

На правах рукописи

УДК 576 315 42

БОРУНОВА ВИКТОРИЯ ВЛАДИМИРОВНА

**ХАРАКТЕРИСТИКА МОЛЕКУЛЯРНЫХ МЕХАНИЗМОВ,
РЕГУЛИРУЮЩИХ ЭКСПРЕССИЮ АЛЬФА-ГЛОБИНОВЫХ ГЕНОВ КУР**

Специальность 03 00 03 - молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва

2005

Работа выполнена в рамках программы Российско-Французского научного сотрудничества (Cotutelle de thèse) в лаборатории структурно-функциональной организации хромосом Института биологии гена РАН и в лаборатории хроматина, развития и канцерогенеза Института им Гюстава Русси, Вильжуиф, Франция

Научные руководители

чл -корр РАН, доктор биологических наук, профессор Разин С В

доктор биологических наук Васецкий Е С

Официальные оппоненты

чл -корр РАН, доктор биологических наук, профессор Рысков А П

доктор биологических наук, профессор Карпов В Л

Ведущая организация

Институт биоорганической химии им М М Шемякина и Ю А Овчинникова РАН

Защита диссертации состоится 15 декабря 2005 года в 11 час на заседании
Диссертационного совета Д 002 037 01 при Институте биологии гена РАН по адресу
119334, Москва, ул Вавилова, д 34/5

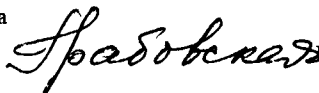
С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Института молекулярной биологии
им В А Энгельгардта РАН по адресу 119991, Москва, ул Вавилова, д 32

Автореферат разослан 14 ноября 2005 года

Ученый секретарь

Диссертационного совета

канд фарм наук

 Grabovskaya Л С

2006-4
25927

2243418

Общая характеристика работы.

Актуальность проблемы

В настоящее время практически не подлежит сомнению тот факт, что геном эукариот организован в отдельные хроматиновые домены. На сегодняшний день известно, по крайней мере, два типа доменов: структурные и функциональные. Типичными доменами, определенными по структурному признаку, являются домены тканеспецифичных генов, характеризующиеся повышенным уровнем чувствительности к нуклеазам и повышенным уровнем ацетилирования гистонов в тех тканях, где домен активен. На границах этих доменов часто расположены инсуляторы, которые ограничивают область действия позитивных регуляторных элементов и препятствуют распространению репрессивных структур хроматина. Типичными примерами таких «классических» хроматиновых доменов, содержащих тканеспецифичные гены, являются домены β -глобиновых генов позвоночных и домен овальбуминовых генов кур. Можно было бы предположить, что весь геном состоит из единообразно организованных доменов, однако изучение различных геномов показало, что наряду с «классическими» доменами существует и множество «неканонических» доменов, в том числе доменов с перекрывающимися генами и регуляторными системами. Именно к такому типу доменов относятся домены α -глобиновых генов позвоночных. Они расположены в богатых генами хромосомных областях и являются предпочтительно чувствительными к нуклеазам во всех типах клеток. Такие домены было предложено называть доменами «открытого типа» или доменами с «размытыми границами».

Одним из наиболее изученных доменов открытого типа является домен α -глобиновых генов кур. Этот домен перекрывается с геном «домашнего хозяйства» ggPRX и является одним из первых доменов, где были обнаружены некодирующие межгенные транскрипты. В настоящей работе продемонстрировано, что в домене α -глобиновых генов кур межгенные транскрипты представляют собой полнодоменный транскрипт. Функциональное значение такого рода транскриптов оставалось неясным. Согласно одной из гипотез, они играют важную роль в поддержании активного статуса хроматинового домена. Настоящая работа посвящена изучению полнодоменного транскрипта домена α -глобиновых генов кур, а именно картированию его границ и изучению феномена симметричной транскрипции 5'-концевой области домена.

Следует подчеркнуть, что домены открытого типа, содержащие одновременно тканеспецифичные гены и гены домашнего хозяйства, привлекли внимание исследователей сравнительно недавно. Принципы взаимодействия регуляторных механизмов, контролирующих работу разных генов в доменах этого типа, изучены недостаточно. В то же



время домены открытого типа составляют значительную часть генома. Раскрытие общих принципов организации этих доменов существенно расширит наши знания о механизмах контроля экспрессии генов в эукариотической клетке. Именно это определяет актуальность темы диссертационной работы.

Цели и задачи исследования.

В работе были поставлены следующие задачи:

- 1) Картировать границы транскрибирующейся области домена α -глобиновых генов кур в эритроидных и незритроидных клетках
- 2) Определить, является ли протяженный «межгенный» транскрипт домена α -глобиновых генов кур непрерывным, т.е. действительно ли он представляет собой транскрипт всего домена, включая его 5'-концевую область
- 3) Выяснить, происходит ли транскрипция α -глобинового домена в направлении глобиновых генов и в противоположном направлении в одних и тех же клетках и, соответственно, присутствуют ли в ядрах таких клеток комплементарные транскрипты

Научная новизна и практическое значение работы.

