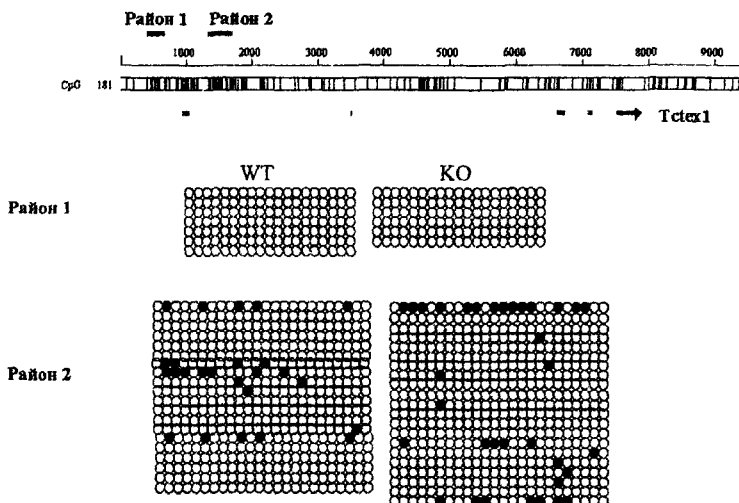


Рис. 12. Делеция Каизо не приводит к изменению метилирования ДНК в районе CpG-островка гена *Tctex1* (Бисульфитное секвенирование).

Верхняя панель – плотность метилирования ЦфГ-динуклеотидов на 17 хромосоме в районе гена *Tctex1*. Серые прямоугольники – экзоны; стрелка – направление транскрипции. Районы 1 и 2 – участки, для которых был исследован статус метилирования.

Таким образом, в результате проведенных исследований продемонстрирована возможность взаимодействия Каизо-содержащего белкового комплекса с последовательностями ДНК, подвергающимися метилированию в результате таких процессов как геномный импринтинг, опухолеобразование и подавление транскрипции мобильных элементов. То, что нокаут Каизо не приводил к изменениям в экспрессии большинства исследованных генов, может быть объяснено наличием т.н. Каизо-подобных белков. Тем не менее, зависимость экспрессии гена *Tctex1* от присутствия исследуемого фактора позволяет предположить, что наличие Каизо является важным при таких сложных процессах как, например, созревание нервной системы.

ВЫВОДЫ

1. Новый метил-ДНК-связывающий белок Каизо обладает способностью метилспецифически взаимодействовать с широким спектром последовательностей-мишеней как *in vitro*, так и *in vivo*. Каизо метилспецифически взаимодействует с регуляторными областями генов *Xist*, *p16*

и мобильного элемента IAP, однако связывания с промоторной областью гена «матрилизин» детектировано не было.

2. Делеция Каизо не влияет ни на уровень экспрессии, ни на количество копий мобильного элемента IAP в геноме нокаутных животных. Кроме того, делеция гена, кодирующего Каизо, не приводит к повышению уровня экспрессии гена *Wnt11*.

3. Белок Каизо *in vivo* взаимодействует с H19 DMR, причем только с метилированным отцовским аллелем. Делеция Каизо не приводит к полной или частичной реактивации молчащих аллелей генов H19 и *Igf2*. Таким образом, присутствие Каизо в районе H19 DMR не является критическим для установления и поддержания импринтинга в данном локусе.

4. Структура хроматина в районе H19 DMR характеризуется метилированием гистона H3 в положениях K27 и K9, а также убиквитинированием гистона H2A в положении 119 на отцовском аллеле. При этом материнский аллель характеризуется ацетилированием гистона H3. Делеция Каизо приводит к исчезновению убиквитинирования гистона H2A в положении 119 на отцовском аллеле H19 DMR.

5. Каизо взаимодействует с промоторной областью гена *Tctex1*, кодирующего легкую субъединицу динеинового комплекса. Делеция Каизо приводит к существенному увеличению экспрессии данного гена, однако не влияет на уровень метилирования ДНК.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Саложин С.В., Прохорчук Е.Б., Георгиев Г.П. Метилирование ДНК как один из основных эпигенетических маркеров// Биохимия, 2005.–Т.70(5).–С.525-532
2. Prokhortchouk A., Sansom O., Selfridge J., Caballero I.M., Salozhin S., Aithozhina D., Cerchietti L., Meng F.G., Augenlicht L.H., Mariadason J.M., Hendrich B., Melnick A., Prokhortchouk E., Clarke A., Bird A. Kaiso-deficient mice show resistance to intestinal cancer//Mol. Cell Biol., 2006.–Vol.26(1).–P.199-208
3. Filion G., Zhenilo S., Salozhin S., Yamada D., Prokhortchouk E., Defossez P-A. A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription//Mol. Cell Biol., 2006.–Vol.26(1).–P.169-181
4. Саложин С.В., Прохорчук Е.Б. Взаимодействие метил-ДНК-связывающих белков с локусом контроля импринтинга генов H19/Igf2. В сб.: III съезд

биохимического общества (Санкт-Петербург; 26 июня–1 июля 2002 г.) Тезисы докладов//СПб, 2002.–С.417

5. **Саложин С.В.**, Прохорчук Е.Б. Новый метил-ДНК-связывающий белок Kaiso взаимодействует с районом H19/Igf2 и молчащими генами на X-хромосоме. В сб.: 7-ая Пущинская школа-конференция молодых ученых: Биология – наука XXI века (Пущино; 14–18 апреля 2003 г.). Сборник тезисов// Пущино, 2003.– С.373-374

6. **Salozhin S.**, Prokhortchouk E. New methyl-DNA-binding protein Kaiso interacts with imprinted H19/Igf2 region and Xist gene in *Mus. musculus domesticus*. In: International congress of medical sciences for students and young doctors (Bulgaria; Sophia; 8–11 May 2003). Abstract book// Sophia, 2003.–P.23

7. Zhenilo S., Filion G., **Salozhin S.**, Defossez P.-A., Prokhortchouk E. A family of Kaiso-like proteins that bind methylated DNA and repress transcription. In: 18th IGB Meeting: Epigenetic bases of genome reprogramming (Italy; Capri; 8 11 October 2005). Abstract book // Capri, 2005.–P.70



Отпечатано в типографии ООО «Гипрософт»
г. Москва, Ленинский пр-т, д.37А
Тираж 100 экз.

2006A
9294

92 - 9294