В работе впервые продемонстрировано существование полнодоменного транскрипта домена α -глобиновых генов кур, начинающегося от регуляторной области домена, обладающей определенными чертами области контроля локуса. Показано, что данный транскрипт присутствует только в эритроидных клетках. Полученные результаты являются косвенным подтверждением гипотезы Траверса, постулирующей, что постоянная транскрипция протяженных областей генома необходима для поддержания их активного статуса. Полученные результаты составляют экспериментальный базис для дальнейшего развития и экспериментального подтверждения данной гипотезы. В работе впервые продемонстрировано, что протяженная область генома может транскрибироваться в противоположных направлениях в одних и тех же клетках. Эти результаты показывают, что в клетке существуют определенные механизмы, ограничивающие действие систем разрушения двунитевых РНК. Осознание этого факта имеет большое практическое значение в силу того, что ингибирование экспрессии генов комплементарными РНК является в настоящее время одним из основных экспериментальных подходов, используемых в качестве альтернативы более трудоемкой процедуры «нокаута» генов.

Апробация работы.

Результаты диссертационной работы были представлены на международной конференции, посвященной десятилетию Московского центра медицинских исследований университета Осло «Advances in Molecular Cell Biology» (Москва, 2004) и на международной конференции «18th IGB Meeting Epigenetic Bases of Genome Reprogramming» (Капри, Италия, 2005)

Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 6 печатных работ. Из них статей 4, материалов конференций 2.

Структура и объем работы.

Диссертация изложена на 83 страницах, содержит 12 рисунков и 2 таблицы, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка литературы, включающего 100 источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Картирование границы эритроид-специфичной транскрипционной единицы в 5'-концевой области домена α -глобиновых генов кур.

В эритроблестах кур протяженная 5'-концевая область домена α -глобиновых генов транскрибируется в глобиновом направлении (Broders, 1987б, 1990). По оценкам авторов цитированных публикаций максимальный размер соответствующих транскриптов достигал 17 т.п.н. (Broders, 1990). Однако границы транскрипционной области домена не были определены. С целью получения информации по данному вопросу представлялось необходимым картировать начало транскрибирующейся области. Кроме того, представлялось интересным выяснить, существуют ли протяженные транскрипты домена α -глобиновых генов в незритроидных клетках.

Для решения этих вопросов мы воспользовались методом обратной транскрипции со специфических праймеров с последующей амплификацией тест-фрагментов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Необходимость использования специфических праймеров для обратной транскрипции определялась тем обстоятельством, что, согласно литературным данным, изучаемая область генома может транскрибироваться в обоих направлениях. Для подбора праймеров мы использовали нуклеотидную последовательность протяженного фрагмента куриной ДНК, включающего кластер α -глобиновых генов (AY016020) (Flint, 2001). Для каждой исследуемой области было выбрано несколько праймеров для обратной транскрипции, инициирующих транскрипцию с точек, находящихся на некотором расстоянии друг от друга. Это было сделано для того, чтобы снизить зависимость результата от качества индивидуального праймера.

В первой серии экспериментов были проанализированы препараты РНК, полученные из эритроидных клеток кур. Полученные результаты представлены на рисунке 1 (секции I – IV). Во всех случаях ПЦР-амплификацию тест-фрагментов проводили на трех препаратах кДНК: исходном (дорожки «а»), разведенном в 5 раз (дорожки «б») и в 25 раз (дорожки «в»). Кроме того, амплификацию тест-фрагментов проводили на препаратах геномной ДНК. Это делалось для того, чтобы сравнить эффективность различных пар праймеров и получить положительный контроль. Представленные результаты четко показывают, что тест-фрагменты I и II (смотри схему на рисунке 1) не транскрибируются в глобиновом направлении. Действительно, при использовании в качестве матрицы кДНК, синтезированной на транскрипте глобинового направления, мы не смогли амплифицировать тест-фрагменты I и II с помощью ПЦР. В то же время в параллельных экспериментах были

амплифицированы тест-фрагменты III-VI. Это свидетельствует о том, что данные фрагменты транскрибируются в глобиновом направлении. Сравнивая интенсивность фрагментов, полученных при ПЦР-амплификации кДНК, взятой в различных разведениях, можно сказать, что уровни транскрипции тест-фрагментов III-VI примерно одинаковы. В совокупности результаты, представленные на рисунке 1, показывают, что транскрипционная единица доменного уровня, охватывающая протяженную 5'-концевую область домена α -глобиновых генов кур, начинается между тест-фрагментами II и III, т.е. на расстоянии 22-24 т.п.н. перед эмбриональным глобиновым геном π . Интересно, что именно в этой области находится LCR-подобный регуляторный элемент домена α -глобиновых генов кур и заканчивается эритроид-специфичный домен предпочтительного ацетилирования гистонов, который включает всю картированную транскрибируемую область и собственно кластер глобиновых генов.

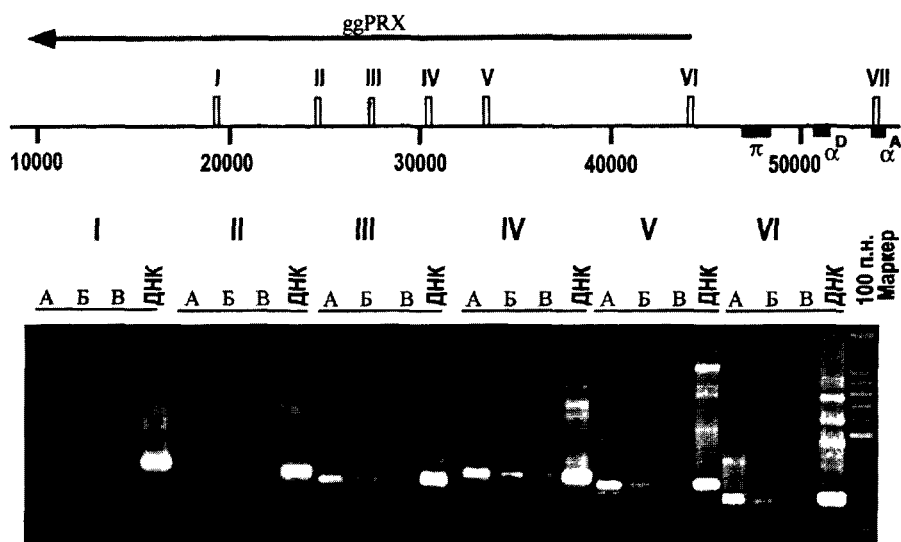


Рисунок 1. Картирование 5'-концевого участка полноразмерного транскрипта кластера α -глобиновых генов кур.

В верхней части рисунка показана схема домена. Обозначения на шкале расстояний (т.п.н.) даны в соответствии с нумерацией последовательности ДНК, депонированной в базе данных GeneBank под номером AY016020. Глобиновые гены показаны черными прямоугольниками. Тест-фрагменты I-VII показаны белыми вертикальными прямоугольниками.

Результаты ПЦР-анализа показаны под картой. На дорожки «Б», «В» наносились продукты амплификации на кДНК, разведенной в 5 и 25 раз по сравнению с количеством кДНК, использованной для ПЦР-реакции, продукты которой наносились на дорожки «А». На дорожки, обозначенные «ДНК» наносились продукты ПЦР-реакции с теми же парами праймеров на геномной ДНК.

В следующей серии экспериментов мы проверяли, транскрибируется ли 5'-концевая область домена в первичных фибробластах, где отсутствует транскрипция α -глобиновых генов. Для этого в качестве матрицы для обратной транскрипции и последующей ПЦР-амплификации тест-фрагментов IV, VI и VII использовали РНК из первичных куриных фибробластов. Для контроля в параллельных экспериментах в качестве матрицы использовали ДНК из эритробластов. Другим контролем служила амплификация тест-фрагмента IV на матрице к ДНК, синтезированной на транскрипте ggPRX-гена. Этот ген перекрывается с доменом α -глобиновых генов (включая тест-фрагмент IV) и транскрибируется во всех типах клеток в направлении, противоположном направлению транскрипции глобиновых генов. Полученные результаты представлены на рисунке 2.

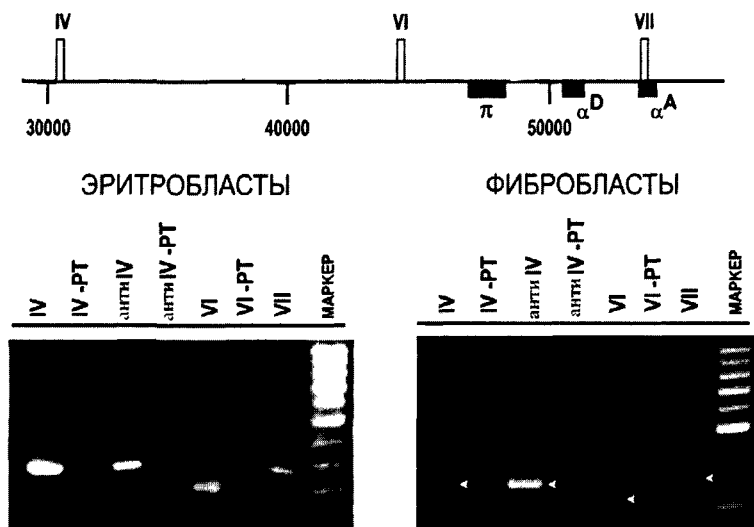


Рисунок 2. Сравнительный анализ транскрипционного статуса 5'-концевой области домена α -глобиновых генов в эритроблестах и фиброблестах.

Обозначения на карте домена такие же, как на рисунке 1. На фотографиях, демонстрирующих результаты ПЦР-амплификаций, -PT обозначает контрольные препараты, в которых ПЦР-амплификация проводилась без предварительной обратной транскрипции. «Анти IV» обозначает дорожки, в которых в качестве матрицы для обратной транскрипции использовалась кДНК, синтезированная в направлении идентичном направлению транскрипции глобиновых генов. Белыми стрелками показаны позиции ожидаемых продуктов амплификации.

Можно видеть, что в фибробластах ни один из проанализированных тест-фрагментов не транскрибируется в глобиновом направлении. Как и следовало ожидать, ген *ggPRX* одинаково интенсивно транскрибируется в эритроидных и неэритроидных клетках (дорожки «анти IV» на рис 2). Таким образом, транскрипция протяженной области домена α -глобиновых генов кур в направлении синтеза глобиновых генов характерна только для эритроидных клеток, из чего можно предположить, что эта транскрипция необходима для поддержания активного статуса хроматинового домена.

2. Анализ области транскрипции домена α -глобиновых генов кур в клетках HD3.

Для того, чтобы картировать всю область, транскрибирующуюся в глобиновом направлении в эритроидных клетках, мы провели гибридизацию по Нозерну ядерной РНК из куриных эритробластов с короткими пробамми, взятыми из разных областей домена. Для приготовления проб были использованы полученные ранее в лаборатории С.В. Разина субклонированные фрагменты домена α -глобиновых генов кур. Эти фрагменты обозначены в соответствии с их позициями на рестриктивной карте домена по рестриктазам *Hind* III и *Bam* HI (см. схему на рисунке 3). При этом *Hind* III и *Bam* HI фрагменты обозначены соответственно буквами H и B с указанием расстояния от некоей произвольно выбранной точки (конститутивного участка гиперчувствительности к ДНКазе I) в начале домена. Для удобства сравнения на рисунке 3 под рестрикционной картой расположена шкала расстояний, обозначения на которой даны в соответствии с нумерацией последовательности ДНК, депонированной в базе данных GeneBank (AY016020). Представляющие интерес фрагменты ДНК были переклонированы в вектор pSP73, который содержит промоторы для SP6 и T7 РНК-полимераз, позволяющие синтезировать РНК пробы, комплементарные разным цепям ДНК. Использование набора проб, комплементарных цепи ДНК, транскрибирующейся в глобиновом направлении, позволило картировать транскрипционную единицу, направляющую синтез полнодоменного транскрипта в эритроидных клетках.

Результаты гибридизации показаны в нижней части рисунка 3. Гибридизационные сигналы над рРНК-полосами наблюдались с пробамми к 5'-концевой области домена (B-I, H0, H4, H7), π -гену (H12), α^A -гену (B18) и к участку, расположенному на расстоянии около 1,5 тпн от гена α^A (B20). Сильный сигнал в области от 7 и 30 тпн наблюдался только в ядерной РНК и отсутствовал в цитоплазматической. Значительно более слабые полосы с меньшим молекулярным весом видны как в ядерной, так и в цитоплазматической РНК. Они скорее всего представляют собой результат неспецифической сорбции пробы на рибосомные

РНК В цитоплазматической фракции РНК полосы, соответствующие мРНК гена α^A (0,6 т.п.н.) и относительно стабильному продукту неполного процессинга этой мРНК (0,7 т.п.н.) четко видны при гибридизации с пробой В18. Присутствие глобиновой мРНК является результатом спонтанной дифференцировки 1-5% клеток HD3 в неиндуцированных культурах. Чтобы картировать нижнюю границу транскрибируемой области, мы выполнили гибридизацию с олигонуклеотидом, взятым из α^A -гена, и имеющим такую же длину и общий нуклеотидный состав как и тестируемый олигонуклеотид из фрагмента В21. Результаты этого эксперимента ясно показывают, что фрагмент В21 не транскрибируется (рис 3, вставка справа)

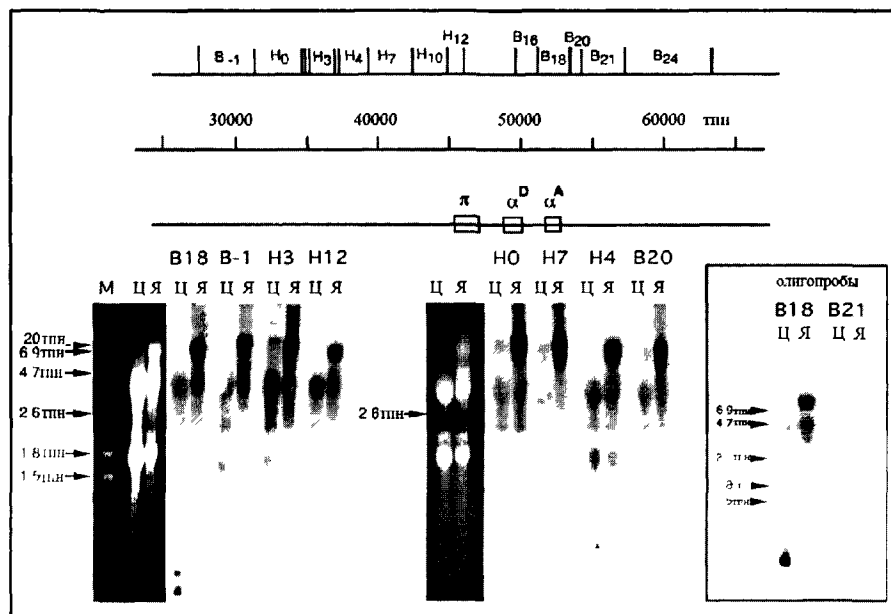


Рисунок 3. Нозерн-блот анализ транскрипционной области домена α -глобиновых генов кур в клетках HD3.

В *верхней части* рисунка представлена карта домена. Буквами В и Н обозначены позиции сайтов рестрикции BamHI и HindIII. Названия рестрикционных фрагментов, использованных для приготовления проб, показаны над шкалой расстояний. Позиции α -глобиновых генов обозначены прямоугольниками под рестрикционной картой. Результаты гибридизации показаны в *нижней части* рисунка. Каждая проба гибридизовалась с блотом с цитоплазматической РНК (обозначена буквой «Ц» в верхней части блота) и ядерной РНК (обозначена буквой «Я»). Гель, окрашенный бромистым этидием, использованный для переноса РНК на нейлоновый фильтр, показан *слева* от двух групп радиоавтографов. Вставка *справа* демонстрирует результаты гибридизации В18 и В21 — специфических олигонуклеотидных проб с фильтрами, на которые были перенесены продукты электрофоретического разделения ядерной и цитоплазматической РНК.

3. Демонстрация непрерывности полнодоменного транскрипта домена α -глобиновых генов кур.

Результаты анализа по Нозерну, описанные в предыдущем разделе, могут означать, что в клетках HD3 весь домен α -глобиновых генов (включая регуляторную 5'-концевую область) транскрибируется, давая начало протяженной ядерной РНК

До настоящего момента не было ясно, существует ли непрерывная транскрипционная единица, покрывающая всю исследуемую область, или различные субдомены транскрибируются независимо, как в домене β -глобиновых генов человека. Для того, чтобы картировать непрерывные транскрипты, мы использовали метод РТ-ПЦР. Мы подобрали несколько наборов праймеров (по 3 праймера в каждом), чтобы инициировать синтез кДНК с различных точек домена (H7, H12/ π -ген, B16/ α^P -ген, B18/ α^A -ген, B20, B21). Эти праймеры были использованы для обратной транскрипции на ядерной РНК. Для последующей амплификации продуктов обратной транскрипции были использованы два набора праймеров для ПЦР, подобранных с целью выявить возможное присутствие последовательностей кДНК, включающих фрагменты B-1 и H3.

Позитивный сигнал в реакции ПЦР-амплификации служит доказательством наличия ядерных транскриптов, охватывающих область между праймерами для обратной транскрипции и праймерами для ПЦР. Результаты ПЦР-анализа показывают, что кДНК, синтез которых иницирован на участках H7-B16, содержат последовательности из фрагментов B-1 и H3 (рисунок 4). В контрольных экспериментах при ПЦР-анализе кДНК, которая была синтезирована в противоположном направлении, начиная с участка B18, сигнал не был обнаружен ни с одним из соответствующих праймеров кДНК, синтезированная с глобиновой РНК, начиная с участка B18, содержала последовательности, присутствующие в H3, но отсутствующие в B-1. Это может отражать неспособность ревертазы синтезировать столь длинные цепи РНК. В последующих экспериментах нам удалось амплифицировать часть фрагмента H12 (π -ген), используя в качестве матрицы кДНК, синтезированную на ядерной РНК посредством B18- и B20-специфических праймеров, но не удалось выполнить этого с B21-специфическими праймерами. Эти результаты хорошо согласуются с отсутствием сигнала на Нозерн блоте с B21-специфичным нуклеотидом.

Результаты гибридизации и РТ-ПЦР показывают, что изучаемый нами транскрипт действительно является полнодоменным. Конец полнодоменной транскрипционной единицы

картируется приблизительно на границе фрагментов В20 и В21, т.е. на расстоянии около 1,5 т.п.н к 3'-концу от α^A -гена. С учетом описанных ранее результатов по картированию начала полнодоменной транскрипционной единицы, можно утверждать, что протяженность ее составляет около 30 т.п.н.

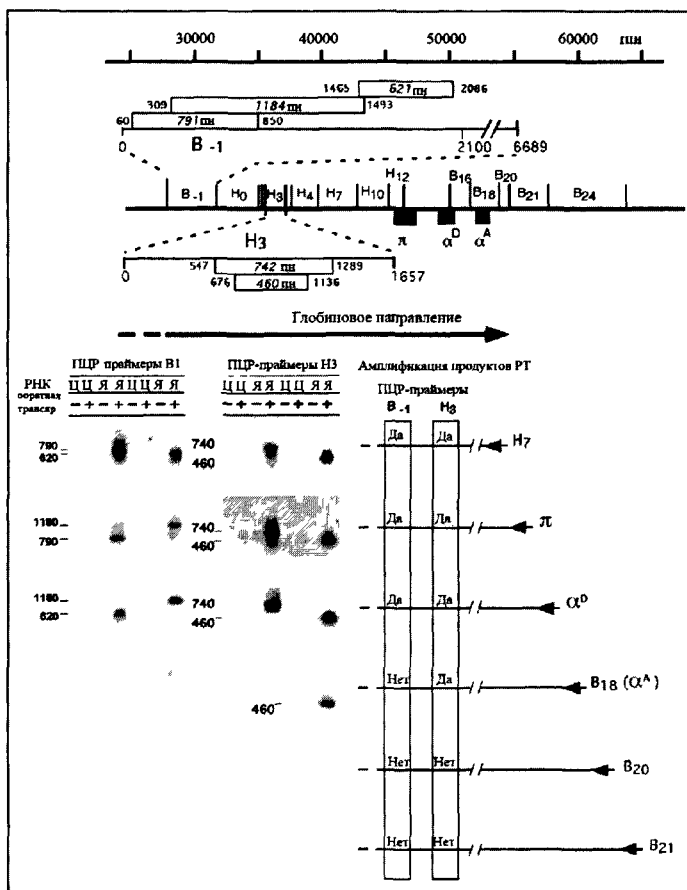


Рисунок 4 РТ-ПЦР картирование протяженной транскрипционной единицы домена α -глобиновых генов кур.

В верхней части рисунка показана карта домена с позициями праймеров, использованных для ПЦР амплификации продуктов РТ. Внизу показаны результаты РТ-ПЦР и их интерпретация. Слева представлены блоты с продуктами ПЦР-амплификации с двумя группами праймеров В1 и H3. В правой части рисунка находится схематическое изображение позиций использованных праймеров для РТ и интерпретация результатов ПЦР. Наличие или отсутствие обратной транскриптазы в реакциях обозначено (+) и (-) соответственно.

4. Одновременная транскрипция с обеих цепей ДНК в домене α -глобиновых генов кур.

В эритроидных клетках 5'-концевая протяженная область домена α -глобиновых генов кур перекрывается с геном «домашнего хозяйства» ggPRX, который транскрибируется в противоположном направлении (Sjakste, 2000) (Razin, 2004) Эти данные были получены

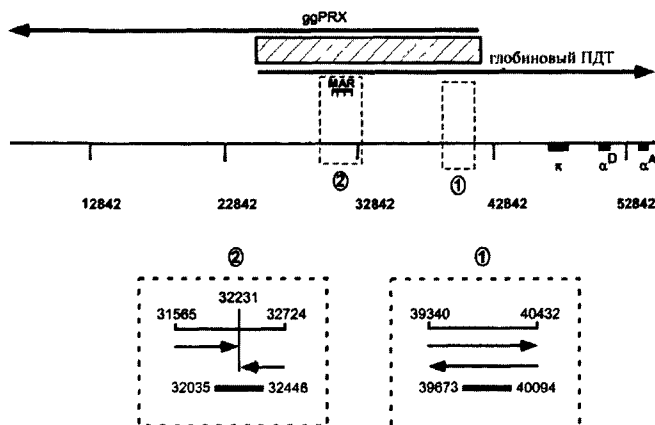


Рисунок 5. Схема изучаемой области.

Обозначения на шкале расстояний (пн) даны в соответствии с нумерацией последовательности ДНК, депонированной в базе данных GeneBank под номером AY016020. Горизонтальными стрелками в верхней части карты показано направление транскрипции гена ggPRX и полнодоменного транскрипта (ПДТ) домена α -глобиновых генов. Область перекрывания обозначена заштрихованным прямоугольником. Цифрами 1 и 2 обозначены изучаемые области. В нижней части карты горизонтальными стрелками показаны позиции гибридационных проб и толстыми линиями продукты РТ-ПЦР.

с помощью анализа по Нозерну со специфичными пробами и РТ-ПЦР амплификации нескольких тест-фрагментов со специфичными праймерами. В связи с этим возник вопрос о том, транскрибируется ли домен α -глобиновых генов кур в обоих направлениях в одной клетке синхронно и присутствуют ли эти транскрипты в ядре одновременно. Для того, чтобы прояснить этот вопрос мы использовали метод гибридизации *in situ* со специфическими РНК-пробами для комплементарных цепей ДНК. Для синтеза проб мы выбрали участок, расположенный близко к 3'-концу (в глобиновом направлении) симметрично транскрибирующейся области. Фрагмент размером около 800 пн имеет позицию 39340-40432 в последовательности ДНК, депонированной в базе данных GeneBank под номером AY0160020 (область 1 на рисунке 5). Этот фрагмент был клонирован в вектор pSP73, а затем

транскрибирован в двух направлениях с использованием Sp6 и T7 РНК-полимераз в присутствии модифицированного биотином УТФ. Эти пробы гибридизовали *in situ* с фиксированными препаратами клеток HD3. После гибридизации сигнал выявлялся с помощью каскада антител, конъюгированных с Alexa 488, флуоресцирующей зеленым цветом. На рисунке 6 видно, что обе пробы дают сильный сигнал в большинстве клеток. Из

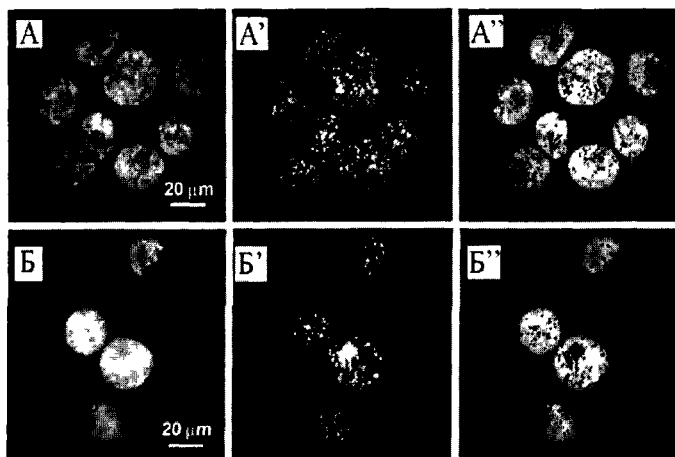


Рисунок 6. *In situ* гибридизация HD3-клеток с рибопробами, узнающими транскрипт в глобиновом направлении области 1 (А-А'') и в направлении гена ggPRX в той же области (Б-Б'').

А, Б – окрашивание ядер DAPI

А', Б' – результаты гибридизации

А'', Б'' – совмещение гибридизационного сигнала (черный) и ядер, окрашенных DAPI (светлый)

200 произвольно выбранных клеток 183 дали позитивный сигнал с пробой, узнающей транскрипт ggPRX, а 167 клеток дали позитивный сигнал с пробой, узнающей транскрипт глобинового направления. Если учесть то обстоятельство, что эффективность гибридизации *in situ* с РНК-пробами никогда не достигает 100%, то можно заключить, что во всех клетках транскрипция идет в обоих направлениях. Чтобы проверить специфичность гибридизации, мы выполнили контрольные эксперименты. В них гибридизацию проводили одновременно с меченой РНК-пробой и 10-кратным избытком немеченой. Кроме того, препараты гибридизовали с «инертной» РНК, синтезированной с плазмиды pSP73. В обоих контрольных экспериментах сигнала не наблюдалось.

Тот факт, что рибопробы, транскрибируемые с одной и той же области в противоположных направлениях, гибридизуются с большинством клеток, уже указывает на то, что в значительной части клеток транскрипция в обоих направлениях происходит одновременно, и оба транскрипта присутствуют в одной и той же клетке. Чтобы подтвердить это заключение, мы выполнили дополнительные эксперименты. Мы выбрали два соседних фрагмента размером около 700 и 500 п.н. в области с координатами 31565-32724, где также имеет место перекрывание транскриптов (область 2 на рисунке 5). Первый фрагмент был транскрибирован в направлении, противоположном транскрипции глобиновых генов и помечен биотином, а второй был транскрибирован в глобиновом направлении и помечен дигоксигенином. В данном случае мы синтезировали РНК разных направлений с разных участков во избежание гибридизации друг с другом проб, меченных биотином и дигоксигенином. Затем смесь этих фрагментов использовалась в качестве пробы для гибридизации.

Биотинилированная проба, узнающая полнодоменный глобиновый транскрипт, давала сигнал зеленого цвета, а проба, меченая дигоксигенином и узнающая транскрипт гена *ggPRX*, красного. Результаты данных экспериментов показывают, что практически все клетки содержат оба транскрипта (рис. 7 Б, В). Стоит отметить, что распределение транскриптов наблюдается в основном в ядре, за исключением одной пробы, которая содержит последовательность экзона экспрессирующегося гена (рис. 7Г).

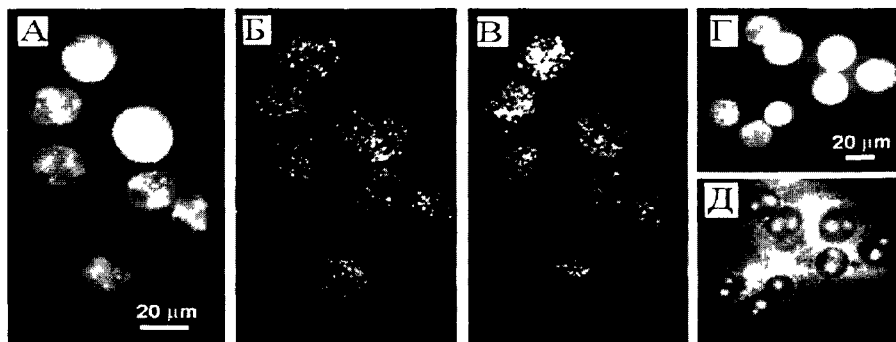


Рисунок 7. Двойное окрашивание клеток HD3, гибридизованных с рибопробами, узнающими транскрипт глобинового направления в области 2 (Б) и с рибопробами, узнающими транскрипт в направлении гена *ggPRX* (В).

А – ядра, окрашенные DAPI

Г, Д – *in situ* гибридизация клеток HD3 с пробой глобинового направления с координатами 31565-32231. Эта проба узнает экзон 4 гена *ggPRX* и таким образом окрашивает РНК, присутствующую в цитоплазме (Д). На панели Г представлена та же группа ядер, окрашенная DAPI

Для того, чтобы приблизительно оценить интенсивность транскрипции в обоих направлениях мы выполнили РТ-ПЦР анализ с использованием специфических праймеров для инициации обратной транскрипции (рис 8) Несмотря на то, что этот метод является полуколичественным, можно предположить, что количество РНК, транскрибируемой с исследуемой области в противоположных направлениях примерно одинаково

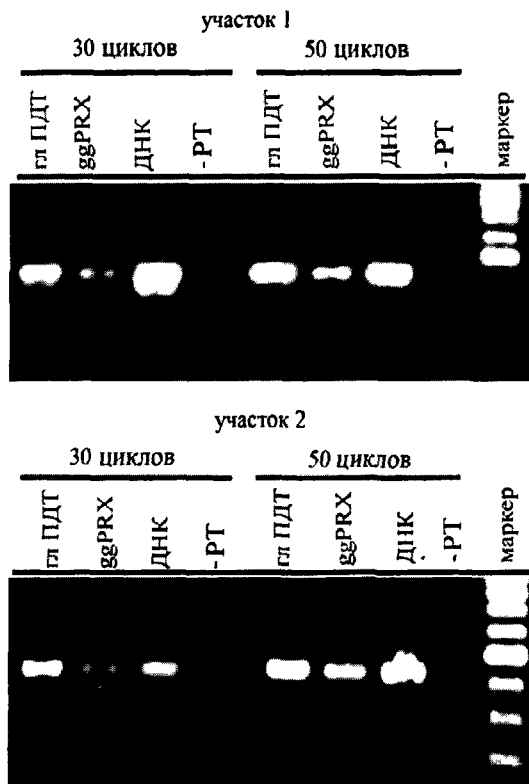


Рисунок 8. РТ-ПЦР анализ РНК, транскрибируемой в противоположных направлениях с ДНК области 1 и ДНК области 2.

«гл» - ПЦР-амплификации на продуктах РТ, полученных в направлении транскрипции глобиновых генов

«ggPRX» - ПЦР-амплификации на продуктах РТ, полученных в направлении транскрипции гена ggPRX

«ДНК» - контрольная ПЦР-амплификация с использованием геномной куриной ДНК в качестве матрицы

«-РТ» - контрольная ПЦР-амплификация на продуктах РТ, когда в реакционную смесь для РТ обратная транскриптаза не добавлялась

Также было необходимо удостовериться в том, что пробы, используемые в последнем эксперименте являются частью более протяженного перекрывающегося транскрипта. Для этого мы взяли фрагмент размером 400 п.н., перекрывающий место соединения проб и провели ПЦР-амплификацию на кДНК, синтезированной в обоих направлениях. В обоих случаях наблюдался позитивный результат (рис. 8).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты диссертационной работы в целом можно рассматривать как косвенное подтверждение гипотезы Траверса (Travers, 1999), постулирующей, что постоянная транскрипция протяженного геномного домена необходима для поддержания его активного статуса. При этом предполагается, что элонгирующая РНК полимераза II служит своеобразным транспортным средством, перемещающим вдоль домена факторы ремоделирования хроматина и комплекс ферментов, необходимых для поддержания транскрипционно активного статуса хроматина (прежде всего, гистон ацетилазы). В полном соответствии с предложенной Траверсом гипотезой мы продемонстрировали, что домен альфа-глобиновых генов кур транскрибируется в эритроидных клетках в составе полнодоменного транскрипта. Следует подчеркнуть, что этот транскрипт не является предшественником мРНК альфа-глобиновых генов, так как каждый из альфа-глобиновых генов имеет собственный промотор, с которого и начинается транскрипция этих генов на более поздних стадиях эритроидной дифференцировки (Razin & Recillas-Targa, 2000). Клетки HD3, изученные в нашей работе, являются пре-эритробласти. Они не экспрессируют глобинов на уровне белков. В этих клетках отсутствуют и процессированные транскрипты индивидуальных глобиновых генов. Они появляются лишь при индукции клеток HD3 к терминальной эритроидной дифференцировке (Beug, 1979). Возвращаясь к результатам нашей работы, следует особенно подчеркнуть то обстоятельство, что полнодоменный транскрипт домена альфа-глобиновых генов кур начинает синтезироваться в области, контролирующей транскрипционный статус домена и отстоящей от первого из генов альфа-глобинового кластера на 22 т.п.н. (Higgs et al., 1990). Это обстоятельство позволяет предположить, что основная функция удаленного регуляторного элемента домена альфа-глобиновых генов (который иногда называют также областью контроля локуса) как раз и состоит в том, что он включает в себе промоторно-энхансерный блок, обеспечивающий начало синтеза полнодоменного транскрипта в эритроидных клетках. Действительно, в этой области был картирован сильный эритроид-специфичный энхансер (Flint et al., 2001). Наше

предположение о том, что полнодоменный транскрипт домена альфа-глобиновых генов кур служит для активации этого домена в эритроидных клетках хорошо согласуется с тем, что в незэритроидных клетках такой транскрипт обнаружен не был

Наряду с характеристикой полнодоменного транскрипта важным результатом диссертационной работы является демонстрация того, что протяженная 5'-концевая область домена альфа глобиновых генов транскрибируется в противоположных направлениях в одних и тех же клетках, и соответственно в ядрах таких клеток присутствуют комплементарные цепи РНК Симметричная транскрипция является типичной для некоторых вирусов, несущих перекрывающиеся гены Подобное явление имеет место также у дрожжей (Grisanti, 1993, Aloni, 1972, 1974) Однако, у высших эукариот транскрипция в обратном направлении является одним из регуляторных механизмов, вовлеченных в процесс деградации РНК (Shibata, 2004, Alfano, 2005, Luther, 2005) И тем не менее, перекрывание генов существует в геномах позвоночных, и некоторые из них могут быть вполне функциональными (Makalowska, 2005) Наши результаты позволяют предположить, что в эукариотических клетках существует механизм, препятствующий деградации комплементарных РНК Природа этого механизма пока не ясна Одна из возможностей заключается в том, что непосредственно в ходе транскрипции комплементарных цепей ДНК новосинтезированная РНК организуется в РНП частицы, что препятствует образованию двуспиральных РНК

ВЫВОДЫ

- 1 Установлено, что в эритроидных клетках транскрибируется весь домен α -глобиновых генов, включая регуляторную 5' регуляторную-обла, в результате чего образуется протяженная ядерная РНК (полнодоменный транскрипт) Верхняя граница полнодоменной транскрипционной единицы домена α -глобиновых генов кур находится на расстоянии 22-24 тпн от эмбрионального гена π Нижняя граница полнодоменного транскрипта располагается на расстоянии 15 тпн от αA гена Длина полнодоменного транскрипта составляет около 30 тпн
- 2 Полнодоменный транскрипт домена α -глобиновых генов кур не синтезируется в фибробластах
- 3 Транскрипционная единица домена α -глобиновых кур является непрерывной
- 4 Протяженная 5'-область домена α -глобиновых генов кур транскрибируется одновременно в двух направлениях в одних и тех же клетках

Список печатных работ, опубликованных по теме диссертации.

- 1 Борунова В В , Юдинкова Е С , Разин С В Картирование границы эритроидспецифичной транскрипционной единицы в 5'-концевой области домена альфа-глобиновых генов кур Доклады Академии Наук, 2003, Т 393, №1 стр 112 - 115
- 2 Razin S, Rynditch A, Borunova V, Ioudinkova E, Smalko V, Sherrer K The 33Kb transcript of the chicken alpha-globin gene domain is part of the nuclear matrix J Cell Biochem, 2004, 92(3) 445-457
- 3 Ioudinkova E, Razin SV, Borunova V, de Conto F, Rynditch A, Scherrer K RNA-dependent nuclear matrix contains a 33 kb globin full domain transcript as well as prosomes but no 26S proteasomes J Cell Biochem, 2005, 94(3) 529-539.
- 4 Borunova V, Iarovaia O V, Vassetzky Y.S, Razin S V The upstream area of the chicken alpha-globin gene domain is transcribed in both directions in the same cells FEBS Lett, 2005, 579(21) 4746-4750
- 5 Borunova V and Youdinkova E The whole domain of chicken α -globin gene including a 20kb-long upstream area is transcribed in the globin direction in premature chicken erythroblasts Conference "Advances in molecular cell biology", Moscow, 17-18 June, 2004 5-12.
- 6 Borunova V, Razin S, Vassetzky Y Mapping transcriptional status of the chicken alpha-globin gene domain transcription in non-coding regions and complementary RNAs 18th IGB Meeting Epigenetic Bases of Genome Reprogramming, Capri, Italy, 8-11 October, 2005, p 37

Для заметок

Для заметок

Заказ № 2123 Подписано в печать 10.11.2005 Тираж 80 экз. Усл. п.л. 0,75



ООО "Цифровичок", тел (095) 797-75-76; (095) 778-22-20
www.cfr.ru ; e-mail: info@cfr.ru

№ 2 2 4 8 6

РНБ Русский фонд

2006-4

25927